

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4383896号
(P4383896)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/06	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A E
A 6 1 K	35/12	(2006.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00 Q
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00

請求項の数 41 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2003-584240 (P2003-584240)	(73) 特許権者	504127647
(86) (22) 出願日	平成15年4月15日 (2003.4.15)		テクニオン リサーチ アンド ディベロ ップメント ファウンデーション リミテ ッド
(65) 公表番号	特表2005-522213 (P2005-522213A)		イスラエル国、ハイファ 32000、テ クニオン シティ、 セネート ハウス
(43) 公表日	平成17年7月28日 (2005.7.28)	(74) 代理人	100103816
(86) 国際出願番号	PCT/IL2003/000320		弁理士 風早 信昭
(87) 国際公開番号	W02003/087296	(74) 代理人	100120927
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003.10.23)		弁理士 浅野 典子
審査請求日	平成18年3月29日 (2006.3.29)	(72) 発明者	ゲレヒトーニール, シャロン
(31) 優先権主張番号	60/372, 429		イスラエル, 34 678 ハイファ, シムジョン ストリート 45
(32) 優先日	平成14年4月16日 (2002.4.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/211, 522		
(32) 優先日	平成14年8月5日 (2002.8.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脈管形成性の始原細胞をインビトロで同定し、単離し、または分化させるための新規な方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未分化 E S 細胞から脈管形成性の始原細胞を調製するための方法であって、
(a) 個々の未分化 E S 細胞を、 E S 細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集 E S 細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、
(b) 脈管形成性の始原細胞である 0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい前記細胞を前記混合細胞集団から単離すること、
を含む方法。

【請求項 2】

工程 (a) が、 I V 型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞 / $cm^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 の細胞接種濃度、および分化培地の存在に未分化 E S 細胞を供することによって行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい前記細胞が、ろ過、形態計測および / またはデンシトメトリーによって単離される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記ろ過が 0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記未分化 E S 細胞がヒト E S 細胞である請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

未分化 E S 細胞から上皮始原細胞を調製するための方法であって、

(a) 個々の未分化 E S 細胞を、 E S 細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集 E S 細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、

(b) 上皮始原細胞である 5 0 μ m より大きい前記細胞を前記混合細胞集団から単離すること、

を含む方法。

【請求項 7】

工程 (a) が、 I V 型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞 / cm^2 ~ 1×10^5 細胞 / cm^2 の細胞接種濃度、および分化培地の存在によって行われる請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

5 0 μ m より大きい前記細胞が、ろ過、形態計測および / またはデンストメトリーによって単離される請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

ろ過による前記単離が 0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項 8 記載の方法。

【請求項 1 0】

前記未分化 E S 細胞がヒト E S 細胞である請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 1】

内皮細胞、平滑筋細胞、または造血細胞を脈管形成性始原細胞の集団から調製する方法であって、

(a) 個々の未分化 E S 細胞を、 E S 細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集 E S 細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、

(b) 脈管形成性の始原細胞である 0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい前記細胞を前記混合細胞集団から単離すること、および、

(c) 内皮細胞、平滑筋細胞、または造血細胞の分化を誘導する少なくとも 1 つの増殖因子の存在下で前記脈管形成性始原細胞の集団を培養し、それにより、内皮細胞、平滑筋細胞、または造血細胞を調製すること、

を含む方法。

【請求項 1 2】

工程 (a) が、 I V 型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞 / cm^2 ~ 1×10^5 細胞 / cm^2 の細胞接種濃度、および分化培地の存在によって行われる請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい前記細胞が、ろ過、形態計測および / またはデンストメトリーによって単離される請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

ろ過による前記単離が 0 μ m より大きくかつ 5 0 μ m より小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記未分化 E S 細胞がヒト E S 細胞である請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記成長因子は、血管内皮増殖因子 (V E G F)、アンジオポエチン (A n g)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、エフリン (E p h)、繊維芽細胞増殖因子 (F G F)、腫瘍増殖因子 (T G F)、胎盤増殖因子 (P L G F)、サイトカイン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、トランスフェリン、インスリン、幹細胞因子 (S C F)、顆粒球コロ

10

20

30

40

50

ニ－刺激因子（G - C S F）および顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）からなる群から選択される請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

血管組織を調製する方法であって、

（a）個々の未分化 E S 細胞を、E S 細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集 E S 細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、

（b）脈管形成性の始原細胞である $0 \mu\text{m}$ より大きくかつ $50 \mu\text{m}$ より小さい前記細胞を前記混合細胞集団から単離すること、および、

（c）血管組織の分化を誘導する条件のもと、少なくとも 1 つの脈管形成性増殖因子および / または血管形成性増殖因子の存在下で脈管形成性始原細胞の前記集団を培養すること、

を含む方法。

【請求項 1 8】

工程（a）が、I V 型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞 / $\text{cm}^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 の細胞接種濃度、および分化培地の存在によって行われる請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

$0 \mu\text{m}$ より大きくかつ $50 \mu\text{m}$ より小さい前記細胞が、ろ過、形態計測および / またはデンストメトリーによって単離される請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 0】

ろ過による前記単離が $0 \mu\text{m}$ より大きくかつ $50 \mu\text{m}$ より小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記未分化 E S 細胞がヒト E S 細胞である請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 2】

脈管形成性始原細胞の前記集団が 3 次元の足場において培養される請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記脈管形成性増殖因子および / または血管形成性増殖因子は、血管内皮増殖因子（V E G F）、アンジオポエチン（A n g）、血小板由来増殖因子（P D G F）、エフリン（E p h）、繊維芽細胞増殖因子（F G F）、腫瘍増殖因子（T G F）および胎盤増殖因子（P L G F）からなる群から選択される請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 4】

血管の発達、成長および / または変化に対する因子の影響を明らかにする方法であって、

（a）個々の未分化 E S 細胞を、E S 細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集 E S 細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、

（b）脈管形成性の始原細胞である $0 \mu\text{m}$ より大きくかつ $50 \mu\text{m}$ より小さい前記細胞を前記混合細胞集団から単離すること、

（c）前記脈管形成性始原細胞を因子にさらすこと、および、

（d）前記脈管形成性始原細胞に対する因子の影響を明らかにし、それにより、血管の発達に対するその影響を明らかにすること、

を含む方法。

【請求項 2 5】

工程（a）が、I V 型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞 / $\text{cm}^2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 の細胞接種濃度、および分化培地の存在によって行われる請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

0 μmより大きくかつ50 μmより小さい前記細胞が、ろ過、形態計測および/またはデンストメトリーによって単離される請求項24記載の方法。

【請求項27】

ろ過による前記単離が0 μmより大きくかつ50 μmより小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項26記載の方法。

【請求項28】

前記未分化ES細胞がヒトES細胞である請求項24記載の方法。

【請求項29】

因子が物質および/または環境因子である請求項24記載の方法。

【請求項30】

因子が、血管形成および/または脈管形成の推定される下方調節因子(down regulator)であり、前記方法はさらに、工程(c)の前に血管形成および/または脈管形成を促進する条件のもとで脈管形成性始原細胞の前記集団を培養することを含む請求項24記載の方法。

【請求項31】

因子が、血管形成および/または脈管形成の推定される上方調節因子(up regulator)であり、前記方法はさらに、工程(c)の前に血管形成および/または脈管形成を制限する条件のもとで脈管形成性始原細胞の前記集団を培養することを含む請求項24記載の方法。

【請求項32】

請求項1～5のいずれかの方法によって得られる、脈管形成性始原細胞の集団を含む細胞培養物であって、脈管形成性始原細胞の集団は少なくとも14日間にわたって増殖状態で維持することができ、かつ、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン(Ang)、血小板由来増殖因子(PDGF)、エフリン(Eph)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、腫瘍増殖因子(TGF)、胎盤増殖因子(PlGF)、サイトカイン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、トランスフェリン、インスリン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)からなる群から選択される少なくとも1つの増殖因子にさらされたとき、平滑筋細胞、内皮細胞および/または造血細胞への分化が可能である細胞培養物。

【請求項33】

脈管形成性始原細胞の前記集団は少なくとも1つの外因性ポリペプチドを発現することができる請求項32記載の細胞培養物。

【請求項34】

前記外因性ポリペプチドは、細胞表面マーカー、細胞表面抗原、血管形成因子、脈管形成因子および造血因子からなる群から選択される請求項33記載の細胞培養物。

【請求項35】

前記外因性ポリペプチドが誘導可能な様式で発現する請求項33記載の細胞培養物。

【請求項36】

マトリゲル、コラーゲンゲルおよびポリマー足場からなる群から選択される基質と、脈管形成性始原細胞の集団とを含む医薬組成物であって、前記の脈管形成性始原細胞は、

(a) 個々の未分化ES細胞を、ES細胞の凝集を防止する条件のもと、未分化非凝集ES細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導する様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、

(b) 脈管形成性の始原細胞である0 μmより大きくかつ50 μmより小さい前記細胞を前記混合細胞集団から単離する工程、

を含む方法によって未分化ES細胞から調製される医薬組成物。

【請求項37】

工程(a)が、IV型コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞/cm² ~ 1×10^5 細胞/cm² の細胞接種濃度、および分化培地の存在によって行われる請求項36記載の医

10

20

30

40

50

薬組成物。

【請求項 38】

0 μmより大きくかつ50 μmより小さい前記細胞が、ろ過、形態計測および/またはデンシトメトリーによって単離される請求項 37 記載の医薬組成物。

【請求項 39】

ろ過による前記単離が0 μmより大きくかつ50 μmより小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる請求項 38 記載の医薬組成物。

【請求項 40】

前記未分化ES細胞がヒトES細胞である請求項 36 記載の医薬組成物。

【請求項 41】

前記脈管形成性始原細胞が、前記基質内における血管の発達を誘導するような様式で前記基質と接触させられる請求項 36 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、幹細胞に由来する脈管形成性の始原細胞を単離および培養するための新規な方法に関する。より詳細には、本発明は、組織工学、研究および診断法において脈管形成性の始原細胞を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、ヒト胚幹細胞を培養で無限に増殖させることを可能にし、これにより、方向づけられた組織特異的な様式での分化の誘導を用いた実験を可能にする様々な技術が開発されている (Itskovitz - Eldor, J他、Mol Med、2000、6:88~95; Reubinf f B E他、Nat Biotech、2000、18:399~404; Schuldiner M他、PNAS USA、2000、97:11307~12)。ヒト胚幹細胞の成長および発達は現在、注意深く研究されており、急速に蓄積しつつある知識が、インビトロ組織工学、移植医療、遺伝子組換え胚の作製、および変性疾患の処置を含む様々な革新的な治療的適用において用いられている。最も重要なことに、合衆国大統領は、医療および研究に対する胚幹細胞の計り知れない重要性を認めており、最近では、既存のヒト胚幹細胞株を使用するプロジェクトを是認している (ホワイトハウス概況報告書: 胚幹細胞研究 [2001年8月9日])。しかしながら、発達の複雑な段階のインビトロ操作は、実質的な量の所望される細胞系譜および特定の表現型を確実に得るためには、依然として極めて重要な目標である。

【0003】

胚発達および成体における血管形成

胚発達の初期段階では、血管形成が、中胚葉に由来する内皮細胞始原体がデノボでの分化、拡大および合着を受けて、原始的な細管の網状組織を形成する、脈管形成と呼ばれるプロセスによって生じている (Yancopoulos GD他、Nature、2000、407:242)。これらの血管は、一般には、それぞれが異なる機能を果たす2つの細胞系譜から構成される: 血液を伝えるための通路を形成し、しかし、単独では脈管形成を完了させることができない内側の内皮細胞、および、脆弱な通路を破裂から保護し、安定化させ、止血の制御を提供する内皮周囲の平滑筋細胞 (Carmeliet P、Nature Med、2000、6:389)。第3の細胞系譜 (造血細胞) は、血管細胞と共通する始原体を有し、血液細胞に分化する。脊椎動物の胚では、脈管形成は沿軸中胚葉および側板中胚葉において生じ、これらは、心臓原基、背側大動脈、ならびに、頭部、肺および胃腸系の大きい血管を生じさせる。血管形成は、大きい血管および小さい血管の複雑な網状組織への原始的な血管叢の成熟化および再構築を伴う。血管形成はまた、最初は無血管の器官 (例えば、腎臓、脳および肢芽など) の脈管化をもたらす。

【0004】

血管形成は、正常な組織成長のために出生後も要求され、成体の生涯にわたって続き、

10

20

30

40

50

例えば、雌性動物の正常な発情期において子宮内膜の血管新生のときに、胎盤において妊娠時に、また、創傷治癒時に継続する (Risau 他、Nature、1997、386 : 671 ~ 674)。

【0005】

さらに、数多くの疾患および障害が、異常な内皮成長、すなわち、アテローム性動脈硬化における内皮の過剰増殖、腫瘍の成長および転移における血管新生、そして、慢性関節リウマチ、網膜症、血管腫および乾癬における脱調節された血管形成に関連している (Folkman 他、Nature Med.、1995、1 : 27 ~ 31 ; Hanahan および Folkman、Cell、1996、86 : 353 ~ 64)。

【0006】

インビトロでの胚内皮細胞

胚内皮細胞 (EEC) の機能、起源および性質に対する研究では、EEC が肝臓の器官形成を促進し得ること (Matsumoto K 他、Science、2001、294 : 559)、膵臓の分化を誘導し得ること (Lammer E 他、2001、294 : 564)、また、特定の条件のもとで心筋細胞にトランス分化し得ること (Condorelli G 他、2001、98 : 10733) が解明されている。内皮前駆体の分化および発達の本質は未だ完全には理解されていないが、血管平滑筋細胞 (c-SMC) の造血的発達および生成が血管の発達と強く関係づけられることが明らかになりつつある。

【0007】

胚幹細胞は、培養で維持することが困難であり、自発的な分化を生じさせやすい。継続中の培養物の場合、胚盤胞の内部塊に由来する細胞が、典型的には、その未分化な表現型および増殖性を保持させるために、マウスの胚繊維芽細胞「フィーダー」細胞の層の表面で成長させられる (Keller, GM、Curr Opin Cell Biol、1995、7 : 862 ~ 69)。マウスでは、胚的に異なる細胞タイプへの初期の分化を、間質細胞株との同時培養によって誘導することができ (Palacios R 他、PNAS USA、1995、92 : 7530 ~ 34)、または、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなどの基質上での培養によって誘導することができ (Ogawa M 他、Blood、1999、93 : 1168 ~ 77)、または、3つの胚葉への領域的な分化が明らかにされる、「胚葉体」(EB) への胚様体幹 (ES) 細胞のインビトロ凝集によって誘導することができる (Keller、GM、Curr Opin Cell Biol、1995、7 : 862 ~ 69)。

【0008】

ネズミ胚幹細胞

ネズミ ES 細胞における脈管形成事象の研究は有益である。造血細胞および内皮細胞の両方が、マウス ES 細胞由来の胚様体から生じた芽細胞コロニーで観測されている (Choi K 他、Development、1998、125 : 725)。ネズミ ES 細胞を用いた研究もまた行われており、Nishikawa および共同研究者らは、3D 胚様体形成が側板中胚葉細胞の分化のためには要求されないことを明らかにしていた。培養された凝集しないマウス胚細胞がコラーゲン基質上で成長させられたとき、血管内皮カドヘリンを発現する細胞 (VE-cad+) が造血細胞を生じさせることが見出された (Nishikawa SI 他、Development、1998、125 : 1747 ; Nishikawa SI 他、Immunity、1998、8 : 761 ; Fujimoto T 他、Genes Cells、2001、6 : 1113)。平滑筋細胞 (SMC) 表現型マーカー (例えば、表面マーカーおよび形態学的マーカー) が観測されるとき、胚内皮管に関連する初期の内皮周囲 SMC が内皮からトランス分化することを示すことができ (Gittenberger de Groot, AC 他、Atheroscler Thromb Vasc Biol、1999、19 : 1589)、また、内皮細胞および平滑筋細胞への胚の共通する脈管始原体 (Flk1+) の分化を観測することができる (Yamashita J 他、Nature、2000、408 : 92)。しかしながら、マウス EC 系からヒト EC 系への直接的な外挿を行う試みは期待はずれの結果で終わってお

10

20

30

40

50

り、このことは、発達プロセスおよび要件の多くが種特異的であることを示している（例えば、Reubinoff BE他、Nat. Biotechnol., 2000、18:399~404を参照のこと）。具体的には、マウス胚幹（mES）細胞におけるその発現とは対照的に、血管特異的増殖因子受容体VEGFR2（Flk-1/KDR）が未分化のヒト胚幹細胞（hES）では発現し（Kaufman, DS他、PNAS USA、2001、98:10716~21）、分化の最初の1週間は増大しない（Levenberg, S他、PNAS USA、2002、99:4391~96）。このことは、VEGFR2発現の時期が脊椎動物の種間で異なり得ることを示している（これはまたNishikawaによって総説される；Nishikawa SI他、Curr Opin Cell Biol、2001、13:862~69）。Levenberg他（Levenberg, S他、PNAS USA、2002、99:4391~96）はさらに、他の内皮マーカー、すなわち、血管内皮カドヘリン（VE-cad）および血小板-内皮細胞接着分子-1（PECAM1/CD31）が、hES分化の最初の1週間の間に増大することを報告していた。明らかに、特異的な様々な内皮特異的因子の発現の協調が、適切な組合せで、ヒトの脈管形成には非常に重要である。

【0009】

ヒト胚幹細胞

ヒト胚幹（hES）細胞株は1998年に最初に得られ（Thomson, JA他、Science、1998、282:1145；米国特許第6200806号（Thomson他）；米国特許第6331406号（Gearhart JDおよびShambloott MJ））、近年では、細胞系譜特異的な様式でインビトロで分化させるために誘導されている（Schuldiner M他、PNAS、2000、97:11307~312；国際特許出願公開第WO0210347A2号（Benvenisty, N））。hES細胞は、何百回の倍化時間を通して胚幹細胞表現型を維持し、また、すべての胚細胞系譜に分化するので、研究および臨床的適用のための潜在的に無限の細胞供給源を提供している。造血細胞分化および内皮細胞分化の両方がヒトES細胞で観測されている。今日まで、hES細胞の造血分化は、S17（ネズミ骨髄）間質細胞株またはC166（卵黄嚢内皮）間質細胞株のいずれかと同時培養することが必要であり、これにより、細胞表面抗原CD34および造血コロニー形成などの主要なヒト造血組織特徴の出現が誘導される（Kaufman, DS他、PNAS USA、2001、98:10716~21）。別の最近の研究では、内皮細胞が、内皮特異的マーカーのPECAM-1に対して惹起されたモノクローナル抗体を使用してヒト胚様体（EB）からの細胞分取（FACS）によって選択されていた（Levenberg, S他、PNAS USA、2002、99:4391~96）。PECAM-1+の選択された胚様体由来（EBD）細胞は、フォンビルブランド因子、VEGFR-2およびVE-cad表面マーカーなどの内皮特異的な特徴を示し、また、軟基質（Matrigel）において培養されたとき、原始的な血管様索の形成を示した。PECAM-1+のEBD細胞はさらに、生分解性ポリママトリックスポンジに接種し、SCIDマウスに移植した後、血管構造をインビボで形成することが観測されていた。しかしながら、ヒトESを分化させるための上記の方法はすべて、内皮表現型の出現の前に非ヒト細胞との同時培養または胚様体の形成のいずれかが必要であり、また、内皮細胞マーカーに従った選択のための免疫蛍光細胞分取が必要であり、これらは、上記の方法を、多くの臨床的適用のためには費用がかかり、かつ好適でない方法にしている。従って、胚様体内への凝集または免疫蛍光選択の制限を伴うことなく、ヒト胚幹細胞を培養し、選択し、また、その分化を導くための単純化された、あまり費用のかからない方法を提供することは好都合である。

【0010】

先行技術では、胚幹細胞の調製および使用に関する数多くの技術および方法が分化のために開示されている。初期の技術では、胚盤胞期の胚に由来する内部細胞塊細胞（採取物または凍結保存物）が幹細胞の供給源として要求された（例えば、国際特許出願公開第WO0129206A1号（Cibelli他）；米国特許出願公開第200200452

10

20

30

40

50

59A1号(Lim他)、同20020004240A1(Wang)を参照のこと)。多くの他の技術は、分化を開始させるために、幹細胞の胚様体への凝集に依拠している(例えば、国際特許出願公開第WO0070021A3号(Itskovitz-Eldor JおよびBenvenisty N)を参照のこと)。

【0011】

培養状態の幹細胞を分化させるための様々な方法もまた開示されている。国際特許出願公開第WO0134776A1号、米国特許出願公開第20020015694A1号および米国特許第6280718号(これはすべてKaufman D他による)には、哺乳動物の間質細胞と同時培養することによってヒト胚幹細胞を造血細胞に分化させる方法が開示される。米国特許出願公開20020023277A1(Stuhlmann, H他)には、マウスにおける脈管形成関連遺伝子Vezflの同定および単離、ならびに、Vezfl発現に基づいて内皮細胞および前駆体を選択するための方法が開示される。また、血管形成を調節するための方法、ならびに、対象における血管疾患および新生物を診断および処置するための方法も開示されており、この場合、これらの方法では、組織におけるVezflのレベルを検出し、測定し、そして改変することが用いられる。しかしながら、記載された遺伝子組換えES細胞実験は、マウスの胚様体細胞のみに限定されており、ヒト胚細胞または他の霊長類胚細胞のいずれも使用されていなかった。さらに、選択は、その開示によれば、Vezflの発現に基づいており、従って、凝集および免疫蛍光分取の前記制限を克服することはできなかった。

【0012】

米国特許出願公開20020039724A1(Carpenter, MK)には、ヒト胚神経始原細胞の分化および選択のための方法、ならびに、その治療的使用、診断的使用および研究使用が開示される。開示されたヒト神経始原細胞は、例えば、神経変性疾患の再構成治療のためには、ヒト胚様体からもまた得られ、神経細胞特異的マーカーのNCAMおよびA2B5の発現および検出に従って選択および単離されている。同様に、国際特許出願公開第WO0181549A3号(Rambhatla LおよびCarpenter MK)には、造血系譜細胞への分化を誘導するために胚様体をn-ブチラートで処理するための方法が開示される。凝集しないhES起源、または、いずれかの適用における始原体単離の簡略化された方法については何ら言及されていない。

【0013】

最近、Benvenisty(国際特許出願公開第WO0210347A2号、Benvenisty)は、凝集した胚様体由来細胞を外因性因子で処理し、培養物を特定の系譜細胞タイプについて濃縮することによってヒト胚幹細胞の「方向づけられた分化」を行うための方法を開示した。使用された因子は、分化の知られている作用因子であり、例えば、レチノイン酸、ニューロン増殖因子、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子などであった。分化は、デノボでの遺伝子発現、および組織系譜特異的な細胞表面マーカーの出現によって決定された。

【0014】

米国特許出願公開20010041668A1(Baron, M他)には、造血、ならびに哺乳動物の成体由来幹細胞および胚中胚葉由来幹細胞からの血管成長を改変するための、胚外の形態形成遺伝子産物(例えば、ヘッジホッグ、TNFおよびWNTなど)の使用が開示される。例えば、外部からの適用または遺伝子操作による、幹細胞環境におけるこれらの胚外遺伝子産物のレベルの調節が、血液の異常、過剰脈管形成、血管新生、および組織の再脈管化を伴う疾患の処置および診断のために幹細胞の造血能力および/または血管能力の強化または低下のいずれかを行うために開示されている。しかしながら、ヒト胚組織の処置は提案されているが、ヒトの成体細胞または胚細胞を使用する例は全く示されておらず、また、上記制限を克服するために設計された、凝集しない胚幹細胞の培養または選択のための方法は開示されていない。

【0015】

従って、ヒト脈管形成性始原細胞のインビトロでの同定、単離および培養のための簡略

10

20

30

40

50

化された安価な方法が求められている。そのような方法、およびそのような方法によって単離された始原細胞は、インビトロでの血管工学、先天的および後天的な血管異常および血液学的異常を処置するために、また、脈管形成プロセスおよび血管形成プロセスに影響を及ぼす薬物を評価および開発するために、また、組織の分化および発達をさらに研究するために使用することができる。

【発明の開示】

【0016】

発明の要約

本発明の1つの局面によれば、未分化ES細胞から脈管形成性の始原細胞を調製するための方法が提供される。この場合、この方法は、個々の未分化ES細胞を、未分化ES細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導するために好適な様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、脈管形成性の始原細胞である50μmより小さい細胞を前記混合細胞集団から単離することによって行われる。

10

【0017】

本発明の別の局面によれば、未分化ES細胞から上皮始原細胞を調製するための方法が提供される。この場合、この方法は、個々の未分化ES細胞を、未分化ES細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導するために好適な様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、上皮始原細胞である50μmより大きい細胞を前記混合細胞集団から単離することによって行われる。

20

【0018】

本発明のさらに別の局面によれば、体細胞を脈管形成性始原細胞の集団から調製する方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、体細胞の分化を誘導するために好適な少なくとも1つの増殖因子の存在下で脈管形成性始原細胞の集団を培養することによって行われる。

【0019】

本発明のなおさらに別の局面によれば、血管組織を調製する方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、血管組織の分化を誘導するために好適な条件のもと、少なくとも1つの脈管形成増殖因子および/または血管形成増殖因子の存在下で脈管形成性始原細胞の集団を培養することによって行われる。

【0020】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞の集団は半固体の脈管化促進培地で培養される。

30

【0021】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞の集団は3次元の足場において培養される。

【0022】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、脈管形成性増殖因子および/または血管形成性増殖因子は、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン(Ang)、血小板由来増殖因子(PDGF)、エフリン(Eph)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、腫瘍増殖因子(TGF)および胎盤増殖因子(PlGF)からなる群から選択される。

40

【0023】

本発明のさらなる局面によれば、血管の発達、成長および/または変化に対する因子の影響を明らかにする方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、脈管形成性始原細胞の集団を因子にさらすこと、および、脈管形成性始原細胞の集団に対する因子の影響を明らかにし、それにより、血管の発達に対するその影響を明らかにすることによって行われる。

【0024】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、因子は物質および/または環境因子である。

50

【0025】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、因子は、血管形成および/または脈管形成の推定される下方調節因子(downregulator)であり、上記方法はさらに、血管形成および/または脈管形成を促進するために好適な条件のもとで脈管形成性始原細胞の集団を培養することを含む。

【0026】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、因子は、血管形成および/または脈管形成の推定される上方調節因子(upregulator)であり、上記方法はさらに、血管形成および/または脈管形成を制限する条件のもとで脈管形成性始原細胞の集団を培養することを含む。

10

【0027】

本発明のさらなる局面によれば、哺乳動物対象における血管の疾患または状態を緩和または防止する方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、脈管形成性始原細胞が内皮細胞および平滑筋細胞に分化することを刺激するために好適な条件のもとで、脈管形成性始原細胞を対象に投与することによって行われる。

【0028】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、血管の疾患または状態は、先天性の血管障害、後天的な血管障害、および虚血/再灌流傷害からなる群から選択される。

20

【0029】

本発明のさらなる局面によれば、哺乳動物組織を脈管化させる方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、脈管形成性始原細胞が内皮細胞および平滑筋細胞に分化することを刺激するために好適な条件のもとで、脈管形成性始原細胞を哺乳動物組織と接触させることによって行われる。

【0030】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、哺乳動物組織は、脈管化を必要とする操作された非血管組織、および/または胚組織である。

【0031】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞を哺乳動物組織と接触させることはインビトロまたはインビボで行われる。

30

【0032】

本発明のなおさらなる局面によれば、哺乳動物対象における血液学的な疾患または状態を緩和または防止する方法が提供される。この場合、この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、脈管形成性始原細胞が内皮細胞および血液細胞に分化することを刺激するために好適な条件のもとで、脈管形成性始原細胞を対象に投与することによって行われる。

【0033】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、血液学的な疾患または状態は、先天性の血液障害、後天的な血液障害、凝固障害および新生物疾患からなる群から選択される。

40

【0034】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞の集団を得ることは、個々の未分化ES細胞を、未分化ES細胞が脈管形成性始原細胞に分化することを誘導するために好適な様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、50 μmより小さい細胞を前記混合細胞集団から単離することによって行われる。

【0035】

本発明のなおさらなる局面によれば、基質と、脈管形成性始原細胞の集団とを含む組成物が提供される。この場合、前記の脈管形成性始原細胞は、個々の未分化ES細胞を、未

50

分化ES細胞が脈管形成性始原細胞に分化することを誘導するために好適な様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得る工程、および、脈管形成性始原細胞である50 μmより小さい細胞を前記混合細胞集団から単離する工程により行われる方法によって未分化ES細胞から調製される。

【0036】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、基質は、マトリゲル、コラーゲンゲルおよびポリマー足場からなる群から選択される。

【0037】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞は、基質内における血管の発達を誘導するような様式で基質と接触させられる。

10

【0038】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、血液学的な疾患または状態は、先天性の血液障害、後天的な血液障害、凝固障害および新生物疾患からなる群から選択される。

【0039】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、個々の未分化ES細胞を培養することは、ES細胞の凝集を避けること、コラーゲン上での成長、 2×10^4 細胞/cm² ~ 1×10^5 細胞/cm² の細胞接種濃度、および分化培地の存在からなる群から選択される少なくとも1つの条件に未分化ES細胞を供すること

20

【0040】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、未分化ES細胞はヒトES細胞である。

【0041】

本発明のさらなる局面によれば、内皮細胞を血管組織から調製する方法が提供される。この場合、この方法は、血管組織から細胞を解離するために設計された条件に血管組織を供し、それにより、解離された細胞の混合集団を得ること、および、50 μmより小さい細胞を前記混合細胞集団から単離することによって行われる。

【0042】

30

本発明のさらなる局面によれば、上皮細胞を血管組織から調製する方法が提供される。この場合、この方法は、血管組織から細胞を解離するために設計された条件に血管組織を供し、それにより、解離された細胞の混合集団を得て、それにより、個々の細胞の混合集団を得ること、および、50 μmより大きい細胞を前記混合細胞集団から単離することによって行われる。

【0043】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、血管組織はヒト血管組織である。

【0044】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、50 μmより小さい細胞、または50 μmより大きい細胞は、ろ過、形態計測および/またはデンストメトリーによって単離される。

40

【0045】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ろ過は、50 μmより小さい細孔サイズを有するフィルターによって行われる。

【0046】

本発明のさらにさらなる局面によれば、脈管形成性始原細胞の集団を含む細胞培養物が提供される。この場合、脈管形成性始原細胞の集団は少なくとも14日間にわたって増殖状態で維持することができ、かつ、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン(Ang)、血小板由来増殖因子(PDGF)、エフリン(Eph)、繊維芽細胞増殖因子

50

(F G F)、腫瘍増殖因子 (T G F)、胎盤増殖因子 (P L G F)、サイトカイン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、トランスフェリン、インスリン、幹細胞因子 (S C F)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) および顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) からなる群から選択される少なくとも1つの増殖因子にさらされたとき、平滑筋細胞、内皮細胞および/または造血細胞への分化が可能である。

【 0 0 4 7 】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、脈管形成性始原細胞の集団は、細胞表面マーカー、細胞表面抗原、血管形成因子、脈管形成因子および造血因子からなる群から選択される少なくとも1つの外因性ポリペプチドを発現することができる。

10

【 0 0 4 8 】

下記に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらにさらなる特徴によれば、外因性ポリペプチドは誘導可能な様式で発現する。

【 0 0 4 9 】

別途に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等な方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料は、下記に記載される。ここで言及される全ての公報、特許出願、特許および他の文献はその全体をここに参照して組入れられる。矛盾する場合には、本特許明細書(定義を含む)が優先する。さらに、材料、方法および例は例示にすぎず、限定することを意図しない。

20

【 0 0 5 0 】

図面の簡単な記述

本発明を、本明細書中で、例示のみを目的として添付の図面を参照して記載する。ここでは詳細な図面を参照して、示した個々の事項は本発明の好ましい実施形態の例示および例示的考察のみを目的とし、最も有用と考えられるものを示すことおよび本発明の原理および概念的局面の説明が容易に理解されるために示すことを強調する。これに関して、本発明の基本的理解に必要とされる以上により詳細に本発明の構造細部を示すことを意図せず、図面と共に示した説明により、どのようにして本発明のいくつかの形態を実際に実施することができるのかが当業者に明らかとなる。

30

図1はヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する(図1A~図1H)。図1Aは分化-選択手法の概略を例示する。図1Bは、コラーゲン上で6日間の培養を行った後の細胞の通常とは異なる形態学を示す一連の顕微鏡写真である:大型の平坦な繊維を有する細胞(矢印)、および、それよりも小さい、大きな核を有する平坦化した細胞(矢頭)に留意すること。図1Cは、ろ過され、単離された脈管形成性始原細胞における内皮細胞表面マーカーのFACS分析を示す一連の図である。ろ過された細胞は、VE-カドヘリンに対する一次抗体(VE-cad)、VEGFR2に対する一次抗体(VEGFR2)、および蛍光標識された抗IgGにさらされたか、または二次抗体単独(IgG-FITC)だけにさらされた。VE-cadを発現する細胞の割合が大きいこと(78%)に留意すること。図1D~図1Eは、ろ過され、単離された脈管形成性始原細胞におけるVE-cad発現の間接的な免疫形態学的分析を示す写真である。ろ過された細胞の固定および設置された12時間培養物の免疫蛍光染色は、より高倍率(図1E)では見ることができるが、VE-cadの強い局在化を細胞-細胞の隣接接合部において示している。図1Fは、単離された脈管形成性始原細胞における内皮マーカーおよび造血マーカーの発現を示すEtBr染色ゲルの写真である。CD31およびTie2の内皮マーカーの発現、ならびに、Tal1、GATA2およびAC133の初期脈前駆体マーカーの発現が、より小さい平坦なろ過された細胞(ろ過物)、および未分化ヒト胚幹(hES)細胞から得られた総RNAにおいてRT-PCRによって比較された。ハウスキーピングマーカーのGAPDHが増幅の内部標準として使用される。CD31、Tie2、Tal1およびGAT

40

50

A 2の各マーカーの、内皮、平滑筋および造血（ESH）に特異的な発現が顕著であることに留意すること。図1 Gは、ろ過によって保持されたより大型の平坦な細胞の蛍光顕微鏡写真であり、これらは、小さなヒト脈管形成性始原細胞では検出されない上皮様表現型平滑筋細胞マーカー（ α -sma）の出現を示している。図1 Hは、単離されたより大型の保持された細胞における上皮様マーカーの発現を示すEtBr染色ゲルの写真である。カルポニン、カルデスモン、平滑筋アクチン（SMA）およびSM-MHCの各マーカーの発現が、より大きい平坦な保持された細胞（保持物）、および、より小さいヒト脈管形成性始原体（ろ過）細胞から得られた総RNAにおいてRT-PCRによって比較された。ハウスキーピングマーカーのGAPDHが増幅の内部標準として使用される。平滑筋細胞マーカーのすべての発現がヒト脈管形成性始原細胞では存在しないこと、そして、保持された細胞におけるそれらの発現が顕著であることに留意すること。図1 Iは、より小さい過された細胞（左パネル）およびより大きい保持された細胞（右パネル）の両方におけるBrdU取り込みの顕微鏡写真であり、これらは、より小さいヒト脈管形成性始原細胞の活発な増殖を明らかにしている。より大きい非増殖性の保持された細胞（矢印）における最小限の取り込みとは対照的に、より小さい黒くなった細胞核におけるBrdUの活発な取り込みに留意すること。スケールバーは100 μ mである。

10

図2は培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびRT-PCR研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている（図2 A~図2 M）。図2 Aは、10 ng/mlのhPDGF-BB（Rand D Systems, Inc., Minneapolis, MN、米国）とともに10日間~12日間、 2.5×10^4 細胞/cm²でIV型コラーゲン上で再培養された共通するヒト脈管形成性始原細胞における平滑筋細胞マーカーの発現を示すEtBr染色ゲルの写真である。平滑筋細胞マーカーのカルデスモン、平滑筋アクチン（SMA）、カルポニン、SM22 およびSM-MHCの各マーカーの発現が、増殖因子で処理された細胞（v-SMC）、および非処理のヒト脈管形成性始原体（ESH始原体）細胞から得られた総RNAにおいてRT-PCRによって比較された。ハウスキーピングマーカーのGAPDHが増幅の内部標準として使用される。平滑筋細胞マーカーのすべての発現がESH細胞には存在しないこと、および、hPDGF-BBで処理された細胞におけるそれらの発現が顕著であることに留意すること。図2 B~図2 Eは、ヒト血小板由来増殖因子（hPDGF）-BBで処理されたヒト脈管形成性始原細胞において発現した平滑筋細胞マーカーの免疫蛍光検出の顕微鏡写真である。処理された細胞の固定された調製物が、SMCに対する一次抗体（図2 B）、スムーセリンに対する一次抗体（図2 C）、SM-MHCに対する一次抗体（図2 D）、およびカルポニンに対する一次抗体（図2 E）で染色され、蛍光性の二次抗体で免疫検出され、蛍光顕微鏡観察によって可視化された。上皮様細胞および紡錘体形状細胞の両方のタイプが、増殖因子で処理された培養物において染色されていることに留意すること。図2 F~図2 Hは、50 ng/mlのhVEGF₁₆₅（Rand D Systems, Inc., Minneapolis, MN、米国）とともに10日間~12日間にわたって 2.5×10^4 細胞/cm²でIV型コラーゲン上で再培養されたヒト脈管形成性始原細胞において発現した内皮細胞マーカーの検出を示す顕微鏡写真である。増殖因子で処理された細胞は固定され、抗VcAd抗体（図2 F）または抗フォンビルプラント因子（vWF）抗体（図2 G）に関して本明細書中上記に記載されるように免疫検出された。抗vWFの染色がヴァイベル-パラデ体に局在化することに留意すること（図2 G）。Dil1標識されたac-LDLの取り込み（10 μ g/ml、4時間、37 $^{\circ}$ C）（図2 h）もまた検出された（図2 H）。図2 Iおよび図2 Jは、血小板由来増殖因子（PDGF）で処理されたヒト脈管形成性始原細胞（図2 J）または血管内皮増殖因子（VEGF）で処理されたヒト脈管形成性始原細胞（図2 I）の両方におけるBrdU取り込みの顕微鏡写真であり、これらは内皮型細胞の活発な増殖（染色）を明らかにしている。ストレスファイバーの出現（図2 I、矢印）、および、より大型のhPDGF処理細胞の低下した取り込み（図2 J）とは対照的に、VEGF処理細胞の黒くなった細胞核におけるBrdUの活

20

30

40

50

発な取り込み（図2I）に留意すること。図2K～図2Mは、ヒト脈管形成性始原細胞から形成された造血系コロニーの顕微鏡写真である。ESH細胞が選択され、造血分化を促進させるためにサイトカインが補充された半固体培地で培養された。12日間のインキュベーションの後で検出された造血系コロニー（CFU）の特徴的な出現に留意すること。

図3は増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体（ESH）細胞における血管構造の形成を示す顕微鏡写真（図3A～図3D）および電子顕微鏡写真（図3E～図3G）である。I型コラーゲン上（図3A）またはマトリゲル内（図3B）に接種された、凝集した（50ng/mlのhVEGF₁₆₅および10ng/mlのhPDGF-BBが補充された分化培地で24時間の）ESH細胞は血管形成を7日間の成長の後に示した（両方の組織学切片における出芽および管状構造に留意すること）。同じ調製物のトルイジンブルー染色切片では、マトリゲルにおける内皮細胞の浸透および血管網状構造の形成が明らかにされ（図3C）、そして、より高倍率では、脈管内で形成された白血球が明らかにされた（矢印、図3D）。スケールバーは100μm（図3A～図3C）または200μm（図3D）である。図3E～図3Gは、Matrigelにおける血管形成の電子顕微鏡写真であり、これらは、内皮細胞に典型的な十分に形成されたヴァイベル-パラデ体を示している（図3E、6000倍の倍率；挿入図、12000倍）。図3Fは、マトリゲル（M）内の伸張した内皮細胞（EC）によって形成された脈管の中心に、（ヘモグロビンのために）暗く染色されている血液細胞（BC）が存在することを明瞭に示している（5000倍の倍率）。図3Gは、明瞭に識別することができる内腔（Lu）、特徴的なリボタンパク質カプセル（Li）、ヴァイベル-パラデ体（WP）およびグリコーゲン（G）を含有するマトリゲル（M）内の内皮細胞（N核）の典型的な配置を示している（図3G、5000倍の倍率）。

図4はヒト脈管形成性始原体（ESH）細胞による3Dアルギン酸塩足場のインビトロでの脈管化を示す組織学切片の顕微鏡写真である（図4A～図4B）。ESH凝集物が、50ng/mlのhVEGF₁₆₅および10ng/mlのhPDGF-BBが補充された分化培地において1f120 50μlのアルギン酸塩足場にインビトロで接種され、14日間インキュベーションされた。図4Aは、2つの代表的な足場細孔の周りにおける脈管の形成を示す。より高倍率（図4B）では、平滑筋細胞の隣接層を伴う伸張した平坦な内皮細胞の典型的な血管壁構造が明らかにされる。スケールバーは100μmである。

図5は血管形成の阻害剤に対するESH由来組織の感受性を明らかにする2組の顕微鏡写真である（図5A～図5B）。ESH凝集物がマトリゲルに接種され、50ng/mlのhVEGF₁₆₅および10ng/mlのhPDGF-BBが単独で補充された分化培地（図5A）、または、50μg/mlの血管形成阻害性の抗VE-cadモノクローナル抗体（クローンBV6、CHEMICON INTNL, Inc.、Temecula、CA、米国）の添加を伴う補充された分化培地（図5B）において7日間インキュベーションされた。抗VE-cadで処理された培養物では、細胞突出がなく、また、管構造および網状組織構造がないことに留意すること（図5B）。スケールバー - 100μm。

図6はhES細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する（図6A～図6F）。図6Aは濃縮手順の概略を示す。図6Bは、IV型コラーゲン上で培養された6日目のhES細胞凝集物の倒立型光学顕微鏡観察像である。この画像には、未分化hES細胞（矢印）および種々のタイプの分化した細胞が示される。図6Cは、6日目の単一細胞懸濁培養物の倒立型光学顕微鏡観察像であり、2つの細胞タイプ（繊維配置を有する大きな平坦な細胞（矢印）、および、大きい核を伴うより小さい平坦な細胞）が例示される。図6Dは、VE-cad、CD31およびVEGFR2に対する、ろ過された細胞のFACS分析である。図6Eは間接的な免疫蛍光分析であり、i) 斑点状の表面CD31（ヒトv-SMC始原体について以前に報告された通りである）、(ii) 核Gata2、および(iii) Tal1の発現が示される。図6Fは、より小さい始原体およびより大きい始原体の細胞増殖を、(iおよびii) BrdU取り込み（より小さい始原細胞に存在し、より大きい細胞には存在しない）（矢印）、および(iii) ろ過された細胞の66±2%に存在する核Ki67発現によって明らかにする。核はDapi（1:100

10

20

30

40

50

0)で染色された。スケールバー - 100 μm。

図7は始原細胞における系譜分化を例示する(図7A~図7D)。図7A - 50 ng/mlのhVEGF165とともに10日間~12日間にわたって再培養されたる過細胞が、Dil-Ac-LDLの取り込みについて調べられた(左側は明るい光での細胞、および右側は蛍光照射での細胞)。図7B - 個々の分離された細胞が、(i) Dil-Ac-LDL代謝、(ii)核周囲のvWF、(iii)(i)および(ii)の両方について調べられた。図7C - 10 ng/mlのhPDGF-BBとともに10日間~12日間にわたって再培養されたる過細胞は、紡錘体様形状の細胞におけるSMA発現の上方調節を示した。図7D - RT-PCR分析はさらなるv-SMCマーカーの上方調節を明らかにした。核はDapi(1:1000)で染色された。スケールバー - 100 μm。

10

図8はVE-cad+細胞のクローン分析を例示する(図8Ai~図8Biii)。図8A(i)は、単一のVE-cad+細胞から形成された典型的な8日目のコロニーを例示する。2つの明確な細胞形状が観測された: 内皮細胞様形態学[図8A(ii)]、およびv-SMCに類似する紡錘体様形態学(矢印)[図8A(iii)]。紡錘体形状の細胞はSMA[図8B(i)]およびカルポニン[図8B(ii)]を発現した。図8B(iii)は、VEGFが補充されたコロニーにおけるAc-LDL代謝を例示する。核はDapiで染色された。スケールバー - 100 μm。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

好適な実施形態の説明

20

本発明は、脈管形成性始原細胞の簡便かつ安価な調製のために使用され得る新規な方法、ならびに、例えば、ヒト幹細胞から調製される細胞培養物およびその組成物に関する。詳細には、本発明は、脈管形成性の始原細胞を幹細胞から単離するために使用することができ、また、例えば、組織工学、血管形成研究、治療的適用および診断的適用において使用される単離された脈管形成性の始原細胞をインビトロで成長および分化させるために使用することができる。

【0052】

本発明の原理および操作は、図面および添付の説明を参照してより深く理解することができる。本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は以下の説明に記載されるか図面で例示される詳細にその適用が制限されないと理解すべきである。本発明は、他の実施形態が可能であるか、種々の方法で実施または実行することができる。また、本明細書中で使用した用語および専門用語は説明を目的とし、制限と見なすべきではないと理解すべきである。

30

【0053】

最近の調査研究では、胚細胞が多能性細胞のための供給源として潜在的に役立つことが例示されている。そのような細胞は、多数の細胞タイプに分化する能力を有しているので、ヒトの治療において有用である(R. A. Pedersen, Sci. Am., 1999, 280: 68)。胚幹細胞に関する初期の研究は、モデルとして同系交配マウスシステムを使用して行われていた。マウスES細胞と比較した場合、サルおよびヒトの多能性細胞は、はるかに脆弱であることが判明しており、また、同じ培養条件および操作に

40

【0054】

近年、ヒト胚幹細胞(hES)および生殖細胞系(hEC)細胞が単離され、培養で維持されている。ヒト胚hES細胞およびヒトhEC細胞はともに、ヒト多能性幹細胞の長く探し求められていた特徴を有しており、分化することなくインビトロで増殖し続けることができ、正常な核型を保持し、また、すべての成体細胞タイプを生じさせるために分化する能力を保持している。しかしながら、培養におけるhES細胞およびhEC細胞の自発的な体細胞分化が、構造的組織化の一定したパターンを何ら伴うことなく進行し、これにより、多様な異なる細胞系譜を表す様々な表現型の非常に不均一な混合物を伴う様々な細胞集団の多細胞凝集物が生じている(Reubinoff, BE他, Nat Biot

50

ech、2001、19:1134)。

【0055】

先行技術の研究では、特定の細胞タイプ系譜の始原細胞をES細胞から単離するために好適な様々な方法が記載されている。しかしながら、そのような方法は、典型的には、極めて複雑であり、また、費用がかかる。最初、ヒト胚幹細胞は哺乳動物の間質細胞層の表面で成長させられる(例えば、米国特許第6280718号(Kaufman, DSおよびThomson, JA)を参照のこと)か、または、テラトームのような生きた宿主内で成長させられる(Thomson, JA, Science、1998、282:1145~47)か、または、胚様体(EB)として知られている多細胞構造体に懸濁状態で凝集させられる(例えば、国際特許出願公開第WO0070021A3号(Itskovits-Eldor JおよびBenvenisty N)および国際特許出願公開第WO0210347A2号(Benvenisty N)を参照のこと)かのいずれかであり、また、分化因子にさらされ、これにより、典型的には、様々な細胞タイプおよび系譜の混合集団が得られている。その後、特定の系譜の始原細胞の単離が、系譜特異的なマーカーの免疫検出、および、蛍光分取または磁石分取による細胞系譜の分離に基づいて達成される(例えば、国際特許出願公開第WO0181549A3号(Rambhatala LおよびCarpenter MK);米国特許第6280718号(Kaufman, DSおよびThomson, JA);国際特許出願公開第WO0129206A1号(Cibelli, J);国際特許出願公開第WO0168815A1号(Pera, MFおよびBen-Hur T)を参照のこと)。上記の方法はすべて、類似する欠点に悩まされている。すなわち、始原細胞への初期のES分化は、多くの複雑な操作、および、間質細胞層、生きた宿主組織または他のEB細胞との複雑な相互作用を伴う。さらに、細胞表面マーカーの発現または呈示による選択は効率的ではなく、このことは、さらにより集約的な操作を必要とし、また、試薬および検出装置に対する大きな費用を生じさせ、また、始原細胞の成長力および生殖不能性を脅かしている。

10

20

【0056】

本発明を実施に移しているとき、本発明者らは、脈管形成性の始原細胞が、凝集を防止し、特異的な内皮分化因子とともにIV型コラーゲン上で培養し、そして簡便かつ効率的なサイズ選択方法を用いることによって胚幹細胞から簡便かつ安価に調製され得ることを発見している。本発明によって調製される脈管形成性始原細胞は、培養でさらに拡大培養することができ、また、内皮組織、壁組織および造血組織にインビトロで分化させるために、すなわち、適切な基質に接種されたとき、小さい脈管構造および大きい脈管構造の両方を形成させるために誘導することができ、そして、組織工学、診断目的および研究目的のために遺伝子操作することができ、また、組織工学、診断目的および研究目的のために好適であるという点で好都合である。

30

【0057】

従って、本発明の1つの局面によれば、脈管形成性の始原細胞をヒトES細胞などの未分化ES細胞から調製する方法が提供される。この方法は、本発明のこの局面によれば、個々の未分化ES細胞を、未分化ES細胞が脈管形成性の始原細胞に分化することを誘導するために好適な様式で培養し、それにより、混合細胞集団を得ること、および、50μmより小さい細胞を混合細胞集団から単離することによって行われる。この様式で単離された細胞は、本明細書中下記の実施例の節において明瞭に例示されるように、脈管形成性の始原細胞である。

40

【0058】

本明細書中で使用される表現「脈管形成性(の)始原細胞」は、内皮もしくは平滑筋の始原体(例えば、血管芽細胞など)、または成熟した内皮細胞もしくは平滑筋細胞、あるいは造血前駆体(例えば、赤芽球コロニー形成ユニットおよび巨核球など)または成熟した血液細胞(例えば、赤血球および白血球など)である後代を生じさせることができる細胞の集団を示す。典型的には、脈管形成性の始原細胞は、内皮系譜、平滑筋系譜および造血系譜に特徴的である表現型マーカーのいくつかを発現する。典型的には、脈管形成性の

50

始原細胞は、脱分化または再プログラム化されない限り、インビトロで単独で培養されたとき、他の胚性胚葉の後代を生じさせない。多能的な脈管形成性始原細胞である個々の細胞が存在する場合があるが、集団内の細胞のそれぞれが、2つ以上のタイプの後代を形成する能力を有することを意味しないことが理解される。

【0059】

本明細書中で使用される用語「全能性(の)」、用語「多能性(の)」および用語「多能的(な)」は、発達上の柔軟性の程度が低下しつつある細胞を示す。全能性の細胞はすべての細胞タイプまたは完全な生物に発達することができる(例えば、割球)。多能性の細胞はすべての細胞タイプに発達することができる(例えば、ES細胞)。多能的な細胞は特定の系譜の細胞にだけ分化することができる(例えば、脈管形成性始原細胞)。

10

【0060】

本明細書中で使用される用語「内皮始原細胞」または用語「内皮前駆細胞」は、成熟した内皮細胞を生じさせることができる細胞を示す。これらの細胞は、造血細胞または平滑筋細胞を生じさせる能力を有してもよく、またはそのような能力を有しなくてもよい。

【0061】

本明細書中で使用される用語「上皮始原細胞」または用語「上皮前駆細胞」は、成熟した平滑筋細胞を生じさせることができる細胞を示す。

【0062】

本明細書中で使用される用語「造血始原細胞」または用語「造血前駆細胞」は、成熟した血液細胞を生じさせることができる細胞を示す。

20

【0063】

胚幹細胞は、集団内の幹細胞およびその派生体の実質的な部分が未分化細胞の形態学的特徴を示しており、これにより、それらが胚起源または成体起源の分化した細胞から明瞭に区別されるとき、「未分化」として記載される。未分化ES細胞は当業者によって容易に認識されており、典型的には、大きな核/細胞質比および顕著な核仁を有する細胞として光学顕微鏡像では見える。同様に、未分化細胞は、系譜特異的なマーカー、例えば、血管内皮増殖因子受容体2(V E G F R 2)、血管内皮カドヘリン(V E - c a d)または血小板-内皮細胞接着分子-1(P E C A M - 1)などが存在しないことによって分化細胞から区別することができる。

【0064】

30

本明細書中で使用される用語「分化(した)細胞」は、発達経路の下流側に下っている細胞を示す。従って、多能性の胚幹細胞は、系譜限定された前駆細胞に分化することができ、例えば、神経細胞、肝細胞および血液細胞タイプに対してそれぞれ多能性である神経始原体、肝細胞始原体または造血細胞、ならびに、上記で示された内皮細胞タイプ、平滑筋細胞タイプおよび血液細胞タイプなどに分化することができる。これらは、その経路のさらに下流側の他のタイプの前駆体にさらに分化することができ、または、特定の組織タイプに特徴的である最終段階の分化細胞に分化することができ、また、さらに増殖する能力を保持する場合があるか、またはそのような能力を保持しない場合がある。血管内皮、壁平滑筋および赤血球は最終分化細胞の例である。

【0065】

40

本明細書中上記で述べられたように、個々の未分化ES細胞は、脈管形成性始原細胞への分化を誘導するために好適な様式で培養される。本発明の方法によって利用される未分化ES細胞は、採取もしくは凍結保存された胚細胞集塊から得られる哺乳動物胚幹細胞、インビトロ受精の胚細胞集塊に由来する細胞、および/または培養されたES細胞株であり得る。ES細胞はヒト起源または非ヒト起源であり得る。

【0066】

本明細書中下記の実施例の節において明瞭に明らかにされるように、本発明の方法および組成物は、ヒト胚幹細胞との使用のために好適である。ヒト胚幹細胞分化を操作および制御するための方法を確立することが、現在の医学的取り組みおよび科学的取り組みの主要な目標であるので、本発明の好ましい実施形態において、未分化ES細胞はヒトES細胞

50

胞である。好ましくは、ES細胞は、本明細書中下記の実施例の節において詳しく記載されるように、非凝集細胞である。

【0067】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、個々の未分化ES細胞の分化は、ES細胞の凝集を防止するために、IV型コラーゲン、ラミニンまたはゼラチンなどの接着性基質が被覆されたプレートでそのような細胞を培養すること、細胞を 2×10^4 細胞/cm² ~ 1×10^5 細胞/cm²の濃度で接種すること、および分化培地を提供することによって行われる。最も好ましい実施形態において、個々の未分化ES細胞は、IV型コラーゲンが被覆されたプレート（これは、例えば、Cell Culture ware、BD-Falcon (Boston, MA) から入手可能である）において成長させられる。ES細胞を分化させるための条件のさらなる記載については実施例の節を参照のこと。

10

【0068】

本発明の方法論の重要な特徴の1つは、細胞接種工程である。本発明を実施に移しているとき、3次元の胚様体構造が、以前には主張されていたが、ヒト胚幹細胞の中胚葉分化のために要求されないことが観測された。そのフィーダー層から除かれ、分化培地とともにIV型コラーゲン上に単一細胞として置床された未分化ES細胞は、内皮分化の指標の発現を示した（図1A~図1G）。細胞接種濃度は、本発明の方法論の効率に対して劇的な影響を及ぼしていた。例えば、マウスESを用いた先行技術の研究（Yamashita, J他、Nature、2000、408:92）に従って接種された細胞は生存可能ではなく、そのような高濃度（ $1.0 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm²）のhES細胞は不均一な集団をもたらした。それよりも低い細胞接種濃度（ 5×10^4 細胞/cm² ~ 1×10^5 細胞/cm²）は、小さい平坦な内皮様細胞の大部分と、より少数の大きい平滑筋様細胞とを含む明確な細胞集団をもたらした（図1B）。

20

【0069】

下記の実施例の節では、「個々の未分化ES細胞」を非凝集条件のもとで培養する方法のさらなる記載が提供される。

【0070】

本明細書中で使用される用語「分化培地」は、ES細胞の成長および分化を支援することができる好適な培地を示す。本発明とともに使用され得る好適な分化培地の例には、10%のFBS (HyClone、Logan、UT、米国) および0.1mMのβ-メルカプトエタノール (Life Technologies Inc.、Rockville、MD、米国) が補充されたMEM培地 (Life Technologies Inc.、Rockville、MD、米国) またはダルベッコ最少必須培地 (DMEM) を基礎として調製される様々な増殖培地が含まれる。

30

【0071】

本明細書中上記で述べられたように、本明細書中上記で詳しく記載されたように未分化ES細胞を培養することにより、小さい平坦な内皮様細胞の大部分と、より少数の大きい平滑筋様細胞とを含む明確な細胞集団が生じる（図1B）。

【0072】

特定の系譜始原体を選択するための以前の技術は、分化および特定の細胞系譜の指標を免疫検出すること、そして、蛍光または磁石によって細胞を分取すること（例えば、国際特許出願公開第WO0210347A2号 (Benvenisty)、米国特許第6280718号 (Kaufman, DSおよびThomson, JA)、国際特許出願公開第WO0129206A1号 (Cibelli, J他) を参照のこと) に依存しているが、これらの方法は面倒であり、かつ費用がかかる。本発明の教示に従って得られる混合細胞集団の観測された形態学的特徴は、混合細胞集団からの脈管形成性始原細胞の簡便かつ迅速な単離を可能にした。下記の実施例の節において例示されるように、50μm未満の小さい細胞の選択は、混合細胞集団からの脈管形成性始原細胞の迅速かつ効率的な単離を可能にしている（図1C~図1F）。

40

【0073】

50

従って、本発明の方法論では、分化後のサイズ/形態学により選択する工程が用いられる。サイズ/形態学によるそのような選択は、下記でさらに記載されるように、様々な過法、形態測定法および/またはデンシトメトリー法を使用して行うことができる。

【0074】

様々な過方法がこの分野では広く知られており、例えば、網目物、ふるい、フィルターなどに通すことなどがある。フィルターは、繊維状マトリックスまたは多孔性材料から構成され得る。そのようなフィルターは、いくつかの市販されているフィルターのいずれかであり得るが、これらには、限定されないが、Pall Life Sciences (Ann-Arbor, MI, 米国) またはBD-Falcon (Boston, MA, 米国) から得られる細胞培養フィルターが含まれる。好ましいフィルターは、細孔サイズが40 μmであるナイロン網目フィルター (Cell Cultureware, BD-Falcon, Boston, MA, 米国) であり、これは、より小さい内皮様細胞を通過させることができ、より大きい平滑筋様細胞を除外することができる。

10

【0075】

「形態測定」は、外形形態の測定を示し、2D画像分析および3D画像分析(これらに限定されない)を含む方法を用いることができる。50 μmより小さい細胞を同定および単離するために好適な最新式の画像化分析ソフトウェアを、当業者は市販品から入手することができる[例えば、Metamorph Software (Universal Imaging Corp., Downing, PA, 米国)、Imagic-5 (Image Science Software (Berlin, ドイツ)、およびStereo 20
ologer (Systems Planning and Analysis, Inc., Alexandria, VA, 米国)を参照のこと]、また、所望する外形特徴(例えば、サイズ)を有する対象物を選択するために、広く知られている光学顕微鏡観察技術およびフロー分取技術と組み合わせることができる(好適な装置については、例えば、米国特許第6249341号(Basiji他)を参照のこと)。

20

【0076】

「デンシトメトリー」は対象物の光学的または物理的な密度の測定を示す。より小さい内皮様細胞は細胞成分の特有かつ特徴的な分布を有するので、デンシトメトリー測定を、細胞を特徴づけ、その分離および単離のための基準を提供するために使用することができる。内皮様細胞のデンシトメトリー単離のために好適な装置は、例えば、MECOS-C
1血液細胞デンシトメトリー分析計(MECOS Co., Moscow, ロシア)である。細胞はまた、FICOLLTMまたはPERCOLLTM (Amersham Bi
osciences, Inc., Piscataway, NJ, 米国)などの調製用密度
勾配による沈降によって分離することができる(デンシトメトリー分画技術の網羅的な総
説については、Pertoft, H, J Biochem Biophys Methods, 2000, 44: 1~30を参照のこと)。従って、本発明は、始原細胞を作製お
よび単離するための容易かつ迅速な方法を提供する。そのような始原細胞を単離する以前
の方法は、望ましい増殖能を有しない始原体集団をもたらしており、このため、その実用
的な適用が制限されていた(Reubinoff, BE他, Nat Biotech, 2
000, 18: 399~404; Schuldiner, M他, PNAS USA, 20
00, 97: 11307~312)。本発明の方法によって単離された脈管形成性始原細胞は、非常
に数多くの回数の細胞倍化による増殖によって非常に多数の同一の細胞を生じ
させることができる。

30

40

【0077】

本発明の教示に従って単離された脈管形成性始原細胞の集団は、内皮始原体マーカーのVE-カドヘリンを発現する細胞(図1C~図1E)および内皮マーカーを発現する細胞(図1F)の量が多いことによって、また、核内への(BrdU)の取り込み(図1I)によって示されるように、活発に増殖することによって特徴づけられる。さらに分化させるためのさらなる刺激がない場合、これらの細胞は、非常に多数の多能的な脈管形成性始原細胞を生じさせることができる。さらに、脈管形成性始原細胞は、この分野で典型的に

50

用いられているコンディショニング、貯蔵および解凍のための方法のいずれかに従った凍結保存によって非常に長い期間にわたって生存可能な状態で維持することができる（例えば、米国特許第6140123号（Demetriou他）を参照のこと）。

【0078】

分化した細胞は様々な治療法において重要であるために、胚性前駆細胞の方向づけられた分化は、幹細胞を培養することの技術分野における重要な目標を提供している。培養で維持された胚幹細胞は、多くの場合、自発的な分化（Thomson, J. A. 他、Science、1998、282:1145~47）を受けるが、胚様体由来する細胞の方向づけられた分化（Shambloot MJ他、PNAS USA、2001、98:113~18）、および、MEF細胞と同時培養されたヒトES細胞の方向づけられた分化（Kaufman DS他、PNAS USA、2001、98:10716~721）が、環境因子の操作によって明らかにされている。例えば、Kaufman他は、マウス骨髄間質細胞との培養によってヒトES細胞における造血分化を誘導した（Kaufman DS他、PNAS USA、2001、98:10716~721；米国特許第6280718号（Kaufman D他）；Carpenter（米国特許出願公開20020039724A1）は、cAMP活性化因子および/または神経栄養増殖因子にさらすことによって神経始原細胞におけるニューロン細胞およびグリア細胞の発達を誘導した。Benvenistyは、ヒト胚様体細胞を様々な増殖因子にさらすことによって、拍動する心筋細胞およびニューロン様細胞を作製した（Itskovitz-Eldor, J 他、Mol Med、2000、6:88~95；Schuldiner, M 他、PNAS USA、2000、97:11307~312；国際特許出願公開第WO0210347A2号（Benvenisty N））。しかしながら、上記の方法はすべて、同時培養、胚様体形成、または細胞表面マーカーの免疫検出による始原体選択のいずれかを用いている。

【0079】

本発明の脈管形成性始原細胞の方向づけられた分化は、特異的な血管増殖因子、平滑筋増殖因子または造血増殖因子にさらすことによって行うことができる。

【0080】

下記の実施例の節において例示されるように、低濃度で接種された脈管形成性始原細胞を増殖因子にさらすことにより、特定の成熟した細胞表現型への分化が誘導される。増殖因子hVEGFに対する暴露は、内皮細胞表現型の形態学的指標および機能的指標の両方の出現を誘導し（図1C~図1Fおよび図2F~図2H）、その一方で、平滑筋増殖因子hPDGF-BBに対する暴露は平滑筋細胞マーカーを上方調節した（図2A~図2E）。同様に、サイトカインに対する暴露は脈管形成性始原細胞の造血分化を刺激した（図2K~図2M）。

【0081】

従って、本発明の別の局面によれば、体細胞を本発明の脈管形成性始原細胞の集団から調製する方法が提供され、この場合、この方法は、本明細書中上記で記載されたように脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、脈管形成性始原細胞の集団を、体細胞の分化を誘導するために好適な少なくとも1つの増殖因子の存在下で培養することによって行われる。

【0082】

本明細書中で使用される用語「体細胞」は、形態学的基準、免疫学的基準、生化学的基準および/または機能的基準によって特定の細胞表現型に属するとして同定可能な、明確な系譜の細胞を示す。体細胞は、定義により、始原細胞および幹細胞よりもさらに分化しているが、始原細胞および幹細胞よりも多能的ではない。体細胞の例は、本発明の関連では、内皮細胞、平滑筋細胞および血液細胞である。

【0083】

非常に多数の増殖因子が、脈管形成、血管形成および造血分化の複雑なプロセスに関係している（総説については、Carmeliet, P、Nature Med、2000

10

20

30

40

50

、6:389~95; Yancopoulos G, Nature, 2000, 407: 242~48を参照のこと)。一部の増殖因子(すなわち、VEGF、AngおよびPDGF)は、それらの影響が、他の増殖因子よりも優勢であるが、始原細胞の体細胞への効果的な分化は、典型的には、多数の因子の組み合わせ、そして時間的に協調した作用の結果である。

【0084】

従って、本発明のこの局面の実施形態の1つによれば、方向づけられた分化は、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン(Ang)、血小板由来増殖因子(PDGF)、エフリン(Eph)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、腫瘍増殖因子(TGF)、胎盤増殖因子(PIGF)、サイトカイン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、トランスフェリン、インスリン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)(これらに限定されない)を含む1つ以上の増殖因子を使用することによって行われる。そのような因子は、細胞培養において使用される好適な調製物で、当業者には市販品から入手することができる。

10

【0085】

さらに、上記の増殖因子は、互いに異なる種々の役割を発達プロセスにおいて有する関連した分子を含む因子ファミリーを含み得ることが理解される。従って、VEGFファミリーのメンバー(例えば、VEGF-A、VEGF-B、・・・、VEGF-D)、GM-CSFおよびbFGFに対する暴露は内皮分化を刺激することができ、その一方で、PDGFファミリーおよびAngファミリーは平滑筋発達および内腔形成においてそれぞれ重要である。

20

【0086】

本発明を実施に移しているとき、分化培地に最初にさらし、そして、ろ過によるサイズ選択を行った後、本発明の平滑筋始原体でなく、本発明の脈管形成性始原細胞は、細胞増殖を示す、BrdUの核での活発な取り込みを示すことが明らかにされた。

【0087】

従って、本発明の別の局面によれば、脈管形成性始原細胞の集団を含む細胞培養物が提供される。この場合、脈管形成性始原細胞の集団は、本明細書中上記で詳しく記載されたように、増殖可能な未分化状態を14日以上もの長期にわたって持続することができ、また、少なくとも1つの血管形成増殖因子、脈管形成増殖因子または造血増殖因子にさらされたとき、平滑筋細胞、内皮細胞および/または造血細胞に分化することができる。従って、本発明の細胞培養物は、比較的分化していない状態で拡大培養および維持することができる。

30

【0088】

胚幹細胞および成体幹細胞の多能性および増殖性は、当然のことではあるが、インビトロでの組織調製および組織工学のためにこれまで利用されている。組織工学では、組織の始原体または前駆体が、個々の細胞のレベルでの分化だけでなく、組織/臓器移植片のための供給源として、または人工臓器支持体のための供給源として、または器官バイオリアクターとして使用され得る認識可能かつ機能的な組織構造および器官構造への形態学的、生化学的および解剖学的な組織化をも達成するために、適切な分化因子とともにインビトロで培養される。インビトロで操作されている組織の例には、軟骨(Koch RJおよびGortti GK, Facial Plast Surg, 2002, 18: 59~68)、皮膚(Lee KH, Yonsei Med J, 2000, 41: 774~79)、尿生殖器組織(Atala A, Curr Opin Urol, 1999, 9: 517~26)、および膵臓小島(Maria-Engler SS他, Braz J Med Biol Res, 2001, 34: 691~7)がある。しかしながら、これらの組織は、幹細胞からではなく、分化した組織成分から操作されている。胚幹細胞が、機能的な膵臓小島様構造体(Lemelsky他, Science, 2001, 292: 1389~94)および血液組織(Kaufman DS他, PNAS USA, 2001

40

50

、98:10716~21)をインビトロで生じさせるために使用されている。

【0089】

血管様構造もまたインビトロで形成されている。K a u s h a l他(Nat Med、2001、7:1035~40)は、末梢の内皮始原体が、脱区画化された(decellularized)ブタ血管上に機能的な新血管を形成することを報告していた。L e v e n b e r g他(PNAS USA、2002、99:4391~96)は、ヒト胚様体に由来する内皮細胞を用いて研究したとき、マトリゲルにおける管様構造の形成を明らかにし、また、移植されたとき、微小血管を明らかにした。しかしながら、これらの血管様構造体は、典型的には、正常な血管に特徴的である正常な複雑な脈管/壁組織化を有していない。

10

【0090】

本発明を実施に移しているとき、驚くべきことに、本発明の脈管形成性始原細胞は、適切な増殖因子とともにマトリゲルにおいて成長させたとき、小さい毛細管様脈管を形成し(図3A~図3G)、また、より大きな脈管構造をアルギン酸塩足場で形成する(図4Aおよび図4B)ことが発見された。両方の場合において、脈管構造体内における血液細胞の形成と同様に、正常な内皮組織化および壁組織化が観測された(図3E~図3Gおよび図4A~図4B)。

【0091】

従って、本発明の別の局面によれば、血管組織を調製するための方法が提供される。この方法は、本発明の脈管形成性始原細胞の集団を、少なくとも1つの脈管形成増殖因子および/または血管形成増殖因子の存在下、血管組織の分化を誘導するための好適な条件のもとで培養することによって行われる。

20

【0092】

本発明のこの局面の実施形態の1つによれば、血管組織が、脈管形成性の始原細胞を半固体の脈管化促進培地で培養することによって調製される。そのような培地は、典型的には、増殖因子で処理された分化途中の脈管形成性細胞が凝集後に混合される細胞外マトリックス成分(例えば、Matrigel(BD Biosciences、Bedford、MA、米国)またはコラーゲン(例えば、ラット尾コラーゲンI)を含む。増殖因子は、脈管形成性および/または血管形成性の成長または発達を誘導することが知られている上記の脈管形成因子および/または血管形成因子のいずれか、例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン(Ang)、血小板由来増殖因子(PDGF)、エフリン(Eph)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、腫瘍増殖因子(TGF)および胎盤増殖因子(PIGF)などであり得る。好ましい実施形態において、増殖因子は、50ng/mlのVEGF₁₆₅および10ng/mlのhPDGF-BBである。脈管構造体の成長は、典型的には、7日間~15日間のインキュベーションの後で明らかになる。特徴的な内皮細胞成分、例えば、ヴァイベル-パラデー体およびリポタンパク質カプセルなど;脈管内腔、ならびに、血液細胞が、下記の実施例の節において詳しく記載されるように、組織学および電子顕微鏡観察によって検出される。

30

【0093】

複雑で、巨視的な組織構造もまた、本発明の始原体を、多孔性の支持体、または足場に接種することによってインビトロで模倣することができる。そのような支持体は、この分野では広く知られており(米国特許第5759830号および同第5770417号(Vacanti他)、ならびに同第6379962号(Holy他))を参照のこと)、近年には、例えば、宿主細胞による脈管化および上皮化のための管状の血管補綴具として、血管再生(米国特許出願公開20020019663A1(Termin, PL他))のために、繊維芽細胞による創傷修復(米国特許出願公開20020076816(Dai, J他))のために、また、インビトロでの骨工学(米国特許出願公開20020028511(de Brujin, JD他))のために提案されている。本発明の実施形態の1つにおいて、毛細管サイズよりも大きい血管組織が、脈管形成性始原細胞を3次元の足場で培養することによって調製される。好ましい実施形態において、足場は、多孔性が

40

50

つ生分解性のスポンジ様物質であり、例えば、ポリL-乳酸、ポリ乳酸-グリコール酸またはアルギン酸塩などであり、また、分化培地はVEGF₁₆₅ (50 ng/ml)およびhPDGF-BB (10 ng/ml)の増殖因子を含有する。そのようなアルギン酸塩足場で成長させられた本発明の血管組織は、典型的には、培養における14日目に、内腔、内皮細胞および平滑筋細胞、細胞封入およびフォンビルブランド因子などの血管の特徴を示している(図4A~図4B)。

【0094】

本発明の方法によって調製された生きている血管組織は、再生治療のために、また、非血管組織の血管新生のために使用することができる。血管組織は、糖尿病の微小血管障害の場合のように、不十分な脈管化または誤った脈管化を受けている胚の器官、成長中の器官または成体の器官に移植することができ、あるいは、虚血性の心臓疾患および脳血管疾患の場合のように、虚血損傷を受けている組織、またはその危険性のある組織に移植することができる。同様に、本発明の血管組織は、外科的バイパス、血管変性(アテローム性動脈硬化など)および自己免疫疾患の場合における組織置換療法のために大きい直径の血管を提供することができる。

10

【0095】

本発明の脈管形成性始原細胞から調製された培養物または血管組織を分化させることはまた、血管の発達および機能をもたらすプロセスを調べるために好適なモデルを提供することが理解される。例えば、本発明の細胞および組織は、毒性が疑われる物質、抗体、催奇物質、薬物およびその他の存在下で培養することができ、または、非標準的な環境因子、例えば、温度、気体分圧およびpHなどにさらすことができ、または、他の組織もしくは他の生物に由来する細胞の存在下で同時培養することができる。成長および発達のパラメーターの変化、例えば、内皮マーカー発現の欠如もしくは遅れ、増殖能の喪失、またはインビトロ脈管化の崩壊などが、様々な因子の影響を明らかにするために評価され得る。

20

【0096】

従って、本発明の別の局面によれば、血管の発達、成長および/または変化に対する因子の影響を明らかにする方法が提供される。この方法は、本発明の脈管形成性始原細胞の集団を因子にさらし、細胞に対する因子の影響を明らかにすることによって行われる。

【0097】

脈管形成性始原細胞は、血管の発達、成長または変化を阻害または下方調節することが疑われる因子にさらすことができる。そのようなアッセイは、薬物の開発および研究では広く知られており、他の非血管プロセスの処置のために意図された物質の望ましくない副作用を試験するために用いることができ、あるいは、脈管形成の新規な阻害剤を発見するために使用することができる。血管の発達および成長を阻害する作用の評価を可能にするために、脈管形成性始原細胞を培養する条件は、脈管形成および血管形成のために有利にしなければならず、あるいは、より好ましくは、脈管形成および血管形成のために最適にしなければならない。これには、調べられている血管発達の特定の段階のための、培地成分(例えば、増殖因子または分化因子など)、温度、基質組成、気体分圧などの他の最適化が含まれる。

30

【0098】

実際、本発明を実施に移しているとき、本発明者らは、血管形成を阻害する抗VE-cad mAbと本発明の脈管形成性始原細胞のインキュベーションはhVEGFによる分化を妨げたことを発見した(図5A~図5B)。同様に、妊娠の初期合併症を処置するために意図された薬物を、脈管形成性始原細胞をさらし、薬物を除き、細胞の成長または発達の変化を、この分野で一般的に使用されている方法によってモニターすることによって、胚の血管発達に対する潜在的な有害作用についてスクリーニングすることができる。同様に、脈管形成性始原細胞における血管形成および/または脈管形成を刺激または上方調節する因子を、最適ではない培養条件のもとで最も良く評価することができる。脈管形成および/または血管形成に影響を及ぼす物質には、ペプチド、ペプチドミメティクス、ポリペプチド、抗体、化学的化合物および生物学的媒介因子が含まれる。

40

50

【0099】

始原細胞集団は、組織工学、移植および再生治療が非常に容易であるので、そのような細胞の遺伝子操作は、以前には得ることができなかった特有の特徴を有する細胞集団を発達させる供給源を提供し得る。

【0100】

本明細書中下記の実施例の節の実施例1において明瞭に例示されるように、本発明の脈管形成性始原細胞は活発な増殖を示しており、従って、そのような活発な増殖は、そのような細胞を遺伝子操作しやくし、それにより、そのような細胞は、例えば、少なくとも1つの外因性ポリペプチドを発現することができようになれる。そのような細胞培養物において発現させられる外因性ポリペプチドは、細胞表面マーカー、細胞表面抗原、血管形成因子、脈管形成因子および造血因子であり得る。発現させることができるさらなるポリペプチドは、例えば、様々な受容体、リガンド、細胞接着分子、酵素、ペプチドホルモン、および免疫系のタンパク質である。

10

【0101】

本発明の脈管形成性始原細胞は、外因性ポリペプチドまたは外因性ポリペプチドの前駆体形態をコードするヌクレオチド配列を導入することによって、外因性ポリペプチドを発現させるために操作することができる。外因性の外来核酸配列は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム、顕微注入、リポフェクション、レトロウイルスベクターまたは他のウイルスベクターまたは細菌ベクター、あるいは、当業者に広く知られている他の手段によって、培養物の脈管形成性始原細胞に移すことができる。好ましくは、外因性配列の発現は誘導可能である。外因性ポリペプチドを発現する細胞は、この分野で広く知られている様々な技術によってスクリーニングおよび単離することができ、これらには、免疫ブロッティング、免疫蛍光、ELISAおよびRT-PCRが含まれるが、これらに限定されない。外因性ポリペプチドを発現する細胞は、例えば、欠陥部を修復するか、または欠陥部を増大させるために、集め、拡大培養し、分化させ、使用することができる。このようにして、細胞、組織または器官を、宿主生物による移植物の拒絶を低下させる外因性の主要組織適合性抗原を伴って調製することができる。さらに、脈管形成増殖因子を発現および分泌する細胞、または増殖因子受容体を過剰発現する細胞を選択および培養することができ、これにより、分化因子に対する変化した時間的な動力学および/または感受性を有する脈管形成性始原細胞の培養物が得られる。

20

30

【0102】

本発明の方法によって単離された脈管形成性始原細胞は、血管疾患および血管関連疾患の処置において治療的に使用することができる。潜在的な適用には、損傷組織および虚血組織を修復するための細胞移植、再生中の組織の脈管化、ならびに胚の再生医療が含まれる。幹細胞および始原細胞のそのような治療的適用の例には、成体の内皮始原体を移植した後の虚血組織の領域で観測される血管成長の増強(Kawamoto A他、Circulation、2001、103:634~37)、および、マウスにおける誘導された発作での脳虚血の後での成体内皮始原体による血管新生(Zhang ZG他、Circ Res、2002、90:284~88)がある。

【0103】

従って、本発明のさらに別の局面によれば、哺乳動物対象における血管の疾患または状態を緩和または防止する方法が提供される。この方法は、本発明の脈管形成性始原細胞を対象に投与することによって行われる。

40

【0104】

本発明の始原細胞を対象(特に、ヒト対象)に投与する方法には、対象における標的部位内への細胞の注入または移植が含まれ、本発明の細胞は、対象内への細胞の、注入または移植による導入を容易にする送達ビヒクルに入れることができる。そのような送達ビヒクルには、細胞および流体を受容対象の体内に注入するためのチューブ(例えば、カテーテル)が含まれる。好ましい実施形態において、チューブは、本発明の細胞が、所望される位置において対象に、それを介して導入され得るニードルをさらに有する(例えば、シ

50

リンジ)。本発明の始原細胞は種々の形態でそのような送達ビヒクル(例えば、シリンジ)に入れることができる。例えば、細胞が、そのような送達ビヒクルに含有されたとき、溶液中に懸濁することができ、または担体マトリックスに埋め込むことができる。本明細書中で使用される用語「溶液」は、本発明の細胞が生存可能な状態を保ち続けるキャリアまたは希釈剤を含む。本発明のこの局面とともに使用され得るキャリアおよび希釈剤には、生理的食塩水、水性緩衝剤溶液、溶媒および/または分散媒体が含まれる。そのようなキャリアおよび希釈剤の使用はこの分野では広く知られている。溶液は、好ましくは、無菌であり、容易なシリンジ通過性が存在する程度に流動性である。好ましくは、溶液は、製造および貯蔵の条件のもとで安定であり、また、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの使用により、細菌および真菌などの微生物の汚染作用を受けないように保存される。本発明の溶液は、本明細書中に記載されるような始原細胞を、キャリアまたは希釈剤、および、要求される場合、上記で列挙された他の成分に配合し、その後、ろ過滅菌することによって調製することができる。

10

【0105】

脈管形成性始原細胞が配合され得るか、または埋め込まれ得る担体マトリックスには、受容者に対する適合性を有するマトリックスで、受容者に対して有害でない生成物に分解するそのようなマトリックスが含まれる。天然および/または合成の生分解性マトリックスがそのようなマトリックスの例である。天然の生分解性マトリックスには、血漿凝固物(例えば、哺乳動物に由来するもの)、ポリマー足場、マトリゲルおよびコラーゲンマトリックスが含まれる。合成の生分解性マトリックス(足場)には、合成ポリマー、例えば、ポリ無水物、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などが含まれる。合成ポリマーの他の例、および、細胞をこれらのマトリックスに配合するか、または埋め込む様々な方法がこの分野では知られている。例えば、米国特許第4298002号および米国特許第5308701号を参照のこと。これらのマトリックスは、脆弱な始原細胞に対する担体および保護をインビボで提供し、従って、脈管形成性始原細胞が受容対象に導入される好ましい形態である。

20

【0106】

本発明の移植された脈管形成性始原細胞の分化は、周囲の組織に由来する因子によって導かれ得るか、または、系譜特異的な増殖因子との移植前のインキュベーションによって開始され得る。従って、例えば、平滑筋の再生を必要とする欠陥を、平滑筋前駆体が濃縮された集団を達成するためにPDGF-BBにさらされた細胞を用いて処置することができる。

30

【0107】

本発明の方法により処置され得る血管の疾患および状態には、先天的な血管障害、後天的な血管障害、および虚血/再灌流傷害が含まれる。本明細書中で使用される用語「先天的な血管障害」は、生まれたときから存在する血管障害を示し、これには、遺伝性の障害および発達上の障害の両方が含まれる。「後天的な血管障害」は、出生後に生じる血管障害を示し、これには、全身的疾患または他の疾患の二次的な血管徴候、例えば、糖尿病の微小血管障害などが含まれる。「虚血/再灌流傷害」は、中断または低下した血液供給、および、虚血組織において循環を再確立することに関連する組織損傷(特に、炎症応答)から生じる細胞傷害または組織傷害を示す。

40

【0108】

そのような処置から利益を受け得る状態には、虚血状態(例えば、心筋、脳または末梢血管の虚血に関連する虚血状態)、創傷治癒、組織の移植(移植片を含む)、および、内皮細胞の成長および増殖を伴う状態(例えば、冠状動脈血管形成術、ステント設置または関連する手法の後)、動脈移植片の再内皮化、ならびに、A-Vシャントにおける内皮再生(例えば、腎臓透析患者において)が含まれる。霊長類においてブタ始原体の異種移植片を使用したときに遭遇する合併症(Buhler L他、Transplantation、2000、70:1232~31)を考慮して、本発明の方法は、ヒト幹細胞に対して適用することができ、そのような血管状態を処置するために特に適する。

50

【0109】

本発明の脈管形成性始原細胞は、造血増殖因子およびサイトカインにさらされたとき、血液細胞始原体および成熟した血液細胞に分化することを誘導し得ること（それぞれ、図2K～図2Mおよび図3D～図3F）が本発明では認められたので、本発明の脈管形成性始原細胞はまた、哺乳動物対象における血液学的な疾患または状態を処置または防止するために使用することができる。

【0110】

そのような処置は、細胞を、内皮細胞および血液細胞の両方への分化を刺激するために好適な条件のもとで対象に投与することによって行われる。このような様式で処置または防止され得る血液学的な疾患または状態には、先天的な血液障害、後天的な血液障害、凝固障害、および新生物疾患が含まれる。

10

【0111】

本発明の方法による処置のために好適な凝固障害の一例が、フォンビルブランド病、すなわち、内皮フォンビルブランド凝固因子の欠乏によって引き起こされる血友病の1つのタイプである。本発明を実施に移しているとき、本発明の方法によって調製される分化した内皮細胞がフォンビルブランド因子を含有することが発見された（図3A～図3Gおよび図4A～図4B）。従って、本発明の内皮細胞または内皮始原細胞、あるいはその組成物を投与することができ、これにより、凝固因子が産生され、凝固不全が軽減される。

【0112】

上記の治療的適用に加えて、本発明の方法によって単離および調製された脈管形成性始原細胞は、非血管組織または生来的に脈管化が不良な組織の脈管化をもたらすために使用することができる。組織工学の分野で直面する非常に重要な課題の1つが、移植のためにインビトロで調製された組織および器官の十分な灌流であることが認められる。今日まで、組織工学のほとんどの方法は、永続的な生着と、酸素および栄養分の移動とを提供するために、微細孔担体と、宿主からの脈管化とに頼っているが、厚い複雑な組織（例えば、肝臓）が関係する場合には特に、様々な、そして多くの場合には予測できない結果が伴っている。1つの代替法が、混合された肝細胞および内皮細胞によるインビトロでの定着のために、「血管」通路を微細加工によってシリコンで作製することである（Kaiharas他、Tissue Eng、2000、6：105～07）。正常な発達をより厳密に模倣する別の方法では、内皮細胞が、血管網状組織を成長中の組織に提供するために、皮膚細胞（Black AF他、Cell Biol Toxicol、1999、15：81～90）または脂肪細胞（Frerich B他、Int J Oral Maxillofac Surg、2001、30：414～20）と同時培養されている。しかしながら、これらはいずれも、生存可能かつ移植可能な脈管化した組織を操作することには成功していない。

20

30

【0113】

従って、本発明のさらなる局面によれば、哺乳動物組織を脈管化させる方法が提供される。この方法は、脈管形成性始原細胞の集団を得ること、および、細胞を、脈管形成性始原細胞が内皮細胞および平滑筋細胞に分化するために好適な条件のもとで哺乳動物組織と接触させることによって行われる。1つの好ましい実施形態において、哺乳動物組織は、操作された非血管組織である。

40

【0114】

そのような操作された組織の例には、移植のための、インビトロで調製された肝細胞、上皮細胞および皮膚細胞、膵臓細胞および骨細胞の集塊がある。組織を分化途中の脈管形成性始原細胞と接触させることは、本明細書中上記で詳しく記載されたように、操作された組織構造において一般に使用されているような半固体マトリックスにおける同時培養または多孔性足場での同時培養によって行うことができる。哺乳動物組織を接触させることは、宿主生物への移植の前にインビトロで、あるいは、以前に移植された組織または存在する組織に対してインビボで行うことができる。別の好ましい実施形態において、哺乳動物組織は、成体宿主生物への移植のために、または、胚としての移植および成長のために

50

調製された胚組織である。

【0115】

本発明を実施に移しているとき、本発明の方法論のサイズ選択工程によって保持された50 μ mより大きい細胞は、特徴的な内皮細胞マーカーおよび形態学(それぞれ、図1Hおよび図1G)を発現する平滑筋細胞前駆体が濃縮された集団を含むこともまた認められた。

【0116】

従って、本発明はまた、内皮始原細胞を未分化ES細胞から調製する方法を提供する。この方法は、未分化ES細胞を、脈管形成性始原細胞への分化に好適な様式で培養すること、および、50 μ mより大きい細胞を単離することによって行われる。内皮前駆体の培養、および平滑筋細胞へのそれらの分化に関する条件は、脈管形成性始原細胞について本明細書中に詳しく記載されている条件と実質的に類似しているが、内皮増殖因子または脈管形成増殖因子に代えて、平滑筋増殖因子または上皮増殖因子(例えば、PDGF-BBなど)が代わりに使用された。しかしながら、上皮細胞および平滑筋細胞は、より小さい脈管形成性始原細胞の増殖能を有しないことが認められた。

【0117】

成体の血管組織は、存在位置および機能だけでなく、サイズ、形態学および細胞マーカーによって区別可能な内皮細胞および上皮細胞から構成される。血管細胞タイプを単離するための現在の方法は、細胞表面マーカーの検出、免疫蛍光およびフローサイトメトリーに頼っており(例えば、Kevill EGおよびBullard DC、Acta Physiol Scand、2001、173:151~57を参照のこと)、このことは、実験および初代培養のための血管細胞の調製を面倒で、高価かつ不十分にしている。従って、本発明の方法は、未分化幹細胞からだけでなく、血管組織から細胞を単離および調製するために用いることができる。好ましい実施形態において、血管組織の細胞は、解離させられた細胞と、脈管形成性始原細胞について本明細書中で詳しく記載されるようにサイズ選択により単離されたより小さい(50 μ mより小さい)内皮細胞との混合集団を得るために、機械的手段または酵素的手段(例えば、トリプシン消化またはコラゲナーゼ消化など)によって解離させられる。同様に、成体の内皮細胞を、類似する方法によって血管組織から単離することができ、この場合、上皮細胞が濃縮されている(50 μ mより大きい)保持された細胞集団が集められる。

【0118】

実施例

ここでは、上記説明と共に以下の実施例を参照して、非限定的様式で本発明を例示する。

【0119】

一般に、本明細書中で使用した用語および本発明で使用した実験手順には、分子、生化学、微生物学、および組換えDNAの技術が含まれる。このような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”、Sambrookら、1989; “Current Protocols in Molecular Biology”、第I~III巻、Ausubel, R.M. 編1994; Ausubelら、“Current Protocols in Molecular Biology”、John Wiley and Sons、Baltimore、Maryland、1989; Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”、John Wiley & Sons、New York、1988; Watsonら、“Recombinant DNA”、Scientific American Books、New York; Birrenら編、“Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”、第1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1998; 米国特許第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第512

10

20

30

40

50

9659号、および同第5272057号に記載の方法；“Cell Biology : A Laboratory Handbook”、第I~III巻、Cellis, J. E. 編、1994；“Current Protocols in Immunology”、第I~III巻、Coligan J. E. 編、1994；Stitesら編、“Basic and Clinical Immunology”、第8版、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994；Mishell and Shiigi編、“Selected Methods in Cellular Immunology”、W. H. Freeman and Co., New York, 1980を参照のこと；利用可能な免疫アッセイは、特許および化学論文に広く記載されており、例えば、米国特許第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号、および同第5281521号；“Oligonucleotide Synthesis”、Gait, M. J. 編、1984；“Nucleic Acid Hybridization”、Hames, B. D. and Higgins S. J. 編、1985；“Transcription and Translation”、Hames, B. D. and Higgins S. J. 編、1984；“Animal Cell Culture”、Freshney, R. I. 編、1986；“Immobilized Cells and Enzymes”、IRL Press, 1986；“A Practical Guide to Molecular Cloning”、Perbal, B., 1984および“Methods in Enzymology”、第1~137巻、Academic Press、“PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”、Academic Press, San Diego, CA, 1990；Marshakら、“Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual”、CSHL Press, 1996（その全てが本明細書中に完全に記載されているかのように参照として援用される）を参照のこと。他の一般的引例を、本明細書中に記載する。引例中の手順は当該分野で周知であると考えられ、読者の都合のために記載する。引例中に含まれる全ての情報は、本明細書中で参考として援用される。

【0120】

別途に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等な方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料は、下記に記載される。

【0121】

材料および方法 細胞培養

未分化のままであるヒト幹(hES)細胞(H9.2、H13)が、20%のFBS(HyClone、Logan、Utah、米国)、または血清代替物およびbFGF、1mMのL-グルタミン、0.1mMのメルカプトエタノールおよび1%の非必須アミノ酸ストック(Life Technologies Inc., Rockville, MD、米国)が補充された80%ノックアウトDMEM培地(ピルビン酸非添加、高グルコース配合；Life Technologies Inc., Rockville, Maryland、米国)において、以前の記載(Amit M他、Dev Biol、2000、227:271~78)のように不活化マウス胚フィーダー層(MEF)上で成長させられた。hES細胞は、1%のウシ胎児血清(FBS；HyClone、Logan、

Utah、米国)が補充されたEDTA(5mM)を使用してフィーダー層から除かれ、40 μ mの網目のろ過器(Benton, Dickinson and Co., Discovery Labware, Bedford, MA、米国)を使用して単一細胞に分散された。

【0122】

分化の場合、未分化hESの単一細胞を、10%のFBS(Hyclone, Logan, UT、米国)および0.1mMの β -メルカプトエタノール(Life Technologies Inc., Rockville, MD、米国)が補充されたMEM培地(Life Technologies Inc., Rockville, MD、米国)からなる分化培地において、5 $\times 10^4$ 細胞/cm²の濃度でIV型コラーゲン被覆6ウエルディッシュ(Becton Dickinson and Co, San Jose, CA、米国)または0.1%ゼラチン被覆6ウエルディッシュ(Sigma Chemical Co., St Louis, MO、米国)に置床した。培養の6日目に、細胞を40 μ mの網目のろ過器(Becton, Dickinson and Co, Discovery Labware, Bedford, MA、米国)でろ過して、分析し、または、さらなる分化のために再培養した。再培養の場合、ろ過された細胞を、hVEGF₁₆₅(50ng/ml)またはhPDGF-BB(10ng/ml)(ともにR&D Systems Inc.(Minneapolis, MN、米国)から得られる)を含む分化培地(上記参照)において、IV型コラーゲン被覆ディッシュ(Becton Dickinson and Co, San Jose, CA、米国)に2.5 $\times 10^4$ 細胞/cm²で、さらに10日間~12日間にわたって接種した。

【0123】

コラーゲンゲルおよびMatrigelでの3D脈管化アッセイ

3次元培養の前に、分化培地で6日間培養されたる過細胞を、EDTA(5mM)を用いて集め、0.3~0.5 $\times 10^6$ 個/mlの細胞を、凝集を誘導するために最大で24時間、非被覆ペトリディッシュ(Ein-Sheemer Industries、イスラエル)で、50ng/mlのVEGF₁₆₅およびhPDGF-BB(10ng/ml)を含有する分化培地においてインキュベーションした。コラーゲンゲルアッセイの場合、凝集物を2 \times 分化培地に再懸濁して、等容量のラット尾コラーゲンI(3mg/ml)(F. Hoffman-La Roche Ltd, Basel、スイス)と混合した。最初、この混合物の250 μ lを24ウエルディッシュに入れ、37 $^{\circ}$ Cで15分間重合させ、その後、同じ増殖因子が補充された分化培地の500 μ lを加えた。Matrigelアッセイの場合、24ウエルディッシュを380 μ lのMatrigel(Becton Dickinson and Co, San Jose, CA、米国)で被覆し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションして、凝集物を、hVEGF(50ng/ml)およびhPDGF-BB(10ng/ml)を含有する分化培地においてマトリゲルに接種した。いくつかのアッセイでは、凝集物はMatrigel(Becton Dickinson and Co, San Jose, CA、米国)の内部に再懸濁され、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションされ、その後、hVEGF(50ng/ml)およびhPDGF-BB(10ng/ml)を含有する分化培地とともにウエルに加えられた。すべてのアッセイについて、細胞は7日間~12日間にわたってインキュベーションされ、位相差顕微鏡(Olympus Optical Co Ltd, Hamburg GmbH)を使用して分析された。

【0124】

足場の脈管化

LF120 50 μ lのアルギン酸塩足場(Shapiro LおよびCohen S、Biomaterials、1997、18:583)をSmadar Cohen教授(ベングリオン大学、Beer Sheva、イスラエル)から譲り受けた。上記で記載されたように、この足場には、本明細書中上記に記載されたように調製された、24時間経ったESH細胞凝集物が接種された。およそ0.5~1.0 $\times 10^6$ 個の細胞が足場

あたり接種された。その後、細胞を含有する足場は、50 ng/mlのVEGF₁₆₅および10 ng/mlのhPDGF-BBが補充された分化培地において培養された。

【0125】

造血コロニーアッセイ

造血始原体の能力が、ろ過されたVEGF処理のVE-cad⁺ ESH細胞を、単一細胞として、プレートあたり1~2×10⁵個の細胞で、サイトカイン補充の半固体培地(Methocult GF+培地; StemCell Technologies、Vancouver、BC)に接種することによって明らかにされた(アッセイの詳細については、Kaufman DS他、PNAS、2001、98:10716~21を参照のこと)。14日間のインキュベーションの後、プレートを、標準的な基準[Eaves CおよびLambie K、Atlas of Human Hematopoietic Colonies(1995); StemCell Technologies、Vancouver、BC]に従ってコロニー形成ユニット(CFU)数についてスコア化した。

10

【0126】

免疫染色、Dil-Ac-LDLおよびBrdUの取り込み

培養された細胞を、4%パラホルムアルデヒド(Sigma-Aldrich Corp.、St Louis、MO、米国)を含むリン酸塩緩衝化生理的食塩水(PBS)(Life Technologies Inc.、Rockville、MD、米国)と室温で30分間インキュベーションすることによってその場に固定した。PBSで洗浄した後、細胞を、供給者の説明書に従って、関連の一次抗体で染色した:ヤギ抗ヒトKDR(R&D Systems Inc.、Minneapolis、MN、米国)、マウス抗hCD31、マウス抗hSMA、マウス抗hカルポニン、マウス抗h平滑筋ミオシン重鎖(これらはすべて、DAKO Corp(Carpenteria、CA、米国)から得られる)、ヤギ抗ヒトVE-カドヘリン(Santa Cruz Biotechnology, Inc.、Santa Cruz、CA、米国)(DAKO Corp、Carpenteria、CA、米国)、マウス抗スムーセリン(CHEMICON, Intl, Inc.、Temecula、CA、米国)。コントロールは、二次抗体単独でインキュベーションされた細胞からなった。免疫染色された培養物は、蛍光顕微鏡(Olympus Optical Co, Ltd.、Hamburg GmbH)を使用して検査および写真撮影された。

20

30

【0127】

Dil1標識ac-LDLの取り込みの場合、培養されたESH細胞が10 μg/mlのDil1標識ac-LDL(Biomedical Technologies Inc.、Stoughton、MA、米国)と37°Cで4時間インキュベーションされた。インキュベーション後、細胞をPBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、蛍光顕微鏡(Olympus Optical Co Ltd.、Hamburg GmbH)を使用して検査および写真撮影した。

【0128】

ESH培養物および分化途中の細胞におけるBrdUの取り込みを、製造者の説明書に従って、BrdU染色キット(Zymed Labs Inc.、South San Francisco、CA、米国)を使用してその位置で調べた。簡単に記載すると、BrdU溶液を培養培地で1:100に希釈して、細胞に一晩加え、その後、PBSで2回洗浄し、75%エタノールで固定して、特異的なBrdU免疫染色を行った。

40

【0129】

免疫表現型

細胞は、以前の記載(Reubinoff BE他、Nat Biotech、2001、19:1134)のように免疫蛍光染色を使用して特徴づけが行われた。簡単に記載すると、フィルター分離されたESH細胞を、上記で記載されたように、分化培地(MEM、10%FBSおよび0.1%メルカプトエタノール)において、IV型コラーゲ

50

ンプレートで12時間～20時間にわたって再培養し、固定して、特異的な細胞タイプマーカーの発現について、抗ヒトVE-カドヘリン(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, 米国)および抗ヒトKDR(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, 米国)を用いてアッセイした。少なくとも150個の細胞がこれらのマーカーのそれぞれの発現について無作為の視野内でスコア化された(100倍)。実験は少なくとも3回繰り返された。

【0130】

組織形態学および免疫組織化学分析

細胞を含有するMatrigelまたはコラーゲングル(これらは、本明細書中上記のコラーゲングルおよびMatrigelの3D脈管化アッセイについて記載された通りである)を、上記で記載されたように、24ウエルディッシュにおいて、ガラス製カバーガラスに載せた。処理が完了したとき、カバーガラス上の細胞含有ゲルブロックを10%中性緩衝化ホルマリンで固定し、段階濃度のアルコール浴(70%～100%)で脱水し、パラフィンに包埋した。使用された場合、アルギン酸塩足場は直接、段階濃度のアルコールで脱水された。一般的な組織形態学の場合、1 μ m～8 μ mの切片がヘマトキシリン/エオシンまたはトルイジンブルーで染色された。脱パラフィン化切片が、製造者の説明書に従って、LSAB+染色キット(DAKO Corp, Carpinteria, CA, 米国)またはCell and Tissue染色キット(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, 米国)を使用して、関連の一次抗体で免疫染色された。染色された切片を、100倍～400倍の倍率で顕微鏡を使用して、観察し、写真撮影した。

【0131】

FACS分析

内皮始原体マーカーのVEGFR2(KDR)およびVE-cadを発現する細胞が、上記で記載されたように、ろ過、およびIV型コラーゲンでの別個の再培養の後、2つのサイズ分離されたヒトES細胞集団から検出され、定量された。FACS分析の場合、ESHろ過細胞を、5%FBSを含有するPBSで洗浄し、ヒトVE-カドヘリン(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, 米国)またはヒトKDR(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, 米国)とインキュベーションして、洗浄し、そして好適な二次抗体と30分間インキュベーションした。細胞を、FACSCalibur(Benton Dickinson and Co., San Jose, CA, 米国)をCELLQUESTソフトウェアとともに使用して分析した。両方のアッセイにおいて、二次抗体のみと反応した細胞がコントロールとして使用された。

【0132】

電子顕微鏡観察

Matrigelまたはコラーゲンゲルに接種された細胞を、3%グルタルアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸ナトリウムで1時間固定し、次いで、1%OsO₄を含むペロナール-酢酸緩衝液で1時間、後固定した。電子顕微鏡観察分析のための調製は、Rambam Medical Centerの病理学部門(Haifa, イスラエル)での標準的な手順に従って行われた。簡単に記載すると、細胞をクエン酸鉛で染色し、脱水し、Epon樹脂に包埋した。切片を、ダイヤモンドナイフを使用して600 μ mの厚さで切断し、JEM-100SX電子顕微鏡を使用して検査し、写真撮影した。

【0133】

逆転写(RT)-PCR分析

総RNAを、製造者の説明書に従って、TriReagent(Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, 米国)を使用して始原体および種々の系譜細胞から抽出した。総RNAをUV分光光度法によって定量し、1 μ gを各RTサンプルのために使用した。RNAを、製造者の説明書に従って、M-MLV逆転写酵素(Promega Corp., Madison, WI, 米国)およびオリゴ(dT)プライマ

- (Promega Corp., Madison, WI, 米国) を用いて逆転写した。選択された転写物の PCR 分析を、反応あたり 1 μ g の RT 産物を使用して、BIOTA Q^TM DNA ポリメラーゼ (BIOLINE, Ltd GmbH, Luckenwalde, ドイツ) を用いて行った。場合により、MgCl₂ 濃度 (通常、1.5 mM) を較正した (これは下記に示される)。RT-PCR アッセイにおける半定量的な結果を確保するために、各プライマーセットに対する PCR サイクルの数は、増幅の直線範囲内にあることが確認された。さらに、すべての RNA サンプルは、内部標準としてのハウスキーピング遺伝子 GAPDH の等しい増幅を生じさせるために調節された。PCR 条件およびプロトコルは下記からなった: 94 で 5 分 (ホットスタート); その後、(a) 94 で 30 秒間、(b) アニーリング温度 (Ta、これは下記に示される) で 30 秒間、および (c) 72 で 30 秒間の 30 サイクル ~ 40 サイクル (実際の回数は下記に示される)、最後に 72 で 7 分間の最後の伸張で終了する。オリゴヌクレオチド特異的な条件は下記の通りであった: - sma、32 サイクル、Ta: 60 (Yamamura, H 他、Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 1998, 79: 245); カルポニン、35 サイクル、Ta: 60 (Yamamura, H 他、Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 1998, 79: 245); SM-MHC、35 サイクル、Ta: 62、1 mM の MgCl₂ (Boreham 他、Am J Obstet Gynecol, 2001, 185: 944~52); SM22、35 サイクル、Ta: 60 (Yamamura, H 他、Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 1998, 79: 245); カルデスモン、35 サイクル、Ta: 60 (Duplaa, C. 他、Circ. Res., 1997, 80: 159); GATA2、35 サイクル、Ta: 55 (Kaufman DS 他、PNAS, 2001, 98: 10716); AC133、32 サイクル、Ta: 60 (Shambloott MJ 他、PNAS, 2001, 98: 113); Tie2、35 サイクル、Ta: 60 (Ahmad, S 他、Cancer, 2001, 92: 1138); CD31、32 サイクル、Ta: 60 (Quarby, S 他、Arterio Thromb Vas Biol, 1999, 19: 588~97); Tal1、40 サイクル、Ta: 53 (Kaufman DS 他、PNAS, 2001, 98: 10716); GAPDH、32 サイクル、Ta: 60 (Itskovitz-Eldor J 他、Mol Med, 2000, 6: 88)。

【0134】

オリゴヌクレオチドプライマー:

PCR 反応のために、下記の特異的なオリゴヌクレオチドプライマーが使用された:

(a) - sma: 5' CCAGCTATGTGAAGAAGAAGAGGG3' (配列番号 1) (センス) および 5' GTGATCTCCTTCTGCATTCGGT3' (配列番号 2) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 965 塩基対である;

(b) カルポニン: 5' GAGTGTGCAGACGGAACTTCAGCC3' (配列番号 3) (センス) および 5' GTCTGTGCCCAACTTGGGGTTC3' (配列番号 4) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 671 塩基対である;

(c) SM-MHC: 5' CTACAGGAGCATGCTGCAGGATCG3' (配列番号 5) および 5' GCTTGCAGAAGCTGCTTCTCCAGC3' (配列番号 6)、これらはヌクレオチド 579 (センス) およびヌクレオチド 758 (アンチセンス) にそれぞれ対応する。予測されるバンドサイズは 179 塩基対である;

(d) SM22: 5' CGCGAAGTGCAGTCCAAAATCG3' (配列番号 7) (センス) および 5' GGGCTGGTTCTTCTTCAATGGGG3' (配列番号 8) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 928 塩基対である;

(e) カルデスモン: 5' AACAACTGAAAGCCAGGAGG3' (配列番号 9) および 5' GCTGCTTGTTACGTTTCTGC3' (配列番号 10)、これらはヌクレオチド 244 (センス) およびヌクレオチド 792 (アンチセンス) にそれぞれ対応する。予測されるバンドサイズは 530 塩基対である;

(f) G A T A 2 : 5 ' A G C C G G C A C C T G T T G T G C A A 3 ' (配列番号 11) (センス) および 5 ' T G A C T T C T C C T G C A T G C A C T 3 ' (配列番号 12) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 242 塩基対である；

(g) A C 1 3 3 : 5 ' C A G T C T G A C C A G C G T G A A A A 3 ' (配列番号 13) (センス) および 5 ' G G C C A T C C A A A T C T G T C C T A 3 ' (配列番号 14) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 200 塩基対である；

(h) T i e 2 : 5 ' A T C C C A T T T G C A A A G C T T C T G G C T G G C 3 ' (配列番号 15) (センス) および 5 ' T G T G A A G C G T C T C A C A G G T C C A G G A T G 3 ' (配列番号 16) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 512 塩基対である；

(i) C D 3 1 : 5 ' C A A C G A G A A A A T G T C A G A 3 ' (配列番号 17) (センス) および 5 ' G G A G C C T T C C G T T C T A G A G T 3 ' (配列番号 18) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 260 塩基対である；

(j) T a 1 1 : 5 ' A T G G T G C A G C T G A G T C C T C C 3 ' (配列番号 19) (センス) および 5 ' T C T C A T T C T T G C T G A G C T T C 3 ' (配列番号 20) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 331 塩基対である；

(k) G A P D H : 5 ' A G C C A C A T C G C T C A G A C A C C 3 ' (配列番号 21) (センス) および 5 ' G T A C T C A G C G G C C A G C A T C G 3 ' (配列番号 22) (アンチセンス)。予測されるバンドサイズは 302 塩基対である。

【実施例 1】

【0135】

ヒト幹細胞からのヒト脈管形成性始原細胞の単離および濃縮

研究および医療に対するヒト幹細胞技術の非常に大きな重要性にもかかわらず、非ヒト種を用いた研究でなされた発見をヒト幹細胞に適用することは、忍耐を要するほど困難であり、そのため、大きな工夫および多大な努力が要求される。例えば、ネズミの胚幹細胞 (mES) 株はその多能性を培養状態で保持しており、また、中胚葉系譜、内胚葉系譜および外胚葉系譜の細胞にインビトロで分化させるために予測可能に操作することができるが、ヒトおよび他の霊長類の ES 細胞株におけるインビトロ分化は、不一致、解体、および同期性の喪失によって特徴づけられており、これらは、インビトロでの組織の成功した組織化を妨げている (例えば、Thompson 他、Curr Top Dev Biol、1998、38:133~165 を参照のこと)。ヒト胚幹細胞からの脈管形成性始原細胞の単離を行う際、最初のヒト ES 中胚葉分化が、3D 胚様体構造がマウス幹細胞中胚葉分化には要求されないという観測結果 (Nishikawa S-I 他、Development、1998、125:1747) に基づいて、この分野で一般に使用されている 3次元 (3D) モデルではなく、新規な 2次元 (2D) モデルで試みられた。

【0136】

未分化ヒト胚幹細胞株の H9.2 細胞および H13 細胞が、以前の記載 (Amit M 他、Dev Biol、2000、227:271~78) のように成長させられ、フィーダー層から除かれ、マウス CCE-ES 細胞 (Yamashita J 他、Nature、2000、408:92) について記載されていたように、分化培地とともに IV 型コラーゲン被覆ディッシュに単一細胞として置かれた。マウス幹細胞を用いた以前の経験は、特定の細胞接種濃度が内皮分化の誘導のために極めて重要であることを示していた。しかしながら、推奨された細胞濃度 (1×10^4 細胞/cm²) でヒト ES 細胞を接種することは、細胞の死をもたらした。従って、いくつかの細胞接種濃度が調べられた。様々な結合基質に細胞をより大きい濃度 ($1.0 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm²) で接種することは、未分化細胞および分化途中の細胞の調和のない混合集団をもたらした (データは示されず)。驚くべきことに、細胞を低い濃度 ($5 \sim 10 \times 10^4$ 細胞/cm²) で IV 型コラーゲン基質に接種することにより、2つの異なる集団の細胞タイプを生じさせる分化が促進された (図 1B)。細胞集団の著しい割合が、ネズミ細胞において以前に認められた内皮始原体の形態学 (Yamashita J 他、Nature、2000、4

10

20

30

40

50

08 : 92) に類似する大きな核を伴う、より小さい平坦な細胞 (図 1 B、矢印) から構成され、一方で、残りは、明らかな繊維状構造を有する大きい平坦な細胞であった (図 1 B、矢頭)。

【0137】

これらの2つの細胞集団を分離し、より小さいヒト脈管形成細胞始原体を単離するために、細胞を40 μmのろ過器でろ過し、内皮様細胞を大きな平坦な細胞から分離した。培養物における内皮始原体の割合を評価するために、ろ過された細胞集団を、hES細胞に由来するニューロン始原体の分化をモニターすることに関する以前の記載 (Reubinoff BB他、Nat Biotech、2001、19 : 1134) のように、特異的な細胞タイプマーカーの検出によって特徴づけた。ろ過された細胞を置き、固定して、

10

【0138】

予想外であったが、2つの集団におけるこれらのマーカーの発現が免疫検出およびFACS分析によって定量されたとき (図 1 C ~ 図 1 E)、著しい割合のより小さい内皮様細胞がVE-cadを発現することが見出され (78%、図 1 C)、より小さい割合がVEGFR2を発現していた (28%、図 1 C)。より小さいろ過された細胞が12時間置かれ、固定され、蛍光性の抗VE-cad抗体を用いて免疫形態学について分析されたとき

20

【0139】

RNAのRT-PCR増幅によってさらに特徴づけられたとき、内皮様細胞は、内皮マーカーのCD31およびTie2 ; AC133 / CD133、GATA2およびTal1、初期の内皮 / 造血始原細胞マーカーを活発に発現していることが見出された (Pechhev, M他、Blood、2000、95 : 952 ; Kaufman DS他、PNAS、2001、98 : 10716) (図 1 F、ろ過物)。未分化ヒト幹細胞から得られた

30

【0140】

より大きい除外された細胞の免疫蛍光染色 (図 1 G) では、上皮様表現型平滑筋細胞の特徴の存在 (これは、Gittenberger-de Groot A.C.他、PNAS、2000、97 : 11307によって総説される)、および、より小さいろ過された細胞では検出されないマーカー (SMA) の存在が明らかにされた。RNAのRT-PCR増幅によってさらに特徴づけられたとき、より大きい除外された細胞は、上皮マーカーのカルボニンおよびカルデスモン ; 平滑筋アクチン (SMA)、およびSM-MHCを活発に発現していることが見出された (図 1 H、保持物)。より小さいろ過された内皮様細胞から得られたRNAのRT-PCRでは、これらの上皮様細胞マーカーはいずれも発現していないことが明らかにされた (図 1 H、ろ過物)。GAPDHバンドの強度が両方の細胞集団について同一であることに留意すること (図 1 H)。このことは、分化に伴う細胞表現型の変化が特異的であることを示している。

40

【0141】

低密度の接種およびヒト幹細胞 (hES) の培養から生じている2つの細胞集団が細胞増殖能について評価されたとき、BrdU取り込みアッセイは、上皮様の除外された大き

50

い平滑筋様細胞は増殖することができず(図1I、矢印)、その一方で、より小さい内皮様始原細胞は、増殖能の保持を示す染色剤の明瞭な取り込みを有すること(図1I)を明らかにした。まとめると、これらの結果は、ヒト幹細胞は、胚様体としてではなく単一細胞として接種され、そして、細胞を含まない2次元マトリックスにおいてインビトロで培養されたとき、平滑筋様前駆体からろ過によって分離され得る増殖性の内皮様始原細胞を生じさせることができることを示している。

【実施例2】

【0142】

ヒト脈管形成性始原細胞の内皮細胞分化、平滑筋細胞分化および造血細胞分化のインビトロでの誘導

脈管形成性始原細胞の分化能を研究するために、細胞を、より低い細胞接種濃度(2.5 × 10⁴ 細胞/cm²)でIV型コラーゲン被覆ディッシュにおいて再培養した。平滑筋細胞分化が、血小板由来増殖因子BB(hPDGF-BB)を添加することによって誘導された。血小板由来増殖因子BBは、ヒト幹細胞ではなく、ネズミ幹細胞(mES)においてSMC分化を誘導することが見出されている(Gittenberger-de Groot A.C.他、PNAS、2000、97:11307)。10日間~12日間の培養の後、紡錘体様形状の細胞および上皮様表現型の細胞の両方が、平滑筋マーカーの発現の同時誘導と一緒に、培養物において検出された。RT-PCR分析により、平滑筋 - アクチン(SMA)、平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)、カルポニン、SM22およびカルデスモンなどの特異的な平滑筋マーカーの上方調節が検出された(図2A、
v-SMC)が、これらは、hPDGF-BB非処理の細胞から得られたRNAでは顕著に検出することができなかった(図2A、ESH始原細胞)。ヒト平滑筋細胞マーカータンパク質の免疫蛍光検出(SMA、図2B;スムーセリン、初期の平滑筋発達のマーカー、図2C;SM-MHC、図2D;カルポニン、図2E)により、hPDGF-BBにさらすことによって、ヒト脈管形成性始原細胞のさらなるインビトロ分化に対する能力が確認される。

【0143】

内皮細胞に分化する能力を調べるために、ヒト脈管形成性始原細胞をhVEGF₁₆₅にさらした。hVEGF₁₆₅は、ヒトの内皮細胞誘導ではなく、ネズミの内皮細胞誘導において効率的であることが見出されている(Yamashita J他、Nature、2000、408:92)。この操作は下記の内皮細胞特異的なマーカーの誘導をもたらした:免疫蛍光によって検出されるようなVE-cadの同時発現、および、ヴァイベル-パラデ体に貯蔵されるフォンビルブランド因子(vWF)の出現(それぞれ図2Fおよび図2G)、より成熟した細胞におけるDiI1-Ac-LDL取り込み(図2H)、そしてさらには、一部の成熟細胞におけるストレスファイバーの配置(図2I)。最も著しいことには、増殖因子により誘導される分化は、hPDGF-BBまたはhVEGF₁₆₅のいずれかをを用いた場合、系譜特異的な拘束を誘導しなかった。すなわち、内皮細胞タイプおよび平滑筋細胞タイプの両方が、これらの増殖因子のいずれかを投与することにより認められた。さらに、分化した細胞へのBrdUの取り込みは、血管内皮増殖因子(VEGF)で処理された細胞(図2I)、および、特に、より小さい形態学を有するそのような細胞では、増殖能が維持されていることを示したが、一方、hPDGF-BBで処理された細胞は、低下した増殖能を示した(図2J)。単離された始原細胞の造血能もまた明らかにされた。ろ過された脈管形成性始原細胞のVE-cad発現集団がサイトカインとともに半固体培地において培養されたとき、造血性コロニーを示すCFU(図2K~図2M)が認められた。従って、単離されたヒト脈管形成性始原細胞の分化が、系譜特異的な拘束または増殖能の喪失を伴うことなく、特異的な増殖因子によって、インビトロで、無細胞培地において、さらに誘導され、かつ制御され得る。

【実施例3】

【0144】

ESH細胞によるインビトロでの脈管形成および血液細胞形成

10

20

30

40

50

脈管形成に特徴的な極めて重要な事象が、ネズミ胚幹細胞由来の胚様体を使用してインビトロで誘導される(例えば、Feraud 他、Lab Invest、2001、81:1661~89)。しかしながら、ヒト多能性幹細胞を使用して、脈管形成プロセスをインビトロで模倣する努力は一般には成功していない。ヒト脈管形成性始原体(ESH)細胞のインビトロでの脈管化能を調べるために、本発明者らは、2つの異なる3次元モデル(I型コラーゲンおよびMatrigel)を使用した。これらは、内皮細胞からの3D血管様形成を促進させるために使用されている(Mardi JAおよびPratt BM, B.M., J Cell Biol、1988、106:1375; Kubota Y他、J Cell Biol、1988、107:1589)。

【0145】

ESH細胞の凝集は、hVEGFおよびhPDGF-BBが補充された分化培地の存在下では、I型コラーゲン(図3A)またはMatrigel(図3B)への接種の前において、コラーゲン基質およびMatrigel基質の両方の初期の脈管形成および脈管化に関連する出芽および管様構造体を明らかに誘導している。組織学的切片は、内皮細胞がMatrigel内に入り込み、血管形成に特徴的な管様の網状構造を形成していることを明らかにしている(図3C)。驚くべきことに、そして非常に重要なことに、より高倍率での観測により、これらのインビトロ培養された脈管の内部において血液細胞が明らかにされる(図3D、矢印)。電子顕微鏡観察により、細胞の細胞質における十分に形成された内皮特異的なヴァイベル-パラデ体(WP)、リポタンパク質カプセル(Li)、索において内腔(Lu)を形成する内皮細胞、および、Matrigel(M)内において内皮細胞(EC)により形成された脈管の内部における造血(BC)発達がさらに明らかにされる(図3E~図3G)。これらの結果は、単離されたヒト脈管形成性始原細胞が、規定された条件のもとで、リポタンパク質代謝、VII(vWF)因子の産生、血液細胞、およびインビトロでの血管構造の全成分を伴う機能的な内皮細胞に分化する能力を有することを初めて明らかにしている。

【実施例4】

【0146】

3次元足場の脈管化

操作された組織のインビトロでの脈管化は、再生医療の非常に重要な局面であり、培養された組織の生存性を移植の前後で維持するために非常に重要である。移植のために好適である大きな直径の血管構造体は、効率的な発達および成長のために支持用の骨組(例えば、足場)を要求する。従って、ヒト脈管形成性(ESH)始原細胞の治療的可能性を、インビトロ組織工学モデル(3次元のアルギン酸塩足場)を使用して調べた。このモデルは、ヒト脈管形成性始原体ではなく、繊維芽細胞および肝細胞からのインビトロでの組織形成を支援することが示されている(Shapiro LおよびCohen S、Biomaterials、1997、18:583; Glicklis R他、Biotechnol Bioeng、2000、67:344)。

【0147】

ヒト脈管形成性始原細胞を、記載されたように凝集させ、多孔性のアルギン酸塩足場の内部に接種したとき、足場の細孔の周りにおける明確な脈管の形成が、hVEGFおよびhPDGF-BBの両方が補充された分化培地での14日間のインキュベーションの後で観測された(図4A、赤く染色されている構造体)。脈管壁構造をより高倍率で調べることにより、脈管の形態学の特徴的な、平滑筋細胞によって取り囲まれた平坦な伸びた内皮細胞が明らかにされる(図4B)。従って、ヒト脈管形成性始原体(ESH)細胞を3D足場で培養することにより、正常な血管形成に忠実な、分化したヒト幹細胞を伴う方向づけられたインビトロ脈管形成に対する能力が初めて明らかにされた。

【実施例5】

【0148】

血管形成に対するモデルとしてのヒト脈管形成性始原細胞の分化

最近の研究では、いくつかのネズミ胚幹細胞(mES)システムは、血管形成プロセス

10

20

30

40

50

の重要な事象および時系列を再現できることが明らかにされている (Feraud, O他、Lab. Invest., 2001, 81:1669)。VE-cad欠損系統のマウス (VE-cad^{-/-}) から得られたmES細胞は内皮芽を発達させることができないという観測結果はさらに重要なことであった。しかしながら、単一細胞ではなく、胚様体 (mEB) のみが、脈管形成事象をインビトロで開始させることができた。

【0149】

単離されたヒト脈管形成性始原細胞からの方向づけられたインビトロ血管発達が血管形成および脈管形成の生理学的プロセスを正確に反映しているかどうかを調べるために、阻害抗体の影響を、BV6 (ヒト内皮細胞のインビトロでの管形成を阻害することが見出されている、hVE-cadの特異的モノクローナル抗体) (Corada M他、Blood, 2001, 97:1679) を使用して評価した。

10

【0150】

驚くべきことに、この抗VE-cadモノクローナル抗体は、ESH細胞によるインビトロでの脈管化に対する強い阻害作用を示した。増殖因子が補充された分化培地における、Matrigelに接種されたESH細胞のインキュベーション後7日目に、初期の脈管形成に典型的な脈管および網状構造をゲル中に明瞭に識別することができる (図5A)。50 μg/mlの抗VE-cad抗体BV6を培地に添加することにより、脈管形成が明らかに妨げられ、不可欠な細胞出芽、ならびに管構造および網状構造の形成が阻害された (図5B)。従って、単離されたヒト脈管形成性始原体 (ESH) 細胞のインビトロの方向づけられた分化は、ヒト血管形成 - 脈管形成の知られている阻害剤に対する感受性を示しており、そのため、血管に関連したエフェクタ - および治療を研究および評価するためのモデルを提供する。

20

【実施例6】

【0151】

脈管形成性始原体の濃縮

Yamashita他 (Yamashita J他、Nature, 2000, 408:92頁~96頁) によって教示される細胞濃度で接種されたhES細胞を用いて行われた実験は細胞の死をもたらした (データは示されず)。そのため、ゼラチン、ラミニンまたはIV型コラーゲンで被覆されたディッシュでの種々の細胞接種濃度を用いたいくつかの2D分化実験が考案され、行われた。

30

【0152】

材料および方法

非分化のままであるhES細胞 (H9.2、継代数: 29+36~29+60; H13、継代数: 31~57; I6、継代数: 35~50) を不活化マウス胚フィーダー層 (MEF) 上で成長させた。すべての実験が、H9.2系統およびH13系統を使用して行われ、その一方で、始原体の濃縮実験および特徴づけ実験はまた、I6系統を使用して行われた。hES細胞を、IV型コラーゲナーゼを使用して分割し、小さい凝集体を得た。細胞を、1% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; HyClone) が補充された、5mMのEDTAを含むPBSで処理し、その後、分化研究およびFACS分析を容易にするために40 μmの網目のろ過器 (Falcon) を使用して個々の細胞の懸濁物に分離した。未分化hES細胞の懸濁物を、10%のFBS (HyClone) および0.1mMのメルカプトエタノール (Gibco-BRL) が補充されたMEM培地 (Gibco-BRL) から構成される分化培地において、 5×10^4 細胞/cm²の細胞密度でIV型コラーゲン被覆ディッシュ (6ウエル、Becton Dickinson) または0.1%ゼラチン (Sigma) 被覆ディッシュに置床した。6日間の培養の後、分化した細胞を40 μmの網目のろ過器 (Falcon) でろ過して、分析するか、または、hVEGF₁₆₅ (50 ng/ml) またはhPDGF-BB (10 ng/ml) (ともにR&D Systems Incから得られる) を含有する分化培地においてさらに10日間~12日間、IV型コラーゲン被覆ディッシュ (Becton Dickinson) での分化のために再培養した。

40

50

【 0 1 5 3 】

クローン分析

濃縮された内皮細胞集団は、抗VE-cadherin-FITC (Santa Cruz) でFACS分析のために免疫標識され、単一細胞が、IVFマイクロピペット (Cook) を使用して単離された。各細胞を適切な分化培地において96ウエルプレート (IV型コラーゲン) のウエルに入れた。1時間の培養を行った後、各ウエルを、置かれた細胞数を確認するために (光学顕微鏡観察および蛍光顕微鏡観察の両方で) 目視検査した。FACSではなく、機械的な単一細胞分離を使用した。なぜなら、単一のhES細胞は、典型的には、FACS分取手順の後、生存していないからである (データは示されず)。生き残った単一細胞の培養を1週間行った後に、単一細胞コロニーを認めることができた。培養後1ヶ月目に、各コロニーをIV型コラーゲンで消化して、24ウエルプレート (IV型コラーゲン) のウエルに移した。コンフルエントな培養物を消化して、連続培養または免疫表現型分析のいずれかのために使用した。

10

【 0 1 5 4 】

結果

内皮始原体およびSMC始原体の単離および特徴づけ

本研究法 (図1A) は、3D胚様体構造が側板中胚葉細胞の分化のためには要求されないという知見に依拠した (Yamashita J他、Nature、2000、408:92~96)。

【 0 1 5 5 】

しかしながら、Yamashita他によって示唆された細胞濃度 (1×10^5 細胞/cm² ~ 1.5×10^5 細胞/cm²) を使用する試みは、未分化コロニーと、未分化コロニーから分化した多数の細胞タイプとの両方を含む混合集団をもたらした (図6B)。

20

【 0 1 5 6 】

IV型コラーゲン被覆ディッシュ、および、より低い細胞接種濃度 (5×10^4 個/cm² ~ 7×10^4 個/cm² のhES細胞) を使用することにより、本発明者らは、様々な特定の始原体集団に対する供給源としてより良好に役立ち得る、より均一な集団を得ることができた。この集団には、内皮始原体に類似する大きい核を伴うより小さい平坦な細胞 (Yamashita J他、Nature、2000、408:92~96) と、線維状配置を伴う大きい平坦な細胞 (図6C) との、2つのタイプの細胞が含まれた。

30

【 0 1 5 7 】

従って、第2の接種実験 (すなわち、IV型コラーゲン被覆ディッシュに接種された 5×10^4 細胞/cm² ~ 7×10^4 細胞/cm²) から得られる細胞集団が、特定の始原体集団を回収することを試みるさらなる実験において使用された。

【 0 1 5 8 】

2つの優勢な部分集団はサイズにおいて実質的な違いを示したので、本発明の教示に従って得られた集団が40μmのフィルターでろ過され、従って、これにより、内皮様細胞が大きい平坦な細胞から分離された。内皮様細胞画分の分析により、VE-cad濃縮集団 (約35%) の優先的な生存が明らかにされ、この集団は、繰り返されたる過によってさらに濃縮された (約75%)。内皮様細胞画分には、CD31を発現する細胞 (細胞の約60%)、および、Flk-1を発現する細胞 (細胞の約30%) が含まれた (図6D)。両方の細胞画分について行われたRT-PCR分析は、内皮様細胞画分はv-SMCのマーカーを何ら発現していないことを示した。内皮様細胞画分の免疫表現型分析では、CD34タンパク質の上方調節 ($17 \pm 3\%$; n=3)、Tal1タンパク質の上方調節 ($75 \pm 8\%$; n=3)、およびGata2タンパク質の上方調節 ($42 \pm 10\%$; n=3) が示された (図6E)。これらは、内皮/造血始原細胞の初期マーカーとして以前には示されていた (Kaufman DS他、Proc Natl Acad Sci USA、2001、98:10716~10721; Peichev M他、Blood、2000、95:952~958; Robertson SM他、Development、2000、127:2447~2459)。

40

50

【0159】

増殖能を評価するために、上記に記載された細胞画分をBrdU取り込みおよびKi-67発現について分析した。BrdUによる12時間のパルス標識により、一部の内皮始原細胞がBrdUを取り込み、一方で、SMC様細胞には、この能力を示すものはなかったことが明らかにされた(図6Fi~ii)。両方の単離された画分はまた、Ki-67(分裂中の細胞において見出される典型的な抗原)の発現について調べられた。この実験は、再培養された内皮様細胞の66±2%(n=3)がKi67を発現し(図6Fiii)、その一方で、不活化されたマウス胚繊維芽細胞(これはコントロールとして使用された)はKi-67について染色されなかった(データは示されず)。

【0160】

系譜分化

濃縮された始原体画分の分化能の研究では、より低い細胞接種濃度(2.5×10⁴細胞/cm²)でIV型コラーゲン被覆ディッシュにおいて再培養することが要求された。そのような細胞が内皮細胞に連続して分化する可能性が、hVEGF₁₆₅(内皮細胞のよく知られている分裂促進因子)の存在下で調べられた。この分裂促進因子の存在は、Dil-アセチル化低密度リポタンパク質(Ac-LDL)の取り込み(図7A)、および、ヴァイベル-パラデ体に貯蔵されるフォンビルブランド因子(vWF)の産生(図7B)を誘導した。v-SMC分化を誘導させるために、周皮細胞に対する知られている「呼び寄せ因子」、すなわち、血小板由来増殖因子BB(PDGF-BB)が使用された。この因子は、マウスES細胞をSMC系譜に分化させる際に効果的であることが証明されていた(Yamashita J他、Nature、2000、408:92~96)。PDGF-BBにおける10日間~12日間の培養を行った後、紡錘体様細胞が培養物に現れた。これらの細胞は平滑筋アクチン(SMA)を発現した(図7C)。他の特異的なv-SMCマーカー(例えば、平滑筋ミオシン重鎖(SM-MHC)、SM22およびカルデスモンなど)もまた、RT-PCR分析(図7D)によって明らかにされるように、これらの細胞によって発現された。これらの結果は、本発明で単離された細胞がSMC表現型に分化することができることを示している。

【0161】

クローン分析

hES細胞から得られた様々な単一のVE-cad⁺細胞が、これらの細胞が内皮細胞および壁細胞のための共通する始原体を含有するかどうかを明らかにするために調べられた。濃縮された脈管形成性集団から単離された様々な単一のE-cad⁺細胞がIV型コラーゲン被覆96ウエルプレートで再培養された。置床後1時間目に、各ウエルを、置かれた細胞数を確認するために(光学および蛍光の両方で)目視検査した。それらの分化能を調べるために、単一細胞を、hVEGFまたはhPDGF-BBが補充された分化培地で培養した。単一細胞コロニーを、いずれかの条件のもとでの8日間の培養の後に観測することができた(図8Ai)。置床効率は8%であったが、これは、mESシステムについて報告されていた効率よりも低かった(Yamashita J他、Nature、2000、408:92~96)。このことは、単一のhES細胞を培養することは困難であることを示している(Amit他、Dev Biol、2000、227:271~278)。

【0162】

VEGFが補充された細胞培養物には、内皮細胞の形態学を有する細胞が優勢に含まれ(図8Aii)、その一方で、PDGF-BBが補充された培養物には、v-SMCに類似する紡錘体様細胞が優勢に含まれた(図8Aiii)。これらの紡錘体様細胞はSMAおよびカルボニンを発現した(図8Bi~ii)。VEGF補充培養物では、ほとんどの細胞が、vWFの産生およびDil-Ac-LDLの代謝によって特徴づけられ(図8Ciii)、従って、内皮細胞表現型を示した。VE-cad⁺細胞を特異的な増殖因子にさらしたとき、1つの系譜への全細胞の拘束は生じなかった。PDGF-BB補充培養物には、v-SMCマーカーを発現する細胞と、VE-cad⁺細胞として分類される細胞

10

20

30

40

50

とが含まれた。

【0163】

本発明のいくつかの特徴は、明確化のために、別個の実施形態に関連して記載されているが、これらはまた、1つの実施形態において組合せて提供されていることがあることが理解される。逆に、本発明の様々な特徴が、簡潔化のために、1つの実施形態に関連して記載されているが、これらはまた、別個に、または任意の好適な部分的組合せで提供されていることがある。

【0164】

本発明を特定の実施形態と共に記載しているが、多数の変形態態、修正形態、および変形形態が当業者に明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれるこのような全ての変形態態、修正形態、および変形形態が含まれることが意図される。全ての刊行物、特許、および特許出願は、その全体が、それぞれの刊行物、特許、および特許出願があたかも特別または個別に本明細書中で参考として援用されるように示されるような範囲に本明細書中で参考として援用される。さらに、本出願における任意の引例の引用または識別により、このような引例が先行技術として本発明で利用可能であることを承認すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0165】

【図1a】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1b】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1c】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1d】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1e】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1f】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1g】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1h】ヒトES細胞由来の脈管形成性始原細胞について、培養に基づいて選択するための概略、およびそのような選択を示す顕微鏡写真を提供する。

【図1i】より小さい過された細胞（左パネル）およびより大きい保持された細胞（右パネル）の両方におけるBrdU取り込みの顕微鏡写真であり、これらは、より小さいヒト脈管形成性始原細胞の活発な増殖を明らかにしている。

【図2a】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびRT-PCR研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図2b】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびRT-PCR研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図2c】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびRT-PCR研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図2d】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびRT-PCR研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図2e】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究およびR

10

20

30

40

50

T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 f】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 g】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 h】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

10

【図 2 i】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 j】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 k】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

20

【図 2 l】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 2 m】培養された共通する脈管形成性始原細胞の顕微鏡下での免疫蛍光研究および R T - P C R 研究であり、これらは、内皮細胞または平滑筋細胞の特徴が、特異的な増殖因子により媒介されて誘導されることを明らかにしている。

【図 3 a】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す顕微鏡写真である。

【図 3 b】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す顕微鏡写真である。

30

【図 3 c】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す顕微鏡写真である。

【図 3 d】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す顕微鏡写真である。

【図 3 e】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す電子顕微鏡写真である。

【図 3 f】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す電子顕微鏡写真である。

【図 3 g】増殖因子で処理されたヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞における血管構造の形成を示す電子顕微鏡写真である。

40

【図 4 a】ヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞による 3 D アルギン酸塩足場のインビトロでの脈管化を示す組織学切片の顕微鏡写真である。

【図 4 b】ヒト脈管形成性始原体 (E S H) 細胞による 3 D アルギン酸塩足場のインビトロでの脈管化を示す組織学切片の顕微鏡写真である。

【図 5 a】血管形成の阻害剤に対する E S H 由来組織の感受性を明らかにする顕微鏡写真である。

【図 5 b】血管形成の阻害剤に対する E S H 由来組織の感受性を明らかにする顕微鏡写真である。

【図 6 a】h E S 細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。

【図 6 b】h E S 細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。

50

- 【図6c】hES細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。
- 【図6d】hES細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。
- 【図6e】hES細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。
- 【図6f】hES細胞に由来する脈管始原細胞の、培養に基づく濃縮を例示する。
- 【図7a】始原細胞における系譜分化を例示する。
- 【図7b】始原細胞における系譜分化を例示する。
- 【図7c】始原細胞における系譜分化を例示する。
- 【図7d】始原細胞における系譜分化を例示する。
- 【図8a】VE-cad+細胞のクローン分析を例示する。
- 【図8b】VE-cad+細胞のクローン分析を例示する。
- 【配列表フリーテキスト】
- 【0166】
- 配列番号1～22は一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gerecht-Nir , Sharon
Itskovitz-Eldor, Joseph

<120> NOVEL METHODS FOR THE IN-VITRO IDENTIFICATION, ISOLATION AND
DIFFERENTIATION OF VASCULOGENIC PROGENITOR CELLS

<130> 25949

<160> 22

10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 1
ccagctatgt gaagaagaag agg 23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 2
gtgatctcct tctgcattcg gt 22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 3
 gagtgtgcag acggaacttc agcc 24

<210> 4
 <211> 21 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 4
 gtctgtgccc aacttggggt c 21

<210> 5 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 5
 ctacaggagc atgctgcagg atcg 24

<210> 6 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 6
gcttgcagaa gctgcttctc cagc 24

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220> 10
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 7
cgcggaagtgc agtccaaaat cg 22

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220> 20
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 8
gggctggttc ttcttcaatg ggg 23

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220> 30
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 9
aacaacctga aagccaggag g 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 10
gctgcttggt acgtttctgc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 11
agccggcacc tgttgtgcaa 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

20

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 12
tgacttctcc tgcattgcact 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

30

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 13
cagtctgacc agcgtgaaaa 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 14
 ggccatccaa atctgtccta 20 10

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 15
 atcccatttg caaagcttct ggctggc 27 20

<210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide 30

<400> 16
 tgtgaagcgt ctcacaggtc caggatg 27

<210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 17
caacgagaaa atgtcaga

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 18
ggagccttcc gttctagagt

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 19
atgggtgcagc tgagtctcc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 20
tctcattctt gctgagcttc

20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 21
 agccacatcg ctcagacacc

20

10

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 22
 gtactcagcg gccagcatcg

20

20

【 図 1 a 】

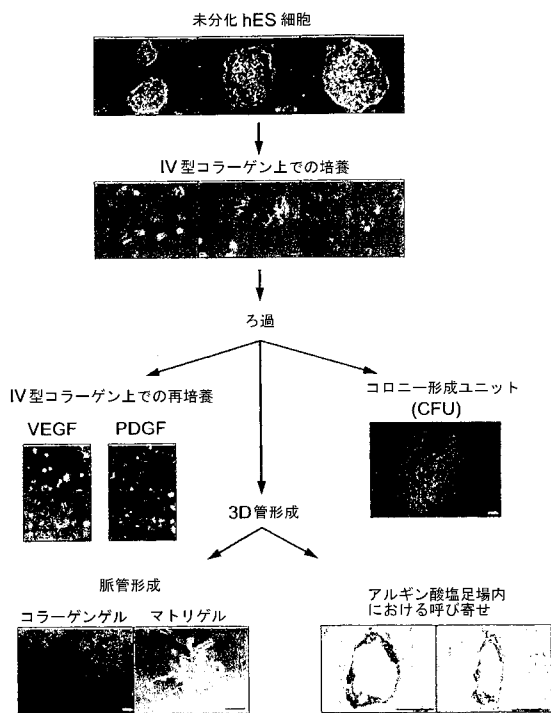


Fig. 1a

【 図 1 b 】

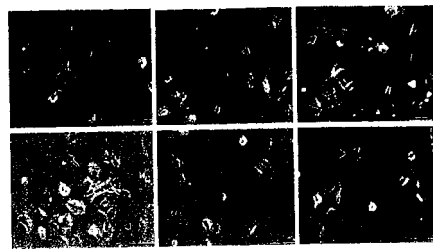


Fig. 1b

【 図 1 c 】

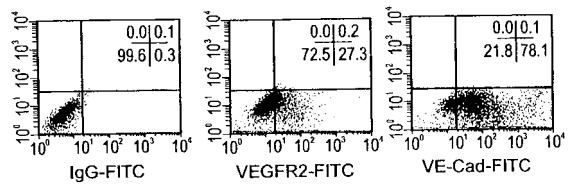


Fig. 1c

【図 1 d】



Fig. 1d

【図 1 e】



Fig. 1e

【図 1 f】



Fig. 1f

【図 1 g】

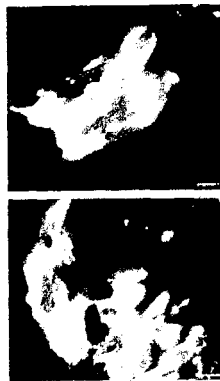


Fig. 1g

【図 1 h】

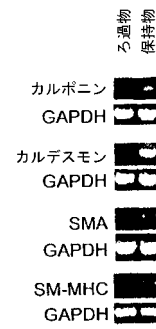


Fig. 1h

【図 1 i】

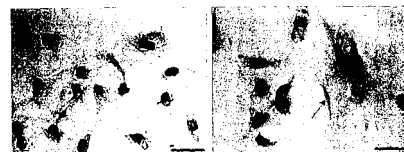


Fig. 1i

【 図 2 a 】



Fig. 2a

【 図 2 d 】



Fig. 2d

【 図 2 e 】



Fig. 2e

【 図 2 f 】



Fig. 2f

【 図 2 b 】



Fig. 2b

【 図 2 g 】



Fig. 2g

【 図 2 c 】



Fig. 2c

【 図 2 h 】



Fig. 2h

【 図 2 i 】



Fig. 2i

【 図 3 a 】

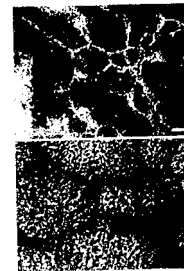


Fig. 3a

【 図 2 j 】



Fig. 2j

【 図 3 b 】

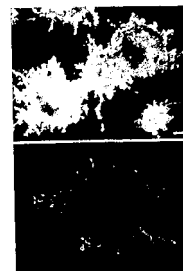


Fig. 3b

【 図 2 k 】



Fig. 2k

【 図 2 l 】



Fig. 2l

【 図 2 m 】



Fig. 2m

【 図 3 c 】



Fig. 3c

【 図 3 d 】



Fig. 3d

【 図 3 e 】



Fig. 3e

【 図 3 f 】

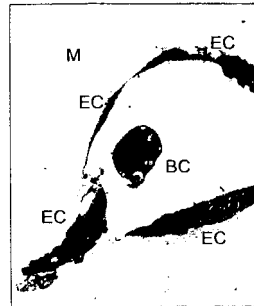


Fig. 3f

【 図 3 g 】



Fig. 3g

【 図 4 b 】



Fig. 4b

【 図 4 a 】



Fig. 4a

【 図 5 a 】

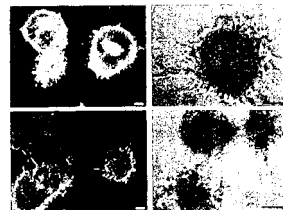


Fig. 5a

【 図 5 b 】

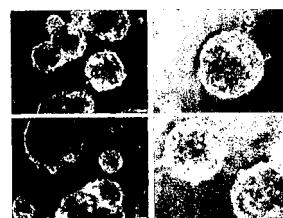
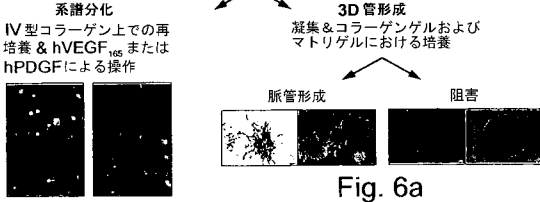
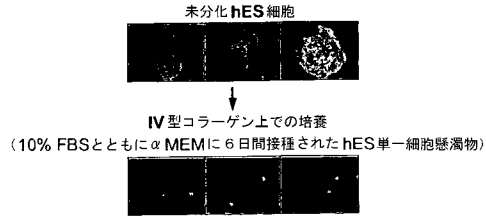
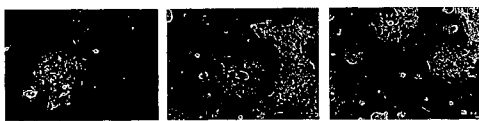


Fig. 5b

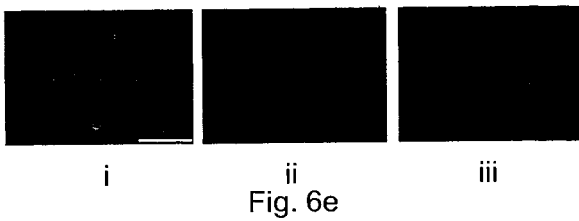
【図 6 a】



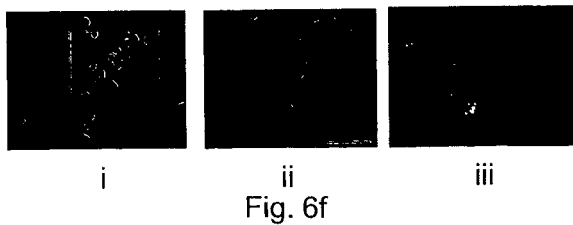
【図 6 b】



【図 6 e】



【図 6 f】



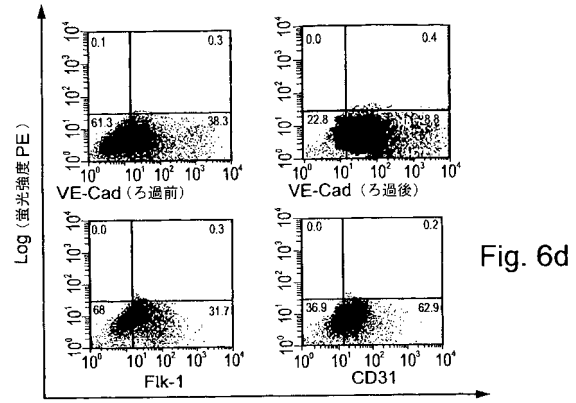
【図 7 a】



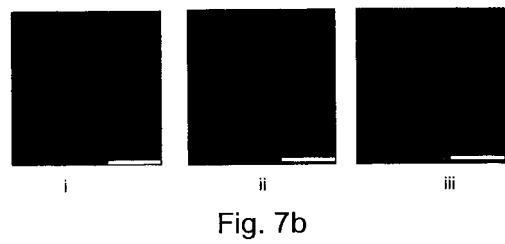
【図 6 c】



【図 6 d】



【図 7 b】



【図 7 c】



【 図 7 d 】



Fig. 7d

【 図 8 b 】

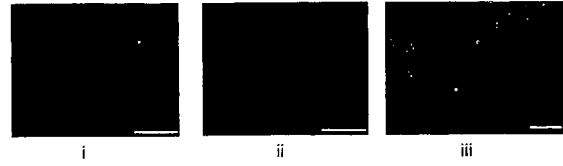


Fig. 8b

【 図 8 a 】

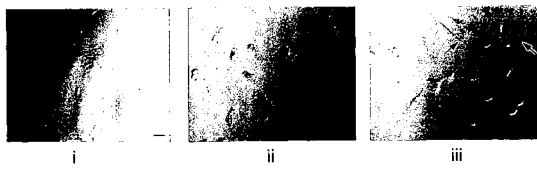


Fig. 8a

フロントページの続き

(72)発明者 イツコヴィッツ - エルドール, ジョセフ
イスラエル, 34 987 ハイファ, シェエリト ハプレタ ストリート 42

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2005-508180(JP, A)
特表2005-521402(JP, A)
Nature, (2000) 408, p.92-96
Development, (2000) 127, p.1931-1941
Development, (1998) 125, p.1747-1757

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/06
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CiNii