

(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2020-535791

(P2020-535791A)

(43) 公表日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A Z 4 B O 3 3
C O 7 K 14/575 (2006.01)	C O 7 K 14/575	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z 4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-509099 (P2020-509099)
 (86) (22) 出願日 平成30年8月16日 (2018. 8. 16)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月25日 (2020. 3. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2018/056169
 (87) 国際公開番号 W02019/035032
 (87) 国際公開日 平成31年2月21日 (2019. 2. 21)
 (31) 優先権主張番号 62/546, 438
 (32) 優先日 平成29年8月16日 (2017. 8. 16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

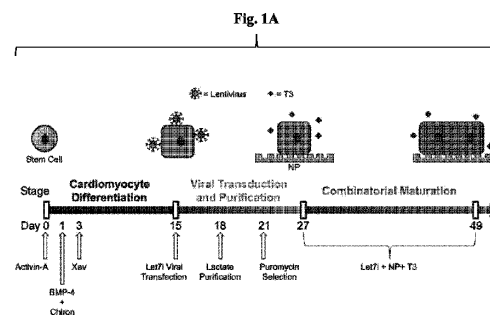
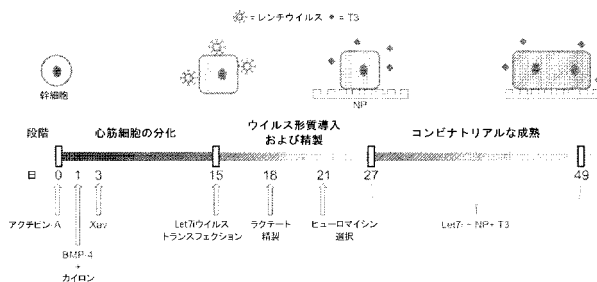
(71) 出願人 514104933
 ユニヴァーシティ オブ ワシントン
 アメリカ合衆国 98105 ワシントン
 州 シアトル ルーズベルト ウェイ ノ
 ースイースト 4545 スイート 40
 O
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 健常および病変心筋細胞の成熟状態を増強するための組成物および方法

(57) 【要約】

本明細書において開示される方法および組成物は、他の用途の中でも特に、疾患モデリング、心毒性スクリーニング、薬物スクリーニングおよび同定などの用途のための、成熟幹細胞由来心筋細胞の作製に関する。本方法は、幹細胞由来心筋細胞が、胎児表現型から、成体心筋細胞の表現型にさらによく似た成熟度の高い表現型に移行するのを促進する物理的および生化学的キューを含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

幹細胞由来心筋細胞を、

(a) ナノパターン化基材、

(b) 甲状腺ホルモンT3、および

(c) Let7i マイクロRNA

と接触させる工程を含む、幹細胞由来心筋細胞を作製する方法。

【請求項 2】

ナノパターン化基材が、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン化表面を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

各溝または隆起部の寸法が、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

溝および隆起部の幅が800nmであり、溝の深さが600nmである、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

Let7i マイクロRNAが幹細胞由来心筋細胞によって発現される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記心筋細胞をLet7i マイクロRNAと接触させる工程が、幹細胞由来心筋細胞とウイルスベクターを接触させることを含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 7】

幹細胞由来心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

幹細胞由来心筋細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞から分化している、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

幹細胞由来心筋細胞が、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

幹細胞由来心筋細胞が遺伝的に修飾される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記心筋細胞を、Let7i マイクロRNAをコードするベクターと接触させた後、ナノパターン化基材および甲状腺ホルモンT3と接触させる、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

得られた幹細胞由来心筋細胞が、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7i マイクロRNAと接触する前の幹細胞由来心筋細胞と比較して、成熟度の高い心筋細胞表現型を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

ナノパターン化基材が、電気刺激を可能にしかつ/または心筋細胞の電気生理学的特性の測定を可能にする微小電極アレイを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 14】

幹細胞由来心筋細胞を、

(a) ナノパターン化基材、

(b) 甲状腺ホルモンT3、および

(c) Let7i マイクロRNA

と接触させる工程を含む、幹細胞由来心筋細胞を成熟させる方法。

【請求項 15】

ナノパターン化基材が、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン化表面を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

50

各溝または隆起部の寸法が、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

溝および隆起部の幅が800nmであり、溝の深さが600nmである、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

Let7iマイクロRNAが幹細胞由来心筋細胞によって発現される、請求項14に記載の方法。

【請求項 19】

前記心筋細胞をLet7iマイクロRNAと接触させる工程が、幹細胞由来心筋細胞をウイルスベクターと接触させることを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 20】

幹細胞由来心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項14に記載の方法。

【請求項 21】

幹細胞由来心筋細胞が、人工多能性幹細胞（iPS細胞）または胚性幹細胞から分化している、請求項14に記載の方法。

【請求項 22】

幹細胞由来心筋細胞が、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する、請求項14に記載の方法。

【請求項 23】

幹細胞由来心筋細胞が遺伝的に修飾される、請求項14に記載の方法。

【請求項 24】

前記心筋細胞を、Let7iマイクロRNAをコードするベクターと接触させた後、ナノパターン化基材および甲状腺ホルモンT3と接触させる、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

得られた幹細胞由来心筋細胞が、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触する前の幹細胞由来心筋細胞と比較して、成熟度の高い心筋細胞表現型を有する、請求項14に記載の方法。

【請求項 26】

ナノパターン化基材が、電気刺激を可能にしかつ/または心筋細胞の電気生理学的特性の測定を可能にする微小電極アレイを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 27】

請求項1または請求項14に記載の方法により調製された幹細胞由来心筋細胞を作用物質と接触させる工程を含む、作用物質の心毒性を評価する方法。

【請求項 28】

前記心筋細胞の少なくとも1つの表現型特性を検出する工程をさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記作用物質が、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集システム、および核酸からなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

作用物質の心毒性が、細胞生存率、細胞サイズ、サルコメア長、組織内のサルコメアの組織化、幹細胞由来心筋細胞の集団の生体電位または電気特性、ミトコンドリア機能、遺伝子発現、拍動数、拍動強度、および収縮性のうちの1つまたは複数に対する作用物質の作用によって示される、請求項27に記載の方法。

【請求項 31】

（a）請求項1または請求項14に記載の方法により調製された幹細胞由来心筋細胞の集団を候補作用物質と接触させる工程、および

（b）該心筋細胞の少なくとも1つの機能特性を検出する工程を含む、心筋細胞の機能特性を調節する作用物質を同定するためのアッセイであって、接触工程（a）後の該心筋細胞の少なくとも1つの機能特性の変化を検出することにより、心筋細胞の機能特性を調節することができるものとして作用物質が同定される、前記ア

10

20

30

40

50

ッセイ。

【請求項 3 2】

検出工程 (b) が、以下の特性：

細胞生存率、細胞サイズ、サルコメア長、組織内のサルコメアの組織化、生体電位または電気特性、ミトコンドリア機能、遺伝子発現、拍動数、拍動強度、および収縮性のうちの少なくとも1つを検出することを含む、請求項31に記載のアッセイ。

【請求項 3 3】

請求項1または請求項14に記載の方法によって調製された幹細胞由来心筋細胞を含む疾患モデルであって、幹細胞が、筋疾患もしくは筋障害を有する対象に由来するか、または、幹細胞由来心筋細胞もしくはそれが由来する幹細胞が、該心筋細胞が疾患表現型を発現するように遺伝的に修飾されている、前記疾患モデル。

10

【請求項 3 5】

筋疾患または筋障害が、心機能不全を伴う表現型を有する、請求項33に記載の疾患モデル。

【請求項 3 6】

筋疾患または筋障害が、心臓表現型の成人発症を特徴とする、請求項33に記載の疾患モデル。

【請求項 3 7】

筋疾患または筋障害がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項33に記載の疾患モデル。

20

【請求項 3 8】

ナノパターン化基材上に幹細胞由来心筋細胞を含む組成物であって、甲状腺ホルモンT3およびLet7iマイクロRNAをさらに含む、前記組成物。

【請求項 3 9】

幹細胞由来心筋細胞が、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する、請求項37に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項37に記載の組成物。

【請求項 4 1】

幹細胞由来心筋細胞またはそれらが由来する幹細胞が、該幹細胞由来心筋細胞が心機能不全表現型を示すように遺伝的に修飾されている、請求項37に記載の組成物。

30

【請求項 4 2】

インビトロ分化心筋細胞をナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させることによって作製された心筋細胞を含む組成物であって、該心筋細胞が、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させなかったインビトロ分化心筋細胞と比較して、成熟度の高い表現型を有する、前記組成物。

【請求項 4 3】

前記心筋細胞が、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する、請求項41に記載の組成物。

【請求項 4 4】

インビトロ分化心筋細胞またはインビトロ分化心筋細胞が分化する幹細胞が、それらが心機能不全表現型を示すように遺伝的に修飾されている、請求項41に記載の組成物。

40

【請求項 4 5】

幹細胞由来心筋細胞、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、Let7iマイクロRNAをコードするベクター、およびそのための包装材料を含む、キット。

【請求項 4 6】

幹細胞由来心筋細胞からの成熟したインビトロ分化心筋細胞の調製を可能にする細胞培養培地および説明書をさらに含む、請求項44に記載のキット。

【請求項 4 7】

ナノパターン化基材が、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン

50

化表面を含む、請求項44に記載のキット。

【請求項 4 8】

各溝または隆起部の寸法が、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である、請求項46に記載のキット。

【請求項 4 9】

溝および隆起部の幅が800nmであり、溝の深さが600nmである、請求項46に記載のキット。

【請求項 5 0】

幹細胞由来心筋細胞がヒト幹細胞由来心筋細胞である、請求項44に記載のキット。

【請求項 5 1】

幹細胞由来心筋細胞が、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する、請求項44に記載のキット。

【請求項 5 2】

幹細胞由来心筋細胞が凍結されている、請求項44に記載のキット。

【請求項 5 3】

幹細胞由来心筋細胞を、

(a) 溝および隆起部の実質的に平行なアレイを含むナノパターン化基材であって、溝および隆起部の幅が800nmであり、溝の深さが600nmである、ナノパターン化基材、

(b) 甲状腺ホルモンT3、ならびに

(c) Let7i マイクロRNA

と接触させる工程を含む、幹細胞由来心筋細胞を作製する方法。

【請求項 5 4】

ナノパターン化基材上に幹細胞由来心筋細胞を含む組成物であって、

(a) 溝および隆起部の実質的に平行なアレイを含むナノパターン化基材であって、溝および隆起部の幅が800nmであり、溝の深さが600nmである、ナノパターン化基材、

(b) 甲状腺ホルモンT3、ならびに

(c) Let7i マイクロRNA

をさらに含む、前記組成物。

【請求項 5 5】

ナノパターン化基材が、その上で培養される心筋細胞の機械的刺激を可能にするエラストマー基材を含み、方法が、そのような機械的刺激に心筋細胞を供する工程をさらに含む、請求項1～32および53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

ナノパターン化基材が、その上で培養される心筋細胞の機械的刺激を可能にするエラストマー基材を含む、請求項38～41もしくは54のいずれか一項に記載の組成物、または請求項45～52のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 7】

前記心筋細胞がナノパターン化基材上にある、請求項43～51のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 8】

室温～4℃の温度での輸送を可能にする、請求項43～51および57のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、2017年8月16日に提出された米国仮出願第62/546,438号の利益を、35 U.S.C. § 119(e)の下で主張する。

【0002】

発明の分野

10

20

30

40

50

本開示は、心機能および心疾患のインビトロモデルに関する。

【背景技術】

【0003】

心血管疾患は、世界中の男女両方の主要な死因であり、発展途上国に急速に影響を及ぼしつつある。遺伝性心筋症は、小児およびその他の点では健康な若年成人を含むあらゆる年齢層の心疾患の主な原因である。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞（hPSC-CM）は、ヒトの心臓に見られるイオンチャネル、タンパク質アイソフォーム、ならびに遺伝的機構および代謝機構の完全な群列を発現することができるヒト心筋細胞への到達性を大幅に向上させるため、心筋症を研究するための有望なツールである。

【0004】

心筋細胞へのヒト多能性幹細胞（hPSC）の定方向性分化は、典型的には、胎児の心臓に存在するものに最もよく似た構造的、機能的、および生化学的特性を有する細胞を産生する。しかし、増強されたサルコメア発達、増強された収縮機能、減少した拍動数、増強されたミトコンドリア容量、および新たに分化したhPSCと比較して成熟度の高いトランスクリプトームを含む成体心筋細胞表現型を有するhPSC-CMの発達に対して満たされていない必要性がある。現在の心疾患モデリングの取り組みの主な目標は、さらに効果的な治療戦略をデザインするための第一歩として、心筋症の発症および進行に関する洞察を得ることである。本明細書に記載の方法以前には、成人発症型筋障害および心血管疾患、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、hPSC-CMによって正確にモデル化されていない。これは、疾患モデリングおよび薬物スクリーニング用途での幹細胞分化および成熟方法の使用の改善の必要性を強調する。

【発明の概要】

【0005】

本明細書において記載されるのは、成熟幹細胞由来心筋細胞を作製するために発達の心臓ニッチプラットフォームを設計する方法である。本方法は、幹細胞由来心筋細胞が、胎児表現型から、成体心筋細胞の表現型にさらによく似た成熟度の高い表現型に移行するのを促進する物理的および生化学的キューを含む。

【0006】

本明細書に記載の手法は、幹細胞からインビトロで分化した成熟度の高い心筋細胞を提供し、それにより、他の用途の中でも特に、心毒性について薬物を評価し、心筋細胞または心機能を調節する新薬を同定するためにスクリーニングするためのプラットフォームを提供する。幹細胞、例えば、正常なおよび疾患を有する対象から人工多能性幹細胞（iPS細胞）を作製する能力、ならびにインビトロ分化に先立って幹細胞を遺伝的に修飾する能力は、改善された疾患モデリングならびに薬物スクリーニングおよび同定のためのプラットフォームを提供する。

【0007】

したがって、一局面では、本明細書において記載されるのは、幹細胞由来心筋細胞を作製する方法であって、幹細胞由来心筋細胞を、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させる工程を含む、方法である。

【0008】

一態様では、ナノパターン化基材は、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン化表面を含む。

【0009】

一態様では、各溝または隆起部の寸法は、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である。

【0010】

一態様では、溝および隆起部の幅は約800nmであり、溝の深さは約600nmである。

【0011】

一態様では、Let7iマイクロRNAは、幹細胞由来心筋細胞によって発現される。

【0012】

10

20

30

40

50

一態様では、心筋細胞をLet7iマイクロRNAと接触させる工程は、幹細胞由来心筋細胞をウイルスベクターと接触させることを含む。

【0013】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞はヒト心筋細胞である。

【0014】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、人工多能性幹細胞（iPS細胞）または胚性幹細胞から分化している。

【0015】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する。

【0016】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は遺伝的に修飾される。

【0017】

一態様では、心筋細胞を、Let7iマイクロRNAをコードするベクターと接触させた後、ナノパターン化基材および甲状腺ホルモンT3と接触させる。

【0018】

一態様では、得られた幹細胞由来心筋細胞は、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触する前の幹細胞由来心筋細胞と比較して、成熟度の高い心筋細胞表現型を有する。

【0019】

一態様では、ナノパターン化基材は、電気刺激を可能にしかつ/または心筋細胞の電気生理学的特性の測定を可能にする微小電極アレイを含む。

【0020】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、幹細胞由来心筋細胞を成熟させる方法であって、幹細胞由来心筋細胞を、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させる工程を含む、方法である。

【0021】

一態様では、ナノパターン化基材は、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン化表面を含む。

【0022】

一態様では、各溝または隆起部の寸法は、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である。

【0023】

一態様では、溝および隆起部の幅は約800nmであり、溝の深さは約600nmである。

【0024】

一態様では、Let7iマイクロRNAは、幹細胞由来心筋細胞によって発現される。

【0025】

一態様では、心筋細胞をLet7iマイクロRNAと接触させる工程は、幹細胞由来心筋細胞をウイルスベクターと接触させることを含む。

【0026】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞はヒト心筋細胞である。

【0027】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、人工多能性幹細胞（iPS細胞）または胚性幹細胞から分化している。

【0028】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する。

【0029】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は遺伝的に修飾される。

【0030】

一態様では、心筋細胞を、Let7iマイクロRNAをコードするベクターと接触させた後、ナノパターン化基材および甲状腺ホルモンT3と接触させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

一態様では、得られた幹細胞由来心筋細胞は、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触する前の幹細胞由来心筋細胞と比較して、成熟度の高い心筋細胞表現型を有する。

【 0 0 3 2 】

一態様では、ナノパターン化基材は、電気刺激を可能にしかつ/または心筋細胞の電気生理学的特性の測定を可能にする微小電極アレイを含む。

【 0 0 3 3 】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、作用物質の心毒性を評価する方法であって、本明細書に記載の方法により調製された幹細胞由来心筋細胞を作用物質と接触させる工程を含む、方法である。

10

【 0 0 3 4 】

一態様では、方法は、心筋細胞の少なくとも1つの表現型特性を検出する工程を含む。

【 0 0 3 5 】

一態様では、作用物質は、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集システム、および核酸からなる群より選択される。

【 0 0 3 6 】

一態様では、作用物質の心毒性は、細胞生存率、細胞サイズ、サルコメア長、組織内のサルコメアの組織化、幹細胞由来心筋細胞の集団の生体電位または電気特性、ミトコンドリア機能、遺伝子発現、拍動数、拍動強度、および収縮性のうちの1つまたは複数に対する作用物質の作用によって示される。

20

【 0 0 3 7 】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、心筋細胞の機能特性を調節する作用物質を同定するためのアッセイであって、以下の工程を含む、方法である：本明細書に記載の方法によって調製された幹細胞由来心筋細胞の集団を候補作用物質と接触させる工程；および心筋細胞の少なくとも1つの機能特性を検出する工程であって、心筋細胞の少なくとも1つの機能特性の変化を検出することにより、心筋細胞の機能特性を調節することができるものとして作用物質が同定される、工程。

【 0 0 3 8 】

一態様では、検出工程は、以下の特性、すなわち、細胞生存率、細胞サイズ、サルコメア長、組織内のサルコメアの組織化、生体電位または電気特性、ミトコンドリア機能、遺伝子発現、拍動数、拍動強度、および収縮性のうちの少なくとも1つを検出することを含む。

30

【 0 0 3 9 】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、本明細書に記載の方法によって調製された幹細胞由来心筋細胞を含む疾患モデルであり、幹細胞は、筋疾患もしくは筋障害を有する対象に由来するか、または、幹細胞由来心筋細胞もしくはそれが由来する幹細胞は、心筋細胞が疾患表現型を発現するように遺伝的に修飾されている。

【 0 0 4 0 】

一態様では、筋疾患または筋障害は、心機能不全を伴う表現型を有する。

40

【 0 0 4 1 】

一態様では、筋疾患または筋障害は、心疾患表現型の成人発症を特徴とする。

【 0 0 4 2 】

一態様では、筋疾患または筋障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【 0 0 4 3 】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、ナノパターン化基材上に幹細胞由来心筋細胞を含む組成物であって、甲状腺ホルモンT3およびLet7iマイクロRNAをさらに含む、組成物である。

【 0 0 4 4 】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する。

50

【0045】

一態様では、心筋細胞はヒト心筋細胞である。

【0046】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞またはそれらが由来する幹細胞は、幹細胞由来心筋細胞が心機能不全表現型を示すように遺伝的に修飾される。

【0047】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、インビトロ分化心筋細胞を、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させることによって作製された心筋細胞を含む組成物であり、心筋細胞は、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7iマイクロRNAと接触させなかったインビトロ分化心筋細胞と比較して、成熟度の高い表現型を有する。

10

【0048】

一態様では、心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する。

【0049】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、インビトロ分化心筋細胞またはインビトロ分化心筋細胞が分化する幹細胞の組成物であって、インビトロ分化心筋細胞またはインビトロ分化心筋細胞が分化する幹細胞が、心機能不全表現型を示すように遺伝的に修飾されている、組成物である。

【0050】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、幹細胞由来心筋細胞、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、Let7iマイクロRNAをコードするベクター、およびそのための包装材料を含む、キットである。

20

【0051】

一態様では、キットは、幹細胞由来心筋細胞からの成熟したインビトロ分化心筋細胞の調製を可能にする細胞培養培地および説明書を含む。

【0052】

一態様では、ナノパターン化基材は、溝および隆起部の実質的に平行なアレイを有するナノパターン化表面を含む。

【0053】

一態様では、各溝または隆起部の寸法は、長さ、幅、または高さ1000ナノメートル未満である。

30

【0054】

一態様では、溝および隆起部の幅は約800nmであり、溝の深さは約600nmである。

【0055】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞はヒトである。

【0056】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来する。

【0057】

一態様では、心筋細胞はナノパターン化基材上にある。

【0058】

一態様では、幹細胞由来心筋細胞は凍結される。

40

【0059】

一態様では、キットは、室温～4℃の温度での輸送を可能にする。

【0060】

別の局面では、本明細書において記載されるのは、幹細胞由来心筋細胞を作製する方法であって、幹細胞由来心筋細胞を以下のものと接触させる工程を含む、方法である：溝および隆起部の実質的に平行なアレイを含むナノパターン化基材であって、溝および隆起部の幅は800nmであり、溝の深さは600nmである、ナノパターン化基材；甲状腺ホルモンT3；およびLet7iマイクロRNA。

【0061】

50

別の局面では、本明細書において記載されるのは、ナノパターン化基材上に幹細胞由来心筋細胞を含む組成物であって、以下のものをさらに含む、組成物である：溝および隆起部の実質的に平行なアレイを含むナノパターン化基材であって、溝および隆起部の幅は800nmであり、溝の深さは600nmである、ナノパターン化基材；甲状腺ホルモンT3；およびLet7iマイクロRNA。

【0062】

一態様では、本明細書において記載されるのは、ナノパターン化基材が、その上で培養される心筋細胞の機械的刺激を可能にするエラストマー基材を含む、方法であって、そのような機械的刺激に心筋細胞を供する工程をさらに含む、方法である。

【0063】

一態様では、ナノパターン化基材が、その上で培養される心筋細胞の機械的刺激を可能にするエラストマー基材を含む、本明細書に記載の組成物、または本明細書に記載のキットである。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1A】図1A～Fは、ComboMatプラットフォームが成熟度の高い転写プロファイルを促進することを示す。図1Aは、ComboMatプラットフォームの概略タイムラインを示す。心筋細胞の分化は、小分子、およびヒト組換えタンパク質ベースのプロトコルを使用して達成される。心筋細胞の作製後、hPSC-CMにLet7iレンチウイルスをトランスフェクトし、これを代謝チャレンジ (metabolic challenge) により精製し、ウイルストランスフェクションに関して選択する。次いで、ウイルスベクターを発現する高純度hPSC-CMをNPに播種し、3週間T3に曝露する。図1Bは、3次元での主成分分析の視覚化を示す。PC2に沿ってT3クラスターに曝露されたhPSC-CM。ComboMat群は、成熟刺激の他の組合せから離れており、成熟刺激の他の組合せから区別される。図1Cは、様々な処理の結果として、差次的に発現される遺伝子の心臓成熟経路における正味の濃縮を示す。図1Dは、EV-Flat対照と比較した、Let7i-NP-T3組合せ処理におけるアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子オントロジー (GO) 濃縮結果を示す。色のグラデーションとバーの長さとは、濃縮の重要性を表す。図1E～Fは、EV-FlatとLet7i-NP-T3 (図1E) および胎児と成体の心筋細胞 (図1F) を比較して、RNAseq試料の分離に対する遺伝子の寄与を示す、PCAローディングのバブルプロットを示す。図1Eおよび図1Fのバブルプロットは、ComboMat処理hPSC-CMと成体CMとの間の特定の遺伝子の類似のアップ/ダウンレギュレーションパターンを強調する。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図1C】図1Aの説明を参照のこと。

【図1D】図1Aの説明を参照のこと。

【図1E】図1Aの説明を参照のこと。

【図1F】図1Aの説明を参照のこと。

【図2A】図2A～Fは、hPSC-CMの構造的成熟を示す。図2Aは、Combomatプロトコルまたは各キュー単独に曝露されたhPSC-CMの免疫蛍光画像を示す。赤 = アクチニン、緑 = Fアクチン、青 = DAPI。挿入図は、hPSC-CM内のサルコメア構造の拡大図を示す。図2Bは、Combomatプラットフォームの標識キューに曝露されたhPSC-CM由来のサルコメアのTEM画像を示す。対照条件に曝露されたhPSC-CMはZ体形成のみを示すが、ComboMatプラットフォームに曝露されたhPSC-CMは、はるかに明白なZディスク構造を有する。図2C～2Fは、Combomatプロトコルまたは各キュー単独に曝露されたhPSC-CMの形態変化の定量化を示す。図2Cは、カスタム2Dフーリエ変換画像分析によって測定されたサルコメア長を示す。図2Dは、TEM画像から測定されたZバンド幅の箱ひげ図であり、平均Zバンド幅を赤線でマークして共に示す。図2Eは、ComboMat群が生理学的二核性パーセンテージに近づいていることを示す二核細胞の棒グラフを示す。図2Fは、免疫蛍光画像から測定した細胞面積を示し、ComboMatプラットフォームに対して明らかな肥大応答を示している。バーは平均 ± S.E.M.を表す。
*P < 0.05。

【図2B】図2Aの説明を参照のこと。

【図 2 C】図2Aの説明を参照のこと。

【図 2 D】図2Aの説明を参照のこと。

【図 2 E】図2Aの説明を参照のこと。

【図 2 F】図2Aの説明を参照のこと。

【図 3 A】図3A～Gは、電気機械的および代謝的成熟を示す。図3Aは、カスタムCCQ法によって測定された、対照またはComboMat hPSC-CMに関するビデオフレーム全体にわたって平均化された収縮速度の代表的なトレースを示す。ピーク収縮速度およびピーク弛緩速度を示す。図3Bは、ピーク収縮速度およびピーク弛緩速度の定量化を示す。図3Cは、対照またはComboMat hPSC-CMの収縮角分布ヒストグラムを示す。ヒストグラムの中央の線は平均収縮角を示し、線の長さは分布が平均と一致する度合いを示す。図3Dは、縦方向および横方向の収縮の大きさの収縮異方性比 (AR) を示す。図3Eは、対照とCombomat hPSC-CMとの間のFPDの変化を示す代表的な電場電位記録を示す。図3FはFPDの定量化を示し、図3GはCombomatプラットフォームまたは各キュー単独に曝露されたhPSC-CMの1分当たりの拍動 (BPM) として表される拍動数を示す。図3Hは、パルミテートを使用した脂肪酸ストレス試験の代表的なOCRトレースを示す。図3Iは、パルミテート添加後のOCRの最大変化の定量化を示す。バーは平均 \pm S.E.M. を表す。* $P < 0.05$ 。

10

【図 3 B】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 C】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 D】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 E】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 F】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 G】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 H】図3Aの説明を参照のこと。

【図 3 I】図3Aの説明を参照のこと。

20

【図 4 A】図4A～Eは、DMD変異体hPSC-CMが、正常対照と同様にComboMatプラットフォームに応答することを示す。図4Aは、正常hPSC-CMと比較して、対照条件またはComboMat条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMのSeahorse代謝プロファイルを示す。図4Bは、FCCP添加後のOCRの最大変化の定量化を示す。ComboMatプラットフォームに曝露すると、正常およびDMD変異体hPSC-CMはともに最大呼吸容量の増加を示す。図4C～Dは、電気生理のMEAベースの測定を示す。図4Cは、正常またはDMD変異体hPSC-CMのBPMとして表される拍動数を示す。図4Dは、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常またはDMD変異体hPSC-CMの平均FPDを示す。図4Eは、対照 (左) 条件およびComboMat (右) 条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMの免疫蛍光画像を示す。挿入図は、各条件でのサルコメア構造の拡大部分を示す。バーは平均 \pm S.E.M. を表す。* $P < 0.05$ 。

30

【図 4 B】図4Aの説明を参照のこと。

【図 4 C】図4Aの説明を参照のこと。

【図 4 D】図4Aの説明を参照のこと。

【図 4 E】図4Aの説明を参照のこと。

【図 5 A】図5A～Fは、曝露された内因性DMD疾患表現型を示す。図5Aは、1つおきの拍動間隔を記した、対照条件またはComboMat条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMから得られた代表的な電場電位記録を示す。図5Bは、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常およびDMD変異体hPSC-CMの30回の連続拍動に対してプロットされた拍動間隔の変化 (BI) を示す。成熟DMD変異体hPSC-CMは、正常hPSC-CMと比較して、BIにはるかに大きな不安定性を示す。図5Cは、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常またはDMD変異体hPSC-CMについて、BI > 250msを伴う平均拍動率を示す。未成熟正常hPSC-CMは、BI > 250msの発生を示さなかった。図5Dは、30回の拍動記録全体の平均BIを示す。未成熟DMD変異体hPSC-CMはMEAで識別可能な疾患表現型を示さないが、ComboMatプラットフォームを使用して成熟させたDMD変異体hPSC-CMは正常対照と有意に異なる。図5Eは、対照条件またはComboMat条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMの代表的なFura-2 Ca^{2+} イメージングトレースを示す。図5Fサイトゾル内の弛緩期 Ca^{2+} 含有量の定量化。DMD変異体hPSC-CMは、ComboMa

40

50

tプラットフォームを使用して成熟させると、有意に高いサイトゾル Ca^{2+} 含有量を示す。バーは平均 \pm S.E.M.を表す。 $*P < 0.05$ 。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図5D】図5Aの説明を参照のこと。

【図5E】図5Aの説明を参照のこと。

【図5F】図5Aの説明を参照のこと。

【図6A】図6A～Fは、成熟hPSC-CMを使用したDMD心筋症表現型薬物スクリーニングを示す。図6Aは、浸透圧ストレスに応答した細胞死の減少についてZスコアによってランク付けされた薬物ライブラリーを示す。特定の化合物の化学構造も示す。図6Bは、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常およびDMD変異体hPSC-CMのベースライン平均BIの定量化を示す。図6C～Dは、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常およびDMD変異体hPSC-CMについて、7日後のニトレンジピンおよびシルデナフィルに対する応答の用量反応曲線を示す。図6Eは、ニトレンジピンのウォッシュアウト後48時間の平均BIの測定を示す。図6Fは、成熟DMD変異体hPSC-CMの代表的なFura-2 Ca^{2+} トレースを示す。図6Gは、ニトレンジピンを使用した場合および使用しない場合の弛緩期 Ca^{2+} 含有量の定量化を示す。ニトレンジピンは、成熟DMD変異体hPSC-CMのサイトゾル Ca^{2+} 負荷を減少させるのに役立つ。バーは平均 \pm S.E.M.を表す。 $*P < 0.05$ 。

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図6C】図6Aの説明を参照のこと。

【図6D】図6Aの説明を参照のこと。

【図6E】図6Aの説明を参照のこと。

【図6F】図6Aの説明を参照のこと。

【図6G】図6Aの説明を参照のこと。

【図7A】図7A～Cは、ジストロフィン変異体分析を示す。図7Aは、正常 (SEQ ID NO:18) およびDMD変異体 (SEQ ID NO:19) hPSC-CMの両方におけるDMD遺伝子配列決定のためのプライマー設計の略図を示し、塩基対263でのG欠失を明らかにする。

【図7B】DMD変異体hPSC-CMにおけるCRISPRにより操作されたbp263での欠失周辺のDMD遺伝子のクロモグラフを示す。

【図7C】エクソン1のフレームシフト欠失の結果としての初期停止コドンとして示唆される、正常 (上) およびDMD変異体 (下) hiPSC-CMの予測されるタンパク質配列を示す。

【図8A】図8A～Fは、パッチクランプ電気生理を示す。図8Aは、hPSC-CMの電流クランプ電気生理学的測定を示す。ComboMat条件に曝露されたhPSC-CMは有意に速い上昇速度を有したが、他のパラメーターはいずれも (図8B～F) 対照とComboMat hPSC-CMとの間で統計学的に差を示さなかった。バーは平均 \pm S.E.M.を表す。 $*P < 0.05$ 。上昇勾配 = 活動電位の上昇速度、RMP = 静止膜電位、APD90 = 90%再分極の活動電位持続時間、崩壊タウ = 弛緩の時定数、振幅 = 活動電位の振幅、MDP = 最大弛緩期電位。

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

【図8C】図8Aの説明を参照のこと。

【図8D】図8Aの説明を参照のこと。

【図8E】図8Aの説明を参照のこと。

【図8F】図8Aの説明を参照のこと。

【図9A】図9A～Eは、hPSC-CMの代謝プロファイリングを示す。図9Aは、MitoStreeアッセイのあいだの、ATPシンターゼ阻害剤であるオリゴマイシン、電子伝達および酸化のリン酸化の脱共役剤 (FCCP)、ならびに電子伝達鎖遮断薬であるロテノンおよびアンチマイシンに応答する代表的なOCRプロファイルを示す。図9Bは、基礎および最大呼吸容量の定量化を示す。図9Cは、パルミテートを使用した脂肪酸ストレス試験の代表的なOCRトレースを示す。図9D～Eは、正常hiPSC-CMについて、パルミテートに応答したOCR変化の定量化を示す。図9Eは、ComboMat hPSC-CMを使用した、曝露された脂肪酸およびBSA対照の代表的なOCRプロファイルを示す。細胞はBSA担体に応答しなかった。バーは平均 \pm S.E.M.を表

10

20

30

40

50

す。*P<0.05。

【図9B】図9Aの説明を参照のこと。

【図9C】図9Aの説明を参照のこと。

【図9D】図9Aの説明を参照のこと。

【図9E】図9Aの説明を参照のこと。

【図10A】図10A~Fは、疾患状態の層別化に必要な完全なComboMatを示す。Gilchristらによって概説された不整脈の測定基準²⁵。成熟キューを単独で使用的場合、正常hPSC-CMとDMD変異体hPSC-CMとの間に統計的差はないが、ComboMatプロトコルに組み合わせた場合、健康正常hPSC-CMと病変DMD変異体hPSC-CMとの間に分離がある。バーは平均±S.E.M.を表す。*P<0.05。

10

【図10B】図10Aの説明を参照のこと。

【図10C】図10Aの説明を参照のこと。

【図10D】図10Aの説明を参照のこと。

【図10E】図10Aの説明を参照のこと。

【図10F】図10Aの説明を参照のこと。

【図11A】図11A~Fは、hPSC-CMに対する長期T3曝露の効果を示す。図11A~Bは、免疫組織化学により測定された、処理後7、14、および21日目に測定されたhPSC-CMのサルコメア長および細胞面積に対するT3の効果を示す。NPをT3単独と組み合わせると、サルコメア構造および肥大に長期的に悪影響が及ぼされた。図11C~Dは、処理後7、14、および21日目に測定されたhPSC-CMの収縮速度（図11C）および弛緩速度（図11D）のCCQ測定を示す。ここでもNPとT3単独とを組み合わせると、収縮能が阻害された。図11E~Fは、処理後7、14、および21日目に対照条件またはT3条件に曝露し、MEAにより測定したhPSC-CMの電気生理学的能力を示す。図11Eは、T3処理細胞のD14でピークに達した拍動周期を示す。図11Fは、T3単独に曝露されたhPSC-CMの実質的に増加した拍動数変動を示す。バーは平均±S.E.M.を表す。*P<0.05。

20

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図11C】図11Aの説明を参照のこと。

【図11D】図11Aの説明を参照のこと。

【図11E】図11Aの説明を参照のこと。

【図11F】図11Aの説明を参照のこと。

30

【図12-1】図12A~Eは、代謝チャレンジによる心筋細胞の精製を示す。図12A~Bは、心臓純度が低い開始集団に対するラクテート濃縮の前（図12A）および後（図12B）のcTnT+細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

【図12-2】図12Cは、IgGアイソタイプ対照フローサイトメトリーの結果がcTnT抗体の非特異的結合を示さないことを示す。

【図12-3】図12D~Eは、心臓純度が高い開始集団について、ラクテート濃縮前（図12D）および後（図12E）のcTnT+細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。

【図13A】図13A~Gは、hPSC-CMのナノトポグラフィックなサイズ依存性の構造的発達を示す。図13Aは、様々な寸法のNP表面の走査型電子顕微鏡写真（上段）、様々な寸法のNP表面上のhPSC-CMの明視野画像（中段）、および様々な寸法のNP上で培養されたhPSC-CMの共焦点免疫蛍光画像（下段）を示す。図13Bは、標識されたトポグラフィック寸法上で培養されたhPSC-CMの細胞面積および細胞異方性比を示す。図13Cは、異なるトポグラフィック寸法上のhPSC-CMの初期播種密度に対する細胞単層密度を示す。図13Dは、様々なトポグラフィック上のhPSC-CMのhPSC-CMの相対的な細胞骨格線維整列を示す。図13E~Fは、平坦と800nm NPとの間のFluo-4カルシウムイメージングおよびhPSC-CMのピーク到達時間Ca²⁺測定を示す。図13Gは、平坦と比較した800nm NP上のhPSC-CMの心臓成熟マーカーのRT-PCR発現レベルを示す。バーは平均±S.E.M.を表す。*P<0.05。

40

【図13B】図13Aの説明を参照のこと。

【図13C】図13Aの説明を参照のこと。

【図13D】図13Aの説明を参照のこと。

50

【図 1 3 E】図13Aの説明を参照のこと。

【図 1 3 F】図13Aの説明を参照のこと。

【図 1 3 G】図13Aの説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0065】

詳細な説明

本明細書に記載の組成物および方法は、細胞を、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモン (T3)、およびLet7iマイクロRNAと接触させる工程を含むプロセスにより、成熟度の高い幹細胞由来心筋細胞を生成することができるという発見に部分的に関する。標準的な方法よりも、成体心筋細胞になお特徴的な構造的および機能的表現型を有する幹細胞由来心筋細胞である。また、本明細書において記載されるのは、増強されたサルコメア発達、電気生理、収縮機能、ミトコンドリア容量、および標準的な方法よりも成熟したトランスクリプトームを有するhPSC由来心筋細胞 (hPSC-CM) を作製するための操作された発達の心臓ニッチプラットフォームを確立する方法および組成物である。

【0066】

プラットフォームの能力は、本明細書において、操作されたジストロフィン遺伝子変異を有する細胞に対する適用によって実証される。この発達の心臓ニッチをジストロフィン変異体hPSC-CMに適用すると、ナノパターン化基材、甲状腺ホルモン (T3)、またはLet7iマイクロRNAと接触していない非成熟病変hPSC-CMでは以前には観察されなかった堅牢な疾患表現型が出現する。成熟したジストロフィン変異体hPSC-CMは、拍動数変動により測定した場合、不整脈に対して比較的大きな傾向を示し、その後の実験では、この効果が比較的高い静止サイトゾルカルシウム含有量によるものである可能性が最も高いことが示された。本明細書において、カスタムナノパターン化微小電極アレイプラットフォームを使用して、発達の心臓ニッチプラットフォーム内のhPSC-CM機能をスクリーニングする追加の能力が示され、例えば、カルシウムチャネル遮断薬ニトレンジピン、催不整脈性拳動の軽減、および偽陽性としてシルデナフィルを正確に同定したアッセイが示されている。

【0067】

まとめると、本明細書に記載の方法は、とりわけ、正確性の高い疾患モデリング、心毒性評価、および予測的薬物スクリーニングを可能にする堅牢なhPSC-CM成熟を可能にする発達の心臓ニッチプラットフォームを提供する。

【0068】

定義

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語がここに集められている。特に明記されていない限り、または文脈から暗示されている場合を除き、以下の用語および語句は、以下に提供される意味を含む。別段の明示的な記載がない限り、または文脈から明らかな場合を除き、以下の用語および語句は、その用語または語句が関係する技術分野において獲得した意味を排除しない。定義は、特定の態様の説明を支援するために提供され、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるため、特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。別段の定義がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0069】

本明細書において使用される用語「接触」は、細胞に関して使用される場合、作用物質、表面、ホルモンなどとの細胞の物理的接触を可能にする様式で細胞に作用物質、表面、ホルモンなどを導入すること、および細胞内のmiRNA、ポリペプチド、または他の発現産物などの作用物質の発現を可能にする遺伝子構築物またはベクターなどの要素を導入することの両方を包含する。作用物質を発現するように遺伝的に修飾された細胞は、作用物質を発現する細胞の子孫がそうであるように、作用物質と「接触」することを理解されたい。

【0070】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される「幹細胞由来心筋細胞」は、培養中、すなわちインビトロで幹細胞から分化した心筋細胞である。したがって、インビボ、すなわち、組織または生物の発生中、心筋細胞は最終的に幹細胞に由来するが、本明細書に記載の幹細胞由来心筋細胞は、幹細胞からのインビトロ分化によって作製されている。本明細書において使用される場合、幹細胞からインビトロで分化した細胞、例えば、人工多能性幹(iPS)細胞または胚性幹細胞(「ES細胞」または「ESC」)は、少なくとも、自発的な拍動または収縮、および心筋トロポニンT(cTnT)の発現を有する場合、「幹細胞由来心筋細胞」である。インビトロで幹細胞を心筋細胞に分化させる方法は、当技術分野において公知であり、本明細書の他の場所に記載されている。

【0071】

本明細書において使用される用語「幹細胞」または「未分化細胞」は、発生能(すなわち、全能性、多能性、多分化能など)に関する特定の暗黙の意味を伴わずに、自己再生の特性を有し、複数の細胞型に分化する発生能を有する未分化または部分的に分化した状態の細胞を指す。幹細胞は、その発生能を維持しながら、増殖し、さらに多くのそのような幹細胞を生じることができる。理論的には、2つの主要な機構のいずれかによって自己再生が起こり得る。幹細胞は非対称的に分裂することができ、これは義務的非対称分化(obligatory asymmetrical differentiation)として知られ、一方の娘細胞は親幹細胞の発生能を保持し、他方の娘細胞は親細胞とは異なるいくつかの他の特定の機能、表現型および/または発生能を発現する。親の発生能を有する1つまたは複数の細胞も潜在的に保持しながら、増殖し、かつ1つまたは複数の成熟した細胞型に後に分化する子孫を生じよう

に娘細胞自体を誘導することができる。分化した細胞は、それ自体が多能性細胞に由来する多能性細胞などに由来してもよい。これらの多能性細胞はそれぞれ幹細胞と見なすことができるが、そのような幹細胞の各々がもたらすことができる細胞型の範囲、すなわち、それらの発生能はかなり変化し得る。あるいは、集団内の幹細胞のいくつかは、確率的分化として知られる2つの幹細胞に対称的に分裂することができるため、集団内のいくつかの幹細胞を全体として維持しながら、集団内の他の細胞が分化した子孫のみを生じる。したがって、用語「幹細胞」は、特定の状況下では、幹細胞よりも特殊化または分化した表現型に分化する発生能を有し、ある状況下では、実質的に分化することなく増殖する能力を保持する細胞の任意のサブセットを指す。いくつかの態様では、幹細胞という用語は、一般に、子孫(子孫細胞)が、分化によって、例えば、胚細胞および組織の徐々に進行する多様化において起こるように、完全に個々の特徴を獲得することによって特殊化する、多くの場合、様々な方向に特殊化する天然の親細胞を指す。分化した細胞の中には、比較的優れた発生能のある細胞を生じる能力を有するものもある。そのような能力は天然でもよく、様々な因子を用いて処理することによって人為的に誘導されてもよい。幹細胞として始まった細胞は、分化した表現型に進む可能性があるが、「逆転」し、次いで、幹細胞表現型を再発現するように誘導することができ、この用語は、当業者によって「脱分化」または「リプログラミング」または「逆分化」と呼ばれることが多い。

【0072】

例示的な幹細胞には、胚性幹細胞、成体幹細胞、多能性幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞、筋幹細胞、筋前駆体幹細胞、内皮前駆細胞、骨髓幹細胞、軟骨形成幹細胞、リンパ幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、中枢神経系幹細胞、末梢神経系幹細胞などが含まれる。幹細胞を単離および培養する方法を含め、幹細胞の説明は、とりわけ、Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weisman et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387-403; Pittinger et al., Science, 284:143-47, 1999; Animal Cell Culture, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al., PNAS 96(25):14482-86, 1999; Zuk et al., Tissue Engineering, 7:211-228, 2001(“Zuk et al.”); Atala et al., particularly Chapters 33-41; ならびにU.S. Pat. No. 5,559,022、U.S. Pat. No. 5,672,346およびU.S. Pat. No. 5,827,735に見出され得る。

【0073】

細胞個体発生の文脈では、用語「分化する」または「分化している」は、「分化細胞」

が、その前駆細胞よりも発生経路をさらに下流に進行した細胞であることを示す相対的な用語である。したがって、いくつかの態様では、本明細書において定義される用語としての幹細胞は、系列限定された前駆細胞（ヒト心臓前駆細胞または中原始線条心原性中胚葉前駆細胞など）に分化することができ、次いで、経路をさらに下流に進んで他の種類の前駆細胞（組織特異的前駆細胞、例えば心筋前駆細胞など）に、次いで、ある特定の組織型に特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力を保持する場合または保持しない場合がある最終段階分化細胞に分化することができる。心筋細胞への幹細胞のインビトロ分化の方法は、当技術分野において公知であり、および/または本明細書において以下に記載されている。細胞の分化状態は、一般に、特徴的な遺伝子またはマーカーの発現パターン、代謝活性、および形態のうちの1つまたは複数によって決定される。

10

【0074】

本明細書において使用される用語「多能性」は、様々な条件下で、3つすべての生殖細胞層（内胚葉、中胚葉および外胚葉）に特徴的な細胞型に分化する能力を有する細胞を指す。多能性細胞は、主に、例えばヌードマウステトラマ形成アッセイを使用して、3つの胚葉いずれにも分化するそれらの能力によって特徴付けられる。多能性はまた、胚性幹（ES）細胞マーカーの発現によっても証明されるが、好ましい多能性試験は、3つの胚葉の各々の細胞へと分化する能力の実証である。

【0075】

当技術分野において公知の方法によって調製された幹細胞由来心筋細胞は、一般に、成体組織由来の心筋細胞よりも胎児心筋細胞に類似した表現型を有する。本明細書において記載するように、ナノパターン化基材上で培養し、甲状腺ホルモンT3およびLet7iマイクロRNAにより処理することによって、幹細胞由来心筋細胞は、成熟度の高い表現型、すなわち、甲状腺ホルモンT3またはLet7iマイクロRNA処理を用いず非パターン化基材上で培養された同じ細胞よりも出生後組織または成体組織の心筋細胞にさらに類似した表現型に誘導することができる。また、胎児または成体組織から初代心筋細胞を培養すると、本明細書に記載の条件から利点を得ることができ、成熟度の高い表現型を示すか、他の条件よりも長く心筋細胞の表現型を維持することが予測される。培養心筋細胞の文脈では、「成熟度の高い表現型」とは、本明細書に記載の甲状腺ホルモンT3およびLet7i処理を用いず非パターン化表面上で培養された同じ心筋細胞と比較して、本明細書に記載の甲状腺ホルモンT3およびLet7i処理を用いてナノパターン化基材上で培養された幹細胞由来心筋細胞では、サルコメア長、Zバンド幅、収縮速度、電場電位持続時間、上昇速度、心筋細胞直径、心筋細胞長およびミトコンドリア容量のうちの1つまたは複数における1つまたは複数の表現型特性が増大する（本明細書において定義されるように）ことを意味する。いくつかの態様では、本明細書に記載の甲状腺ホルモンT3およびLet7i処理を用いず非パターン化表面上で培養された同じ心筋細胞と比較して、本明細書に記載の甲状腺ホルモンT3およびLet7i処理を用いてナノパターン化基材上で培養された幹細胞由来心筋細胞では、サルコメア長、Zバンド幅、収縮速度、電場電位持続時間、上昇速度、心筋細胞直径、心筋細胞長およびミトコンドリア容量のそれぞれが増大する。いくつかの態様では、サルコメア長、Zバンド幅、収縮速度、電場電位持続時間、上昇速度、心筋細胞直径、心筋細胞長およびミトコンドリア容量のうちの1つまたは複数の増大は、甲状腺ホルモンT3およびLet7i miRNA処理を用いずナノパターン化基材上で培養された幹細胞由来心筋細胞と比較して、あるいは、甲状腺ホルモンT3およびLet7i miRNAの両方ではなく、いずれかを用いてナノパターン化表面上で培養された幹細胞由来心筋細胞と比較して生じる。

20

30

40

【0076】

「成熟度の高い表現型」の証拠にはまた、例えば、Let7i miRNAまたは甲状腺ホルモンT3を用いず平坦な表面上で培養された幹細胞由来心筋細胞での発現に対して少なくとも1.5倍の、または甲状腺ホルモンT3およびLet7i miRNAの両方ではなく、いずれかを用いてナノパターン化表面上で培養された幹細胞由来心筋細胞での発現と比較して少なくとも10%の、毛成長関連遺伝子HR（リジンデメチラーゼおよび核内受容体コリプレッサー）、Krupel様因子KLF9、シトクロムcオキシダーゼサブユニット6A2（COX6A2）、ミオシン軽鎖2（M

50

YL2) およびMYOM3を含む1つまたは複数の遺伝子のアップレギュレートまたは発現増加も含まれ得る。

【0077】

本明細書に記載の「成熟幹細胞由来心筋細胞」または「成人表現型を有する心筋細胞」は、成人発症型筋疾患を有する対象に由来する場合、または成人発症型の表現型を伴う筋疾患の疾患モデルを提供するように修飾された幹細胞に由来する場合、成人発症型筋疾患の疾患表現型を示す。例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象に由来するか、ジストロフィン遺伝子を変異させるように修飾された幹細胞に由来する幹細胞由来心筋細胞は、本明細書に記載の成熟促進条件（すなわち、甲状腺ホルモンT3およびLet7i miRNAを用いたナノパターン化基材）では、同じ細胞が甲状腺ホルモンT3またはLet7i miRNAを用いず平坦な表面上で培養された場合には見られない拍動数変動によって明らかな不整脈を発現する。

10

【0078】

本明細書において使用される用語「リプログラミング」は、分化細胞（例えば、体細胞）の分化状態を変更または逆転させるプロセスを指す。別の言い方をすれば、リプログラミングとは、細胞の分化をさらに未分化なまたはさらに原始的なタイプの細胞へと逆行させるプロセスを指す。リプログラミングされる細胞は、リプログラミングの前に部分的にまたは最終的に分化され得る。いくつかの態様では、リプログラミングとは、分化細胞（例えば、体細胞）の分化状態の多能性状態への完全な逆転を包含する。いくつかの態様では、リプログラミングとはまた、分化細胞（例えば、体細胞）の分化状態の多能性状態への部分的な逆転を包含する。いくつかの態様では、リプログラミングとは、分化細胞（例えば、体細胞）の分化状態の未分化細胞への完全または部分的な逆転を包含する。リプログラミングとはまた、体細胞の分化状態を部分的に逆転させて、追加の操作を受けた際に細胞が多能性状態に完全にリプログラミングされやすくなる状態にすることを包含する。

20

【0079】

リプログラミングには、接合子が成体に発達する際の細胞分化の間に生じる核酸修飾（例えばメチル化）、クロマチン凝縮、エピジェネティック変化、ゲノムインプリンティングなどの遺伝性パターンのうちの少なくともいくつかの修飾、例えば、逆転が含まれる。

【0080】

本明細書において使用される用語「hPSC細胞」および「ヒト多能性幹細胞」は、区別なく使用され、分化した体細胞から人工的に誘導された多能性細胞を指す。hPSC細胞は、心臓系統の細胞、ならびに様々なタイプの成熟細胞を含め、自己再生、および細胞運命に係る幹細胞への分化が可能である。

30

【0081】

幹細胞に関して使用される用語「に由来する」は、ある幹細胞表現型への分化細胞のリプログラミングによって、その幹細胞が生成されたことを意味する。分化細胞に関して使用される用語「に由来する」は、細胞が幹細胞の分化、例えば、インビトロ分化の結果であることを意味する。

【0082】

本明細書において使用される用語「基材」は、広義では、細胞を培養することができる生体適合性マトリックス、足場などを含む組成物を指す。単層または3次元培養（浮遊培養とは対照的に、接着性の）で増殖可能な細胞は、一般に、基材に付着する。本明細書に記載のナノパターン化基材は、インビボで心筋細胞に類似する形態学的特性および機能特性をとるように心筋細胞を促進する構造的キューを提供する。特定の態様では、基材は、合成または半合成材料を含む。特定の態様では、基材は、ポリマー足場などのフレームワークまたは支持体を含む。

40

【0083】

本明細書において使用される用語「ナノパターン化基材」は、1000ナノメートル未満の幅および高さを有する隆起部および溝の平行なアレイを有するパターン化表面を指す。深さまたは幅が約50~100ナノメートル未満のパターン化であると、さらに大きなナノスケ

50

10
20
30
40
50

は950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは600ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは700ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは800ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは900ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。例としてここに提供される寸法は、50または100nmの倍数でもあるが、50または100nmの倍数でもない他の寸法も、そのようなナノパターンを有する基材上で培養された幹細胞由来心筋細胞の表現型に利点をもたらし得ることが企図される。

10

20

30

40

50

【0084】

ナノパターン寸法の関連する差が、本明細書に記載の培養心筋細胞表現型の差をもたらすものであることを理解されたい。

【0085】

ナノパターン化基材は、ポリマー、ヒドロゲル、ポリジメチルシロキサン、プラスチック、ガラス、樹脂、マトリックス、またはナノパターン化の作製を可能にし、自然に、または表面処理もしくはコーティングの後に、幹細胞由来心筋細胞の付着を可能にする当技術分野において公知の任意の他の材料から構成され得る。心筋細胞の相互作用を促進することが望ましい場合、ナノパターン化基材は、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、または当技術分野において公知の他の細胞外マトリックス材料などの細胞外マトリックスタンパク質によりコーティングすることができる。

【0086】

本明細書において使用される用語「作用物質」は、限定されることなく、小分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬物、イオンなどを含む任意の化合物または物質を意味する。「作用物質」は、限定されることなく、合成および天然のタンパク質性および非タンパク質性の実体を含む任意の化学物質、実体または部分であり得る。いくつかの態様では、作用物質は、限定されることなく、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リボタンパク質ならびにそれらの修飾および組合せを含む核酸、核酸類似体、タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマー、ヌクレオチドのオリゴマー、アミノ酸、または炭水化物である。特定の態様では、作用物質は、マクロライド、レプトマイシン、および関連する天然産物またはその類似体を含む非置換もしくは置換アルキル、芳香族、またはヘテロシクリル部分を含む化学部分を含むか、それらからなる小

分子である。作用物質は、所望の活性および/または特性を有することが知られていてもよい、多様な化合物のライブラリーから選択されてもよい。

【0087】

本明細書において使用される用語「小分子」は、1モル当たり約5,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物（ヘテロ有機および有機金属化合物を含む）、1モル当たり約1,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、1モル当たり約500グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に許容される形態を含み得る化学作用物質を指す。

【0088】

用語「心毒性」は、限定されることなく、収縮、生体電位もしくは電気生理学的特性もしくはそのリズム、または適切な心機能に必要な遺伝子発現を含め、心筋細胞の生存率、構造または機能のうちの1つまたは複数を阻害する薬物または作用物質の特性を指す。

10

【0089】

本明細書において使用される用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は、一般に、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これらには非修飾RNA、非修飾DNA、修飾RNA、および修飾DNAが含まれる。ポリヌクレオチドには、限定されることなく、一本鎖および二本鎖のDNAポリヌクレオチドおよびRNAポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において使用されるポリヌクレオチドという用語は、化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態のポリヌクレオチド、ならびに、例えば、単純な（原核生物の）細胞および複雑な（真核生物の）細胞を含め、ウイルスおよび細胞に見出されるか、それらに特徴的な天然に存在する化学的形態のDNAおよびRNAを包含する。本明細書に記載の核酸ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、その同族の相補鎖にハイブリダイズする能力を保持している。

20

【0090】

したがって、本明細書において使用される用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」はまた、プライマーおよびプローブ、ならびにオリゴヌクレオチド断片を包含し、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、およびプリンもしくはピリミジン塩基または修飾されたプリンもしくはピリミジン塩基（限定されることなく、塩基脱落部位を含む）のN-グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチドの総称である。用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」の間には長さの区別は意図されておらず、これらの用語は区別なく使用される。これらの用語は、分子の一次構造のみを指す。オリゴヌクレオチドは、任意の既存のまたは天然の配列に必ずしも物理的に由来するわけではなく、化学的合成、DNA複製、DNA増幅、インビトロでの転写、逆転写、または任意のそれらの組合せを含む任意の方法で生成することができる。

30

【0091】

本明細書に記載の「遺伝的に修飾された細胞」とは、異種遺伝物質または構築物のいずれかを有するか、例えば、限定されることなく、部位特異的変異を含む変異によって操作されたゲノムを含む細胞である。異種遺伝物質の導入は、一般に、非修飾細胞と比較して遺伝子またはタンパク質発現に変化をもたらす。RNAの導入は、細胞内で統合または複製しないベクターの導入と同様に、外来性または異種性産物の発現を一時的に促進することができる。細胞のゲノムに組み込まれるか、細胞の核酸とともに複製する構築物の導入は、連続的な細胞分裂を通して安定性が高い。一態様では、遺伝的修飾は、体細胞をiPS細胞表現型などの幹細胞表現型にリプログラムする1つまたは複数の構築物の導入に加えられるか、それとは別個である。別の態様では、遺伝的修飾は、Let7i miRNAまたはそれをコードする構築物の導入に加えられるか、それとは別個である。遺伝的修飾には、限定されることなく、ウイルスベクターを介した遺伝物質の導入、またはCRISPR/Cas、もしくは部位特異的組換えのための同様のシステムを使用する修飾が含まれ得る。

40

【0092】

本明細書において使用される用語「機能アッセイ」は、細胞活性の測定により、とりわ

50

け細胞の遺伝子発現、代謝、発達状態または成熟度など、細胞の特性を評価する試験を指す。機能アッセイには、例えば、細胞生存率の測定（例えば、色素排除、栄養摂取および/または変換、代謝産物産生などによる）、電位または他の電気生理学的特性の測定、収縮強度、速度またはリズムの測定、ミトコンドリア機能の測定などが含まれる。

【0093】

本明細書において使用される用語「疾患モデル」は、ヒト疾患の1つまたは複数の側面を再現する動物または細胞培養系を指す。疾患の動物モデル、例えば、マウスまたはラットモデルは、疾患関連遺伝子への1つまたは複数の変異、または1つまたは複数の疾患関連産物を発現する異種構築物の導入により、多くの場合ヒト疾患にかなりよく類似する。ヒト疾患の細胞培養モデルには、疾患を有するヒト対象由来の細胞、または1つまたは複数の疾患関連遺伝子を発現するか、それらの発現に干渉するように修飾されたヒトもしくは他の細胞が含まれ得る。一例として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有するヒト由来のhPSC、またはジストロフィン遺伝子が不活性化された細胞由来のhPSCは、心筋細胞に分化され、成熟度を促進するために本明細書において記載されるように処理されると、顕著な不整脈によって特徴付けられるDMD心筋症の細胞培養モデルを提供することができる。

10

【0094】

本明細書において使用される「マーカー」は、所与の細胞の表現型に寄与するか関連する1つまたは複数の特性を指す。マーカーは、関心対象の特性を含む細胞を選択するのに使用することができる。マーカーは特定の細胞によって異なり、形態学的、機能的または生化学的であるかどうかにかかわらず、細胞もしくは組織型、または疾患状態もしくは表現型に特有であり、細胞外および細胞内分子の両方、例えば、細胞または組織によって発現または示されるタンパク質、RNA、グリコシル化パターンなどを含む特性であり得る。いくつかの態様では、このようなマーカーは、限定されることなく、抗体、または当技術分野において利用可能な他の結合分子に対するエピトープを有するタンパク質をはじめとするタンパク質である。他のマーカーには、とりわけ、ペプチド、脂質、多糖類、核酸およびステロイドが含まれる。形態学的特性または形質の例には、限定されることなく、形状、サイズ、および核対細胞質比が挙げられる。機能特性または形質の例には、限定されることなく、特定の基材に接着する能力、特定の色素を取り込むまたは排出する能力、特定の条件下で移動する能力、特定の系統にそって分化する能力、収縮、拍動などが挙げられる。マーカーは、当業者が利用可能な任意の適切な方法により検出することができる。

20

30

【0095】

本明細書において使用される用語「電気生理」または「生体電位」は、細胞の電気特性を指す。具体的には、これらの用語は、細胞を通るイオン電流の流れ、および例えば細胞間接触によって伝達される電気信号に関するイオンチャネル挙動の特性を説明する。限定されることなく、全細胞パッチクランプ電気生理学的記録（自動または手動）、微小電極アレイ、カルシウムイメージング、光学マッピング、またはxCeIlIgence（商標）リアルタイム細胞分析（Acea Biosciences, Inc., San Diego, CA）を含む多数の手法によって、生体電位または電気生理学的特性を測定することができる。

【0096】

「電気機械的刺激」は、細胞または細胞集団と接触する基材によって生成される電位のいずれかの変化であり、および/または細胞への機械的運動または刺激をさらに生じさせる。電気的および機械的刺激は、同時に（フェーズ内で）、または異なる時間に（フェーズ外で）、装備された基材によって生成され得る。機械的刺激の非限定的な例には、伸張、剛性の変化、相変化剤、圧力、振動、または当技術分野において公知の任意の他のタイプの機械的刺激が挙げられる。

40

【0097】

本明細書において使用される用語「装備された」は、基材に関して使用される場合、測定、試験、制御、または刺激などの特定の機能を行うように適合または設計された基材または装置を指す。装備された基材の例は、ナノパターン化微小電極アレイである。

【0098】

50

「微小電極アレイ」、「多電極アレイ」、または「MEA」は、電極アレイと接触している細胞の生体電位を測定する、および/またはアレイと接触している細胞に電気刺激を提供することができる、マイクロサイズまたはナノサイズのワイヤ電極のアレイを有する装置である。MEAの電極は、典型的には、酸化インジウムスズ、チタン、または金から構成されるが、他のタイプの導電性材料、または導電性および非導電性材料を含む組成物から構成されてもよい。MEAは、例えば、組織または操作された組織（例えば、ナノパターン化基材と接触している幹細胞由来心筋細胞）の電場電位を決定または操作するためのインビトロ試験に使用される。

【0099】

本明細書において使用される用語「減少」、「低減」、「低下」、「減少する」、または「阻害」は、一般に、統計的に有意な量の減少を指す。ただし、誤解を避けるために、「低減」、「低下」または「減少」または「阻害」とは、基準レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば少なくとも約20%の減少、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%もしくは最大100%の減少（例えば、基準試料と比較して存在しないレベル）、または基準レベルと比較して10~100%のいずれかの減少を意味する。

【0100】

本明細書において使用される用語「増加」、「増加する」、または「増強」、または「活性化」は、一般に、統計的に有意な量の増加を指す。ただし、誤解を避けるために、用語「増加」、「増加する」または「増強」または「活性化」とは、基準レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば少なくとも約20%の増加、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%もしくは最大100%の増加もしくは基準レベルと比較して10~100%のいずれかの増加、または基準レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍もしくは少なくとも約10倍以上の増加を意味する。

【0101】

本明細書において使用される用語「調節」は、それらの用語が本明細書で定義されるように、所与のパラメータを増加または減少させることを含む効果を指す。

【0102】

本明細書において使用される用語「機能特性」は、心筋細胞または心筋細胞の培養物に適用される場合、心筋細胞機能または成熟心筋細胞機能の尺度として本明細書において記載されるパラメータのいずれかを指す。「機能特性の変化」は、機能特性の統計的に有意な増加または減少によって示される。

【0103】

本明細書において使用される「筋疾患または筋障害」とは、疾患もしくは障害の主な影響として、または筋機能に影響を及ぼす他の系に対する疾患もしくは障害の影響の結果として、正常な筋機能に悪影響を及ぼすものである。心疾患または心障害は、心筋の適切な機能に必然的に影響を及ぼし、限定されることなく、それらには、心不整脈、心筋症（例えば、肥大型および拡張型）、QT延長症候群、不整脈源性右室異形成（ARVD）、カテコールアミン誘発性多形性心室性頻拍（CPVT）、またはパース症候群が含まれる。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、心筋機能に後期に影響を及ぼす。

【0104】

用語「統計的に有意」または「有意に」は、統計的有意性を指し、一般に、基準に対する2標準偏差（2SD）の変化を意味する。この用語は、そこに差が存在するという統計的証拠を指す。これは、帰無仮説が実際に真であった場合に、その帰無仮説を却下する判定を下す蓋然性と定義される。

【0105】

本明細書において使用される用語「収縮性」は、心筋細胞を含む筋細胞の挙動を指し、

10

20

30

40

50

それにより、それらは単独で、またはさらに多くの場合、群で収縮する。収縮性は、収縮率または弛緩率、および例えば収縮力の観点から測定することができる。複数の細胞の収縮性は、力の伝達の生物物理学的および生体力学的特性によって測定される。収縮性は、上記心細胞の単層または多層の位相差顕微鏡、および力変換器を使用した直接力測定により較正される計算分析を使用して測定される。

【0106】

用語「組織」は、特定の特別な機能をとともに実行する同様に特殊化された細胞の群または層を指す。用語「組織特異的」は、特異的な組織由来の細胞の供給源または定義特性を指す。

【0107】

本明細書において使用される語句「心血管症状、疾患または障害」は、不十分な、望ましくない、または異常な心筋機能によって特徴付けられるあらゆる障害、例えば、不整脈、虚血性心疾患、高血圧性心疾患および肺高血圧性心疾患、先天性心疾患、ならびに対象、特にヒト対象の心筋系の不全につながるあらゆる症状を含むことが意図される。不十分または異常な心筋機能は、疾患、傷害および/または加齢の結果である場合がある。

【0108】

本明細書において、冠詞 (a, an) は、冠詞の文法的対象の1つまたは複数 (例えば、少なくとも1つ) を指すために使用される。例として、「要素」とは、1つの要素または複数の要素を意味する。

【0109】

動作例以外、または他に示されている場合を除き、本明細書において使用される寸法、成分の量、または反応条件を表すあらゆる数字は、用語「約」によっていずれの場合も修飾されると理解されるべきである。用語「約」は、割合に関連して使用される場合、 $\pm 1\%$ を意味し得る。ナノパターン寸法に関連して使用される場合、用語「約」は、所与のパターンに対して達成可能な分解能内の変動を指す。例えば、パターン生成のために達成可能な分解能が $\pm 50\text{nm}$ 以内である場合、 600ナノメートル の寸法は、 $550\text{ナノメートル} \sim 650\text{ナノメートル}$ を包含すると理解されるべきである。当業者であれば、ナノパターンを生成する様々な方法が様々な分解能を有することを理解し、所与の方法の分解能が何であるかを理解するであろう。

【0110】

本明細書において使用される用語「含む (comprising)」は、提示された定義された要素に加えて他の要素も存在し得ることを意味する。「含む」の使用は、限定ではなく包含を示す。すなわち、用語「含む」は、「主に含むが、必ずしもそれだけではない」ことを意味する。さらに、「含む」という語の変形、例えば、「含む (comprise)」および「含む (comprises)」はそれに応じた同じ意味を有する。ある点では、本発明に必須である、本明細書に記載の組成物、方法、およびそれらのそれぞれの構成要素に関連する本明細書に記載の技術は、必須であるかどうかを問わず、特定されていない要素の包含を受け入れる (「含む」)。

【0111】

用語「から本質的になる」は、「原則として少なくとも1つのみを含むが、必須ではない」を意味し、したがって、「1つまたは複数の選択、および任意の組合せ」を意味することを意図する。すなわち、他の要素が本発明の基本的かつ新規な特性に実質的に影響を及ぼさないものに限定されるならば、他の要素を組成物、方法、またはそれらのそれぞれの構成要素の説明に含めることができる (「から本質的になる」)。これは、記載された方法内の工程、ならびにその中の組成物および構成要素に等しく適用される。

【0112】

本発明、組成物、方法、およびそれらのそれぞれの構成要素に関して本明細書において使用される用語「からなる」は、構成要素、組成物または方法に必須の要素と見なされない任意の要素を除外することを意図する。

【0113】

心筋機能および筋疾患

本明細書に記載の方法および組成物を使用して幹細胞から誘導することができる多くの種類のヒト筋細胞がある。

【0114】

筋細胞は、様々な細胞、組織、および器官レベルの機能を実行するために筋肉の収縮を促進するアクチンおよびミオシンのタンパク質フィラメントを含む軟組織細胞である。筋細胞は四肢の運動に必要であるだけでなく、とりわけ、消化器系を通る食物の移動、心臓の拍動、血圧を調節する血管の収縮および拡張、出産時の子宮収縮、正常な視力のための虹彩の焦点合わせ、ならびに気道の収縮も含む。

【0115】

筋肉によって生成される力は、収縮中にアクチンフィラメントを横切ってミオシンタンパク質の頭部が移動することによって生成される。一連のシグナル伝達事象が筋細胞内で起こって、一般に以下を含む収縮が生じる:1) 近くの筋細胞および/またはニューロンの電気インパルスの刺激;2) 細胞の筋小胞体からのカルシウム放出を引き起こす細胞内カルシウムイオンの流入;3) カルモジュリンのカルシウム活性化;4) ATP存在下でのキナーゼ(例えばミオシン軽鎖キナーゼ、MLCK)によるミオシンのリン酸化;および5) ミオシン頭部とアクチンフィラメントとの間の「架橋」形成。これらのシグナル伝達事象は、筋収縮が正常に起こるために重要である。

【0116】

デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィーおよび肢帯型筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーは、小児患者では最も一般的な骨格筋疾患であり、例えば、ジストロフィンおよびその関連分子を含む遺伝子の遺伝的変異によって引き起こされる。これらの変性筋障害の主な症状には、進行性の筋肉消耗および筋力低下、バランス不良、頻回の転倒、歩行困難、あひる歩行、ふくらはぎ痛、限られた運動範囲、筋拘縮、垂れ下がった瞼(眼瞼下垂)、性腺萎縮、脊柱側弯症(脊椎の湾曲)、ならびに歩行不能が含まれる。多くの場合、筋壊死があり、これにより、血液中に大量の筋タンパク質クレアチンキナーゼが存在するようになる。

【0117】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、筋肉の遺伝性(X染色体)進行性変性であり、遺伝子産物、細胞骨格タンパク質ジストロフィンの欠如により生じ、出生男児の約3,500人に1人が罹患する。ジストロフィンの欠如は、この筋線維タンパク質をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる。ジストロフィン、ジストロフィン糖タンパク質複合体(DGC)と呼ばれる膜結合タンパク質の大きな複合体に結合する。ジストロフィンの欠如、および結合したDGCにより、筋肉の原形質膜の構造的完全性が損なわれ、筋壊死および再生の損傷サイクルが生じる。筋肉が絶え間なく損傷した後、筋細胞は最終的に非収縮性の線維組織または脂肪組織に置き換わる。DMD患者の骨格筋はゆっくりと進行性の損傷を受け、これにより疾患症状がもたらされる。

【0118】

骨格筋、横隔膜、および心筋が影響を受ける可能性がある。DMDは、重度の心血管機能障害も引き起こす骨格筋障害の一例である。DMD患者は、多くの場合、心不整脈または突然死により死亡する。これは、骨格筋機能と並行した心筋機能の進行性不全によるものである。もっとも、DMD患者では、心筋不全は疾患後期に発生し、一般に成人期に心臓の発病が始まる。

【0119】

心臓の電気生理学的機能および収縮機能は、厳密に制御されたプロセスである。心細胞または心組織でイオンチャネル調節または収縮機能が破壊されると、これにより、場合によっては致命的になり得る心不整脈が生じる可能性がある。限定されることなく、心不整脈、心筋症(例えば、肥大型および拡張型)、QT延長症候群、不整脈源性右室異形成(ARVD)、カテコールアミン誘発性多形性心室性頻拍(CPVT)、またはバース症候群を含む多数の疾患が心筋に影響を及ぼす。

10

20

30

40

50

【0120】

幹細胞由来心筋細胞は、これらの疾患および疾患表現型をモデル化するために使用されてきた (Itzhaki et al., Nature.2011; Moretti et al., NEJM.2010; Ma et al., European Heart Journal.2012; Kim et al. Nature.2013; Wang and McCain et al. Nature Medicine.2014; Jung et al. EMBO Molecular Medicine.2012)。しかし、既存のモデルではhPSC-CMの機能的成熟度は一般に不足しており、正常および病変hPSC-CMにわたって十分に制御されておらず、一貫性が保たれていない。hPSC-CM成熟のための品質管理基準および方法が必要である。例えば、疾患表現型が、必要に応じて、心疾患および心障害の成人発症を表して、これらの疾患および障害を効果的に治療するための治療法を特定することを確実にするために、hPSC-CM成熟の信頼できる方法が必要である。

10

【0121】

疾患モデリングとは別に、一般に心機能に関連しない疾患または障害の治療のための薬物または作用物質の心毒性が、試験中の薬物の失敗の一般的な理由である。心筋細胞の既存の細胞培養物が比較的胎児性であるか未成熟な表現型を有する傾向がある場合、それらは心組織に対する薬物のインビボ効果を正確に反映していない可能性が高い。本明細書に記載の方法および細胞培養プラットフォームは、この文脈における心毒性の評価にも利点を提供する。本明細書において提供される方法および組成物は、DMD心筋症などの疾患表現型の生成を可能にし、表現型の成人発症を有する他の心疾患および心障害に適用することができる。本明細書に記載の方法および組成物は、本明細書に記載の多数の機能アッセイに基づいて、成熟度の高い表現型を有し機能的に成熟したhPSC-CMを作製する。

20

【0122】

本明細書に記載の方法は、幹細胞を胎児様状態から成熟型の筋細胞または筋組織まで成熟させるために、Let7iマイクロRNAの代わりに細胞特異的マイクロRNAを使用して、他のタイプの筋細胞（例えば骨格筋）に適用できると考えられる。運動に重要な筋組織の一例が骨格筋である。骨格筋は、体性神経系の随意制御下にある横紋筋組織である。本明細書に記載の方法は、幹細胞由来骨格筋細胞により、DMDなどの筋疾患の疾患モデリングに適用できると考えられる。

【0123】

本明細書に記載の方法は、平滑筋に適用できるとさらに考えられる。平滑筋の非限定的な例には、眼の虹彩、肺の細気管支、喉頭筋（声帯）、胃の筋層、食道、消化管の小腸および大腸、尿管、膀胱の排尿筋、子宮筋層、陰茎、または前立腺の平滑筋が挙げられる。本明細書に記載のものに類似した幹細胞由来筋細胞成熟の方法を、幹細胞由来平滑筋細胞の成熟に適用できると考えられる。

30

【0124】

幹細胞由来心筋細胞の調製

したがって、一態様では、本明細書に記載の組成物および方法に使用するための心筋細胞は、心組織、すなわち初代心筋細胞から得ることができる。第1の事項として、本開示は、インビトロで幹細胞から分化した心筋細胞の使用に焦点を当てているが、甲状腺ホルモンT3およびLet7i miRNAを用いてナノパターン化基材上で培養することによって提供される心筋細胞表現型を維持または促進するためのキューは、初代細胞に利点をもたらすことができる。

40

【0125】

また、本明細書において記載されるのは、対象、患者またはドナーに由来する体細胞から始まる幹細胞由来心筋細胞の作製方法である。体細胞は、人工多能性幹細胞（iPS細胞、iPSC）にリプログラミングされ、次いで、これが心筋細胞に分化する。したがって、本明細書において記載されるのは、体細胞をiPS細胞にリプログラミングする方法であり、また、本明細書において記載されるのは、iPS細胞を幹細胞由来心筋細胞（例えば、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞、hPSC-CM）に分化させる方法である。胚性幹細胞を心筋細胞に分化させる方法は当技術分野において公知であり、iPS細胞を心筋細胞に分化させる方法とほぼ類似している。

50

【0126】

iPS細胞にリプログラミングするための体細胞の供給源

幹細胞由来心筋細胞は、心筋細胞系統に沿って分化する、多能性幹細胞表現型に誘導されたドナー細胞から作製される。非限定的に、iPS細胞は、ヒトに加えて任意の動物から作製することができる。いくつかの態様では、細胞ドナーは哺乳動物である。通常、動物とは、霊長類、齧歯類、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えばアカゲザルが含まれる。齧歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、家ネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚、例えば、マス、ナマズおよびサケが含まれる。細胞ドナー、患者、または対象は、所与の用途に適切な前述のサブセットのいずれかを含むことができる。本明細書に記載の局面の特定の態様では、対象は哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトである。

10

【0127】

iPS細胞はまた、ドナー幹細胞から作製することができる。例示的な幹細胞には、成体幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞、筋幹細胞、内皮前駆細胞、骨髄幹細胞、軟骨形成幹細胞、リンパ幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、中枢神経系幹細胞、末梢神経系幹細胞などが含まれる。幹細胞を単離および培養する方法を含む幹細胞の説明は、とりわけ、Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weisman et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387-403; Pittinger et al., Science, 284:143-47, 1999; Animal Cell Culture, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al., PNAS 96(25):14482-86, 1999; Zuk et al., Tissue Engineering, 7:211-228, 2001 (“Zuk et al.”); Atala et al., particularly Chapters 33-41; ならびにU.S. Pat. No. 5,559,022、U.S. Pat. No. 5,672,346およびU.S. Pat. No. 5,827,735に見出すことができる。

20

【0128】

なお多くの場合、iPS細胞は、限定されることなく、線維芽細胞、間質細胞、筋細胞、または成体生物の多数の組織のいずれかの細胞をはじめとする有核体細胞などの分化したドナー細胞から作製される。実際、本明細書に記載の実施例は、尿から単離され、iPS細胞にリプログラムされたヒト細胞を使用する（実施例および例えばZhou et al., J. Urology, 2012; Guan et al., Stem Cell Research, 2014を参照されたい）。ドナー細胞は、他の方法の中でも特に、皮膚生検、尿試料、または採血によって対象から得ることができる。

30

【0129】

いくつかの態様では、iPS細胞は、心細胞、例えば心臓線維芽細胞から、または対象、例えばヒト対象を含む哺乳動物対象から得られた心室心筋細胞からリプログラムすることができる。心組織の好適な供給源から得られた細胞の混合物は、当技術分野において公知の方法によって哺乳動物ドナーから収集することができる。心組織は解離され、培養液に細胞が播種される。心臓線維芽細胞は培養皿の表面に接着し、心臓線維芽細胞を収集してiPS細胞にリプログラムすることができる。

40

【0130】

iPS細胞への体細胞のリプログラミング

分化細胞をiPS細胞にリプログラミングする方法は、当技術分野において周知であり、一般に、細胞内でのOct 3/4、Sox2、Klf4、およびc-Mycの強制発現を伴うが、当技術分野においては多数の変形例が公知である。例えば、本明細書において提供される実施例では、ヒトOct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Mycをコードする多シストロン性レンチウイルスベクターを使用して、クリーンキャッチ尿試料から収集した細胞をiPSCにリプログラムした。hiPSCは、本明細書に記載の方法、または細胞生存率および未分化の多能性表現型の維持に有利な他の条件に従って培養、拡大および継代される。hiPSCは、例えば低酸素状態（例えば、37°C、5%CO₂、5%O₂）で維持される。

50

【0131】

非限定的に、iPS細胞はまた、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる国際特許出願WO2010/019569、WO2009/149233、WO2009/093022、WO2010/022194、WO2009/101084、WO2008/038148、WO2010/059806、WO2010/057614、WO2010/056831、WO2010/050626、WO2010/033906、WO2009/126250、WO2009/143421、WO2009/140655、WO2009/133971、WO2009/101407、WO2009/091659、WO2009/086425、WO2009/079007、WO2009/058413、WO2009/032456、WO2009/032194、WO2008/103462、JP4411362、EP2128245、ならびに米国特許出願US2004/0072343、US2009/0253203、US2010/0112693、US2010/07542、US2009/0246875、US2009/0203141、US2010/00625343、US2009/0269763、およびUS2010/059806に記載の方法を含め、限定されることなく、非ウイルス法、多シストロン性ベクター、mRNA種、miRNA、およびタンパク質の使用を含む他の方法を使用して作製することができる。いずれの組織も、心筋細胞に分化するためのiPS細胞を生成するための供給源細胞を提供することができるが、iPS細胞由来心筋細胞を生成するために本明細書に記載の方法に使用される場合、心組織由来の細胞であれば、成熟心筋細胞の生成の増強を可能にする利点、例えば、エピジェネティックメモリーを有し得ると考えられる。

10

【0132】

幹細胞から幹細胞由来心筋細胞への分化

本明細書において記載されるように、心筋細胞への分化のための調製では、iPSCは、細胞解離試薬（例えば、トリプシンまたはエチレンジアミン四酢酸）を使用して単一細胞に解離され、幹細胞培養培地（Current Protocols in Stem Cell Biology.2:1C.2.1-1C2.16, 2007を参照）中でマトリックスコーティング（例えば、Matrigel（商標）コーティング）プレート上に播種される。iPS細胞の標準的な単層培養では、他の細胞外マトリックスタンパク質表面処理を使用することができる。培養皿の表面処理の非限定的な例には、タンパク質またはそれらの混合物、例えば、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチンなどが挙げられる。

20

【0133】

心筋細胞への分化のためにiPS細胞を調製するために、iPS細胞は高密度（250,000細胞/mm²以上）で播種される。単層が形成されると、本明細書の実施例に記載されるように、または例えば、Macadangdang J, et al., Cell. Mol. Bioeng. 8:320-332（2015）に記載されるように、細胞は心筋細胞に分化することができる。多能性幹細胞（iPSまたはES細胞）を心筋細胞に分化させるための、当技術分野において公知の他の手法も使用することができる。

30

【0134】

いくつかの態様では、iPS細胞は、多能性状態の後または最中に遺伝的に修飾される。例えば、CRISPR-Cas技術を使用して疾患モデル細胞株（例えば、DMD変異体ヒトiPS細胞）を作製して、正常な親細胞株（例えば、UC3-4）から同質遺伝子対（isogenic pair）を作製することができる。限定されることなく、ウイルスベクターの導入、リボソーム媒介トランスフェクション、マイクロインジェクションなどを含め、iPSまたはドナー細胞を遺伝的に修飾するための他の手法も使用することができる。遺伝的修飾には、1つまたは複数の因子の発現を増加させる変化、または逆に1つまたは複数の因子の発現を不活性化もしくは阻害する変化の両方が含まれ得る。

40

【0135】

CRISPR-Cas手法では、遺伝子を変異させるために、標的ジストロフィン遺伝子の筋肉特異的エクソンを標的とするガイド配列が使用される。次いで、当技術分野において公知の配列決定方法によって変異が確認される。次いで、疾患モデル細胞株は、本明細書に記載の正常または野生型細胞株と同じ方法および条件で維持される。

【0136】

幹細胞由来心筋細胞成熟のための甲状腺ホルモンおよびLet7iマイクロRNA処理

本明細書に記載の方法および組成物は、幹細胞由来心筋細胞の成熟のためのLet7iマイクロRNAおよび甲状腺ホルモンT3の送達を含む。

【0137】

50

甲状腺ホルモンおよびLet7i miRNAの送達

Let7i miRNA

Let7i miRNAの送達に関して、用語「接触」、「送達する」または「送達」は、細胞外からのLet7i miRNAの送達、および細胞内からの送達の両方を包含することを意図する。例えば、miRNAは、細胞外から、例えば脂質複合体（例えばリポソーム）に導入することができる。あるいは、miRNAは、外因性構築物、例えば、ウイルスまたは他の発現ベクターからの細胞内での発現により送達され得る。そのような構築物は、エピソームであっても、細胞のゲノム内に安定して組み込まれてもよい。一態様では、心筋細胞をLet7i miRNAと接触させる工程は、構築物からLet7iを安定に発現する心筋細胞の使用を含む。また、内因性Let7i miRNA遺伝子配列の発現をアップレギュレートして、Let7i miRNAの送達を行うことも考えられる。

10

【0138】

ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3、およびLet7i miRNAの組合せは、幹細胞由来心筋細胞の効率的な成熟をもたらす、これらの様々な刺激のタイミングが成熟に影響を及ぼし得る。一態様では、インビトロ分化心筋細胞は、少なくとも、それらが非パターン化基材上で拍動単層を形成し、心筋トロポニンTを発現する時点で、Let7i miRNAをコードするウイルスベクターに感染させる。タイミングは様々であり得るが、一態様では、これは分化誘導の約15日後である。次いで、培地に甲状腺ホルモンT3を加え、ナノパターン化基材に細胞を導入する。理論に束縛されることを望まないが、Let7i miRNAの1つの機能は、甲状腺ホルモンT3の作用を少なくとも部分的に阻害することであると考えられており、甲状腺ホルモンT3は成熟に有益な影響を及ぼすが、長期曝露後の有害な影響を含むことが分かっている。この状況では、Let7i miRNAは甲状腺ホルモンの前ではなく後に投与された場合に最良の利点をもたらすと予測され得る。ただし、ウイルスベクターからのLet7i miRNAの発現は、導入遺伝子の発現を確立する際に若干の遅延を伴う。miRNAをさらに迅速に提供するLet7i miRNA送達の他の手段は、甲状腺ホルモンと同時にまたはその後に投与された場合に効果的であり得ると考えられる。

20

【0139】

甲状腺ホルモンT3

甲状腺ホルモンT3またはトリヨードチロニン（本明細書において単に「T3」とも呼ばれる）は、甲状腺によって産生および放出されるチロシンベースのホルモンである。T3は、インビボで代謝、成長および発達、体温、ならびに心拍数の調節に主に関与する。T3は、標的細胞内の核内ホルモン受容体に結合し、標的細胞内では、甲状腺ホルモン受容体が代謝、細胞増殖および発達に関与する遺伝子の調節領域の応答要素に結合して、それを介して転写を活性化する。ほとんどの細胞型では、T3は、典型的には、基礎代謝率の増加をもたらす、これにより身体の酸素およびエネルギー消費を全体的に増加させることができる。

30

【0140】

心臓では、甲状腺ホルモンT3は、心筋のミオシンおよび アドレナリン受容体レベルを増加させることにより、心拍数および収縮力を増加させ、心拍出量を増加させる。さらに、T3の作用により、心電図上のQRS群間の時間を短縮することができる（これは、甲状腺機能亢進症の動物モデルにより実証されている）。T3はまた、幹細胞由来心筋細胞のカルシウム処理を改善することができる。出生後、甲状腺ホルモンT3の血清中濃度は直ちに急上昇する。これにより、乳児の心臓のその後の成熟、および収縮機能の改善が可能になる。

40

【0141】

本明細書において提供される実施例では、20ng/mlの濃度の甲状腺ホルモンT3が、心筋細胞の成熟に有益な効果をもたらすことが実証されている。しかし、濃度は、例えば1ng/ml ~ 50ng/ml、またはその間の任意の濃度に変化し得る。さらに、甲状腺ホルモンT3はホルモンの代謝的に活性な形態であるが、細胞がT4形態を脱ヨウ素化する能力を有することを条件として、細胞のデヨードナーゼ酵素によって活性なT3形態に脱ヨウ素化される甲状

50

腺ホルモンT4を使用することできると考えられる。T4の脱ヨウ素に関与するデヨードナーゼ酵素はセレンを含有するため、セレンを含有する培地はこの活性を促進することができる。甲状腺ホルモン受容体活性を促進する甲状腺ホルモンT3の類似体も、本明細書に記載の心筋細胞成熟プロセスでの使用が企図される。例には、3,3',5'-トリヨードサイロ酢酸 (Triac)、3,3',5,5'-テトラヨードサイロ酢酸 (Tetrac)、3,5-ジヨードサイロプロピオン酸 (DIPTA) およびデキストロ (D) -T4 (チロキシン) が挙げられる。類似体、およびそれらが活性についてどのようにアッセイされるかは、例えば、Shoemaker et al., Endocrin. Pract. 18:954-964 (2012)、および Groeneweg et al., Mol. Cell. Endocrinol. 458:82-90 (2017) に記載されている。

【0142】

T3は、T3産生甲状腺濾胞細胞、例えば細胞株PCCL3の培養物から得られた馴化培地の使用を通じて提供できると考えられる (Palmero et al. Mol. Cell. Endocrinol. 376:12-22 (2013))。

【0143】

Let-7i miRNA

miRNAは、キャップされポリアデニル化された一次転写物 (pri-miRNA) の一部としてRNAポリメラーゼIIにより転写される。一次転写物は、DroshaリボヌクレアーゼIII酵素によって切断されて、約70-ntのステムループ前駆体miRNA (pre-miRNA) を生じる。pre-miRNAは細胞質Dicerリボヌクレアーゼによってさらに切断されて、成熟miRNAおよびアンチセンスmiRNA (時にmiRNAスターまたはmiRNA*として言及される) 産物を生じる。成熟したmiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれ、RISCは、miRNAとの不完全な塩基対形成により標的mRNAに結合し、最も一般的には、標的mRNAの翻訳阻害または不安定化をもたらす。

【0144】

脊椎動物では、マイクロRNAのLet7ファミリーは、種全体で保存された配列であり、最終分化を促進するための多くの発達過程に一時的に発現する。マイクロRNAのLet7ファミリーは、とりわけ、例えば、プロトオンコジーン、細胞周期調節因子、細胞増殖、アポトーシス、および免疫の調節因子、例えば、RAS、HMGA2、サイクリンA2、CDC34、オーロラAおよびBキナーゼ、E2F5、CDK8、CDC25A、CDK6、Casp3、Bcl2、Map3k1、Cdk5、サイトカイン、toll様受容体を含む多くの標的を有する。

【0145】

Let-7iは、他の遺伝子の中でも特に、甲状腺ホルモン受容体を含む多くの核内受容体の転写共抑制因子として作用する毛成長関連遺伝子HRの発現を調節する。

【0146】

Let-7ファミリーのメンバーは高度に保存された18ヌクレオチドのコア配列によって特徴付けられ、メンバーLet-7a、Let-7b、Let-7c、Let-7g、およびLet-7iは、正確な配列同一性を16ヌクレオチド配列

UGAGGUAGUAGUUUGU

で共有する。ヒトLet-7iは染色体12q14.1においてコードされる。ヒトLet-7i前駆体配列は、(5'-3') (SEQ ID NO:5):

CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG

GGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUG

CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG

である。

【0147】

ヒトLet-7i成熟型分子は、配列(5'-3') (SEQ ID NO:6):

UGAGGUAGUAGUUUGUGCU

およびその相補配列 (SEQ ID NO:7) を有する二重鎖である。

【0148】

10

20

30

40

50

下に示すLet-7a~Let-7iの成熟型の配列は、ファミリーの他のメンバーと比較して最も重要な変化が成熟型の配列の3'末端にあることを示している。そのため、3'末端またはその近くでのLet-7i分子の変化は、心筋細胞成熟におけるLet-7i分子の特異性または機能に影響を及ぼすことが予測される。対照的に、成熟型配列の5'末端または中心に向かう変化は、心筋細胞成熟における分子の機能を可能にするという点で許容される可能性が高くなる。Let-7 miRNAは、それらの標的配列と不完全な塩基対ハイブリダイゼーション相互作用を起こす傾向があり、これは、標的RNAとの100%の相補性は必要ないことを意味する。そのため、5個以下、例えば4個以下、3個以下、2個以下、または単一のヌクレオチド（好ましくは配列の5'またはより中央の領域における）の配列変化は、心筋細胞成熟における機能を維持しながら許容され得ると考えられる。ヒト成熟型配列と比較して2個以上の配列の相違がある場合、連続する相違が互いに隣り合っていないことが好ましくあり得、例えば、3個、4個、または5個の相違がある場合、それらは連続するヌクレオチドに存在しないことが好ましくあり得る。最後に、本明細書に記載の方法および組成物に関してLet-7i miRNAにとって最も重要なのは、miRNAが、単独で、または甲状腺ホルモンT3およびナノパターン化基材と組み合わせられて、幹細胞由来心筋細胞の成熟度の高い心筋細胞表現型を促進するという点である。本明細書に記載の方法を使用して、そのような活性について所与の配列変異体をアッセイすることは容易なことである。

10

20

30

40

50

【0149】

次いで、本明細書において使用される場合、「Let-7i miRNA」は、UGAGGUAGUAGUUUGUGC Uの5'-3'配列（SEQ ID NO:6）およびその相補配列（SEQ ID NO:7）を有する二重鎖RNA分子、または上記のように、5以下のヌクレオチド位置で異なる分子であって、その用語が本明細書において定義されるように成熟度の高い心筋細胞表現型を促進する（すなわち、心筋細胞の成熟を促進する）分子である。Let-7i miRNAは、例えば、ベクターから、細胞内で成熟型二重鎖にプロセシングされるpri-mRNAとして、またはpre-miRNAとして発現され得る。あるいは、所望であれば、例えば脂質複合体または他の直接送達形態を介して、細胞に成熟型二重鎖を導入することができると考えられる。また、前駆体miRNA、またはmiRNA配列を有するヘアピン分子の直接送達を使用することができると考えられる。この状況では、細胞のプロセシング酵素を使用して、細胞内で成熟型miRNAを生じさせる。

【0150】

（表1）ヒト成熟Let-7マイクロRNA配列

成熟 miRNA	成熟 miRNA 配列	対応する前駆体	
名称	(5' → 3')	マイクロRNA	SEQ ID NO
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	let-7a-1; let-7a-2; let-7a-3; let-7a-4	10
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	let-7b	11
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	let-7c	12
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	let-7d; let-7d-v1	13
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	let-7e	14
let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	let-7f-1; let-7f-2-1; let-7f-2-2	15
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU	let-7g	16
let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU	let-7i	17

【0151】

Let-7i miRNAが直接送達される場合、すなわち、細胞内で発現されない場合、miRNAは、例えば分子の安定性および/または標的分子とのその相互作用を増強する修飾を含むことができる。修飾は、例えば、核酸塩基または骨格に対するものであり得る。修飾された核酸塩基の非限定的な例には、5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他の誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル (プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオールキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが挙げられる。

【0152】

マイクロRNA骨格修飾には、限定されることなく、デオキシリボ核酸 (DNA、SEQ ID NO: 1~5)、ペプチド核酸 (PNA)、モルホリノ、ロックド核酸 (LNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、または当技術分野において公知の他のゼノ核酸 (XNA) 形態が含まれ得る。任意の核酸塩基または骨格の修飾について、本明細書に記載の心筋細胞成熟または成熟度の高い心筋細胞表現型の促進は、本明細書に記載の方法および組成物に使用される修飾miRNAに必要であることを理解されたい。

【0153】

また、Let7i miRNAベクターは、miRNAを発現する幹細胞由来心筋細胞のポジティブまたはネガティブ選択を可能にする選択マーカーを含み得る。ほとんどの場合、選択マーカーは、抗生物質などの作用物質に対して細胞の耐性を付与する。選択マーカーの非限定的な例には、とりわけ、ピューロマイシン、アンピシリン、カナマイシン、ジェネテシン、ネオマイシン、ブレオマイシン、メトトレキサート、G418スルフェートの耐性遺伝子が挙げられる。選択は、適切な量の選択剤を細胞培養培地に加えて、Let7i miRNAを発現する首尾よく形質導入された幹細胞由来心筋細胞を同定することによって行うことができる。

【0154】

幹細胞由来筋細胞成熟のための生体模倣ナノパターン化基材の作製および使用

幹細胞由来心筋細胞の培養および成熟に生体模倣ナノパターン化基材を使用する、本明細書に記載の組成物および方法では、使用される基材材料に適した当技術分野において公知の任意の方法によって、ナノパターン化基材を作製することができる。いくつかの態様では、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、KimらによるProc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107:565-570 (2010)、MacadangdangらによるJ.Vis.Exp.88:50039 (2014)に記載されているように、またはU.S.9,994,812に記載されているように、基材にナノパターンを導入することができる。毛管カリソグラフィー、ナノインデンテーション、eビームリソグラフィー、エレクトロスピンニングまたは当業者に公知の他の方法を含むプロセスを使用して、ナノパターン化された配列の平行な溝および隆起部を作製することができる。いくつかの態様では、毛管カリソグラフィーが使用される。

【0155】

いくつかの態様では、ポリマー基材は、熱、もしくはUVベースの硬化方法、または毛管カリソグラフィーの使用を可能にする材料と適合性の生体適合性ヒドロゲルから構成される。いくつかの態様では、ポリマー基材は、PEG、PUA、PLGA、PMMA、PUA-PGMA、またはそれらの化学的変異体から構成される。いくつかの態様では、ポリマー基材は、UV硬化性ヒドロゲルポリマー、感熱性ヒドロゲルポリマー、または溶媒蒸発により生成されたポリマーを含む。いくつかの態様では、感熱性ポリマーはPNIPAMである。

【0156】

異方性にナノ加工された下層は、例えば、UV支援毛管カリソグラフィーを使用して、深さが600ナノメートルである800ナノメートル幅の隆起部および溝を有するように作製する

ことができる (Macadangdang J, et al., Cell Mol Bioeng. 2015, W02013151755A1)。他の寸法を使用することができる。深さまたは幅が約50~100ナノメートル未満のパターン化であると、さらに大きなナノスケール寸法を有するようにパターン化して、成熟度の高い心筋細胞表現型を促進する可能性が低い。したがって、溝の深さ/高さは、1000ナノメートルを超えず、100ナノメートル以上、または150ナノメートル以上、または200ナノメートル以上、または250ナノメートル以上、または300ナノメートル以上、または350ナノメートル以上、または400ナノメートル以上、または450ナノメートル以上、または500ナノメートル以上、または550ナノメートル以上、または600ナノメートル以上、または650ナノメートル以上、または700ナノメートル以上、または750ナノメートル以上、または800ナノメートル以上、または850ナノメートル以上、または900ナノメートル以上、または950ナノメートル以上であり得る。ナノパターン化基材上のナノパターンの溝間の溝または隆起部の幅は、1000ナノメートルを超えず、100ナノメートル以上、または150ナノメートル以上、または200ナノメートル以上、または250ナノメートル以上、または300ナノメートル以上、または350ナノメートル以上、または400ナノメートル以上、または450ナノメートル以上、または500ナノメートル以上、または550ナノメートル以上、または600ナノメートル以上、または650ナノメートル以上、または700ナノメートル以上、または750ナノメートル以上、または800ナノメートル以上、または850ナノメートル以上、または900ナノメートル以上、または950ナノメートル以上であり得る。一態様では、溝の深さ、溝の幅、および溝間の隆起部の幅は、いずれも同じ寸法であり、例えば、1000ナノメートルを超えず、100ナノメートル以上、150ナノメートル以上、200ナノメートル以上、250ナノメートル以上、300ナノメートル以上、350ナノメートル以上、400ナノメートル以上、450ナノメートル以上、500ナノメートル以上、550ナノメートル以上、600ナノメートル以上、650ナノメートル以上、700ナノメートル以上、750ナノメートル以上、800ナノメートル以上、850ナノメートル以上、900ナノメートル以上、950ナノメートル以上である。別の態様では、溝の深さ、溝の幅、および溝間の隆起部の幅には、例えば、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900または950ナノメートルの溝の幅、および100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900または950ナノメートルの隆起部の幅を有する100の深さが含まれる。別の態様では、溝の深さは200ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは300ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは400ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の

幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは600ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは700ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。別の態様では、溝の深さは800ナノメートルであり、溝の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルであり、隆起部の幅は100、または150、または200、または250、または300、または350、または400、または450、または500、または550、または600、または650、または700、または750、または800、または850、または900、または950ナノメートルである。例としてここに提供される寸法は、50または100nmの倍数でもあるが、50または100nmの倍数でもない他の寸法も、そのようなナノパターンを有する基材上で培養された幹細胞由来心筋細胞の表現型に利点をもたらし得ることが企図される。

10

20

30

【0157】

いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、実質的に平面状の基材の片側または両側に、平行な溝および隆起部のナノテクスチャアレイを含む。いくつかの態様では、心筋細胞または幹細胞は、ナノパターン化基材の片側または両側に存在し得る。

【0158】

本明細書において提供される実施例で説明および実証される溝および隆起部は、例えば、溝の側面が溝の間の隆起部と垂直の角度で交わる、または同様に溝の側面が溝の底と交わるほぼ長方形である。ただし、インピボでの細胞外マトリックスのパターン化は、垂直または長方形の移行部を伴う特徴から構成されない。したがって、本明細書において、隆起部と溝との間の移行部が、例えば正弦波であり得ることも企図される。重要なことは、本明細書において記載されているように、パターンが高さおよび幅のナノスケール寸法の実質的に平行な溝および隆起部を有することである。平行という用語は、その標準的な意味、すなわち、隣接する溝または隆起部が培養表面の範囲では交差しないという意味で使用される。しかし、テクスチャーの利点を犠牲にすることなく、ある程度の不完全性、または、隣接する溝のある程度の設計された交差が許容されることが認識される。したがって、絶対数は、許容され得る非平行または交差する溝および隆起部の程度を完全には捕捉しない可能性があるが、ナノパターン化基材の使用に際して心筋細胞の構造または機能が測定される培養表面の範囲にわたって、2つの隣接する溝または隆起部が交差しないか、溝または隆起部の長さ方向に見た際に最大20%の確率で、かつ20度未満の鋭角でのみ交差する場合、溝および隆起部は「実質的に平行」であることを理解されたい。全体として、

40

50

選択されたトポグラフィーの特徴は、正常または野生型の幹細胞由来心筋細胞のサルコメア形成を可能にし、その結果、それらが滑走するアクチンおよびミオシンフィラメントの秩序立ったZバンドおよびHゾーンを提示するようにすべきである。成熟心筋細胞では、筋原線維束形成の指標である細胞のZバンド幅は、非パターン化細胞単独と比較して有意に大きい。サルコメア形成は、例えば、幹細胞由来心筋細胞の免疫組織化学により検証することができる。

【0159】

ナノパターン化基材は、例えば、細胞外マトリックスタンパク質調製物または他の生体適合性表面処理によりコーティングすることによって、細胞接着を促進するように処理することができる。いくつかの態様では、生体適合性表面処理は、例えば、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリ-オリニチン、またはビトロネクチン、エリスロネクチン、ゼラチン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、フィブロネクチンドメイン、ラミニンなどの細胞外マトリックスタンパク質、または改変された細胞外マトリックスタンパク質もしくはペプチドを含むことができる。改変されたタンパク質は、例えば、CS1、RGD、インテグリン受容体に結合する細胞外マトリックスタンパク質内のドメイン、および当業者に一般的に公知の他のものを含むペプチドセグメントであり得る。

【0160】

いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、幹細胞由来心筋細胞の電場電位記録のために多電極アレイ上に直接作製される。いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、心筋細胞によるポストの偏向を可能にして収縮性を測定するナノまたはマイクロポストにより作製される。いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、心筋細胞が収縮するか電気的にシミュレートされる際に偏向する層状の薄膜上に作製される。いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、心筋細胞が収縮するか電気的にシミュレートされる際に偏向する層状の薄膜上に作製される。いくつかの態様では、ナノパターン化基材は、心筋細胞の伸張を可能にする装置（例えば、シリコンまたはヒドロゲル）上に作製される。他の材料を使用することもできるが、心筋細胞の機械的刺激および伸張を可能にしてその成熟度をさらに向上させるエラストマー基材の例は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）である。その上にナノパターン化基材を作製することができるプラットフォームの他の例には、Du et al., Nat Commun. 8:400 (2017)、U.S. 9,994,812、U.S. 20120027807 A1およびU.S. 2012004716 A1に記載されているものが含まれる。

【0161】

上記のように、伸張することにより心筋細胞を機械的刺激に供すること、例えば、それらを伸張および弛緩の繰り返しのサイクルに供することにより、成熟度の高い表現型を促進することができる。ナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3およびLet7i処理の組合せは優れた心筋細胞成熟をもたらすが、これらのキューを他の刺激または条件と組み合わせることにより、この成熟をさらに促進できると考えられる。非限定的な例には、上記のように、機械的伸張/弛緩サイクルの適用、および培養培地への脂肪酸の添加が挙げられる。したがって、一態様では、本明細書に記載のナノパターン化基材/甲状腺ホルモンT3/Let7i処理に供される心筋細胞は、この用語が本明細書において記載されるように、例えば、伸張/弛緩サイクルの適用のための装置と係合するエラストマーナノパターン化基材の使用により、伸張にさらに供されて成熟度の高い表現型をさらに促進することができる。本明細書に記載のアッセイおよび測定は、この追加の刺激によりさらに成熟した表現型の尺度を提供することができる。

【0162】

別の態様では、限定されることなく、パルミテート、オレイン酸、およびリノール酸を含む脂肪酸の存在下での培養は、この用語が本明細書において記載されるように、成熟度の高い表現型をさらに促進することができる。非限定的な例として、ウシ血清アルブミン（BSA）（例えば、約50 μM）、オレイン酸（例えば、約15 μg/ml）、もしくはリノール酸（例えば、約10 μg/ml）、またはそれらの組合せにコンジュゲートしたパルミテートを基礎培地に加えて、本明細書に記載の成熟度の高い表現型をさらに促進することができる。

【0163】

別の態様では、ナノパターン化基材/甲状腺ホルモンT3/Let7i処理を機械的刺激および脂肪酸曝露の両方と組み合わせて、本明細書に記載の成熟度の高い表現型をさらに促進することができる。

【0164】

幹細胞由来心筋細胞の機能特性評価

本明細書に記載の条件下で成熟させた幹細胞由来心筋細胞は、様々な処理または刺激に対する成熟心筋細胞の応答の評価を可能にする。様々な態様では、幹細胞由来心筋細胞の定量化可能なパラメーターには、収縮力、収縮性、収縮の変化、収縮の頻度、収縮期間、収縮スタミナ、心筋細胞のサイズ、サルコメアの組織化、長さ、円周、構造、多核状態、代謝呼吸容量、酸素消費、電気生理学および生物物理学のパラメーターが含まれ得る。いくつかの態様では、定量化可能なパラメーターには、幹細胞由来心筋細胞の生存および/または分裂または再生が含まれる。

【0165】

ほとんどのパラメーターは定量的な読み出しを提供するが、場合によっては、半定量的または定性的な結果が許容される。読み出しは、単一の決定された値を含むことができるか、平均、中央値または分散などを含んでもよい。特徴的には、多数の同じアッセイから、各パラメーターについて一連のパラメーター読み出し値が得られる。変動性が予測され、有用な値を提供するために、標準的な統計的方法を使用して、一連の試験パラメーターのそれぞれに対する値の範囲が得られる。

【0166】

心筋細胞の状態または機能を評価するのに有用な様々なパラメーターの測定について、以下で説明する。

【0167】

イムノアッセイ: 当技術分野において公知であり、特に記載されていない免疫学の標準的な方法は、Stites et al. (Eds.), Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1994); および Mishell and Shigi (Eds.), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980) に一般に従う。

【0168】

一般に、イムノアッセイは、細胞がアッセイのためにどのように調製されるかに応じて、細胞表面または細胞内マーカーについて試料を評価するために使用される。免疫細胞化学アッセイが当業者に周知である。そのようなアッセイでは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方を使用することができる。必要に応じて、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイおよびフローサイトメトリーなどの他のイムノアッセイを使用して、細胞型特異的マーカーを検出することができる。

【0169】

利用可能なイムノアッセイは、特許文献および科学文献に広範囲に記載されている。例えば、とりわけ、U.S. Pat. No. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771; および 5,281,521 ならびに Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, N.Y., 1989 を参照されたい。

【0170】

免疫ベースの方法を使用してアッセイすることができる心臓特異的マーカーの非限定的な例には、とりわけ、心筋トロポニンT、心筋トロポニンC、トロポミオシン、カベオリン-3、GATA-4、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖-2a、ミオシン軽鎖-2v、リアノジン受容体、心房性ナトリウム利尿因子が挙げられる。

【0171】

サルコメア組織化

本明細書に記載の方法には、幹細胞由来心筋細胞の分化および成熟の尺度としてのサルコメア形態ならびにアクチンおよびミオシンフィラメントの構造的特性評価の使用が含ま

れる。サルコメアは、顕微鏡写真では一連の暗い線として現れる、筋細胞の2つの隣接するZ線（またはZディスク、またはZ体）の間のセグメントとして定義される。Z線は、筋収縮のためのアクチンおよびミオシンフィラメントの固定点として機能する。心臓サルコメアは、(i) フィラメントにほぼ垂直なミオシン頭部を有する太いミオシンタンパク質フィラメント、(ii) 細いアクチンフィラメント、および(iii) タイチンフィラメントを含む。各Z線の間には、太いミオシンフィラメントが重なっていない、細いフィラメントのIバンドがある。心筋細胞組織化の他の構造的（および可変の）特徴にはAバンドが含まれ、Aバンドは単一の太いミオシンフィラメントの全長である。Hゾーンは、アクチンの細いフィラメントが重なっていない、太いフィラメントのゾーンである。M線は、細胞の細胞骨格の交差接続要素によって形成される。

10

【0172】

アクチンフィラメントとタイチン分子とは、Z線タンパク質 アクチニンを介してZディスク内で架橋されている。心臓の層状組織内では、アクチニンはアクチンおよびミオシンのフィラメントに垂直である。心臓サルコメアの構造は高度に秩序立っているため、当業者であれば、成熟筋細胞および組織を同定するためのマーカーとして、これらのタンパク質（アクチン、ミオシン、アクチニン、タイチン）、および組織、または培養細胞の集合におけるそれらの配置を認識するであろう。発達中の心細胞は、細胞内に新しいサルコメア単位を生じる「サルコメア形成 (sarcomerogenesis)」を受ける。サルコメア組織化の程度は、心筋細胞の成熟度の尺度を提供する。

20

【0173】

とりわけ、ミオシン、アクチン、cTnT、トロポミオシンに対する免疫蛍光アッセイ、および電子顕微鏡を使用して、サルコメア構造を同定および測定することができる。

【0174】

サルコメア整列、パターン強度、およびサルコメア長について免疫蛍光画像を定量化することができる。これは、スキャン勾配およびフーリエ変換スクリプトを使用して、タンパク質の位置を決定することにより実現することができる。これは、個々の分析のためにいくつかの小さなセグメントに分割された各画像を取得することにより行われる。方向導関数を使用して、各セグメントの画像勾配を計算して、サルコメアの局所的な整列を決定することができる。パターン強度は、勾配方向の一次元フーリエ変換の最大ピークを計算することにより決定することができる。サルコメア長は、この同じ勾配方向に沿ったサルコメアの強度プロファイルを測定することにより計算することができる。強度プロファイルがそれらの平均と交差する頻度により、各画像セグメント内の局所サルコメア長の正確な計算が可能になる。この分析は、ナノトポグラフィーによって提供される整列キューを欠く細胞であっても、サルコメアパターン化の偏りのない細胞内解像度マッピングを可能にする。

30

【0175】

細胞形態を使用して、構造的に成熟した幹細胞由来心筋細胞を同定することができる。形態学および構造的パラメータの非限定的な例には、限定されることなく、サルコメア長、Zバンド幅、二核性パーセンテージ、核離心率、細胞面積、および細胞アスペクト比が挙げられる。

40

【0176】

あるいは、サルコメア構造の定性分析も使用することができる。当業者にとって、成体心筋細胞表現型の基準は、アクチンがアクチンフィラメントに対して約90度であることである。胎児心筋細胞はアクチニンを発現しないか、アクチニン構造が本明細書に記載のサルコメア構造から無秩序化している。

【0177】

電気生理

成熟心筋細胞は、心筋細胞間の信号を生成する電位を生成する機能的イオンチャネルを有し、心筋収縮の同期化を可能にする。幹細胞由来心筋細胞の電氣的機能は、様々な方法によって測定することができる。そのような方法の非限定的な例には、とりわけ、全細胞

50

パッチクランプ（手動または自動）、多電極アレイ、カルシウムイメージングおよび光学マッピングが挙げられる。幹細胞由来心筋細胞は、全細胞電流クランプまたは多電極アレイの記録中に電氣的に刺激されて、電氣的または収縮性の応答を生じることができる。さらに、幹細胞由来心筋細胞は、例えば、細胞の光刺激を可能にするチャンネルロドプシンを発現するように、遺伝的に修飾することができる。

【0178】

幹細胞由来心筋細胞の電場電位および生体電位の測定を使用して、分化段階と細胞の成熟度を決定することができる。限定されることなく、以下のパラメーター、すなわち、とりわけ、FPDの変化、FPDの定量化、拍動周波数、BPM、上昇速度、静止膜電位、活動電位の振幅、最大弛緩期電位、弛緩の時定数、90%再分極の活動電位持続時間、スパイク間隔、拍動間隔の変化、電流密度、活性化および不活性化の動態を使用して、幹細胞由来心筋細胞の電気生理学的機能を決定することができる。

10

【0179】

疾患状態の間、心筋細胞の電気生理学的機能が損なわれる可能性があり、これは、本明細書において記載されるように成熟した心筋細胞を使用する疾患モデルによって再現することができる。例えば、QT延長症候群などの心不整脈をモデル化するのに使用される幹細胞由来心筋細胞は、正常な幹細胞由来心筋細胞と比較した場合、長期のFPDおよびAPDを示す場合がある。

【0180】

代謝アッセイ

20

成体心筋細胞は、増加したミトコンドリア機能と予備の呼吸容量とによって特徴付けられる胎児心筋細胞と比較して、増強された細胞代謝を有することが示されている。代謝アッセイは、本明細書において記載されるように、幹細胞由来心筋細胞の分化段階および細胞成熟度を決定するために使用することができる。代謝アッセイの非限定的な例には、細胞生体エネルギーアッセイ（例えば、Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer）、および酸素消費試験が挙げられる。

【0181】

さらに具体的には、細胞代謝は、他のパラメーターの中でも特に、酸素消費速度（OCR）、脂肪酸ストレス試験中のOCRトレース、OCRの最大変化、FCCP添加後のOCRの最大変化、および最大呼吸容量によって定量化することができる。

30

【0182】

さらに、代謝チャレンジまたはラクテート濃縮アッセイは、幹細胞由来心筋細胞の成熟度の尺度、またはそのような細胞の様々な処理の効果の尺度を提供することができる。哺乳動物の細胞は一般に、それらの主なエネルギー源としてグルコースを使用する。ただし、心筋細胞は、ラクテートまたは脂肪酸などの様々な供給源からエネルギーを生成することができる。いくつかの態様では、ラクテート補充およびグルコース枯渇培養培地、またはエネルギー源としてラクテートまたは脂肪酸を使用する細胞の能力は、成熟幹細胞由来心筋細胞およびそれらの機能の変動を同定するのに有用である。

【0183】

心収縮性の測定方法

40

収縮性は、典型的には、ビデオ追跡法によって測定される。収縮の大きさ、速度、および角度などの機能的出力は、各ビデオフレームのベクトルフィールドとして出力され、空間的または時間的に平均化することができる。ビデオ追跡法では、幹細胞由来心筋細胞の収縮（または収縮期）は、細胞または心組織が最短の長さにある時間および空間の点であると考えられる。弛緩（弛緩期）は、細胞または心組織が最大の長さにある時間または空間の点であると考えられる。これらのパラメーターは、ビデオ内の基準フレームを使用し、基準フレームをガイドとして使用して心筋細胞または心組織の動きを追跡することによって決定される。

【0184】

ビデオ追跡に加えて、インピーダンス測定も行うことができる。例えば、本明細書に記

50

載の幹細胞由来心筋細胞は、xCelligence (商標) リアルタイム細胞分析 (Acea Biosciences, Inc., San Diego, CA) によって決定される収縮性または拍動数測定値を有し得る。

【0185】

幹細胞由来心筋細胞機能の重要なパラメーターは拍動数である。収縮の頻度、拍動数、拍動間隔の変化 (BI)、または拍動周期を使用して、幹細胞の分化段階、幹細胞由来心筋細胞の成熟度、およびそのような度合いに対する所与の処理の効果を決定することができる。拍動数は、典型的には、胎児心筋細胞では上昇し、心筋細胞が発達するにつれて低下する。疾患状態の間、拍動数の変化は可変であり、電気生理学的または構造的不安定性のために一定の頻度を欠く場合がある。限定されることなく、収縮パラメーターにはまた、収縮速度、弛緩速度、収縮角分布、または収縮異方性比が含まれ得る。

10

【0186】

疾患モデル

DMDは、本明細書において記載されるように調製および成熟された幹細胞由来心筋細胞をモデルに適合させることができる、心機能に影響を及ぼす多数の疾患のうちの1つにすぎない。様々な心疾患を有する対象に由来するiPS細胞から心細胞が分化する多数の心疾患モデルが記載されている。例えば、Ebert and Svendsen, Nat. Rev. Drug Discov 9:367-372 (2010) を参照されたい。

【0187】

本明細書に記載されるように調製および成熟された幹細胞由来心筋細胞を使用してモデル化することができる心疾患には、例えば、Smith et al., Biotechnol. Adv. 35:77-94 (2017) に説明されているものが含まれる。さらに具体的には、そのような疾患には、iPS細胞に由来する心筋細胞を使用するモデルがMoretti et al., New Engl. J. Med. 363:1397-1409 (2010) らによって記載されているQT延長症候群などのイオンチャネル病が含まれる。他のモデルには、Egashira et al., Cardiovasc. Res. 95:419-429 (2012) によって記載されているLQT1サブタイプのモデル、Itzhaki et al., Nature 471:225-229 (2011)、Lahti et al., Dis. Model Mech. 5:220-230 (2012) およびMatsa et al., Eur. Heart J. 32:952-962 (2011) によって記載されているLQT2サブタイプのモデル、ならびにMa et al., Int. J. Cardiol. 168:5277-5286 (2013) およびTerrenoire et al., J. Gen. Physiol. 141:61-72 (2013) によって記載されているLQT3サブタイプのモデルが含まれる。LQT3およびブルガダ症候群の両サブタイプを引き起こすモデルは、Davis et al., Circulation 125:3079-3091 (2012) によって記載されており、チモシー症候群患者からのLTQ8のモデルはYazawa et al., J. Cardiovasc. Transl. Res. 6:1-9 (2013) によって記載されている。

20

30

【0188】

そのような疾患を有する患者から分化した心細胞を使用してモデル化することができるその他の心疾患には、チャネル病であるカテコールアミン誘発性多形性心室性頻拍 (CPVT) が含まれる。心筋細胞に分化したiPS細胞に基づくこの疾患モデルには、CPVT1についてはItzhaki et al., J. Am. Coll. Cardiol. 60:990-1000 (2012)、Fatima et al., Cell Physiol. Biochem. 28:579-592 (2011)、Jung et al., EMBO Mol. Med. 4:180-191 (2012) DiPasquale et al., Cell Death Dis. 4:e843 (2013)、およびPaavola et al., Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology (2015)、ならびにCPVT2についてはNovak et al., Rambam Maimonides Med. J. 3:e0015 (2012) によって記載されているものが含まれる。

40

【0189】

疾患を有する対象からのiPS細胞分化を使用してモデル化された他の障害には、肥大型心筋症 (HCM) (Carvajal-Vergara et al., Nature 2010 465:808-812 (2010) およびLan et al., Cell Stem Cell 12:101-113 (2013))、および家族性拡張型心筋症 (DCM) (Sun et al., Sci Transl. Med. 4:130ra47 (2012)、Siu et al., Aging 4:803-822 (2012)、Tse et al., Hum. Mol. Genet. 22:1395-1403 (2013)、ボンペ病 (Huang et al., Hum. Mol. Genet. 20:4851-4864 (2011)、フリートライヒ運動失調症 (FRDA) (Hick et al., Dis. Model.

50

Mech.6:608-621 (2013)、パーズ症候群 (Wang et al., Nat. Med. 20:616-623 (2014))、不整脈源性右室異形成/心筋症 (ARVD/C) Calkins, Circulation Journal: official Journal of the Japanese Circulation Society 79:901-913 (2015)、Caspi et al., Circulation Cardiovascular Genetics 6:557-568 (2013)、Kim et al., Nature 494:105-110 (2013)、Malik and Rao, Meth. Mol. Biol. 997:23-33 (2013) が含まれる。

【0190】

様々な疾患を有する対象に由来するiPS細胞から分化した心細胞を使用する上記の疾患モデルのいずれかまたは全部は、幹細胞由来心筋細胞を調製し成熟させるための本明細書に記載の方法から利点を得ることができる。

【0191】

幹細胞由来心筋細胞を使用する薬物スクリーニングプラットフォーム

本明細書において記載されるように調製された成熟心筋細胞は、インビボでの心筋細胞または心組織に対する公知の薬物または実験薬の可能性のある効果の試験または評価のためのプラットフォームを提供する。これは、起こり得る心臓の副作用または心毒性について、非心臓適応症の治療に使用される薬物を評価するのに使用することができる。あるいは、例えば、潜在的な薬物または作用物質のライブラリーまたは集合を用いてスクリーニングすることにより、本明細書において記載されるように調製および成熟された心筋細胞を使用して、心筋細胞または心機能に対して有益な効果を有する新薬を同定することもできる。正常なドナー細胞に由来する心筋細胞は、両方の状況に有用な情報を提供することができる。心疾患または他の疾患を有するドナーに由来するか、心疾患または心障害を模倣するように操作された細胞に由来する心筋細胞は、そのような疾患を治療するための新薬または作用物質を同定するのに非常に有用であり得る。いずれの場合も、本明細書に記載のまたは当技術分野において公知の機能的または構造的パラメーターの評価は、所与の作用物質の効果に関して有益であり得る。一般に、そのようなアッセイは、本明細書において記載されるように調製および成熟された心筋細胞を作用物質と接触させること、ならびに作用物質の効果の指標として本明細書に記載の心筋細胞の1つまたは複数のパラメーターを測定することを含む。効果が観察される場合、作用物質の濃度および/または接触時間を変化させることにより、用量反応を評価することもできる。本明細書に記載の成熟心筋細胞の1つの利点は、低成熟培養心筋細胞と比較して、培養時に長期間（最適な条件下で数週間以上）にわたり成熟表現型を維持することである。これにより、例えば、別のプラットフォームの心筋細胞では不可能な、作用物質への長期低レベル曝露に関するデータの収集が可能になる。

【0192】

したがって、本明細書において記載されるように調製および成熟された幹細胞由来心筋細胞を使用して、マーカーの発現、細胞生存率、サルコメア配置、収縮性、電気生理学的応答、拍動数、または本明細書において記載されているか当技術分野において公知の他のパラメーターなどのパラメーターに対するその効果について、作用物質を同定するか作用物質を評価することができる。

【0193】

いくつかの態様では、幹細胞由来心筋細胞をアッセイに使用して、細胞に対する有害または有益な効果について、他の作用物質の中でも特に、小分子、核酸またはそれらの類似体、アプタマー；それらのタンパク質またはポリペプチドまたは類似体または断片から選択される作用物質をスクリーニングすることができる。また、本明細書において記載されるように調製および成熟された心筋細胞が心組織に対する薬物の効果を再現または模倣することができる限り、本明細書において記載されるように調製および成熟された心筋細胞を使用して、非心臓適応症に有用な別の作用物質の心臓の副作用に対抗する作用物質をスクリーニングできると考えられる。

【0194】

いくつかの態様では、作用物質は、多数の化学クラス、有機金属分子、無機分子、遺伝子配列などを含み得る主に有機分子を包含する公知および未知の化合物を含む、関心対象

10

20

30

40

50

の作用物質である。本明細書に記載の幹細胞由来心筋細胞の使用の重要な側面は、毒性試験などを含め、候補薬を評価することである。候補作用物質は、構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含む有機分子も含み、典型的には、アミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、多くの場合そのような官能化学基のうちの複数を含む。候補作用物質は、多くの場合、上記の官能基のうちの1つまたは複数で置換された環状炭素または複素環構造および/または芳香族またはポリ芳香族構造を含む。候補作用物質は、ペプチド、ポリヌクレオチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体またはそれらの組合せを含む生体分子にも見出される。

【0195】

また、作用物質として含まれるのは、薬理学的に活性な薬物、遺伝的に活性な分子などである。関心対象の化合物には、例えば、化学療法剤、ホルモンまたはホルモン拮抗薬、成長因子または組換え成長因子ならびにそれらの断片および変異体が含まれる。本発明に適した医薬品の例は、いずれも参照により本明細書に組み入れられる「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, N.Y., (1996), Ninth edition: Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Acting on Blood-Forming Organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins, Dermatology; and Toxicologyの節の下に記載されているものである。また、毒素、ならびに生物学的兵器および化学兵器も含まれ、例えば、Somani, S.M. (Ed.), 「Chemical Warfare Agents」、Academic Press, New York, 1992)を参照されたい。

【0196】

候補作用物質を含む化合物は、合成または天然化合物のライブラリーを含む様々な供給源から得ることができる。ランダム化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含め、生体分子を含む多種多様な有機化合物のランダムおよび指向性合成のための様々な手段が利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが入手可能であるか、容易に生成される。さらに、天然のまたは合成的に生成されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的手段によって容易に修飾され、コンビナトリアルライブラリーを生成するために使用され得る。アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの指向性またはランダムな化学修飾に公知の作用物質を供して、構造類似体を作製してもよい。

【0197】

候補作用物質は、上記のあらゆるクラスの分子を含み、未知の内容の試料をさらに含む得る。興味深いのは、植物などの天然資源に由来する天然化合物の複雑な混合物である。多くの試料は溶液中の化合物を含むが、好適な溶媒に溶解することができる固体試料もアッセイされ得る。関心対象の試料には、環境試料、例えば、地下水、海水など; 生物学的試料、例えば、作物から調製された溶解物、組織試料など; 製造試料、例えば、医薬品の調製中の時間経過; および分析用に調製された化合物のライブラリーなどが含まれる。

【0198】

いくつかの態様では、作用物質の効果は、収縮力、収縮性、収縮の変化、収縮の頻度、収縮期間、収縮スタミナ、心筋細胞のサイズ、サルコメアの組織化、長さ、構造、代謝呼吸容量、酸素消費、ならびに電気生理学および生物物理学のパラメーターを含み得る、幹細胞由来心筋細胞の定量化可能なパラメーターによって決定される。いくつかの態様では、定量化可能なパラメーターには、幹細胞由来心筋細胞の分化、生存および再生が含まれる。

【0199】

異なる作用物質濃度を用いて、幹細胞由来心筋細胞を含む複数のアッセイを並行して実行して、様々な濃度に対する異なる反応を得ることができる。当技術分野において公知であるように、作用物質の有効濃度の決定には、典型的には、1:10または他のログスケールの希釈から生じる濃度範囲が使用される。必要に応じて、第2の一連の希釈液を用いて、

10

20

30

40

50

濃度をさらに精緻化してもよい。典型的には、これらの濃度のうちの1つは、陰性対照として、すなわち、0濃度で、または作用物質の検出レベル未満で、または表現型に検出可能な変化を与えない作用物質の濃度未満で、用いられる。

【0200】

任意で、スクリーニングに使用される幹細胞由来心筋細胞を操作して、所望の遺伝子産物を発現させることができる。

【0201】

キット

いくつかの態様では、本明細書に記載の組成物はキットとして調製することができる。一態様では、キットは、本明細書に記載のナノパターン化基材、甲状腺ホルモンT3またはその類似体、Let7iマイクロRNAをコードするベクターまたはLet7i miRNAを含む調製物、およびそのための包装材料を含むことができる。別の態様では、キットは、代謝的に活性であるか凍結され得るiPS細胞またはES細胞調製物をさらに含み、iPS細胞またはES細胞調製物の細胞を心筋細胞表現型に分化させるための、本明細書に記載の試薬を任意で含むことができる。別の態様では、幹細胞由来心筋細胞は、ナノパターン化基材上に事前に播種されるか、付着される。

10

【0202】

他の態様では、キットは、幹細胞由来心筋細胞からの成熟したインビトロ分化心筋細胞の調製を可能にする細胞培養培地および説明書をさらに含む。一態様では、キットは、組織培養培地への添加に適した脂肪酸調製物を含む。脂肪酸調製物は、例えば、パルミット、オレイン酸、リノール酸、またはそれらの組合せを含む調製物を含むことができる。

20

【0203】

別の態様では、キットは、代謝的に活性であるか凍結され得る幹細胞由来心筋細胞を含む。別の態様では、キットおよび/またはその構成要素のいずれも、周囲温度もしくは室温、または例えば4℃で輸送および/または保管することができる。

【0204】

いくつかの態様では、iPS細胞、ES細胞、または幹細胞由来心筋細胞は、ヒト細胞、齧歯類細胞、イヌ細胞などである。いくつかの態様では、幹細胞由来心筋細胞は、筋疾患または筋障害を有する対象に由来するか、例えば、心疾患または心障害を含む筋疾患または筋障害を模倣するように遺伝的に修飾される。

30

【実施例】

【0205】

実施例1: 操作された発達のニッチはヒトジストロフィー性心筋症 (dystrophic cardiomyopathy) における予測表現型スクリーニングを可能にする

心血管疾患は、世界中の男女両方の主要な死因であり、発展途上国に急速に影響を及ぼしつつある¹。遺伝性心筋症は、小児およびその他の点では健康な若年成人を含むあらゆる年齢層の心疾患の主な原因である²。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞 (hPSC-CM) は、ヒトの心臓に見られるイオンチャネル、タンパク質アイソフォーム、ならびに遺伝的機構および代謝機構の完全な群列を理論的に発現することができるヒト心筋細胞への到達性を大幅に向上させるため、心筋症を研究するための有望なツールである³。現在の心疾患モデリングの取り組みの主な目標は、さらに効果的な治療戦略をデザインするための第一歩として、心筋症の発症および進行に関する洞察を得ることである。しかし、遺伝性心筋症患者の多くは、青年期後期または成人期初期まで心症状を示さない²。現在の分化プロトコルでは、胎児心臓の細胞に最もよく似た構造的、機能的および生化学的特性を有する心筋細胞が作製されるため、これは、hPSC-CM疾患モデリングの可能性を制限する⁴。

40

【0206】

心疾患モデルでは、発達の成熟がhPSC-CMの技術的ハードルを提示する。これまで、胎児様表現型を示すhPSC-CMは、チャネル病⁵⁻⁷、メタボリックシンドローム⁸、肥大型および拡張型心筋症^{9、10}、およびデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 心筋症などの他の遅発性心疾患^{11、12}を試験するのに使用されてきた。このような報告は確かに革新的で価

50

値があるが¹³、知見の大部分は、まだ非常にナイーブで、不完全な構造組織、および胎児と成体とのタンパク質アイソフォーム発現の混合物を有する心筋細胞の能力に基づいている。hPSC-CMの発達を加速する方法を開発するために、多くの努力が注がれてきた^{4、13}。このような戦略はhPSC-CM発達の特定の側面を増強するのに効果的であることが証明されているが、単一の方法が発達中の心臓微小環境ニッチを完全に再現することができるとは考えにくい。インビトロでhPSC-CMの成熟を加速するために、発達の心臓ニッチをさらに包括的に模倣することを目的として、ナノトポグラフィック基材キュー、甲状腺ホルモンT3、およびLet-7i miRNAの過剰発現を組み込んだ多面的かつコンビナトリアルな成熟(ComboMat)プラットフォームを作製した。完全に発達した心臓での適切な構造と機能との関係に、かつhPSC-CMの形態学的発達に重要な異方性細胞外マトリックスキュー¹⁴も、心臓発達およびルーピング中の重要な因子であることが見出されている¹⁵。出生直後の血清中T3濃度の急上昇を模倣する甲状腺ホルモン処理は、hPSC-CMでの力の生成とカルシウム処理とを改善することが示されており¹⁶、その一方で、Let-7 miRNAのアップレギュレーションはhPSC-CMでの代謝発達を増強する¹⁷。

10

20

30

40

50

【0207】

インビトロ心組織工学応用のための成熟心臓表現型の有用性を強調する手段として、ジストロフィー性心筋症の成熟度の高いモデルを開発した。デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)およびベッカー型筋ジストロフィー(BMD)などのジストロフィー性心筋症は、変異したジストロフィン遺伝子に起因するX染色体遺伝性障害である。DMD患者では、標準治療としての支持換気の出現により、主要な死因として心臓合併症が呼吸不全に取って代わっている¹⁸。しかし、mdxマウスなどのジストロフィー様の齧歯類モデルの心筋症は、診療所での治療に対する患者の応答の予測因子としては不良であることが証明されている^{19、20}。実際、mdxマウスの心機能不全の軽減に有望なシルデナフィルを用いた最近の臨床試験では²¹、DMD患者の心症状が悪化し、試験を早期に中止しなければならなかった²⁰。したがって、ジストロフィー性心筋症の改善されたヒトモデルに対する満たされていない医学的必要性が存在する。ジストロフィン変異体ヒト心筋細胞が、健康な対照と比較して表現型の相違を示したことが以前に報告されているが、これらの相違は軽度であったか、低張負荷などの外因性急性ストレスにより誘導されていた^{11、22}。Linら¹²およびYoungら²³により開発された他のジストロフィン変異体モデルは、DMD特異的疾患機構および可能性のある治療選択肢に関する価値ある洞察を提供しているが、両報告は胎児様hPSC-CMに基づくものであった。特定の理論に束縛されないために、成熟度の高いhPSC-CMが、患者に見られるジストロフィー性心筋症の予測モデルを改善するという、仮説を立てた。

【0208】

この仮説を検討するために、CRISPRにより作製されたジストロフィン変異体(DMD 263delG) hPSC-CMにComboMatプラットフォームを適用して、インビトロでの成人発症型心疾患表現型の発現を促進した。DMD遺伝子に同様のエクソン1変異を有する患者(図7)は、切断型ジストロフィンタンパク質を発現し、BMD表現型を示す²⁴。コンビナトリアルを使用して成熟させた場合、DMD変異体hPSC-CMは、カスタムナノパターン化多電極アレイ(ナノMEA)心臓スクリーニングプラットフォーム上では、不整脈のはるかに大きな傾向を示す。発達の心臓ニッチキューがなければ、健常な同質遺伝子対照細胞からDMD変異体hPSC-CMの機能プロファイルを区別することはできなかった。このように、ComboMatプラットフォームにより、疾患モデリングおよび薬物スクリーニング用途のための生理学的に適切性の高いhPSC-CMが作製された。

【0209】

結果:ComboMat処理心筋細胞のトランスクリプトームのプロファイリング

ComboMatプラットフォーム(図1Aに概略的に示される)と呼ばれる単一手順に組み込まれた生体模倣ナノパターン化トポグラフィー(NP)^{14、15}、甲状腺ホルモンT3(T3)¹⁶、およびLet7i miRNA過剰発現(Let7i)¹⁷を含む3つの異なるキューのコンビナトリアルな影響を検討した。RNA-seqを行って、3つの成熟キューの異なる組合せに曝露されたhPSC-CMのトランスクリプトーム全体を調べた。主成分分析(図1B)では、ComboMat群(3つすべ

ての因子が組み合わされている)が他の全条件から離れていることが示された。次に、心筋細胞成熟の7つの特徴的な経路からなる濃縮ヒートマップを作製した(図1C)。多くの成熟条件が互いに重なっていくにつれて、心筋細胞は次第に成熟度を高めていくように見えた。ComboMat群は、6つの経路でのアップレギュレーション、および細胞周期経路でのダウンレギュレーションを伴う最も堅牢な成熟を示した。図1Dは、ComboMat群と対照(平坦な表面上の空ベクター細胞;EV-Flat)群との間のP値に基づく8つのアップレギュレートされた遺伝子オントロジー(GO)項目を示す。グルコース代謝過程、長鎖脂肪酸取り込み、および解糖過程などの代謝に関連する経路がアップレギュレートされた。筋組織発達、筋収縮、および横紋筋細胞分化を含む筋過程に関連するGO項目もアップレギュレートされた。

10

【0210】

バブルプロットを作製して(図1E)、PC1に沿ったComboMat群および対照群の遺伝子発現を比較した。成体対胎児およびComboMat対対照の両群では、有意に高い53個の遺伝子、および有意に低い13個の遺伝子が発見された。ComboMat群では、PC1に沿って最もアップレギュレートされた遺伝子は、甲状腺ホルモン共抑制因子である毛成長関連遺伝子(HR)であった。転写因子であるKrupel様因子(KLF9)も有意にアップレギュレートされた。KLF9は、脂肪酸代謝の重要な遺伝子であるPPAR-プロモーターに結合することが報告されている²⁵。ComboMat群では、心臓代謝に関連する別の遺伝子、シトクロムcオキシダーゼサブユニット6A2(COX6A2)もアップレギュレートされた。さらに、心室アイソフォームであり心筋細胞成熟の特徴であるミオシン軽鎖2(MYL2)がアップレギュレートされた。

20

【0211】

ComboMat処理心筋細胞の構造的成熟

これらの試験、およびその後のあらゆる機能アッセイでは、完全なComboMatプラットフォーム(Let7i+NP+T3)と、ウイルスベクター対照(EV+Flat+T3なし)ならびに各成熟キュー単独:NP(EV+NP+T3なし)、T3(EV+Flat+T3)、およびLet7i(Let7i+Flat+T3なし)とを比較した。免疫蛍光イメージング(図2A)から、NP上で培養されたhPSC-CMがナノトポグラフィーの方向に伸長し、異方性の高い棒状の形態を示すことを確認した。NP上ではサルコメアはより高度な方向性および秩序を伴って発達し、より多くのサルコメアが互いに位置の合った状態となった(図2B)。対照と比較して、T3またはLet7iのみに曝露したhPSC-CMは有意に大きかったが(図2F)、丸いまたは不規則な形態を形成した。ComboMatプラットフォームでは、3つすべてのキューに曝露されると、hPSC-CMは棒状になり、各キューを単独で用いるよりも大きくなった(図2F、* $p < 0.05$)。また、ComboMatプラットフォームに曝露されたhPSC-CMは、対照群で見られた円周方向のバンド形成とは対照的に、細胞の長軸に沿って反復サルコメアバンド形成パターンを示した他、約1.8マイクロメートル(μm) ± 0.012 マイクロメートル(μm)の比較的長い静止サルコメア長を有した(図2C、* $p < 0.05$)。また、ComboMat群のhPSC-CMの方が高い二核性パーセンテージを示した(図2E、* $p < 0.05$)。

30

40

【0212】

透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、hPSC-CMの超微細構造を調査した。対照条件に曝露されたhPSC-CMは、低密度の無秩序な筋原線維、および点状のZ体形成のみを示すことが観察された(図2B)。NP、T3、またはLet7iの個別の適用により、より組織化され、より広いZバンドの発達が改善されたが(図2D)、全体的なサルコメアはかなり無秩序で低密度のままであった。対照的に、ComboMatプラットフォームを用いて培養されたhPSC-CMは、ZバンドおよびHゾーンの出現を伴い、はるかに秩序立ったサルコメアを発達させた(図2B)。筋原線維束形成の指標である細胞内のZバンド幅も、ComboMat群の方が、対照または各キュー単独よりも有意に大きかった。

50

【0213】

ComboMat 処理心筋細胞の電気機械的および代謝的成熟

ComboMat プラットフォームによって与えられた遺伝的および構造的変化が hPSC-CM の機能的性能の向上に現れるかどうかを試験するために、2 つの非侵襲的測定を使用して電気機械的機能を決定した。相関ベース収縮定量化 (CCQ) ²² を使用して、hPSC-CM 単層の収縮を測定し、1 Hz でペーシングし、30 フレーム / 秒で撮影した。これらの収縮ベクトルと一緒に空間的に平均化することによって、対照、NP、T3、Let7i、および ComboMat 条件について最大収縮速度および最大弛緩速度を測定し (図 3A では赤および青のマークとして記している)、ComboMat プラットフォームに曝露された細胞は、対照またはいずれかの成熟キュー単独と比較して、有意に速い収縮を示すことを見出した (図 3B)。これを説明するために、収縮中の変位の角度を調査し、NP 上で培養された hPSC-CM は、平坦基材上で培養された細胞よりも均一な方向に収縮することを見出した (図 3C)。この好ましい方向性を定量化するために、収縮異方性比 (AR) を測定し、ComboMat プラットフォームの細胞などの NP 上の細胞は、基礎となるナノトポグラフィーに垂直な方向よりも平行な方向に 2 倍超大きい収縮の大きさを有することが決定された (ComboMat AR = 2.39 ± 0.01) (図 3D)。これは、収縮がランダムに配向され、あらゆる方向に同様の大きさを示す従来の平坦基材上で増殖させた細胞とは対照的であった (対照 AR = 1.04 ± 0.02)。

10

【0214】

収縮動態に加えて、微小電極アレイ (MEA) を使用して心筋細胞の電気的活性を測定した。イオン透過性樹脂である Nafion を使用して、MEA (ナノ MEA) 上にナノトポグラフィック表面を作製して、NP および ComboMat 条件での hPSC-CM 整列を促進するとともに、下部電極からの高解像度の電気生理学的データの取得をさらに可能にした。図 3E は、対照および ComboMat 培養物から得られた時間的に平均化された電場電位記録を示す。心臓単層の自発的な電気的活性を測定し、ComboMat プラットフォームに曝露された hPSC-CM が、対照、NP、および T3 群よりも有意に長い電場電位持続時間を有することを見出した (図 3F)。さらに、ComboMat プラットフォームは、対照または各成熟キュー単独と比較して、心筋細胞の拍動数を有意に低下させた (図 3G)。パッチクランプを介して測定すると、ComboMat プラットフォームに曝露された hPSC-CM の方が速い上昇速度を示した (図 8)。

20

【0215】

RNA-seq 分析により、ComboMat プラットフォームによってもたらされる心臓代謝の有意な変化が示唆された。このように、Seahorse ミトコンドリアフラックス分析装置を用いた「パルミテートアッセイ」を介して、外因性脂肪酸を利用する心筋細胞の能力を調査した (図 3H)。ComboMat プラットフォームに曝露された hPSC-CM が、 $200 \mu\text{M} \sim 400 \mu\text{M}$ のパルミテート濃度で測定された酸素消費速度 (OCR) の有意に大きな最大変化を示すことが観察された (図 3I)。ComboMat 群では、最大呼吸容量も対照と比較して有意に大きかった (図 9)。

30

【0216】

ComboMat 処理ジストロフィン変異体 hPSC-CM は疾患表現型を発現する

まず、DMD 変異体 hPSC-CM が、ComboMat プラットフォームに対して、それらの正常 (UC3-4) 同質遺伝子対照と同様の様式で応答するかどうかを試験した。Seahorse MitoStress アッセイを使用し (図 4A)、DMD 変異体 hiPSC-CM が、ComboMat プラットフォーム下で培養された場合、対照条件と比較して増加した最大呼吸容量を有することが観察された (図 4B)。しかし、対照条件または ComboMat 条件内では、正常群と DMD 変異体群との間に統計的差はなかった。カスタム ナノ MEA プラットフォームを使用して、DMD 変異体細胞のベースラインの電気生理学的特性を測定した。DMD 変異体 hiPSC-CM の拍動数は、ComboMat プラットフォームに反応して、正常 hPSC-CM と同程度に減少した (図 4C)。さらに、ComboMat に曝露すると、DMD 変異体 hPSC-CM の電場電位持続時間 (FPD) は対照と比較して増加し、これは、正常 hPSC-CM から得られた観察結果を反映している (図 4D)。構造的観点から、DMD 変異体 hiPSC-CM は、ComboMat プラットフォームに曝露すると、位置の合ったサルコメアを有する特徴的な伸長した形態を発現したが、対照条件に曝露された DMD 変異体 hiPSC-CM は、より丸く、より無秩序なサルコメアを示した (図 4E)。

40

50

【0217】

特定の理論に束縛されることなく、肥大および全体的な心筋細胞成熟を誘導することにより、ジストロフィー性hPSC-CMはさらに大きな機械的ストレスおよび細胞損傷を受け、未成熟細胞には存在しない不規則な機能的活性を生じると仮定した。ナノMEAプラットフォームを使用して、対照条件またはComboMat条件に曝露された正常およびDMD変異体hPSC-CMの同質遺伝子対の自発的拍動単層の電氣的活性を記録した。拍動数変動に依存する不整脈検出方法²⁶を使用し、ComboMatプラットフォームに曝露されたDMD変異体hPSC-CMの方が、対照条件で成熟度の低いDMD変異体hPSC-CMよりも催不整脈性が有意に高いことを観察した。図5Aは、個々の拍動間隔を記した、対照条件またはComboMat条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMから得られた代表的な電場電位トレースを示す。ある拍動から次の拍動までの拍動間隔の時間差を測定し（BI）、30回の連続拍動についてこの変化をプロットすることにより（図5B）、成熟したDMD変異体hPSC-CMの拍動数が著しく不安定であることを発見した。BI > 250msを伴う拍動率（図5C）および30回の連続拍動にわたるBIの算術平均（図5D）を測定することにより、催不整脈性状態が高いことを示す、拍動間隔の比較的大きな変化が観察された。インビトロで自律神経系なしで、hPSC-CMは拍動間の大きな変動を伴わず安定した拍動パターンを発生させるはずである。この安定した挙動は、正常心筋細胞およびDMD心筋細胞の両方に対する対照条件、ならびに健常な成熟正常細胞で明らかである（図5B）。重要なことに、正常hPSC-CMとDMD変異体hPSC-CMとの間の機能的相違を観察するためには完全なComboMatプラットフォームが必要であることが観察された。成熟キューを単独で適用すると、健常正常細胞とDMD変異体hPSC-CMとの間に分離はない（図10）。

10

20

【0218】

この拍動数変動の潜在的機構を特定するために、ナノモルの細胞内 Ca^{2+} 濃度を計算するために較正されたIonOptixイメージング設定上でレシオメトリック Ca^{2+} インジケータFura-2を使用して、細胞内カルシウム（ Ca^{2+} ）を測定した。図5Eは、対照条件またはComboMat条件に曝露されたDMD変異体hPSC-CMから得られた代表的な Ca^{2+} トレースを示す。成熟したDMD変異体hPSC-CMでは、対照群の成熟度の低い細胞と比較して、ベースライン、または弛緩期静止 Ca^{2+} 濃度が上昇していることが見出された。この弛緩期 Ca^{2+} 濃度を定量化すると、前述のように電氣的不安定性と同様の傾向が観察された。対照群の正常およびDMD変異体hPSC-CMは、互いに統計的に差のないサイトゾル Ca^{2+} 濃度を有した（図5F）。

30

【0219】

成熟hPSC-CMを使用する表現型薬物スクリーニング

さらに詳細な表現型薬物スクリーニングのための潜在的な薬物標的または薬物クラスを同定するために、様々な作用機序を有する2,000種類の多様な分子の小さなライブラリーを用いて、予備的な中間スループットの半自動スクリーニングを行った。低張ストレス後のDMD変異体hPSC-CMに対して、細胞内ATP（ハイスループットスクリーニングで広く使用されている細胞生存率のアッセイ）を測定した。全体として、アッセイのZプライムは0.71であった。Zスコアに基づいて8,000のデータポイント（2,000種類の化合物を4種類の濃度）をランク付けし、プロットした（図6A）。Zスコアランク付け（>3）、反復の標準偏差、および用量範囲応答の上昇を考慮して、2000種類の入力化合物から39のヒットを同定した（約2%のヒット率）（表2）。これらのヒットのうち、9種類（約23%）を Ca^{2+} チャンネル遮断薬として分類した。

40

【0220】

（表2）一次スクリーニングのヒット

化合物	生存率%の 平均	Zスコア	作用機序
マレイン酸アセプロマジン	239.1±38.37	6.57	鎮静
アシクロビル	258.33±14.16	7.44	抗ウイルス性
アクロミド	276.60±12.37	8.26	抗原虫性、抗コクシジウム薬
アルトレタミン	188.22±2.87	4.27	抗悪性腫瘍性
アミノ馬尿酸	207.49±7.09	5.14	腎機能診断
アミオダロン塩酸塩	168.14±8.45	3.37	アドレナリン作動薬、 冠拡張薬、Caチャネル遮断薬
アンチマイシンA	180.04±1.89	3.90	抗真菌性、抗ウイルス性、 シトクロム酸化阻害
アスコルビン酸	181.48±23.68	3.97	抗壊血病性、抗ウイルス性
アテノロール	171.27±1.77	3.51	β アドレナリン遮断薬
塩化ベンザルコニウム	194.64±23.10	4.56	抗感染症性（局所）
ベプリジル塩酸塩	178.65±3.48	3.84	抗不整脈性

10

20

化合物	生存率%の 平均	Zスコア	作用機序
ビオチン	315.95±51.89	10.04	ビタミンB複合体
カンタリジン	239.59±14.65	6.59	びらん剤 (テルペノイド)
セフジニル	185.70±45.76	4.16	抗細菌性
クロルシクリジン塩酸塩	238.84±35.23	6.56	H1抗ヒスタミン剤
シンコフェン	168.44±44.63	3.38	鎮痛性、解熱性、 抗炎症性
クロピドグレル硫酸塩	194.84±50.3	4.57	血小板凝集阻害剤
酢酸コルチゾン	205.92±12.32	5.07	グルココルチコイド
コチニン	188.79±56.0	4.30	抗鬱剤
クロタミトン	178.25±27.22	3.82	鎮痒薬、殺疥癬虫薬
ダカルバジン	177.63±45.35	3.79	抗悪性腫瘍性
ドキソルビシン	207.98±34.29	5.16	抗悪性腫瘍性
エストロピペート	208.65±30.77	5.19	エストロゲン
ギトキシゲニンジアセテート	177.20±1.17	3.77	強心配糖体
ハロペリドール	197.30±19.03	4.68	抗ジスキネジア、抗精神病薬
ヒドロキシ尿素	187.65±49.61	4.25	抗悪性腫瘍性、 リボヌクレオシド二リン酸 還元酵素阻害
メブヒドロリン ナフタレンスルホネート	172.81±39.86	3.58	H1抗ヒスタミン剤
ナプロキソール	168.76±2.61	3.39	抗炎症性、鎮痛性、 解熱性
酒石酸ニコチニック アルコール	262.12±57.89	7.61	血管拡張薬
ニモジピン	292.38±56.17	8.97	カルシウムチャネル遮断薬、 血管拡張薬
ニトレンジピン	275.48±52.16	8.21	カルシウムチャネル遮断薬、 血管拡張薬
オキシフェンブタゾン	176.96±42.53	3.76	抗炎症性

10

20

30

40

化合物	生存率%の 平均	Zスコア	作用機序
ポドフィロックス	168.46±28.98	3.38	抗悪性腫瘍性、微小管会合 およびヒトDNA トポイソメラーゼIIの阻害、 有糸分裂阻害剤
プログルミド	175.69±50.35	3.71	抗コリン性
塩酸ピューロマイシン	187.84±39.68	4.25	抗悪性腫瘍性、抗原虫性
パルミチン酸レチニル	236.79±46.63	6.46	プロビタミン、 抗眼球乾燥性
セラメクチン	172.91±25.29	3.58	抗寄生虫性、防ダニ
スルファドキシム	195.32±23.52	4.59	抗細菌性
テルフェナジン	211.28±22.46	5.31	H1抗ヒスタミン剤、非鎮静型
チロロン	172.53±15.79	3.56	抗ウイルス性

10

20

【0221】

この予備的な薬物スクリーニングデータと細胞内 Ca^{2+} 含有量上昇（図5F）の知見とを組み合わせ、ナノMEAプラットフォームを利用して、ジヒドロピリジン Ca^{2+} チャネル遮断薬、ニトレンジピン（図6Aの青色のボックスにより強調される）が成熟DMD変異体hiPSC-CMの催不整脈性挙動を低下させ得るかどうかを試験した。DMD患者に有益でないことが以前に示された薬剤、シルデナフィル²⁰も試験した。初期の時点（4日間のComboMat曝露）でも、成熟正常hPSC-CMとDMD変異体hPSC-CMとの間のベースライン拍動数変動には有意差があったが、未成熟細胞は互いに区別できなかった（図6A）。

【0222】

様々な濃度のニトレンジピンまたはシルデナフィルクエン酸塩に細胞を7日間曝露し、それらの拍動数変動を測定した。図6C～Dは、それぞれニトレンジピンおよびシルデナフィルの用量反応曲線を示す。ニトレンジピンは、DMSO担体対照と比較して、成熟DMD変異体hPSC-CMの平均BIを有意に減少させた。最大1 μM のニトレンジピンを投与すると、拍動数変動が生理学的に適切な範囲内（<50ms）のレベルに回復した。しかし、高用量では自発的な拍動が止まった。対照的に、シルデナフィルは、用量に関係なく、拍動数変動に影響を及ぼさなかった。ニトレンジピンもシルデナフィルも、対照条件に曝露された細胞、またはComboMatプラットフォームに曝露された正常hPSC-CMの拍動数変動に有意な影響を及ぼさなかった。ニトレンジピンの効果は、細胞培養培地から除去されると、48時間以内にウォッシュアウトされた（図6E）。 Ca^{2+} イメージングにより、100nMニトレンジピンが、DMSO対照と比較して、成熟DMD変異体hPSC-CMの弛緩期 Ca^{2+} 含有量を減少させることが明らかにされた（図6F～G）。ニトレンジピンは、対照条件に曝露された細胞の弛緩期 Ca^{2+} 含有量に影響を及ぼさなかった（図6G）。

30

40

【0223】

考察

ComboMatプラットフォームは、インビトロで心筋細胞の発達を調節し、細胞面積を増加させ、サルコメア長を延ばし、生理学的に適切性の高い二核性パーセンテージを達成する強力なツールであることが証明された。ComboMatプラットフォームから観察された機能増強の多くは、RNAseq分析によって予測された。ComboMat群では、筋肉の発達および収縮のGO項目がアップレギュレートされたため、CCQ収縮マッピングによって測定されるように収縮動態がさらに速くなった。ComboMat群では、脂肪酸取り込みなどの代謝GO項目もアッ

50

プレギュレートされ、続いて、ComboMat群に曝露された細胞の方が、大きな最大呼吸容量、および外因性脂肪酸の利用能を有することが観察された。したがって、ComboMatプラットフォームによって与えられる転写変化と機能的変化との間には一致があり、本明細書において提供される方法の検証を提供した。

【0224】

本明細書に記載の方法の重要な側面は、良好な表現型薬物スクリーニングプラットフォームの開発である。ナノMEA電気生理学的スクリーニングシステムと組み合わせたComboMatプラットフォームなどの方法は、新規化合物の高度なスループットスクリーニングのために規模を拡大することができる。非侵襲的測定は、細胞機能を縦断的にモニターするために使用することができ、疾患表現型の強力な層別化は、薬物治療が機能の回復と関連するかどうかを確認するための健常対照との容易な比較を可能にする。重要な Ca^{2+} チャネル遮断薬がスクリーニングで検証され、mdxマウスモデル試験から偽陽性の薬物ヒットを除外することができた²⁰。

10

【0225】

ジストロフィー性心筋症の以前のhPSC-CMモデルは、測定可能な疾患表現型をもたらすために低張負荷に大きく依存している¹¹、²³。低張負荷は効果的ではあるが、生理的に正確ではなく、一過性の傷害にすぎない。したがって、ComboMatプラットフォームを用いてDMD変異体hPSC-CMを成熟させることにより、細胞はカルシウム過負荷に一部起因する拍動数変動を示す。活性酸素種（ROS）およびミトコンドリアアポトーシスシグナル伝達経路を介した細胞傷害の媒介に対する関与とともに²⁷、 Ca^{2+} 過負荷は心不整脈を媒介することが長い間知られており²⁸、インビトロおよびインビボの両方でDMD病態生理の背後にある推進力であると示唆されてきた²⁹。したがって、DMD変異体hPSC-CMの成熟依存性疾患表現型は、患者に見られる初期の疾患表現型を再現することが実証されている。これは、以前のDMD疾患モデルとの重要な違いであり、心疾患モデリング分野における論理的な進展を表している。また、Wenらは、疾患表現型をもたらすために不整脈源性右室異形成のhPSC-CMモデルにおける成熟の必要性を報告し³⁰、Tiburcyらは、慢性カテコールアミン刺激を介する成熟が心不全をモデル化する能力を改善することを実証した³¹。これらの知見に基づいて、本明細書に記載の方法および組成物を使用する標準的な定方向性分化方法の典型的な胎児段階を超えて成熟したhPSC-CMを使用することにより、他の心筋症を忠実にモデル化することができる。

20

30

【0226】

DMD患者は拡張機能障害および不整脈を示すことが知られているが、この疾患表現型の病因は完全には理解されていない¹⁸。 Ca^{2+} 過負荷は、ジストロフィー性心筋症の病態生理に中心的な役割を果たすと長い間仮定されてきた²⁹。細胞膜および筋小胞体上の漏出性 Ca^{2+} チャネル、異常なNOシグナル伝達、および筋細胞膜の裂け目はいずれも細胞への Ca^{2+} 侵入の手段として提案されているが、意見の一致は存在しない。 Ca^{2+} 濃度の上昇による内因性電気生理学的疾患表現型を有する本モデルは、これらの疑問のいくつかに対処するための価値あるツールであることを証明する。まとめると、本データは、心臓成熟がDMD心筋症などの成人発症疾患を正確にモデル化する重要な因子であり、ComboMatプラットフォームが成熟度の高いhPSC-CMの作製に必須であることを示す。さらに、ナノMEAプラットフォームを併用して、潜在的な治療標的を効果的にスクリーニングすることができる。

40

【0227】

実施例2: 方法

実験群

3つの成熟キュー、NP、T3、およびLet7iのすべての異なる組合せに曝露された細胞に対して、RNAseqを行った。ウイルス曝露に空ベクター（EV）陰性対照を含めた。あらゆる他のアッセイについては、完全なComboMatプラットフォーム（Let7i + NP + T3）と、ウイルスベクター対照（EV + Flat + T3なし）ならびに各成熟キュー単独：NP（EV + NP + T3なし）、T3（EV + Flat + T3）、およびLet7i（Let7i + Flat + T3なし）とを比較した。ComboMatプラットフォームは、培養期間中の特定の時点でナノトポグラフィック基材キュー、甲状腺

50

ホルモンT3、およびLet-7iマイクロRNA (miR) の過剰発現を利用して、hPSC-CMの高度な構造および表現型の発達を誘導する。各キューは、hPSC-CM発達の特定の側面に影響を及ぼすように選択した。ナノトポグラフィック基材キューは、初代およびhPSC-CMの構造的成熟を促進することが示されている¹⁴、³²。ただし、これらの生物物理学的キューは、hPSC-CMの代謝発達に対して最小限の影響を及ぼす。このため、hPSC-CMの代謝、カルシウム処理、および収縮能を高めるための生化学的キューとして、甲状腺ホルモンT3を導入した¹⁶。しかし、予備的結果から、長期T3曝露が、甲状腺機能亢進症からの合併症を連想させる、サルコメア発達および拍動数変動に負の影響を及ぼすことが見出された (図11)。これらの有害な影響に対抗するため、Let7ファミリーなどのmiRを使用してトランスクリプトームを操作した。Let7iは、代謝能力、肥大、および遺伝子プロファイルの改善とともに¹⁷、甲状腺ホルモン受容体を含む多くの核内受容体の転写共抑制因子として作用する毛成長関連遺伝子の発現を調節するのに役立つ。

10

【0228】

hiPS細胞株の生成および維持

以前に記述されている¹¹ように、IRB承認プロトコルから正常な尿由来ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) を得た。要約すると、ヒトOct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Mycをコードする多シストロン性レンチウイルスベクター³³を使用して、クリーンキャッチ尿試料から収集した細胞をiPSCにリプログラムした¹¹。派生hiPSC系統 (UC3-4) の核型を決定し、正常な46,XY核型であることを示した。hiPSCをMatrigelコーティング組織培養プラスチック上で培養し、mTeSR培養培地 (StemCell Technologies) を供給し、1.9U/mL Dispase (ThermoFisher) を使用して継代した。細胞を37℃、5%CO₂、および5%O₂で低酸素状態で培養した。CRISPR-Cas9技術を使用してDMD変異体hiPSC (UC1015-6) を生成して、正常な親系統UC3-4から同質遺伝子対を作製した。要約すると、ヒトジストロフィンの最初の筋肉特異的エクソンを標的とするガイド配列を使用して、ジストロフィン遺伝子の263位の単一G塩基を削除して、変異体対立遺伝子を作製した (図7)。配列決定により、ジストロフィン遺伝子の変異を確認した。DMD変異体hiPSCは、正常UC3-4親系統と同じ方法で維持した。

20

【0229】

心臓定方向性分化および細胞培養

以前に記述されている²²ように、単層ベースの定方向性分化プロトコルを使用した。hiPSCは、Versene (ThermoFisher) を使用して単一細胞に解離し、Matrigelコーティングプレート上にmTeSR中で高密度 (250,000細胞/cm²) に播種した。単層が形成された後、インスリン不含B27を補充したRPMI1640 (ThermoFisher) (RPMI/B27/Ins-) 中の100nM Activin-A (R&D Systems) を用いた誘導まで、mTeSR中の1μM Chiron 99021 (Stemgent) を用いて細胞を処理し、0日目に正常酸素状態 (37℃、5%CO₂、周囲O₂) に切り替えた。18時間後、細胞に5ng/mL BMP4 (R&D Systems) + RPMI/B27/Ins-培地中の1μM Chiron 99021を供給した。誘導後3日目に、細胞にRPMI/B27/Ins-培地中の1μM Xav 939 (Tocris) を供給した。誘導後5日目に、細胞に新鮮なRPMI/B27/Ins-培地を供給した。誘導後7日目に、インスリンを含有するRPMI-B27培地に細胞を切り替え、1日おきに培地 (RPMI/B27/Ins+) をリフレッシュした。T3処理群では、RPMI/B27/Ins+に20ng/ml T3を新たに加えた。

30

【0230】

Let7i miRNAのレンチウイルス形質導入および心筋細胞の精製

Let7i過剰発現 (OE) 構築物作製の詳細な説明は、Kuppusamy et al.¹⁷に見出すことができる。Let7iに対する対照ベクターは、U6プロモーター下のeGFP発現pLK0.1 TRCベクター (Addgene) とした。pLK0.1 TRCベクターのAgeI部位とEcoRI部位との間にeGFP構築物をクローニングした。レンチウイルス粒子を生成するために、トランスフェクションの1日前に293FT細胞を播種した。トランスフェクションの日に、293FT細胞にpsPAX2 (Addgene #12260)、pMD2.G (Addgene #12259)、ベクターおよびポリエチレンイミン (PEI) をコトランスフェクトした。24時間後に培地を交換し、次いで、24時間および48時間後にレンチウイルス粒子を回収した。PEG-it Virus Precipitation Solution (5x) (System Biosciences) を使用してレンチウイルス粒子を濃縮した。

40

50

【0231】

誘導後15日目に、37℃で1時間、カルシウムおよび10U/mL DNaseを含有するDPBS中の10U/mLコラゲナーゼI型を用いて、hiPSC-CMの拍動単層を解離した。次いで、細胞を収集し、遠心分離し、10U/mL DNaseを含有するTrypLE (ThermoFisher) に5分間かけて再懸濁した。P1000マイクロピペットを使用して、単一細胞が得られるまで、TrypLE中のhiPSC-CMの塊を粉碎した。次いで、Matrigelコーティングプレート上に100,000細胞/cm²で細胞を播種した。翌日、RPMI/B27/Ins+培地中の臭化ヘキサジメトリン (Polybrene、6 µg/ml) の存在下でウイルスを一晩希釈することにより、細胞のウイルス形質導入を行った。翌日、細胞をPBSで洗浄し、RPMI/B27/Ins+を交換した。

【0232】

次いで、培地を交換することなく、3日間にわたり、グルコース不含DMEM、ピルビン酸ナトリウム、または2%ウマ血清および4mMラクテートを含有するグルタミン (ThermoFisher) を細胞に供給することにより、代謝チャレンジ³⁴により心筋細胞を精製した。心臓純度のフローサイトメトリーを行って、高純度の試料を確認した (図12)。その後、3日間かけてhiPSC-CMを2 µg/mLピューロマイシンジヒドロクロリドを含有するRPMI/B27/Ins+培地に切り替えて、形質導入が成功したhiPSC-CMを選択した。

【0233】

ナノパターン化基材およびナノMEAの作製

以前に記述されている³⁵ように、毛管カリソグラフィーによりナノパターン化基材を作製した。意図するナノトポグラフィック形状 (幅800nmの隆起部および深さ600nmの溝) を有するディープイオンエッチングされたシリコンマスター上に液体PUAプレポリマーを滴下分配し、その上に透明ポリエステル (PET) フィルムを配置することによって、ポリウレタンアクリレート (PUA) マスター型を作製した。hPSC-CMの構造および機能を増強するためにナノパターン寸法を選択した (図13)。高出力UV光源下で硬化させた後、シリコンマスターからPUAおよびPETフィルムを剥離して、PUAマスター型を作製した。ナノパターン化細胞培養基材を作製するために、ガラス製のプライマー処理した18mm、#1カバースリップ (Fisher Scientific) 上にポリウレタン系UV硬化性ポリマー (NOA76、Norland Optical Adhesive) を滴下分配し、PUAマスター型をその上に配置した。UV光源により硬化させた後、PUAマスター型を剥離し、ナノパターン化表面 (NP) を残した。同じプロセスを用いて、ナノパターン化PUAマスターをパターン化されていないPETフィルムに置き換えて、対照平坦基材を製造した。

【0234】

細胞培養のための表面を調製するために、PU系NPおよび対照平坦基材を、70%エタノールで洗浄し、50Wで5分間酸素プラズマ処理し、UV-C光源下に1時間置いて滅菌し、次いで、5 µg/cm²のヒトフィブロネクチンとともに37℃で24時間インキュベートした (Life Technologies)。150,000細胞/cm²の密度でhPSC-CMを播種した。

【0235】

US Pat No.20160017268A1に記載されているように、ナノパターン化MEA (ナノMEA) を作製した。要約すると、溶媒媒介毛管カリソグラフィーにより、市販のマルチウェルMEAプレート (Axion Biosystems) 上に、イオン透過性ポリマーのNafion (Sigma-Aldrich) をパターン化した。細胞播種の前に、UV-C光を用いて対照平坦表面またはナノMEA Nafion表面を滅菌し、次いで、5 µg/cm²のヒトフィブロネクチン (Life Technologies) とともに37℃で6時間インキュベートした。MEAプレートの1ウェル当たり25,000細胞で、滴下によりhPSC-CMを播種した。

【0236】

免疫蛍光イメージングおよび形態学的分析

ComboMatプラットフォームの3週間後、4%パラホルムアルデヒド (Affymetrix) 中に室温で15分間固定することにより、免疫蛍光分析用に細胞を調製した。次いで、PBS中の0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) を用いて試料を透過処理し、5%ヤギ血清によりブロックした。次いで、1%ヤギ血清中のマウス抗アクチニンモノクローナル抗体 (1:1000、S

10

20

30

40

50

igma-Aldrich)とともに細胞を4で一晩インキュベートした。PBSで洗浄した後、Alexa-594コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体(1:200、Invitrogen)およびAlexafluor 488標識ファロイジン(1:200、Invitrogen)を用いて試料を染色した。DAPIを含有するVectashield(Vector Labs)を用いて核対比染色を行った。Nikon CFI Plan Apo VC 60倍水浸対物レンズを備えたNikon A1R共焦点顕微鏡を使用して、サルコメア分析のための詳細な免疫蛍光画像を取得し、20倍空気対物レンズを使用して、細胞二核性パーセンテージを測定するための細胞の低出力画像を得た。両対物レンズ出力から得られた細胞を使用して、細胞サイズを測定した。形態学およびサルコメア分析のために、10,000細胞/cm²でhPSC-CMを播種した。各条件について、少なくとも3つの生物学的試料を播種し、1試料当たり少なくとも7つの細胞を撮像した。

10

【0237】

定量的サルコメア分析

MATLAB(Mathworks)のスキャン勾配/フーリエ変換スクリプトを使用して、サルコメア整列、パターン強度、およびサルコメア長について免疫蛍光画像を定量化した。個別に分析されるいくつかの小さなセグメントに各画像を分割した。方向導関数を使用して、各セグメントの画像勾配を計算して、サルコメアの局所的な整列を決定した。次いで、勾配方向の一次元フーリエ変換の最大ピークを計算することにより、パターン強度を決定した。サルコメア長は、この同じ勾配方向に沿ったサルコメアの強度プロファイルを測定することにより計算した。強度プロファイルがそれらの平均と交差する頻度により、各画像セグメント内の局所サルコメア長の正確な計算が可能になった。この分析は、完了すると、ナ

20

【0238】

カルシウムイメージング

以前に記述されている³⁶ように、レシオメトリックインジケータ色素fura2-AMを使用して、細胞内カルシウム含有量を測定した。簡単に言えば、細胞をTyrode溶液中の0.2μM fura2-AM色素中で37で20分間インキュベートし、PBSで洗浄した。次いで、Nikon倒立蛍光顕微鏡に連結したIonoptix Stepper Switchシステムを用いて自発的Ca²⁺過渡変化をモニターした。40倍Olympus対物レンズを使用して蛍光シグナルを取得し、510nmフィルターを通過させ、光電子増倍管を使用してシグナルを定量化した。下記の式を使用してIonoptixソフトウェアIonWizardで弛緩期静止カルシウム濃度を定量化した。

30

$$[Ca^{2+}] = K_d * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} * \frac{Sf2}{Sb2}$$

式中、

K_d = fura2カルシウム解離定数 = 225nM

R_{max} および R_{min} = 飽和カルシウム濃度下およびカルシウム非存在下でそれぞれ測定された比率値

$Sf2/Sb2$ = それぞれゼロおよび飽和カルシウム溶液中のバックグラウンド減算波長2励起蛍光間の比

【0239】

電子顕微鏡および超微細構造分析

ComboMatプラットフォーム下での3週間後、透過型電子顕微鏡(TEM)分析のために、hiPSC-CMをカコジル酸ナトリウム緩衝液中4%グルタルアルデヒド中で2時間室温で固定した。次いで、試料を緩衝液で洗浄し、緩衝化1%四酸化オスミウム中で氷上で30分間染色した。次に、試料を水で洗浄し、段階的な一連のエタノールで脱水した。次いで、1:1エタノール:Epon-Aralditeエポキシ樹脂の浸透とそれに続く純Epon-Aralditeの2回の交換により試料を処理した。この時点で、重合のために60のオープン内の試料の上に第2のカバースリップを置いた。翌日、フッ化水素酸を使用してカバースリップを溶解し、試料をブロックに載せて切断した。80kVのJEOL JEM 1200EXIIによる画像化の前に、単一細胞の超薄(70~80nm)軸切片をクエン酸鉛と比較した。ImageJ(国立衛生研究所)を使用して、

40

50

サルコメア構造内の連続した電子密度の高いバンドの幅として定義されるZバンド幅を測定した。

【0240】

MEA電気生理学的分析

AxISソフトウェア (Axion Biosystems) を使用して、自発的拍動心筋細胞の電気生理学的分析を2分間収集した。生データ収集後、Butterworthバンドパスフィルターおよび90 μ Vスパイク検出閾値を使用してシグナルをフィルタリングした。多項式フィットT波検出アルゴリズムを使用して、電場電位持続時間を自動的に決定した。以前に公開されている²⁶ように、30回の連続拍動に関する拍動間隔分析を行った (表3を参照)。

【0241】

(表3) 拍動間隔分析パラメーター

パラメーター	説明
StDev BI	拍動間隔の標準偏差
平均 Δ BI	連続拍動間の差の平均絶対値
中央値 Δ BI	連続拍動間の差の中央絶対値
StDev Δ BI	連続拍動間の差の絶対値の標準偏差
% Δ BI > 100ms	絶対 Δ BI値が100msを超える割合
% Δ BI > 250ms	絶対 Δ BI値が250msを超える割合

【0242】

ミトコンドリア機能アッセイ

以前に公開されている¹⁷ように、Seahorse XF96細胞外フラックス分析器を使用して、細胞代謝機能を測定した。ComboMatプラットフォームによる処理の3週間後、細胞をトリプシン処理し、フィブロネクチンコーティング ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) XF96プレート上に30,000細胞/ウェルの密度で再播種した。XF96プレートへの再播種の3日後にMitoStressおよびパルミテートアッセイを行った。実験の1時間前に、RPMI/B27/Ins+培地を、ピルビン酸ナトリウム (Gibco/Invitrogen、1mM)、およびMitoStressアッセイ用の25mMグルコースまたはパルミテートアッセイ用の0.5mMカルニチンを含む25mMグルコースを補充したSeahorse XFアッセイ培地に交換した。MitoStressアッセイでは、測定中に基質および阻害剤の注入を適用して、4-(トリフルオロメトキシ)フェニルヒドラゾン1 μM (FCCP; Seahorse Biosciences)、オリゴマイシン (2.5 μM)、アンチマイシン (2.5 μM) およびロテノン (2.5 μM) の最終濃度を達成した。パルミテートアッセイでは、測定中に基質および阻害剤の注入を適用して、200mMパルミテートまたは33 μM BSAの最終濃度を達成した。OCR値は、各ウェルに存在する細胞の数に対してさらに正規化し、355nm励起および460nm発光での蛍光を使用して測定する際にHoechst染色 (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich) によって定量化した。MitoStressアッセイにおける基礎呼吸はオリゴマイシン添加前のOCRと定義したのに対して、最大呼吸容量はオリゴマイシン添加後のOCRからFCCPに応答するOCRの変化と定義した。外因性脂肪酸利用は、パルミテート添加後のベースラインからのOCRの最大変化と定義した。

【0243】

収縮分析

以前に公開されている²²ように、相関ベース収縮定量化 (CCQ) と呼ばれるビデオベース収縮分析アルゴリズム³⁷を使用し、粒子画像速度測定およびデジタル画像相関アルゴリズムを利用して、明視野ビデオ記録から細胞の動きを追跡した。収縮の大きさ、速度、および角度などの機能的出力は、各ビデオフレームのベクトルフィールドとして出力され、空間的または時間的に平均化することができる。簡単に言えば、設定されたサイズのウィンドウのグリッドに基準フレームが分割される。動きを追跡するために、第2のフレームを比較する相関スキームを通して各ウィンドウを実行し、第2のフレームにおけるそのウ

インドウの位置を提供する。使用した相関方程式は、サブピクセル精度を与える確率的性質を有するガウス型相関ピークを与えた。この分析に使用したビデオは、Nikonのカメラを用いて20倍の倍率で每秒30フレームで撮影した。

【0244】

RNA-seq分析

RUES2 hESC-CMから、トリゾール (Thermo Fisher Scientific) を使用して全RNAを抽出した。Tophat (PMID:19289445、バージョン2.0.13) を使用して、RNA-seq試料をhg19にアラインした。Ensembl GRCh37遺伝子アノテーションを使用するhtseq-count (PMID:25260700) を使用して遺伝子レベルの読み取り数を定量化した。その後の分析のために、RNA-seq試料全体で合計した3RPKM超の全発現を有する遺伝子を保存した。主成分分析にはRのprincomp関数を使用した。差次的遺伝子発現解析にDESeq (PMID:20979621) を使用した。1.5を超える変化倍率を有する遺伝子は、差次的に発現すると見なした。遺伝子オントロジー濃縮分析にはtopGO Rパッケージ (PMID:16606683) を使用した。

10

【0245】

経路濃縮のヒートマップのために、各条件を対照 (EV-Flat) 条件と比較し、アップレギュレートされた遺伝子 (>1.5 倍の変化) およびダウンレギュレートされた遺伝子 (<-1.5 倍の変化) を同定した。心臓成熟に有益な経路の精選されたセットに対する濃縮のために、アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた遺伝子に対して超幾何分布検定を別個に行い、 $m \times n$ マトリックスを得た。ここで、 m は経路の数 ($m=7$) であり、 n は条件の数 ($n=10$) である。アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた遺伝子に対する濃縮 p 値間の比の負の \log_{10} を計算して、処理の全体の正味「利点」を表した: 大きな正の値 (>0) は、処理が、心臓成熟経路では、これらの遺伝子のダウンレギュレーションと比較して遺伝子のさらに多くのアップレギュレーションを生じることを意味し、大きな負の値は、処理が、心臓成熟経路では遺伝子のさらに多くのダウンレギュレーションを生じることを意味する。

20

【0246】

フローサイトメトリー

細胞を解離し、ラクトート精製およびピューロマイシン選択の前後にフローサイトメトリー用に調製して、選択効率を決定した。最初に4%パラホルムアルデヒドで細胞を15分間固定した。次いで、0.75%サポニンを用いて細胞を透過処理し、1:100マウス抗cTnTまたはアイソタイプ対照マウスIgG抗体のいずれかを含む5%FBSを含有するPBSで染色した。Alexa-488コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体 (1:200、Invitrogen) を視覚化に使用した。BD Sciences FACS Cantoフローサイトメーターに試料を流し、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。

30

【0247】

ハイスループット薬物スクリーニング

分化の14日後に、TrypLE (Life Technologies) 中で5分間インキュベートすることによって心筋細胞を単一細胞懸濁液に解離させ、1mg/mL Matrigel (Corning) で予めコーティングした不透明底部384ウェルプレート (Nunc) 上に、10,000細胞/ウェルで37℃で1時間かけて播種した。次いで、384ウェルプレート上で細胞をさらに16日間培養し、72時間ごとに培地を交換した。15日後、CyBi Well Vario 384/25液体ハンドラー (Cybio, Germany) を使用して、DMSOに溶解した化合物をプレートに分配して、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} Mの濃度を2連で達成した。18時間のインキュベーション後、BioTek EL406ウォッシュャーディスペンサー (BioTek, Winooski, VT) を使用して、培地を吸引し、12.5%の正常浸透圧に達するように純水を注入した。30分間のインキュベーション後、上清を除去し、製造元の指示に従ってCellTiter Glo (Promega) を加えることによってプレートをアッセイした。5分後、EnVision Multilable Resaer (PerkinElmer) を使用して発光を測定した。データはいずれも、Tibco Spotfire (Tibco Spotfire, Boston, MA) によって処理および視覚化した。各ウェルからのシグナルとDMSOを単独で用いて処理した対照ウェルの平均とを比較することにより、生存率を計算した (1プレート当たり32対照ウェル)。

40

50

【 0 2 4 8 】

統計分析

特に明記されていない限り、SigmaPlotソフトウェアのTukeyのペアワイズ事後分析とともに一元配置分散分析または二元配置分散分析のいずれかを使用して、群間の統計的有意性を決定した。統計分析ではいずれも、0.05未満のp値は有意と見なした。エラーバーは、平均の標準誤差（SEM）を表す。

【 0 2 4 9 】

参考文献

1. Celermajer, D. S., Chow, C. K., Marijon, E., Anstey, N. M. & Woo, K. S. Cardiovascular Disease in the Developing World. *JAC* **60**, 1207–1216 (2012).
2. Watkins, H., Ashrafian, H. & Redwood, C. Inherited Cardiomyopathies. *The New England Journal*

- of Medicine* **364**, 1–14 (2011).
3. Kim, C. iPSC technology-Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Reports* **48**, 256–265 (2015).
 4. Yang, X., Pabon, L. & Murry, C. E. Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circulation Research* **114**, 511–523 (2014).
 5. Moretti, A. *et al.* Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med* **363**, 1397–1409 (2010).
 6. Itzhaki, I. *et al.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 225–229 (2012). 10
 7. Novak, A. *et al.* Cardiomyocytes generated from CPVT. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 468–482 (2012).
 8. Huang, H.-P. *et al.* Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Human Molecular Genetics* **20**, 1–14 (2011).
 9. Lan, F. *et al.* Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 101–113 (2013). 20
 10. Sun, N. *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Science Translational Medicine* **4**, 130ra47–130ra47 (2012).
 11. Guan, X. *et al.* Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from human urine: New biologic reagents for drug discovery. *Stem Cell Research* **12**, 467–480 (2014).
 12. Lin, B. *et al.* Modeling and study of the mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from individuals with Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms* **8**, 457–466 (2015).
 13. Smith, A. S. T., Macadangdang, J., Leung, W., Laflamme, M. A. & Kim, D.-H. Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening. *Biotechnology Advances* **35**, 77–94 (2017). 30
 14. Carson, D. *et al.* Nanotopography-Induced Structural Anisotropy and Sarcomere Development in Human Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21923–21932 (2016).
 15. Shiraishi, I., Takamatsu, T. & Fujita, S. Three-dimensional observation with a confocal scanning laser microscope of fibronectin immunolabelling during cardiac looping in the chick embryo. *Anatomy and Embryology* **191**, 1–8 (1995). 40
 16. Yang, X. *et al.* Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived

- from induced pluripotent stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **72**, 296–304 (2014).
17. Kuppusamy, K. T. *et al.* Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E2785–E2794 (2015).
 18. Finsterer, J. & Cripe, L. Treatment of dystrophin cardiomyopathies. **11**, 168–179 (2014).
 19. Mourkioti, F. *et al.* Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. **15**, 895–904 (2013). 10
 20. Leung, D. G. *et al.* Sildenafil does not improve cardiomyopathy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol.* **76**, 541–549 (2014).
 21. Adamo, C. M. *et al.* Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 19079–19083 (2010).
 22. Macadangdang, J. *et al.* Nanopatterned Human iPSC-Based Model of a Dystrophin-Null Cardiomyopathic Phenotype. *Cellular and Molecular Bioengineering* **8**, 320–332 (2015).
 23. Young, C. S. *et al.* A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. 1–9 (2016). 20
doi:10.1016/j.stem.2016.01.021
 24. Gurvich, O. L. *et al.* DMDexon 1 truncating point mutations: Amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6. *Hum. Mutat.* **30**, 633–640 (2009).
 25. Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K. & Wu, J.-R. Kruppel-like factor KLF9 regulates PPARgamma transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death and Differentiation* **18**, 315–327 (2010).
 26. Gilchrist, K. H., Lewis, G. F., Gay, E. A., Sellgren, K. L. & Grego, S. High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode arrays. *Toxicology and Applied Pharmacology* **288**, 249–257 (2015). 30
 27. Vassalle, M. & Lin, C.-I. Calcium Overload and Cardiac Function. *J Biomed Sci* **11**, 542–565 (2004).
 28. Thandroyen, F. T. *et al.* Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circulation Research* **69**, 810–819 (1991).
 29. van Westering, T., Betts, C. & Wood, M. Current Understanding of Molecular Pathology and Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 8823-8855 **20**, 8823–8855 (2015). 40
 30. Wen, J.-Y. *et al.* Maturation-Based Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Using

- Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ J* 1–7 (2015). doi:10.1253/circj.CJ-15-0363
31. Tiburcy, M. *et al.* Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and RepairClinical Perspective. *Circulation* **135**, 1832–1847 (2017).
 32. Kim, D.-H. *et al.* Nanoscale cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 565–570 (2010).
 33. Warlich, E. *et al.* Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming. *Mol Ther* **19**, 782–789 (2009). 10
 34. Tohyama, S. *et al.* Distinct Metabolic Flow EnablesLarge-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell* **12**, 127–137 (2013).
 35. Macadangang, J. *et al.* Capillary Force Lithography for Cardiac Tissue Engineering. e50039 (2014).
 36. Lundy, S. D., Zhu, W.-Z., Regnier, M. & Laflamme, M. A. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* **22**, 1991–2002 (2013).
 37. Milde, F. *et al.* Cell Image Velocimetry (CIV): boosting the automated quantification of cell migration in wound healing assays. *Integr. Biol.* **4**, 1437 (2012). 20

【 0 2 5 0 】

配列

SEQ ID NO: 1

CTGGCTGAGG TAGTAGTTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCCG
TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCTA

SEQ ID NO: 2

CTGGCTGAGG TAGTAGTTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCCG
TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCTAG

SEQ ID NO: 3

CTGGCTGAGG TAGTAGTTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCCG
TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCT

SEQ ID NO: 4

GGGCCCTGGC TGAGGTAGTA GTTTGTGCTG TTGGTCGGGT TGTGACATTG
CCCGCTGTGGAGATAACTGC GCAAGCTACT GCCTTGCTAG TG

30

SEQ ID NO: 5

CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGGUUGUGACAUUGCCCGCUGU
GGAGAUAAACUGCGCAAGCUACUGCCUUGCUAG

SEQ ID NO: 6

UGAGGUAGUAGUUUGUGCU

SEQ ID NO: 7

UCTCCUTCUTCUUUCUCGU

SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 6の逆相補鎖)

10

UGCUCUUUCTUCTUCCTCU

SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 6の逆配列)

UCGUGUUUGAUGAUGGAGU

SEQ ID NO: 10

UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU

SEQ ID NO: 11

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU

SEQ ID NO: 12

20

UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU

SEQ ID NO: 13

AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU

SEQ ID NO: 14

UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU

SEQ ID NO: 15

UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU

SEQ ID NO: 16

30

UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU

SEQ ID NO: 17

UGAGGUAGUAGUUUGUGCU

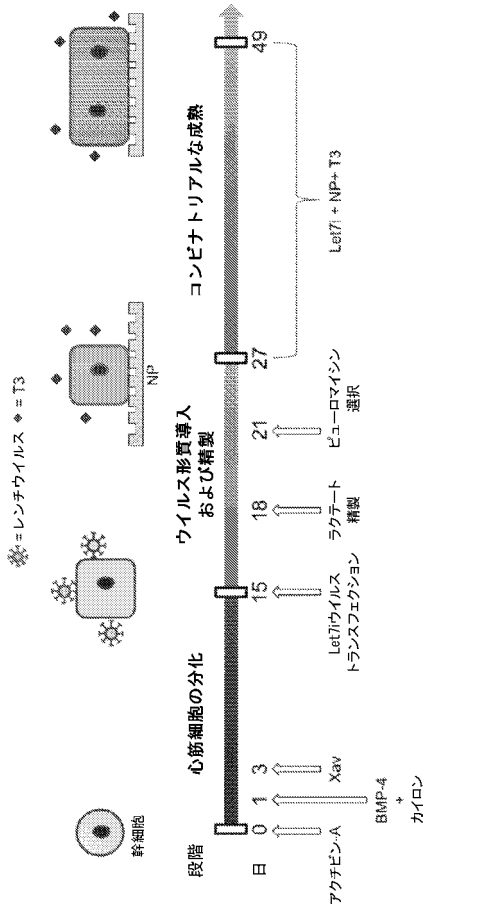
SEQ ID NO: 18

ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTT

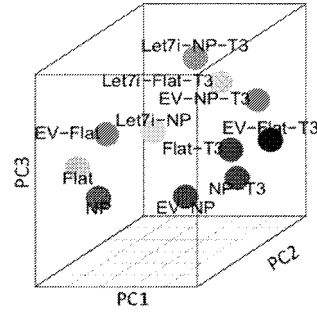
SEQ ID NO: 19

ATGCTTTGGTGGGAAGAATAGAGGACTGTT

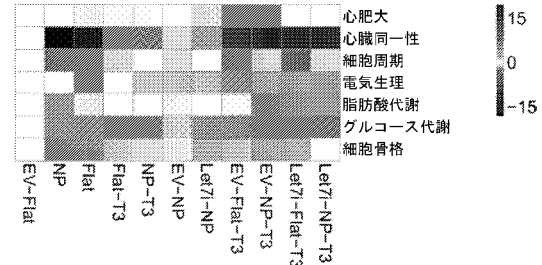
【図 1 A】



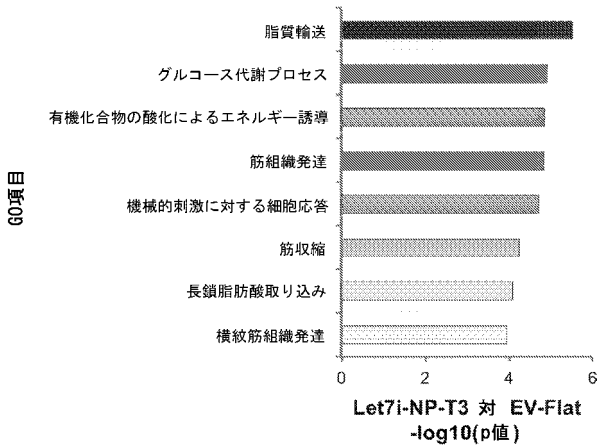
【図 1 B】



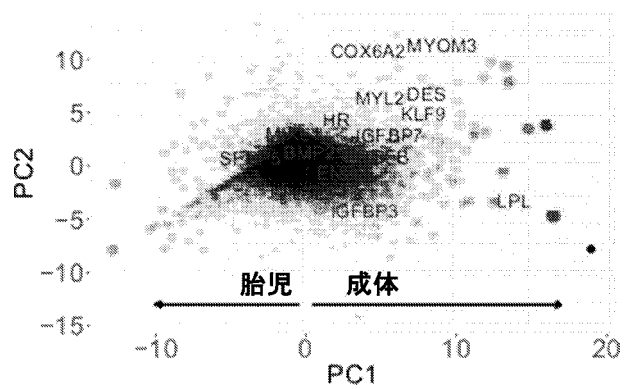
【図 1 C】



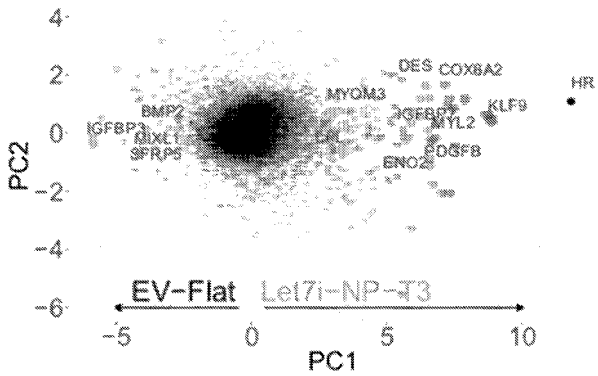
【図 1 D】



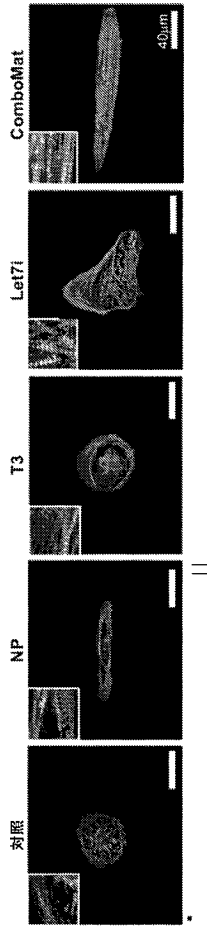
【図 1 F】



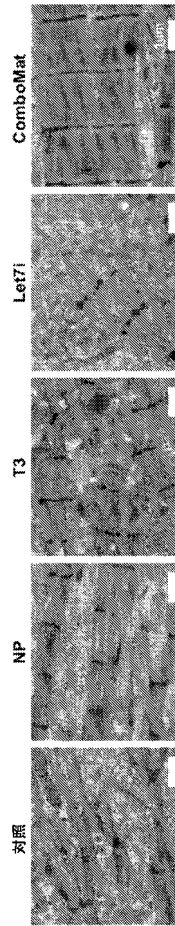
【図 1 E】



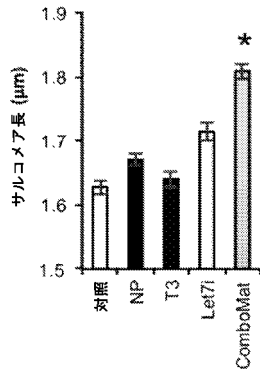
【図 2 A】



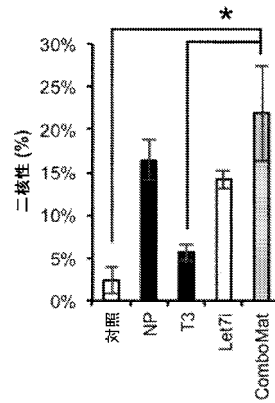
【図 2 B】



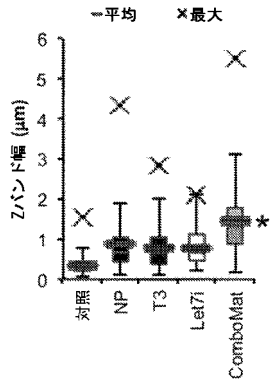
【図 2 C】



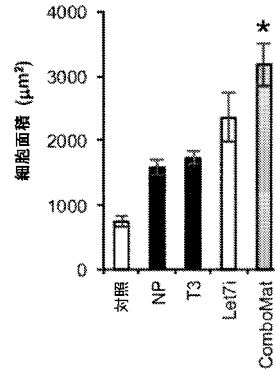
【図 2 E】



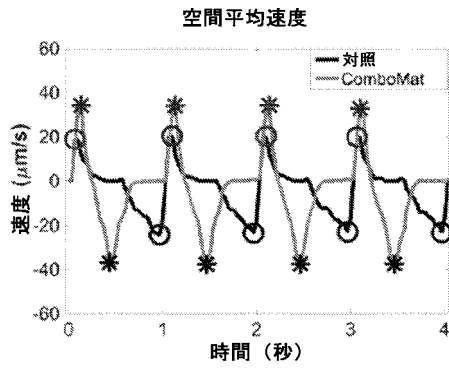
【図 2 D】



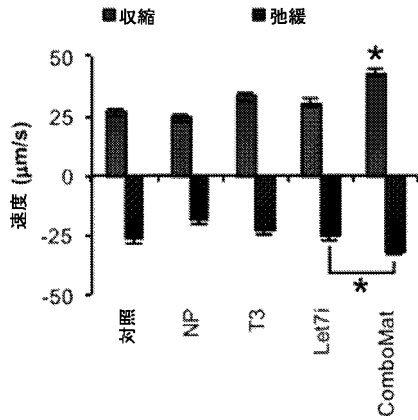
【図 2 F】



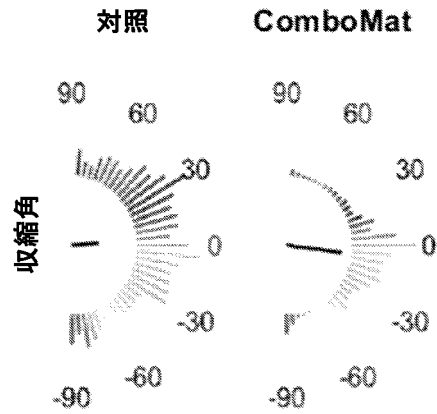
【図 3 A】



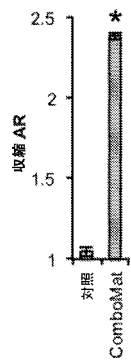
【図 3 B】



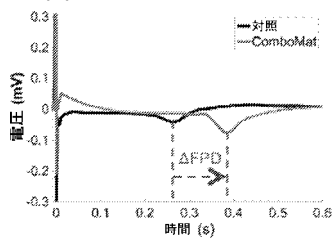
【図 3 C】



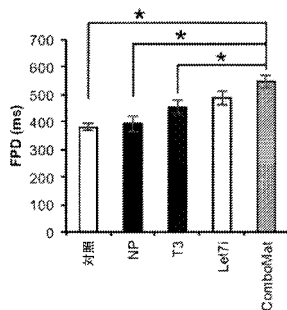
【図 3 D】



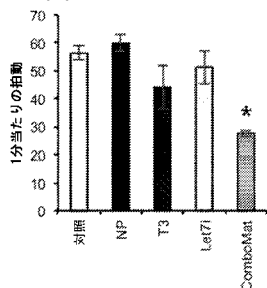
【図 3 E】



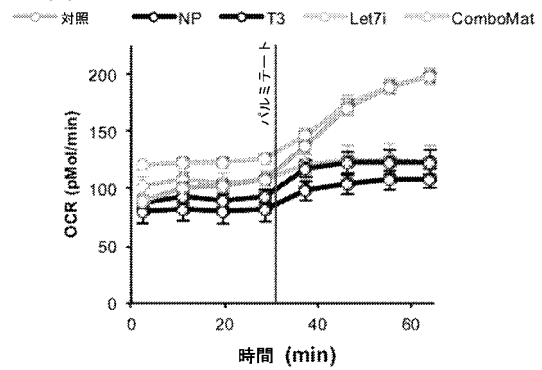
【図 3 F】



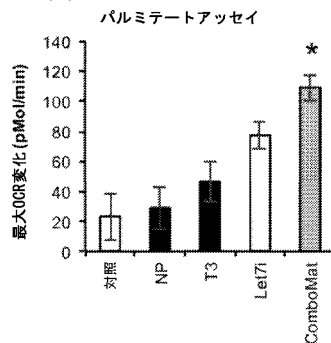
【図 3 G】



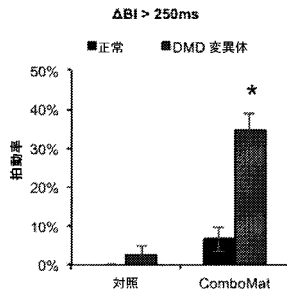
【図 3 H】



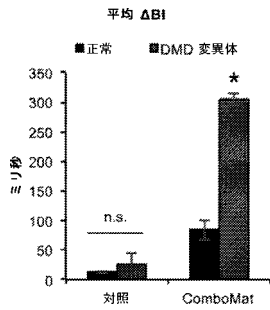
【図 3 I】



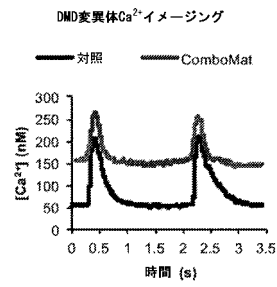
【図 5 C】



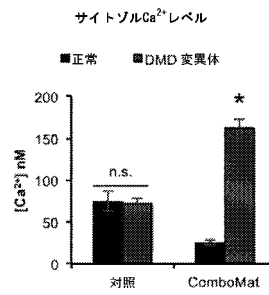
【図 5 D】



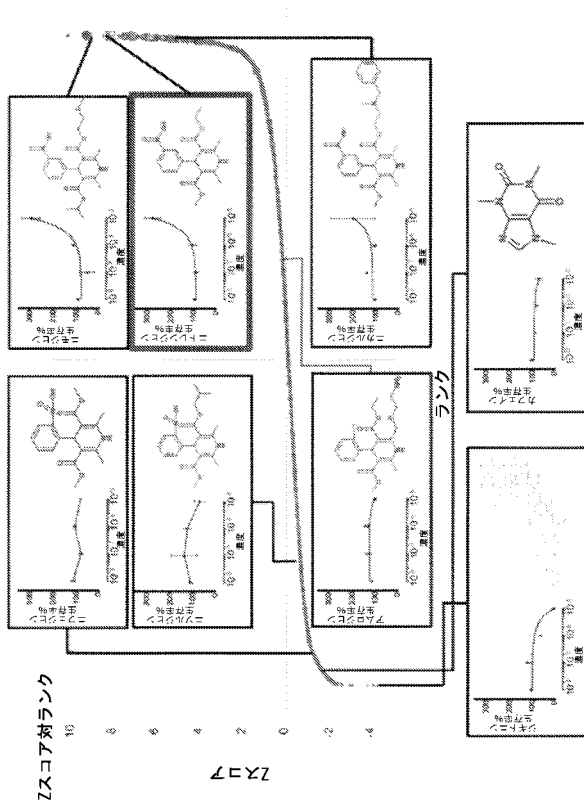
【図 5 E】



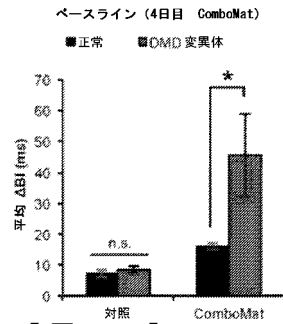
【図 5 F】



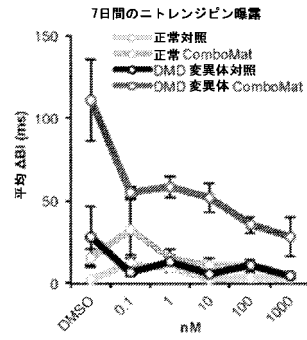
【図 6 A】



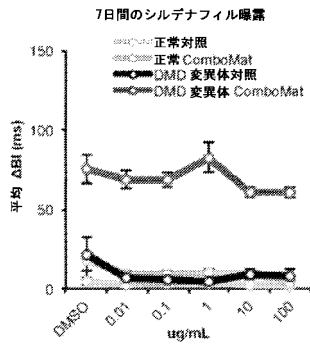
【図 6 B】



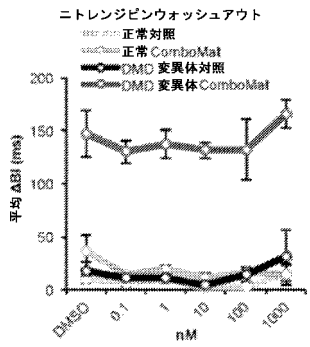
【図 6 C】



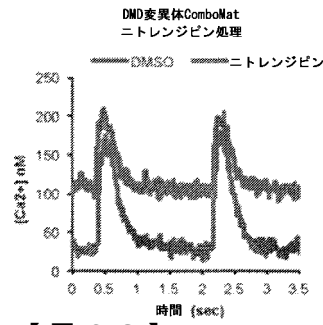
【図 6 D】



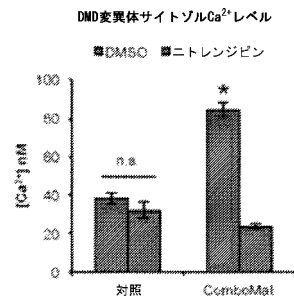
【図 6 E】



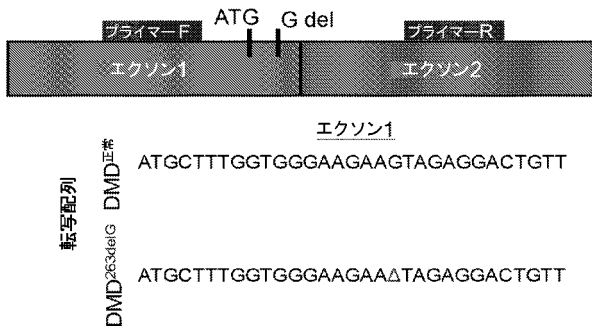
【図 6 F】



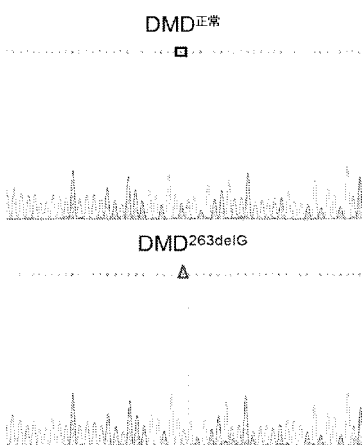
【図 6 G】



【図 7 A】



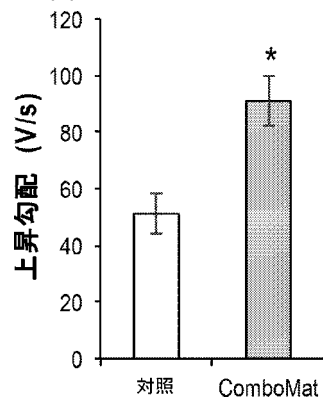
【図 7 B】



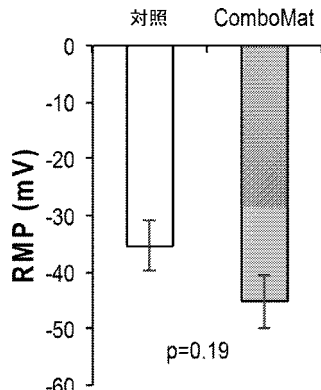
【図 7 C】



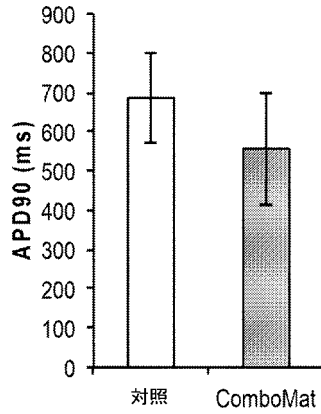
【図 8 A】



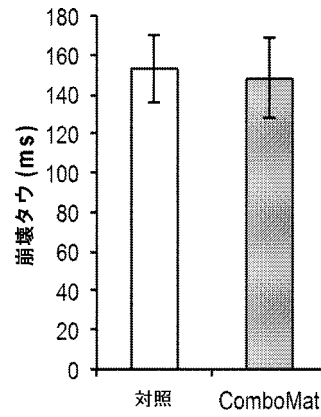
【図 8 B】



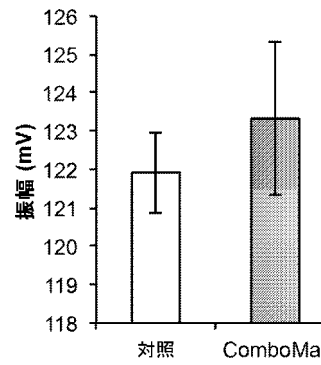
【図 8 C】



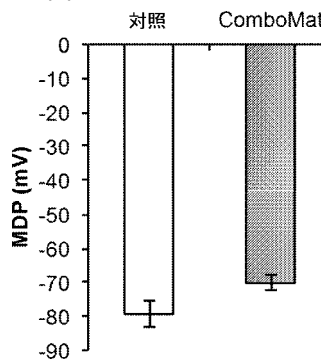
【図 8 D】



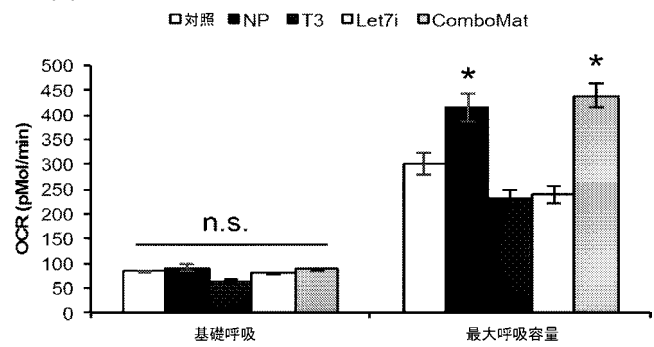
【図 8 E】



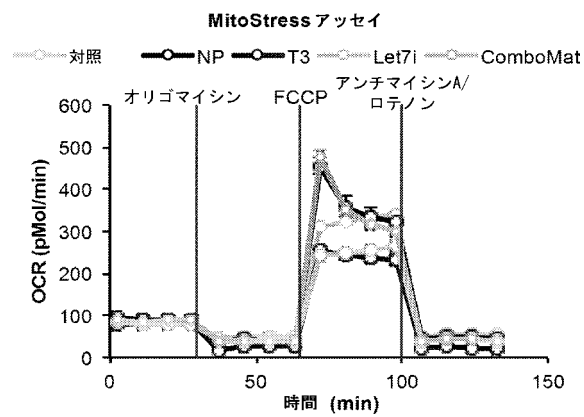
【図 8 F】



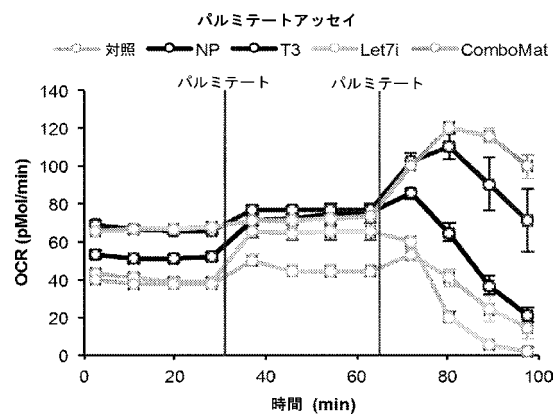
【図 9 B】



【図 9 A】

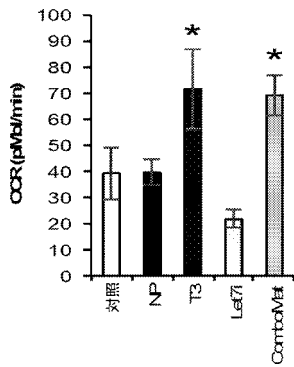


【図 9 C】

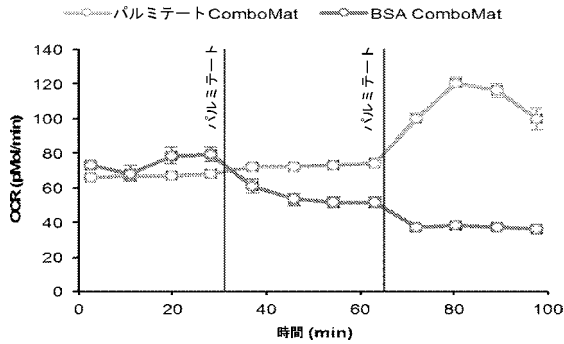


【図 9 D】

UC3-4 - パルミテートアッセイ

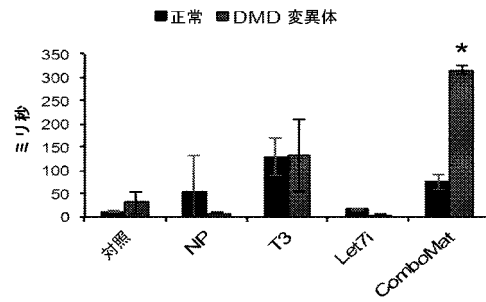


【図 9 E】



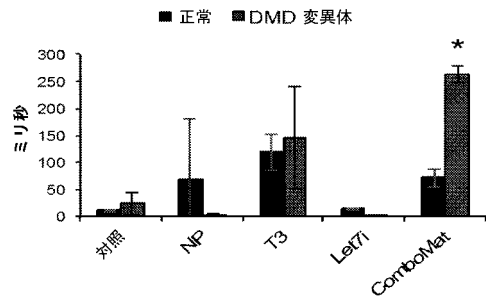
【図 10 A】

StDev BI



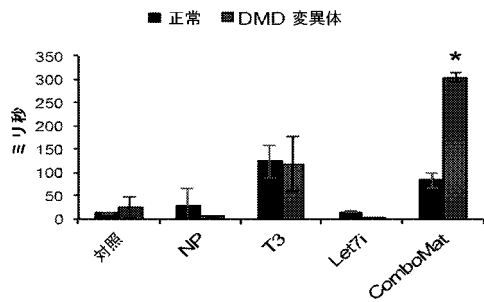
【図 10 B】

StDev ΔBI



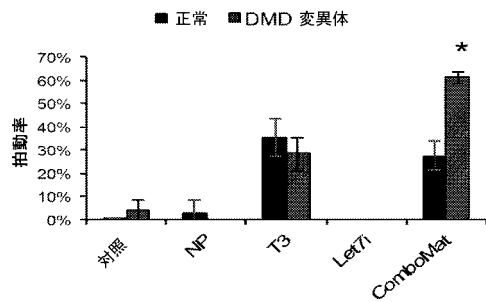
【図 10 C】

平均 ΔBI



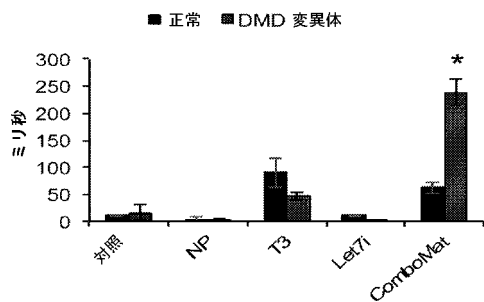
【図 10 E】

ΔBI > 100ms



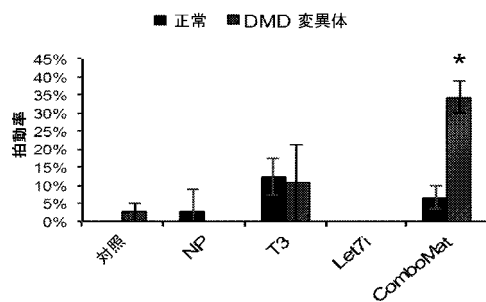
【図 10 D】

中央値 ΔBI

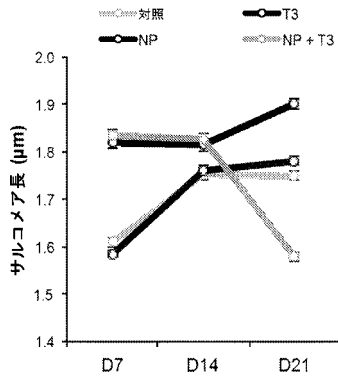


【図 10 F】

ΔBI > 250ms

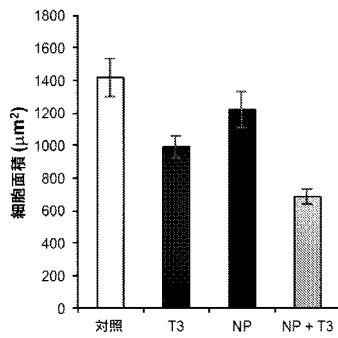


【図 1 1 A】



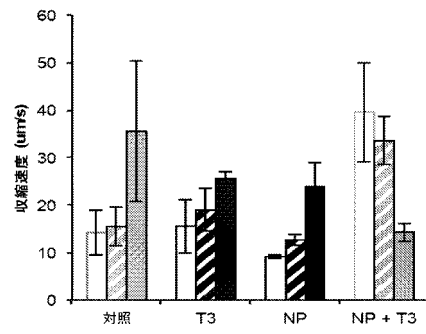
【図 1 1 B】

3週間の処理

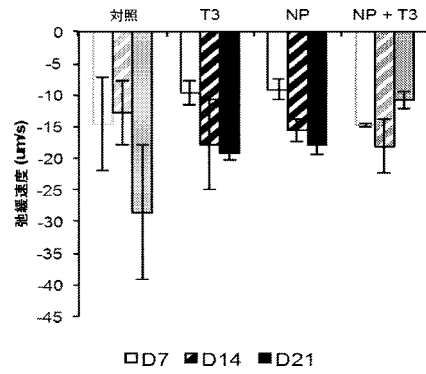


【図 1 1 C】

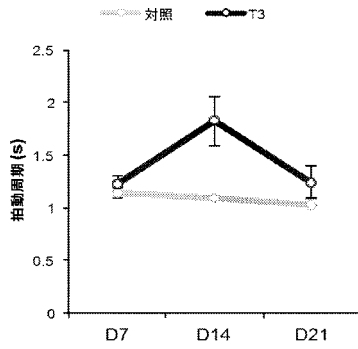
□ D7 ■ D14 ■ D21



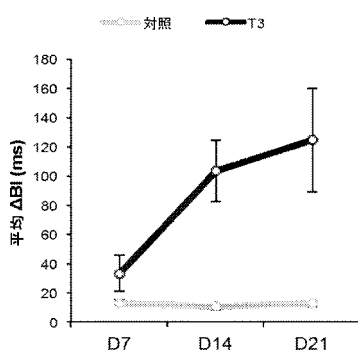
【図 1 1 D】



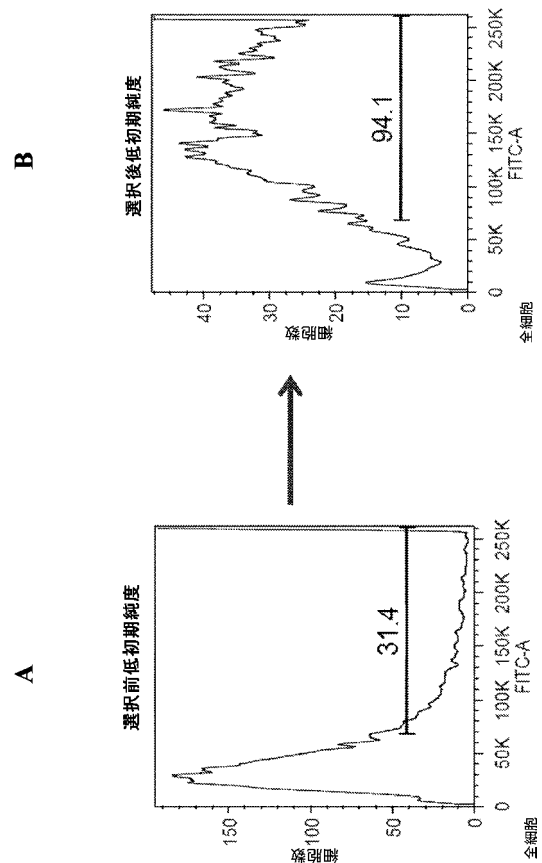
【図 1 1 E】



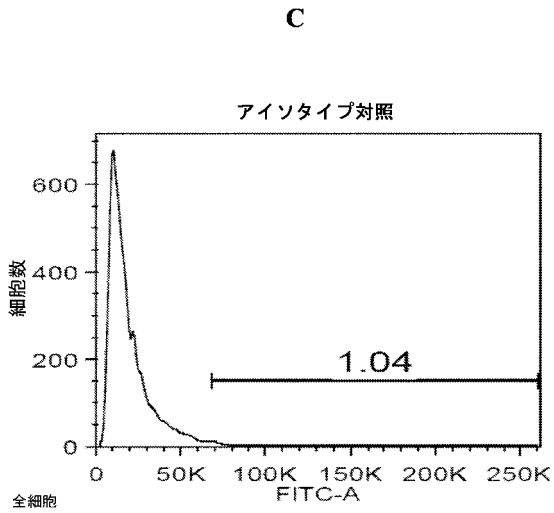
【図 1 1 F】



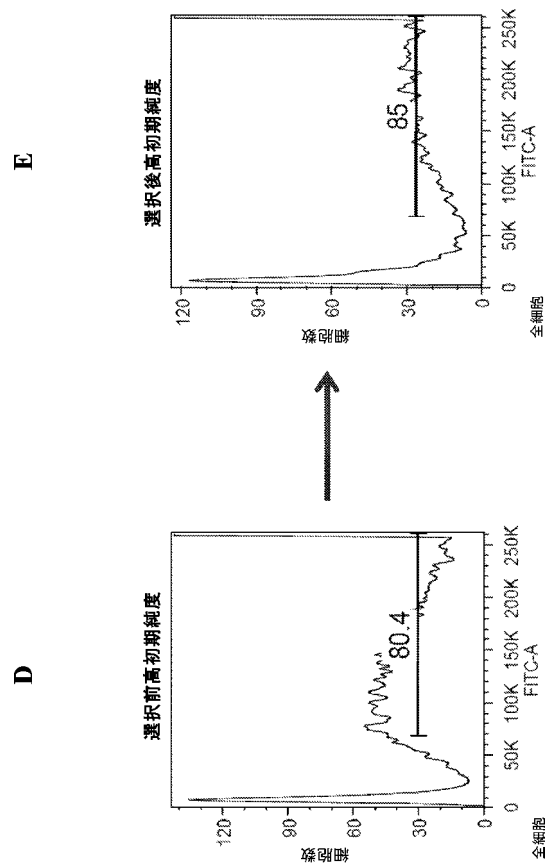
【図 1 2 - 1】



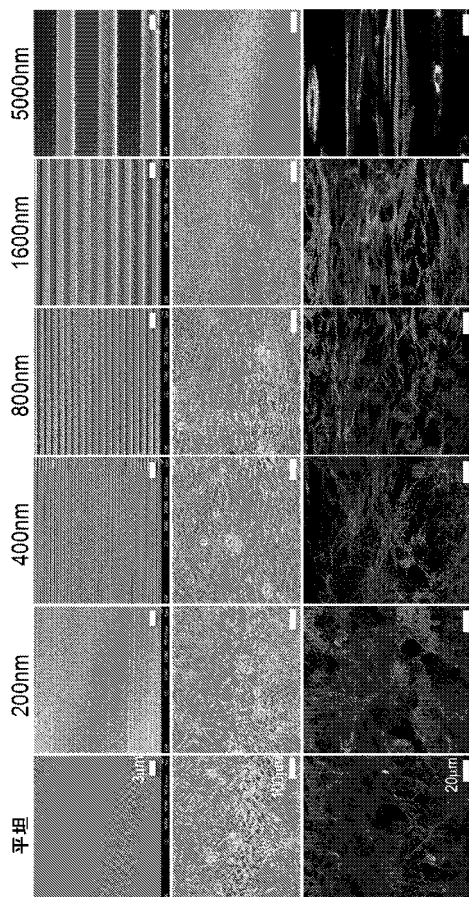
【図 1 2 - 2】



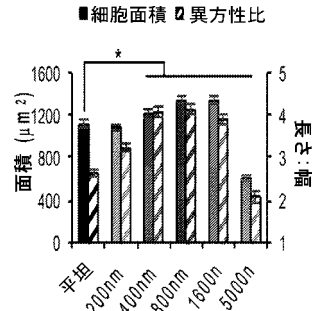
【図 1 2 - 3】



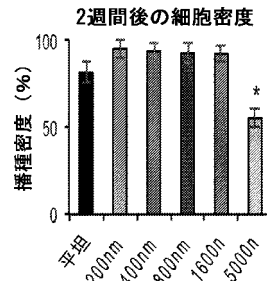
【図 1 3 A】



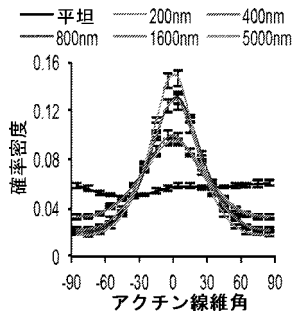
【図 1 3 B】



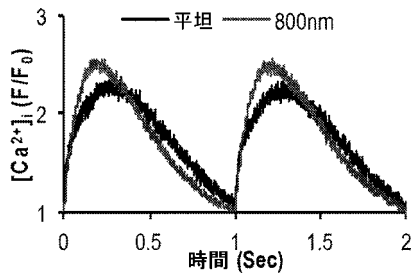
【図 1 3 C】



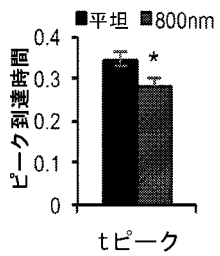
【図 1 3 D】



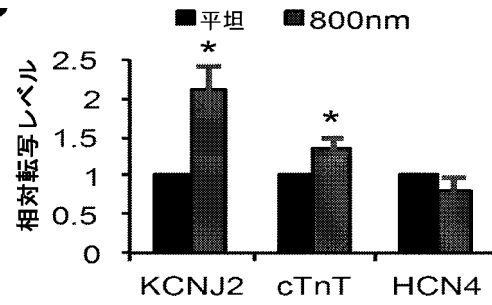
【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



【図 1 3 G】



【手続補正書】

【提出日】令和2年7月20日(2020.7.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2020535791000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 18/56169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/34, A61K 35/44, A61K 35/545, A61L 27/38 (2019.01)

CPC - A61K 35/34, A61K 35/44, A61K 35/545, A61L 27/3886, A61L 38/34, C12N 5/0602

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2016/0017268 A1 (University Of Washington Through Its Center For Commercialization et al.) 21 January 2016 (21.01.2016) Abstract; Claim 17; Claim 24; Claim 25; Claim 26; Claim 27; para [0013]; para [0033-0034]; para [0051]; para [0087]; para [0095]; para [0320]	1-30, 53
Y	YANG et al., Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. J Mol Cell Cardiol. July, 2014, Vol. 72, pp 296-304. Abstract	1-30, 53
Y	KUPPUSAMY et al., Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. PNAS. 11 May 2015, Vol. 112, No. 21, pp E2785-94. Abstract; pE2788, col 1, last para-col2, first para; pE2788, col 1, last para-col2, first para; pE2793, col 1, para 3	1-30, 53

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2019

Date of mailing of the international search report

08 MAR 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 18/56169

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 55-58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Please see continuation in first extra sheet —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-30, 53

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 18/56169

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: claims 1-30, 53, drawn to a method of making stem cell-derived cardiomyocytes.

Group II: claims 31-32, drawn to an assay for identifying an agent that modulates a functional property of cardiomyocytes.

Group III: claims 33, 35-52, 54, 56, 57, drawn to a disease model, a composition, or a kit comprising stem cell-derived cardiomyocytes.

The inventions listed as Groups I, II and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of a method comprising contacting stem-cell derived cardiomyocytes with T3 and Let7i miRNA, not required by Groups II and III.

Group II includes the special technical feature of an assay comprising a candidate agent that modulates a functional property of a cardiomyocyte, not required by Group I and III.

Group III includes the special technical feature of a disease model, a composition, or a kit comprising a stem cell-derived cardiomyocyte, not required by Group I and II.

Common Technical Features

The inventions of Groups I, II and III share the technical feature of Claims 1 and 14.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2016/0017268 A1 to University Of Washington Through Its Center For Commercialization et al., (hereinafter 'Univ Washington'), the article entitled "Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells" by Yang et al., (hereinafter 'Yang') (J Mol Cell Cardiol. July 2014, Vol 72, pages 296-304) and the article entitled "Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes" by Kuppusamy et al., (hereinafter 'Kuppusamy') (PNAS, 26 May 2015, Vol 112, No 21, pages E2785-E2794).

Univ Washington teaches (instant claim 1) a method of making stem cell-derived cardiomyocytes, the method comprising, contacting stem cell derived cardiomyocytes with:

a. a nanopatterned substrate (Abstract - 'The present invention relates to the devices and method comprising microelectrode arrays for the differentiation, maturation and functional analysis of electroconductive cells, including muscle cells (including, but not limited to, cardiomyocytes, skeletal muscle myocytes and smooth muscle myocytes) and neuronal cells.'; para [0013] - 'In some embodiments, the electroconductive cells are derived from stem cells, e.g., ES cells and/or induced pluripotent stem cells (iPSC).'; para [0051] - 'FIG. 14C depicts the formation of confluent, neonatal rat ventricular myocytes on unpatterned and nanopatterned surfaces').

Univ Washington does not expressly teach b. thyroid hormone T3; and c. a Let7i microRNA.

Yang teaches use of T3 for maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (Abstract - 'A one-week treatment with T3 increased cardiomyocyte size, anisotropy, and sarcomere length. T3 treatment was associated with reduced cell cycle activity, manifest as reduced DNA synthesis and increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. Contractile force analyses were performed on individual cardiomyocytes using arrays of microposts, revealing an almost two-fold higher force per-beat after T3 treatment and also an enhancement in contractile kinetics. This improvement in force generation was accompanied by an increase in rates of calcium release and reuptake, along with a significant increase in sarcoendoplasmic reticulum ATPase expression'). Kuppusamy teaches use of Let7i microRNA for promoting cardiomyocyte maturation (pE2793, col 1, para 3 - 'In this study,...we demonstrate that the let-7 family of miRNAs is required and sufficient for maturation of hESC-CMs....Overexpression of let7g and let-7i specifically accelerates the CM's capacity to use fatty acid as a major energy source without affecting mitochondrial copy number or improving the efficiency of glycolysis.').

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the method of Univ Washington could be made more efficacious by combining with those of Yang and Kuppusamy, since Yang and Kuppusamy teach independent methods to promote maturation of cardiomyocytes via T3 and Let7i microRNA, respectively.

—continued on next sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 18/56169

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

Continuation from prior sheet

Univ Washington teaches (instant claim 14) a method of maturing stem cell-derived cardiomyocytes, the method comprising contacting stem cell-derived cardiomyocytes with:

a. a nanopatterned substrate (Abstract - 'The present invention relates to the devices and method comprising microelectrode arrays for the differentiation, maturation and functional analysis of electroconductive cells, including muscle cells (including, but not limited to, cardiomyocytes, skeletal muscle myocytes and smooth muscle myocytes) and neuronal cells.'; para [0013] - 'In some embodiments, the electroconductive cells are derived from stem cells, e.g., ES cells and/or induced pluripotent stem cells (iPSC).'; para [0051] - 'FIG. 14C depicts the formation of confluent, neonatal rat ventricular myocytes on unpatterned and nanopatterned surfaces').

Univ Washington does not expressly teach b. thyroid hormone T3; and c. a Let7i microRNA.

Yang teaches use of T3 for maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (Abstract - 'A one-week treatment with T3 increased cardiomyocyte size, anisotropy, and sarcomere length. T3 treatment was associated with reduced cell cycle activity, manifest as reduced DNA synthesis and increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. Contractile force analyses were performed on individual cardiomyocytes using arrays of microposts, revealing an almost two-fold higher force per-beat after T3 treatment and also an enhancement in contractile kinetics. This improvement in force generation was accompanied by an increase in rates of calcium release and reuptake, along with a significant increase in sarcoendoplasmic reticulum ATPase expression').

Kuppusamy teaches use of Let7i microRNA for promoting cardiomyocyte maturation (pE2793, col 1, para 3 - 'In this study,...we demonstrate that the let-7 family of miRNAs is required and sufficient for maturation of hESC-CMs....Overexpression of let7g and let-7i specifically accelerates the CMs capacity to use fatty acid as a major energy source without affecting mitochondrial copy number or improving the efficiency of glycolysis.').

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the method of Univ Washington could be made more efficacious by combining with those of Yang and Kuppusamy, since Yang and Kuppusamy teach independent methods to promote maturation of cardiomyocytes via T3 and Let7i microRNA, respectively.

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I, II and III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note, Claim 34 is absent.

Note, Claim 57, which depends on "any one of claims 43-51" as drafted, is objected to, because claims 43 and 44 disclose composition. Claim 57 is reconstructed to "any one of claims 45-51".

Item 4 (continued): Claims 55 and 58 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 M 1/42 (2006.01)	C 1 2 M 1/42	
C 1 2 N 13/00 (2006.01)	C 1 2 N 13/00	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 キム トク - ホ
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト 4545 スイート 400 ボックス 354950 コモーション イノベーション センター ケア オブ ユニヴァーシティ オブ ワシントン

(72) 発明者 マカダングダン ジェシー
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト 4545 スイート 400 ボックス 354950 コモーション イノベーション センター ケア オブ ユニヴァーシティ オブ ワシントン

(72) 発明者 スミス アレック エス . ティー .
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト 4545 スイート 400 ボックス 354950 コモーション イノベーション センター ケア オブ ユニヴァーシティ オブ ワシントン

(72) 発明者 ルオホラ - ベイカー ハンネレ
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト 4545 スイート 400 ボックス 354950 コモーション イノベーション センター ケア オブ ユニヴァーシティ オブ ワシントン

(72) 発明者 ミクラス ジェイソン ウェイン
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト 4545 スイート 400 ボックス 354950 コモーション イノベーション セ

センター ケア オブ ユニヴァーシティ オブ ワシントン

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB11 CC02 FA15
4B033 NG05 NH04 NJ01 NK01
4B063 QA05 QQ02 QQ08 QR32 QR35 QR41 QR48 QR82
4B065 AA87X AA90X AB01 AC20 BA02 BC41 BD32 BD39 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 BA60 CA40 DA30 EA50 FA71