

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6016642号
(P6016642)

(45) 発行日 平成28年10月26日(2016.10.26)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/0735 (2010.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)C 12 N 5/0735
C 12 N 15/00 Z N A A

請求項の数 16 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2012-557626 (P2012-557626)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月17日 (2011.3.17)
 (65) 公表番号 特表2013-521795 (P2013-521795A)
 (43) 公表日 平成25年6月13日 (2013.6.13)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2011/000982
 (87) 國際公開番号 WO2011/114237
 (87) 國際公開日 平成23年9月22日 (2011.9.22)
 審査請求日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (31) 優先権主張番号 12/725,877
 (32) 優先日 平成22年3月17日 (2010.3.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 510333900
 トウリッジパソコン, カール
 スウェーデン国 エスイー-18261
 ジューショルム, ロークヴァーゲン 8
 エー
 (73) 特許権者 512238586
 ロダン, セレゲイ
 スウェーデン国 エス-11348 スト
 ックホルム, ハガガタン 22
 (73) 特許権者 512238597
 ドマガツキヤ, アナ
 スウェーデン国 エス-14462 レニ
 エ, セントラルヴェイエン 8エー
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多能性ヒト幹細胞の増殖を可能にするための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

規定された人為的環境において新しい幹細胞系を生成するための方法であって、コーティングを含む基材を提供することであって、該コーティングは、完全な組換えラミニン-511(LN-511又はラミニン-10)のみを含み、タンパク質もフィーダー細胞も含まない、こと、

ヒト幹細胞を該コーティング上にプレーティングすること、

該ヒト幹細胞を、40 μg / ml のアスコルビン酸および96ng / ml のbFGFを含み、フィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び

該ヒト幹細胞の増殖物から新しい幹細胞を得ること
を含む、方法。

10

【請求項2】

前記新しい幹細胞が非分化である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記新しい幹細胞が均質である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記ヒト幹細胞が前記コーティング上に単層を形成する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記ヒト幹細胞が非分化胚性幹細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

20

前記新しい幹細胞を収集すること、

前記コーティングを含む第2の基材上に該新しい幹細胞を再度プレーティングすること

、該新しい幹細胞を、 $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のアスコルビン酸および $96\text{ ng}/\text{mL}$ のbFGFを含み、フィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び

該新しい幹細胞の増殖物から精製幹細胞を得ること

を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記培地が増殖因子を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記培地がヒトアルブミンを更に含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項9】

自己複製する多能性ヒト幹細胞を維持するための方法であって、

コーティングを含む基材を提供することであって、該コーティングは、完全な組換えラミニン-511(LN-511又はラミニン-10)のみを含み、動物タンパク質もフィーダー細胞も含まない、こと、

ヒト幹細胞を前記コーティング上にプレーティングすること、

該ヒト幹細胞を、 $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のアスコルビン酸および $96\text{ ng}/\text{mL}$ のbFGFを含み、フィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び

該幹細胞を定期的に収集し、再度プレーティングすることを含む、方法。

20

【請求項10】

前記培地が増殖因子を更に含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記培地がヒトアルブミンを更に含む、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記コーティングが完全な組換えラミニン-511からなる、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

インピトロで成長した多能性ヒト幹細胞の自己複製を可能にするための組成物であって、

30

基材、

完全な組換えラミニン-511(LN-511又はラミニン-10)のみを含み、動物タンパク質もフィーダー細胞も含まない、コーティング、及び

$40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のアスコルビン酸および $96\text{ ng}/\text{mL}$ のbFGFを含み、フィーダー細胞を含まない既知組成培地を含む、組成物。

【請求項14】

前記培地が増殖因子を更に含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記培地がヒトアルブミンを更に含む、請求項13に記載の組成物。

40

【請求項16】

前記コーティングが完全な組換えラミニン-511からなる、請求項13に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2007年1月4日に出願した米国仮出願第60/883,406号に対する優先権を主張する2008年1月4日に出願した米国特許出願第11/969,620号の一部継続出願である2010年3月17日に出願した米国特許出願第12/725,8

50

77号に対する優先権を主張する。

【0002】

これらの出願のすべてを参照によりその全体を本明細書に援用する。

【背景技術】

【0003】

背景

本開示は、種々の例示的実施形態において、一般に、インビトロで成長した多能性又は未分化ヒト幹細胞の接着、増殖及び自己複製 (self-renewal) 維持を可能にする組成物及び方法に関する。これらのヒト幹細胞としては、胚性幹細胞、骨髄幹細胞及び多能性幹細胞が挙げられる。

10

【0004】

幹細胞は、未分化細胞であり、分化した細胞がその後にそれから誘導される。胚性幹細胞は、広範な自己複製能力及び多能性を有し、全3種類の胚葉の細胞に分化する潜在能力を有する。それらは治療目的に有用であり、組織置換療法、薬物スクリーニング、機能ゲノミクス及びプロテオミクスのための細胞の無限の供給源を提供することができる。（非特許文献1）。

【0005】

ヒト胚性細胞は、インビトロで多能性状態で維持するためにフィーダー細胞を必要とし、Matrigel（商標）上で培養するときにはNogginのような分化阻害剤及び/又は高用量の塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF）を必要とする（概説については、非特許文献1を参照されたい）。しかし、フィーダー細胞の使用は幾つかの欠点を有する。例えば、フィーダー細胞は、幹細胞に感染し得るウイルスなどの病原体を含む可能性がある。（非特許文献2；非特許文献1）

20

ヒト胚性幹細胞の自己複製を支援するフィーダー細胞のないシステムは、接着剤基層としてi) Matrigel（商標）（非特許文献3）；（非特許文献4）；（非特許文献5）、又はii) マウスフィーダー細胞由来の細胞外マトリックス（非特許文献6）を必要とする。しかし、これらのコーティングは、異種起源であり、したがってFDA要件に従って診療に使用することができない（非特許文献2）。これらのコーティングは、明確なシステム及び非免疫原性の判定基準を満たすこともできない。その重要性は、（非特許文献2；非特許文献1）で考察されている。

30

【0006】

上記問題のために、化学的に明確であり、異種を含まない、ヒト胚性幹（hES）細胞培養環境の開発は、重要な目標である。この点に関して、hES細胞増殖用基層の探索は、特に重要である。細胞外マトリックス（ECM）タンパク質、特に基底膜（BM）成分は、人体における分化、表現型維持並びに多数のタイプの体細胞及び幹細胞の機能のためのin vivo微小環境の重要な部分を構成し、したがって、ある細胞型の自己複製の可能性を有する。基底膜タンパク質のうち、ラミニンは、細胞分化、接着、増殖及び移動に影響を及ぼすことが示された。

【0007】

ほ乳動物の胚発生の間、受精した卵母細胞は、まず2個の細胞に分裂し、続いて別の細胞を複製して4細胞胚を生成する。4細胞段階では、胚性細胞は、細胞膜タンパク質及び新しい結合組織（細胞外マトリックス）の分子の助けを借りて互いに結合する。出現する最初の細胞外マトリックス分子は、ラミニン、プロテオグリカンなどの基底膜タンパク質である。続いて、胚性細胞は、3種類の生殖細胞層、すなわち外胚葉、内胚葉及び中胚葉に分化し始め、形態形成が始まる。ラミニンなどの細胞外マトリックス分子は、細胞表面受容体との相互作用の原因であり、したがって接着、増殖、移動、分化などの細胞拳動を調節する（非特許文献7）。一方、I、II、III又はIV型コラーゲンなどの別の細胞外マトリックス成分は機械的支持機能に主に役立つ（非特許文献8）。

40

【0008】

ラミニンは、アルファ、ベータ及びガンマ鎖で構成される大きい三量体細胞外マトリッ

50

クスタンパク質である。ヒト組織においては少なくとも 15 の異なる組合せで見いだされた、5 本の異なるアルファ鎖、3 本のベータ鎖及び 3 本のガンマ鎖が存在する（非特許文献 7）；（非特許文献 9）。これらの分子は、その歴史的発見に基づいてラミニン - 1 からラミニン - 15 と称されるが、別の命名法は、その鎖組成に基づいてアイソフォーム、例えば、アルファ - 1、ベータ - 1 及びガンマ - 1 鎖を含むラミニン - 111（ラミニン - 1）を記述する（ラミニン命名法：（非特許文献 9））。

【0009】

ラミニンアイソフォームは、種々の時空間的発現パターン並びに組織特異的位置及び機能を示す。すなわち、LN - 211 は、筋細胞及び運動ニューロンシナプスの BM 中に主に存在し、一方 LN - 111 は、初期胚及びその後のある種の上皮細胞に限定される。LN - 332 は上皮下の BM 中に特異的に見いだされ、LN - 411 は内皮下の BM 中にある。LN - 511 は一様に分布し、初期胚の BM 及び大部分の成体組織の BM 中に見いだされた。多数のラミニン鎖の変異は、接合部型表皮水泡症（3、3、2 鎖）及び先天性筋ジストロフィー（2 鎖）、ネフローゼ症候群（2 鎖）、毛細血管障害（4 鎖）などの重篤な疾患をもたらす。これらは、特定の組織における細胞系譜に対するその重大な機能的役割を示すものである。広範に分布する 5、1 及び 1 鎖の遺伝子の欠失は、マウスの死を招く。これは、生物体の発生に対するその本質的な役割を強調するものである。

【0010】

ラミニンは、初期胚において同定された最初の ECM タンパク質細胞であり、ラミニン鎖は、マウス胚の 2 細胞段階において細胞表面で検出された。胚盤胞の内部細胞塊は、ES 細胞の天然の起源であり、ラミニン 5 鎖を含むことが示された。

【0011】

ECM タンパク質がインビトロでの hES 培養のコーティング基層として使用された多数の試験がある。しかし、これらの例では、ECM タンパク質の不明確な混合物若しくは不明確な培地が使用され、又はすべての必要なアッセイがなされる十分な時間実験が実施されなかった。これまで、hES 細胞培養に使用された最も成功したフィーダー細胞のないコーティング材料は Matrigel、すなわち、ネズミ Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肉腫組織から得られた複合腫瘍・BM 様抽出物である。Matrigel は、ネズミ LN - 111、IV 型コラーゲン、パールカン及びニドジェンを主に含むが、増殖因子 (growth factor) 及び細胞タンパク質を含めて異なる量の別の材料も含み、したがって、その組成は不明確であり、バッチごとに異なる。この可変性のために、科学的結果を再現することができず、さらに、動物起源の基層という理由から、Matrigel は、ヒト細胞療法のための hES 細胞の増殖及び維持に容認されない。

【0012】

大部分のラミニンアイソフォームは、ECM タンパク質間の広範な架橋のために、組織から未変性の形態で抽出及び精製することが困難又は不可能であり、角化細胞、内皮細胞などの細胞から微量でしか生成することができない。ごく最近、LN - 332、LN - 411、LN - 511 などのラミニンをヒト組換えタンパク質として生成することに成功した。

【0013】

上記のことにもかかわらず、引き続き、ヒト胚性幹細胞を培養及び成長させるための組成物及び方法を提供する必要がある。この点に関して、LIF などの分化阻害剤やフィーダー細胞を使用せずに、インビトロで多能性ヒト幹細胞の増殖及び生存を可能にする組成物及び方法を提供することが有利であろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献 1】 Skottman, H., Dilber, M.S., and Hova

10

20

30

40

50

- tta , O . (2 0 0 6) ; The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines ; FEB S Lett 580 , 2875 - 2878
- 【非特許文献 2 】 Hovatta , O . , and Skottman , H . (2 0 0 5) ; Feeder-free derivation of human embryonic stem-cell lines ; Lancet 365 , 1601 - 1603
- 【非特許文献 3 】 Richards , M . , Fong , C . Y . , Chan , W . K . , Wong , P . C . , and Bongso , A . (2 0 0 2) ; Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells ; Nat Biotechnol 20 , 933 - 936
- 【非特許文献 4 】 Xu , C . , Inokuma , M . S . , Denham , J . , Golds , K . , Kundu , P . , Gold , J . D . , and Carpenter , M . K . (2 0 0 1) ; Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells ; Nat Biotechnol 19 , 971 - 974
- 【非特許文献 5 】 Xu , R . H . , Peck , R . M . , Li , D . S . , Feng , X . , Ludwig , T . , and Thomson , J . A . (2 0 0 5) ; Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells ; Nat Methods 2 , 185 - 190
- 【非特許文献 6 】 Klimanskaya , I . , Chung , Y . , Meissner , L . , Johnson , J . , West , M . D . , and Lanza , R . (2 0 0 5) ; Human embryonic stem cells derived without feeder cells ; Lancet 365 , 1636 - 1641
- 【非特許文献 7 】 Colognato , H . , and Yurchenco , P . D . (2 0 0 0) ; Form and function : the laminin family of heterotrimers ; Dev Dyn 218 , 213 - 234
- 【非特許文献 8 】 Aumailley , M . , and Gayraud , B . (1 9 9 8) ; Structure and biological activity of the extracellular matrix ; J Mol Med 76 , 253 - 265
- 【非特許文献 9 】 Aumailley , M . , Bruckner-Tuderman , L . , Carter , W . G . , Deutzmann , R . , Edgar , D . , Ekblom , P . , Engel , J . , Engvall , E . , Hohenester , E . , Jones , J . C . , et al . (2 0 0 5) ; A simplified laminin nomenclature ; Matrix Biol 24 , 326 - 332
- 【発明の概要】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0015】
- 概要
- 本開示は、細胞外マトリックスなどの組成物の開発、及びヒト幹細胞をインビトロで未分化状態で培養するためにそれを使用するプロセスを対象とする。
- 【0016】
- ある種のラミニンは、未分化ヒト胚性幹細胞のインビトロでの成長 (growth) 及び増殖 (proliferation) のための規定された適切な細胞外マトリックスを提供することが見いだされた。これは、フィーダー細胞及び / 又は分化阻害剤がない。換言すれば、フィーダー細胞及び / 又は分化阻害剤は、胚性幹細胞がラミニン細胞外マトリックス上で成長及び増殖するのに不要である。さらに、多能性ヒト胚性幹細胞を、組換え

ラミニン - 10 (ラミニン - 511) で被覆されたプレート上で mTeSR1 の類似物などの既知組成培地 (chemical ly defined medium) 中で培養すると、細胞は、増殖し、分化阻害剤の非存在下でもその多能性を維持できることが見いだされた。本明細書では「既知組成」 (chemical ly defined) という用語は、その成分すべてが既知である培地を指し、各成分の (絶対的又は相対的) 量が既知であり、培地は、植物組織も動物組織も含まない。

【0017】

さらに、動物産物もフィーダー細胞も全く含まず、唯一の不明確な成分である純度 96 % 以上のヒトアルブミンのみを含む系が、自然な hES 細胞微小環境であるヒト組換えラミニン - 511 上で種々の hES 細胞系を培養することによって樹立された。hES 細胞は、正常な核型で少なくとも 4 か月 (20 繼代) 自己複製し、その後、細胞は、全 3 種類の胚葉の細胞系譜を含む奇形腫を発生することができた。ラミニン - 511 上で小さい塊でプレーティングすると、hES 細胞は単層で広がり、約 97 % Oct - 4 陽性細胞を含む細胞均質性を維持した。hES 細胞の接着は、6-1 インテグリンに依存した。均質な单層 hES 細胞培養物を使用すると、幹細胞の分化経路の設計条件がより制御可能になる。この異種もフィーダー細胞も含まない系は、細胞療法目的の細胞系譜の開発に有用であり得る。

【0018】

本開示のこれら及び他の非限定的特徴を以下により詳細に考察する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

インピトロで成長した多能性ヒト幹細胞の自己複製を可能にするための組成物であって
、

基材、

完全な組換えラミニン - 511 (LN - 511 又はラミニン - 10) を含み、動物タンパク質もフィーダー細胞も含まない、コーティング、及び

フィーダー細胞を含まない既知組成培地
を含む、組成物。

(項目 2)

前記培地が増殖因子を更に含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3)

前記培地がヒトアルブミンを更に含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 4)

前記コーティングが完全な組換えラミニン - 511 からなる、項目 1 に記載の組成物。

(項目 5)

規定された人為的環境において新しい幹細胞系を生成するための方法であって、
コーティングを含む基材を提供することであって、該コーティングは、完全な組換えラミニン - 511 (LN - 511 又はラミニン - 10) を含み、タンパク質もフィーダー細胞も含まない、こと、

ヒト幹細胞を該コーティング上にプレーティングすること、
該ヒト幹細胞を、フィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び
該ヒト幹細胞の増殖物から新しい幹細胞を得ること
を含む、方法。

(項目 6)

前記新しい幹細胞が非分化である、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記新しい幹細胞が均質である、項目 5 に記載の方法。

(項目 8)

前記ヒト幹細胞が前記コーティング上に単層を形成する、項目 5 に記載の方法。

(項目 9)

10

20

30

40

50

<u>前記ヒト幹細胞が非分化胚性幹細胞である、項目 5 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 10)</u>	
<u>前記新しい幹細胞を収集すること、</u>	
<u>前記コーティングを含む第 2 の基材上に前記新しい幹細胞を再度プレーティングすること、</u>	
<u>前記新しい幹細胞をフィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び</u>	
<u>前記新しい幹細胞の増殖物から精製幹細胞を得ること</u>	
<u>を更に含む、項目 5 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 11)</u>	
<u>前記培地が増殖因子を更に含む、項目 5 に記載の方法。</u>	10
<u>(項目 12)</u>	
<u>前記培地がヒトアルブミンを更に含む、項目 5 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 13)</u>	
<u>項目 5 に記載の方法によって製造される新しいヒト幹細胞。</u>	
<u>(項目 14)</u>	
<u>自己複製する多能性ヒト幹細胞を維持するための方法であって、</u>	
<u>コーティングを含む基材を提供することであって、該コーティングは、完全な組換えラ</u>	
<u>ミニン - 511 (LN - 511 又はラミニン - 10) を含み、動物タンパク質もフィーダー</u>	
<u>細胞も含まない、こと、</u>	
<u>ヒト幹細胞を前記コーティング上にプレーティングすること、</u>	20
<u>該ヒト幹細胞を、フィーダー細胞を含まない既知組成培地に曝露すること、及び</u>	
<u>該幹細胞を定期的に収集し、再度プレーティングすること</u>	
<u>を含む、方法。</u>	
<u>(項目 15)</u>	
<u>前記培地が増殖因子を更に含む、項目 14 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 16)</u>	
<u>前記培地がヒトアルブミンを更に含む、項目 14 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 17)</u>	
<u>前記コーティングが完全な組換えラミニン - 511 からなる、項目 14 に記載の方法。</u>	
【0019】	30
本特許又は出願ファイルは、少なくとも 1 つのカラー図面を含む。カラー図面（単数又は複数）を含むこの特許又は特許出願の複製は、請求次第、かつ必要な手数料の支払い次第、特許庁によって提供される。	
【0020】	
以下は、図面の簡単な記述である。これらは、本明細書に開示する例示的実施形態を説明するためのものであって、それを限定するものではない。	
【図面の簡単な説明】	
【0021】	
【図 1】図 1 は、組換えラミニン - 10 (ラミニン - 511) で被覆されたプレート上の既知組成培地における 105 日間のフィーダー細胞のない培養後のヒト胚性幹細胞の顕微鏡写真（位相差）である。	40
【図 2】図 2 は、既知組成培地においてラミニン - 10 (ラミニン - 511) 上で 105 日間 (LN - 511、20 繼代)、及び従来の培地においてヒト包皮線維芽細胞（対照）上で、培養されたヒト胚性幹細胞における多能性マーカー (Oct 4, Nanog)、内部標準 (GAPDH) 及び分化マーカー (アルファ - フェトプロテイン、brachyury, Sox 1 及び Pax 6) の発現を示す RT - PCR の写真である。ここで、hGAPDH, hOct 4, hNanog, hBrach, hAFP, hSox 1 及び hPax 6 は、それぞれ GAPDH, Oct 4, Nanog, brachyury, アルファ - フェトプロテイン、Sox 1 及び Pax 6 を表す。	
【図 3】図 3 は、ラミニン - 511 上のヒト胚性幹細胞自己複製効果を示す一連のカラー	50

顕微鏡写真（免疫蛍光）を含む。既知組成培地におけるラミニン - 511 上の 105 日間（20 繼代）の培養後、ヒト胚性幹細胞は、多能性マーカー Oct 4（緑）及び Sox 2（赤）（LN - 511、20 繼代）を発現し続ける。従来の培地におけるヒト包皮線維芽細胞上で培養されたヒト胚性幹細胞は、多能性マーカー Oct 4 及び Sox 2（対照）も発現する。

【図 4 a】図 4 は、ヒト ES 細胞と種々のコーティングの接着、及び hES 細胞におけるラミニン鎖の発現を示す。図 4 a は、LN - 511 及び LN - 111 に付着したヒト ES 細胞のクリスタルバイオレット染色を示す。拡大率：×5（挿入図：×20）

【図 4 b】図 4 は、ヒト ES 細胞と種々のコーティングの接着、及び hES 細胞におけるラミニン鎖の発現を示す。図 4 b は、ES 細胞と種々の接着基層の接触面積を示すグラフである。値は、（ポリ - D - リジン上にブレーティングされた細胞と比較した）平均相対接觸面積として示される。統計的有意性（P）は、Student t 検定によって計算された。エラーバーは標準誤差（SE）を示し、各バー内の数は独立した測定数を示す。
略語：LN、ラミニン；MG、Matrigel；PL、ポリ - D - リジン。

【図 4 c】図 4 は、ヒト ES 細胞と種々のコーティングの接着、及び hES 細胞におけるラミニン鎖の発現を示す。図 4 c は、HS420 細胞から単離された全 RNA の RT - PCR 分析を示す。既知のラミニン鎖すべてに対するプライマーセットを使用した。

【図 5 a】図 5 は、hES 細胞表面のインテグリン受容体、及び LN - 511 との接着におけるその役割を示す。図 5 a は、種々の抗インテグリン抗体による、ヒト ES 細胞と LN - 511 の接着阻害を示すグラフである。バーは（左から右に）1、6、1、
2、3、4、5、V、V 3、2、3、4（すべて Millipore 製）を示す。IgG は、阻害されない細胞接着の対照として使用された。エラーバーは標準誤差（n = 4）を示す。統計的有意性（P）は、Student t 検定によって計算された。

【図 5 b】図 5 は、hES 細胞表面のインテグリン受容体、及び LN - 511 との接着におけるその役割を示す。図 5 b は、種々の抗インテグリン抗体によって被覆された表面と hES 細胞の接着を示す別のグラフである。バーは（左から右に）1 (100%)、
2、3、4 及び IgG との接着を示す。エラーバーは標準誤差（n = 4）を示す。Student t 検定によって計算された統計的有意性（P）を示す：**、P < 0.01。

【図 5 c】図 5 は、hES 細胞表面のインテグリン受容体、及び LN - 511 との接着におけるその役割を示す。図 5 c は、LN - 511 上で培養された多能性（Sox 2 陽性）hES 細胞における 1 インテグリンサブユニットとインテグリン 6 の同時発現を示す 1 セットの免疫蛍光の図である。拡大率 × 40。

【図 6 a】図 6 は、O3 培地及び動物由来の成分を含まない H3 培地において LN - 511 上で培養された HS207 の代表的な免疫染色分析、RT - PCR、FACS 分析、実時間定量 RT - PCR 及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図 6 a は、O3 培地において LN - 511 及び Matrigel 上で培養された hES 細胞の成長曲線を示す。細胞は、長期実験のために以下に示すように継代された。各 TrypLE (商標) E x press 处理及びそれに続く洗浄後、塊状の細胞の 1/3 のみを使用して、新しい LN - 511 又は Matrigel 被覆皿上にブレーティングした。残りを解離させて単細胞懸濁液とし、数えた。実験をコーティングごとに 2 つの独立した二つ組で実施した。第 5 繼代後、細胞の一部を固定し、免疫蛍光染色によって分析して、細胞の大多数が依然として多能性のマーカー Nanog を発現することを確認した。

【図 6 b】図 6 は、O3 培地及び動物由来の成分を含まない H3 培地において LN - 511 上で培養された HS207 の代表的な免疫染色分析、RT - PCR、FACS 分析、実時間定量 RT - PCR 及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図 6 b は、O3 培地における LN - 511 上の 20 繼代（6か月）後の（Nanog と表示された）抗 Nanog 、抗 Sox 2 (Sox 2) 及び抗 Oct 4 (Oct 4) 抗体による HS207 細胞の免疫染色を示す。右側のパネルは、核の DAPI 染色である。より高い拡大率で示された同じ

10

20

30

40

50

染色。拡大率：×20。バー：0.15mm。

【図6c】図6は、O3培地及び動物由来の成分を含まないH3培地においてLN-511上で培養されたHS207の代表的な免疫染色分析、RT-PCR、FACS分析、実時間定量RT-PCR及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図6cは、(フィーダーと表示された)フィーダー細胞上、O3培地において7継代後のMatrigel上(MG、p.7 in O3)、H3培地において8継代後のLN-511上(LN-511、p.8 in H3)、及びO3培地において27継代後のLN-511上(LN-511、p.27 in O3)で成長したH207細胞から単離された全RNAのRT-PCR分析を示す。多能性マーカーOct4及びNanog；分化マーカーbrachyury、-フェトプロテイン、Sox1及びPax6；並びにグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のハウスキーピング遺伝子に対するプライマーセットを分析した。
10

【図6d】図6は、O3培地及び動物由来の成分を含まないH3培地においてLN-511上で培養されたHS207の代表的な免疫染色分析、RT-PCR、FACS分析、実時間定量RT-PCR及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図6dは、実時間定量RT-PCR分析を使用して、LN-511上及びMatrigel上で培養されたHS207細胞において、実験の異なる時点における多能性マーカーOct4(灰色のバー)及びNanog(黒色のバー)のmRNA転写物の数をフィーダー細胞上で培養されたHS207細胞のそれと比較した。バーは(左から右に)、比較する基準値としての支持層上で培養された対照HS207細胞(フィーダー)における、O3培地において7継代後のMatrigel上で培養されたHS207細胞(MG、p.7 in O3)における、O3において5(LN-511、p.5 in O3)、10(LN-511、p.10 in O3)、16(LN-511、p.16 in O3)、20(LN-511、p.20 in O3)継代後のLN-511上で培養されたHS207細胞における、及びH3において8継代後のLN-511上の細胞(LN-511、p.8 in H3)における、Oct4及びNanog発現のレベルを示す。エラーバーは95%信頼区間を示す。
20

【図6e】図6は、O3培地及び動物由来の成分を含まないH3培地においてLN-511上で培養されたHS207の代表的な免疫染色分析、RT-PCR、FACS分析、実時間定量RT-PCR及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図6eは、異なる時点及び種々の培地において、ウエスタンプロットによって測定され、濃度測定によって定量された、フィーダー細胞、Matrigel及びLN-511上で培養されたHS207細胞における多能性マーカーOct4及びSox2の発現を示す。灰色のバーはOct4の発現レベル、黒色のバーはSox2の発現レベルを示す。略語は図6dと同様である。エラーバーは範囲を表す。
30

【図6f】図6は、O3培地及び動物由来の成分を含まないH3培地においてLN-511上で培養されたHS207の代表的な免疫染色分析、RT-PCR、FACS分析、実時間定量RT-PCR及び定量ウエスタンプロット分析を示す。図6fは、多能性の細胞表面マーカーOct4について、O3培地においてLN-511上で25継代後のHS207細胞のFACS分析を示す。陽性細胞の割合を括弧内に示す。
40

【図7a】図7は、LN-511上の長期継代後のHS207細胞の多能性を示す。3種類の胚葉の組織成分で構成された奇形腫が、LN-511上で15継代の培養後のHS207細胞をSCIDマウスに皮下注射した後に形成された。図7aは、軟骨、HE染色を示す。拡大率×100。

【図7b】図7は、LN-511上の長期継代後のHS207細胞の多能性を示す。3種類の胚葉の組織成分で構成された奇形腫が、LN-511上で15継代の培養後のHS207細胞をSCIDマウスに皮下注射した後に形成された。図7bは、発達中の神経組織及び腸内胚葉を示す。杯細胞は赤色で示される。HE-PAS染色。拡大率×400。

【図7c】図7は、LN-511上の長期継代後のHS207細胞の多能性を示す。3種類の胚葉の組織成分で構成された奇形腫が、LN-511上で15継代の培養後のHS2
50

07細胞をSCIDマウスに皮下注射した後に形成された。図7cは、発達中の腎糸球体、HE染色を示す。拡大率×400。

【図7d】図7は、LN-511上の長期継代後のHS207細胞の多能性を示す。3種類の胚葉の組織成分で構成された奇形腫が、LN-511上で15継代の培養後のHS207細胞をSCIDマウスに皮下注射した後に形成された。図7dは、網膜色素上皮、HE染色を示す。拡大率×400。

【図7e】図7は、LN-511上の長期継代後のHS207細胞の多能性を示す。3種類の胚葉の組織成分で構成された奇形腫が、LN-511上で15継代の培養後のHS207細胞をSCIDマウスに皮下注射した後に形成された。図7eは、LN-511上で20継代後にHS207細胞から形成された胚様体の免疫染色によって、3種類の胚性細胞層のマーカーの発現が明らかになったことを示す：(SMアクチンと表示された)平滑筋アクチン、ネスチン(ネスチニン)、MAP-2(MAP-2)及び-フェトプロテイン(AFP)。下側のパネルは、核のDAPI染色である。10

【図8】図8は、LN-511上で成長した種々のhES細胞の免疫染色分析を示す。図8は、O3培地においてLN-511上の5継代(1か月)後のH1及びH9細胞が多能性のマーカーOct4(緑)、Nanog(緑)及びSox2(赤)を発現したことを示す。DAPI染色は青色である。拡大率×20。

【図9】図9は、LN-511上で20継代後のHS207細胞のGバンドィング染色体分析を示す。

【図10】図10は、多能性の細胞表面マーカー(SSEA-4、Tra1-60、Tra1-81)及び分化の細胞表面マーカーSSEA-1について、O3培地においてLN-511上で20継代後のHS207細胞のFACS分析を示す。SSEA-4、Tra1-60及びTra1-81陽性細胞の割合を括弧内に示す。20

【図11】図11は、多能性のマーカーOct-4及びSSEA-4について、O3培地においてMatrigel上の10継代後のHS207細胞のFACS分析を示す。陽性細胞の割合を括弧内に示す。

【図12】図12は、LN-511、Matrigel及びフィーダーHS207細胞培養物における自発的分化のレベルを示すグラフである。実時間定量RT-PCR分析を使用して、O3培地においてMatrigel上で(白色のバー)、O3培地においてLN-511上で(灰色のバー)、及び血清代替物質に基づく培地においてヒト包皮線維芽細胞層上で(黒色のバー)、培養されたHS207細胞における分化マーカーPax6、Sox17及びSox7のmRNA転写物数を比較した。エラーバーは95%信頼区間を示す。30

【図13a】図13は、O3培地においてLN511上でhESC系HS588の誘導の初期段階を示す1組の図である。図13aは、内部細胞塊の機械的単離及びLN511上の平板培養から4日後の6日目の胚盤胞の内部細胞塊から成長した形態学的に典型的なhESCを示す。

【図13b】図13は、O3培地においてLN511上でhESC系HS588の誘導の初期段階を示す1組の図である。図13bは、O3培地においてLN-511上で継代2における抗Nanog抗体によるHS588細胞の免疫染色を示す。40

【図13c】図13は、O3培地においてLN511上でhESC系HS588の誘導の初期段階を示す1組の図である。図13cは、抗Oct4抗体による同じ細胞の免疫染色を示す。

【図14】図14は、還元及び非還元条件下で3~8%勾配SDS-PAGEを使用した、論文に使用されたヒト組換えLN-511の特性分析を示す。タンパク質は、Sypuro Rubyタンパク質染色によって可視化された。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

ヒト幹細胞をインビトロで未分化状態で培養するための組成物及びプロセスを開示する50

。この点に関して、ヒト胚性幹細胞は、組換えラミニン - 10 (ラミニン - 511) で被覆されたプレート上で培養すると、増殖し、その多能性を維持した。

【0023】

サイトカインの発現、細胞周期調節及び自己複製機序は、ヒトとマウスのES細胞では異なる。例えば、STAT3活性化は、マウスES細胞の自己複製に十分であるが、hES細胞の分化を防止することができない。したがって、マウスES細胞を用いて得られた結果をヒトES細胞に直接外挿することはできない。

【0024】

最近、フィーダーも異種も含まないhES細胞培養システムが報告された。それは、血しょうから精製されたヒトアルブミン、及び培養皿コーティングのためのヒトタンパク質混合物を含む。ヒトタンパク質細胞培養皿コーティングは、IVコラーゲン、ビメンチン、フィプロネクチン及びヒトラミニンを含むことが報告された。ヒトラミニンは、ヒト胎盤由来の分解タンパク質の混合物であることが示された。それは、幾つかのラミニンタイプの断片を含み、しばしば他のBMタンパク質及びフィプロネクチンも含む。したがって、これらのhES細胞状態は可変であり、化学的に明確であるとは考えられず、自己複製を与える基質の成分（単数又は複数）は不明である。

【0025】

本開示においては、本出願人らは、ヒト組換えLN-511単体が長期間の培養においてhES細胞の自己複製を支援することができるかどうか調べた。本出願人らは、ヒト胎児腎細胞（HEK293）において産生されたヒト組換えLN-511であらかじめ被覆された培養皿上でhES細胞系HS420、HS207及びHS40133を培養した。2つの異なる培地O3及びH3を使用した。O3培地は、唯一の動物由来の成分としてウシ血清アルブミンを含む、市販の既知組成mTeSR1培地の改変物であった。H3培地は、ヒト血清アルブミンを含む、異種を含まない既知組成TeSR1培地の改変物であった。使用したヒトアルブミンの潜在的なバッチ間のばらつきを抑制するために、本出願人らは12~14KDa透析膜を使用してタンパク質溶液を透析した。動物由来の成分を含まない細胞を継代するために、TrypLE（商標）Express酵素を使用した。対照細胞を、O3培地においてMatrigel上で、又は血清代替物質に基づく培地においてフィーダー細胞の層上で、培養した。本出願人らは、hESC細胞と種々のECMタンパク質の接着を試験した。LN-511は、基層に最大細胞接触面積を与えた。人工多能性幹（iPS）細胞系もLN-511上で自己複製した。接着は、hES細胞表面で最も豊富であることが示された6-1インテグリンに依存した。LN-511は、hES細胞において発現され、フィーダー依存性細胞培養及び初期胚におけるhES細胞環境の一部としてhES細胞接着、移動及び増殖の天然の基層とすることことができた。

【0026】

多能性ヒト胚性幹細胞は、既知組成培地において組換えヒトラミニン-10 (ラミニン-511) で被覆されたプレート上で培養すると、増殖し、その多能性を少なくとも10日間（20継代）維持することも見いだされた（図1~3）。Oct4、Sox2、Nanogなどの多能性マーカーの発現、及び増殖速度も安定なままであった。

【0027】

本明細書では「自己複製」という用語は、多数の細胞分裂サイクルを通過し、未分化（すなわち多能性）のままである幹細胞の能力を指す。多能性自体は、任意の細胞型に分化する幹細胞の能力を指す。「増殖」（proliferation）という用語は、幹細胞の分裂能力を指す。生存とは、分化型であろうと未分化であろうと、幹細胞の生存能力を指し、分裂又は分化するその能力を幹細胞が維持する必要はない。

【0028】

本開示を以下の非限定的な2組の実施例で更に説明するが、これらの実施例は単なる説明のためのものであって、本開示が、本明細書に列挙された材料、条件、プロセスパラメータなどに限定されるものではないことを理解されたい。別段の記載がないかぎり、割合はすべて重量単位である。

10

20

30

40

50

【実施例】**【0029】****I . 第1の実験セットの方法****細胞培養**

ヒト胚性幹細胞（2つの系を使用した：HS420及びHS207、どちらもProf. Hovatta、Karolinska University Hospital Huddinge、Karolinska Institute、Swedenの好意で提供された）を、既知組成培地、すなわちmTeSR1の類似物において組換えラミニン-10（ラミニン-511）で被覆されたプレート上で培養した。幾つかの点を除いて、培地を（Ludwig, T. E., Bergendahl, V., Levenstein, M. E., Yu, J., Probasco M. D. and Thomsom, J. A. (2006) ; Feeder-independent culture of human embryonic stem cells; Nat Methods 8, 637-646）に記載のように調製した。第一に、組換えヒトFGF basic (R@D Systems)をzbFGFの代わりに使用し、ウシ血清由来のアルブミン（SIGMA-Aldrich、B4287）をBSA画分Vの代わりに使用した。第二に、既製培地に添加されたInsulin-Transferrin-Selenium Supplement (Invitrogen)を、論文に記載された方法の代わりに要素源として使用した。ヒト胚性幹細胞は、TrypLE（商標）Express (GIBCO)に曝露することによって4～6日間隔で塊状の継代であった。細胞を酵素に室温で2分間さらし、次いで培地で2回洗浄し、続いて静かにこすって収集した。細胞の大きい塊を軽いピペット操作によって破壊し、1:3継代した。10

【0030】

(Inzunzaa, J., Gertow, K., Stroemberg, M., A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Aehrlund-Richter, L. and Hovatta, O. (2005) ; Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines in Serum Replacement Medium Using Postnatal Human Fibroblasts as Feeder Cells. Stem Cells 2005; 23: 544-549) 30に記載のように、対照ヒト胚性幹細胞を従来の培地においてヒト包皮線維芽細胞上で維持した。実体顕微鏡下でメスを使用してコロニーを8個の小片に切断することによって、細胞を機械的に継代した。機械的分割を6日間隔で実施した。非分化細胞を、形態によって判断して、各々更なる継代用に選択した。

【0031】**プレートコーティング**

96ウェル組織細胞培養プレート (Sarstedt) を、終夜4で以下の細胞外マトリックスタンパク質の無菌溶液で被覆した：ネズミラミニン-111 (Invitrogen)、ヒト組換えラミニン-332、ヒト組換えラミニン-411 (Kortesmaa, J., Yurchenco, P., and Tryggvason, K. (2000) ; Production, purification, and interactions with integrins. J Biol Chem 275, 14853-14859, 米国特許6,638,907)、ヒト組換えラミニン-511 (Doi, M., Thyboll, J., Kortesmaa, J., Jansson, K., Iivanainen, A., Parvardeh, M., Timpl, R., Hedin, U., Swedenborg, J., and Tryggvason, K. (2002) ; Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. J Biol Chem 277, 12741-12748; U.S. Patent 6,933,273) (すべて、濃度30μg/ml (5μg/mm²)) 4050

、増殖因子が欠乏したMatrigel(商標)(1:30)(BD Biosciences)、ウシのゼラチン1mg/ml(Sigma)、0.1mg/mlポリ-D-リジン(Sigma)。

【0032】

細胞接着アッセイ

付着アッセイを([Extracellular Matrix Protocols, 2000]に記載のように実施した。手短に述べると、上述したように細胞外マトリックスタンパク質で被覆し、1%熱変性BSA溶液でブロックされたMaxiSorp 96ウェルプレート(Nunc)。未分化胚性細胞を細胞密度800細胞/mm²で細胞外マトリックス被覆プレート上で培養し、37℃で1時間付着させた。非接着細胞を洗浄除去し、接着細胞を5%グルタルアルデヒドによって20分間固定し、0.1%クリスタルバイオレットによって染色した。
10

【0033】

RT-PCR:

全RNAをAbsolutely RNA Microprep Kit(Stratagene)を使用して製造者の指示に従ってヒト試料から単離した。オリゴ(dT)12~18プライマー及びSuperscript II逆転写酵素(Invitrogen)を含む反応混合物20μl中の全RNA 0.2μgを使用して、製造者の指示に従って、cDNAを合成した)。可変のcDNA収率を補償するために、各PCR反応のcDNAの量を、ハウスキーピング遺伝子GADPHの発現レベルを標準として使用することによって較正した。(20サイクルにおいて)等量のGADPH PCR産物を生成するcDNA量(データ示さず)を後続のPCR反応に使用した。cDNAをヒト試料のための表1のプライマーを使用して増幅した。(図示したGADPH PCRを含めて)全PCR反応を30サイクル行い、20μlで標準条件下で1UのTaq DNA Polymerase Recombinant(Invitrogen)を使用して実施した。PCR産物を臭化工チジウムを含む1.5%アガロースゲル上で分析した。
20

【0034】

各RNA試料について、逆転写酵素なしのRT-PCRを実施して、ゲノムDNAが単離されないことを確認した。

【0035】

【表1】

表1. RT-PCR用プライマー(ヒト試料)

遺伝子	順方向プライマー	逆方向プライマー	産物 サイズ (bp)	T _a (C)
Oct-4	CGACCATCTGCCGCTTGAG(配列番号1)	CCCCCTGTCCCCCATTCCTA(配列番号2)	573	61
Nanog	AGCATCCGACTGTAAAGAACATTCAC(配列番号3)	CGGCCAGTTGTTTCTGCCACCT(配列番号4)	433	61
GADPH	GAAGGTGAAGGTGGAGTCA(配列番号5)	TTCACACCCATGACGAACAT(配列番号6)	402	59
Pax6	AACAGACACAGCCCTCACAAAC(配列番号7)	CGGGAACTTGAAGTGGAACTGAC(配列番号8)	275	61
AFP	CTTTGGGCTGCTCGCTATGA(配列番号9)	TGGCTTGGAAAGTTGGGTC(配列番号10)	175	59
Brachyury	GAAGGTGGATCTCAGGTAGC(配列番号11)	CATCTCATTGGTGAGCTCCTT(配列番号12)	251	59
Sox1	CTCACTTCCCTCCGCGTTGTTCC(配列番号13)	TGCCCTGGCTTTGTCCCTCATCC(配列番号14)	849	61

【0036】

免疫蛍光:

免疫蛍光では、胚性細胞を4%パラホルムアルデヒドによって96ウェルプレートウェルに固定し、0.1% Triton-Xによって透過処理し、0.1% Tween-20(Sigma)PBS中の10%ウシ胎児血清(Invitrogen)によって1時間
50

ブロックした。一次抗体と一緒に室温で1.5時間インキュベートした。以下のヒト抗原に対する一次抗体を使用した：Oct 4及びSox 2（どちらもR@DS systems製）。（Alexa 488及びAlexa 546で標識された）二次抗体（Molecular probes）及びDAPI（Molecular probes）と一緒に40分間インキュベートした。インキュベーション間に、試料を0.1%Tween-20のPBS溶液で3から5回各10分間洗浄した。試料を蛍光封入剤（Dak o）に保存し、蛍光顕微鏡（Leica）で観察した。

【0037】

第1の実験セットの結果

A. ラミニン-511上で培養されたヒト胚性幹細胞は、既知組成培地においてフィーダーなしで増殖し、多能性のままである。

【0038】

ラミニン-511上では、ヒト胚性幹細胞は、既知組成培地において少なくとも105日間（20継代）多能性のままであることが判明した。

【0039】

形態：ラミニン-511上で培養されたヒト胚性幹細胞の形態は、Matrigel（商標）（Bendall, S., Stewart, M., H., Menendez, P., George, D., Vijayaraghavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bosse', M., Lajoie, G. and Bhatia, M. (2007)；IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells *in vitro*. Nature, 2007 Aug 30; 448(7157): 1015-21.)又は細胞外マトリックス被覆プレート（Klimanskaya, I., Chung, Y., Meissner, L., Johnson, J., West, M., D. and Lanza, R. (2005)；Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet. 2005 May 7-13; 365(9471): 1601-1603）上で培養されたヒト胚性幹細胞のそれと極めて類似した。図1を参照されたい。しかし、上記2つのコーティングとは異なり、組換えヒトラミニン-511は、FDA要件に従って異種を含まない規定された非免疫原性化合物として製造することができ、続いて臨床に使用することができる。

【0040】

RT-PCRマーク：多能性マーク-Oct 4及びNanogは、既知組成培地におけるラミニン-551上で105日間培養されたヒト胚性幹細胞によって、従来の培地におけるヒト線維芽細胞包皮上で培養された多能性胚性幹細胞と同程度に発現された。図2を参照されたい。

【0041】

免疫蛍光：ヒト胚性幹細胞は、従来の環境で成長した胚性幹細胞と同程度にOct 4及びSox 2のような多能性マークを発現した。図3を参照されたい。

【0042】

I I . 第2の実験セットの方法

ヒトES細胞培養

Karolinska Instituteの本発明者らの研究室で最初に誘導されたHS207、HS420及びHS401のヒトES細胞は、LN-511被覆実験皿上で（1）既知組成O3培地（mTeSR1培地の変形物）及び（2）異種を含まない既知組成H3培地（TeSR培地の変形物）において37、5%CO₂で培養された。臨床等級の純度96%以上のヒトアルブミンをOctapharma AB、Stockholmから購入した。最初に、系の細胞を、無菌ナイフを使用して慎重にはがし取ることによって、フィーダー細胞層から小片でLN-511上に移した。ほんの数滴の新しい培地が

10

20

30

40

50

添加された継代後の第1日を除いて、恒温器で1時間予熱した新しい培地を1日1回細胞に供給した。TrypLE (商標) Express (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland) に室温で1.5分間曝露することによって6~7日間で1回細胞を常法に従って継代した。次いで、それを皿上で培地で2回洗浄し、静かにこすり、ピペット操作によって(単細胞懸濁液ではなく)小片に破壊し、1:2又は1:3比(多数の細胞が必要な場合は最高1:6比)で培養した。同じ系の対照細胞をO3培地におけるMatrigel上で、及びヒト包皮線維芽細胞上で、培養した。実験皿を被覆した。使用前に、皿を恒温器で1時間予熱し、次いで予熱培地で2回慎重に洗浄した。

【0043】

10

O3培地(mTeSR1の改変物)の調製

L-アスコルビン酸がないこと以外はLudwig, Nat. Methods 3:6 37-646 (2006) に記載のようにして、チアミン165mg及び還元型グルタチオン50mgを蒸留水500mlに添加することによってストックAを調製した。蒸留水をGIBCO Invitrogen Corporationから購入した。次いで、溶液をろ過し(0.22μmフィルター)、等分し、-20で凍結させた。

【0044】

20

ストックBを、セレン、インスリン及びホロ-トランスフェリンないこと以外はLudwigに記載のとおりに調製した。次いで、フェノールレッド6μgを添加し、慎重に攪拌し、ろ過した。ストックBは、+4で最高2か月貯蔵することができた。

【0045】

トランスフォーミング増殖因子(TGF)-1、ピペコリン酸、-アミノ酪酸(GABA)及びLiClのストックを調製し、Ludwigに記載のように貯蔵した。

【0046】

30

O3培地100mlを調製するために、D-MEM/F12培地にストックB20ml、TGF-1ストック200μl、ピペコリン酸ストック13μl、GABAストック200μl、LiClストック200μl、MEM非必須アミノ酸溶液(GIBCO Invitrogen Corporation)1ml、200mM L-グルタミン溶液(GIBCO Invitrogen Corporation)1ml及びインスリン-トランスフェリン-セレン補助剤(GIBCO Invitrogen Corporation)2mlを補充した。塩バランスを補償し、培地のpHを調節するために、NaCl 145mg及びNaHCO₃ 56mgを添加した。次いで、溶液を徹底的に混合し、室温における培地のpHを10N NaOHを用いて7.4に調節した。溶液を0.22μmフィルターを使用してろ過し、次いで既知組成の脂質濃縮物(GIBCO Invitrogen Corporation)200μlを添加した。

【0047】

O3培地は、+4で最高1か月貯蔵することができた。使用前に、組換えヒトFGF basic(R@D Systems Europe LTD, Abingdon, England)96ng/ml及びアスコルビン酸(Sigma Aldrich)40μg/mlを培地に補充した。

40

【0048】

H3培地(TeSR1の改変物)の調製

O3培地の項で上述したように、ストックAを調製した。

【0049】

ヒトアルブミン溶液(Albuminativ)をOctapharma AB、Stockholm, Swedenから購入した。溶液を12~14Kda透析膜(Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA)を使用して細胞培養リン酸緩衝食塩水(PBS)で3回各3時間透析し、続いてD-MEM/F12培地で1回透析した。光学濃度を測定して、溶液中のタンパク質の最終濃度を測定した。この場合、(濃度に応じた)適切な体積の透析ヒトアルブミン溶液を使

50

用してストックBを混合して、(上記)O3培地のストックBの場合と同じ濃度のアルブミンを得た。微量元素及びフェノールレッドを添加し、水の代わりにD-MEM/F12を使用した。

【0050】

TGF-1のストックを、ウシアルブミンの代わりに透析ヒトアルブミンを使用したこと以外はLudwigに記載のとおりに調製した。他のストックをすべて上述のように調製した。

【0051】

H3培地をO3の場合と同様に混合した。ただし、NaClは全く添加されなかった。

【0052】

使用前に、担体を含まない組換えヒトFGF basic (R@D Systems Europe LTD, Abingdon, England) 96ng/ml及びアスコルビン酸(Sigma Aldrich) 40μg/mlを培地に補充した。

【0053】

ラミニン及び他のコーティング材料

BioLamina、AB、Stockholmから入手可能なヒト組換えLN-511を、完全長ラミニン1、1及び5構築物を逐次的に移入したヒト胎児腎細胞(HEK293; ATCC CRL-1573)中で産生させた。タンパク質産生のために、HEK293細胞を、Glutamax I及び4.5g/lグルコース(GIBCO Invitrogen Corporation)を補充したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で最高6日間培養した。LN-511分子を抗FLAG基質(Sigma)を使用して親和性精製し、次いで3~8%(図14)及び4~15%勾配SDS-PAGEを使用して還元及び非還元条件下で特性分析した。ポリフッ化ビニリデン膜上で鎖のSypro Ruby(Bio-Rad)タンパク質染色及び免疫染色を使用して、タンパク質を可視化した。タンパク質を更に特徴づけるために、ラミニン5、1及び1鎖に対する抗体を使用したウエスタンプロット分析を実施した。調製物は、正しいサイズの全3本の鎖を含んだ。ヒト組換えラミニン-411は、LN-511と同様に産生された。他のECMタンパク質はすべて上述のように得られた。

【0054】

細胞接触面積測定

MaxiSorp 96ウェルプレート(Sarstedt, Nürnberg, Germany)を上述したようにECMタンパク質で被覆し、1%熱変性BSA溶液によってブロックした。未分化ES細胞を分割して単細胞懸濁液とし、40μm無菌細胞篩によってろ過し、細胞密度700細胞/mm²でECM被覆プレート上にブレーティングし、37℃で1時間付着させた。非接着細胞を洗浄除去し、接着細胞を5%グルタルアルデヒドによって20分間固定し、洗浄し、0.1%クリスタルバイオレットによって染色した。6~10個の無作為な場の写真を撮影し、Volocityイメージングソフトウェア(Improvision, Waltham, MA, http://www.improvision.com)を使用して13~93個の細胞の細胞接触面積を測定した。非拡散ヒトES細胞の細胞面積を測定するために、細胞をポリ-D-リジン上で20分間培養し、固定し、上述のように染色した。

【0055】

抗インテグリン抗体を使用した接着ブロッキングアッセイ

接着ブロッキングアッセイを実施した。手短に述べると、プレートをLN-511で被覆し、1%熱変性BSA溶液でブロックした。ES単細胞懸濁液を機能阻害抗インテグリン抗体(供給業者によって推奨された濃度)と一緒に30分間インキュベートし、LN-511被覆プレートにブレーティングし、37℃で1時間付着させた。非接着細胞を除去し、残りの細胞を固定し、接着細胞を5%グルタルアルデヒドによって20分間固定し、洗浄し、0.1%クリスタルバイオレットによって染色した。1時間後、クリスタルバイオレットを細胞から10%酢酸によって抽出し、570nmにおける光学濃度を測定する

10

20

30

40

50

ことによって定量した。

【0056】

抗インテグリン抗体アッセイによって被覆された表面との細胞接着

アッセイは、抗インテグリン特異抗体で被覆された表面に付着した細胞を保持するのに十分な量で発現されるインテグリン受容体を特定するように設計された。MaxiSorp 96 ウェルプレート(Nunc)を精製抗インテグリン抗体を用いて濃度10 μg/mlで+4で終夜被覆し、その後1%BSA溶液で洗浄し、ブロックした。ES細胞を抗体被覆プレートにプレーティングし、37で1時間付着させた。付着しない細胞を除去し、残りの細胞を固定し、染色し、上述したように定量した。エラーバーはSEMを示す。

10

【0057】

RT-PCR

全RNAをAbsolutely RNA Microprep Kit(Stratagene、La Jolla CA、www.stratagene.com)を使用して製造者の指示に従って単離した。オリゴ(dT)12~18プライマー及びSuperscript II逆転写酵素(GIBCO Invitrogen Corporation)を含む反応混合物20 μl中の全RNA 0.2 μgを使用して、製造者の指示に従って、cDNAを合成した。可変のcDNA収率を補償するために、各PCR反応のcDNAの量を、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のハウスキーピング遺伝子の発現レベルを標準として使用することによって較正した。(20サイクルにおいて)等量のGAPDH PCR産物を生成するcDNA量(データ示さず)を後続のPCR反応に使用した。hES細胞の多能性又は分化の種々のマーカーの発現を分析するために、表2に記載のプライマーを使用してcDNAを増幅した。種々のラミニン鎖の発現を分析するために、プライマーを使用した。(図示したGAPDH PCRを含めて)全PCR反応を30サイクルを行い、20 μlで標準条件下で1UのTaq DNA Polymerase Recombinant(GIBCO Invitrogen Corporation)を使用して実施した。PCR産物を臭化エチジウムを含む1.5%アガロースゲル上で分析した。各RNA試料について、逆転写酵素なしのRT-PCRを実施して、ゲノムDNAが単離されないことを確認した。

20

【0058】

【表2】

表2. RT-PCR用プライマー(ヒト試料)

遺伝子	順方向プライマー	逆方向プライマー	産物 サイズ (bp)	T _a , (C)
Oct-4	CGACCATCTGCCGCTTGAG (配列番号1)	CCCCCTGTCCCCCATTCCTA (配列番号2)	573	61
Nanog	AGCATCCGACTGTAAAGAACCTTCAC (配列番号3)	CGGCCAGTTGTTTCTGCCACCT (配列番号4)	433	61
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号5)	TTCACACCCATGACGAACAT (配列番号6)	402	59
Pax6	AACAGACACAGCCCTCACAAAC (配列番号7)	CGGGAACCTTGAACCTGGAACTGAC (配列番号8)	275	61
α-フェトプロテイン(AFP)	CTTGGGCTGCTCGCTATGA (配列番号9)	TGGCTTGGAAAGTTGGGTC (配列番号10)	175	59
Brachyury	GAAGGTGGATCTCAGGTAGC (配列番号11)	CATCTCATTGGTGAGCTCCTT (配列番号12)	251	59
Sox1	CTCACTTCTCCCGCGTTGCTTCC (配列番号13)	TGCCCTGGTCTTGTCCCTTCATCC (配列番号14)	849	61

40

【0059】

免疫蛍光

免疫蛍光試験のために、ES細胞を培養し、8ウェルスライドチャンバー(BD Biosciences)又は96ウェルプレートウェルに4%パラホルムアルデヒドによつ

50

て固定し、0.1% Triton-X によって透過処理し、0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含むリン酸-食塩水緩衝剤 (PBS) 中の 10% ウシ胎児血清 (GIBCO Invitrogen Corporation) によって 1 時間ブロックした。一次抗体と一緒に室温で 1.5 時間インキュベートした。二次抗体及び 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI, Molecular Probes) と一緒に 40 分間インキュベートした。インキュベーション間に、試料を 0.1% Tween-20 の PBS 緩衝剤溶液で 3 から 5 回洗浄した。試料を蛍光封入剤 (Dako, Glostrup, Denmark) に保存し、蛍光顕微鏡 (Leica, Heerbrugg, Switzerland) で観察した。

【0060】

10

種々のmRNAのリアルタイムPCR定量

全 RNA を単離し、RT-PCR の項で上述したように cDNA を合成した。実時間定量 RT-PCR Taqman アッセイを、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して実施した。対象とする mRNA のプライマー及びプローブを含む pre-developed gene expression assay mix (Applied Biosystems) を使用して全反応を四つ組で実施した。各実験の追加の反応は、RNA 入力を正規化するための GAPDH の pre-developed gene expression assay mix を含んだ。全データを 7300 System SDS Software v1.4 によって分析した。

【0061】

20

ウエスタンプロット及び濃度測定分析

LN-511 上で培養後、hES 細胞を収集し、数え、遠心分離によってペレット化し、非還元 SDS-PAGE 試料緩衝剤と 2000 細胞 / μl の等濃度に混合し、5 回 15 秒間超音波処理した。勾配 4 ~ 12% ゲルを SDS 電気泳動に使用し、タンパク質を PVDF 膜に移した。膜を 5% 乳の PBS 溶液 - 0.1% Tween 緩衝剤で 2 時間ブロックした。0.1% Tween 緩衝剤を含む 5% 乳の PBS 溶液中の Oct4 及び Sox2 に対する一次抗体 (どちらも Millipore 製) を膜と一緒に +4° で終夜インキュベートした。4 回洗浄後、HRP 複合化二次抗体の 0.1% Tween 緩衝剤を含む 5% 乳 PBS 溶液 (希釈 1 : 1000) を膜と一緒に室温で 40 分間インキュベートし、PBS で 5 回洗浄した。Amersham Biosciences 製化学発光 HRP-基材を可視化に使用した。フィルムを 2,400 dpi で走査し、ChemiImager 5500 プログラム (1D-Multi Line 濃度測定モード) によって分析した。Matrigel 上及びフィーダー細胞上で培養されたヒト ES 細胞を正の対照として使用した。

【0062】

30

FACS 分析

細胞をトリプシン / EDTA を用いて培養皿から除去し、解離させて单細胞懸濁液とし、氷冷 FACS 緩衝剤 (Hanks 緩衝剤中 2% ウシ胎仔血清、0.1% アジ化ナトリウム) に再懸濁させた。SSEA-4、SSEA-1 (どちらも R&D Systems, Minneapolis, MN USA 製)、Tra1-60 又は Tra1-81 (どちらも Millipore, Billerica, MA 製) に対する一次抗体と一緒に氷上で 1 時間インキュベートした。次いで、細胞を氷冷 FACS 緩衝剤で 3 回洗浄した。その後、細胞を Alexa Fluor 抗マウス二次抗体 (GIBCO Invitrogen Corporation) の 1 : 400 希釈を含む FACS 緩衝剤中で 30 分間暗所でプローブし、4 回洗浄した。対照細胞をマウス免疫グロブリン、続いて上述したように二次抗体と一緒にインキュベートした。細胞を FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) によって分析した。データを CellQuest ソフトウェア (Becton Dickinson) によって分析した。データを CellQuest ソフトウェア (Becton Dickinson) によって分析した。

40

50

on) によって分析した。Oct 4 発現の分析も実施した。

【0063】

核型分析

細胞系の核型分析を標準 Q バンディング技術を使用して継代 20 で LN - 511 上で実施した。細胞の試料をコルセミド KaryoMAX (0.1 µg / ml; Gibco Invitrogen Corporation) を用いて最高 4 時間処理し、続いて TrypLE (商標) Express (Gibco Invitrogen Corporation) を用いて解離させた。細胞を遠心分離によってペレット化し、予熱した 0.0375 M KC1 低張液に再懸濁させ、10 分間インキュベートした。遠心分離後、細胞を固定液 (3 : 1 メタノール : 酢酸) に再懸濁させた。中期拡散培養物 (spread) をガラス顕微鏡スライド上で調製し、トリプシンに短時間曝露して G - バンド染色し、4 : 1 Gurr's / Leishmann's 染料 (Sigma-Aldrich Co.) で染色した。最小 10 個の中期拡散培養物を分析し、追加の 20 個を数えた。
10

【0064】

奇形腫形成

若い (7 週齢) 重症複合免疫不全 (SCID) マウスの精巣嚢下の約 106 個の細胞を移植して奇形腫形成実験を実施した。各細胞系当たり 3 匹の動物を使用した。奇形腫成長を触診によって毎週測定し、マウスを移植から 8 週間後に屠殺した。奇形腫を固定し、切片をヘマトキシリンとエオシン (HE) 又はヘマトキシリン、エオシン及び PAS (HE - PAS) で染色した。全 3 つの胚性生殖系列層の組織成分の存在が、染色切片から分析して示された。動物実験はすべて、Karolinska University Hospital の感染のない動物施設で倫理委員会の承認に従って実施された。
20

【0065】

胚様体形成

ES 細胞を継代のために上述したように LN - 511 被覆細胞培養皿から解離させ、小片に分解し、懸濁 96 ウエルプレート (Sarstedt) 中で培養した。これに使用した培地は、2 mM L - グルタミン、20 % ウシ胎仔血清 (GIBCO Invitrogen Corporation)、0.1 mM - メルカプトエタノール (GIBCO Invitrogen Corporation) 及び 1 % 非必須アミノ酸 (GIBCO Invitrogen Corporation) を補充した Knockout DMEM (GIBCO Invitrogen Corporation) であった。懸濁状態で 1 週間後、胚様体をゼラチン被覆組織細胞培養 96 ウエルプレート (Sarstedt) に移し、1 週間培養し、次いで固定し、全 3 種類の胚性生殖系列層のマーカーに対する抗体 (平滑筋アクチン、ネスチニン、MAP - 2 及び - フェトプロテイン、全 3 種類の抗体は Millipore 製であった) で染色し、免疫蛍光の項で上述したように分析した。
30

【0066】

統計

統計的有意性を不等分散の Student の両側 t 検定によって判定した。

【0067】

第 2 の実験セットの結果

A . LN - 511 との強力な接着は、ヒト ES 細胞と基層の大きい接触面積をもたらす。
40

【0068】

細胞の増殖は、その接着基層との細胞接触面積に大きく依存することが知られている。この考えは、種々のラミニン及び他の ECM タンパク質とのマウス ES 細胞の接着、並びに種々のラミニン及び他の ECM タンパク質上でのその増殖に関する本発明者らの以前の知見と一致する。種々の ECM タンパク質とのヒト ES 細胞の接着性を比較するために、本出願人らは、LN - 511、LN - 332、LN - 411、LN - 111、Matrix gel 又はポリ - D - リジン基層上でヒト ES 細胞接着アッセイを実施した (図 4a 及び
50

4 b)。LN - 511上で成長した接着ヒトES細胞の平均接触面積は、Matrigel上培養された細胞より約1.6倍高く、LN - 332上で培養された細胞より約1.2倍高かった(図4b)。試験した他のコーティング上の胚性幹細胞の拡散は、LN - 511上のそれよりもかなり小さかった。

【0069】

B.HS207、HS420及びHS401細胞はLN - 511を発現する。

【0070】

幾つかのヒトES細胞系の細胞は、ラミニン5、1及び1鎖を発現することが報告された。それがその系の独特の性質であるかどうかを解明するために、本出願人らは、HS207、HS420及びHS401の細胞から生ずるcDNAのRT - PCRを、種々のラミニン鎖に特異的なプライマーを使用して実施した。1、2及び2と一緒に10

5、1及び1ラミニン鎖の全3種類の転写物は容易に検出でき、LN - 511が全3種類の系のhESC細胞において発現されることを示した(図4c)。興味深いことに、以前の報告と一致して、3及び3ラミニン鎖の転写は記録されず、LN - 332が胚性細胞において産生されなかったことを示唆している。

【0071】

C.LN - 511との接触は、ヒトES細胞において高度に発現されるインテグリン61に依存する。

【0072】

LN - 511とのhES結合に強力に関与するインテグリン受容体を特定するために、本出願人らは接着ブロッキングアッセイを実施した。胚性細胞の単細胞懸濁液をLN - 511被覆皿上で種々のインテグリン受容体に対する機能阻害抗体を含む培地内でインキュベートした。試験したすべてのインテグリンサブユニットのうち、6及び1は、これらの条件下でLN - 511との相互作用に関与する最も重要なものであった(図5a)。単細胞懸濁液はヒトES細胞に有利な状態ではないので、実験を3回繰り返して、同じ結果を得た(データ示さず)。

20

【0073】

最近、61は、hES細胞表面で最も豊富なインテグリンアイソフォームであることが示された。hES細胞表面のインテグリンサブユニット量の問題に更に対処するために、本出願人らは、抗インテグリン抗体をプラスチック表面に固定し、付着したhES細胞に結合し、それを保持することができる抗体を特定した。本出願人らは、1インテグリンサブユニットに対する抗体が最強の接着を与えるものの、2、3及び4に対する抗体が、表面にはるかに弱く付着した細胞を保持することを見いだした(1に対する抗体との接着に比べてそれぞれ19%、4%及び4%)(図5b)。

30

【0074】

免疫蛍光染色によって、未分化(Sox2陽性)hES細胞における6及び1インテグリンサブユニットの発現、及び細胞表面のそれらの共存が確認された(図5c)。

【0075】

D.ヒトES細胞は、異種を含まない既知組成培地におけるヒト組換えLN - 511上で少なくとも4か月自己複製する。

40

【0076】

LN - 511の自己複製支援能力を試験するために、本出願人らは、3種類のhES細胞系をO3及びH3培地で培養した。HS207、HS420及びHS401細胞系は、両方の培地で活発に増殖した。通常、細胞は、小塊で6~7日ごとに1:2又は1:3の比で継代されたが、多数の細胞が必要な場合は、1:6の比で継代することができた。細胞は、両方の培地で類似した増殖速度及び表現型を示した。図6aに示すように、LN - 511上のヒトES細胞は、少なくともMatrigel上で成長した細胞と同じ安定した速度で増殖した。記述時点で、HS420、HS207及びHS401系は、O3培地においてそれぞれ28、27及び25継代であった(培養5~6か月)。核型は、20継代後の全3種類の系で正常であった(図9)。HS420及びHS207系は、それまで50

、H3においてそれぞれ29及び27継代増殖した(5か月)。免疫蛍光及びRT-PCR分析によれば、hES細胞は、Oct4、Nanog、Sox2などの多能性マーカーの高い発現レベルを維持した(図6b及び6c)。

【0077】

hES細胞を継代するときには、それらは、単細胞懸濁液としてではなく、小塊でブレーティングされた。興味深いことに、翌日既に細胞は表面に単層として拡散した(ごく薄い円板状)。これは、LN-511被覆表面との親和性が細胞間接着に匹敵する、又はそれよりもさらに高いことを示唆している。通常、96ウェル培養プレート上にブレーティングされると、細胞は、まず、薄いコンフルエントな層を形成し、その後、細胞の上方に成長することによって細胞層を形成し始めた。LN-511上の単層とフィーダー又はMatrigel上で成長する細胞には差があり、細胞はより不均質であり、より高濃度のコロニー状で出現した。10

【0078】

定性的にでも、安定な増殖速度を有するOct4及びSox2陽性細胞は、多能性を失う得る。特定の多能性マーカーの発現を定量するために、本出願人らは、LN-511上で培養されたhES細胞の試料を異なる時点での収集し、実時間定量RT-PCR及び定量ウエスタンプロット分析を使用して、主な多能性マーカーの発現レベルをMatrigel上又はフィーダー細胞層上で培養された細胞と比較した(図6d及び6e)。実時間定量RT-PCRによれば、両方の培地で培養されたhES細胞のOct4及びNanog発現レベルは、時間とともに低下せず、Matrigel上で培養された細胞よりも安定して高く、フィーダー細胞上で培養された細胞の発現レベルに匹敵した。ウエスタンプロットの定量は、Oct4及びSox2で類似した結果を示した。蛍光活性化細胞選別(FACS)によるLN-511上で培養された細胞の分析によれば、大多数の細胞は、多能性のマーカーOct-4、SSEA-4、TRA1-60及びTRA1-81を発現し、同時に、SSEA-1を微量しか発現しない(図6f、図10)。Matrigel上で培養されたヒトES細胞の同様の分析によって、わずかに少ないOct-4及びSSEA-4陽性細胞が明らかになった(図11)。20

【0079】

LN-511、Matrigel及びフィーダー上のhES培養物における自発的分化レベルを評価するために、本出願人らは、分化マーカーPax6、Sox17及びSox7の発現レベルを比較した。実時間定量RT-PCRによって、20継代(4か月)後のLN-511培養物と4継代(1か月)後のMatrigel培養物における全3種類のマーカーの発現レベルが類似していることが明らかになった(図12)。30

【0080】

LN-511が新しいhES細胞系の誘導に有用であり得るかどうかを試験するために、本出願人らは、3個の6日目の胚盤胞の内部細胞塊を単離し、それをLN-511上にブレーティングした。細胞は、コーティングに容易に付着し、hES細胞に典型的な増殖物(outgrowth)を生じた(図13a)。培養10日後、増殖物を小片に機械的に解離させ、その一部を免疫染色すると、多能性のマーカーNanog及びOct4の発現を示した(図13b及び13c)。実験は、倫理委員会の承認に従って実施された。40

【0081】

E.ヒトES細胞は、LN-511上で培養4か月後にヒト胚の全3種類の生殖系列に分化することができる。

【0082】

O3培地においてLN-511上で15、20及び20継代培養されたHS207、HS420及びHS401細胞、並びにH3培地において23継代培養されたHS207細胞は、重症複合免疫不全マウス(SCID)の精巣に移植後、奇形腫を形成した。染色切片の分析によって、細胞がヒト胚の全3種類の生殖系列の細胞に分化する能力が確認された(図7a~7d)。発生の可能性を更に調べるために、O3培地においてLN-511上で20継代後の全3種類のhES系の細胞を、胚様体の形成及びそれに続く全3種類の50

胚性胚葉のマーカーの免疫染色によってインビトロで調べた。染色によって、中胚葉（平滑筋アクチン）、外胚葉（ネスチン及びMAP-2）及び内胚葉（α-フェトプロテイン）マーカーの発現が明らかになった（図7e）。これは、細胞の多能性の更なる証拠である。

【0083】

F. LN-511上の種々のヒトES細胞系自己複製

LN-511が種々のhES系の自己複製を支援することができるかどうか判定するために、本出願人らは、O3又はmTeSR1培地におけるタンパク質上で培養された、十分に特徴づけられ、広く用いられるH1及びH9 hES系を培養した。H1及びH9細胞の表現型及び増殖速度は、同じ条件下でHS207、HS420及びHS401細胞と類似した。免疫蛍光分析によれば、LN-511上の培養5継代（1か月）後、H1及びH9細胞は、Oct4、Nanog、Sox2などの多能性マーカーの発現を維持した（図8）。

10

【0084】

I.II. 考察

本試験によれば、LN-511は、異種を含まない環境における培養においてヒトES細胞の生存及び自己複製を支援する人工的微小環境を少なくとも20継代又は4か月提供した。重要なことには、細胞は、その長期のLN-511上の培養後に、ヒト胚の全3種類の生殖系列の細胞系譜を含む奇形腫を形成した。異種もフィーダーも含まない既知組成hES細胞培養システムが大いに必要とされるので、本明細書に記載のシステムは、その問題の解決策を提供することができる。

20

【0085】

LN-511は、このタンパク質がヒトES細胞の天然の起源である胚盤胞の内部細胞塊において検出されたので、ヒト胚における幹細胞の自然微小環境の一部である可能性がある。さらに、LN-511は、インビトロでフィーダー細胞上で培養されたヒト胚性幹細胞のコロニー中で発現される。さらに、ヒトES細胞はLN-511自体を発現し（図4c）、このタンパク質はES細胞の構築を促進する。これは、フィーダー細胞層上のその自己複製に極めて重要である。LN-511は、hES細胞の自然環境の一部であるので、ヒトES細胞をインビトロで自己複製するための生物学的に関連したコーティング基質を提供することができる。最近、hES細胞がLN-111、LN-332、LN-511などの幾つかの組換えヒトラミニン上で96時間多能性のままいることが報告された。しかし、マウスES細胞を使用した以前の研究によれば、ES細胞自己複製に対する基質分子の能力を実証するために、細胞をより長く培養することが重要である。該研究では、マウスES細胞は、LN-511とLN-332の両方で少なくとも169日間生存し、増殖したが、LN-511上で培養されたマウスES細胞のみが生殖細胞系に適格なキメラマウスを生成することができた。

30

【0086】

hES細胞が、新しいLN-511被覆プレートに塊状で継代された後、単層を形成する傾向にあったことは興味深い。これは、LN-511が、通常、移動可能なヒトES細胞を与え、したがって可溶性栄養素及び増殖因子の移動が困難な高密度多層クラスターの形成を回避できることを示唆している。LN-511上で培養されたhES細胞に対する可溶性因子の利用能は、フィーダー又はMatrigel上で培養したときに過成長したES細胞コロニーの中央部で通常見られる自発的分化及び死亡を回避するのに役立ち得る。hES細胞の単層は、可溶性因子の同等の利用能によってより均質な分化細胞集団を生成することができるので、分化手順の開発にも有益であり得る。

40

【0087】

ヒトES細胞の集団はすべて、恐らくは自発的分化に帰因するある割合の分化細胞を含む。人工的微小環境は、それにコロニーを形成し、自己複製するために、非分化ヒトES細胞に競合の優位性を与えるべきである。本出願人らは、実験中にポジティブ選択を行わなかったが、それでも、本出願人らは、FACSを使用して、未分化ヒトES細胞の割合

50

が実験全体を通して安定で高いことを示した(図6f)。

【0088】

本出願人らは、LN-511へのヒトES細胞の付着機序が、6-1インテグリン受容体との結合にも大きく依存することを示した(図5a)。さらに、本出願人らは、1インテグリンに対する抗体が2、3又は4インテグリンよりも強力なヒトES細胞の付着を支援することを認めた。これは、細胞接着における1含有インテグリンの枢要な役割を強調するものである(図5b)。最近、6-1は、hES細胞表面24で最も豊富なインテグリンアイソフォームであることが判明した。これらの観察に基づいて、本出願人らは、6-1インテグリンを多量に発現するヒトES細胞が、素早く付着し、LN-511被覆表面に効率的に移動することができ、その結果LN-511被覆表面はそれらの自己複製を促進することを示唆する。したがって、LN-511の役割は、ヒトES細胞に表面との限局的な接着接触点を与える、その上の移動を可能にすることかもしれない。LN-511の発現が初期胚に限定されず、多数の成体組織の基底膜において見られるという事実は、この考えを支持するものである。
10

【0089】

時間的に、LN-511被覆実験プレート上のヒトES細胞自己複製で得られた本結果は、マウスEHS肉腫由来のMatrigel又はヒトフィーダー細胞上で得られたものと少なくとも同程度に良好である。しかし、ヒトLN-511コーティングの完全に既知組成の、異種を含まない組成物は、標準化された不变の科学的な将来の臨床応用の観点から、かなりの利点を有し得る。さらに、既知組成基層は、同じ目的でフィーダー細胞を使用するのと比較して主要な利点である。というのは、フィーダー細胞は、サイトカインなどの生理活性分子のその産生が変動し得るものであり、増殖因子及び他のタンパク質はほとんど未知であり、それらは、微生物及びウイルス混入のリスク、並びに結果におけるバッチ間のばらつきも引き起こし得る。したがって、この研究において記述されるLN-511に基づく異種もフィーダーも含まないヒトES細胞培養システムは、この問題の重要な解決策となり得る。大部分の国では、規制当局が、ヒト療法への使用が意図されたあらゆる試薬に厳格な規則を適用する。ヒト組換えLN-511は、ヒト細胞において産生される既知組成のタンパク質であるので、細胞療法用ヒト細胞の開発に適切なタンパク質を生産することができる製造手順を確立することが可能である。製造は、医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準(GMP)の実験室に容易に取り入れることができる。
20

【0090】

TesR1培地は、Matrigelと併用するために処方された。それは、多数の増殖因子を極めて高濃度で含む。LN-511は、hES細胞のより良好な拡散及び主要な多能性マーカーの高い平均発現を与えたので、増殖因子、特にbFGFの用量を削減するために、培地組成を最適化する可能性を広げる。Matrigelとは異なり、LN-511は、バッチごとのコーティングで安定である規定された均質なタンパク質分子である。hES細胞をインビトロで培養する、より規定された環境の使用は、分化の分子機構を明らかにし、理解するのに役立ち、インビトロでのヒトES細胞の分化経路を設計するためのより制御可能な条件を提供することができる。

【0091】

特定の実施形態を記述したが、現在予期しない又はし得ない代替形態、改変形態、変更形態、改善形態及び実質的均等形態が本出願人ら又は他の当業者に生じ得る。したがって、提出された、さらに、補正され得る、添付の特許請求の範囲は、かかる代替形態、改変形態、変更形態、改善形態及び実質的均等形態すべてを包含するものとする。
40

【図1】

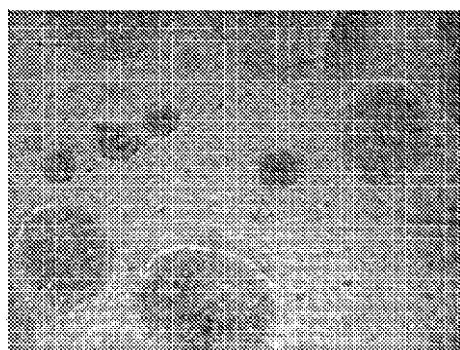


Fig. 1

【図4 a】

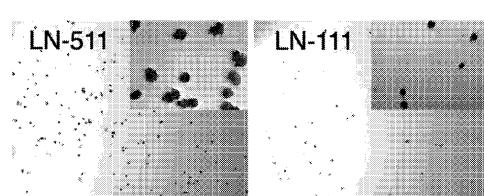


Fig. 4a

【図5 c】

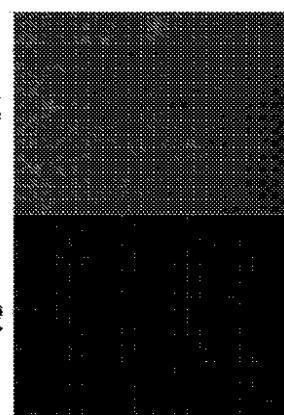


Fig. 5c

【図6 b】

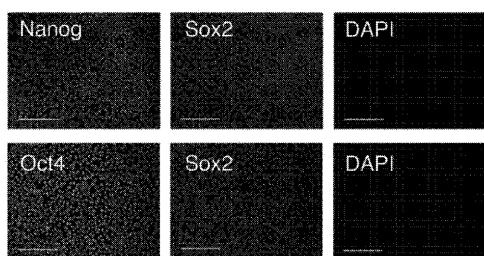


Fig. 6b

【図7 a】

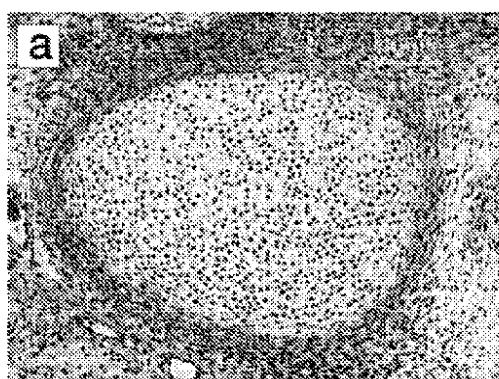


Fig. 7a

【図7 b】

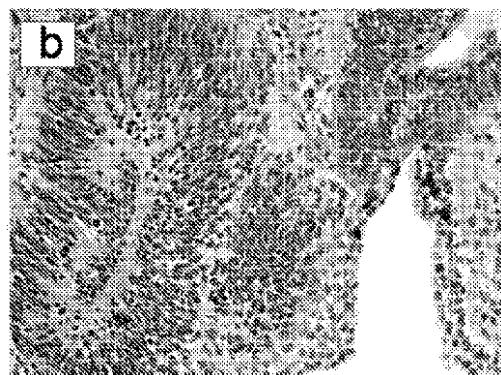


Fig. 7b

【図 7 c】

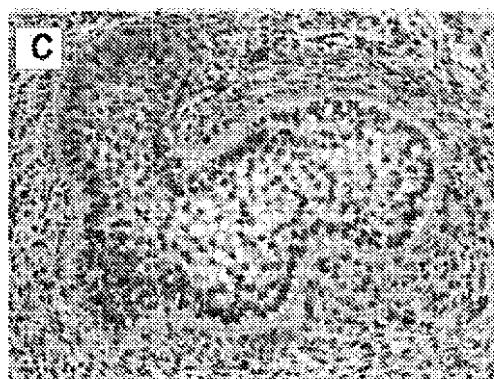


Fig. 7c

【図 7 d】

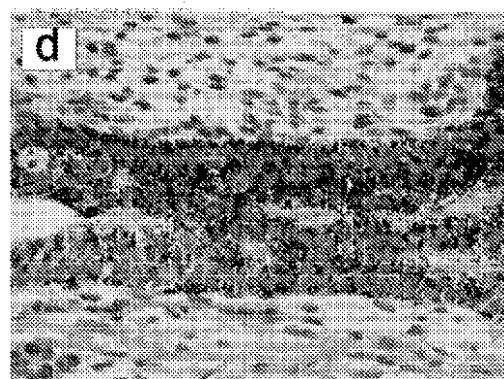


Fig. 7d

【図 8】

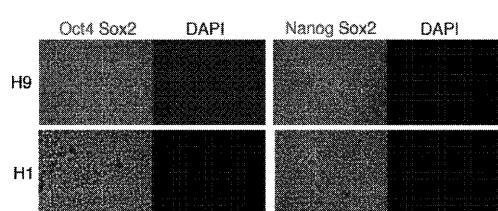


Fig. 8

【図 9】

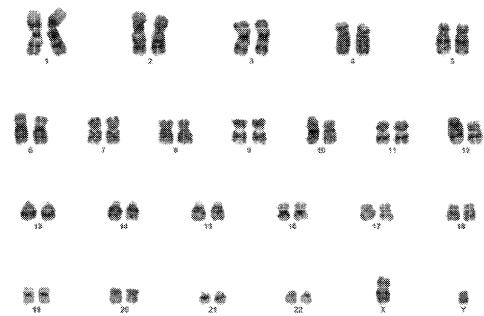


Fig. 9

【図 13 b】

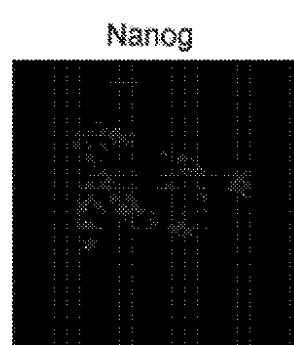


Fig. 13b

【図 13 a】

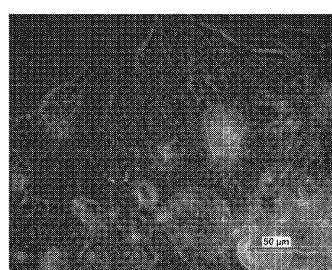


Fig. 13a

【図 1 3 c】

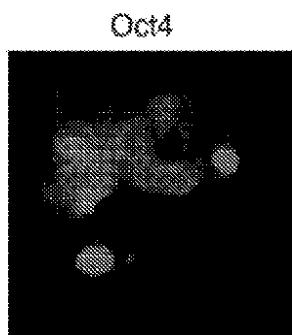


Fig. 13c

【図 2】

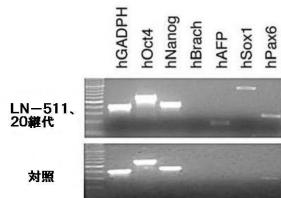


Fig. 2

【図 3】

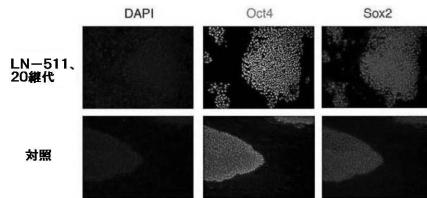


Fig. 3

【図 4 b】

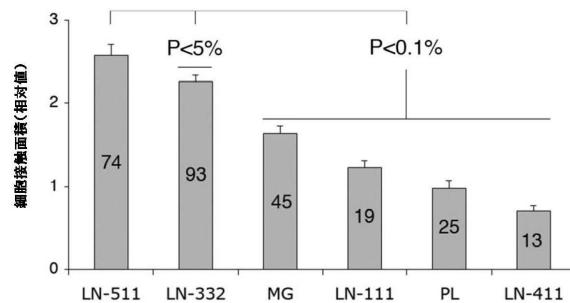


Fig. 4b

【図 4 c】

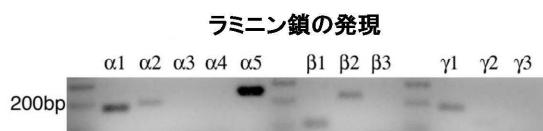


Fig. 4c

【図 5 a】

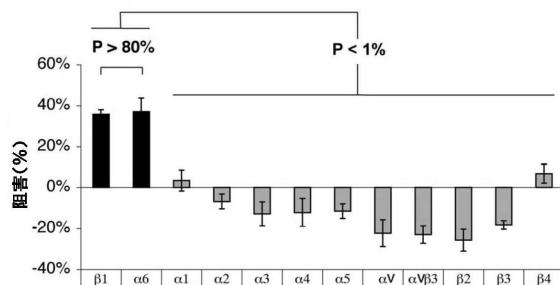


Fig. 5a

【図 5 b】

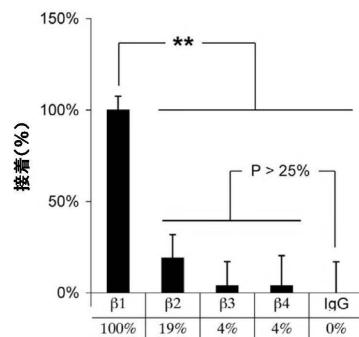


Fig. 5b

【図 6 a】

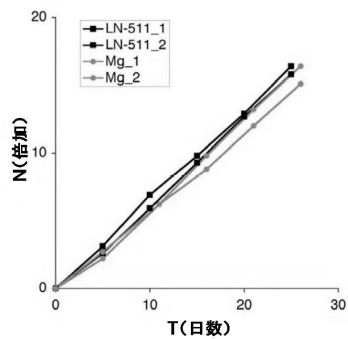


Fig. 6a

【図 6 c】

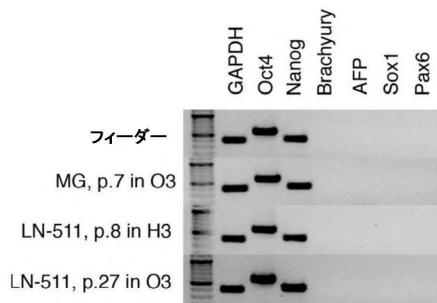


Fig. 6c

【図 6 e】

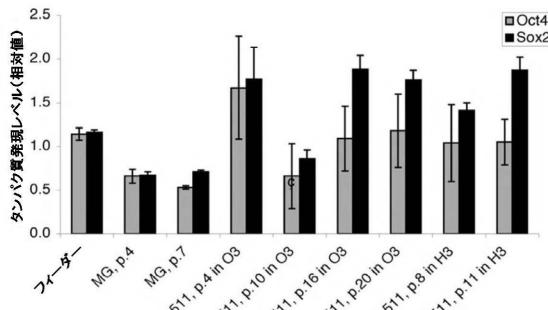


Fig. 6e

【図 6 d】

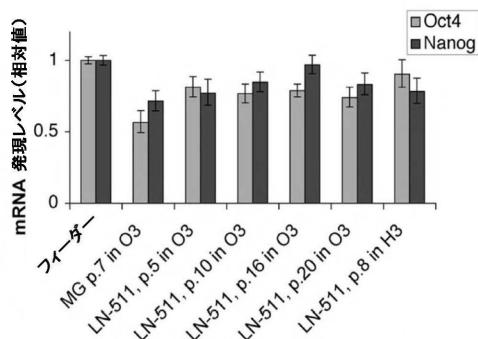


Fig. 6d

【図 6 f】

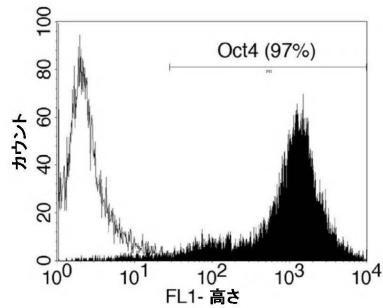


Fig. 6f

【図 7 e】

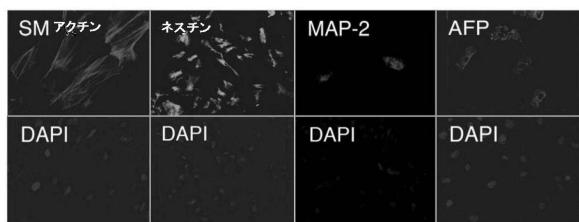
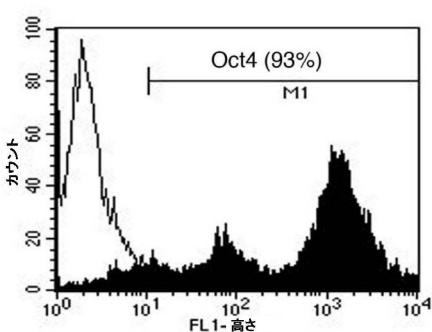


Fig. 7e

【図 11】



【図 10】

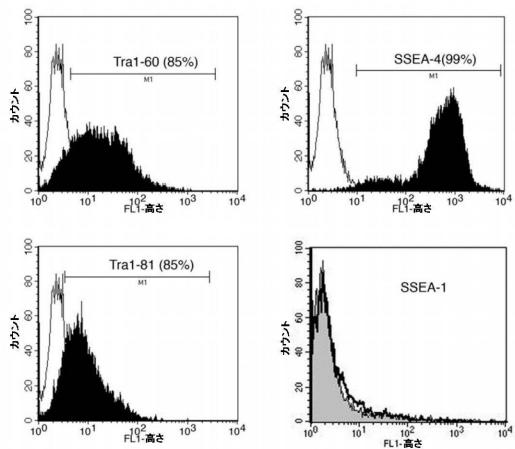


Fig. 10

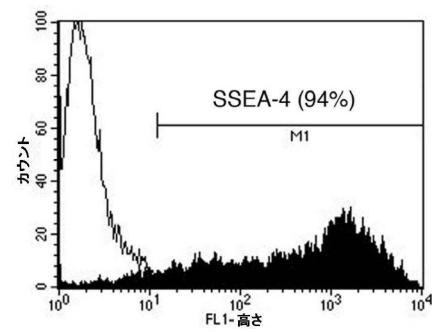


Fig. 11

【図12】

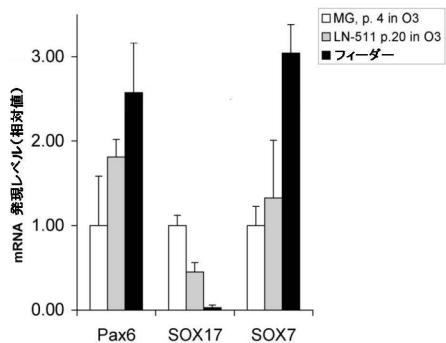


Fig. 12

【図14】

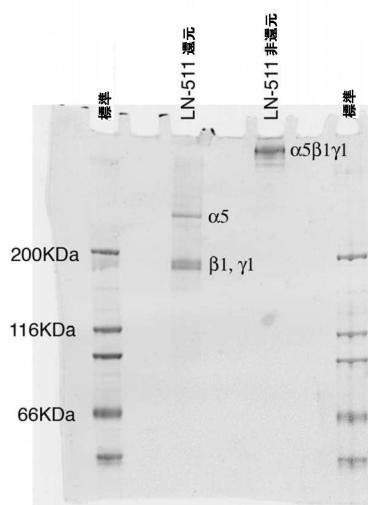


Fig. 14

【配列表】

0006016642000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 トゥリックパソコン， カール
スウェーデン国 エス - 1 8 2 6 1 ジューショルム， ロークヴァーゲン 8 エー
(72)発明者 ロダン， セレゲイ
スウェーデン国 エス - 1 1 3 4 6 ストックホルム， スヴェアヴェイエン 1 6 4 , アパー
トメントジェイ 1 2
(72)発明者 ドマガツキヤ， アナ
スウェーデン国 エス - 1 4 4 6 2 レニエ， セントラルヴェイエン 8 エー

審査官 上條 肇

(56)参考文献 國際公開第 2 0 0 8 / 0 8 4 4 0 1 (WO , A 2)
J Biol Chem. , 2 0 0 2 年 , Vol.277, No.15 , p.12741-12748
Nat Methods , 2 0 0 6 年 , Vol.3, No.8 , p.637-646
Nat Biotechnol. , 2 0 0 6 年 , Vol.24, No.2 , p.185-187

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 5 / 0 7 3 5
J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d