

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5928681号  
(P5928681)

(45) 発行日 平成28年6月1日 (2016. 6. 1)

(24) 登録日 平成28年5月13日 (2016. 5. 13)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N 5/10 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 5/10
<b>C 1 2 N 1/00 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/00 G
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 P 7/00 (2006. 01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28

請求項の数 4 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2011-189582 (P2011-189582)	(73) 特許権者	304021831
(22) 出願日	平成23年8月31日 (2011. 8. 31)		国立大学法人 千葉大学
(65) 公開番号	特開2012-70731 (P2012-70731A)		千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号
(43) 公開日	平成24年4月12日 (2012. 4. 12)	(74) 代理人	100088904
審査請求日	平成26年8月29日 (2014. 8. 29)		弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	特願2010-193827 (P2010-193827)	(74) 代理人	100124453
(32) 優先日	平成22年8月31日 (2010. 8. 31)		弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀
		(72) 発明者	岩間 厚志
			千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号
			国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院
			内

最終頁に続く

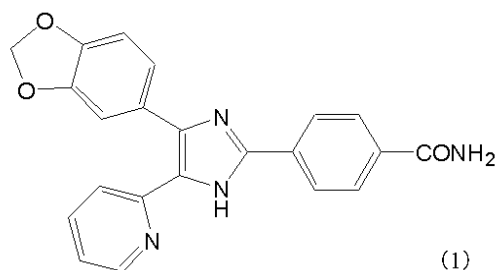
(54) 【発明の名称】 ヒト多能性幹細胞からの造血幹細胞の効率的な誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (1)

【化 1】



で表される化合物からなる、ヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤であって、

下記工程：

(1) ヒト人工多能性幹細胞を、ヒト骨形成タンパク質4 (bone morphogenetic protein 4 ; BMP4) およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF) を含む培地中で培養する工程、

(2) 前記工程 (1) で培養した細胞を、さらに上記式 (1) で表される化合物、ヒトBMP4およびヒト血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) を含む培

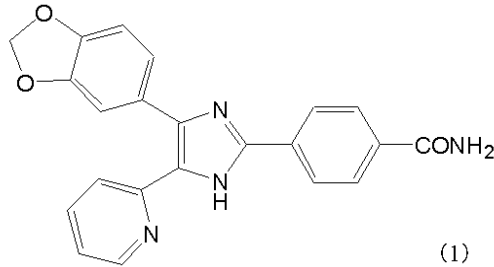
地中で培養する工程、  
および

(3)前記工程(2)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトトロポポイエチン(thrombopoietin)およびヒト幹細胞因子(stem cell factor)を含む培地中で培養する工程、  
を含むヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法で使用される分化誘導促進剤。

【請求項2】

下記式(1)

【化2】



で表される化合物を含む、ヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物であって、

下記工程：

(1)ヒト人工多能性幹細胞を、ヒト骨形成タンパク質4(bone morphogenetic protein 4; BMP4)およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)を含む培地中で培養する工程、

(2)前記工程(1)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4およびヒト血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)を含む培地中で培養する工程、

および

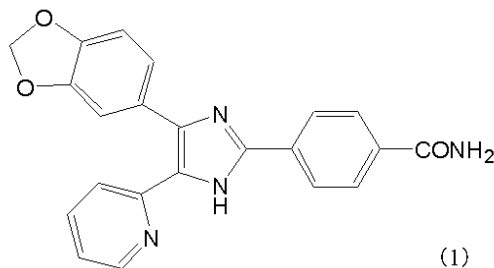
(3)前記工程(2)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトトロポポイエチン(thrombopoietin)およびヒト幹細胞因子(stem cell factor)を含む培地中で培養する工程、

を含むヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法で使用される分化誘導促進用組成物。

【請求項3】

下記式(1)

【化3】



で表される化合物を試薬として含む、ヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットであって、

下記工程：

(1)ヒト人工多能性幹細胞を、ヒト骨形成タンパク質4(bone morphogenetic protein 4; BMP4)およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)を含む培地中で培養する工程、

(2)前記工程(1)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4およびヒト血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)を含む培地中で培養する工程、

および

(3)前記工程(2)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトロンボポイエチン(thrombopoietin)およびヒト幹細胞因子(stem cell factor)を含む培地中で培養する工程、

を含むヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法で使用される分化誘導促進用試薬キット。

【請求項4】

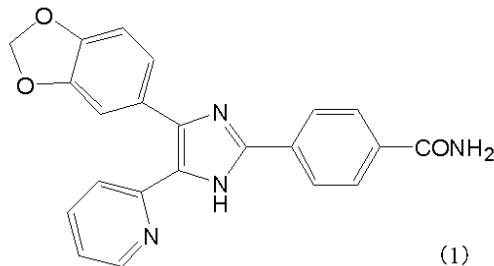
10

下記工程：

(1)ヒト人工多能性幹細胞を、ヒト骨形成タンパク質4(bone morphogenetic protein 4; BMP4)およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)を含む培地中で培養する工程、

(2)前記工程(1)で培養した細胞を、さらに下記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4およびヒト血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)を含む培地中で培養する工程、

【化4】



20

および

(3)前記工程(2)で培養した細胞を、さらに上記式(1)で表される化合物、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトロンボポイエチン(thrombopoietin)およびヒト幹細胞因子(stem cell factor)を含む培地中で培養する工程、

30

を含むヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤、分化誘導促進用組成物、分化誘導促進用試薬キット、分化誘導方法、並びに該分化誘導方法により得られる細胞培養物に関する。より詳しくは本発明は、トランスフォーミング増殖因子 - (TGF-) 阻害剤を使用することを特徴とする前記分化誘導促進剤、分化誘導促進用組成物、分化誘導促進用試薬キット、分化誘導方法、並びに該分化誘導方法により得られる細胞培養物に関する。また、本発明は、多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である前記分化誘導促進剤、分化誘導促進用組成物、分化誘導促進用試薬キット、分化誘導方法、並びに該分化誘導方法により得られる細胞培養物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

近年、造血機能の不全や障害による造血系疾患の治療を目的として、造血幹細胞や造血前駆細胞を移植して造血機能を再生する造血系再生医療が行われている。再生医療は機能不全や機能障害を起こした細胞、組織、器官の再生や機能の回復を目的とした医療である。造血系再生医療は、主に造血系の悪性腫瘍および遺伝子疾患への治療に応用され、また、造血系以外の悪性腫瘍の化学療法後の骨髄抑制の治療にも応用されている。

50

## 【 0 0 0 3 】

造血系再生医療は、今まで骨髓移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植などの幹細胞移植により実施されているが、これらには含有される造血幹細胞数、生着率、ドナーリスクなどの様々な問題がある。

## 【 0 0 0 4 】

このような状況において、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: 以下、iPS細胞と略称することがある) や胚性幹細胞 (embryonic stem cells: 以下、ES細胞と略称することがある) などの多能性幹細胞から長期骨髓再構築能を持つ造血幹細胞を効率的に分化誘導し、増幅することは、造血系再生医療において大きな課題である。

## 【 0 0 0 5 】

既にマウスES細胞からはHoxB4遺伝子を強制発現させることにより長期骨髓再構築能を持つ造血幹細胞を分化誘導、増幅することが可能である (非特許文献1)。しかしながら、ヒトES細胞においては、未だ効率的な造血幹細胞の分化誘導および増幅方法の報告はなく、HoxB4遺伝子を強制発現させた場合においてもマウスと同等の効果は得られていない (非特許文献2)。ヒトES細胞からの造血幹細胞誘導において、現在までに最も良好な報告は、マウス胎生10.5日目の大動脈 - 生殖隆起 - 中腎領域由来のストローマ細胞株 (AM20.1B4) を支持細胞 (feeder cells) として用いて造血幹細胞の分化誘導を行ったもので、免疫不全マウスで移植実験を行った結果、最大で骨髓に約2%、末梢血に約16%のヒトES細胞由来の血液細胞の生着が認められている (非特許文献3)。

## 【 0 0 0 6 】

造血幹細胞の体外増幅に関しては、臍帯血造血幹細胞を対象とした研究も多数報告されている。これらの報告では、幹細胞因子 (以下、SCFと略称することがある) やトロンボポイエチン (以下、TPOと略称することがある)、FMS様チロシンキナーゼ3リガンド (以下、Flt3Lと略称することがある)、インターロイキン - 6 / 可溶性インターロイキン - 6 受容体複合体 (以下、IL-6/sIL-6Rと略称することがある)、ノッチリガンド (以下、Notchリガンドと称する) などのサイトカインや増殖因子の存在下で臍帯血造血幹細胞を培養することにより、造血幹細胞の増幅が試みられている。また、DNAメチル化酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤、銅キレート化合物などの低分子化合物を添加することによる造血幹細胞の増幅方法が報告されている (非特許文献4および非特許文献5)。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 国際公開第WO2007-069666号パンフレット

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Kyba, M. et al., HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors, Cell, Vol.109, No.1, p.29-37, 2002

【 非特許文献 2 】 Wang, L. et al., Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression, J Exp Med, Vol.201, No.10, p.1603-1614, 2005

【 非特許文献 3 】 Ledran, M.H. et al., Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches, Cell Stem Cell, Vol.3, No.1, p.85-98, 2008

【 非特許文献 4 】 Araki, H. et al., Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents, Exp Hematol, Vol.34, No.2, p.140-149, 2006

【 非特許文献 5 】 de Lima, M. et al., Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial, Bone Marrow Transplant, Vol.41, No.9, p.771-778, 2008

10

20

30

40

50

【非特許文献6】Yamazaki S., et al., TGF- $\beta$  as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation, BLOOD, Vol.113, No.6, pp.1250-1256

【非特許文献7】Itskovitz-Eldor, J. et al., Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers, Mol Med, Vol.6, No.2, p.88-95, 2000

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ヒトES細胞からの造血幹細胞分化誘導において、現在までに最も良好な結果が報告されている方法（非特許文献3）であっても、その効率は再生医療に応用するには未だ不十分である。また、報告されている方法は、造血のための微小環境を構築し得るマウス由来ストローマ細胞株の使用に依存している。異種動物由来のストローマ細胞株を利用して増幅したヒト造血幹細胞を移植することは異種移植に該当することとなり、この点は臨床応用を考える上で大きな問題となる。このため、ヒトiPS/ES細胞からの効率的な造血幹細胞分化誘導方法において異種動物由来ストローマ細胞株への依存の程度が少ない方法を確立していくことが望まれる。

10

【0010】

本発明の目的は、多能性幹細胞、特にヒト多能性幹細胞から長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞を効率的に分化誘導し、増幅する手段を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

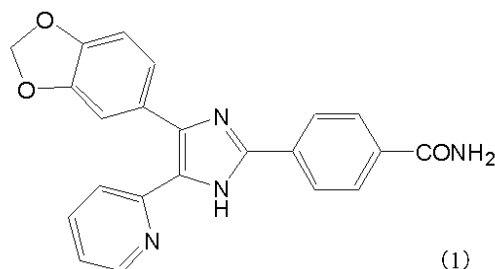
【0011】

本発明者は上記目的を達成すべく、ヒトiPS細胞を用いて、ヒト多能性幹細胞から造血幹細胞への分化誘導、およびその増幅を促進する低分子化合物の探索を行った。その結果、SB431542と称されるTGF- $\beta$  受容体阻害剤である低分子化合物4-[4-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド（下記式（1））がヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導並びにその増幅を促進した。

【0012】

【化1】

30



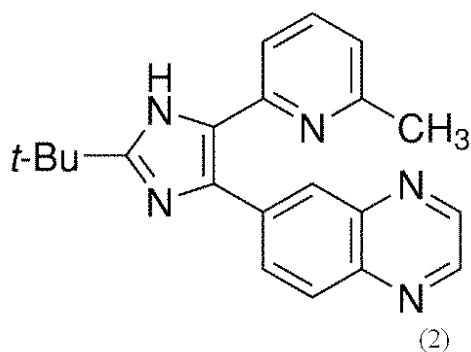
【0013】

さらに、TGF- $\beta$  受容体阻害剤であるSB525334と称される低分子化合物6-[2-tert-ブチル-5-(6-メチル-ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル]-キノキサリン（下記式（2））およびLY364947と称される低分子化合物4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン（下記式（3））がいずれもヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導並びにその増幅を促進した。

40

【0014】

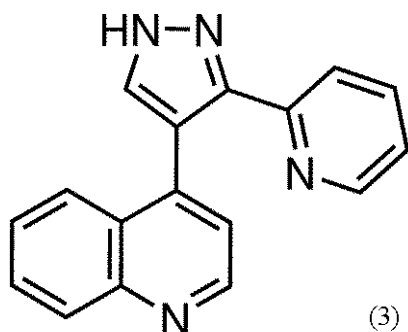
## 【化2】



10

## 【0015】

## 【化3】



20

## 【0016】

TGF- 受容体阻害剤はTGF- 受容体の作用を阻害することにより該受容体が介するTGF- の作用を抑制することから、TGF- の作用を阻害する化合物はTGF- 受容体阻害剤と同様にヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導並びにその増幅を促進し得ると考えることができる。本発明はこの知見を利用することにより完成したものである。

## 【0017】

すなわち、本発明は、1. TGF- 阻害剤からなる、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

30

## 【0018】

また本発明は、2. TGF- 阻害剤がTGF- 受容体阻害剤である、上記1.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

## 【0019】

さらに本発明は、3. TGF- 受容体阻害剤が、上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなるTGF- 受容体阻害剤である、上記2.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

## 【0020】

さらにまた本発明は、4. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなる、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

40

## 【0021】

また本発明は、5. 多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、上記1.から4.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

## 【0022】

さらに本発明は、6. 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、上記1.から5.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

50

る。

【0023】

さらにまた本発明は、7. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなる、ヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

【0024】

また本発明は、8. TGF- 阻害剤を含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0025】

さらに本発明は、9. TGF- 阻害剤がTGF- 受容体阻害剤である、上記8.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

10

【0026】

さらにまた本発明は、10. TGF- 受容体阻害剤が上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなるTGF- 受容体阻害剤である、上記9.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0027】

また本発明は、11. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物を含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0028】

20

さらに本発明は、12. 多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、上記8.から11.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0029】

さらにまた本発明は、13. 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、上記8.から12.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0030】

また本発明は、14. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物を含む、ヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

30

【0031】

さらに本発明は、15. TGF- 阻害剤を試薬として含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットに関する。

【0032】

さらにまた本発明は、16. TGF- 阻害剤がTGF- 受容体阻害剤である、上記15.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットに関する。

【0033】

また本発明は、17. TGF- 受容体阻害剤が上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなるTGF- 受容体阻害剤である、上記16.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットに関する。

40

【0034】

さらに本発明は、18. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物を試薬として含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットに関する。

【0035】

さらにまた本発明は、19. TGF- 阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

50

## 【0036】

また本発明は、20. TGF- 阻害剤がTGF- 受容体阻害剤である、上記19.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0037】

さらに本発明は、21. TGF- 受容体阻害剤が上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなるTGF- 受容体阻害剤である、上記20.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0038】

さらにまた本発明は、22. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

10

## 【0039】

また本発明は、23. TGF- 阻害剤および造血因子の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0040】

さらに本発明は、24. TGF- 阻害剤がTGF- 受容体阻害剤である、上記23.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0041】

さらにまた本発明は、25. TGF- 受容体阻害剤が上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物からなるTGF- 受容体阻害剤である、上記24.の多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

20

## 【0042】

また本発明は、26. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物および造血因子の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0043】

さらに本発明は、27. 多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、上記19.から26.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

30

## 【0044】

さらにまた本発明は、28. 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、上記19.から27.のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0045】

また本発明は、29. 上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物および造血因子の存在下で、ヒト人工多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

## 【0046】

さらに本発明は、30. 下記工程を含むヒト人工多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する：

40

(1)ヒト人工多能性幹細胞を、ヒト骨形成タンパク質4(bone morphogenetic protein 4; BMP4)およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)を含む培地中で培養する工程、

(2)前記工程(1)で培養した細胞を、さらに上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物、ヒトBMP4およびヒト血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)を含む培地中で培養する工程、

および

(3)前記工程(2)で培養した細胞を、さらに上記式(1)から(3)のいずれかの式で表される化合物、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトTPOおよびヒトSCFを含む培地中で培養する工程。

50



## 【0047】

さらにまた本発明は、31. 上記19. から30. のいずれかの多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法により得られる細胞培養物に関する。

## 【発明の効果】

## 【0048】

本発明によれば、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤、分化誘導促進用組成物、分化誘導促進用試薬キット、分化誘導方法、並びに該分化誘導方法により得られる細胞培養物を提供できる。

## 【0049】

本発明に係る薬剤、組成物、試薬キット、および方法により、長期骨髄再構築能を持つ成体型造血幹細胞を効率よく分化誘導することが可能である。本発明によれば、遺伝子導入などの煩雑な操作の必要がなく、培養液中にTGF- 阻害剤、例えばTGF- 受容体阻害剤である低分子化合物や抗TGF- 受容体抗体を添加するだけで多能性幹細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導の効率化が可能であり、分化誘導の効率化に加えて簡便性の点で本発明は従来の技術と比較して明らかな優位性を有する。また、本発明により、異種動物由来のストローマ細胞株を用いることなく造血幹細胞の分化誘導を実施し得る。現在、多能性幹細胞の維持培養にはマウス由来の支持細胞 (feeder cells) が使用され、また従来の造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導方法ではマウス由来のストローマ細胞が使用されるため、該多能性幹細胞から分化誘導した造血幹細胞には該維持培養時に使用した異種動物由来細胞および分化誘導時に使用する異種動物由来細胞の両方が混入する可能性がある。しかし、本発明に係る分化誘導方法においては異種動物由来細胞を使用しないので、得られる造血幹細胞への異種動物由来細胞の混入を低減することができ、臨床応用を考えた際に有用である。さらに、従来の技術との組み合わせが可能であり、従来技術の効率を更に向上することが期待される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0050】

【図1】胚様体 (Embryoid Body, EB) 形成によるiPS細胞の分化誘導工程および使用した培養液の組成を示す図である。(実施例1)

【図2】iPS細胞をサイトカイン存在下でSB431542にて処理したところ、化合物無処理のiPS細胞 (コントロール) と比較して造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) が約5倍に増加したことを示す図である。(実施例1)

【図3】フローサイトメーターによる解析で得られた造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) の割合 (図2) と全細胞数に基づいて、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む細胞 (CD34+CD43+) の数を算出して求めた増殖曲線を示す図である。(実施例1)

【図4A】iPS細胞をサイトカイン存在下でSB431542にて処理したところ、化合物無処理のiPS細胞 (コントロール) と比較して、コロニー形成能を示す細胞が約5倍に増加したことを示す図である。(実施例1)

【図4B】iPS細胞をサイトカイン存在下でSB431542にて処理したところ、化合物無処理のiPS細胞 (コントロール) と比較して、多系統の細胞からなるコロニー (GEMMコロニー: 顆粒球、赤血球、マクロファージおよび巨核球からなるコロニー) を形成する未分化前駆細胞の割合が高くなったことを示す図である。図中、CFCsはコロニー形成細胞、GMは顆粒球およびマクロファージ、Mはマクロファージ、Gは顆粒球、BFU-Eは赤芽球バースト形成細胞、CFU-Eは赤芽球コロニー形成細胞を意味する。(実施例1)

【図5】iPS細胞をサイトカイン存在下でSB525334またはLY364947にて処理したところ、化合物無処理のiPS細胞 (コントロール) と比較して、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) が著明に増加したことを示す図である。(実施例2)

【図6A】ES細胞をサイトカイン存在下でTGF- 受容体阻害剤LY364947にて処理したところ、異種動物由来ストローマ細胞を用いた分化誘導法においても、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) が、化合物無処理のES細胞 (コントロール)

10

20

30

40

50

と比較して著明に増加したことを示す図である。(実施例3)

【図6B】ES細胞をサイトカイン存在下でTGF- 受容体阻害剤LY364947にて処理したところ、異種動物由来ストローマ細胞を用いた分化誘導法においても、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画(CD34+CD43+)が、化合物無処理のES細胞(コントロール)と比較して約6倍増加したことを示す図である。(実施例3)

【発明を実施するための形態】

【0051】

本発明は、TGF- 阻害剤からなる、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤に関する。

【0052】

また本発明は、TGF- 阻害剤を含む多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物に関する。

【0053】

さらに、本発明は、TGF- 阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することを特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法、並びに該方法により得られる細胞培養物に関する。

【0054】

本発明により、長期骨髄再構築能を持つ成体型造血幹細胞を多能性幹細胞から効率よく分化誘導することが可能である。すなわち本発明により、多能性幹細胞を材料として、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む細胞集団を効率よく取得することができる。

【0055】

TGF- は、腎臓、骨髄、血小板などほぼすべての細胞で産生されるタンパク質であり、5種類のサブタイプ(1~5)が存在する。このうち哺乳類で見られるのは1~3の種類である。

【0056】

TGF- の主な作用は増殖抑制であり、上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞、リンパ球などの多くの細胞に対して、増殖抑制因子として作用する。一方、TGF- は骨芽細胞の増殖および間葉細胞の増殖やコラーゲン合成を促進することも知られている。また、TGF- が、ニッチと呼ばれる骨髄微小環境に存在する造血幹細胞の休眠状態に関与している可能性があることがマウスにおいて報告されている(非特許文献6)。細胞へのTGF- のこのような作用は、細胞膜上に発現するTGF- 受容体により媒介される。

【0057】

用語「TGF- 阻害剤」は、TGF- の作用を阻害する効果を有する化合物からなる薬剤を意味する。TGF- の作用は、TGF- が細胞表面上のTGF- 受容体と結合することによりTGF- 受容体から細胞内にシグナルが伝達され、その結果、細胞において発現される。したがって、TGF- の作用の阻害は、TGF- とTGF- 受容体との結合やTGF- 受容体を介して細胞内に生じるTGF- シグナル伝達経路を阻害することにより実施できる。すなわち、TGF- 阻害剤の範囲には、TGF- に作用してTGF- の作用を阻害する化合物、並びにTGF- 受容体および/またはTGF- シグナル伝達経路に作用してTGF- の作用を阻害する化合物などが包含される。

【0058】

TGF- 阻害剤として、TGF- 受容体阻害剤を好ましく例示できる。用語「TGF- 受容体阻害剤」は、TGF- 受容体および/またはTGF- シグナル伝達経路に作用してTGF- の作用を阻害する化合物からなる薬剤を意味する。用語「TGF- 受容体阻害剤」は、言い換えれば、TGF- 受容体の作用を阻害する効果を有する化合物からなる薬剤を意味する。TGF- 受容体の作用は、TGF- の結合により細胞内にシグナルを伝達してTGF- の作用を細胞において発現させることである。すなわち、TGF- 受容体の作用を阻害する効果を有する化合物は、TGF- 受容体が介するTGF- の作用を阻害する化合物とすることができる。TGF- 受容体阻害剤には、TGF- 受容体自体に作用してTGF- 受容体の作用を阻害する化合物やTGF- シグナル伝達経路に作用してTGF- 受容体の作用を阻害する化合物が含まれる

10

20

30

40

50

。

## 【 0 0 5 9 】

用語「TGF- の作用を阻害する効果」は、阻害する前と比較して阻害した後にTGF- の作用を低下させる効果または消失させる効果を意味する。用語「TGF- 受容体の作用を阻害する効果」は、阻害する前と比較して阻害した後にTGF- 受容体の作用を低下させる効果または消失させる効果を意味する。

## 【 0 0 6 0 】

用語「化合物」は、任意の化学物質または分子を意味し、低分子、ペプチド、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、核酸などを包含するがこれら例示に限定されない。化合物は天然物または合成物であり得る。用語「低分子」は有機分子であって比較的分子量が小さいものをいい、通常、分子量が約1,000以下のものをいう。

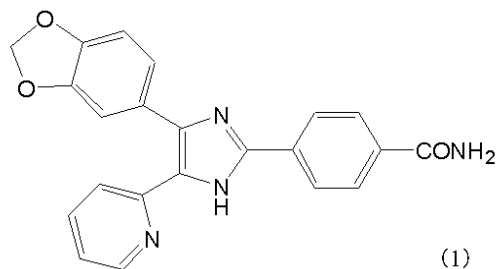
10

## 【 0 0 6 1 】

TGF- 阻害剤として、SB431542と称されるTGF- 受容体阻害剤である低分子化合物4-[4-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド(下記式(1))を好ましく例示できる。SB431542は、市販されており、容易に入手可能である。以下、本明細書において、この低分子化合物をSB431542と称することがある。

## 【 0 0 6 2 】

## 【化4】



20

## 【 0 0 6 3 】

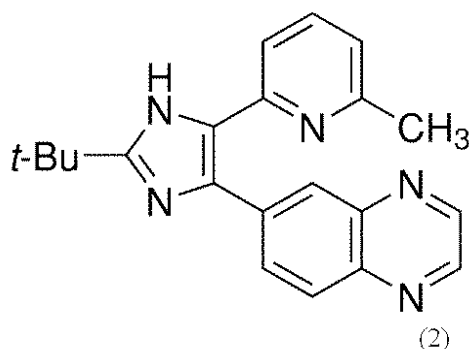
TGF- 阻害剤としてさらに、SB525334と称されるTGF- 受容体阻害剤である低分子化合物6-[2-tert-ブチル-5-(6-メチル-ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル]-キノキサリン(下記式(2))を好ましく例示できる。SB525334は、市販されており、容易に入手可能である。以下、本明細書において、この低分子化合物をSB525334と称することがある。

30

。

## 【 0 0 6 4 】

## 【化5】



40

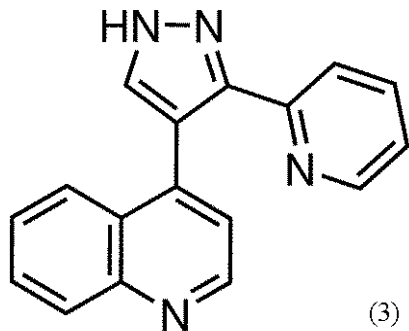
## 【 0 0 6 5 】

TGF- 阻害剤としてさらに、LY364947と称されるTGF- 受容体阻害剤である低分子化合物4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン(下記式(3))を好ましく例示できる。LY364947は、市販されており、容易に入手可能である。以下、本明細書において、この低分子化合物をLY364947と称することがある。

## 【 0 0 6 6 】

50

## 【化 6】



(3)

10

## 【 0 0 6 7 】

SB431542、SB525334、およびLY364947はいずれも、 $0.01\ \mu\text{M}$ ~ $1000\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\ \mu\text{M}$ ~ $100\ \mu\text{M}$ 、より好ましくは $0.1\ \mu\text{M}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ で使用される。本化合物の濃度はこれら例示された濃度に限定されず、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導を促進する濃度であればいずれの濃度でも使用できる。適当な濃度は、多能性幹細胞を培養して造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導を行う実験（実施例1参照）を使用し、該培養中に本化合物を様々な濃度で添加して分化誘導促進の程度を測定して分化誘導促進の程度が高い濃度を選択することにより容易に決定できる。

## 【 0 0 6 8 】

20

TGF- $\beta$  阻害剤としてまた、抗TGF- $\beta$  抗体や抗TGF- $\beta$  受容体抗体であってTGF- $\beta$  の作用を阻害する抗体を例示できる。抗TGF- $\beta$  抗体や抗TGF- $\beta$  受容体抗体は、抗原特異的な抗体であることが好ましい。抗TGF- $\beta$  抗体は、TGF- $\beta$  に結合してTGF- $\beta$  受容体との結合を阻害し、その結果、TGF- $\beta$  の作用を阻害する。抗TGF- $\beta$  受容体抗体は、TGF- $\beta$  受容体に結合してTGF- $\beta$  との結合を阻害し、その結果、TGF- $\beta$  の作用を阻害する。抗TGF- $\beta$  抗体および抗TGF- $\beta$  受容体抗体は、それぞれTGF- $\beta$  およびTGF- $\beta$  受容体、あるいはそれらの一部分のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として使用して、自体公知の抗体作製法により取得できる。TGF- $\beta$  の作用を阻害する抗体の選択は、例えばTGF- $\beta$  を発現している細胞にTGF- $\beta$  を接触させてTGF- $\beta$  の作用を測定する実験系に被検抗体を添加し、TGF- $\beta$  の作用を阻害する効果を示す抗体を選択することにより実施できる。例えば、上皮細胞、血管内皮細胞、リンパ球、またはそれらの培養細胞株にTGF- $\beta$  を接触させて該細胞に対するTGF- $\beta$  の増殖抑制作用を測定する実験系に被検抗体を添加し、TGF- $\beta$  の細胞増殖抑制作用を阻害する効果を示す抗体を選択することにより実施できる。

30

## 【 0 0 6 9 】

用語「抗体」は、免疫グロブリンまたはその一部を指し、抗原結合部位を含む任意のポリペプチドを包含する。用語「抗原特異的な抗体」とは、抗原タンパク質を強く認識して結合するが、該タンパク質とは別種のタンパク質に対する認識および結合が弱い、認識および結合しない抗体を意味する。本明細書において用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単価抗体、多価抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組み換え抗体、ハイブリッド抗体、変異抗体、およびCRDグラフト化（接合）抗体が包含される。抗体は、さらに、その免疫原性を減少するか、その抗原親和性を増大するか、その特異性を変更するか、または他の目的のために、修飾されたものであってもよい。

40

## 【 0 0 7 0 】

用語「多能性幹細胞」は、本明細書中で用いられる場合、自分自身を複製する自己複製能と多分化能を共に有する細胞を意味する。用語「多能性（pluripotency）」は、用語「多分化能」と互換可能に使用され、細胞の有する性質をいい、様々な組織や器官に属する細胞に分化し得る能力をいう。このように用語「多能性」は、複数の種類の細胞に分化し得る能力をいい、全ての種類の細胞に分化し得る能力を意味する用語「全能性（totipotency）」の概念を包含するが、明確に区別する場合は、全能性と多能性は区別することが

50

できる。

#### 【0071】

本発明において多能性幹細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）または人工多能性幹細胞（iPS細胞）であり得る。ES細胞は、着床前の胚盤胞中の内部細胞塊から樹立された細胞株で、未分化状態を維持したまま培養することが可能であり、全ての種類の細胞に分化する全能性を有する。マウスES細胞は1981年に樹立され、ヒトES細胞も1998年に樹立されている。一方、iPS細胞は、体細胞へ数種類の遺伝子を導入することにより、ES細胞のように非常に多くの細胞に分化できる多能性と、分裂増殖を経ても多能性を維持できる自己複製能を持つ細胞であり、マウスiPS細胞およびヒトiPS細胞がそれぞれ2006年および2007年に作製されたことが報告されている（特許文献1など）。

10

#### 【0072】

造血幹細胞や造血前駆細胞をヒトの再生医療に使用する場合、本発明で使用する多能性幹細胞はヒト多能性幹細胞であることが好ましい。また、再生医療にES細胞あるいはES細胞から分化誘導して得た細胞を使用する場合、ES細胞の樹立に関する倫理的問題や、ES細胞固有のヒト白血球抗原（HLA）が患者のHLAと異なると免疫的拒絶が生じるという問題がある。そのため、好ましくはこのような問題がないiPS細胞が使用される。iPS細胞として、ヒト成人皮膚繊維芽細胞にOCT4、SOX2、NANOG、およびc-Mycの各遺伝子を導入することにより樹立されたヒトiPS細胞を好ましく例示できる。本発明において使用される多能性幹細胞はこのような例示に限らず、造血幹細胞および／または造血前駆細胞に分化誘導し得る細胞であれば、どのような細胞でも使用できる。

20

#### 【0073】

用語「造血幹細胞」は、白血球、赤血球、および血小板などの血液細胞に分化する多分化能と自己複製能を併有する細胞をいう。血液細胞は、多能性造血幹細胞から、造血幹細胞そして種々の造血前駆細胞を経て分化し形成される。成熟の進んだ血液細胞は、細胞内顆粒などの特徴によって形態的に識別できる。一方、造血幹細胞および造血前駆細胞のような未分化な造血細胞は形態的な特徴では識別できないため、それらの検出は、細胞マーカーを利用して行われる。造血幹細胞はCD34+細胞であり得る。より好ましくは、造血幹細胞はCD34+CD43+細胞であり得る。また、CD34+およびCD43+以外にも、他の造血幹細胞マーカーの存在が知られている。造血幹細胞マーカーとして、CD38-、HLA-DR-、CD90+、CD117+、CD123+、CD133+が例示される。細胞マーカー+とは、細胞マーカー陽性ともいい、細胞が該マーカーを発現していることを意味する。細胞マーカー-とは、細胞マーカー陰性ともいい、細胞が該マーカーを発現していないことを意味する。多能性幹細胞から造血幹細胞への分化の確認は、多能性幹細胞から分化誘導された細胞の細胞マーカーを、フローサイトメトリー法などの自体公知の方法で測定することにより実施できる。また、多能性幹細胞から分化誘導された細胞から、特定の造血幹細胞マーカーを発現している造血幹細胞を、フローサイトメトリー法などの自体公知の方法で分離、精製することもできる。

30

#### 【0074】

用語「前駆細胞」は、分化の方向性が決定されており、一部の細胞系譜に属する1系統あるいは複数系統の細胞を作り出す分化能力と、自己増殖能とを有し、終末分化していない細胞をいう。このような分化能力は、数種類の系統の細胞に分化できる複能性（multipotency）、2～3系統の血球に分化できる寡能性（oligopotency）、1つの系統の細胞に分化できる単能性（unipotency）とに分類できる。

40

#### 【0075】

用語「造血前駆細胞」は、造血幹細胞に由来する細胞であって、血液細胞に属する1系統あるいは複数系統の細胞を作り出す分化能力と、終末分化していない細胞をいう。造血前駆細胞は、2～3系統の血球に分化できる寡能性造血前駆細胞（oligopotent progenitor cells）、1つの血球に分化が限定された単能性造血前駆細胞（unipotent progenitor cells）に分類することができる。

#### 【0076】

造血前駆細胞は、骨髓系前駆細胞およびリンパ系前駆細胞に大別できる。骨髓系前駆細胞

50

胞は、赤血球、好中球、単球、好酸球、好塩基球、マクロファージ、血小板、およびマスト細胞のそれぞれの前駆細胞に分化し、増殖成熟過程を経てそれぞれの成熟した細胞の集団を形成する。また、リンパ系前駆細胞は、T細胞、B細胞、NK細胞、およびNKT細胞などのそれぞれの前駆細胞に分化し、増殖成熟過程を経てそれぞれの成熟した細胞の集団を形成する。血小板の前駆細胞は巨核球や巨核芽球などと呼ばれ、また、赤血球の前駆細胞は赤芽球などと呼ばれる。これら各系統の前駆細胞は、自体公知の方法を用いて細胞マーカーを判別することにより分類することができる。例えば、骨髄系細胞のマーカーとしてCD13、単球及びマクロファージ系のマーカーとしてCD14、巨核球系マーカーとしてCD41、赤血球系マーカーとしてグリコホリン、B細胞系マーカーとしてCD19、T細胞系マーカーとしてCD3が知られている。

10

#### 【0077】

さらに、造血前駆細胞は、自体公知のコロニー形成法で造血前駆細胞を培養することにより形成させたコロニーを構成する細胞の形態により、骨髄系前駆細胞コロニー形成単位(CFU-GEMM)、顆粒球-マクロファージコロニー形成単位(CFU-GM)、マクロファージコロニー形成単位(CFU-M)、顆粒球コロニー形成単位(CFU-G)、赤芽球コロニー形成単位(CFU-E)、赤芽球バースト形成単位(BFU-E)、巨核球コロニー形成単位(CFU-MK)、赤血球・巨核球前駆細胞(Ery-MK)、巨核球バースト形成単位(BFU-MK)、好酸球コロニー形成単位(CFU-E0)、好塩基球コロニー形成単位(CFU-Baso)、マスト細胞コロニー形成単位(CFU-Mast)などに対応する細胞に分類することができる。コロニーアッセイ法として、コロニー形成細胞アッセイ(colony forming unit-culture assay; CFC assayまたはCFU-C)を例示できる。

20

#### 【0078】

用語「造血幹細胞および/または造血前駆細胞」は、造血幹細胞で構成される細胞集団、造血前駆細胞で構成される細胞集団、および造血幹細胞と造血前駆細胞とで構成される細胞集団のいずれをも含む。造血幹細胞および/または造血前駆細胞は、CD34陽性CD43陽性(CD34+CD43+)細胞の細胞集団であり得る。

#### 【0079】

用語「成体型造血幹細胞」は、多能性幹細胞から分化誘導される細胞であり、成体骨髄における造血を長期に亘って構築できる造血幹細胞を意味する。成体骨髄に存在する造血幹細胞は、骨髄系前駆細胞およびリンパ系前駆細胞に分化し、さらに増殖成熟過程を経て成熟した血液細胞の集団を形成する。すなわち「用語成体型造血幹細胞」は、成体に投与された後に、自己複製を行いつつ、骨髄系前駆細胞およびリンパ系前駆細胞に分化し、成熟した血液細胞の集団の形成を長期に亘って維持することができる細胞を意味する。

30

#### 【0080】

用語「分化」は、用語「細胞分化」と互換可能に使用され、1個の細胞の分裂に由来する娘細胞集団において形態的および機能的に変化して質的な差をもった2つ以上の種類の細胞が生じる現象をいう。分化により、細胞の役割に応じた特異性が確立していく。したがって、形態的および機能的に特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団が、特定のタンパク質の産生、ゲノム中の特定の遺伝子群の発現などの明確な特徴を示すに至る過程も分化に包含される。用語「分化」に対し、用語「未分化」は、形態的および機能的に質的な差を未だ持たず、分化能を有する細胞細胞の状態を意味する。

40

#### 【0081】

用語「分化誘導」は、1個の細胞の分裂において、該細胞に由来する娘細胞集団が、形態的・機能的に変化して質的な差をもった2つ以上の種類の細胞を含有するように、そのような変化をもたらすことをいう。分化誘導は、そのような変化をもたらす因子を標的細胞あるいは標的細胞群に作用させることにより実施することができる。

#### 【0082】

因子は、所望の目的を達成することができる限りどのような物質であってもよく、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸、低分子などを挙げることができる。

50

## 【0083】

造血幹細胞および/または造血前駆細胞を多能性幹細胞から分化誘導することのできる因子は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞の自己複製、増幅および分化の少なくとも1つを調節するサイトカインや増殖因子などのいわゆる造血因子であれば特に限定されずいずれも使用できる。具体的には、骨形成タンパク質4 (bone morphogenetic protein 4 ; BMP4) および塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF) などの中胚葉誘導因子、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF)、トロンボポイエチン (thrombopoietin ; TP0) などの血小板増殖因子、幹細胞因子 (stem cell factor ; SCF)、FMS様チロシンキナーゼ3リガンド (FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand ; Flt3L)、インターロイキン - 6 / 可溶性インターロイキン - 6受容体複合体 (IL-6/sIL-6R)、およびノッチリガンド (以下、Notchリガンドと称する) などを例示できる。造血因子は単独で使用する事ができるが、組み合わせて使用することが好ましい。また、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を分化誘導する場合、使用する造血因子は多能性幹細胞が由来する種と同じ種由来のものであることが好ましい。すなわち、ヒト多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を分化誘導する場合、好ましくはヒト由来の造血因子を使用することが適当である。

10

## 【0084】

用語「分化誘導促進」は、分化誘導を助けること、または、分化誘導の程度をより著しくさせることを意味する。分化誘導促進には、細胞分化の速度の促進、分化した細胞の増幅あるいは増殖の促進のいずれをも含む。分化した細胞とは、形態的および機能的に特別な特徴を獲得した細胞、例えば成熟した血液細胞およびそれらの前駆細胞のいずれをも意味する。用語「増幅」は、終末分化していないいわゆる未分化細胞、例えば多能性幹細胞、造血幹細胞、および造血前駆細胞などの数を増加させることをいう。

20

## 【0085】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用組成物は、TGF- 阻害剤、好ましくはTGF- 受容体阻害剤、例えばSB431542、SB525334、およびLY364947、並びに抗TGF- 受容体抗体から選択されるいずれか1または2以上の化合物を有効成分として含む組成物であり得る。本発明に係る組成物は、有効成分の他に、適当な担体、例えば医薬用に許容される担体 (医薬用担体) 含むことができる。担体は、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤および賦形剤を例示できる。これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択して使用される。より具体的には、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースを例示できる。これらは、本薬剤の剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組み合わせ使用される。その他、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、界面活性剤、およびpH調整剤などを適宜使用することもできる。安定化剤は、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体を例示できる。L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘導体などのいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。界面活性剤には、例えばポリオ

30

40

50

キシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などが包含される。緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\alpha$ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）を例示できる。等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンを例示できる。キレート剤は、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸を例示できる。

#### 【0086】

本発明に係る組成物は、その他、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導または分化誘導促進に効果を示す活性成分をさらに含み得る。本発明に係る組成物は、このような活性成分の1種類または2種類以上を組み合わせる含むことができる。活性成分として公知の造血因子を挙げることができる。造血因子として上記の造血因子、好ましくはBMP4、bFGF、VEGF、TPO、およびSCFを例示できる。

#### 【0087】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤あるいは分化誘導促進用組成物は、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進用試薬キットの形態で提供することができる。本発明に係る分化誘導促進用試薬キットは、少なくとも造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤あるいは分化誘導促進用組成物を個別に包装された形態で含むことができる。本発明に係る試薬キットは、その他、造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化や増幅に作用する造血因子などの薬剤を個別に包装された形態でさらに含み得る。

#### 【0088】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進剤あるいは分化誘導促進用組成物を生体に投与する場合、投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状などに応じた適当な投与経路を選択する。本発明に係る薬剤は、経口経路および非経口経路のいずれによっても投与できる。非経口経路としては、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内などへの投与を挙げることができる。さらに、経粘膜投与または経皮投与を実施することができる。

#### 【0089】

剤形は、特に限定されず、種々の剤形とすることができる。例えば、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製した後に使用することもできる。また本発明に係る薬剤は、持続性または徐放性剤形であってもよい。

#### 【0090】

具体的には、経口投与のためには、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁液、溶液剤、酒精剤、シロップ剤、エキス剤、エリキシル剤とすることができる。非経口剤としては、例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤などの注射剤；経皮投与または貼付剤、軟膏またはローション；口腔内投与のための舌下剤、口腔貼付剤；ならびに経鼻投与のためのエアゾール剤；坐剤とすることができるが、これらには限定されない。これらの製剤は、製剤工程において通常用いられる公知の方法により製造することができる。

#### 【0091】

経口用固形製剤を調製する場合は、上記有効成分に賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などを製造することができる。そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸などを、結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロ

10

20

30

40

50



キシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどを、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖などを、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコールなどを、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸などを例示できる。

【 0 0 9 2 】

経口用液体製剤を調製する場合は、上記有効成分に矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤などを加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤などを製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウムなどが、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチンなどを挙げることができる。

10

【 0 0 9 3 】

注射剤を調製する場合は、上記有効成分にpH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤などを添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。この場合のpH調節剤及び緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどを挙げることができる。安定化剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、チオグリコール酸、チオ乳酸などを挙げることができる。局所麻酔剤としては塩酸プロカイン、塩酸リドカインなどを挙げることができる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが例示できる。

20

【 0 0 9 4 】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法は、多能性幹細胞を生体外で培養することの特徴とする。用語「生体外（インビトロ）」は、用語「生体内（インビボ）」と対照をなす用語であり、生体から摘出または遊離された状態をいう。化合物の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することは、該化合物を細胞培養液中に添加することにより実施できる。

【 0 0 9 5 】

より詳しくは、本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法は、胚様体形成法による多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導において、TGF- 阻害剤を多能性幹細胞に作用させることが好ましい。すなわち本発明は、TGF- 阻害剤の存在下で、多能性幹細胞を胚様体形成法により培養することの特徴とする、多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法に関する。

30

【 0 0 9 6 】

胚様体形成法とは、多能性幹細胞の未分化性を維持するのに必要なサイトカイン、増殖因子および支持細胞を取り除いて適当な培地で培養することにより、嚢胞性の構造を有し、その内部に外胚葉、内胚葉、および中胚葉のいずれの細胞系譜も包含する胚様体と呼ばれる細胞塊を形成させる方法である（非特許文献7）。胚様体形成法において適当な造血因子を存在させることにより、多能性幹細胞から形成された胚様体に含まれる中胚葉細胞から、造血幹細胞および／または造血前駆細胞を分化誘導することができる。

40

【 0 0 9 7 】

すなわち、本発明は、TGF- 阻害剤および造血因子の存在下で、多能性幹細胞を生体外で培養することの特徴とする多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法であり得る。TGF- 阻害剤および造血因子の存在下での多能性幹細胞の培養は、まず適当な造血因子の存在下で培養する工程、およびその後上記化合物および造血因子の共存下で培養する工程を含むものであり得る。培養の工程は、多能性幹細胞を培養して造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導を行う実験（実施例1参照）を使用し、適当な造血因子やその組み合わせを選択することにより容易に決定できる。

【 0 0 9 8 】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方

50

法は、より詳しくは、下記（a）から（c）の工程を含み得る：

- （a）多能性幹細胞を、BMP4およびbFGFを含む培地中で培養する工程、
- （b）前記工程（a）で培養した細胞を、さらにTGF- 受容体阻害剤、BMP4およびVEGFを含む培地中で培養する工程、および
- （c）前記工程（b）で培養した細胞を、さらにTGF- 受容体阻害剤、BMP4、VEGF、TPOおよびSCFを含む培地中で培養する工程。

【0099】

ここで、上記分化誘導方法の工程（b）および工程（c）で使用されるTGF- 受容体阻害剤は、好ましくはSB431542、SB525334、およびLY36494から選択される1または2以上の化合物であり、工程（b）で使用されるTGF- 受容体阻害剤と工程（c）で使用されるTGF- 受容体阻害剤とは同一のものであっても別のものであっても良いが、好ましくは同一ものが使用される。

10

【0100】

本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法は、好ましくは下記（1）から（3）の工程を含むヒト人工多能性幹細胞からの造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導方法であり得る：

- （1）多能性幹細胞を、ヒトBMP4およびヒトbFGFを含む培地中で培養する工程、
- （2）前記工程（1）で培養した細胞を、さらにTGF- 受容体阻害剤、ヒトBMP4およびヒトVEGFを含む培地中で培養する工程、および
- （3）前記工程（2）で培養した細胞を、さらにTGF- 受容体阻害剤、ヒトBMP4、ヒトVEGF、ヒトTPOおよびヒトSCFを含む培地中で培養する工程。

20

【0101】

ここで、上記分化誘導方法の工程（2）および工程（3）で使用されるTGF- 受容体阻害剤は、好ましくはSB431542、SB525334、およびLY36494から選択される1または2以上の化合物であり、工程（2）で使用されるTGF- 受容体阻害剤と工程（3）で使用されるTGF- 受容体阻害剤とは同一のものであっても別のものであっても良いが、好ましくは同一ものが使用される。

【0102】

本発明に係る分化誘導方法において、多能性幹細胞を培養する期間は、多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化を誘導し得る期間であれば特に限定されない。適当な期間は、多能性幹細胞を本発明に係る分化誘導方法で培養して造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導を行う実験（実施例1参照）を行い、分化誘導の程度を測定して分化誘導の程度が高い期間を選択することにより容易に決定できる。

30

【0103】

本発明に係る分化誘導方法における適当な培養期間は、上記工程（1）について2日間、その後、上記工程（2）について4日間、さらに上記工程（3）について2日間から6日間、好ましくは2日間である。培養期間において、培養液は1日から2日に1回新たな培養液と交換することが好ましい。

【0104】

TGF- 受容体阻害剤を培養中に添加する期間は、培養開始日から培養最終日までであってよく、好ましくは培養開始日を0日として培養2日目から6日目まで、より好ましくは培養2日目から培養4日目までである。

40

【0105】

造血因子の濃度は、多能性幹細胞から造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導を促進する濃度であればいずれの濃度でも使用できる。適当な濃度は、多能性幹細胞を培養して造血幹細胞および／または造血前駆細胞への分化誘導を行う実験（実施例1参照）を使用し、該培養中に造血因子を様々な濃度で添加して分化誘導の程度を測定して分化誘導の程度が高い濃度を選択することにより容易に決定できる。

【0106】

造血因子の適当な濃度は、多能性幹細胞の種類および使用量によるが、例えばヒトBMP4

50

は1ng/mlから100ng/ml、ヒトbFGFは1ng/mlから100ng/ml、ヒトVEGFは1ng/mlから100ng/ml、ヒトTP0は2ng/mlから200ng/ml、ヒトSCFは2ng/mlから200ng/mlであり得る。好ましくは、ヒトBMP4は10ng/ml、ヒトbFGFは10ng/ml、ヒトVEGFは10ng/ml、ヒトTP0は20ng/ml、ヒトSCFは20ng/mlであることが適当である。

【0107】

本発明に係る分化誘導方法において培養する多能性幹細胞の濃度は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導が可能である限り特に限定されないが、約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ /mlが例示される。培養温度は約30~40℃、好ましくは37℃であり得る。培養時の二酸化炭素濃度は約1~10%、好ましくは約5%が適当である。

【0108】

本発明に係る分化誘導方法に使用する培養培地は、通常の細胞培養用、特に哺乳動物細胞培養用の培地であれば特に限定されない。培養培地は、血清由来のウイルスやプリオンの混入を防ぐなどの目的で、無血清培地を使用することが好ましい。より好ましくは、造血幹細胞や造血前駆細胞などの中胚葉系幹細胞の培養に適した培養培地を用いることが適当である。具体的には、無血清完全合成培地であるmTeSR (Stemcell Technologies社製)を好ましく例示できる。

【0109】

本発明に係る分化誘導方法において、マトリゲルなどの細胞培養の基質や支持体となる物質を使用することがより好ましい。

【0110】

本発明に係る薬剤、組成物、および方法により、長期骨髄再構築能を持つ成体型造血幹細胞を効率よく分化誘導することが可能である。本発明に係る方法は、遺伝子導入などの煩雑な操作の必要がなく、培養液中にTGF-β阻害剤を添加するだけで多能性幹細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導の効率化が可能であり、分化誘導の効率化に加えて簡便性の点で従来の技術と比較してその有用性は明らかである。現在、多能性幹細胞の維持培養にはマウス由来の支持細胞 (feeder cells) が使用され、また従来の造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導方法ではマウス由来のストローマ細胞が使用されるため、該多能性幹細胞から分化誘導した造血幹細胞には該維持培養時に使用した異種動物由来細胞および分化誘導時に使用する異種動物由来細胞の両方が混入する可能性がある。しかし、本発明に係る分化誘導方法においては異種動物由来細胞を使用しないので、得られる造血幹細胞への異種動物由来細胞の混入を低減することができ、臨床応用を考えた際に有用である。

【0111】

本発明はまた、本発明に係る多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導方法により得られる細胞培養物に関する。本発明に係る分化誘導方法により、造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画、すなわちCD34+CD43+細胞分画の著大な増加、コロニー形成能を示す細胞の増加、および多系統の細胞からなるGEMMコロニー (顆粒球、赤血球、マクロファージおよび巨核球からなるコロニー) を形成する未分化前駆細胞の割合の増加が認められた (実施例1参照)。本発明に係る細胞培養物は、このように、細胞マーカーCD34およびCD43を有する造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む。また、本発明に係る細胞培養物に含まれる造血幹細胞および/または造血前駆細胞には、GEMMコロニーを形成する未分化前駆細胞が多く含まれる。本発明に係る細胞培養物は、CD34+CD43+細胞分画の他、多能性幹細胞を含むものであり得る。本発明に係る細胞培養物からCD34+CD43+細胞を分離精製して得ることも可能である。細胞の分離精製は、例えば発現しているCD34およびCD43などの細胞マーカーを指標としてフローサイトメトリー法やパンニング法などの公知方法により実施できる。また、特定の種類の造血前駆細胞を、そのような造血前駆細胞に特有の細胞マーカーを指標として公知方法により分離することにより取得することも可能である。

【0112】

本発明に係る細胞培養物は、従来の分化誘導方法により得られたものと異なり、異種細胞

10

20

30

40

50

胞の混入が低減されているという特徴を有する。したがって、本発明に係る細胞培養物は、造血系再生医療などの臨床応用において有用である。

【0113】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0114】

ヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導およびその増幅を促進する化合物を見出すべく、化合物の探索を行った。

【0115】

ヒトiPS細胞は、国立大学法人東京大学 医科学研究所ステムセルバンクより供与されたiPS細胞を使用した。このiPS細胞は、ヒト成人皮膚繊維芽細胞にOCT4、SOX2、NANOG、およびc-Mycの各遺伝子を導入することにより樹立されたヒトiPS細胞である。iPS細胞の維持培養は、無血清完全合成培地であるmTeSR (Stemcell Technologies社製) を培養液として用い、3000rad (3Gy) 放射線照射したマウス胚由来繊維芽細胞 (MEF) を支持細胞 (feeder cells) として用いて、継代することにより実施した。

【0116】

継代維持したiPS細胞からの造血系細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導は、胚様体 (EB) を形成させる方法により実施した。分化誘導のための細胞培養は支持細胞を使用せずに行った。より詳しくは、まず、iPS細胞をACCUMAX (MILLIPORE社製) を用いて37℃、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で3分間酵素処理し、単一細胞懸濁液とした。6cmディッシュあたり1×10<sup>6</sup>個の単一細胞を5mlの培養液を用いてローテーション (60回転/分) しながら37℃、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養することでEBを形成し、分化誘導を行った。培養液は図1に示した通りに培養日数に応じて組成を変化させ、また、2日に一度新しいものに交換した。この際、化合物を培養開始2日目から4日目まで、または、2日目から6日目まで添加した。分化誘導後の細胞は、リン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBSと略称する) で洗浄後、0.25% トリプシンで37℃、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で10分間から15分間処理し、単一細胞懸濁液とした。単一細胞に解離しきれなかった細胞塊をメッシュで取り除いた後、フローサイトメーターによる細胞マーカーの解析、およびコロニーアッセイを行った。細胞マーカーの解析は、上記調製した単一細胞懸濁液を、蛍光色素標識したCD34抗体およびCD43抗体で抗体染色し、CD34および/またはCD43を発現している細胞の割合をFACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) を用いて測定することにより実施した。また、コロニーアッセイは、培養開始8日目にEBより調整した単一細胞懸濁液をメチルセルロース培地を用いて12日間培養し、形成された血液細胞コロニーの数と種類を調べることにより実施した。

【0117】

その結果、TGF- $\beta$  受容体阻害剤SB431542がヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導および増幅を促進することを見出した。

【0118】

図2、図3、図4Aおよび図4Bに、サイトカイン存在下でiPS細胞を培養し、培養2日目から6日目まで10 $\mu$ MのSB431542を添加して分化誘導を行った結果を示す。SB431542処理により、化合物無処理のときと比較してCD34+CD43+細胞分画、すなわち造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画の約5倍の著明な増加を認めた (図2、図3)。また、SB431542処理により、コロニー形成能を示す細胞が約5倍に増加していることを認めた (図4A)。さらに、多系統の細胞からなるコロニー (GEMMコロニー: 顆粒球、赤血球、マクロファージおよび巨核球からなるコロニー) を形成する未分化前駆細胞の割合が高くなること (図4B) が明らかとなった。

【0119】

以上の結果より、TGF- $\beta$  受容体を介してTGF- $\beta$  によって活性化されるシグナル伝達経路はヒトiPS細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化を阻害するものと考えられ、TGF- $\beta$  あるいはTGF- $\beta$  によって活性化されるシグナル伝達経路の抑制は、ヒトiP

10

20

30

40

50

S細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の効率的な分化誘導および増幅に有用であると考えられる。また、この効果は、iPS細胞だけでなく、ES細胞などの多能性幹細胞でも同等であると考えることができる。

【実施例2】

【0120】

ヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導およびその増幅を促進する化合物の探索をさらにに行った。材料および方法は実施例1と同様の材料および方法を使用した。

【0121】

その結果、TGF- $\beta$  受容体阻害剤SB525334およびLY364947がいずれもヒトiPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導および増幅を促進することを見出した。

【0122】

図5に、サイトカイン存在下でiPS細胞を培養し、培養2日目から6日目まで1  $\mu$ MのSB525334または10  $\mu$ MのLY364947を添加して分化誘導を行った結果を示す。SB525334処理により、化合物無処理のときと比較してCD34+CD43+細胞分画、すなわち造血幹細胞および/または造血前駆細胞を含む分画の著明な増加を認めた(図5)。また、LY364947処理により、化合物無処理のときと比較してCD34+CD43+細胞分画は造血前駆細胞を含む分画の著明な増加を認めた(図5)。SB525334は少なくとも濃度0.1-1  $\mu$ M、LY364947は少なくとも濃度0.3-10  $\mu$ Mで誘導促進効果が観察された。

【0123】

SB431542以外のTGF- $\beta$  受容体阻害剤であるSB525334およびLY364947がいずれも、ヒトiPS細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導および増幅を促進したことから、TGF- $\beta$  受容体を介してTGF- $\beta$  によって活性化されるシグナル伝達経路がヒトiPS細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化を阻害すること、TGF- $\beta$  あるいはTGF- $\beta$  によって活性化されるシグナル伝達経路の抑制は、ヒトiPS細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞の効率的な分化誘導および増幅に有用であることが確認された。

【実施例3】

【0124】

TGF- $\beta$  受容体阻害剤の、造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導および増幅を促進する効果が、EBを用いた分化誘導法(実施例1および2参照)以外の分化誘導法においても得られるか検証した。

【0125】

継代維持したヒトES細胞(KhES-3)を、マウス由来ストローマ細胞株10T1/2との共培養によって、造血系細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導を実施した。より詳しくは、まず、ES細胞を0.25% トリプシン/100 mM  $\text{CaCl}_2$ /10% KSRを用いて37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で7分間酵素処理し、コロニー懸濁液とした。この時、コロニーあたり約200細胞が含まれる程度の大きさになるようにコロニーを碎いた。その後、 $5 \times 10^5$ 個の10T1/2細胞をあらかじめ播いた10cmディッシュに $2 \times 10^5$ 個分のES細胞コロニーを10mlの培養液を用いて37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で培養し、分化誘導を行った。培養液は培養日数に応じてサイトカイン組成を変化させ(後述)、培養4日目、8日目、10日目に新しいものに交換した。この際、化合物(LY364947 5  $\mu$ M)を培養開始4日目から8日目まで添加した。分化誘導後の細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと略称する)で洗浄後、0.25% トリプシンで37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で10分から15分間処理し、単一細胞懸濁液とした。単一細胞に解離しきれなかった細胞塊をメッシュで取り除いた後、フローサイトメーターによる細胞マーカーの解析を行った。細胞マーカーの解析は、上記調製した単一細胞懸濁液を、蛍光色素標識したCD34抗体およびCD43抗体で抗体染色し、CD34および/またはCD43を発現している細胞の割合をFACS(Fluorescence Activated Cell Sorter)を用いて測定することにより実施した。培養液には培養0-8日目まではVEGF(10ng/ml)、BMP4(3ng/ml)、Activin(3ng/ml)、8日目以降はVEGF(10ng/ml)を添加した。VEGFは10-20 ng/mlであり得る。

他のサイトカインに関しては濃度の検討は行っていない。

#### 【 0 1 2 6 】

FACS解析の結果、LY364947を処理することにより造血幹細胞 / 造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) の著明な増加を認めた (図6A)。また、FACS解析で得られた造血幹細胞 / 造血前駆細胞を含む分画 (CD34+CD43+) の割合と全細胞数をもとに造血幹細胞 / 造血前駆細胞を含む細胞 (CD34+CD43+) の数を算出したところ、LY364947処理により約6倍の増殖を示した (図6B)。

#### 【 0 1 2 7 】

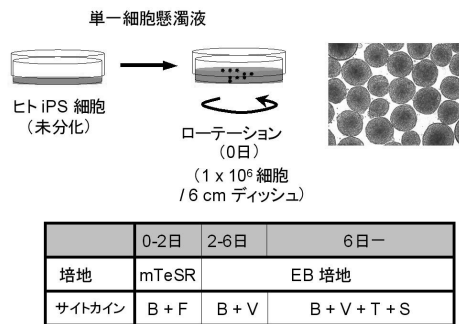
以上の結果から、TGF- $\beta$  受容体阻害剤は、EBを用いた分化誘導法 (実施例1および2参照) だけでなく、異種動物由来ストローマ細胞を用いた分化誘導法においても造血幹細胞の効率的な誘導および増殖に効果を示すことが判明した。すなわち、TGF- $\beta$  受容体阻害剤は、使用する分化誘導方法に関らず、造血幹細胞の効率的な誘導および増殖を促進することができる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【 0 1 2 8 】

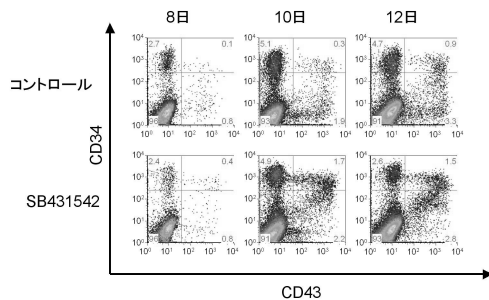
本発明は、多能性幹細胞から造血幹細胞および / または造血前駆細胞を効率的に分化誘導する薬剤、組成物、および方法に関するものであり、再生医療、例えば癌化学療法後の骨髄抑制の治療を目的とした造血幹細胞を用いた細胞医療などの医薬関連分野への寄与が極めて高い。

【 図 1 】

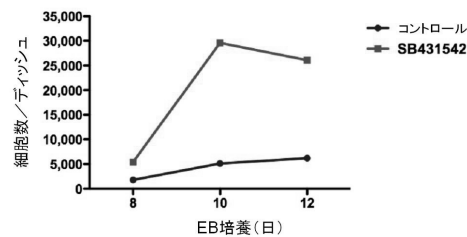


mTeSR (Stem cell Technologies社製)  
B: hBMP4 10 ng/ml, F: hbFGF 10 ng/ml, V: hVEGF 10 ng/ml,  
T: hTPO 20 ng/ml, S: hSCF 20 ng/ml

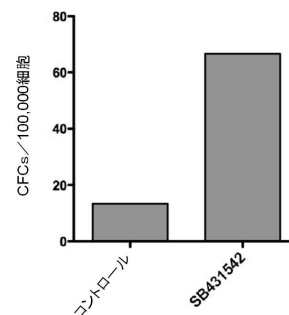
【 図 2 】



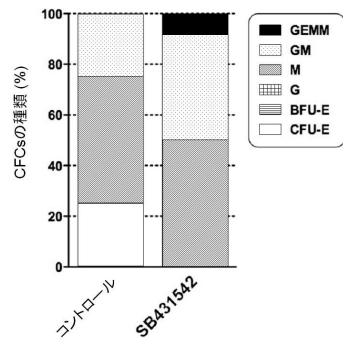
【 図 3 】



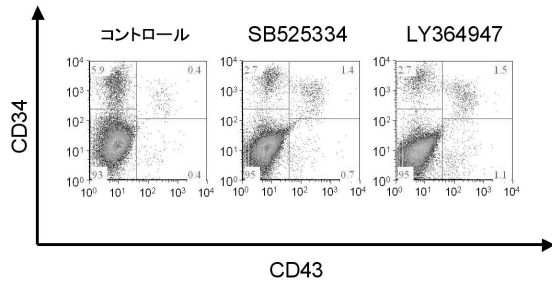
【 図 4 A 】



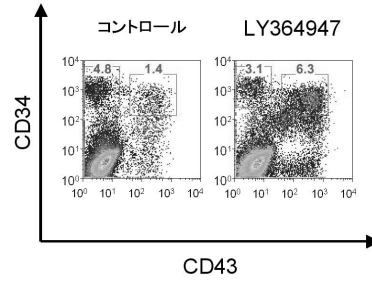
【図 4 B】



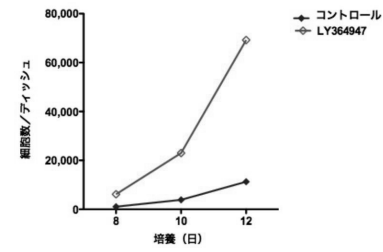
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



## フロントページの続き

(72)発明者 大澤 光次郎

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内

(72)発明者 中島 やえ子

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2010/051634(WO, A1)

STEM CELLS, 2009年, Vol. 27, pp. 559-567

Cell Research, 2011年 8月23日, Vol. 22, pp. 194-207

THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2005年, Vol. 313, No. 3, pp. 943-951

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters, 2003年, Vol. 13, pp. 4355-4359

Cell Stem Cell, 2008年, Vol. 2, pp. 60-71

Journal of Bone and Mineral Research, 2010年 6月, Vol. 25, No. 6, pp. 1216-1233

BLOOD, 2009年, Vol. 113, No. 6, pp. 1250-1256

BLOOD, 2003年, Vol. 102, No. 9, pp. 3129-3135

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/07 - 5/0797

C12N 5/10

C12N 1/00

C12N 15/09

C07K 14/495

C07K 14/71

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

DWPI(Thomson Innovation)