(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5897002号
(P5897002)
(45)発行日　平成28年4月13日(2016.4.13)　(24)登録日　平成28年3月11日(2016.3.11)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/10	ZNA
C12N	5/0735	(2010.01)	C12N	5/0735	
C12N	5/0789	(2010.01)	C12N	5/0789	
C12N	5/077	(2010.01)	C12N	5/077	
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 26　(全 60 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-518833(P2013-518833)
(86)(22)出願日　平成23年7月7日(2011.7.7)
(65)公表番号　特表2013-535186(P2013-535186A)
(43)公表日　平成25年9月12日(2013.9.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/043218
(87)国際公開番号　WO2012/006440
(87)国際公開日　平成24年1月12日(2012.1.12)
審査請求日　平成26年4月16日(2014.4.16)
(31)優先権主張番号　61/362,085
(32)優先日　平成22年7月7日(2010.7.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　510003830
セルラー　ダイナミクス　インターナショナル,　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７１１,　マディソン,　サイエンス　ドライブ　５２５,　スイート　２００,　ユニバーシティー　リサーチ　パーク
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プログラミングによる内皮細胞の産生

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトの多能性幹細胞からフォワードプログラミングにより内皮細胞をもたらす方法であって、ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６腫瘍遺伝子相同体（鳥類）（ＥＲＧ）、ｅｔｓ変種２（ＥＴＶ２）、またはこれらの任意のアイソフォームから選択される１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で該多能性幹細胞を培養することを含む方法。
【請求項２】
内皮細胞が多能性幹細胞のフォワードプログラミングによりもたらされる、請求項１記載の方法。
【請求項３】
多能性幹細胞が誘導多能性幹細胞である、請求項２記載の方法。
【請求項４】
多能性幹細胞が少なくとも１つの外因性発現カセットを含み、該外因性発現カセットが１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む、請求項１記載の方法。
【請求項５】
多能性幹細胞を、多能性細胞のフォワードプログラミングを引き起こして内皮細胞にするのに十分な量で１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の遺伝子産物を含む１つ以上の内皮プログラミング因子と接触させることを含む、請求項１記載の方法。
【請求項６】

１つ以上の遺伝子産物が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチドである、請求項５記載の方法。
【請求項７】
遺伝子産物が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のＲＮＡ転写物である、請求項５記載の方法。
【請求項８】
少なくとも１つの内皮プログラミング因子遺伝子がＥＲＧアイソフォーム３を含む、請求項１記載の方法。
【請求項９】
多能性幹細胞若しくはその子孫細胞が、レポーター遺伝子に機能的に結合している内皮細胞特異的転写調節エレメントを含むレポーター発現カセットを更に含む、請求項１記載の方法。
【請求項１０】
内皮細胞が、下記：
（ｉ）１つ以上の内皮細胞マーカーの発現；
（ｉｉ）アセチル化低密度リポタンパク質（ａｃ－ＬＤＬ）を取り込む能力、三次元マトリックスに管様構造を形成する能力、１つ以上の炎症促進性刺激に反応して１つ以上の細胞接着分子の発現を上方制御する能力又はこれらの能力の２つ以上の組み合わせ；或いは
（ｉｉｉ）内皮細胞の形態的特徴
を含む内皮細胞の１つ以上の特徴を含む、請求項１記載の方法。
【請求項１１】
１つ以上の内皮細胞マーカーが、ＣＤ１４４、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＥＳＡＭ、ＣＤ１０２、ＣＤ１４３、ＣＤ９３、ＣＤ１８４、ＣＤ１０５、ＣＤ１４６、フォンウィルブランド因子、ＺＯ－１、ＣＤ３０４及びＤＬＬ４からなる群より選択される、請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
１つ以上の炎症促進性刺激がＴＮＦ及びＩＬ－１からなる群より選択され、１つ以上の細胞接着分子がＣＤ５４、ＣＤ６２Ｅ及びＣＤ１０６からなる群より選択される、請求項１０記載の方法。
【請求項１３】
もたらされる内皮細胞が成熟内皮細胞である、請求項１記載の方法。
【請求項１４】
内皮細胞を選択又は豊富化することを更に含み、選択又は豊富化された内皮細胞が請求項１０記載の内皮細胞の１つ以上の特徴の発現を含む、請求項１０記載の方法。
【請求項１５】
多能性幹細胞又はその子孫細胞が１つ以上の増殖因子を含む培地で培養される、請求項１記載の方法。
【請求項１６】
１つ以上の増殖因子が、塩基性線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）又は両方を含む、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
もたらされる内皮細胞が発現の増加の最大１０日後に得られる、請求項１記載の方法。
【請求項１８】
もたらされる内皮細胞が発現の増加の最大４日後に得られる、請求項１記載の方法。
【請求項１９】
細胞集団を実質的に個別の細胞に分散することを更に含み、分散が発現の増加の少なくとも約２４時間後に実施される、請求項１記載の方法。
【請求項２０】
実質的に個別の細胞をマトリックス成分が被覆された表面で平板培養することを更に含

む、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
（ａ）平板培養細胞を少なくとも約１２時間培養すること；（ｂ）非結合細胞を除去すること；及び（ｄ）残った結合細胞を培養することを更に含む、請求項２０記載の方法。
【請求項２２】
残った結合細胞が少なくとも２日間培養される、請求項２１記載の方法。
【請求項２３】
もたらされた内皮細胞を造血培養培地で培養して、造血細胞を生じることを更に含む、請求項１記載の方法。
【請求項２４】
もたらされた内皮細胞を間葉培養培地で培養して、間葉細胞を生じることを更に含む、請求項１記載の方法。
【請求項２５】
内皮細胞への効果について化合物を評価する方法であって、
ａ）請求項１記載の方法に従う方法によりもたらされる内皮細胞を該化合物と接触させること；及び
ｂ）該内皮細胞に対する該化合物の効果をアッセイすること
を含む方法。
【請求項２６】
効果が薬理学的又は毒性効果である、請求項２５記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、米国特許出願第６１／３６２，０８５号、２０１０年７月７日出願の優先権を主張し、これはその全内容が権利を放棄することなく参照として特定的に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、一般に分子生物学、幹細胞及び分化細胞の分野に関する。より詳細には、体細胞及び未分化細胞を特定の細胞系列、特に内皮細胞及び内皮前駆細胞のような内皮細胞の前駆体にプログラミングすることに関する。
【背景技術】
【０００３】
内皮細胞及び内皮細胞の前駆体は、組織虚血（例えば、アテローム動脈硬化症の際に生じる）、心筋梗塞及び虚血肢（損傷血管の修復）の治療、並びに移植片の生物工学を含む、多くの潜在的な治療用途を有する。予備研究は、内皮前駆細胞（ＥＰＣ）の移植が、心筋梗塞又は虚血肢の患者において虚血を治療するのに有用でありうることを示している（非特許文献１（Dzau et al., 2005））。しかし、患者から得たＥＰＣの臨床有用性は限定され、それは内皮細胞療法を必要とする患者が多くの場合に少なすぎるＥＰＣ又は機能性を欠いたＥＰＣを産生するからである。
【０００４】
そのような臨床適用に加えて、内皮細胞には、血管毒性、血管透過性及び抗癌活性についての化合物及び薬剤のスクリーニングにおける使用に高い需要がある。しかし、一次内皮細胞は、年齢、供給者及び器官の種類に特異的な変化に起因して有限な繁殖潜在能力を有し、これらは全て内皮細胞培養プロトコールを標準化する能力及びこれらの細胞を薬剤スクリーニングの目的に十分な数に拡大する能力を制限する。
【０００５】
内皮細胞は、ヒト胚幹細胞（ＥＳＣ）又は誘導多能性幹細胞（ｉＰＳ）から得ることもでき、これらは両方ともインビボで無制限の繁殖が可能であり、全ての体細胞型に分化する潜在能力を保持する。ヒトＥＳＣ又はｉＰＳＣのインビトロにおける内皮系列の細胞への分化は、通常のインビボ発育を反復し、中胚葉前駆体の中胚葉誘導及び血管新生特異化

の段階を含む。このプロセスには特異的な誘導因子の添加が必要である。ヒトＥＳＣ又はｉＰＳＣから誘導された内皮細胞は、インビトロアッセイにおいて機能性があり、インビボでの移植の可能性がある（非特許文献２（Li et al, 2009））。しかし、ヒトＥＳＣ又はｉＰＳＣからの内皮細胞の分化は、非効率なプロセスである。

したがって、治療及び研究用途のために内皮細胞及び内皮細胞前駆体を効率的に産生する必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Dzau et al., Hypertension, 46:7-18, 2005.

【非特許文献２】Li et al., J. Cell Biochem., 106:194-199, 2009.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明は、フォワードプログラミング（forward programming）又は分化転換により内皮細胞又は内皮細胞の前駆体の無制限の供給をもたらすことによって、内皮細胞又は内皮細胞の前駆体の提供における当該技術の主な欠陥を克服する。この方法は、患者特異的な内皮細胞の無制限の供給をもたらすのに特に有用でありうる。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本明細書に開示される方法は、多様な種類の細胞をプログラミングすることにより内皮細胞又は内皮細胞前駆体をもたらす。特定の態様において、プログラミング方法は、単独で又は他のプログラミング因子遺伝子と組み合わせて発現したとき、内皮系列へのプログラミングを促進することができる１つ以上の遺伝子の発現レベルを増加する条件下で、多能性幹細胞又は体細胞を培養することを含む。そのような遺伝子は、「内皮プログラミング因子遺伝子」と呼ばれる。本発明に有用な内皮プログラミング因子遺伝子は、単独又は組み合わせで非内皮細胞に内皮の運命を直接課す任意の遺伝子を含むことができ、転写因子遺伝子又は内皮細胞分化若しくは機能に重要である他の遺伝子を含むことができる。プログラミングのプロセスは、細胞が産生することができる子孫の種類を変え、フォワードプログラミング及び分化転換の特徴的なプロセスを含む。幾つかの実施態様において、多分化能細胞又は多能性細胞のフォワードプログラミングは、内皮細胞又は内皮前駆体細胞をもたらす。他の実施態様において、非内皮体細胞の分化転換は、内皮細胞又は内皮前駆体細胞をもたらす。特定の態様において、プログラミングは、非内皮細胞のフォワードプログラミング又は分化転換を引き起こして内皮前駆体細胞又は内皮細胞にするのに十分な数の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加することを含むことができる。内皮プログラミングに適した細胞の供給源は、任意の幹細胞又は非内皮細胞体細胞を含むことができる。例えば、幹細胞は、多能性幹細胞又は任意の非多能性幹細胞でありうる。本明細書で使用されるとき、「多能性細胞」又は「多能性幹細胞」は、実質的に任意の胎児又は成体細胞型に分化する能力を有する細胞である。多能性幹細胞の例示的な種類には、胚幹細胞及び誘導多能性幹細胞（又はｉＰＳ細胞）が含まれうるが、これらに限定されない。そのような多能性幹細胞は、哺乳類多能性幹細胞でありうる。特定の実施態様において、多能性幹細胞はヒト多能性幹細胞である。分化転換による内皮前駆体又は内皮細胞のプログラミングに適した細胞の供給源は、任意の非内皮体細胞を含むことができる。そのような体細胞は、生物体の身体を形成する任意の細胞でありうる。特定の態様において、体細胞を、例えばテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）のレベルを増加することにより不死化して、細胞の無制限の供給をもたらすことができる。例えば、ＴＥＲＴのレベルを、内皮遺伝子からのＴＥＲＴの転写の増加により又は任意の遺伝子送達法若しくは系を介する導入遺伝子の導入により増加することができる。

【０００９】

本発明に有用な多能性幹細胞は、誘導多能性幹細胞、胚幹細胞又は核移植若しくは核融

合により誘導された多能性幹細胞でありうる。幹細胞は、多分化能幹細胞、少分化能（oligopotent）幹細胞又は単分化能幹細胞を含むこともできる。幹細胞は、造血幹細胞、間葉幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞又は皮膚幹細胞のような胎児幹細胞又は成体幹細胞を含むこともできる。特定の態様において、幹細胞を、臍帯組織、胎盤、羊水、絨毛膜絨毛、胚盤胞、骨髄、脂肪組織、脳、末梢血、臍帯血、月経血、血管、骨格筋、皮膚又は肝臓から単離することができる。

【００１０】

「前駆細胞」又は「前駆体細胞」は、多能性幹細胞から誘導される系列関連細胞を意味する。したがって、前駆細胞又は前駆体細胞は、多能性幹細胞よりも分化しているが、依然として、２種類以上の細胞に分化する能力を有している。本明細書に開示されている方法によりもたらされる内皮細胞は、成熟内皮細胞でありうる。他の実施態様において、開示されている方法は、内皮前駆細胞又は内皮前駆体細胞をもたらす。そのような細胞は、多能性幹細胞よりも分化しているが、内皮細胞又は他の種類の細胞に分化することができる。幾つかの態様において、開示されている方法は、血管内皮（hematoendothelial）（又は血管芽）前駆細胞をもたらし、これは造血細胞又は内皮細胞に分化することができる。なお他の実施態様において、内皮前駆細胞又は内皮前駆体細胞をフォワードプログラミングにより内皮細胞に分化する方法が提供される。

【００１１】

特定の実施態様において、内皮細胞又は内皮前駆体細胞は、多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換によりもたらされる。そのような方法は、多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞又は内皮前駆体細胞にすることができる１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で多能性幹細胞又は体細胞を培養し、それによって多能性幹細胞をフォワードプログラミングして又は体細胞を分化転換して内皮細胞又は内皮前駆体細胞にすることにより、内皮細胞又は内皮前駆体細胞をもたらすことを含むことができる。

【００１２】

当業者が理解するように、プログラムされる細胞において内皮プログラミング因子遺伝子の発現を増加する方法は、当該技術において既知の任意の方法を含むことができ、例えば、細胞に予め導入した１つ以上の発現カセットの発現を誘導すること又はＤＮＡ若しくはＲＮＡのような核酸、ポリペプチド若しくは小型分子を細胞に導入することである。特定の内在性であるが転写抑制されたプログラミング因子遺伝子の発現を増加することは、上流転写因子発現の制御又は後成的調節により、これらのプログラミング因子遺伝子の発現に対するサイレンシング又は阻害効果を逆転することを含むこともできる。

【００１３】

特定の態様において、内皮細胞又は内皮前駆体細胞は、多能性幹細胞のフォワードプログラミングによりもたらされる。そのような多能性幹細胞は、誘導多能性幹細胞でありうる。他の態様において、内皮細胞又は内皮前駆体細胞は、体細胞の分化転換によりもたらされる。幾つかの実施態様において、体細胞は、皮膚線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、角化細胞又は血球のようなヒト体細胞である。分化転換に有用な体細胞は、不死化体細胞でありうる。特定の態様において、体細胞を、例えばテロメラーゼ逆転写酵素（ＴＥＲＴ）のレベルを増加することにより不死化して、細胞の無制限の供給をもたらすことができる。例えば、ＴＥＲＴのレベルを、内在性遺伝子からのＴＥＲＴの転写の増加により又は任意の遺伝子送達法若しくは系を介する導入遺伝子の導入により増加することができる。

【００１４】

内皮細胞又は内皮前駆体細胞を、少なくとも１つの外因性発現カセットを含む、多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換によりもたらすことができる。発現カセットは、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含むことができる。幾つかの態様において、多能性幹細胞又は体細胞を、多能性細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞又は内皮前駆体細胞にするのに十分な量で１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の遺伝子産物を含む、１つ以上のそのような内皮

プログラミング因子と接触させる。幾つかの実施態様において、１つ以上の遺伝子産物は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチド産物である。特定の態様において、１つ以上の内皮プログラミング因子は、内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチドの細胞内進入を促進するタンパク質伝達ドメインを含む。そのようなタンパク質伝達ドメインは当該技術において良く知られており、例えば、ＨＩＶ　ＴＡＴタンパク質伝達ドメイン、ＨＳＶ　ＶＰ２２タンパク質伝達ドメイン、ドロフィラアンテナペディア（Drosophila　Antennapedia）ホメオドメイン又はこれらの変種である。幾つかの実施態様において、１つ以上の遺伝子産物は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のＲＮＡ転写物である。

【００１５】

本発明に有用な内皮プログラミング因子遺伝子は、単独又は組み合わせで非内皮細胞に内皮の運命を直接課す任意の遺伝子、特に、転写因子遺伝子又は細胞内で発現したときに内皮細胞分化若しくは機能に重要である遺伝子を含むことができる。内皮細胞プログラミング因子遺伝子には、ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６癌遺伝子相同体（鳥類）（ＥＲＧ）、ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６癌遺伝子相同体１（鳥類）（ＥＴＳ１）、ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６癌遺伝子相同体２（鳥類）（ＥＴＳ２）、ＥＬＦ－１、ＥＬＦ－４、ＦＬＩ－１、ＴＥＬ、ＥＴＶ２（ｅｔｓ変種２、ＥＲ７１若しくはＥｔｓｒｐ７１）、ＴＡＬＩ（ＳＣＬ）、ＧＡＴＡ２又はフォークヘッド（ＦＯＸ）転写因子（例えば、ＦｏｘＣ、ＦｏｘＦ、ＦｏｘＨ及びＦｏｘＯファミリー）が含まれるが、これらに限定されない。例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個又はこれ以上のこれらの例示的な遺伝子、そのような遺伝子のアイソフォーム又はこれらの変種を、本発明の特定の態様に使用することができる。これらの遺伝子の多くは、異なるアイソフォームを有し、これらは同様の機能を有することができ、したがって本発明の特定の態様に使用することが考慮される。

【００１６】

特定の態様において、内皮プログラミング因子遺伝子はＥＲＧである。特定の態様において、内皮プログラミング因子遺伝子は、ＥＲＧアイソフォーム３（ＥＲＧ－３）であるが、プログラミング因子遺伝子は、ＥＲＧアイソフォーム１（ＥＲＧ－１）、ＥＲＧアイソフォーム２（ＥＲＧ－２）及びＥＲＧアイソフォーム４（ＥＲＧ－４）を含むＥＲＧの任意のアイソフォームでありうる。なお他の特定の実施態様において、内皮プログラミング因子遺伝子はＥＴＶ２である。

【００１７】

「フォワードプログラミング」は、本明細書で使用されるとき、図１の上側に例示されているように、中間細胞段階を介してそれぞれの段階に適合された培養条件を使用して細胞を培養する要件を実質的に有さない、並びに／又は、場合により、出発細胞供給源と所望の最終細胞産物、例えば内皮細胞若しくは内皮細胞前駆体との間の異なる時点で異なる増殖因子を加える必要がないプロセスを意味する。一方、図１の下側は、段階的分化プロセスに存在する多様な発育段階及びプロセスの異なる時点で異なる増殖因子を加える必要性を示し、このことは本発明の特定の態様に記載されている方法よりも多くの労力、時間及び費用を伴う。したがって、本発明の特定の態様におけるフォワードプログラミングの方法は、効率を改善するためにプログラミング又は分化の異なる段階で異なる増殖因子を加える必要性を回避するので有利である。

【００１８】

特定の態様において、例えば多能性幹細胞又は体細胞のような内皮細胞又は内皮前駆体プログラミングのための細胞は、少なくとも１つの外因性発現カセットを含み、ここで発現カセットは、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む。１つ以上の発現カセットは、多能性細胞のフォワードプログラミングを引き起こして内皮細胞にする又は体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞にするのに十分な量で１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現を駆動することができる。特定の実施態様において、１つ以上の発現カセットは、ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６癌遺伝子相同体（鳥類）（ＥＲＧ）の発現

を駆動する。他の特定の態様において、１つ以上の発現カセットは、ＥＴＶ２の発現を駆動することができる。あるいは、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現は、発現カセットを使用することなく増加されうる。

【００１９】

１つ以上の外因性発現カセットを利用する方法において、そのような発現カセットは、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現を誘導しうる外部誘導性転写調節エレメントを含むことができる。例えば、本発明に有用な外因性発現カセットは、テトラサイクリン応答エレメントを含むプロモーターのような誘導性プロモーターを含有することができる。幾つかの実施態様において、外因性発現カセットは遺伝子送達系に含まれる。例えば、そのような遺伝子送達系は、トランスポゾン系、ウイルス遺伝子送達系又はエピソーム遺伝子送達系でありうる。本発明に有用なウイルス遺伝子送達系は、ＲＮＡに基づいた又はＤＮＡに基づいたウイルスベクターである。本発明に有用なエピソーム遺伝子送達系は、プラスミド、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）に基づいたエピソームベクター、酵母に基づいたベクター、アデノウイルルに基づいたベクター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）に基づいたエピソームベクター、ウシパピローマウイルス（ＢＰＶ）に基づいたベクターなどでありうる。特定の態様において、フォワードプログラミング又は分化転換に使用される発現カセットは、レポーター遺伝子に機能的に結合している内皮特異的転写調節エレメントを含むことができる。

【００２０】

特定の態様において、多能性幹細胞のような内皮細胞プログラミングのために細胞は、細胞のフォワードプログラミングを引き起こして内皮細胞にするのに十分な量の１つ以上の内皮プログラミング因子と接触する。内皮プログラミング因子は、内皮プログラミング因子遺伝子、そのような遺伝子の産物又はそのような遺伝子の産物のフラグメントを含む。内皮プログラミング因子は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の遺伝子産物でありうる。例えば、１つ以上の遺伝子産物は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチド又は１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチドのフラグメントでありうる。特定の実施態様において、内皮プログラミング因子は、ＥＲＧ遺伝子（その任意のアイソフォームを含む）、ＥＴＳ１遺伝子、ＥＴＳ２遺伝子、ＥＬＦ－１遺伝子、ＥＬＦ－４遺伝子、ＦＬＩ－１遺伝子、ＴＥＬ遺伝子、ＥＴＶ２（ＥＲ７１若しくはＥｔｓｒｐ７１）遺伝子、ＴＡＬＩ（ＳＣＬ）遺伝子、ＧＡＴＡ２遺伝子又はフォークヘッド（ＦＯＸ）転写因子遺伝子（例えば、ＦｏｘＣ、ＦｏｘＦ、ＦｏｘＨ若しくはＦｏｘＯファミリーのメンバー）の産物である。

【００２１】

幾つかの実施態様において、多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細部の分化転換により内皮細胞又は内皮前駆体細胞をもたらす方法が提供され、ここで多能性幹細胞、体細胞又は多能性幹細胞若しくは体細胞の子孫細胞は、レポーター発現カセットを含有する。そのような発現カセットは、内皮プログラミング因子遺伝子を含むことができる。特定の実施態様において、そのような発現カセットは、レポーター遺伝子に機能的に結合している内皮細胞特異的転写調節エレメントを含むことができる。特定の実施態様において、内皮細胞特異的プロモーターはレポーターに機能的に結合することができる。例えば、ＦＬＴ－１のプロモーターであるフォンウィルブランド因子（ｖＷＦ）又はＴＩＥ１は、同じ実施態様において発現カセットのレポーターと機能的に結合することができる。

【００２２】

本明細書において提供される方法のいずれかにより生じる内皮細胞又は内皮前駆体細胞は、内皮細胞の１つ以上の特徴を有することができる。例えば、そのような内皮細胞は、１つ以上の内皮細胞マーカーを発現することができる。内皮細胞マーカーには、ＶＥ－カドヘリン（ＣＤ１４４）、ＡＣＥ（アンギオテンシン変換酵素）（ＣＤ１４３）、ＢＮＨ９／ＢＮＦ１３、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）、ＣＤ６２Ｅ（Ｅ－セレクチン）、ＣＤ１０５（エンドグリン）、ＣＤ１４６、エンドカン（ＥＳＭ－１とも呼ばれる）、エンドグリクス－１、エンドムチン、エオタキシン－３、ＥＰＡＳ１（内皮Ｐ

ＡＳドメインタンパク質１）、第ＶＩＩＩ因子関連抗原、ＦＬＩ－１、Ｆｌｋ－１（ＫＤＲ、ＶＥＧＦＲ－２）、ＦＬＴ－１（ＶＥＧＦＲ－１）、ＧＡＴＡ２、ＧＢＰ－１（グアニル酸結合タンパク質－１）、ＧＲＯ－アルファ、ＨＥＸ、ＩＣＡＭ－２（細胞間接着分子２）、ＬＭＯ２、ＬＹＶＥ－１、ＭＲＢ（マジックラウンドアバウト（magic roundabout））、ヌクレオリン、ＰＡＬ－Ｅ（病理解剖学的罹患内皮（pathologische anatomie Leiden-endothelium））、ＲＴＫｓ、ｓＶＣＡＭ－１、ＴＡＬ１、ＴＥＭ１（腫瘍内皮マーカー１）、ＴＥＭ５（腫瘍内皮マーカー５）、ＴＥＭ７（腫瘍内皮マーカー７）、トロンボモジュリン（ＴＭ、ＣＤ１４１）、ＶＣＡＭ－１（血管細胞接着分子－１）（ＣＤ１０６）、ＶＥＧＦ（血管内皮増殖因子）、ｖＷＦ（フォンウィルブランド因子、第ＶＩＩＩ因子とも呼ばれる）、ＺＯ－１、内皮細胞選択的接着分子（ＥＳＡＭ）、ＣＤ１０２、ＣＤ９３、ＣＤ１８４、ＣＤ３０４及びＤＬＬ４が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施態様において、本発明に有用な内皮細胞マーカーは、ＣＤ１４４、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＥＳＡＭ、ＣＤ１０２、ＣＤ１４３、ＣＤ９３、ＣＤ１８４、ＣＤ１０５、ＣＤ１４６、フォンウィルブランド因子、ＺＯ－１、ＣＤ３０４及びＤＬＬ４の１つ以上である。幾つかの実施態様において、フォワードプログラミング又は分化転換により産生される内皮細胞は、特定のマーカーを発現しないか又は特定のマーカーの減少した発現を示し、例えば、間葉細胞のマーカー（例えば、ＣＤ１４０ａ、ＣＤ１４０ｂ）、造血細胞のマーカー（例えば、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ２３５ａ若しくはＣＤ４１ａ）又はヒト多能性幹細胞のマーカー（例えば、ＴＲＡ１－６０）である。

【００２３】

本発明に有用な内皮細胞の他の特徴は、内皮細胞の機能的特性である。例えば、そのような機能的特性の１つは、アセチル化低密度リポタンパク質（ａｃ－ＬＤＬ）を取り込む能力である。内皮細胞のなお別の機能的特性は、マトリゲルのような三次元マトリックスの管様構造体を形成する能力である。内皮細胞の追加の機能的特性は、バリア機能である。本発明に有用な内皮細胞の別の特徴は、細胞接着分子（例えばＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）、ＣＤ１０６及びＣＤ６２Ｅ）の発現を上方制御することにより、１つ以上の炎症促進性刺激（例えば、ＴＮＦ及びＩＬ－１）に反応する能力である。本発明に有用な内皮細胞のなお別の特徴は、密着結合タンパク質（例えば、クローディン５及びＺＯ－１）の発現である。本発明に有用な内皮細胞の他の追加的な特徴は、平板化（又は扁平）外観及び大型の中心核のような形態的特徴である。

【００２４】

特定の実施態様において、方法は、内皮細胞を選択又は豊富化する１つ以上の工程を更に含むことができる。例えば、選択又は豊富化された内皮細胞は、内皮細胞特異的転写調節エレメントに機能的に結合しているレポーター遺伝子を発現することができる。他の実施態様において、選択又は豊富化された内皮細胞は、１つ以上の内皮細胞の特徴を示すことができる。例えば、選択又は豊富化された内皮細胞は、１つ以上の内皮細胞マーカーを発現することができる、内皮細胞の１つ以上の機能的特性を示すことができる又は内皮細胞の１つ以上の形態的特性を示すことができる。

【００２５】

特定の実施態様において、本明細書に開示されている方法に使用される多能性幹細胞は、１つ以上の増殖因子を含有する培地で培養される。例えば、培地は、塩基性ＦＧＦ、ＶＥＧＦ又はこれらを両方とも含有することができる。そのような培養は、内皮プログラミング因子の発現の増加の前、間又は後でありうる。

【００２６】

本明細書に開示されている方法によりもたらされる内皮細胞を、発現の増加の後又は増殖因子の存在下若しくは不在下での培養の後、少なくとも、約又は最大３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０日（又はこれらから導かれる任意の範囲）でもたらすことができる。幾つかの特定の方法において、もたらされる内皮細胞は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現の増加の最大１０日後に得られる。他の実施態様において、もたらされる内皮細胞は、発現の増

加の最大４日後に得られる。

【００２７】

特定の態様において、方法は、細胞集団が実質的に個別の細胞に分散される１つ以上の追加の工程を含む。分散は、例えば、発現の増加の少なくとも約２４時間後に実施することができる。幾つかの実施態様において、分散は、発現の増加の少なくとも１、２、３、４又はそれ以上の日数の後で実施される。方法は、実質的に個別の細胞が、マトリックス成分で被覆された表面に分散される１つ以上の工程を含むこともできる。例えば、表面を、フィブロネクチン、ゼラチン、コラーゲン、ポリ－ｄ－リシン、マトリゲル又はＲＧＤペプチドで被覆することができる。マトリックス成分で被覆された表面において平板培養された細胞を、培養することができる。幾つかの実施態様において、マトリックス成分で被覆された表面において平板培養された細胞を、少なくとも約１２時間培養することができる。培養した後、非結合細胞を除去することができ、結合細胞を更に培養することができる。例えば、結合細胞を少なくとも２日間更に培養することができる。

【００２８】

細胞集団の分散は、機械的又は酵素的な手段により実施することができる。例えば、細胞を、チロシン若しくはｔｒｙｐＬＥ又はＡｃｃｕｔａｓｅ（登録商標）のような酵素の混合物のような１つ以上の酵素の有効量で処理することにより分散することができる。分散された細胞は、１つ以上の増殖因子を含む培地で培養することができる。例えば、分散された細胞は、塩基性ＦＧＦ、ＶＥＧＦ又はこれらを両方とも含有する培地で培養することができる。

【００２９】

また、提供されるものは、多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換により内皮前駆細胞をもたらす方法である。そのような方法において、内皮前駆細胞は、多能性細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換を引き起こして内皮前駆細胞にすることができる１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で多能性幹細胞又は体細胞を培養し、それによって多能性幹細胞をフォワードプログラミングして内皮前駆細胞にすること又は体細胞を分化転換して内皮前駆細胞にすることによりもたらすことができる。

【００３０】

動脈内皮細胞をもたらす方法も提供される。幾つかの態様において、方法は、例えばＥＲＧ又はＥＴＶ２のような１つ以上の内皮プログラミング因子の発現を増加することを含む。特定の実施態様において、動脈内皮細胞は、例えばＣＤ３０４、ＣＤ１８４又はＤＬＬ４のような１つ以上の動脈内皮細胞マーカーを発現する。

【００３１】

特定の態様において、血液生成内皮細胞をもたらす方法が提供される。幾つかの態様において、血液生成内皮細胞は、例えばＥＴＶ２のような内皮プログラミング因子の発現を増加することによりもたらされる。そのような血液生成内皮細胞を使用して、造血培養培地で培養されたときに造血細胞を生じることができる。造血培養培地は、造血細胞を生じるのに適した任意の培地でありうる。例えば、造血培養培地は、ＥＳＦＭ、ＳｔｅｍＬｉｎｅ　ＨＳＣ培地（シグマ社）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、インターロイキン－３（ＩＬ－３）及びインターロイキン－６（ＩＬ－６）からなる群より選択される１つ以上の成分を含むことができる。特定の実施態様において、造血培養培地は、ＥＳＦＭ、ＳｔｅｍＬｉｎｅ　ＨＳＣ培地（シグマ社）、ＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＩＬ－３及びＩＬ－６を含む。生じた造血細胞は、ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ２３５ａ及びＣＤ４１ａからなる群より選択される１つ以上の造血細胞マーカーを含むことができる。特定の態様において、造血細胞は、ＣＤ４３＋、ＣＤ４５＋、ＣＤ２３５ａ＋及び／又はＣＤ４１ａ＋である。

【００３２】

他の態様において、間葉生成（mesenchymogenic）内皮細胞をもたらす方法が提供され

る。幾つかの態様において、間葉生成内皮細胞は、ＥＲＧ又はＥＴＶ２のような内皮プログラミング因子の発現を増加することによりもたらされる。特定の実施態様において、間葉生成内皮細胞は、ＥＲＧの発現を増加することによりもたらされる。そのような間葉生成内皮細胞を使用して、間葉培養培地で培養されたときに間葉細胞を生じることができる。間葉培養培地は、間葉細胞を生じるのに適した任意の培地でありうる。例えば、間葉培養培地は、ＦＧＦ及び例えばＡ８３－０１のようなＴＧＦ－ベータインヒビターからなる群より選択される１つ以上の成分を含むことができる。特定の実施態様において、間葉培養培地は、ＦＧＦ及びＡ８３－０１を含む。生じた間葉細胞は、ＣＤ７３及びＣＤ１０５からなる群より選択される１つ以上の間葉細胞マーカーを含むことができる。幾つかの態様において、生じた間葉細胞はＣＤ３１－ＣＤ７３＋ＣＤ１０５＋である。

【００３３】

本明細書において提供される内皮細胞、内皮前駆細胞又は内皮細胞の前駆体を、臨床又はスクリーニング用途のような内皮細胞のための当該技術で現在既知の任意の方法及び用途に使用することができる。例えば、本発明は、内皮細胞に対する効果について化合物を評価する方法を提供する。そのような方法において、本明細書に開示されている任意の方法によりもたらすことができる内皮細胞を化合物と接触させることができ、内皮細胞に対する化合物の効果をアッセイすることができる。例えば、内皮細胞に対する薬理学的又は毒物学的効果をアッセイすることができる。特定の実施態様において、本発明の内皮細胞は、薬剤血管毒性又は血管透過性を評価するために使用される。他の実施態様において、本発明の内皮細胞は、抗癌薬の開発に使用される。動脈内皮細胞を使用して、血栓症、アテローム動脈硬化症及び高血圧症のような疾患を研究することができる。

【００３４】

幾つかの態様において、被験者を治療する方法が提供される。例えば、被験者は、心血管の疾患又は心血管の損傷を有する場合がある又はその危険性がある。幾つかの実施態様において、被験者は虚血を有する又はその危険性がある。なお他の実施態様において、被験者は組織損傷を有する又は組織移植片の必要性がある。特定の態様において、任意のそのような被験者は、本明細書に開示されている任意の方法によりもたらされる内皮細胞又は内皮前駆細胞の治療有効量を被験者に投与することにより治療される。加えて、幾つかの実施態様において、本発明の方法によりもたらされる内皮細胞を使用して、そのような療法が必要な患者に投与される組織移植片を生物工学により作ることができる。幾つかの実施態様において、動脈内皮細胞は、動脈障害、損傷又は疾患を治療する方法のような治療方法に使用される。

【００３５】

特定の実施態様において、本発明は、内皮細胞又は内皮前駆体細胞を対象とする。そのような内皮細胞又は内皮前駆体細胞は、本明細書に開示されている方法のいずかに従うプロセスによりもたらすことができる。他の特定の実施態様において、本発明は、内皮前駆細胞又は内皮前駆体細胞を対象とする。そのような内皮前駆細胞又は前駆体細胞は、本明細書に開示されている方法のいずかに従うプロセスによりもたらすことができる。

【００３６】

なお他の実施態様において、細胞個体群が提供される。そのような細胞個体群は、多能性幹細胞、体細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、内皮細胞の他の前駆体、幹細胞又はこれらのいずれかの子孫を含むことができる。例えば、細胞個体群は内皮細胞からなることができ、ここで少なくとも１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、９９％若しくはそれ以上又はこれらから導かれる任意の範囲の内皮細胞は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを担持する。特定の実施態様において、８０％の内皮細部は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを担持する。他の態様において、細胞個体群は内皮前駆細胞からなることができ、ここで少なくとも８０％の内皮前駆細胞は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを担持する。なお他の態様において、多能性幹細胞又は体細胞を含有する細胞個体群が提供され、ここで１５、２０、２５

、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、９９％若しくはそれ以上又はそれらから導かれる任意の範囲の細胞は、１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを担持する。例えば、内皮プログラミング因子遺伝子は、ＥＲＧ又はＥＴＶ２でありうる。

【００３７】

また提供されるものは、２つの細胞型、すなわち内皮細胞になるようにプログラムされた細胞及び内皮細胞を含み、他の中間細胞型を実質的に含まない細胞個体群を含む組成物である。例えば、そのような細胞個体群は、幹細胞及び内皮細胞を含む２つの細胞型を有することができるが、内皮細胞分化プロセスの中間発育段階において他の細胞型を実質的に含まない。特に、幹細胞及び内皮細胞からなる細胞個体群を含む組成物を提供することができる。幹細胞は、特に多能性幹細胞、例えば誘導多能性幹細胞でありうる。内皮細胞は、細胞個体群の少なくとも、約又は最大１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、９９％又はこれらから導かれる任意の範囲でありうる。

【００３８】

特定の実施態様において、内皮細部は、内皮前駆細胞のフォワードプログラミングによりもたらされる。例えば、内皮前駆細胞を、内皮前駆細胞のフォワードプログラミングを引き起こして内皮細胞にすることができる、本明細書に記載されているような１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で培養し、それにより前駆細胞をフォワードプログラミングして内皮細胞にすることができる。別の実施態様において、内皮細胞は、非内皮不死化体細胞の分化転換によりもたらされる。例えば、非内皮不死化体細胞胞を、体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞にすることができる、本明細書に記載されているような１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で培養し、それにより体細胞を分化転換して内皮細胞にすることができる。

【００３９】

本発明の方法及び／又は組成物の文脈において考察されている実施態様を、本明細書に記載されている任意の他の方法又は組成物に関して用いることができる。したがって、１つの方法又は組成物に関する実施態様を、本発明の他の方法及び組成物に当てはめることもできる。

【００４０】

本明細書で使用されるとき、核酸に関する用語「コードする」又は「コードしている」は、本発明が当業者に容易に理解できるように使用されているが、これらの用語を、それぞれ「含む」又は「含んでいる」と交換可能に使用することができる。

【００４１】

本明細書において使用されるとき、「ａ」又は「ａｎ」は１つ以上を意味することができる。請求項において使用されるとき、語「含んでいる」と共に使用される場合、語「ａ」又は「ａｎ」は１つ又は２つ以上を意味することができる。

【００４２】

請求項における語「又は」の使用は、代替物のみを意味すること又は代替物が相互排他的であることが明確に示されない限り「及び／又は」を意味するために使用されるが、開示は、代替物及び「及び／又は」のみを意味する定義を支持する。本明細書で使用されるとき「別」は、少なくとも二番目又はそれ以上を意味することができる。

【００４３】

本出願の全体にわたって、用語「約」は、値が、値を決定するために用いられる装置、方法の固有誤差変動又は研究被験者に存在する変動を含むことを示すために使用される。

【００４４】

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な記載によって明白となる。しかし、詳細な記載及び特定の例は、本発明の好ましい実施態様を示しているが、本発明の精神及び範囲内の多様な変更及び改変がこの詳細な記載により当業者に明白であるので、例示のため提示されていることが理解されるべきである。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目１）

多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換により内皮細胞をもたらす方法であって、

該多能性細胞のフォワードプログラミング又は該体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞にすることができる１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で該多能性幹細胞又は該体細胞を培養し、それによって該多能性幹細胞をフォワードプログラミングして又は該体細胞を分化転換して内皮細胞にすることにより該内皮細胞もたらすこと

を含む方法。

（項目２）

内皮細胞が多能性幹細胞のフォワードプログラミングによりもたらされる、項目１記載の方法。

（項目３）

多能性幹細胞が誘導多能性幹細胞である、項目２記載の方法。

（項目４）

内皮細胞が体細胞の分化転換によりもたらされる、項目１記載の方法。

（項目５）

体細胞が不死化体細胞である、項目４記載の方法。

（項目６）

多能性幹細胞又は体細胞が少なくとも１つの外因性発現カセットを含み、該外因性発現カセットが１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む、項目１記載の方法。

（項目７）

多能性幹細胞又は体細胞を、多能性細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換を引き起こして内皮細胞にするのに十分な量で１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の遺伝子産物を含む１つ以上の内皮プログラミング因子と接触させることを含む、項目１記載の方法。

（項目８）

１つ以上の遺伝子産物が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のポリペプチドである、項目７記載の方法。

（項目９）

遺伝子産物が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子のＲＮＡ転写物である、項目７記載の方法。

（項目１０）

少なくとも１つの内皮プログラミング因子遺伝子がｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６腫瘍遺伝子相同体（鳥類）（ＥＲＧ）を含む、項目１記載の方法。

（項目１１）

少なくとも１つの内皮プログラミング因子遺伝子がＥＲＧアイソフォーム３を含む、項目１０記載の方法。

（項目１２）

少なくとも１つの内皮プログラミング因子遺伝子がｅｔｓ変種２（ＥＴＶ２）を含む、項目１記載の方法。

（項目１３）

多能性幹細胞若しくはその子孫細胞又は体細胞若しくはその子孫細胞が、レポーター遺伝子に機能的に結合している内皮細胞特異的転写調節エレメントを含むレポーター発現カセットを更に含む、項目１記載の方法。

（項目１４）

内皮細胞が、下記：

（ｉ）１つ以上の内皮細胞マーカーの発現；

（ｉｉ）アセチル化低密度リポタンパク質（ａｃ－ＬＤＬ）を取り込む能力、三次元マ

トリックスに管様構造を形成する能力、１つ以上の炎症促進性刺激に反応して１つ以上の細胞接着分子の発現を上方制御する能力又はこれらの能力の２つ以上の組み合わせ；或いは
（ｉｉｉ）内皮細胞の形態的特徴
を含む内皮細胞の１つ以上の特徴を含む、項目１記載の方法。
（項目１５）
１つ以上の内皮細胞マーカーが、ＣＤ１４４、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＥＳＡＭ、ＣＤ１０２、ＣＤ１４３、ＣＤ９３、ＣＤ１８４、ＣＤ１０５、ＣＤ１４６、フォンウィルブランド因子、ＺＯ－１、ＣＤ３０４及びＤＬＬ４からなる群より選択される、項目１４記載の方法。
（項目１６）
１つ以上の炎症促進性刺激がＴＮＦ及びＩＬ－１からなる群より選択され、１つ以上の細胞接着分子がＣＤ５４、ＣＤ６２Ｅ及びＣＤ１０６からなる群より選択される、項目１４記載の方法。
（項目１７）
もたらされる内皮細胞が成熟内皮細胞である、項目１記載の方法。
（項目１８）
内皮細胞を選択又は豊富化することを更に含み、選択又は豊富化された内皮細胞が項目１４記載の内皮細胞の１つ以上の特徴の発現を含む、項目１４記載の方法。
（項目１９）
多能性幹細胞又はその子孫細胞が１つ以上の増殖因子を含む培地で培養される、項目１記載の方法。
（項目２０）
１つ以上の増殖因子が、塩基性線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）又は両方を含む、項目１９記載の方法。
（項目２１）
もたらされる内皮細胞が発現の増加の最大１０日後に得られる、項目１記載の方法。
（項目２２）
もたらされる内皮細胞が発現の増加の最大４日後に得られる、項目１記載の方法。
（項目２３）
細胞集団を実質的に個別の細胞に分散することを更に含み、分散が発現の増加の少なくとも約２４時間後に実施される、項目１記載の方法。
（項目２４）
実質的に個別の細胞をマトリックス成分が被覆された表面で平板培養することを更に含む、項目２３記載の方法。
（項目２５）
（ａ）平板培養細胞を少なくとも１２時間培養すること；（ｂ）非結合細胞を除去すること；及び（ｄ）残った結合細胞を培養することを更に含む、項目２４記載の方法。
（項目２６）
残った結合細胞が少なくとも２日間培養される、項目２５記載の方法。
（項目２７）
もたらされた内皮細胞を造血培養培地で培養して、造血細胞を生じることを更に含む、項目１記載の方法。
（項目２８）
もたらされた内皮細胞を間葉培養培地で培養して、間葉細胞を生じることを更に含む、項目１記載の方法。
（項目２９）
多能性幹細胞のフォワードプログラミング又は体細胞の分化転換により内皮前駆細胞をもたらす方法であって、
該多能性細胞のフォワードプログラミング又は該体細胞の分化転換を引き起こして該内

皮前駆細胞にすることができる１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で該多能性幹細胞又は該体細胞を培養し、それによって該多能性幹細胞をフォワードプログラミングして又は該体細胞を分化転換して内皮前駆細胞にすることにより該内皮前駆細胞もたらすこと
を含む方法。
（項目３０）
内皮細胞への効果について化合物を評価する方法であって、
ａ）項目１記載の方法に従う方法によりもたらされる内皮細胞を該化合物と接触させること；及び
ｂ）該内皮細胞に対する該化合物の効果をアッセイすること
を含む方法。
（項目３１）
効果が薬理学的又は毒性効果である、項目３０記載の方法。
（項目３２）
項目１～３１のいずれか１項記載の方法によりもたらされる内皮細胞又は内皮前駆細胞。
（項目３３）
疾患又は損傷を有する又は発生する危険性のある被験者の治療に使用される、項目１～３１のいずれか１項記載の方法によりもたらされる内皮細胞又は内皮前駆細胞。
（項目３４）
疾患が虚血である、項目３３記載の内皮細胞又は内皮前駆細胞。
（項目３５）
損傷が、組織損傷又は組織移植片の必要なものである、項目３３記載の内皮細胞又は内皮前駆細胞。
（項目３６）
疾患又は損傷が、心血管疾患又は心血管損傷である、項目３３記載の内皮細胞又は内皮前駆細胞。
（項目３７）
疾患又は損傷を有する又は発生する危険性のある被験者の治療のための薬剤の調製における、項目１～３１のいずれか１項記載の方法によりもたらされる内皮細胞又は内皮前駆細胞の使用。
（項目３８）
疾患が虚血である、項目３７記載の使用。
（項目３９）
損傷が、組織損傷又は組織移植片の必要なものである、項目３７記載の使用。
（項目４０）
疾患又は損傷が、心血管疾患又は心血管損傷である、項目３７記載の使用。
（項目４１）
少なくとも８０％の内皮細胞が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを含む、内皮細胞を含む細胞個体群。
（項目４２）
少なくとも８０％の内皮前駆細胞が１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性発現カセットを含む、内皮前駆細胞を含む細胞個体群。
（項目４３）
内皮前駆細胞のフォワードプログラミングにより内皮細胞をもたらす方法であって、
該内皮前駆細胞のフォワードプログラミングを引き起こして該内皮細胞にすることができる１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子の発現レベルを増加する条件下で該内皮前駆細胞を培養し、それによって該前駆細胞をフォワードプログラミングして内皮細胞にすることにより該内皮細胞もたらすこと
を含む方法。

【図面の簡単な説明】
【００４５】
以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を更に示すために含まれる。本発明は、本明細書に提示される特定の実施態様の詳細な記述と組み合わせてこれらの図面の１つ以上を参照することにより、より良好に理解することができる。
【図１】ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣからの内皮細胞分化の代替的手法。ＥＣは、通常の分化（下側の囲み）において観察される発育段階の全てでなければ大部分を迂回する、適切な導入遺伝子の発現を介して（上側の囲み）、ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣから効率的に誘導することができる。
【図２】ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣを内皮細胞に直接変換する導入遺伝子を同定するのに用いられる戦略。ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣを、誘導性遺伝子発現のためにｒｔＴＥＴを構成的に発現するように操作した。誘導性プロモーターＰｔｉｇｈｔの制御下の導入遺伝子を、操作済ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにエレクトロポレーションにより導入する。ドキシサイクリン（Ｄｏｘ）の添加により、導入遺伝子発現を誘導し、ＥＣ分化を、フローサイトメトリーにより、ＥＣマーカー（ＣＤ３１、ＣＤ１４４（ＶＥ－カドヘリン））の発現と共に特徴的なＥＣ形態によってモニターする。
【図３】内皮細胞分化のヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣ誘導性系統の確立。染色体３のヒトＲｏｓａ２６座を選択して、ｒｔＴＥＴの発現を可能にし、同時に、染色体位置依存性サイレンシング効果を最小限にした。最初にＬｏｘＰ組み換え部位（ＬＯＸ７１及びＬＯＸ２２７２）を、ヒトＲＯＳＡ２６遺伝子のエクソン１とエクソン２の間の部位に相同組み換えにより導入した。標的作成物（ＫＩ作成物）は、負の選択のためにジフテリア毒素Ａフラグメント遺伝子（ＤＴＡ）のホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター（ＰＧＫ）駆動発現を使用し、約２．０ｋｂの５アーム及び４．５ｋｂの３鋳アームを含有する。ヒトＢＣＬ２遺伝子（ＳＡ）からのスプライシングアクセプターシグナルをＬＯＸ７１部位の前に配置して、内在性ヒトＲＯＳＡ２６プロモーターからの選択マーカーの発現を可能にした。チミジンキナーゼ（ＴＫ）のコード領域を含めて、ガンシクロビルの使用による工程２での不正確なＣｒｅ／ＬｏｘＰ組み換え事象に対する負の選択を可能にした。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（Ｎｅｏ）を、相同組み換え（工程１）の際に正の選択に使用した。口蹄疫ウイルスペプチド（２Ａ）を使用して、内在性ヒトＲＯＳＡ２６プロモーターからＴＫとＮｅｏの遺伝子を同時発現した。ＢＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモン遺伝子から誘導されるポリアデニル化シグナル。相同組み換えは、Ｃｒｅ／ＬｏｘＰ組み換えを介する効率的なカセット交換のために親ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣ系統を生じた。ＥＣ分化の誘導性細胞系統を確立するために、構成的に活性な真核生物延長因子１αプロモーター（ｐＥＦ）により駆動されたｒｔＴＥＴを、組み換え仲介カセット交換（ＲＭＣＥ）ベクター及びＣｒｅ発現プラスミドの脂質媒介同時形質移入によりＲｏｓａ２６座に導入した。ピューロマイシンＮアセチルトランスフェラーゼ（Ｐｕｒｏ）を使用して、組み換え事象を選択した。正確に組み換えられた誘導性細胞は、ピューロマイシン（Ｐｕｒｏ＋）及びガンシクロビル（ＴＫ－）に抵抗性があり、ジェネテシン選択（Ｎｅｏ－）に対して感受性がある。
【図４Ａ】ヒトＨ１　ＥＳＣ誘導性系統におけるＴｅｔオン誘導性遺伝子発現の確認。２ベクターＰｉｇｇｙＢａｃ安定遺伝子発現系；Ｐｔｉｇｈｔは、ｒｔＴＥＴ反応性の誘導性プロモーターであり；ｐＥＦは、真核生物延長因子１αプロモーターであり；ｈＰＢａｓｅは、ヒト細胞における発現が最適化されているコドンを有するＰｉｇｇｙＢａｃトランスポサーゼのコード領域である。
【図４Ｂ】ヒトＨ１　ＥＳＣ誘導性系統におけるＴｅｔオン誘導性遺伝子発現の確認。ドキシサイクリン（１μｇ／ｍＬ）を用いる又は用いない誘導の４日後のヒトＥＳＣ誘導性系統におけるＥＧＦＰ発現のフローサイトメトリー分析。灰色線：ＥＧＦＰベクターでの形質移入によるヒトＥＳＣ誘導性系統；黒色線：ドキシサイクリンを有する又は有さない誘導の４日後の安定したＰｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン組み込みを有するヒトＥＳＣＲ／Ｉ系統。

【図５】ＥＲＧ発現を介するヒトイＥＳＣ誘導性系統からの直接内皮細胞（ＥＣ）誘導の明視野像。ＥＲＧ－３を、Ｐｔｉｇｈｔプロモーターの制御下でＰｉｇｇｙＢａｃベクター（図４Ａ）にクローンし、ｈＰＢａｓｅ発現ベクターと共に、エレクトロポレーションによりヒトＥＳＣ誘導性系統に導入した。形質移入細胞を、安定したゲノム導入遺伝子組み込みを有する形質転換体の選択のために、ジェネテシン（１００μｇ／ｍｌ）の存在下でマトリゲルのＴｅＳＲ培地で培養した。ドキシサイクリン（０．２μｇ／ｍｌ）を加えてＥＲＧ－３発現を誘導し、ＴｅＳＲを、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ（両方ともペプロテック社（Peprotech））を補充した内皮無血清培地（ＥＳＦＭ；インビトロゲン社）に代えた。分化細胞は、ＥＲＧ誘導の２～３日目にＥＣ形態を得る。ＥＲＧ－３発現をこれらの実験で使用して、ここに示される結果をもたらしたが、同様の結果は、ＥＲＧアイソフォーム１、ＥＲＧアイソフォーム２及びＥＲＴアイソフォーム４を含む他のＥＲＧアイソフォームにより得られた（データは示されず）。

【図６】ＥＴＶ２発現によるヒトＥＳＣ誘導性系統からのＥＣのフォワードプログラミングの明視野像。ＥＴＶ２を、Ｐｔｉｇｈｔプロモーターの制御下でＰｉｇｇｙＢａｃベクター（図４Ａ）にクローンし、次にｈＰＢａｓｅ発現ベクターと共に、エレクトロポレーションによりヒトＥＳＣ誘導性系統に導入した。形質移入細胞を、安定したゲノム導入遺伝子組み込みを有する形質転換体の選択のために、ジェネテシン（１００μｇ／ｍｌ）の存在下でマトリゲルのＴｅＳＲ培地で培養した。ドキシサイクリン（０．２μｇ／ｍｌ）を加えてＥＴＶ２発現を誘導し、ＴｅＳＲを、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ（両方ともペプロテック社（Peprotech））を補充した内皮無血清培地（ＥＳＦＭ；インビトロゲン社）に代えた。分化細胞は、ＥＴＶ２誘導の２～３日目にＥＣ形態を得る。

【図７】ヒトＥＳＣからのＥＲＧ誘導ＥＣ分化の際のヒト多能性幹細胞特異的マーカーＴＲＡ－１－６０及びＥＣマーカー（ＣＤ１４４／ＶＥ－カドヘリン及びＣＥ３１）のフローサイトメトリー発現分析。ＥＲＧ誘導分化細胞は、ＥＣマーカー（ＣＤ１４４及びＣＤ３１）の発現を上方制御し、一方、ヒト多能性幹細胞マーカーＴＲＡ－１－６０の発現を下方制御した。

【図８】ヒトＥＳＣからのＥＴＶ２誘導ＥＣ分化の際のヒト多能性幹細胞特異的マーカーＴＲＡ－１－６０及びＥＣマーカー（ＣＤ１４４／ＶＥ－カドヘリン及びＣＥ３１）のフローサイトメトリー発現分析。ＥＴＶ２誘導分化細胞は、ＥＣマーカー（ＣＤ１４４及びＣＤ３１）の発現を上方制御し、一方、ヒト多能性幹細胞マーカーＴＲＡ－１－６０の発現を下方制御した。

【図９】ＥＲＧ誘導及びＥＴＶ２誘導ｈＥＳＣ培養におけるＥＣマーカー（ＣＤ３１、ＣＤ１４４、ＥＳＡＭ及びＣＤ３４）と造血マーカー（ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ４１ａ、ＣＤ２３５ａ）の発現の動態分析。

【図１０】通常の分化（ＥＥＣ）を介して又はＥＲＧ（ＥＲＧ－ＥＣ）若しくはＥＴＶ２（ＥＴＶ２－ＥＣ）を介してヒトＥＳＣから得た確立されたＥＣの明視野像。誘導３日目の細胞培養を、Ａｃｃｕｔａｓｅ処理（インビトロゲン社）により解離して単一細胞懸濁液にし、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦを補充したＥＳＦＭにおいてゼラチン被覆プラスチックで平板培養した。２時間平板培養した後、非接着性細胞を含有する培地を除去し、結合細胞を、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び５μｇ／ｍｌのヒトフィブロネクチン（インビトロゲン社）を補充したＥＳＦＭで培養した。ＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの形態は、ＨＵＶＥＣ及びＥＥＣと高度に類似していた。

【図１１】ＥＣ及び造血マーカーのフローサイトメトリー発現分析。ＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣにおける動脈ＥＣの３つのマーカー（ＣＤ３０４／ＮＲＰ１、ＣＤ１８４／ＣＸＣＲ４及びＤＬＬ４）全ての発現は、ＨＵＶＥＣ及びＥＥＣと異なるこれらの誘導ＥＣの動脈への運命を示唆しうる。

【図１２】ＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの免疫蛍光分析：ＣＤ１４４（緑色）、ｖＷＦ（緑色）及びｅＮＯＳ（赤色）。ＤＡＰＩを使用して、核を対比染色した。染色はＨＵＶＥＣよりも一般に弱かったが、ｖＷＦはＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの両方におい

て明確に発現した。
【図１３】ＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣにおける密着結合タンパク質（クローディン５及びＺＯ－１）発現のフローサイトメトリー及び免疫蛍光分析。
【図１４】ＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣによるＡｃ－ＬＤＬ組み込み。ＥＣを、ＡｃＬＤＬ－Ｄｉｌ接合体（インビトロゲン社、２μｇ／ｍｌ）と共に３７℃で４時間インキュベートし、続いて対比染色のために０．５μｇ／ｍｌのＨｏｅｃｈｓｔ　３３２５８と共に５分間インキュベートした。フローサイトメトリー分析では、Ａｃ－ＬＤＬ処理培養を、Ａｃｃｕｔａｓｅ解離の前に新たな培地で一晩培養した。未処理ＥＣを対照として使用した。
【図１５】ＥＣＩＳ　Ｚθｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ（アプライド・バイオフィジクス社）を使用して経内皮抵抗（ＴＥＲ）を測定することによるＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣのバリア機能分析。上側の線は、ベースラインＴＥＲを示し、一方、下側の線は、トロンビン（０．５Ｕ／ｍｌ）に対するバリア機能の破壊及び回復を示す。ＥＲＧ－ＥＣは、ＨＵＶＥと比較してバリア機能回復において同様の動態を示したが、ＥＴＶ２－ＥＣは遅く、ＥＲＧ－ＥＣとＥＴＶ２－ＥＣが異なっていることを示唆した。
【図１６】ＥＲＧ誘導ＥＣの管形成。ＥＲＧ－ＥＣを、４０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦを補充したＥＳＦＭ中の凝固マトリゲルにおいて２５０００細胞／ｃｍ2で平板培養し、１２時間インキュベートした。
【図１７】ＴＮＦ処理に反応したＣＤ５４、ＣＤ６２Ｅ及びＣＤ１０６活性化マーカーの発現の増加によるＥＲＧ－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの炎症性反応。ＥＣ培養を、２５ｎｇ／ｍｌのＴＮＦで２４時間処理し、フローサイトメトリーにより分析した。
【図１８】ＥＴＶ２－ＥＣの血液生成機能。ＥＴＶ２及びＥＲＧ誘導は、５０％のＥＳＦＭ、５０％のＳｔｅｍＬｉｎｅ　ＨＳＣ培地（シグマ社）、１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ、５ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ、５０ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、２０ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、１０ｎｇ／ｎｌのＴＰＯ、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ３及び２０ｎｇ／ｍｌのＩＬ６を含有する培地において実施した。ＣＤ３１＋ＣＤ４３＋表現型により定義された造血細胞は、ＥＴＶ２において検出されたが、ＥＲＧ誘導培養では検出されなかった。９日目のＥＴＶ２培養における大部分の造血細胞もＣＤ２３５ａ／ＣＤ４１ａ－ＣＤ４５＋であり、最終的に造血であることが示唆された。
【図１９】ＥＲＧ－ＥＣの間葉生成の可能性。ＥＲＧ－ＥＣを、１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ２を含有し、２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ又は１μｇ／ｍｌのＡ８３－１０（ＴＧＦβインヒビター）のいずれかを追加的に補充したＥＳＦＭにおいて培養した。ＣＤ３１－ＣＤ７３＋ＣＤ１０５＋表現型により定義される間葉細胞へのＥＲＧ－ＥＣの漸進的な移行が、ＦＧＦ＋Ａ８３－０１を含有する培養において観察されたが、ＦＧＦ＋ＶＥＧＦでは観察されなかった。ＥＴＶ２－ＥＣ細胞は同様の間葉移行を受けたが、効率はＥＲＧ－ＥＣよりも低かった。
【発明を実施するための形態】
【００４６】
内皮細胞は、血管の壁を含み、身体の多様なプロセスにおいて重要である。例えば、内皮細胞は、血管新生、血圧の調節、血栓、炎症及び濾過において役割を果たす。内皮細胞は、細胞の異種群であり、管径、特定の器官への特異化及び形態に応じて多様な特徴を有することができる。内皮細胞の幾つかの特徴には、ＣＤ３１、ＣＤ１０５（エンドグリン）及びウィルブランド因子（第ＶＩＩＩ因子とも呼ばれる）の発現、並びにアセチル化低密度リポタンパク質（ａｃ－ＬＤＬ）を取り込む能力が含まれる。
【００４７】
本発明は、フォワードプログラミング又は分化転換よる内皮細胞産生の方法及び組成物を提供することによって、現行技術による幾つかの主要な問題を克服する。段階的分化プロトコールを使用する以前の方法と対照的に、これらの方法の特定の態様は、フォワードプログラミング又は分化転換により非内皮細胞において内皮プログラミング転写因子のレベルを増加することによって内皮細胞をもたらす。多様な中間体発育段階における異なる

増殖因子の添加のような余分の工程は、本発明の方法の特定の態様において不必要でありうる。したがって、本発明の特定の態様は、時間効率及び費用効率がより高くなることができ、例えば幹細胞又は体細胞のような再生可能な供給源から治療用の内皮細胞又は内皮前駆細胞の製造を可能にすることができる。本発明の更なる実施態様及び利点が下記に記載される。

【００４８】

Ｉ．定義

「プログラミング」は、細胞が産生できる子孫の種類を変更するプロセスである。例えば、細胞は、プログラミングなしの同じ条件下で形成することができるものと比較して、培養又はインビボのいずれかにおいて少なくとも１つの新たな細胞型の子孫を形成できるように変更される場合、プログラムされている。このことは、十分な繁殖の後、新たな細胞型の表面型の特徴を有する子孫の測定可能な割合が観察され、そのような子孫がプログラミングの前に実質的に形成できなかったこと、あるいは、新たな細胞型の特徴を有する割合がプログラミングの前よりも測定できる程度に多いことを意味する。このプロセスは、分化、脱分化及び分化転換を含む。「分化」は、特異化が乏しい細胞がより特異化された細胞型になるプロセスである。「脱分化」は、部分的又は最終的に分化した細胞が、多能性又は多分化能のような初期発育段階に戻る細胞プロセスである。「分化転換」は、１つの分化細胞型が別の分化細胞型に形質転換するプロセスである。特定の条件下、新たな細胞型の特徴を有する子孫の割合は、優先度を増加するために、少なくとも約１％、５％、２５％又はそれ以上でありうる。

【００４９】

用語「内皮プログラミング因子」は、単独又は別のプログラミング因子遺伝子との組み合わせで発現したとき、多能性細胞又は非内皮体細胞の直接分化を引き起こして内皮細胞又は内皮前駆体細胞にすることができる遺伝子である。

【００５０】

用語「フォワードプログラミング」は、多能性を有さない分化体細胞とは対照的に、多分化能細胞又は多能性細胞に１つ以上の特異的系列決定遺伝子又は遺伝子産物を提供することにより、多分化能細胞又は多能性細胞をプログラミングすることを意味する。例えば、フォワードプログラミングは、ＥＳＣ又はｉＰＳＣをプログラミングして内皮細胞、内皮前駆体細胞、他の前駆体細胞又は他の分化体細胞にするプロセスを記載することができる。

【００５１】

用語「外因性」は、細胞又は生物体におけるタンパク質、遺伝子、核酸又はポリヌクレオチドに関して使用される場合、人工的又は自然の手段により細胞又は生物体に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸又はポリヌクレオチドを意味するか、或いは細胞に関する場合、単離され、後に人工的又は自然の手段により他の細胞又は生物体に導入される細胞を意味する。外因性核酸は、異なる生物体若しくは細胞からのものでありうる又は生物体若しくは細胞内の天然に生じる核酸の１つ以上の追加的なコピーでありうる。外因性細胞は、異なる生物体からのものでありうる又は同じ生物体からのものでありうる。非限定的例として、外因性核酸は、天然の細胞と異なる染色体位置のものであるか、そうでなければ天然に見出されるものと異なる核酸配列によりフランクされたものである。外因性核酸は、エピソームベクターのような染色体外のものでもありうる

【００５２】

「発現作成物」又は「発現カセット」とは、転写を指示することができる核酸分子を意味する。発現作成物は、最低でも、１つ以上の望ましい細胞型、組織又は器官において遺伝子発現を指示する１つ以上の転写制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー又は機能的に同等の構造物）を含む。転写終結シグナルのような追加のエレメントを含むこともできる。

【００５３】

「ベクター」又は「作成物」（時々、遺伝子送達系又は遺伝子導入「ビヒクル」と呼ば

れる）は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む巨大分子又は分子の複合体を意味する。

【００５４】

「プラスミド」は、一般的な種類のベクターであり、染色体ＤＮＡから独立して複製することができる、染色体ＤＮＡから離れている染色外ＤＮＡ分子である。特定の場合において、環状の二本鎖である。

【００５５】

「複製の起点」（「ｏｒｉ」）又は「複製起点」は、細胞のプラスミドに存在する場合、プラスミドにおいて及び／又はＤＮＡ合成が開始する部位において若しくは近接して結合配列を維持することができる、例えばリンパ増殖性ヘルペスウイルスにおけるＤＮＡ配列である。ＥＢＶの起点は、ＦＲ配列（３０ｂｐ反復の２０個の不完全コピー）、好ましくはＤＳ配列を含むが、ＥＢＶ結合ＥＢＮＡ－１の他の部位、例えばＲｅｐ＊配列を、複製の起点としてＤＳと置き換わることができる（Kirshmaier and Sugden, 1998）。したがって、ＥＢＶの複製起点は、ＦＲ、ＤＳ若しくはＲｅｐ＊配列又は核酸修飾を介した機能的に同等の任意の配列若しくはそれから誘導される合成の組み合わせを含む。例えば、本発明は、Lindner, et. al, 2008において特定的に記載されているように、個別のエレメントの挿入又は突然変異のようなＥＢＶの遺伝子操作された複製起点を使用することもできる。

【００５６】

用語「対応する」は、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の全て若しくは一部と相同性である（すなわち、同一であり、進化的に厳密に関連していない）こと又はポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために本明細書において使用される。対照的に、用語「相補的」は、相補配列が参照ポリヌクレオチド配列の全て又は一部と相同性であることを意味するために本明細書において使用される。例示として、核酸配列「ＴＡＴＡＣ」は参照配列「ＴＡＴＡＣ」に対応し、参照配列「ＧＴＡＴＡ」と相補的である。

【００５７】

特定のタンパク質を「コードする」「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「フラグメント」又は「導入遺伝子」は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、インビトロ又はインビボにおいて、遺伝子産物、例えばポリペプチドに転写され、また場合により翻訳される核酸分子である。コード領域は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ又はＲＮＡ形態のいずれかに存在することができる。ＤＮＡ形態で現れる場合、核酸分子は一本鎖（すなわち、センス鎖）又は二本鎖でありうる。コード領域の境界は、５’（アミノ）末端の開始コドン及び３’（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンにより決定される。遺伝子は、原核又は真核ｍＲＮＡからのｃＤＮＡ、原核又は真核ＤＮＡからのゲノムＤＮＡ配列及び合成ＤＮＡ配列を含むことができるが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、遺伝子配列の３’に位置している。

【００５８】

用語「制御エレメント」は、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製の起点、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、エンハンサー、スプライス接合部位などを集合的に意味し、これらは受容細胞においてコード配列の複製、転写、転写後プロセシング及び翻訳を集合的に提供する。選択されたコード配列が適切な宿主細胞において複製、転写及び翻訳されうる限り、これらの制御エレメントが全て存在する必要はない。

【００５９】

用語「プロモーター」は、ＤＮＡ調節配列を含むヌクレオチド領域を意味するために本明細書において通常の意味で使用され、ここで調節配列は、ＲＮＡポリメラーゼを結合すること及び下流（３’方向）コード配列の転写を開始することができる遺伝子から誘導される。

【００６０】

「エンハンサー」とは、プロモーターの近位の位置にあるとき、エンハンサードメインが不在のプロモーターから得る転写活性よりも増加した転写活性を付与する核酸配列を意味する。

【００６１】

核酸分子を参照して「機能的に結合する」とは、２つ以上の核酸分子（例えば、転写される核酸分子、プロモーター及びエンハンサーエレメント）が、核酸分子の転写を可能にするように連結していることを意味する。ペプチド及び／又はポリペプチド分子を参照して「機能的に結合する」とは、２つ以上のペプチド及び／又はポリペプチド分子が、単一のポリペプチド鎖、すなわち融合物の各ペプチド及び／又はポリペプチド成分の少なくとも１つの性質を有する融合ポリペプチドを生じるように連結していることを意味する。融合ポリペプチドは、好ましくはキメラであり、すなわち異種分子から構成される。

【００６２】

「相同性」は、２つのポリヌクレオチド又は２つのポリペプチドの間の同一性の率を意味する。１つの配列と別の配列との一致は、当該技術に既知の技術により決定することができる。例えば、相同性は、配列情報を整列し、容易に利用可能なコンピュータープログラムを使用して、２つのポリペプチド分子の間の配列情報を直接比較することによって決定することができる。あるいは、相同性は、相同性領域の間に安定した二重鎖の形成を促進する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続く一本鎖特異的ヌクレアーゼによる消化及び消化フラグメントのサイズ決定によって決定することができる。２つのＤＮＡ又は２つのポリペプチドの配列は、少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、最も好ましくは少なくとも約９５％のヌクレオチド又はアミノ酸が、上記の方法を使用して決定された分子の確定された長さにわたって、それぞれマッチしている場合に、「実質的に相同性」である。

【００６３】

用語「細胞」は、当該技術において最も広義の意味で本明細書に使用され、多細胞生物の組織の構造単位である、外側から隔離する膜構造により囲まれている、自己複製の能力を有する、並びに遺伝子情報及びそれの発現する機構を有する生体を意味する。本明細書において使用される細胞は、天然に生じる細胞又は人工的に修飾された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子修飾細胞など）でありうる。

【００６４】

本明細書で使用されるとき、用語「幹細胞」は、少なくとも１種類のより特殊化された細胞を生じることができる細胞を意味する。幹細胞は、自己再生する能力、すなわち未分化状態を維持しながら多数の細胞分化周期を通過する能力を有し、特殊化された細胞型に分化する可能性、すなわち能力を有する。典型的には、幹細胞は、損傷組織を再生することができる。本明細書における幹細胞は、胚幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹細胞又は組織幹細胞（組織特異的幹細胞又は体幹細胞とも呼ばれる）でありうるが、これらに限定されない。上記に記載された能力を有する任意の人工的に産生された細胞（例えば、本明細書において使用される融合細胞、再プログラム細胞など）は、幹細胞でありうる。

【００６５】

「胚幹（ＥＳ）細胞」は、初期胚から誘導される多能性幹細胞である。ＥＳ細胞は１９８１年に最初に確立され、これは１９８９年からノックアウトマウスの製造にも適用されてきた。１９９８年には、ヒトＥＳ細胞が確立され、これは再生医療のために現在入手可能になりつつある。

【００６６】

ＥＳ細胞と異なり、組織幹細胞は、限定された分化可能性を有する。組織幹細胞は、組織の特定の位置に存在し、未分化細胞内構造を有する。したがって、組織幹細胞の多能性は典型的に低い。組織幹細胞は、より高い核／細胞質比を有し、細胞内オルガネラをほとんど有さない。大部分の組織幹細胞は、低い多能性、長い細胞周期及び固体の生命を越える繁殖能力を有する。組織幹細胞は、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などのような、細胞が誘導される部位に基づいて部類に分けられる。皮膚系の組織幹細胞には、表皮幹細

胞、毛包幹細胞などが含まれる。消化器系の組織幹細胞には、膵臓（共通）幹細胞、肝臓幹細胞などが含まれる。骨髄系の組織幹細胞には、造血幹細胞、間葉幹細胞などが含まれる。神経系の組織幹細胞には、神経幹細胞、網膜幹細胞などが含まれる。

【００６７】

「誘導多能性幹細胞」は、ｉＰＳ細胞又はｉＰＳＣと一般的に略され、再プログラミング因子と呼ばれる特定の遺伝子を挿入することにより、非多能性細胞、典型的には成体体細胞から又は線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、神経細胞、表皮細胞などのような最終的に分化した細胞から人工的に調製される種類の多能性幹細胞を意味する。

【００６８】

「多能性」は、１つ以上の組織若しくは器官を構成する全ての細胞又は好ましくは３つの胚葉：内胚葉（胃の内壁、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、必尿生殖器）若しくは外胚葉（表皮組織及び神経系）のいずれかに分化する可能性を有する幹細胞を意味する。本明細書において使用される「多能性幹細胞」は、３つの胚葉のいずれかから誘導される細胞、例えば全能性細胞又は誘導多能性細胞の直接の子孫に分化しうる細胞を意味する。

【００６９】

本明細書で使用されるとき、「全能性幹細胞」は、卵と精子細胞の融合から産生される細胞のような、生物体を構成する全ての細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。受精卵の最初の幾つかの分裂により産生される細胞も、全能性である。これらの細胞は、分化して胚細胞型及び胚外細胞型になることができる。多能性幹細胞は、あらゆる胎児又は成体細胞型を生じることができる。しかし、単独では、これらは胎児又は成体の動物に発育することはできず、それはこれらが胎盤のような胚外組織に寄与する可能性を欠いているからである。

【００７０】

対照的に、多くの前駆細胞は多分化能幹細胞であり、すなわち、これらは限られた数の細胞運命に分化することができる。多分化能前駆細胞は、幾つかの他の種類の細胞を生じることができるが、これらの種類は数が限られている。多分化能幹細胞の例は、造血細胞（幾つかの種類の血球に発育することができるが、脳細胞又は他の種類の細胞に発育することができない血液幹細胞）である。胚を形成する長い一連の細胞分裂の終了時には、最終的に分化した細胞又は特定の機能に永久的に関連づけられたと考慮される細胞となる。

【００７１】

本明細書で使用されるとき、用語「体細胞」は、そのＤＮＡを次世代に直接伝達しない、卵、精子などの生殖細胞以外の任意の細胞を意味する。典型的には、体細胞は限定された多能性を有する又は多能性を有さない。本明細書において使用される体細胞は、天然に生じうる又は遺伝子修飾されうる。

【００７２】

細胞は、本明細書で使用されるとき、１０％未満の望ましくない細胞型を有する場合、特定の望ましくない細胞型を「実質的に含有しない」、１％未満の望ましくない細胞型を有する場合、特定の望ましくない細胞型を「本質的に含有しない」。しかし、さらにより望ましいものは、細胞個体群全体の０．５％未満又は０．１％未満が望ましくない細胞型を含む細胞個体群である。したがって、個体群の０．１％～１％未満（中間の率を含む）の細胞が望ましくない細胞型を含む細胞個体群は、これらの細胞型を本質的に含まない。培地は、本明細書で使用されるとき、特定の試薬を、そのような作用物質の外部添加がない場合に「本質的に含有しない」。より好ましくは、これらの作用物質は、不在であるか又は検知されない量で存在する。

【００７３】

ＩＩ．内皮細胞プログラミングに関与する細胞

本発明の特定の実施態様において、内皮細胞ではない細胞のフォワードプログラミングにより内皮細胞をもたらす方法及び組成物が開示される。１つ以上の内皮プログラミング因子遺伝子を含む外因性カセット及び／又は内皮細胞同定に特異的なレポーター発現カセ

ットを含む細胞を提供することもできる。幾つかの実施態様において、細胞は、胚幹細胞、胎児幹細胞又は成体幹細胞を含む幹細胞でありうるが、これらに限定されない。更なる実施態様において、細胞は任意の体細胞でありうる。

【００７４】

Ｂ．幹細胞

幹細胞は、全てでなければ大部分の多細胞生物において見出される。これらは、有糸細胞分裂を介してそれら自体を再生する能力により及び多様な範囲の特殊化細胞型に分化する能力によって特徴付けられる。２つの主な種類の哺乳類幹細胞は、胚盤胞において見出される胚幹細胞と成体組織において見出される成体幹細胞である。発育中の胚において、幹細胞は全ての特殊化された胚組織に分化することができる。成体の生物において、幹細胞及び前駆細胞は、特殊化細胞を補充することにより身体の修復系として作用し、また、血液、皮膚又は腸管組織のような再生器官の通常の代謝回転を維持する。

【００７５】

ヒト胚幹細胞（ＥＳＣ）及び誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、内皮細胞を含む身体の全ての細胞型に分化する可能性を保持しながら、インビトロで長期間繁殖することができる。したがって、これらの細胞は、薬剤開発及び治療用途の両方において患者特異的機能性内皮細胞の無制限の供給を提供する可能性がありうる。ヒトＥＳＣ又はｉＰＳＣのインビトロにおける内皮細胞への分化は、通常のインビボ発育を反復し、すなわち、中胚葉分化及び血液新生特異化を含む通常の連続的な発育段階を経る（図１）。この連続的な発育プロセスは、分化の異なる段階で異なる増殖因子の添加を必要とする。本発明の特定の態様は、通常の発育段階の全てでなければ大部分を迂回して、ｉＰＳＣの生成と同様に、内皮細胞分化／機能に重要な転写因子の組み合わせの発現を介して、ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣからフォワードプログラミングにより完全な機能性内皮細胞を提供する。この手法は、時間効率及び費用効率がより高くなることができ、ヒト一次成体内皮細胞と同一でなければ高度に類似した機能を有する内皮細胞を生じることができる。加えて、ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣは、これらの無制限の繁殖と共に、内皮細胞分化の出発細胞個体群として、体細胞と比べて特有の利点を有する。

【００７６】

２．胚幹細胞

胚幹細胞系統（ＥＳ細胞系統）は、胚盤胞又は初期桑実期胚の内部細胞塊（ＩＣＭ）の原外胚葉組織から誘導される細胞の培養である。胚盤胞は、初期段階の胚（ヒトではおよそ４～５日齢）であり、５０～１５０個の細胞からなる。ＥＳ細胞は、多能性であり、３つの一次胚葉：外胚葉、内胚葉及び中胚葉の全ての誘導体への発育の際に生じる。換言すると、特定の細胞型のために十分で必要な刺激を与えると、２００個を越える成体の細胞型のそれぞれに発育することができる。これらは、胚体外膜又は胎盤に寄与しない。

【００７７】

ほぼ全ての研究は、現在まで、マウス胚幹細胞（ｍＥＳ）又はヒト胚幹細胞（ｈＥＳ）を使用して実施されてきた。両方とも必須の幹細胞の特徴を有するが、これらは、分化状態を維持するために非常に異なる環境を必要とする。マウスＥＳ細胞は、ゼラチン層に増殖させることができ、白血病抑制因子（ＬＩＦ）の存在を必要とする場合がある。ヒトＥＳ細胞は、マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）の支持細胞層に増殖させることができ、多くの場合、塩基性線維芽細胞増殖因子胃（ｂＦＧＦ又はＦＧＦ－２）の存在を必要とする可能性がある。最適な培養条件又は遺伝子操作（Chambers et al., 2003）なしでは、胚幹細胞は急速に分化する。

【００７８】

ヒト胚幹細胞は、幾つかの転写因子及び細胞表面タンパク質の存在により定義することもできる。転写因子Ｏｃｔ－４、Ｎａｎｏｇ及びＳｏｘ－２は、分化及び多能性の維持をもたらす遺伝子の抑制を確実にする主要な調節ネットワークを形成する（Boyer et al, 2005）ｈＥＳの同定に最も一般的に使用される細胞表面抗原には、糖脂質ＳＳＥＡ３及びＳＳＥＡ４、並びにケラタン表面抗原Ｔｒａ－１－６０及びＴｒａ－１－８１が含まれ

る。

【００７９】

マウスＥＳ細胞の得る方法は良く知られている。一つの方法において、マウスの１２９株からの着床前胚盤胞を、マウス抗血清で処理して、栄養外胚葉を除去し、内部細胞塊を、ウシ胎児血清を含有する培地において化学的に不活性化したマウス胚線維芽細胞の支持細胞層で培養する。発育した未分化ＥＳ細胞のコロニーを、ウシ胎児血清の存在下、マウス胚線維芽細胞の支持細胞層で継代培養して、ＥＳ細胞の個体群を産生する。幾つかの方法において、マウスＥＳ細胞をサイトカイン白血病抑制因子（ＬＩＦ）の添加により支持細胞層の不在下で増殖させて、血清含有培養培地とすることができる（Smith, 2000）。他の方法では、マウスＥＳ細胞を骨形成タンパク質及びＬＩＦの存在下で血清無含有培地において増殖させることができる（Ying et al, 2003）。

【００８０】

ヒトＥＳ細胞は、以前に記載された方法（Thomson et al, 1995; Thomson et al, 1998; Thomson and Marshall, 1998; Reubinoff et al, 2000）を使用して胎盤胞から得ることができる。一つの方法において、５日目のヒト胎盤胞をウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に曝露し、次に１：５希釈のモルモット補体に曝露して、栄養外胚葉細胞を溶解する。無傷の内部細胞塊から溶解栄養外胚葉細胞を除去した後、内部細胞塊を、ガンマ不活性化マウス胚線維芽細胞の支持細胞層において、ウシ胎児血清の存在下で培養する。９～１５日後、内部細胞塊由来の細胞の凝集塊を、化学的（すなわち、トリプシンへの曝露）又は機械的に解離し、ウシ胎児血清及びマウス胚線維芽細胞の支持細胞層を含有する新たな培地で再び平板培養することができる。更に繁殖すると、未分化形態を有するコロニーをマイクロピペットで選択し、機械的に解離して凝集塊にし、再び平板培養する（米国特許第６，８３３，２６９号を参照すること）。ＥＳ様形態は、明確に高い核対細胞質の比率及び顕著な核小体を有する緻密なコロニーにより特徴付けられる。得られるＥＳ細胞は、短時間のトリプシン処理により又はマイクロピペットでの個別のコロニーの選択により、ルーチン的に継代することができる。幾つかの方法において、ヒトＥＳ細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、線維芽細胞の支持細胞層でＥＳ細胞を培養することにより、血清なしで増殖することができる（Amit et al, 2000）。他の方法では、ヒトＥＳ細胞は、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）のようなタンパク質マトリックス又は塩基線維芽細胞増殖因子を含有する「調整」培地の存在下のラミニンで細胞を培養することにより、支持細胞層なしで増殖することができる（Xu et al, 2001）。培地は、線維芽細胞を同時培養することにより予め調整される。

【００８１】

アカゲザル及びコモンマーモセットのＥＳ細胞を単離する方法も知られている（Thomson, and Marshall, 1998; Thomson et al, 1995; Thomson and Odorico, 2000）。

【００８２】

ＥＳ細胞の別の供給源は、確立されたＥＳ細胞系統である。多様なマウス細胞系統及びヒトＥＳ細胞系統が知られており、これらの増殖及び繁殖の条件は定義されている。例えば、マウスＣＧＲ８細胞系統は、マウス株１２９胚の内部細胞塊から確立され、ＣＧＲ８細胞の培養は、支持細胞層なしのＬＩＦの存在下で増殖することができる。更なる例として、ＥＳ細胞系統Ｈ１、Ｈ７、Ｈ９、Ｈ１３及びＨ１４は、Thompson et alにより確立された。加えて、Ｈ９系統のサブクローンＨ９．１及びＨ９．２が開発されている。例えばYu and Thompson, 2008に記載されているもの（これは参照として本明細書に組み込まれる）のような、当該技術に既知のほぼあらゆるＥＳ又は幹細胞系統を本発明に使用できることが予想される。

【００８３】

本発明に関連して使用されるＥＳ細胞の供給源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊を培養することで誘導される細胞又は確立された細胞系統の培養から得られる細胞でありうる。したがって、本明細書で使用されるとき、用語「ＥＳ細胞」は、胚盤胞の内部細胞塊の細

胞、内部塊細胞の培養から得られるＥＳ細胞及びＥＳ細胞系統の培養から得られるＥＳ細胞を意味することができる。

【００８４】

３．誘導多能性幹細胞

誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞は、ＥＳ細胞の特徴を有するが、分化体細胞の再プログラミングにより得られる細胞である。誘導多能性細胞は、多様な方法により得られてきた。一つの方法では、成人ヒト皮膚線維芽細胞を、レトロウイルス形質導入を使用して転写因子Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、ｃ－Ｍｙｃ及びＫｌｆ４により形質移入する（Takahashi et al, 2007）。形質移入細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）を補充した培地においてＳＮＬ支持細胞（ＬＩＦを産生するマウス細胞線維芽細胞系統）で平板培養する。およそ２５日後、ヒトＥＳ細胞コロニーに類似するコロニーが培養に現れる。ＥＳ細胞様コロニーを取り出し、ｂＦＧＦの存在下の支持細胞で拡大する。

【００８５】

細胞の特徴に基づくと、ＥＳ細胞様コロニーの細胞は、誘導多能性幹細胞である。誘導多能性幹細胞は、ヒトＥＳ細胞と形態的に類似しており、多様なヒトＥＳ細胞マーカーを発現する。また、ヒトＥＳ細胞の分化をもたらすことが知られている条件下で増殖すると、誘導多能性幹細胞はそれに応じて分化する。例えば、誘導多能性幹細胞は、内皮細胞構造及び内皮細胞マーカーを有する細胞に分化することができる。例えばYu and Thompson, 2008に記載されたものを含む、ほぼあらゆるｉＰＳ細胞又は細胞系統を本発明に使用できることが予想される。

【００８６】

別の方法では、ヒト胎児又は新生児線維芽細胞を、レンチウイルス形質導入を使用して４つの遺伝子Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｎａｎｏｇ及びＬｉｎ２８により形質移入する（Yu et al., 2007）。感染の１２～２０日後、ヒトＥＳ細胞形態を有するコロニーが目に見えるようになる。コロニーを取り出し、拡大する。コロニーを構成する誘導多能性幹細胞は、ヒトＥＳ細胞と類似した形態であり、多様なヒトＥＳ細胞マーカーを発現し、マウスに注射した後に神経細胞、軟骨及び腸上皮を有する奇形種を形成する。

【００８７】

マウスから誘導多能性幹細胞を調製する方法も知られている（Takahashi and Yamanaka, 2006）。ｉＰＳ細胞の誘導は、典型的にはＳｏｘファミリーの少なくとも１つのメンバー及びＯｃｔファミリーの少なくとも１つのメンバーの発現又はそれらへの曝露を必要とする。Ｓｏｘ及びＯｃｔは、ＥＳ細胞同一性を特定する転写調節階層の中心であると考えられる。例えば、Ｓｏｘは、Ｓｏｘ－１、Ｓｏｘ－２、Ｓｏｘ－３、Ｓｏｘ－１５又はＳｏｘ－１８でありうる；ＯｃｔはＯｃｔ－４でありうる。Ｎａｎｏｇ、Ｌｉｎ２８、Ｋｌｆ４又はｃ－Ｍｙｃのような追加の因子は、再プログラミング効率を増加することができ、再プログラミング因子の特定のセットは、Ｓｏｘ－２、Ｏｃｔ－４、Ｎａｎｏｇ及び場合によりＬｉｎ－２８を含む又はＳｏｘ－２、Ｏｃｔ４、Ｋｌｆ及び場合によりｃ－Ｍｙｃを含むセットでありうる。

【００８８】

ＥＳ細胞のようなｉＰＳ細胞は、抗体のＳＳＥＡ－１、ＳＳＥＡ－３及びＳＳＥＡ－４（Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda Md.）並びにＴＲＡ－１－６０及びＴＲＡ－１－８１（Andrews et al., 1987）を使用する免疫組織化学又はフローサイトメトリーによって同定又は確認できる特徴的な抗原を有する。胚幹細胞の多能性は、およそ０．５～１０×１０^{6}細胞を８～１２週齢の雄ＳＣＩＤマウスの後肢筋肉に注射することにより確認できる。３つの胚葉のそれぞれの少なくとも１つの細胞型を示す奇形種が発生する。

【００８９】

本発明の特定の態様において、ｉＰＳ細胞は、上記に記載されたＫｌｆ又はＮａｎｏｇと組み合わせたＯｃｔ４及びＳｏｘ２のようなＯｃｔファミリーメンバー及びＳｏｘファ

ミリーメンバーを含む再プログラミング因子を使用して、体細胞を再プログラミングすることにより作製される。再プログラミング用の体細胞は、線維芽細胞、角化細胞、造血細胞、間葉細胞、肝細胞、胃細胞又はβ細胞のような、誘導して多能性にすることができる任意の体細胞でありうる。特定の態様において、Ｔ細胞を再プログラミング用の体細胞の供給源として使用することもできる（参照として本明細書に組み込まれる米国特許出願第６１／１８４，５４６号を参照すること）。

【００９０】

再プログラミング因子を、組み込みベクター又はエピソームベクターのような１つ以上のベクターに含まれる発現カセット、例えばＥＢＶエレメントに基づいた系から発現することができる（参照として本明細書に組み込まれる米国特許出願第６１／０５８，８５８号；Yu et al, 2009を参照すること）。更なる態様において、再プログラミングタンパク質を、タンパク質形質導入により体細胞に直性導入することができる（参照として本明細書に組み込まれる米国特許出願第６１／１７２，０７９号を参照すること）。

【００９１】

４．体細胞核移植により誘導される胚幹細胞

多能性幹細胞を、供与体核が紡錘体無含有卵母細胞に移入される体細胞核移植により調製することができる。核移植により産生される幹細胞は、供与体核と遺伝子的に同一である。一つの方法では、アカゲザルの皮膚線維芽細胞の供与体線維芽細胞核を、紡錘体無含有の成熟した第二分裂中期のアカゲザル卵母細胞の細胞質に電気融合により導入する（Byrne et al, 2007）。融合卵母細胞を、イオノマイシンへの曝露により活性化し、次に胚盤胞段階になるまでインキュベートする。次に、選択された胚盤胞の内部細胞塊を培養して、胚幹細胞系統を産生する。胚幹細胞系統は、通常のＥＳ細胞形態を示し、多様なＥＳ細胞マーカーを発現し、インビトロとインビボの両方で複数の細胞型に分化する。本明細書で使用されるとき、用語「ＥＳ細胞」は、受精核を含有する胚から誘導される胚幹細胞を意味する。ＥＳ細胞は、「体細胞核移植により誘導される胚幹細胞」と呼ばれる、核移植により産生される胚幹細胞と区別される。

【００９２】

５．他の幹細胞

胎児幹細胞は、自己再生能力及び多能性の分化可能性を有する細胞である。これらを、胎児細胞栄養芽層細胞（ヨーロッパ特許第０４１２７００号）から、並びに絨毛膜絨毛、羊水及び胎盤（国際公開第２００３／０４２４０５号）から単離及び拡大することができる。これらの参考文献は、その全体が参考として本明細書に組み込まれる。胎児幹細胞の細胞表面マーカーには、ＣＤ１１７／ｃ－ｋｉｔ$^{+}$、ＳＳＥＡ３$^{+}$、ＳＳＥＡ４$^{+}$及びＳＳＥＡ１$^{-}$が含まれる。

【００９３】

体幹細胞は大部分の器官組織において同定されてきた。最適な特徴決定は、造血幹細胞である。これは、細胞表面マーカー及び機能的特性に基づいて精製された中胚葉由来細胞である。骨髄、血液、臍帯血、胎児肝臓及び卵黄嚢から単離された造血幹細胞は、受容者の寿命にわたって造血を再開する及び複数の造血性系列を生じる前駆細胞である（全てその全体が参照として本明細書に組み込まれる、米国特許第５，６３５，３８７号；同第５，４６０，９６４号；同第５，６７７，１３６号；同第５，７５０，３９７号；同第５，７５９，７９３号；同第５，６８１，５９９号；同第５，７１６，８２７号；Hill et al, 1996を参照すること）。致死的に照射された動物又はヒトに移植された場合、造血幹細胞は、赤血球、好中球マクロファージ、巨核球及びリンパ系造血細胞プールを再生息させることができる。インビトロにおいて造血幹細胞を誘導して、少なくとも幾つかの自己再生細胞分裂を起こすことができ、誘導して、インビボで見られる同じ系列に分化させることができる。したがって、この細胞は幹細胞の基準を満たす。

【００９４】

次善の特徴決定は、間葉幹細胞（ＭＳＣ）であり、初めは胚体中胚葉から誘導され、成体骨髄から単離され、分化して、筋肉、骨、軟骨、脂肪、骨髄間質及び腱を形成すること

ができる。胚形成の際に、中胚葉は、骨、軟骨、脂肪、骨格筋及び可能であれば内皮を生じる組織である肢芽中胚葉に発育する。中胚葉は、内臓中胚葉に分化し、これは心筋、平滑筋又は内皮と造血前駆細胞からなる血島を生じることができる。したがって原始中胚葉又は間葉幹細胞は、多数の細胞及び組織型の供給源を提供することができる。多数の間葉幹細胞が単離されている（例えば、全てその全体が参照として本明細書に組み込まれる、米国特許第５，４８６，３５９号；同第５，８２７，７３５号；同第５，８１１，０９４号、同第５，７３６，３９６号；米国特許第５，８３７，５３９号；同第５，８３７，６７０号；同第５，８２７，７４０号；Jaiswal et al, 1997；Cassiede et al, 1996；Johnstone et al, 1998；Yoo et al, 1998；Gronthos, 1994；Makino et al, 1999を参照すること）。記載されている多くの間葉幹細胞は、全てが、一般に間葉由来であると考慮される分化細胞のみを形成する限定された分化を示している。現在まで、大部分の多分化能間葉幹細胞は、ＳＨ２$^{+}$ ＳＨ４$^{+}$ ＣＤ２９$^{+}$ ＣＤ４４$^{+}$ ＣＤ７１$^{+}$ ＣＤ９０$^{+}$ ＣＤ１０６$^{+}$ ＣＤ１２０ａ$^{+}$ ＣＤ１２４$^{+}$ ＣＤ１４$^{-}$ ＣＤ３４$^{-}$ ＣＤ４５$^{-}$表現型を発現する。

【００９５】

卵形細胞とも呼ばれる、胃腸幹細胞、表皮幹細胞、神経及び肝幹細胞を含む他の幹細胞が同定されている（Potten, 1998; Watt, 1997; Alison et al, 1998）。

【００９６】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されている方法に有用な幹細胞には、胚幹細胞、誘導多能性肝細胞、間葉幹細胞、骨髄由来幹細胞、造血幹細胞、軟骨細胞前駆細胞、表皮幹細胞、胃腸幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞、脂肪由来間葉幹細胞、膵臓前駆細胞、毛包幹細胞、内皮前駆細胞及び平滑筋前駆細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【００９７】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されている方法に有用な幹細胞を、臍帯、胎盤、羊水、絨毛膜絨毛、胚盤胞、骨髄、脂肪組織、脳、末梢血、胃腸管、臍帯血、血管、骨格筋、皮膚、肝臓及び月経血から単離される。月経血から調製される幹細胞は、子宮内膜再生細胞（Medistem, Inc.から入手可能）と呼ばれる。

【００９８】

当業者は、そのような幹細胞を見つけ、単離し、拡大することができる。多様な供給源からヒト幹細胞を単離する詳細な手順は、Current Protocols in Stem Cell Biology (2007)に記載されており、これはその全体が参照として本明細書に組み込まれる。あるいは、市販のキット及び単離系を使用することができ、例えば、ＢＤバイオサイエンス社のＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ細胞選別系、ＢＤ ＩＭａｇ磁気式細胞分離系及びＢＤ ＩＭａｇマウス造血前駆細胞豊富化セットである。多様な供給源から幹細胞を単離し、培養する方法も、５，４８６，３５９、６，９９１，８９７、７，０１５，０３７、７，４２２，７３６、７，４１０，７９８、７，４１０，７７３、７，３９９，６３２（これらはその全体が参照として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００９９】

Ｃ．体細胞

本発明の特定の態様において、分化転換、すなわち１つの体細胞型から別の体細胞型への直接変換の方法、例えば他の体細胞から内皮細胞を誘導する方法を提供することもできる。しかし、ヒト体細胞は、供給、特に成体臓器提供者からの供給が限定されうる。特定の態様において、プログラミング用の出発細胞の無制限の供給を提供するために、体細胞を、ｈＴＥＲＴ又は腫瘍遺伝子のような不死化遺伝子又はタンパク質の導入により不死化することができる。細胞の不死化は、可逆的（例えば、除去可能発現カセットの使用）又は誘導性（例えば、誘導性プロモーターの使用）でありうる。

【０１００】

本発明の特定の態様における体細胞は、動物から新たに単離されたもののような一次細胞（非不死化細胞）でありうる又は細胞系統（不死化細胞）から誘導されうる。細胞を、被験者からの単離の後に細胞培養で維持することができる。特定の実施態様において、細

胞は、本発明の方法に使用される前に１回又は２回以上（例えば、２～５回、５～１０回、１０～２０回、２０～５０回、５０～１００回又はそれ以上）継体される。幾つかの実施態様において、細胞は、本発明の方法に使用される前に１、２、５、１０、２０又は５０回以下継体される。これらを凍結、解凍することなどができる。

【０１０１】

本明細書に使用される又は記載される体細胞は、天然体細胞又は操作体細胞、すなわち遺伝子的に変更された体細胞でありうる。本発明の体細胞は、典型的には例えばヒト細胞、霊長類細胞又はマウス細胞のような哺乳類の細胞である。これらは周知の方法により得ることができ、生体体細胞を含有する任意の器官又は組織、例えば血液、骨髄、皮膚、肺、膵臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、尿道及び他の必尿器官などから得ることができる。

【０１０２】

本発明に有用な哺乳類体細胞には、セトリ細胞、内皮細胞、顆粒膜細胞、神経細胞、膵島細胞、表皮細胞、上皮細胞、肝細胞、毛包細胞、角化細胞、造血細胞、メラニン形成細胞、軟骨細胞、リンパ球（Ｂ及びＴリンパ球）、赤血球、マクロファージ、単球、単核球、心筋細胞及び他の筋細胞などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１０３】

幾つかの実施態様において、細胞は、唯一又は主に所望の細胞型において発現することが知られている内在性マーカーの発現に基づいて選択される。例えば、ビメンチンは線維芽細胞マーカーである。他の有用なマーカーには、多様なケラチン、カドヘリン、フィブロネクチン、ＤＣ分子などの細胞接着分子が含まれる。体細胞の個体群は、１８～９６時間、例えば２４～４８時間、４８～７２時間などの平均細胞周期時間を有することができる。幾つかの実施態様において、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％又はそれ以上の細胞が、２４、４８、７２又は９６時間のような所定の時間内に分裂することが予測される。

【０１０４】

本明細書に記載される方法を使用して、１つ以上の体細胞、例えば体細胞のコロニー又は個体群をプログラムして内皮細胞にすることができる。幾つかの実施態様において、本発明の細胞の個体群は、少なくとも９０％の細胞が目的の表現型又は特徴を示す点において実質的に均一である。幾つかの実施態様において、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．８％、９９．９、９９．９５％又はそれ以上の細胞が、目的の表現型又は特徴を示す。本発明の特定の実施態様において、体細胞は、分裂する能力を有する、すなわち体細胞は、有糸分裂後のものではない。

【０１０５】

体細胞は、部分的又は完全に分化されうる。分化は、特異化が乏しい細胞がより特異化された細胞型になるプロセスである。細胞分化は、細胞のサイズ、形状、極性、代謝活性、遺伝子発現及び／又はシグナルへの反応性における変化を伴うことができる。例えば、造血幹細胞は分化して、骨髄性（単球及びマクロファージ、好中球、好塩素球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）及びリンパ様系列（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）を含む全ての血球型を生じる。分化の経路に沿った進行の間に、細胞の最終的な運命がより固定化される。本明細書に記載されるように、部分的に分化された体細胞と完全に分化された体細胞の両方を本明細書に記載されているようにプログラムして、内皮細胞のような所望の細胞型を産生することができる。

【０１０６】

ＩＩＩ．内皮プログラミング因子

本発明の特定の態様は、内皮プログラミングのための内皮プログラミング因子を提供する。内皮細胞は、細胞における内皮プログラミング因子のレベルを増加することにより他の細胞供給源から直接産生することができる。内皮細胞の多数の機能を、限定された数の内皮豊富化転写因子の共同作用により転写レベルで制御することができる。内皮細胞豊富化転写因子、特にこのセクションに提示されているそれらの遺伝子のような、内皮細胞分

化又は機能に重要な任意の転写因子を本明細書において使用することができる。本発明者たちは、このセクションに提示されている遺伝子の全てのアイソフォーム及び変種が本発明に含まれ、特定のアイソフォーム又は変種の受入番号の限定例が提供されることも考慮する。

【０１０７】

例えば、本発明に開示されている転写因子の組み合わせの発現を実施することにより、多能性幹細胞から内皮細胞への分化は、通常の発育段階の全てでなければ大部分を迂回することができる。

【０１０８】

特定の実施態様において、内皮プログラミング因子はＥＲＧであり、これは、転写調節因子ＥＲＧ、ｅｔｓ関連形質転換タンパク質ＥＲＧ、前立腺癌特異的ＴＭＰＲＳＳ２－ＥＲＧ、腫瘍遺伝子様ｖ－ｅｔｓ赤芽球症ウイルスＥ２６、腫瘍遺伝子関連ｖ－ｅｔｓ鳥類赤芽球症ウイルスＥ２６、形質転換タンパク質ＥＲＧとしても知られている。幾つかの実施態様において、内皮プログラミング因子は、ＥＲＧ－１（受入番号：ＮＭ１８２９１８．３；ＧＬ２０９９５４７９８）（配列番号１３及び１４）、ＥＲＧ－２（配列番号９及び１０）、ＥＲＧアイソフォーム３（配列番号１１及び１２）又はＥＲＧ－４（受入番号：ＮＭ＿００１１３６１５５．１；ＧＬ２０９９５４８０７）（配列番号１５及び１６）のようなＥＲＧのアイソフォームでありうる。特定の実施態様において、内皮プログラミング因子遺伝子はＥＲＧ－３である。他の特定の実施態様において、内皮プログラミング因子はＥＴＶ２（ＥＲ７１、ＥＴＳＲＰ７１とも呼ばれる）（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿０１４２０９、バージョンＮＭ＿０１４２０９．２、ＧＩ：１５３７９１１７７）（配列番号１７及び１８）である。

【０１０９】

他の実施態様において、１つ以上の内皮プログラミング因子は、ｖ－ｅｔｓ赤血球症ウイルスＥ２６腫瘍遺伝子相同体１（鳥類）（ＥＴＳ１）アイソフォーム１（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１１４３８２０、バージョンＮＭ＿００１１４３８２０．１、ＧＩ：２１９６８９１１７）、ＥＴＳ１アイソフォーム３（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１１６２４２２、バージョンＮＭ＿００１１６２４２２．１、ＧＩ：２４１６６６４４５）、ＥＴＳ１アイソフォーム２（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００５２３８、バージョンＮＭ＿００５２３８．３、ＧＩ：２１９６８９１１６）、Ｖ－ｅｔｓ赤血球症ウイルスＥ２６腫瘍遺伝子相同体２（鳥類）（ＥＴＳ２）（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００５２３９、バージョンＮＭ＿００５２３９．４、ＧＩ：５６１１９１７１）、Ｅ７４様因子１（ＥＬＦ－１）アイソフォームｂ（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１１４５３５３、バージョンＮＭ＿００１１４５３５３．１、ＧＩ：２２３９４１９２８）、ＥＬＦ－１アイソフォームａ（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭＪ７２３７３、バージョンＮＭ＿１７２３７３．３、ＧＩ：２２３９４１９３１）、ＥＬＫ－４アイソフォームａ（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１９７３、バージョンＮＭ＿００１９７３．２、ＧＩ：４１８７２４４７）、ＥＬＫ－４アイソフォームｂ（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿０２１７９５、バージョンＮＭ＿０２１７９５．２、ＧＩ：４１８７２４６１）、フレンド白血病ウイルス組み込み１（ＦＬＩ－１）アイソフォーム２（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１１６７６８１、バージョンＮＭ＿００１１６７６８１．１、ＧＩ：２６４６８１５５３）、ＦＬＩ－１アイソフォーム１（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００２０１７、バージョンＮＭ＿００２０１７．３、ＧＩ：１９４０１８４６０）、ＥＴＶ６（ＴＥＬ若しくはＴＥＬ１とも呼ばれる）（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１９８７、バージョンＮＭ＿００１９８７．４、ＧＩ：１５３２６７４５８）、Ｔ細胞急性リンパ性白血病１（ＴＡＬＩ、またＳＣＬとも呼ばれる）（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００３１８９、バージョンＮＭ＿００３１８９．２、ＧＩ：１９７９２７２７９）、ＧＡＴＡ結合タンパク質２（ＧＡＴＡ２）アイソフォーム１変種１（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿００１１４５６６１、バージョンＮＭ＿００１１４５６６１．１、ＧＩ：２２４６１１６９８）、ＧＡＴＡ２アイソフォーム１変種２（ＮＣＢＩ受入番号ＮＭ＿０３２６３８、バージョンＮＭ＿０３２６３８．４、ＧＩ：２２４６１１６９７）、ＧＡＴＡ２アイソフォーム２（ＮＣＢ

Ｉ受入番号ＮＭ＿００１１４５６６２、バージョンＮＭ＿００１１４５６６２．１、ＧＩ：２２４６１１７００）又はフォークヘッド（ＦＯＸ）転写因子（例えば、ＦｏｘＣ、ＦｏｘＦ、ＦｏｘＨ若しくはＦｏｘＯファミリーのメンバー）である。全ての受入番号、バージョン番号及びＧＩ番号は、２０１０年７月７日付けで参照として本明細書に組み込まれる。

【０１１０】

なお他の実施態様において、１つ以上の内皮プログラミング因子はＢＭＰ－４であり、これは造血前駆細胞の繁殖及び分化の可能性の調節に重要である（Bhardwaj et al, 2001; Bhatia et al, 1999; Chadwick 2003）。加えて、ＢＭＰ－４は、ヒト胎児、新生児及び成人造血前駆細胞の初期造血細胞発育を調節することができる（Davidson and Zon, 2000; Huber et al, 1998; Marshall et al, 2000）。例えば、ＢＭＰ－４は、成人及び新生児供給源からの高度に精製した原始ヒト造血細胞の繁殖及び分化を調節することができ（Bhatia et al, 1999）、ＢＭＰ－４は、ヒト胚幹細胞に造血性分化を促進することができる（Chadwick, 2003）。ＢＭＰ－４は、内皮前駆細胞から内皮細胞への分化を促進することもできる（Wang et al, 2007）。

【０１１１】

更なる実施態様において、１つ以上の内皮プログラミング因子は血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）であり、これは、胚循環系の形成及び血管新生に関与する重要なシグナル伝達タンパク質である。ＶＥＧＦは、血管内皮及び他の細胞型（例えば、神経細胞、癌細胞、腎臓上皮細胞）を含む多様な細胞型に影響を与えることができる。インビトロでは、ＶＥＧＦは、内皮細胞有糸分裂生起及び細胞移動を刺激することができる。ＶＥＧＦ機能は、癌、糖尿病、自己免疫性疾患及び眼血管疾患を含む多様な疾患状態において重要であることも示されている。

【０１１２】

さらに更なる実施態様において、１つ以上の内皮プログラミング因子は、Ｖｅｚｆ１／ＤＢ１、内皮ＰＡＳドメイン含有タンパク質１（ＥＰＡＳ１）、ＦＯＸＯ３ａ、低酸素誘導性転写因子２、ＦｏｘＦ１、ＦｏｘＨ１、ＦｏｘＣ１、ＦｏｘＣ２、クルッペル様因子２又はクルッペル様因子６でありうる。

【０１１３】

内皮細胞をもたらすフォワードプログラミングは、このセクションに記載されている１つ以上の内皮細胞因子のいずれかの発現を増加することにより達成することができる。

【０１１４】

ＩＶ．遺伝子又は遺伝子産物の送達

特定の実施態様において、内皮プログラミング又は分化因子をコードする核酸の送達用ベクターを構築して、細胞においてこれらの因子を発現させることができる。そのようなベクターの成分及び送達方法の詳細が以下に開示される。加えて、タンパク質形質導入組成物又は方法を使用して、内皮プログラミング因子の発現を実施することができる。

【０１１５】

更なる態様において、以下の系及び方法を、内皮細胞のような所望の細胞型の同定のためのレポーター発現カセットの送達に使用することもできる。特に、内皮細胞特異的調節エレメントを使用して、レポーター遺伝子の発現を駆動することができる。したがって、プログラミングにより誘導される内皮細胞を、レポーターの使用により特徴決定、選択又は豊富化することができる。

【０１１６】

Ｂ．核酸送達系

当業者は、標準的組み換え技術（例えば、両方とも参照として本明細書に組み込まれるSambrook et al., 2001及びAusubel et al., 1996を参照すること）を介してベクターを構築するのに十分な知識を備えている。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス及び植物ウイルス）並びに人工染色体（例は、ＹＡＣ）、例えばレトロウイルスベクター（例は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ

ｏＭＬＶ）、ＭＳＣＶ、ＳＦＦＶ、ＭＰＳＶ、ＳＮＶなどから誘導されるもの）、レンチウイルスベクター（例は、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ＢＩＶ、ＦＩＶなどから誘導されるもの）、複製可能性形態、複製欠損性形態及び無活力形態（gutless form）のものを含むアデノウイルス（Ａｄ）ベクター、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、サルウイルス４０（ＳＶ－４０）ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクチニアウイルスベクター、ハーベイマウス肉腫ウイルスベクター、ネズミ乳癌ウイルスベクター、ラウス肉腫ウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

【０１１７】

２．ウイルスベクター

組み換えウイルスベクターの生成において、非必須遺伝子は、異種（又は非天然）タンパク質の遺伝子又はコード配列と交換される。ウイルスベクターは、ウイルス配列を利用して核酸、可能であればタンパク質を細胞に導入する一種の発現作成物である。特定のウイルスの、レセプター仲介エンドサイトーシスを介して細胞を感染する又は細胞に侵入する能力、並びに宿主細胞ゲノムに組み込み、ウイルス遺伝子を安定的及び効率的に発現する能力は、これらを、外来核酸を細胞（例えば、哺乳類細胞）に移入する魅力的な候補にする。本発明の特定の態様の核酸の送達に使用することができるウイルスベクターの非限定例を下記に記載する。

【０１１８】

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込む能力、多量の外来遺伝子材料を移入する能力、広範囲の種及び細胞型を感染する能力、並びに特別な細胞系統にパッケージされる能力によって、遺伝子送達ベクターとして有望である（Miller, 1992）。

【０１１９】

レトロウイルスベクターを構築するために、複製欠損性であるウイルスを産生するために、特定のウイルス配列の代わりに核酸をウイルスゲノムに挿入する。ビリオンを産生するために、ｇａｇ、ｐｏｌ及びｅｎｖ遺伝子を含有するが、ＬＲＴ及びパッケージング成分のないパッケージング細胞系統を構築する（Mann et al, 1983）。ｃＤＮＡをレトロウイルスＬＴＲ及びパッケージング配列と一緒に含有する組み換えプラスミドを、特別な細胞系統に（例えば、リン酸カルシウム沈殿により）導入する場合、パッケージング配列は、組み換えプラスミドのＲＮＡ転写を可能にして、ウイルス粒子にパッケージさせ、次にこれは培養培地に分泌される（Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al, 1983）。次に組み換えレトロウイルスを含有する培地を収集し、場合により濃縮し、遺伝子移入に使用する。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞型を感染することができる。しかし、組み込み及び安定した発現は、宿主細胞の分裂を必要とする（Paskind et al, 1975）。

【０１２０】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、一般的なレトロウイルス遺伝子ｇａｇ、ｐｏｌ及びｅｎｖに加えて、調節的又は構造的機能を有する他の遺伝子を含有する。レンチウイルスベクターは当該技術において良く知られている（例えば、Naldini et al, 1996; Zufferey et al, 1997; Blomer et al, 1997;米国特許第６，０１３，５１６号及び同第５，９９４，１３６号を参照すること）。

【０１２１】

組み換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞を感染することができ、インビボとエキソビボの両方の遺伝子移入及び核酸配列の発現に使用することができる。非分裂細胞を感染することができる組み換えレンチウイルス（適切な宿主細胞が、パッケージング機能を担持する、すなわちｇａｇ、ｐｏｌ及びｅｎｖ、並びにｒｅｖ及びｔａｔを担持する２つ以上のベクターで形質移入される）は、米国特許第５，９９４，１３６号（参照として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１２２】

３．エピソームベクター

プラスミドに基づいた又はリポソームに基づいた染色体外（すなわち、エピソーム）ベクターの使用も、本発明の特定の態様において提供される。そのようなエピソームベクターは、例えばｏｒｉＰに基づいたベクター及び／又はＥＢＮＡ－１の誘導体をコードしているベクターを含むことができる。これらのベクターは、ＤＮＡの大型フラグメントを、細胞に導入する、染色体外に維持する、細胞周期１回あたり１回複製する、娘細胞に効率的に分割する及び免疫反応を実質的に誘発しないことを可能にすることができる。

【０１２３】

特に、ｏｒｉＰに基づいた発現ベクターの複製を必要とする唯一のウイルスタンパク質であるＥＢＮＡ－１は、ＭＨＣクラスＩ分子に対して抗原を提示するのに必要なプロセッシングを迂回する効率的な機構を発達させたので、細胞免疫反応を誘発しない（Levitskaya et al, 1997）。更に、ＥＢＮＡ－１はトランスに作用してクローン遺伝子の発現を増強し、一部の細胞系統ではクローン遺伝子の発現を１００倍まで誘導することができる（Langle-Rouault et al., 1998; Evans et al., 1997）。最後に、そのようなｏｒｉＰに基づいた発現ベクターの製造は安価である。

【０１２４】

他の染色体外ベクターには、他のリンパ増殖性ヘルペスウイルスに基づいたベクターが含まれる。リンパ増殖性ヘルペスウイルスは、リンパ芽球（例えば、ヒトＢリンパ芽球）において複製し、天然の生活環の一部においてプラスミドになるヘルペスウイルスである。単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）は、「リンパ増殖性」ヘルペスウイルスではない。例示的なリンパ増殖性ヘルペスウイルスには、ＥＢＶ、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（ＫＳＨＶ）、サイリミヘルペスウイルス（ＨＳ）及びマレック病ウイルス（ＭＤＶ）が含まれるが、これらに限定されない。酵母ＡＲＳ、アデノウイルス、ＳＶ４０又はＢＰＶのような、エピソームに基づいたベクターの他の供給源も考慮される。

【０１２５】

当業者は、標準的組み換え技術（例えば、両方とも参照として本明細書に組み込まれるManiatis et al., 1988及びAusubel et al., 1994を参照すること）を介してベクターを構築するのに十分な知識を備えている。

【０１２６】

ベクターは、遺伝子送達及び／又は遺伝子発現を更に調節する、そうでなければ標的細胞に利益特性を提供する他の成分又は機能性を含むこともできる。そのような他の成分には、例えば、細胞への結合又は標的化に影響を及ぼす成分（細胞型又は細胞特異的結合を仲介する成分を含む）；細胞によるベクター核酸の取り込みに影響を与える成分；取り込み後の細胞内でのポリヌクレオチドの局在化に影響を及ぼす成分（例えば、核酸局在化を仲介する作用物質）；及びポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす成分が含まれる。

【０１２７】

そのような成分は、取り込まれてベクターにより送達された核酸を発現する細胞の検出又は選択に使用することができる、検出及び／又は選択マーカーのようなマーカーを含むこともできる。そのような成分を、ベクターの天然の特徴として提供することができる（例えば、結合及び取り込みを仲介する成分又は機能性を有する特定のウイルスベクターの使用）又はベクターを修飾してそのような機能性を提供することができる。多種多様なそのようなベクターが当該技術において知られており、一般に入手可能である。ベクターが宿主細胞において維持される場合、ベクターは、宿主細胞のゲノム内に組み込まれた自律性構造物として有糸分裂の際に細胞により安定して複製されうる又は宿主の細胞の核若しくは細胞質に維持されうる。

【０１２８】

４．トランスポゾンに基づいた系

特定の実施態様によると、核酸の導入はトランスポゾン－トランスポサーゼ系を使用することができる。トランスポゾン－トランスポサーゼ系の使用は、周知のスリーピングビューティー（Sleeping Beauty）、フロッグプリンス（Frog Prince）のトランスポゾン－トランスポサーゼ系（後者の記載は、ヨーロッパ特許第１５０７８６５号を参照するこ

と）又はＴＴＡＡ特異的トランスポゾンｐｉｇｇｙＢａｃ系でありうる。

【０１２９】

トランスポゾンは単一細胞のゲノム内の異なる位置に動き回ることができるＤＮＡの配列であり、転位と呼ばれるプロセスである。このプロセスにおいて、これらは、突然変異及びゲノムのＤＮＡ量に変化を引き起こす可能性がある。トランスポゾンは、かつてはジャンピング遺伝子とも呼ばれ、可動遺伝子エレメントの例である。

【０１３０】

多様な可動遺伝子エレメントがあり、転位の機構に基づいて分類することができる。クラスＩ可動遺伝子エレメント又はレトロトランスポゾンは、最初にＲＮＡに転写されることにより自体をコピーし、次に逆転写酵素によりＤＮＡに逆転写され、次にゲノムに別の位置に挿入される。クラスＩＩ可動遺伝子エレメントは、トランスポサーゼを使用して１つの位置から別の位置に直接移動して、ゲノム内で自体を「切り貼り」する。

【０１３１】

５．ｍＲＮＡ送達

当業者は、本発明に有用な任意のｍＲＮＡを細胞に送達するのに十分な知識を備えている。例えば、そのような技術は、Yamamoto et al, 2009により提供される。

【０１３２】

６．相同組み換え

本発明の特定の態様において、核酸分子をゲノム操作の特定の方法により、例えば相同組み換えにより細胞に導入することができる。上記に考察したように、細胞において遺伝子を発現する幾つかの手法は、ゲノムにランダムに組み込むウイルスベクター又は導入遺伝子の使用を伴う。しかしこの手法は、組み込みが、組み込み核酸の発現を効果的に仲介することができない又は天然遺伝子の破壊をもたらす部位に生じる決定を有する。ランダム組み込みに関連する問題は、標的ゲノムの特定の座位、例えばＲｏｓａ２６座への相同組み換えにより部分的に克服することができる。

【０１３３】

普遍的組み換えとしても知られている相同組み換え（ＨＲ）は、ヌクレオチド配列がＤＮＡの２つの類似又は同一の鎖の間で交換される、全ての生き物に使用される遺伝子組み換えの一種である。技術は、１９８０年代中期から哺乳類細胞のゲノム操作の標準的な方法である。プロセスは、ＤＮＡの物理的な切断及び最終的な再結合の幾つかの工程を伴う。このプロセスは、ＤＮＡにおける潜在的に致死的な二本鎖の切断を修復するために最も広範囲に使用されている。加えて、相同組み換えは、真核生物が精子及び卵のような生殖細胞を作製するプロセスである有糸分裂の際に、ＤＮＡ配列の新たな組み合わせを産生する。ＤＮＡのこれらの新たな組み合わせは、個体群が経時的に変化する環境条件に進化的に適合することを可能にする、子孫における遺伝的変異を表す。相同組み合わせは、細菌及びウイルスの異なる菌株及び種の間で遺伝子材料を交換する遺伝子水平伝播にも使用される。相同組み換えは、標的生物体に遺伝子変化を導入する分子生物学の技術としても使用される。

【０１３４】

相同組み換えを、ゲノム標的修飾として使用することができる。哺乳類細胞における標準的なＨＲの効率は、処理される細胞のわずか10^{-6}～10^{-9}個である（Capecchi, 1990）。メガヌクレアーゼ又はＩ－ＳｃｅＩのようなホーミングエンドヌクレアーゼが、ＨＲの効率を増加するために使用されてきた。天然のメガヌクレアーゼと、修飾標的特異性を有する操作メガヌクレアーゼの両方が、ＨＲ効率を増加するために利用されてきた（Pingoud and Silva, 2007; Chevalier et al, 2002）。

【０１３５】

ＨＲの効率を増加する一つの経路は、プログラム可能なＤＮＡ特異性ドメインによりキメラエンドヌクレアーゼを操作することであった（Silva et al., 2011）。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、そのようなキメラ分子の一例であり、ここでジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインは、ＦｏｋＩのようなＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼの

触媒ドメインと融合している（Durai et al, 2005;ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０３０６０６に概説されている）。

【０１３６】

そのような特異性分子の別の部類には、ＦｏｋＩのようなＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼの触媒ドメインと融合している転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメインが含まれる（Miller et al, 2011;ＰＣＴ／ＩＢ２０１０／０００１５４）。ＴＡＬＥＮを、目的のほぼあらゆる所定の部位における部位特異的ゲノム修飾のために設計することができる（Cermak et al, 2011; Christian et al, 2010; Li et al, 2011 ; Miller et al, 2011 ; Weber et al, 2011; Zhang et al, 2011）。部位特異的ＤＮＡ結合ドメインは、ＦｏｋＩのようなＤＮＡ切断酵素との融合タンパク質として発現される。ＤＮＡ結合ドメインは、修復アミノ酸の足場であり、それぞれの反復を結合するものは、ＤＮＡの単一のヌクレオチドに結合する２つの可変アミノ酸である。例えば、Ａｓｎ－Ａｓｎはグアノシンを結合し、Ａｓｎ－Ｉｌｅはアデノシンを結合し、Ａｓｎ－Ｇｌｙはチミジンを結合し、Ｈｉｓ－Ａｓｐはシトシンを結合する。これらの２つのアミノ酸は、反復可変２残基（Repeat Variable Diresidue）又はＲＶＤとしても知られている。多くの異なるＲＶＤが存在し、これらを操作して、ＴＡＬエフェクター／ＦｏｋＩタンパク質作成物にして、特定のＴＡＬＥＮを作り出すことができる。次に、組み換えＴＡＬＥＮをコードしているＲＮＡを精製し、部位特異的ゲノム修飾のために細胞に形質移入することができる。ＴＡＬＥＮが二本鎖ＤＮＡの切断を導入すると、ＤＮＡを、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）により又は相同方向修復（homologous directed repair）（ＨＤＲ）により修飾することができる。このことは、どのような追加の配列がＤＮＡ修復の際に提示されるかに応じて、ＤＮＡの突然変異誘発、欠失又は付加を可能にする。

【０１３７】

Ｃ．調節エレメント：

本発明に有用なベクターに含まれる真核生物発現カセットは、好ましくは、（５’から３’の方向に）タンパク質コード配列に機能的に結合している真核生物転写プロモーター、介在配列を含むスプライスシグナル及び転写終結／ポリアルデニル化配列を含有する。

【０１３８】

２．プロモーター／エンハンサー

「プロモーター」は、開始及び転写速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。これは、核酸配列の特定の転写を開始するために、ＲＮＡポリメラーゼ及び他の転写因子のような、調節タンパク質と分子が結合しうる遺伝子エレメントを含有することができる。語句「機能的に位置する」、「機能的に結合する」、「制御下に」及び「転写制御下に」は、プロモーターが、核酸配列に対して、転写開始及び／又はその配列の発現を制御するために正確な機能位置及び／又は配向にあることを意味する。

【０１３９】

プロモーターは、一般に、ＲＮＡ合成の開始部位を位置するように機能する配列を含む。この一番良く知られている例はＴＡＴＡボックスであるが、例えば哺乳類末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター及びＳＶ４０後期遺伝子のプロモーターのような、ＴＡＴＡボックスを欠いている幾つかのプロモーターでは、開始部位に重なっている別のエレメントが、開始の場所を固定するのを助ける。追加のプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置しているが、多数のプロモーターが開始部位の下流にも機能性エレメントを含有することを示す。コード配列をプロモーターの「制御下に」置くために、選択したプロモーターの「下流」（すなわち、３’）に、転写リーディングフレームの転写開始部位の５’末端を位置させる。「上流」のプロモーターは、ＤＮＡの転写を刺激し、コードされたＲＮＡの発現を促進する。

【０１４０】

プロモーターエレメントの間の間隔は、多くの場合に可動性であるので、プロモーター

機能は、エレメントが互いに反転又は移動したときも保存される。ｔｋプロモーターでは、プロモーターエレメントの間の間隔を、活性が下降し始める前に５０ｂｐの間隔に増大することができる。プロモーターに応じて、個別のエレメントは協同的又は独立的のいずれかで機能して、転写を活性化することができると思われる。プロモーターを、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列を意味する「エンハンサー」と共に使用しても、しなくてもよい。

【０１４１】

プロモーターは、コードセグメント及び／又はエクソンの上流に位置する５’非コード配列を単離することにより得ることができる核酸配列と天然に会合するものでありうる。そのようなプロモーターを、「内在性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流又は上流に位置する核酸配列と天然に会合するものでありうる。あるいは、特定の利点は、コード核酸配列を、天然の環境下で核酸配列と通常は会合しないプロモーターを意味する組み換え又は異種プロモーターの制御下に位置することによって得られる。組み換え又は異種エンハンサーは、また、天然の環境下で核酸配列と通常は会合しないエンハンサーを意味する。そのようなプロモーター又はエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、他の任意のウイルス又は原核若しくは真核細胞から単離されるプロモーター又はエンハンサー、並びに「天然に生じ」ない、すなわち異なる転写調節領域の異なるエレメント及び／若しくは発現を変更する突然変異を含有するプロモーター又はエンハンサーを含むことができる。例えば、組み換えＤＮＡ作成物に最も一般的に使用されるプロモーターは、β－ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース及びトリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系を含む。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、配列は、本明細書に開示されている組成物に関して、ＰＣＲ（商標）を含む、組み換えクローニング及び／又は核酸増幅技術を使用して産生することができる（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる米国特許第４，６８３，２０２号及び同第５，９２８，９０号を参照すること）。更に、ミトコンドリア、葉緑体などのような非核オルガネラ内の配列の転写及び／又は発現を指示する制御配列を用いることができることも考慮される。

【０１４２】

当然のことながら、発現のために選択されたオルガネラ、細胞型、組織、器官又は生物体におけるＤＮＡセグメントの発現を効果的に指示するプロモーター及び／又はエンハンサーを用いることが重要である。分子生物学の当業者は、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー及び細胞型の組み合わせの使用について一般に知っている（例えば、参照として本明細書に組み込まれるSambrook et al. 1989を参照すること）。用いられるプロモーターは、導入ＤＮＡセグメントの高い発現レベルを指示する適切な条件下で構成的、組織特定的、誘導性及び／又は有用であることができ、このことは組み合わせタンパク質及び／又はペプチドの大規模生産において有利である。プロモーターは、異種又は内在性でありうる。

【０１４３】

加えて、任意のプロモーター／エンハンサーの組み合わせ（例えば、epd.isb-sib.ch/でワールドワイドウエブを介した真核生物プロモーターデータベースＥＰＤＢによるもの）を使用して、発現を駆動することもできる。Ｔ３、Ｔ７又はＳＰ６細胞質発現系の使用は、別の可能な実施態様である。真核細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが送達複合体の一部として又は追加の遺伝子発現作成物の一部として提供される場合、特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

【０１４４】

プロモーターの非限定例には、ＳＶ４０初期又は後期プロモーター、サイトメガウイルス（ＣＭＶ）最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）初期プロモーターのような初期又は後期ウイルスプロモーター；例えばベータアクチンプロモーター（Ng, 1989; Quitsche et al., 1989）、ＧＡＤＰＨプロモーター（Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988）、メタロチオネインプロモーター（Karin et al., 1

989; Richards et al., 1984）のような真核細胞プロモーター；並びに環状ＡＭＰ応答エレメントプロモーター（ｃｒｅ）、血清応答エレメントプロモーター（ｓｒｅ）、ホルボールエステルプロモーター（ＴＰＡ）及びミニマルＴＡＴＡボックス近傍応答エレメントプロモーター（ｔｒｅ）のような連鎖応答エレメントプロモーターが含まれる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列（例えば、ジェンバンク受入番号Ｘ０５２４４、ヌクレオチド２８３－３４１に記載されているヒト成長ホルモンミニマルプロモーター）又はマウス乳癌プロモーター（ＡＴＣＣカタログ番号ＡＴＣＣ４５００７で入手可能）の使用も可能である。特定の例は、ホスホグリセンリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターでありうる。

【０１４５】

内皮細胞は、例えばＣＤ３１及び／又はＶＥカドヘリンの細胞表面抗原発現に基づいて容易に同定及び精製することができる。幾つかの実施態様において、フォワードプログラミングにより産生される内皮細胞は、レポーター遺伝子の発現に基づいて同定することができる。特異性と活性の両方を増加するために、シス作用性調節エレメントの使用が考慮されてきた。例えば、内皮細胞特異的プロモーターを使用することができる。多くの内皮細胞特異的プロモーターが当該技術において知られている（例えば、DeVal and Black, 2009を参照すること）。例には、Ｍｅｆ２ｃ、Ｆｌｋ１、Ｔａｌ１、エンドグリン、ＬＭ０２、Ｆｌｉ１、Ｔｉｅ２、Ｔｉｅ１、Ｆｌｔ１、Ｇａｔａ２、Ｐｒｏｘ１、ＥＣＥ１、ＦＬＴ４、ＰＤＧＦＲ－ベータ、ＦＯＸＰ１、ＮＲＰ１、ＮＯＴＣＨ４、ＬＹＬ１、ＥＰＣＲ、フォンウィルブランド因子、第ＶＩＩＩ因子関連抗原、ＣＤ３１／ＰＥＣＡＭ－１、アンギオテンシン変換酵素、血管内皮カドヘリン（Ｃｄｈ５）、ＣＤ３４、ＣＤ１０２／ＩＣＡＭ－２、ＣＤ５１／６１（ビトロネクチンレセプター）、ＣＤ１０５／エンドグリン、ＣＤ３６、ＣＤ７３／ＶＡＰ－２又はＳｃａ－１のプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４６】

特定の態様において、本発明の方法は、エンハンサー配列、すなわちプロモーター活性を増加する及び比較的長い距離（標的プロモーターから数キロベースまで離れている）にわたっても配向にかかわらずシスに作用する可能性を有する核酸配列にも関する。しかし、エンハンサー機能は、所定のプロモーターに極めて近接しても機能できるので、そのような長い距離に限定される必要はない。

【０１４７】

多くの内皮細胞プロモーター及びエンハンサー配列が同定されており、本発明の使用に有用でありうる。例えば、米国特許出願第２０１０００８１１９３５号；DeVal and Black, 2009; Liu et al. 1995; Collins et al. 1995; Schlaeger et al, 1997を参照すること。

【０１４８】

３．開始シグナル及び内部リボソーム結合部位

特定の開始シグナルを、コード配列の効率的な翻訳に使用することもできる。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドン又は隣接配列を含む。ＡＴＧ開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルの提供が必要な場合がある。当業者は、このことを容易に決定し、必要なシグナルを提供することができる。開始コドンは、全ての挿入の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームの「インフレーム」でなければならないことは良く知られている。外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然又は合成のいずれかでありうる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることにより増強することができる。

【０１４９】

本発明の特定の実施態様において、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントの使用は、多重遺伝子又は多シストロン性メッセージを作り出すために使用される。ＩＲＥＳエレメントは、５’メチル化Ｃａｐ依存性翻訳のリボソームスキャニングモデルを迂回すること及び内部部位で翻訳を開始することができる（Pelletier and Sonenberg, 19

88）。ピコナウイルスファミリーの２つのメンバー（ポリオ及び脳心筋炎）からのＩＲＥＳエレメント（(Pelletier and Sonenberg, 1988）、並びに哺乳類メッセージからのＩＲＥＳ（Macejak and Sarnow, 1991）が記載されている。ＩＲＥＳエレメントは、異種オープンリーディングフレームに結合することができる。それぞれＩＲＥＳにより離されている多数のオープンリーディングフレームを一緒に転写することができ、多シストロン性メッセージを作り出すことができる。ＩＲＥＳエレメントのおかげで、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームが利用できる。同義遺伝子を、単一のプロモーター／エンハンサーの使用により効率的に発現させて、単一メッセージを転写することができる（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる米国特許第５，９２５，５６５号及び同第５，９３５，８１９号を参照すること）。

【０１５０】

４．複製の起点

宿主細胞においてベクターを繁殖させるため、複製部位の１つの以上の起点（多くの場合に、「ｏｒｉ」と呼ばれる）、例えば上記に記載されたＥＢＶのｏｒｉＰ又はプログラミングにおいて同様の若しくは高められた機能を有する遺伝子操作ｏｒｉＰに対応する核酸配列を含むことができ、これは複製が開始される特定の核酸配列である。あるいは、上記に記載された他の染色体外複製ウイルス又は自律複製配列（ＡＲＳ）の複製起点を用いることができる。

【０１５１】

５．選択及びスクリーン可能（Screenable）マーカー

本発明の特定の実施態様において、本発明の核酸作成物を含有する細胞は、発現ベクターにマーカーを含めることによりインビトロ又はインビボにおいて同定されうる。そのようなマーカーは、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にする、同定可能な変化を細胞に付与する。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。正の選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、一方、負の選択マーカーは、その存在が選択を防止するものである。正の選択マーカーの例は、薬剤抵抗性マーカーである。

【０１５２】

通常、薬剤選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニング及び同定を助け、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ＤＨＦＲ、ＧＰＴ、ゼオシン及びヒスチジノールに対して抵抗性を付与する遺伝子が有用な選択マーカーである。条件の実施に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析であるＧＦＰのようなスクリーン可能マーカーを含む他の種類のマーカーも考慮される。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ｔｋ）又はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）のようなスクリーン可能酵素を、負の選択マーカーとして利用することができる。当業者は、また、可能であればＦＡＣＳ分析と共に免疫マーカーをどのように用いるかを知っている。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードしている核酸と同時に発現することができる限り、重要であるとは考えられない。選択及びスクリーン可能マーカーの更なる例は、当業者に良く知られている。本発明の一つの特徴は、内皮細胞を、プログラミング因子がこれらの細胞に所望のプログラミング変化を起こした後に選択するために、選択及びスクリーン可能マーカーを使用することを含む。

【０１５３】

Ｄ．核酸送達

本発明によりプログラムされる細胞へのＤＮＡ又はＲＮＡのような核酸の導入は、本明細書に記載されている又は当業者に既知である、細胞の形質転換のための核酸送達に適した任意の方法を使用することができる。そのような方法には、エキソビボ形質移入による（Wilson et al., 1989, Nabel et al, 1989）；マイクロインジェクション（Harland and Weintraub, 1985;参照として本明細書に組み込まれる米国特許第５，７８９，２１５号）を含む注入による（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる、米国特許

第５，９９４，６２４号、同第５，９８１，２７４号、同第５，９４５，１００号、同第５，７８０，４４８号、同第５，７３６，５２４号、同第５，７０２，９３２号、同第５，６５６，６１０号、同第５，５８９，４６６号及び同第５，５８０，８５９号）；エレクトロポレーションによる（参照として本明細書に組み込まれる米国特許第５，３８４，２５３号; Tur-Kaspa et al, 1986; Potter et al, 1984）；リン酸カルシウム沈殿による（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al, 1990）；ＤＥＡＥデキストラン、続くポリエチレングリコールの使用による（Gopal, 1985）；直接音波装填による（Fechheimer et al, 1987）；リポソーム仲介形質移入（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al, 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991）及びレセプター仲介形質移入（Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988）による；微粒子銃による（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ特許出願国際公開第９４／０９６９９号及び同第９５／０６１２８号；米国特許第５，６１０，０４２号、同第５，３２２，７８３号、同第５，５６３，０５５，号、同第５，５５０，３１８号、同第５，５３８，８７７号及び同第５，５３８，８８０号）；炭化ケイ素繊維を用いる撹拌による（Kaeppler et al, 1990;それぞれ参照として本明細書に組み込まれる米国特許第５，３０２，５２３号及び同第５，４６４，７６５号）；アグロバクテリウム仲介形質転換による（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる米国特許第５，５９１，６１６号及び同第５，５６３，０５５号）；乾燥／阻害仲介ＤＮＡ取り込みによる（Potrykus et al, 1985）；並びにこのような方法の任意の組み合わせのようなＤＮＡの直接送達が含まれるが、これらに限定されない。これらのような技術の適用を介して、オルガネラ、細胞、組織又は生物体を安定的又は一過的に形質転換することができる。

【０１５４】

２．リポソーム仲介形質移入

本発明の特定の実施態様において、核酸を、例えばリポソームのような脂質複合体に閉じ込めることができる。リポソームは、リン脂質二分子膜及び内部水性媒質により特徴付けられる小胞構造体である。多重層リポソームは、水性媒質により離されている複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質を過剰量の水溶性に懸濁すると自発的に形成される。脂質成分は、閉鎖構造を形成する前に自己再構成を行い、水を閉じ込め、脂質二分子層の間の溶質を溶解する（Ghosh and Bachhawat, 1991）。また考慮されるものは、リポフェクタミン（ギブコGibco）ＢＲＬ社）又はスーパーフェクト（Superfect）（キアゲン社（Qiagen））と複合体を形成する核酸である。使用されるリポソームの量は、使用されるリポソームと細胞の性質に基づいて変わることができ、例えば、細胞一百万から一千万個あたり約５～約２０μｇのベクターＤＮＡを考慮することができる。

【０１５５】

インビトロにおける外来性ＤＮＡのリポソーム仲介核酸送達及び発現は、大きな成功を収めている（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al, 1987）。培養ニワトリ胚、ヒーラー細胞及び肝細胞癌の細胞における外来性ＤＮＡのリポソーム仲介送達及び発現の可能性も実証されている（Wong et al, 1980）。

【０１５６】

本発明の特定の実施態様において、リポソームは血球凝集性ウイルス（ＨＶＪ）と複合体を形成することができる。このことは、細胞膜との融合を促進し、リポソーム封入ＤＮＡの細胞進入を促進することが示されている（Kaneda et ah, 1989）。他の実施態様において、リポソームは、核非ヒストン染色体タンパク質（ＨＭＧ－１）と複合体を形成することができる又はと共に用いることができる（Kato et ah, 1991）。なお更なる実施態様において、リポソームは、ＨＶＪとＨＭＧ－１の両方と複合体を形成することができる又はと共に用いることができる。他の実施態様において、送達ビヒクルは、リガンド及びリポソームを含むことができる。

【０１５７】

３．エレクトロポレーション

本発明の特定の実施態様において、核酸は、エレクトロポレーションを介してオルガネラ、細胞、組織又は生物体に導入される。エレクトロポレーションは、細胞及びＤＮＡの懸濁液を高電圧放電に曝露することを伴う。受容細胞は、機械的損傷により形質転換して、より感受性にすることができる。また、使用されるベクターの量は、使用される細胞の性質によって変わることができ、例えば、細胞一百万から一千万個あたり約５～約２０μｇのベクターＤＮＡを考慮することができる。

【０１５８】

エレクトロポレーションを使用する真核細胞に形質移入は、かなりの成功を収めている。この方法により、マウスプレＢリンパ球はヒトカッパ免疫グロブリン遺伝子で形質移入されており（Potter et ah, 1984）、ラット肝細胞はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子で形質移入されている（Tur-Kaspa et ah, 1986）。

【０１５９】

エレクトロポレーションの一つの種類はヌクレオフェクション（nucleofection）であり、ここで核酸は、ヌクレオフェクター（Nucleofector）と呼ばれる装置の使用及び細胞特異的試薬（例えば、Ａｍａｘａ系；ロンザコローン（Lonza Cologne）ＡＧ社）との組み合わせを介して細胞に移入される。

【０１６０】

４．リン酸カルシウム

本発明の他の実施態様において、核酸は、リン酸カルシウム沈殿を使用して細胞に導入される。ヒトＫＢ細胞は、この技術を使用してアデノウイルス５ＤＡにより形質移入されている（Graham and Van Der Eb, 1973）。また、この方法により、マウスＬ（Ａ９）、マウスＣ１２７、ＣＨＯ、ＣＶ－１、ＢＨＫ、ＮＩＨ３Ｔ３及びヒーラー細胞は、ネオマイシンマーカー遺伝子で形質移入され（Chen and Okayama, 1987）、ラット肝細胞は、多様なマーカー遺伝で形質移入された（Rippe et ah, 1990）。

【０１６１】

５．ＤＥＡＥ－デキストラン

別の実施態様において、核酸は、ＤＥＡＥ－デキストラン、続いてポリエチレングリコールを使用して細胞に送達される。この方法により、レポータープラスミドがマウス骨髄腫及び赤白血病細胞に導入された（Gopal, 1985）。

【０１６２】

６．音波処理装填

本発明の追加の実施態様は、直接音波装填による核酸の導入を含む。ＬＴＫ－線維芽細胞は、音波処理装填によりチミジンキナーゼ遺伝子で形質移入されている（Fechheimer et al, 1987）。

【０１６３】

７．微粒子銃

微粒子銃技術を使用して、核酸を少なくとも１つのオルガネラ、細胞、組織又は生物体に導入することができる（それぞれ参照として本明細書に組み込まれる、米国特許第５，５５０，３１８号；米国特許第５，５３８，８８０号；米国特許第５，６１０，０４２号；及びＰＣＴ出願国際公開第９４／０９６９９号）。この方法は、ＤＮＡ被覆微粒子を高速に加速し、これらが細胞膜を突き刺し、死滅させることなく細胞に進入することを可能にする能力に依存している（Klein et al, 1987）。多種多様な微粒子銃技術が当該技術において知られており、それらの多くを本発明に適用することができる。

【０１６４】

この微粒子銃において、１つ以上の粒子を少なくとも１つの核酸で被覆し、推進力により細胞に送達することができる。小型粒子を加速する幾つかの装置が開発されてきた。そのような装置の１つは、高電圧放電によって電流を生じ、次に原動力を提供する（Yang et al, 1990）。使用される微粒子は、タングステン又は金の粒子又はビーズのような生物学的に不活性な物質から構成されている。例示的な粒子には、タングステン、白金、好ましくは金から構成されるものが含まれる。幾つかの場合において、金属粒子へのＤＮ

Ａ沈殿は、微粒子銃を使用して受容細胞にＤＮＡを送達するために必ずしも必要ではないことが考慮される。しかし、粒子はＤＮＡで被覆されるのではなく、むしろＤＮＡを含有しうることが考慮される。ＤＮＡ被覆粒子は、粒子銃を介するＤＮＡ送達のレベルを増加することができるが、それ自体必ずしも必要ではない。

【０１６５】

照射では、懸濁液中の細胞はフィルター又は固体培養培地に集められる。あるいは、未熟胚又は標的細胞を固体培養培地に配列することができる。照射される細胞は、微粒子止めプレートの下方の適切な間隔に位置される。

【０１６６】

Ｅ．タンパク質形質導入

本発明の特定の態様において、プログラムされて内皮細胞になる細胞を、内皮細胞転写因子遺伝子のポリペプチドを含む内皮プログラミング因子と、フォワードプログラミングに十分な量で接触させることができる。タンパク質形質導入は、細胞への巨大分子の送達を増強する方法として使用されてきた。タンパク質形質導入ドメインを使用して、内皮プログラミングポリペプチド又はその機能性フラグメントを細胞に直接導入することができる。多くのグループによる研究は、ＨＩＶ　Ｔａｔタンパク質が誘導されるＴＡＴタンパク質の領域が標的タンパク質と融合して、細胞への標的タンパク質の進入を可能にできることを示している。このドメインの特に例示的なタンパク質配列は、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１）であり、ここで、Ｒはアルギニンをコードし、Ｋはリシンをコードし、Ｑはグルタミンをコードする。この配列は、Ｎ末端又はＣ末端融合体として、両方のタンパク質融合体の進入を可能にすることが示されている。ＴＡＴ仲介進入の機構は、マイクロピノサイトーシスによるものであると考えられる（Gump　and　Dowdy）。

【０１６７】

「タンパク質形質導入ドメイン」又は「ＰＴＤ」は、生体膜、特に細胞膜を横断することができるアミノ酸配列である。異種ポリペプチドに結合する場合、ＰＴＤは、生体膜の全体にわたって異種ポリペプチドの転位を増強することができる。ＰＴＤは、典型的には、異種ＤＮＡ結合ドメインに（例えば、ペプチド結合により）共有結合している。例えば、ＰＴＤ及び異種ＤＮＡ結合ドメインを、例えば共通のオープンリーディングフレームにおいて又は共通遺伝子の１つ以上のエクソンにおいて単一の核酸によりコードすることができる。例示的なＰＴＤは、１０～３０個のアミノ酸を含むことができ、両親媒性ヘリックスを形成することができる。多くのＰＴＤは、塩基性の性質である。例えば、塩基性ＰＴＤは、少なくとも４、５、６又は８個の塩基性残基（例えば、アルギニン又はリシン）を含むことができる。ＰＴＤは、細胞壁を欠いている細胞又は特定の種からの細胞、例えばヒト、サル、ネズミ、ウシ、ウマ、ネコ若しくはヒツジの細胞のような哺乳類の細胞へのポリペプチドの転位を増強することができる場合がある。

【０１６８】

ＰＴＤを、例えば可動性リンカーを使用して人工転写因子に結合することができる。可動性リンカーは、１つ以上のグリシン残基を含んで自由回転を可能にすることができる。例えば、ＰＴＤを、少なくとも１０、２０又は５０個のアミノ酸により転写因子のＤＮＡ結合ドメインから隔てることができる。ＰＴＤは、ＤＮＡ結合ドメインに対してＮ末端又はＣ末端に位置することができる。特定のドメインに対してＮ末端又はＣ末端に位置することは、その特定のドメインに隣接することを必要としない。例えば、ＤＮＡ結合ドメインに対してＮ末端であるＰＴＤを、スペーサー及び／又は他の種類のドメインによりＤＮＡ結合ドメインから隔てることができる。ＰＴＤを化学的に合成し、次に、リンカーペプチドを用いて又は用いることなく、別個に調製されたＤＮＡ結合ドメインと化学的に接合させることができる。人工転写因子は、複数のＰＴＤ、例えば複数の異なるＰＴＤ又は１つのＰＴＤの少なくとも２つのコピーを含むこともできる。

【０１６９】

幾つかのタンパク質及び小型ペプチドは、伝統的なレセプター仲介又はエンドサイトーシス仲介経路と無関係に、生体膜を通って形質導入する又は移動する能力を有する。これ

らのタンパク質の例には、ＨＩＶ－１　ＴＡＴタンパク質、単純ヘルペスウイルス１（ＨＳＶ－１）ＤＮＡ結合ドメインＶＰ２２及びドロフィラアンテナペディア（Ａｎｔｐ）ホメオティック転写因子が含まれる。これらのタンパク質の小型タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）を、他の巨大分子、ペプチド又はタンパク質に融合して、これらを成功裏に細胞に輸送することができる。これらのタンパク質の形質導入ドメインの配列アラインメントは、高い塩基性アミノ酸含有量（Ｌｙｓ及びＡｒｇ）を示し、これは、これらの領域と膜における負荷電脂質との相互作用を促進することができる。二次構造分析は、３つのドメイン全てに構造の一致がないことを示す。

【０１７０】

これらの形質導入ドメインの融合体を使用する利点は、タンパク質進入が急速であること、濃度依存性であること及び困難な細胞型と作用すると思われることである。

【０１７１】

ヒト免疫不全ウイルスＩ型（ＨＩＶ－１）からのＴａｔタンパク質は、外因的に添加されたときに細胞に進入する顕著な能力を有する（Frankel and Pabo, 1988; Mann and Frankel, 1991; Fawell et al, 1994）。Ｔａｔ　ＰＴＤの特定の例は、ヒト免疫不全ウイルスＴａｔタンパク質：ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号２）の残基４７～５７を含むことができる。このペプチド配列は、本明細書において「ＴＡＴ」と呼ばれる。このペプチドは、インビトロ及びインビボにおいて哺乳類細胞への１００ｋＤａを越える異種ペプチド及びタンパク質の導入を成功裏に仲介したことを示している（Ho et al., 2001）。Schwarze et al.は、ＴＡＴと融合した１２０ｋＤａのβ－ガラクトシダーゼタンパク質をマウスの腹腔内に注射した場合、融合タンパク質が、血液脳関門のために困難であると思われていた脳も含む全種類の細胞及び組織において見出されたことを示した（Schwarze et al., 1999）。

【０１７２】

アンテナペディアホメオドメインも、ＰＴＤであるペプチドを含む（Derossi et al., 1994）。このペプチドは、「ペネトラチン」とも呼ばれ、アミノ酸配列：ＡＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫＥＮＮ（配列番号３）を含む。

【０１７３】

ＨＳＶ　ＶＰ２２タンパク質もＰＴＤを含む。このＰＴＤは、ＶＰ２２のＣ末端３４アミノ酸残基：ＤＡＡＴＡＴＲＧＲＳＡＡＳＲＰＴＥＲＰＲＡＰＡＲＳＡＳＲＰＲＲＰＶＥ（配列番号４）に位置する。例えば、Elliott and O'Hare (1997)及び米国特許第６，１８４，０３８号を参照すること。

【０１７４】

一つの実施態様において、ＰＴＤは、ヒト又は他の哺乳類タンパク質から得られる。例示的な哺乳類ＰＴＤは、国際公報第０３／０５９９４０号（ヒトＳＩＭ－２）及び国際公報第０３／０５９９４１号（Ｍｐｈ）に記載されている。特定の実施態様において、ＰＴＤは合成ＰＴＤでありうる。ミニマルＴａｔ　ＰＴＤ（ａａ４７～５７）は、タンパク質形質導入の可能性を最適化するために修飾された（Ho et al., 2001）。一連の合成ＰＴＤと結合したＦＩＴＣを、培養Ｔリンパ球で試験した。幾つかの合成ＰＴＤは、Ｔａｔ　ＰＴＤと比較して増強されたタンパク質形質導入を示した。これらのＰＴＤには、ＹＡＲＫＡＲＲＱＡＲＲ（配列番号５）；ＹＡＲＡＡＲＲＡＡＲＲ（配列番号６）；ＹＡＲＡＡＲＲＡＡＲＡ（配列番号７）；ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号８）が含まれる。特に、合成ＰＴＤ　ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号８）と接合したＦＩＴＣは、マウスに腹腔内注射されたとき、全血球の取り込みの増強を示した。

【０１７５】

約６～１２個のアルギニン残基から構成されるポリアルギニンペプチドも、幾つかの場合においてタンパク質軽質導入を仲介することができる。ポリアルギニンについての追加の情報は、Rothbard et al. (2000); Wender et al. (2000)を参照すること。

【０１７６】

ＰＴＤについての追加の情報は、米国特許出願第２００３／００８２５６１号；米国特

許出願第２００２／０１０２２６５号；米国特許出願第２００３／００４００３８号; Schwarze et al. (1999); Derossi et al. (1996); Hancock et al. (1991); Buss et al. (1988); Derossi et al. (1998); Lindgren et al. (2000); Kilic et al. (2003); Asoh et al. (2002);及びTanaka et al. (2003)も参照すること。

【０１７７】

ＰＴＤに加えて、細胞取り込みシグナルを使用することができる。そのようなシグナルには、細胞レセプター又は他の表面タンパク質により特異的に認識されるアミノ酸配列が含まれる。細胞取り込みシグナルと細胞との相互作用は、細胞取り込みシグナルを含む人工転写因子の内部移行を引き起こす。幾つかのＰＴＤは、細胞レセプター又は他の表面タンパク質との相互作用によっても機能することができる。

【０１７８】

多数のアッセイを、アミノ酸配列がＰＴＤとして機能できるか決定するために利用することができる。例えば、アミノ酸配列を、β－ガラクトシダーゼのようなレポータータンパク質と融合して、融合タンパク質を形成することができる。この融合タンパク質を培養細胞と接触させる。細胞を洗浄し、次にレポーター活性についてアッセイする。別のアッセイは、当該のアミノ酸配列及び別の検出可能な配列、例えばエピトープタグを含む融合タンパク質の存在を検出する。この融合タンパク質を培養細胞と接触させる。細胞を洗浄し、次にウエスタン又は免疫蛍光法により分析して、細胞における検出可能な配列の存在を検出する。なお別のアッセイを使用して、推定ＰＴＤ、ＤＮＡ結合ドメイン及び場合によりエフェクタードメインを含む融合タンパク質の転写調節活性を検出することができる。例えば、そのような融合タンパク質と接触した細胞を、例えばマイクロアレイ、質量分析及びハイスループット技術を使用してｍＲＮＡ又はタンパク質の存在又は量についてアッセイすることができる。

【０１７９】

Ｖ．細胞培養

一般に、本発明の細胞は、細胞増殖を維持することができる栄養豊富緩衝溶液である培養培地で培養される。

【０１８０】

本明細書に記載されている方法により幹細胞を単離、拡大及び分化して内皮細胞にするのに適した培地には、高グルコースダルベッコー修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＤＭＥＭ／Ｆ－１５、Ｌｉｅｂｏｖｉｔｚ Ｌ－１５、ＲＰＭＩ １６４０、イスコフ（Iscove）修飾ダルベッコー培地（ＩＭＤＭ）及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ ＳＦＭ（インビトロゲン社）が含まれるが、これらに限定されない。合成培地は、ヒト血清アルブミン、ヒトＥｘＣｙｔｅリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須及び非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、グルタミンを補充したイスコフ修飾ダルベッコー培地（ＩＭＤＭ）（ギブコ社）のような最小必須培地を含み、分裂促進因子も適している。本明細書で使用されるとき、分裂促進因子は、細胞の分裂を促進する作用物質を意味する。作用物質は、化学的であり、通常は、細胞が細胞分裂を始めるのを助長し、有糸分裂を誘発するある種のタンパク質である。一つの実施態様において、米国特許出願第０８／４６４，５９９号及び国際公開第９６／３９４８７号に記載されているような無血清培地、並びに米国特許第５，４８６，３５９号に記載されている「完全培地」は、本明細書に記載されている方法による使用に考慮される。幾つかの実施態様において、培養培地には、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ヒト自己血清、ヒトＡＢ血清又はヘパリン（２Ｕ／ｍＬ）補充血小板豊富血漿が補充されている。細胞培養を、例えば５％～１２％のCO_2雰囲気で維持して培養液のｐＨを維持し、湿度雰囲気において３７℃でインキュベートし、継体して８５％未満のコンフルエンスに維持することができる。

【０１８１】

内皮細胞に分化する多能性幹細胞を、多能性を維持するのに十分な培地で培養することができる。本発明の特定の態様において生成される誘導多能性幹細胞（ｉＰＳ）細胞の培

養は、米国特許出願第２００７０２３８１７０号及び米国特許出願第２００３０２１１６０３号に記載されているような、霊長類多能性幹細胞、とりわけ胚幹細胞を培養するために開発された多様な培地及び技術を使用することができる。例えば、ヒト胚肝（ｈＥＳ）細胞と同様に、ｉＰＳ細胞を、８０％のＤＭＥＭ（ギブコ社番号１０８２９－０１８又は番号１１９６５－０９２）、熱不活性化していない２０％の限定ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１％の非必須アミノ酸、１ｍＭのＬ－グルタミン及び０．１ｍＭのベーターメルカプトフェノールに維持することができる。あるいは、ＥＳ細胞を、８０％のノックアウトＤＭＥＭ（ギブコ社番号１０８２９－０１８）、２０％の血清補充（ギブコ社番号１０８２８－０２８）、１％の非必須アミノ酸、１ｍＭのＬ－グルタミン及び０．１ｍＭのベーターメルカプトフェノールから作製される無血清培地に維持することができる。使用直前に、ヒトｂＦＧＦを加えて、最終濃度の約４ｎｇ／ｍＬにすることができる（国際公開第９９／２０７４１号）。

【０１８２】

本発明の内皮細胞は、細胞のプログラミングを促進して内皮細胞にするのに十分になるように内皮プログラミング因子の細胞内レベルを増加する条件下で、培地において多能性幹細胞又は他の非内皮細胞を培養して作製することができる。培地は、多様な種類の増殖因子のような、１つ以上の内皮細胞分化及び成熟作用物質を含有することもできる。しかし、内皮プログラミング転写因子の細胞内レベルを増加することによって、本発明の態様は、各段階で培地を交換する必要なく、成熟内皮細胞への大部分の段階を迂回する。したがって、本発明により提供される利点を考慮すると、特定の態様において、内皮プログラミング下で細胞を培養する培地は、１つ以上の内皮細胞分化及び成熟作用物質を実質的に含有しなくてもよい又はそのような作用物質の異なる組み合わせを含有する培地を連続的に交換しなくてもよい。

【０１８３】

これらの作用物質は、より成熟した表現型に関連づけられるように細胞を誘導するのを助ける又は成熟細胞の生存を優先的に促進する又はこれらの効果の組み合わせを有することができる。本開示に例示されている内皮細胞分化及び成熟作用物質は、内皮細胞系列の細胞の増殖を促進することができる可溶性増殖因子（ペプチドホルモン、サイトカイン、リガンドレセプター複合体及び他の成分）を含むことができる。そのような作用物質の非限定例には、塩基性ＦＧＦ（ｂＦＧＦ）、ＢＭＰ－４及びＶＥＧＦ又はこれらのアイソフォーム若しくは変種が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８４】

ＶＩ．内皮細胞の特徴

細胞を多数の表現型基準に従って特徴決定することができる。基準には、発現細胞マーカーの検出又は定量化、酵素活性、並びに形態的特徴及び細胞内シグナル伝達の特徴決定が含まれるが、これらに限定されない。他の態様において、プログラムされる細胞は、内皮細胞同定のための内皮細胞特異的プロモーターのような組織特異的又は細胞特異的転写調節エレメントを含むレポーター遺伝子発現カセットを含むことができる。

【０１８５】

本発明の特定の態様に包含される内皮細胞は、本質的に内皮細胞に特徴的な形態的特徴を有する。特徴は、そのようなものを評価する当業者によって容易に理解され、扁平外観及び大型中心核を含む。単一の細胞に存在するそのような特徴の１つ以上は、内皮細胞系列のメンバーである細胞と一致する。細胞が内皮細胞に特徴的な形態的特徴を有するかについての不偏的な決定は、プログラミング子孫細胞、成体又は胎児内皮細胞及び線維芽細胞又はＲＰＥ（網膜色素上皮）細胞のような１つ以上の陰性対照細胞の顕微鏡写真をコード化すること、次に顕微鏡写真を盲検様式で評価すること、並びにコードを解読して、プログラミングによる内皮細胞が正確に同定されているかを決定することによって行うことができる。

【０１８６】

本発明の細胞は、これらが内皮細胞系列の細胞に特徴的な表現型マーカーを発現するか

によって特徴決定することもできる。内皮細胞を識別するのに有用な細胞マーカーの非限定例には、７Ｂ４抗原、ＡＣＥ（アンギオテンシン変換酵素）、ＢＮＨ９／ＢＮＦ１３、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）、ＣＤ６２Ｐ（ｐ－セレクチンＧＭＰ１４０）、ＣＤ１０５（エンドグリン）、ＣＤ１４４、ＣＤ１４６、エンドカン（ＥＳＭ－１とも呼ばれる）、エンドグリン（ＣＤ１０５）、エンドグリクス－１、エンドムチ（Endomuci）、エオタキシン－３、ＥＰＡＳ１（内皮ＰＡＳドメインタンパク質１）、第ＶＩＩ因子関連抗原、ＦＬＩ－１、Ｆｌｋ－１（ＶＥＧＦＲ－２）、Ｆｌｔ－１（ＶＥＧＦＲ－１）、ＧＡＴＡ２、ＧＢＰ－１（グアニル酸結合タンパク質－１）、ＧＲＯ－アルファ、Ｈｅｘ、ＩＣＡＭ－２（細胞間接着分子２）、ＬＭＯ２、ＬＹＶＥ－１、ＭＲＢ（マジックラウンドアバウト）、ヌクレオリン、ＰＡＬ－Ｅ（病理解剖学的罹患内皮）、ＲＴＫｓ、ｓＶＣＡＭ－１、ＴＡＬ１、ＴＥＭ１（腫瘍内皮マーカー１）、ＴＥＭ５（腫瘍内皮マーカー５）、ＴＥＭ７（腫瘍内皮マーカー７）、トロンボモジュリン（ＴＭ、ＣＤ１４１）、ＶＣＡＭ－１（血管細胞接着分子－１）（ＣＤ１０６）、ＶＥ－カドヘリン（ＣＤ１４４）及びｖＷＦ（フォンウィルブランド因子、第ＶＩＩＩ因子とも呼ばれる）が含まれる。

【０１８７】

そのようなマーカーの発現レベルの評価は、他の細胞との比較により決定することができる。成熟内皮細胞のマーカーの陽性対照には、目的の種の成体内皮細胞及び確立された内皮細胞系統が含まれる。読者は、永久細胞系統又は長期内皮細胞培養が代謝的に変わって、一次内皮細胞の特定の特徴の発現し損なう場合があることに注意すること。陰性対照には、成体線維芽細胞の細胞系統又は網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞のような別の系列の細胞が含まれる。未分化幹細胞は、上記に提示された幾つかのマーカーでは陽性であるが、成熟内皮細胞のマーカーでは陰性であり、下記の実施例において例示されている。

【０１８８】

本開示に提示されている組織特異的（例えば、内皮細胞特異的）タンパク質及びオリゴ糖決定因子は、細胞表面マーカーのフローイムノサイトケミストリー（flow immunocytochemistry）、細胞内又は細胞表面マーカーの（例えば、固定細胞又は組織片の）免疫組織化学、細胞抽出物のウエスタンブロット分析及び培地に分泌された細胞抽出物又は産物の酵素結合イムノアッセイのような、任意の適切な免疫技術を使用して検出することができる。細胞による抗原の発現は、有意に検出可能な量の抗体が、場合により細胞を固定した後及び場合により標識二次抗体又は他の接合体（例えばビオチンアビジン接合体を標識の増幅に使用する標準的免疫細胞化学又はフローサイトメトリーアッセイにおいて抗原に結合する場合、「抗体検出可能」であると言われる。

【０１８９】

組織特異的（例えば、内皮細胞特異的）マーカーの発現は、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析又は標準的な増幅方法で配列特異的プライマーを使用するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によりｍＲＮＡレベルで検出することもできる（米国特許第５，８４３，７８０号）。本開示に提示されている特定のマーカーの配列データは、ジェンバンクのような公共のデータバンクから得ることができる。ｍＲＮＡレベルでの発現は、典型的に制御された実験における標準的なプロトコールによる細胞試料のアッセイの実施が、標準的な時間内に明確に識別可能なハイブリダイゼーション又は増幅産物をもたらす場合、本開示に記載されたアッセイの１つにより「検出可能」であると言われる。特に必要のない限り、特定のマーカーの発現は、対応するｍＲＮＡがＲＴ－ＰＣＲにより検出可能である場合に示される。タンパク質又はｍＲＮＡレベルで検出される組織特異的マーカーの発現は、レベルが、未分化多能性幹細胞、線維芽細胞又は他の無関係の細胞型のような対照細胞の少なくとも２倍、好ましくは１０～５０倍を越えて高い場合、陽性であると考慮される。

【０１９０】

細胞を、これらが内皮細胞系列の細胞に特徴的な酵素活性を示すかによって、特徴決定することができる。例えば、アセチル化低密度リポタンパク質の取り込み、ブラキジニン

分解、アンギオテンシンＩ変換又は酸化窒素産生を検出するアッセイは有用でありうる。例えば、Voyta et al, 1984; King, et al, 1989; Graf et al, 1992; Ming et al, 2002を参照すること。他の実施態様において、本発明の細胞を、そのような細胞の１つ以上の細胞接着分子（例えば、ＣＤ５４及び／又はＣＤ６２Ｅ）の発現を上方制御することにより、管様構造を形成する又は炎症促進性刺激（例えば、ＴＮＦ及び／又はＩＬ－１）に反応する能力についてアッセイする。例えば、Chalupowicz et al, 1995を参照すること。

【０１９１】

熟練した読者は、プログラミング誘導内皮細胞の利点が、線維芽細胞、免疫細胞、血管周囲細胞、クッパー細胞及び他の間質細胞のような、成体又は胎児組織から単離された一次内皮細胞培養を典型的に汚染する他の細胞型を実質的に含有しないことであることを容易に理解する。プログラミング誘導内皮細胞は、免疫染色及び蛍光活性化の定量化又は他の適切な技術により決定して０．１％未満（好ましくは１００又は１０ｐｐｍ未満）が望ましくない細胞型のマーカー又は他の特徴を有する場合、汚染細胞型の幾つか又は全てを実質的に含有しないと特徴決定することができる。更に、プログラミング誘導内皮細胞は、間葉細胞又は造血細胞を含有しない又は実質的に含有しない場合がある。

【０１９２】

本発明のプログラミングによりもたらされる内皮細胞は、表すことが意図される細胞段階の多数の特徴を有することができる。特定の細胞において表される特徴が多いほど、内皮細胞系列の細胞として特徴決定することができる。少なくとも２、３、５、７又は９個のこれらの特徴を有する細胞がより一層好まれる。培養容器又は投与用調合薬において表されうる特定の細胞個体群を参照すると、細胞の間でのこれらの特徴の発現の均一性が多くの場合に有利である。この状況では、少なくとも４０％、６０％、８０％、９０％、９５％又は９８％の細胞が所望の特性を有する個体群が、より一層好まれる。

【０１９３】

ＶＩＩ．内皮細胞の使用

本発明の特定の態様の方法及び組成物によりもたらされる内皮細胞を、多様な用途に使用することができる。これらには、幾つか上げると、インビボでの内皮細胞の移植又は内移植；インビトロでの細胞毒性化合物、発癌物質、突然変異原増殖／調節因子、医薬化合物などのスクリーニング；心血管疾患及び損傷の機構の解明；薬剤及び／又は増殖因子が作動する機構の研究；患者における癌の診断及びモニタリング；遺伝子療法；並びに生物学的に活性な産物の産生が含まれるが、これらに限定されない。

【０１９４】

Ｂ．試験化合物のスクリーニング

本発明のプログラミング誘導内皮細胞を使用して、本明細書において提供される内皮細胞の特性に影響を与える因子（例えば、溶媒、小型分子薬剤、ペプチド及びポリヌクレオチド）又は環境条件（例えば、培養条件若しくは操作）をスクリーンすることができる。

【０１９５】

幾つかの用途において、幹細胞（分化又は未分化）は、内皮細胞系列に沿った細胞の成熟を促進する又は長期培養においてそのような細胞の繁殖及び維持を促進する因子をスクリーンするために使用される。例えば、候補内皮細胞成熟因子又は増殖因子は、これらを異なるウエルの幹細胞に加え、次に更なる培養又は細胞の使用に望ましい基準に従って、得られた任意の表現型変化を決定することにより試験される。

【０１９６】

本発明の特定のスクリーニング用途は、薬剤研究における医薬化合物の試験に関する。読者は、一般に、標準的な教科書のIn vitro Methods in Pharmaceutical Research、アカデミックプレス社、１９９７及び米国特許第５，０３０，０１５を参照すること。本発明の特定の態様において、内皮系列になるようにプログラムされた細胞は、短期培養において内皮細胞系統又は一次内皮細胞に対して以前に実施されているものと同じような標準的薬剤スクリーニング及び毒性アッセイのために、試験細胞の役割を果たす。候補医

薬化合物の活性についての評価は、一般に、本発明の特定の態様においてもたらされる内皮細胞を候補化合物と組み合わせること、化合物に寄与する細胞の形態、マーカー表現型又は代謝活性における（未処理細胞又は不活性化合物で処理した細胞と比較した）あらゆる変化を決定すること、次に化合物の効果を観察された変化と相関させることを伴う。スクリーニングは、化合物が内皮細胞に対して薬理学的効果を有するように設計されているため又は他に効果を有するように設計した化合物が意図されない内皮細胞副作用を有する場合があるため、実施することがある。２つ以上の薬剤を、可能性のある薬剤－薬剤相互作用の効果を検出するために、（同時又は連続的のいずれかで細胞と組み合わせることにより）組み合わせて試験することができる。

【０１９７】

幾つかの用途において、化合物は内皮細胞に対する毒性についてスクリーンされる。例えば、Kuzuya et al, 2001を参照すること。他の用途では、本明細書に開示されているプログラミング方法により誘導された内皮細胞は、化合物の血管透過性を試験するために使用される。

【０１９８】

Ｃ．内皮細胞療法及び移植

本発明は、おそらく心血管疾患、心血管損傷又は組織損傷に起因する、肝機能の程度の回復をそのような療法の必要な被験者に行う、本明細書において提供される内皮細胞の使用も提供する。例えば、本明細書に開示されている方法により誘導される内皮細胞又は内皮前駆細胞を、例えばDzau et al, 2005及びLi et al, 2009に開示されているように、血管疾患、心血管疾患、虚血性疾患、血管若しくは他の組織の損傷の治療（例えば、移植片の操作による）又は高血圧症の治療に使用することができる。

【０１９９】

本明細書において提供される内皮細胞の治療用途における適合性を決定するために、細胞を最初に適切な動物モデルで試験することができる。あるレベルにおいて、細胞を、インビボにおいて表現型を生存及び維持する能力について評価する。本明細書において提供される内皮細胞を、免疫不全動物（例えば、ＳＣＩＤマウス又は化学的若しくは照射により免疫不全にした動物）の、腎臓皮膜の下、脾臓の中又は肝小葉の中のような更なる観察のために扱いやすい部位に投与する。組織を数日から数週間又はそれ以上の期間の後で採取し、多能性幹細胞のような出発細胞型が依然として存在するかを評価する。これは、検出可能な標識（例えば、緑色蛍光タンパク質又はβ－ガラクトシダーゼ）を有する投与細胞を準備することにより又は投与細胞に特異的な構成的マーカーを測定することにより実施することができる。本明細書において提供される内皮細胞が齧歯類モデルで試験される場合、投与細胞の存在及び表現型は、ヒト特異的抗体を使用する免疫組織化学若しくはＥＬＩＳＡにより又はヒトポリヌクレオチド配列に特異的になるように増幅を引き起こすプライマー及びハイブリダイゼーション条件を使用するＲＴ－ＰＣＲ分析により評価することができる。ｍＲＮＡ又はタンパク質レベルでの遺伝子発現を評価するのに適したマーカーは、本開示の他の部分に提供されている。

【０２００】

本発明の方法によりもたらされる内皮細胞及び内皮前駆細胞を、心血管疾患、血管疾患、血管損傷、組織損傷などを治療する能力について多様な動物モデルで試験することができる。本発明の特定の態様における使用が見出されうる多様なそのような動物モデルは、例えば、Dzau et al, 2005及びLi et al, 2009において考察されている。

【０２０１】

のプロフィール酵素又は動物モデルにおける効力によると望ましい機能的特性を示す本発明の特定の態様においてもたらされる内皮細胞及び内皮前駆細胞は、それを必要とするヒト被験者への直接投与に適切でありうる。止血の目的では、細胞を、循環への適切な経路を有する任意の部位に投与することができる。内皮細胞を損傷又は疾患の部位に送達することもできる。

【０２０２】

本発明の特定の態様においてもたらされる内皮細胞又は内皮前駆体を、それを必要とする任意の被験者の療法に使用することができる。そのような療法に適切でありうるヒトの状態には、心血管疾患、血管疾患、虚血、血管損傷、組織損傷、糖尿病、冠動脈疾患、アテローム動脈硬化症、末梢動脈疾患、動脈瘤又は高血圧症が含まれる。ヒトの療法において、用量は、一般に約10^9～10^{12}個の細胞、典型的には約5×10^9～5×10^{12}個の細胞であり、被験者の体重、罹患の性質及び重篤度、並びに投与細胞の複製能力によって調整される。治療の様式及び適切な用量を決定する最終的な責任は、管理する医師にある。

【０２０３】

本発明の特定の態様は、生物工学により作られた組織移植片の一部を形成する、本明細書において提供される内皮細胞又は内皮前駆細胞を含む。そのような組織移植片は、心臓組織移植片（例えば、米国特許出願第２００８０１９９８４３号を参照すること）、血管化組織移植片（例えば、米国特許出願第２００７０２９９５０８号を参照すること）又は当該技術において既知の他の任意の組織移植片（例えば、米国特許出願第２００８００６３６２７号；同第２００７０１８４１２２号；同第２００７０１４１０３７号；同第２０１００１４５４４４号；同第２００９０３２４６８３号；同第２００９０１４９５６９号；同第２００７０１２２３８８号を参照すること）でありうる。

【０２０４】

Ｄ．市販、治療及び研究目的の配布

製造、配布及び使用の目的で本発明の内皮系列の細胞を、典型的には、輸送又は保存を促進するために場合により凍結される、等張賦形剤又は培養培地中の細胞培養又は懸濁液の形態で供給することができる。

【０２０５】

本発明は、製造、配布又は使用の間の任意の時点で存在する細胞のセット又は組み合わせを含む異なる試薬系も含む。細胞のセットは、未分化幹細胞、体細胞誘導内皮細胞又は他の分化細胞型と組み合わせたプログラミング誘導細胞（内皮系列細胞、これらの前駆体及びサブタイプ）が例示されるがこれらに限定されない、本開示に記載されている２つ以上の細胞個体群の任意の組み合わせを含む。セットにおける細胞個体群は、時々、同じゲノム又はその遺伝子修飾形態を共有する。セットのそれぞれの細胞型を、一緒に又は同じ設備若しくは異なる場所で別々の容器に、同時若しくは異なる時点において、取引関係を共有する同じ実体又は異なる実体の制御下でパッケージすることができる。

【０２０６】

ＶＩＩＩ．プログラミングにおける候補遺伝子を試験する細胞及び方法

内皮細胞のような特定の細胞型のプログラミング因子として作用する特定の候補遺伝子又は候補遺伝子の組み合わせの能力を、本開示に提供される方法及び細胞を使用して試験することができる。プログラミングにおける特定の候補遺伝子又は候補遺伝子の組み合わせの効力は、細胞形態、マーカー発現、酵素活性、繁殖能力又は目的の他の特徴に対する効果により評価し、次に候補遺伝子又は組み合わせを含まない平行培養との比較により評価することができる。候補遺伝子は、望ましい細胞型への分化又は望ましい細胞型の機能に重要な転写因子でありうる。

【０２０７】

特定の態様において、候補遺伝子又は候補遺伝子の組み合わせの発現のために少なくとも１つの発現カセットを含む、多能性幹細胞のような出発細胞を提供することができる。発現カセットは、誘導性プロモーターのような、外部制御可能転写調節エレメントを含むことができる。これらのプロモーターの活性は、生物又は非生物因子の存在又は不在により誘導することができる。誘導性プロモーターは、遺伝子操作の非常に強力なツールであり、それは、これらに機能的に結合した遺伝子の発現が、生物体又は特定の組織の発育の特定の段階においてオン又はオフになりうるからである。大腸菌テトラサイクリン抵抗性オペロンの必須調節成分に基づいたＴｅｔオン及びＴｅｔオフ誘導性遺伝子発現系を使用することができる。出発細胞において確立されると、インデューサードキシサイクリン（

Ｄｏｘ、テトラサイクリン誘導体）は、発現系を用量依存的に制御することができ、候補遺伝子の発現レベルを正確に調節することを可能にする。

【０２０８】

所望の細胞型の同定を助けるため、出発細胞は、細胞特異的又は組織特異的レポーター発現カセットを更に含むことができる。　レポーター発現カセットは、所望の細胞型に特異的な転写調節エレメントと機能的に結合しているレポーター遺伝子を含むことができる。例えば、レポーター発現カセットは、内皮細胞の産生、単離、選択又は豊富化のために、内皮細胞特異的プロモーターを含むことができる。レポーター遺伝子は、当該技術に既知の任意の選択可能又はスクリーン可能なマーカー遺伝子であり、前述の開示に例示されている。

【実施例】

【０２０９】

ＩＸ．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を示すために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能する、本発明者たちにより発見された技術を表し、したがって、その実施の好ましい様式を構成することが考慮できることが、当業者には理解されるべきである。しかし、当業者は、本発明の開示を考慮すると、多くに変更を開示されている特定の実施態様に行うことができ、依然として、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく同様又は類似の結果が得られることを理解するべきである。

【０２１０】

実施例１－内皮細胞へのフォワードプログラミング

ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣからの内皮細胞分化の代替的な手法が図１に示される。内皮細胞は、通常の分化（下側の囲み）において必要とされる発育段階の全てでなければ大部分を迂回する、適切な導入遺伝子又は導入遺伝子の組み合わせの発現を介して（上側の囲み）、ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣから効率的に誘導できる可能性がある。

【０２１１】

ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣを成熟内皮細胞に直接変換することができる導入遺伝子を同定するのに用いられる戦略（図２）。ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣを、誘導性遺伝子発現のためにｒｔＴＥＴを構成的に発現するように操作した。誘導性プロモーターＰｔｉｇｈｔの制御下の導入遺伝子を、操作済ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにエレクトロポレーションにより導入した。ドキシサイクリン（Ｄｏｘ）の添加により、導入遺伝子発現を誘導し、ＥＣ分化を、フローサイトメトリーにより、ＥＣマーカー（ＣＤ３１、ＣＤ１４４（ＶＥ－カドヘリン））の発現と共に特徴的なＥＣ形態によってモニターする。このようのプログラムされた内皮細胞を、インビトロ及びインビボ機能性アッセイのために精製する。

【０２１２】

内皮細胞分化のためのヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣ誘導性（Ｒ／Ｉ）系統の確立（図３）。染色体３のヒトＲｏｓａ２６座を選択して、ｒｔＴＥＴの発現を可能にし、同時に、染色体位置依存性サイレンシング効果を最小限にした。最初にＬｏｘＰ組み換え部位（ＬＯＸ７１及びＬＯＸ２２７２）を、ヒトＲＯＳＡ２６遺伝子のエクソン１とエクソン２の間の部位に相同組み換えにより導入した。標的作成物（ＫＩ作成物）は、負の選択のためにジフテリア毒素Ａフラグメント遺伝子（ＤＴＡ）のホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター（ＰＧＫ）駆動発現を使用し、約２．０ｋｂの５’アーム及び４．５ｋｂの３’アームを含有する。ヒトＢＣＬ２遺伝子（ＳＡ）からのスプライシングアクセプターシグナルをＬＯＸ７１部位の前に配置して、内在性ヒトＲＯＳＡ２６プロモーターからの選択マーカーの発現を可能にした。チミジンキナーゼ（ＴＫ）のコード領域を含めて、ガンシクロビルの使用による工程２での不正確なＣｒｅ／ＬｏｘＰ組み換え事象に対する負の選択を可能にした。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（Ｎｅｏ）を、相同組み換え（工程１）の際に正の選択に使用した。口蹄疫ウイルスペプチド（２Ａ）を使用して、内在性ヒトＲＯＳＡ２６プロモーターからＴＫとＮｅｏの遺伝子を同時発現した。ＢＧＨｐＡは、ウシ成長ホルモン遺伝子から誘導されるポリアデニル化シグナルである。相同組み換えは、Ｃ

ｒｅ／ＬｏｘＰ組み換えを介する効率的なカセット交換のために親ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣ系統を生じた。

【０２１３】

内皮細胞分化の誘導性細胞系統を確立するために、構成的に活性な真核生物延長因子１αプロモーター（ｐＥＦ）により駆動されたｒｔＴＥＴを、組み換え仲介カセット交換（ＲＭＣＥ）ベクター及びＣｒｅ発現プラスミドの脂質媒介同時形質移入によりＲｏｓａ２６座に導入した。ピューロマイシンＮアセチルトランスフェラーゼ（Ｐｕｒｏ）を使用して、組み換え事象を選択した。正確に組み換えられた誘導性細胞は、ピューロマイシン（Ｐｕｒｏ＋）及びガンシクロビル（ＴＫ－）に抵抗性があり、ジェネテシン選択（Ｎｅｏ－）に対して感受性がある。

【０２１４】

ヒトＨ１　ＥＳＣ誘導性系統におけるＴｅｔオン誘導性遺伝子発現の確認（図４）。図４Ａは、２ベクターＰｉｇｇｙＢａｃ安定遺伝子発現系を示す。Ｐｔｉｇｈｔは、ｒｔＴＥＴ反応性の誘導性プロモーターであり；ｐＥＦは、真核生物延長因子１αプロモーターであり；ｈＰＢａｓｅは、ヒト細胞における発現が最適化されているコドンを有するＰｉｇｇｙＢａｃトランスポサーゼのコード領域である。

【０２１５】

Ｐｔｉｇｈｔプロモーターにより駆動されるＥＧＦＰを、図４Ａに示されている両方のＦｕｇｅｎｅ　ＨＤ仲介形質導入を使用してヒトＥＳＣ誘導性系統に導入した。安定したＰｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン組み込みを有するヒトＥＳＣを、ジェネテシン（１００μ／ｍＬ）で選択した。細胞を、ドキシサイクリン（１μｇ／ｍＬ）を用いる又は用いない誘導の２日後に観察し、ドキシサイクリン誘導細胞におけるＥＧＦＰ発現を顕微鏡で確認した。図４ＢＮは、ドキシサイクリン（１μｇ／ｍＬ）を用いる又は用いない誘導の４日後のヒトＥＳＣ誘導性系統におけるＥＧＦＰ発現のフローサイトメトリー分析を示す。灰色線は、ＥＧＦＰベクターでの形質移入によるヒトＥＳＣ誘導性系統であり；黒色線は、ドキシサイクリンを用いる又は用いない誘導の４日後の安定したＰｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン組み込みを有するヒトＥＳＣ　Ｒ／Ｉ系統である。

【０２１６】

ＥＲＧ－３発現を介するヒト胚幹細胞（ＥＳＣ）誘導性系統からの内皮細胞（ＥＣ）のフォワードプログラミング（図５）。ＥＲＧ－３を、Ｐｔｉｇｈｔプロモーターの制御下でＰｉｇｇｙＢａｃベクター（図４Ａ）にクローンし、ｈＰＢａｓｅ発現ベクターと共に、エレクトロポレーションによりヒトＥＳＣ誘導性系統に導入した。形質移入細胞を、安定したゲノム導入遺伝子組み込みを有する形質転換体の選択のために、ジェネテシン（１００μｇ／ｍｌ）の存在下でマトリゲルのＴｅＳＲ培地で培養した。ドキシサイクリン（０．２μｇ／ｍｌ）を加えてＥＲＧ発現を誘導し、ＴｅＳＲを、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ（両方ともペプロテック社）を補充した内皮無血清培地（ＥＳＦＭ；インビトロゲン社）に代えた。分化細胞は、ＥＲＧ誘導の２～３日目にＥＣ形態を得る。図５に示されているように、フォワードプログラムされたＥＣの明視野像は、ＥＣ形態を示した。

【０２１７】

ＥＲＧ－３がこれらの実験のために選択されたが、他のＥＲＧアイソフォーム（ＥＲＧ－１、ＥＲＧ－２及びＥＲＧ－４を含む）も同様の結果をもたらした。したがって、ＥＲＧアイソフォーム３は、一貫してより効率的なアイソフォームなので実験のために選択されたが、他の全てのアイソフォームを使用することもでき、それは全てのアイソフォームがフォワードプログラミングにより内皮細胞をもたらすからである。

【０２１８】

ＥＴＶ２発現を介するヒト胚幹細胞（ＥＳＣ）誘導性系統からの内皮細胞（ＥＣ）のフォワードプログラミング。ＥＴＶ２を、Ｐｔｉｇｈｔプロモーターの制御下でＰｉｇｇｙＢａｃベクター（図４Ａ）にクローンし、次にｈＰＢａｓｅ発現ベクターと共に、エレクトロポレーションによりヒトＥＳＣ誘導性系統に導入した。形質移入細胞を、安定したゲ

ノム導入遺伝子組み込みを有する形質転換体の選択のために、ジェネテシン（１００μｇ／ｍｌ）の存在下でマトリゲルのＴｅＳＲ培地で培養した。ドキシサイクリン（０．２μｇ／ｍｌ）を加えてＥＴＶ２発現を誘導し、ＴｅＳＲを、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ（両方ともペプロテック社）を補充した内皮無血清培地（ＥＳＦＭ；インビトロゲン社）に代えた。分化細胞は、ＥＴＶ２誘導の２～３日目にＥＣ形態を得る。図６から分かるように、フォワードプログラムされたＥＣの明視野像は、ＥＣ形態を示した。

【０２１９】

フォワードプログラムされたＥＣにおけるマーカーのフローサイトメトリー発現分析。ＥＲＧ－３誘導分化細胞は、ＥＣマーカー（ＣＤ１４４及びＣＤ３１）の発現を上方制御し、一方、ヒト多能性幹細胞マーカーＴＲＡ－１－６０の発現を下方制御した（図７）。ＥＴＶ２誘導分化細胞は、ＥＣマーカー（ＣＤ１４４及びＣＤ３１）の発現を上方制御し、一方、ヒト多能性幹細胞マーカーＴＲＡ－１－６０の発現を下方制御した（図８）。経時的にＥＲＧ－３誘導ＥＣ及びＥＴＶ２誘導ＥＣは、ＥＣマーカー（ＣＤ３１、ＣＤ１４４，ＥＳＡＭ、ＣＤ３４）の発現を増加したが、造血マーカー（ＣＤ４３、ＣＤ４５、ＣＤ４１ａ、ＣＤ２３５ａ）を増加しなかった（図９）。

【０２２０】

フォワードプログラミングと通常の分化との比較。誘導３日目の細胞培養を、Ａｃｃｕｔａｓｅ処理（インビトロゲン社）により解離して単一細胞懸濁液にし、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦを補充したＥＳＦＭにおいてゼラチン被覆プラスチックで平板培養した。２時間平板培養した後、非接着性細胞を含有する培地を除去し、結合細胞を、１０ｎｇ／ｍｌの塩基性ＦＧＦ及び５μｇ／ｍｌのヒトフィブロネクチン（インビトロゲン社）を補充したＥＳＦＭで培養した。ＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの形態は、ＨＵＶＥＣ及びＥＥＣと高度に類似していた（図１０）。

【０２２１】

動脈ＥＣマーカーのフローサイトメトリー分析。ＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣにおける動脈ＥＣの３つのマーカー（ＣＤ３０４／ＮＲＰ１、ＣＤ１８４及びＤＬＬ４）全ての発現は、ＨＵＶＥＣ及びＥＥＣと異なるこれらの誘導ＥＣの動脈への運命を示唆する（図１１）。

【０２２２】

ＨＵＶＥＣにおいて見出されるマーカーの分析。ＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣは、ＨＵＶＥＣと比較して、ＣＤ１４４、ｖＷＦ及びｅＮＯＳと同様の染色パターンを示す（図１２）。ＤＡＰＩを使用して、核を対比染色した。染色はＨＵＶＥＣよりも一般に弱かったが、ｖＷＦはＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣの両方において明確に発現した。

【０２２３】

密着結合において見出されるタンパク質の分析。密着結合タンパク質のクローディン５及びＺＯ－１は、ＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣに発現する（図１３）。

【０２２４】

フォワードプログラムされたＥＣは、ＥＣの機能的特性を示す。Ａｃ－ＬＤＬを、ＥＲＧ－３－ＥＣ及びＥＴＶ２－ＥＣにより組み込んだ（図１４）。ＥＣを、ＡｃＬＤＬ－Ｄｉｌ接合体（インビトロゲン社、２μｇ／ｍｌ）と共に３７℃で４時間インキュベートし、続いて対比染色のために０．５μｇ／ｍｌのＨｏｅｃｈｓｔ　３３２５８と共に５分間インキュベートした。フローサイトメトリー分析では、Ａｃ－ＬＤＬ処理培養を、Ａｃｃｕｔａｓｅ解離の前に新たな培地で一晩培養した。未処理ＥＣを対照として使用した。バリア機能試験は、ＥＲＧ－３－ＥＣがＨＵＶＥＣと類似していることを明らかにした（図１５）。特に、ＥＲＧ－３－ＥＣは、ＨＵＶＥと比較してバリア機能回復において同様の動態を示したが、ＥＴＶ２－ＥＣは遅く、ＥＲＧ－３－ＥＣとＥＴＶ２－ＥＣがバリア機能に関して異なっていることを示唆した。ＥＲＧ－３－ＥＣは、また、凝固マトリゲルで平板培養したとき、管を形成する能力においてＨＵＶＥＣと類似していた（図１６）。

【０２２５】
フォワードプログラムされたＥＣの血液生成機能。ＥＴＶ２及びＥＲＧ－３誘導は、５０％のＥＳＦＭ、５０％のＳｔｅｍＬｉｎｅ　ＨＳＣ培地（シグマ社）、１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ、５ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ、５０ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、２０ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、１０ｎｇ／ｎｌのＴＰＯ、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ３及び２０ｎｇ／ｍｌのＩＬ６を含有する培地において実施した。造血細胞は（ＣＤ３１＋ＣＤ４３＋表現型により定義された）、ＥＴＶ２において検出されたが、ＥＲＧ－３誘導培養では検出されなかった（図１８）。９日目のＥＴＶ２培養における大部分の造血細胞もＣＤ２３５ａ／ＣＤ４１ａ－ＣＤ４５＋であり、最終的に造血であることが示唆された。

【０２２６】
フォワードプログラムされたＥＣの間葉生成の可能性。ＥＲＧ－３－ＥＣを、１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ２を含有し、２０ｎｇ／ｍｌのＶＥＧＦ又は１μｇ／ｍｌのＡ８３－０１（ＴＧＦβインヒビター）のいずれかを追加的に補充したＥＳＦＭにおいて培養した。間葉細胞（ＣＤ３１－ＣＤ７３＋ＣＤ１０５＋表現型により定義される）へのＥＲＧ－３－ＥＣの漸進的な移行が、ＦＧＦ＋Ａ８３－０１を含有する培養において観察されたが、ＦＧＦ＋ＶＥＧＦでは観察されなかった（図１９）。ＥＴＶ２－ＥＣ細胞は同様の間葉移行を受けたが、効率はＥＲＧ－３－ＥＣよりも低かった。

【０２２７】
実施例２－内皮細胞又は内皮前駆体細胞への分化転換
フォワードプログラミングと同様に、内皮細胞又は内皮前駆体細胞を、皮膚線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、角化細胞及び血球のようなヒト体細部からの分化転換により得ることもできる。体細胞を内皮細胞又は内皮前駆体細胞に変換することができる遺伝子を同定するために、レンチウイルス導入遺伝子送達系を、候補遺伝子の誘導性発現に使用することができる（ＴＥＴオン系と呼ばれる）。簡潔には、サイトメガウイルス（ＣＭＶ）プロモーターが、ｒｔＴＥＴタンパク質の発現を駆動するために使用され、候補遺伝子は、ｒｔＴＥＴ反応性の誘導性プロモーター（Ｐｔｉｇｈｔと呼ばれる）の制御下に置かれる。ｒｔＴＥＴと導入遺伝子発現レンチウイルスの両方を使用して、細胞に同時形質導入する。ドキシサイクリン（０．２～１μｇ／ｍＬ）を形質導入細胞に加えて、導入遺伝子の発現を誘導し、細胞培養培地を内皮細胞培養培地に代えて、プログラミングを支持する。あるいは、ｐｉｇｇｙＢａｃベクター系（レンチウイルス送達系ではなく）を、候補遺伝子の誘導性発現に使用することができる。

【０２２８】
内皮細胞又は内皮前駆体の確認は、ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣからのフォワードプログラミングと同様に実施され、形態的特徴、細胞表面マーカー発現及び機能的特性を含むことができる。ＥＲＧ及びＥＴＶ２のような、ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣからのフォワードプログラミングにより同定される遺伝子は、内皮細胞又は内皮前駆体へのヒト体細胞の分化転換に使用される強力な候補であるが、追加のプログラミング遺伝子（例えば、ＯＣＴ４のようなｉＰＳＣ再プログラミング遺伝子）が、体細胞において確立された分化状態を不安定化して、最適なプログラミング効率を達成するために必要でありうる。

【０２２９】
本明細書に開示及び請求されている全ての方法を、本開示を考慮して過剰な実験をすることなく作製及び実施することができる。本発明の組成物及び方法は好ましい実施態様に関して記載されてきたが、本発明の概念、精神及び範囲を逸脱することなく、本明細書に開示されている方法及び方法の工程又は一連の工程に変形を適用できることは、当業者には明白である。より詳細には、科学的にも生理学的にも関連する特定の作用物質を、本明細書に記載の作用物質で置換することができ、同じ又は同様の結果が達成されることは明白である。そのような同様の置換及び変更は、全て、当業者に明白であり、添付の請求項で定義されている本発明の精神、範囲及び概念の範囲内であると見なされる。

【０２３０】
参考文献

例示的な手順又は本明細書に記載されたものへの他の詳細な補足を提供する程度の以下の参考文献は、参照として本明細書に特定的に組み込まれる。

米国特許第４，６８３，２０２号
米国特許第５，０３０，０１５号
米国特許第５，３０２，５２３号
米国特許第５，３２２，７８３号
米国特許第５，３８４，２５３号
米国特許第５，４６０，９６４号
米国特許第５，４６４，７６５号
米国特許第５，４８６，３５９号
米国特許第５，４８６，３５９号
米国特許第５，５３８，８７７号
米国特許第５，５３８，８８０号
米国特許第５，５５０，３１８号
米国特許第５，５６３，０５５号
米国特許第５，５８０，８５９号
米国特許第５，５８９，４６６号
米国特許第５，５９１，６１６号
米国特許第５，６１０，０４２号
米国特許第５，６３５，３８７号
米国特許第５，６５６，６１０号
米国特許第５，６７７，１３６号
米国特許第５，６８１，５９９号
米国特許第５，７０２，９３２号
米国特許第５，７１６，８２７号
米国特許第５，７３６，３９６号
米国特許第５，７３６，５２４号
米国特許第５，７５０，３９７号
米国特許第５，７５９，７９３号
米国特許第５，７８０，４４８号
米国特許第５，７８９，２１５号
米国特許第５，８１１，０９４号
米国特許第５，８２７，７３５号
米国特許第５，８２７，７４０号
米国特許第５，８３７，５３９号
米国特許第５，８３７，６７０号
米国特許第５，８４３，７８０号
米国特許第５，９２５，５６５号
米国特許第５，９２８，９０６号
米国特許第５，９３５，８１９号
米国特許第５，９４５，１００号
米国特許第５，９８１，２７４号
米国特許第５，９９４，１３６号
米国特許第５，９９４，６２４号
米国特許第６，０１３，５１６号
米国特許第６，１８４，０３８号
米国特許第６，８３３，２６９号
米国特許第６，９９１，８９７号
米国特許第７，０１５，０３７号
米国特許第７，３９９，６３２号

米国特許第７，４１０，７７３号
米国特許第７，４１０，７９８号
米国特許第７，４２２，７３６号
米国特許出願第０８／４６４，５９９号
米国特許出願第６１／０５８，８５８号
米国特許出願第６１／１７２，０７９号
米国特許出願第６１／１８４，５４６号
米国特許出願公開第２００２／０１０２２６５号
米国特許出願公開第２００３／００４００３８号
米国特許出願公開第２００３０２１１６０３号
米国特許出願公開第２００７０１２２３８８号
米国特許出願公開第２００７０１４１０３７号
米国特許出願公開第２００７０１８４１２２号
米国特許出願公開第２００７０２３８１７０号
米国特許出願公開第２００７０２９９５０８号
米国特許出願公開第２００８００６３６２７号
米国特許出願公開第２００８０１９９８４３号
米国特許出願公開第２００９０１４９５６９号
米国特許出願公開第２００９０３２４６８３号
米国特許出願公開第２０１００１４５４４４号
米国特許出願公開第２００３／００８２５６１号
米国特許出願公開第２０１０００８１１９３号
Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096,1988.
Alison et al., Hepatol, 29:678-83, 1998.
Amit et al., Dev. Bio., 227:271-278, 2000.
Andrews et al., In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, Robertson (Ed.), IRL Press, 207-246,1987.
Asoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(26): 17107-12, 2002.
Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.
Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1994.
Bhardwaj et al., Nat. Immunol, 2: 172-180, 2001.
Bhatia et al., J. Exp. Med., 189: 1139-1148, 1999.
Blomer et al., J. Virol, 71(9): 6641-6649, 1997.
Boyer et al., Cell, 122(6):947-56, 2005.
Buss et al., Mol. Cell. Biol, 8:3960-3963, 1988.
Byrne et al., Nature, 450(7169):497-502, 2007.
Cassiede et al., J. Bone Miner. Res., 11(9): 1264-1273, 1996.
Chadwick et al., Blood, 102(3):906-915, 2003.
Chalupowicz et al., J. Cell Biol, 130(1):207-215, 1995.
Chambers et al., Cell, 113(5):643-55, 2003.
Chen and Okayama, Mol. Cell Biol, 7(8):2745-2752, 1987.
Collins et al., FASEB J, 9:899-909, 1995.
Current Protocols in Stem Cell Biology, Bhatia et al., (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2007. Davidson and Zon, Curr. Top Dev. Biol, 50:45-60, 2000.
Derossi et al., J. Bio. Chem., 269:10444-10450, 1994.
Derossi et al., J. Biol. Chem., 271:18188, 1996.
Derossi et al., Trends in Cell Biol, 8:84-87, 1998.

DeVal et al., Developmental Cell, 16(2): 180-195, 2009.
Dzau et al., Hypertension, 46:7-18, 2005.
Elliott and O'Hare, Cell, 88:223-234, 1997.
ヨーロッパ特許第１５０７８６５号
ヨーロッパ特許第０４１２７００号
Ercolani et al., J. Biol Chem., 263: 15335-15341,1988.
Evans, et al., In: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
Fawell et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 91:664-668, 1994.
Fecbhdmer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
Frankel and Pabo, Cell, 55(6):1189-1193, 1988.
Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al., (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
Gopal, Mol., Cell Biol, 5:1188-1190, 1985.
Graf et al., J. Cardiovas. Pharm., 20(Suppl. 9):SI6-820, 1992.
Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
Gronthos, Blood, 84(12):41644173, 1994.
Hancock et al., EMBO J., 10:4033-4039, 1991.
Harland and Weintraub, J. Cell Biol, 101(3):1094-1099, 1985.
Hill et al., Exp. Hematol, 24(8):936-943, 1996.
Ho et al., Cancer Res., 61(2):474-7, 2001.
Huber et al., Blood, 92: 4128-4137, 1998.
In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997.
Jaiswal et al., J. Cell Biochem., 64(2):295-312, 1997.
Johnstone et al., 238(l):265-272, 1998.
Kaeppler et al., Plant Cell Rep., 8:415-418, 1990.
Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.
Karin et al., Cell, 36: 371-379, 1989.
Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
Kilic et al., Stroke, 34:1304-10, 2003.
King, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol, 256:C1231-C1238, 1989.
Kirchmaier and Sugden, J. Virol, 72(6):4657-4666, 1998.
Klein et al., Nature, 327:70-73, 1987.
Kuzuya et al., Arterioscl, Thromb. Vascular Biol., 21: 765, 2001.
Langle-Rouault et al., J. Virol, 72(7):6181-6185, 1998.
Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23): 12616-12621, 1997.
Li et al., J. Cell Biochem., 106:194-199, 2009.
Lindgren et al., Trends in Pharmacol. Sci., 21:99-103, 2000.
Lindner et. al., J. Virol., 82(12): 5693-702, 2008.
Liu et al., Circulation Res., 77:638-643, 1995.
Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
Makino et al., J. Clin. Invest., 103(5):697-705, 1999.
Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
Mann and FrankeL EMBO J, 10: 1733-1739, 1991.
Mann et al., Cell, 33: 153-159, 1983.
Manno et al., Nat. Med., 12(3): 342-7, 2006.

Marshall et al., Blood, 96: 1591-1593, 2000.
McLaughlin et al., Blood, 98: 3332-3339, 2001.
Miller et al., Am. J. Clin. Oncol., 15(3): 216-221, 1992.
Ming et al., Molec. Cell. Biol., 22(24): 8467-8477, 2002.
Nabel et al., Science, 244(4910): 1342-1344, 1989.
Naldini et al., Science, 272(5259): 263-267, 1996.
Ng, Nuc. Acid Res., 17:601-615, 1989.
Nicolas and Rubenstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
Nicolau et al., Methods Enzymoh, 149:157-176, 1987.
Nikolova-Krstevski et al., BMC Developmental Biology, 9:72, 2009.
Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.
ＰＣＴ出願国際公開第０３／０５９９４０号
ＰＣＴ出願国際公開第０３／０５９９４１号
ＰＣＴ出願国際公開第９４／０９６９９号
ＰＣＴ出願国際公開第９４／０９６９９号
ＰＣＴ出願国際公開第９５／０６１２８号
ＰＣＴ出願国際公開第９６／３９４８７号
ＰＣＴ出願国際公開第９９／２０７４１号
ＰＣＴ出願国際公開第２００３／０４２４０５号
Pelletier and Sonenberg, Nature, 334:320-325, 1988.
Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
Potten, Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci., 353:821-30, 1998.
Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7161-7165, 1984.
Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264:9539-9545, 1989.
Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18:399B404, 2000.
Richards et al., Cell, 37: 263-272, 1984.
Rippe, et al., Mol. Cell Biol, 10:689-695, 1990.
Rothbard et al., Nat. Med., 6(11): 1253-7, 2000.
Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
Sambrook et al., In:Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (7)7:19-17.29, 1989.
Schlaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(7):3058-3063, 1997.
Schwarze et al., Science, 285(5433):1466-7, 1999.
Schwarze et al., Science, 285: 1569-1572, 1999.
Smith, In: Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol, 2000.
Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676, 2006.
Takahashi et al., Cell, 126(4):663-76, 2007.
Takahashi et al., Cell, 131:861-872, 2007.
Tanaka et al., J. Immunol, 170(3):1291-8, 2003.
Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
Thomson and Marshall, Curr. Top. Dev. Biol, 38:133-165, 1998.
Thomson and Odorico, J. Trends. Biotechnol, 18:53-57, 2000.
Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.

Thomson et al., Science, 282:1145, 1998.
Tur-Kaspa et al., Cell Biol, 6:716-718, 1986.
Vlaeminck-Guillem et al. Mechanisms of Development, 91:331-335, 2009.
Voyta et al., J. Cell Biol, 99:2034-2040, 1984.
Wang et al., Nature Biotech., 25(3):317-318, 2007.
Watt, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 353:831, 1997.
Wender et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(24):13003-8, 2000.
Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989.
Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980.
Wu and Wu, Biochemistry, 27:887-892, 1988.
Wu and Wu, J Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987.
Xu et al., Nat. Biotechnol, 19:971-974, 2001.
Yamamoto et al., Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 71(3):484-89, 2009. Yang and Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-4148, 1990.
Ying et al., Cell, 115:281-292, 2003.
Yoo et al., J. Bone Joint Sure. Am., 80(12):1745-1757, 1998.
Yu and Thompson, Genes Dev., 22(15):1987-97, 2008.
Yu et al., Science, 318:1917-1920, 2007.
Yu et al., Science, 324(5928):797-801, 2009.
Zufierey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, 1997.

【図１】

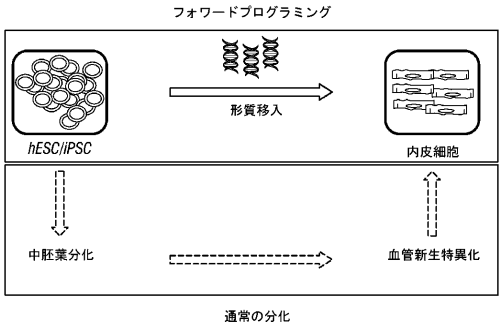

図１

【図２】

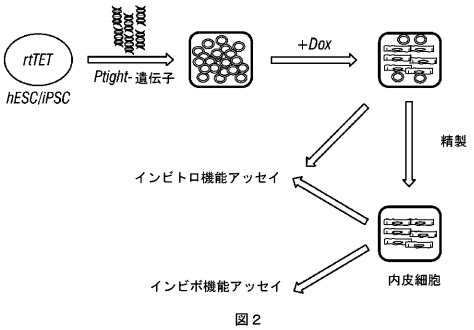

図２

【図３】

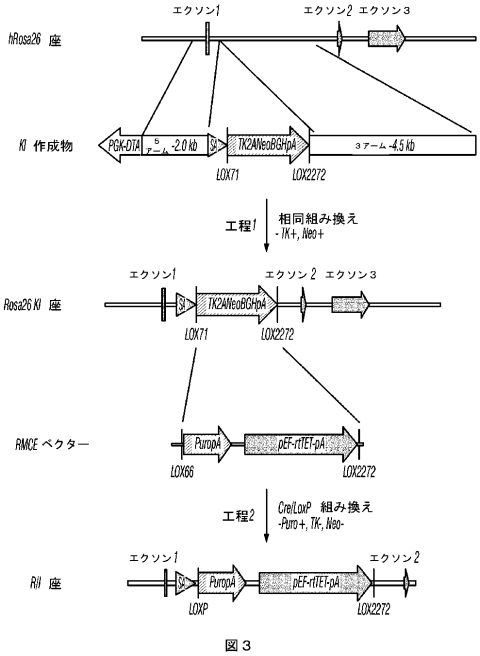

図３

【図４Ａ】

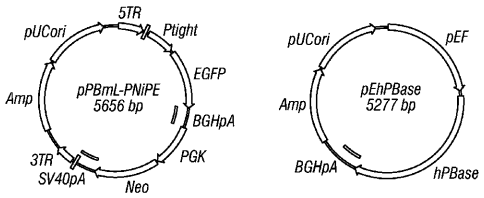

図４Ａ

【図４Ｂ】

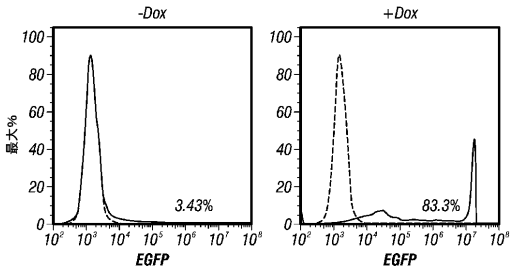

図４Ｂ

【図５】

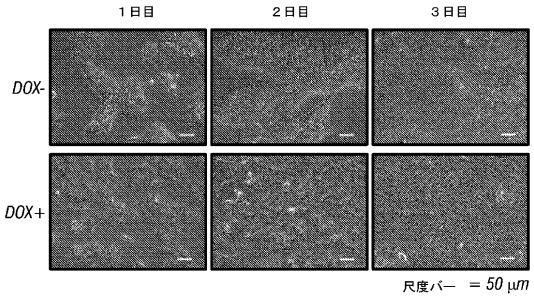

図５

【図６】

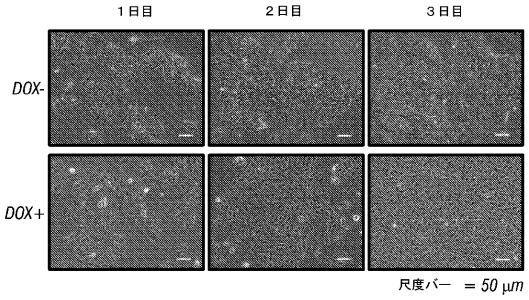

図６

【図７】

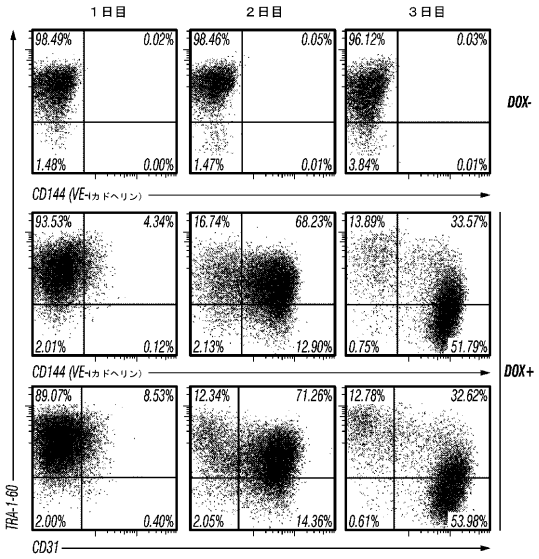

図７

【図８】

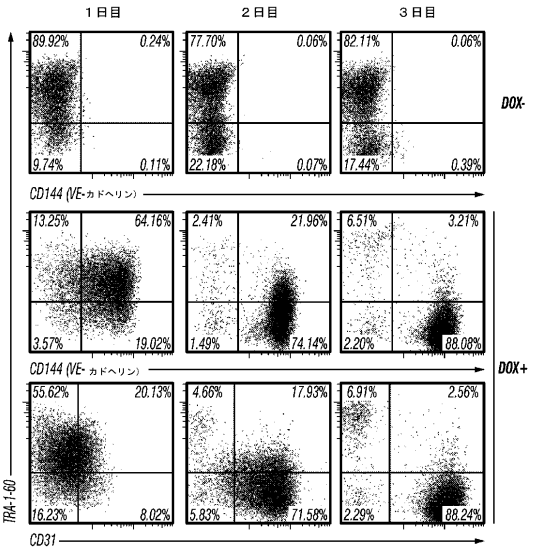

図８

【図９】

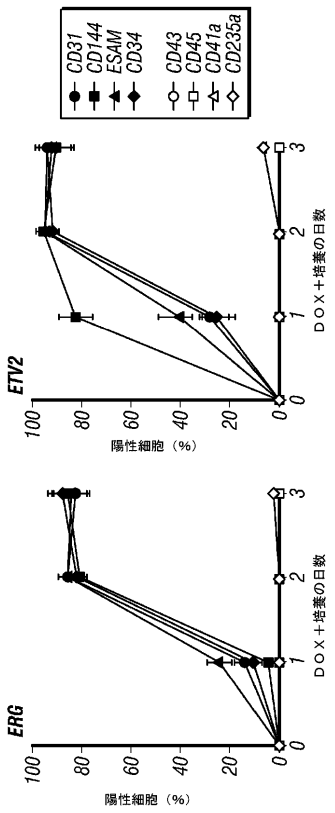

図９

【図１１】

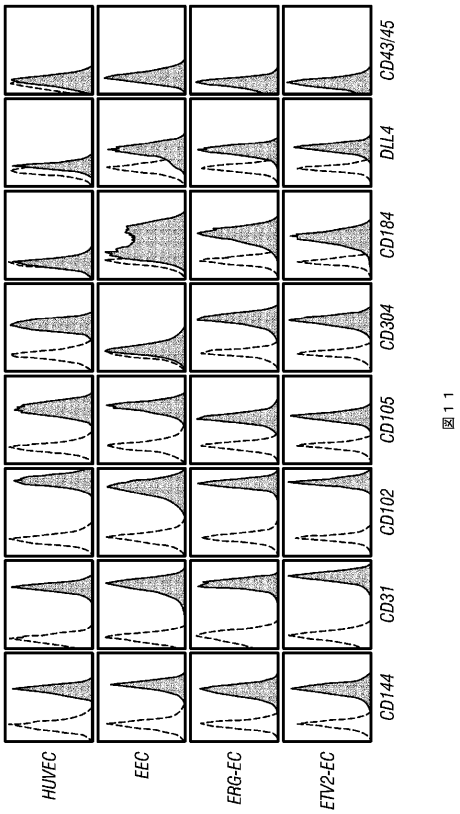

図１１

【図１５】

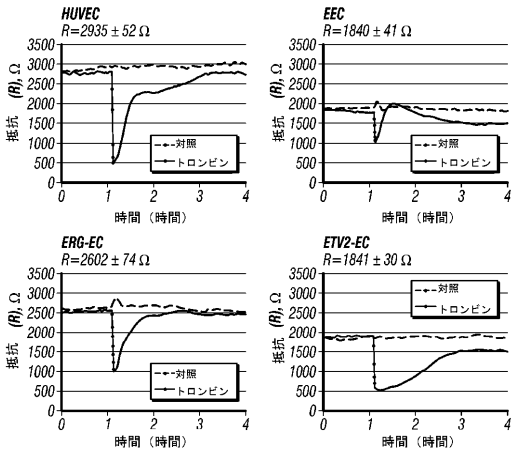

図１５

【図１７】

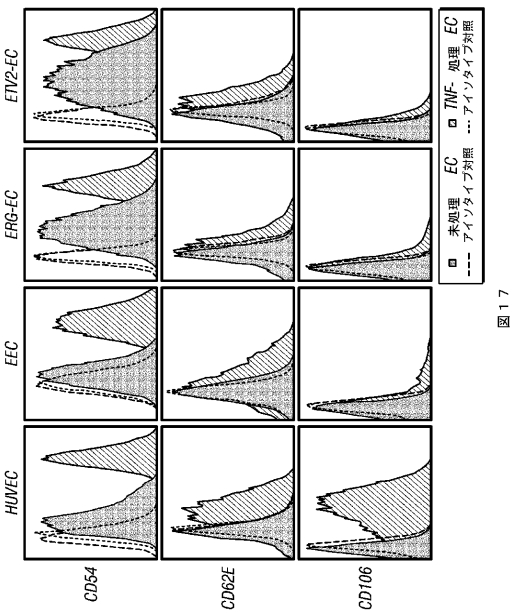

図１７

【図１０】

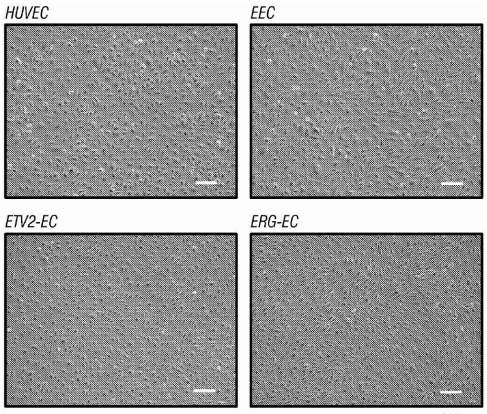

図１０

【図１２】

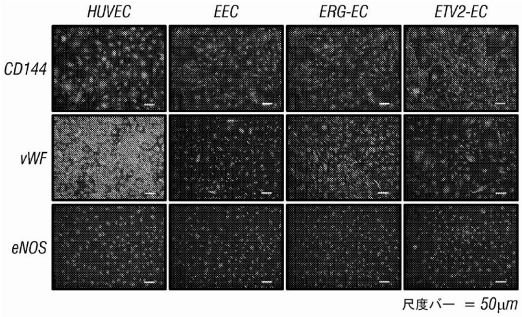

図１２

【図１３】

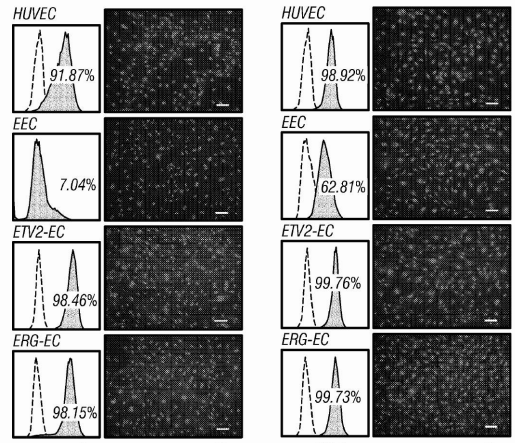

図１３Ａ　図１３Ｂ

【図１４】

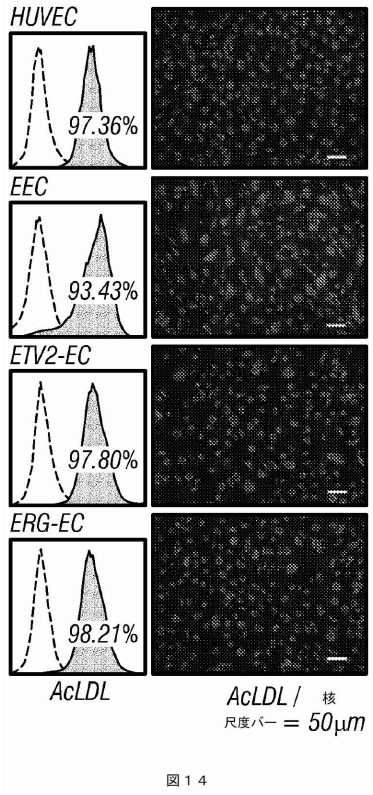

図１４

【図１６】

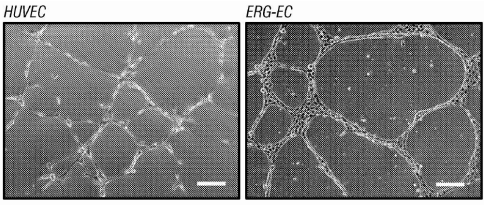

図１６

【図１８】

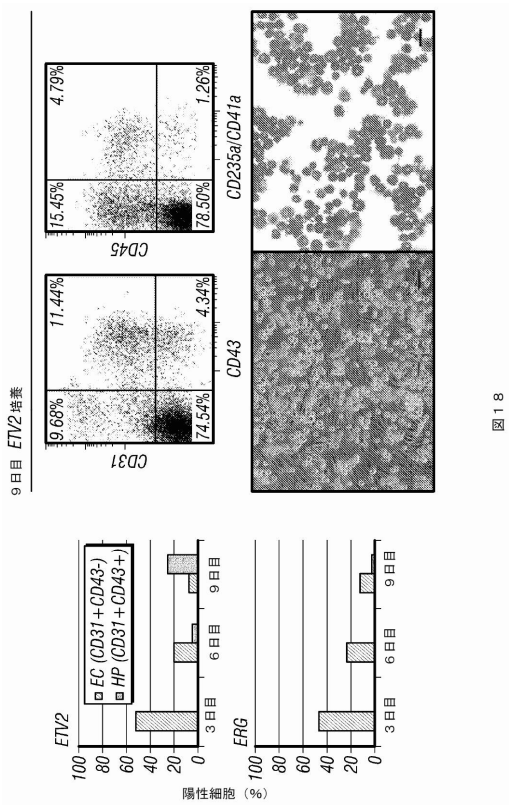

図１８

【図１９】

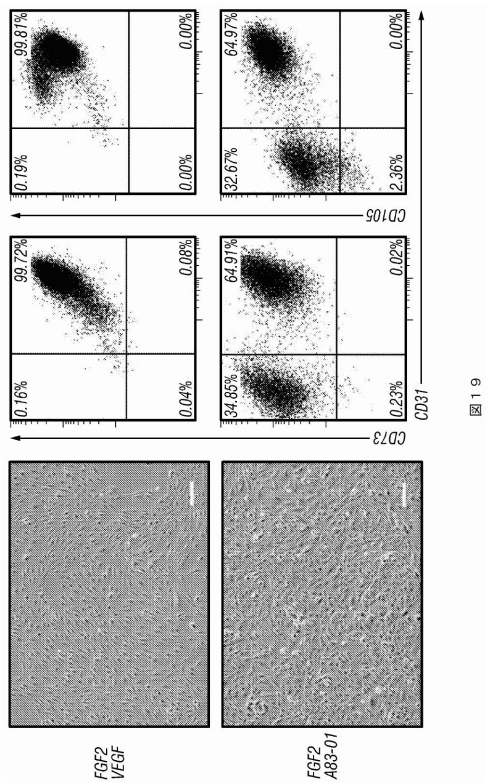

図１９

【配列表】

0005897002000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	C07K	14/47	
C12Q	*1/02*	*(2006.01)*	C12Q	1/02	
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(72)発明者 ユー, ジュンイン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１, マディソン, サイエンス ドライブ ５２５, スイート ２００, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ボドヤニク, マクシム エー.
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ５３７１１, マディソン, サイエンス ドライブ ５２５, スイート ２００, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第２００８／０３６２０９（WO, Ａ１）
Cell Stem Cell, 2008, Vol.2, pp.497-507
Blood, 2008, Vol.111, No.9, pp.4500-4510
Cardiovascular Research, 2009, Vol.84, pp.263-272
BMC Developmental Biology, 2009, Vol.9, No.72
Developmental Dynamics, 2009, Vol.238, pp.1836-1850
Clin. Cancer Res., 2008, Vol.14, No.6, pp.1678-1685

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００－５／２８
Ｃ０７Ｋ １４／００－１４／８２５
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ １／００－１／７０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）