

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-4903

(P2019-4903A)

(43) 公開日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	

審査請求 有 請求項の数 22 O L 外国語出願 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2018-167419 (P2018-167419)	(71) 出願人	509000747
(22) 出願日	平成30年9月7日 (2018.9.7)		アンスティトゥー ナショナル ドゥ ラ
(62) 分割の表示	特願2014-527647 (P2014-527647)		サンテ エ ドゥ ラ レシエルシュ
原出願日	平成24年8月29日 (2012.8.29)		メディカル (イエヌエスエールエム)
(31) 優先権主張番号	11306080.0		フランス国 エフー75013 パリ リ
(32) 優先日	平成23年8月29日 (2011.8.29)	(71) 出願人	502205846
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
(31) 優先権主張番号	61/528,348		ルシュ シアンティフィク
(32) 優先日	平成23年8月29日 (2011.8.29)		フランス国 パリ セデックス 16 リ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ユ ミシエール-アンジュ 3
(31) 優先権主張番号	12305610.3		
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工沿軸中胚葉前駆 (i PAM) 細胞を調製する方法及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】天然の胚沿軸中胚葉前駆細胞と区別するために、沿軸中胚葉前駆体のマーカーを発現する前駆細胞株を調製する方法の提供。

【解決手段】有効量のW n tシグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質 (B M P) シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆細胞を調製するe x v i v o方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の W n t シグナル伝達経路の活性化剤を含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆細胞を調製する e x v i v o 方法。

【請求項 2】

有効量の W n t シグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質 (B M P) シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆細胞を調製する e x v i v o 方法。

【請求項 3】

前記 W n t シグナル伝達経路が古典的 W n t / ベータカテニンシグナル伝達経路及び W n t / P C P シグナル伝達経路のうちの少なくとも一方である請求項 1 又は 2 に記載の e x v i v o 方法。

10

【請求項 4】

前記 W n t シグナル伝達経路の活性化剤が、 R - s p o n d i n ファミリーのメンバーである請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 5】

前記 R - s p o n d i n ファミリーのメンバーが、 R - s p o n d i n 3、 R - s p o n d i n 2、又は前記 R - s p o n d i n 3 及び R - s p o n d i n 2 の組合せからなる群において選択される請求項 4 に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 6】

前記 R - s p o n d i n - 3 が、配列番号 1 の配列のヒト R - s p o n d i n - 3 又は配列番号 5 の配列のヒト R - s p o n d i n - 3 アイソフォーム 2 である請求項 5 に記載の e x v i v o 方法。

20

【請求項 7】

前記 R - s p o n d i n - 2 が、配列番号 3 の配列のヒト R - s p o n d i n - 2、配列番号 6 の配列のヒト R - s p o n d i n - 2 アイソフォーム 2、又は配列番号 7 の配列のヒト R - s p o n d i n - 2 アイソフォーム 3 である請求項 5 に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 8】

前記 B M P シグナル伝達経路の阻害剤が、 N o g g i n、 C h o r d i n、 C h o r d i n 様 1 ~ 3、 F o l l i s t a t i n、 F o l l i s t a t i n 様 1 ~ 5、 D a n ファミリーのメンバー、並びに B M P シグナル伝達経路を阻害するそれらの変異体及びフラグメントからなる群より選択される請求項 2 に記載の e x v i v o 方法。

30

【請求項 9】

前記 B M P シグナル伝達経路の阻害剤が N o g g i n である請求項 8 に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 10】

前記 B M P シグナル伝達経路の阻害剤が D o r s o m o r p h i n 等の B M P シグナル伝達の化学的阻害剤である請求項 8 に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 11】

前記 W n t シグナル伝達経路の活性化剤が G S K - 3 の阻害剤である請求項 1 又は 2 に記載の e x v i v o 方法。

40

【請求項 12】

前記適切な培養培地が D M S O 又は等価物を更に含む請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の e x v i v o 方法。

【請求項 13】

前記多能性幹細胞がマウス若しくはヒト胚性幹細胞、又は i P S 細胞である請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上する、 W n t 活性化

50

剤及びBMPシグナル伝達経路の阻害剤を含む培養培地。

【請求項15】

前記Wnt活性剤がR-spondin3であり、前記BMPシグナル伝達経路がNogginである請求項14に記載の培養培地。

【請求項16】

DMSOを更に含む請求項15に記載の培養培地。

【請求項17】

請求項1～13のいずれか一項に記載の方法により得ることができる人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団。

【請求項18】

前記集団における細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、及び好ましくは90%が、例えばMsn1遺伝子産物といった、高発現の沿軸中胚葉前駆細胞に特徴的なバイオマーカーを呈する請求項17に記載の集団。

【請求項19】

骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統を含む集団を調製する方法であって、

(a) 請求項1～13のいずれか一項に記載の方法に従って調製された人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を供給する工程と、

(b) 骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統を含む沿軸中胚葉誘導体のうちから選択される所望の細胞系統へと人工沿軸中胚葉前駆細胞を分化させるのに適切な条件下で、前記人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を培養する工程とを含む、方法。

【請求項20】

骨格筋細胞系統を含む集団を調製する請求項19に記載の方法であって、

(a) 請求項1～13のいずれか一項に記載の方法に従って調製された人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を供給する工程と、

(b) 少なくとも以下の成分：

i. 細胞外マトリクス材料；及び

ii. レチノイン酸、BMP、TGF (トランスフォーミング増殖因子)、Hedgehog、Notch、FGF、Wnt、ミオスタチン、インスリン、PDGF、VEGF、MAPK、PI3Kを含むが、これらに限定されない前記系統の分化を制御することが知られているシグナル伝達経路を活性化又は阻害する化合物；

を含む分化培地の存在下で前記人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を培養する工程と、

(c) 任意選択で、Wntシグナル伝達経路、FGFシグナル伝達経路、HGF (肝細胞増殖因子)シグナル伝達経路、アクチビンシグナル伝達経路、EGF (上皮増殖因子)シグナル伝達経路、インスリンシグナル伝達経路、及びIGFシグナル伝達経路を活性化若しくは阻害する少なくとも1又は複数の化合物、又はウマ血清若しくはトランスフェリン等の筋形成分化を促進することが知られている少なくとも1又は複数の化合物を含む、第2分化培地中で工程(b)から得られた前記集団を培養する工程と、

を含み、それによって、Desmin若しくはミオシン重鎖等のマーカーによって同定され得る骨格筋細胞系統を含む集団を得る、方法。

【請求項21】

真皮細胞系統を含む集団を調製する請求項19に記載の方法であって、BMP経路、TGF経路、Wnt経路、FGF経路、EGF経路、レチノイン酸経路、Notch経路及びHedgehog経路を活性化若しくは阻害する効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で請求項1～13のいずれか一項に記載の方法に従って調製された人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を培養する工程を含む、方法。

【請求項22】

骨細胞系統又は軟骨細胞系統を含む集団を調製する請求項19に記載の方法であって、

レチノイン酸経路、Wnt経路、Hedgehog経路、pTHRP経路、TGF経路、BMP経路を活性化又は阻害する効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物、又はデキサメタゾン、アスコルビン酸、ビタミンD3、及びベータ-グリセロリン酸等の骨若しくは軟骨の分化を促進することが知られている効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で請求項1～13のいずれか一項に記載の方法に従って調製された人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞を含む集団を培養する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有効量のWntシグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein: BMP)シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆(induced Paraxial Mesoderm Progenitor: iPAM)細胞を調製するex vivo方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹(Embryonic Stem: ES)細胞研究は、系統分化等の根本的な発生過程を理解するための先例のない可能性を提供する。胚性幹細胞株は初期胚から得られ、自己複製、即ち、培養物中において増殖性の未分化な状態で無期限に維持される能力を特徴とする。また、ES細胞は多能性であり、3つの胚系統、即ち、外胚葉、中胚葉及び内胚葉、更にそれらの全ての誘導体へと分化する能力を保持していることを意味する(非特許文献1)。最近のリプログラミング技術の発達により、現在では線維芽細胞等の体細胞からES細胞様幹細胞を作製することが可能である。少数の特定の転写因子セットである、マウス(非特許文献2)及びヒト(非特許文献3;非特許文献4)におけるOct4、Sox2、c-Myc、及びKlf4、又はヒトにおけるOct4、Sox2、Nanog及びLin28(非特許文献5)の体細胞への導入により、様々な分化した細胞種をES様幹細胞状態へとリプログラムすることができ(人工多能性幹細胞すなわちiPS)。この戦略は、現在、個々の患者からのES様細胞株の作製を可能とし、そのようにしてヒト遺伝子疾患と関連性の高いin vitroモデルを作り出す可能性を提供している。そのようなリプログラムされた細胞株が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又筋萎縮性側索硬化症(ALS)等の様々な疾患を有する患者から既に作製されており、かかるリプログラムされた細胞の欠損組織への分化がALS等の幾つかの疾患に冒された患者由来のiPS細胞で達成され、したがって上記アプローチの実行可能性が立証されている(非特許文献6;非特許文献7)。

【0003】

心筋細胞又はニューロン等の幾つかの系統は、in vitroにおいてES細胞から容易に作製される一方で、ES細胞又はiPS細胞から骨格筋、真皮、軟骨、又は骨等の沿軸中胚葉誘導体を分化させることは困難であるとされている。幾つかの筋肉変性疾患の治療のための細胞補充療法又は整形外科用の細胞補充療法によって与えられる裏付けを考慮すれば、筋系統及び骨格系統の前駆体を産生するためのプロトコルの開発が決定的に重要である。胚において、筋肉、背側真皮及び身体の中軸骨格は、沿軸中胚葉、より具体的には未分節中胚葉(PSM)を形成する多能性前駆体由来する。これらの前駆体は、遺伝子Brachyury(T)、Tbx6及びMesogenin1(Msgn1)(非特許文献8;非特許文献9)の発現を特徴とし、それらのほとんどが、骨格筋系統、真皮系統、骨格系統、並びに脂肪細胞及び内皮細胞を含む他の様々な誘導体へと分化する。マウス胚において、Rspo3(Cristin1、Thsd2とも呼ばれる)は、PSM及び体節において強く発現し、また後に凝縮している間葉系細胞中において強く発現する(非特許文献10;非特許文献11)。R-spondin(Rspo1~Rspo4遺伝子)は、トロンボスポンジン領域を含む分泌分子であり、Fzd/LRP/Lgr4/Lgr5コレセプター複合体を介して古典的Wntシグナル伝達及びベータ-カテニンを活性化することができるが(非特許文献12;非特許文献13;非特許文献14;非特許

文献 15)、Syndecan 4 にも結合して Wnt / PCP シグナル伝達を誘導することが示されている (非特許文献 16)。興味深いことに、生化学的アッセイにより、Rspo 2 及び Rspo 3 は、Rspo 1 及び Rspo 4 に比べてより強力に Wnt シグナル伝達を活性化することが示されている (非特許文献 14)。また、R-spondin は、骨形成及び軟骨形成 (非特許文献 17; 非特許文献 18; 非特許文献 16)、筋形成 (非特許文献 19; 非特許文献 10)、並びに血管新生 (非特許文献 20) に関係することが示されている。

【0004】

骨形成タンパク質 (BMP) は、二量体化して BMP シグナル伝達を活性化し、I 型及び II 型 BMP 受容体 (BMPR - I 及び BMPR - II) で構成されるレセプター複合体に結合し得る、TGF ベータスーパーファミリーの分泌分子である。より正確には、BMPR - I はアクチビン受容体様キナーゼ (ALK) - 2 / 3 及び 6 (それぞれ ActR - IA、BMPR - IA 及び BMPR - IB としても知られている) からなる場合もある。同様に、BMPR - II は、BMPR - II、ActR - IIA 及び ActR - IIB からなる場合もある。BMP レセプター複合体は、2 つの BMPR - I 及び 2 つの BMPR - II のヘテロテトラマー複合体によって形成される。BMP 受容体は、BMP 二量体の結合に際して Smad 1 / 5 / 8 のリン酸化を可能とする細胞質内のセリン / トレオニンキナーゼ領域を含む。リン酸化された Smad 1 / 5 / 8 は、その後、Smad 4 と連携し、核内へとシャトルして (shuttle)、DNA 結合阻害因子 (Id) 1 / 2 / 3 遺伝子を含む標的遺伝子を活性化する (非特許文献 21)。重要なことは、非常に多くの BMP / TGF 分泌アゴニスト及びアンタゴニストが、発生の間に BMP シグナル伝達を調節及び微調整することが説明されている。特に、noggin、chordin、follistatin 及び gremlin が、分泌された BMP を隔離することによって BMP シグナル伝達を遮断し、受容体への結合を妨げる。BMP リガンド (著しくは、BMP 2、4 及び 7)、BMP 受容体、Smad、Co-Smad 及び BMP アゴニスト / アンタゴニストは、中胚葉特異化及び発生の間の器官形成に関係している (非特許文献 22; 非特許文献 23; 非特許文献 24; 非特許文献 25; 非特許文献 26; 非特許文献 27 及び 非特許文献 28)。

【0005】

ES 細胞の沿軸内胚葉及びその誘導体への分化は、in vitro では非常に非効率的である。自発的な骨格筋分化が制限されているのは、マウス胚様体の培養及び DMSO 処理 (非特許文献 29; 非特許文献 30)、又はレチノイン酸処理 (非特許文献 31) によると説明されている。マウス及びヒト ES 細胞を in vitro において筋肉系統へと分化させるための 2 つの明確な戦略が報告されている。1 つ目は、表面マーカーを使用した前駆体の選別を含む。例えば、Studer のグループは、血清含有培地における培養期間の後に、ヒト ES 細胞由来 CD 73 + 間葉系前駆体の単離及びそれらのその後の骨格筋への分化を報告した (非特許文献 32)。また、衛星細胞 SM / C - 2.6 に対する抗体を、マウス ES 細胞及び iPS 細胞から分化した筋原細胞を単離するために使用した (非特許文献 33; 非特許文献 34)。最後に、マウス ES 細胞から分化した内胚葉前駆体もまた、血小板由来増殖因子受容体アルファ (PDGFR α) 又は血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR 2) 等の他の表面マーカーの発現に基づいて単離された (非特許文献 35; 非特許文献 36; 非特許文献 37; 非特許文献 38)。しかしながら、このマーカーの組合せが沿軸内胚葉前駆体に厳密に特異的であるかどうかは立証されていない。2 つ目の戦略は、転写因子である Pax 3 若しくは MyoD、又は分泌因子であるインスリン増殖因子 2 (IGF - 2) のマウス ES 細胞における強制発現に基づくものである (非特許文献 39; 非特許文献 40; 非特許文献 41; 非特許文献 42; 非特許文献 43)。しかしながら、これらの戦略は効率が悪い、安全な細胞療法の開発において大きな障害である ES 細胞への外来性 DNA の導入を必要とするかのいずれかであり、分化細胞は増殖力及び生着力が劣ることが多い。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0006】

- 【非特許文献1】Chambers I., 2004
 【非特許文献2】Takahashi and Yamanaka, 2006
 【非特許文献3】Park et al., 2008b
 【非特許文献4】Takahashi et al., 2007
 【非特許文献5】Yu et al., 2007
 【非特許文献6】Dimos et al., 2008
 【非特許文献7】Park et al., 2008a
 【非特許文献8】Chapman et al., 1996
 【非特許文献9】Yoon and Wold, 2000
 【非特許文献10】Kazanskaya et al., 2004
 【非特許文献11】Nam et al., 2007
 【非特許文献12】Carmon et al., 2011
 【非特許文献13】de Lau et al., 2011
 【非特許文献14】Kim et al., 2008
 【非特許文献15】Nam et al., 2006
 【非特許文献16】Ohkawara et al., 2011
 【非特許文献17】Hankenson et al., 2010
 【非特許文献18】Jin et al., 2011
 【非特許文献19】Han et al., 2011
 【非特許文献20】Kazanskaya et al., 2008
 【非特許文献21】Hollnagel A et al., 1999
 【非特許文献22】Derynck Rik, 2008
 【非特許文献23】Reshef R. et al, Gen Dev 1998
 【非特許文献24】Wijgerde M. et al, 2005
 【非特許文献25】McMahon JA et al, 1998
 【非特許文献26】Stafford DA et al, 2011
 【非特許文献27】Pourquie O. et al, 1996
 【非特許文献28】Tonegawa A. et al, 1997
 【非特許文献29】Dinsmore et al., 1996
 【非特許文献30】Rohwedel et al., 1994
 【非特許文献31】Kennedy et al., 2009
 【非特許文献32】Barberi et al., 2007
 【非特許文献33】Fukada et al., 2004
 【非特許文献34】Mizuno et al., 2010
 【非特許文献35】Sakurai et al., 2009
 【非特許文献36】Sakurai et al., 2008
 【非特許文献37】Sakurai H. et al., 2006
 【非特許文献38】Takebe A. et al, 2006
 【非特許文献39】Darabi et al., 2008
 【非特許文献40】Darabi et al., 2011
 【非特許文献41】Dekel et al., 1992
 【非特許文献42】Prelle et al., 2000
 【非特許文献43】Shani et al., 1992

10

20

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、再生医療における応用の開発のため、筋肉細胞及び沿軸中胚葉由来系統を産生するためのより良好なES細胞及びiPS細胞の分化戦略を開発することが必要とさ

50

れている。

【0008】

本発明は、天然の胚沿軸中胚葉前駆細胞と区別するために沿軸中胚葉前駆体のマーカーを発現する、人工沿軸中胚葉前駆細胞又すなわちiPAMと呼ばれる多分化能の前駆細胞株を調製する方法を提供することによって、この要求を満たす。それらのin vivoにおける対応物のように、iPAM細胞は、筋肉、骨格（骨及び軟骨）、真皮組織、並びに脂肪細胞及び内皮等の誘導体の細胞系統をもたらすことができる。本発明者らは、胚性幹細胞又は多能性のリプログラムされた細胞（iPS）を、制限された数の因子を使用して人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞へと分化し得ることを示した。特に、本発明者らは、標的細胞のいかなる遺伝的修飾も伴うことなく、特定の因子で処理することによって、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を効率的に得ることが可能であるという驚くべき知見を得た。本発明者らは、得られた人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞が、内因性の沿軸中胚葉前駆細胞の特徴を呈することを示した。出願人の知る限り、本発明は、筋肉組織、骨格組織、脂肪組織又は真皮組織のいずれか、及び沿軸中胚葉由来内皮を再生するための前駆細胞としての使用に好適な無限の量の細胞を得る方法を初めて説明するものである。したがって、本発明は、とりわけ再生医学において非常に有用である。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、本発明は、有効量のWntシグナル伝達経路の活性化剤を含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するex vivo方法に関する。

20

【0010】

特に、本発明は、有効量のWntシグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するex vivo方法に関する。

【0011】

より具体的には、本発明は、有効量のR-spondinファミリーのメンバーと有効量の骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆細胞を調製するex vivo方法に関する。

30

【0012】

本発明は、有効量のGSK-3の阻害剤のメンバーと有効量の骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む代替方法にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】R-spondinが人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞運命を誘導することを示す図である。（A）組換えマウスRspo3（10ng/mL）を含むか又は含まない、FBS15%培地又はKSR15%培地における基本培養条件（default culture conditions）下でのmES細胞（Msn1RepV）の分化4日後の蛍光Msn1レポーター活性化（YFP陽性細胞（YFP+細胞））の比較。YFPチャネル、50倍。（B）FBS15%培地中でマウスRspo3に反応したiPAM細胞誘導の頑強性。フローサイトメトリーによる3組のウェルの測定。エラーバーはs.e.m.である。

40

【図2】Rspo3による処理時のMsn1-YFP+（人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞）集団の誘導のフローサイトメトリー分析を示す図である。（A）FBS15%培地での分化0日目におけるMsn1RepV mES細胞に対するフローサイトメトリー分析。YFP+集団は1%未満であった。（B）R-spondin3 10ng/mLを補充されたFBS15%培地での分化4日目におけるフローサイトメトリー分析。YFP+集団は全集団の70%より多かった。

50

【図3】沿軸中胚葉前駆体（人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞）の特性評価を示す図である。（A）抗YFP抗体で標識化され、ヘキストで共染色された培養物中における4日後のマウスMsgn1Reporter-mES細胞のiPAM細胞への分化、10倍。（B）沿軸中胚葉前駆体に特異的な遺伝子であるMsgn1及びTbx6に対する、FACSで選別されたiPAM YFP陽性集団のqRT-PCR分析、非iPAM YFP陰性集団発現レベルに対して正規化された相対発現（濃縮倍率）。

【図4A】図4A-Cは古典的Wntシグナル伝達によって媒介される人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞におけるR-spondin活性を示す図である。（図4A）古典的Wnt阻害剤であるDkk1の存在下又は不在下におけるFBS15%培地での分化4日後のiPAM誘導（%YFP陽性細胞）に対する種々の用量のRspo3の効果の比較。濃度はng/mL。

【図4B】FBS15%培地での分化4日後におけるiPAM誘導（%YFP陽性細胞）に対する4つの組換えRspoファミリーメンバーの効率の比較。濃度はng/mL。

【図4C】古典的Wntシグナル伝達活性化のためにBatlucレポーター構築物によって形質移入され、低血清（FBS1%）含有培地中においてRspo3（10ng/mL）、Dkk1（50ng/mL）及びLiCl（5mM）の存在下で培養されたMsgn1Reporter-mES細胞におけるルシフェラーゼ検出。Rspo3による処理は、分化しているES細胞における古典的Wnt反応を強く活性化する。

【図5】R-spondin活性が、GSK3ベータ阻害剤であるCHIR99021によって模倣され得ることを示す図である。FBS15%培地での分化3日後及び4日後におけるiPAM誘導（%YFP陽性細胞）に対するRspo3及びCHIR99021の効率の比較。Rspo3についての濃度はng/mL、CHIR99021についての濃度はμM。

【図6】DMSOが人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞誘導に対して好ましい効果を有することを示す図である。DMSO0.5%を含有するFBS15%培地での分化4日後におけるiPAM誘導。最適なiPAM誘導がR-spondin及びDMSOの併用により得られた。濃度はng/mL。

【図7】限定培地中におけるRspo2及びRspo3活性を示す図である。FBS1%培地（A）又はKSR15%培地（B）での分化4日後におけるiPAM誘導（YFP陽性細胞の%）に対する組換えマウス及びヒトR-spondin2及びR-spondin3の効果の分析。濃度はng/mL。

【図8】分化18日目における本発明の集団の特性評価を示す図である。0日目～4日目において、マウスES細胞を、Rspo3の存在下で分化させ、その後FBS15%培地中で18日目まで分化させた。細胞種を組織特異的抗体染色、即ち、筋肉（デスミン、緑色）、内皮（PECAM1（CD31）、緑色）及び軟骨（アルシアンブルー）により同定した。

【図9】培養5日後のiPAM細胞の真皮及び筋形成分化を示す図である。ES細胞を、FBS15%、DMSO0.5%及びRspo3 10ng/mL中で4日間培養し、その後、FBS15%若しくはFBS1%、又はソニックヘッジホッグ（Shh）及びレチノイン酸添加FBS1%（F1ShhRA）又はShh、Noggin及びLiCl添加FBS1%（F1SNLi）に移した。次の日に細胞を回収し、真皮マーカーDermo1（A）及び筋肉マーカーMyf5（B）についてqRT-PCRにより分析した。グラフは、濃縮倍率を示す。

【図10A】図10A-DはR-spondinがヒトES細胞においてiPAM運命を誘導することを示す図である。（図10A）mibunkaHUES1、又はRspo3を含むか若しくは含まないFBS15%含有培地中で10日目まで培養されたHUES1において、QRT-PCRによって測定された、沿軸中胚葉前駆体マーカーであるBrachyuryの発現比較。未分化HUES1細胞に対する相対的発現を示す（誘導倍率）。

【図10B】沿軸中胚葉前駆体マーカーであるPDGFRαの発現比較。未分化HUES

10

20

30

40

50

1細胞に対する相対的発現を示す（誘導倍率）。

【図10C】沿軸中胚葉前駆体マーカーであるTbx6の発現比較。未分化HUES1細胞に対する相対的発現を示す（誘導倍率）。

【図10D】沿軸中胚葉前駆体マーカーであるMsxnの発現比較。未分化HUES1細胞に対する相対的発現を示す（誘導倍率）。

【図11】Nogginが、BMP4活性を相殺することによってiPAM運命を促進することを示す図である。Noggin（200ng/ml）の添加を伴う（RDN）又は伴わない（RD）、Rspo3 10ng/ml及びDMSO 0.5%の存在下での分化3日目（d3）及び4日目（d4）におけるBMP4発現。データは、正規化された発現値として示される。灰色に着色されたデータポイントは、有意でないものとする。データポイントは、3組の生物試料の平均である。

【図12】沿軸中胚葉分化の初期段階の分子特性評価を示す図である。（A）PSM領域の後方部及び前方部、並びにRspo3 10ng/ml、DMSO 0.5%及びNoggin 200ng/mlの存在下で、3日目及び4日目にそれぞれ回収されたin vitroにおいて分化したMsxn RepV Venus陽性ES細胞の遺伝子サインリスト（GSL法）を比較するベン図。in vivo及びin vitroのVenus陽性ES細胞（人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞）におけるPSM間で共有される主要なサイン遺伝子を強調する（黒色四角）。赤色矢印は、ES細胞分化の3日目及び4日目の間にシフトする遺伝子サインを示す。（B）PSM、並びに3日間及び4日間in vitroにおいて分化されたMsxn RepV細胞（人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞）に共通のサイン遺伝子リストからの代表的な遺伝子。示される遺伝子は、強く発現され、in-situハイブリダイゼーションによって沿軸中胚葉に特異的であることが確認された（データは非図示）。3日目に活性化された遺伝子はほとんどがPSM後方に特異的であったのに対し、4日目に活性化された遺伝子はPSM前方部のアイデンティティーの獲得を明確に示した。

【図13A】図13A-Cは、in vitroにおいてES細胞から分化されたPax3陽性PSM前駆体が、in vivoにおいて筋線維を作製することができることを示す図である。（図13A）CAG-GFPレンチウイルスで標識化され、in vitroにおいて分化されたPax3陽性細胞（人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞）を用いた移植の1ヶ月後に前脛骨筋を採取した（横断面）。コントロール（Ctrl、非移植領域）及び生着領域をジストロフィン（DYS）及びラミニン（LAMA1）に対する抗体で染色（赤色）した。生着した前駆体は、ジストロフィン及びラミニンを発現する筋線維を広範囲に亘って産生した。核をヘキストで対比染色した。スケールバー、100µm。

【図13B】移植1か月後に前脛骨筋を採取した（横断面）。コントロール（Ctrl）及び生着領域をミオゲニン（MYOG）及びPAX7（赤色）に対する抗体で染色した。核をヘキストで対比染色した。PAX7欄について、挿入欄はGFP分布を示す。スケールバー、100µm。

【図13C】生着した細胞は、胚性ミオシンMyHCemb、MyHCI（遅筋）及びMyHCperi/MyHCI（速筋）（左欄）を発現し、対応するGFP/ヘキスト対比染色とのオーバーレイを右欄に示す。各抗体について、移植組織を上段に示し、コントロール組織を下段に示す。スケールバー、200µm。

【発明を実施するための形態】

【0014】

人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製する方法

本発明の第1の態様は有効量のWntシグナル伝達経路の活性化剤を含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するex vivo方法に関する。

【0015】

別の特定の態様では、本発明は、有効量のWntシグナル伝達経路の活性化剤を含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞

胞の集団を調製する *ex vivo* 方法にも関する。

【0016】

特定の態様では、本発明は、有効量の *Wnt* シグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質 (*BMP*) シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆 (*iPAM*) 細胞を調製する *ex vivo* 方法にも関する。

【0017】

特定の態様では、本発明は、有効量の *Wnt* シグナル伝達経路の活性化剤と有効量の骨形成タンパク質 (*BMP*) シグナル伝達経路の阻害剤とを含む適切な培養培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、人工沿軸中胚葉前駆 (*iPAM*) 細胞の集団を調製する *ex vivo* 方法に関する。

10

【0018】

本明細書で使用される用語「*Wnt* シグナル伝達経路」は、2つの経路、即ち「古典的 *Wnt* / ベータカテニンシグナル伝達経路」及び「*Wnt* / *PCP* シグナル伝達経路」に分けられ得るシグナル伝達経路を表す。本明細書で使用される用語「古典的 *Wnt* / ベータカテニンシグナル伝達経路」又は「*Wnt* / *PCP* シグナル伝達経路」は、その一般的な意味において、胚発生及びがんにおける役割で最もよく知られているのみならず、成体動物における正常な生理学的プロセスに關与するタンパク質及び他の生物活性因子 (脂質、イオン、糖等) のネットワークを表す。「古典的 *Wnt* / ベータカテニンシグナル伝達経路」は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (*GSK-3*) の *Wnt* 依存性の阻害を特徴とし、後の - カテニンの安定化をもたらし、その後、核へと移行し転写因子として作用する。「*Wnt* / *PCP* シグナル伝達経路」は、*GSK-3* 又は - カテニンを含まず、カルシウム依存性シグナル伝達、平面内細胞極性 (*PCP*) 分子、低分子 *GTP* アーゼ及び *C-Jun* N末端キナーゼ (*JNK*) シグナル伝達を含む幾つかのシグナル伝達の分岐を含む。これらの経路は、Clevers, 2006; Montcouquiol et al, 2006; Schlessinger et al, 2009等の多数の総説において詳しく記載されている。

20

【0019】

1つの実施形態において、*Wnt* シグナル伝達経路は、古典的 *Wnt* / - カテニンシグナル伝達経路である。

【0020】

更に好ましい実施形態において、*Wnt* シグナル伝達経路は、*Wnt* / *PCP* シグナル伝達経路である。

30

【0021】

別の好ましい実施形態において、*Wnt* シグナル伝達経路は、古典的 *Wnt* / - カテニンシグナル伝達経路及び *Wnt* / *PCP* シグナル伝達経路である。

【0022】

本明細書で使用される用語「活性化剤」は、*Wnt* シグナル伝達活性を増強する物質を表す。例えば、古典的 *Wnt* / - カテニンシグナル伝達経路について、この活性は、*LEF* / *TCF* 結合部位レポーターの確立された多量体を使用する *Wnt* レポーター活性、及び / 又は *GSK-3* の阻害、及び / 又は *T*、*Tbx6*、*Msgn1*、若しくは *Axin2* 等の古典的 *Wnt* 標的遺伝子の活性化によって測定され得る。

40

【0023】

本明細書で使用される用語「人工沿軸中胚葉前駆細胞」又は「*iPAM*」は、任意の細胞種由来であるが、沿軸中胚葉の前駆細胞の特徴を呈する細胞を指す。1つの実施形態において、*iPAM*細胞は、以下の特性を特徴とする：

a) それらは、*Tbx6*、*EphrinA1*、*EphrinB2*、*EPHA4*、*PDGFR* アルファ、*Sal11*、*Sal14*、*D111*、*D113*、*Papc* (*Pcdh8*)、*Lfng*、*Hes7*、*Ripply1*、*Ripply2*、*Brachyury* (*T*)、*Cdx2*、*Cdx4*、*Evx1*、*Cxcr4*、*Il17rd*、*Fgf8*、*Fgf17*、*Gbx2*、*Wnt3a*、*Wnt5b*、*Rspo3*、*SP5*、*SP8*、*Has2*、*Dkk1*、*D*

50

a c t 1、P a x 3、P a x 7、M e s p 1、M e s p 2 又は M s g n 1 遺伝子等の沿軸中胚葉前駆細胞に特徴的なバイオマーカーを発現する。例えば、M s g n 1 プロモーターを含む遺伝子レポーターアッセイで測定されるように M s g n 1 遺伝子を優先的に発現する；並びに、

b) それらは多能性細胞であり、少なくとも骨格細胞系統、真皮細胞系統又は筋肉細胞系統への分化が可能である；

c) 任意選択で、それらは、例えば、6 か月を超えて培養物中に維持され得る、長期の自己複製特性を有してもよい。

【0024】

上記人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の多分化能を、例えば、以下、特に実施例において記載されるプロトコルを使用して、骨格細胞系統、真皮細胞系統又は筋肉細胞系統への i n v i t r o における分化によって、i n v i t r o において試験することができる。

10

【0025】

本明細書で使用される、用語「多分化能」は、環境条件及び培養条件に依存して2以上の細胞系統へと分化することが可能な細胞を指す。多能性であり全ての種類の体細胞系統へと分化し得る胚性幹細胞とは対照的に、本発明の人工沿軸中胚葉前駆細胞は、限定された分化能を有する。

【0026】

用語「多能性細胞」は、本明細書で使用される場合、様々な異なる細胞系統のもととなり得る哺乳類未分化細胞を指す。典型的には、多能性細胞は、以下のマーカー、O c t 4、S O X 2、N a n o g、S S E A 3 及び S S E A 4、T R A 1 / 8 1 を発現し得る。International Stem Cell Initiative recommendations, 2007を参照されたい。

20

【0027】

1つの実施形態において、多能性細胞はヒト多能性細胞である。

【0028】

別の実施形態において、多能性細胞は非ヒト哺乳類多能性細胞である。

【0029】

1つの実施形態において、多能性細胞は幹細胞である。

【0030】

典型的には、上記幹細胞は胚性幹細胞である。

30

【0031】

別の実施形態において、多能性細胞はヒト胚性幹細胞 (h E S 細胞) である。典型的には、下表に記載されるもののような h E S 細胞株 (Loser et al, 2010) が、本発明の方法に採用され得る。

【0032】

【表 1】

株	核型	入手可能な継代	原産国	起源
SA01	46XY	25	スウェーデン	Cellartis AB
VUB01	46XY	73	ベルギー	AZ-VUB Bruxel
HUES 24,	46XY	26	アメリカ合衆国	Harvard
HI1	46XY, 20q11.21	26	アメリカ合衆国	Wicell research Institute
H9	46XX	27	アメリカ合衆国	Wicell research Institute
WT3	46XY	35	英国	UKSCB
HUES1	46XX	33	アメリカ合衆国	Harvard

【0033】

1つの実施形態において、多能性細胞は、マウス幹細胞、齧歯類幹細胞又は霊長類幹細胞等の非ヒト胚性幹細胞である。

【0034】

1つの実施形態において、多能性細胞は人工多能性幹細胞（iPS）である。人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、或る特定の遺伝子の「強制」発現を誘導することによって、非多能性細胞、典型的には成体の体細胞から人工的に得られた多能性幹細胞の種類である。iPS細胞は、2006年にマウス細胞から最初に産生され（非特許文献2）、2007年にヒト細胞から産生された（非特許文献4；非特許文献5）。

【0035】

別の実施形態において、本発明の古典的Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路又はWnt/PCPシグナル伝達経路の活性化剤は、脊椎動物種起源であるか又は修飾されたR-spondinファミリーのメンバーである。

【0036】

別の実施形態において、R-spondinファミリーのメンバーは、哺乳類R-spondinファミリーのメンバーである。

【0037】

特定の実施形態において、本発明によるR-spondinファミリーのメンバーは、R-spondin1、R-spondin2、R-spondin3及びR-spondin4からなる群において選択される。

【0038】

特定の実施形態において、本発明による R - s p o n d i n ファミリーのメンバーは R - s p o n d i n 3 である。

【 0 0 3 9 】

特定の実施形態において、本発明による R - s p o n d i n ファミリーのメンバーは R - s p o n d i n 2 である。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される用語「 R - s p o n d i n 3 」又は「 R - s p o n d i n 2 」は、 W n t シグナル伝達経路を活性化する脊椎動物における分泌タンパク質のファミリーのメンバーを指す。

【 0 0 4 1 】

ヒト R - s p o n d i n 3 タンパク質の例示的配列は、アクセッション番号 N P _ 1 1 6 1 7 3 . 2 (配列番号 1) のもと、データベースに寄託されている。マウス R - s p o n d i n 3 タンパク質の例示的配列は、アクセッション番号 N P _ 0 8 2 6 2 7 . 3 (配列番号 2) のもと、データベースに寄託されている。ヒト R - s p o n d i n 2 タンパク質の例示的配列は、アクセッション番号 N P _ 8 4 8 6 6 0 . 3 (配列番号 3) のもと、データベースに寄託されている。マウス R - s p o n d i n 2 タンパク質の例示的配列は、アクセッション番号 N P _ 7 6 6 4 0 3 . 1 (配列番号 4) のもと、データベースに寄託されている。

【 0 0 4 2 】

また、本明細書で使用される用語「 R - s p o n d i n 3 」は、かかる機能的変異体が多発する本発明の目的のための分化因子の有利な特性を保持する限り、 R - s p o n d i n 3 野生型 (天然起源) タンパク質の任意の機能的変異体も包含する。 1 つの実施形態において、上記機能的変異体は、最も密接に関連する既知の天然 R - s p o n d i n 3 ポリペプチド配列に対して、例えば、それぞれ配列番号 1 又は配列番号 2 のヒト又はマウスポリペプチド R - s p o n d i n 3 に対して、少なくとも 6 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % の同一性を有し、かつ関連する野生型タンパク質と実質的に同一の W n t 活性化活性を保持する、 R - s p o n d i n 3 の機能的ホモログである。別の実施形態において、上記機能的変異体は、例えば、野生型 R - s p o n d i n 3 タンパク質の少なくとも 5 0 、 1 0 0 、又は 2 0 0 の連続するアミノ酸を含み、かつ実質的に同一の W n t 活性化活性を保持する、 R - s p o n d i n 3 のフラグメントである。別の実施形態において、かかる機能的変異体は、参照番号 Q 9 B X Y 4 - 2 及び C A I 2 0 1 4 2 . 1 (配列番号 5) のもとに記載されるヒト R - s p o n d i n 3 のアイソフォーム 2 等の R - s p o n d i n 3 遺伝子産物アイソフォームにおいて構成され得る。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される用語「 R - s p o n d i n 2 」もまた、かかる機能的変異体が多発する本発明の目的のための分化因子の有利な特性を維持する限り、 R - s p o n d i n 2 野生型 (天然起源) タンパク質の任意の機能的変異体を包含する。

【 0 0 4 4 】

1 つの実施形態において、上記機能的変異体は、最も密接に関連する既知の天然 R - s p o n d i n 2 ポリペプチド配列に対して、例えば、それぞれ配列番号 3 又は配列番号 4 のヒト又はマウスポリペプチド R - s p o n d i n 2 に対して、少なくとも 6 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % の同一性を有し、かつ関連する野生型タンパク質と実質的に同一の W n t 活性化活性を保持する、 R - s p o n d i n 2 の機能的ホモログである。別の実施形態において、上記機能的変異体は、例えば、野生型 R - s p o n d i n 2 タンパク質の少なくとも 5 0 、 1 0 0 、又は 2 0 0 の連続するアミノ酸を含み、かつ実質的に同一の W n t 活性化活性を保持する、 R - s p o n d i n 2 のフラグメントである。別の実施形態において、上記機能的変異体は、それぞれ参照番号 Q 6 U X X 9 - 2 (配列番号 6) 又は参照番号 Q 6 U X X 9 - 3 (配列番号 7) のもとに記載されるヒト R - s p o n d i n 2 のアイソフォーム 2 又はアイソフォーム 3 等の R - s p o n d i n 2 遺伝子産物アイソフォームにおいて構成され得る。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップ数及び各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置数の関数（即ち、%同一性 = 同一の位置数 / 全位置数 × 100）である。2つの配列間の配列比較及び同一性パーセントの決定は、以下に記載される数学的アルゴリズムを使用して達成される。

【 0 0 4 6 】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、P A M 1 2 0 重量残基表（weight residue table）、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用するA L I G N プログラム（バージョン2.0）に組み込まれている、E. Meyers及びW. Millerのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17, 1988）を使用して決定することができる。

10

【 0 0 4 7 】

別の実施形態において、本発明による活性化剤は、R - s p o n d i n 3 及び R - s p o n d i n 2 の組合せである。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態において、本発明による活性化剤は、配列番号5の配列のヒト R - s p o n d i n - 3 アイソフォーム2であってもよい。

【 0 0 4 9 】

別の実施形態において、本発明による活性化剤は、配列番号6の配列のヒト R - s p o n d i n - 2 アイソフォーム2又は配列番号7の配列のヒト R - s p o n d i n - 2 アイソフォーム3であってもよい。

20

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態において、多能性細胞の培養に使用される R - s p o n d i n 3 の濃度は、0.1 ng / ml ~ 500 ng / ml であり、好ましくは1 ng / ml ~ 500 ng / ml であり、より好ましくは5 ng / ml ~ 30 ng / ml である。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態において、多能性細胞の培養に使用される R - s p o n d i n 2 の濃度は、1 ng / ml ~ 500 ng / ml であり、好ましくは5 ng / ml ~ 30 ng / ml である。

30

【 0 0 5 2 】

特定の実施形態において、R - s p o n d i n 3 又は R - s p o n d i n 2 の濃度は、10 ng / ml である。10 ng / ml の濃度により、50%を超えて70%までの多能性細胞が人工沿軸中胚葉前駆（i P A M）細胞において分化される。

【 0 0 5 3 】

別の実施形態において、多能性細胞は、1日~15日間又はそれよりも短い期間に亘って、R - s p o n d i n 3 又は R - s p o n d i n 2 と共に培養される。特定の実施形態において、多能性細胞は少なくとも10日間に亘って、10 ng / ml の濃度の R - s p o n d i n 3 又は / 及び R - s p o n d i n 2 と共に培養される。

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される用語「B M P シグナル伝達経路の阻害剤」は、B M P（骨形成タンパク質）シグナル伝達経路の活性化の低下を生じさせる、天然又は合成の任意の化合物を表す。B M P シグナル伝達経路は、I 型及び I I 型 B M P 受容体で構成されるヘテロ複合体への二量体 B M P タンパク質の結合を特徴とし、S m a d 1 / 5 / 8 のリン酸化をもたらすリン酸化カスケードを生じ、I d 遺伝子等の標的遺伝子の活性化を生じるものである。典型的には、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、タンパク質 S m a d 1、5 及び 8 のリン酸化レベルの低下を誘発する（Gazzerro and Minetti, 2007）。

40

【 0 0 5 5 】

当業者であれば、所定の化合物が B M P シグナル伝達経路の阻害剤であるかどうかについてどのように評価するか理解している。典型的には、化合物は、該化合物の存在下で細

50

胞を培養した後、リン酸化 S m a d 1、5 又は 8 のレベルが、上記化合物の非存在下で培養された細胞と比較して減少していれば、B M P シグナル伝達経路の阻害剤であると判断する。リン酸化 S m a d タンパク質のレベルは、該 S m a d タンパク質のリン酸化形態に特異的な抗体を使用するウェスタンブロットによって測定され得る。

【0056】

I d 遺伝子等の標的遺伝子活性化は、典型的には、定量的リアルタイム P C R (q R T - P C R) を介して、直接的な I d 1 / 2 / 3 転写産物 (m R N A) 産生によって測定され、発現レベルを上記化合物の非存在下におけるコントロール状況と比較することができる。

【0057】

B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、B M P アンタゴニスト、I 型及び / 又は I I 型 B M P 受容体活性を遮断する化合物 (I / I I 型 B M P 受容体阻害剤)、I 型及び / 又は I I 型 B M P 遺伝子発現の阻害剤、又は B M P シグナル伝達経路の任意の下流段階を阻害する分子であってもよい。B M P シグナル伝達の阻害剤は、天然化合物又は合成化合物であってもよい。B M P シグナル伝達経路の阻害剤がタンパク質である場合、精製タンパク質又は組換えタンパク質若しくは合成タンパク質であってもよい。

【0058】

1 つの実施形態において、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、I 型 B M P 受容体阻害剤である。

【0059】

組換えタンパク質を産生するための多くの方法が当該技術分野において既知である。当業者であれば、所定のタンパク質の配列の知識、又は該タンパク質をコードするヌクレオチド配列の知識から、標準的な分子生物学的技術及び生化学的技術を使用して該タンパク質を容易に産生することができる。

【0060】

本発明の 1 つの実施形態において、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、N o g g i n、C h o r d i n 及び関連するタンパク質 (C h o r d i n 様 1 / 2 / 3)、F o l l i s t a t i n 及び関連するタンパク質 (F o l l i s t a t i n 様 1 / 2 / 3 / 4 / 5)、D a n ファミリーのタンパク質 (C e r b e r u s 1、G r e m l i n 1 及び 2、C e r 1 - 2 (C o c o)、S O S T (S c l e r o s t i n)、S O S T D C 1 (W i s e) を含む) 並びに B M P シグナル伝達経路を阻害するそれらの変異体及びフラグメントからなる群より選択される。

【0061】

本発明の別の実施形態において、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、B M P - 1 / T o l l o i d 様タンパク質、T W S G 1 (t w i s t e d g a s t r u l a t i o n)、T M E F F (T o m o r e g u l i n)、B i g l y c a n、T S K (T s u k u s h i)、B M P E R (C r o s s v e i n l e s s 2)、O g o n (S i z z l e d)、A M N (A m n i o n l e s s)、C T G F (結合組織増殖因子)、及び H S P G (G l y p i c a n 3 及び S y n d e c a n 4 を含む) からなる群より選択される。

【0062】

別の実施形態において、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は n o g g i n である。n o g g i n は、マウス n o g g i n (G e n P e p t アクセッション番号 N P _ 0 3 2 7 3 7 によって例示されるマウス n o g g i n、配列番号 1 0) 又はヒト n o g g i n (G e n P e p t アクセッション番号 E A W 9 4 5 2 8 によって例示されるヒト n o g g i n、配列番号 1 1) であってもよい。それは精製されてもよく、組換え体であってもよい。それは、単量体形態又は二量体形態であってもよい。

【0063】

1 つの実施形態において、B M P シグナル伝達経路の阻害剤は、B M P シグナル伝達カスケードを阻害する化合物である。特定の実施形態において、B M P シグナル伝達カスケードを阻害する化合物は、合成化合物又は化合物である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

別の実施形態において、BMPシグナル伝達経路の阻害剤は、I型BMP受容体の阻害剤である。

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される「骨形成タンパク質」に対する用語「I型BMP受容体」は、特定の細胞基質上の或る特定のセリンアミノ酸及びトレオニンアミノ酸に対してリン酸塩分子の付加を媒介するセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性を有する膜貫通タンパク質を表す。当該技術分野においては、I型BMP受容体の阻害剤は、BMPシグナル伝達経路を遮断し得ることがよく知られている。例えば、Yu et al, Nat Chem Biol. 2008を参照されたい。

10

【 0 0 6 6 】

好ましい実施形態において、I型BMP受容体の阻害剤は、化合物Dorsomorphin又は構造活性研究によって作製された任意の誘導体(Cuny GD et al, 2008)である。Dorsomorphin(6-[4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)フェニル]-3-ピリジン-4-イル-ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン、化合物Cとしても知られる)は、I型BMP受容体(ALK2、3及び6)を特異的に阻害する(Yu PB et al, 2008)。

【 0 0 6 7 】

組換えNogginは、R&D Systems若しくはPeprotechから購入することができ、又は上述の標準的な技術を使用して産生することができる。

20

【 0 0 6 8 】

典型的には、BMPシグナル伝達経路の阻害剤は、1 ng/ml ~ 10000 ng/ml、好ましくは5 ng/ml ~ 1000 ng/ml、好ましくは5 ng/ml ~ 500 ng/ml、好ましくは10 ng/ml ~ 200 ng/mlの濃度範囲、更に好ましくは約200 ng/mlの濃度で本発明の培養培地に添加される。

【 0 0 6 9 】

典型的にはnogginは、1 ng/ml ~ 1000 ng/ml、好ましくは10 ng/ml ~ 200 ng/mlの濃度範囲、更に好ましくは約200 ng/mlの濃度で本発明の培養培地に添加される。

【 0 0 7 0 】

典型的には、Dorsomorphinは、0.1 µM ~ 2 µMの濃度範囲、好ましくは1 µMの濃度で本発明の培養培地に添加される。

30

【 0 0 7 1 】

1つの実施形態において、多能性細胞は、BMPシグナル伝達経路の阻害剤と共に1日 ~ 4日間培養される。

【 0 0 7 2 】

1つの実施形態において、本発明による培養培地は多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞への分化を向上するため、本発明によるWnt活性化剤及びBMPシグナル伝達経路の阻害剤を含む。

【 0 0 7 3 】

1つの実施形態において、Wnt活性化剤はR-spondin3であり、BMPシグナル伝達経路の阻害剤はNogginである。

40

【 0 0 7 4 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆(iPAM)細胞への分化を向上するために、DMSO(ジメチルスルホキシド)又はDMSOの等価物を更に含んでもよい。

【 0 0 7 5 】

本明細書で使用される用語「等価物」は、極性化合物及び非極性化合物の両方を溶解する溶媒であるDMSOと同一の特性を呈する物質を意味する。

【 0 0 7 6 】

50

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3、N o g g i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 7 7 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3 及び D M S O を含む。

【 0 0 7 8 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 2、N o g g i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 7 9 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 2 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 0 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3、D o r s o m o r p h i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 1 】

別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 2、D o r s o m o r p h i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 2 】

更なる別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3、R - s p o n d i n 2、N o g g i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 3 】

更なる別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3、R - s p o n d i n 2 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 4 】

更なる別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞への分化を向上するために、R - s p o n d i n 3、R - s p o n d i n 2、D o r s o m o r p h i n 及び D M S O を含む。

【 0 0 8 5 】

脊椎動物組換え R - s p o n d i n は、商業的に購入することができ、又は順化培養培地として産生することができる。これは、C O S 細胞等のコンピテント細胞中に R - s p o n d i n タンパク質のコード配列を含む構築物を発現させることを含む。R - s p o n d i n タンパク質は、培養培地中に分泌される。順化培地を、多能性細胞に直接適用してもよく、又は予め基本培地中に希釈してもよい。

【 0 0 8 6 】

別の実施形態において、W n t シグナル伝達経路の活性化剤は、G S K - 3 の阻害剤である。

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用される「グリコーゲン合成キナーゼ 3 ベータ」に対する用語「G S K - 3」は、特定の細胞基質上の或る特定のセリンアミノ酸及びトレオニンアミノ酸に対するリン酸塩分子の付加を媒介するセリン/トレオニンプロテインキナーゼを表す。当該技術分野において、G S K - 3 の阻害剤は、W n t シグナル伝達経路を活性化し得ることがよく知られている。例えば、Cohen and Goedert, 2004 ; Sato et al, 2004 ; Taelman et al, 2010 ; Wu and Pan, 2010 を参照されたい。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、GSK-3 の阻害剤はCHIR99021である。

【0089】

別の好ましい実施形態において、以下の代替手段を生体内 (the system) での R-spondin 因子の活性を高めるために使用することができる：

1. 上記 R-spondin 因子又は R-spondin の修飾形態をコードする遺伝子の内因性の発現を増強する；
2. 制御配列に制御可能に連結された R-spondin 因子のコード配列を含む発現ベクターを多能性細胞に導入して分化させるか、又は R-spondin 因子に対するコーディング RNA を細胞に導入することによって上記 R-spondin 因子の異所性の発現を可能とする；
3. 例えば、培養培地中、若しくは順化培地中の組換え R-spondin 因子 (R-spondin 1、2、3 及び 4 のファミリー) として、又は基体コーティングとして、適切な量の R-spondin 因子を細胞環境に直接導入する；
4. 上記標的細胞において R-spondin 因子シグナル伝達に關与する遺伝子の内因性の発現を活性化若しくは阻害する；又は、
5. 上記標的細胞における R-spondin 因子の発現レベルの制御、突然変異及び全体的な調節に關与するタンパク質を過剰発現させる。

10

【0090】

1つの実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞への分化を向上するために、CHIR99021 及び本発明による BMP シグナル伝達経路の阻害剤である Dorsomorphin を含む。

20

【0091】

1つの実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞への分化を向上するために、CHIR99021、Dorsomorphin 及び DMSO を含む。

【0092】

1つの実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞への分化を向上するために、R-spondin 2、R-spondin 3 及び CHIR99021 の組合せである Wnt 活性化剤と、Noggin 及び Dorsomorphin の組合せである本発明による BMP シグナル伝達の阻害剤とを含む。

30

【0093】

更なる別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞への分化を向上するために、R-spondin 3、R-spondin 2、CHIR99021、Dorsomorphin 及び DMSO を含む。

【0094】

更なる別の実施形態において、本発明による培養培地は、多能性細胞の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞への分化を向上するために、R-spondin 3、R-spondin 2、CHIR99021、Noggin 及び DMSO を含む。

【0095】

別の実施形態において、生体内での Wnt シグナル伝達経路の活性を高めるための代替手段として、例えば、化合物 CHIR99021 のような適切な量の薬理的な GSK-3 阻害剤の単独又は R-spondin との併用による直接的な細胞環境への導入を使用する。

40

【0096】

本発明は、多能性細胞から人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を調製するための組成物に關し、ここで、該組成物は、有効量の本発明による Wnt シグナル伝達経路の活性化剤、及び有効量の骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達経路の阻害剤を含む。

【0097】

また、本発明は、多能性細胞由来の人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を調製するための組成物に關し、ここで、該組成物は、有効量の本発明による Wnt シグナル伝達経路

50

の活性化剤を含む。

【0098】

また、本発明は、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するためのキットに関し、該キットは、

- a) Wntシグナル伝達経路の活性化剤、
- b) 骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達経路の阻害剤、及び
- c) 任意選択で、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するための使用説明書、を含む。

【0099】

また、本発明は、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するためのキットに関し、該キットは、

- a) Wntシグナル伝達経路の活性化剤、及び
- b) 任意選択で、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製するための使用説明書、を含む。

【0100】

好ましい実施形態において、上記活性化剤は、R-spondinファミリーのメンバーである。

【0101】

別の実施形態において、上記活性化剤は、R-spondin1、R-spondin2、R-spondin3及びR-spondin4からなる群より選択される。

【0102】

別の好ましい実施形態において、上記活性化剤は、R-spondin2又はR-spondin3である。

【0103】

別の好ましい実施形態において、上記活性化剤は、CHIR99021等のGSK-3の阻害剤である。

【0104】

別の実施形態において、本発明による阻害剤は、BMP/TGFベータファミリーの分泌アンタゴニストである。

【0105】

別の実施形態において、BMPシグナル伝達経路の阻害剤は、Noggin、Chordin、Chordin様1/2/3、Follistatin、Follistatin様1/2/3/4/5、並びにCerberus1、Gremlin1/2を含むDanファミリーのメンバーからなる群より選択される。

【0106】

別の好ましい実施形態において、上記阻害剤はNoggin又はFollistatinである。

【0107】

別の好ましい実施形態において、上記阻害剤は、Dorsomorphin等のBMPシグナル伝達の化学的阻害剤である。

【0108】

特定の実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製する上記キットは、

- a) R-spondinファミリーのメンバーを含む組成物、
- b) BMPシグナル伝達経路の阻害剤を含む組成物、及び
- c) DMSO又は等価物、を含む。

【0109】

別の特定の実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆（iPAM）細胞を調製する上記キットは、

10

20

30

40

50

- a) R - s p o n d i nファミリーのメンバーを含む組成物、及び
 - b) D M S O又は等価物、
- を含む。

【0110】

特定の実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を調製するための上記キットは、

- a) G S K - 3 の化合物阻害剤を含む組成物、
 - b) I 型 B M P 受容体の化合物阻害剤を含む組成物、及び
 - c) D M S O又は等価物、
- を含む。

10

【0111】

本発明の方法により得ることができる人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団

本発明は、さらに、上記方法により得ることができる人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団に関する。

【0112】

これらの集団は、典型的には、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞に加えて、他の細胞種を含んでもよい。1つの実施形態において、本発明の集団は、例えば M s g n 1 遺伝子産物といった沿軸中胚葉前駆細胞に特徴的な少なくとも1つのバイオマーカーの高発現を呈する細胞を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%及び好ましくは少なくとも90%含む。

20

【0113】

沿軸中胚葉前駆細胞に特徴的な他のバイオマーカーとしては、限定ではないが、以下の1又は複数のタンパク質が挙げられる： T b x 6、E p h r i n A 1、E p h r i n B 2、E P H A 4、P D G F R アルファ、S a l l 1、S a l l 4、D l l 1、D l l 3、P a p c (P c d h 8)、L f n g、H e s 7、R i p p l y 1、R i p p l y 2、B r a c h y u r y (T)、C d x 2、C d x 4、E v x 1、C x c r 4、I 1 1 7 r d、F g f 8、F g f 1 7、G b x 2、W n t 3 a、W n t 5 b、R s p o 3、S P 5、S P 8、H a s 2、D k k 1、D a c t 1、P a x 3、P a x 7、M e s p 1、M e s p 2。

【0114】

遺伝子発現を測定するために当該技術分野において既知の任意の方法を使用することができ、特に、リアルタイム定量的 P C R 若しくはマイクロアレイ等の定量的方法、又は遺伝子レポーター発現を使用する方法であって、該遺伝子レポーターが実施例に記載される M s g n 1 プロモーターを含む方法、又は免疫染色法等の定性的方法、若しくは細胞表面マーカーを含む特異的バイオマーカーを呈する細胞を同定する細胞ソーティング法を使用してもよい。

30

【0115】

本明細書で使用される、M s g n 1 遺伝子は、M e s o g e n i n 1 をコードする遺伝子を指す。マウス及びヒトにおいて M e s o g e n i n 1 をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の例として、それぞれ、配列番号 8 (N M _ 0 1 9 5 4 4 . 1) 及び配列番号 9 (N M _ 0 0 1 1 0 5 5 6 9 . 1) が挙げられる。

40

【0116】

1つの実施形態において、遺伝子発現に対する定量的アッセイにおいて発現が検出可能である場合に M s g n 1 の発現が高いとされる。別の実施形態において、本来の多能性細胞において観察された発現レベルよりも上記発現レベルが有意に高いか、又はマウス多能性細胞に対する L I F (白血病抑制因子) を含まないか、若しくはヒト多能性細胞に対する F G F (線維芽細胞増殖因子) を含まない基本培養培地等の非特異的条件下で分化する細胞において観察された発現レベルよりも上記発現レベルが有意に高い場合に、M s g n 1 の発現が高いとされる。コントロール細胞及び試験細胞間の発現レベルは、G A P D H 又はベータアクチン等の構成的に発現される遺伝子を使用して正規化され得る。

【0117】

50

人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団は、適切な増殖条件下で無期限に培養され得る。当業者であれば、例えば胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞 (i P S 細胞) の確立された増殖条件、又は以下の実施例に記載される増殖条件に基づいて適切な増殖条件を確立し得る。増殖条件は、有利には、例えば、F G F、W N Tのような増殖因子、又はそれぞれのシグナル伝達経路を調整する化合物を補充されたK S R (Gibco)、E S G R O (Chemicon/Millipore) といった血清置換培地の使用を含んでもよい。

【0118】

人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞は精製されてもよく、又は上記集団は人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を選択することによって人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞において濃縮されてもよい。1つの実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞集団の精製又は濃縮のための人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞に特異的なマーカーは、以下のマーカー：M s g n 1、T b x 6、E p h r i n A 1、E p h r i n B 2、E P H A 4、P D G F R a l p h a、S a l l 1、S a l l 4、D l l 1、D l l 3、P a p c (P c d h 8)、L f n g、H e s 7、R i p p l y 1、R i p p l y 2、B r a c h y u r y (T)、C d x 2、C d x 4、E v x 1、C x c r 4、I 1 1 7 r d、F g f 8、F g f 1 7、G b x 2、W n t 3 a、W n t 5 b、R s p o 3、S P 5、S P 8、H a s 2、D k k 1、D a c t 1、P a x 3、P a x 7、M e s p 1、M e s p 2の1又は複数のうちから選択されてもよく、又は神経運命等の他の系統/細胞種のマーカーを用いて否定的に選択されてもよい。

10

【0119】

精製又は人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の濃縮は、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) 若しくは人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の上記細胞表面マーカーの特異的バインダーを含む磁気ビーズ等のセルソーティング技術、又は沿軸中胚葉前駆体マーカーに対する蛍光レポーターを使用して達成され得る。別の方法は、規定の基体上への選択的付着によって人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の特異接着特性を利用してなる。

20

【0120】

したがって、精製又は濃縮の後、上記集団は、例えばM s g n 1遺伝子産物といった人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞に特徴的なバイオマーカーを高発現で有する細胞を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%より多く、又は95%より多く含み得る。

30

【0121】

別の好ましい実施形態において、本発明は、上述の方法により得ることができる人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞集団を含む組成物に関する。

【0122】

人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の分化による細胞系統の調製方法

人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞は、骨格筋、骨、軟骨、真皮細胞、並びに脂肪細胞又は内皮細胞を含むがこれらに限定されない沿軸中胚葉の他の誘導体を作製するためのi n v i t r oでの分化条件下で有利に培養され得る。

【0123】

したがって、本発明は、骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統を含む集団を調製する方法であって、

40

(a) 人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団を供給する工程と、

(b) 骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統を含む沿軸中胚葉誘導体のうちから選択される所望の細胞系統へと人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を分化させるために適切な条件下で、上記人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団を培養する工程とを含む、方法に関する。

【0124】

さらに、本発明は、本発明による人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む細胞系統集団の調製のための組成物、及び所望の細胞系統への分化に適切な条件に関する。

【0125】

50

1つの特定の実施形態において、本発明は、骨格筋細胞系統を含む集団を調製する方法であって、

(a) 人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団を供給する工程と、

(b) 少なくとも以下の成分：

(i) 細胞外マトリクス材料；及び

(i i) レチノイン酸、B M P、T G F (トランスフォーミング増殖因子)、H e d g e h o g、N o t c h、F G F、W n t、ミオスタチン、インスリン、P D G F、V E G F、M A P K、P I 3 Kを含むが、これらに限定されない上記系統の分化を制御することが知られているシグナル伝達経路を活性化又は阻害する化合物；

を含む分化培地の存在下で上記人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団を培養する工程と、

(c) 任意選択で、W n tシグナル伝達経路、F G Fシグナル伝達経路、H G F (肝細胞増殖因子)シグナル伝達経路、アクチピンシグナル伝達経路、E G F (上皮増殖因子)シグナル伝達経路、インスリンシグナル伝達経路、及びI G Fシグナル伝達経路を活性化若しくは阻害する少なくとも1又は複数の化合物、又はウマ血清若しくはトランスフェリン等の筋形成分化を促進することが知られている少なくとも1又は複数の化合物を含む、第2分化培地中で工程 (b) から得られた上記集団を培養する工程と、

を含み、それによって、D e s m i n若しくはミオシン重鎖等のマーカーによって同定され得る骨格筋細胞系統を含む集団を得る、方法を提供する。

【0126】

設計された細胞外マトリクス又は三次元足場の使用は、当該技術分野において広く記載されている (Metallo et al, 2007)。特定の実施形態において、細胞外マトリクス材料は、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ゼラチン、ポリリジン、P D M S及びM a t r i g e lからなる群より選択される。

【0127】

さらに、本発明は、更に以下を含む、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞から骨格筋細胞系統を調製するための組成物に関する：

i . 細胞外マトリクス材料、

i i . レチノイン酸経路、B M P (骨形成タンパク質) 経路、T G F 経路、H e d g e h o g 経路、N o t c h 経路、F G F 経路、W n t 経路、ミオスタチン経路、インスリン経路、P D G F (血小板由来増殖因子) 経路、V E G F (血管内皮増殖因子) 経路、M A P K 経路、P I 3 K 経路を活性化又は阻害する少なくとも1又は複数の化合物。上記組成物は、W n tシグナル伝達経路、F G Fシグナル伝達経路、H G Fシグナル伝達経路、アクチピンシグナル伝達経路、E G Fシグナル伝達経路、インスリンシグナル伝達経路及びI G Fシグナル伝達経路を活性化又は阻害する少なくとも別の化合物、又はウマ血清若しくはトランスフェリン等の筋形成分化を促進することが知られている化合物を更に含む。

【0128】

別の実施形態において、本発明は、真皮細胞系統を含む集団を調製する方法を提供し、該方法は、B M P経路、T G F 経路、W n t経路、F G F経路、E G F経路、レチノイン酸経路、N o t c h経路及びH e d g e h o g経路を活性化又は阻害する効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む集団を培養する工程を含む。真皮細胞は、D e r m o - 1等のマーカーを使用して同定され得る。

【0129】

さらに、本発明は、B M P経路、T G F 経路、W n t経路、F G F経路、E G F経路、レチノイン酸経路、N o t c h経路及びH e d g e h o g経路を活性化又は阻害する少なくとも1又は複数の化合物を更に含む、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞由来の真皮細胞系統を調製するための組成物に関する。

【0130】

別の実施形態において、本発明は、レチノイン酸経路、W n t経路、H e d g e h o g

10

20

30

40

50

経路、P T H r P 経路、T G F G 経路、B M P 経路を活性化若しくは阻害する効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物、又はデキサメタゾン、アスコルビン酸、ビタミンD3及びベータ-グリセロリン酸等の骨若しくは軟骨分化を促進することが知られている効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で、人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞を含む集団を培養する工程を含む、骨細胞系統又は軟骨細胞系統を含む集団を調製する方法を提供する。軟骨細胞は、アルシアンブルー等の古典的染色法によって同定され、骨細胞はアリザリンレッド又はフォンコッサ染色によって同定され得る。

【0131】

さらに、本発明は、レチノイン酸経路、W n t 経路、H e d g e h o g 経路、P T H r P 経路、T G F 経路、B M P 経路を活性化若しくは阻害する少なくとも1又は複数の化合物、又はデキサメタゾン、アスコルビン酸、ビタミンD3及びベータ-グリセロリン酸等の骨若しくは軟骨分化を促進することが知られている少なくとも1又は複数の化合物を更に含む、人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞由来の骨細胞系統又は軟骨細胞系統を調製するための組成物に関する。

10

【0132】

更なる別の実施形態において、本発明は、脂肪細胞を含む集団を調製する方法を提供し、該方法は、デキサメタゾン、イソブチルキサンチン及びインスリンを含む、脂肪細胞の分化を促進することが知られている効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞を含む集団を培養する工程を含む。脂肪細胞は、O i l R e d O 染色によって検出され得る。

20

【0133】

さらに、本発明は、デキサメタゾン、イソブチルキサンチン及びインスリンを含む、脂肪細胞の分化を促進することが知られている少なくとも1つの化合物を更に含む、人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞から脂肪細胞を調製するための組成物に関する。

【0134】

更なる別の実施形態において、本発明は、内皮細胞を含む集団を調製する方法を提供し、上記方法は、V E G F 経路又はF G F 経路を活性化又は阻害する効果的な量の少なくとも1又は複数の化合物の存在下で人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞を含む集団を培養する工程を含む。内皮は、P E C A M - 1 (C D 3 1) 免疫染色によって検出され得る。

【0135】

30

さらに、本発明は、V E G F 経路又はF G F 経路を活性化又は阻害する少なくとも1又は複数の化合物を更に含む、人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞から内皮細胞を調製するための組成物に関する。

【0136】

人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞を、軟骨細胞、筋肉細胞又は内皮細胞へと分化させるための幾つかの好適な条件の例が、下記実施例において記載される。

【0137】

別の実施形態において、本発明は、骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統、及び人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞に由来する他の誘導体を含む集団を提供する。

40

【0138】

好ましい実施形態において、本発明は、骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統、及び本発明の組成物により得られた人工沿軸中胚葉前駆(i P A M)細胞に由来する他の誘導体を含む集団を提供する。

【0139】

別の実施形態において、本発明は、本発明による方法によって得ることができる、骨格筋系統、骨系統、軟骨系統、真皮細胞系統、脂肪細胞系統又は内皮細胞系統を含む組成物に関する。

【0140】

i P A M 細胞、i P A M 細胞由来の細胞集団、及びそれらの使用

50

本発明の別の態様は、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を含む上記集団の使用、又は人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の分化に由来する骨格筋細胞系統、骨細胞系統、軟骨細胞系統又は真皮細胞系統を含む上記集団の使用のみならず、脂肪組織及び内皮の沿軸中胚葉誘導体の使用に関し、以下、これらを本発明の集団と呼ぶ。

【0141】

本発明の集団を、様々な適用、特に研究分野又は治療分野において使用し得る。

【0142】

適用の主要な分野の1つとして、細胞療法又は再生医療が挙げられる。例えば、遺伝的欠陥を患う患者から得られた細胞を培養して、当該技術分野において既知の方法に従って遺伝的に補正し、その後、上記患者に再投与するために i P S 細胞へとリプログラムして人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞又はその誘導体へと分化させてもよい。

10

【0143】

同様に、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞、又は適切な前駆体若しくは細胞系統を含むそれらの誘導体のいずれかを含む集団の直接的な i n v i v o 移植によって i n v i v o において損傷した組織を再生することにより、機能障害、損傷又は欠陥組織より生じる任意の疾患を潜在的に治癒するため、再生医療を使用することができる。

【0144】

したがって、1つの態様において、本発明は、哺乳類、例えばヒト患者への移植用の細胞療法製品としての使用のための人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞、若しくはそれらの誘導体、又は本発明の集団に関する。

20

【0145】

1つの特定の実施形態において、本発明は、本発明により得られた人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の集団を含む医薬組成物に関する。別の好ましい実施形態において、本発明は、例えば、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は少なくとも 10^9 の M s g n 1 発現細胞を含む、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の集団を含む医薬組成物に関する。別の実施形態において、この組成物は、薬学的に許容可能な担体を含む。

【0146】

1つの特定の実施形態において、本発明の集団を、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はその他の任意の遺伝的筋ジストロフィーといった筋遺伝子疾患の治療に使用する。

30

【0147】

1つの実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を様々な細胞種と共培養し、所望の系統への分化を誘導する。別の実施形態において、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を、受容宿主へと直接に移植する。再生医療の目的のため、人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞を、当該技術分野において既知の方法による遺伝子補正の後に移植することもできる。

【0148】

別の特定の実施形態において、本発明の集団を、加齢、疾患によって、又は外傷若しくは反復性緊張により生じるような身体的負荷によって引き起こされた関節又は軟骨若しくは骨の損傷の治療のための整形外科において使用する。

40

【0149】

また、別の特定の実施形態において、本発明の集団を、真皮組織、例えば皮膚組織の産生、再生医療又は研究における使用、特に化粧品産業又は火傷治療及び形成外科における使用のため、有利に使用し得る。

【0150】

別の好ましい実施形態において、本発明は、本発明の集団を含む組成物に関する。本発明の集団を含む組成物は、細胞療法又は再生医療において使用され得る。

【0151】

本発明は、以下の図面及び実施例により更に解説される。しかしながら、これらの実施

50

例及び図面は、何ら本発明の範囲を制限するものと解釈されるものではない。

【 0 1 5 2 】

図及び表：

【 0 1 5 3 】

【表 2】

表 1 : 本発明の配列

タンパク質	バンク参照番号	配列番号	配列
hRspodin 3	NP-116173.2 (CAI20141.1) 又は Q9BXY4-1	配列 番号1	MHLRLISWLF IILNFMEYIG SQNASRGRRO RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCKPR LFFALERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRY DINKCTKCKA DCDTCFNKNF CTKCKSGFY HLGKCLDNCP EGGLEANNHTM ECVSIVHCEV SEWNPWSPCT KKGKTCGFKR GTETRVREII QHPSAKGNLC PPTNETRKCT VQRKKCQKGE RGKKGRERKR KKPNGESKE AIPDSKSLES SKEIPEQREN KQQQKKRKVQ DKQKSVSVST VH
mRspodin 3	NP-082627.3	配列 番号2	MHLRLISCFE IILNFMEYIG SQNASRGRRO RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCKPR LFFVLERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRY DINKCTKCKV DCDTCFNKNF CTKCKSGFY HLGKCLDSCP EGGLEANNHTM ECVSIVHCEA SEWSPWSPCM KKGKTCGFKR GTETRVRDIL QHPSAKGNLC PPTSETRTCI VQRKKCSKGE RGKKGRERKR KKLNKEERKE TSSSDSKGL ESSIETPDQ ENKERQQQK RRARDKQKKS VSVSTVH
hRspodin 2	NP-848660.3 又は Q6UXX9-1	配列 番号3	MQFRLFSFAL IILNCMDYSH CQGNRWRRSK RASYVSNPIC KGCLSCSKDN GCSRCQKLF FFLRREGMRQ YGECLHSCPS GYYGHRAPDM NRCARCRIEN CDSCFSKDFC TKCKVGFYLH RGRCFDECPD GFAPLEETME CVEGCEVGH SEWGTC SRNN RTCGFKWGLE TRTRQIVKKP VKDTILCPTI AESRRCKMTM RHCPGGKRT KAKEKRNKKK KRKLIERAQE QHSVFLATDR ANQ
mRspodin 2	NP-766403.1	配列 番号4	MRFCLFSFAL IILNCMDYSQ CQGNRWRRNK RASYVSNPIC KGCLSCSKDN GCSRCQKLF FFLRREGMRQ YGECLHSCPS GYYGHRAPDM NRCARCRIEN CDSCFSKDFC TKCKVGFYLH RGRCFDECPD GFAPLDETME CVEGCEVGH SEWGTC SRNN RTCGFKWGLE TRTRQIVKKP AKDTIPCPTI AESRRCKMAM RHCPGGKRT KAKEKRNKKK RRKLIERAQE QHSVFLATDR VNQ
hRspodin 3 アイソ フォーム2	CAI20142.1 又は Q9BXY4-2	配列 番号5	MHLRLISWLF IILNFMEYIG SQNASRGRRO RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCKPR LFFALERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRY DINKCTKCKA DCDTCFNKNF CTKCKSGFY HLGKCLDNCP EGGLEANNHTM ECVSIVHCEV SEWNPWSPCT KKGKTCGFKR GTETRVREII QHPSAKGNLC PPTNETRKCT VQRKKCQKGE RGKKGRERKR KKPNGESKE AIPDSKSLES SKEIPEQREN KQQQKKRKVQ DKQKSGIEVT LAELTSSVSQ RTQPTPCRRR YL
hRspodin 2 アイソ フォーム2	Q6UXX9.2	配列 番号6	MRQYGECLHS CPSGYYGHRA PDMNRCARCR IENCDCFSK DFCTKCKVGF YLHRGRCFDE CPDGFAPLEE TMECVEGCEV GHWSEWGTC RNNRTCGFKW GLETRTRQIV KKPVKDTILC PTIAESRRCK MTMRHCPGGK RTPKAKEKRN KKKKRKLIER AQEQHSVFLA TDRANQ

10

20

30

40

hRspodin 2 isoform3	Q6UXX9-3	配列 番号7	FRLFSFAL IILNCMDYSH CQGNRWRRSK RGCIENCD S CFSKDFCTKC KVGFLHRGR CFDECPDGFA PLEETMECVG CEVGHWSEWG TCSRNNRTCG FKWGLETRTR QIVKKPKVDT ILCPTIAESR RCKMTMRHCP GSKRTPKAKE KRNNKKRKL IERAQEQHSV FLATDRANQ
mMsgn1	NM.019544.1	配列 番号8	ATGGACAACC TGGGTGAGAC CTTCTCAGC CTGGAGGATG GCCTGGACTC TTCTGACACC GCTGGTCTGC TGGCCTCCTG GGAAGTGGAA AGCAGAGCCA GGCCCTTGGA GCTGGTCCAG GAGTCCCCCA CTCAAAGCCT CTCCCCAGCT CCTTCTCTGG AGTCCTACTC TGAGGTGCGA CTGCCCTGCG GGCACAGTGG GGCCAGCACA GGAGGCAGCG ATGGCTACGG CAGTCACGAG GCTGCCGGCT TAGTCGAGCT GGATTACAGC ATGTTGGCTT TTCAACCTCC CTATCTACAG ACTGCTGGTG GCCTCAAAGG CCAGAAAGGC AGCAAAGTCA AGATGTCTGT CCAGCGGAGA CGGAAGGCCA GCGAGAGAGA GAAACTCAGG ATGCGGACCT TAGCCGATGC CCTCCACACG CTCCGGAATT ACCTGCCGCC TGTCTACAGC CAGAGAGGCC AACCGCTCAC CAAGATCCAG ACACTCAAGT ACACCATCAA GTACATCGGG GAACTCACAG ACCTCCTCAA CAGCAGCGGG AGAGAGCCCA GGCCACAGAG TGTGTGA
hMsgn1	NM00110556 9.1	配列 番号9	ATGGACAACC TGCGCGAGAC TTCTCTCAGC CTCGAGGATG GCTTGGGCTC CTCTGACAGC CCTGGCCTGC TGTCTTCTG GGAAGTGGAA GACAGGGCAG GGCCCTTTGA GCTGAATCAG GCCTCCCCCT CTCAGAGCCT TTCCCCGGCT CCATCGCTGG AATCCTATTG TTCTTCTCCC TGTCCAGCTG TGGCTGGGCT GCCCTGTGAG CACGGCGGGG CCAGCAGTGG GGGCAGCGAA GGCTGCAGTG TCGGTGGGGC CAGTGGCCTG GTAGAGGTGG ACTACAATAT GTTAGCTTTC CAGCCACCC ACCTTCAGGG CGGTGGTGGC CCCAAGGCC AGAAGGGCAC CAAAGTCAGG ATGTCTGTCC AGCGGAGGCG GAAAGCCAGC GAGAGGGAGA AGCTCAGGAT GAGGACCTTG GCAGATGCCG TGCACACCCT CCGGAATTG CTGCCACCTG TCTACAGCCA GAGAGGCCAG CCTCTACCA AGATCCAGAC ACTCAAGTAC ACCATCAAGT ACATCGGGGA ACTCACAGAC CTCCTTAACC GCGGCAGAGA GCCCAGAGCC CAGAGCGCGT GA
mNoggin	NP_032737	配列 番号10	MERCPSLGV LYLAVVVLGL RAAPAGGQHY LHIRPAPSDN LPLVDLIEHP DPFDPKEKD LNETLLRSL GGHYDPGFMA TSPPEDRPGG GGGPAGGAED LAELDQLLRQ RPSGAMPSEI KGLEFSEGLA QGKKQRLSK LRRKLQMWLW SQTFCPVLYA WNDLGSRFWP RYVKVGSFCS KRSCSVPEGM VCKPSKSVHL TVLRWRCQRR GGQRCGWIP QYPISECKC SC
hNoggin	EAW94528	配列 番号11	MERCPSLGV LYLAVVVLGL RATPAGGQHY LHIRPAPSDN LPLVDLIEHP DPFDPKEKD LNETLLRSL GGHYDPGFMA TSPPEDRPGG GGGAAGGAED LAELDQLLRQ RPSGAMPSEI KGLEFSEGLA QGKKQRLSK LRRKLQMWLW SQTFCPVLYA WNDLGSRFWP RYVKVGSFCS KRSCSVPEGM VCKPSKSVHL TVLRWRCQRR GGQRCGWIP QYPISECKC SC

10

20

30

40

【0154】

材料及び方法

細胞培養

未分化のマウスES細胞M s g n 1 R e p V (E 1 4 由来) は、ゼラチンコーティングしたディッシュ上でウシ胎児血清 (F B S ; PAAより) 1 5 %、ペニシリン、ストレプトマイシン、L - グルタミン 2 m M、非必須アミノ酸 0 . 1 m M、ピルビン酸ナトリウム 1 m M、 β -メルカプトエタノール 0 . 2 %、及び L I F 1 5 0 0 U / m L を補充された D M E M 中に維持した。ES細胞をマイトマイシン不活性化 M E F (フィーダー) と共培養した。未分化ヒトES細胞は、m a t r i g e l (BD Biosciences) でコーティングしたプレート上で m T e S R 培地 (STEMCELL Technologies) 中で培養した。培養物を、3 7 °C にて 5 % C O ₂ のインキュベーター内で維持した。

10

【0155】

ES細胞の分化

ES細胞をトリプシン処理し、因子及びDMSO (Sigma) を補充された血清ベース (F B S 1 5 %) 条件又は血清置換 (K S R 1 5 %、Invitrogen) 条件において、ゼラチンでコーティングしたフィーダーを含まない24ウェルプレートに様々な密度で直接播種した。組換えタンパク質を商業的に (R & D) 入手し、ストック溶液を製造業者の推奨に従って調製した。GSK-3 阻害剤 C H I R 9 9 0 2 1 及びI型BMP受容体阻害剤 D o r s o m o r p h i n をStemgentから購入し、製造業者の推奨に従って調製した。蛍光レオーター分析及び画像取得をZ e i s s A x i o v e r t s y s t e m 上にて行った。

20

【0156】

FACS分析及びセルソーティング

細胞培養物をトリプシン処理することによって解離し、YFP発現に従ってFACS c a l i b u r (BD Biosciences) 上でフローサイトメトリーにより分析した。データを M o F l o ソフトウェア (Beckman Coulter) 及び F l o w J o ソフトウェアにより更に分析した。

【0157】

DNAマイクロアレイ

マウスE9.5胚のPSMを顕微解剖し、以前に記載されているように加工し (K r o l e t a l , 2011)、調製した試料をA f f y m e t r i x G e n e C h i p a r r a y s 上で実行した。分化細胞培養物について、M s g n 1 - Y F P + 発現に基づくフローサイトメトリーによりiPAMを選別し、マイクロアレイ用に試料を調製した。実験を生物学的に3通り実施した。A f f y m e t r i x M i c r o a r r a y S u i t e (M A S) 5 . 0 を使用してデータセットを加工した。

30

【0158】

遺伝子サインリスト法

A f f y m e t r i x M o u s e G e n o m e 4 3 0 2 . 0 A r r a y s (G E O p l a t f o r m i d G P L 1 2 6 1) に対応する、GEOに寄託された野生型マウス組織の全マイクロアレイを使用して遺伝子発現参照を構築した。各マイクロアレイについて平均値を算出することにより正規化を行った。全マイクロアレイに亘るこれらの平均値の分布に対する中央値を決定した。その後、この中央値 (median) を各マイクロアレイに対する各値のスケール因子として使用した。一旦全てのマイクロアレイを正規化すると、各プローブセットに対する中央発現値 (median expression value) は参照値として規定される。1つの実験条件に特異的な遺伝子サインリストを、参照データセットのような対応するマイクロアレイデータを正規化することによって作製した。正規化発現値 (normalized expression value) が対応する参照値より10倍高いプローブセットをその条件のサイン遺伝子とした。

40

【0159】

定量的RT-PCR

T r i z o l (Invitrogen) を使用するか、又はR n a e a s y p l u s m i n i

50

- k i t (Qiagen) により E S 細胞培養物から全 R N A を抽出した。Q u a n t i F a s t S Y B R G r e e n R T - P C R K i t (Qiagen)、適切なプライマーを使用し、L i g h t C y c l e r 4 8 0 I I (Roche) を実行して、R T - P C R を全 R N A 5 n g に対して実施した。G A P D H を内部コントロールとして使用した。

【0160】

分化培養物のフェノタイピング

4 にて一晚、P F A 4 % により細胞培養物を固定した。T r i s 緩衝生理食塩水 (T B S) 中にウシ胎児血清 1 % 及び T r i t o n 0 . 1 % で構成されるブロッッキング溶液を用いて、細胞を 2 0 分間インキュベートした。一次抗体インキュベーションを 4 にて一晚実施し、抗体使用希釈は以下の通りであった：抗 G F P (Abcam) は 1 : 1 0 0 0、抗 D e s m i n (DSHB) は 1 : 1 0 0、抗 C D 3 1 (BD Pharmingen) は 1 : 1 0 0。T B S で洗浄後、細胞を A l e x a F l u o r 4 8 8 標識二次抗体 (Molecular probes) と 1 : 5 0 0 にて 3 0 分間インキュベートし、ヘキストにより対比染色を行った。アルシアンブルー染色を標準的なプロトコルに従って行った。

10

【0161】

細胞の調製及び損傷した前脛骨筋への移植

M s g n 1 R e p V E S 細胞培養物を分化の 4 日後にトリプシン処理し、F A C S A r i a 又は M o f l o w A s t r i o s (B D) を使用して Y F P 蛍光発光に基づいて i P A M を選別した。C A G - G F P レンチウイルス (2 0 ~ 3 0 の M O I) を用いて一晚形質導入を行うことによって不可逆的に i P A M を標識化した。融合していないウイルス粒子を除去するため、細胞を数回洗浄し、移植のための調製前に培地中で 1 時間再度インキュベートした。移植筋を 1 か月後に採取し、免疫組織化学用に加工した。解剖された前脛骨筋を、以前に記載されているように (B. Gayraud-Morel B. et al., 2012) 凍結切片用 (1 2 μ m) に調製した。この研究において使用された抗体は、抗ジストロフィン (Sigma)、抗ラミニン (Sigma)、ミオゲニン (Dako)、P a x 7 (DSHB) 及び G F P (Abcam) であった。ミオシンアイソフォームに対する抗体は S. J. Mathew Dev 138, 371 (2011) に記載されている。組織切片を一次抗体と共に一晚インキュベートした。A l e x a F l u o r (Molecular probes) で標識された二次抗体を 1 : 5 0 0 で使用した。Z e i s s A x i o o b s e r v e r 上で画像化を行い、A d o b e p h o t o s h o p を用いて画像を加工した。

20

30

【0162】

結果

実施例 1 : W n t シグナル伝達経路の活性化剤の使用

i n - v i t r o での人工沿軸中胚葉前駆 (i P A M) 細胞の産生

本発明者らは、当初、E S 細胞由来の沿軸中胚葉系統の分化を促進する主要な分子プレーヤーの同定に焦点を絞っていた。最初に、本発明者らは、ウシ胎児血清 1 5 % (F B S 1 5 %) を補充された D M E M 系培地において、胚様体を形成した後にマウス E S 細胞が分化する間、沿軸中胚葉誘導の経時的変化を調査した。沿軸中胚葉前駆細胞における分化は、P C R によって検出される B r a c h y u r y / T マーカー、T b x 6 マーカー、及び M s g n 1 マーカーの活性化を特徴とした。培養 1 日目から 4 日目の本発明者らのデータは、幾つかの分化細胞は未分節中胚葉様段階にあることを示唆している。

40

【0163】

M s g n 1 R e p V 受容体 E S 株の特性評価

中胚葉アイデンティティーの獲得後の骨格筋分化の第 1 段階を表す、沿軸中胚葉分化 (即ち、未分節運命 (presomitic fate)) の第 1 期への E S 細胞の分化を追跡するため、本発明者らは、沿軸中胚葉前駆体において特異的に発現する蛍光性レポーターを保持するトランスジェニックマウス E S 細胞株を作製した。本発明者らは、V e n u s (修飾 Y F P) の発現を制御する未分節中胚葉に特異的な遺伝子であるマウス M s g n 1 由来のプロモーターを使用した。その後、完全にトランスジェニック E S 細胞に由来する胚を作製するために 4 倍体凝集法を使用して、トランスジェニック M s g n 1 R e p V (M e s o g

50

en1 Reporter Venus) マウス ES 細胞株を検証した。予想通り、トランスジェニックマウス胚は、蛍光標識された沿軸中胚葉組織を呈し、したがって、トランスジェニック ES 細胞株における Venus 発現の組織特異性が検証された。

【0164】

R - spondin の同定

沿軸中胚葉前駆体の分化条件を最適化するため、本発明者らは、ES 細胞に対して様々なシグナル伝達経路に干渉する候補増殖因子及び薬物を試験する手作業のスクリーニングアッセイを開発した。ゼラチン (0.1%) でコーティングされた 24 ウェルプレートに *Ms gn1 Rep V* レポーター細胞を所定の密度で播種した。2 種の基本培養培地を選択した：ウシ胎児血清 15% (FBS、高血清) を含有する DMEM 系培地、及び KSR 15% (Invitrogen/Gibco) を含有する限定無血清培地。分化の 0 日目において、これらの基本培地を候補因子により補填した。コントロール条件及び実験条件を並行して培養した。2 日目又は 3 日目に培地を交換し、細胞を 3 日間から 4 日間に亘って分化させた。分化の 3 日目及び 4 日目に細胞培養物を目視で分析し、更に YFP + 集団の定量化のためフローサイトメトリーによって分析した。

10

【0165】

分化の 4 日後、FBS 15% におけるコントロールの分化は、低く変化しやすい YFP + 細胞の誘導を生じ (典型的には培養物の 1% ~ 15%)、限定培地 KSR 15% (Invitrogen) における分化は更に低い誘導を生じた (典型的には 1%)。試験された一連の候補物質のうち、本発明者らは、分泌された R - spondin 3 タンパク質が YFP + 細胞の誘導を劇的に増加することが可能であると同定した。本発明者らのアッセイにおいて、10 ng/mL の R - spondin 3 は、FBS 系培地及び KSR 系培地の両方において YFP + 細胞の誘導を 70% まで顕著に増加するのに十分であった (図 1、2 及び 7)。R - spondin 3 反応は 30 ng/mL ~ 100 ng/mL の間で飽和した。0 日目において、R - spondin 3 補填分化培地中の YFP + 集団は細胞の 1% 未満であったのに対し、4 日目においては YFP + 集団は細胞の 50% を超え、70% までを示し得た (図 2B)。ヒト ES 細胞において、沿軸中胚葉前駆体マーカーである *Brachyury*、*PDGFRA*、*Tbx6* 及び *Ms gn1* の誘導は、*huES1* を R - spondin 3 で処理する場合、FBS 15% を含有する培地における培養の 3 日 ~ 10 日後に観察される (図 10)。

20

30

【0166】

沿軸中胚葉前駆体の特性評価

in vitro における ES 細胞の分化に際する沿軸中胚葉前駆細胞運命の誘導を確認するため、本発明者らは、R - spondin 3 の存在下での分化の 4 日後に YFP + 細胞集団を選別し (図 3A)、主要な沿軸中胚葉マーカーである *Ms gn1* 及び *Tbx6* について qRT - PCR により YFP - 細胞に対する YFP + 細胞を分析した (図 3B)。本発明者らは、YFP + 集団は *Ms gn1* 内因性遺伝子、並びに *Tbx6* を強く発現していることを確認し、これは本発明者らが *in vitro* において沿軸中胚葉前駆体 (*iPAM*) を作製し得ることを立証している。

40

【0167】

R - spondin ファミリー及び Wnt シグナル伝達

次に、本発明者らは、R - spondin ファミリーの他のメンバーが沿軸中胚葉前駆体 *iPAM* 細胞 (*Ms gn1* - YFP + 沿軸中胚葉前駆体) を誘導し得るかどうかを問うた。ES 細胞を、FBS 15% を補充された組換え R - spondin タンパク質 (R - spondin 1 ~ 4) を含有する培地中で培養し、4 日間に亘って分化させた (図 4B)。このファミリーの 2 つのメンバー、R - spondin 2 及び R - spondin 3 が同等の活性を呈し、YFP + 細胞数を顕著に増加した。R - spondin ファミリータンパク質の活性は、古典的 Wnt / ベータカテニンシグナル伝達と関連し (非特許文献 14; 非特許文献 15)、より最近では、Wnt / PCP シグナル伝達と関連している (非特許文献 16)。本発明者らは、分泌された Dkk1 阻害剤を使用して、R - spon

50

d i n 依存性分化に対する古典的 W n t シグナル伝達の阻害効果を分析した (図 4 A) 。細胞外 W n t アンタゴニストである D k k 1 による培地の補填は、Y F P + 誘導の急激な減少を生じる。さらに、F B S 含有培地に D k k 1 を添加すると、R - s p o n d i n 3 の効果が遮断され、R - s p o n d i n 3 効果は、W n t 古典的経路によって媒介されていることを示唆している。また、本発明者らは、R - s p o n d i n 3、及び D k k 1、又は W n t シグナル経路を活性化し得る化合物 L i C l によって処理された、又は処理されていない E S 細胞において形質移入された古典的 W n t シグナル伝達に反応するプロモーター (B A T - l u c) により制御されるプラスミド由来のルシフェラーゼ発現を分析した (図 4 C) 。ルシフェラーゼは、R - s p o n d i n 3 処理によって強く活性化され、このような状況において古典的 W n t 経路を活性化することを示唆している。

10

【 0 1 6 8 】

R - s p o n d i n 3 効果が W n t 古典的経路によって媒介されているかどうかを更に試験するため、本発明者らは、十分に説明されている G S K - 3 阻害剤である C H I R 9 9 0 2 1 (Ring et al., 2003) の効果を試験した。図 5 は、4 日後において、C H I R 9 9 0 2 1 が R s p o - 3 と同様に Y F P + 細胞の誘導に効果的であることを示し、R - s p o n d i n 3 効果が古典的 W n t 経路の活性化によって媒介されていることを示唆している。

【 0 1 6 9 】

ジメチルスルホキシド (D M S O) は、幾つかの細胞種、特に P 1 9 胚性癌腫 (E C) 細胞株由来の中胚葉の分化を促進することが示されている (McBurney et al., 1982 ; Ske r janc, 1999) 。細胞培養物中の D M S O の正確な作用機構は知られておらず、D M S O が原形質膜の特性を修飾することによって分化培地中に存在する細胞外シグナルに対して細胞をより反応性とする仮定されている。F B S 含有培地への 0 . 5 % の D S M O の添加により、培養 4 日後における Y F P + 細胞の増加が生じるが (図 5、6 及び 7)、この増加は R - s p o n d i n 2 若しくは R - s p o n d i n 3、又はその両方の添加に起因する増加と比較して控えめである。興味深いことに、R - s p o n d i n 及び D M S O の添加は相乗的に沿軸中胚葉前駆体の分化を増強する (図 5、6 及び 7) 。D M S O 及び R - s p o n d i n 2 及び / 又は R - s p o n d i n 3 の両方を併用した場合の沿軸中胚葉分化に最適な条件を観察した (図 5、6 及び 7) 。重要なことは、この効果は、無血清の限定 K S R 系培地においても見られたことである (図 7 B) 。

20

30

【 0 1 7 0 】

沿軸中胚葉前駆体の分化可能性

本発明者らは、次に、i P A M 細胞集団の分化可能性を探索した。i n v i v o において、沿軸中胚葉前駆細胞は、骨格筋、脊椎組織 (軟骨、骨)、背側真皮、内皮、及び脂肪組織等の他の組織になるよう運命づけられている。

【 0 1 7 1 】

それゆえ、本発明者らは、最初に i P A M 細胞を作製し、その後、1 5 % F B S 培地中でそれらを更に分化させることを目的とする連続的な分化プロトコルを実施するか、又は様々な記載されている分化プロトコル (以下を参照)、特に「筋形成」培地及び「軟骨形成」培地を適用することによって、実施した。

40

【 0 1 7 2 】

例えば、0 日目から 4 日目の間、E S 細胞を最適化された分化条件 (即ち、F B S 1 5 % 基本培地中に R - s p o n d i n 3 1 0 n g / m L、D M S O 0 . 5 %) に暴露した。4 日目に培養培地を交換し、3 日毎に培地交換をしながら、細胞を 1 8 日目まで特定の分化培地に暴露した。1 8 日目において、細胞培養物を固定し、組織特異的な組織化学的染色又は免疫蛍光法により分析した (図 8) 。最適化された分化条件下において、細胞培養物は、軟骨 (アルシアンブルー陽性小結節)、筋肉 (デスミン陽性線維) 及び内皮 (C D 3 1 / P E C A M 1) に対して陽性であった。或いは、分化条件 (即ち、F B S 1 5 % 基本培地中に R s p o 3 1 0 n g / m L、D M S O 0 . 5 %) において 4 日後、F B S 1 5 %、又は F B S 1 %、若しくはソニックヘッジホッグ (S h h) 及びレチノイン酸

50

添加 FBS 1% (F1ShhRA)、若しくは Shh、Noggin 及び LiCl 添加 FBS 1% (F1SNLi) に細胞を移した。次の日に細胞を回収し、真皮マーカー Derm1 及び筋肉マーカー Myf5 について qRT-PCR により分析した (図9)。これらのマーカーの顕著な活性化が観察され、iPAM 細胞の真皮系統及び筋肉系統への分化がそれぞれ示された。

【0173】

筋形成プロトコル：

代替的に、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、3 日間に亘って BMP4、アクチビン A 及び IGF-1 を補完された SFO3 培地を使用する二次元培養の後、LiCl 及び Shh を補完された SFO3 培地中で 3 日間に亘り、筋肉細胞へと分化させることができる。

10

【0174】

人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、ウシ胎児血清 (FCS) 10%、ウマ血清 5% (Sigma)、2-メルカプトエタノール 0.1 mM、非必須アミノ酸 0.1 mM、及びペニシリン/ストレプトマイシン 50 ug/ml を補充された DMEM で構成される分化培地中において、800 細胞/20 µL で 3 日間に亘って懸滴培養することができる。3 日後、培地を交換し、細胞凝集物を低吸着プレートに移した。6 日目において、細胞を蒔き、Matrigel (BD Bioscience、ベッドフォード、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国) でコーティングしたプレート上の分化培地中で培養した。筋形成分化は、FBS をコンフルエント細胞から除去し、インスリン 10 ug/ml、トランスフェリン 5 ug/ml、及びウマ血清 2% を添加することにより達成される。

20

【0175】

また、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、EGF、インスリン、フェチュイン、デキサメタゾン、及び bFGF (100 ng/ml) を補完された骨格筋細胞培地 (Lonza、Chemicon) 中で 3 週間にわたって培養することもできる。

【0176】

骨形成プロトコル：

骨格系統については、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、ヒト又はマウス組換え BMP4 200 ng/ml、又はレチノイン酸 1 µM 及び塩化リチウム 10 mM の組合せに暴露する。或いは、細胞を、1 ウェル (24 ウェルプレート) 当たり $1 \sim 3 \times 10^3$ の密度でゼラチンコーティングしたプレートに蒔き、骨特異的マーカーを発現する細胞又はアルシアンブルー陽性細胞外マトリクスを分泌する細胞を観察するため、骨分化培地 (DMEM、FBS 10%、1-グルタミン 2 mM、1x ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S)、デキサメタゾン 0.1 µM、アスコルビン酸 2 リン酸 50 µM、-グリセロリン酸 10 mM、BMP4 10 ng/ml) 中で 28 日間培養する。分化した骨格細胞系統を、アルシアンブルー又はアリザリンレッドを含む骨及び軟骨の細胞外マトリクス成分に対する特異的染色を使用して、並びに軟骨細胞特異的抗体及び/又は骨細胞特異的抗体を使用する免疫蛍光法により同定する。

30

【0177】

また、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、DMEM、FBS 10%、L-グルタミン 2 mM、1x P/S、デキサメタゾン 0.1 mM、アスコルビン酸 2 リン酸 50 mM、ベータ-グリセロリン酸 10 mM、及び BMP4 10 ng/ml で構成される以下の分化培地を使用して、ビタミン D3 と共に 20 日間に亘り、3 日毎の培地交換をしながら、骨系統へと分化させることもできる。骨形成は、当該技術分野においてよく知られている通り、分化した骨を赤く染色するアリザリンレッドを用いて分化している培養物を染色することによって確認することができる。また、カルシウムの細胞外蓄積は、フォンコッパ染色によって可視化することができる。或いは、分化している細胞を溶解し、BBTP 試薬を使用して ALP 活性についてアッセイすることもできる。或いは、分化している細胞を、例えば、Osterix (Ox) 及び Cbfa1/Runx2、アルカリホスファターゼ、I 型コラーゲン、オステオカルシン及びオステオポンチンといった骨芽細胞系

40

50

統マーカー発現について分析することができる。

【0178】

軟骨形成プロトコル：

軟骨形成細胞分化について、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、1 ウェル (24 ウェルプレート) 当たり 8×10^4 の密度で蒔き、軟骨分化培地 (MEM、FBS 10 %、L - グルタミン 2 mM、1 × P / S、デキサメタゾン 0 . 1 μM、アスコルビン酸 2 リン酸 170 μM) 中で37 °C のインキュベーターにおいて30分間培養する。次に、等量の TGFβ3 10 ng / mL を含む軟骨細胞分化培地をウェルに添加する。1週間後、Bmp2 10 ng / mL を補充された軟骨分化培地で培地を置換する。21日後、細胞外マトリクスを分泌する軟骨小結節を観察することができる。また、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、アルファMEM、FBS 10 %、L - グルタミン 2 mM、1 × P / S、デキサメタゾン 0 . 1 mM、及びアスコルビン酸 2 リン酸 170 mM に基づく分化培地、又はデキサメタゾン 0 . 1 mM、アスコルビン酸 0 . 17 mM、ビルビン酸ナトリウム 1 . 0 mM、L - プロリン 0 . 35 mM、インスリン - トランスフェリンナトリウム 1 %、ウシ血清アルブミン 1 . 25 mg / mL、リノール酸 5 . 33 μg / mL、及びトランスフォーミング増殖因子ベータ 0 . 01 μg / mL) 並びに TGFβ3 又は BMP2 を補充された DMEM を使用して、軟骨細胞へと分化させることもできる。細胞を、3日毎に培地交換をしながら数週間培養する。また、分化を、FBS 10 % 及び抗生物質を含有し、組換えヒト骨形成タンパク質 - 2 (BMP - 2) 100 ng / mL 及びアスコルビン酸 50 mg を補充された DMEM 系培地中において、アルギン酸ビーズ等の 3D 足場上に高密度で行うこともできる。ムコ糖タンパク質 (Muco-glycoproteins) を青く染色することが当該技術分野においてよく知られている、分化している培養物のアルシアンブルー染色によって、軟骨形成を確認することができる。或いは、サフラニン O 染色を行うことができる。

【0179】

真皮線維芽細胞プロトコル：

人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を、bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) 又は増殖因子の Wnt ファミリーのメンバー等の線維芽細胞増殖因子を含有する培地中でコラーゲンの足場上でそれらを培養することによって真皮線維芽細胞へと分化させることができる。

【0180】

次に、R - spondin もまたヒト ES 細胞分化から沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を誘導することを確認するため、HUES 1 細胞を単一細胞として蒔き、FBS 15 % を含有する培地中で、Rspo3 と共に、又は Rspo3 を含まずに分化させた。沿軸中胚葉前駆体マーカー発現に対する qRT - PCR 時間経過分析を行った (図 10)。R - spondin 3 の存在下における hES 細胞分化の間の Ms gn 1 及び Tbx 6 の強い活性化は、iPAM 細胞が hES 細胞から分化され得ることを立証している。

【0181】

実施例 2：Wnt シグナル伝達経路の活性化剤及び BMP シグナル伝達経路の阻害剤の使用

Ms gn 1 - YFP + 細胞集団の特性評価

R - spondin タンパク質及び DMSO を使用することにより、本発明者らは、1 つの工程で 70 % の Ms gn 1 - YFP + 細胞を産生することができる (図 2B)。Ms gn 1 - YFP + のトランスクリプトームをそれらの in vivo 対応物 (即ち、未分節中胚葉、PSM) と直接比較するため、本発明者らは、マイクロアレイを使用して、徐々に成熟した分化段階を表す、連続したマウスフラグメントの全体的なトランスクリプトームプロファイリングを作製した (データは非図示)。PSM フラグメントは、下肢芽レベルから筋形成プログラムが最初に活性化される体節領域にまで及んだ。このマイクロアレイシリーズに基づいて、本発明者らは、下肢芽 (エピブラスト) から未分節中胚葉及び体節段階への細胞の進行性の成熟段階を規定するサイン遺伝子セットを特定すること

ができた。並行して、本発明者らは、R - s p o n d i n 3 及び D M S O (R D) の存在下で E S 細胞を分化し、M s g n 1 - Y F P + 細胞集団を選別して、この集団の分化3日目及び4日目のマイクロアレイをそれぞれ作製した。全体的なトランスクリプトーム及びサイン遺伝子セットを、i n v i v o P S M 及び i n v i t r o 分化 M s g n 1 - Y F P + 細胞間で比較した(データは非図示)。

【0182】

本発明者らは、M s g n 1 - Y F P + 細胞が、M s g n 1 及び T b x 6 等の Q - P C R によって既に検証されている多数の主要な沿軸中胚葉マーカーを発現することを確認している(図3B)。本発明者らは、本来の P M S 細胞とは対照的に、M s g n 1 - Y F P + 集団は、より腹側/外側中胚葉誘導体のサインである心臓マーカー及び血管新生マーカーも活性化することに気付いた。また、本発明者らは、T G F / B M P シグナル伝達は、M s g n 1 - Y F P + において上方制御される傾向にあることを見出した。予想外に、本発明者らは、i n v i v o において P M S では非常に低いレベルでしか B M P 4 が検出されるに過ぎないのに対し、M s g n 1 - Y F P + 細胞集団は B M P 4 を顕著なレベルで発現していることを見出した。これは、B M P 4 が、側板運命を犠牲にして沿軸中胚葉運命を獲得する細胞を防止することが示されているため、問題であった(非特許文献27、非特許文献28)。

10

【0183】

B M P 4 シグナル伝達を相殺する N o g g i n

この B M P 4 活性を相殺するため、本発明者らは、B M P 4 を阻害することが知られている組換え N o g g i n (N o g) タンパク質の分化培地への添加の効果を試験した。本発明者らは、分化の0日目又は1日目からの N o g g i n の添加により、N o g g i n を含まない分化培地中で培養された細胞と比較して、M s g n 1 - Y F P + 細胞は効果的に B M P 4 発現を抑制することを見出した。さらに、本発明者らは、N o g g i n を添加する最適な濃度及び最適なタイミングの両方を特定した。N o g g i n は M s g n 1 - Y F P + 人工沿軸中胚葉前駆(i P A M) 細胞の総数(産生効率)を変化せず、培養物中の総細胞数も変化しないが、むしろ M s g n 1 - Y F P + の成熟(成熟効率)を変化する。M s g n 1 - Y F P + 細胞に対する N o g g i n の影響をより詳しく特性評価するため、本発明者らは、分化の3日目と4日目に M s g n 1 - Y F P + 人工沿軸中胚葉前駆体(i P A M) 集団に対してマイクロアレイを実施した(図11、条件 R D N 及び条件 R D を比較)。

20

30

【0184】

本発明者らは、培地への N o g g i n の添加が M s g n 1 - Y F P + 細胞における B M P 4 発現を抑制し、T b x 6、P c d h 8、P a x 3、F o x c 1、R a l d h 2 及び R i p p l y 2 を含む幾つかの P S M 特異的マーカーの上方制御をもたらすことを示す(図12B及びデータは非図示)。

【0185】

B M P 阻害剤及び B M P シグナル伝達

本発明者らは、マウス P S M マイクロアレイシリーズにおける B M P 阻害剤である F o l l i s t a t i n (F s t) 及び C e r b e r u s (C e r 1) の強い上方制御を検出した。また C h o r d i n、N o g g i n、及び G r e m l i n 1 等の他の B M P 阻害剤は、発生の間近接する組織によって発現されることが知られている(非特許文献25; 非特許文献26及び Scott I C et al, 2000)。これは、i n v i v o において P S M が適切に成熟するために B M P 阻害を必要とし、i n v i t r o においても B M P 阻害が i P A M 細胞の適切な成熟に必要であることを示唆している。

40

【0186】

本発明者らは、組換えタンパク質 N o g g i n (N o g)、C h o r d i n (C h d)、C h o r d i n 様 1 (C h d 1 1)、F o l l i s t a t i n (F s t)、F o l l i s t a t i n 様 1 (F s t 1 1) を含む一連の B M P 阻害剤、C e r b e r u s 1 (C e r b e r u s) 及び G r e m l i n 1 (G r e m 1) を含む D a n ファミリータンパク質

50

を、様々な濃度範囲 (10 ng/mL ~ 200 ng/mL)、及び様々な時間枠 (0日目 ~ 4日目、1日目 ~ 4日目) においてスクリーニングし、また、BMP4 及びPSMマーカであるTbx6の発現に対する影響を分析した。さらに、本発明者らは、様々な濃度 (0.1 μM ~ 1 μM) 及び様々な時間枠 (0日目 ~ 4日目、1日目 ~ 4日目) においてI型BMP受容体の特異的阻害剤である、化合物Dorsomorphin (化合物C) を試験した。BMP阻害剤の添加は、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞の数又は培養物中の総細胞数に影響を与えない (データは非図示)。試験された一連の候補物質のうち、本発明者らは、特にNoggin (Nog)、Follistatin (Fst) 及びDorsomorphinが、BMP4を相殺し、Msgn1発現及びTbx6発現を活性化することによって人工沿軸中胚葉前駆体 (iPAM) 成熟を促進することを同定した (データは非図示)。

【0187】

in vitroで分化したMsgn1RepV細胞のPSMアイデンティティを観測するため、本発明者らは、R-spondin3及びNogginの存在下での分化3日後及び4日後の両方においてFACSによってそれらを精製した。qRT-PCR分析により、選別された集団は、PSM細胞に対して予測されたように、Msgn1及びTbx6を強く発現することが確認された (図3B)。より系統的な分析のため、遺伝子サインを上述の両方の時間点に対して作製した。3日目の分化ES遺伝子サインとPSM転写領域のそれを比較すると、分化ES細胞はT、Rspo3及びFgf8を含む多数のPSM前方部の遺伝子を発現することが明らかとなった (図12A及びB)。それにより、Msgn1レポーターを発現する細胞は、in vivoでのそれらの対応物に近い分子類似性を有している。

【0188】

その後、本発明者らは、in vitroにおいて成熟過程を更に遂行できるかどうかを問うた。印象的なことは、3日目ではなく4日目の分化ES細胞により、Mesp2、Ripply2又はFoxc1等のPSM前方部に特異的な遺伝子を活性化することが見出され、これらの細胞が、PSM前方部のアイデンティティを獲得したことを示している (図12B)。特に、これらの4日目の細胞は、Pax3遺伝子を顕著に上方制御した。Pax3は、筋形成システムの分化を調節し、近年、ES細胞におけるPax3の過剰発現は筋肉を誘導することが示された (Darabi, R et al, 2008)。これにより、R-spondin3及びNoggin処理によって、遺伝子操作を行うことなく、徐々に未分化ES細胞を真のPax3陽性筋前駆体に形質転換し得ることが示唆された。

【0189】

結論として、これらの結果は、人工沿軸中胚葉前駆 (iPAM) 細胞を取得するため、R-spondin3のようなWntシグナル伝達経路の活性化剤と、Nogginのような骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達経路の阻害剤との使用可能性及び相乗効果を立証している。

【0190】

実施例3: in vivoにおける筋形成システムの作製

これらの前駆体の最終分化を更に制御するため、本発明者らは、次に、in vivoアプローチを採用した。R-spondin3及びNogginを含有する培地での分化4日後に得られたPax3陽性細胞を、GF-P発現レンチウイルスにより形質導入し、恒久的に標識した。その後、蛇毒心臓毒の筋肉内投与によって損傷された免疫無防備状態のRag2-/-; c-/-成体マウス (Gayraud-Morel B. et al., 2012) の前脛骨筋にそれらを注入した。1ヶ月後の移植された筋肉の検査より、移植GF-P発現細胞は、ラミニン及びジストロフィンを発現する筋線維により満たされた広い面積を再構成したことが示された (n = 3; 図13A)。分化マーカーであるミオゲニンを高レベルで発現した線維は、直径が小さく、成体の筋肉のようには整列されておらず、胚性一次線維 (embryonic primary fibers) に対応している可能性があることを示唆している (図13B) (Gayraud-Morel B. et al., 2009)。これは、上記線維がミオシン重鎖の胚性アイソフォー

ム及び周産期アイソフォーム発現することを示すことにより確認された(図13C)。注目すべきことは、筋衛星細胞特異的マーカーであるPax7を発現する重要な細胞集団が、生着した再生領域において観察され、これは分化ES細胞が筋細胞の前駆体プール(progenitor pool)を産生することもできることを示唆している(図13B)。このようにして、損傷した筋肉にin vivoで移植された場合、in vitroで得られたPax3陽性細胞は筋形成システムへのそれらの分化を継続することができる。

【0191】

参考文献：

本出願全体に亘り、様々な参考文献により本発明が属する現行の技術水準が記載される。これらの参考文献の開示は、引用することにより本開示の一部をなすものとする。

10

【表3】

Barberi, T., Bradbury, M., Dincer, Z., Panagiotakos, G., Socci, N. D. and Studer, L. (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 13, 642-8.

Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/{beta}-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11452-7.

20

Chal, J. and Pourquie, O. (2009). Patterning and Differentiation of the Vertebrate Spine. In *The Skeletal System*, (ed. O. Pourquie), pp. 41-116: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6, 386-91.

Chapman, D. L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L. M. and Papaioannou, V. E. (1996). Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol* 180, 534-42.

30

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-80.

Cohen, P. and Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3, 479-87.

Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, Deng DY, Sachidanandan C, Bloch KD, Peterson RT. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Aug 1;18(15):4388-92. Epub 2008 Jun 27.

40

Darabi, R., Gehlbach, K., Bachoo, R. M., Kamath, S., Osawa, M., Kamm, K. E., Kyba, M. and Perlingeiro, R. C. (2008). Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 14, 134-43.

Darabi, R., Santos, F. N., Filareto, A., Pan, W., Koene, R., Rudnicki, M. A., Kyba, M. and Perlingeiro, R. C. (2011). Assessment of the Myogenic Stem Cell Compartment

Following Transplantation of Pax3/Pax7-Induced Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors. Stem Cells.

de Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B. K., Li, V. S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P. J., van de Wetering, M. et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*.

Dekel, I., Magal, Y., Pearson-White, S., Emerson, C. P. and Shani, M. (1992). Conditional conversion of ES cells to skeletal muscle by an exogenous MyoD1 gene. *New Biol* 4, 217-24. 10

Derynck Rik, 2008. The TGF- β Family. CSHL. Kōhei Miyazono Editors).

Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R. et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-21.

Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W. and Isacson, O. (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5, 131-43. 20

Fukada, S., Higuchi, S., Segawa, M., Koda, K., Yamamoto, Y., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Uezumi, A., Imamura, M., Miyagoe-Suzuki, Y. et al. (2004). Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 296, 245-55.

Gayraud-Morel B. et al., *J Cell Sci* 125, 1738 (Apr 1, 2012).

Gayraud-Morel B., F. Chretien, S. Tajbakhsh, *Regen Med* 4, 293 (Mar, 2009). 30

Gayraud-Morel B. et al. *J Cell Sci* 125, 1738 (Apr 1, 2012).

Han, X. H., Jin, Y. R., Seto, M. and Yoon, J. K. (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* 286, 10649-59.

Hankenson, K. D., Sweetwyne, M. T., Shitaye, H. and Posey, K. L. (2010). Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 8, 68-76. 40

Hirsinger, E., Jouve, C., Dubrulle, J. and Pourquie, O. (2000). Somite formation and patterning. *Int Rev Cytol* 198, 1-65.

Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Rütther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19838-45.

Jin, Y. R., Turcotte, T. J., Crocker, A. L., Han, X. H. and Yoon, J. K. (2011). The canonical Wnt signaling activator, R-spondin2, regulates craniofacial patterning and morphogenesis within the branchial arch through ectodermal-mesenchymal interaction. *Dev Biol* 352, 1-13.

Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C. and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 7, 525-34.

10

Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H. G. and Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* 135, 3655-64.

Kennedy, K. A., Porter, T., Mehta, V., Ryan, S. D., Price, F., Peshdary, V., Karamboulas, C., Savage, J., Drysdale, T. A., Li, S. C. et al. (2009). Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* 7, 67.

20

Kim, K. A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M. A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N. et al. (2008). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 19, 2588-96.

Krol AJ, Roellig D, Dequéant ML, Tassy O, Glynn E, Hattem G, Mushegian A, Oates AC, Pourquié O. Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. *lopment*. 2011 Jul;138(13):2783-92.

Loser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A. M. and Kurtz, A. (2010). Human embryonic stem cell lines and their use in international research. *Stem Cells* 28, 240-6.

30

McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K. and Anderson, P. J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299, 165-7.

McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev*. 1998 May 15;12(10):1438-52.

Metallo, C. M., Mohr, J. C., Detzel, C. J., de Pablo, J. J., Van Wie, B. J. and Palecek, S. P. (2007). Engineering the stem cell microenvironment. *Biotechnol Prog* 23, 18-23.

40

Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., Fukada, S., Yamamoto, H., Yamanaka, S., Nakahata, T. et al. (2010). Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 24, 2245-53.

Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B., 3rd and Kelley, M. W. (2006). Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 29, 363-86.

Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. and Yoon, J. K. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem* 281, 13247-57.

Nam, J. S., Turcotte, T. J. and Yoon, J. K. (2007). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr Patterns* 7, 306-12.

10

Ohkawara, B., Glinka, A. and Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Dev Cell* 20, 303-14.

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. and Daley, G. Q. (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-86.

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. and Daley, G. Q. (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-6.

20

Pourquié O, Fan CM, Coltey M, Hirsinger E, Watanabe Y, Bréant C, Francis-West P, Brickell P, Tessier-Lavigne M, Le Douarin NM. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):461-71.

Prelle, K., Wobus, A. M., Krebs, O., Blum, W. F. and Wolf, E. (2000). Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 631-8.

30

Reshef R, Maroto M, Lassar AB. Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev*. 1998 Feb 1;12(3):290-303.

Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., Ma, S. T., Reeder, J. W., Samuels, I., Slabiak, T. et al. (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* 52, 588-95.

40

Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J. and Wobus, A. M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164, 87-101.

Sakurai, H., Inami, Y., Tamamura, Y., Yoshikai, T., Sehara-Fujisawa, A. and Isobe, K. (2009). Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically defined medium. *Stem Cell Res* 3, 157-69.

Sakurai, H., Okawa, Y., Inami, Y., Nishio, N. and Isobe, K. (2008). Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* 26, 1865-73.

Sakurai H, Era T, Jakt LM, Okada M, Nakai S, Nishikawa S, Nishikawa S. In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells*. 2006 Mar;24(3):575-86. Epub 2005 Dec 9.

10

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.

Schlessinger, K., Hall, A. and Tolwinski, N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 23, 265-77.

Scott IC, Steiglitiz BM, Clark TG, Pappano WN, Greenspan DS. Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain. *Dev Dyn*. 2000 Apr;217(4):449-56.

20

Shani, M., Faerman, A., Emerson, C. P., Pearson-White, S., Dekel, I. and Magal, Y. (1992). The consequences of a constitutive expression of MyoD1 in ES cells and mouse embryos. *Symp Soc Exp Biol* 46, 19-36.

Skerjanc, I. S. (1999). Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 9, 139-43.

30

Stafford DA, Brunet LJ, Khokha MK, Economides AN, Harland RM. Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development. *Development*. 2011 Mar;138(5):1005-14.

Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D. and De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136-48.

40

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76.

Takebe A, Era T, Okada M, Martin Jakt L, Kuroda Y, Nishikawa S. Microarray analysis of PDGFR alpha+ populations in ES cell differentiation culture identifies genes involved in differentiation of mesoderm and mesenchyme including ARID3b that is essential for development of embryonic mesenchymal cells. *Dev Biol.* 2006 May 1;293(1):25-37. Epub 2006 Mar 13.

Tonegawa A, Funayama N, Ueno N, Takahashi Y. Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development.* 1997 May;124(10):1975-84.

10

Wijgerde M, Karp S, McMahon J, McMahon AP. Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. *Dev Biol.* 2005 Oct 1;286(1):149-57.

Wittler, L., Shin, E. H., Grote, P., Kispert, A., Beckers, A., Gossler, A., Werber, M. and Herrmann, B. G. (2007). Expression of *Msgn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and *Tbx6*. *EMBO Rep* 8, 784-9.

20

Wu, D. and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35, 161-8.

Yoon, J. K. and Wold, B. (2000). The bHLH regulator pMesogenin1 is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm. *Genes Dev* 14, 3204-14.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-20.

Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol.* 2008 Jan;4(1):33-41. Epub 2007 Nov 18.

30

【 図 1 】

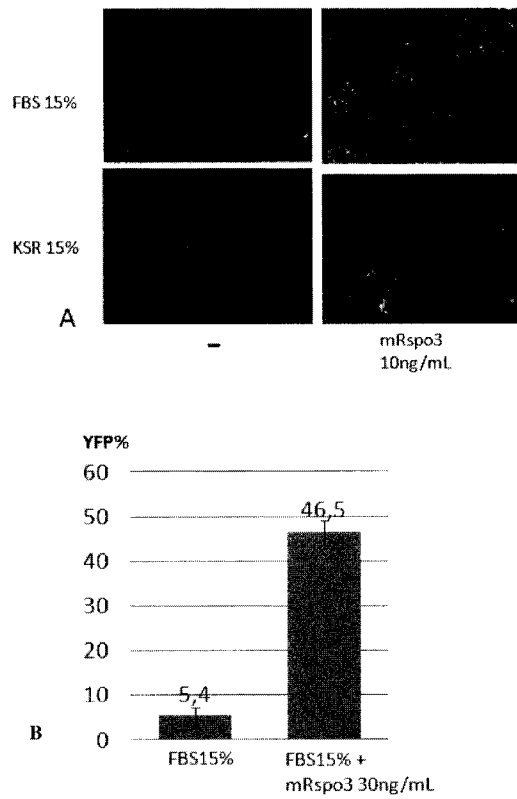
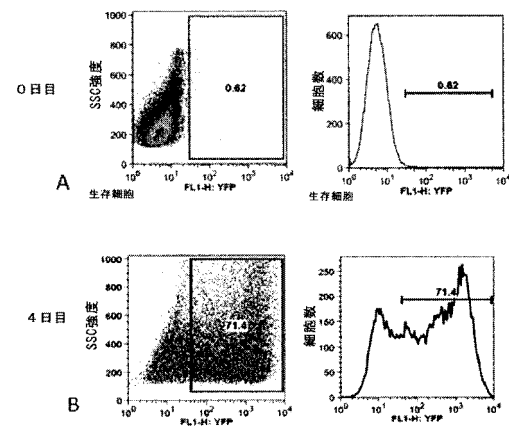


Figure 1

【 図 2 】



【 図 3 】

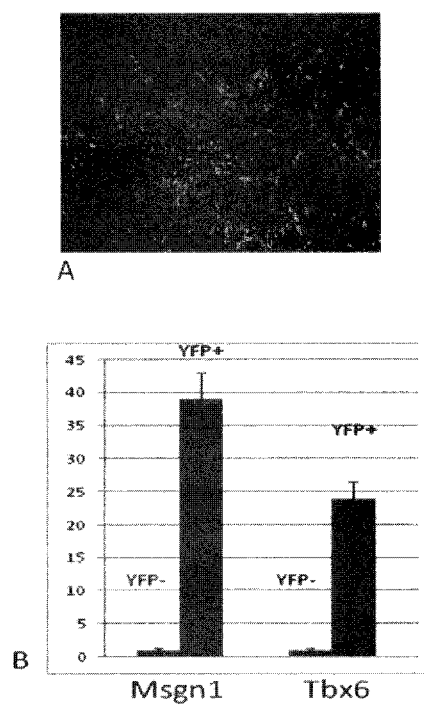


Figure 3

【 図 4 A 】

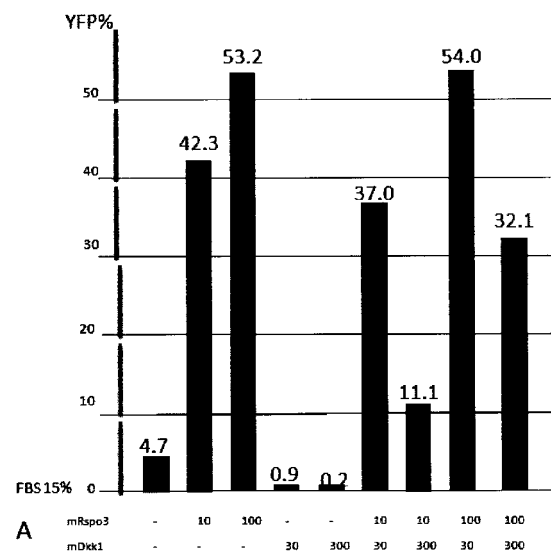


Figure 4 A

【図 4 B】

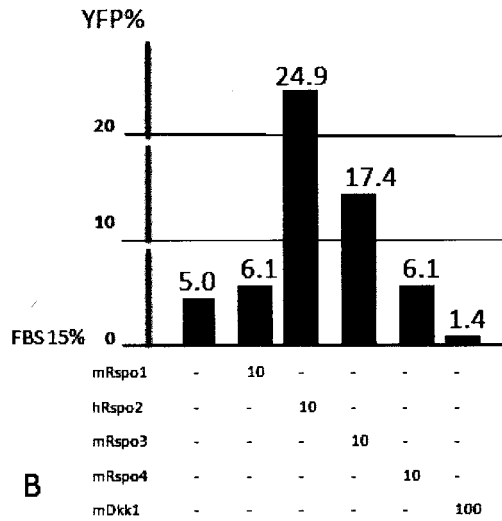
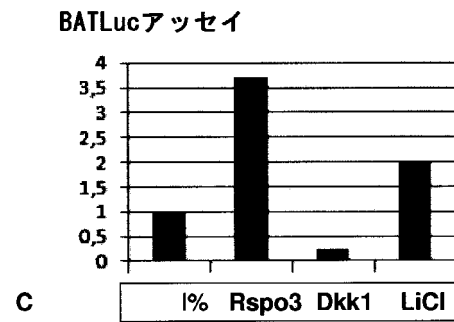
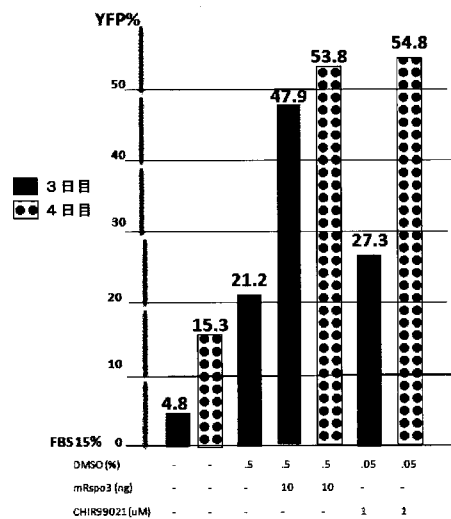


Figure 4 B

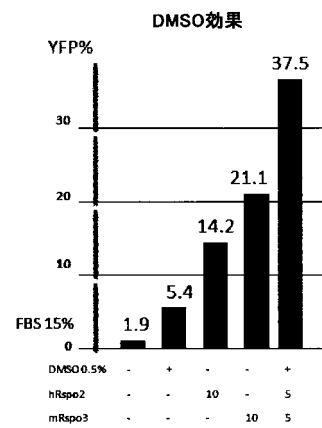
【図 4 C】



【図 5】



【図 6】



【 図 7 A 】

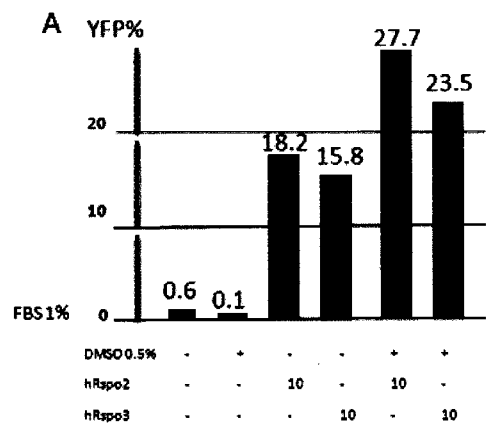


Figure 7 A

【 図 7 B 】

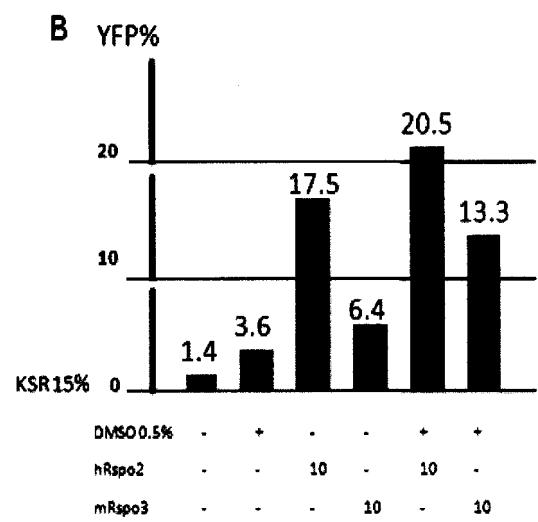
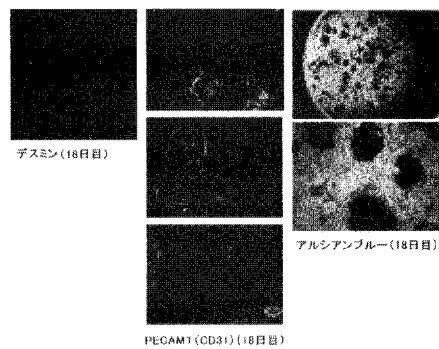


Figure 7 B

【 図 8 】



【 図 9 A 】

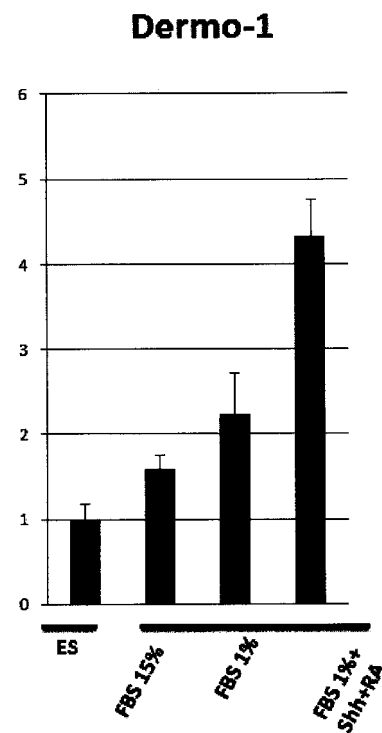


Figure 9 A

【 図 9 B 】

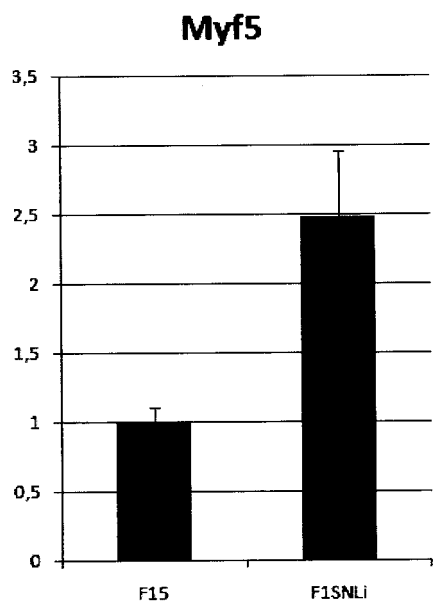
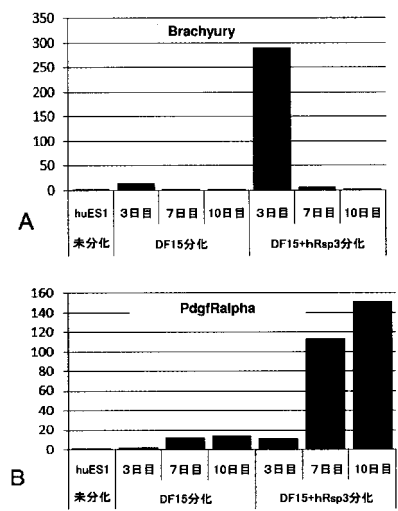
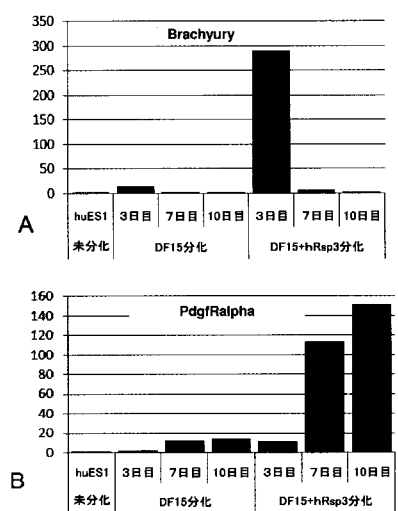


Figure 9 B

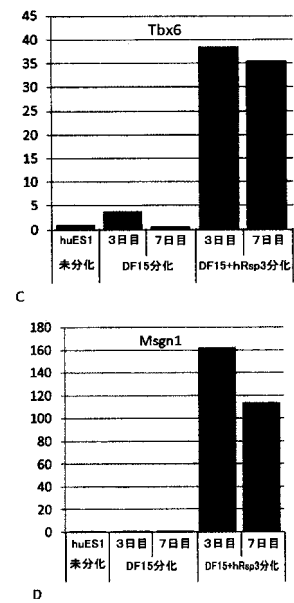
【 図 1 0 A 】



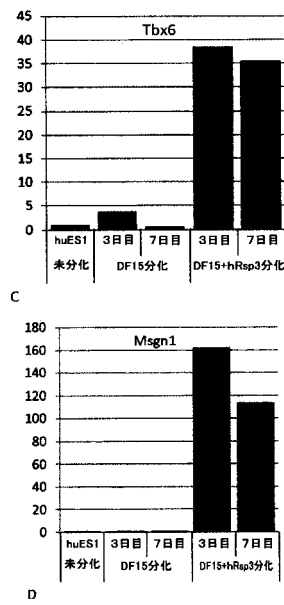
【 図 1 0 B 】



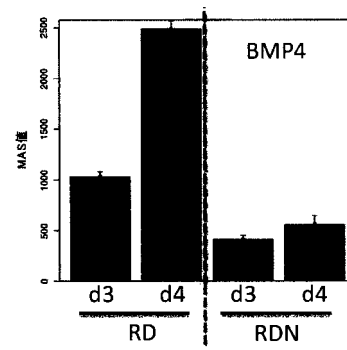
【 図 1 0 C 】



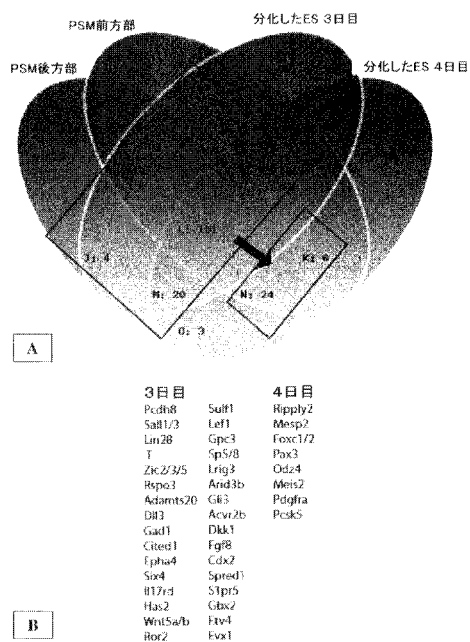
【図10D】



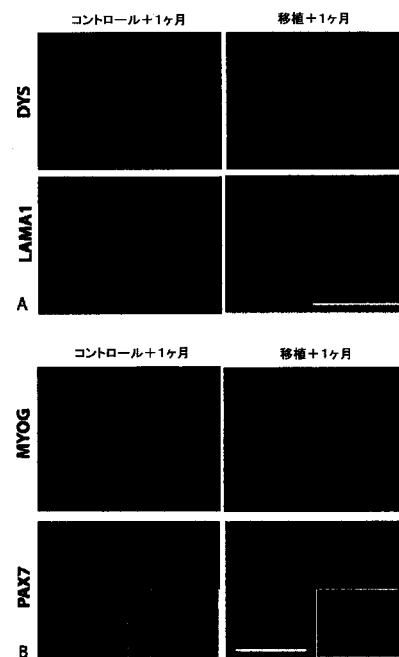
【図11】



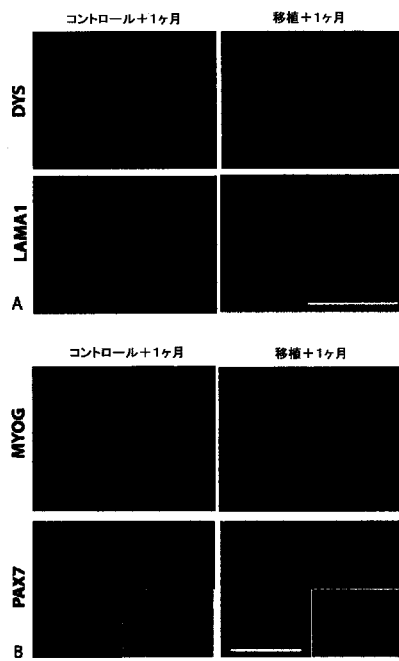
【図12】



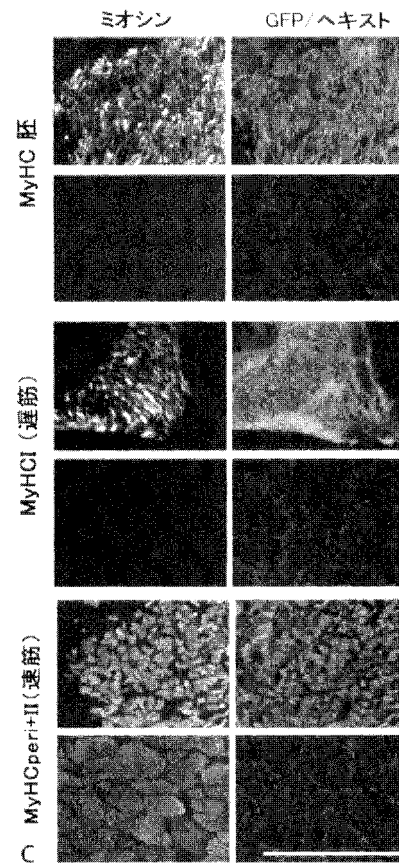
【図13A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【配列表】

2019004903000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/654,120

(32)優先日 平成24年6月1日(2012.6.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 500262120

ユニヴェルシテ・ドゥ・ストラスブール

UNIVERSITE DE STRASBOURG

フランス エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール リュー ブレーズ パスカル 4

(71)出願人 514051084

アソシアシオン フランセーズ コントル レ ミオパチー

フランス国 エフ - 7 5 6 5 1 パリ セデックス 1 3 ブールヴァード ドゥ ロピタル 4
7 - 8 3

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 ブルキエ オリヴィエ

フランス国 エフ - 6 7 4 0 4 イルキルシュ ベー . ペー 1 0 1 4 2 リュ ローラン フリ
1 , イエヌエスエールエム - ユニヴェルシテ ドゥ ストラスブール - ユーエム
アール 7 1 0 4 - ユー . 9 6 4

(72)発明者 シャル ジェローム

フランス国 エフ - 6 7 4 0 4 イルキルシュ ベー . ペー 1 0 1 4 2 リュ ローラン フリ
1 , イエヌエスエールエム - ユニヴェルシテ ドゥ ストラスブール - ユーエム
エール 7 1 0 4 - ユー . 9 6 4

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BB04 BB19 BD50 CA44 CA46

4H045 AA10 AA50 BA10 CA40 EA50

【外国語明細書】

2019004903000001.pdf

2019004903000002.pdf

2019004903000003.pdf

2019004903000004.pdf