(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5921558号
(P5921558)

(45)発行日　平成28年5月24日(2016.5.24)　(24)登録日　平成28年4月22日(2016.4.22)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 35/34	(2015.01)	A61K	35/34	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 11　(全 35 頁)

(21)出願番号　特願2013-534029(P2013-534029)
(86)(22)出願日　平成23年10月14日(2011.10.14)
(65)公表番号　特表2013-540777(P2013-540777A)
(43)公表日　平成25年11月7日(2013.11.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/056329
(87)国際公開番号　WO2012/051515
(87)国際公開日　平成24年4月19日(2012.4.19)
審査請求日　平成26年8月27日(2014.8.27)
(31)優先権主張番号　61/393,003
(32)優先日　平成22年10月14日(2010.10.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　510170730
ユニバーシティ　オブ　セントラル　フロリダ　リサーチ　ファウンデーション，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　フロリダ　３２８２６，オーランド，スイート　５０１，リサーチ　パークウェイ　１２２０１
(74)代理人　100083806
弁理士　三好　秀和
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(74)代理人　100111235
弁理士　原　裕子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】心臓人工多能性幹細胞ならびに心筋の修復および再生に使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

被検体において損傷した心臓組織を修復または再生させるための組成物であって、挿入された幹細胞様因子を安定して発現する心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞由来の心臓人工多能性幹細胞を含み、前記幹細胞様因子がＯｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃを含み、プラスミドベクターを用いて前記幹細胞様因子のｃＤＮＡ配列が挿入されている、組成物。

【請求項２】

前記心臓組織は心臓虚血／再かん流事象または先天的心臓欠損により損傷したものである、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記虚血／再かん流事象が、心筋梗塞、心筋虚血、心筋再かん流、心内膜下虚血、高安動脈炎、心房細動、出血性脳卒中、人工心肺が使用される心臓外科手術中に生じる虚血／再かん流事象、冠動脈バイパス形成中に生じる虚血／再かん流事象、または移植のための臓器保存中に生じる虚血／再かん流事象であり、前記先天性心臓欠損が成形不全またはカントレル五徴である、請求項２に記載の組成物。

【請求項４】

２回の等量の心筋内注射で前記被検体に投与する、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】

前記虚血／再かん流事象が心筋梗塞であり、前記組成物は梗塞周囲領域において前記被

検体に投与する、請求項３に記載の組成物。
【請求項６】
前記心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞は自家、同種異系または同一遺伝子型の供給源から得られたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
挿入された幹細胞様因子を安定して発現する心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞由来の心臓人工多能性幹細胞であって、前記挿入された幹細胞様因子がＯｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－Ｍｙｃを含み、プラスミドベクターを介して前記幹細胞様因子のｃＤＮＡが挿入されている、心臓人工多能性幹細胞。
【請求項８】
前記心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞が、自家、同種異系または同一遺伝子型の供給源から得られたものである、請求項７に記載の幹細胞。
【請求項９】
請求項７に記載の心臓人工多能性幹細胞を作製する方法であって、
心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞を得る工程、
前記心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞に、幹細胞様因子のｃＤＮＡ配列を含むプラスミドベクターを挿入する工程であって、前記幹細胞様因子がＯｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－Ｍｙｃを含む工程、ならびに
前記挿入された幹細胞様因子を安定に発現させ、それによって前記心臓線維芽細胞、心筋芽細胞、またはＨ９ｃ２心筋芽細胞を心臓人工多能性幹細胞に変換する工程
を含む方法。
【請求項１０】
Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－ＭｙｃのｃＤＮＡ配列を含むプラスミドベクターを生成する工程を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－ＭｙｃのｃＤＮＡ配列を含むプラスミドベクターを生成する工程は、
Ｏｃｔ３／４のｃＤＮＡをプラスミドベクターｐＢＳ－２Ａに挿入してｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａを生じさせること；
ＫｌＦ４のｃＤＮＡをプラスミドベクターｐＢＳ－２Ａに挿入してｐＢＳ－ＫｌＦ４－２Ａを生じさせること；
前記ＫｌＦ４－２Ａの配列を単離し、前記単離されたＫｌＦ４－２Ａの配列を前記ｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａに挿入して、ｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａを生じさせること；
ｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２ＡをＳｏｘ２のｃＤＮＡと融合させて、ｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２を生じさせること；
前記Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２の断片を単離し、前記単離された断片をプラスミドベクターｐＣＸ－ＥＧＦＰ中にクローン化すること；および
前記ｐＣＸ－ＥＧＦＰプラスミドベクター中のＥＧＦＰをｃ－Ｍｙｃに置き換えることを含む、請求項１０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
Ｉ．関連出願
本出願は、全体が参照により本明細書に組み込まれる、２０１０年１０月１４日出願の米国仮特許出願第６１／３９３００３号の利益を主張する。
【０００２】
ＩＩ．政府支援の言明
本発明は、国立衛生研究所により授与された助成番号１Ｒ０１ＨＬ０９０６４６－０１号の下、政府支援がなされた。政府は本発明における特定の権利を有する。

【背景技術】
【０００３】
ＩＩＩ．概要
心筋梗塞（ＭＩ）は、心筋細胞の細胞死、心肥大および線維症の複雑な機構が関与する心不全につながる（Anversa, et al., Myocyte cell death and ventricular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertens 1997;6:169-176）。残念なことに、通常の治療では、末期心不全につながるＭＩのさらなる悪化を阻害する選択肢は非常に制限される。さらに、末期心不全患者を管理するために必要な心臓移植は、容易に利用できない（Foo, et al., Death begets failure in the heart. J Clin Invest 2005;115:565-571）。それゆえ、損傷した心筋を修復および再生し、かつ有害な心臓リモデリングの進行を防ぐ新たな細胞治療が精力的に検討されている。これまで、マウス、ラットおよびヒトの梗塞発症の心臓における細胞移植について、骨格筋筋芽細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、ｃ－ｋｉｔ陽性心臓幹細胞、ＣＤ４５$^{+ve}$骨髄幹細胞、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）および造血幹細胞などの多種多様な細胞型を使用して試験が行われている（Haider & Ashraf, Bone marrow cell transplantation in clinical perspective. J Mol Cell Cardiol 2005;38:225-235; Kajstura, et al., Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. Circ Res 2005;96:127-137; Orlic, et al., Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 200;410:701-705; Singla, et al., Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293:H1308-H1314）。実際に、成人幹細胞の臨床試験では、細胞移植に対する重要な見解が得られているが、これらの効果にはなお疑問がある（Singla, Stem cells in the infarcted heart. J Cardiovasc Transl Res 2010;3:73-78）。対照的に、ＥＳ細胞は、倫理的およびさらなる懸念により臨床試験に至っていない。それゆえ、損傷した心筋における移植のための、心臓再生、修復およびリモデリングに適した細胞型は、今なお見出されていない。最近同定された、人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞は、心疾患の処置において選択肢となる可能性を有する細胞型であるが、その心臓の修復および再生の基本的な機構はほとんど知られていない。
【０００４】
４つの因子（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４およびｃ－Ｍｙｃ；４Ｆ－ＩＰＳ細胞）で形質移入した線維芽細胞から生成されるｉＰＳ細胞は、細胞の培養において心筋細胞に分化する可能性を有する（Zhang, et al., Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res 2009;104:e30-e41; Zhao & Daley, From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. J Cell Biochem 2008;105:949-955）。最近の先駆的研究では、Ｔｅｒｚｉｃらが３Ｆ（ｃ－ＭＹＣがん遺伝子を含まない）でｉＰＳ細胞を生成し、さらに心筋細胞の生成の可能性を樹立した（Martinez-Fernandez, et al., iPS programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism. Circ Res 2009;105:648-656）。梗塞発症の心臓への移植後に、線維芽細胞から生じたｉＰＳ細胞が心筋に発達し得る証拠が存在するが（Nelson, et al., Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009;120:408-416）、Ｈ９ｃ２細胞などの心臓由来細胞型源から生じたｉＰＳ細胞を使用した梗塞発症の心臓の再生能力を決定することに利用可能なデータはない。
【発明の概要】
【０００５】
本研究の目的は、ラット心臓ｉＰＳ細胞を生成すること、ならびに、それらが細胞培養系において心筋細胞に分化する能力、および梗塞発症マウスの心臓を修復し（アポトーシスおよび線維症を阻害し）再生させる能力について試験することであった。
【図面の簡単な説明】
【０００６】

ＩＶ．図面の簡単な説明

添付の図は、本明細書に組み込まれ、かつ一部を構成しているが、いくつかの実施形態を例示し、かつ説明と併せて開示の組成物および方法を例示する。

【図１】図１（ａ）および（ｂ）は、未形質導入のＨ９ｃ２細胞の顕微鏡写真であるが、右パネルは形質導入されたＨ９ｃ２細胞がＥＳ細胞様コロニーを形成することを示す。

【図２】図２は、ウェスタンブロット分析であり、Ｈ９ｃ２細胞において４つの因子（ｃ－Ｍｙｃ、Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４およびＳｏｘ２）が発現せず（左パネル）、形質導入されたＨ９ｃ２細胞では、４つの因子の発現が増加した（右パネル）ことを示す。

【図３】図３（ａ）～（ｃ）は、アルカリホスファターゼの顕微鏡写真であり、Ｈ９ｃ２細胞では陽性染色されず（パネルａ）、ＥＳ細胞（桃赤色、パネルｂ、陽性対照）およびｉＰＳ細胞（パネルｃ）は染色されたことを示す。１０倍。

【図４】図４（ａ）～（ｅ）は、ＲＦＰを発現するＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞（パネルａおよびｅ）、ＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞内のｏｃｔ３／４（パネルｂおよびｆ）、ＤＡＰＩ（パネルｃおよびｇ）、ならびに合成（パネルｄおよびｈ）を示す共焦点画像である。２０倍。

【図５】図５（ａ）～（ｌ）は、胚様体（ＥＢ）を形成し、心筋細胞に分化するｉＰＳ細胞の顕微鏡写真である。ＥＢは１７日間で分化した。小さなＥＢの中には、抗サルコメアαアクチン／Ａｌｅｘａ４８８（パネルｆ、ＥＳ細胞－ＥＢ、およびパネルｊ、ｉＰＳ細胞－ＥＢ）の大きな陽性領域およびＤＡＰＩ（ｃ、ｇ、ｋ）を示すものがあった。Ｈ９ｃ２細胞は、αアクチン染色を示さなかった（パネルｂ）。合成画像（パネルｄ、ｈおよびｌ）はαアクチンおよびＲＦＰの共発現を示す。２０倍。

【図６】図６（ａ）～（ｄ）は、抗サルコメアαアクチン／Ａｌｅｘａ４８８、（ｃ）ＤＡＰＩで心筋細胞を染色したトリプシン化ｉＰＳ細胞および（ｄ）合成の顕微鏡写真である。１６０倍。

【図７】図７（ａ）～（ｌ）は、トリプシン化し、心筋細胞に特異的なＭＨＣであるＭＦ－２０（パネルｆ、ＥＳ細胞－ＥＢ、およびパネルｊ、ｉＰＳ細胞－ＥＢ）およびＤＡＰＩ（ｃ、ｇ、ｋ）で染色した、胚様体（ＥＢ）を形成したｉＰＳ細胞の顕微鏡写真である。Ｈ９ｃ２細胞は、ＭＦ－２０染色を示さなかった（パネルｂ）。合成画像（パネルｄ、ｈおよびｉ）はＭＦ－２０、ＲＦＰおよびＤＡＰＩの共発現を示す。１６０倍。

【図８】図８は、図７で示したＥＳおよびｉＰＳ細胞由来のトリプシン化されたＥＢ内の陽性心筋細胞の割合の定量分析を示すグラフである。＊は、Ｈ９ｃ２細胞に対してｐ＜０．００１。

【図９】図９（ａ）～（ｌ）は、ＭＩ後に心筋細胞に分化した、移植された心臓ＲＦＰ－ｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞の顕微鏡写真である。赤に染色される心筋細胞に特異的な抗サルコメアαアクチンが心筋細胞（パネルａ、ｅ、ｉおよびｍ）を示し、ドナー細胞を同定する抗ＲＦＰ（パネルｂ、ｆ、ｊおよびｎ）およびＤＡＰＩ（パネルｃ、ｇ、ｋおよびｏ）を示す。３つ全ての染色の合成画像を示す（パネルｄ、ｈ、ｌおよびｐ）。４０倍。

【図１０】図１０は、図７に示された、移植した後に新たに分化した心筋細胞のＭＩ後２週間の時点での定量的分析を示すグラフである。＊は、ＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞に対してＰ＜０．００１。

【図１１】図１１（ａ）～（ｌ）は、ＭＩ後に心筋細胞に分化した、移植された心臓ＲＦＰ－ｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞の顕微鏡写真である。細胞は、抗サルコメアαアクチン（パネルａおよびｆ）、抗ＲＦＰ（パネルｂおよびｇ）、ドナー由来の心筋細胞と天然の心筋（パネルｂおよびｇ）との間のギャップ結合の形成を同定するコネキシン－４３（パネルｃおよびｈ）、およびＤＡＰＩ（パネルｄおよびｉ）で染色される。合成画像を示す（パネルｅおよびｊ）。ａ～ｅは４０倍、ｆ～ｊは１２０倍。

【図１２】図１２（ａ）～（ｌ）は、ＭＩ後２週間の時点でアポトーシスを抑制する、移植されたｉＰＳ細胞の顕微鏡写真である。ＴＵＮＥＬ染色されたアポトーシス核の代表的な顕微鏡写真を示し（パネルａ、ｄ、ｇおよびｊ）、ＤＡＰＩで染色された核全体（パネルｂ、ｅ、ｈおよびｋ）および核の合成画像（パネルｃ、ｆ、ｉおよびｌ）を示す。４０

倍。
【図１３】図１３は、アポトーシス核の定量的割合を示すヒストグラムである。＊はＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞に対してＰ＜０．０５。
【図１４】図１４（ａ）～（ｌ）は、ＭＩ後２週間の移植されたｉＰＳ細胞のアポトーシスの顕微鏡写真であり、抗サルコメアαアクチン（パネルａおよびｆ）、ＴＵＮＥＬ（パネルｂおよびｇ）、カスパーゼ－３免疫標識（パネルｃおよびｈ）、およびＤＡＰＩ（パネルｄおよびｉ）を示す。合成画像を示す（パネルｅおよびｊ）。ａ～ｅは４０倍および下段ｆ～ｊは１６０倍。
【図１５】図１５は、定量的カスパーゼ－３活性を示すヒストグラムである。＊はＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞に対してｐ＜０．０５。
【図１６】図１６（ａ）～（ｄ）は、ＭＩ後のｉＰＳ細胞移植の有無に関わらずマッソントリクローム染色された心臓切片からの代表的な顕微鏡写真である。ＭＩ＋細胞培養培地（パネルａ）、ＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞（パネルｂ）、ＭＩ＋ＥＳ細胞（パネルｃ）、ＭＩ＋ｉＰＳ細胞（パネルｄ）（２０倍）。
【図１７】図１７は、ＭＩ＋細胞培養培地およびＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞群と比べ、ＭＩ＋ｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞群の線維症が定量的に少ないことを示すヒストグラムである（＊ｐ＜０．０５）。
【図１８】図１８は、ＭＩ後２週間の、移植された幹細胞の有無に関わらずＨ＆Ｅ染色された一連の心臓切片であり、奇形腫形成のエビデンスは見られない（１．２５倍）。
【図１９】図１９は、移植されたｉＰＳ細胞が心機能を改善することを示すグラフである。処置群の心エコー検査による平均左室内径短縮率（ＦＳ）。＊はＭＩ、Ｈ９ｃ２、ＥＳ細胞に対してｐ＜０．０５、＃はＭＩ、Ｈ９ｃ２細胞に対してｐ＜０．０５、@はＭＩに対してｐ＜０．０５。
【図２０】図２０は、移植されたｉＰＳ細胞が心機能を改善することを示すグラフである。異なる処置群の左室収縮期末期径（ＬＶＩＤｓ）。＊はＭＩに対してｐ＜０．０５を意味し、＆ｐ＝有意差なし。
【発明を実施するための形態】
【０００７】
Ｖ．詳細な説明
本発明の化合物、組成物、物品、装置および／または方法を開示し、記載する前に、これらは他に明記しない限り、特定の合成方法または特定の組み換えバイオ技術方法に限定されず、または他に明記しない限り具体的な試薬に限定されず、当然ながら変化し得るといったことが理解される。本明細書で使用される用語は具体的な実施形態を記載する目的に過ぎず、限定することを意図しない。
【０００８】
Ａ．定義
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈上他に明記されない限り複数の指示対象を含む。それゆえ、例えば、「a pharmaceutical carrier（薬学的担体）」への言及は、２つ以上のこのような担体の混合物などを含む。
【０００９】
範囲は、本明細書において、「約」１つの具体的な値から、および／または「約」別の具体的な値まで、として表現されることができる。このような範囲を表現する場合、別の実施形態では、前記１つの具体的な値から、および／または前記別の具体的な値までを含む。同様に、各値が先行詞「約」を使用することにより近似値として表現される場合、その具体的な値が別の実施形態を形成することが理解されるだろう。さらに、各範囲それぞれの末端点は、他の末端点との関係における場合と、他の末端点から独立した場合の両方において意義を有することが理解されるだろう。また、多くの数字が本明細書に開示され、各値はまた、その値そのものに加えて、「約」その値として本明細書に開示されることが理解される。例えば、値「１０」が開示される場合、それをもって「約１０」も開示さ

れる。当業者であれば適宜理解されるように、ある値が開示される場合、その値「以下」、「以上」、および値間で可能な範囲も開示されることも理解される。例えば、値「１０」が開示される場合、「１０以下」ならびに「１０以上」も開示される。本出願を通して、データが多くの様々なフォーマットで提供され、かつこのデータが末端点および開始点ならびにデータ点のいずれかの組合せの範囲を表すことも理解される。例えば、具体的なデータ点「１０」および具体的なデータ点１５が開示される場合、１０と１５より大きいこと、１０と１５以上であること、１０と１５未満であること、１０と１５以下であること、および１０と１５に等しいということが開示され、ならびに、１０と１５との間であるということも同様に開示されると考えられると理解される。

【００１０】

以下の本明細書および特許請求の範囲において、多くの用語を参照し、これらは以下の意味を有すると定義されるものとする。

【００１１】

「任意の」または「任意で」は、続いて記載される事象または状況が発生する場合もあれば発生しない場合もあることを意味し、上記の事象または状況が発生する例および発生しない例が説明に含まれることを意味する。

【００１２】

本出願を通して、種々の刊行物を参照する。これらの刊行物のその全体の開示を、これに関連する最新技術をより完全に記載するために参照により本出願に組み込む。開示された参照文献はまた、参照を行う文において考察の対象となっている参照文献中の事項について、参照により本明細書に個々に、および具体的に組み込まれる。

【００１３】

Ｂ．心機能障害から生じる損傷した心臓組織を減少させ、修復し、再生させる方法

本明細書において、被検体の心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓細胞型由来の心臓人工多能性幹細胞を投与することを含む方法を開示する。心機能障害は、先天的心臓欠損および虚血／再かん流の事象などの多くの事象により生じ得ることが理解され、本明細書において検討される。それゆえ、例えば一態様において、心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、前記機能障害が虚血／再かん流の事象である方法を本明細書において開示する。

【００１４】

本明細書において使用される「虚血」は、通常は血管の機能的狭窄または実際の閉塞による、部分的な血液の不足を指す。このような不足は、梗塞、つまり、もっとも一般的には血栓または塞栓によるその領域への循環の閉塞から生じる局所虚血による組織内の細胞死の領域を生じる。狭窄または閉塞を取り除き、血流を戻すと、再かん流が生じたこととなる。血流は戻るものの、再かん流は、細胞の膨化および壊死、アポトーシス、浮腫、出血、非再かん流現象および酸素フリーラジカルによる組織損傷などの、虚血エピソード後の血流回復の有害作用も生じさせ得る。従って、虚血／再かん流による傷害の軽減の１つの現れとしては、梗塞の大きさを軽減することがある。それに応じて、一態様において、本明細書において、被検体に心臓細胞型由来の心臓人工多能性幹細胞を投与することを含む、被検体の心機能障害による傷害後の梗塞の大きさを軽減する方法を開示する。

【００１５】

虚血／再かん流による傷害の原因は多く知られていることが理解される。例えば、虚血／再かん流による傷害は、心筋梗塞、心筋虚血、心筋再かん流、心内膜下虚血、高安動脈炎、心房細動、出血性脳卒中（動脈瘤および動静脈奇形から生じる脳卒中など）、および一過性虚血発作）、冠動脈バイパス形成など人工心肺を使用する心臓外科手術、および移植のための臓器保存などの、虚血再かん流事象から生じ得る。例として、そして一態様において、心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復し、または再生させる方法であって、被検体に心臓人工多能性幹細胞を投与することを含み、前記心機能障害が虚血再かん流による傷害であり、前記虚血／再かん流による傷害が、心筋虚血、心筋再かん流

、心内膜下虚血、高安動脈炎、脳卒中、虚血性脳卒中、心房細動、出血性脳卒中、一過性虚血発作、冠動脈バイパス形成のような人工心肺を使用する心臓外科手術中に生じる虚血／再かん流事象、および移植のための臓器保存中に生じる虚血／再かん流事象からなる群から選択される虚血／再かん流事象
の後に生じる方法を、本明細書において開示する。

【００１６】

心機能障害はまた、損傷した心臓組織または補正的な修復を必要とする組織を生じる、被検体の先天的な欠損の結果であり得る。例えば、心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓組織由来の心臓人工多能性幹細胞を投与することを含み、前記心機能障害が例えば形成不全および／またはカントレル五徴などの先天的心臓欠損である方法を本明細書において開示する。

【００１７】

「処置」および「処置する」とは、疾患、病態または障害を治癒し、改善し、安定させまたは予防する目的の、被検体の医療管理を意味する。この用語には、積極的処置、すなわち、疾患、病態または障害の改善に特に向けられた処置が含まれ、かつ原因処置、すなわち、関連疾患、病態または障害の原因の除去に向けられた処置も含まれる。さらに、この用語には、緩和処置、すなわち、疾患、病態または障害の治癒よりむしろ症状の緩和のために設計された処置、予防処置、すなわち、関連疾患、病態または障害の発症を最小限にし、または部分的もしくは完全に抑制することに向けられた処置、ならびに支持処置、すなわち、関連疾患、病態または障害の改善に向けられた別の特定の療法を補充するために使用される処置が含まれる。処置は、疾患、病態または障害を治癒し、改善し、安定させ、または予防することを意図とするが、実際に治癒、改善、安定化または予防を生じる必要はないことが理解される。「処置」は必ずしも疾患または状態の治癒や梗塞の完全な予防を指さず、例えば、虚血／再かん流による傷害の見通しの改善を含み得ることが理解され、本明細書において検討される。処置の効果を、本明細書に記載されるように、および、関与する疾患、病態または障害について適切であるとして当技術分野で知られているように、測定または評価することができる。このような測定および評価は、定性的および／または定量的な条件でなされ得る。それゆえ、例えば、疾患、病態もしくは障害の特徴もしくは特性、および／または、疾患、病態もしくは障害の症状を、任意の結果または任意の量に軽減することができる。

【００１８】

本明細書において、疾患または状態の文脈において「減少する」「減少させる」または「減少」は、疾患または状態の原因、症状または影響の低下を指す。それゆえ、開示された方法において、「減少する」とは、梗塞の大きさを含むがそれだけに限定されない虚血／再かん流による傷害の量の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％または１００％の低下を指すことができる。

【００１９】

残念なことに、心機能障害は、例えば梗塞などの切迫した機能障害に気付いていない被検体に生じ得る。多くの場合、このような個人における最初の兆候は、虚血／再かん流事象などの機能障害それ自体である。このような個人において、潜在的な心臓組織の傷害を減少させる必要がある。従って、本明細書において、心機能障害後の心臓組織の損傷を減少させ、修復しまたは再生させるために使用され得る方法を開示することが検討される。例として、例えば虚血／再かん流事象などの心機能障害による心臓の損傷を減少させ、修復しかつ／または再生する方法であって、それを必要とする被検体に心臓細胞型由来の心臓人工多能性幹細胞（ｉＰＳ）を投与することを含み、前記ｉＰＳが心機能障害の傷害後２４時間以内に投与される方法を開示する。心機能障害事象後にｉＰＳを投与することが早いほど、傷害の可能性がより低くなり、続いて、例えば梗塞の大きさの低下など、損傷の潜在的な軽減がより大きくなることが理解される。従って、本明細書において、心臓人工多能性幹細胞を心機能障害事象または傷害後２４時間、１２時間、６時間、２時間、１

時間、３０分間、１５分間、１０分間、５分間以内に投与する方法を開示する。
【００２０】
心臓人工多能性幹細胞（ｉＰＳ）の投与は、心機能障害事象または傷害後５分～２４時間の任意の時間でなされ得ることが理解される。機能障害が虚血／再かん流事象である場合、虚血および再かん流が生理学的に異なる事象であるだけでなく、必ずしも同時に起こるとはかぎらないないことが理解される。虚血は典型的には血栓または塞栓による一部への血流不足を指し、再かん流傷害は閉塞または狭窄が取り除かれたときに生じるところ、例えば虚血／再かん流事象の最中のように、心機能障害の発生中に心機能障害による傷害を軽減させることが可能であり、かつ望ましい。従って例えば、虚血中に、または別法として、虚血後であるが再かん流が生じる前に、または別法として、虚血後かつ再かん流発生時に、ｉＰＳを投与することができる。同様に、ｉＰＳを任意の心機能障害事象の発生中に投与することができる。従って、本明細書において、ｉＰＳを心機能障害事象の発生中に投与する方法を開示する。
【００２１】
心機能障害の前にｉＰＳを投与した個人において、心機能障害による心臓の損傷の軽減が生じることが理解され、本明細書において検討される。従って、心機能障害の危険性または既往歴を有する個人が、ｉＰＳを予防的に摂取することにより、将来の事象におけるさらなる損傷の危険を低下させることができることが理解され、本明細書において検討される。さらに、心筋梗塞のような虚血／再かん流事象などの多くの心機能障害は、認識した場合に被検体が迅速な処置を求めることを可能とし得る、実際の事象に先行する早期の前兆の症状を有することが理解される。将来の心機能障害事象により心臓組織の傷害が引き起こされる場合でも、ｉＰＳの予防的投与により、例えば梗塞の大きさを軽減するなど、心臓組織の傷害を軽減することができることが検討される。例えば、被検体の心臓組織の傷害を減少させる方法であって、それを必要とする被検体にｉＰＳを投与することを含み、前記ｉＰＳが心機能障害事象の少なくとも３０分前に投与される方法を本明細書において開示する。本明細書において、心機能障害事象の１５分、３０分、１時間、２時間、６時間、１２時間、２４時間、２日、３日、１週間または２週間前あるいはそれらの間の任意の時点でｉＰＳが投与される方法を開示する。
【００２２】
Ｃ．組成物
開示された組成物を調製するために使用される成分、ならびに本明細書において開示される方法で使用される組成物自体を開示する。これらのおよび他の材料が本明細書で開示され、かつこれらの材料の組合せ、部分集合、相互作用、群などが開示される一方で、これらの化合物の種々の個別的および集合的な組合せおよび並び替えの特定の参照がそれぞれ明確に開示されていない場合であっても、本明細書において、それぞれが特に検討され、記載されていることが理解される。例えば、具体的な幹細胞性因子（例えば、Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃ）または心臓人工多能性幹細胞について開示・考察され、かつ、幹細胞性因子（例えば、Ｏｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃ）を含む多くの分子または心臓人工多能性幹細胞になされ得る多くの改変について考察される場合、特に断り書きが示されない限り、幹細胞性因子（例えば、Ｏｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃ）または心臓人工多能性幹細胞のあらゆる全ての組合せおよび並び替えならびに可能な改変が特に検討される。従って、あるクラスの分子Ａ、ＢおよびＣが開示され、かつあるクラスの分子Ｄ、ＥおよびＦ、ならびに組合せの分子Ａ－Ｄの例が開示される場合、それぞれが個々に引用されていない場合でも、それぞれが個別的および集合的に検討され、すなわちＡ－Ｅ、Ａ－Ｆ、Ｂ－Ｄ、Ｂ－Ｅ、Ｂ－Ｆ、Ｃ－Ｄ、Ｃ－ＥおよびＣ－Ｆという組合せが検討され、開示される。同様に、これらの任意の部分集合または組合せについても開示される。従って、例えば、Ａ－Ｅ、Ｂ－ＦおよびＣ－Ｅの部分群について検討され、開示される。この概念を、開示された組成物を作製し使用する方法の工程を含むがそれらに限定されない本出願の全ての側面に適用する。従って、実施され得る種々の追加の工程がある場合、これらの追加の工程のそれぞれが、

開示された方法のあらゆる特定の実施形態または各実施形態の組合せとともに実施され得ることが理解される。

【００２３】

一態様において、本明細書において、心臓の人工多能性幹細胞（ｉＰＳ）について開示する。本明細書において考察および開示されるように、心臓人工多能性幹細胞は、幹細胞性因子が挿入され、それらを発現する、心臓細胞型由来の人工幹細胞である。幹細胞性因子は当技術分野で公知であり、Ｏｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃを含むがこれらに限定されない。従って、例えば本明細書において、安定したベクターが細胞内に挿入された心臓細胞型を含み、ベクターがさらにＯｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃを含む、ｉＰＳについて開示する。幹細胞性因子を互いに操作可能に連結し得る。例えば本明細書において、幹細胞性因子であるＯｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃを含むベクターを含み、これら幹細胞性因子が口蹄疫ウイルスの自己切断２Ａ配列を介して操作可能に連結される、心臓人工多能性幹細胞について開示する。開示された心臓人工多能性幹細胞を本明細書に開示された方法のいずれかに使用することができる。例えば、本明細書において、被検体の心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓細胞型由来のｉＰＳを投与することを含み、前記ｉＰＳがさらに幹細胞性因子であるＯｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃを含むベクターを含む方法について開示する。

【００２４】

本明細書において、心臓細胞型内に含有され幹細胞性因子を発現させるために使用するベクターは、細胞内で遺伝子を安定して発現させるのに適した任意のベクターであってよいことが検討される。例えば、ベクターはａｐＢＳ－２Ａベクターであってよい。

【００２５】

本明細書に開示されたｉＰＳを生成するために使用され得る心臓細胞型は、心筋芽細胞（例えば、心筋細胞）および心臓線維芽細胞を含むがそれらに限定されない任意の心臓細胞型であってよい。本明細書において開示されるｉＰＳに使用され得る心筋芽細胞の例はＨ９ｃ２心筋芽細胞である。さらに、筋細胞および線維芽細胞は、ヒト、非ヒト霊長類、類人猿、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、モルモットおよびマウスを含むがそれらに限定されない任意の哺乳類動物種由来であってよい。

【００２６】

細胞を被検体に送達する場合、心臓細胞型源が免疫学的に類似しているほど、免疫拒絶または移植片対宿主病の生じる可能性が低いことが理解される。それに応じて、本明細書において、心臓人工多能性幹細胞を形成するために最終的に誘導される心臓細胞型源が、自家、同種異系または同一遺伝子型の供給源であってよいことが検討される。例えば、被検体の心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓細胞型由来のｉＰＳを投与することを含み、前記心臓細胞型が自家、同種異系または同一遺伝子型の供給源から得られるものである方法を本明細書において開示する。

【００２７】

本明細書において、記載の心臓人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞を作製する方法についても開示する。一態様において、ｉＰＳを作製する開示の方法は、幹細胞性因子を含むベクターを心臓細胞型に挿入することを含む。例えば、本明細書において、１）１つ以上の幹細胞様因子を心臓細胞型に挿入する工程であって、前記幹細胞様因子がＯｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃまたはそのいずれかの組合せを含む工程、ならびに、２）心臓細胞型内に幹細胞様因子を安定して発現する心臓人工多能性幹細胞を得る工程を含む、心臓人工多能性幹細胞を生成する方法を開示する。さらなる態様において、ｉＰＳを作製する開示の方法は、幹細胞様因子であるＯｃｔ３／４およびＫｌＦ４のｃＤＮＡを別個のベクターに独立して挿入する工程を含むことができる。なおさらなる態様において、ｉＰＳを作製する開示の方法は、ａ）ＫｌＦ４－２Ａ配列を単離する工程、ｂ）ＫｌＦ４

－２Ａ配列を、Ｏｃｔ３／４ベクターの同じ読み取り枠に挿入してＯｃｔ３／４－ＫｌＦ４－２Ａベクターを形成する工程、およびｃ）終止コドンを有するＳｏｘ２ｃＤＮＡにＯｃｔ３／４－ＫｌＦ４－２Ａベクターを融合させてＯｃｔ３／４－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２ベクターを形成する工程を含むことができる。なおさらなる態様において、本明細書において、Ｏｃｔ３／４－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２を取り出し、ｐＣＸ－ＥＧＦＰベクターに挿入する工程をさらに含む、ｉＰＳを作製する方法を開示する。ｉＰＳを作製する方法は、なおさらにｃ－Ｍｙｃ　ｃＤＮＡをベクターに挿入する工程を含み得る。ｃ－Ｍｙｃを他の幹細胞性因子に操作可能に連結させ操作可能に発現させる能力を保持するのに適したベクターの任意の位置に、ｃ－Ｍｙｃを挿入することができる。例えば、ｃ－ＭｙｃをｐＣＸ－ＥＧＦＰベクターのＥＧＦＰと置き換えることができる。

【００２８】

１．組成物の細胞への送達

インビトロまたはインビボで核酸を細胞へ送達するために使用することができる多くの組成物および方法が存在する。これらの方法および組成物を、おもに２つのクラス、ウイルス系送達システムおよび非ウイルス系送達システムに分類することができる。例えば、核酸を、電気穿孔法、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドなどの多くの直接送達システムを介して、または、細胞中もしくはカチオン性リポソームなどの担体中の遺伝物質の移送を介して、送達することができる。ウイルスベクター、化学形質移入体、または電気穿孔法およびＤＮＡの直接拡散などの物理機械的方法を含む、形質移入の適切な手段が、例えばWolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990)およびWolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991)により記述されている。このような方法は当技術分野において公知であり、本明細書に記載の組成物および方法とともに使用するために容易に適合させることができる。特定の場合において、大きなＤＮＡ分子と特に機能するよう方法を修正する。さらにこれらの方法を、担体の標的特性を使用することにより、特定の疾患および細胞集団を標的とするために使用することができる。

【００２９】

ａ）核酸系送達システム

導入ベクターは、遺伝子を細胞に送達するために使用される任意の核酸構築物（例えば、プラスミド）であってよく、または遺伝子を送達するための一般的戦略の一部、例えば、組み換えレトロウイルスまたはアデノウイルスの一部であってよい（Ram et al. Cancer Res. 53:83-88, (1993)）。

【００３０】

本明細書で使用されるプラスミドまたはウイルスベクターは、開示された核酸、例えば本明細書に開示された幹細胞性因子（Ｏｃｔ３／４、ＫｌＦ４－２Ａ、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃ）をコードする遺伝子を、分解させることなく細胞内に輸送する物質であり、送達される細胞内で遺伝子の発現を生成するプロモーターを含む。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、口蹄疫ウイルス、エイズウイルス、神経栄養ウイルス、シンドビスウイルスおよび他のＲＮＡウイルスであり、ＨＩＶ骨格を有するこれらのウイルスを含む。さらに、ベクターとしての使用に適しているこれらのウイルスの特性を共有する任意のウイルスファミリーも好ましい。レトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス、ＭＭＬＶを含み、ベクターとしてのＭＭＬＶの望ましい特性を発現するレトロウイルスを含む。レトロウイルスベクターは、他のウイルスベクターより大きな遺伝的荷重（すなわち導入遺伝子またはマーカー遺伝子）を担持することができ、この理由で一般的に使用されるベクターである。しかし、非増殖細胞ではそれほど有用ではない。アデノウイルスベクターは相対的に安定であり、操作しやすく、力価が高く、エアロゾル製剤において送達することができ、非分裂細胞で形質移入することができる。ポックスウイルスベクターは大きく、遺伝子を挿入するための部位がいくつかあり、熱安定性であり、室温で保存することができる。好ましい実施形態は、ウイルス抗原により誘起される宿主生物の免疫反応を抑制

するように遺伝子操作されたウイルスベクターである。この種の好ましいベクターはインターロイキン８または１０をコードする領域を担持するだろう。本明細書において、心臓細胞型内に含まれ、幹細胞性因子を発現させる場合に使用されるベクターは、細胞内で遺伝子を安定して発現させるのに適した任意のベクターであってよいことが検討される。例えば、ベクターはａｐＢＳ－２Ａベクターであってよい。

【００３１】

ウイルスベクターは、遺伝子を細胞に導入するための化学的または物理的方法に比べ、より高い処理能力（遺伝子を導入する能力）を有し得る。典型的には、ウイルスベクターは、非構造初期遺伝子、構造後期遺伝子、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ転写産物、複製およびキャプシド形成に必要な逆位末端配列、ならびにウイルスゲノムの転写および複製を制御するプロモーターを含有する。ベクターとして遺伝子操作される場合、ウイルスは典型的に１つ以上の初期遺伝子が取り除かれ、遺伝子または遺伝子／プロモーターカセットが、前記取り除かれたウイルスＤＮＡの場所においてウイルスゲノムに挿入される。この種の構築物は、約８ｋｂまでの外来遺伝物質を担持することができる。取り除かれた初期遺伝子の必要な機能は、トランス的に(in trans)初期遺伝子の遺伝産物を発現するよう遺伝子操作されている細胞株により通常は供給される。

【００３２】

（１）レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、任意の種類、亜科、属または指向性を含むレトロウイルス科に属する動物ウイルスである。レトロウイルスは、本質的に、核酸カーゴを内部に包み込んだパッケージである。核酸カーゴは、パッケージングシグナルを担持し、これは、複製された娘分子がパッケージコート内に効率よくパッケージされることを確実にする。パッケージシグナルに加え、ウイルスの複製および複製済みウイルスのパッケージングのために、多くの分子がシス的に(in cis)必要とされる。典型的には、レトロウイルスゲノムは、タンパク質コートの作製に関与するｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子を含有する。典型的には、ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子が、標的細胞に移入させる外来性ＤＮＡによって置き換えられる遺伝子である。レトロウイルスベクターは、典型的に、パッケージコートに組み込まれるためのパッケージングシグナル、ｇａｇ転写単位の開始をシグナルする配列、逆転写のｔＲＮＡプライマーと結合するためのプライマー結合部位を含む逆転写に必要なエレメント、ＤＮＡ合成中のＲＮＡ鎖のスイッチをガイドする末端反復配列、第２のＤＮＡ鎖合成のためのプライミング部位として作用する３’ＬＴＲの５’側にあるプリンリッチ配列、および宿主ゲノムに挿入するためにレトロウイルスのＤＮＡ状態の挿入を可能にするＬＴＲの末端付近の特異的な配列を含有する。ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子の除去により、約８ｋｂの外来性配列が、ウイルスゲノムに挿入可能となり、逆転写され、複製時に新たなレトロウイルス粒子にパッケージされるようになる。この核酸量は、各転写産物の大きさに応じて、１つないしは多数の遺伝子を送達するのに十分な量である。挿入物内に、他の遺伝子とともに陽性または陰性の選択可能マーカーを含むことが好ましい。

【００３３】

ほとんどのレトロウイルスベクターは複製機構およびパッケージタンパク質（ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ）が取り除かれているため、ベクターは典型的にパッケージング細胞株に入れることにより生成される。パッケージング細胞株は、複製およびパッケージング機構を含有するがパッケージングシグナルを欠くレトロウイルスで形質移入または形質転換されている細胞株である。選択したＤＮＡを担持するベクターがこれらの細胞株に形質移入される場合、当該ヘルパー細胞によりシス的に供給される機構により、目的の遺伝子を含有するベクターが複製され、新たなレトロウイルス粒子にパッケージされる。これらの機構のためのゲノムは、必要なシグナルが欠如しているためパッケージされない。

【００３４】

（２）アデノウイルスベクター

複製欠損アデノウイルスの構築について記述されている（Berkner et al., J. Virolog

y 61:1213-1220 (1987); Massie et al., Mol. Cell. Biol. 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad et al., J. Virology 57:267-274 (1986); Davidson et al., J. Virology 61:1226-1239 (1987); Zhang "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis" BioTechniques 15:868-872 (1993)）。これらのウイルスをベクターとして使用する利点は、最初の感染細胞内で複製できるが、新たな感染ウイルス粒子を形成することができないため、他の細胞型に広がり得る範囲が限定されることである。組み換えアデノウイルスは、気道上皮、肝細胞、血管内皮、ＣＮＳ実質組織および他の多くの組織部位に直接インビボ送達された後、効率的に遺伝子移入を達成できることが示されている（Morsy, J. Clin. Invest. 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, J. Clin. Invest. 92:381-387 (1993); Roessler, J. Clin. Invest. 92:1085-1092 (1993); Moullier, Nature Genetics 4:154-159 (1993); La Salle, Science 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, J. Biol. Chem. 267:25129-25134 (1992); Rich, Human Gene Therapy 4:461-476 (1993); Zabner, Nature Genetics 6:75-83 (1994); Guzman, Circulation Research 73:1201-1207 (1993); Bout, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994); Zabner, Cell 75:207-216 (1993); Caillaud, Eur. J. Neuroscience 5:1287-1291 (1993); and Ragot, J. Gen. Virology 74:501-507 (1993)）。組み換えアデノウイルスは、特定の細胞表面受容体に結合し、その後、野生型または複製欠損アデノウイルスの場合と同じように、ウイルスが受容体介在性エンドサイトーシスにより内在化することにより遺伝子形質導入を達成する（Chardonnet and Dales, Virology 40:462-477 (1970); Brown and Burlingham, J. Virology 12:386-396 (1973); Svensson and Persson, J. Virology 55:442-449 (1985); Seth, et al., J. Virol. 51:650-655 (1984); Seth, et al., Mol. Cell. Biol. 4:1528-1533 (1984); Varga et al., J. Virology 65:6061-6070 (1991); Wickham et al., Cell 73:309-319 (1993)）。

【００３５】

ウイルスベクターは、Ｅ１遺伝子を取り除いたアデノウイルス系のものであってよく、これらのバイロンはヒト２９３細胞株などの細胞株で生成される。別の好ましい実施形態において、Ｅ１およびＥ３遺伝子の両方をアデノウイルスゲノムから取り除く。

【００３６】

（３）アデノ随伴ウイルスベクター

別の種類のウイルスベクターとして、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）系のものがある。この欠損パルボウイルスは、多くの細胞型に感染することができ、ヒトに非病原性であるため好ましいベクターである。ＡＡＶ型のベクターは約４～５ｋｂを輸送することができ、野生型ＡＡＶは染色体１９に安定して挿入されることが知られている。この部位特異的組み込み特性を含有するベクターが好ましい。この型のベクターの特に好ましい実施形態は、カリフォルニア州サンフランシスコのアビゲンにより生成されたＰ４．１Ｃベクターであり、これは単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子であるＨＳＶ－ｔｋおよび／または緑色蛍光タンパク質ＧＦＰをコードする遺伝子などのマーカー遺伝子を含有することができる。

【００３７】

別の型のＡＡＶウイルスにおいて、ＡＡＶは、異種遺伝子に操作可能に連結され細胞特異的発現を指向するプロモーターを含有する少なくとも１つのカセットに隣接する一対の逆位末端配列（ＩＴＲ）を含有する。この文脈における異種とは、ＡＡＶまたはＢ１９パルボウイルス由来でない任意のヌクレオチド配列または遺伝子を指す。

【００３８】

典型的には、ＡＡＶおよびＢ１９コード領域は削除されており、安全な非細胞毒性ベクターが生じる。ＡＡＶ　ＩＴＲまたはその改変物は、感染力および部位特定的組み込みを付与するが細胞毒性は生じず、プロモーターは細胞特異的発現を指向する。

【００３９】

このように開示されたベクターは、実質的に毒性を含むことなく、哺乳類動物の染色体に組み込むことができるＤＮＡ分子を提供する。

【００４０】
ウイルスおよびレトロウイルス内の挿入された遺伝子は、通常、プロモーター、および／または所望の遺伝子産物の発現の制御を助けるためのエンハンサーを含有する。プロモーターとは、一般に、転写開始部位に対して比較的固定された位置にある場合に機能する、ＤＮＡの１つまたは複数の配列である。プロモーターはＲＮＡポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコアエレメントを含有し、上流エレメントおよび応答エレメントを含有し得る。
【００４１】
（４）荷重が大きいウイルスベクター
大きなヒトヘルペスウイルスを用いた分子遺伝学的実験により、ヘルペスウイルスの感染を許容する細胞において大きな異種ＤＮＡ断片をクローン化し、増殖させ、樹立することができる手段が提供されている（Sun et al., Nature genetics 8: 33-41, 1994; Cotter and Robertson,.Curr Opin Mol Ther 5: 633-644, 1999）。これらの大きなＤＮＡウイルス（単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）およびエプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ））は、１５０ｋｂより大きいヒト異種ＤＮＡの断片を特定の細胞に送達する可能性を有する。ＥＢＶ組み換え体は大きなＤＮＡ片をエピソームＤＮＡとして感染Ｂ細胞に保持することができる。個々のクローンは、３３０ｋｂまでのヒトゲノム挿入物を担持し、遺伝的に安定していると見られた。これらのエピソームの保持には、ＥＢＶに感染する間に構成的に発現する、特異的なＥＢＶ核タンパク質であるＥＢＮＡ１を必要とする。さらに、これらのベクターを形質移入に使用することができ、この場合、多量のタンパク質を生体外で一過性に生成することができる。ヘルペスウイルスのアンプリコンシステムも、２２０ｋｂより大きいＤＮＡ片をパッケージし、エピソームとしてＤＮＡを安定して保持することができる細胞に感染させるために使用されている。
【００４２】
他の有用なシステムとしては、例えば、複製および宿主限定非複製ワクシニアウイルスベクターがある。
【００４３】
ｂ）非核酸系システム
開示された組成物を種々の方法で標的細胞に送達することができる。例えば、組成物を、電気穿孔法を介して、またはリポフェクションを介して、あるいはリン酸カルシウム沈殿を介して送達することができる。選択される送達機構は、標的の細胞型、および、送達が起こるのが例えば生体内であるか生体外であるかということに部分的に依存するであろう。
【００４４】
従って、組成物としては、開示されたベクターに加えて、例えばリポソーム、カチオン性リポソーム（例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、ＤＣ－コレステロール）またはアニオン性リポソームなどの脂質が含まれ得る。リポソームはさらに所望の場合、特定の細胞を標的とすることを促進するタンパク質を含むことができる。化合物およびカチオン性リポソームを含む組成物の投与は、標的器官に求心性の血管に投与され、または呼吸器に吸入して気道の細胞を標的とすることができる。リポソームに関して、例えば、Brigham et al. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1:95-100 (1989); Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413-7417 (1987)；米国特許第４８９７３５５号を参照のこと。さらに、化合物は、マクロファージなど特定の細胞型を標的とし得るマイクロカプセルの成分として、または、化合物の拡散または化合物の送達が特定の速度もしくは用量となるよう設計されているマイクロカプセルの成分として、投与されることができる。
【００４５】
被検体の細胞への外因性ＤＮＡの投与および取込み（すなわち、遺伝子形質導入または形質移入）を含む上記の方法において、組成物の細胞への送達は種々の機構を介したものであり得る。一例として、送達は、リポフェクチン、リポフェクトアミン（ギブコ－ＢＲＬ社、メリーランド州ゲーサーズバーグ）、スーパーフェクト（キアゲン社、ドイツ、ヒ

ルデン）およびトランスフェクタム（プロメガ・バイオテック社、ウィスコンシン州マディソン）などの市販のリポソーム製剤ならびに当技術分野で標準的な方法に従い開発された他のリポソームを使用した、リポソームを介したものであってよい。さらに、開示された核酸またはベクターを、ジェネトロニクス社（カリフォルニア州サンディエゴ）から入手可能な技術である電気穿孔法により、ならびに超音波穿孔機（イマルクス・ファーマシューティカルズ社、アリゾナ州ツーソン）の手段により、インビボ送達することができる。従って、一態様において、被検体の心機能障害により損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓人工多能性幹細胞を投与することを含み、心臓人工多能性幹細胞が幹細胞性因子を含み、幹細胞様因子はリポフェクトアミンを使用して心臓細胞または心室細胞に挿入される方法を本明細書において開示する。

【００４６】

材料は、溶液、懸濁液（例えば、微粒子、リポソームまたは細胞に組み込まれたもの）中にあってよい。これらは抗体、受容体または受容体リガンドを介して特定の細胞型を標的とすることができる。以下の参照は、腫瘍組織を特定のタンパク質の標的とするこの技術の使用の例である（Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988); Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); and Roffler, et al., Biochem. Pharmacol, 42:2062-2065, (1991)）。これらの技法は種々の他の特異的な細胞型に使用することができる。「ステルス」型リポソームその他抗体がコンジュゲートしたリポソームのようなビヒクル（結腸癌に対する脂質介在型薬剤標的指向化を含む）、細胞特異的リガンドを介したＤＮＡの受容体介在型標的指向化、リンパ球により誘導される腫瘍標的化、およびインビボでマウス神経膠腫細胞に非常に特異的な治療用レトロウイルスの標的指向化。以下の参照は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的指向化するこの技術の使用の例である（Hughes et al., Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger and Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)）。一般に、受容体は、構成的な、またはリガンド誘導された、エンドサイトーシスの経路に関与する。これらの受容体は、クラスリン被覆ピット内でクラスターを形成し、クラスリン被覆小胞を介して細胞に入り、受容体を選別する酸性化エンドソームを通過し、次いで、細胞表面に再循環されるか、細胞内に貯蔵されるか、またはリソソームで分解されるかのいずれかとなる。内在化経路は、種々の機能、例えば栄養素の摂取、活性タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見的侵入、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの制御に作用する。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの種類、リガンド価およびリガンド濃度に応じて複数の細胞内経路をたどる。受容体介在型エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構については概説されている（Brown and Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)）。

【００４７】

細胞に送達され、宿主細胞ゲノムに組み込まれる核酸は、典型的に組み込み配列を含有する。これらの配列は多くの場合、特にウイルス系システムを使用する場合、ウイルス関連配列である。これらのウイルス組み込みシステムを、リポソームなどの非核酸系送達システムを使用して送達される核酸に取り入れ、その送達システムに含有される核酸が宿主ゲノムに組み込まれるようにすることもできる。

【００４８】

宿主ゲノムへの組み込みの他の一般的な技法には、例えば、宿主ゲノムとの相同組み換えを促進するよう設計されたシステムを含む。これらのシステムは、典型的には、発現される核酸と隣接する配列に依存し、この配列は宿主細胞ゲノム内の標的配列と十分な相同性を有することによりベクター核酸と標的核酸との間の組み換えを生じさせ、送達された核酸の宿主ゲノムへの組み込みを引き起こす。これらのシステムおよび相同組み換えを促

進するために必要な方法は、当業者に公知である。

【００４９】

ｃ）生体内(in vivo)／生体外(ex vivo)

上記のように、組成物を薬学的に許容される担体中で投与することができ、当技術分野で公知の種々の機構により生体内および／または生体外で被検体の細胞に送達することができる（例えば、ネイキッドＤＮＡの摂取、リポソーム融合、遺伝子銃を介したＤＮＡの筋肉内注射、エンドサイトーシスなど）。

【００５０】

生体外の方法を使用する場合、細胞または組織を取り出し、当技術分野で公知の標準的なプロトコールに従い体外で保持する。組成物を、任意の遺伝子移入機構、例えば、リン酸カルシウム媒介型遺伝子送達、電気穿孔法、顕微注入またはプロテオリポソームを介して細胞に導入することができる。次いで、形質導入したこの細胞を（例えば、薬学的に許容される担体中で）注入し、またはその細胞型もしくは組織型における標準的な方法に従って、被検体にホモトピー的に移植して戻すことができる。被検体に種々の細胞を移植または注入する標準的な方法が知られている。

【００５１】

２．相同性／同一性

本明細書において開示される遺伝子およびタンパク質の既知の変異体および誘導体または生じ得る変異体および誘導体を定義する１つの方法は、特定の既知配列に対する相同性の観点から変異体および誘導体を定義することであることが理解される。特に、言及された配列に対して少なくとも７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９％の相同性を有する、本明細書に開示されたこれらのおよび他の遺伝子ならびにタンパク質の変異体が開示される。当業者であれば、２つのタンパク質、または２つの核酸（遺伝子など）の相同性を決定する方法が容易に理解される。例えば、相同性は、相同性を最大レベルにするように上記２つの配列をアラインメントさせた後に算出することができる。

【００５２】

相同性を算出する別の方法は、公開されているアルゴリズムにより行うことができる。比較のための配列の最適アラインメントは、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988)の類似検索法により、これらのアルゴリズム（ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ、ウィスコンシン・ジェネティックス・ソフトウェアパッケージ、ジェネティックス・コンピュータ・グループ、５７５、ドクターサイエンス、ウィスコンシン州マディソン）のコンピュータによる実施により、または目視により行うことができる。

【００５３】

３．核酸

本明細書において開示されている種々の分子は、核酸系であり、例えば、幹細胞性因子（例えば、Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃ）および本明細書に開示される任意の他のタンパク質をコードする核酸、ならびに種々の機能的核酸などを含む。開示された核酸は、例えば、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体またはヌクレオチド代替物から構成される。これらおよび他の分子の非限定的例が本明細書において考察される。例えば、ベクターが細胞内で発現する場合、発現したｍＲＮＡは典型的にＡ、Ｃ、ＧおよびＵから構成されることが理解される。同様に、例えば、アンチセンス分子を例えば外因性の送達を介して細胞または細胞環境に導入する場合、細胞環境におけるアンチセンス分子の分解を低下させるヌクレオチド類似体によりアンチセンス分子が構成されていることが有利であることが理解される。

【００５４】

ａ）ヌクレオチドおよび関連分子

ヌクレオオチドは、塩基部分、糖部分およびリン酸部分を含有する分子である。ヌクレオチドはリン酸部分および糖部分を介して連結されヌクレオシド間結合を生成し得る。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン－９－イル（Ａ）、シトシン－１－イル（Ｃ）、グアニン－９－イル（Ｇ）、ウラシル－１－イル（Ｕ）およびチミン－１－イル（Ｔ）であり得る。ヌクレオチドの糖部分はリボースまたはデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸部分は５価のリン酸である。ヌクレオチドの非限定的例は、３’－ＡＭＰ（３’－アデノシン一リン酸）または５’－ＧＭＰ（５’－グアノシン一リン酸）である。

【００５５】

ヌクレオチド類似体は、塩基、糖またはリン酸部分のいずれかに、何らかの種類の修飾を含有するヌクレオチドである。ヌクレオチドへの修飾は、当技術分野において公知であり、例えば５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチンおよび２－アミノアデノシン、ならびに糖部分またはリン酸部分での修飾を含む。

【００５６】

ヌクレオチド代替物は、ヌクレオチドに類似する機能特性を有するが、リン酸部分を含有しない分子であり、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）などである。ヌクレオチド代替物はワトソン－クリックまたはフーグスティーン様式で核酸を認識する分子であるが、リン酸部分以外の部分を通して連結される。ヌクレオチド代替物は、適切な標的核酸と相互作用する場合、二重らせん型構造に順応することができる。

【００５７】

例えば、細胞摂取を高めるために、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に他の型の分子（コンジュゲート）を結合することも可能である。コンジュゲートはヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に化学的に結合することができる。このようなコンジュゲートはコレステロール部分などの脂質部分を含むがそれに限定されない（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989,86, 6553-6556）。

【００５８】

ワトソン－クリックの相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体またはヌクレオチド代替物のワトソン－クリック面による少なくとも１つの相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体またはヌクレオチド代替物のワトソン－クリック面は、プリン系のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体もしくはヌクレオチド代替物のＣ２、Ｎ１およびＣ６位、ならびに、ピリミジン系のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体もしくはヌクレオチド代替物のＣ２、Ｎ３およびＣ４位を含む。

【００５９】

フーグスティーンの相互作用は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体のフーグスティーン面上で生じる相互作用であり、これは二重ＤＮＡの主溝に顕在化する。フーグスティーン面はプリンヌクレオチドのＮ７位およびＣ６位の反応基（ＮＨ２またはＯ）を含む。

【００６０】

ｂ）配列

本明細書において、種々の配列が提供され、これらおよび他のものはジェンバンクで見つけることができる。当業者であれば、配列の不一致および違いを解決し、特定の配列に関する組成物および方法を他の関連配列に調節する方法を理解する。本明細書に開示され、当技術分野で公知の情報によって、任意の配列用のプライマーおよび／またはプローブを設計することができる。

【００６１】

４．発現系

細胞に送達される核酸は、典型的に発現制御システムを含有する。例えば、ウイルスおよびレトロウイルスシステムに挿入された遺伝子は、通常所望の遺伝子産物の発現の制御を助けるプロモーターおよび／またはエンハンサーを含有する。プロモーターは、一般に

、転写開始部位に対して比較的固定された位置にある場合に機能する、ＤＮＡの１つまたは複数の配列である。プロモーターはＲＮＡポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコアエレメントを含有し、上流エレメントおよび応答エレメントを含有し得る。

【００６２】

ａ）ウイルスプロモーターおよびエンハンサー

哺乳類動物の宿主細胞においてベクターからの転写を調節する好ましいプロモーターは、種々の供給源、例えば、ポリオーマ、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、および最も好ましくはサイトメガロウイルスなどのウイルスのゲノムから得ることができ、または異種哺乳類動物プロモーター、例えばβアクチンプロモーターから得ることができる。ＳＶ４０ウイルスの初期および後期プロモーターはＳＶ４０の複製起点も含有するＳＶ４０制限断片として好都合に得られる（Fiers et al., Nature, 273: 113 (1978)）。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限断片として好都合に得られる（Greenway, P.J. et al., Gene 18: 355-360 (1982)）。当然ながら、宿主細胞または関連種由来のプロモーターも本明細書において有用である。

【００６３】

一般に、エンハンサーは、転写開始部位から様々な距離において機能し、転写単位に対して５’側（(Laimins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)）または３’側（Lusky, M.L., et al., Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983)）のいずれにあってよいＤＮＡ配列を指す。さらに、エンハンサーはイントロン内（Banerji, J.L. et al., Cell 33: 729 (1983)）あるいはコード配列自体の中（Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984)）にあってもよい。通常、これらは１０～３００ｂｐの長さであり、シスに機能する。エンハンサーは近くのプロモーターからの転写を増大させるよう機能する。エンハンサーは多くの場合、転写の制御を媒介する応答エレメントも含有する。プロモーターもまた、転写の制御を媒介する応答エレメントを含有し得る。エンハンサーは多くの場合、遺伝子発現の制御を決定する。哺乳類動物の遺伝子（グロブリン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトタンパク質およびインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が今では知られているが、典型的には一般的な発現において真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用するだろう。好ましい例は、複製起点の後ろ側のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ１００～２７０）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後ろ側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーである。

【００６４】

プロモーターおよび／またはエンハンサーは、これらの機能をトリガーする光または特定の化学事象により、特異的に活性化させることができる。システムはテトラサイクリンおよびデキサメタゾンなどの試薬により制御され得る。さらに、γ照射などの照射への曝露またはアルキル化化学療法薬によりウイルスベクター遺伝子発現を増強させる方法もある。

【００６５】

特定の実施形態において、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、転写されるべき転写単位の領域の発現を最大にするための構成的プロモーターおよび／またはエンハンサーとして作用することができる。特定の構築物において、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、特定の時期においては特定の細胞型だけに発現するとしても、全ての真核細胞型において活性であり得る。この型の好ましいプロモーターは、ＣＭＶプロモーター（６５０塩基）である。他の好ましいプロモーターはＳＶ４０プロモーター、サイトメガロウイルス（全長のプロモーター）およびレトロウイルスベクターＬＴＲである。

【００６６】

全ての特定の制御エレメントをクローン化することができ、メラノーマ細胞などの特定の細胞型に選択的に発現される構築発現ベクターに使用することができることが示されて

いる。グリア原線維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）プロモーターは、グリア由来の細胞において遺伝子を選択的に発現させるために使用されている。

【００６７】

真核宿主細胞（酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒトまたは有核細胞）に使用される発現ベクターは、ｍＲＮＡ発現に影響し得る、転写終結に必要な配列も含有し得る。これらの領域は組織因子タンパク質をコードするｍＲＮＡの未翻訳部分におけるポリアデニル化セグメントとして転写される。３’未翻訳領域はまた、転写終結部位を含む。転写単位はポリアデニル化領域も含有することが好ましい。この領域の１つの利点は、転写単位がｍＲＮＡのように処理され輸送される可能性を高めることである。発現構築物のポリアデニル化シグナルの同定および使用は十分に樹立されている。相同的ポリアデニル化シグナルが導入遺伝子構築物に使用されることが好ましい。特定の転写単位において、ポリアデニル化領域はＳＶ４０初期ポリアデニル化シグナル由来であり、約４００塩基から構成される。さらに、転写単位は、構築物由来の発現または構築物の安定性を改善させるために、他の標準的な配列を単独でまたは上記の配列と組み合わせて含有することが好ましい。

【００６８】

ｂ）マーカー

ウイルスベクターは、マーカー生成物をコードする核酸配列を含むことができる。このマーカー生成物は、遺伝子が細胞に送達されたかどうか、また送達された後に発現しているかどうかを決定するために使用される。好ましいマーカー遺伝子は、βガラクトシダーゼをコードする大腸菌ｌａｃＺ遺伝子、および緑色蛍光タンパク質である。

【００６９】

いくつかの実施形態において、マーカーは選択可能なマーカーであり得る。哺乳類動物の細胞に適切な選択可能マーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体Ｇ４１８、ヒドロマイシンおよびピューロマイシンである。このような選択可能なマーカーを哺乳類動物の宿主細胞へ形質移入することが成功すれば、形質転換した哺乳類動物の宿主細胞は、選択圧下に置かれた場合生存することができる。選択的方法の広く使用されている個別の分類には２つある。１つ目の分類は、細胞の代謝と、補充培地に依存せず増殖する能力を欠く突然変異細胞株の使用とに基づいたものである。この例の２つとして、ＣＨＯ　ＤＨＦＲ－細胞およびマウスＬＴＫ－細胞がある。これらの細胞は、チミジンまたはヒポキサンチンなどの栄養素の添加なしに増殖する能力に欠けている。これらの細胞は完全なヌクレオチド合成経路に必要な特定の遺伝子を欠損しており、欠如したヌクレオチドを補充培地において提供しない限り、生存することができない。培地を補充することの代替手段として、無傷のＤＨＦＲまたはＴＫ遺伝子をこれら各遺伝子が欠如している細胞に導入し、それにより細胞の増殖必要条件を変更することである。ＤＨＦＲまたはＴＫ遺伝子で形質転換されなかった個々の細胞は、非補充培地で生存することができないだろう。

【００７０】

２つ目の分類は、優性選択であり、これは任意の細胞型に使用され、突然変異細胞株の使用を必要としない選択スキームを表す。これらのスキームは典型的には宿主細胞の増殖を停止させる薬剤を使用する。新規の遺伝子を有する細胞は薬剤耐性を担持させるタンパク質を発現し、選択処理で生き残る。このような優性選択の例では、ネオマイシン（Southern P. and Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982)）、ミコフェノール酸（Mulligan, R.C. and Berg, P. Science 209: 1422 (1980)）またはハイグロマイシン（Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)）の薬剤を使用する。この３つの例では、真核細胞による制御下において細菌遺伝子を使用し、それぞれ適切な薬剤Ｇ４１８もしくはネオマイシン（ジェネティシン）、ｘｇｐｔ（ミコフェノール酸）、またはハイグロマイシンに対する耐性を担持させる。他にネオマイシン類似体Ｇ４１８およびピューロマイシンがある。

【００７１】

５．医薬担体／医薬生成物の送達

本明細書に記載のように、組成物は薬学的に許容される担体中においてインビボ投与することもできる。「薬学的に許容される」とは、生物学的観点から、あるいは他の観点から、望ましくないものではない材料、すなわち、何らかの望ましくない生物学的影響を引き起こしたり、それが含有されている医薬組成物の他の成分のいずれかと有害な相互作用をしたりすることなく、核酸またはベクターとともに被検体に投与され得る材料を意味する。担体は、当業者にはよく知られているように、活性成分の分解を最小限にし、被検体における有害な副作用を最小限にするよう選択されることは当然のことである。

【００７２】

組成物は、経口、非経口（例えば、静脈内）、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経皮、体外、局所等による投与をすることができ、これは局所鼻腔内投与または吸入剤による投与を含む。本明細書で使用される「局所鼻腔内投与」とは、１つまたは両方の鼻孔を通して鼻および鼻道に組成物を送達することを意味し、噴霧機構もしくは液滴機構による送達、または核酸もしくはベクターのエアロゾル化を介した送達を含むことができる。吸入剤による組成物の投与は、噴霧または液滴機構による送達を介して鼻または口を通して行うことができる。送達はまた、挿管を介して呼吸器系の任意の領域（例えば、肺）に直接なされることができる。必要とされる組成物の正確な量は、被検体の動物種、年齢、体重および全般的な状態、処置されるアレルギー障害の重症度、使用される具体的な核酸またはベクター、その投与様式などに応じて各被検体により異なるだろう。従って、各組成物の正確な量を特定することは可能ではない。しかし、適切な量は、当業者であれば、本明細書の教示に基づいて、ルーチン実験のみを使用して決定することができる。例えば、本明細書に開示された心臓人工多能性幹細胞を、組織損傷の部位、例えば梗塞周囲領域に非経口注射により投与することができる。

【００７３】

それに応じて、本明細書において、被検体の損傷した心臓組織を減少させ、修復しかつ／または再生させ、または梗塞の大きさを減少させる方法であって、それを必要とする被検体に心臓人工多能性幹細胞（ｉＰＳ）を投与することを含み、ｉＰＳを梗塞周囲領域に心筋内注射などの非経口注射を介して投与する方法を開示する。

【００７４】

組成物の非経口投与が使用される場合は、一般的には注射である。注射剤を従来の形態において、すなわち液状の溶液もしくは懸濁液、注射前に液中で溶液もしくは懸濁液とすることに適した固体形態、または乳液として調製することができる。最近改良されている非経口投与の手法は、定用量が維持されるような徐放性システムまたは持続放出性システムの使用を含む。

【００７５】

材料は溶液、懸濁液（例えば、微粒子、リポソームまたは細胞に組み込まれたもの）であってよい。これらは、抗体、受容体または受容体リガンドを介して特定の細胞型を標的とし得る。以下の参照は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的指向化するこの技術の使用の例である（Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988); Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); and Roffler, et al., Biochem. Pharmacol, 42:2062-2065, (1991)）。「ステルス」型リポソーム、その他抗体がコンジュゲートしたリポソームなどのビヒクル（結腸癌に対して薬剤を脂質媒介により標的指向化することを含む）、細胞特異的リガンドを介したＤＮＡの受容体介在型標的指向化、リンパ球誘導による腫瘍の標的化、およびインビボにおけるマウス神経膠腫細胞に対する非常に特異的な治療用レトロウイルス標的指向化。以下の参照は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的指向化するこの技術の使用の例である（Hughes et al., Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger and Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)）。一般に、受容体は、構成的またはリガンド誘導性のエンドサイトーシスの経路に関与する

。これらの受容体は、クラスリン被覆ピット内にクラスターを形成し、クラスリン被覆小胞を介して細胞に入り、受容体を選別する酸性化エンドソームを通過し、次いで、細胞表面に再循環されるか、細胞内に貯蔵されるか、またはリソソームで分解されるかのいずれかとなる。内在化経路は、種々の機能、例えば栄養素の摂取、活性タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見的侵入、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの制御に作用する。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの種類、リガンド価、およびリガンド濃度に応じて、複数の細胞内経路をたどる。受容体介在型エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構については概説されている（Brown and Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)）。

【００７６】

ａ）薬学的に許容される担体

組成物（抗体を含む）を、薬学的に許容される担体と組み合わせて治療に使用することができる。

【００７７】

適切な担体およびその配合物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的に、薬学的に許容される塩の適切な量を使用して、配合物を等張性とする。薬学的に許容される担体の例は、生理食塩水、リンゲル液およびブドウ糖溶液を含むが、それらに限定されない。溶液のｐＨは約５～約８が好ましく、約７～約７．５がより好ましい。さらなる担体は、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリクスなどの、持続放出性調製物を含み、このマトリクスは、例えば、フィルム、リポソームまたは微粒子のような成形物の形態である。例えば投与経路および投与される組成物の濃度に応じて、特定の担体がより好ましくなり得ることは当業者であれば明らかであろう。

【００７８】

医薬担体は当業者に知られている。これらは最も典型的には滅菌水、生理食塩水、および生理学的ｐＨの緩衝液などの溶液を含む、ヒトへの薬剤投与のための標準的な担体である。組成物を筋肉内投与または皮下投与することができる。他の化合物は当業者が使用する標準的な方法に従い投与される。

【００７９】

医薬組成物は、選択の分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、防腐剤、表面活性剤などを含むことができる。医薬組成物はまた、抗微生物剤、抗炎症剤、麻酔剤など、１つ以上の活性成分を含むこともできる。

【００８０】

医薬組成物は、局所処置が望ましいかあるいは全身処置が望ましいかということ、および処置される領域に応じて、多くの方法で投与され得る。投与は、局所投与（眼、膣、直腸、鼻腔内を含む）、経口投与、吸入による投与、または非経口投与であってよく、例えば、静脈内点滴、皮下、腹腔内あるいは筋肉内注射であってよい。開示された抗体を、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内または経皮投与することができる。

【００８１】

非経口投与の製剤は、滅菌水溶液または非水性溶液、懸濁液および乳液を含む。非水性溶剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルなどの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体は、水、アルコール／水性溶液、乳液または懸濁液、ならびに生理食塩水および緩衝媒体を含む。非経口ベヒクルは塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖および塩化ナトリウム、加乳酸リンゲル液または固定油を含む。静脈内ベヒクルは、流体および栄養補充剤、電解質補充剤（例えば、ブドウ糖リンゲル液系のもの）などを含む。例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなど、保存剤および他の添加物も存在し得る。

【００８２】

局所投与の配合物は、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座剤、スプレー

、液体および粉末を含み得る。従来型の医薬担体、水性、粉末もしく油性の基剤、増粘剤などが必要であるかまたは望ましい場合もある。

【００８３】

経口投与の組成物は、粉末もしくは顆粒、水もしくは非水性媒体の懸濁液もしくは溶液、カプセル、サシェまたは錠剤を含む。増粘剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合もある。

【００８４】

組成物の中には、薬学的に許容される酸付加塩または塩基付加塩として投与される可能性を有するものがあり、これらは、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、リン酸などの無機酸との反応、およびギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などの有機酸との反応、または、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基との反応、およびモノアルキルアミン、ジアルキルアミン、トリアルキルアミン、アリールアミン、置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応により形成される。

【００８５】

ｂ）治療用途

組成物を投与するための有効な用量およびスケジュールは、経験的に決定することができ、このような決定は当業者の技量の範囲内である。組成物の投与のための用量の範囲は、症状／障害に作用する望ましい効果を得るために十分に大きいものである。用量は、有害な副作用、例えば不必要な交差反応、アナフィラキシー反応などを生じるほど大きいものであるべきではない。一般に、用量は、患者の年齢、状態、性別および疾患の程度、投与経路、あるいは他の薬剤が投与計画に含まれているか否かに応じて異なり、当業者により決定され得る。用量は、何らかの禁忌がある事象においては個々の医師が調節することができる。用量は変動することができ、１日または数日間にわたって、１日１回または複数回の投与を行うことができる。所与のクラスの医薬製品の適切な用量に関する手引きは文献中に見つけることができる。例えば、抗体の適切な用量選択の手引きは、抗体の治療用途についての文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noges Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389に見つけることができる。心臓人工多能性幹細胞の典型的な用量は、上記の因子に応じて、５００００～５０００００００個のｉＰＳであり得る。例えば、投与用量は、細胞５００００個、５５０００個、６００００個、６５０００個、７００００個、７５０００個、８００００個、９００００個、１０００００個、１１０００００個、１２０００００個、１３０００００個、１４０００００個、１５０００００個、２００００００個、３０００００個、４０００００個、５０００００個、６０００００個、７０００００個、８０００００個、９０００００個、１００００００個、１０００００００個または５００００００００個あるいはそれらの間の任意の量であってよい。従って、例えば、投与される細胞の量は細胞１００００００個～５００００００００個であってよい。

【００８６】

投与される用量を１回または複数回の注射において適用することができることがさらに理解される。特に、被検体に、１、２、３、４、５６、７、８、９または１０回の注射を行って合計用量を送達し、それぞれの注射毎の細胞量を可算すると合計用量に達するように、それぞれの注射毎に送達される細胞量を適宜少なくする例について検討する。例えば、細胞５００００個の用量が２回の注射で投与されるならば、細胞２５０００個の注射を２回することとなる。従って、例えば、被検体の心臓組織の損傷を減少させ、修復しかつ／または再生させる方法であって、それを必要とする被検体にｉＰＳを投与することを含み、ｉＰＳ５００００個～５０００００個が被検体に投与される方法を開示する。さらに、被検体が２回の等量の注射（例えば、２回の等量の心筋内注射）でｉＰＳ５００００個～５０００００個の用量を投与される方法を、本明細書において開示する。

【００８７】

虚血／再かん流による傷害を処置し、抑制し、または予防するための、抗体などの開示された組成物の投与の後に、当該治療抗体の有効性について、当業者に公知の様々な方法で評価することができる。

【実施例】

【００８８】

Ｄ．実施例

以下の実施例は、特許請求の範囲に記載される化合物、組成物、物質、デバイスおよび／または方法がどのように作製され、評価されるかについて、当業者が完全な開示および記載を得られるように提供されるものであって、純粋に例示を目的とし、開示を限定することを意図しない。数字（例えば、量、温度など）に関して正確性を確実にするよう努力がなされているが、いくらかの誤差および逸脱は考慮されるものとする。他に指示されない限り、部は重量部であり、温度は℃で表されるかまたは雰囲気温度であり、圧力は大気圧であるかまたは大気圧付近である。

【００８９】

１．実施例１

これまで報告されてきた心筋細胞の分化は、マウスおよびヒトの線維芽細胞から生成されたｉＰＳ細胞からのものであった。本発明は、幹細胞様因子で形質移入した心臓細胞を利用した。以下の実施例は、ｉＰＳ細胞を生成するためラットの心臓細胞を利用するが、本明細書における開示はヒトまたはげっ歯類の心臓細胞などの任意の他の心臓細胞および心室細胞とともに使用することができる。他の細胞の例として、市販のヒト初代心筋細胞またはヒト胎生細胞があり、例えばＡＴＣＣ（バージニア州マナサス）から入手できる細胞などがある。

【００９０】

ａ）細胞株の維持

もともとはラット胎生心臓心室組織から単離されたものであるラット心筋芽Ｈ９ｃ２細胞（Hescheler, et al., Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. Circ Res 1991;69:1476-1486; Kimes & Brandt, Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res 1976;98:367-381）を、米国培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ）から注文し、ＤＭＥＭ中で維持した。赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）を発現するＨ９ｃ２細胞および未分化のマウスＣＧＲ８　ＥＳ細胞を、以前報告されたように（Singla et al., Factors Released from Embryonic Stem Cells inhibit Apoptosis in H9c2 cells through Pl-3kinase/Akt but not ERK pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol;295:H907-H913）、ゼラチンプレート上で維持した。

【００９１】

ｂ）形質導入したベクターおよびｉＰＳ細胞の生成

Ｏｃｔ３／４、ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびｃ－Ｍｙｃをコードするｃ ＤＮＡを、ハイフィデリティＤＮＡポリメラーゼおよびＰＣＲプライマー（Ｏｃｔ３／４　５’－ＣＡＣＣＡＴＧＧＣＴＧＧＡＣＡＣＣＴＧＧＣＴＴＣ－３’および５’－ＧＴＴＴＧＡＡＴＧＣＡＴＧＧＧＡＧＡ－３’、Ｋｌｆ４：５’－ＡＴＧＧＣＴＧＴＣＡＧＣＧＡＣＧＣＴＣＴ－３’および５’－ＡＡＡＧＴＧＣＣＴＣＴＴＣＡＴＧＴＧＴＡＡＧ－３’、Ｓｏｘ２：５’－ＡＴＧＴＡＴＡＡＣＡＴＧＡＴＧＧＡＧＡＣＧ－３’およびＴＣＡＣＡＴＧＴＧＣＧＡＣ　ＡＧＧＧＧＣＡＧＴＧＴ－３’、ｃ－Ｍｙｃ：５’－ＴＴＣＡＣＣＡＴＧＣＣＣＣＴＣＡＡＣＧＴＧＡＡＣＴＴ－３’および５’－ＴＴＴＡＴＧＣＡＣＣＡＧＡＧＴＴＣＧ－３’）を使用したＰＣＲクローニングにより生成し、次いでベクターｐＣＲ２．１（インビトロジェン、カリフォルニア州カースルバッド）にクローン化した。ＫｌＦ４、Ｓｏｘ２およびＯｃｔ３／４のｃＤＮＡ配列を、口蹄疫ウイルスの自己切断２Ａ配列（５’－ＡＡＡＡＴＴＧＴＣＧＣＴＣＣＴＧＴＣＡＡＡＣＡＡＡＣＴＣＴ　ＴＡＡＣＴＴＴＧＡＴＴＴＡＣＴＣＡＡＡＣＴＧＧＣＴＧＧＧＡＴＧＴＡＧＡＡＡＧＣＡＡＴＣＣＡＧＧＴＣＣＡ－３’）を介して連結させた。２Ａ配列を含有するセンスおよびアンチセンスオリゴ

ヌクレオチドをベクターｐＢｌｕｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ｐＢＳ、ストラタジーン、カリフォルニア州ラホーヤ）にライゲートし、さらなるクローニングに必要なベクターｐＢＳ－２Ａを生成した。次に、Ｏｃｔ３／４およびＫｌＦ４のｃＤＮＡを独立してベクターｐＢＳ－２Ａに挿入し、これによりｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２ＡおよびｐＢＳ－ＫｌＦ４－２Ａを生成した。さらに、ＫｌＦ４－２Ａ配列を単離した後、ｐＢＳ－Ｏｃｔ３／４－２Ａの同じ読み取り枠に挿入し、ｐＢＳ－Ｏｃｔ－３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａを形成した後、終止コドンを有するＳｏｘ２　ｃＤＮＡの同じ読み取り枠にこれを融合させ、ｐＢＳ－Ｏｃｔ－３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２を形成した。Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２のｃＤＮＡ断片をベクターから取り出し、発現ベクターｐＣＸ－ＥＧＦＰ（日本国の岡部勝博士より入手）のＥｃｏＲＩ部位にクローン化した。４つ目の遺伝子ｃ－ＭＹＣのクローニングにおいては、Ｏｃｔ３／４－２Ａ－ＫｌＦ４－２Ａ－Ｓｏｘ２－ｐＣＸ－ＥＧＦＰに存在するＥＧＦＰをｃ－Ｍｙｃ　ｃＤＮＡと置き換えた。生成された最終生成物が、上述の４つの遺伝子を含有する発現ベクターであった。

【００９２】

Ｈ９ｃ２細胞を、１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ中で、ウェル当たり細胞２００００個の密度にて、６ウェルプレートで培養した。細胞を８０％の密集度に増殖させた後、製造者の使用説明書に従ってリポフェクトアミン２０００（インビトロジェン）を使用して、Ｏｃｔ－３／４、Ｓｏｘ２、ＫｌＦ４およびｃ－Ｍｙｃを含有する発現プラスミドで形質導入させた。次の形質導入を３日目および５日目に行い、細胞を７日間インキュベーションし、培地を４８時間毎に入れ替えた。

【００９３】

ｉＰＳ細胞に変換した形質導入済みＨ９ｃ２細胞をトリプシン処理し、ゼラチン被覆プレートに入れ、上述のように幹細胞増殖培地で培養した。続いて、３週間後、これらの細胞はＥＳ細胞様コロニーを形成し始める。ＥＳ細胞様コロニーを抽出し、ＥＳ細胞培養培地およびマウス胚性線維芽（ＭＥＦ）細胞から調製された馴化培地（ＣＭ）（５０：５０）中で、ゼラチン被覆プレートにおいてさらに培養した。さらに、ｉＰＳおよびＨ９ｃ２細胞をＲＦＰ発現ベクターで形質移入し、安定したＲＦＰ細胞クローンを、抗生物質を用いて選択した。

【００９４】

以前報告されたやり方（Singla & Sun, Transforming growth factor-beta2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2005;332:135-141）でウェスタンブロット法を実施し、Ｈ９ｃ２細胞から生成された心臓ｉＰＳ細胞内において形質導入した幹細胞性因子（４Ｆ）の発現を検証した。つまり、ｉＰＳまたはＨ９ｃ２細胞（対照）を溶解し、遠心分離し、上清を単離した。タンパク質をＳＤＳ－Ｐａｇｅ（１０％ポリアクリルアミドゲル）で泳動し、ＰＶＤＦ膜上に移した。洗浄後、室温にて、一次抗体（抗ｃ－Ｍｙｃ、抗Ｓｏｘ２、抗Ｋｌｆ４および抗Ｏｃｔ３／４）とインキュベーションし、続いてセイヨウワサビペルオキシターゼとコンジュゲートした二次抗体とインキュベーションした。インキュベーション後、増幅化学発光キット（ＧＥライフ・サイエンス）を用いた反応をかなり進行させ、Ｘ線フィルム（シグマ・コダック）で撮影した。

【００９５】

ｃ）多能性の決定

生成したｉＰＳ細胞、ＥＳ細胞（陽性対照）またはＨ９ｃ２細胞（陰性細胞）をＰＢＳで５～７分間、２～３回洗浄した。洗浄後、細胞を、アルカリホスファターゼキット（ケミコン・インターナショナル、米国）を用いて製造者の具体的な推奨の通り染色した。次いで、細胞を明視野倒立顕微鏡により検査し、写真を鮮明に撮影した。

【００９６】

免疫染色において、メタノール：アセトン（７：３）で２０分間、－２０℃にて細胞を固定および透過処理し、ＥＳ細胞に存在する多能性マーカーであるＯｃｔ－３／４に対す

る一次抗体とインキュベーションした。３回洗浄後、細胞を、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５６８がＩｇＧにコンジュゲートされたものである二次抗体（モレキュラー・プローブス）とインキュベーションした。核を包埋媒体（ベクターラボラトリーズ）中に存在するＤＡＰＩで同定した。細胞をライカＴＳＣ　ＳＰ２レーザー走査共焦点顕微鏡で検査した。

【００９７】

次に、ｉＰＳまたはＥＳ細胞の標準的な懸滴法を使用して、胚様体（ＥＢ）を生成したが、これは、報告されたように３つ全ての胚層由来の細胞を含有する（Singla, et al., Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. J Mol Cell Cardiol 2006;40:195-200; Wiles & Keller, Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development 1991;111:259-267）。つまり、ｉＰＳまたはＥＳ細胞を、ＬＩＦの非存在下で、細胞２．５×１０^{4}個／ｍｌの濃度にて培養した。懸滴法を使用して、細胞６００～７５０個を含有する細胞懸濁液３０μｌを細胞培養プレート内で２日間で懸滴に成長させた後、さらに２日間、プレートで懸濁培養した。次いで、各ＥＢを抽出し、最大１７日間、ゼラチン被覆プレート上に置いた。両群から生成されたＥＢを比較して多能性を決定し、かつ心筋細胞への分化に使用した。

【００９８】

ｄ）梗塞発症マウスの心臓における細胞移植

この試験で使用される動物プロトコールは、セントラルフロリダ大学の動物実験委員会で承認された。ＭＩは報告されたように実施した（Singla, et al., Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. J Mol Cell Cardiol 2006;40:195-200; Kumar, et al., Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. Coron Artery Dis 2005;16:41-44)）。つまり、実験室でルーチン的に行われるように、雌雄８～１０週齢（Ｃ５７ＢＬ／６）マウスをイソフルランで麻酔し、左冠動脈下行枝を同定し、７－０縫合糸で結紮した。結紮後に変色を示した動物は梗塞発症動物と考え、細胞または媒体移植に使用した。結紮から数分以内に、梗塞周辺領域において、ｉＰＳ細胞（ｎ＝８）、ＥＳ細胞（ｎ＝８）またはＨ９ｃ２細胞（ｎ＝８）を、心筋内注射１０μｌ（それぞれ、細胞２５０００個／注射、または細胞培養媒体（ｎ＝８）を含有する）を２本行って移植した。２週間後、心臓機能を、論文に記載されているように心エコー検査を使用して決定し（Singla, et al., Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. J Mol Cell Cardiol 2006;40:195-200; Wiles & Keller, Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development 1991;111:259-267; Kumar, et al., Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. Coron Artery Dis 2005;16:41-44)）、ペントバルビタール（８０ｍｇ／ｋｇ、腹腔）注射を使用した後に頸椎脱臼させることによって動物を屠殺した。心臓を単離し、緩衝ホルマリン液（１０％）中で固定し、さらなる分析を行った。

【００９９】

ｅ）組織切片の調製および組織病理学検査

以前に報告されているように（Singla, et al., Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1308-H1314）、パラフィン包埋した心臓組織を５μｍの厚さの切片にし、脱パラフィン化し、再水和化を行った。細胞形態および線維症を決定するため、次いで全ての心臓群からの切片をそれぞれヘマトキシリン・エオジンおよびマッソントリクロームで染色した。心臓線維症（おもに左心室（ＬＶ）に存在）が観察され、ｉｍａｇｅ　Ｊ　ＮＩＨプログラムを用いて、マッソントリクローム染色した切片における総青色領域／ｍｍ^{2}を測定することによりこれを定量した。

【０１００】

ｆ）分化した心筋の同定

ＥＢまたはＥＢのトリプシン化拍動領域の免疫染色を、以前に報告されているように行った（Singla & Sun, Transforming growth factor-beta2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2005;332:135-141）。つまり、細胞を固定し、１０％正常ヤギ血清（ＮＧＳ）でブロッキングした後、一次抗体、すなわち抗サルコメア心臓αアクチン（１：１００　シグマ）またはミオシン重鎖抗体（ＭＨＣ）、ＭＦ－２０（１：１００　ハイブリドーマテクノロジーズ）と室温（ＲＴ）にて１時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を二次抗体、すなわちヤギ抗マウスＩｇＭまたはＩｇＧ（１：７５、インビトロジェン）で処理した。最後に、切片をＰＢＳで洗浄し、空気乾燥させ、４，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ；ベクターラボラトリーズ）を含有する退色防止ベクタシールド封入剤で封入し、全ての細胞核を染色した。Ｈ９ｃ２細胞を陰性対照として使用し、ＥＳ細胞が陽性対照であった。切片を検査し、上記のように共焦点顕微鏡で撮影した。

【０１０１】

心臓切片を脱パラフィン化し、脱水し、１０％ＮＧＳとインキュベーションして非特異的結合をブロッキングした。手短に述べると、ドナー細胞、つまりｉＰＳ細胞、ＥＳ細胞またはＨ９ｃ２細胞を検出するために、切片を一次抗体である抗ＲＦＰとインキュベーションした。心筋用に、一次抗体であるマウスｍＡｂ抗サルコメアαアクチン（シグマ）で心臓切片を共標識した後、二次抗体である抗マウスもしくは抗ウサギＡｌｅｘａ５６８、またはＦＩＴＣもしくはローダミンでコンジュゲートした抗マウスＩｇＧ（Ｍ．Ｏ．Ｍキット、ベクターラボラトリーズ）とインキュベーションした。各染色の組には一次抗体または二次抗体を省略した対照切片を含ませた。切片を、ＤＡＰＩを含有する退色防止剤で封入して全ての核を染色し、共焦点顕微鏡下において視覚化した。

【０１０２】

ｇ）アポトーシス

心臓切片を脱パラフィン化し、脱水し、透過性とするために２０分間室温にてプロテイナーゼＫにさらした。市販のアポトーシス細胞死検出キットを米国、ロッシュ・アプライド・サイエンスより入手した。心臓切片のアポトーシス核を検出するために、キットに備えられた小冊子に説明されている厳密な指示に従いアポトーシス染色を実施した。アポトーシスの量は、以前に報告されているように、６～８個の異なる心臓由来の１～２個の心臓切片内の赤いアポトーシス核を計数することにより決定した（Singla, et al., Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1308-H1314）。切片当たりのアポトーシス核の計数を、梗塞および境界帯域の４～６の無作為の選択された視野（倍率２０倍）において、赤色染色されたＴＵＮＥＬ陽性核の合計を青色染色されたＤＡＰＩ陽性核の合計で除することにより、陽性百分率に変換した。

【０１０３】

カスパーゼ３染色において、切片を、一次抗体である抗カスパーゼ３ウサギポリクローナル（１：５０希釈　サンタクルーズバイオテクノロジーおよびセルシグナリング）およびサルコメア心臓αアクチンマウスモノクローナル抗体（１：２０；シグマ）で１時間、３７℃にて加湿チャンバー内で共標識した。３回の洗浄を行い、切片を抗ウサギＡｌｅｘａ６３５または抗マウスＡｌｅｘａ４８８二次抗体（モレキュラープローブス）とインキュベーションした。切片を、ＤＡＰＩを含有する退色防止封入剤（ベクターラボラトリーズ）で封入して核を染色した。切片を共焦点顕微鏡で検査した。

【０１０４】

カスパーゼ－３活性を、以前報告されたように、バイオビジョン比色アッセイを使用して行った（Singla DK, Singla RD, McDonald DE. Factors Released from Embryonic Stem Cells inhibit Apoptosis in H9c2 cells through Pl-3kinase/Akt but not ERK pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol;295:H907-H913; Fatma S, Selby DE, Singla RD, Singla DK. Factors Released From Embryonic Stem Cells Stimulate c-kit-FlK-1+ve Progenitor Cells and Enhance Neovascularization. Antioxid Redox Signal 2010; [

印刷版の前に電子版公開]）。

【０１０５】

各群のデータを平均±標準誤差として表した。一元配置ＡＮＯＶＡに続いてテューキー検定を行い、各群間の有意差（ｐ＜０．０５）を評価した。

【０１０６】

２．実施例２：心臓ｉＰＳ細胞を分析し、その多能性を決定した

図１（ａ）および（ｂ）は、Ｈ９ｃ２細胞は長細いのに対し、４Ｆ発現ベクターを用いた形質導入後は、図１（ｂ）に見られるように、これらの細胞は未形質導入のＨ９ｃ２細胞（図１（ａ））と比較して形態学的に異なって見えるようになることを示している。さらに、形質導入されたＨ９ｃ２細胞の形態は、増殖中のマウスＥＳ細胞（Singla, et al., wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;345:789-795）と類似していると見られた。形質導入後のＨ９ｃ２細胞におけるクラスター形成の効率は０．００８～０．０１％の間であった。続いて、増殖するクローンをモニターし、抽出し、ＭＥＦ馴化培地を含有する細胞培養培地に維持した。生成したｉＰＳ細胞にこれらの４つの因子が存在するかを決定するためのウェスタンブロット分析のデータでは、図２に見られるように、ｉＰＳ細胞がこれら４つの幹細胞性因子を発現していることを示すが、このような因子はＨ９ｃ２細胞には存在しなかった。次に、生成したｉＰＳ細胞がアルカリホスファターゼおよびＯｃｔ３／４などの多能性マーカーをも発現するかどうかを決定するために心臓ｉＰＳ細胞を分析した。予測した通り、図３（ｂ）および（ｃ）に見られるように、ｉＰＳ細胞は増殖細胞の１００％にアルカリホスファターゼを発現し、陽性対照として使用されたＥＳ細胞でも同様の発現が観察された。対照的に、図３（ａ）に見られるように、Ｈ９ｃ２細胞はアルカリホスファターゼ染色について陰性であった。さらに、増殖するｉＰＳ細胞は未分化多能性マーカーＯｃｔ３／４について陽性であり、これは図４（ａ）～（ｄ）に見られるように陽性対照としてのＥＳ細胞と比較された。これらのデータは、生成したｉＰＳ細胞は再プログラムされ、多能性マーカーを発現し、ＥＳ細胞と同等であることを示唆する。

【０１０７】

３．実施例３：細胞培養のｉＰＳ細胞からの心筋細胞の分化

ＥＳ細胞を用いて観察されるように、心臓ｉＰＳ細胞が３つ全ての胚層由来の細胞を含有するＥＢを生成する可能性があるかを試験するため、ＥＢを標準的な懸滴法を使用して生成した。ｉＰＳ細胞から生成されたＥＢは、形態的、機能的に、ＥＳ細胞由来のＥＢと類似していた（データは示さず）。次に、１１日目の時点でＥＢが心筋細胞を生成する潜在的能力を決定した。ｉＰＳ細胞から生成されたものでは自発的に拍動するＥＢが３０％観察され、それに比べてＥＳ細胞からのものでは２７％であり、両細胞型において同様な潜在的能力を有する心筋細胞が存在することが示唆された（データは示さず）。さらに、心臓特異的マーカーであるサルコメアαアクチンとリポータータンパク質ＲＦＰとの二重免疫標識を行い、心筋細胞の有無を決定した。ｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞から生成されたＥＢのいくつかは、心筋細胞の存在を実証するサルコメアαアクチンについて強く陽性であった（サルコメアαアクチンは図５（ａ）、（ｅ）および（ｉ）に示し、レポータータンパク質ＲＦＰは図５（ｂ）、（ｆ）および（ｊ）に示す）。ＤＡＰＩは全ての核を染色し（図５（ｃ）、（ｇ）および（ｋ））、合成画像により心筋細胞の分化を確認する（図５（ｄ）、（ｈ）および（ｌ））。次に拍動ＥＢをトリプシン処理し、図６（ａ）～（ｄ）に示されるようにサルコメアαアクチンで染色した。さらに、ｉＰＳ－ＥＢおよびＥＳ－ＥＢにおいて、消化されたＥＢは別の心筋細胞特異的マーカーであるＭＨＣ抗体ＭＦ－２０でも染色したが（図７（ｉ）～（ｌ）および（ｅ）～（ｈ））、Ｈ９ｃ２細胞はＭＦ－２０について陰性であった（図７（ａ）～（ｄ））。定量的データにより、心筋細胞の分化は、Ｈ９ｃ２細胞では０％であるのに比べ、ｉＰＳ細胞およびＥＳ細胞から生成されたＥＢではどちらも２５％であったことが示唆された。それゆえ、心臓ｉＰＳ細胞株は細胞培養において心筋細胞に分化する潜在的能力を有することが示唆された。

【０１０８】

４．実施例４：移植されたｉＰＳ細胞は心筋細胞に分化し、ギャップ結合を形成する
抗ＲＦＰで染色した心臓切片より、Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおいて移植されたｉＰＳ細胞は心筋の梗塞周囲および梗塞領域に存在するが（図９（ｎ））、Ｈ９ｃ２細胞移植された心臓には染色される細胞が存在しないことが実証された。次に、ＭＩ＋ＥＳ細胞移植の心臓の抗ＲＦＰ抗体染色は、心臓の梗塞周囲および梗塞領域に移植細胞がまばらに分布することを示した（図９（ｊ））。移植された細胞が心筋細胞に分化したかを確認するため、４つ全ての群をサルコメアαアクチン抗体で共標識し、移植された幹細胞が新たな心筋細胞に分化したことが示唆された（図９（ｉ）～（ｐ））。しかし、Ｈ９ｃ２細胞移植された群では、新たに生成された心筋細胞はほとんど認められなかった。定量的データにより、ＥＳ細胞移植された心臓では１．９２±０．３％の新たに形成された心筋細胞が存在していたのに対し、ｉＰＳ細胞では２．３７±０．３％であったことが示された（図１０）。ｉＰＳ群およびＥＳ群の陽性分化心筋細胞の割合は、Ｈ９ｃ２細胞群およびＭＩ群と比べ有意に差があった（ｐ＜０．０５）。しかし、ｉＰＳ細胞群とＥＳ細胞群との間に統計的な差はなかった（図１０）。次に、新たに生成された心筋細胞が天然の心筋との電気的カップリングを示すかを確認するため、心臓切片を、ドナーｉＰＳ細胞を検出するためにＲＦＰ、心筋細胞を検出するためにサルコメアαアクチン、およびギャップ結合を同定するためにコネキシン－４３で、三重に免疫標識した。図１１（ａ）～（ｌ）は、新たに生成された心筋細胞がギャップ結合を形成し、電気的にカップリングし、心筋に組み込まれたことを示す。

【０１０９】

５．実施例５：移植されたｉＰＳ細胞はアポトーシスを抑制する
移植されたｉＰＳ細胞の心臓アポトーシスに対する影響をＴＵＮＥＬ染色、カスパーゼ－３免疫染色、およびカスパーゼ－３活性により決定した。ＴＵＮＥＬ染色のデータでは、ＭＩ群およびＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞群において広範囲に赤色のアポトーシス核が示されているのに対し（図１２（ａ）および（ｄ））、ＭＩ＋ｉＰＳ細胞群またはＥＳ細胞群では赤色のアポトーシス核の量が減少している（図１２（ｇ）および（ｊ））。ＤＡＰＩ染色した全ての核（図１２（ｂ）、（ｅ）、（ｈ）および（ｋ））、ならびに合成画像を図１２（ｃ）、（ｆ）、（ｉ）および（ｌ）に見ることができる。定量的ＴＵＮＥＬアポトーシス核により、ＭＩ群またはＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞群（ＭＩ；１．２±０．１、ＭＩ±Ｈ９ｃ２細胞；１＋０．２％アポトーシス核／切片、図１３）と比べ、移植されたｉＰＳ細胞がアポトーシス核を有意に（Ｐ＜０．０５）減少させた（０．６±０．７％）ことが示された。さらに、移植されたＥＳ細胞はｉＰＳ細胞群と同様にアポトーシスを減少させた。ＴＵＮＥＬ染色した心臓切片をカスパーゼ－３染色とも組み合わせて、細胞死がアポトーシス性のものであることを確認した。さらに、いくつかの切片では、３つ目の抗体でサルコメアαアクチンを共染色し、アポトーシスが心筋細胞で発生することを確認した。図１４（ａ）～（ｊ）により、アポトーシス核がＴＵＮＥＬで染色され、カスパーゼ－３抗体で共標識され、さらにサルコメアαアクチンについて陽性であったことを確認し、アポトーシスが心筋細胞で発生することが示唆された。次に、アポトーシスの特質であると考えられるカスパーゼ－３活性を測定した。本データにより、ｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞移植後に、カスパーゼ－３活性はＭＩに比べ有意に（Ｐ＜０．０５）減少したが、Ｈ９ｃ２細胞ではカスパーゼ－３活性の減少が見られないことが示された。さらに、カスパーゼ－３活性のデータはＴＵＮＥＬアポトーシス核染色によっても裏付けられており、心臓におけるアポトーシスが確認できる。

【０１１０】

６．実施例６：移植されたｉＰＳ細胞は線維症を抑制する
移植されたｉＰＳ細胞またはＥＳ細胞が、有害な心臓リモデリングを抑制するか否かについて決定するために、組織学的検査を行った。幹細胞の有無に関わらず、移植された全てのマウス群の総間質性線維面積（ｍｍ^2）を測定することにより、ＬＶリモデリングを決定した。ＭＩ心臓およびＨ９ｃ２細胞移植心臓が大きな線維面積を有する（ＭＩ：０．９４±０．０３、およびＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞：０．９±０７ｍｍ^2）のに比べ、ｉＰＳ細

胞およびＥＳ細胞を用いて移植を行った梗塞発症心臓から得られた心臓切片は線維症の有意な（ｐ＜０．０５）減少を示している（ＭＩ＋ｉＰＳ細胞：０．２５±０．０９、およびＭＩ＋ＥＳ細胞：０．２１±０，０５ｍｍ^2）。

【０１１１】

７．実施例７：奇形腫形成

ＭＩ後にｉＰＳ細胞およびＥＳ細胞を用いて移植を行った全ての動物は、Ｈ＆Ｅ染色した切片を検査したところ、奇形腫形成のエビデンスを示さなかった（図１８）。

【０１１２】

８．実施例８：移植されたｉＰＳ細胞は心臓機能を改善する

ＬＡＤ結紮後２週間の時点で行った心エコー検査により、左室内径短絡率について、ＭＩ＋ＥＳ細胞群、ＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞群、およびＭＩ群（ＭＩ＋ＥＳ細胞；４１±０．９、ＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞；３８±０．７、およびＭＩ；３１±０．９）に比べ、ｉＰＳ移植された心臓では有意な改善が示された（ＭＩ＋ｉＰＳ細胞；４５．４±０．７）。さらに、ＥＳおよびＨ９ｃ２細胞の移植群は、ＭＩ心臓と比べ有意な差（Ｐ＜０．０５）があった。次に、左室収縮内径（ＬＶＩＤｓ）が、ＭＩ群およびＭＩ＋Ｈ９ｃ２細胞群に比べ、ＭＩ＋ｉＰＳ細胞群およびＥＳ細胞群で有意に（Ｐ＜０．０５）減少した。

【０１１３】

９．実施例９：考察

本研究の目的は、ラット心臓ｉＰＳ細胞を生成し、それらが梗塞発症心筋を修復し再生させる可能性を実証することであった。本研究は、４つの幹細胞性因子（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４およびｃ－Ｍｙｃ）を使用して、Ｈ９ｃ２細胞（もともとは胚性ラット心臓組織由来；Hescheler, et al., Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. Circ Res 1991;69:1476-1486; Kimes & Brandt, Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res 1976;98:367-381）から、ラット心臓ｉＰＳ細胞の作製に初めて成功したものである。これらの心臓ｉＰＳ細胞は、ＥＳ細胞と類似の特徴を数多く示し、それらの特徴には以下のものが含まれる；ＥＳ細胞様コロニーの形成、４つの幹細胞性因子の存在、アルカリホスファターゼおよびＯｃｔ３／４の陽性染色、そしてＥＢを形成するという特性。心臓ｉＰＳ細胞のデータは、ヒトの胚性細胞および成人線維芽細胞から生成したＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞の未分化性の特徴により支持される（Kumar, et al., Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. Coron Artery Dis 2005 ;16:111-116; Thomson, et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-1147; Zhao & Daley, From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. J Cell Biochem 2008;105:949-955）。さらに、心臓由来Ｈ９ｃ２細胞の再プログラミングの成功により、ヒト成人または新生児の単離された心筋細胞から心臓ｉＰＳ細胞を生成する可能性が示された。

【０１１４】

また、インビトロおよびインビボでヒトまたはマウスのｉＰＳ細胞から心筋細胞を誘導したことについて得られていたデータは、４つの幹細胞性因子（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、ＫｌＦ４およびｃ－Ｍｙｃ）を使用し、またはｃ－Ｍｙｃを省略して、線維芽細胞から作製したｉＰＳ細胞に基づくものである（Zhang, et al., Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res 2009;104:e30-e41; Martinez-Fernandez, et al., iPS programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism. Circ Res 2009;105:648-656; Narazaki, et al., Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation 2008;118:498-506）。

【０１１５】

本研究の目的は、ラット心臓ｉＰＳ細胞が細胞培養において心筋に分化し、かつ移植後に梗塞発症マウスの心臓を修復し、再生させることができるかについて決定することであ

った。これに関しては、ＥＢが発生し、ｉＰＳ細胞由来の心筋が同調して拍動し、心筋細胞特異的マーカーであるサルコメアαアクチンおよびＭＨＣ抗体ＭＦ－２０の染色が陽性であることが、確固として結論付けられた。このｉＰＳ由来の心筋細胞分化のデータを、既に確立されたＥＳ細胞の心筋生成モデルと比較し、確認した（Singla & Sun, Transforming growth factor-beta2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2005;332:135-141）。さらに、最近刊行された、細胞培養系におけるマウスおよびヒト線維芽ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞は、本研究で得られたデータとよく一致しており、心臓ｉＰＳ細胞が心筋細胞に分化する能力を有することが強く示唆される（Zhang, et al,, Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res 2009;104:e30-e41; Martinez-Fernandez, et al., iPS programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism. Circ Res 2009 ;105:648-656; Narazaki, et al., Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation 2008;118:498-506）。しかしながら、ラット線維芽ｉＰＳ細胞を生成してラット心臓ｉＰＳ細胞と比較することが、いずれかの細胞が他の細胞型と比べて心血管細胞型に分化する上でより有利であるか否かを決定するためには依然として必要である。同様に、本研究は、組織特異的ｉＰＳ細胞型からｉＰＳを生成するという新たな道を切り開き、これは一般的な線維芽ｉＰＳ細胞と対比される。組織特異的ｉＰＳ細胞の生成が有利であるかについてさらなる研究が必要である。

【０１１６】

さらに、細胞が梗塞発症の心筋を再生する可能性を有するかを確認するために、移植された心臓ｉＰＳ細胞のデータを証明するべきである。心臓ｉＰＳ細胞は、梗塞発症の心筋に挿入されると多能性を失って本来の心筋中に植え付けられ、そこでは局所的な微小環境がこれらの細胞を心筋細胞に分化するよう誘導することを、上記データは強く示唆している。さらに、幹細胞移植試験においては、新たに分化した細胞が宿主心筋に組み込まれることができるかという懸念がある。上記データは、新たに形成された心筋細胞がコネキシン－４３について陽性であり、電気的カップリングを示すことを示唆する。ヒト心筋細胞など患者に特異的な種々の成人細胞源からｉＰＳ細胞を容易に生成できるのであるから、心臓ｉＰＳ細胞を使用したこれらの心臓再生データは重要である。さらに、移植された心臓ｉＰＳ細胞の再生データは、ＥＳ細胞または線維芽ｉＰＳ細胞を使用して梗塞発症の心臓において行われた試験と一致している（Nelson, et al., Repair of acute myocardial infarction by human sternness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009;120:408-416; Singla, et al., Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. J Mol Cell Cardiol 2006;40:195-200; Behfar, et al., Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J 2002;16:1558-1566）。さらに、移植されたＨ９ｃ２細胞は新たな心筋分化を示さなかった。これらのデータは、形質導入した心臓ｉＰＳ細胞はＨ９ｃ２細胞の元の特性を喪失しており、非形質導入Ｈ９ｃ２細胞と比べて、梗塞発症の心臓を再生させるより優れた能力を有することを示唆する。

【０１１７】

移植されたＥＳまたはｉＰＳ細胞は、免疫不全マウスに移植した後に奇形腫を形成する恐れがあり、これはＥＳ細胞の確立された特徴である（Thomson, et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-1147; Reubinoff, et al., Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000;18:399-404）。従って、奇形腫形成は、あらゆる器官においてＥＳ細胞またはｉＰＳ細胞の移植後の大きな制約となる。免疫不全マウスの梗塞発症の心筋に移植されたｉＰＳ細胞は腫瘍形成を示し、それに比べて免疫応答性マウスでは奇形腫形成が認められなかったことが最近報告された（Nelson, et al., Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009;120:408-416）。本研究では、梗塞発症マウスの心臓に移植さ

れたｉＰＳ細胞が、奇形腫形成のエビデンスを示すことなくうまく移植され、心筋細胞に分化し得ることが、確固として示されている。奇形腫形成の欠如の正確な理由は全く理解されていない。しかし、少ない数の心臓ｉＰＳ細胞が移植されたため、細胞がＭＩ後の心臓放出因子によりよくさらされ、これにより心臓細胞型に直接分化することに役立った可能性がある。対照的に、多数移植されたＥＳまたはｉＰＳ細胞は、細胞クランプを形成し、これにより心臓細胞型分化よりむしろ幹細胞増殖を促進する内部幹細胞微小環境にこれら細胞がさらされ、奇形腫形成につながり得る。形質導入された癌原遺伝子であるｃ－Ｍｙｃが、これらの心臓ｉＰＳ細胞において奇形腫形成能を失ったかどうかを決定する他の指標はまだ知られていない。上記データは、少数のＥＳまたはｉＰＳ細胞は奇形腫を形成しないことを示唆する過去に発表された研究と一致している（Nelson, et al., Repair of acute myocardial infarction by human sternness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009;120:408-416; Nussbaum, et al., Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. FASEB J 2007;21:1345-1357; Singla, Embryonic Stem Cells in Cardiac Repair and Regeneration. Antioxid Redox Signal 2009;11:1857-1863）。

【０１１８】

次に、ＭＩ対照に比べ、ｉＰＳ細胞を移植された心臓において心臓機能の著しい改善が観察された。しかし、観察された機能改善は、新たに分化した心筋の数とあまり相関を示さない。これに関し、本研究を拡大して、移植されたｉＰＳ細胞が心筋アポトーシスおよび線維症を抑制するかどうかについて調べた。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、末期心不全へとつながるＭＩの進行に重要な役割を果たすことがすでに確立されている（Anversa, et al., Myocyte cell death and ventricular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertens 1997;6:169-176）。さらに、有害な心臓リモデリングには線維芽細胞増殖が関与し、これが死んだアポトーシス心筋と置き換わり、線維症の発症を引き起こし、最終的に心機能不全につながる（Anversa, et al., Myocyte cell death and ventricular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertens 1997;6:169-176）。本研究において、移植されたｉＰＳ細胞が梗塞発症の心臓の内因性心臓アポトーシスおよび線維症を著しく抑制することが示唆されている。本研究におけるアポトーシスおよび線維症の抑制は、これまでの幹細胞試験で観察された効果と類似しているようである（Singla, et al., Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1308-H1314; Wang, et al., Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. J Mol Cell Cardiol 2006;40:736-745; Wang, et al, Chronic Preconditioning: A Novel Approach For Cardiac Protection. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292:H2300-H2305）。このデータは、ＭＩのアポトーシスおよび線維症の著しい減少は、梗塞発症の心臓における細胞移植が、自己分泌または傍分泌経路を介して有益な効果を発揮する一般的な現象であることを示唆する。それゆえ、移植されたｉＰＳ細胞も自己分泌または傍分泌因子を放出し、この因子はまだ未同定であるが、これがアポトーシスおよび線維症の抑制に主要な役割を果たすことが想定される。さらに、ＥＳ細胞またはＭＳＣから放出される因子はアポトーシスを抑制する（Singla, et al., Factors Released from Embryonic Stem Cells inhibit Apoptosis in H9c2 cells through Pl-3kinase/Akt but not ERK pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol;295:H907-H913; Gnecchi, et al., Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. Nat Med 2005;11:367-378; Gnecchi, et al., Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J 2006;20:661-669）。しかし、この放出された因子は、報告されたように、特定の型の成長因子である（Singla, et al., Factors Released from Embryonic Stem Cells inhibit Apoptosis in H9c2 cells through Pl-3kinase/Akt

but not ERK pathway. Am J Physiol Heart Circ Physiol;295:H907-H913; Gnecchi, et al, Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. Nat Med 2005;11:367-378; Gnecchi, et al, Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J 2006;20:661-669; Singla & McDonald, Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1590-H1595）。同様に、ｉＰＳ細胞により放出される因子がＥＳ細胞またはＭＳＣのものと同じであるか否かについて決定するためにはさらなる研究が必要である。全体として、本研究における心機能の改善は、新たな心筋細胞の形成ならびに有害な心臓リモデリングの抑制によるものであることが示唆される。

【０１１９】

結論として、ラットの心臓ｉＰＳ細胞が多能性であり、細胞培養系において心筋細胞に分化することができ、梗塞発症の心筋を再生させることを、初めて報告する。これらの発見はさらに、梗塞発症の心臓に移植されたｉＰＳ細胞が、ＭＩの２週間後、アポトーシスおよび線維症を抑制することを初めて提示する。移植されたｉＰＳ細胞の多因子的な効果が、新たな心筋の分化および心臓リモデリングの減少につながり、心機能改善に貢献する。

【図１】

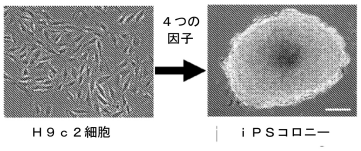


図１

【図２】

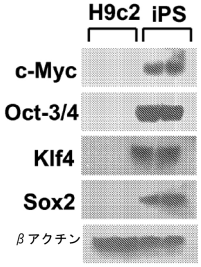


図２

【図３】

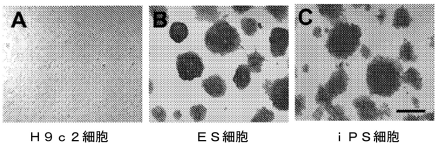


図３

【図４】

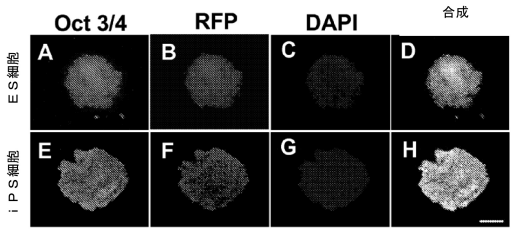


図４

【図５】

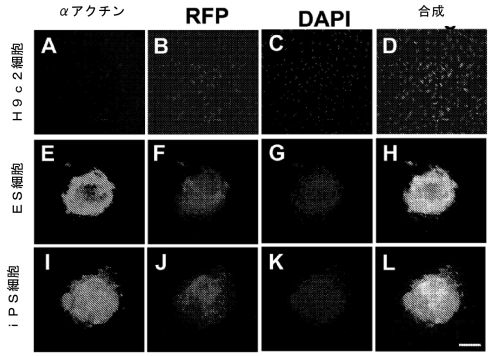


図５

【図６】

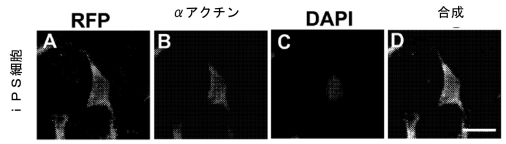


図６

【図７】

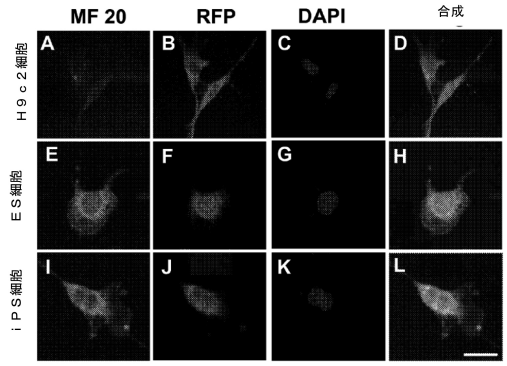


図７

【図８】

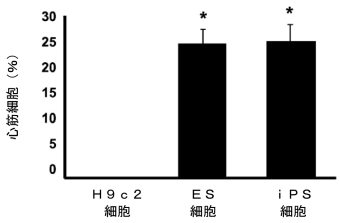


図８

【図９】

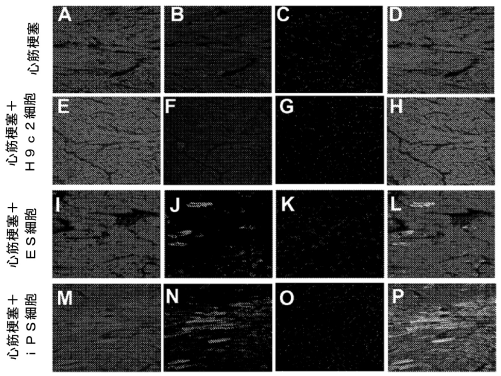


図９

【図１０】

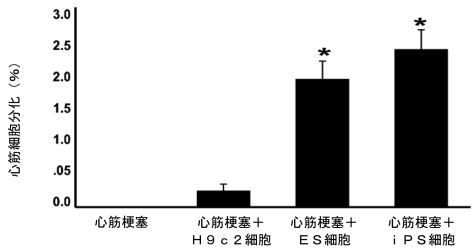


図１０

【図１１】

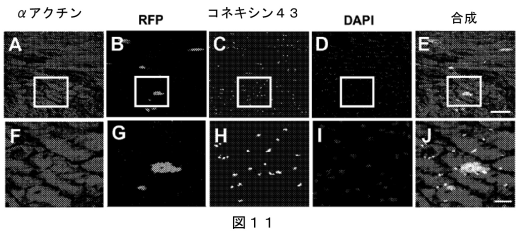


図１１

【図１２】

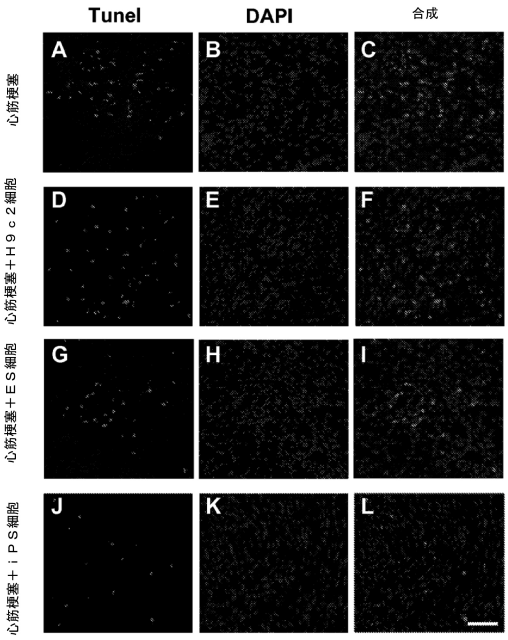


図１２

【図１３】

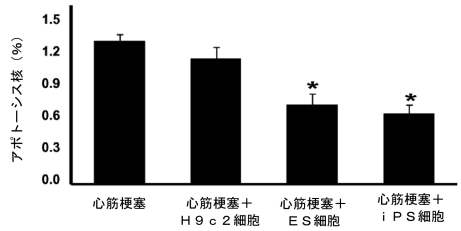


図１３

【図１４】

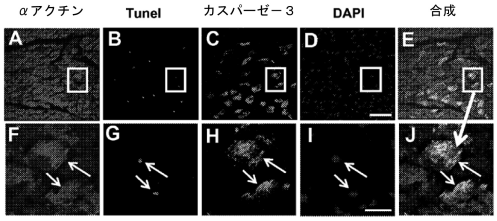


図１４

【図１５】

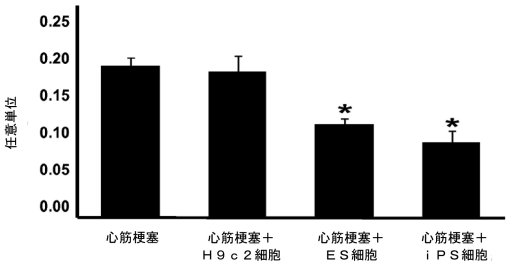


図１５

【図１６】

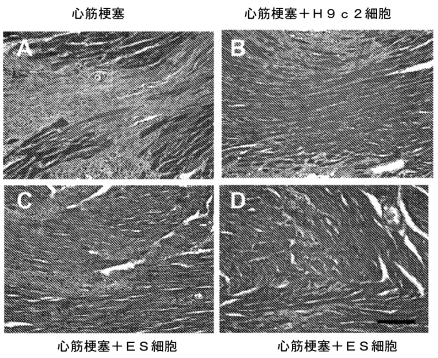


図１６

【図１７】

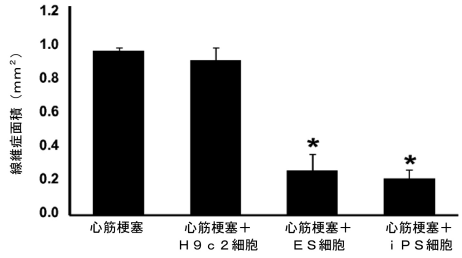


図１７

【図１８】

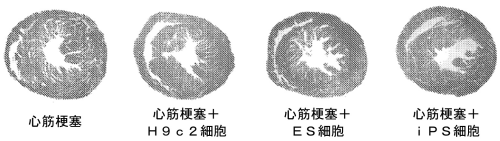


図１８

【図１９】

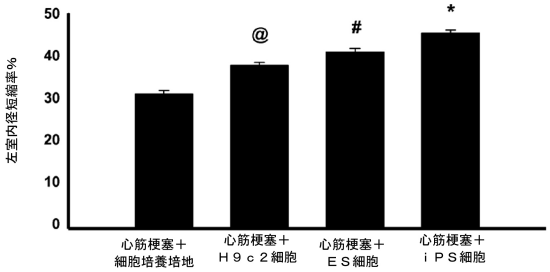


図１９

【図２０】

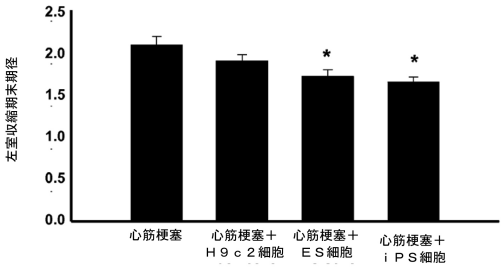


図２０

【配列表】
0005921558000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　シングラ、　ディネンダー
アメリカ合衆国　３２８１７　フロリダ州　オーランド　レイク　ジーン　ドライブ　３０１９

審査官　山村　祥子

(56)参考文献　Circulation, ２００９年, Vol.120, p.408-416
綜合臨牀, ２００９年　4月, Vol.58,No.4, p.591-598
日本臨牀, ２０１０年　4月, ６８巻４号, p.731-736

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３５／３４
Ａ６１Ｐ　９／１０
Ｃ１２Ｎ　５／０７１
Ｃ１２Ｎ　１５／０９
ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）