

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-530984

(P2008-530984A)

(43) 公表日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)		
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/06</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>E</b>	<b>4 B 0 6 5</b>
<b>A 6 1 L</b>	<b>27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 L</b>	<b>27/00</b>	<b>D</b>	<b>4 C 0 8 1</b>
			<b>A 6 1 L</b>	<b>27/00</b>	<b>Z</b>	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2007-552111 (P2007-552111)	(71) 出願人	507247070
(86) (22) 出願日	平成17年7月20日 (2005. 7. 20)		アドバンスド セル テクノロジー, イ
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月14日 (2007. 9. 14)		ンコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025860		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1
(87) 国際公開番号	W02006/080952		6 0 5, ウォーセスター, ワン イノ
(87) 国際公開日	平成18年8月3日 (2006. 8. 3)		ベーション ドライブ
(31) 優先権主張番号	11/041, 382	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年1月24日 (2005. 1. 24)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網膜の変性疾患の処置のための改良されたモダリティ

## (57) 【要約】

本発明は、網膜変性用の改良された細胞 - ベースの療法のための、およびヒト胚性幹細胞およびヒト胚 - 由来細胞を網膜色素上皮 (R P E) 細胞および他の網膜先祖細胞に分化させるための方法に関する。一つの実施形態において、本発明は、a) h E S 細胞の増殖および R P E - 様細胞へのトランス分化を支持する培地中で h E S 細胞を培養し; b) 神経系に沿って分化の兆候を呈する工程 a) の細胞を選択し; c) 色素沈着上皮島が出現し、または数が増加するまで、トリプシン、コラゲナーゼ I V、コラゲナーゼ I、およびジスパーゼよりなる群から選択される酵素を用いて工程 b) で選択された細胞を継代し; 次いで、d) 高純度 R P E - 様培養の樹立のために、工程 c) で継代した色素沈着または非 - 色素沈着細胞を選択する; ことを含む、R P E - 様細胞を単離する方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

a) h E S 細胞の増殖および R P E - 様細胞へのトランス分化を支持する培地中で h E S 細胞を培養する工程；

b) 神経系に沿って分化の兆候を呈する工程 a) の細胞を選択する工程；

c) 色素沈着上皮島が出現し、または数が増加するまで、トリプシン、コラゲナーゼ I V、コラゲナーゼ I、およびジスパーゼよりなる群から選択される酵素を用いて工程 b) で選択された細胞を継代する工程；および

d) 高純度 R P E - 様培養物の樹立のために、工程 c) で継代した色素沈着または非 - 色素沈着細胞を選択する工程；

を含む、R P E - 様細胞を単離する方法。

10

**【請求項 2】**

工程 c) における細胞の継代を少なくとも 2 回反復する、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

工程 b) における細胞の選択が、ネスチンまたは P a x 6 神経系 - 特異的マーカーを発現する細胞の選択である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

該培地が血清置換物を含む、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

該培地が、500 u / m l ペニシリン、500 μ g / m l ストレプトマイシン、1 % 非 - 必須アミノ酸溶液、2 m M G l u t a M A X I、0.1 m M ベータ - メルカプトエタノール、4 ないし 80 n g / m l b F G F、および 8.4 % ないし 20 % 血清置換物を補充したロックアウト高グルコール D M E M を含む請求項 4 記載の方法。

20

**【請求項 6】**

該培地が 10 ないし 100 n g / m l ヒト L I F をさらに含む、請求項 5 記載の方法。

**【請求項 7】**

該培地がプラズマネートをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

**【請求項 8】**

増殖速度、色素の発現、培養における脱分化、培養における再分化よりなる群から選択される特徴の少なくとも 1 つにおいて樹立された R P E 細胞系から変化する、単離された R P E または R P E 様細胞系。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

(発明の分野)

本発明は、一般に、網膜変性および他の視覚障害についての改良された細胞 - ベースの療法、ならびにパーキンソン病の治療のための、および哺乳動物胚性幹細胞および哺乳動物胚 - 由来細胞を、網膜色素上皮 (R P E) 細胞、および限定されるものではないが、桿体、錐体、二極、角膜、神経、虹彩上皮、および先祖細胞を含めた他の目の組織に分化させるための方法に関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

(発明の背景)

中枢神経系 (C N S) の多くの部分は層状組織化を呈し、神経病理学的プロセスは、一般には、1 を超えるこれらの多くの細胞層を含む。C N S の病気は、頻繁には、ニューロン細胞の喪失を含む、内因性再集団化の不存在のために、C N S - 関連病に続いての機能の効果的な回復は極端に制限されているか、または存在しない。特に、年齢 - 関連黄斑変性 (A M D) として知られている通常の網膜疾患は、網膜色素上皮 (R P E) と共に、内部核層 (I N L) の介在 (「リレー」) ニューロンのさらなる可変関与と共に光受容体の喪失に由来する。中低度ないし高度な明瞭度視覚の回復は、従って、損傷した細胞層のい

50

くつかまたは全ての機能的置換を必要とする。

【0003】

解剖学的には、色素性網膜炎（R P）、遺伝性網膜変性のファミリーは、視覚の喪失に導く光受容体細胞の数の継続的減少である。表現型はR Pのほとんどの形態を通じて同様であるが、根底となる細胞メカニズムは多様であり、多くの遺伝子において種々の突然変異に由来し得る。ほとんどは、光受容体 - 細胞 - 特異的遺伝子の発現を改変する突然変異を含み、これらのほぼ10%を占めるロドプシン遺伝子における突然変異を伴う。病気の他の形態において、アポトーシスの調節遺伝子は改変される（例えば、B a xおよびP a x 2）。A M Dは、分子レベルにおいて病因が異なるようであるある範囲の変性疾患を含む臨床的診断である。A M Dの全てのケースは、中央網膜内の光受容体細胞喪失の特徴を共有する。しかしながら、この共通する最終点は、R P E、血管新生、および下にあるブルッヒ膜のレベルにおいてより初期の異常の二次的結果であるように見える。後者は、未だよく理解されていない光受容体膜代謝回転での困難に関連し得る。加えて、網膜色素上皮は、目における最も重要な細胞型の1つである。というのは、それは光受容体機能の裏付に対して非常に重要だからである。それは、桿体および錐体の放出された外側セグメントのファゴサイトーシス、ビタミンA代謝、網膜下空間における代謝産物交換に参与するムコ多糖の合成、代謝産物の輸送、脈管形成の調節、光の吸収、像の分解能の増強、およびポロテアーゼおよびプロテアーゼ阻害剤のような分泌された蛋白質を通じての網膜における多くの他の機能の調節を含めたいくつかの複雑な仕事を行う。

10

【0004】

A M Dのいくつかの場合に存在するさらなる特徴は、異常な血管の存在であり、これは、脈絡膜血管新生（C N V）として知られた疾患をもたらす。A M Dのこの血管新生（「湿潤」）形態は特に破壊的であり、脈管形成の適切な調節の喪失に由来するように見える。R P E機能障害の結果としてのブルッヒ膜における破壊は、網膜下空間に対する脈絡膜循環アクセスからの新しい血管を可能とし、そこで、それらは物理的に外側 - セグメント組織化を破壊することができ、さらなる光受容体喪失に導く血管漏出または出血を引き起こしかねない。

20

【0005】

C N Vはレーザー処理によって標的化することができる。かくして、A M Dの「湿潤」形態に対するレーザー処理は、合衆国において一般的に用いられている。しばしば、望ましくない副作用があるが、従って、患者の試料結果に対する不満足がある。これは、もしそれらが起これば、レーザー火傷が光受容体死滅に、および視野の対応する部分内での絶対的修復できない盲目に関連するという事実による。加えて、レーザー処理は、発生するC N Vに向けての基礎となる素因を固定しない。事実、レーザー火傷は、サルにおいてC N Vの誘導のための「慣用的な方法として用いられてきた。（A r c h e r a n d G a r d i n e r , 1 9 8 1）。C N Vについての黄斑レーザー処理は、英国のような他の国においてはほとんど用いられていない。黄斑およびドルーゼンと呼ばれる関連する細胞外物質におけるR P E萎縮の不規則なパッチに重なる光受容体の喪失がある、A M Dのより普通の「乾燥した」形態に対して一般的に認められた治療はない。

30

【0006】

R P Eは光受容体の維持、および脈管形成の調節において重要な役割を演じているので、イン・ビボでの種々のR P Eの機能障害は、光受容体の損傷および盲目をもたらしかねない年齢 - 関連黄斑変性を含めた、色素性網膜炎、R P E脱落、形成異常、萎縮、網膜障害、黄斑ジストロフィーまたは変性に関連する。具体的には、およびA M Dに加えて、黄斑に影響する他の変性疾患の種類は、限定されるものではないが、錐体ジストロフィー、錐体 - 桿体ジストロフィー、マラッティア・レベンティネーズ（m a l a t t i a l e v e n t i n e s e）、ドイネハニカムジストロフィー、ソルスビージストロフィー、シュタルガルト病、パターンノバタフライジストロフィー、ベスト卵黄ジストロフィー、ノウースカロリナジストロフィー、中枢輪紋状脈絡膜ジストロフィー、アンギオイドストローク、および毒性黄斑障害を含む。

40

50

## 【0007】

黄斑に二次的に影響し得る一般的な網膜病は網膜剥離、病理学的近視、色素性網膜炎、糖尿病性網膜障害、CMV網膜炎、閉塞性網膜血管病、未成熟の網膜障害（ROP）、脈絡膜破壊、目ヒストプラスマ症候群（POHS）、トキシプラスマ症、およびレーバー先天性黒内障を含む。前記リストのいずれも限定的なものではない。

## 【0008】

前記疾患の全ては光受容体の喪失を含む、従って、治療オプションは少数かつ不十分である。

## 【0009】

その創傷治癒能力のため、RPEは移植療法への適用において広範に調べられてきた。試験への一年である2002年において、患者は30ないし50%改善を示していた。いくつかの動物モデルにおいて、およびヒトにおいて（Lund et al., 2001によってレビューされたGouras et al., 2002, Stanga et al., 2002, Binder et al., 2002, Schraermeyer et al., 2001）、RPE移植は視覚回復の良好な能力を有することが示されている。しかしながら、目のような免疫-特権部位においてさえ、移植片拒絶に伴う問題があり、もし同種異系移植を用いれば、このアプローチの進行を妨げる。新しい光受容体（PRC）は移植によって実験的に導入されてきたが、グラフト化PRCは、宿主網膜の生存するニューロンと連結するのに顕著な抵抗を示す。胎児組織から由来するRPE細胞に対する信頼性はもう1つの問題である。というのは、これらの細胞は非常に低い増殖能力を示すからである。エモリー（Emory）大学の研究者は実験を行い、そこでは、彼らはイン・ビトロにてヒト目ドナーからのRPE細胞を培養し、それらを、進行したパーキンソン病を持つ6人の患者に移植した。兆候の30ないし50%減少が移植から1年後に見出されたが、目ドナーの欠乏がある、これは未だFDAで認可されておらず、提供される目の組織に適合し得るのを超えて依然として要望が存在するであろう。

10

20

## 【0010】

かくして、これまで、異所性RPE細胞を用いる療法は、線維芽細胞のように振舞うことが示されており、軸索喪失（Villégas-Perez, et al., 1998）および網膜剥離に伴う増殖性硝子体障害（PVR）（Cleary and Ryan, 1979）を含めた多数の破壊的な網膜合併症に関連付けられている。RPEは、緩いシートは巻かれる傾向があるので送達される。この結果、光受容体の貧弱な効果の被覆ならびに正しくない極性を伴う多層RPEがもたらされ、恐らくは、嚢胞形成または黄斑浮腫をもたらす。

30

## 【0011】

病気のヒトの目の網膜下（黄斑下）への神経網膜移植片の送達はKaplan et al. (1997), Humayun et al. (2000)、およびdel Cerro et al. (2000)に記載されている。神経網膜移植片は典型的には宿主網膜と機能的に一体化しない点で深刻な問題が存在する。加えて、無傷RPE単層の不存在は、RPE昨日不全またはブルッヒ膜の破壊が矯正されていないことを意味する。両者は視覚喪失の基本的な先行事情である。

40

## 【0012】

かくして、現在の療法のいずれにおいてもRPEを復元するための効果的な手段はなく、各々において、特に、移植片および宿主網膜の間の機能的遮断の本質的な問題において欠陥が依然として存在する。従って改良された網膜療法に対する要望が存在する。

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明の目的は、限定されるものではないが、水平細胞および無軸索細胞を含めた神経細胞、桿体および錐体のような網膜細胞、角膜細胞、血管細胞、および幹細胞からのRPEおよびRPE-様細胞を含めた目の細胞の誘導のための改良された方法を提供し、およ

50

び網膜変性の治療のための改良された方法および療法を提供することにある。特に、これらの細胞は、ヒト胚性幹細胞に由来するRPEおよびRPE-様細胞の使用を含む。

【0014】

本発明の1つの具体例は、RPE細胞、RPE-様細胞、これらの細胞の先祖、または哺乳動物胚性幹細胞に由来するこれまでのもののいずれかの2つまたは3つの組合せを用いて網膜変性のための療法用の細胞を生じさせて、限定されるものではないが、色素性網膜炎および黄斑変性および関連疾患を含めた種々の疾患を治療する改良された方法を提供する。本発明を用いて生産することができる細胞型は、限定されるものではないが、RPE、RPE-様細胞、およびRPE先祖を含む。やはり生産することができる細胞は虹彩色素沈着上皮(IPE)細胞を含む。介在ニューロン(例えば、内部核層(INL)の「リレー」ニューロン)および無軸索細胞(光受容体-二極-神経節細胞鎖よりなる垂直に直接的な経路の第二のシナプスレベルにおいて相互作用する介在ニューロン-それらは内部網状層( IPL )においてシナプスで活性であり、神経節細胞に提示される視覚メッセージに対する時間的ドメインを一体化し、変調し、および間に挟み働きをする)を含めた視覚関連神経細胞もまた本発明を用いて生産することができる。加えて、網膜細胞、桿体、錐体、および角膜細胞を生産することができる。本発明のさらなる具体例において、目の血管系を供する細胞もまた生産することができる。本発明の細胞は、硝子体切除外科的処置を用いることによって網膜下空間に移植することができる。非限定的例は懸濁液、マトリックスまたは基材へのこれらの細胞の移植を含む。治療することができる色素性網膜炎の動物モデルはげっ歯類(rdマウス、RPE-65ノックアウトマウス、たるのようなマウス、RCSラット)、ネコ(アビシニアンネコ)、イヌ(錐体変性「cd」イヌ、進行性桿体-錐体変性「prcd」イヌ、初期網膜変性「erd」イヌ、桿体-錐体形成異常1、2および3「rcd1、rcd2およびrcd3」イヌ、光受容体形成異常「pd」イヌ、およびBriard「RPE-65」(イヌ)を含む。評価は、挙動テスト、蛍光アンジオグラフィー、組織学、あるいはファゴサイトーシス(光受容体断片)、ビタミンA代謝、密な接合導電率、または電子顕微鏡を用いる評価を用いて行う。ここに提示された方法に対する多くの利点の1つは、もし目ドナー組織を用いることに制限されるならば治療が可能であろうよりもより多くの患者を生じ、および治療する能力である。

【0015】

本発明のさらなる具体例は、RPEの多数の特徴を持つ細胞へのhES細胞の自然発生分化のための方法を提供する。これらのRPE調製物は、培養において表現型変化が可能であり、かつ多数の通過を通じてRPE特徴を維持することができる。また、本発明は、bFGFまたはFGFの使用を介する非限定的例として、樹立されたRPE細胞系を別のニューロン系列、角膜細胞、網膜細胞に分化する方法も提供する。

【0016】

本発明のもう1つの具体例は、存在するおよび新しいES細胞系からの新しいRPE系および先祖細胞の誘導方法である。それらが異なるES細胞系に由来する場合、RPE-様細胞の、成長速度、色素の発現、または培養における脱分化および細分化のような特性の変動があり得る。それらの機能および核型安定性にはある種の変動があり得、従って、クローン的に選択して、高い品質のRPE-様細胞の純粋な集団を生産することができる。所望の特性を持つ系の選択を可能とする新しいRPE系および新しいES細胞系の誘導方法を提供するのが望ましい。

【0017】

なお、もう1つの具体例において、本発明は、成長速度、色素の発現、培養における脱分化、および培養における細分化よりなる群から選択される特徴の少なくとも1つにおいて樹立されたRPE細胞系から変化する単離されたRPEまたはRPE-様細胞系を提供する。

【0018】

存在するおよび新しいES細胞系にやはり由来し得る細胞は虹彩色素沈着上皮(IPE)細胞を含む。さらなる具体例において、介在ニューロン(例えば、内部核層(INL))

の「リレー」ニューロン)および無軸索細胞を含めた視覚関連神経細胞も本発明を用いて生産することができる。加えて、網膜細胞、桿体、錐体、および角膜細胞を生産することができる。本発明のさらなる具体例において、目の血管系を供する細胞もまた生産することができる。

#### 【0019】

本発明のもう1つの具体例は、血管新生を妨げる増大した能力を有するRPE系またはRPE細胞に対する前駆体の誘導方法である。そのような細胞は、テロメラーゼが短くなるように患者からの体細胞を老化させることによって生産することができ、ここに、該細胞の正常な複製寿命の少なくとも10%は過ぎており、従って、核移動ドナー細胞としての該体細胞の使用は、色素上皮由来因子(PEDF/EPC-1)のような脈管形成阻害剤を過剰発現する細胞を作り出す。別法として、そのような細胞は血管新生を阻害する外因性遺伝子で遺伝的に修飾することができる。

10

#### 【0020】

本発明のもう1つの具体例は、該細胞がそれらのHLA抗原の低下した複雑性を有するように、HLA領域におけるホモ接合性を持つESまたは胚-由来細胞のバンクを利用した。

#### 【0021】

従って、本発明のさらなる具体例は、ES-由来RPE-様細胞の特徴付けを含む。ES-由来色素沈着上皮細胞は、それらの形態、挙動および分子マーカーによってRPEに非常に似ているが、それらの治療的価値は、RPE機能を行い、かつ非-癌形成性のままであるそれらの能力に依存するであろう。従って、ES-由来RPE細胞は以下の技術(i)それらの機能、すなわち、光受容体断片のファゴサイトーシス、ビタミンA代謝、創傷治癒能力の評価；(ii)動物モデル移植を通じてのRPE-様ES細胞誘導体の多能性の評価(非限定的例として、これはSCIDマウスを含むことができる)；(iii)RPE-様細胞のフェノタイピングおよびカリオタイピング；(iv)遺伝子発現プロファイリングによるES細胞-由来RPE-様細胞およびRPE組織の評価、(v)ベストロフィン、CRALBP、RPE-65、PEDFを含めた蛋白質レベルにおけるRPEの分子マーカーの発現、およびESマーカーの不存在の評価、および(vi)RPEおよび神経マーカーの比率の評価の1以上を用いて特徴付けられる。該細胞が、 $rx/rax$ 、 $chx10/vsx-2/alx$ 、 $ots-1$ 、 $otx-2$ 、 $six3/optx$ 、 $six6/optx2$ 、 $mitf$ 、 $pax6/mitf$ 、および $pax6/pax2$ を含めた、目の発生に通常必要な転写アクチベーターのそれらの発現に基づいて評価することもできる(Fischer and Reh, 2001, Baumer et al., 2003)。

20

30

#### 【0022】

本発明のさらなる具体例は、(i)ES-由来RPE-様細胞機能の評価；(ii)動物モデル移植を通じてのRPE-様ES細胞誘導体の多能性の評価；(iii)RPE-様細胞のフェノタイピングおよびカリオタイピング；(iv)遺伝子発現プロファイリングの評価、(v)蛋白質レベルにおけるRPEの分子マーカーの発現の評価；および(vi)目発生に通常必要な転写アクチベーターの評価よりなる群から選択される技術の少なくとも1つを用いてES-誘導RPE-様細胞を特徴付ける方法である。さらなる具体例において、これらの技術は、多数のhES細胞-由来細胞型の評価で用いることができる。

40

#### 【0023】

本発明のもう1つの具体例は、ES細胞系の発生なくして、ヒトおよび非-ヒト動物桑実胚または胚盤胞-段階の胚(EDC)から直接的にRPE細胞およびRPE前駆体細胞を誘導する方法である。

#### 【0024】

胚性幹細胞(ES)は未分化段階においてイン・ビトロではっきりとせずに維持することができるが、実質的にいずれの細胞型へ分化することもできる。かくして、ヒト肺性幹

50

(hES)細胞はヒト細胞の分化についての研究で有用であり、移植療法のための潜在的源と考えることができる。今日、多数の細胞型へのヒトおよびマウスES細胞の分化が報告されており(Smith, 2001によってレビューされている)、心筋細胞[Kehat et al., 2001, Mummery et al., 2003, Carpenter et al., 2002]、ニューロンおよび神経前駆体(Reubinoff et al., 2000, Carpenter et al., 2001, Schuldiner et al., 2001)、脂肪細胞(Bost et al., 2002, Aubert et al., 1999)、肝細胞-様細胞(Rambhatla et al., 2003)、造血細胞(Chadwick et al., 2003)、卵細胞(Hudner et al., 2003)、胸腺細胞-様細胞(Lin RY et al., 2003)、膵臓島細胞(Kahan, 2003)、および骨芽細胞(Zur Nieden et al., 2003)。本発明のもう1つの具体例は、そのような細胞のメッセンジャーRNA転写体をイン・ピボで誘導された細胞と比較することによって、胚、胚性幹細胞系、または有用な細胞型へ分化する能力を持つ他の胚性細胞に由来する、細胞療法または研究で有用なRPE細胞、造血細胞、筋肉細胞、肝臓細胞、膵臓ベータ細胞、ニューロン、内皮、先祖細胞または他の細胞のような細胞を同定する方法である。この方法は、正常な表現型を持ち、かつ研究用の細胞療法につき最適化された細胞を誘導するための細胞の同定を容易とする。

#### 【0025】

本発明は、ニューロン系、網膜色素上皮(RPE)における特殊化された細胞へのヒトES細胞の分化を提供する。RPEは、脈絡膜および神経網膜の間の密に色素沈着した上皮単層である。それは血流および網膜の間のバリアーの一部として働き、その機能は放出された桿体および錐体の外側セグメントのファゴサイトーシス、迷光の吸収、ビタミンA代謝、レチノイドの再生、および組織修復を含む(Grierson et al., 1994, Fisher and Reh, 2001, Marmorstein et al., 1998)。RPEは黒色色素沈着細胞の丸石細胞形態によって容易に認識される。加えて、細胞レチナルデヒド-結合蛋白質(CRALBP)、先端微小絨毛においても見出される細胞質蛋白質(Bunt-Milam and Saari, 1983); RPE65、レチノイド代謝に関与する細胞質蛋白質(Ma et al., 2001, Redmond et al., 1998); ベストロフィン、ベスト卵黄黄斑ジストロフィー遺伝子の産物(VMD2, Marmorstein et al., 2000)、および色素上皮由来因子(PEDF)、毛細血管性出血特性を持つ48kD分泌蛋白質(Karakousis et al., 2001, Jablonski et al., 2000)を含めた、RPEのいくつかの公知のマーカーがある。

#### 【0026】

RPEの異常な特徴はその見掛けの可塑性である。RPE細胞は通常は分裂時に休止するが、負傷または光凝固に応答して分裂を開始する。負傷に隣接するRPE細胞は扁平となり、増殖し、新しい単層を形成する(Zhao et al., 1997)。いくつかの研究は、RPE単層が、後にそれらの元のRPE形態に復帰することができる線維芽細胞外観の細胞を生産することができるのを示した(Grierson et al., 1994, Kirchhof et al., 1988, Lee et al., 2001)。RPE細胞の2つの集団：上皮および紡錘状が単離されているので、分裂する細胞および色素沈着上皮層が同一系からのものであるか否かは明瞭でない(McKay and Burke, 1994)。イン・ピトロにおいて、成長因子および下層の組合せに応じて、RPEは上皮として維持できるか、または迅速に脱分化し、増殖性となることができる(Zhao 1997, Opas and Dziak, 1994)。興味深いことには、上皮表現型は長期休止培養において再度樹立させることができる(Grierson et al., 1994)。

#### 【0027】

哺乳動物の発生において、RPEは神経網膜、目小胞の神経上皮と同一先祖を共有する

10

20

30

40

50

。ある種の条件下では、RPEはニューロン先祖 (Opas and Dziak, 1994)、ニューロン (Chen et al., 2003, Vinores et al., 1995)、およびレンズ上皮 (Eguchi, 1986) にトランス分化することができることが示唆されている。ニューロンへのRPEの変化を指摘することができる因子の1つはbFGFであり (Opaz and Dziak, 1994)、これは、rx/rax、chx10/vsx-2/alx、ots-1、otx-2、six3/optx、six6/optx2、mitf、およびpax6/pax2を含めた、目の発生に通常必要な転写アクチベーターの発現に関連するプロセスである (Fischer and Reh, 2001, Baumer et al., 2003)。最近、ニワトリ網膜の縁が神経幹細胞を含有し (Fischer and Reh, 2000)、およびpax6/mitfを発現するその領域における色素沈着細胞がFGFに応答してニューロン細胞を形成できる (Fisher and Reh, 2001) ことが示されている。

10

#### 【0028】

本発明は、hESからの小柱メッシュワーク細胞の誘導、および緑内障の治療のための遺伝的に修飾された小柱メッシュワーク細胞を提供する。

#### 【0029】

また、本発明は、RPE先祖およびRPE-様細胞からの小柱メッシュワーク細胞の誘導、および緑内障の治療用の遺伝的に修飾された小柱メッシュワーク細胞も提供する。

#### 【0030】

もう1つの具体例において、本発明は、RPE-様細胞を単離する方法を提供する。そのような方法はa) 増殖、およびhES細胞のRPE-様細胞へのトランス分化を支持する培地中でhES細胞を培養し；b) 神経系に沿って分化の兆候を呈する工程a) の細胞を選択し；c) コラゲナーゼまたはコラゲナーゼの組合せのような酵素および/または解離緩衝液 (これらの非限定的例はトリプシン、コラゲナーゼIV、コラゲナーゼI、ジスパーゼ、EDTA、または他の商業的に入手可能な解離緩衝液) を用いて、工程b) で選択された細胞を、色素沈着上皮島が出現し、または数が増大するまで継代し；次いで、d) 高純度のRPE-様培養の樹立のために、工程c) で継代した色素沈着または非-色素沈着細胞を選択することを含むことができる。ある態様において、本発明のhES細胞は、増殖およびトランス分化を支持するいずれかの培地において培養することができる。他の態様において、hES細胞は、血清置換を含有する培地中で培養される。具体的な態様において、本発明のhES細胞は、50u/ml ペニシリン、500μg/ml ストレプトマイシン、1% 非-必須アミノ酸溶液、2mM Glutamax I、0.1mM ベータ-メルカプトエタノール、4ないし80ng/ml bFGF、および8.4% ないし20% 血清置換を補足したロックアウト高グルコールDMEMを含む培地中で培養することができる。所望により、本発明のhES細胞は、さらに10ないし100ng/ml ヒトLIFを含む培地中で培養される。所望により、本発明のhES培養基はさらにプラズマネート (Plasmanate) を含む。プラズマネートは約1% ないし約25% (例えば、約1%、4%、6%、8%、12%、16% または20%) の最終濃度まで加えることができる。もう1つの態様において、本発明のhES細胞は反復して継代することができ、2、3、5、7、10回以上を含む。分化する細胞が、神経-系特異的マーカーのそれらの発現により選択することができる。例示的な神経-系特異的マーカーはPax6を含む。好ましい具体例において、bFGFは増殖の間にRPE培養に加え、細胞は分化の間にbFGFなくして培養される。

20

30

40

#### 【0031】

本発明は、ES細胞系の発生なくして、ヒトおよび非-ヒト動物桑実胚または胚盤胞-段階の胚 (EDC) から直接的にRPE細胞およびRPE前駆体細胞を誘導する方法を含む。1つの具体例において、そのような方法は：a) イン・ビトロにてES細胞を未分化状態に維持し；b) ES細胞をRPEおよびRPE前駆体細胞に分化させ；c) そのような細胞のメッセンジャーRNA転写体をイン・ビボで誘導された細胞と比較することによってRPE細胞を同定し、および/または蛋白質発現プロファイルを公知のRPE細胞お

50



よび / または表現型評価と比較することによって R P E 細胞を同定し ; 次いで、 e ) R P E 細胞および / または R P E 前駆体を同定し、および / または単離する工程を含む。

【 0 0 3 2 】

本発明によってさらに提供されるのは、血管新生を妨げる増大した能力を有する R P E 系または R P E 細胞への前駆体を誘導する方法であり、該方法は : a ) テロメラーゼが短くなるように動物からの体細胞を老化させ、ここに、該細胞の正常な複製寿命の少なくとも 1 0 % は経過しており ; 次いで、 b ) 該体細胞を核移動ドナー細胞として用いて、脈管形成阻害剤を過剰発現する細胞を作成することを含み、ここに、該脈管形成阻害剤は色素上皮誘導因子 ( P E D F / E P C - 1 ) であり得る。

【 0 0 3 3 】

本発明は、 h E S 細胞 - 誘導 R P E、 R P E - 様および / または R P E 先祖細胞でパーキンソン病を治療する方法を提供する。これらは、マイクロキャリアと共に定位層間移植によって送達することができる。別法として、それらはマイクロキャリアを用いることなく送達することができる。該細胞は培養において拡大培養することもでき、当業者に知られたいずれかの方法によってパーキンソン病の治療に用いることもできる。

【 0 0 3 4 】

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な記載から明らかであろう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 5 】

本発明の種々の具体例を詳細に記載し、これは、提供された実施例によってさらに説明することができる。本明細書中において、以下の請求項を通じて用いるように、「ある」および「該」の意味は、文脈上明瞭にその他のことを支持するのでなければ複数の参照を含む。また、ここに明細書で用いるように、文脈上明瞭に他のことを指令するのでなければ、「における」の意味は「における」および「において」を含む。

【 0 0 3 6 】

本明細書中および請求の範囲を通じて、用語「含む」、または「を含む」または「含んでいる」のような変形は、述べられた整数または整数の群を含めることを意味するが、いずれかの他の整数または整数の群を排除することを意味しないと理解されるであろう。

【 0 0 3 7 】

本明細書中で用いる用語は、一般には、発明の文脈内において、および各用語が用いられる具体的な文脈において、当該分野におけるそれらの通常の意味を意味する。発明を記載するのに用いるある用語は以下に、または明細書中の他の箇所において議論して、発明の組成物および方法、およびどのようにしてそれらを製造し使用するかを記載するにおいて実行者に対するさらなるガイダンスを提供する。便宜のために、例えば、イタリック体および / またはコーテンションマークを用いてある用語を強調することができる。強調の使用は用語の範囲および意味に対して影響を有さず ; 用語の範囲および意味は、それが強調されているか否かに拘わらず、同一の文脈において同一である。同一の事は 1 を超える方法で述べることができると認識されるであろう。その結果、代替言語および同義語を本明細書中で議論する用語のいずれかの 1 以上で用いることができ、用語が本明細書中において技巧を凝らしたもの、または議論されるか否かに基づいて、特殊な意義がもたらされるものではない。ある用語に対する同義語が供される。 1 以上の同義語の引用は、他の同義語の使用を排除しない。本明細書中で議論するいずれかの用語の例を含めた、本明細書中におけるいずれかの箇所での例の使用は単に説明するものであり、データが、いずれかの特定の議論または作用のスキームに関することなく、本発明に従って処理され、サンプリングされ、変換されるなどされる限り、断じて本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 3 8 】

定義

「胚」または「胚性」は、母親宿主の子宮膜に着床していない発生する細胞塊を意味する。「胚性細胞」は、胚から単離された、または胚に含まれる細胞である。これは、できる限り早く 2 - 細胞段階で得られた分割球、および凝集した分割球も含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

用語「胚性幹細胞」とは胚 - 由来細胞をいう。より具体的には、それは、未分化胚芽細胞または桑実胚の内部細胞塊から単離され、細胞系として系列的に継代された細胞をいう。

## 【 0 0 4 0 】

用語「ヒト胚性幹細胞」(hES細胞)とは、ヒト胚 - 由来細胞をいう。より具体的にはhESとは、ヒト未分化胚芽細胞または桑実胚の内部細胞塊から単離され、細胞系として系列的に継代された細胞をいう、分割球および凝集した分割球を含むことができる。

## 【 0 0 4 1 】

用語「ヒト胚 - 由来細胞」(hEDC)とは、桑実胚 - 由来細胞、内部細胞塊のものを含めた未分化胚芽細胞 - 由来細胞、胚性シールド、または原外胚葉、または原始内胚葉、外胚葉、および中胚葉を含めた、また、分割球および凝集された単一分割球からの細胞塊、あるいは発生の種々の段階からの胚も含めた、初期胚の他の全能性または多能性幹細胞をいうが、細胞系として継代されているヒト胚性幹細胞を排除する。

## 【 0 0 4 2 】

ヒト身体の実質的にいずれの組織にも分化する能力を有する胚性幹(ES)細胞は、移植療法のための再若年化および組織適合細胞の制限のない供給を提供することができる。というのは、免疫拒絶の問題は核移動および単為生殖技術でもって克服できるからである。Hirano et al. (2003)の最近の知見は、マウスES細胞がイン・ビトロにて分化実験において目 - 様構造を生産できることを示した。それらのうち、網膜色素上皮に似ている色素沈着上皮細胞が記載された。霊長類およびヒトES細胞系でもってAdvanced Cell Technologyで行われた予備的実験は、特殊化された培養系において、これらの細胞は、単離し、継代できるRPE - 様細胞に分化することを示す。ヒトおよびマウスNT、Cynoバルテノート(partenote)ES細胞誘導体はRPEの複数の特徴を有し；これらの色素沈着上皮細胞はRPEの分子マーカー - ベストロフィン、CRA LBP、PEDFおよびRPE 65を発現する；RPEのように、培養中のそれらの増殖には脱分化 - その双方は細胞が単層を形成し、休止し始めた後に維持される色素および上皮継代の喪失が伴う。そのようなRPE - 様細胞は容易に継代し、凍結および解凍でき、かくして、それらの拡大培養を可能とする。分化するES培養の組織学的分析は、桿体および錐体と同様な細胞の凝集体を含めた、初期網膜発生と合致する細胞のパターンを示す。

## 【 0 0 4 3 】

## RPE移植

現在、RPE同種異系移植片の慢性的なゆっくりとした拒絶は、科学者がこのRPE移植の治療効果を判断するのを妨げる。いくつかの方法がこの傷害を克服すると考えられている。最も容易な方法は、癌および感染のようなひどい副作用に関連する、全身免疫抑制を用いることである。第2のアプローチは患者自身のRPE、すなわち、ホモグラフトを移植することであるが、これは、古い病気のRPEを用いて、より多くの病気のRPEを置き換える欠点を有する。しかしながら、3番目のアプローチは同一患者からの虹彩上皮(IPE)を用いることであるが、これは、IPEがRPEのすべての視覚関連機能を実行できない欠点を有する。

## 【 0 0 4 4 】

本発明は、移植拒絶が起こる確率を実質的に低下させる。なぜならばhES細胞に由来するRPEまたはRPE - 様細胞は、HLA領域におけるホモ接合性を持つhES細胞のバンクから由来でき、あるいはクローン化されたhES細胞系から由来できるからである。また、核移動および単為生殖はグラフトドRPE細胞および先祖の組織適合性を容易とする。

## 【 0 0 4 5 】

## 色素性網膜炎におけるRPEの欠陥

色素性網膜炎は、視覚受容体が異常な遺伝的プログラミングを介して徐々に破壊される

10

20

30

40

50

遺伝的疾患である。いくつかの形態は比較的若い年齢において完全な盲目を引き起こし、ここに、他の形態は特徴的な「骨スピクラー」網膜変化を示し、視覚破壊はほとんど伴わない。この病気は世界中で約150万の人々に影響する。常染色体劣性RPを引き起こす2つの遺伝子の欠陥がRPEにおいて専ら発現される遺伝子で見出されており：1つはビタミンA代謝に關与するRPE蛋白質（シスレチナルデヒド結合蛋白質）によるものである、第2のものはRPE、RPE65に対してユニークなもう1つの蛋白質を含む。非ヒト動物細胞を用いることなく培養されたhES細胞由来RPE細胞系の使用では、RPのこれらの形態の双方はRPE移植によって直ちに処理可能であるべきである。この処理は、RPが絶望的に処理できず、かつまだよく理解されていない盲目の形態であった数年前では考えることができなかった。

10

#### 【0046】

RPE移植における新しい研究は、黄斑変性を含めた網膜変性の治療で融合であることを示唆する。加えて、進行したRPを持つ多数の患者は胎児網膜細胞移植に続いていくらか有用な視覚を回復している。患者の一人は、例えば、患者の顔から約6フィートの距離で保持された指をカウントできるまでほとんど光が見えない状態から改善された。第2の場合には、視覚は、トンネル視覚を通じて文字を見ることができるようまで改善された。これらの研究における移植は注入によって行われ、新しい網膜細胞を現存する神経網膜直下に導入した。細胞の全てが生存したのではない。というのは、生存したものは他のニューロンとの結合を形成し、それらの周りの光受容体のように機能し始めたが、移植された胎児細胞は同種異系（すなわち遺伝子的）にマッチしなかったからである。最初の8人の人々が移植を受けてからほぼ1年後に、4人はいくらか視覚機能を回復し、5番目の人はそうする兆候を示す。

20

#### 【0047】

3つの新しく誘導されたヒト胚性幹細胞系は従前に記載されたものと特性が同様である（Thomson et al., 1998, Reibunoff et al., 2000, Richards et al., 2000, Lanzendorf et al., 2001）：それらは、培養において45継代を通じて、あるいは130集団倍化にわたって、未分化表現型を維持し、未分化hES細胞、Oct-4、アルカリ性ホスファターゼ、SSEA3、SSEA-4、TRA-I-60、TRA-I-81の公知のマーカーを発現する。全てのhES細胞系はEBまたは長期接着性培養において、およびテラトーマにおいて、3つの染色系層の誘導体に分化する。hES細胞の分化誘導体の1つは、以下の基準によって網膜色素上皮と同様である：形態学的には、それらは典型的な上皮丸石単層外観を有し、それらの細胞質において暗茶色素を含有し、これは、メラノサイト、ケラチノサイト、網膜および虹彩色素上皮（IPE）においてのみヒト身体で存在することが知られている。しかしながら、メラノサイトは非-上皮細胞であり、ケラチノサイトはメラニンを分泌せず、蓄積するに過ぎない。これらの細胞に存在するRPE-特異的蛋白質-ベストロフィン、CRALBP、PEDFの組は、それらがIPEに対してではなくRPEに対して同様であるようであることを示す。もう1つの同様性は、増殖する細胞においてほとんどまたは全く色素が見られないが、密にパッキングされた上皮島に保持され、あるいは細胞が休止上体となった後に新しく樹立された丸石単層で再度発現される場合に、培養中の単離された色素沈着細胞の挙動である。そのような挙動は培養中のRPE細胞について記載されており（Zhao et al., 1997によってレビューされている）、ニューロンマーカーのチューブリンベータIIIはイン・ビトロにおいて脱RPE細胞では特異的に局所化されており、典型的なRPE系体を持つ細胞では局所化されていないことが従前に報告されており（Vinores et al., 1995）、これは、それがRPEの可塑性、および神経系に脱分化するその能力を反映することを示唆する。本発明者らは、培養中のそのような細胞の脱分化を反映でき、あるいは長期培養においてhES細胞の分化を通じて色素沈着細胞の隣に元来は位置し、RPE-様細胞と共に単離できたであろう、ニューロン運命に委ねられる細胞の別々の集団を示すことができる、RPEおよびRPE-様細胞の初代および継代培養におけるチューブリンベータ

30

40

50

III局所化の同一パターンを観察した。

【0048】

成長する目小胞において、RPEおよび神経網膜は同一の2能力神経上皮先祖を共有し、それらの運命はPax2、Pax6およびMittfによって決定されることが示されており(Baumer et al., 2003)、後者は最初の2つの標的である。初期段階におけるPax6はプロ神経遺伝子のアクチベーターとして作用し、さらなる発生においてRPEでダウンレギュレートされ、成熟網膜中で無軸索および神経節細胞に留まる(Ashery-Padan and Gruss, 2001によってレビューされている)。金魚において、それは再生するニューロンの有糸分裂的に活性な先祖においても見出される(Hitchcock et al., 1996)。本発明者らは、RPE - 様細胞の多くは、チュープリンベータIIIと同様なパターンでmittfおよびPax6を発現し、長期培養において、または(軽く色素沈着し、ゆるくバックグランドされた)「部分的」RPE表現型を持つ細胞において色素沈着上皮島を囲う非 - 上皮継代の非 - 色素沈着細胞においてのみ見出されたことを発見した。最近継代された培養における増殖する細胞において、全てのこれらのマーカーはほとんど各細胞で見出され、これは、増殖の開始における先祖段階へのRPE - 様細胞の復帰、または網膜先祖の実質的増殖いずれかを示唆する。興味深いことには、上皮継代の色素沈着細胞の島も見出されたテラトーマにおいて、Pax6は色素沈着領域に隣接した非 - 色素沈着細胞で発現された(データは示さず)。多数の研究は、培養中のRPEの脱分化、およびニューロン表現型の細胞(Reh and Gretton, 1987, Skaguchi et al., 1997, Vin 20 ores et al., 1995, Chen et al., 2003)、ニューロン、無軸索および光受容体細胞(Zhao et al., 1995)、神経膠(Sakaguchi et al., 1997)、神経網膜(Galy et al., 2002)、およびニューロン先祖(Opaz and Dziak, 1993)の細胞へのそれらのトランス分化を従前に示している。そのような先祖は、今度は、培養中の成熟RPE - 様細胞と共存することができ、あるいはRPE - 様細胞の脱分化の結果として出現することができる。同時に、神経網膜の細胞はイン・ビトロにてRPEヘトランス分化することができ(Opas et al., 2001)、従って、別法としてチュープリンベータIIIおよびPax6陽性細胞は、共単離された神経細胞または神経先祖のRPE - 様細胞へのそのようなトランス分化の一過性段階を表すことができる。 30

【0049】

hES細胞のRPE - 様細胞への分化は、後の実施例に記載された方法を用いた場合に自然に起こり、本発明者らは、色素沈着上皮細胞は6ないし8週間よりも古い培養で信頼性よく出現し、それらの数は経時的に進行し - 3ないし5ヶ月以内、ほとんどEB毎の培養は大きな色素沈着領域に有したことに気が付いた。記載されたhES系に加えて、6つのより新しく誘導されたhES系はRPE - 様細胞に変化し、これは、神経の運命は通常は自然にES細胞によって選択されるので、RPE - 様細胞はそのような経路の進行した段階として欠陥によって生起し得ることを示唆する。また、分化するhES細胞が多層環境を形成するそのような長期培養において、許容性および/または指令性分化シグナルは、hES細胞の分化する誘導体によって生産された細胞外マトリックスおよび成長因子から来る。hES細胞のRPE - 様細胞への分化のモデルは、そのようなマイクロ環境がRPE分化およびトランス分化を協調させるのかを調べる有用なツールとなりえるであろう。 40

【0050】

RPEは光受容体の維持において重要な役割を演じており、種々のRPE機能障害は、イン・ビボにて、RPE脱落、形成不全、萎縮、網膜障害、色素性網膜炎、年齢 - 関連黄斑変性を含めた黄斑のジストロフィーまたは変性のような、光受容体損傷および盲目をもたらしかねない、多数の視覚 - 改変疾患と関連する。その創傷治癒能力のため、RPEは移植療法への適用において広く調べられている。いくつかの動物モデルにおいて、およびヒトにおいて(Lund et al., 2001によってレビューされたGouras et al., 2002, Stanga et al., 2002, Binder e 50

t al., 2002, Schraermeyer et al., 2001)、RPE移植は視覚回復の良好な能力を有することが示されている。最近、RPE移植についてのもう1つの有望なニッチェが提案されており、臨床試験の相に到達さえしている：これらの細胞はドーパミンを分泌するのでそれらはパーキンソン病の治療で用いることができよう (Subramanian, 2001)。しかしながら免疫 - 特権目においてさえ、移植片拒絶の問題があり、もし同種異系移植片が用いられれば、このアプローチの進行を妨げる。他の問題は胎児組織に対する依存性である。というのは、成人RPEは非常に引き増殖能力を有するからである。本発明は、移植片拒絶が起こる尤度を減少させ、胎児組織の腫瘍に対する依存性を除去する。

#### 【0051】

免疫適合組織の源として、hES細胞は移植療法に対して有望である。というのは、免疫拒絶の問題は核移動技術で克服できるからである。網膜色素上皮 - 様細胞およびニューロン前駆体細胞を含めた、ヒトES細胞の新しい分化誘導体の使用、およびそれを生産するための分化システムの使用は、RPEの魅力的な潜在的供給、および移植のためのニューロン前駆体細胞を提供する。

#### 【実施例】

#### 【0052】

##### 実施例 1

長期培養における色素沈着上皮細胞への自然分化

LIFF、FGFおよびプラズマネート存在下でhES細胞培養をMEFで過剰増殖させた場合、それらは細胞の厚い多層を形成する。約6週間後に、細胞の暗い島がより大きなクラスター内に出現する(図1)。これらの暗い細胞は、図1Aに示すように、裸眼で容易に見られ、細胞のプレートにおいて「小斑点」のように見えた。より高い倍率においては、これらの島は、細胞質における茶色色素と共に、上皮細胞に典型的な、丸石単層における密にパッキングされた多角形細胞として出現する(図1C)。ほとんどの色素を有する島およびエッジ近くの島の中央部分における細胞とで、細胞における色素の量に差がある(図1Eおよび1F)。

#### 【0053】

hES細胞が胚様体(EB)を形成する場合 - 色素沈着上皮細胞が最初の6ないし8週間以内にEBの約1ないし2%で出現する(図1B)。経時的に、より多くのEBが色素沈着細胞を発生させ、3ヶ月までにほとんど各EBは色素沈着上皮領域を有した(図1D)。EBの色素沈着領域における細胞の継代は、接着性培養のそれと非常に似ていた(図1D)。

#### 【0054】

##### 実施例 2

色素沈着上皮細胞の単離および培養

本発明者らは、双方の接着性hES細胞培養から、およびEBから色素沈着上皮細胞を単離した。色素沈着多角形細胞を酵素(トリプシン、および/またはコラゲナーゼ、および/またはジスパーゼ)で消化し、これらの色素沈着島からの細胞をガラスキャピラリーで選択的に拾った。色素沈着細胞のみを拾うように注意を払ったにも拘わらず、単離された細胞の集団はいくつかの非 - 色素沈着細胞を相変わらず含んだ。細胞をゼラチンまたはラミニンで1ないし2日間平板培養した後、細胞は初代培養(P0)と考えた。

#### 【0055】

初代培養は、色素沈着多角形細胞およびいくつかの単一色素沈着細胞の島を含有した。培養における3ないし4日後に、上皮継代(扁平およびラメリポディウムを持つ細胞)を喪失したように見える非 - 色素沈着細胞はいくつかの島の周辺部に出現した(図2)。そのような周辺細胞の数は経時的に増加し、これは、これらの細胞が増殖性であることを示唆し、2週間後に、新しく形成された単層におけるほとんどの細胞はほとんどまたは全く色素を含有しなかった。さらに2ないし3週間の継続的培養の後、色素沈着上皮細胞は再度出現し始め、元の培養におけるものから視覚的に区別できなかった(図2)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 6 】

## 実施例 3

## R P E マーカーの検出

R P E としてのこれらの分化したヒト細胞の予備的特徴付けは、従前に記載された R P E 培養に対するそれらの同様性；主としてそれらの上皮継代および色素の保有に基づく。ヒト身体には3つのタイプの色素沈着上皮細胞：網膜および虹彩色素沈着上皮およびケラチノサイトがあるが、後者は色素を分泌しない。上皮構造および丸石継代は他の色素沈着細胞、例えば、メラノサイトによって保有されない。また、R P E 細胞は培養で増殖させるとそれらの色素および上皮継代を喪失し、獲得することが示されており（Z h a o 1997, O p a s and D r i a k, 1994）、色素沈着細胞は同様に挙動し、従って、E S 由来細胞はR P E であり得るといふ仮説を検定するために、それらをR P E に対する公知のマーカー：ベストロフィンおよびC R A L B P に対する抗体で染色した。図3（左側パネル）はベストロフィン（A）およびC R A L B P（C）の膜局所化を示し、双方は色素沈着上皮島で見出される。該細胞の全てがこれらの抗体で染色されるのではなく、染色の強度は色素発現およびコロニーの「緻密性」と相関し - 細胞がより大きく、よりゆるくパッキングされた各色素沈着島の境界は、双方の蛋白質のより低い発現を示した。

10

## 【 0 0 5 7 】

R P E 細胞を推定的にさらに特徴付けるために、ウェスタンブロッティングによってベストロフィン、C R A L B P の発現に対して分析を行った。図3（右側パネル、頂部）は細胞溶解物において、ベストラフィン、68 k D（a）、C R A L B P、36 k D（b）に対応するバンドを示す。全てのこれらの蛋白質は初代培養および引き続いての継代双方において見出された。

20

## 【 0 0 5 8 】

もう1つの公知のP R E マーカーであるR P E 6 5 が、リアル - タイム、P T - P C R によってR P E - 様細胞で見出された（図3、右側パネル、底部）。図3、右側パネル、底部に示すように、R P E 6 5 の発現が分析した全てのh E S - R P E 試料で確認された。興味深いことには、（継代から7週間後の）成熟培養は対照の未分化h E S 細胞よりも4ないし9倍多いR P E 6 5 m R N A を有し、他方、より初期の継代（2週齢）培養のみが1.5ないし2.5倍だけ対照を超えた。図3、右側パネル、底部参照。

30

## 【 0 0 5 9 】

P E D F E L I S A アッセイは、全ての推定されたR P E 培養の細胞溶解物におけるP E D F の存在を示し、およびウェスタンブロットはほぼ48 k D のバンドを示した（示さず）。

## 【 0 0 6 0 】

R P E - 様培養におけるニューロンおよび網膜先祖のマーカーの検出。

## 【 0 0 6 1 】

P A X - 6、P a x 2、m i t f およびチューブリンベータI I I は、最近継代された細胞の大部分において、およびh E S 細胞に由来するR P E - 様細胞の古い培養での少数の細胞においてのみ発現されることが示された（図4）。

40

## 【 0 0 6 2 】

増殖する細胞のR P E - 様継代が失われる（トリプシン処理から3日後の）増殖培養において、ほとんど各細胞はm i t f、P a x 6、チューブリンベータI I I およびネスチンの存在を示した。P a x 2 はm i t f - 陰性のように見えた細胞の小さなサブセットのみで見出され、他方、P a x 6 / m i t f、m i t f / チューブリンベータI I I およびP a x 6 / チューブリンベータI I I のかなりの程度の共局所化があった。色素沈着上皮島が再度確立された後の21日齢休止培養において、P A X - 6 およびm i t f の群は、色素沈着上皮島の間の非 - 上皮継代の非 - 色素沈着細胞においてほとんどが見出され（図4、A ないしC）、チューブリンベータI I I は同様な分布のパターンを有した（示さず）。しかしながら、色素沈着島の周辺近くに位置する、m i t f - 陽性およびP a x 6 -

50

陰性細胞の集団があった（図4、AないしC）。Pax2はmitf-陰性細胞の非常に小さなサブセットにおいてのみ見出された（図4、EないしH）。これらの蛋白質のいずれかの存在は「成熟」色素沈着上皮島の細胞で決して検出されなかった。しかしながら、いくつかのRPE特徴を有するに過ぎない細胞におけるこれらのマーカーはしばしば目に見え、すなわち、上皮のように見えるが、色素沈着上皮島から離れたある単一色素沈着細胞においては色素を有しなかった。

#### 【0063】

##### 実施例4

Cyno-1 ES細胞からのhES細胞系ACT J-1から誘導されたRPE-様細胞の特徴付け、および存在するhES細胞系H1、H9およびH7からのRPE-様細胞の誘導

RPE-様細胞系を拡大培養し、凍結および回収についてテストし、以下の方法およびRPE細胞の分子マーカーを用いて特徴付けた：ウェスタンブロットおよび免疫蛍光によってベストロフィンおよびCRALBP、ELISAおよびウェスタンブロットによってPEDFおよびRT-PCRによってRPE65。細胞を対照としての未分化hESまたはCyno-1細胞と共にSCIDマウスに注入して、腫瘍形成性を評価した。RPE-様細胞のカリオタイピングは市販ベースにて臨床試験上によってなされるであろう。次いで、RPE-様細胞の機能的特性の特徴付け、およびそれらの移植能力の試験を、本出願に記載されたようにまた当業者に知られた技術を用いて行う。

#### 【0064】

遺伝子発現プロファイリング実験は、Affymetrixヒトゲノムアレイを用いて行う。遺伝子発現は、ES細胞に由来するRPE-様細胞、およびオートプシからの網膜試料において比較する。限定されるものではないが、アカゲザル、ラットおよびウサギを含めたいくつかの動物モデルを用いて、移植されたRPE-様細胞の有効性を確認することができる。

#### 【0065】

##### 実施例5

RPE-様細胞の高い収率を保証する分化培養系の最適化

ES細胞を、bFGFインスリン、TGFベータ、IBMX、bmp-2、bmp-4、または段階的添加を含めたそれらの組合せのような因子の存在下で、フィーダー細胞上で、あるいは胚様体（EB）として培養する。別法として、ES細胞は、RPE系性におけるECMの役割を評価するにおいて、種々の細胞外マトリックス-被覆プレート（ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンI、コラーゲンIV、Matrigelなど）上で増殖させる。初期RPE先祖の（Pax6、Pax2、mitf）、およびRPE細胞の（CRALBP、ベストロフィン、PEDF、RPE65）分子マーカーの発現を、リアルタイムRT-PCRによって種々の時間間隔で評価して、前記剤、およびRPE-様細胞またはそれらの先祖において豊富化を生じる段階的手法の首尾よい組合せを確認し、決定する。また、このアプローチを用いて、RPEの共通の先祖、および単離し、それらの分化能力についてさらに特徴付け、および移植実験で用いることができる光受容体または神経網膜のような他の目の組織を表示させることもできる。

#### 【0066】

##### 実施例6

RPE、および現存するおよび新しいEP細胞系からの他の目組織先祖の誘導

遺伝子発現プロファイリングからのデータを用い、RPE先祖マーカーの発現を表面蛋白質の発現と関連付けて、RPE先祖細胞に対する表面マーカーのユニークな組合せを見出す。もしそのように見出されれば、表面蛋白質に対する抗体を用いてRPE先祖の純粋な集団を単離することができ、これは、次いで、培養し、培養中にさらに分化させることができ、あるいは移植実験で用いて、グラフティング後のそれらの分化を可能とすることができる。

#### 【0067】

10

20

30

40

50

もし遺伝子発現プロファイリング実験からのデータが不十分であれば、R P E 先祖を単離するために、以下のアプローチを用いる。E S 細胞および R P E - 様細胞を P a x 6 のようなプロモーターの存在下で G F P でトランスフェクトし、安定なトランスフェクタントを選択する。トランスフェクトされた分化 E S 細胞または分化（脱分化）R P E 細胞の培養から、G F P / P a x 6 陽性細胞を F A C S によって単離し、これをマウス注射のための抗原源として用いて、P a x 6 陽性細胞の表面分子に対するモノクローナル抗体を生起させる。P a x 6 は R P E 先祖にのみ存在するのではないので、スクリーニングはいくつかの戦略を用い：a) 増殖する R P E - 様細胞に対して、b) P a x 2 - 陽性 R P E 細胞に対して、c) m i t f - 陽性 R P E 細胞に対して（F A C S によって）なされる。b) および c) では、R P E 細胞は対応するプロモーター下で G F P でトランスフェクトし；陰性対照として、これらの抗原によって陰性な R P E または E S 細胞を用いる。全てのこれらの戦略によって選択される陽性クローンの拡大培養後に、抗体を、スクリーニングで用いた全てのタイプの細胞に対してテストし、さらに分析する：この戦略は、R P E 先祖に対して特異的なおよび非特異的な細胞表面抗原を認識する抗体を表示させることができるので、これらの抗体で選択された E S 細胞または R P E 細胞の分化する全集団からの細胞を、R P E 先祖の分子マーカーにつき、および R P E を生産するそれらの能力について評価する。

10

#### 【0068】

R P E、または目組織の他の初期先祖、およびそれらのユニークな表面マーカーに対する抗体を生産するための最適化された規定段階的手法を用い、そのような先祖は分化された E S 細胞から単離し、イン・ビトロで培養される。目の種々の組織に分化するそれらの能力を、A i m 2 に記載された戦略を用いて調べる。

20

#### 【0069】

R P E - 様細胞（H 1、H 7、H 9、A C T J 1、A C T - 4、C y n o - 1）、R P E - 様細胞を既に生じた E S 細胞系を用いて、A i m 1 および 2 に記載したように、継続的に R P E - 様細胞およびそれらの先祖を誘導する。R P E の分子マーカーについての拡大培養および特徴付けの後、これらの系を単一 - 細胞をクローン化し、得られた系を A i m 1 に記載したように特徴付ける。R P E 細胞についての基準を満足する系を移植実験のために用いる。新しいヒト E S 細胞系は未使用 I V F 胚から、受精なくして発生するように刺激した提供された卵細胞から（パルテノート）、および核移動技術の適用で提供された卵細胞から得られた作成された発生する未分化胚芽細胞から誘導する。R P E - 様細胞および共通する目先祖は A i m 2 におけるアプローチを用いてこれらの系から誘導し、得られた系は A i m 1 におけるように特徴付ける。「任意」新しいヒト E S 細胞系はウィルス - フリー系で誘導し、特徴付け、臨床試験のために提出する。

30

#### 【0070】

##### 実施例 7

色素性網膜炎および黄斑変性の種々の動物モデルにおける R P E - 様細胞および先祖の治療的能力

霊長類 E S 細胞をカニクイザル（マタクザル）においてテストする。最初に、硝子体切除外科的処置を行い、細胞を動物の網膜下空間に移植する。第 1 の工程は懸濁液様式における細胞の移植であり、その後、基材またはマトリックスを用いて、単層移植を生じさせる。これは、ヒト E S - 細胞から由来する細胞を用いる免疫抑制ウサギにおいて、また、げっ歯類（r d マウス、R P E 6 5 ノックアウトマウス、たるのようなマウス、R C S ラット）、ネコ（アビジニアンネコ）、イヌ（錐体変性「c d」、イヌ、進行性桿体 - 錐体変性「p r d c」イヌ、初期網膜変性「e r d」イヌ、桿体 - 錐体形成異常 1、2 および 3「r c d 1、r c d 2 および r c d 3」イヌ、光受容体形成異常「p d」イヌ、および B r i a r d「R P E - 6 5」イヌ）を含めた、色素性網膜炎の種々の他の動物モデルにおいて行うこともできる。評価は蛍光アンジオグラフィー、組織学（光受容体の回復およびおそらくは E R G があるかないかを問わない）を用いて行う。機能的テストも行い、これは、ファゴサイトーシス（光受容体断片）、ビタミン A 代謝、密な接合導電率、および

40

50



電子顕微鏡観察を含む。

#### 【0071】

##### 実施例 8

ヒト胚 - 由来細胞からの R P E 細胞の直接的分化

ヒト未分化胚芽細胞 - 段階の胚を免疫外科的処置の有または無にてネズミまたはニワトリ胚線維芽細胞の存在下で平板培養して、栄養外胚葉を除去し、あるいは細胞外マトリックス蛋白質 - 被覆組織培養器具上で直接的に平板培養する。細胞を培養および継代して、ヒト E S 細胞系を生じさせる代わりに、細胞を直接的に分化させる。

#### 【0072】

h E D C 細胞培養を L I F、F G F およびプラズマネートの存在下で M E F 上で過剰増殖させた場合、それらは細胞の厚い多層を形成するであろう（別の成長因子、培地および F B S を用いて、当業者に知られているように、直接的分化を代わりに行うことができる）。約 6 週間後に、細胞の暗い島がより大きなクラスター内に出現する。これらの暗い細胞は裸眼で容易に見られ、図 5 B に示したように、細胞のプレートにおいて「小斑点」のように見えた。より高い倍率では、これらの島は、細胞質における茶色色素と共に、上皮細胞に典型的な、丸石単層における密にパッキングされた多角形細胞として出現する（図 5 A）。ほとんどの色素を有する島、およびエッジ近くの島の中央部分における細胞とで、細胞中の色素の量の差がある（図 5 B）。

10

#### 【0073】

h E D C 細胞を直接的に分化させた場合、それらは、典型的にはそうでないが、胚様体（E B）を形成することができる。色素沈着上皮細胞は、最初の 6 ないし 8 週間内に、これらの分化した細胞および / または E B の約 1 ないし 2 % で出現する。経時的に、より多くの E B が色素沈着細胞を発生させ、3 ヶ月までに、ほとんど各 E B は色素沈着上皮領域を有した。E B の色素沈着領域における細胞の継代は、接着性培養のそれと非常に似ていた。

20

#### 【0074】

##### 材料および方法

M E F 培地：2 mM G l u t a M a x I、および 5 0 0 u / m l ペニシリン、5 0 0 u g / m l ストレプトマイシン（全て I n v i t r o g e n から）および 1 6 % F C S（H y c l o n e）を補足した高グルコース D M E M。h E S 細胞増殖培地：5 0 0 u / m l ペニシリン、5 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン、1 % 非 必須アミノ酸溶液、2 mM G l u t a M a x I、0 . 1 mM ベータ - メルカプトエタノール、4 n g / m l b F G F（I n v i t r o g e n）、1 - n g / m l ヒト L I F（C h e m i c o n, T e m e c u l a, C A）、8 . 4 % の血清置換物（S R, I n v i t r o g e n）および 8 . 4 % プラズマネート（B a y e r）を補足したノックアウト高グルコース D M E M。誘導培地は、培養基と比較して、より低い濃度の S R およびプラズマネート（各々 4 . 2 %）および 8 . 4 % F C S および 2 x 濃度のヒト L I F および b F G F をそれが有する以外は培養基と同一の成分を含有した。E B 培地：b F G F、L I F、およびプラズマネートを除いて増殖培地に同じ；S R 濃度は 1 3 % であった。R P E 培地：5 0 % E B 培地および 5 0 % M E F 培地。

30

40

#### 【0075】

##### h E S 細胞系

分化実験は接着性 h E S 細胞で、あるいは胚様体（E B）で行った。接着分化では、h E S コロニーがそれらの密な境界を失い、その時点で、培養基を E B 培地で交換するまで（通常継代から 8 ないし 1 0 日後）h E S 細胞を M E F で過剰増殖させた。培地を 1 ないし 2 日ごとに交換した。E B 形成のため h E S 細胞をトリプシン処理し、低接着性プレート上で E B 培地中で培養した（C o s t e r）。

#### 【0076】

##### 免疫染色

細胞を 2 % パラホルムアルデヒドで固定し、細胞内抗原の局所化のための 0 . 1 % N P

50

- 40で浸透させ、およびPBS (Invitrogen)中の10%ヤギ血清、10%ラバ血清 (Jackson Immunoresearch Laboratories West Grove, PA)で少なくとも1時間ブロックした。初代抗体とのインキュベーションを4にで一晩行い、二次抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories West Grove, PA)を1時間で加えた。すべてのインキュベーションの間に、検体をPBS中の0.1%Tween-20 (Sigma)3ないし5回、各洗浄につき10ないし15分間洗浄した。DAPIを備えたVectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いて検体を設置し、蛍光顕微鏡 (Nikon)下で観察した。用いた抗体：ベストロフィン (Novus Biologicals, Littleton, CO)、抗-CRALBP抗体は親切にもWashington大学のSaari博士から贈られた。二次抗体はJackson Immunoresearch Laboratoriesからのものであり、ストレプトアビジン-FITCはAmershamから購入した。

10

#### 【0077】

RPE-様細胞の単離継代

hES細胞およびEBの接着性培養をPBSで2回濯ぎ、単層がゆるめられるまで、37にで0.25%トリプシン/1mM EDTA (Invitrogen)中でインキュベートした。色素沈着領域からの細胞をガラスキャピラリーで掻き落とし、MEF培地に移し、200×gで遠心し、RPE培地中のゼラチン-被覆プレート上に平板培養した。培地を細胞が付着した後に交換し (通常、1ないし2日以内)、その後5ないし7日毎に；細胞を0.05%トリプシン/0.53mM EDTA (Invitrogen)にて2ないし4週間毎に継代した。

20

#### 【0078】

ウェスタンブロットおよびELISA

試料を、5%メルカプトエタノールおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche)を補足したLaemmli緩衝液 (Laemmli, 1970)中で調製し、5分間煮沸し、Mini-Protean装置を用いて8ないし16%グラジエントゲル (Bio-Rad, Hercules, CA)上に付加し；ゲルをゲル当たり25ないし30mAで流し；蛋白質を20ボルトにて一晩0.2ニトロセルロース膜 (Schleicher and Shull, Keene, NH)に移した。ブロットをボンソレッド (Sigma)で軽く染色してバンドを可視化し、Milli-Q水で洗浄し、0.1%TBST中の5%無脂肪ドライミルク (Bio-Rad)で1時間ブロックした。ベストロフィン、CRALBPまたはPEDF (Chemicon)に対する初代抗体を2時間で加え、続いて、TBSTで3回15分間洗浄し；ペルオキシダーゼ-コンジュゲート二次抗体を1時間で加え、洗浄を反復した。Super-Signal試薬 (Pierce)を備えたECLシステムを用いてブロットを検出した。製造業者のプロトコルに従い、PEDF ELISAキット (Chemicon)を用い、PEDF ELISAを細胞溶解物で行った。

30

#### 【0079】

リアル-タイムRT-PCR

2工程手法によって、全RNAを分化するES培養から精製し、粗製RNAをTrizol試薬 (Invitrogen)を用いて単離し、RNeasyミニカラム (Qiagen)でさらに精製した。製造業者 (Qiagen)プロトコルに従い、RPE65検出のための市販のプライマー組 (Assay on Demand) # Hs00165642 ml, Applied Biosystems)およびQuantitect Probe RT-PCR試薬 (Qiagen)を用いて、RPE65転写体のレベルを例アル-タイムPCRによってモニターした。

40

#### 【0080】

実施例9

50

エクス・ピボで分化した正常な分化細胞を同定するためのトランスクリプトミックスの使用

hES-細胞誘導体は、再生医学の将来において重要な役割を演じるようである。これらおよび他の幹細胞誘導体の定量的評価は、依然として、機能的ゲノミックスを用いてアプローチすることができる挑戦のままである。我々は、hES-RPEの転写プロファイルVSその移植値について広く研究されているそのイン・ピボカウンターパートの胎児RPE細胞を比較した。次いで、双方のプロファイルをヒトRPE細胞系について既に公表された(Rogojina et al., 2003)トランスクリプトミックスデータと比較した。

#### 【0081】

我々のデータ組の遺伝子発現プロファイルを2つのヒトRPE細胞系(非-形質転換ARPE-19および形質転換D407、Rogojina et al., 2003)と比較して、hES-RPEが同様な全体的転写プロファイルを有するか否かを判断した。全ての細胞において発現された共通するハウスキーピング遺伝子を説明するために、我々は、共通のハウスキーピングおよび上皮遺伝子を排除し、RPE-特異的遺伝子を同定するのを可能とするその共通の上皮起源に基づく対照としての未分化hES細胞(H1系、h1-hES, Sato et al., 2003)および気管支上皮細胞(BE, Wright et al., 2004)からの公に入手可能なAffymetrixデータ組を用いた。

#### 【0082】

hES-RPE、hES-RPE-TD、ARPE-19、D407の間に同様性および差がある。該同様性は、BEではなくhES-RPE/ARPE-19に存在する遺伝子の間の排除的交差を分析することによってさらに示した(1026遺伝子)。バックグラウンドを説明するために、我々は、これを、BEと比較した場合に、hES-RPEおよびARPE-19における5倍または6倍大きな同様性をもたらす、ARPE-19ではなくBE/hES-RPEに存在する遺伝子の排除的交差と比較した(186遺伝子)。D497/ARPE19は、長期継代細胞に典型的な、RPE65、ベストロフィン、CRALBP、PEDFのようなRPE特異的遺伝子を失うように見える(図6)。さらなるデータマイニングは、ARPE19ではなく胎児RPEおよびES-RPEのみにおける、メラニン生合成、視覚、レチノール-結合のような公知のRPE特異的存在論を明らかにした。

#### 【0083】

それらのイン・ピボカウンターパートである、新たに単離されたヒト胎児RPE(feRPE)に対するhES-RPE、ARPE-19およびD407の比較は我々の従前のデータと合致し、これは、ヒトfeRPEに対するhES-RPEの転写同一性がfeRPEに対するD407(2.3倍の差-849遺伝子/373遺伝子)およびfeRPEに対するARPE-19(1.6倍の差-588遺伝子/364遺伝子)よりも有意に大きいことを示す(図5c/5d)。ARPE-19またはD407ではなくhES-RPEのみに存在する前記で同定されたRPE特異的マーカーもまたfeRPEにやはり存在し、これは、培養されたRPE系よりもそのイン・ピボカウンターパートに対するhES-RPEのより高い同様性を示す。

#### 【0084】

hES-RPEに存在する784遺伝子はfeRPEおよびARPE-19データ組に存在しなかった。「幹性」遺伝子の保持は、もし患者に移植すれば、hES誘導体の悪性テラトーマへのトランスフォーメーションを潜在的に引き起こしかねないので、我々は、現在利用可能なAffymetrixマイクロアレイデータ組を用いて保存的潜在的「幹性」遺伝子を作り出した(Abeyta et al., 2004 Sato 2003)。この結果、(共通のハウスキーピング遺伝子を含めた)全ての12のデータ組に存在する3806遺伝子のリストがもたらされた。feRPE-ARPE-19ではなくhES-RPEデータ組に存在する784遺伝子のうち36のみが3806の潜在的幹性遺伝

10

20

30

40

50

子と共通した。これらのいずれも、Oct 4、Sox 2、TDGF 1のような公知の幹性遺伝子ではなかった。

#### 【0085】

##### 実施例 10

##### パーキンソン病の治療のためのRPE細胞の使用

hRPEはパーキンソン病の細胞療法のための細胞の代替源として用いることができる、なぜならばそれらはL-ドーパを分泌するからである。研究は、ゼラチン-被覆マイクロキャリアに付着したそのような細胞が半パーキンソン病サルに首尾よく移植することができ、顕著な改善（標的当たり1万ないし5万細胞）を生じ、2000年に開始されたFDA-認可試験において、患者は有害効果なくしてhRPE線条体内移植を受けたことを示した。hES細胞-由来RPEを用いる多くの利点のうち1つは、それがドナーの目の組織の決定を回避することである。それは遺伝子療法の使用も容易とする。

10

#### 【0086】

##### 実施例 11

##### 光受容体の喪失を救済または予防するための幹細胞由来RPE細胞系の使用

##### RPE細胞系の誘導

ヒト胚性幹（「hES」）細胞を、2 mM Glutamax Iまたはグルタミン、500 u/ml ペニシリン、500 µg/ml ストレプトマイシン（全てInvitrogenから）および16% FCS）8ないし10%の範囲とできる（HyClone）を補足した高グルコースDMEMを含有するMEF培地中で増殖させた。hES細胞は、500 u/ml ペニシリン、500 µg/ml ストレプトマイシン、1%非-必須アミノ酸溶液、2 mM Glutamax I、0.1 mM ベータ-メルカプトエタノール、4 ng/ml（または80まで）bFGF（In vitro gen）、10 ng/ml（または100まで）ヒトLIF（LIFは任意である）（Chemicon, Temecula, CA）、8.4%の血清置換物（20%まで用いることができる）（SR, In vitro gen）および8.4%プラズマネート（任意）（Bayer）を補足したノックアウト高グルコースDMEMを含有する増殖培地中で増殖させることができる。EB培地は、bFGF、LIF、およびプラズマネートが含まれておらず、SR濃度が13%である以外は増殖培地と同一である。RPE培地は50% EB培地および50% MEF培地である。別法として、hES細胞はヒト血清またはFBSの存在下で培養することができる。RPE培養では、分化した表現型のその増殖、トランス分化および再樹立を支持する異なる培地を用いることができる。その例は、限定されるものではないが、2 mM Glutamax Iまたはグルタミン、500 u/ml ペニシリン、500 µg/ml ストレプトマイシン（抗生物質は任意）（全てInvitrogenから）および16% FCS（8ないし20%の範囲とできる）（HyClone）またはヒト血清を補足した高グルコースDMEM；1.2 g/L 炭酸水素ナトリウム、2.5 mM L-グルタミン、15 mM HEPES 0.5 mM ピルビン酸ナトリウム；胎児ウシ血清、10%を含有するダルベッコの修飾イーグル培地およびハムのF12培地の1:1混合物；（ATCCから、ヒトRPE細胞から樹立されたARPE-19細胞系の増殖用に推奨される）。ヒト網膜色素上皮の機能的に局化された単層への分化を支持する細胞培養基もこの目的で使用することができる。

20

30

40

#### 【0087】

RPEは、従前に記載されているように培養することができ（その開示をここに引用して援用するHu and Bok, Molecular Vision (2000) 7: 14-19）、あるいは血清または血清置換成分、あるいはRPE増殖を支持する成長因子組合せを有する他の培養基中で培養することができる。

#### 【0088】

これらの実験で用いたhES細胞の2つは記載されているように誘導し（双方の開示をここに引用して援用する、Cowan et al., N. Eng. J. Med. 350: 1353-1356 (2004), Klimanskaya and McMahon

50

, Handbook of Stem Cells, Vol. 1: Embryonic Stem Cells, Edited by Lanza et al., Elsevier/Academic Press, pp. 437 - 449 (2004)), 3つの系はJamie Thomson (H1、H7およびH9)によって誘導した。ヒト凍結未分化胚芽細胞は、彼らの受精処理を完了したカップルによって研究に寄付された。

#### 【0089】

分化実験は接着性hES細胞で、または胚様体(ES)で行った。接着性分化では、hES細胞を、hESコロニーがその密な境界を喪失し、その時点で、培養基をEB培地で交換する(通常、継代から8ないし10日後まで、MEF上で過剰増殖させた。培地が黄色になれば、あるいは密な培養では1ないし2日毎に、あるいはまばらな培養またはEBでは頻度低く、培地を交換した。EB形成では、hES細胞をトリプシン処理し、低接着性プレート(Costar)でEB培地中で培養した。

10

#### 【0090】

##### 免疫染色

細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞内抗原の局所化のための0.1%NP-40で浸透させ、PBS(Invitrogen)中の10%ヤギ血清、10%ロバ血清、Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)で少なくとも1時間ブロックした。次いで、検体を一次抗体と共に4℃にて一晩インキュベートし、次いで、二次抗体Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)と共に1時間インキュベートした。全てのインキュベーションの間に、検体をPBS中の0.1%Tween-20(Sigma)で3ないし5回、各洗浄につき10ないし15分洗浄した。DAPIを備えたVectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いて検体を設置し、蛍光顕微鏡(Nikon)下で観察した。用いた抗体は抗-ベストロフィン抗体(Novus Biologicals, Littleton, CO)、および抗-CRALBP抗体(Washington大学のSaari博士からの贈物)を含む。二次抗体はJackson ImmunoResearch Laboratoriesから入手し、ストレプトアビジン-FITCはAmershamから購入した。

20

#### 【0091】

##### RPE-様細胞の単離および継代

hES細胞またはEBの接着性培養をPBSで2回濯ぎ、37℃にて、単層が緩くなるまで0.25%トリプシン/1mM EDTA(Invitrogen)中でインキュベートした。色素沈着領域からの細胞をガラスキャピラリーで掻き落とし、MEF培地に移し、200×gで遠心し、RPE培地中のゼラチン-被覆プレート上に平板培養した。細胞が付着した後(通常、1ないし2日以内)、その後5ないし7日毎に、培地を交換した。細胞を0.05%トリプシン/0.53mM EDTA(Invitrogen)で2ないし4週間毎に継代した。

30

#### 【0092】

細胞を継代し、あるいは1ないし10%の濃度のトリプシンまたはコラゲナーゼIV、コラゲナーゼI、またはジスパーゼを用いて移植用に集めた。各々、1ないし10%の濃度のこれらのいずれの組合せも、色素沈着細胞の単離および継代のために、トリプシンの代わりに用いることができよう。この関係で「組合せ」は、一緒のまたは順次のそのような酵素の使用、例えば、コラゲナーゼ消化、続いてのトリプシン消化を意味することを意図する。継代希釈は、希釈無しから1:6以上まで変化させることができる。移植に先立っての培養用の基材は、限定されるものではないが、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニニン、コラーゲンまたは異なるタイプの細胞外マトリックス、被覆されていないプラスチック表面、フィルターECM(細胞外マトリックス)蛋白質で未被覆または被覆、Matrigel、角膜、RPE、線維芽細胞のような他の細胞培養から単離されたECM、未被覆ビーズ、またはECMで被覆したビーズのような、hES-RPEの増殖および

40

50

特徴を支持するいずれのものであってもよい。継代の間の時間は1日から7週間まで変化させることができる。以前の実験において、表面のRPEのシートと共に9ヶ月齢胚様体を用いて、hES-RPEの継代可能な培養を樹立し、従って、どれくらい長く細胞を継代することなく培養に維持できるかについて知られた制限はない。

#### 【0093】

培養は適切なRPE継代を持つ細胞 - すなわち、多角形の密にパッキングされた色素沈着細胞 - のみならず、種々の程度のトランス分化（細長い色素沈着または非 - 色素沈着細胞等）、およびhES細胞から共分化する他の細胞型を持つ細胞よりなることができる。細胞を培養のために個々に選択するのでなければ、そのような培養は、通常、非 - RPE細胞によって分離されるRPE島を含有する。

10

#### 【0094】

（色素沈着細胞の島、または上皮シート、または空胞化細胞の凝集体であり得る個々の細胞の、RT-PCR、ウェスタンブロット、免疫染色、組織学、または継代によって検出できるような、ネスチン、Pax6等のようなこの系のマーカーを発現する）神経系に沿った分化の兆候を呈した分化するES細胞の培養をトリプシン、コラゲナーゼ、ジスパーゼ、またはその混合物で継代し、拡大し、色素沈着上皮島が出現し、または数が増加するまで（通常、1または2継代）培養した。色素沈着上皮および非 - 色素沈着非 - 上皮細胞のそのような混合培養を用いて、コラゲナーゼまたはコラゲナーゼ - ジスパーゼ消化の後に色素沈着および非 - 色素沈着細胞を選択的に手で拾うことができよう。次いで、これらの手で拾った色素沈着および非 - 色素沈着細胞をより小さな業種体または単一細胞に分散させ、あるいは分散なくして平板培養でき、その結果、高純度のRPE培養が樹立された。

20

#### 【0095】

ウェスタンブロットおよびELISA

試料は、5%メルカプトエタノールおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche）を補足したLaemmli緩衝液（Laemmli, 1970）中で調製し、5分間煮沸し、Mini-Protean装置を用いて8ないし16%グラジエントゲル（Bio-Rad, Hercules, CA）に負荷し；ゲルをゲル当たり25ないし30mAで流した。次いで、蛋白質を20ボルトにて一晚、ゲルから0.2ニトロセルロース膜（Schleicher and Shull, Keene, NH）に移した。ブロットをボンソレッド（Sigma）で軽く染色して、バンドを可視化し、Milli-Q水で洗浄し、0.1%TBS-T中の5%無脂肪ドライミルク（Bio-Rad）で1時間ブロックした。ベストロフィン、CRALBPまたはPEDFに対する一次抗体（Chemicon）を2時間でブロットに加え、続いて、TBS-Tで3回15分間洗浄を行った。次いで、ペルオキシダーゼ - コンジュゲート二次抗体を1時間でブロットに加え、洗浄を反復した。Super-Signal試薬（Pierce）を備えたECLシステムを用いてブロットを検出した。製造業者のプロトコルに従い、PEDF ELISAキット（Chemicon）を用い、PEDF ELISAを細胞溶解物で行った。

30

#### 【0096】

リアル - タイムRT-PCR

40

2 - 工程手法によって、全RNAを分化するES培養から精製した。Trizol試薬（Invitrogen）を用いて粗製RNAを単離し、RNeasyミニカラム（Qiagen）でさらに精製した。RPE65転写体のレベルは、製造業者（Qiagen）プロトコルに従い、RPE65検出（Assay on Demand # Hs00165642 ml, Applied Biosystems）についての市販のプライマーのための組およびQuantitect Probe RT-PCR試薬（Qiagen）を用い、RPE65転写体のレベルをリアル - タイムPCRによってモニターした。

hES - 由来RPE細胞系の移植

hES細胞系の培養を23日齢RCSラットの1つの目に対する移植細胞として用いて、光受容体の喪失を救済または予防することができる。異なる形態および/または分化の

50

異なる程度の細胞を選択することができる。移植は記載されているように行った（その開示をここに引用して援用する、Lund et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9942-47; Del Priore et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science (2004) 45:985-992; Gouras et al. (2002) Ophthalmology & Visual Science 43:3307-11）。（前記したような）トリブシンまたは他の酵素での消化に続き、hES細胞を洗浄し、2  $\mu$ l 注射当たり  $2 \times 10^5$  細胞の密度にて懸濁液に経強膜送達した。送達は、約75ないし150  $\mu$ mの内径を持つ微細なガラスピペットを用いてハムのF-10培地中で達成した。注射は、機能的劣化および有意な光受容体死滅の前の時点で、麻酔した23日齢のジストロフィー-色素沈着RCSラットの1つの目の側頭背後網膜下空間に送達されるべきである。シャム-注射ラットはhES-由来細胞なくしてキャリアー媒体単独を受ける。手術後ラットの組織学的評価をより短い時点で（例えば、手術から1ヶ月後に）行って、移植に関連する短期の変化を評価し、より長い時点で（例えば、手術後5ヶ月で）行って、ドナー細胞の生存を調べることができる。細胞は、移植前48時間、20  $\mu$ m BrdUrdを含有する培地中で培養することによってタグを付し、または標識することができる。

10

#### 【0097】

移植されたhES-由来細胞の機能的評価

Lund et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9942-47にも記載されているように、移植されたラットの挙動評価を、該動物を含有する静止保持チャンバーの周りに12度/秒の一定速度で回転する円形ドラムよりなる頭部-トラッキング装置で行うことができる。刺激の提示は、度当たり0.125、0.25および0.5サイクルのような種々の空間的周波数にて黒色および白色ストライプで被覆した相互交換可能なパネル上に置くことができる。動物は手術後10ないし20週間でテストすることができる。全ての動物評価は唯一のオペレーターによって盲検的に行うことができる。挙動データはANOVAを用いて分析することができる。

20

#### 【0098】

生理学的実験は、60および90日において、角膜心電図(ERG)で動物に対して行うことができる。テストに先立ち、ラットは暗所に一晚適合させ、ケタミンおよびキシラジンで赤色光下で麻酔すべきである。例えば、Peachy et al., Vis Neurosci. 2002 Nov-Dec; 19(6):693-701参照。瞳孔は膨張し、ERGを綿ガーゼ生理食塩水電極で角膜から記録すべきである。皮下30-ゲージ針を、各々、参照および設置電極として、前頭および体幹に挿入することができる。対象ラットの体温を35ないし36に維持しつつ、光刺激を約0.7  $\times 10^3$   $\mu$ W/cm<sup>2</sup>の角膜にて測定した最大フラッシュ強度で適用すべきである。種々の周波数においてコンピューター化データ獲得システムによって応答は記録し平均化すべきである。ERG振幅はa-波の初期府ピークから、またはb-波の正のピークに対してベースラインから測定すべきである。

30

#### 【0099】

Lund et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9942-47におけるように、100日における上丘からの視覚受容場の照明に対する閾値応答を記録すべきである。動物は末端ウレタン麻酔(1.25 g/kg/i.p.)下におくべきである。データは概略200  $\mu$ m空間的に離れた独立した点において全視野にわたって収集すべきであり、各点は視野における約10ないし15°変位に対応する。視覚閾値はバックグラウンドに対する強度の増加として測定し、3°直径のスポート光で上丘の表層200  $\mu$ mにおけるユニットを活性化するために0.02 cd/m<sup>2</sup>に[桿体飽和未満の少なくとも2.6対数(logユニットに)]維持すべきである。閾値マップは各動物について表示させ、網膜表示として示すべきである。

40

#### 【0100】

50

H 9 細胞系に由来する R P E 細胞を移植した 7 つの目、および J 1 細胞系に由来する R P E 細胞を移植した 6 つの目を E R G 分析に付した。R P E 移植は 2 3 日齢ラットで行い、E R G 分析は移植後 3 6 日に行った。H 9 群は均一に良好な応答を生じ、他方、J 1 群は最小応答を伴うに過ぎない一匹の動物を生じた。

#### 【 0 1 0 1 】

移植された細胞の組織学的分析

L u n d e t a l . ( 2 0 0 1 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 8 : 9 9 4 2 - 4 7 に記載されているように、動物は組織学的分析に付すべきである。動物はオイタナールで安楽死させ、P B S、続いて、過ヨウ素酸塩 - リシン - パラホルムアルデヒド ( P L P ) で経心臓灌流した。目を切開し、クレジルバイオレットで染色すべきである。B r d U 群の動物からの目を抗 - B r d U r d 抗体で標識し、適当な二次抗体および各試薬を用いて可視化すべきである。他の目は 0 . 1 M カコジレート緩衝液中の 2 . 5 % パラホルムアルデヒド、2 . 5 % グルタルアルデヒド、および 0 . 0 1 % ピクリン酸での注射によって固定することができる。目は 1 % 四酸化オスニウム中でポスト固定し、引き続いて、エポキシプロパンに対する特級アルコールを通じて脱水することができる。組織を樹脂に包埋し、それから半 - 薄いセクションを切断し、1 % ホウ酸緩衝液中のトルイジンブルーで染色することができる。

10

#### 【 0 1 0 2 】

実施例 1 2

網膜変性の処理のための幹細胞由来神経先祖細胞の使用

20

神経先祖の生成

h E S 細胞 ( 例えば、H 1、H 7 および H 9、N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h - W A 0 1、W A 0 7 および W A 0 9 として登録 ) を、M E F 培地 ( 2 m M G l u t a M A X I またはグルタミン、および 5 0 0 u / m l ペニシリン、5 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン ( 抗生物質、任意 ) ( 全て I n v i t r o g e n から ) および 1 5 % F C S ( 8 % ないし 2 0 % の範囲とできる ) H y C l o n e ) を補足した高グルコース D M E M ) 上で、あるいは細胞外マトリックス上で過剰増殖させた。次いで、継代から一週間またはそれ以上後に、s E S 細胞をトリプシン、コラゲナーゼまたはジスパーゼ、または 2 つの后者の酵素の組合せで分裂させ、E B 培地中のゼラチン上で平板培養する ( 実施例 1 1 参照 )。培地をそれが黄色となれば、通常は 2 ないし 4 日毎に交換する。これらの条件下で増殖する細胞の大部分は神経先祖として陽性である。なぜならば、それらはネスチンおよび / またはチューブリンベータ I I I を発現し、神経先祖細胞の典型的な外観 - 細長い紡錘 - 様細胞を有するからである。それらは同一条件下で再度継代することができ、これはネスチン - およびチューブリンベータ I I I - 陽性細胞での細胞集団の豊富化に導く。R T - P C R を、そのような培養においてネスチン、P a x 6、N - C A M、チューブリンベータ I I I の存在を確認する。

30

#### 【 0 1 0 3 】

別法として、h E S 細胞の分化する培養におけるスフェロイド形成を除去し、E B 培地中で培養皿 ( ゼラチンまたはもう 1 つの細胞外マトリックスで被覆することができ、記載された細胞型の形成を可能とする ) 上に平板培養することができ、あるいはそのようなスフェロイドは分化する h E S 細胞の全集団の最初の継代後に形成され、同様にしてアプローチすることができる。数日以内に、紡錘 - 様細胞の増殖が認められ、これは、後に、拡大培養し、神経先祖細胞についての前記マーカーを発現することができる。

40

#### 【 0 1 0 4 】

h E S 細胞からの目組織の分化

h E S 細胞の実施例 1 1 に記載された分化条件は、ロドブシン、オブシン 5、オブシン 1、およびレコベリンの発現を確認する、分化する培養の組織学的調査によって ( 図 9 a、および R T - P C R 分析によって示される桿体および錐体 - 様構造の出現を可能とすることができる ( 図 9 b、9 c および 9 d )。また、我々は、そのような培養は R T - P C R 検出ケラチン 1 2、角膜マーカーとして角膜細胞を含有することができることも示す (

50



図 9 e)。

【 0 1 0 5 】

他の具体例

これまでの記載から、変形および修飾を本明細書中に記載された発明に対して行って、それを種々の用法および条件に適用することができるのは明らかである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 6 】

【 図 1 】図 1 A ないし F は、自然に分化する h E S 細胞における ( R P E 細胞に特徴的な ) 色素沈着領域の出現を示す一連の写真である。図 1 A は 2 . 5 ヶ月齢接着性培養、4 - ウェルプレートウェルにおけるスキャンされた色素沈着領域の写真であり ; 図 1 B は 4 5 倍の、E B として増殖された 2 . 5 ヶ月齢培養における色素沈着領域の写真であり ; 図 1 C は接着性培養の色素沈着領域の写真であり ; 図 1 D は E B の色素沈着領域の写真であり ; 図 1 E は色素沈着領域および培養の残りの間の境界の写真であり、 $\times 200$  ; 400 倍を除いて図 F は図 E と同一である。A および B における矢印は色素沈着領域を指す。

【 図 2 】図 2 A ないし F は、培養における色素沈着および上皮継代の喪失および獲得を示す一連の写真である。図 2 A は初代 E B 外植を示す写真であり、一週間 ; 図 2 B は手で拾った細胞の初代培養を示す写真であり、一週間 ; 図 2 C は増殖する細胞によって囲まれた上皮島を示す写真であり ; 図 2 D は一ヶ月齢培養における色素沈着および上皮継代の獲得を示す写真であり ; 図 2 E は 3 継代後の培養を示す写真であり、200 倍 ; 図 2 F は E における同一の培養を示す、400 倍、H o f f m a n 顕微鏡観察。黒色矢印は色素沈着細胞を指し示し、白色矢印は色素なしの外植細胞を示す。

【 図 3 】図 3 の左側パネル ( A ないし D ) および右側パネルは一連の写真および 1 つの写真であり - これらは、h E S 細胞 - 由来色素沈着上皮細胞における R P E のマーカーを示す。図 3 A および 3 B は、R P E マーカー、ベストロフィンの免疫局所化を示す写真、および対応する位相顕微鏡視野、200 倍であり ; 図 3 C および D は C R A L B P を示す写真、および対応する位相コントラスト顕微鏡視野、400 倍である。矢印は、ベストラフィン ( A ) および C R A L B P ( C ) の色素沈着細胞 ( C , D ) への共局所化を示し ; 矢印の頭は、非 - 色素沈着領域 ( C , D ) におけるこれらの蛋白質 ( A , B ) についての染色の不存在を指し示す。図 3 の右側パネル ( 頂部 ) はベストロフィン ( a ) および C R A L B P ( b ) に対する抗体での細胞溶解物のウェスタンブロットの写真を示す ; ( c )、( d - 未分化 h E S 細胞、c - 抗 - C R A L B P 抗体に対する対照、d - 抗 - ベストロフィン抗体に対する対照。図 3 の右側パネル ( 底部 ) は、リアル - タイム R T - P C R による、成熟および未成熟 R P E - 様細胞における R P E 6 5 発現の比較を示す。試料番号 1、6 および 7 は成熟 7 週齢培養であり ; 試料番号 2、3、4 および 5 は未成熟 15 日齢培養であり ; および試料番号 8 は未分化 h E S 細胞である。

【 図 4 】図 4 は、長期休止培養での、R P E - 様細胞における P a x 6 ( 図 4 A )、P a x 2 ( 図 4 E ) および m i t f ( 図 4 B、図 4 F ) のマーカーの発現を示す写真を示す。図 4 C、図 4 G - 位相差、図 4 D、図 4 H - P a x 6 / m i t f / 位相差の融合させたイメージ ( 図 4 A、図 4 B、図 4 C ) および P a x 2 / m i t f / 位相差 ( 図 4 E、図 4 F、図 4 G )。

【 図 5 】図 5 A ないし B は、E S 細胞系の誘導の段階を回避するヒト胚 - 由来細胞の培養における R P E 分化の写真を示す。

【 図 6 A 】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 19 および D 407 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【 図 6 B 】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 19 および D 407 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【図 6 C】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 1 9 および D 4 0 7 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【図 6 D】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 1 9 および D 4 0 7 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【図 6 E】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 1 9 および D 4 0 7 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【図 6 F】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 A ないし F - 腫瘍学注釈に基づき、この表は、h E S 細胞 - 由来網膜色素上皮 ( h E S - R P E )、h E S 細胞由来トランス分化 ( h E S - R P E - T D )、A R P E - 1 9 および D 4 0 7 および新たに単離されたヒト R P E ( f e - R P E ) についての R P E 関連遺伝子の発現パターンを表す。

【図 6 G】図 6 は、R P E 調製物の転写の比較を示す。図 6 G - さらなるデータの蓄積は、胎児 R P E および E S - R P E のみならず、A R P E - 1 9 において、メラニン合成、視覚、レチノール - 結合のような公知の R P E 特異的存在論を明らかにした。

【図 7】図 7 は、h E S 細胞からの神経先祖の発生を示す。A ) h E S 細胞の過剰増殖した培養、立体顕微鏡観察。B ) スフェロイド ( A において矢印 ) を除去し、E B 培地中のゼラチン - 被覆プレート上で平板培養し、1 ないし 2 週間の内に紡錘 - 様細胞を生じる。C )、D ) チューブリンベータ I I I ( C ) およびネスチン ( D ) に対する抗体での B ) で示した細胞の染色倍率 : A )  $\times 60$  ; B ないし D )、 $\times 200$ 。図 7 は h E S 細胞から生じたいくつかの神経先祖細胞を示す。

【図 8】図 8 は異なる R P E 培養の形態学を示す。A ) 均一な分化した R P E。B ) いくつかの細長い色素沈着していない細胞 ( 矢印 )。C ) 色素沈着していない細胞によって囲まれた色素沈着した島、コラゲナーゼおよび / またはジスパーゼ消化後における色素沈着細胞の手で拾うための候補として指摘された細胞。D ) トランス分化細胞。倍率  $\times 200$ 。図 8 は、異なる R P E の形態学を示す。

【図 9】図 9 は、h E S 細胞の分化する培養における桿体および錐体 - 様構造の出現を示す一連の写真である。図 9 a は、ヘマトキシリン - エオシンで染色した分化する培養の組織学的調査である。 $\times 200$ 。図 9 b ないし 9 e は、これらの培養における、オブシン 5 およびオブシン 1 ( 9 b )、レコベリン ( 9 c )、ロトブシン ( 9 d ) およびケラチン 1 2 ( 9 e ) の R T - P C R 分析である。

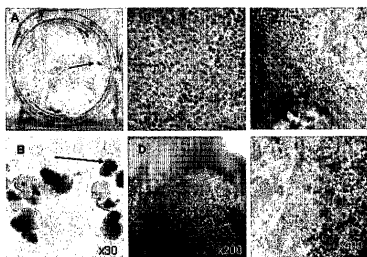
10

20

30

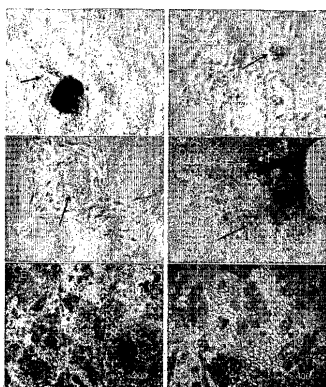
【 図 1 】

**Figure 1**



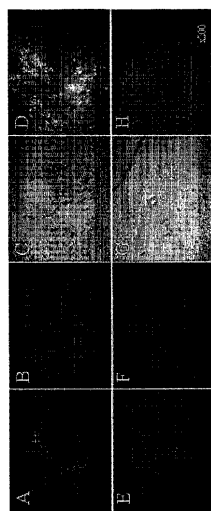
【 図 2 】

**Figure 2**



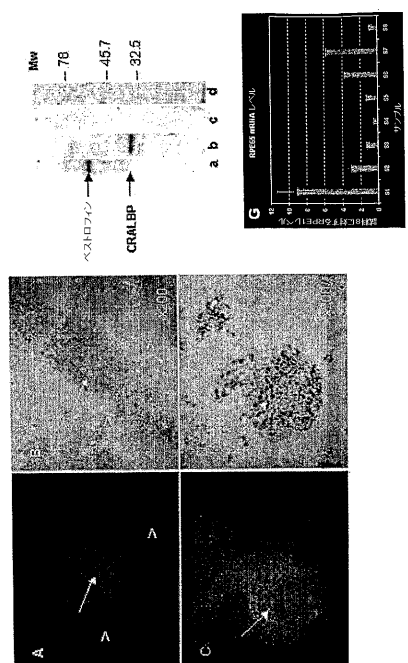
【 図 4 】

**Figure 4**



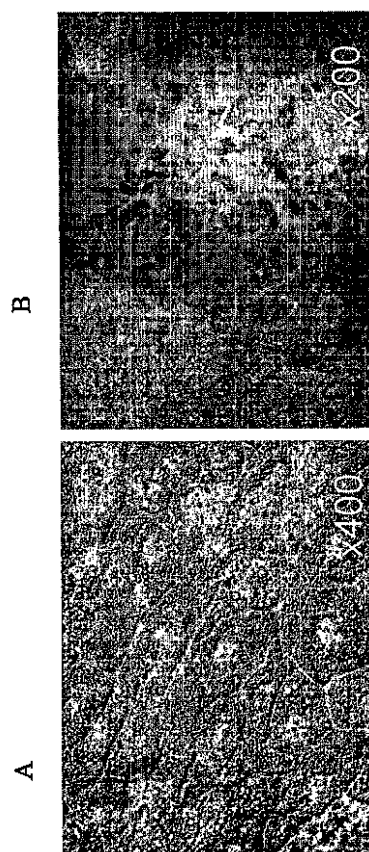
【 図 3 】

**Figure 3**



【 図 5 】

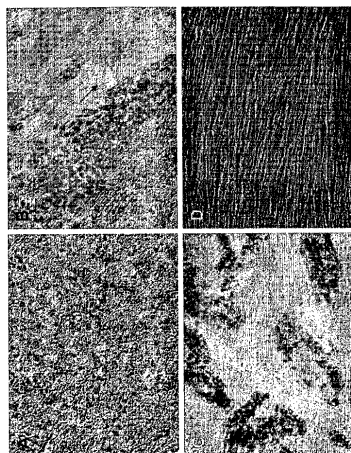
**Figure 5**



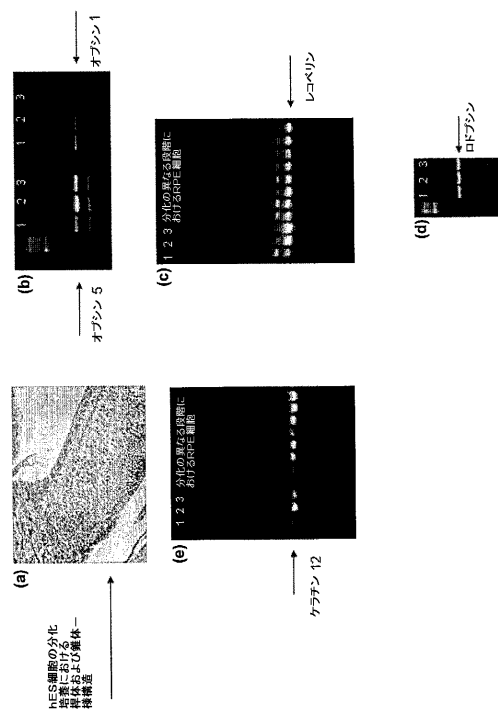




**Figure 8**



6/



ES細胞の分化  
培養における  
桿体および錐体—  
線構造

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クリマンスカヤ, イリナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01568, アプトン, メカニック ストリート 75

(72)発明者 ランサ, ロバート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01510, クリントン, エス. メドウ ロード 35

Fターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BB21 BB40 CA44

4C081 AB11 AB21 CD34 EA01