

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-5462

(P2016-5462A)

(43) 公開日 平成28年1月14日 (2016.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 C	4 B O 6 5
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	4 H O 4 5
C O 7 K 14/475 (2006.01)	C O 7 K 14/475	
C O 7 K 14/65 (2006.01)	C O 7 K 14/65	
C O 7 K 14/51 (2006.01)	C O 7 K 14/51	

審査請求 有 請求項の数 37 O L 外国語出願 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-139512 (P2015-139512)	(71) 出願人	508255333
(22) 出願日	平成27年7月13日 (2015.7.13)		ヴィアサイト インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2008-556567 (P2008-556567) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ジェネラル ア トミックス コート 3 5 5 0
原出願日	平成19年2月23日 (2007.2.23)	(74) 代理人	100083806
(31) 優先権主張番号	60/776, 113		弁理士 三好 秀和
(32) 優先日	平成18年2月23日 (2006.2.23)	(74) 代理人	100095500
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 伊藤 正和
		(74) 代理人	100111235
			弁理士 原 裕子
		(72) 発明者	ロビンス、 アラン
			アメリカ合衆国 3 0 6 0 6 ジョージア 州 アセンズ コーディ ブラフ 1 0 5 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分化可能細胞の培養に有用な組成物及び方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】多能性幹細胞と、基礎塩栄養液と、E r b B 3 リガンドとを含む組成物および、それを用いた多能性幹細胞の培養方法の提供。

【解決手段】E r b B 3 リガンドはE r b B 3 受容体に結合し、これがE r b B 2 受容体と共に二量体化してE r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体を形成し得るものであり、これにより、E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体においてE r b B 2 受容体のチロシンキナーゼ活性が活性化され、前記組成物に含まれる血清は5 %未満であり、前記多能性幹細胞は増殖するが分化せず (i) 前記多能性幹細胞はヒト由来であって前記組成物はさらにインスリン様成長因子1 受容体 (I G F 1 R) の活性化因子を含むか、又は (i i) 前記多能性幹細胞はマウス由来であって前記組成物はさらに白血病抑制因子 (L I F) を含む、組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基礎塩栄養液及び E r b B 3 リガンドを含む組成物であって、実質的に無血清である、組成物。

【請求項 2】

外因性インスリン及びインスリン代用物を含まない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

インスリン様成長因子又はその機能断片をさらに含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 E r b B 3 リガンドが、ニューレグリン 1、ヘレグリン β (H R G - β)、ヘレグリン α (H R G - α)、N e u 分化因子 (N D F)、アセチルコリン受容体誘導活性 (A R I A)、グリア成長因子 2 (G G F 2)、運動ニューロン由来因子 (S M D F)、ニューレグリン 2、ニューレグリン 2 β (N R G 2 - β)、エピレギュリン、ビレギュリン及びこれらの機能断片からなる群から選択される、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 5】

前記 E r b B 3 リガンドが H R G - β 又はその機能断片である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

形質転換成長因子 β (T G F - β)、T G F - β ファミリーメンバー又はこれらの機能断片をさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記 T G F - β ファミリーメンバーが、ノーダル、アクチビン A、アクチビン B、骨形態形成タンパク質 2 (B M P 2)、骨形態形成タンパク質 4 (B M P 4)、及びこれらの機能断片からなる群から選択される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

アクチビン A を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

インスリン様成長因子又はその機能断片をさらに含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

外因性線維芽細胞成長因子を含まない、請求項 9 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

F G F - 2、F G F - 7、F G F - 10、F G F - 22 及びこれらの機能断片からなる群から選択される少なくとも 1 つの線維芽細胞成長因子 (F G F) をさらに含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの F G F が、F G F - 7、F G F - 10 及び F G F - 22 である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

血清アルブミン (S A) をさらに含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 S A がウシ S A (B S A) 又はヒト S A (H S A) である、請求項 13 に記載の組成物。

40

【請求項 15】

前記 S A の濃度が容量対容量 (v / v) で約 0 . 2 % より高い、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 S A の濃度が約 5 v / v % 未満である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

少なくとも 1 つの不溶性基質をさらに含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

50

前記少なくとも1つの不溶性基質が、コラーゲン、フィブロネクチン及びこれらの断片からなる群から選択される、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

基礎塩栄養液と、分化可能細胞におけるErbb2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段とを含む組成物。

【請求項20】

前記Erbb2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段が、前記分化可能細胞中のErbb3を特異的に結合する少なくとも1つのリガンドを含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

10

前記分化可能細胞が霊長類胚性幹細胞である、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

分化可能細胞の培養方法であって、

- a) 前記分化可能細胞を細胞培養表面にプレーティングする工程と、
- b) 前記分化可能細胞に基礎塩栄養液を与える工程と、
- c) Erbb3と特異的に結合するリガンドを与える工程と、

を含む、方法。

【請求項23】

前記分化可能細胞が霊長類胚性幹細胞である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

20

前記胚性幹細胞にインスリン及びインスリン代用物のどちらも与えない、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

インスリン様成長因子又はその機能断片を前記胚性幹細胞に与える工程をさらに含む、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

Erbb3を特異的に結合する前記リガンドが、ニューレグリン1、ヘレグリンβ(HRG-β)、ヘレグリンα(HRG-α)、Neu分化因子(NDF)、アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA)、グリア成長因子2(GGF2)、運動ニューロン由来因子(SMDF)、ニューレグリン2、ニューレグリン2β(NRG2-β)、エプレグリン、ピレグリン及びこれらの機能断片からなる群から選択される、請求項25に記載の方法。

30

【請求項27】

前記リガンドがHRG-β又はその機能断片である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記細胞に形質転換成長因子β(TGF-β)、TGF-βファミリーメンバー又はこれらの機能断片を与える工程をさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記TGF-βファミリーメンバーが、ノーダル、アクチビンA、アクチビンB、骨形態形成タンパク質2(BMP2)、骨形態形成タンパク質4(BMP4)、及びこれらの機能断片からなる群から選択される、請求項28に記載の方法。

40

【請求項30】

インスリン様成長因子又はその機能断片を前記胚性幹細胞に与える工程をさらに含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

FGF-2、FGF-7、FGF-10、FGF-22及びこれらの機能断片からなる群から選択される少なくとも1つの線維芽細胞成長因子(FGF)を前記胚性幹細胞に与える工程をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記少なくとも1つのFGFが、FGF-7、FGF-10及びFGF-22である、

50

請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

血清アルブミン (S A) を前記胚性幹細胞に与える工程をさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 S A がウシ S A (B S A) 又はヒト S A (H S A) である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 S A の濃度が容量対容量 (v / v) で約 0 . 2 % より高い、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記 S A の濃度が約 5 v / v % 未満である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

少なくとも 1 つの不溶性基質を前記胚性幹細胞に与える工程をさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記少なくとも 1 つの不溶性基質が、コラーゲン、フィブロネクチン及びこれらの断片からなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

分化可能細胞の培養方法であって、

20

a) 前記分化可能細胞を細胞培養表面にプレーティングする工程と、

b) 基礎塩栄養液を前記分化可能細胞に与える工程と、

c) 前記分化可能細胞における E r b B 2 特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段を提供する工程と、

を含む、方法。

【請求項 4 0】

前記分化可能細胞が霊長類幹細胞である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 E r b B 2 特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段を提供する工程が、E r b B 3 を特異的に結合するリガンドを提供する工程を含む、請求項 3 9 に記載の方法

30

【請求項 4 2】

分化可能細胞の培養方法であって、

a) 細胞溶解試薬を前記分化可能細胞の層に与えて前記細胞を単一細胞に分解する工程であって、前記分化可能細胞の層が消化に先立ち培養チャンバに入れられる工程と、

b) 前記単一細胞を組織培養チャンバ内に置く工程と、

c) 細胞培養液を与える工程であって、前記幹細胞培養液が基礎塩栄養液及び E r b B 3 リガンドを含む工程と、

d) 前記培養された単一細胞を、前記単一細胞の成長及び分裂が可能な条件下に置く工程と、

40

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2006年2月23日出願の米国仮特許出願第60/776,113号明細書に対する優先権を主張し、これを参照により援用する。

【0002】

連邦政府資金による研究開発に関する記載事項

本発明の開発中に実施された作業の一部は、国立衛生研究所 (N a t i o n a l I n

50

stitutes of Health) 補助金交付番号第 5 R 2 4 R R 0 2 1 3 1 3 - 0 5 号による米国政府資金を利用した。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、細胞培養方法と、実質的に無血清であり、且つ基礎塩栄養液及び E r b B 3 リガンドを含む組成物とに関する。

【背景技術】

【0004】

ヒト多能性細胞は、ヒトの発生初期の研究、並びに糖尿病及びパーキンソン病などのいくつかの疾患状態への治療介入に対し、独自の機会を提供する。例えば、ヒト胚性幹細胞 (hESC) 由来のインスリン産生 β 細胞の使用により、ドナー膵からの細胞を利用する現行の細胞療法と比べて大きな進歩がもたらされ得る。現在の糖尿病の細胞治療処置は、ドナー膵細胞を利用するもので、移植に必要な高品質の膵島細胞の不足により制約されている。1 人の I 型糖尿病患者に対する細胞治療には、約 8×10^8 個の膵島細胞の移植が必要となる (Shapiro ら、2000 年、N Engl J Med 343:230-238 頁; Shapiro ら、2001a 年、Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15:241-264 頁; Shapiro ら、2001、British Medical Journal 322:861 頁)。そのため、移植を成功させるうえで十分な膵島細胞を得るためには、少なくとも 2 人分の健常ドナー臓器が必要とされる。

【0005】

従って、胚性幹 (ES) 細胞は、多能性細胞の生物学的諸相及び初期胚内における分化の根底にある機序を研究するための強力なモデル系となると同時に、哺乳動物を遺伝子操作する機会を提供し、結果として商業的、医学的及び農業的応用をもたらす。さらには、然るべき ES 細胞の増殖及び分化を使用することで、細胞の傷害又は機能不全により生じる疾患を処置するための、移植に好適な細胞の無限の供給源を作り出せる可能性がある。国際公開第 99/53021 号パンフレットに記載されるような初期原始外胚葉様 (EPL) 細胞、インビボ又はインビトロ由来 ICM/胚盤葉上層、インビボ又はインビトロ由来原始外胚葉、始原生殖細胞 (EG 細胞)、テラトカルシノーマ細胞 (EC 細胞)、及び脱分化又は核移植により得られた多能性細胞を含む他の多能性細胞及び細胞系は、これらの特性及び適用性の一部又は全部を共通して備え得る。国際公開第 97/32033 号パンフレット及び米国特許第 5,453,357 号明細書は、げっ歯類以外の種に由来する細胞を含む多能性細胞について記載している。ヒト ES 細胞については、国際公開第 00/27995 号パンフレット及び米国特許第 6,200,806 号明細書に記載されており、ヒト EG 細胞については、国際公開第 98/43679 号パンフレットに記載されている。

【0006】

ES 細胞の多能性及び分化を調節する生化学的機序は、ほとんど解明されていない。しかしながら、入手可能な限られた実験上のデータ (及び多くの事例証拠) からは、インビトロ培養条件下での多能性 ES 細胞の継続的な維持が、細胞外環境中に存在するサイトカイン及び成長因子の存在に依存することが示唆される。

【0007】

ヒト ESC は、相当量の高品質なヒト細胞治療用分化細胞を開発するための出発物質の供給源を提供するが、これらの細胞は臨床上の安全性及び有効性を管理する想定上の規制ガイドラインに適合する条件下で入手及び/又は培養しなければならない。かかるガイドラインは、化学限定培地の使用を求めるものと思われる。かかる化学的に限定された / GMP 規格条件の開発が、ヒトの治療を目的とした hESC 及び hESC 由来細胞の使用の促進に必要とされている。

【0008】

加えて、hESC に基づく細胞補充療法を最終的に適用するには、規制ガイドラインに準拠した大規模な培養及び分化条件を可能にする方法の開発が求められるであろう。いく

10

20

30

40

50

つかのグループがhESC用の単純化した成長条件を報告しているが、これらの試験では相当な制約がある。しかしながら、これまで、多能性細胞の単離、長期にわたるクローン維持、遺伝子操作及び生殖系列伝播を成功させることは、概して困難であった。

【0009】

幹細胞向けの細胞培養条件のほとんどは、いまだ培地中に血清代替物(KSR)を含む(Xuら、2005年 Stem Cells、23:315-323頁; Xuら、2005年 Nature Methods、2:185-189頁; Beattieら、2005年 Stem Cells、23:489-495頁; Amitら、2004年 Biol. Reprod.、70:837-845頁; Jamesら、2005年 Development、132:1279-1282頁)。KSRは、高度に精製された供給源ではなく、ウシ血清アルブミン(BSA)の粗画分を含む。他の条件は短期間の試験を行ったに過ぎず、従ってそれらの条件が長期間にわたり多能性を維持可能であるかどうかは不明である(Satoら、(2004年) Nature Med.、10:55-63頁; 米国特許出願公開第2006/0030042号明細書及び同第2005/0233446号明細書)。その他の条件は、FGF2、アクチビンA、及びインスリンを含む化学限定培地で多能性の長期維持を示しているが、これらの細胞は、ヒト血清でコーティングされ、細胞のプレティング前にヒト血清が「洗い落とされた」プレート上で成長させたものである(Vallierら、2005年 J Cell Sci.、118(第19部):4495-509頁)。FGF2はこれらの培地の全てにおける成分であったが、特にFGF2を高濃度で使用する必要がある一部の配合のように(最高100ng/ml、Xuら、2005年 Nature Methods、2:185-189頁)、FGF2が絶対に必要なかどうかは不明である。

10

20

【0010】

さらに、これらのグループの全ては、その培地中に $\mu\text{g}/\text{ml}$ レベルのインスリンを含むか、又はKSRを使用したためインスリンが存在した。インスリンは一般的には、インスリン受容体との結合を介したグルコース代謝及び「細胞生存」シグナル伝達において機能すると考えられる。しかしながら、生理学的濃度を上回るレベルでは、インスリンはまた、より低効率ながらIGF1受容体とも結合でき、PI3キナーゼ/AKT経路を通じて古典的な成長因子活性を供与し得る。KSR又はこれらの他の培地条件におけるかかる高レベルのインスリン($\mu\text{g}/\text{ml}$ レベル)の存在/必要性は、主要な活性が、hESCにより発現するIGF1受容体との結合を介して誘発されることを示唆する(Spergerら、2003年 PNAS、100(23):13350-13355頁)。他の条件ではhESCにおける全てのIGF1R及び細胞内シグナル伝達経路メンバーの発現が留意されるが、これはこの経路の機能活性を示している可能性が高い(Miuraら、2004年 Aging Cell、3:333-343頁)。hESCを培養するためにこれまで開発された全ての条件が、インスリン、KSRにより供給されるインスリン、又は血清により供給されるIGF1のいずれかを含むという事実から示唆されるとおり、インスリン又はIGF1はhESCの自己複製に必要な主要シグナルを誘発し得る。この見解を支持するものとして、PI3キナーゼがhESC培養物中で阻害されると、この細胞は分化することが示されている(D'Amaourら、2005年 Nat. Biotechnol.、23(12):1534-41頁; McLeanら、2007年 Stem Cells 25:29-38頁)。

30

40

【0011】

最近の発表に、hESC用のヒト化限定培地の概要が述べられている(Ludwigら、Nature Biotechnology、オンライン刊行2006年1月1日、doi:10.1038/nbt1177)。しかしながら、この最新の配合は、FGF2、TGF β 、Licl、 γ -アミノ酪酸及びピペコリン酸を含む、hESCの増殖に影響を与えることが示唆されるいくつかの要素を含んでいる。この最新の限定細胞培養培地はまた、インスリンも含むことが注記される。

【0012】

50

E G F 成長因子ファミリーは少なくとも 14 個のメンバーを有し、E G F、T G F β 、ヘパリン結合 E G F (h b - E G F)、ニューレグリン β (ヘレグリン β (H R G - β))、グリア成長因子及びその他の呼称もある)、H R G - α 、アンフィレギュリン、ベータセルリン、及びエピレギュリンを含むが、これらに限定されない。これらの成長因子の全てが E G F ドメインを含み、一般的にはまず初めに膜貫通タンパク質として発現し、この膜貫通タンパク質がメタロプロテアーゼ (具体的には、A D A M) タンパク質によるプロセッシングを受けることで可溶性のエクトドメイン成長因子が生成される。E G F ファミリーメンバーは E r b B 1、2、3 及び 4 細胞表面受容体のホモ二量体又はヘテロ二量体のいずれとも種々の親和性で相互作用する (J o n e s ら、F E B S L e t t、1999 年、447:227-231 頁)。E G F、T G F α 及び h b E G F は E r b B 1 / 1 (E G F R) ホモ二量体及び E r b B 1 / 2 ヘテロ二量体を高親和性 (1 ~ 100 nM の範囲) で結合する一方、H R G - β は E r b B 3 及び E r b B 4 を極めて高い親和性 (1 nM 未満の範囲) で結合する。活性化した E r b B 受容体は、P I 3 キナーゼ / A K T 経路及びまた M A P K 経路も通じてシグナルを伝達する。E r b B 2 及び E r b B 3 は h E S C のなかで最も高度に発現する成長因子受容体であり (S p e r g e r ら、2003 年 P N A S、100 (23):13350-13355 頁)、H R G - β はマウス始原生殖細胞の増殖を支持することが既に示されている (T o y o d a - O h n o ら、1999 年 D e v . B i o l .、215 (2):399-406 頁)。さらに、過剰発現及びその後の E r b B 2 の不適切な活性化が、腫瘍発生と関連している (N e v e ら、2001 年 A n n . O n c o l .、12 補遺 1: S9-13 頁; Z h o u & H u n g、2003 年 S e m i n . O n c o l .、30 (5 補遺 16):38-48 頁; Y a r d e n、2001 年 O n c o l o g y、61 補遺 2:1-13 頁)。ある h E S C 中にトリソミーとして蓄積することが観察されている染色体上には、ヒト E r b B 2 (17 番染色体 q 腕)、及び E r b B 3 (12 番染色体 q 腕) が存在する (D r a p e r ら、2004 年 N a t . B i o t e c h n o l .、22 (1):53-4 頁; C o w a n ら、2004 年 N E n g l . J . M e d .、350 (13):1353-6 頁; B r i m b l e ら、2004 年 S t e m C e l l s D e v .、13 (6):585-97 頁; M a i t r a ら、2005 年 N a t . G e n e t .、37 (10):1099-103 頁; M i t a l i p o v a ら、2005 年 N a t . B i o t e c h n o l .、23 (1):19-20 頁; D r a p e r ら、2004 年 S t e m C e l l s D e v .、13 (4):325-36 頁; L u d w i g ら、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y、オンライン刊行 2006 年 1 月 1 日、doi:10.1038/nbt1177)。

【0013】

E r b B 2 及び E r b B 3 (B r o w n ら、2004 年 B i o l . R e p r o d .、71:2003-2011 頁; S a l a s - V i d a l & L o m e l i、2004 年、D e v B i o l .、265:75-89 頁) はマウス胚盤胞で発現するが、これは特に内部細胞塊 (I C M) に限定されず、並びに E r b B 1、E G F 及び T G F β はヒト胚盤胞で発現する (C h i a ら、1995 年 D e v e l o p m e n t、1221 (2):299-307 頁)。H B - E G F は、ヒト I V F 胚盤胞培養物中において増殖効果を有する (M a r t i n ら、1998 年 H u m . R e p r o d .、13 (6):1645-52 頁; S a r g e n t ら、1998 年 H u m . R e p r o d .、13 補遺 4:239-48 頁)、及び 15% 血清中で成長するマウス E S 細胞に対し中程度の追加的な効果を (H e o ら、2005 年、A m . J . P h y . C e l l P h y s i o l .、近日刊行)。移植前及び移植後早期の発生は、E r b B 2 - / -、E r b B 3 - / -、ニューレグリン 1 - / - (B r i t s c h ら、1998 年 G e n e s D e v .、12:1825-36 頁)、A D A M 17 - / - (P e s c h o n ら、1998 年 S c i e n c e、282:1281-1284 頁) 及び A D A M 19 - / - (H o r i u c h i、2005 年 D e v . B i o l .、283 (2):459-71 頁) ヌル胚において影響を受けないように思われる。従って、h E S C における E r b B 受容体ファミリーを介したシグナル伝達の重要性は、これまでのところ不明である。

【 0 0 1 4 】

ニューレグリン 1 (N R G 1) は、複数のスプライシング変異及びタンパク質プロセシング変異を呈する大型遺伝子である。これは多数のタンパク質アイソフォームを生成するが、本明細書においてこれらはまとめてニューレグリンと称される。ニューレグリンは主に、細胞表面膜貫通タンパク質として発現する。細胞外領域には、免疫グロブリン様ドメイン、炭水化物修飾領域及び E G F ドメインが含まれる。N R G 1 発現アイソフォームは既に論考されている (F a l l s 、 2 0 0 3 年 E x p . C e l l R e s . 、 2 8 4 : 1 4 - 3 0 頁) 。細胞膜メタロプロテアーゼ A D A M 1 7 及び A D A M 1 9 は、膜貫通型のニューレグリン 1 を可溶性ニューレグリン / ヘレグリンにプロセシングすることが示されている。H R G - α 及び H R G - β は、ニューレグリンの切断されたエクトドメインであり、E G F 及び他のドメインを含む。E G F ドメインは E r b B 受容体の結合及び活性化を担うことから、組換え分子はこのドメインを含むだけで、本質的にこのタンパク質の全ての可溶性成長因子作用を呈することができる (J o n e s ら、1 9 9 9 年 F E B S L e t t . 、 4 4 7 : 2 2 7 - 2 3 1 頁) 。また、ニューレグリンのプロセシングされた膜貫通型アイソフォームもあり、これは E G F ドメインの E r b B 受容体との相互作用を介することで隣接する細胞においてジャクスタクラインによるシグナル伝達を引き起こすと考えられる。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

20

培養中の多能性の維持に向けた h E S C 研究の進展における重要な開発は、臨床上の安全性及び有効性を管理する想定上の規制ガイドラインに適合する培地及び細胞培養条件の解明であろう。h E S C 用の化学限定培地を利用できるようになることが最良の結果といえるが、化学的に限定されていない成分であっても、それが G M P 規格に合わせて生産されたならば許容されるであろう。従って、治療目的で使用可能な多能性幹細胞の集団を培養し、且つ安定化させるための方法及び組成物を特定する必要がある、ここで培養組成物は、G M P 規格に合わせて限定及び / 又は生産される。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

本発明は、基礎塩栄養液及び E r b B 3 リガンドを含む組成物に関し、組成物は実質的に無血清である。

30

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、基礎塩栄養液と、分化可能細胞中の E r b B 2 特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段とを含む組成物にも関する。

【 0 0 1 8 】

本発明は分化可能細胞の培養方法に関し、本方法は、分化可能細胞を細胞培養表面にプレーティングする工程、基礎塩栄養液を分化可能細胞に与える工程、及び E r b B 3 を特異的に結合するリガンドを与える工程を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は分化可能細胞の培養方法に関し、本方法は、分化可能細胞を細胞培養表面にプレーティングする工程、及び基礎塩栄養液を分化可能細胞に与えるとともに、分化可能細胞中の E r b B 2 特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段を提供する工程を含む。

40

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、分化可能細胞の培養方法にも関し、本方法は、消化に先立ち培養チャンバ内に入れている分化可能細胞の層に消化溶液を与える工程を含み、ここで消化により細胞の層は単一細胞に分離される。消化後、単一細胞は分化可能細胞培養液を含む新しい組織培養チャンバ内に置かれ、ここで分化可能細胞培養液は基礎塩栄養液及び E r b B 3 リガンドを含む。単一分化可能細胞は培養されると、単一細胞の成長及び分裂が可能な条件下に置かれる。

50

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、限定条件下（8 ng/mlのFGF2、100 ng/mlのLR-IGF1、1 ng/mlのアクチビンA）で成長させたBG01vにおけるADAM19、ニューレグリン1、及びErbbB1～3のリアルタイムRT-PCR発現解析を表す。GAPDH及びOCT4の対照反応が示される。

【図2】図2は、AG879を使用したBG01v細胞の増殖の阻害を表す。BG01v細胞は6ウェルトレイにプレーティングされ、プレーティングの24時間後にDMSO（図2A）、50 nM～20 μMのAG1478（図2B）、または100 mM～20 μMのAG879（図2C）に対して曝露された。培養5日後、培養物は固定され、アルカリホスファターゼ活性について染色された。AG1478はこれらの濃度（20 μM）では増殖に影響を及ぼさなかったが、AG879は5 μMで細胞成長を実質的に遅延させた。

【図3】図3は、10 ng/mlのHRG-β、10 ng/mlのアクチビンA、200 ng/mlのLR-IGF1及び8 ng/mlのFGF2を含む限定培養培地であるDC-HAIFで培養された（図3Aおよび図3B）、および10 ng/mlのHRG-β、10 ng/mlのアクチビンA、及び200 ng/mlのLR-IGF1を含有する限定培養培地（DC）で培養された（図3Cおよび図3D）BG01v細胞の形態を表す。

【図4】図4は、RT-PCRによる、マウスES細胞（図4A）およびMEF（図4B）におけるADAM19、ニューレグリン1、及びErbbB1～4の発現を表す。

【図5】図5は、マウスES細胞におけるErbbB1及びErbbB2シグナル伝達の阻害を表す。2 × 10⁵個のマウスR1 ES細胞が、10% FBS、10% KSR、1000 U/mlのマウスLIF（ESGRO）添加の1:1000のMATRIGEL（商標）上にプレーティングされた。翌日、DMSO（担体対照）が新鮮培地と共に添加された。培養物は8日目に固定され、アルカリホスファターゼ活性について染色された。DMSO（図5A）および1～50 μMのAG1478（図5Bおよび図5C）は明確には増殖を阻害しなかった。AG879は50 μM（図5Dと図5Fを比較）で細胞成長を実質的に阻害し、および20 μMで増殖を遅延させた可能性がある（図5E）。

【図6】図6は、馴化培地（CM）で成長させたBG02細胞の増殖の阻害を表す。（図6A）50 μMのAG825はCMで成長させたBG02 hESCの増殖を阻害した。（図6B）AG825はhESC中のErbbB2 Y1248リン酸化を阻害する。（図6C）種々の組み合わせの成長因子におけるCyT49 hESCの連続継代のコロニー計数。（図6D）BG02細胞を使用したhESC増殖におけるIGF1及びHRGの役割に関する細胞計数分析（左）。（図6E）二回繰り返された実験のOCT4/DAPI免疫染色から、IGF1及びHRGによりOCT4⁺細胞の割合がActA/FGF2条件と比較して有意に上昇したことが実証された。（図6F）BG01 DC-HAIF hESCであって、成長因子を一晩欠乏させた培養物；欠乏させた後、DC-HAIFを伴い15分間パルスを印加した培養物；又は定常状態の培養物のRTKプロッティング解析が示される（左）。平均値及び正規化相対強度の範囲がプロットされる（右）。

【図7】図7は、種々の成長因子の組み合わせで限定条件下に成長させたマウスES細胞を表す。図7Aは、2 × 10⁵個の細胞を種々の成長因子の組み合わせで8日間成長させた後のAP⁺コロニーのスコア化を示す。図7B～図7Gは、種々の成長因子の組み合わせで成長させたAP⁺コロニーの4倍率画像を示す。

【図8】図8は、DC-HAIF培地で維持されるヒトES細胞の特徴を表す。（図8A）BG02 DC-HAIF p25細胞由来の奇形腫の分析から、潜在的な外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多能性分化能が実証された。（図8B）15% FCS/5% KSRで培養されたBG02細胞の免疫染色であり、このBG02細胞は分化している。（図8C）CM（64代の継代）又はDC-HAIF（限定培地で10代又は32代の継代）で維持されたBG02細胞において、47,296個の転写プローブを含む高密度Illumina Sentrix Human-6 Expression Beadchipを使用して検出された転写産物の分布に関するベン図である。（図8D）BG02 DC-

10

20

30

40

50

H A I F p 3 2 細胞の転写プロファイルは、C M (上)で維持されたB G 0 2 細胞のものと極めて類似しており、D C - H A I F (下)での初期及び後期の継代培養物においては実質的に変化しなかったことを実証する散布図解析である。(図 8 E) B e a d s t u d i o ソフトウェアを使用して生成された種々の集団における相対遺伝子発現の階層クラスタ分析のデンドログラムである。

【図 9】図 9 は、D C - H A I F 培地の存在下にヒト化細胞外マトリクス (E C M) 上で培養された細胞の形態を表す。(図 9 A) 成長因子低減 M A T R I G E L (商標) (1 : 2 0 0 希釈) 上で成長した C y T 4 9 細胞 (1 : 2 0 0 希釈)。C y T 4 9 細胞はまた、ヒト全血清 (図 9 B)、ヒトフィブロネクチン (図 9 C) および V I T R O G R O (商標) (図 9 D) でコーティングされた組織培養皿上においても成長可能であった。

10

【図 10】図 10 は、ヒト E S 細胞の単一細胞継代を表す。(図 10 A ~ 図 10 D) A C C U T A S E (商標) による継代及び約 5×10^5 個の細胞の 6 0 m m 培養皿へのプレーティング後の B G 0 2 細胞の段階的画像である。(図 10 A) 最初のプレーティングから 1 . 5 時間後、皿に接着した生細胞を示す。(図 10 B) プレーティング後 2 0 時間目、大多数の細胞が凝集して小さいコロニーを形成した。これらのコロニーはプレーティング後 4 日目 (図 10 C) まで増殖により拡大し、プレーティング後 5 ~ 6 日間で皿全体を覆う上皮様単層を形成する (図 10 D)。(図 10 E) 正常男性核型が、D C - H A I F で A C C U T A S E (商標) により 1 9 回継代された B G 0 2 培養物において実証された。

【図 11】図 11 は、A C C U T A S E (商標) (図 11 A)、0 . 2 5 % トリプシン / E D T A (図 11 B)、T r y p L E (図 11 C) または V e r s e n e (図 11 D) を使用したヒト E S 細胞の単一細胞継代後の細胞形態を表す。

20

【図 12】図 12 は、D C - H A I F で培養されたヒト E S 細胞の大規模増殖を表す。(図 12 A) 細胞が 10^{10} 個を超えるまで増殖した後の B G 0 2 細胞のフローサイトメトリ分析。8 5 % 超の細胞が、O C T 4、C D 9、S S E A - 4、T R A - 1 ~ 8 1 を発現した。(図 12 B) 多能性のマーカーである O C T 4、N A N O G、R E X 1、S O X 2、U T F 1、C R I P T O、F O X D 3、T E R T 及び D P P A 5 の発現の R T - P C R 分析。分化系列のマーカー、 α - フェトプロテイン (A F P)、M S X 1 及び H A N D 1 は検出されなかった。(図 12 C) ヒト染色体特異的反復配列を使用した蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) から、h C h r 1 2、1 7、X 及び Y について正常なコピー数の維持が実証された。

30

【図 13】図 13 は、H R G - β 及び I G F 1 を含む限定培地で、但し F G F 2 の不在下、7 代、すなわち 2 ヶ月超にわたり成長させた h E S C B G 0 2 細胞の形態 (図 13 A) および正常核型 (図 13 B) を表す。

【図 14】図 14 は、D C - H A I F (3 2 代の継代) 又は D C - H A I (1 0 代の継代) で維持される h E S C (B G 0 2) からの転写産物の散布図解析を表す。発現した転写産物の大部分が双方の試料から検出され、h E S C を外因性 F G F 2 の不在下で培養しても転写は実質的に変化しなかった。発現レベルが > 0 の全ての検出転写産物 (全ての点)、又は検出信頼水準が $> 0 . 9 9$ を呈する転写産物 (R^2 選択、破線の楕円により示される点) を使用して相関係数 (R^2) が求められた。傾斜線は平均値及び 2 倍差の限界を表す。

40

【図 15】図 15 は、D C - H A I F で維持された初期及び後期継代 B G 0 2 細胞の種々の集団における相対遺伝子発現の階層クラスタ分析のデンドログラムを表す。細胞は高度にクラスタ化し (約 0 . 0 0 7 5)、馴化培地 (C M) で維持された B G 0 2 及び B G 0 3 細胞 (約 0 . 0 3 7) との高い類似性を保持した。D C - H A I で維持された B G 0 2 細胞もまた、他の調査対象の h E S C 集団で高度にクラスタ化された。図 15 の説明としては、C M は馴化培地であり、D C は上記に定義されたとおりの限定培養培地 D C - H A I F であり、a p は A C C U T A S E (商標) 単一細胞継代であり、D C - H A I は F G F 2 を含まないことを除き、本明細書に定義されたとおりの D C - H A I F と同一のものである。

【図 16】図 16 は、9 6 ウェルプレートにおいて D C - H A I F で培養された B G 0 2

50

細胞の形態及びアルカリホスファターゼ (a l k a l i n e p h s o p h a t a s e) 染色を表す。図 1 6 A および B はそれぞれ、9 6 ウェルプレートの中のあるウェルで成長した B G 0 2 細胞 (10^4 細胞 / ウェル) の位相差画像 (図 1 6 A) およびアルカリホスファターゼ染色 (図 1 6 B) である。図 1 6 C および D はそれぞれ、3 8 4 ウェルプレートの中のあるウェルで成長した B G 0 2 細胞 (10^3 細胞 / ウェル) の位相差画像 (図 1 6 C) およびアルカリホスファターゼ染色 (図 1 6 D) である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

特に注記されない限り、本明細書で使用される用語は、関連技術分野の当業者による慣習的用法に従うものと理解されたい。以下に提供される用語の定義に加え、分子生物学における一般的な用語の定義はまた、Riegerら、1991年「Glossary of genetics: classical and molecular」、第5版、Berlin: Springer-Verlag; 及び「Current Protocols in Molecular Biology」、F.M. Ausubelら編、Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. との合併事業、(1998年 補遺) にも見ることができる。明細書及び特許請求の範囲において使用されるとき、単数形 (「a」又は「an」) はそれが使用される文脈に応じて1つ又は複数を意味し得ることを理解されたい。従って、例えば「細胞 (a c e l l) 」への言及は、少なくとも1個の細胞を利用できることが意味され得る。

【0023】

本明細書で使用される場合、用語「接触させる」(すなわち、細胞、例えば分化可能細胞を化合物と接触させる) は、化合物と細胞とを共にインビトロでインキュベートする (例えば、化合物を培養中の細胞に添加する) ことを含むよう意図される。用語「接触させる」は、インビボでの細胞の、ErbB3リガンド、及び場合によりTGF- β ファミリーのメンバーを含む限定細胞培地に対しての、対象者の体内において自然に起こり得る曝露 (すなわち、自然の生理学的過程の結果として起こり得る曝露) を含むように意図されるものではない。細胞を、ErbB3リガンド、及び場合によりTGF- β ファミリーのメンバーを含む限定細胞培地と接触させる工程は、任意の好適な方法で行うことができる。例えば細胞は、接着培養、又は懸濁培養で処理されてもよい。限定培地と接触させた細胞を細胞分化環境でさらに処理して、細胞を安定化させ得るか、又は細胞を分化させ得ることが理解される。

【0024】

本明細書で使用される場合、用語「分化する」は、由来元の細胞型より高度に分化した細胞型の産生を参照する。従ってこの用語は、部分的及び最終的に分化した細胞型を包含する。

【0025】

本発明の特定の実施形態において、用語「豊富な」は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%を超える所望の細胞系列を含む細胞培養物を参照する。

【0026】

本明細書で使用される場合、化合物の「有効量」という用語は、限定培地の残りの成分の存在下において培養中の分化可能細胞の安定化を、支持細胞の不在下、且つ血清又は血清代替物の不在下で1ヶ月より長い間もたらすのに十分な化合物の濃度を参照する。この濃度は、当業者により容易に決定される。

【0027】

本明細書で使用される場合、用語「発現する」は、細胞におけるポリヌクレオチドの転写又はポリペプチドの翻訳を参照し、結果として分子のレベルは、その分子を発現しない細胞中のレベルより分子を発現する細胞中で計測可能な程度に高くなる。分子の発現を計測するための方法は当業者に周知であり、ノーザンブロッティング、RT-PCR、イン

10

20

30

40

50

サイチュハイブリダイゼーション、ウエスタンブロッティング、及び免疫染色を含むが、これらに限定されない。

【0028】

細胞、細胞系、細胞培養物又は細胞集団に言及して本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、細胞、細胞系、細胞培養物、又は細胞集団がインビトロで培養可能となるように、天然の細胞源から実質的に分離されていることを参照する。加えて、用語「単離する」は、2個以上の細胞群からの1個又は複数の細胞の物理的な選択を参照するために使用され、ここで細胞は、細胞形態及び/又は様々なマーカーの発現に基づき選択される。

【0029】

本発明は、以下の好ましい本発明の実施形態の詳細な説明及び本明細書に含まれる実施例を参照することにより、さらに容易に理解され得る。しかしながら、本組成物及び方法の開示及び記載の前に、本発明は、特定の核酸、特定のポリペプチド、特定の細胞型、特定の宿主細胞、特定の条件、又は特定の方法等に限定されず、そのため、当然ながら変わり得ることが理解されるべきであり、そこでの数多くの修正例及び変形例は当業者に明らかであろう。

【0030】

クローニング、DNA単離、増幅及び精製について、またDNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどの関わる酵素反応についての標準的な技術、及び様々な分離技術は当業者に周知であり、当業者により一般的に用いられている。数多くの標準技術が、Sambrookら、1989年「Molecular Cloning」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、New York; Maniatisら、1982年「Molecular Cloning」、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、New York; Wu(編)1993年 Meth. Enzymol. 218、第I部; Wu(編)1979年 Meth. Enzymol. 68; Wuら(編)1983年 Meth. Enzymol. 100及び101; Grossman及びMoldave(編)1980年 Meth. Enzymol. 65; Miller(編)1972年「Experiments in Molecular Genetics」、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、New York; Old及びPrimrose、1981年「Principles of Gene Manipulation」、University of California Press、Berkeley; Schleif及びWensink、1982年「Practical Methods in Molecular Biology」; Glover(編)1985年「DNA Cloning」第I巻及び第II巻、IRL Press、Oxford、英国; Hames及びHiggins(編)1985年「Nucleic Acid Hybridization」、IRL Press、Oxford、英国; 及びSetlow及びHollander、1979年「Genetic Engineering: Principles and Methods」、第1~4巻、Plenum Press、New Yorkに記載されている。略称及び命名法が用いられる場合、それらはその分野で標準的と見なされ、且つ本明細書に引用されるような専門雑誌で一般的に使用されるものである。

【0031】

本発明は、基礎塩栄養液及び有効量のErbb3リガンドを含む組成物及び方法に関し、組成物は実質的に無血清である。本発明の組成物及び方法は、細胞、特に分化可能細胞の培養に有用である。分化可能細胞の培養における種々の時点で、様々な成分が細胞培養物に添加され得るため、培地は本明細書に記載されるもの以外の成分を含み得ることが理解される。しかしながら、培養物の調製中、又は分化可能細胞の培養中の少なくともある時点において、限定培地は基礎塩栄養液及びErbb2特異的チロシンキナーゼを活性化

10

20

30

40

50

させるための手段を含むことが企図される。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、用語「分化可能細胞」は、少なくとも部分的に成熟した細胞に分化できるか、又は細胞の分化に関与できる、例えば、少なくとも部分的に成熟した細胞に分化できる他の細胞と融合できる細胞又は細胞集団を記載するのに使用される。本明細書中で使用される場合、「部分的に成熟した細胞」は、同一の器官又は組織由来の成熟細胞の表現型の少なくとも1つの特徴、例えば形態又はタンパク質発現などを呈する細胞である。例えば、正常な成熟肝実質細胞は一般的には、とりわけ、アルブミン、フィブリノゲン、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン、プロトロンビン凝固因子、トランスフェリン、及びシトクロム P - 4 5 0 などの解毒酵素といったタンパク質を発現する。従って、本発明で定義される場合、「部分的に成熟した肝実質細胞」は、アルブミン又は別の1つ又は複数のタンパク質を発現し得るか、又は正常な成熟肝実質細胞の外見又は機能を取り始め得る。さらに、「部分的に成熟した膵 β 細胞」は、とりわけプロインスリンタンパク質を産生又は発現し得る。細胞は当然ながら遺伝子操作され得るが、細胞の少なくとも部分的に成熟した細胞に分化する能力が、組換え操作技術、例えばトランスフェクションなどに依存することはないといえる。

10

【 0 0 3 3 】

本発明は、分化可能細胞の供給源又は可塑性に関しない、分化可能細胞に有用な組成物及び方法を企図する。細胞の「可塑性」は本明細書では、当該技術分野において使用される場合とほぼ同様に使用される。つまり、細胞の可塑性は、胚、胎児又は発達した生物体からの組織又は器官に見られる特定の細胞型に分化する細胞の能力を指す。細胞の「可塑性がより高い」ほど、細胞が分化可能であり得る組織は多くなる。「多能性細胞」は、多能性細胞、多分化能細胞、少分化能 (oligopotent) 細胞及び単能性細胞、及び/又は胚、胎児又は発達した生物体に見られる成熟した、又は部分的に成熟した細胞型の全てではないがいくつかは分化するか、又はそれを生じさせる能力を有し得る細胞及びその子孫を含む。「多分化能細胞」は、多分化能細胞から得られる成熟した、又は部分的に成熟した細胞型が特定の組織、器官又は器官系の細胞に限定されていることを除き、多分化能前駆細胞、少分化能前駆細胞及び単能性細胞前駆細胞、及び/又は1つ又は複数の成熟した、又は部分的に成熟した細胞型に分化するか、又はそれを生じさせる能力を有し得る細胞及びその子孫を含む。例えば、多分化能の造血前駆細胞及び/又はその子孫は、1つ又は複数の型の少分化能細胞、例えば骨髓系前駆細胞及びリンパ球前駆細胞などに分化するか、又はそれを生じさせ、および通常血液中に見られる他の成熟細胞成分も生じさせる能力を有する。「少分化能細胞」は、成熟した、又は部分的に成熟した細胞に分化する能力が多分化能細胞より制限されている細胞及びその子孫を含む。しかしながら、少分化能細胞はなお、少分化能細胞及び単能性細胞、及び/又は所与の組織、器官又は器官系の1つ又は複数の成熟した、又は部分的に成熟した細胞型に分化する能力を有し得る。少分化能細胞の一例は骨髓系前駆細胞であり、これは最終的には成熟した、又は部分的に成熟した赤血球、血小板、好塩基球、好酸球、好中球及び単球を生じさせることができる。「単能性細胞」は、他の単能性細胞及び/又はある型の成熟した、又は部分的に成熟した細胞型に分化するか、又はそれを生じさせる能力を有する細胞及びその子孫を含む。

20

30

40

【 0 0 3 4 】

分化可能細胞は、本明細書で使用される場合、多能性であっても、多分化能を有しても、少分化能を有しても、又はさらには単能性であってもよい。本発明の特定の実施形態において、分化可能細胞は多能性分化可能細胞である。より具体的な実施形態において、多能性分化可能細胞は、胚性幹細胞、ICM/胚盤葉上層細胞、原始外胚葉細胞、始原生殖細胞、及びテラトカルシノーマ細胞からなる群から選択される。詳細な一実施形態において、分化可能細胞は哺乳動物胚性幹細胞である。さらに詳細な実施形態において、分化可能細胞はヒト胚性幹細胞である。

【 0 0 3 5 】

本発明はまた、動物体内の任意の供給源由来の分化可能細胞も企図するが、但し細胞は

50

本明細書に定義されるとおり分化可能であるものとする。例えば、分化可能細胞は、胚又はそのなかの任意の始生殖細胞層から、胎盤又は絨毛組織から、又は、脂肪、骨髄、神経組織、乳腺組織、肝組織、脾臓、上皮、呼吸器系、性腺及び筋組織を含む成人幹細胞などのより成熟した組織から採取されてもよいが、これらに限定されない。具体的な実施形態において、分化可能細胞は胚性幹細胞である。他の具体的な実施形態において、分化可能細胞は成人幹細胞である。さらに他の具体的な実施形態において、幹細胞は胎盤由来又は絨毛由来幹細胞である。

【0036】

当然ながら本発明は、分化可能細胞の生成能を有する任意の動物由来の分化可能細胞の使用を企図する。分化可能細胞を採取する動物は、脊椎動物又は無脊椎動物、哺乳動物又は非哺乳動物、ヒト又は非ヒトであってもよい。動物供給源の例としては、霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ及びブタを含むが、これらに限定されない。

10

【0037】

本発明の分化可能細胞は、当業者に周知の任意の方法を使用して得ることができる。例えば、ヒト多能性細胞は脱分化法及び核移植法を使用して産生できる。加えて、本発明で使用されるヒトICM/胚盤葉上層細胞又は原始外胚葉細胞はインビボ又はインビトロで得ることができる。原始外胚葉細胞は、接着培養で、又は国際公開第99/53021号パンフレットに記載されるとおり、懸濁培養で細胞凝集体として生成されてもよい。さらに、ヒト多能性細胞は、手作業での継代法、及び酵素又は非酵素継代などのバルク継代法を含む当業者に周知の任意の方法を使用して継代できる。

20

【0038】

特定の実施形態においてES細胞が利用される場合、胚性幹細胞は正常核型を有するが、他の実施形態において、胚性幹細胞は異常核型を有する。一実施形態においては、大多数の胚性幹細胞が正常核型を有する。50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%を上回る、又は95%を上回る中期の調査対象が正常核型を呈するであろうことが企図される。

【0039】

別の実施形態においては、大多数の胚性幹細胞が異常核型を有する。50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%を上回る、又は95%を上回る中期の調査対象が異常核型を呈することが企図される。特定の実施形態において、異常核型は、細胞が5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は20より多い継代数にわたり培養された後に明らかとなる。具体的な一実施形態において、異常核型は少なくとも1つの常染色体のトリソミーを含み、ここで常染色体は、1、7、8、12、14、及び17番染色体からなる群から選択される。別の実施形態において、異常核型は2つ以上の常染色体のトリソミーを含み、ここで2つ以上の常染色体のうちの少なくとも1つは、1、7、8、12、14、及び17番染色体からなる群から選択される。一実施形態において、常染色体は12番染色体又は17番染色体である。別の実施形態において、異常核型は追加的な性染色体を含む。一実施形態において、核型は2つのX染色体及び1つのY染色体を含む。また、染色体の転座が起こり得ることも企図され、かかる転座は用語「異常核型」のなかに包含される。前述の染色体異常と他の染色体異常との組み合わせもまた、本発明により包含される。

30

40

【0040】

本組成物及び方法は、基礎塩栄養液を含む。本明細書で使用される場合、基礎塩栄養液は、細胞に水及び正常な細胞代謝に必須の特定のバルク無機イオンを提供し、細胞内及び細胞外浸透平衡を維持し、炭水化物をエネルギー源として提供し、及び緩衝系を提供して培地を生理学的pHの範囲に維持する塩の混合物を参照する。基礎塩栄養液の例としては、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、最小必須培地(MEM)、イーグル基礎培地(BME)、RPM11640、ハムF-10、ハムF-12、 α -最小必須培地(α MEM)、グラスゴー最小必須培地(G-MEM)、及びイスコフ変法ダルベッコ培地、及びこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。詳細な一実施形態において、

50

基礎塩栄養液は、DMEMとハムのF12との約50：50の混合物である。

【0041】

本組成物はさらに、微量元素を含むことが企図される。微量元素は市販品として、例えばMediatechから購入できる。微量元素の非限定的な例としては、アルミニウム、塩素、硫酸塩、鉄、カドミウム、コバルト、クロム、ゲルマニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、リン酸塩及びマグネシウムを含む化合物を含むがこれらに限定されない。微量元素を含有する化合物の具体例としては、 $AlCl_3$ 、 $AgNO_3$ 、 $Ba(C_2H_3O_2)_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $CdSO_4$ 、 $CoCl_2$ 、 $CrCl_3$ 、 $Cr_2(SO_4)_3$ 、 $CuSO_4$ 、クエン酸鉄、 GeO_2 、 KI 、 KBr 、 Li 、モリブデン酸、 $MnSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、 NaF 、 Na_2SiO_3 、 $NaVO_3$ 、 NH_4VO_3 、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 、 $NiSO_4$ 、 $RbCl$ 、セレン、 Na_2SeO_3 、 H_2SeO_3 、亜セレン酸・2Na、セレノメチオノン、 $SnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $ZrOCl_2$ 、並びにこれらの混合物及び塩を含むが、これらに限定されない。セレン、亜セレン酸塩又はセレノメチオノンが存在する場合、これは約0.002～約0.02mg/Lの濃度である。加えて、ヒドロキシルアパタイトもまた存在し得る。

10

【0042】

アミノ酸が限定培地に添加され得ることが企図される。かかるアミノ酸の非限定的な例としては、グリシン、L-アラニン、L-アラニル-L-グルタミン、L-グルタミン/Glutamax、塩酸L-アルギニン、L-アスパラギン- H_2O 、L-アスパラギン酸、塩酸L-システイン- H_2O 、L-シスチン $2HCl$ 、L-グルタミン酸、塩酸L-ヒスチジン- H_2O 、L-イソロイシン、L-ロイシン、塩酸L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン二ナトリウム二水和物、及びL-バリンである。特定の実施形態において、アミノ酸は、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-バリン、及びこれらの混合物である。

20

【0043】

限定培地がアスコルビン酸を含み得ることもまた企図される。好ましくは、アスコルビン酸は初期濃度が約1mg/L～約1000mg/L、又は約2mg/L～約500mg/L、又は約5mg/L～約100mg/L、又は約10mg/L～約100mg/L又は約50mg/Lで存在する。

30

【0044】

加えて、本組成物及び方法はまた、血清アルブミン、トランスフェリン、L-グルタミン、脂質、抗生物質、 β -メルカプトエタノール、ビタミン、ミネラル、ATPなどの他の成分も含み得るとともに、類似した成分が存在し得る。存在し得るビタミンの例としてはビタミンA、 B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_5 、 B_6 、 B_7 、 B_9 、 B_{12} 、C、 D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 、 D_5 、E、トコトリエノール、 K_1 及び K_2 を含むが、これらに限定されない。当業者は、所与の培養に使用するためのミネラル、ビタミン、ATP、脂質、必須脂肪酸等の最適濃度を決定できる。補助剤の濃度は、例えば、約0.001 μM ～約1mM以上であり得る。供給され得る補助剤の濃度の具体例としては、約0.005 μM 、0.01 μM 、0.05 μM 、0.1 μM 、0.5 μM 、1.0 μM 、2.0 μM 、2.5 μM 、3.0 μM 、4.0 μM 、5.0 μM 、10 μM 、20 μM 、100 μM 等を含むが、これらに限定されない。具体的な一実施形態において、本組成物及び方法はビタミン B_6 及びグルタミンを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はビタミンC及び鉄分補助剤を含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はビタミン K_1 及びビタミンAを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はビタミン D_3 及びATPを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はビタミン B_{12} 及びトランスフェリンを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はトコトリエノール及び β -メルカプトエタノールを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法はグルタミン及びATPを含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法は ω -3脂肪酸及びグルタミンを含む。別の具体的な実施形態において

40

50

、本組成物及び方法は ω -6脂肪酸及びビタミンB₁を含む。別の具体的な実施形態において、本組成物及び方法は α -リノレン酸及びB₂を含む。

【0045】

本発明の組成物は実質的に無血清である。本明細書で使用される場合、「実質的に無血清」は、本発明の溶液中に血清がないことを指す。血清は本発明の組成物及び方法にとって必須の成分ではない。従って、任意の本組成物中の血清の存在は、例えば出発物質由来の不純物又は初代細胞培養物からの残留血清のみに起因しなければならない。例えば、本質的に無血清の培地又は環境の含有し得る血清は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1%未満であり、ここで本培地又は環境には本明細書における生理活性の維持能力の向上がなお観察される。本発明の特定の実施形態において、本質的に無血清の組成物は、血清又は血清代替物を含まないか、又は限定培地に添加される血清又は血清代替物の成分を単離することによる微量の血清又は血清代替物しか含まない。

10

【0046】

本発明の組成物及び方法はまた、分化可能細胞内のErbB2チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段も含む。具体的な一実施形態において、本発明の組成物及び方法は、少なくとも1つのErbB3リガンドの存在を含む。一般的には、ErbB3リガンドはErbB3受容体に結合し、ErbB2受容体と共に二量体化することとなる。ひいてはErbB2受容体が、分化可能細胞内の細胞内チロシンキナーゼ活性に概して関与する。

【0047】

本明細書で使用される場合、「ErbB3リガンド」は、ErbB3と結合するリガンドを指し、ひいてはこれがErbB2と二量体化し、従ってErbB2/ErbB3ヘテロ二量体受容体のErbB2部分のチロシンキナーゼ活性が活性化される。ErbB3リガンドの非限定的な例としては、ニューレグリン1、HRG- β 、HRG- α 、Neu分化因子(NDF)、アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA)、グリア成長因子2(GGF2)、並びに感覚及び運動ニューロン由来因子(SMDF)を含むがこれらに限定されないニューレグリン1のスプライス変異体及びアイソフォーム、ニューレグリン2およびNRG2- β 、エピレギュリン、及びビレギュリン(Biregulin)を含むがこれらに限定されないニューレグリン2のスプライス変異体及びアイソフォームを含む。

20

【0048】

一実施形態において、ErbB2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段は、ニューレグリン1、ヘレグリン β (HRG- β)、ヘレグリン α (HRG- α)、Neu分化因子(NDF)、アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA)、グリア成長因子2(GGF2)、運動ニューロン由来因子(SMDF)、ニューレグリン2、ニューレグリン2 β (NRG2- β)、エピレギュリン、ビレギュリン(Biregulin)及びこれらの変異体及び機能断片からなる群から選択される少なくとも1つのErbB3リガンドを含む。別の具体的な実施形態において、本発明の組成物及び方法は、2つ以上のErbB3リガンドを使用するなど、ErbB2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための2つ以上の手段を含むが、これらに限定されない。

30

【0049】

本発明の組成物及び方法のより具体的な実施形態において、ErbB3リガンドはHRG- β 又はその変異体若しくは機能断片である。一実施形態において、培養添加タンパク質、ポリペプチド又はこれらの変異体若しくは機能断片が誘導される種は、培養される細胞の種と同じである。例えば、マウスES細胞が培養される場合、アミノ酸配列がマウス(mus musculus)のHRG- β 配列と同一のHRG- β を培養中の添加剤として使用でき、このHRG- β は「同一種」と見なされる。他の実施形態において、生物学的添加剤が誘導される種は、培養される細胞と異なる。例えば、マウスES細胞が培養される場合、アミノ酸配列がヒトHRG- β 配列と同一のHRG- β を培養中の添加剤として使用でき、このHRG- β は「異種」と見なされる。

40

【0050】

本明細書で使用される場合、「機能断片」は、完全長ポリペプチドと同様の生理学的作

50

用又は細胞作用を及ぼす完全長ポリペプチドの断片又はスプライス変異体である。機能断片の生物学的作用は、同様の生理学的作用又は細胞作用が見られる限り、完全長ポリペプチドと同じ範囲又は強度である必要はない。例えば、HRG- β の機能断片は検出可能な程度にErbbB2特異的チロシンキナーゼを刺激できる。

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「変異体」は、キメラ又は融合ポリペプチド、相同体、類似体、オルソログ、及びパラログを含む。加えて、参照タンパク質又は参照ポリペプチドの変異体は、アミノ酸配列が参照タンパク質又は参照ポリペプチドと少なくとも約80%同一なタンパク質又はポリペプチドである。具体的な実施形態において、変異体は、参照タンパク質又は参照ポリペプチドと少なくとも約85%、90%、95%、95%、97%、98%、99%又はさらには100%同一である。本明細書で使用される場合、用語「～と一致する」及び「～と一致している」は、それらが配列アラインメントに関する場合、参照タンパク質又は参照ポリペプチド、例えば野生型のヒト又はマウスニューレグリン1内の列挙された位置、及び参照タンパク質又は参照ポリペプチド上の位置と整列させたときの修飾タンパク質又は修飾ポリペプチドにおけるそれらの位置を意味することが意図される。従って、対象タンパク質又は対象ポリペプチドのアミノ酸配列を参照タンパク質又は参照ポリペプチドのアミノ酸配列と整列させた場合、参照タンパク質又は参照ポリペプチド配列の特定の列挙位置「と一致する」配列は、参照配列の当該位置と整列するものではあるが、必ずしも参照配列の正確な数値上の位置にあるわけではない。配列間で一致するアミノ酸を決定するための配列の整列方法は、以下に記載される。

【0052】

例えばTGF- β をコードする参照アミノ酸配列と、少なくとも、例えば約95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、アミノ酸配列が参照TGF- β をコードする参照アミノ酸配列の100アミノ酸につき最大約5つまでの修飾を含み得ることを除き、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列と同一であることを意味するものと理解される。換言すれば、参照アミノ酸配列と少なくとも約95%同一のアミノ酸配列を有するペプチドを得るためには、参照配列のアミノ酸残基の最高約5%が欠失しているか、又は別のアミノ酸と置換されてもよく、又は参照配列中の全アミノ酸の最高約5%までの複数のアミノ酸が参照配列中に挿入されてもよい。こうした参照配列の修飾は、参照アミノ酸配列のN末端若しくはC末端位置、又はこれらの末端位置間の任意の箇所でもよく、いずれの場合も参照配列中又は参照配列内の1つ又は複数の隣接群中のアミノ酸間に個別に散在し得る。

【0053】

本明細書で使用される場合、「同一性」は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の参照ヌクレオチド又は参照アミノ酸配列と比較した同一性の尺度である。概して、配列は最高位の整合性が得られるように整列される。「同一性」それ自体は当該技術分野で認められている意味を有し、公開されている技術を使用して計算できる。(例えば、「Computational Molecular Biology」、Lesk, A.M. 編、Oxford University Press、New York (1988年); 「Biocomputing: Informatics And Genome Projects」、Smith, D.W. 編、Academic Press、New York (1993年); 「Computer Analysis of Sequence Data, Part I」、Griffin, A.M.、及びGriffin, H.G. 編、Humana Press、New Jersey (1994年); von Heinje, G.、 「Sequence Analysis In Molecular Biology」、Academic Press (1987年); 及び「Sequence Analysis Primer」、Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編、M Stockton Press、New York (1991年)を参照)。2本のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列間の同一性を計測するうえではいくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は当業者に周知である(Carillo, H.

& Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 頁 (1988年))。2本の配列間の同一性又は類似性を決定するために一般に用いられる方法としては、「Guide to Huge Computers」、Martin J. Bishop 編、Academic Press、San Diego (1994年) 及び Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 頁 (1988年) に開示されるものを含むが、これらに限定されない。コンピュータプログラムもまた、同一性及び類似性を計算する方法及びアルゴリズムを含み得る。2本の配列間の同一性及び類似性を決定するためのコンピュータプログラム方法の例としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. ら、Nucleic Acids Research 12(i):387 頁 (1984年))、BLASTP、EXPASy、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. ら、J Molec Biol 215:403 頁 (1990年)) 及び FASTDB を含むが、これらに限定されない。同一性及び類似性を決定するための方法の例は、Michaels, G. 及び Garian, R., 「Current Protocols in Protein Science」、第1巻、John Wiley & Sons, Inc. (2000年) に考察され、参照により援用される。本発明の一実施形態において、2つ以上のポリペプチド間の同一性を決定するために使用されるアルゴリズムは BLASTP である。

【0054】

本発明の別の実施形態において、2つ以上のポリペプチド間の同一性を決定するために使用されるアルゴリズムは FASTDB であり、これは Brutlag ら (Comp. App. Biosci. 6:237-245 頁 (1990年)、参照により援用) のアルゴリズムに基づく。FASTDB 配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列及び対象配列はアミノ配列である。配列アラインメントの結果は同一性パーセントで表される。アミノ酸配列の FASTDB アラインメントにおいて同一性パーセントを計算するために使用され得るパラメータとしては、マトリックス = PAM、k-tuple = 2、ミスマッチペナルティ = 1、結合ペナルティ = 20、ランダム化グループ長 = 0、カットオフスコア = 1、ギャップペナルティ = 5、ギャップサイズペナルティ = 0.05、ウィンドウサイズ = 500 か、又は対象アミノ配列長のうち、より短い方を含むがこれらに限定されない。

【0055】

内側の付加又は欠失ではなく、N末端又はC末端の付加又は欠失によって対象配列が問い合わせ配列より短い、又は長い場合、FASTDB プログラムは同一性パーセントを計算するうえで、対象配列のN末端及びC末端トランケーション又は付加を考慮しないため、手動での補正が行われてもよい。問い合わせ配列と比べ、5'又は3'末端で切断された対象配列について、同一性パーセントは、参照配列に対し整合/整列しないN末端及びC末端である問い合わせ配列の塩基数を、問い合わせ配列の全塩基の百分率として計算することにより補正される。FASTDB 配列アラインメントの結果が整合/整列を決定する。次に整列パーセンテージが、特定のパラメータを使用して上記のFASTDB プログラムにより計算された同一性パーセントから減算され、最終的な同一性パーセントスコアが算出される。この補正済みスコアはアラインメントがいかに互いに「一致する」かを、同一性パーセンテージと同時に決定するために使用できる。それぞれ参照又は対象配列のN末端又はC末端を越えて伸長する問い合わせ(対象)配列又は参照配列の残基は、同一性パーセントスコアを手動で調節するためのものと考えることができる。すなわち、比較配列のN末端又はC末端と整合/整列しない残基は、同一性パーセントスコア又はアラインメント番号付けを手動で調節するときに考慮され得る。

【0056】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列を100残基の参照配列と整列させて同一性パーセントを決定する。欠失は対象配列のN末端で起こっており、従って、FASTDB アラインメントはN末端の最初の10残基の整合/整列を示さない。10個の対をなさない残

基は配列の10%に相当し(整合しないN末端及びC末端での残基数/問い合わせ配列中の総残基数)、そのため10%が、FASTDBプログラムにより計算される同一性パーセントスコアから減算される。残りの90残基が完全に整合すれば、最終同一性パーセントは90%となる。別の例において、90残基の対象配列が100の参照配列と比較される。このとき欠失は内部欠失であるため、対象配列のN末端又はC末端に問い合わせ配列と整合/整列しない残基はない。この場合、FASTDBにより計算される同一性パーセントが手動で補正されることはない。

【0057】

本発明はまた、キメラ又は融合ポリペプチドも提供する。本明細書で使用される場合、「キメラポリペプチド」又は「融合ポリペプチド」は、第2の異なるポリペプチドと機能的に連結する参照ポリペプチドのメンバーの少なくとも一部分を含む。第2のポリペプチドは、参照ポリペプチドと実質的に同一でなく、且つ同じ又は異なる生物体由来のポリペプチドと一致するアミノ酸配列を有する。融合ポリペプチドに関して、用語「機能的に連結する」は、参照ポリペプチド及び第2のポリペプチドの双方の配列が使用される配列に属する提示機能を果たすよう互いに融合していることを示すよう意図される。第2のポリペプチドは参照ポリペプチドのN末端又はC末端と融合し得る。例えば、一実施形態において、融合ポリペプチドはGST-IGF-1融合ポリペプチドであり、ここではIGF-1配列がGST配列のC末端と融合している。かかる融合ポリペプチドは組換えポリペプチドの精製を促進し得る。別の実施形態において、融合ポリペプチドはそのN末端に異種シグナル配列を含み得る。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)において、ポリペプチドの発現及び/又は分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加し得る。

【0058】

断片及び融合ポリペプチドに加え、本発明は天然に存在するポリペプチドの相同体及び類似体を含む。「相同体」は本明細書では、類似した、又は「同一の」ヌクレオチド又はアミノ酸配列をそれぞれ有する2つの核酸又はポリペプチドと定義される。相同体としては、以下で定義されるとおりの、対立遺伝子変異体、オルソログ、パラログ、アゴニスト、及びアンタゴニストを含む。用語「相同体」はさらに、遺伝暗号の縮重に起因して参照ヌクレオチド配列と異なり、ひいては参照ヌクレオチド配列によりコードされるものと同じポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。本明細書で使用される場合、「天然に存在する」は、自然界に存在する核酸又はアミノ酸配列を参照する。

【0059】

ポリペプチドのアゴニストは、ポリペプチドの生物活性と実質的に同じもの、又はそのサブセットを保持できる。ポリペプチドのアンタゴニストは、天然に存在する型のポリペプチドの活性の1つ又は複数を阻害できる。

【0060】

本発明の組成物及び方法の別のより具体的な実施形態において、Erbb3リガンドはHRG-β又はその変異体若しくは機能断片である。Erbb3リガンドのさらなる非限定的な例が、米国特許第6,136,558号明細書、同第6,387,638号明細書、及び同第7,063,961号明細書に開示され、これらは参照により援用される。

【0061】

ヘレグリンは一般に、C末端部分が異なる2つの変異EGF様ドメインに基づき、2つの主要なタイプ、αとβとに分類される。しかしながら、これらのEGF様ドメインは、そこに含まれる6個のシステイン残基の間隔が同じである。アミノ酸配列比較に基づき、Holmesらは、EGF様ドメイン中の第1番目と第6番目のシステインの間でHRGがヘパリン結合EGF様成長因子(HB-EGF)と45%類似しており、アンフィレグリン(AR)と35%同一であり、TGF-αと32%同一であり、及びEGFと27%同一であることを明らかにした。

【0062】

44kDaのneu分化因子(NDF)は、ヒトHRGのラット等価物である。HRGポリペプチドと同様に、NDFは免疫グロブリン(Ig)相同ドメインと、それに続くE

10

20

30

40

50

G F 様ドメインを有するとともに、N 末端シグナルペプチドが欠失している。現在、E G F 様ドメインの配列に基づき α ポリペプチド又は β ポリペプチドのいずれかに分類される少なくとも 6 種の異なる線維芽細胞性促進性 N D F (p r o - N D F) がある。アイソフォーム 1 ~ 4 は、E G F 様ドメインと膜貫通ドメインとの間の可変伸長部に基づき特性決定される。このように、異なる N D F アイソフォームは選択的スプライシングにより生成され、異なる組織特異的機能を果たし得るものと思われる。参照により援用される欧州特許第 5 0 5 1 4 8 号明細書、国際公開第 9 3 / 2 2 4 2 4 号パンフレット、及び国際公開第 9 4 / 2 8 1 3 3 号パンフレットを参照されたい。

【 0 0 6 3 】

本発明の一実施形態において、本組成物及び方法は、外因性インスリン及びインスリン代用物を含まない。「外因性インスリン又はインスリン代用物」という語句は、本明細書では、本発明の組成物又は方法に意図的には添加されないインスリン又はインスリン代用物を示すために使用される。従って、本発明の特定の実施形態において、本方法及び組成物は、意図的に供給されるインスリン又はインスリン代用物を含まない。しかしながら、本組成物又は方法は必ずしも内因性インスリンを含まないとは限らない。本明細書で 사용되는場合、「内因性インスリン」は、培養細胞が本発明の方法に従い培養される場合独自にインスリンを産生している可能性があることを示す。内因性インスリンはまた、初代細胞培養物由来の残留不純物又は出発物質由来の不純物を示すためにも使用され得る。具体例として、本組成物及び方法は、5 0、4 5、4 0、3 5、3 0、2 5、2 0、1 5、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は $1 \mu g / ml$ 未満のインスリンを含む。

10

20

【 0 0 6 4 】

本明細書で 사용되는場合、用語「インスリン」は、通常の生理学的濃度においてインスリン受容体と結合するとともにインスリン受容体を通じたシグナル伝達を誘発できるタンパク質、又はその変異体若しくは断片を参照する。用語「インスリン」は、天然ヒトインスリン、又は他の哺乳動物インスリンのポリペプチド配列、又はそれらの配列に対する任意の相同体若しくは変異体を有するタンパク質を包含する。加えて、インスリンという用語は、インスリン受容体と結合してインスリン受容体を通じたシグナル伝達を誘発する能力を有するポリペプチド断片を包含する。用語「インスリン代用物」は、インスリンの代わりに使用してインスリンと実質的に同様の効果をもたらし得る任意の亜鉛含有化合物を参照する。インスリン代用物の例としては、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、及び硫酸亜鉛を含むが、これらに限定されない。

30

【 0 0 6 5 】

明確にすれば、インスリン様成長因子は、本発明において企図されるようなインスリンの代用物又は相同体ではない。従って、別の具体的な実施形態において、本発明の組成物及び方法は、少なくとも 1 種のインスリン様成長因子 (I G F) 又はその変異体若しくは機能断片の使用を含む。別の実施形態において、本発明の組成物及び方法は、いかなる外因性インスリン様成長因子 (I G F) も含まない。具体的な実施形態において、本発明の組成物及び方法は、2 0 0、1 5 0、1 0 0、7 5、5 0、2 5、2 0、1 5、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は $1 ng / ml$ 未満の I G F - 1 を含む。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書で 사용되는場合、用語「I G F - 1 R の活性化因子」は、細胞増殖、分化、及びアポトーシスの調節に中心的な役割を果たすマイトジェンを参照する。I G F - 1 R の活性化因子の作用は、一般的には I G F - 1 R を通じて媒介されるが、これは他の受容体を通じても媒介され得る。I G F - 1 R はまた、腫瘍ウイルスタンパク質及び癌遺伝子産物により誘発される細胞形質転換にも関与し、その相互作用は特異的結合タンパク質 (I G F B P) 群により調節される。加えて、大集団の I G F B P プロテアーゼが I G F B P を加水分解し、結果として結合している I G F が放出され、ひいては I G F - 1 R と相互作用するその能力が回復される。本発明の目的上、リガンド、受容体、結合タンパク質、及びプロテアーゼは、全て I G F - 1 R の活性化因子と見なされる。一実施形態において、I G F - 1 R の活性化因子は、I G F - 1、又は I G F - 2 である。さらなる実施形

50

態において、IGF-1Rの活性化因子は、IGF-1類似体である。IGF-1類似体の非限定的な例としては、LongR3-IGF1、Des(1-3)IGF-1、[Arg³]IGF-1、[Ala³¹]IGF-1、Des(2,3)[Ala³¹]IGF-1、[Leu²⁴]IGF1、Des(2,3)[Leu²⁴]IGF-1、[Leu⁶⁰]IGF-1、[Ala³¹][Leu⁶⁰]IGF-1、[Leu²⁴][Ala³¹]IGF-1、及びこれらの組み合わせを含む。さらなる実施形態において、IGF-1類似体はLongR3-IGF1であり、これはヒトインスリン成長因子1の組換え類似体である。LongR3-IGF1は当初は、約1 ng/ml～約1000 ng/ml、より好ましくは約5 ng/ml～約500 ng/ml、より好ましくは約50 ng/ml～約500 ng/ml、より好ましくは約100 ng/ml～約300 ng/mlの濃度、又は約100 ng/mlの濃度で存在することが企図される。

【0067】

特定の実施形態において、本発明の組成物及び方法は、形質転換成長因子β(TGF-β)又はTGF-βファミリーメンバー又はその変異体若しくは機能断片を含む。本明細書で使用される場合、「TGF-βファミリーのメンバー」などの用語は、既知のTGF-βファミリーメンバーとの相同性か、又は既知のTGF-βファミリーメンバーとの機能上の類似性のいずれかによって、一般に当業者によりTGF-βファミリーに属するものとして特徴付けられる成長因子を参照する。本発明の詳細な実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーが存在する場合、その変異体又は機能断片のTGF-βファミリーメンバーがSMAD2又は3を活性化する。特定の実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーは、ノードル、アクチビンA、アクチビンB、TGF-β、骨形態形成タンパク質2(BMP2)及び骨形態形成タンパク質4(BMP4)からなる群から選択される。一実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーはアクチビンAである。

【0068】

ノードルが存在する場合、ノードルは当初は、約0.1 ng/ml～約2000 ng/ml、より好ましくは約1 ng/ml～約1000 ng/ml、より好ましくは約10 ng/ml～約750 ng/ml、又はより好ましくは約25 ng/ml～約500 ng/mlの濃度で存在することが企図される。アクチビンAが使用される場合、アクチビンAは当初は、約0.01 ng/ml～約1000 ng/ml、より好ましくは約0.1 ng/ml～約100 ng/ml、より好ましくは約0.1 ng/ml～約25 ng/mlの濃度、又は最も好ましくは約10 ng/mlの濃度で存在することが企図される。TGF-βが存在する場合、TGF-βは当初は、約0.01 ng/ml～約100 ng/ml、より好ましくは約0.1 ng/ml～約50 ng/ml、又はより好ましくは約0.1 ng/ml～約20 ng/mlの濃度で存在することが企図される。

【0069】

本発明のさらなる実施形態において、本発明の組成物及び方法は、FGF受容体の活性化因子を含まない。現在、線維芽細胞成長因子のファミリーには少なくとも22個の既知のメンバーがあり、これらの因子が、4つのFGF受容体のうちの少なくとも1つに結合する。本明細書で使用される場合、用語「FGF受容体の活性化因子」は、既知のFGFファミリーメンバーとの相同性か、又は既知のFGFファミリーメンバーとの機能上の類似性のいずれかによって、一般に当業者によりFGFファミリーに属するものとして特徴付けられる成長因子を参照する。特定の実施形態において、FGF受容体の活性化因子は、α-FGF及びFGF2などのFGFであるが、これらに限定されない。詳細な実施形態において、本組成物及び方法は、外因性FGF2を含まない。語句「外因性FGF2」は、本明細書では、本発明の組成物又は方法に意図的には添加されない線維芽細胞成長因子2、すなわち塩基性FGFを示すために使用される。従って、本発明の特定の実施形態において、本方法及び組成物は意図的に供給されるFGF2を含まない。しかしながら、本組成物又は方法は必ずしも内因性FGF2を含まないとは限らない。本明細書で使用される場合、「内因性FGF2」は、培養細胞が本発明の方法に従い培養される場合FGF

2を独自に産生している可能性があることを示す。「内因性FGF2」はまた、初代細胞培養物由来の残留不純物又は出発物質由来の不純物を示すためにも使用され得る。具体例として、本組成物及び方法は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1 ng/ml未満のFGF2を含む。

【0070】

しかしながら、本発明の組成物及び方法は、FGFポリペプチド、その機能断片又はその変異体のいずれかを含む、FGF受容体の少なくとも1つの活性化因子を含み得ることが企図される。FGF2が存在する場合、FGF2は当初は、約0.1 ng/ml～約100 ng/ml、より好ましくは約0.5 ng/ml～約50 ng/ml、より好ましくは約1 ng/ml～約25 ng/ml、より好ましくは約1 ng/ml～約12 ng/mlの濃度、又は最も好ましくは約8 ng/mlの濃度で存在することが企図される。別の具体的な実施形態において、本発明の組成物及び方法は、FGF2以外のFGF受容体の少なくとも1つの活性化因子を含み得る。例えば、本発明の組成物及び方法は、FGF-7、FGF-10若しくはFGF-22のうちの少なくとも1つ又はその変異体若しくは機能断片を含んでもよい。具体的な実施形態において、FGF-7、FGF-10若しくはFGF-22のうちの少なくとも2つ、又はそれらの変異体若しくは機能断片の組み合わせが存在する。別の実施形態において、FGF-7、FGF-10及びFGF-22の3つ全て、又はそれらの変異体若しくは機能断片が存在する。FGF-7、FGF-10又はFGF-22のいずれか、又は変異体若しくは機能断片が存在する場合、各々は当初、約0.1 ng/ml～約100 ng/ml、より具体的には約0.5 ng/ml～約50 ng/ml、より具体的には約1 ng/ml～約25 ng/ml、より具体的には約1 ng/ml～約12 ng/mlの濃度、又は最も具体的には約8 ng/mlの濃度で存在することが企図される。

【0071】

さらなる特定の実施形態において、本発明の組成物及び方法は、血清アルブミン(SA)を含む。具体的な実施形態において、SAは、ウシSA(BSA)又はヒトSA(HAS)のいずれかである。さらにより具体的な実施形態において、SAの濃度は、容量対容量(v/v)で約0.2%より高いが、約10 v/v%未満である。さらにより具体的な実施形態において、SAの濃度は、約0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%、3.8%、4.0%、4.2%、4.4%、4.6%、4.8%、5.0%、5.2%、5.4%、5.6%、5.8%、6.0%、6.2%、6.4%、6.6%、6.8%、7.0%、7.2%、7.4%、7.6%、7.8%、8.0%、8.2%、8.4%、8.6%、8.8%、9.0%、9.2%、9.4%、9.6%及び9.8%(v/v)より高い。

【0072】

さらなる実施形態において、本組成物及び方法は、少なくとも1種の不溶性基質を含む。例えば、分化可能細胞は、ポリスチレン、ポリプロピレンなどの化合物を含む細胞培養表面上に置かれてもよいが、これらに限定されない。次に表面は、不溶性基質でコーティングされてもよい。具体的な実施形態において、不溶性基質は、コラーゲン、フィブロネクチン及びそれらの断片又は変異体からなる群から選択される。不溶性基質の他の例としては、フィブリン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン及びナイドジェンを含むが、これらに限定されない。

【0073】

従って、本発明の細胞培養環境及び方法は、細胞を接着培養でプレーティングする工程を含む。本明細書で使用される場合、用語「プレーティングされた」及び「プレーティングする」は、細胞を接着培養で成長可能にする任意の過程を参照する。本明細書で使用される場合、用語「接着培養」の参照する細胞培養系とは、固体表面上で細胞が培養されるもので、この固体表面は次に不溶性基質でコーティングされ得、これが次に以下に列挙さ

れるものなどの別の基質表面コート、又は培養中に細胞を増殖させるか、若しくは安定化させる任意の他の化学的又は生物学的材料でコーティングされ得る。細胞は固体表面又は基質に緊密に接着しても、又はしなくてもよい。接着培養用基質は、ポリオルニチン、ラミニン、ポリリジン、精製コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、テネイシン、ビトロネクチン、エンタクチン、硫酸ヘパリンプロテオグリカン、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ乳酸 (PLA)、及びポリ乳酸-グリコール酸 (PLGA) のいずれか1つ又はこれらの組み合わせを含んでもよい。さらに、接着培養用基質は、支持細胞層により固着する、又は多能性ヒト細胞又は細胞培養物により固着するマトリックスを含んでもよい。本明細書で使用される場合、用語「細胞外マトリックス」は、上記のもの、並びに支持細胞層又は多能性ヒト細胞又は細胞培養物により固着するマトリックスなどの固体基質を包含するが、これらに限定されない。一実施形態において、細胞は MATRIGEL (商標) でコーティングされたプレート上にプレーティングされる。別の実施形態において、細胞はフィブロネクチンでコーティングされたプレート上にプレーティングされる。特定の実施形態において、細胞がフィブロネクチン上にプレーティングされる場合、プレートは、2~3時間にわたり室温で、組織級の水で希釈された $10 \mu\text{g/ml}$ のヒト血漿フィブロネクチン (Invitrogen、#33016-015) でコーティングすることにより調製される。別の実施形態において、血清が最長24時間まで培地に置かれてもよく、それにより細胞をプラスチックにプレーティングすることが可能となる。血清を使用して細胞の付着を促進する場合、培地は除去され、本質的に無血清の組成物がプレーティングされた細胞に添加される。

10

20

30

40

50

【0074】

本発明の組成物及び方法は、分化可能細胞が本質的に支持細胞又は支持細胞層を含まない条件下で培養されることを企図する。本明細書で使用される場合、「支持細胞」は、インビトロで成長し、標的細胞と共培養されると標的細胞をその現在の分化状態で安定化させる細胞である。本明細書で使用される場合、「支持細胞層」は用語「支持細胞」と同義的に使用できる。本明細書で使用される場合、用語「本質的に支持細胞を含まない」は、支持細胞を含有しないか、又は最小限の (de minimus) 数の支持細胞しか含まない組織培養条件を参照する。「最小限の」とは、分化可能細胞が支持細胞上で培養された前の培養条件からその時の培養条件に持ち越される支持細胞の数を意味する。上記方法の一実施形態において、標的細胞をその現在の分化状態で安定化させる支持細胞から、馴化培地が得られる。別の実施形態において、限定培地は非馴化培地であり、これは支持細胞からは得られない培地である。

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「安定化させる」は、細胞又は細胞の培養物の分化状態に言及して使用される場合、細胞は培養下で複数の代にわたり、及び好ましくは培養下で無限に増殖し続けるであろうが、ここで培養物中の全てではないがほとんどの細胞が同一の分化状態であることを示す。加えて、安定化させた細胞が分裂する場合、分裂は一般的には、同じ細胞型の細胞をもたらすか、又は同じ分化状態の細胞をもたらす。安定化させた細胞又は細胞集団は一般に、細胞培養条件が変化せず、且つ細胞が継代され続けても成長し過ぎることがなければ、それ以上分化又は脱分化しない。一実施形態において、安定化させた細胞は、無限に、又は少なくとも2代より長く安定状態で増殖することが可能である。より具体的な実施形態において、細胞は、3代、4代、5代、6代、7代、8代、9代より長く、10代より長く、15代より長く、20代より長く、25代より長く、又は30代より長く安定している。一実施形態において、細胞は、約1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、又は11ヶ月より長い連続継代の間、安定している。別の実施形態において、細胞は、約1年より長い連続継代の間、安定している。一実施形態において、幹細胞は限定培地における定期的な継代により、幹細胞の分化が所望されるまで、培養下に多能性状態で維持される。本明細書で使用される場合、用語「増殖する」は、細胞培養物中の細胞数の増加を指す。

【0076】

特定の実施形態において、本組成物及び方法は、BMPシグナル伝達の不活性化因子を含む。本明細書で使用される場合、「BMPシグナル伝達の不活性化因子」は、1つ又は複数のBMPタンパク質の、又はその上流若しくは下流のシグナル伝達成分のいずれかの、その可能なシグナル伝達経路のいずれかを介した活性を拮抗する作用剤を参照する。BMPシグナル伝達を不活性化させるために使用される化合物は、当該技術分野において周知の、又はこれ以降発見される任意の化合物であり得る。BMPシグナル伝達の不活性化因子の非限定的な例としては、ドミナントネガティブな切断されたBMP受容体、可溶性BMP受容体、BMP受容体-Fcキメラ、ノギン、フォリスタチン、コーディン、グレムリン、ケルベロス/DANファミリータンパク質、ベントロピン(ventropin)、高用量アクチビン、及びアムニオンレス(amnionless)を含む。

10

【0077】

特定の実施形態において、本組成物及び方法は、少なくとも1つのホルモン、サイトカイン、アディポカイン、成長ホルモン又はこれらの変異体若しくは機能断片を含み得る。現在のところ特定の実施形態において、限定培地中に存在する成長ホルモンは、限定培地で培養される分化可能細胞と同一種であろうことが企図される。従って、例えばヒト細胞が培養される場合、成長ホルモンはヒト成長ホルモンである。培養細胞と異なる種由来の成長ホルモンの使用もまた企図される。好ましくはホルモン、サイトカイン、アディポカイン及び/又は成長ホルモンは、約0.001ng/ml~約1000ng/ml、より好ましくは約0.001ng/ml~約250ng/ml、又はより好ましくは約0.01ng/ml~約150ng/mlの初期濃度で存在する。

20

【0078】

本発明の組成物及び方法に含まれ得るサイトカイン及びアディポカインの例としては、サイトカインの4つの α ヘリックス束ファミリー、サイトカインのインターロイキン1(IL-1)ファミリー、サイトカインのIL-17ファミリー及びサイトカインのケモカインファミリーを含むが、これらに限定されない。当然ながら、本発明は、これらのサイトカインファミリーの各々のメンバー及びサブクラス、例えばCCケモカイン、CXCKケモカイン、Cケモカイン及びCX₃Cケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホトキシン、c-キットリガンド、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、単球マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、レプチン、アディポネクチン、レジスチン、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子1(PAI-1)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、腫瘍壊死因子 β (TNF β)、白血病抑制因子、ビスファチン、レチノール結合タンパク質4(RBP4)、エリスロポエチン(EPO)、トロンプオエチン(THPO)などを企図するが、これらに限定されない。当然ながら当業者は、本発明が上に列挙した因子の変異体又は機能断片を企図することを理解するであろう。

30

【0079】

本発明は分化可能細胞の培養方法に関し、本方法は、分化可能細胞を細胞培養表面にプレーティングする工程、基礎塩栄養液を細胞に与える工程、及び細胞中のErbb2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段を提供する工程を含む。

【0080】

一実施形態において、分化可能細胞は、本発明の組成物の少なくとも1つと、血清又は血清代替物の不在下、且つ支持細胞層の不在下で、細胞が少なくとも1ヶ月間未分化状態で維持されるように接触させる。多能性は、表面マーカー、転写マーカー、核型、及び3つの胚葉の細胞への分化能に関する細胞の特性決定を通じて決定できる。これらの特性は当業者に周知である。

40

【0081】

分化可能細胞は、本発明の限定培地との接触前及び/又は接触後に、酵素的に、非酵素的に、又は手作業で解離する方法を使用して継代できることが企図される。酵素的解離方法の非限定的な例としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、及びACCU TASE(商標)などのプロテアーゼの使用を含む。一実施形態においては、ACCU TASE

50

SE（商標）を使用して、接触させた細胞が継代される。酵素的継代方法が使用される場合、得られる培養物は、使用される酵素に応じてサイズの変わる、一重、二重、三重、及び塊の細胞の混合物を含み得る。非酵素的解離方法の非限定的な例は、細胞分散緩衝液である。手作業での継代技術は、Schulzら、2004年、Stem Cells、22（7）：1218-38頁など、当該技術分野において十分な記載がある。継代方法の選択は細胞外マトリックスの選択に影響を受け、当業者によって容易に決定される。

【0082】

具体的な一実施形態において、分化可能細胞の培養方法は、解離に先立ち培養チャンバ内に入れられている幹細胞の層に解離溶液を与える工程を含み、ここで解離により細胞の層は単一細胞に分解される。解離後、単一細胞は幹細胞培養液を伴う新しい組織培養チャンバ内に置かれ、ここで幹細胞培養液は基礎塩栄養液及びErbb3リガンドを含む。単一幹細胞は培養されると、単一細胞の成長及び分裂が可能な条件下に置かれる。

10

【0083】

本発明の方法で使用される分離溶液は、細胞に対し広範な毒性を引き起こすことなく細胞を単一細胞に分解又は脱凝集させることが可能な任意の分離溶液であり得る。分離溶液の例としては、トリプシン、ACCUTASE（商標）、0.25%トリプシン/EDTA、TrypLE、又はVERSENE（商標）（EDTA）及びトリプシンを含むが、これらに限定されない。本発明の方法は、少なくともいくつかの単一細胞が脱凝集され、且つ再培養可能であるならば、コンフルエント層のあらゆる細胞が単一細胞に脱凝集される結果となる必要はない。

20

【0084】

分化可能細胞を利用して、その可塑性又は他の特性に影響を及ぼす分子又は因子をスクリーニングしてもよい。例えば、分化可能細胞を使用して、アポトーシス、分化又は増殖、並びに分化可能細胞から生じた分化系列における類似の作用を誘発する作用因子を同定できるであろう。

【0085】

本発明の組成物及び方法は単一細胞継代を可能にするため、96ウェルプレート及び384ウェルプレートなどの限定されないハイスループット設定での分化可能細胞の培養が成功している。図16は、本明細書に記載される方法を使用して、96ウェル及び384ウェルプレートの双方においてDC-HAIFで培養されたBG02細胞の形態及びアルカリホスファターゼ染色を示す。簡潔には、ACCUTASE（商標）を使用して分離されたうえ、96ウェル及び384ウェルプレートにプレーティングされ、そこで培養されたhESC細胞が、他の培養皿を使用して観察されたものと同様のプレーティング効率を示した。加えて、細胞はコロニーを形成し、5日間にわたり同様の環境において増殖に成功した。これらのより小さい培養物は形態的に未分化のままであり、未分化細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼが陽性として一様に染色された。さらには、hESCはまた、ACEA Biosciences, Inc. (www.aceabio.com)からのRT-CES（商標）方法を使用して細胞増殖及び生存率を計測するために使用できる、インピーダンスのリアルタイム計測を提供する96ウェル培養装置（図示せず）で成長させることもできた。かかる手法により、分化可能細胞に対する僅かな、又は即時的な作用の無標識同定及び定量化、並びに増殖、アポトーシス及び形態変化の計測が、リアルタイムで可能となり得る。

30

40

【0086】

本発明の組成物及び方法は実質的に、本組成物及び方法が基礎塩栄養液及びErbb2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激するための手段を含むのであれば、上記の、又は本明細書の他所に記載される要素の任意の組み合わせを含み得る。当業者は認識するであろうとおり、本発明の組成物及び方法の要素はプロトコル設計に応じて変わり得る。従って、本発明の一実施形態は、分化可能細胞の96ウェルプレート及び/又は384ウェルプレート中での培養に関する。実際に、本発明の方法及び組成物を使用すれば、細胞培養チャンバ、すなわち培養皿はもはや特定の寸法に限定されない。従って、本発明の方法は、特

50

定の培養チャンバ寸法に限定されない。

【0087】

本明細書に記載される組成物及び方法は、いくつかの有用な特徴を有する。例えば、本明細書に記載される組成物及び方法は、ヒト発生の初期をモデル化するうえで有用である。さらには、本明細書に記載される組成物及び方法はまた、純粋な組織又は細胞型の作成によるなどして、神経変性障害、糖尿病又は腎不全などの疾患状態への治療的介入にも役立ち得る。

【0088】

分化可能細胞から分化する細胞型は、創薬、薬剤開発及び試験、毒物学、治療目的での細胞産生、並びに基礎科学研究を含むがこれらに限定されない、様々な分野の研究開発においていくつかの使用法がある。これらの細胞型は、広範な研究分野の関心を引く分子を発現する。これらには、標準的な参考文献に記載されるような様々な細胞型の機能を必要とすることが知られる分子が含まれる。これらの分子としては、サイトカイン、成長因子、サイトカイン受容体、細胞外マトリクス、転写因子、分泌ポリペプチド及び他の分子、及び成長因子受容体を含むが、これらに限定されない。

【0089】

本発明の分化可能細胞は細胞分化環境との接触を通じて分化し得ることが企図される。本明細書で使用される場合、用語「細胞分化環境」は、分化可能細胞が分化するよう誘発されるか、又は分化細胞に富むヒト細胞培養物となるよう誘発される細胞培養条件を参照する。好ましくは、成長因子により誘発される分化細胞系列は本質的に均一であり得る。用語「均一な」は、所望の細胞系列を約50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%より多く含む集団を参照する。

【0090】

細胞分化培地又は環境を利用して、本発明の分化可能細胞を部分的に、最終的に、又は可逆的に分化させてもよい。本発明に従えば、細胞分化環境の培地は、例えば、KODMEM培地（ノックアウトダルベッコ変法イーグル培地）、DMEM、ハムF12培地、FBS（ウシ胎仔血清）、FGF2（線維芽細胞成長因子2）、KSR又はhLIF（ヒト白血病抑制因子）を含む、様々な成分を含み得る。細胞分化環境はまた、L-グルタミン、NEAA（非必須アミノ酸）、P/S（ペニシリン/ストレプトマイシン）、N2、B27及びβ-メルカプトエタノール（β-ME）などの補助剤も含み得る。限定はされないが、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパリン、硫酸ヘパリン、レチノイン酸、表皮成長因子ファミリー（EGF）のメンバー、FGF2及び/又はFGF8を含む線維芽細胞成長因子ファミリー（FGF）のメンバー、血小板由来成長因子ファミリー（PDGF）のメンバー、限定はされないが、ノギン、フォリスタチン、コーディン、グレムリン、ケルベロス/DANファミリータンパク質、ベントロピン（ventropin）、高用量アクチビン、及びアムニオンレス（amniolless）などを含む形質転換成長因子（TGF）/骨形成タンパク質（BMP）/成長及び分化因子（GDF）の因子ファミリーアンタゴニスト、又はこれらの変異体若しくは機能断片を含むさらなる要素が細胞分化環境に添加され得ることが企図される。TGF/BMP/GDFアンタゴニストはまた、TGF/BMP/GDF受容体-Fcキメラの形態で添加されることもあり得る。添加され得る他の要素としては、限定はされないが、Delta様及びJaggedファミリーのタンパク質並びにNotchプロセッシング又は切断の阻害因子、又はそれらの変異体若しくは機能断片を含む、Notch受容体ファミリーを通じたシグナル伝達を活性化又は不活性化させ得る分子を含む。他の成長因子としては、インスリン様成長因子ファミリー（IGF）のメンバー、インスリン、ウィングレス関連（WNT）因子ファミリー、及びヘッジホッグ因子ファミリー又はそれらの変異体若しくは機能断片を含むことができる。さらなる要素を添加して、中内胚葉幹/前駆体、内胚葉幹/前駆体、中胚葉幹/前駆体、又は最終的な内胚葉幹/前駆体の増殖及び生存並びにこれらの前駆体の誘導体の生存及び分化を促進してもよい。

10

20

30

40

50

【0091】

本明細書に記載される組成物は、試験化合物が、分化可能細胞の多能性、増殖、及び／または分化を調節するかどうかを判定するための試験化合物のスクリーニングに有用である。分化可能細胞の多能性、増殖及び／又は分化は、当業者により容易に確認され得る。非限定的な方法としては、細胞形態の調査、様々なマーカーの発現、奇形腫形成、細胞計数及びインピーダンス計測を含む。

【0092】

分化細胞の所望の細胞系列への発達、又はその未分化状態での維持は、所望の細胞系列の特徴を示すマーカー遺伝子の発現並びに分化可能細胞型の特徴を示すマーカー遺伝子の発現の不足を定量化することによりモニタできる。かかるマーカー遺伝子の遺伝子発現を定量化する一方法は、定量的PCR(Q-PCR)を介したものである。Q-PCRの実施方法は、当該技術分野において周知である。当該技術分野において周知の他の方法を使用しても、マーカー遺伝子発現を定量化できる。マーカー遺伝子発現は、対象となるマーカー遺伝子に特異的な抗体を使用することにより検出できる。

10

【0093】

特定の実施形態において、スクリーニング方法は、分化可能細胞の多能性、増殖及び／又は分化の調節能を有する化合物の同定方法を包含し、(a)分化可能細胞を提供する工程、(b)細胞を基礎塩栄養液及びErbb3リガンドを含む組成物中で培養する工程であって、組成物が本質的に無血清である工程、(c)細胞を試験化合物と接触させるとともに、多能性、増殖及び／又は分化の増加又は減少が、化合物と接触させた細胞に生じているかどうかを判定する工程であって、前記増加が、化合物が多能性、増殖及び／又は分化を調節することの指標となる工程とを含む。特定の実施形態において、Erbb3リガンドはHRG-βである。他の実施形態において、Erbb3リガンドを試験化合物に置換することで、試験化合物の効果を判定できる。例えば、試験化合物で生じる多能性、増殖及び／又は分化の効果を、Erbb3リガンドで生じる多能性、増殖及び／又は分化の効果と比較して、試験化合物の分化可能細胞に対する効果を判定できる。本明細書に記載される任意の組成物を本発明のスクリーニング方法に使用し得ることが企図される。

20

【0094】

さらに別の実施形態において、細胞をErbb3リガンド(Erbb2特異的チロシンキナーゼ活性)の不在下で培養することにより、細胞に対するErbb3リガンド(Erbb2特異的チロシンキナーゼ活性)の不在の効果を判定できる。

30

【0095】

本明細書に記載される方法を使用して、実質的に他の細胞型を含まない所望の細胞系列を含む組成物を生成できる。あるいは、分化可能細胞と所望の細胞系列との混合物を含む組成物もまた生成できる。

【0096】

本発明のある実施形態において、所望の細胞系列の細胞は、かかる細胞に特異的な親和性タグを使用することにより単離できる。標的細胞に特異的な親和性タグの一例は、標的細胞の細胞表面上に存在するが、本明細書に記載される方法により生成された細胞培養中に存在するであろう他の細胞型には実質的に存在しないマーカーポリペプチドに特異的な抗体である。

40

【0097】

本発明はまたキットにも関し、ここでキットは、基礎塩栄養液及びErbb2特異的チロシンキナーゼ活性を刺激する能力を有する少なくとも1つの化合物を含む。一実施形態において、キットは、本明細書に記載されるとおりの、少なくとも1つのErbb3リガンドを含む。別の実施形態において、キットは、2つ以上のErbb3リガンドを含む。別の実施形態において、キットは、本明細書に記載されるとおりのTGF-β又はTGF-βファミリーメンバーの少なくとも1つ又はそれらの変異体若しくは機能断片を含む。さらに別の実施形態において、キットは、TGF-β又はTGF-βファミリーメンバーの2つ以上又はそれらの変異体若しくは機能断片を含む。なお別の実施形態において、キ

50

ットは、少なくとも1つの線維芽細胞成長因子又はその変異体若しくは機能断片を含む。別の実施形態において、キットは、2つ以上の線維芽細胞成長因子又はその変異体若しくは機能断片を含む。特定の実施形態において、キットは、FGF-7、FGF-10、FGF-22又はそれらの変異体若しくは機能断片のうちの少なくとも1つを含む。別の実施形態において、キットは、血清アルブミンを含む。なお別の実施形態において、キットは、血清及び/又は本明細書に記載されるとおりの少なくとも1つの不溶性基質及び/又は少なくとも1つの分離溶液を含む。

【0098】

本発明のキットは実質的に、上記の、又は本明細書の他所に記載される成分の任意の組み合わせを含み得る。当業者は認識するであろうとおり、本発明のキットで供給される成分は、キットの使用目的に応じて変わり得る。従って、キットは本出願に記載される様々な機能を果たすよう設計されてもよく、それに応じてかかるキットの成分は変わり得る。

【0099】

本出願の全体を通じて様々な刊行物が参照される。これらの刊行物及びそれらの刊行物のなかで全体として引用される参考文献の全ての開示は、本明細書によって全体として参照により本出願に援用され、それにより本発明の関わる技術分野の水準がより十全に説明される。

【実施例】

【0100】

ヒト胚性幹細胞系BG01v (BresaGen, Inc., Athens, GA) が、本明細書に記載される実験のいくつかで使用された。BG01v hESC系は核型上、変異細胞系であり、特有のトリソミーを含む安定な核型(核型: 49, XXY, +12, +17)を呈する。親培養物が前述のとおり維持された(Schulzら、2003年、BMC Neurosci., 4: 27頁; Schulzら、2004年、Stem Cells, 22(7): 1218-38頁; Roslerら、2004年、Dev. Dynamics, 229: 259-274頁; Brimbleら、2004年 Stem Cells Dev., 13: 585-596頁)。簡潔には、細胞は、MATRIGEL (商標)又はフィブロネクチンでコーティングした皿において、20% KSR、8 ng/mlのFGF2、2 mMのL-グルタミン、1×非必須アミノ酸、0.5 U/mlのペニシリン、0.5 U/mlのストレプトマイシン、0.1 mMのβ-メルカプトエタノール(Sigma, St. Louis, Missouri, 米国)を含むDMEM: F12を含むマウス胚線維芽細胞(MEF)からの馴化培地(MEF-CM)内で成長させて、コラゲナーゼを用いて継代した。

【0101】

本明細書で試験される限定培養(DC)培地は、DMEM/F12、2 mMのGlutamax、1×非必須アミノ酸、0.5 U/mlのペニシリン、0.5 U/mlのストレプトマイシン、10 µg/mlのトランスフェリン(全てInvitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州、米国より)、0.1 mMのβ-メルカプトエタノール(Sigma)、0.2%の無脂肪酸Cohn画分V BSA(Serologicals)、1×微量元素混合物A、B及びC(Cellgro)及び50 µg/mlのアスコルビン酸(Sigma)を含んだ。FGF2(Sigma)、LongR3-IGF1(JRH Biosciences)、ヘレグリンβEGFドメイン(HRGβ, Peptidech)、TGFβ(R&D systems)、ノーダル(R&D systems)、LIF(R&D systems)、EGF(R&D systems)、TGFα(R&D systems)、HRGα(R&D systems)、BMP4(R&D systems)、及びアクチビンA(R&D systems)を含む、様々なレベルの組換え成長因子が使用された。LongR3-IGF1はIGF1の修飾されたバージョンであって、hESCで発現するものもあるIGF1結合タンパク質に対する親和性が低減している。DC-HAIFは上記の限定培養培地であり、10 ng/mlのHRGβ、10 ng/mlのアクチビンA、200 ng/mlのLR-IGF1及び8 ng/ml

mlのFGF2を含む。DC-HAIは上記の限定培養培地であり、10ng/mlのHRG-β、10ng/mlのアクチビンA、及び200ng/mlのLR-IGF1を含有する。DC-HAIF及びDC-HAIの双方において、当然ながらLR-IGF1成分はIGF1に換えてもよい。

【0102】

成長因子低減BD MATRIGEL (商標)マトリクス(BD Biosciences、Franklin Lakes、ニュージャージー州、米国)を約1:30~約1:1000の最終濃度範囲まで冷温のDMEM/F-12中に希釈することにより、MATRIGEL (商標)コーティング皿が調製された。一実施形態において、MATRIGEL (商標)の濃度は約1:200である。1ml/35mm皿を用いて、1~2時間室温で、又は少なくとも一晩4で皿がコーティングされた。プレートは最長1週間まで4で保存された。MATRIGEL (商標)溶液は使用直前に除去された。

10

【0103】

試験条件について、複数の条件を比較するため親培養物が6ウェル皿にプレーティングされた。培養物は一般的には、試験条件に直接プレーティングされた。培養物は毎日評価され、プレーティング後4~5日で形態学的基準に基づき段階評価された。1~5の評価尺度には、培養物全体の調査、及び未分化コロニーの全体的な割合、それらの相対的サイズ、及び明らかな分化を呈するコロニー又はコロニーの一部の割合の評価が関わる。評価5は「理想的な」培養物を示し、大部分の未分化コロニー及び無視できる程度の分化を伴う。評価4は非常に良好な培養物を示すが、一部に明らかな分化を伴う。評価3は許容範囲の培養物を示すが、およそ半分のコロニーが明らかな分化を呈する。評価2の培養物は主として分化しており、時折、未分化らしき細胞を伴う。評価1の培養物は分化コロニーを含むか、又は培養物が接着しなかったか、若しくは生存できなかった。未分化細胞の良好な増殖を呈した培養物が継代され、これらの条件下での長期培養が評価された。

20

【0104】

実施例1-BG01v細胞におけるErbb1~3、Nrg1及びADAM19の発現リアルタイムRT-PCRを使用して、BG01v細胞におけるErbb1~3、ニューレグリン及びADAM-19の発現を実証した(図1)。100ng/mlのLongR3-IGF1(LR-IGF1)、8ng/mlのFGF2及び1ng/mlのアクチビンAを含有する上記のとおりDC培地で培養されたBG01v細胞が回収され、RNeasyミニキット(Qiagen)を使用して製造者の指示に従いRNAが調製された。iScriptキット(Biorad)を使用して第1鎖cDNAが調製され、MJ Research Opticonサーマルサイクラーを使用してリアルタイムPCRが実行された。

30

【0105】

ADAM19(Hs00224960__m1)、EGFR(Hs00193306__m1)、Erbb2(Hs00170433__m1)、Erbb3(Hs00176538__m1)、NRG1(Hs00247620__m1)、OCT4(Hs00742896__s1)及び対照GAPDHについてのTaqManアッセイ・オンデマンド(Applied Biosystems)が、TaqManユニバーサルPCR(Applied Biosystems)と共に使用された。リアルタイム増幅プロットが図1に示され、未分化BG01v細胞におけるこれらの転写産物の発現が示されている。

40

【0106】

実施例2-Erbb2の阻害がBG01v細胞の増殖を遅延させる

リガンドのEGFドメインファミリーは、受容体チロシンキナーゼのErbbファミリーと結合する。hESCにおけるErbbチロシンキナーゼの既知の阻害剤の効果を調査するため、BG01v細胞が、6ウェルトレイのなか1:1000で希釈されたMATRIGEL (商標)上、100ng/mlのLongR3-IGF1、8ng/mlのFGF2及び1ng/mlのアクチビンAを含有する限定培養培地(DC)にプレーティングされた。翌日、DMSO(担体対照)、50nM~20μMのAG1478(Erbb1

50

阻害剤)、又は100 nM ~ 20 µMのAG879 (Erbb2阻害剤)が新鮮培地と共に添加された。細胞はさらに5日間培養され、培地は毎日交換された。次に培養物は固定され、アルカリホスファターゼ活性について染色された。

【0107】

対照及びAG1478培養細胞においてAP + BG01v細胞のサブコンフルエントなコロニーが観察された(図2A、及びB)が、これはDMSO及びAG1478(50 nM ~ 20 µM)のいずれも細胞増殖に対し明らかな影響を及ぼさなかったことを示している。しかしながら、AG879は5 µM(図2C)で細胞成長を実質的に阻害し、20 µM(図示せず)で細胞死を引き起こした。AG879で成長させた培養物は分化しなかったようであり、且つ多能性形態及びアルカリホスファターゼ活性は維持したようだが、これはAG879が分化を誘発することなく増殖を阻害した可能性が高いことを示しており、BG01v細胞が細胞生存上、Erbb2シグナル伝達に依存することが示唆される。逆に、上記と同様の条件下で成長させたBG01v細胞は、増殖に関してErbb1シグナルに依存しないものと思われる。

10

【0108】

実施例3 - BG01v細胞は、ヘレグリン含有限定培地で維持される

Erbb2及びErbb3の発現及びAG879による増殖の阻害から、BG01v細胞が活性な内因性Erbbシグナル伝達を有するとともに、外因性HRG-βにもまた応答し得ることが示唆された。BG01v細胞を、1:1000に希釈されたMATRIGEL(商標)上、10 ng/mlのHRG-β、200 ng/mlのLongR3-IGF1、8 ng/mlのFGF2及び10 ng/mlのアクチビンAを含むDC培地で成長させた(図3A及びB)。4代にわたり、すなわち20日超の間成長させたこれらの細胞は、未分化形態を呈し、自発的な分化の上昇は示さなかった。

20

【0109】

さらにBG01v細胞はまた、10 ng/mlのHRGβ、200 ng/mlのLongR3-IGF1、及び10 ng/mlのアクチビンAを含むDC培地でも、2代または13日超の間、維持された。これらの培養物は正常に増殖し、自発的な分化を呈することは極めて少なかったが、これによりBG01v細胞がFGF2の不在下でもHRGβにより限定条件下で維持できることが実証された。

30

【0110】

実施例4 - ES細胞におけるErbb2特異的チロシンキナーゼの役割

RT-PCRにより、mESCが、ADAM19、ニューレグリン1(Nrg1)、及びErbb1~4を発現することが実証された(図4A)。mESCにおいて、Erbb2及び3はErbb1より高いレベルで発現したように見え、Erbb4の検出は低いレベルであった。これらのデータから、内因性HRG-βがmESC自己複製の促進に関与している可能性が示唆される。

40

【0111】

マウス胚線維芽細胞(MEF)におけるErbb受容体転写産物の発現もまた調査された(図4B)。MEFは、歴史的にマウス及びヒトEC細胞及びES細胞の維持に使用されてきたE12.5 ~ 13.5内臓由来の異種細胞集団である。この集団内でのNrg1及びAdam19の発現から、HRG-βエクドメインがMEF馴化培地中にも存在し、多能性に対して大きな効果を及ぼし得ることが示唆される。

40

【0112】

AG1478及びAG879を使用してマウスES細胞におけるHRG/Erbbシグナル伝達の役割が調査された。R1マウスES細胞が、DMEM、10%FBS、10%KSR、0.5 U/mlのペニシリン、0.5 U/mlのストレプトマイシン、1×NEAA、1 mMのピルビン酸ナトリウム、1000 U/mlのLIF(ESGRO)、0.1 mMのβ-MEの標準条件下で維持され、0.5%のトリプシン/EDTAにより継代された。2×10⁵細胞/ウェルが、6ウェルトレイの1:1000で希釈されたMATRIGEL(商標)上にプレーティングされた。プレーティングの翌日、DMSO(担体

50

対照)、1~50 μ MのAG1478、又は1~50 μ MのAG879が新鮮培地と共に添加された。細胞はさらに8日間培養され、培地は毎日交換された。次に培養物は固定され、アルカリホスファターゼ活性について染色された。

【0113】

DMSO及び1~50 μ MのAG1478は細胞増殖に対し明らかな影響を一切及ぼさず、アルカリホスファターゼ陽性のmESCのサブコンフルエントなコロニーが観察された(図5A~C)。しかしながら、AG879は50 μ M(図5D及び5Fを比較)で細胞成長を実質的に阻害したうえ、20 μ M(図5E)で増殖を遅延させた可能性もある。AG879で成長させたmESCは、分化しなかったようであり、且つ多能性形態、及びアルカリホスファターゼ活性を維持した。

10

【0114】

この結果は、AG879がmESCの分化を誘発することなくmESCの増殖を阻害した可能性が高いことを示しており、mESCが増殖にErbb2シグナル伝達を必要とすることが示唆される。逆に、mESCは増殖においてErbb1シグナルには依存しないように思われる。増殖を阻害するために必要なAG879の濃度は、限定条件で成長させたBG01v細胞に必要な濃度よりmESCについて約10倍高かったが、これはmESC条件において使用された血清が薬物の活性を妨げた可能性があること、AG879の親和性がヒトErbb2チロシンキナーゼよりマウスErbb2チロシンキナーゼに対するほうが低いこと、又はErbb2が異なる種のES細胞では若干異なる役割を果たし得ることのいずれかを示している。

20

【0115】

別の高度に選択的なErbb2チロシンキナーゼ阻害剤であるチロホスチンAG825(Murilloら、2001年 Cancer Res 61、7408-7412頁)を使用して、ヒトESCにおけるErbb2の役割を調べた。AG825は馴化培地(CM)で成長するhESCの増殖を著しく阻害した(図6A)。AG825は細胞死を広範囲に及ぼすことなく増殖を阻害し、生存hESCは5日超の間維持可能であった(図示せず)。ウエスタンブロッティングは、AG825がDC-HAIFで成長する欠乏/ヘレグリン(HRG)パルス印加hESCにおいてチロシン-1248でErbb2の自己リン酸化を阻害したことを示した(図6B)。このように、Erbb2シグナル伝達の途絶がhESC増殖を大幅に阻害した。限定成長条件下でhESCを樹立するうえで、培養物はCM条件からDC-HAIFへと直接継代が可能であって、およびそれが呈した自発的な分化は最小限であった(図6C)。コロニー及び細胞計数アッセイから、LongR3-IGF1及びHRGが、本発明の実施形態の1つに関連して自己複製及び増殖において主要な役割を果たしたことが確認された(図6D、6E)。定常状態DC-HAIF培養物、及びDC-HAIFを伴いパルス印加された欠乏培養物の双方において、IGF1R、IR、FGF2 α 、Erbb2、及びErbb3のリン酸化もまた観察された(図6F)。

30

【0116】

実施例5 - 限定条件下でのマウスES細胞の培養

マウスES細胞におけるHRG/Erbb2シグナル伝達の役割をさらに調査するため、DC培地中でのR1ES細胞の増殖が、成長因子の組み合わせを使用して調査された。1 $\times$ 10⁵細胞/ウェルが、0.2%ゼラチンでコーティングされた6ウェルトレイのなか、10 ng/mlのHRG- β 、100 ng/mlのLongR3-IGF1、1 ng/mlのアクチビンA、1000 U/mlのマウスLIF又は10 ng/mlのBMP4(下表1)の組み合わせを含むDCにプレーティングされた。8日間にわたり増殖が観察された。

40

【0117】

生存コロニーは、少なくともLIF/HRG- β 又はLIF/BMP4を含有する条件のみで成長した(表1)。これらの組み合わせにLongR3-IGF1又はアクチビンが添加されても、その他の明らかな有益性は観察されなかった。対照の親培養物では正常

50

な増殖が観察されたが、成長因子を一切含まない限定培地では生存コロニーは観察されなかった。

【0118】

【表1】

HRG	IGF	アクチビン	LIF	BMP4	成長
+					しなかった
+			+		した
+	+				しなかった
+	+		+		した
+	+	+			しなかった
+	+	+	+		した
+		+			しなかった
+		+	+		した
			+	+	した
+			+	+	した

10

20

【0119】

10又は50ng/mlのHRG-β、10ng/mlのEGF、1000U/mlのLIF又は10ng/mlのBMP4からの選択された組み合わせで、6-ウェルトレイのなかの1:1000のMATRIGEL(商標)上に 2×10^5 細胞/ウェルをプレーティングすることにより定量的アッセイが行われた。培養物を8日間成長させ、固定し、アルカリホスファターゼコロニーの数が計数された(図7A)。成長因子のない限定条件にコロニーは観察されず、HRG-β、HRG-β/EGF及びHRG-β/BMPの組み合わせでは45個未満のコロニーが観察された。LIF単独では1358個のコロニーが観察された一方、10ng/mlのHRG-β/LIF及び50ng/mlのHRG-β/LIFの組み合わせでは、それぞれ4114個及び3734個のコロニーが観察された。ここから、限定条件においては、LIFが単独で実質的な多能性シグナルを提供したうえ、HRG-βがLIFと共に多大な相乗効果を呈して、このアッセイのmESCコロニーにおける増殖数を2倍超としたことが示された。このアッセイの低倍率拡大画像もまた、この増殖相乗効果を示す(図7B~G)。

30

【0120】

実施例6-DC-HAIFで維持されたヒト胚性幹細胞(hESC)の多能性の特性決定

複数の手法を使用して、DC-HAIFでのhESCの可塑性の維持を確認した。DC-HAIFで6ヶ月間(25代)培養されたBG02細胞は、複合奇形腫(図8A)及び3つの典型的な胚葉をインビトロで(図8B)形成する可能性を維持した。転写解析を使用して、CM及びDC-HAIFで維持されたhESC細胞における全体的な発現を比較した(Liuら、2006年、BMC Dev Biol 6、20頁)。DC-HAIFで10代及び32代にわたり成長させたBG02細胞、及びCMで64代にわたり成長させたBG02細胞においては11,600個より多い転写産物が検出された。全ての集団に共通の転写産物が約10364個あり(図8C)、これにはCD9、DNMT3、NANOG、OCT4、TERT及びUTF1などの既知のhESCマーカーが含まれていた(図示せず)。CM培養物とDC-HAIF培養物との比較(R^2 選択=0.928)、並びに継代細胞の初期と後期との比較(R^2 選択=0.959)では、高い相関係数が観測された(図8D)。階層クラスタ分析から、DC-HAIFで維持されたBG02細胞

40

50

胞が高度に群化され、CMで維持されたBG02細胞及びBG03細胞との高い類似性を保持したことが明らかとなった(図8E)。これらのデータは、未分化hESCが胚様体又は線維芽細胞と比較して高度にクラスタ化されたことを示した先行分析(Liuら、2006年、BMC Dev Biol 6、20頁)と一致する。このように、本発明の組成物で維持された細胞は、多能性(pluripotency)の主要なマーカーを維持することが可能である。従って、本発明の組成物は、分化可能細胞の自己複製を支持するための単純培地として使用できる。

【0121】

実施例7 - DC-HAIFにおけるヒト化細胞外マトリクス(ECM)上でのヒト胚性幹細胞(hESC)の維持

ErbB2シグナル伝達の役割を調べてhESC用の限定培地を開発するため、最初に、成長因子低減MATRIGEL(商標)1:30でコーティングした培養皿上でDC-HAIF培養物を増殖させたが、1:200(図9A)、又は1:1000で希釈したこの基質上での長期間の維持にも成功することができた。BG02及びCyT49 hESCはまた、ヒト血清(図9B)、ヒトフィブロネクチン(図9C)、又は専売のヒト化ECMであるVITROGRO(商標)(図9D)でコーティングされた組織培養皿上でも5代より長く維持できた。

【0122】

実施例8 - ヒト胚性幹細胞(hESC)の単一細胞継代

複数の研究グループが、特定の三倍性(triploides)、特にhChr12及び17の三倍性が、特定の準最適培養条件下でhESCに蓄積されることを実証している(Bakerら、2007年 Nat. Biotech. 25(2):207-215頁)。三倍性の出現は、継代において培養物が単一細胞に分割されときの細胞生存率の低さと最も直接的に関係しているものと思われ、これらの異数性を内包する細胞に強い選択的成長の優位性をもたらすことが推定される。逆に、本発明の一実施形態、DC-HAIFで成長するhESCは、単一細胞に分割された後のプレーティングにおいて高い生存率を維持した(図10A~D)。BG01及びBG02細胞は、ACCUTASE(商標)によりそれぞれ18代及び19代より長く継代された後も正常核型を維持した(図10E)。細胞における正常核型の維持から、hESC培養物の単一細胞への脱凝集は、DC-HAIFで維持されたhESCにおいては本質的にこうしたトリソミーの蓄積につながる

【0123】

本発明の組成物を使用して、未分化hESCの大規模増殖もまた可能である。60mmプレート内のBG02細胞のコンフルエントな出発培養物をDC-HAIFで4代にわたり増殖させて、単一の実験において20日間で 1.12×10^{10} 個超の細胞を得た。フローサイトメトリーにより調査した場合、OCT4、CD9、SSEA-4、TRA-1~81などの多能性(pluripotency)マーカーの発現を維持するバッチにおいて85%超の細胞により実証されたとおり、培養物は未分化のままであった(図12A)。他の多能性マーカーの発現もまたRT-PCR分析により観察されたが、分化系列 α -フェトプロテイン、MSX1及びHAND1のマーカーは検出されなかった(図12B)。蛍光インサイチュハイブリダイゼーション分析から、DC-HAIFで培養及び継代された細胞は、hChr12(98%2コピー)、hChr17(98%2コピー)、hChrX(95%1コピー)及びhChrY(98%1コピー)について、予想されたコピー数を維持したことが実証された(図12C)。核型決定分析からはまた、正常な正倍数染色体含量及び結合プロファイルがこれらの細胞において維持されたことも実証された

。

【0124】

実施例9 - インスリン及びIGF1は生理学的濃度で適用された場合にhESCに対し異なる効果を及ぼす

本質的に、hESCについてこれまで報告されている培養条件の全ては超生理学的なレベルのインスリンを含み、それによりIR及びIGF1Rの双方を刺激できる。IGF1と比較して、インスリン及びインスリン代用物の及ぼす活性を識別するため、hESCが生理学的レベルのこれらの成長因子における限定培地条件下で培養される。インスリン及びIGF1の濃度が約0.2~約200ng/mlで滴定され、細胞を5日後に計数することにより細胞増殖がモニタされる。増殖に成功した培養物は連続的に5回継代される。生理学的レベルのIGF1がhESC培養物の増殖を支持する一方、生理学的レベルのインスリンは支持せず、これはインスリン又はインスリン代用物の活性がIGF1の代わりにはならないこと、及びIGF1及びインスリン(又はインスリン代用物)がhESCに対する作用に関して別個のクラスの生物活性に相当することを示す。

10

【0125】

実施例10 - 補助剤の効果のスクリーニング方法

最初に、中程度の密度で成長するhESCの成長又は分化に対するビタミンB₁₂及びビタミンB₆の効果を調査するため、BG02細胞がACCUTASE(商標)を使用して分割され、1×10⁵細胞/ウェルが6ウェルトレイの限定培養(DC)培地にプレーティングされる。DC培地は、10ng/mlのHRG-β、200ng/mlのL_{on}gR3-IGF1、及び10ng/mlのFGF10を含む。ビタミンB₆(0.5μM)及び/又はビタミンB₁₂(0.5μM)が実験用ウェルに添加される。各条件の細胞数が7日後に計数される。実験用ウェル及び対照ウェルの双方の細胞計数及びコロニー計数から、ビタミンB₆及びビタミンB₁₂の細胞成長に対する効果に関する洞察が提供されることとなる。

20

【0126】

加えて、OCT4などの分化マーカーを実験用ウェルでアッセイすることにより、分化可能細胞の分化状態に対する添加剤及び補助剤の効果を判定できる。

【0127】

実施例11 - FGF2の不在下におけるhESCの培養

30

BG02細胞が20代にわたりDC-HAIで長期間維持され(図13A)、BG01細胞もまたDC-HAIで連続継代され、双方ともFGF2の不在下であった。培養物は劣化したり、又は明白な分化を呈したりはせず、培養期間全体を通じて未分化コロニーの正常な増殖を呈した。BG02培養物における正常な男性核型の維持が、6代後もDC-HAIにおいて実証された(図13B、20/20正常中期伸展)。

【0128】

転写解析を使用して、DC-HAIF及びDC-HAIで維持されたhESC細胞における全般的な発現が比較された。全細胞RNAがhESCからTrizol(Invitrogen)を使用して単離され、DNase I(Invitrogen)により製造者の推奨するプロトコルに従い処理された。試料増幅がIllumina RNA増幅キットを使用して100ngの全RNAで行われ、非標識UTPとの1:1の比でのビオチン-16-UTP(Perkin Elmer Life and Analytical Sciences)の取り込みにより標識が実現された。標識され、増幅された材料(1アレイ当たり700ng)が、47,296個の転写プローブを含有するIllumina Sentrix Human-6 Expression Beadchipと、製造者の指示に従い(Illumina, Inc.)ハイブリダイズされた。アレイがIllumina Bead Array Reader共焦点スキャナにより走査されたうえ、一次データが処理され、バックグラウンド減算、及びデータ解析が、Illumina BeadStudioソフトウェアを使用して製造者の指示に従い行われた。0.99の最小検出信頼スコア(標的配列シグナルを示す計算されたカットオフは陰性対照

40

50

と区別できた)を使用して転写産物発現の存在又は不在が判別された。他のhESC試料向けに記載される並列手法を使用して(Liuら、2006年、BMC Dev Biol 6:20頁)データ解析が行われた。階層クラスタ分析が先行文献に記載されるとおり(Liuら、2005年、BMC Dev Biol 6:20頁)に行われ、これは類似性尺度としては、ANOVAにより同定された($p < 0.05$)特異的発現遺伝子を使用した平均連鎖法及びユークリッド距離に基づいた。アレイ製造に使用される感受性及び品質対照試験及びBead studioソフトウェアにおいて使用されるアルゴリズムの詳細な説明は、Illumina, Inc (San Diego, CA)から入手できる。検出された転写産物の大部分は、CD9、DNMT3、NANOG、OCT4、TERT及びUTF1などの既知のhESCマーカーを含め(図示せず)、DC-HAIF及びDC-HAIの双方のBG02培養物で発現した。DC-HAIFとDC-HAIとの培養物比較においては高い相関係数が観測された(R^2 選択 = 0.961)(図14)。階層クラスタ分析から、DC-HAIで維持されたBG02細胞が高度に群化され、DC-HAIFで維持された細胞、並びに複数の培養フォーマットにおけるBG02及び他のhESC系と高い類似性を保持したことが実証された(図15)。これらのデータは、未分化hESCが胚様体又は線維芽細胞と比較して高度にクラスタ化されたことを示す先行分析と一致する(Liuら、2006年、BMC Dev Biol 6:20頁)。

10

【0129】

さらに、DC-HAIで維持されたBG02細胞は、SCIDベージュマウス(図示せず)で形成された複合奇形腫において典型的な中胚葉、内胚葉及び外胚葉に分化し、形式上、外因性FGF2の不在下で成長させた培養物における多能性の維持を実証している。

20

【0130】

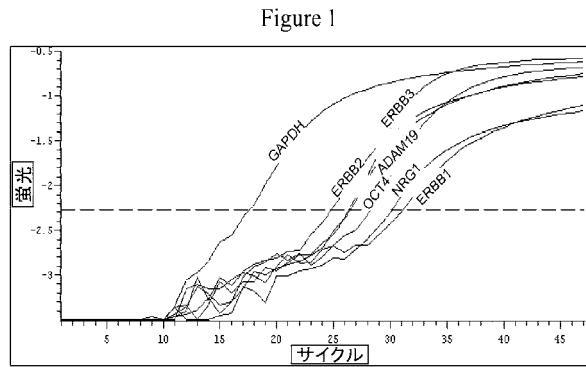
単一細胞継代に関連して外因性FGF2が必要とされたかどうかを調査するため、BG01細胞をACCUASE(商標)で継代し、10ng/mlのHRG- β 及び200ng/mlのLongR3-IGF1のみを含む限定条件(DC-HI)下で成長させた。これらのDC-HI培養物は10代の間維持されたが、明白な分化又は増殖の遅延は呈示しなかった。

【0131】

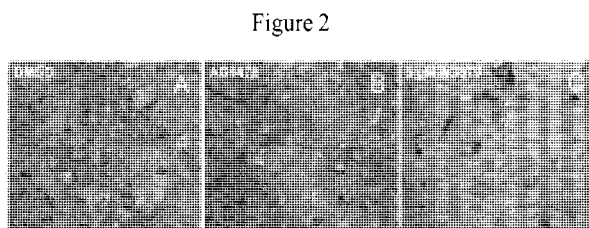
これらの研究から、hESCが最小限ヘレグリン及びIGF1を含有する限定培地中に維持される場合には、外因性FGF2の供給は必要ないことが明らかに実証された。さらに、FGF2のない培養物は、転写プロファイル及びインビボでの中胚葉、内胚葉及び外胚葉への分化を含む、多能性の鍵となる特性を保持した。

30

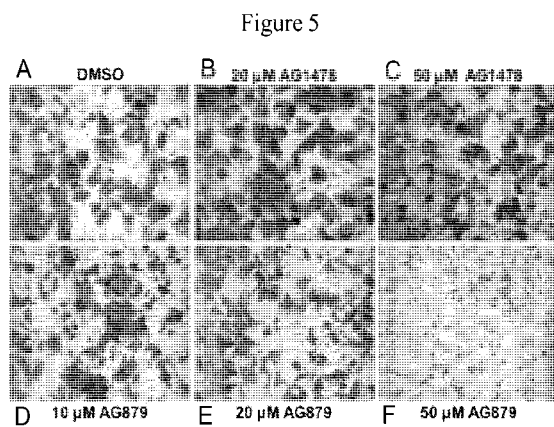
【 図 1 】



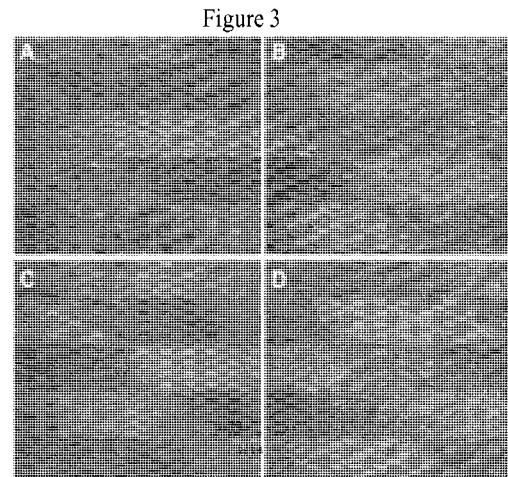
【 図 2 】



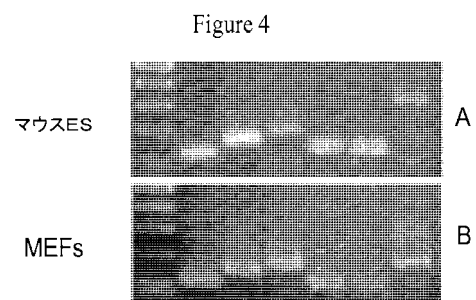
【 図 5 】



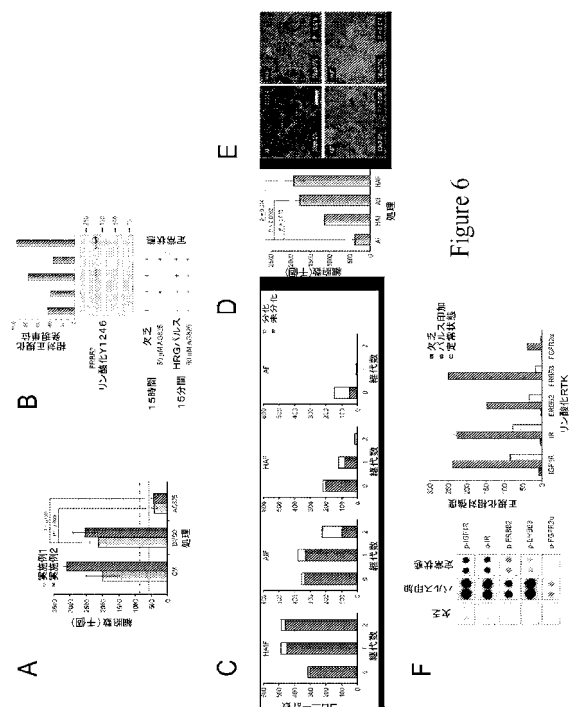
【 図 3 】



【 図 4 】

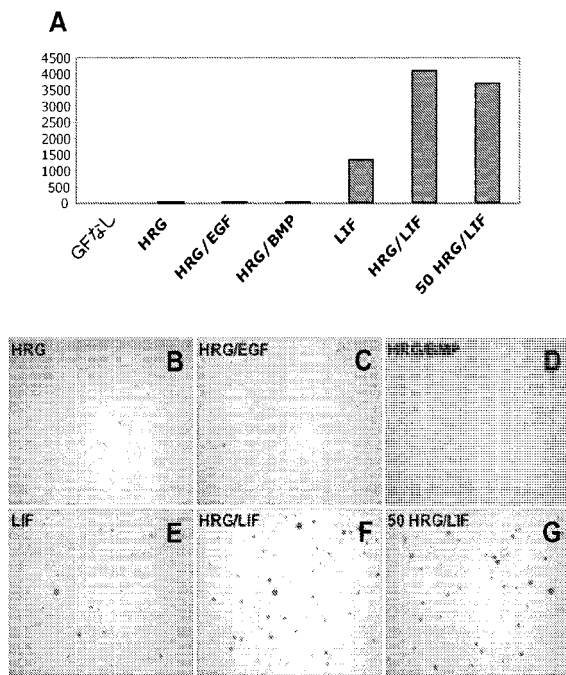


【 図 6 】



【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

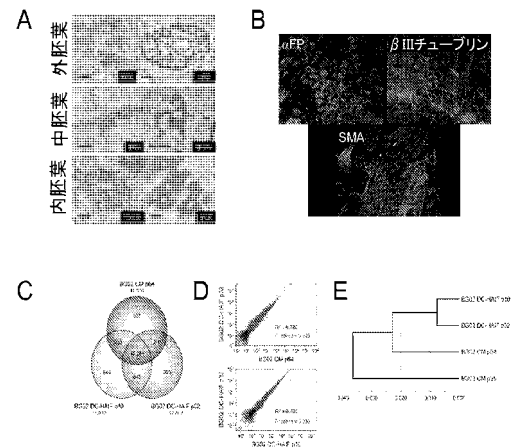
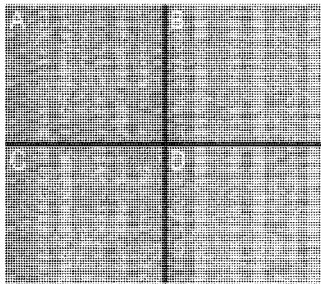


Figure 8

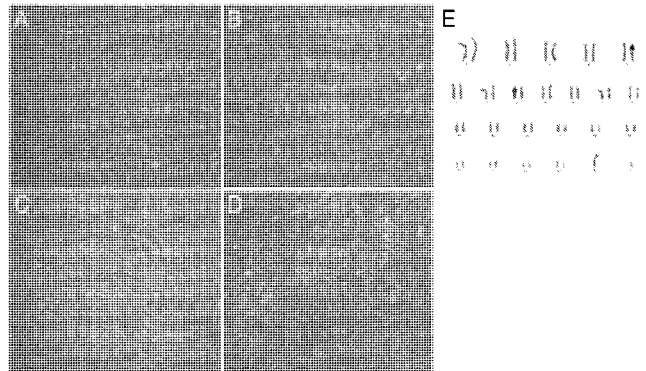
【 図 9 】

Figure 9



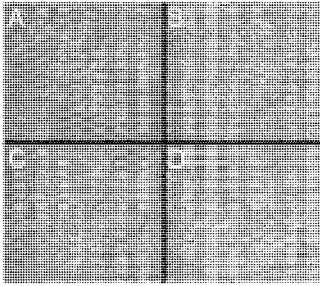
【 図 10 】

Figure 10



【 図 1 1 】

Figure 11



【 図 1 2 】

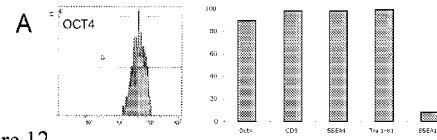
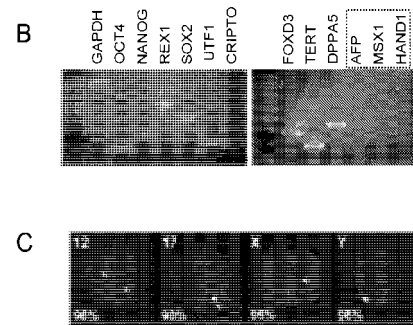
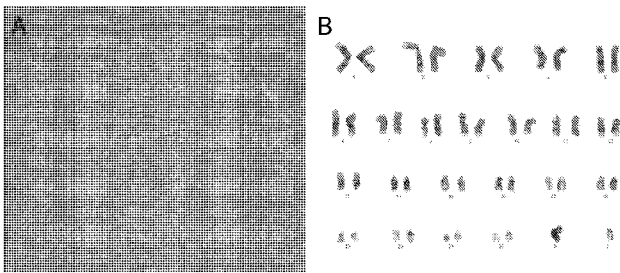


Figure 12



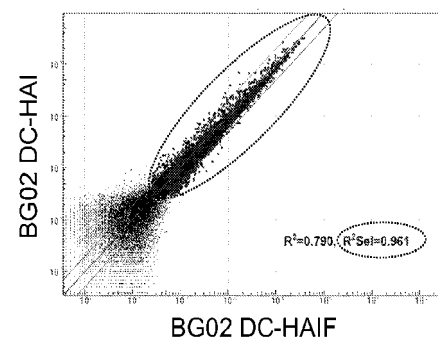
【 図 1 3 】

Figure 13

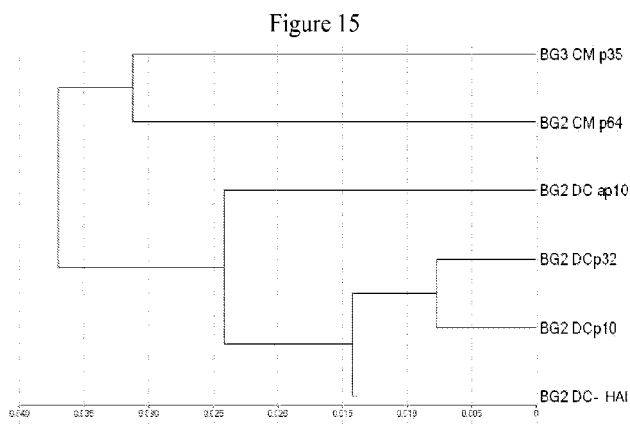


【 図 1 4 】

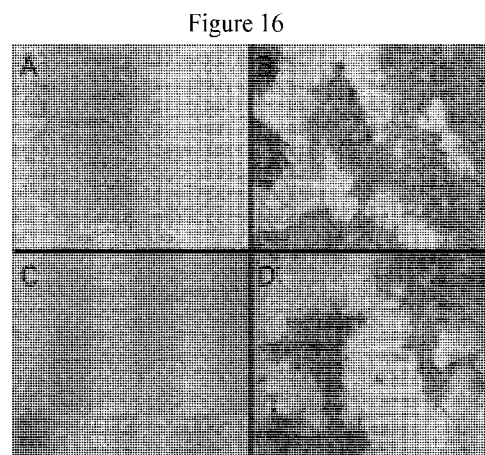
Figure 14



【図 15】



【図 16】



【手続補正書】

【提出日】平成27年8月12日(2015.8.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性幹細胞と、基礎塩栄養液と、E r b B 3 リガンドとを含む組成物であって、
前記 E r b B 3 リガンドは E r b B 3 受容体に結合し、これが E r b B 2 受容体と共に二量体化して E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体を形成し得るものであり、これにより、E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体において E r b B 2 受容体のチロシンキナーゼ活性が活性化され、

前記組成物に含まれる血清は 5 % 未満であり、

前記多能性幹細胞は増殖するが分化せず、

(i) 前記多能性幹細胞はヒト由来であって前記組成物はさらにインスリン様成長因子 1 受容体 (I G F 1 R) の活性化因子を含むか、又は

(i i) 前記多能性幹細胞はマウス由来であって前記組成物はさらに白血病抑制因子 (L I F) を含む、

組成物。

【請求項 2】

外因性インスリン及びインスリン代用物を含まず、前記インスリン代用物は、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、及び硫酸亜鉛から選択される亜鉛含有化合物である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 E r b B 3 リガンドが、ニューレグリン 1、ヘレグリン β (H R G - β)、ヘレグリン α (H R G - α)、Neu 分化因子 (N D F)、アセチルコリン受容体誘導活性 (A R I A)、グリア成長因子 2 (G G F 2)、運動ニューロン由来因子 (S M D F)、ニューレグリン 2、ニューレグリン 2 β (N R G 2 - β)、エピレギュリン、及びビレギュリンからなる群より選択される、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 E r b B 3 リガンドがヘレグリン β (H R G - β) である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記多能性幹細胞はヒト由来であって、前記 I G F 1 R の活性化因子はインスリン様成長因子 1 (I G F 1) 又は l o n g R 3 - I G F 1 を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記多能性幹細胞はマウス由来であって前記組成物はインスリン様成長因子をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

形質転換成長因子 β (T G F - β) 又は T G F - β ファミリーメンバーをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 T G F - β ファミリーメンバーが、ノードル、アクチビン A、アクチビン B、骨形態形成タンパク質 2 (B M P 2)、及び骨形態形成タンパク質 4 (B M P 4) からなる群から選択される、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 T G F - β ファミリーメンバーがアクチビン A である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

外因性線維芽細胞成長因子を含まない、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

F G F - 2、F G F - 7、F G F - 10、及び F G F - 22 からなる群から選択される少なくとも 1 つの線維芽細胞成長因子 (F G F) をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの F G F が、F G F - 7、F G F - 10 及び F G F - 22 である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

血清アルブミン (S A) をさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 S A がウシ S A (B S A) 又はヒト S A (H S A) である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 S A の濃度が 0 . 2 % (v / v) より高い、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 S A の濃度が 5 % (v / v) 未満である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

少なくとも 1 つの不溶性基質をさらに含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの不溶性基質が、コラーゲン、及びフィブロネクチンからなる群から選択される、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項 1 ~ 5 又は請求項 7 ~ 18 のいずれ

か1項に記載の組成物。

【請求項 20】

多能性幹細胞の培養方法であって、

a) 前記多能性幹細胞を細胞培地において接着培養で固体表面にプレーティングする工程であって、

前記細胞培地が基礎塩栄養液と E r b B 3 リガンドとを含み、

前記 E r b B 3 リガンドは E r b B 3 受容体に結合し、これが E r b B 2 受容体と共に二量体化して E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体を形成し得るものであり、これにより、E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体において E r b B 2 受容体のチロシンキナーゼ活性が活性化され、

前記細胞培地に含まれる血清は 5 % 未満である、工程と、

b) 前記細胞培地において適切な培養条件下、接着培養で前記多能性幹細胞を維持する工程であって、前記細胞培地が定期的に交換され、前記多能性幹細胞は増殖するが分化しない、工程

とを含み、

(i) 前記多能性幹細胞はヒト由来であって前記細胞培地はさらにインスリン様成長因子 1 受容体 (I G F 1 R) の活性化因子を含むか、又は

(i i) 前記多能性幹細胞はマウス由来であって前記細胞培地はさらに白血病抑制因子 (L I F) を含む、

方法。

【請求項 21】

多能性幹細胞の培養方法であって、

a) 前記多能性幹細胞を細胞培地の懸濁物中に置く工程であって、

前記細胞培地が基礎塩栄養液と E r b B 3 リガンドとを含み、

前記 E r b B 3 リガンドは E r b B 3 受容体に結合し、これが E r b B 2 受容体と共に二量体化して E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体を形成し得るものであり、これにより、E r b B 2 / E r b B 3 ヘテロ二量体において E r b B 2 受容体のチロシンキナーゼ活性が活性化され、

前記細胞培地に含まれる血清は 5 % 未満である、工程と、

b) 前記細胞培地の懸濁物中において前記多能性幹細胞を維持する工程であって、前記細胞培地が定期的に交換され、前記多能性幹細胞は増殖するが分化しない、工程

とを含み、

(i) 前記多能性幹細胞はヒト由来であって前記細胞培地はさらにインスリン様成長因子 1 受容体 (I G F 1 R) の活性化因子を含むか、又は

(i i) 前記多能性幹細胞はマウス由来であって前記細胞培地はさらに白血病抑制因子 (L I F) を含む、

方法。

【請求項 22】

前記多能性幹細胞はヒト由来であって、前記 I G F 1 R の活性化因子はインスリン様成長因子 1 (I G F 1) 又は l o n g R 3 - I G F 1 を含む、請求項 20 又は 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項 20 又は 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記多能性幹細胞がマウス胚性幹細胞であり、前記細胞培地はインスリン様成長因子をさらに含む、請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記細胞培地は外因性インスリン及びインスリン代用物を含まず、前記インスリン代用物は、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、及び硫酸亜鉛から選択される亜鉛含有化合物である、請求項 20 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 E r b B 3 リガンドが、ニューレグリン 1、ヘレグリン β (H R G - β)、ヘレグリン α (H R G - α)、Neu 分化因子 (N D F)、アセチルコリン受容体誘導活性 (A R I A)、グリア成長因子 2 (G G F 2)、運動ニューロン由来因子 (S M D F)、ニューレグリン 2、ニューレグリン 2 β (N R G 2 - β)、エピレギュリン、及びピレギュリンからなる群より選択される、請求項 20 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記 E r b B 3 リガンドがヘレグリン β (H R G - β) である、請求項 20 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞培地は形質転換成長因子 β (T G F - β) 又は T G F - β ファミリーメンバーをさらに含む、請求項 20 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 T G F - β ファミリーメンバーが、ノーダル、アクチビン A、アクチビン B、骨形態形成タンパク質 2 (B M P 2)、及び骨形態形成タンパク質 4 (B M P 4) からなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記細胞培地は、F G F - 2、F G F - 7、F G F - 10、及び F G F - 22 からなる群から選択される少なくとも 1 つの線維芽細胞成長因子 (F G F) をさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 つの F G F が、F G F - 7、F G F - 10 及び F G F - 22 である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞培地は血清アルブミン (S A) をさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記 S A がウシ S A (B S A) 又はヒト S A (H S A) である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 S A の濃度が 0 . 2 % (v / v) より高い、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 S A の濃度が 5 % (v / v) 未満である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記固体表面が不溶性基質を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 37】

前記不溶性基質が、コラーゲン、及びフィブロネクチンからなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/50 (2006.01)	C 0 7 K 14/50	
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	
C 0 7 K 14/78 (2006.01)	C 0 7 K 14/78	
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00	G
	C 1 2 N 1/00	B

(72)発明者 シュルツ、 トーマス

アメリカ合衆国 3 0 6 0 5 ジョージア州 アセンズ オーク ミードウ ドライブ 1 6 2

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA91X AA93X AC20 BC01 BC41 BD22 BD25 BD42 CA44

CA60

4H045 AA20 BA10 CA40 DA38 DA70 EA20 EA21 EA27 FA72

【外国語明細書】
2016005462000001.pdf