

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635191号
(P7635191)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類

C 12 N	5/0781(2010.01)	C 12 N	5/0781	Z N A
C 12 N	5/0783(2010.01)	C 12 N	5/0783	
C 12 N	5/0789(2010.01)	C 12 N	5/0789	
C 12 N	5/10 (2006.01)	C 12 N	5/10	
C 12 N	5/0735(2010.01)	C 12 N	5/0735	

請求項の数 19 (全112頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-176895(P2022-176895)
 (22)出願日 令和4年11月4日(2022.11.4)
 (62)分割の表示 特願2019-512797(P2019-512797)
)の分割
 原出願日 平成29年9月6日(2017.9.6)
 (65)公開番号 特開2023-11849(P2023-11849A)
 (43)公開日 令和5年1月24日(2023.1.24)
 審査請求日 令和4年12月1日(2022.12.1)
 (31)優先権主張番号 62/383,984
 (32)優先日 平成28年9月6日(2016.9.6)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 596115687
 ザ チルドレンズ メディカル センター
 コーポレーション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
 2115, ポストン, シャタック・ス
 トリート 55
 (73)特許権者 507244910
 プレジデント・アンド・フェロウズ・オ
 ブ・ハーバード・カレッジ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
 ンブリッジ クインシー ストリート 17
 (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 人工多能性幹細胞由来の免疫細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 多系列造血前駆細胞 (MHPC) においてZesteホモログ1エンハンサー (EZH1) 発現を阻害する段階であって、MHPCが、人工多能性幹 (iPS) 細胞から生成されたCD34+造血内皮細胞から分化されたものである、段階と、

b) リンパ球系列への分化およびTリンパ球またはBリンパ球の生産を促進するために、該MHPCをnotchリガンドまたはストローマ細胞または両方と接触させる段階と、

c) B220もしくはCD19陽性Bリンパ球、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞、またはCD8シングルポジティブT細胞を単離する段階と、

を含む方法により生産された免疫細胞。

10

【請求項2】

前記免疫細胞が、CD4/CD8ダブルポジティブまたはCD8シングルポジティブT細胞である、請求項1記載の免疫細胞。

【請求項3】

前記免疫細胞が、CD8シングルポジティブT細胞である、請求項2記載の免疫細胞。

【請求項4】

前記免疫細胞中のZesteホモログ1エンハンサー (EZH1) が阻害されている、請求項1記載の免疫細胞。

【請求項5】

前記免疫細胞が、以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、および任意で

20

c-MYCのそれぞれの外因性コピーを含む、請求項1記載の免疫細胞。

【請求項6】

前記免疫細胞が、ネイティブなT細胞受容体（TCR）遺伝子座を除去するため、クラスIもしくはクラスII主要組織適合抗原複合体もしくは両方を欠失させるため、非古典的HLA-GもしくはHLA-Eもしくは両方を発現させるため、またはその中の内因性HLAを編集するために、さらに遺伝的に改変されている、請求項1記載の免疫細胞。

【請求項7】

請求項1記載の免疫細胞の集団を含む、組成物。

【請求項8】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項7記載の組成物。

10

【請求項9】

a) 以下の転写因子：ETS関連遺伝子（ERG）、ホメオボックスA9（HOXA9）、およびレチノイン酸受容体（RAR）関連オーファン受容体アルファ（RORA）のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、CD34+ CD45+である骨髄球系前駆細胞に、インビトロでトランスフェクトする段階であって、トランスフェクトされた細胞において該転写因子が発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能（potential）を有し、かつ、リンパ球系分化能を有しないまたは5%未満のリンパ球系分化能を有する多系列造血前駆細胞集団を產生させる、段階と、

b) リンパ球系分化能を拡大するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団におけるZesteホモログ1エンハンサー（EZH1）発現を阻害する段階と、

20

c) リンパ球系列への分化およびTリンパ球またはBリンパ球の生産を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団をnotchリガンドまたは支持ストローマ（supportive stroma）または両方の存在下で分化させる段階と、

d) B220もしくはCD19陽性Bリンパ球、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞、またはCD8シングルポジティブT細胞を単離する段階と、

を含む方法により生産された免疫細胞。

【請求項10】

前記Tリンパ球が、CD4/CD8ダブルポジティブまたはCD8シングルポジティブT細胞である、請求項9記載の免疫細胞。

【請求項11】

30

前記免疫細胞中のEZH1が阻害されている、請求項9記載の免疫細胞。

【請求項12】

前記免疫細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを含む、請求項9記載の免疫細胞。

【請求項13】

前記免疫細胞が、以下のリプログラミング因子：SOX4およびMYBのそれぞれの外因性コピーをさらに含む、請求項12記載の免疫細胞。

【請求項14】

前記免疫細胞が、以下のリプログラミング因子：NFIAおよびDACH1のそれぞれの外因性コピーをさらに含む、請求項12記載の免疫細胞。

40

【請求項15】

前記免疫細胞が、以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、および任意でc-MYCのそれぞれの外因性コピーをさらに含む、請求項12記載の免疫細胞。

【請求項16】

前記免疫細胞が、ネイティブなT細胞受容体（TCR）遺伝子座を除去するため、クラスIもしくはクラスII主要組織適合抗原複合体もしくは両方を欠失させるため、非古典的HLA-GもしくはHLA-Eもしくは両方を発現させるため、またはその中の内因性HLAを編集するために、さらに遺伝的に改変されている、請求項9記載の免疫細胞。

【請求項17】

請求項10記載の免疫細胞の集団を含む、組成物。

50

【請求項 18】

がん、自己免疫障害、血液疾患、または他の遺伝性疾患および障害を処置する方法に用いるための、請求項 7、8、または 17 記載の組成物。

【請求項 19】

ホストにおいて造血幹細胞のインビオ生着を改善するエクスピオまたはインビトロの方法に用いるための、請求項 7、8、または 17 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願の相互参照

10

本国際出願は、2016年9月6日に出願された米国仮出願第62/383,984号の米国特許法119条(e)項に基づく恩典を主張するものであり、その各内容は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府の支援

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号U01 HL100001およびR24DK092760の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

開示の分野

20

本開示は、概して、医学、細胞生物学、および分子生物学の分野に関する。本開示は、限られた系列の骨髄球系前駆細胞、または多能性幹細胞(PSC)、または多系列造血前駆細胞(MHPC)からのBまたはTリンパ球などの免疫細胞の产生方法に関する。

【背景技術】**【0004】**

背景

インビオ細胞補充治療のため、多数の疾患、障害および状態の治療のため、ならびに疾患モデル化、薬物スクリーニング、および血液疾患のインビトロ研究のための機能的免疫細胞の供給は不足している。骨髄移植は、多様な血液障害のための最も定評のある細胞補充治療である。骨髄移植の機能単位は、複雑な細胞階層の頂点に位置し、生涯にわたり血液の発生を補充する、造血幹細胞(HSC)である。しかし、HLAがマッチするHSCまたは患者特異的HSCの欠乏により、移植、疾患モデル化、薬物スクリーニング、および血液疾患のインビトロ研究を実施する能力が著しく限定されている。多くの場合、レシピエント対象における満足なインビオ生着および再構成を確実にするのに足るほど大きな細胞集団が移植されるわけではない。

30

【0005】

このように、代替供給源からHSCを生成させるために多くの研究が開発されている。例えば、体細胞の人工多能性幹細胞(iPSC)へのリプログラミングは、疾患モデル化、薬物選別および細胞療法のための有望な供給源である多彩な患者特異的多能性細胞を利用できるようにした。多能性細胞は、ヒトおよびマウス体細胞において、OCT4(Oct4)およびSOX2(Sox2)を、KLF4(Klf4)と任意でc-MYC(c-Myc)との組み合わせ、またはNANOG(Nanog)とLIN28(Lin28)との組み合わせのいずれかと共に強制発現させることによって誘導される。トランス活性化因子の代替的な組み合わせは、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28を含む。骨髄造血前駆細胞(HPC)由来のマウスiPS細胞株が報告されている。出生後のヒト血液細胞から、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)により動員された末梢血CD34+細胞から、ならびにG-CSF動員などのいかなる前処置も行わないヒト臍帯血および成体骨髄CD34+細胞からのヒトiPS細胞の派生も報告されている。これらは全て、iPSCの供給源としてHPC、幹細胞を採用したものである。Tリンパ細胞、Bリンパ細胞、線維芽細胞およびケラチノサイトなどの体細胞も、iPSCの代替供給源として使用される。

40

50

【0006】

ヒトiPSCおよびマウスiPSCから生成した奇形腫の分析によって実証されたように、iPSCは、3つの胚葉に属する様々な細胞に分化することが示されている。加えて、iPSCの多能性は、iPSCを導入された胚盤胞から発生したキメラマウスの様々な器官へのiPS細胞由来細胞の寄与によって確認されている。

【0007】

しかし、細胞の量および細胞供給源の問題に加えて、iPSC由来の造血幹細胞および前駆細胞(iPSC-HSPC)を産生させること、または、子孫細胞がインビトロで生着するであろう、それから分化した細胞を産生させることにはまだ大きな障害がある。上記のように、代替供給源からHSCをインビトロ生成させることを目指した様々な研究により、造血前駆細胞または幹細胞が産生されたが、それらはインビトロでうまく生着しない。

10

【発明の概要】

【0008】

概要

本開示の態様は、特異的定方向分化に供することができる患者特異的な組織適合性複能性造血前駆細胞(MHPC)を産生させて、従来可能であった量よりも大きい量で機能的免疫細胞をインビトロ培養条件で提供するための方法に関する。本開示の態様は、これらのMHPCを含む組成物、および特異的定方向分化プロセスの結果として生じた子孫細胞、およびこれらの細胞の使用にも関する。

【0009】

20

疾患、障害および医学的状態の処置であるインビトロ細胞補充治療のため、ならびに疾患モデル化、薬物スクリーニング、および血液疾患のインビトロ研究のための、HLAがマッチする機能的免疫細胞の供給は不足している。主として、免疫細胞は、造血幹細胞(HSC)から分化するが、HLAがマッチするHSCは欠乏している。本方法は、予め非リンパ球系列に決定済みの骨髄球系前駆細胞の系列分化能(lineage potential)をMHPCに逆戻りさせ、そして続いて、造血前駆細胞(HPC)の分化を特異的に促進し、リンパ球系列に方向づけることによってこの問題を解決する。加えて、逆戻り(reversed)系列分化能を有するMHPCが、増強したインビトロ生着および再構成特性を有するように改変される。本産生方法は、例えば免疫療法における細胞調製方法として有用である。

【0010】

30

本明細書において使用される略語：

HPC = 造血前駆細胞

MHPC = 多系列造血前駆細胞または複能性造血前駆細胞

iPSC = 人工多能性幹細胞

HSC = 造血幹細胞

【0011】

本発明者らは、少なくとも3つの外因性転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAを非リンパ球系列決定済み骨髄球系前駆細胞に導入することによって、これらの細胞の系列分化能を逆戻りさせることができた。結果として生じた細胞は、MHPCであった。

【0012】

40

造血の間に産生する血液細胞は、以下の3つの細胞系列：(1)赤血球系細胞、(2)リンパ球系細胞、および(3)骨髄球系細胞に分けられる。図15を参照されたい。正赤芽球、赤芽球および成熟赤血球(RBC)を含む赤血球系細胞は、最も一般的な種類の血液細胞であり、肺から身体組織に酸素を送達する主な手段である。B細胞およびT細胞を含むリンパ球系細胞は、身体の免疫防御に重大な役割を果たす白血球の一種である。顆粒球、巨核球、およびマクロファージを含む骨髄球系細胞は、その他の白血球(例えば、好中球、好酸球および好塩基球)および血小板を含む多様な細胞群である。

【0013】

骨髄球系前駆細胞は、非リンパ球系列である骨髄球系列に決定済みである。骨髄球系列中の骨髄球系前駆細胞は、さらなる細胞分裂、分化および成熟を受け、骨髄球系列は、以

50

下の細胞型：巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、骨髓芽球、好塩基球、好中球、好酸球、単球およびマクロファージを産生する。図15を参照されたい。骨髓球系列は、TおよびBリンパ球などの免疫細胞を産生するリンパ球系列とは異なる。これらの逆戻り系列 (reversed lineage) のMHPCにおけるヒストンメチルトランスフェラーゼEZH1をさらに阻害することによって、本発明者らは、OP9-DL1/4細胞との共培養によって、またはこれらの細胞におけるNotchシグナル伝達経路を活性化することによって、これらの細胞の分化を免疫細胞に方向づけることができた。そのうえ、本発明者らは、2つの追加的な外因性転写因子：DACH1およびNFIAをこれらの細胞に組み込むことが、OP9-DL1/4細胞と共に培養により、またはNotchシグナル伝達経路を活性化することにより、これらの細胞のリンパ球系分化能を高めたことを見出した。さらに、本発明者らは、2つの他の外因性転写因子：SOX4およびMYBをこれらの細胞に組み込むことが、レシピエント対象におけるこれらの細胞のインビオ生着および再構成を高めたことを見出した。

【0014】

本開示のプロトコールの長所は、この方法が、患者の身体から容易に採取することができる細胞源、例えば血液細胞、免疫細胞、皮膚細胞などの体細胞から、所望で特異的な免疫細胞の半永続的な大量生産を可能にすることである。機能的免疫細胞の産生は、患者から得られた幹細胞または前駆細胞のみを使用することに限らない。産生された免疫細胞は、次に、免疫療法のために使用することができる。

【0015】

したがって、予め非リンパ球系列に決定済みの骨髓球系前駆細胞の系列分化能をMHPCに逆戻りさせ、逆戻り系列MHPCを所望の免疫細胞に特異的に定方向分化させる段階を含む、免疫細胞の産生方法を提供することが、本開示の目的である。非リンパ球系列に決定済みの骨髓球系前駆細胞は、患者の身体における任意の細胞、例えば体細胞から生成されるiPSCから製造することができる。そのような細胞は、患者の身体から容易に採取することができる。例えば、血液試料、皮膚試料、口腔拭き取り検体等からの細胞である。非リンパ球系列に決定済みの骨髓球系前駆細胞は、患者の骨髓から収集される場合がある。

【0016】

対象に植え込まれた造血関連細胞のインビオ生着、または再構成、または両方を増強または改善するための方法を提供することも、本開示の目的である。

【0017】

インビオ細胞補充治療、がん免疫療法などの医学療法における使用のため、ならびに疾患モデル化、薬物スクリーニング、および血液疾患のインビトロ研究のための改変（操作とも呼ばれる）細胞の組成物を提供することも、本開示の目的である。

【0018】

したがって、(1) TまたはB細胞などの改変免疫細胞を調製するための方法であって、転写因子の外因性コピーを使用して骨髓球系前駆細胞の系列分化能をHPCに逆戻りさせる段階、および逆戻り系列HPCを免疫細胞に特異的定方向分化させる段階を含む、方法；(2) 逆戻り系列を有し、増大したリンパ球系列分化能を有する改変骨髓球系前駆細胞；(3) 増大したリンパ球系列分化能を含む逆戻り系列を有する改変骨髓球系前駆細胞を含有する組成物；(4) 記載された改変免疫細胞の製造／産生において使用するための本明細書記載の改変骨髓球系前駆細胞およびその組成物；(5) 細胞補充治療における使用のため、またはがん、自己免疫障害、血液疾患もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための、本明細書記載の改変骨髓球系前駆細胞およびその組成物；(6) 本明細書記載の方法によって調製される改変免疫細胞を含有する薬学的組成物；ならびに(7) 骨髄移植およびがん免疫療法、自己免疫障害、血液疾患または他の遺伝性疾患および障害などの、上記方法を用いて製造される免疫細胞を用いた処置を使用するための方法が、本明細書に開示される。改変免疫細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞である。

【0019】

一態様では、本開示は、増大したリンパ球系列分化能を含む、逆戻り系列を有する改変または操作骨髓球系前駆細胞を提供する。一態様では、本開示は、本明細書記載の方法に

10

20

30

40

50

よって產生される、増大したリンパ球系列分化能を含めるために逆戻りさせた系列を有する改変または操作骨髓球系前駆細胞を提供する。いくつかの態様では、改変または操作骨髓球系前駆細胞は、ERAトランスフェクションを介して以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを有する。一態様では、改変または操作骨髓球系前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変または操作骨髓球系前駆細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。いくつかの態様では、改変骨髓球系前駆細胞は、系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髓球系前駆細胞に由来する。

【0020】

10

別の態様では、本開示は、本明細書記載の改変または操作骨髓球系前駆細胞を含む組成物を提供する。

【0021】

別の態様では、本開示は、記載された改変免疫細胞の製造／產生において使用するための、本明細書記載の改変骨髓球系前駆細胞およびその組成物を提供し、その際、改変骨髓球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む。一態様では、改変または操作された改変骨髓球系前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変または操作改変骨髓球系前駆細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

20

【0022】

別の態様では、本開示は、細胞補充治療における使用のため、またはがん、自己免疫障害、血液疾患、もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための、本明細書記載の改変骨髓球系前駆細胞およびその組成物を提供し、その際、改変骨髓球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む。一態様では、改変または操作改変骨髓球系前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変または操作された改変骨髓球系前駆細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

30

【0023】

したがって、一態様では、(a)骨髓球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞(MHPC)をインビトロまたはエクスピボで生成させる段階；(b)結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；および(c)リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドまたは所定のストローマ細胞または両方の存在下で分化させる段階を含む方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段階(a)と段階(b)との間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階(a)と段階(b)との間に起こる。

【0024】

別の態様では、(a)以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髓球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトする段階であって、トランスフェクトされた細胞において転写因子が発現されて、骨髓球系および赤血球系分化能を有する、結果として生じる多系列造血前駆細胞(MHPC)集団を產生させる、段階；(b)(i)結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害して、リンパ球系分化能を拡大する段階、または(ii)結果として生じたMHPC集団にDACH1およびNFIAの外因性遺伝子コーディングコピーをインビトロでトランスフェクトして、リンパ球系分化能を拡大する段階、または(iii)(i)および(ii)の両方；ならびに(c)リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドまたは支持ストローマ(supportive stroma)または両方の存在下で分化させる段階を含む方法が、本明細書に提供される。

40

50

【0025】

別の態様では、本開示は、(a)以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトする段階であって、トランスフェクトされた転写因子が、細胞においてインビオで発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能を有する多系列前駆細胞（MHPC）集団を産生させる、段階；(b) (i)結果として生じたMHPC集団におけるH3K9および/もしくはH3K27でヒストンタンパク質を標的とするヒストンメチルトランスフェラーゼ酵素を阻害して、リンパ球系分化能を拡大する段階、または(ii)結果として生じたMHPC集団にDACH1およびNFIAの外因性遺伝子コーディングコピーをインビトロでトランスフェクトして、リンパ球系分化能を拡大する段階、または(iii)(i)および(ii)の両方；ならびに(c)リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドの存在下で分化させる段階を含む、骨髄球系前駆細胞集団から改変免疫細胞を生成させる方法を提供する。これらの免疫細胞は、元の骨髄球系前駆細胞と比較して、ERG、HOXA9、およびRORAの外因性コピーを有するように遺伝的に改変されている。

10

【0026】

別の態様では、(a)接触された細胞における遺伝子の外因性コピーのインビオ発現のために、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに担持する1つまたは複数のベクターを骨髄球系前駆細胞集団とインビトロで接触させるまたはそれに導入する段階であって、トランスフェクトされた転写因子が、接触後の細胞においてインビオで発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能を有する多系列造血前駆細胞（MHPC）集団を産生させる、段階；(b) MHPCをヒストンメチルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤と接触させる段階；ならびに(c) MHPCをnotchリガンドまたは所定のストローマ細胞または両方と接触させる段階を含む方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段階(a)と段階(b)との間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階(a)と段階(b)との間に起こる。方法の一態様では、段階(c)は、当技術分野において公知の任意の方法により、MHPCにおけるNotchシグナル伝達経路を活性化することからなる。

20

【0027】

別の態様では、本開示は、レシピエントホストにおける造血幹細胞のインビオ生着（およびまた再構成）を改善する方法であって、(a)骨髄球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞（MHPC）をインビトロまたはエクスピオで生成させる段階；(b)結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；および(c)結果として生じたMHPCをレシピエントホストに移植する段階を含む方法を提供する。

30

【0028】

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって産生された、改変または操作免疫細胞を提供する。

【0029】

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって産生された、改変または操作免疫細胞を含む組成物を提供する。

40

【0030】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変または操作免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む免疫細胞を提供する。一態様では、改変または操作免疫細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変または操作免疫細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0031】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変または操作免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む免疫細胞を提供する。

50

【0032】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変または操作免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCもしくはNANOGおよびLIN28、または4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む免疫細胞を提供する。別の態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBの外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：DACH1およびNFIAの外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0033】

10

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを含む組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBの外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0034】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。

【0035】

20

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1、NFIA、SOX4、およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。

【0036】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。リプログラミング因子の代替的な組み合わせは、これらの4つの因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28を含む。

【0037】

30

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。リプログラミング因子の代替的な組み合わせは、これらの4つの因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28を含む。

【0038】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系前駆細胞、HPC、M HPC、iPSC、改変もしくは操作された細胞、または改変もしくは操作免疫細胞は、哺乳動物細胞である。例えば、免疫細胞は、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、またはハムスター細胞である。

40

【0039】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系前駆細胞、HPC、M HPC、iPSC、改変または操作哺乳動物細胞は、靈長類細胞である。

【0040】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系前駆細胞、HPC、M HPC、iPSC、改変または操作靈長類細胞または免疫細胞は、ヒト細胞である。

【0041】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、MHPCは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれを骨髄球系共通前駆細胞（CMP）などの骨髄球

50

系前駆細胞にインビトロまたはエクスピボで導入することによって、例えば、1つまたは複数のベクターをトランスフェクトすることによって生成し、ベクターは、トランスフェクトされた細胞における転写因子のインビボ発現のために、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに担持する。

【 0 0 4 2 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、MHPCは、骨髄球系前駆細胞集団を1つまたは複数のベクターと接触させることによって生成し、その際、ベクターは、接触後の細胞における因子のインビボ発現のために、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに担持し、トランスフェクトされた転写因子は、接触後の細胞においてインビボで発現される。例えば、第1のベクターが、ERGの外因性遺伝子コーディングコピーの核酸配列を担持し、第2のベクターが、HOXA9の外因性遺伝子コーディングコピーの核酸配列を担持し、第3のベクターが、RORAの外因性遺伝子コーディングコピーの核酸配列を担持する。あるいは、単一のベクターが、ERG、HOXA9、およびRORA転写因子をコードする3つの外因性遺伝子を全て担持する。

【 0 0 4 3 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、方法は、転写因子：SOX4の外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトすることをさらに含み、その際、トランスフェクトされた転写因子は、トランスフェクトされた細胞においてインビボで発現される。

【 0 0 4 4 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、方法は、転写因子：MYBの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトすることをさらに含み、その際、トランスフェクトされた転写因子は、トランスフェクトされた細胞においてインビボで発現される。

【 0 0 4 5 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、少なくともCD45⁺である。記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、CD34⁺CD45⁺である。記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、少なくともCD45⁺およびCD11b⁺である。いくつかの態様では、骨髄球系列前駆細胞は、IL-7Rアルファ / CD127、CD3、CD4、CD8およびCD19などのリンパ球系列マーカーが陰性である。

【 0 0 4 6 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、非リンパ球系列に決定済みである。

【 0 0 4 7 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、結果として生じたMHPCは、CD34+CD38陰性 / 低発現である。

【 0 0 4 8 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、結果として生じたMHPCは、骨髄球系および赤血球系分化能を有するが、リンパ球系分化能を有しないまたは5%未満の非常に限られたリンパ球系分化能を有する。

【 0 0 4 9 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、多能性幹細胞集団から得られた胚様体由来の前駆細胞である。

【 0 0 5 0 】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、多能性幹細胞集団は、iPSCまたは胚性幹細胞（ESC）である。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCは、3つのリプログラミング因子のみ：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを成熟細胞または体細胞内にインビトロまたはエクスピボで導入することによって產生される。あるいは、4つのリプログラミング因子の外因性コピーを有するiPSCは、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28を含む。

【0052】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを有するiPSCは、c-MYCまたはnanogおよびLIN28の外因性コピーを細胞内にインビトロまたはエクスピボでさらに導入される。

【0053】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCは、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを、任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28と共に成熟細胞または体細胞内にインビトロまたはエクスピボで導入することによって產生される。

【0054】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCは、成熟細胞を1つまたは複数のベクターとインビトロまたはエクスピボで接触させることによって產生され、その際、ベクターは、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを、任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28と共に成熟細胞内にひとまとめに担持し、リプログラミング因子は、接触された成熟細胞または体細胞においてインビボで発現される。

【0055】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCが作製される元の細胞は、ドナー対象における任意の細胞型、任意の成熟細胞または体細胞からのものであることができる。例えば、細胞は、血液試料、または骨髄試料、Bリンパ球（B細胞）、Tリンパ球（T細胞）、線維芽細胞、ケラチノサイトなどである。

【0056】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCは、開示されたリプログラミング因子を成熟細胞または体細胞内にインビトロまたはエクスピボで2回以上導入することによって產生される。

【0057】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、iPSCは、成熟細胞を、開示されたベクター因子とインビトロまたはエクスピボで2回以上成熟細胞または体細胞内に接触させることによって產生される。

【0058】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、notchリガンドは、Delta-like-1、Delta-like-4、およびヒトIgG1のFcドメインと融合されたヒトDelta-like-1の細胞外ドメインからなる固定化Delta 1 ext-IgGである。

【0059】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、Delta-like-1またはDelta-like-4は、MHPCを固定化Delta 1 ext-IgG、OP9-DL1細胞またはOP9-DL4細胞と共に培養することによって供給される。OP9-DL1細胞は、Notchリガンド、Delta-like 1 (DII1)を異所性発現する骨髄由来ストローマ細胞株である。

【0060】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、阻害されたMHPCのNotchシグナル伝達経路は、培養状態で刺激される。

【0061】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼは、ヒストンH3リシン残基9 (H3K9) および/またはヒストンH3リシン残基27 (H3K27) へのメチル基の付加を触媒する。

【0062】

10

20

30

40

50

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、G9a/GLPヘテロマー複合体を阻害する。

【0063】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、EZH1 (Zeste 1ポリコーム抑制複合体2サブユニットエンハンサー)を阻害する。

【0064】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、H3K9またはH3K27ヒストンメチルトランスフェラーゼは、小分子または核酸またはCRISPRによって媒介される標的遺伝的干渉によって阻害される。

10

【0065】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、H3K27ヒストンメチルトランスフェラーゼは、EZH1である。

【0066】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、H3K27ヒストンメチルトランスフェラーゼは、EZH2ではない。

【0067】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ小分子阻害剤は、EZH2ではなくEZH1に特異的である。

【0068】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ小分子阻害剤には、AMI-1、A-366、BIX-01294、BIX01338、BRD4770、ケトシン、UNC0224、UNC0631、UNC0638、UNC0642、UNC0646、EPZ5676、EPZ005687、GSK343、EPZ-6438、3-デアザネプラノシンA (DZNep) HCl、UNC1999、MM-102、SGC 0946、エンタカポン、EPZ015666、UNC0379、EI1、MI-2 (メニン-MLL阻害剤)、MI-3 (メニン-MLL阻害剤)、PFI-2、GSK126、EPZ004777、BRD4770、およびEPZ-6438が非限定的に含まれる。

20

【0069】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ核酸阻害剤は、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を標的とする核酸である。

30

【0070】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、核酸阻害剤は、RNA干渉阻害剤である。

【0071】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、核酸は、CTATCTGGCAGTGCGAGAATG (SEQ. ID. NO: 1),

AGACGTGCAAGCAGGTCTTC (SEQ. ID. NO: 2), TGGATGACTTATGCGTGATT (SEQ. ID. NO: 3), CAACAGAACTTATGGTAGAA (SEQ. ID. NO: 4), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 5), GCTTCCTCTTCAACCTCAATA (SEQ. ID. NO: 27), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 28), GCTCTTCTTGATTACAGGTA (SEQ. ID. NO: 29), およびGCTACTCGGAAAGGAAACAAA (SEQ. ID. NO: 30)

40

からなる群より選択される。

【0072】

記載された任意の改変免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、SOX4またはMYBまたはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0073】

記載された任意の改変免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、DACH1またはNFIAまたは

50

DACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0074】

記載された任意の方法、細胞または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたMHPGの特異的定方向分化は、細胞を、IL-7、IL-2、IL-15、およびIL-4からなる群より選択されるサイトカインと接触させることを含む。

【0075】

一態様では、細胞補充治療の方法、または対象におけるがん、自己免疫障害、血液疾患、もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための方法であって、(a)ドナー対象から体細胞を提供する段階、(b)任意の前述のパラグラフに記載された体細胞に由来する骨髓球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞を生成させる段階；(c)任意の前述のパラグラフに記載された、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；(d)任意の前述のパラグラフに記載されたリンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団をnotchリガンドまたはストローマ細胞または両方の存在下で分化させる段階、および結果として生じた分化後のリンパ球系細胞をレシピエント対象に植え込む段階を含む方法が、本明細書に提供される。

10

【0076】

上記処置方法の一態様では、ホスト対象およびレシピエント対象は、同じ個体である。

【0077】

上記処置方法の一態様では、ホスト対象およびレシピエント対象は、同じ個体ではないが、少なくともHLA適合性である。

20

【0078】

定義

一態様では、本明細書に使用される用語「造血幹細胞」または「HSC」は、自己複製能を有し、かつ3つの造血系列：赤血球系、リンパ球系、および骨髓球系の全ての血液細胞型を生じる、幹細胞を表す。これらの細胞型には、骨髓球系列（単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、およびリンパ球系列（T細胞、B細胞、NK細胞）が含まれる。ヒトHSCは、CD34⁺、CD59⁺、CD90/Thy1⁺、CD38^{low/-}、c-kit/CD117^{-/low}、およびLin⁻として判定される。マウスHSCは、CD34^{low/-}、SCA-1⁺、CD90/Thy1^{+/low}、CD38⁺、c-Kit/CD117⁺、およびLin⁻と見なされる。これらのマーカーパネルの発現を検出することで、蛍光標示式細胞分取（FACS）のような技法を介した特異的細胞集団の分離が可能になる。一態様では、用語「造血幹細胞」または「HSC」は、自己複製能を有し、以下の細胞表面マーカー：CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{low/-}、CD133⁺、c-Kit/CD117^{-/low}、およびLin⁻を有する幹細胞を表す。一態様では、用語「造血幹細胞」または「HSC」は、少なくともCD34⁺である幹細胞を表す。一態様では、用語「造血幹細胞」または「HSC」は、自己複製能を有し、少なくともCD34⁺およびc-kit/CD117^{low/-}である幹細胞を表す。一態様では、用語「造血幹細胞」または「HSC」は、自己複製能を有し、少なくともCD38^{low/-}、c-kit/CD117^{-/low}である幹細胞を表す。

30

【0079】

本明細書に使用される用語「iPS細胞」、「iPSC」、および「人工多能性幹細胞」は、互換的に使用され、以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のトランスフェクションによって分化細胞、例えば体細胞から人工的に派生する多能性細胞を表す。リプログラミング因子の代替的な組み合わせは、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28を含む。

40

【0080】

幹細胞および前駆細胞の分化および発生の文脈で使用されるときの、本明細書に使用される用語「系列」は、細胞が完全分化細胞になるために採ることができる細胞分化および発生の経路を表す。例えば、HSCには、3つの造血細胞系列：赤血球系、リンパ球系、および骨髓球系があり、HSCは、これら3つの系列全てについて知られている最終分化細胞

50

型に分化および発生する分化能、すなわち能力を有する。用語「多系列」が使用されるとき、本用語は、細胞が将来的に、1つよりも多い系列について知られている最終分化細胞型に分化および発生できることを意味する。例えば、HSCは、多系列分化能を有する。用語「限られた系列」が使用されるとき、本用語は、細胞が、1つの系列について知られている最終分化細胞型に分化および発生できることを意味する。例えば、骨髄球系共通前駆細胞(CMP)または巨核球-赤血球系前駆細胞(MEP)(図15参照)は、リンパ球系列ではなく骨髄球系列の最終分化細胞型にのみ分化および発生できるので、限られた系列を有する。骨髄球系列の最終分化細胞には、赤血球、単球、マクロファージ、巨核球、骨髄芽球、樹状細胞、および顆粒球(好塩基球、好中球、好酸球、およびマスト細胞)が含まれ；リンパ球系列の最終分化細胞には、Tリンパ球/T細胞、Bリンパ球/B細胞、樹状細胞、およびナチュラルキラー細胞が含まれる。

10

【0081】

本明細書に使用される用語「前駆細胞」は、後で特異的細胞型(完全分化または最終分化細胞)、例えば、血液細胞、皮膚細胞、骨細胞、または有毛細胞に成熟(分化)する能力を有する未熟または未分化細胞を表す。前駆細胞は、分化によって生み出すことができる細胞と比べて原始細胞表現型を有する(例えば、完全分化細胞よりも発生経路または進行に沿った早い段階である)。多くの場合に、前駆細胞は、顕著または非常に高い増殖能も有する。前駆細胞は、発生経路ならびに細胞が発生および分化する環境に応じて、複数の別個の分化細胞型、または単一の分化細胞型を生み出すことができる。前駆細胞は、増殖して、同様に未熟または未分化のより多くの前駆細胞を作製することもできる。

20

【0082】

本明細書に使用される用語「多系列造血前駆細胞」、「複能性造血前駆細胞」および「MHPC」は互換的に使用され、複数の種類の造血系列細胞を生成またはそれに分化する力(ability)または能力を有する造血細胞(血液を形成する細胞)を表す。一態様では、この用語は、本明細書記載の「逆戻り多系列造血前駆細胞」および「逆戻りMHPC」を含む。そのような細胞は、転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの遺伝子コーディング核酸のいくつかの外因性コピーを細胞内に組み込むためのインビトロまたはエクスピボトランスクエクション後の骨髄球系前駆細胞に由来する。一態様では、この用語は、「胚様体由来前駆細胞」および「EB由来前駆細胞」を含む。

30

【0083】

本明細書に使用されるように、一態様では、用語「骨髄球系前駆細胞」または「骨髄球系列前駆細胞」は、骨髄球系列に決定済みであり、骨髄球系列の最終分化細胞型にのみ分化および発生することができる未熟または未分化細胞を表す。例は、骨髄球系列のCMP、MEP、およびGMPである。一態様では、用語「骨髄球系前駆細胞」または「骨髄球系列前駆細胞」は、胚様体から得られた多能性幹細胞由来のCD34+CD45+細胞を表す。一態様では、用語「骨髄球系前駆細胞」または「骨髄球系列前駆細胞」は、顆粒球およびマクロファージにのみ分化および発生する細胞を表す。

【0084】

用語「分化細胞」は、そのネイティブな形態で本明細書において定義される用語としての多能性ではない、任意の初代細胞を意味する。用語「分化細胞」は、複能性細胞(例えば成体体性幹細胞)などの部分的に分化した細胞も包含する。いくつかの態様では、用語「分化細胞」は、専門化の度合いの低い細胞型の細胞(例えば、未分化細胞またはリプログラミングされた細胞)由来の、より専門化された細胞型の細胞であって、細胞分化プロセスを受けた細胞も表す。

40

【0085】

細胞個体発生の文脈における用語「分化する」、または「分化している」は、「分化細胞」が、その前駆細胞よりも発生経路をさらに下に進行した細胞であることを意味する、相対的な用語である。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書において定義される本用語としてのリプログラミングされた細胞は、系列限定された前駆細胞(中胚葉幹細胞または内胚葉幹細胞など)に分化することができ、この前駆細胞は、今度は経路をさら

50

に下に進んで他の種類の前駆細胞（組織特異的前駆細胞、例えば心筋前駆細胞、または臍臍前駆細胞など）に、次に、ある特定の組織型に特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力を保持する場合または保持しない場合がある最終段階分化細胞に分化することができる。

【 0 0 8 6 】

「複能性細胞」に関連して使用される場合の用語「複能性」は、全部で3つの胚葉に由来する細胞の全てではなく一部に分化することができる細胞を表す。したがって、複能性細胞は、部分分化細胞である。複能性細胞は、当技術分野において周知であり、複能性細胞の例には、例えば、造血幹細胞および神経幹細胞、毛包幹細胞、肝臍幹細胞などの成体細胞型幹細胞が含まれる。複能性は、幹細胞が、他の系列の細胞ではなく、所与の系列の多くの細胞型を形成する場合があることを意味する。例えば、複能性血液幹細胞は、多数の異なる血液細胞型（赤血球、白血球、血小板など）を形成することができるが、ニューロンを形成することができず；心血管前駆細胞（MICP）は、特定の成熟心臍、ペースメーカー、平滑筋、および内皮細胞型に分化し；臍臍由来複能性前駆細胞（PMP）コロニーは、臍臍系列の細胞型（インスリン、グルカゴン、アミラーゼまたはソマトスタチンを産生する細胞）および神経系列の細胞型（形態的にニューロン様、アストロサイト様またはオリゴデンドロサイト様の細胞）を産生する。

【 0 0 8 7 】

本明細書に使用される用語「リプログラミング遺伝子」は、その発現が、分化細胞、例えば体細胞の未分化細胞（例えば、多能性状態または部分多能性状態、複能性状態の細胞）へのリプログラミングに寄与する遺伝子を表す。リプログラミング遺伝子は、例えば、マスター転写因子：Sox2、Oct3/4、Klf4、Nanog、Lin-28、c-mycなどをコードする遺伝子であることができる。用語「リプログラミング因子」は、リプログラミング遺伝子によってコードされるタンパク質を表す。

【 0 0 8 8 】

用語「外因性」は、そのネイティブな供給源以外の細胞に存在する物質を表す。本明細書に使用される場合の用語「外因性」は、当該核酸またはタンパク質が通常は見出されないまたはより低い量で見出される細胞または生物などの生体システムに、ヒトの手を伴うプロセスによって導入された、核酸（例えば、リプログラミング転写因子、例えばSox2、Oct3/4、Klf4、Nanog、Lin-28、c-mycなどをコードする核酸）またはタンパク質（例えば、転写因子ポリペプチド）を表す。物質（例えば、sox2転写因子をコードする核酸、またはタンパク質、例えばSOX2ポリペプチド）は、それが細胞またはその物質を受け継ぐ細胞の祖先に導入されたならば、外因性と見なされる。

【 0 0 8 9 】

本明細書に使用される用語「単離された」は、細胞がその自然環境以外の状態に置かれることを示す。用語「単離された」は、その後これらの細胞を他の細胞と組み合わせてまたは混合して後に使用することを排除しない。

【 0 0 9 0 】

本明細書に使用される用語「拡大すること」は、細胞分裂（有糸分裂）を経由して同様の細胞の数を増加させることを表す。用語「増殖させること」および「拡大すること」は、互換的に使用される。

【 0 0 9 1 】

本明細書に使用される「細胞表面マーカー」は、細胞表面に発現される任意の分子を表す。細胞表面発現は、通常、分子が膜貫通ドメインを保有することを要する。細胞表面には通常見出されないいくつかの分子を、細胞表面に発現するように、組み換え技法によって操作することができる。多くの天然細胞表面マーカーは、「CD」または「分化クラスター」分子と名付けられている。細胞表面マーカーは、多くの場合、抗体が結合することができる抗原決定基を提供する。本明細書記載の方法に特に関連する細胞表面マーカーは、CD34である。本開示による有用な造血前駆細胞は、好ましくはDC34を発現し、または言い換えると、これらの細胞は、CD34陽性である。

【0092】

細胞は、任意の細胞表面マーカーについて「陽性」または「陰性」と称することができ、このような呼称の両方が、本明細書記載の方法の実施のために有用である。細胞を、マーカーに特異的に結合する抗体と接触させ、続いてそのような接触後の細胞のフローサイトメトリー分析を行って、抗体が細胞と結合しているかどうかを判定することなどの当業者に公知の方法を用いて、細胞が、検出されるに足る量でその表面にマーカーを発現している場合、その細胞は、細胞表面マーカーについて「陽性」と見なされる。細胞が細胞表面マーカーについてのメッセンジャーRNAを発現する場合があるとはいえ、本明細書記載の方法に関して陽性と見なされるために、細胞は、このマーカーを細胞表面に発現しなければならないことを理解されたい。同様に、細胞をマーカーと特異的に結合する抗体と接触させ、続いてそのような接触後の細胞のフローサイトメトリー分析を行って、抗体が細胞と結合しているかどうかを判定することなどの当業者に公知の方法を用いて、細胞がその表面にマーカーを検出されるに足る量で発現していない場合、その細胞は、細胞表面マーカーについて「陰性」または「陰性／低発現」（「-/lo」または「lo/-」と略される）と見なされる。細胞表面系列マーカーに特異的な薬剤が使用されるいくつかの態様では、この薬剤は、全て、蛍光タグなどの同じラベルまたはタグを含むことができ、したがって、そのラベルまたはタグについて陽性の全ての細胞を排除または除去して、本明細書記載の方法における使用のために、未接触の造血幹細胞または前駆細胞を残すことができる。

【0093】

本明細書に使用される用語「ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤」または「阻害剤」は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（例えば、G9a、GLP、EZH1）の発現を阻害する、または基質ヒストンタンパク質上のリシン残基をメチル化する酵素の触媒活性を阻害する、任意の分子である。例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、阻害された細胞におけるG9a、GLP、もしくはEZH1の発現を阻害するsiRNAもしくはdsRNA、または阻害された細胞におけるG9a、GLP、もしくはEZH1のmRNAの分解を促進するgRNAができる。例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、酵素活性と拮抗する小分子である。例には、本明細書記載の小分子AMI-1、A-366、BIX-01294、BIX01338、BRD4770、ケトシン、UNC0224、UNC0631、UNC0638、UNC0642、UNC0646、EPZ5676、EPZ005687、GSK343、EPZ-6438、3-デアザネオブランシンA (DZNeP) HCl、UNC1999、MM-102、SGC0946、エンタカポン、EPZ015666、UNC0379、EI1、MI-2（メニン-MLL阻害剤）、MI-3（メニン-MLL阻害剤）、PFI-2、GSK126、EPZ004777、BRD4770、およびEPZ-6438が非限定的に含まれる。

【0094】

本明細書に使用される用語「小分子」は、ペプチド、ペプチド模倣薬、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、アプタマー、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、約10,000グラム／モル未満の分子量を有する有機または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機（heteroorganic）および有機金属化合物を含む）、約5,000グラム／モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約1,000グラム／モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約500グラム／モル未満の分子量を有する有機または無機化合物を非限定的に含む化学薬剤、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に許容される形態を表す。いくつかの態様では、小分子は、ヘテロ有機化合物または有機金属化合物である。

【0095】

用語「抑制性RNA」は、標的核酸のレベルまたは活性の減少を媒介する標的核酸（例えば、標的マイクロRNA）と相補的な配列を含有する核酸分子を含むことが意味される。抑制性RNAの非限定的な例には、干渉性RNA、shRNA、siRNA、リボザイム、アンタゴミル、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。抑制性RNAを作製する方法は、本明細書に記載されている。抑制性RNAを作製する追加的な方法は、当技術分野において公知である。一態様では、本明細書記載のBCL11AマイクロRNAは、BCL11A mRNAの活性の減少を引き起こす抑制性RNAである。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

本明細書に使用される「干渉性RNA」は、直接的または間接的（すなわち、変換されて）のいずれかでRNA干渉を媒介することによって遺伝子発現を阻害または下方調節することができる、任意の二本鎖または一本鎖RNA配列を表す。干渉性RNAには、低分子干渉性RNA（「siRNA」）および低分子ヘアピン型RNA（「shRNA」）が非限定的に含まれる。「RNA干渉」は、配列適合性メッセンジャーRNA転写物の選択的分解を表す。

【 0 0 9 7 】

本明細書に使用される「shRNA」（低分子ヘアピン型RNA）は、アンチセンス領域、ループ部分およびセンス領域を含むRNA分子であって、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対形成して二重鎖システムを形成する相補的ヌクレオチドを有する、RNA分子を表す。転写後プロセシングに続いて、低分子ヘアピン型RNAは、RNアーゼIIIファミリーのメンバーである酵素ダイサーによって媒介される切断事象によって低分子干渉性RNAに変換される。本明細書に使用される語句「転写後プロセシング」は、転写後に起こり、例えば酵素ダイサーおよび／またはドローシャによって媒介されるmRNAプロセシングを表す。

10

【 0 0 9 8 】

本明細書に使用される「低分子干渉性RNA」または「siRNA」は、RNA干渉を配列特異的に媒介することによって遺伝子発現を阻害または下方調節することができる任意の小型RNA分子を表す。低分子RNAは、例えば、約18から21ヌクレオチド長であることができる。各siRNA二重鎖は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖によって形成される。エンドヌクレアーゼ、アルゴノート2（Ago 2）は、siRNA二重鎖の巻き戻しを触媒する。巻き戻された後、ガイド鎖は、RNA干渉特異性複合体（RISC）に組み込まれ、一方でパッセンジャー鎖は放出される。RISCは、ガイド鎖を用いて相補的配列を有するmRNAを見つけ、標的mRNAのヌクレオチド鎖内分解性切断をもたらす。

20

【 0 0 9 9 】

レトロウイルスは、その複製サイクルの途中に逆転写酵素を利用するRNAウイルスである。用語「レトロウイルス」は、任意の公知のレトロウイルス（例えば、モロニーマウス肉腫ウイルス（MoMSV）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳がんウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ネコ白血病ウイルス（FLV）、スプーマウイルスなどのc型レトロウイルスを表す。

30

【 0 1 0 0 】

レトロウイルスゲノムRNAは、逆転写酵素によって二本鎖DNAに変換される。ウイルスのこの二本鎖DNA形態は、感染細胞の染色体に組み込まれることができ、組み込まれた後、これは、「プロウイルス」と呼ばれる。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIに対する鑄型として役立ち、新しいウイルス粒子を產生するために必要な構造タンパク質および酵素をコードするRNA分子の発現を指示する。

【 0 1 0 1 】

「末端反復配列」または「LTR」と呼ばれる構造が、プロウイルスの各末端にある。用語「末端反復配列（LTR）」は、レトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインを表し、このドメインは、その天然配列状況で、ダイレクトリピートであり、U3、R、およびU5領域を含有する。LTRは、一般的に、レトロウイルス遺伝子の発現およびウイルス複製の基礎となる機能（例えば、遺伝子転写物の促進、開始およびポリアデニル化）を提供する。LTRは、転写制御エレメント、ポリアデニル化シグナルならびにウイルスゲノムの複製および組み込みに必要な配列を含む、多数の調節シグナルを含有する。ウイルスLTRは、U3、RおよびU5と呼ばれる3つの領域に分けられる。U3領域は、エンハンサーおよびプロモーターエレメントを含有する。U5領域は、プライマー結合部位とR領域との間の配列であり、ポリアデニル化配列を含有する。R（反復）領域は、U3およびU5領域に隣接する。U3、R、およびU5領域からなるLTRは、ウイルスゲノムの5'および3'末端の両方に出現する。本発明の一態様では、5'LTRを含むLTR内のプロモーターは、異種プロモーターと置換される。使用することができる異種プロモーターの例には、例えば、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）プロモーター、テトラサイクリン誘導性（TET）プロモーター、

40

50

-グロビン遺伝子座制御領域および -グロビンプロモーター (LCR)、ならびにサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターが含まれる。

【0102】

用語「レンチウイルス」は、緩徐型疾患を引き起こすレトロウイルス群（または属）を表す。この群に含まれるウイルスには、ヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原体であるHIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV1型、およびHIV2型を含む）；ヒツジに脳炎（ビスナ）または肺炎（マエディ）を引き起こすビスナ-マエディ、ヤギに免疫不全、関節炎、および脳炎を引き起こすヤギ関節炎脳炎ウイルス；ウマに自己免疫性溶血性貧血および脳炎を引き起こすウマ伝染性貧血ウイルス；ネコに免疫不全を引き起こすネコ免疫不全ウイルス (FIV)；ウシにリンパ節症、リンパ球増加症、および可能性があることには中枢神経系感染を引き起こすウシ免疫不全ウイルス (BIV)；ならびに類人霊長類に免疫不全および脳炎を引き起こすサル免疫不全ウイルス (SIV) が含まれる。これらのウイルスによって引き起こされる疾患は、長い潜伏期および遅延性の経過を特徴とする。通常、ウイルスは、単球およびマクロファージに潜伏感染し、これらからウイルスが他の細胞に伝播する。HIV、FIV、およびSIVは、Tリンパ球、すなわちT細胞にも容易に感染する。

10

【0103】

用語「R領域」は、キャッシング群の開始部（すなわち、転写開始部）に始まり、ポリA区域 (tract) の開始部直前に終わるレトロウイルスLTR内の領域を表す。R領域は、U3およびU5領域に隣接するとも定義される。R領域は、逆転写の間にゲノムの一端から他端への新生DNAの移動を可能にすることに重要な役割を果たす。

20

【0104】

用語「プロモーター／エンハンサー」は、プロモーターおよびエンハンサー機能の両方を提供することができる配列を含有するDNAセグメントを表す。例えば、レトロウイルスの末端反復配列は、プロモーターおよびエンハンサー機能の両方を含有する。エンハンサー／プロモーターは、「内因性」、「外因性」、または「異種」であり得る。「内因性」エンハンサー／プロモーターは、ゲノム中の所与の遺伝子と自然に連結されているものである。「外因性」または「異種」エンハンサー／プロモーターは、遺伝子操作（すなわち分子生物学的技法）により遺伝子の近位に配置され、それにより、その遺伝子の転写が連結されるエンハンサー／プロモーターによって指示されるものである。

30

【0105】

本明細書記載の「核酸」は、RNAまたはDNAであることができ、一または二本鎖であることができ、例えば、関心対象のタンパク質をコードする核酸、オリゴヌクレオチド、核酸類似体、例えばペプチド-核酸 (PNA)、疑似相補的PNA (pc-PNA)、およびロックド核酸 (LNA) を含む群より選択することができる。そのような核酸配列には、例えば、タンパク質をコードする核酸配列、例えば、転写リプレッサー、アンチセンス分子、リボザイム、低分子抑制性核酸配列、例えば非限定的に、RNAi、shRNAi、siRNA、マイクロRNAi (miRNA)、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用する核酸配列が非限定的に含まれる。

【0106】

本明細書に使用されるレシピエントホストに関連する用語「生着」は、植え込まれた細胞由来であり、かつ植え込みから最低10日後にレシピエントの血中に現れる健康な血液幹細胞を作る、新しい血液形成細胞が成長し始めるときのことである。生着は、早ければ移植の10日後に起こることができるが、約14～20日がより一般的である。

40

【0107】

本明細書に使用されるように、レシピエントホストにおける免疫システムまたは血液システムに関連する用語「再構成」は、レシピエントホストの体内の生来のリザーバーもしくは動作システム、またはその部分を自然状態または機能的状態に再建することを表す。例えば、化学療法後の骨髄などは、骨髄幹細胞が消失していた。

【図面の簡単な説明】

【0108】

50

【図1】図1A～1Fは、確定的なリンパ球系分化能を制限するエピジェネティック修飾因子についてのインビトロスクリーニングをひとまとめに示す。図1Aに、ヒトiPSCの造血前駆細胞への胚様体（EB）分化についての模式図を示す。血清、BMP4および造血性サイトカインの中で培養されたEBを14日後に解離させた。CD34⁺前駆細胞をMACSソートティングによって単離し、この細胞にドキシサイクリン（Dox）誘導性レンチウイルスベクター中のHOXA9、ERG、RORA、SOX4およびMYB（5F）を形質導入した。次に、5F細胞に各エピジェネティック修飾因子を標的とする個別のshRNAを形質導入し、次に、96ウェルプレート中のOP9-DL1ストローマ共培養物上に播種して、T細胞の分化を誘導した。Doxを培養物に20日間添加して、導入遺伝子の発現を持続させ、その後除去した。35日目にフローサイトメトリーでT細胞分化能を評価した。図1Bに、2つの異なるiPSC株、CD45-iPSおよびMSC-iPSを使用する2つの独立した実験からの候補のヒットを要約したベン図を示す。5Fによる形質導入に続くshRNAの重感染によってスクリーニングし、次に、形質導入後の細胞をOP-DL1ストローマと共に培養した。スクリーニングからの上位候補を記載する。ルシフェラーゼを標的とする対照shRNA（shLUC）と比較して、4つのshRNAのうち少なくとも2つが高い頻度および高い絶対細胞数でCD4+CD8+ T細胞を産生した場合、各候補をヒットとしてスコア化した。図1Cに、+Dox培養物中で14日間再特異化（respecification）後の5F+shRNA細胞の相対拡大を示す。図1Dに、表示のエピジェネティック修飾因子を標的とする5F+shRNAからのCD4+CD8+ T細胞の頻度の前向き分析を示す。図1Eに、表示の5F+shRNA細胞からのCD19+ B細胞の頻度の前向き分析を示す。図1Fに、長期インビトロ培養後の5F+shEZH1の拡大および分化能を示す。通常14日の再特異化（約10²倍の拡大）の間、およびさらに追加的な6週間（約10⁴倍の拡大）に、5F+shEZH1細胞を+Dox培養物中に維持し、次にOP9-DL1ストローマ共培養物中にプレーティングした。長期培養および分化（13週間）後の5F+shLUCおよび5F+shEZH1細胞のT細胞分化能の代表的なフローサイトメトリー分析を示す。

【図2】図2A～2Fは、EZH1の抑制が、リンパ球系複分化能を解除し、骨髄赤血球系分化に最小限の効果を有したことをひとまとめにして示す。図2Aに、ルシフェラーゼ（shLUC）またはEZH1（shEZH1）を標的とする2つの異なるshRNAを用いた5F細胞のCD4+CD8+ T細胞発生のフローサイトメトリー分析を示す。OP9-DL1と共に培養した35日後に細胞を評価した。図2Bに、フローサイトメトリーによって評価されたように、EZH1のノックダウンが、iPSC由来5F細胞におけるB細胞（CD19+）分化能を強く促進することを示す。図2Cに、骨髄球系（CD11b）細胞の分化が、5F+shEZH1細胞において損なわれていないことを示す。図2Dに、赤血球系（CD71+GLY+）細胞の分化が、5F+shEZH1細胞において損なわれていないことを示す。図2Eに、5F+shLUC細胞と比較した5F+shEZH1のT細胞分化能の定量を示す。CD34-iPS、CH45-iPSおよびMSC-iPS株を使用して5回の独立した繰り返しの平均±SEMとしてグラフを示す。***p < 0.001。図2Fに、Dox不在下でプレーティングした5F+shLUCまたは5F+shEZH1細胞のコロニー形成能を示す。（上欄）Dox不在下のプレート上のCFU-G、CFU-M、CFU-GM、CFU-GEMMおよびCFU-Eコロニーの代表的な画像である。（左下欄）5F+shLUCまたは5F+shEZH1プレートの代表的な画像。（右下欄）2つの独立した実験（n = 2）における5F+shLUCまたは5F+shEZH1細胞のコロニー形成能の定量。

【図3】図3A～3Jは、古典的PRC2サブユニットの抑制が強いリンパ球系分化能を解除しないことをひとまとめに示す。図3Aに、2つの異なるshRNAを用いて表示のPRC2サブユニットのそれぞれがノックダウンされた5F細胞の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。図3Bに、個別のshRNAのmRNAノックダウン効率の定量PCRを示す。図3Cに、2つの独立した実験の平均±SEMとして示される、表示のサブユニットを標的とするshRNA加5FからのT細胞頻度の定量を示す。図3Dに、レスキュー実験のための概略図を示す。5F細胞はGFP+であり、shRNAは、ピューロマイシンにより選択可能である。5F+shEZH1細胞に、両方ともmCherry蛍光によってマークされたマウスEZH1 ORF（mEzh1）または触媒SETドメイン欠失mEzh1（mEzh1_Set）を形質導入した。GFP+、ピューロ耐性、mCherry+細胞をソーティングし、T細胞分化のためにOP9-DL1ストローマ共培養物中

10

20

30

40

50

に播種した。図3Eに、図3Dに詳述したレスキュー実験の代表的なフローサイトメトリー プロットを示す。全てのプロットは、CD45+にゲート設定されている。図3Fに、データを 2つの独立した実験の平均 \pm SEMとして提示した図3Eにおけるフローサイトメトリー分析の定量を示す。図3Gに、5F細胞におけるH3K27me3の総タンパク質レベルによってモニターされた、GSK126濃度の増加に伴うEZH2およびEZH1酵素活性における用量依存的減少を示す。3uMで、総H3K27me3のタンパク質レベルがDMSO対照と比べて減少し始めるので、この濃度は、EZH2およびEZH1阻害についての有効用量を示している。図3Hに、漸増する用量のGSK126で処理された、5F不含CD34+ d9造血内皮(HE)細胞の処理後のT細胞分化能のフロー分析を示す。図3Iに、表示のGSK126濃度で処理された5F細胞をプレーティングしたコロニー-アッセイの代表的な画像を示す。図3Jに、(G)におけるコロニーの定量を2回の繰り返しの \pm SEMとして示す。

【図4-1】図4A～4Hは、確定的再特異化前駆細胞の遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティーをひとまとめに示す。図4Aに、5F細胞における対照ノックダウンと比較してEZH1をノックダウンしたときに、104個の遺伝子が有意に上方調節され、49個の遺伝子が有意に下方調節されたことを示す(>2倍; t検定, $p < 0.1$)。図4Bに、図4Aにおいて最も有意に上方調節された遺伝子のGO分析を示す。図4Cに、5F+shLUC細胞と比較した5F+shEZH1細胞におけるヒトHSCおよび前駆細胞のシグネチャーのGSEA分析を示す。HSC_MLP、MLPおよびGMPのシグネチャーは、5F+shEZH1細胞において有意に濃縮されている(FDR < 0.25)。図4Dに、5F+shEZH1および5F+shLUC細胞における全てのATAC-seqピークのプロットを示す。図4Eに、上方調節されたATAC-seqピークに関連する領域の濃縮経路のGO分析を示す。図4Fに、上方調節されたATAC-seqのピークに関連するゲノム領域と、HSPC、T、B細胞のGRNおよびHSPCシグネチャーとの比較を示す。 $*p < 0.05$ 。図4Gに、下方調節されたATAC-seqのピークに関連する領域の濃縮経路のGO分析を示す。

【図4-2】図4A～4Hは、確定的再特異化前駆細胞の遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティーをひとまとめに示す。図4Hに、上方調節されたATAC-seqのピークに関連するゲノム領域と、HSPC、T、B細胞のGRNおよびHSPCシグネチャーとの比較を示す。 $*p < 0.05$ 。

【図5】図5A～5Hは、EZH1がHSCおよびリンパ球系遺伝子ネットワークと直接結合してそれを調節することをひとまとめに示す。図5Aに、V5エピトープをタグ付けされたEZH1またはEZH2が5F細胞に過剰発現され、ChIP配列解析に供されたことを示す。ChIP-seqのピークを近位プロモーター領域内に定義した(TSSの-1から+1kb)。EZH1およびEZH2 ChIP-seqピークを重ねて、独特なEZH1結合型プロモーターを同定した。図5Bは、H3K4me3、H3K27me3、EZH1およびEZH2についてのChIP-seq密度ヒートマップである。図5Cに、EZH1およびEZH2プロモーターに関連するヒストンマークの比率を示す。図5Dに、遺伝子合計1069個中152個の独特なEZH1結合TFのmRNA発現ヒートマップ、およびそれらの調節されたネットワークを示す。図5Eに、EZH1結合TF(FDR < 0.25)の有意に上方調節されたネットワークが、HSPC、BおよびT細胞のGRNにおいて濃縮されていることを示す。図5Fに、EZH1結合TFが、HSPC階層のHSC、MLPおよびプロ-B細胞集団に特異的に発現されていることを示す。図5Gに、HSPC階層の各集団へのEZH1結合遺伝子の濃縮(左)およびそれらに関連するヒストンマークの崩壊(右)を示す。図5Hに、EZH1結合二価遺伝子が、B、T、NK、顆粒球および単球系列に高度に発現していることを示す。

【図6】図6A～6Nは、Ezh1の欠乏が、胚性造血幹/前駆細胞のリンパ球系分化能および生着を増大させることをひとまとめに示す。図6Aに、E9.5胚本体(上)および卵黄嚢(下)の代表的な画像を示す。図6Bに、E9.5 WTまたはEzh1-/- EPおよびYSからのT細胞分析の代表的なフロープロットを示す。YSおよびEPを単一細胞に解離させ、それを、5ng/ml IL-7および5ng/mL FLT3を補充したOP9-DL1ストローマ共培養物中にプレーティングした。ストローマ共培養の12日後に、細胞を収集し、マーカーCD4およびCD8によりT細胞発生について分析した。全てのプロットは、CD45にゲート設定したものである。図

10

20

30

40

50

6Cに、WTまたはEzh1-/- EPおよびYSからのTCR およびTCR の代表的なフロー分析を示す。図6Dに、Ezh1-/- YSからのCD4+CD8+ T細胞またはTCR をWTと比較した比の定量を3回の独立した実験から示す。図6Eに、E10.5胚の代表的な画像を示す。図6Fに、E10.5 WT胚からのYSおよびAGMにおける各PRC2サブユニットの定量PCRを3回の繰り返しの平均±SEMとして示す。図6Gに、3.5eeの全E10.5 AGMを静脈内移植された、亜致死照射成体NSG雌を示す。4週間毎にマウスから後眼窩採血し、ドナーのキメリズムを移植後最大16週間モニタリングした。各点は、1体の移植レシピエントを表す。図6Hに、図6Gにおいて生着したマウスの系列分布を示す。図6Iに、5eeの全E 10.5 YSを尾静脈注射により移植された、亜致死照射成体NSG雌を示す。図6Jに、(図6I)において生着したマウスの系列分布を示す。図6Kに、一次移植の24週間後に二次レシピエントに移植された図6Gの一次レシピエントからの全髄を示す。各群から2~5匹の一次レシピエントを殺し、全骨髄細胞 4×10^6 個を1~3匹の二次レシピエントに移植した。図6Lに、図6Kにおける二次レシピエントの系列分布を示す。図6Mに、図6Iにおける一次レシピエントの二次移植を示す。図6Nに、図6Mにおける二次レシピエントの系列分布を示す。*p < 0.05、**p < 0.01、N.E. = 生着なし。

【図7】図7A~7Bは、T細胞分化能を制限することができるエピジェネティック修飾因子についてのスクリーニングをひとまとめに示す。図7Aに、候補クロマチン因子を示す。各因子を標的とする4つのshRNAをスクリーニングに使用した。図7Bに、上位の各候補因子がshRNAでノックダウンされた5F細胞のT細胞分化能を示す代表的なフロープロットを示す。

【図8】有意に濃縮されたGSEAネットワークを示す。RNAシーケンシングによって評価した、5F細胞におけるEZH1のノックダウンの4、14または28日後に統計的に有意に上方調節または下方調節された経路。

【図9 A】図9A~9Cは、5F+shEZH1細胞と5F+shLUC細胞とを比べたATAC-シーケンシング分析をひとまとめに示す。図9A: 上方調節されたATAC-seqピークに関連する最近傍遺伝子の濃縮経路のGO分析。

【図9 B】図9A~9Cは、5F+shEZH1細胞と5F+shLUC細胞とを比べたATAC-シーケンシング分析をひとまとめに示す。図9B: 上方調節されたATACピークに関連する最近傍遺伝子のGO分析。

【図9 C】図9A~9Cは、5F+shEZH1細胞と5F+shLUC細胞とを比べたATAC-シーケンシング分析をひとまとめに示す。図9C: HSPC、B、T細胞のGRNおよびHSPC階層シグネチャーを有する5F+shEZH1細胞における上方調節および下方調節されたATAC-seqピークの比較。

【図10】図10A~10Fは、成体Ezh1欠損マウスの特徴づけをひとまとめに示す。図10Aに、成体骨髄におけるLSK SLAM HSCの定量を示す。図10Bに、WT、Ezh1+/-およびEzh1-/-成体マウス(8~12週齢)の系列分布を示す。遺伝子型1つあたりマウスn=3。図10Cに、末梢血中のWBC数を示す。図10Dに、末梢血中のリンパ球数を示す。図10Eに、胸腺中の絶対細胞数を示す。図10Fに、WT、Ezh1+/-およびEzh1-/-マウスからの2つの胸腺の代表的な画像を示す。****P < 0.0001。

【図11】図11A~11Cは、E9.5 YSにおける造血性集団の系列分析をひとまとめに示す。図11Aに、(胚本体)EPおよび(卵黄嚢)YSについてのゲート設定のスキームを示す。図11Bに、プールされた複数の胚からのEPおよびYSにおけるB細胞の代表的なフロープロット(左)および2回の繰り返しからの定量(右)を示す。図11Cに、プールされた複数の胚からのEPおよびYSにおけるT細胞の代表的なフロープロット(左)および2回の繰り返しからの定量(右)を示す。

【図12】図12A~12Cは、E9.5 EPおよびYSのインビトロB細胞分化能をひとまとめに示す。図12Aに、OP9-DLストローマ上で9日分化後のB1およびB2前駆細胞頻度の代表的なフロープロットを示す。図12Bに、(図13A)から単離されたCD19+ B細胞(左)およびクラススイッチ組み換え促進条件で4日後(右)の代表的な画像を示す。図12Cに、クラススイッチ組み換え効率のフロー分析を示す。

10

20

30

40

50

【図13】図13A～13Bは、Ezh1欠損胚性HSPCがインビボで成体型リンパ球新生に寄与することをひとまとめに示す。図13Aに、生着した一次レシピエントの腹膜腔内のB1およびB2前駆細胞の代表的なフロー分析を示す。図13Bに、生着した一次レシピエントからのドナー由来末梢CD3+ T細胞のTCR αおよびTCR β頻度の代表的なフロー分析を示す。

【図14】図14A～14Dは、EZH1調節ネットワークがマウスとヒトHSPCとの間で共通であったことをひとまとめに示す。図14Aに、全てのマウスとヒトEzh1欠損HSPCとの間で共通であった7つの顕著に上方調節された経路を示す。図14Bに、全てのマウスとヒトEzh1欠損HSPCとの間で共通であった3つの顕著に下方調節された経路を示す。図14Cに、表示された組織／遺伝子型からソーティングされたヒト5F+shEZH1とマウスHSPCとの間で共通であった各GSEAネットワークにおける遺伝子数を示す。図14Dに、図15Cにおける全ての共通遺伝子のGO分析を示す。

10

【図15】複能性造血幹細胞のための造血の概略図である。造血は、体内で新しい血液細胞を創造するプロセスである。概略図に、幹細胞が分化する場合がある様々な系列を示す。

【図16】多能性造血幹細胞からの様々な骨髄球系、赤血球系、および免疫細胞の態様の產生を示す概略図である。

【図17】図17A～17Fは、NFIAおよびDACH1は、hPSCからリンパ球系を発生させるためであることを示す。図17Aに、HSCにおいて特異的に発現され、EB由来CD34+前駆細胞で下方調節され、ERG、HOXA9、RORA形質導入造血前駆細胞において誘導されない、23個の候補転写因子(TF)のベン図を示す。図17Bに、23個のTFおよび5F(HOXA9、ERG、RORA、SOX4、MYB)の新しいライブラリーをドキシサイクリン誘導性レンチウイルスベクターにクローニングし、EB由来CD34+造血前駆細胞に形質導入し、プレーティングレコロニーアッセイしたことを示す。コロニーを釣り上げ、遺伝子特異的プライマーを用いるゲノムPCRによりTFの組み込みについて分析した。図17Cに、28または13個のTFサブセットを形質導入されたEB-CD34+細胞のリンパ球系分化能を評価するための概略図を示す。最高頻度で組み入れられた13個のTF(5Fを含む)を選択して、ストローマ共培養によるTおよびB細胞分化能を評価した。図17Dに、2つの異なるIPS株(MSC-IPS 1、CD34-IPS)における28個のTFまたは13個のTFのT細胞分化能のフローサイトメトリー分析を示す。図17Eに、2つのIPS株における28個のTFまたは13個のTFのB細胞分化能のフローサイトメトリー分析を示す。13個の全てのTFは、TおよびB細胞分化能を明らかにするために十分である。図17Fに、多リンパ球系列分化能について最低限のTFの要件を決定するための減少戦略を示す。13個のTFが形質導入された、または1回に1つのTFが差し引かれたEB由来CD34+細胞のリンパ球系分化能のフローサイトメトリー分析。TおよびB細胞の両方の分化能のために、ERGおよびRORAに加えて、NFIAおよびDACH1が必要である。

20

【発明を実施するための形態】

【0109】

詳細な説明

特に説明しないかぎり、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の専門家によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本開示は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコールおよび試薬などに限定されず、したがって変更される可能性があることが理解されるべきである。本明細書において用いられる用語は、特定の態様を記述するためのものにすぎず、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を制限するものとは意図していない。

30

【0110】

分子生物学における一般用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)またはmerckmanuals.comの2015年デジタルオンライン版; Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527 600908);およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a

40

50

Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN N 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-14 49659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005;およびCurrent Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)に見出すことができ、その内容は、その全体で参照により本明細書に全て組み入れられる。さらに、状況により特に必要とされないかぎり、単数の用語は、複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。

【0111】

特に述べないかぎり、本開示は、例えば、Michael R. Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPC B) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998), Methods in Molecular biology, Vol.180, Transgenesis Techniques by Alan R. Clark editor, second edition, 2002, Humana Press、およびMethods in Molecular Biology, Vo. 203, 2003, Transgenic Mouse, edited by Marten H. Hofker and Jan van Deursenにおける当業者に公知の標準的な手順を使用して行われたが、これらは全て、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0112】

実施例以外において、または他に指定のない場合、本明細書において用いられる成分の量または反応条件を表現している全ての数値は、いずれの場合にも、用語「約」により修飾されるものと理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用される場合の用語「約」は、±1%を意味する。

【0113】

特定される全ての特許および刊行物は、例えば、本発明に関連して用いられ得るそのような刊行物に記載されている方法論を記述および開示する目的のために、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日より前にそれらの開示があったことを示すために提供される。この点に関して、本発明者らが、以前の発明のせいでまたは他の何らかの理由のためにそのような開示に先行する権利を有さないことを承認するものと解釈されるべきではない。日付に関する記載またはこれらの文献の内容に関する表現は全て、出願人が入手可能な情報に基づいており、かつ、これらの文献の日付または内容の正確さに関するいかなる承認も構成しない。

10

20

30

40

50

【0114】

本明細書記載の開示は、好ましい態様では、ヒトをクローニングするためのプロセス、ヒトの生殖系列の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、産業もしくは商業目的でのヒト胚の使用、またはヒトもしくは動物への任意の医学的利益を実質的にもたらすことなくそれらを苦しめる可能性がある、動物の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、およびそのようなプロセスの結果として生じる動物にも関するものではない。

【0115】

本開示は、リンパ球系分化能をほとんどまたは全く有しない前駆細胞から機能的免疫細胞を産生するためのインビトロまたはエクスピボ方法に関する。例えば、骨髄球系前駆細胞は、リンパ球系分化能を有さず、ナチュラルキラーリンパ球、樹状細胞、Tリンパ球、およびBリンパ球などのリンパ球系細胞に増殖および分化しない。骨髄球系前駆細胞は、骨髄球系列に決定済みであり、それらは、さらなる細胞分裂、分化および成熟を受け、以下の細胞型：巨核球、血小板、顆粒球、赤血球、マスト細胞、骨髄芽球、好塩基球、好中球、好酸球、単球およびマクロファージを産生する。図15を参照されたい。非リンパ球系前駆細胞由来の機能的免疫細胞は、ある特定の転写因子をコードする外因性DNAコピーを担持するように改変される。一態様では、患者特異的機能的免疫細胞を、本方法により産生することができる。細胞は、TまたはB細胞特異的マーカーを発現し、T細胞受容体（TCR）遺伝子再編成も受けるので、機能的である。

10

【0116】

したがって、一態様では、(a) 骨髄球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞（MHPC）を生成させる段階；(b) 結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；および(c) リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドまたは所定のストローマ細胞または両方の存在下で分化させる段階を含む、インビトロまたはエクスピボ方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段階間に起こる。いくつかの態様では、細胞培養は、方法の次の段階を行う前に各段階で関心対象の細胞数を拡大するために役立つ。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階間に起こる。

20

【0117】

別の態様では、(a) 以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトする段階であって、転写因子が、トランスフェクトされた細胞において発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能の両方を有する、結果として生じるMHPC集団を産生する、段階；(b) 結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害して、それにおけるリンパ球系分化能を拡大する段階；ならびに(c) リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドまたは支持ストローマまたは両方の存在下で分化させる段階を含む方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、方法の次の段階を行う前に各段階で段階間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階間に起こる。いくつかの態様では、培養は、関心対象の細胞の数を拡大するために役立つ。

30

【0118】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団から改変免疫細胞または改変造血前駆細胞（HPC）を生成させる方法であって、(a) 以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでトランスフェクトする段階であって、トランスフェクトされた転写因子が、細胞においてインビボで発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能を有するMHPC集団を産生する、段階；(b) 結果として生じたMHPC集団におけるヒストンのヒストン3リシン9またはリシン27残基（H3K9もしくはH3K27またはその両方）をメチル化するヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；ならびに(c) リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じたMHPC集団をnotchリガンドの存在下で分化させる段階を含む方法を提供する。これらの免疫細胞は、遺伝的に改変されている。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段

40

50

階間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階間に起こる。いくつかの態様では、培養は、方法の次の段階を行う前に各段階で関心対象の細胞の数を拡大するために役立つ。

【 0 1 1 9 】

別の態様では、(a)接触後の細胞におけるインビオ発現のために、骨髄球系前駆細胞集団に、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに担持する1つまたは複数のベクターを導入または接触させる段階であって、トランスフェクトされた転写因子が、接触後の細胞においてインビオで発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能を有するMHPC集団を產生する、段階；(b) MHPCをヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤と接触させる段階；ならびに(c) MHPCをnotchリガンドまたは所定のストローマ細胞または両方と接触させる段階を含む方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段階間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階間に起こる。いくつかの態様では、培養は、方法の次の段階を行う前に各段階で関心対象の細胞の数を拡大するために役立つ。

10

【 0 1 2 0 】

別の態様では、本開示は、レシピエントホストにおける造血幹細胞(HSC)またはHPCのインビオ生着を改善する方法であって、(a)骨髄球系前駆細胞からMHPCを生成させる段階；(b)結果として生じたMHPC集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；および(c)結果として生じたMHPCをホストに移植する段階を含む方法を提供する。いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、段階間に起こる。いくつかの態様では、細胞の選択は、段階間に起こる。いくつかの態様では、培養は、方法の次の段階を行う前に各段階で関心対象の細胞の数を拡大するために役立つ。骨髄球系前駆細胞は、リンパ球系分化能を有しないまたは限定的に有する。一態様では、OP9-DL1/4細胞において骨髄球系前駆細胞を共培養することは、いかなるCD4⁺/CD8⁺細胞も產生しない。

20

【 0 1 2 1 】

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって產生された改変または操作免疫細胞を提供する。これらの免疫細胞は、元の骨髄球系前駆細胞と比較して、ERG、HOXA9、およびRORAの外因性コピーを有するように遺伝的に改変されている。

【 0 1 2 2 】

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって產生された操作免疫細胞を含む組成物を提供する。一態様では、組成物は、薬理学的に許容される担体をさらに含む。一態様では、薬理学的に許容される担体は、細胞培養培地ではない。

30

【 0 1 2 3 】

一態様では、本開示は、増大したリンパ球系列分化能を含むように逆戻り系列を有する改変骨髄球系前駆細胞を提供する。

【 0 1 2 4 】

一態様では、本開示は、増大したリンパ球系列分化能を含むように逆戻り系列を有する改変骨髄球系前駆細胞を含有する組成物を提供する。

40

【 0 1 2 5 】

一態様では、本開示は、記載された改変免疫細胞の製造／產生において使用するための本明細書記載の改変骨髄球系前駆細胞およびその組成物を提供する。

【 0 1 2 6 】

一態様では、本開示は、細胞補充治療における使用のため、またはがん、自己免疫障害、血液疾患もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための、本明細書記載の改変骨髄球系前駆細胞およびその組成物を提供する。

【 0 1 2 7 】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由來の操作免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む操作免疫細胞を提供する。別の態様では、免疫細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらな

50

る態様では、免疫細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。一態様では、免疫細胞は、以下の転写因子：SOX4またはMYBまたはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーからさらに構成される。一態様では、免疫細胞は、以下の転写因子：DACH1またはNFIAまたはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーからさらに構成される。

【0128】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の操作免疫細胞または改変骨髄球系前駆細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む免疫細胞または改変骨髄球系前駆細胞を提供する。あるいは、リプログラミング因子は、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28である。別の態様では、免疫細胞または改変骨髄球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、免疫細胞または改変骨髄球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。あるいは、改変細胞内に導入されたリプログラミング因子は、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28である。

10

20

30

【0129】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変もしくは操作免疫細胞または改変骨髄球系前駆細胞の組成物を提供し、その際、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを含む。別の態様では、改変細胞または改変骨髄球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、改変細胞または改変骨髄球系前駆細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。

【0130】

一態様では、記載された改変細胞は、2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBの一方または両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBの一方または両方の外因性遺伝子コーディングコピーからさらに本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。

40

【0131】

一態様では、記載された改変細胞は、2つの追加的な転写因子：DACH1およびNFIAの一方または両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：DACH1およびNFIAの外因性遺伝子コーディングコピーからさらに本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、2つの追加的な転写因子：DACH1およびNFIAの一方または両方の外因性遺伝子コーディングコピーからなる。

【0132】

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって產生された改変または操作MHP Cを提供する。別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって產生された操作MH PCを含む組成物を提供する。操作MHPCは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1、NFIA、OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOGおよびLIN28のうちの1つまたは複数の外因性遺伝子コーディングコピーを有する。操作MHPCにおける外因性転写またはリプログラミング因子の組み合わせには、ERG、HOXA9、およびRORA；ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYB；ERG、HOXA9、RORA、DACH1、およびNFIA；ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1、およびNFIA；ERG、HOXA9、

50

RORA、OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはNANOGおよびLIN28；ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28；ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1、NFIA、OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはNANOGおよびLIN28；ERG、HOXA9、RORA、DACH1、NFIA、OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28；ERG、HOXA9、RORA、DACH1、NFIA、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28；ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28；ならびにERG、HOXA9、RORA、DACH1、NFIA、SOX4、MYB、OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28が含まれる。一態様では、組成物は、薬理学的に許容される担体をさらに含む。一態様では、薬理学的に許容される担体は、細胞培養培地ではない。

10

【0133】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからさらに本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。

【0134】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからさらに本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。

20

【0135】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4c-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。あるいは、4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28の組み合わせが、改変細胞中にある。

30

【0136】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4およ

40

50

びMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。あるいは、4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28の組み合わせが、改変細胞中にある。

【0137】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。あるいは、4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28の組み合わせが、改変細胞中にある。

【0138】

一態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の改変細胞の組成物であって、改変細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、組成物を提供する。別の態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーから本質的になる。さらなる態様では、改変細胞は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、MYB、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーからなる。あるいは、4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28の組み合わせが、改変細胞中にある。

【0139】

一態様では、本開示は、本明細書記載の改変免疫細胞と薬理学的に許容される担体とを含む薬理学的組成物であって、改変免疫細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORAのそれぞれ、ならびに任意で以下の転写因子：SOX4、MYB、DACH1およびNFIAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、薬理学的組成物を提供する。一態様では、薬理学的に許容される担体は、細胞培養培地ではない。一態様では、薬理学的組成物は、当技術分野において公知の少なくとも1つの凍結保存剤を含む、凍結保存組成物である。

【0140】

多能性幹細胞（PSC）は、全ての体細胞組織を生み出す能力を有する。PSCの定方向分化は、胚発生を繰り返して、3つの胚葉を特異化することによって患者にマッチした組織を生成させることを目的とする。全胚葉にわたる定方向分化における共通テーマは、PSCが胚性および胎児様細胞型を生み出す傾向であり、これは、成体レシピエントにおける組み込みおよび機能について問題を提起する。この特徴は、個体発生の間に時間的および空間的に別々の波状になって出現する造血システムで特に著しい（Dzierzak and Speck, 2008）。最初期の「原始」前駆細胞は、8.5dpcに卵黄嚢内に出現し、限られたレパートリーのマクロファージ、巨核球および有核赤血球を生み出す（Baron et al 2005, Tavian and Peault 2005, Ferkowicz et al 2005）。これらの初期胚様前駆細胞は、一般的に

10

20

30

40

50

骨髄球ベースであり、成体レシピエントの骨髄に機能的に再増殖することができない。対照的に、造血幹細胞（HSC）分化能を有する「確定的」細胞が、その後、大動脈-性腺-中腎（AGM）内の動脈内皮および他の解剖学的部位に出現する（Dzierzak and Speck, 2008）。PSCの定方向分化は、初期胚の卵黄嚢に見出されるものに類似した造血前駆細胞を生み出す。これらは、機能再構成能を欠如し、骨髄球系列に偏り、胚性グロビンを発現する。したがって、原始または確定的系列のいずれかの発生を促進する主要な運命決定メカニズムを理解することは、HSCおよびPSCからの他の成体様細胞型（例えば赤血球）を特異化するために重要である。

【0141】

初期中胚葉におけるWnt経路および造血内皮におけるNotchの活性化は、確定的分化能を高めるために重要である（Kennedy et al. 2012, Sturgeon et al. 2013, Ditadi et al. 2015）。確定的分化能は、BおよびTリンパ球新生によって特徴づけられる。リンパ球系の活性は、HSCの前に出現するのに対し（Boeiers et al 2013, Yoshimoto et al. 2012, Yoshimoto et al 2011）、強いBおよびT細胞分化能は、インビトロで確定的運命の有用なマーカーのままである。網羅的遺伝子発現プロファイリングは、個体発生全体にわたる造血前駆細胞の間の分子的差異に光を当てた（McKinney-Freeman et al. 2012, Miranda-Saavedra et al. 2009）。ホメオボックス（Hox）AおよびBクラスター遺伝子のいくつかのクラスは、卵黄嚢細胞ではなく、確定的細胞に発現される（Sauvageau et al. 1994, McGrath and Palis 1997）。したがって、HoxB4の過剰発現は、マウスPSCから生着能を有する細胞を生成させるために十分である。そのうえ、HOXAクラスター遺伝子は、ヒトPSCからの造血系の決定を高める（Doulatov et al. 2013, Ramos-Mejia et al. 2015, Dou et al. 2016）。これらの進歩にかかわらず、PSCの確定的造血分化能は、限定的なままである。

10

20

30

40

【0142】

エピジェネティック調節は、発生の間に細胞同一性を維持する。分化は、ヘテロクロマチンに関連するDNAおよびヒストン残基のメチル化を含む、抑制メカニズムによる代替系列プログラムの進行性サイレンシングを特徴とする（Dambacher et al 2010）。例えば、ポリコーム抑制複合体2（PRC2）によるヒストンH3のリシン27上のトリメチル化（H3K27）は、血液発生に必要である（Majewski et al. 2008, Majewski et al. 2010, Mochizuki-Kashio et al. 2011, Hidalgo et al. 2012, Xie et al. 2014, Kinkel et al. 2015, Lee et al. 2015, Ikeda et al. 2016）。本発明者らは、原始および確定的造血プログラムは、代替的な系列運命と同様にエピジェネティックなメカニズムによって共排除されることを試験した。卵黄嚢中およびPSCの定方向分化の間に出現する原始プログラムは、マスター転写因子：SCL、RUNX1、GATA2、HOXAが確定的前駆細胞に特徴的な幹細胞およびリンパ球系遺伝子を活性化できないようにする抑制メカニズムによって強固にされている。本発明者らは、この抑制を緩和することが、インビトロのPSCおよびインビトロの初期胚性前駆細胞から確定的分化能を樹立することを見出した。本発明者らは、ポリコーム群タンパク質EZH1におけるハプロ不全減少が、インビトロでPSCからの多リンパ球系アウトプットおよび原始造血部位におけるHSC出現を可能にすることを本明細書に報告する。したがって、EZH1は、インビトロおよびインビトロにおいて確定的造血性分化能の新規な調節因子である。

【0143】

本開示の目的は、インビトロ細胞補充治療、様々な医学的疾患／状態の処置、ならびに疾患モデル化、薬物スクリーニング、および血液疾患のインビトロ研究のための、HLAがマッチするHSCが、特に免疫細胞を最終的に産生するHLAがマッチするHSCについて、不足している問題の解決を提供することである。別の目的は、対象における移植された造血関連細胞または造血由来細胞の生着および再構成を高めることである。

【0144】

本発明者らは、少なくとも3つの転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAを系列限定された骨髄球系前駆細胞に導入することによって、これらの細胞の系列分化能を逆戻りさせ

50

ることができ、その結果、結果として生じた細胞は、今や、増殖してより多くの子孫細胞を產生し、前駆細胞に自己再生し、1つよりも多い系列の細胞型にも分化する能力を有する。この段階は、リンパ球系細胞およびまた赤血球系細胞を作製するための細胞型の別の供給源を提供する。骨髓球系前駆細胞は、さらなる分化および成熟のために骨髓球系列に決定済みであり、骨髓球系列は、以下の細胞型：巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、骨髓芽球、好塩基球、好中球、好酸球、単球およびマクロファージを產生する。骨髓球系列は、TおよびBリンパ球などの免疫細胞を產生するリンパ球系列と異なる。図15を参照されたい。

【0145】

本発明者らは、以前に、系列限定された大量のCD34⁺CD45⁺骨髓球系前駆細胞がiPSCから作製可能であることを示した。(S. Doulatov, et al. 2013, *Cell Stem Cell.* 13: 459-470を参照されたく、この参考文献は、その全体で本明細書に組み入れられる)。以前に記載されたように、ヒトiPSCは、BMP4およびサイトカインの存在下で胚様体(EB)として分化した(Chadwick et al., 2003, *Blood*, 102:906-915)。簡潔には、iPSCのコロニーをかき取って、回転している非接着性の10cmプレートに入れた。EB培地は、KO-DMEM + 20% FBS (Stem Cell Technologies)、1mM L-グルタミン、1mM NEA A、ペニシリン/ストレプトマイシン、0.1mM -メルカプトエタノール、200 μg/ml h-トランスフェリン、および50 μg/ml アスコルビン酸であった。24時間後に、EBを重力によって沈降させることにより培地を交換し、成長因子：50ng/ml BMP4 (R&D Systems)、300ng/ml SCF、300ng/ml FLT3、50ng/ml G-CSF、20ng/ml IL-6、10ng/ml IL-3 (全てPeprotech)を補充したEB培地に置き換えた。培地を5日目および10日に交換した。コラゲナーゼB (Roche)で2時間消化することによって14日目にEBを解離させ、続いて酵素不含解離緩衝液 (Gibco)で処理し、80 μmフィルターを通して濾過した。解離したEBは、10% DMSO、40% FBS凍結溶液中で凍結させることができる。

【0146】

EBは、血清の存在下、インビトロで產生および培養された多能性幹細胞の三次元凝集物である。次に、EBは、原始造血前駆細胞型と確定的造血前駆細胞型との混合物を生成するように進む。原始前駆細胞は、胚発生の最初期段階で自然にインビオで生じる細胞と同等と見なされ、一方で、胚性集団は、成熟のその後の段階で成体造血に典型的な細胞と同様に挙動する確定的前駆細胞を生み出す。系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髓球系前駆細胞は、10日目に出現し、14日目まで拡大し、次に、EB中に凝集した細胞の解離後にCD34⁺CD45⁺表面マーカーによる細胞ソーティングによって単離される。これらの骨髓球系前駆細胞は、強い骨髓球系コロニー形成活性：マクロファージコロニー (CFU-M)、および顆粒球コロニー (CFU-G) を示したが、わずかな赤血球系コロニー (CFU-EおよびBFU-E) または混合コロニー：顆粒球/赤血球/マクロファージ/巨核球コロニー (多系列骨髓球系前駆細胞：CFU-GEMM)、および顆粒球/マクロファージコロニー (CFU-GM) しか產生しない。これらの系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髓球系前駆細胞は、血清の不在下で培養中に増殖または自己再生する能力を有しなかった。無血清培地中のこれらのCD34⁺CD45⁺前駆細胞は、培養7日後にCD34⁻細胞に完全に分化し、これは、クローン形成能の欠如と一致する。

【0147】

大量產生された系列限定CD34⁺CD45⁺骨髓球系前駆細胞から、本発明者らは、これらの細胞に3つの転写因子：ERG、HOXA9およびRORA (本明細書においてEAR因子と省略) を発現させることによってこれらの細胞の骨髓球系拘束系列を逆戻りさせ、細胞増殖および自己複製能を誘導することが可能であったと示した。(S. Doulatov, et al. 2013, *Cell Stem Cell.* 13: 459-470を参照されたく、この参考文献は、その全体で本明細書に組み入れられる)。簡潔には、3つの転写因子：ERG、HOXA9およびRORAをコードするオープンリーディングフレームを、LR Clonase (INVITROGEN (商標)) を使用してレンチウイルスベクターにクローニングした。2つのレンチウイルスベクター：pSMAL-GFP (構成性) およびpINDUCER-21 (ドキシサイクリン調節型) を使用した (Meerbrey et al

10

20

30

40

50

., 2011, 108:3665-3670、この参考文献は、その全体で本明細書に組み入れられる)。第三世代パッケージングプラスミドを293T-17細胞(ATCC)にトランスフェクトすることによってレンチウイルス粒子を產生した。トランスフェクションの12および36時間後にウイルスを収集し、23,000rpmで2時間の超遠心分離により濃縮した。293T細胞上の系列希釈により構築物を力価検定した。ソーティングしたCD34⁺CD45⁺前駆細胞を、フィプロネクチン被覆(10ug/cm²)96ウェルプレート上に細胞密度2~5×10⁴個/ウェルで播種した。感染培地は、300ng/ml SCF、300ng/ml FLT3、50ng/ml G-CSF、20ng/ml IL-6、10ng/ml IL-3(全てPeprotech)を有するIMDM+20%BIT(StemCell Technologies)、1mM L-グルタミン、および0.1mM P-メルカプトエタノールであった。レンチウイルス感染を合計体積150ulで実施した。遺伝子導入後、50ng/ml SCF、50ng/ml FLT3、50ng/ml TPO、50ng/ml IL6、および10ng/ml IL-3(全てR&D Systems)を補充した感染培地中で前駆細胞を懸濁培養した。誘導性構築物を用いた全ての実験(全ての移植実験を含む)において、感染培地をStemSpan SFEM(StemCell Technologies)で置き換えた。Doxを2ng/ml(Sigma)で添加した。培養培地は、上記と同じであった。培養物を細胞密度<1×10⁶個/mlで維持し、培地を3~4日毎に交換した。単一のレンチウイルスシステムは、また、3つの転写因子:ERG、HOXA9およびRORAをコードするオープンリーディングフレームを選択された骨髄球系前駆細胞に導入するために使用することができる。単一のレンチウイルス発現システムおよびベクターカセットは、当技術分野において公知である。例えば、その内容がその全体で参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,865,467号に教示される通りである。あるいは、遺伝子導入は、エピソームベクターにより行うことができる。エピソーム発現ベクターシステムは、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,624,820号;同第5,674,703号;同第6,339,065号;同第6,410,314号;同第6,479,279号;同第6,797,494号;同第6,808,923号;同第7,294,505号;同第7,790,446号;同第8,703,481号;同第8,187,836号;および同第9,068,200号に教示される通りであり、その内容は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0148】

結果として生じたトランスフェクトされた系列限定CD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞は、無血清培地中で7日間培養後にCD34⁺細胞集団を產生し、このCD34⁺細胞集団は、培養7~14日から拡大し続けた。無血清培地中の細胞集団の產生は、多系列造血前駆細胞の自己複製能の回復を示す。CD34⁺細胞集団のこの拡大後の集団の中に、CD38陰性または低発現でもあるが、CD90⁺およびCD49⁺である細胞が含まれる。臍帯血および造血幹細胞に見出される複能性造血前駆細胞が、CD34⁺/CD38⁻であることは、周知である。したがって、EARを、系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトすることによって、無血清培地中で増殖および自己再生することができる新しい細胞集団は、EARトランスフェクションのために使用された元の系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞の代わりに多系列複能性造血前駆細胞の特徴である細胞表面マーカーも示す。

【0149】

したがって、本発明者らは、EARトランスフェクションにより系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞から多系列複能性CD34⁺/CD38^{10/-}造血前駆細胞を產生することができた。

【0150】

一態様では、系列限定されたCD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞由來の改変骨髄球系前駆細胞であって、増大したリンパ球系列分化能を含む逆戻り系列を有する改変骨髄球系前駆細胞が、本明細書に提供される。一態様では、増大したリンパ球系列分化能は、以前のEARトランスフェクションと比較して少なくとも5%である。他の態様では、増大したリンパ球系列分化能は、EARトランスフェクション前と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれよりも大きい。

10

20

30

40

50

【0151】

逆戻り系列の造血前駆細胞は、骨髄球系および赤血球系列分化能を有し、骨髄-赤血球系コロニーを生み出す。そのうえ、本発明者らは、前駆細胞に2つの追加的な転写因子：SOX4およびMYBを発現させることによって、逆戻り系列の造血前駆細胞のインビオ生着が高まり、逆戻り系列のCD34⁺CD45⁺造血前駆細胞から混合骨髄-赤血球系コロニーの数に増加があったことを見出した。一態様では、高まったインビオ生着は、SOX4およびMYBからなる群より選択される任意の追加的な転写因子の不在下と比較して少なくとも0.1%である。他の態様では、高まったインビオ生着は、SOX4およびMYBからなる群より選択される任意の追加的な転写因子の不在下と比較して、少なくとも0.2%、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれよりも大きい。

10

【0152】

加えて、本発明者らは、別の2つの転写因子：DACH1およびNFIAがリンパ球系分化能を高めたことも見出した。一態様では、高まったインビオリンパ球系分化能は、DACH1およびNFIAからなる群より選択される任意の追加的な転写因子の不在下と比較して、少なくとも0.1%である。他の態様では、高まったインビオリンパ球系分化能は、DACH1およびNFIAからなる群より選択される任意の追加的な転写因子の不在下と比較して、少なくとも0.2%、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれよりも大きい。

20

【0153】

これらの逆戻り系列の複能性CD34⁺/CD38^{lo/-}造血前駆細胞におけるヒストンメチルトランスフェラーゼをさらに阻害することによって、本発明者らは、逆戻り系列の複能性造血前駆細胞をOP9-DL1/4細胞と共に培養することによってこれらの細胞を免疫細胞に分化させることができた。OP9-DL1/4細胞は、Tリンパ球へのHSCの分化を促進することが知られている因子であるNotchリガンドを発現および分泌する。Notchリガンドは、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたCD34⁺/CD38^{lo/-}造血前駆細胞においてNotchシグナル伝達経路を活性化する。通常、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の不在下で、逆戻り系列の複能性CD34⁺/CD38^{lo/-}造血前駆細胞は、OP9-DL1/4細胞と共に培養したときにT細胞分化能を有するコロニーまたは細胞を約0~5%産生する。対照的に、EZ H1をノックダウンすると（例えば、siRNAまたはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤を使用することによる）、T細胞分化能の出現率は、少なくとも5倍の増加の25~30%に增加了。図2Aおよび2Bを参照されたい。いくつかの態様では、本明細書において参照される用語「OP9」細胞は、Notchシグナル伝達経路を活性化するNotchリガンドを分泌するOP9-DL1またはOL9-DL4細胞を表す。

30

【0154】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の不在下と比較して、T細胞分化能の出現率増大を示す。一態様では、T細胞分化能の出現率増大は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の不在下の前と比較して、少なくとも5%である。他の態様では、T細胞分化能の出現率増大は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の不在下の前と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれよりも大きい。

40

【0155】

そのうえ、2つの他の転写因子：SOX4およびMYBのインビオ発現をこれらの細胞にさらに組み込むことによって、これらの細胞のインビオ生着および再構成は、高まる。本発

50

明者らは、2つの他の転写因子：DACH1およびNFIAのインビオ発現をこれらの細胞にさらに組み込むことによって、これらの細胞のリンパ球系分化能が高まることも見出した。図17Fを参照されたい。

【0156】

ヒト多能性幹細胞（hPSC）からの確定的リンパ球系発生の遺伝子調節ネットワークを並行して理解するために、本発明者らは、造血幹細胞（HSC）に高発現されることが知られている追加的な転写因子をスクリーニングした。本発明者らは、HOXA9、ERG、RORA、SOX4およびMYBに加えて23個の追加的な転写因子（TF）を選択し、これらは、HSC特異的であり、HOXA9、ERG、およびRORAによって誘導されず、胚様体（EB）から分化したCD34⁺細胞で下方調節された。28個の転写因子のライブラリーをCD34⁺ EBに導入し、EBをブレーティングし、コロニー形成アッセイに使用した。PCRによるコロニーの組み込み部位の分析により、13個のTFの濃縮が明らかとなった。これらのライブラリーを前向きに試験するために、CD34⁺ EBに13個のTFサブセットまたは28個のTFライブラリーを形質導入し、細胞をストローマ共培養物上にブレーティングして、TまたはB細胞分化を誘導した。13個のTFライブラリーは、CD34⁺ EBから多リンパ球系分化能を誘導するためには十分であった。リンパ球系分化能に必要なTFを同定するために、1回に1つのTFを13個のTFカクテルから除去し、形質導入後のEBにTおよびB細胞分化を行った。本発明者らは、HOXA9、ERG、RORAと一緒に、NFIAおよびDACH1を追加することが、hPSCからのTおよびB細胞発生に必要であったことを見出した。

【0157】

NFI遺伝子は、遺伝子転写の正、および調節因子の両方として機能する。NFIAは、赤血球／顆粒球系列スイッチを調節することが示された（Fazi et al 2005, Starnes et al 2009）。DACH1は、骨髄球系細胞の細胞周期進行を調節し、コロニー形成（colonogenic）活性を維持し、骨髄球系前駆細胞の分化を遮断する（Lee et al 2012, Lee et al 2012）。しかし、造血幹細胞および確定的リンパ球系発生におけるそれらの役割は、以前に調査されていない。ここで、本発明者らは、これらのTFがhPSCからのリンパ球系発生に必要な調節ネットワークの部分であることを実証した。

【0158】

本開示のプロトコールの利点は、本方法が、全て患者の身体から容易に採取することができる多様な種類の細胞供給源から、幹細胞、造血前駆細胞、ならびに成熟および分化細胞から、所望の免疫細胞または他の種類の造血細胞（すなわち複能性HSCから分化した細胞、図15参照）の半永久的大量生産を可能にすることである。

【0159】

産生された操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害された操作CD34^{+/CD38^{10/-}}造血前駆細胞を、免疫システム再構成療法（例えば、骨髄アブレーション後）または免疫療法（例えば、がん療法または自己免疫疾患における）などの様々な医学的処置のために患者に移植することができる。追加的な一利点は、供給源細胞のドナーおよび操作免疫細胞のレシピエントが同一人物ならば、産生される操作免疫細胞が、レシピエントと同一のHLAを有し、このことが移植後のホスト-移植片免疫拒絶を回避することである。供給源細胞のドナー人物とHLAが同種であるレシピエント患者にとって、ホスト-移植片免疫拒絶が大きく減少する。

【0160】

産生された操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害された操作CD34^{+/CD38⁻}造血前駆細胞を、将来必要になるまで凍結保存することもできる。

【0161】

現在のところ、骨髄移植は、多様な血液障害のための最も定評のある細胞補充治療である。骨髄移植の機能単位は、複雑な細胞階層の頂点にあり、生涯にわたり血液発生を補充する造血幹細胞（HSC）である¹。HLAがマッチするHSCの不足は、移植、疾患モデル化および薬物スクリーニングを実施する能力を大きく制限する。このように、多くの研究が、代替的な供給源からHSCを生成させることを目的とした。人工多能性幹細胞（iPSC）へ

10

20

30

40

50

のリプログラミングにおける利点²は、疾患モデル化、薬物スクリーニングおよび細胞療法のための有望な供給源である多彩な患者特異的多能性細胞へのアクセスを提供した。しかし、ヒト多能性幹細胞 (hPSC) から、生着可能な造血幹細胞および前駆細胞が派生不可能なことは、インビトロアッセイへの血液疾患の特徴づけを限定した。定方向分化によるHSCの生成は、分かりにくいままであり、この問題に対する新規なアプローチの必要がある。

【 0 1 6 2 】

hPSCからHSCを生成させるアプローチは、HSCをその個体発生前駆細胞から特異化することである。今や、HSCは、大動脈-性腺-中腎 (AGM) において造血内皮 (HE)³および他の解剖学的部位における動脈内皮を起源とすると広く受け入れられている。hPSCからのHEの定方向分化に関する最近の研究は、原始または確定的集団の出現を制御するシグナル伝達経路のいくつかへの貴重な洞察を提供した^{4,5}；しかし、内皮-造血移行は、ヒトの造血発生において不完全な理解のままであり、合理的な介入を意欲のそぞるものにしている。

10

【 0 1 6 3 】

HSCをその前駆HEから特異化することの代替は、短寿命の前駆細胞から開始して、前駆細胞を幹細胞状態に変換するという、「再特異化」として定義される戦略である⁶。再特異化は、定方向分化を転写ベースのリプログラミングと組み合わせて、HSCの運命を再確立する。ヒト初代HSCと前駆細胞との間の分子的差異は、遺伝子発現プロファイリングによって十分に特徴づけられており^{7,8}、幹細胞遺伝子を前駆細胞に導入し戻す合理的アプローチを提供している。本発明者らは、hPSC由来の原始前駆細胞におけるHSC転写因子ネットワークを回復することによって移植可能なHSCを得ることができた。このアプローチのための原理証明は、HoxB4がマウス原始前駆細胞においてHSC特性を回復できることを実証している精液実験である⁹。

20

【 0 1 6 4 】

ヒトシステムについて^{10,11}、種特異差に起因して、ヒト原始前駆細胞におけるhHSC特性を回復するために異なるセットの因子が必要であった。本発明者らは、hPSC用の転写因子の組み合わせを作った。本発明者らは、5つの転写因子：ERG、HOXA9、RORA、SOX4、およびMYB (5Fと略す) がhPSC由来骨髄球系拘束前駆細胞を可逆的に不死化された多系列造血前駆細胞に変換できると以前に報告した⁶。5Fのドキシサイクリン (Dox) 調節型条件付き誘導は、未熟CD34⁺CD38⁻の自己再生状態を拡大し、維持する一方で、Doxの中止で分化が開始する。未熟CD34⁺CD38⁻自己再生状態は、hHSCの性質である。これらの細胞は、CD34-5F細胞と略される。CD34-5F細胞は、免疫欠損マウスに移植後に短期生着を引き起こし、赤血球系前駆細胞は、インビボで成熟およびヘモグロビンスイッチを受ける。このシステムは、それがインビトロおよびインビボスクリーニングのために多数の生着可能な疾患細胞を生成する能力に起因して、血液障害をモデル化するための有用なプラットフォームを提示する。

30

【 0 1 6 5 】

体細胞リプログラミングによるiPSCの生成は、全体的なエピジェネティックリモデリングを伴い、クロマチン修飾酵素が、リプログラミングの障壁または促進因子として特徴づけられている^{12,13,14}。造血システム内で、HSCから成熟子孫への個体発生および分化の間に血液発生を媒介する多くのエピジェネティックな変化がある。HSCから分化済み子孫への進行は、系列特異的遺伝子の活性化または抑制をもたらす遺伝子発現プログラムの協調制御を伴う。図5を参照されたい。抗原受容体を発現する成熟リンパ球の形成をもたらす事象は、主にクロマチンアクセシビリティーの制御により遺伝子発現およびDNA組み換えの両方の調節を伴う¹⁵。HSCの状態は、多数の転写因子およびエピジェネティック修飾因子によって制御される。本発明者らは、スクリーニング戦略を使用して、HSCの運命を調節する追加的な因子を見出した。本発明者らは、HSC運命の潜在的な負の調節因子を抑制するshRNAライブラリーを使用して、転写因子およびエピジェネティック修飾因子をスクリーニングした。

40

【 0 1 6 6 】

50

したがって、本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロで導入することによって生成される。一態様では、ベクターは、本明細書記載の外因性遺伝子コーディングコピーのいずれかを骨髄球系前駆細胞に導入するための輸送媒体として使用される。例えば、1つまたは複数のベクターを骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトすることにより、その際、ベクターは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、トランスフェクトされた細胞における転写因子のインビオ発現のためにひとまとめに担持する。例えば、骨髄球系前駆細胞を1つまたは複数のベクターと接触させることにより、その際、ベクターは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、接触した細胞における転写因子のインビオ発現のためにひとまとめに担持する。例えば、骨髄球系前駆細胞を1つまたは複数の核酸と接触させることにより、その際、核酸は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、接触した細胞における転写因子のインビオ発現のためにひとまとめに担持する。一態様では、単一のベクターが、3つの転写因子の全て、ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞に導入するための輸送媒体として使用される。一態様では、1つまたは複数のエピソームベクターが、3つの転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞に導入するための輸送媒体として使用される。

【0167】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、骨髄球系前駆細胞集団を1つまたは複数のベクターと接触させることによって生成し、その際、ベクターは、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、接触した細胞における因子のインビオ発現のためにひとまとめに担持し、トランスフェクトされた転写因子は、接触した細胞においてインビオ発現される。接触は、インビトロまたはエクスピボである。一態様では、単一のベクターが、3つの転写因子の全て：ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞に導入するための輸送媒体として使用される。一態様では、1つまたは複数のエピソームベクターが、3つの転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞に導入するための輸送媒体として使用される。

【0168】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、骨髄球系前駆細胞を1つまたは複数の核酸と接触させることによって生成し、その際、核酸は、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを、接触した細胞における転写因子のインビオ発現のためにひとまとめに含む。接触は、インビトロまたはエクスピボである。

【0169】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、骨髄球系前駆細胞を本明細書記載の任意のベクター、核酸、またはベクターもしくは核酸を含む組成物と接触させることは、インビトロまたはエクスピボで起こる。

【0170】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、接触させることまたは導入は、少なくとも1回繰り返される。

【0171】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、方法は、SOX4またはMYBまたはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトすることをさらに含み、その際、トランスフェクトされた転写因子は、トランスフェクトされた細胞においてインビオで発現される。トランスフェクトすることは、インビトロまたはエクスピボである。

【0172】

10

20

30

40

50

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、方法は、DACH1またはNFIAまたはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトすることをさらに含み、その際、トランスフェクトされた転写因子は、トランスフェクトされた細胞においてインビトで発現される。トランスフェクトすることは、インビトロまたはエクスピトである。

【0173】

転写因子

ERG (ETS関連遺伝子)は、がんにおいて典型的には変異しているタンパク質をコードしていることを意味するがん遺伝子である。ERGは、ETS (赤芽球形質転換特異) ファミリーの転写因子のメンバーである。ERG遺伝子は、転写調節因子として機能する、ERGとも呼ばれるタンパク質をコードする。ETSファミリーにおける遺伝子は、胚発生、細胞増殖、分化、血管新生、炎症、およびアポトーシスを調節する。ERG遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 3446 ; Entrez Gene : 2078 ; Ensembl : ENSG0000157554 ; OMIM : 165080 ; UniProtKB : P11308 ; EMBL : AY204741 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : AAP41719.1 ; ならびにGENBANK : AY204742 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : AAP41720.1。

10

【0174】

ホメオボックスタンパク質Hox-A9は、ヒトにおいてHOXA9遺伝子によってコードされるタンパク質である。脊椎動物において、ホメオボックス遺伝子クラスの転写因子をコードする遺伝子は、4つの別々の染色体上のA、B、C、およびDという名のクラスター中に見出される。これらのタンパク質の発現は、胚発生の間に空間および時間的に調節される。Hox-A9は、第7染色体上のAクラスターの部分であり、遺伝子発現、形態形成、および分化を調節し得るDNA結合性転写因子をコードする。HOXA9遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 5109 ; Entrez Gene : 3205 ; Ensembl : ENSG00000078399 ; OMIM : 142956 ; UniProtKB : P31269 ; EMBL : BT006990 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : AAP35636.1 ; ならびにGENBANK : AC004080ゲノムDNA。

20

【0175】

NR1F1 (核内受容体サブファミリー1グループFメンバー1) またはRORAとしても知られているRAR関連オーファン受容体アルファ (ROR α) は、ヒトにおいてRORA遺伝子によりコードされる核内受容体である。ROR α は、概日リズムに関わるいくつかの遺伝子の転写調節に関与する。この核内受容体は、モノマーとしてのDNAを、短鎖A-Tリッチ配列により先行する单一のコアモチーフハーフサイト5'-AGGTCA-3'を含有するROR応答エレメント (RORE) と結合させる。これは、胚発生、細胞分化、免疫、概日リズムのみならず、脂質、ステロイド、生体異物およびグルコース代謝の主要な調節因子である。これは、固有の転写活性を有し、それぞれ転写活性を強化または抑制するアゴニスト (25-ヒドロキシコレステロール) またはインバースアゴニスト (7-酸化ステロール) として作用するオキシステロールのようないくつかの天然リガンドを有すると考えられている。これは、組織、時間およびプロモーターの状況に依存して、別個の組み合わせの補因子を標的遺伝子調節領域に動員して、それらの転写発現をモジュレートすることに関与する。これは、OPN1SW、OPN1SMおよびARR3を含む光受容器発生ならびにMYOD1を用いた骨格筋発生に関与する遺伝子を調節する。これは、適切な小脳発生に必要であり、SHH遺伝子発現を調節して、とりわけ、顆粒細胞の増殖およびカルシウム媒介シグナル伝達に関与する遺伝子の発現を誘導する。これは、CLOCK、ARNTL/BMAL1、NPAS2およびCRY1を含むいくつかの時計遺伝子の概日発現を調節する。これは、ARNTL/BMAL1、CRY1およびNR1D1自体などのいくつかの時計遺伝子上のそれらの共通のDNA応答エレメントとの結合をNR1D1と競合し、結果として時計遺伝子の発現のNR1D1媒介抑制またはRORA媒介活性化を生じ、時計遺伝子の発現の概日パターンをもたらす。したがって、これは、時計の期間および安定性に影響する。これは、アポリポタンパク質APOA1、APOA5、APOC3およびPPARGなどの、脂質代謝に関する遺伝子も調節する。肝臓において、これは、脂質、ステロイドおよび生体異物の代謝に関与するI期およびII期タンパク質、例えばCYP7B

30

40

50

1およびSULT2A1をコードする遺伝子の発現の正または負のモジュレーターとして特異的で、RORCと重複する機能を有する。これは、これらの遺伝子のいくつかの律動的発現を誘導する。加えて、コレステロール代謝に関する遺伝子の調節のためにNR1H2およびNR1H3と機能的に相互作用する。これは、G6PCおよびPCK1のモジュレーションにより肝臓グルコース代謝の調節にも関与する。脂肪組織において、これは、おそらく二重メカニズムにより作用する脂肪細胞分化の負の調節因子として役割を果たす。これは、直接相互作用によりCEBPB依存性脂肪生成、およびDNA結合の競合によりPPARG依存性脂肪生成を抑制し得る。IL6およびTGFBの下流ならびにRORCアイソフォーム2と相乗的に未決定C10
D4⁺ヘルパーT(T(H))細胞のT(H)17細胞への系列特異化に意味づけられており、T(H)1プログラムと拮抗する。これは、おそらく、IL17-IL17F遺伝子座における不可欠なエンハンサーである保存非コード配列2(CNS2)と結合することによってT(H)上でのIL17およびIL17Fの発現を調節する。これは、HIF1Aの転写活性と相互作用し、それを活性化することによって低酸素シグナル伝達に関与する。これは、細胞ストレスに応答して細胞成長を阻害し得る。RORAは、CHUKの発現を誘導し、NF-カッパ-Bシグナル伝達を阻害することによって抗炎症の役割を発揮し得る。RORA遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC：10258；Entrez Gene：6095；Ensembl：ENSG00000069667；OMIM：600825；UniProtKB：P35398；EMBL：U04899 mRNAおよび対応するmRNA：AAA62660.1；GENBANK：L14611 mRNAおよび対応するmRNA翻訳：AAA02963.1。

【0176】

HOXおよびETSファミリー転写因子：HOXA9およびERGは、hPSCから分化した造血前駆細胞における自己複製および多系列分化能の誘導因子である。RORAは、造血前駆細胞の静止状態の維持に役割を果たす核内受容体である。SOX4およびMYBの追加は、このネットワークをモジュレートして、骨髄球系および赤血球系のインビオ生着を可能にする。

【0177】

OCT4、SOX2、KLF4およびc-MYCは、マウス線維芽細胞をiPSCにリプログラムすると同定された本来の4つの転写因子である。これらと同じ4つの因子が、ヒトiPSCを生成するためにも十分であった。OCT3/4およびSOX2は、多能性関連遺伝子の発現を調節することによって多能性ネットワークのコア転写因子として機能する。クルッペル様因子4(KLF4)は、マウスES細胞におけるLIF-STAT3シグナル伝達の下流の標的であり、自己複製を調節する。ヒトiPSCは、4つの代替的な因子を使用して生成させることもでき；OCT4およびSOX2が必要であるが、KLF4およびc-MYCは、ES細胞および初期胚の両方における多能性の維持に重要なホメオボックスタンパク質であるNANOG、ならびにRNA結合タンパク質であるLIN28により置き換えることもできる。OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28リプログラミング因子の組み合わせは、ヒトiPSCを生成するためにも十分であると報告されている。

【0178】

転写因子SOX-4(SOX4)。この無インtron遺伝子は、胚発生の調節および細胞運命の決定に関するSOX(SRY関連HMGボックス)ファミリー転写因子のメンバーをコードする。コードされるタンパク質は、シンデカン結合タンパク質(シンテニン)などの他のタンパク質とタンパク質複合体を形成した後に転写調節因子として作用する。このタンパク質は、細胞死をもたらすアポトーシス経路および腫瘍発生に機能する場合があり、骨発生における副甲状腺ホルモン(PTH)およびPTH関連タンパク質(PTHrP)の下流の効果を媒介する場合がある。ホモサピエンス(Homo sapiens)(ヒト)SOX4遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC：11200；Entrez Gene：6659；Ensembl：ENSG0000124766；OMIM：184430；UniProtKB：Q06945；EMBL：BC072668 mRNAおよび対応するmRNA翻訳：AAH72668.1；GENBANK：X65661 mRNAおよび対応するmRNA翻訳：CAA46612.1。

【0179】

MYBがん原遺伝子、転写因子(MYB)。この遺伝子は、転写調節因子として機能する、

10

20

30

40

50

3つのHTH DNA結合ドメインを有するタンパク質をコードする。このタンパク質は、造血の調節に不可欠な役割を果たす。この遺伝子は、白血病およびリンパ腫において異常発現される、または再配列される、または転座を受ける場合があり、がん遺伝子であると考えられる。MYB遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 7545 ; Entrez Gene : 4602 ; Ensembl : ENSG00000118513 ; OMIM : 189990 ; UniProtKB : P10242 ; EMBL : AJ606319 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : CAE55170.1 ; GENBANK : AJ606320 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : CAE55171.1。

【 0 1 8 0 】

NFI遺伝子は、遺伝子転写の正および調節因子の両方として機能する。核内因子1A型 (NFIA) は、赤血球 / 顆粒球系列スイッチを調節することが示されている (Fazi et al 2005, Starnes et al 2009)。NFIAは、ウイルスおよび細胞プロモーターならびにアデノウイルス2型の複製起点に存在する回文配列5'-TTGGCNNNNNGCAA-3'を認識し、それと結合することが示されている。NFIAタンパク質は、転写および複製を個別に活性化することができる。NFIA遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 7784 ; Entrez Gene : 4774 ; Ensembl : ENSG00000162599 ; OMIM : 600727 ; UniProtKB : Q12857 ; EMBL : AK299579 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : BAG61515.1 ; GENBANK : AC092784ゲノムDNA。

【 0 1 8 1 】

ダックスフントファミリー転写因子1 (DACH1)。この遺伝子は、他のDNA結合転写因子と関連して発生の間に遺伝子発現および細胞運命の決定を調節するクロマチン関連タンパク質をコードする。タンパク質は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) からヒトまで高度に保存されているSKIドメインを含有する。DACH1は、骨髄球系細胞の細胞周期の進行を調節し、コロニー形成活性を維持し、骨髄球系前駆細胞の分化を遮断する (Lee et al 2012, Lee et al 2012)。転写因子は、器官形成の調節に関与し、SIX1、SIX6およびおそらくSIX5の調節因子であり得る。SIX1による筋芽細胞における前駆細胞増殖の共抑制は、SIX1-DACH1複合体へのEYA3の動員により共活性化にスイッチされる。転写活性化は、CREBBPの会合も伴うようにも見える。DACH1は、p27Kip1プロモーターを含むサイクリン依存性キナーゼ阻害剤を直接抑制することによって、増殖調節におけるSIX6の共リプレッサーとしても作用する。さらに、DACH1は、SMAD4およびNCOR1との相互作用によりTGF-ベータシグナル伝達を阻害し、そのDACHボックス-Nドメインを介してクロマチンDNAと結合する。しかし、造血幹細胞および確定的リンパ球系発生に果たすそれらの役割は、以前に調査されていない。DACH1遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 266 ; Entrez Gene : 1602 ; Ensembl : ENSG00000276644 ; OMIM : 603803 ; UniProtKB : Q9UI36 ; EMBL : AF356492 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : AAL08487.1。

【 0 1 8 2 】

記載のおよび所望の転写因子をコードするcDNAは、細胞におけるインビオ発現のために当技術分野において公知の方法によって発現ベクター中にクローニングすることができる。発現ベクターは、構成性または誘導性ベクターであることができる。転写因子についてのタンパク質およびDNA情報は、National Institute of HealthのGenBank (商標) データベース、Protein knowledgebaseのUniProt、およびWeizmann Institute for ScienceのGeneCardデータベースなどの公的に利用可能なデータベースに見出すことができる。cDNAクローンまたはcDNAを担持するプラスミドは、BioCat GmbHから購入することができ、発現用cDNAを担持するレンチウイルスは、また、Applied Biological Materials (ABM) Incから購入することができる。

【 0 1 8 3 】

したがって、一態様では、転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを有する改変骨髄球系列前駆細胞の集団が、本明細書に提供される。一態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆

10

20

30

40

50

細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性遺伝子コーディングコピーを任意でc-MYCもしくはnanogおよびLIN28と共に、またはOCT4、SOX2、NANOG、およびLIN28からなる4つのリプログラミング因子についての外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、無血清培地中で、培養拡大することができ、すなわち、改変骨髄球系列前駆細胞は、無血清培地中で有糸分裂および自己複製を受ける。

【0184】

したがって、一態様では、免疫細胞などの血液細胞の產生における使用のために、移植療法およびがん免疫療法などの医学的処置のために、または本明細書記載のインビトロ研究目的で、転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの外因性遺伝子コーディングコピーを有する改変骨髄球系列前駆細胞の集団が、本明細書に提供される。一態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、リプログラミング因子OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性遺伝子コーディングコピーを任意でc-MYCもしくはnanogおよびLIN28と共に、またはOCT4、SOX2、NANOG、およびLIN28からなる4つのリプログラミング因子についての外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。別の態様では、改変骨髄球系列前駆細胞は、無血清培地中で培養拡大することができ、すなわち、改変骨髄球系列前駆細胞は無血清培地中で有糸分裂および自己複製を受ける。

10

【0185】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、多能性幹細胞集団から得られた胚様体（EB）由来の前駆細胞である。一態様では、多能性幹細胞は、iPSCである。一態様では、iPSCは、成熟分化体細胞由来である。

【0186】

したがって、記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、方法は、骨髄球系列前駆細胞を生成させるための多能性幹細胞（PSC）集団を提供することをさらに含む。一態様では、PSCは、ヒト細胞である。

30

【0187】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、方法は、多能性幹細胞（PSC）集団から骨髄球系列前駆細胞を産生させることをさらに含む。一態様では、PSCは、ヒト細胞である。

【0188】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、最初に多能性幹細胞集団を骨形成タンパク質4（BMP4）、幹細胞因子（SCF）、Fms様チロシンキナーゼ3（FLT3/CD135）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF/CSF3）、IL-6、およびIL-3中で約10～21日間インビトロ培養して、多能性幹細胞からEBを形成させること、細胞のEB凝集物を単一細胞に解離させること、ならびに解離した細胞からCD34⁺およびCD45⁺細胞の正の選択を行うことによって產生される。正の選択をされたCD34⁺およびCD45⁺細胞は、骨髄球系列前駆細胞である。一態様では、PSCは、少なくとも10日間培養される。他の態様では、PSCは、数日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、少なくとも20日間または少なくとも21日間培養される。一態様では、トランスフェクトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、約7～21日間培養される。他の態様では、PSCは、約10～20日間、約10～18日間、約10～16日間、約10～14日間、約10～12日間、約11～21日間、11～20日間、約11～18日間、約11～16日間、約11～14日間、約11～13日間、約11～12日間、約12～21日間、約12～20日間、約12～18日間、約12～16日間、約12～14日間、約13～21日間、1

40

50

3～20日間、約12～18日間、約13～16日間、約14～20日間、約14～18日間、約14～16日間、10～19日間、約10～17日間、約10～15日間、約10～13日間、約10～11日間、約11～19日間、11～19日間、約11～17日間、約11～15日間、約12～19日間、約12～17日間、約12～15日間、12～13日間、約14～21日間、約13～18日間、約13～17日間、約13～15日間、約13～14日間、約15～21日間、約15～20日間、約15～19日間、約15～17日間、約15～16日間、約16～21日間、約16～20日間、約16～19日間、約16～18日間、約16～17日間、約17～21日間、約17～20日間、約17～19日間、約17～18日間、約18～21日間、約18～20日間、約18～19日間、約19～21日間、約19～20日間、および約20～21日間培養される。

【0189】

10

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、CD34⁺およびCD45⁺である。本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の他の態様では、骨髄球系列前駆細胞は、さらに、CD14陽性、またはCD15陽性、またはCD11b陽性またはこれらの細胞表面CD抗原の2もしくは3つの組み合わせについて陽性である。

【0190】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、非リンパ球系列に決定済みである。一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、主として（コロニー形成アッセイにおける合計CFUの>80%のCFU）以下の培養コロニー形成活性：CFU-MおよびCFU-Gコロニーを示す。他の態様では、骨髄球系列前駆細胞は、コロニー形成アッセイにおける合計CFUのうち、82%よりも大きい、84%よりも大きい、86%よりも大きい、88%よりも大きい、90%よりも大きい、92%よりも大きい、95%よりも大きい、97%よりも大きい、または99%よりも大きいCFU-MおよびCFU-Gコロニーを產生する。一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、少数のCFU-E、BFU-E、CFU-GEMM、およびCFU-GMコロニー（コロニー形成アッセイにおける合計CFUの<20%）しか產生しない。一態様では、骨髄球系列前駆細胞は、コロニー形成アッセイにおける合計CFUのうち、18%未満、16%未満、14%未満、12%未満、10%未満、8%未満、6%未満、4%未満または2%未満のCFU-E、BFU-E、CFU-GEMM、およびCFU-GMコロニーを產生する。インビトロコロニー形成アッセイは、当技術分野において公知の任意の方法により行うことができる。例えば、Tashiro K, et al. 2012, Stem Cell Res. 8:300-311、米国特許第6103522号、同第6419918号、同第683854号、同第7883861号、同第7989178号、同第9273285号に教示される通りである。これらの参考文献は、その全体で本明細書に組み入れられる。例えば、Cell Biolabs Inc.からの造血CFCアッセイおよびR&D Systemsからのメチルセルロースベース培地を使用するヒトコロニー形成細胞（CFC）アッセイなどの市販のキットを使用する。

20

【0191】

30

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の別の態様では、骨髄球系列前駆細胞は、末梢血、臍帯血、絨毛膜絨毛、羊水、胎盤血、または骨髄から収集または採取される。CD34⁺およびCD45⁺細胞である骨髄球系列前駆細胞は、これらの供給源から正の選択をされる。

【0192】

40

末梢血前駆細胞（PBPC）は、採取が技術的に容易で、生着に必要な時間がより短いせいで、同種および自己移植のための造血前駆細胞の好ましい供給源になった。伝統的に、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が、より多くのPBPCおよび骨髄からの造血前駆細胞の放出を刺激するために使用してきた。G-CSFを使用するレジメンは、通常健康なドナーからの十分な数のPBPCの採取に成功するものの、5%～10%は幹細胞の動員が不十分であり、複数の大量アフェレーシスまたは骨髄収集が必要になる場合がある。

【0193】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、多能性幹細胞集団は、人工多能性幹細胞（iPSC）または胚性幹細胞（ESC）である。iPSCおよびESCは、当技術分野において公知の任意の方法によって產生させることができる。iPS細胞の產生方法は

50

、当技術分野において、例えば、米国特許第8,058,065号、および米国特許出願公開第20110223669号、同第20120214243号、同第20130059386号、および同第20130183759号において公知であり、これらの全ては、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0194】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPSCは、わずか3つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを成熟細胞または体細胞に導入することによって産生される。

【0195】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性遺伝子コーディングコピーを有するiPSCが、c-MYCまたはnanogおよびLIN28と共に成熟細胞または体細胞にさらに導入される。 10

【0196】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPSCは、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4の外因性コピーを、任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28と共に成熟細胞または体細胞に導入することによって産生される。

【0197】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPSCは、成熟細胞を1つまたは複数のベクターと接触させることによって産生され、その際、ベクターは、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、およびKLF4についての外因性遺伝子コーディングコピーを、任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28と共に成熟細胞または体細胞内にひとまとめに担持し、リプログラミング因子は、接触後の成熟細胞または体細胞においてインビボ発現される。接触は、インビトロまたはエクスピボである。 20

【0198】

任意の開示された方法の一態様では、iPS細胞は、遺伝子Oct4 (Pou5f1)、Sox2、c Myc、Klf4、Nanog、Lin28およびGlis1からなる群より選択されるリプログラミング因子をコードする核酸配列の少なくとも1つの外因性コピーを含む。いくつかの態様では、リプログラミング因子の組み合わせが使用される。例えば、Oct4、Sox2、cMyc、およびKlf4からなる4つのリプログラミング因子の組み合わせ、またはOct4、Sox2、Nanog、およびLin28からなる4つのリプログラミング因子の組み合わせである。 30

【0199】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPS細胞が作製される元の成熟細胞には、Bリンパ球（B細胞）、Tリンパ球（T細胞）、線維芽細胞およびケラチノサイトなどの任意の体細胞が含まれる。

【0200】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPSCは、開示されたリプログラミング因子を成熟細胞または体細胞に2回以上導入することによって産生される。

【0201】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、iPSCは、成熟細胞を、開示されたベクター因子と2回以上接触させて成熟／体細胞内に入れることによって産生される。 40

【0202】

いくつかの態様では、細胞のインビトロ培養は、MHPCを生成させる段階（a）と、多系列造血前駆細胞におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階（b）との間で起こる。いくつかの態様では、所望の細胞の選択は、MHPCを生成させる段階（a）とMHPCにおけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階（b）との間で起こる。

【0203】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する前に、記載された転写因子の追加された外因性遺伝子コーディングコピーを担持する、トランスクレプトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、細胞数を拡

10

20

30

40

50

大するために十分な時間さらにインビトロで培養される。本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、トランスフェクトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、少なくとも7日間培養される。他の態様では、トランスフェクトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、または少なくとも14日間培養される。一態様では、トランスフェクトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、約7～21日間培養される。他の態様では、トランスフェクトまたは接触後の骨髄球系前駆細胞は、約7～20日間、約7～18日間、約7～16日間、約7～14日間、約7～12日間、約7～10日間、8～20日間、約8～18日間、約8～16日間、約8～14日間、約8～12日間、約8～10日間、9～20日間、約9～18日間、約9～16日間、約9～14日間、約9～12日間、約9～10日間、10～20日間、約10～18日間、約10～16日間、約10～14日間、約10～12日間、11～20日間、約11～18日間、約11～16日間、約11～14日間、約11～13日間、約11～12日間、約12～20日間、約12～18日間、約12～16日間、約12～14日間、13～20日間、約12～18日間、約13～16日間、約14～20日間、約14～18日間、および約14～16日間培養される。

【0204】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、記載された転写因子の追加された外因性遺伝子コーディングコピーを担持する、培養拡大された骨髄球系前駆細胞は、細胞表面マーカーCD34の存在(CD34陽性)について、および細胞表面マーカーCD38の不在または低発現(CD38低発現/陰性)について、さらに選択される。言い換えると、本明細書記載の期間、培養拡大後に得られた細胞は、CD34について正の選択をされ、CD38に対して負の選択をされる。選択されたCD34⁺CD38^{lo/-}細胞は、リバース系列MHPCである。選択は、任意の公知の方法、例えば、米国特許出願公開第20090239235号、同第20090061513号、同第20140075593号、ならびに米国特許第5985216号、同第6455263号、同第6461813号、および同第6897031号に記載されている蛍光標識細胞分取(facs)によって行うことができる。これらの参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0205】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、骨髄球系および赤血球系分化能を有し、リンパ球系分化能が低いかまたは検出不能である。リンパ球系分化能は、例えば、実施例の部に教示される当技術分野において公知の任意の方法によって、またはインビトロ分化プロトコールの間にもしくは受容するマウスホストにおける生着後に測定されるように、決定される。

【0206】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、CD34⁺CD38低発現/陰性である。本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、CD90陽性またはCD49f陽性または両方である。本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、MHPCは、細胞へのEARの導入前と比較して、HSC特異的転写因子：HLF、またはNF1B、またはHOPX、またはHMGA2もしくはRBPM3もしくはその組み合わせの増大した発現を示す。一態様では、増大した発現は、細胞へのEARの導入前と比較して少なくとも5%である。他の態様では、増大した発現は、細胞へのEARの導入前と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%である、またはそれよりも大きい。

【0207】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物のいくつかの態様では、MHPCは、ヒト造血前駆細胞の細胞表面マーカー特徴：CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117^{lo/-}およびLin⁻のうちの少なくとも1つを有する。好ましくは、多系列造血前駆細胞は、これらのマーカーのうちのいくつかを有する。

【0208】

10

20

30

40

50

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物のいくつかの態様では、MHPCは、赤血球系系列：CD71およびTer119の細胞表面マーカー特徴を有する。

【0209】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物のいくつかの態様では、骨髄球系列前駆細胞またはMHPCは、任意の接触前にCD34⁺表面マーカーについて選択される。

【0210】

リンパ球系分化能を促進および強化するためのヒストンH3メチル化の阻害

これらの実験の過程で、本発明者らは、H3K9およびH3K27を標的とする特異的ヒストン修飾酵素の阻害が、多能性幹細胞由来の造血前駆細胞のリンパ球系分化能を促進することを発見した。ヒストン修飾酵素は、ヒストンリシンメチルトランスフェラーゼである。ヒストンタンパク質の翻訳後修飾は、クロマチンコンパクションを調節し、転写のエピジェネティック調節を媒介し、健康および疾患状態における細胞分化を制御する。ヒストン尾部のメチル化は、エピジェネティックシグナル伝達の基本事象の1つである。ヒストンH3のリシン9(H3K9)のトリメチル化は、HP1のクロマチン動員、ヘテロクロマチン凝縮および遺伝子サイレンシングを媒介する。同様に、H3K27およびH4K20のメチル化は、抑制状態のクロマチンと関連し、それに対し、発現された遺伝子は、H3K4、H3K36およびH3K79でメチル化される。ヒトにおけるH3K9のメチル化は、主にSuv39ファミリーのメンバー、すなわちEHMT1/GLP、EHMT2/G9a、SUV39H1、SUV39H2、SETDB1およびSETDB2、ならびに次に非Suv39酵素PRDM2およびASH1L(Hong Wu et al., Structural Biology of Human H3K9 Methyltransferases, 2010, PLoS ONE, 5(2):e8570に依存する。対照的に、H3K27のメチル化は、ポリコーム抑制複合体2(PRC2)によって行われる。

【0211】

H3K9のジ/トリメチル化は、保存されたSUV39H1/2ヒストンメチルトランスフェラーゼによって主に触媒され、一方で、ポリコーム抑制複合体2(PRC2)は、H3K27のジ/トリメチル化を確実にする(Rea S, 2000. Nature 406:593-599; Margueron R, and Reinberg D. 2011. Nature 469:343-349。PRC2は、EZH1/2触媒サブユニット、SUZ12、EED、およびRBBP7/4を含む(Margueron R, and Reinberg D, 2011)。

【0212】

理論に縛られることを望むわけではなく、H3K9およびH3K27を標的とするヒストンリシンメチルトランスフェラーゼを阻害することは、ヒストンH3のメチル化に起因する転写抑制を軽減し、それにより、細胞分化を容易にする遺伝子発現を促進する。

【0213】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼは、ヒストンH3リシン残基9(H3K9)および/またはヒストンH3リシン残基27(H3K27)へのメチル基の付加を触媒する。

【0214】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、G9a/GLPヘテロマー複合体を阻害する。

【0215】

G9a(EC2.1.1.43)(UniProtKB:Q96KQ7)は、EHMT2、(真性染色質ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ2)、G9Aヒストンメチルトランスフェラーゼおよびタンパク質G9aとしても知られている。

【0216】

GLP(EC2.1.1.43)(UniProtKB:Q9H9B1)は、EHMT1(真性染色質ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ1)、G9a様タンパク質1およびGLP1としても公知である。

【0217】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤は、EZH1(Zeste 1ポリコーム抑制複合体2サブユニットのエンハンサー

10

20

20

30

40

50

)を阻害する。

【0218】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、H3K27ヒストンメチルトランスフェラーゼは、EZH1 (EC:2.1.1.43) (UniproKB Q92800-1) である。

【0219】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、H3K27ヒストンメチルトランスフェラーゼは、EZH2 (EC:2.1.1.43) (Unipro Q15910-1) ではない。

【0220】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼの阻害剤は、ヒストンメチルトランスフェラーゼの遺伝子発現またはタンパク質触媒活性を阻害する。

10

【0221】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼH3K9および/またはH3K27は、小分子または核酸またはCRISPR媒介標的遺伝子干渉によって阻害される。

【0222】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ小分子阻害剤は、約10,000グラム/モル未満の分子量を有するペプチド、ペプチド模倣薬、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、アプタマー、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機および有機金属化合物を含む）を非限定的に含む化学薬剤、約5,000グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約1,000グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約500グラム/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に許容される形態である。いくつかの態様では、小分子は、ヘテロ有機化合物または有機金属化合物である。

20

【0223】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ小分子阻害剤には、AMI-1、A-366、BIX-01294、BIX01338、BRD4770、ケトシン、UNC0224、UNC0631、UNC0638、UNC0642、UNC0646、EPZ5676、EPZ005687、GSK343、EPZ-6438、3-デアザネプラノシンA (DZNep) HCl、UNC1999、MM-102、SGC0946、エンタカポン、EPZ015666、UNC0379、EI1、MI-2 (メニン-MLL阻害剤)、MI-3 (メニン-MLL阻害剤)、PFI-2、GSK126、EPZ004777、BRD4770、およびEPZ-6438が非限定的に含まれる。

30

【0224】

記載された任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ小分子阻害剤は、UNC0631、BRD4770、UNC1999、CPI-360、およびBIX01294からなる群より選択される。

【0225】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、核酸阻害剤は、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を標的とする核酸である。例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、EZH1のmRNAまたは一次転写物を標的とし、それにより、酵素のタンパク質発現を阻害するものである。ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ、Zeste 1ポリコーム抑制複合体2サブユニットのakaエンハンサー (EZH1) またはEC 2.1.1.43は、ヒストンH3 (MIM602812参照) lys27 (H3K27) のメチル化を媒介し、胚性幹細胞の多能性および可塑性の維持に機能する非古典的ポリコーム抑制複合体-2 (PRC2) の成分である。ヒトEZH1遺伝子についての外部識別は、以下の通りである：HGNC : 3526 ; Entrez Gene : 2145 ; Ensembl : ENSG00000108799 ; OMIM : 601674 ; UniProtKB : Q92800 ; EMBL : AB002386 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : BAA20842.2 ; GENBANK : BT009782 mRNAおよび対応するmRNA翻訳 : AAP88784.1。

40

【0226】

50

一態様では、核酸阻害剤は、ヒトEZH1 mRNAを標的とする。

【0227】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、核酸阻害剤は、RNA干渉阻害剤またはCRISPR媒介遺伝子干渉阻害剤である。RNA干渉阻害剤は、Whitehead Institute、MIT、sirnaウェブサイトに見られる予測RNAiソフトウェア、Invitrogen/ThermoFisherのBLOCK-iT (商標) RNAi Designer、およびRNAi Webの他のオンラインsiRNA設計ツールを使用して、標的としてEZH1のmRNAを使用して設計することができる。

【0228】

同様に、CrisperガイドRNAは、Broad Institute (MIT) crisprソフトウェア (MITのウェブサイト参照)、dna20、Clontech、AddGene、e-crisp、およびinnovative genomicを使用して、標的としてEZH1のmRNAまたはゲノム遺伝子を使用して設計することができる。

【0229】

CRISPR (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート) Cas9媒介遺伝子破壊は、哺乳動物を含む多様な生物に機能喪失型変異を生成するのに広く使用されている (Cong et al., 2013, Science, 339(6121):819-23; Hsu et al., 2014, Cell, 157(6):1262-78)に総説)。Cas9ベースのノックアウトスクリーニングが、様々な細胞株における不可欠な遺伝子および薬物耐性に関する遺伝子を同定するのに適用されている。本発明の実施に全て有用な、量および処方に關してなどのCRISPR-Casシステム、その構成成分、およびそのような構成成分の送達に関する全般情報について、方法、材料、送達媒体、ベクター、粒子、AAV、ならびにその製造および使用を含めて、米国特許第8,999,641号、同第8,993,233号、同第8,945,839号、同第8,932,814号、同第8,906,616号、同第8,895,308号、同第8,889,418号、同第8,889,356号、同第8,871,445号、同第8,865,406号、同第8,795,965号、同第8,771,945号および同第8,697,359号；米国特許出願公開第2014-0310830号、同第2014-0287938号、同第2014-0273234号、同第2014-0273232号、同第2014-0273231号、同第2014-0256046号、同第2014-0248702号、同第2014-0242700号、同第2014-0242699号、同第2014-0242664号、同第2014-0234972号、同第2014-0227787号、同第2014-0189896号、同第2014-0186958号、同第2014-0186919号、同第2014-0186843号、同第2014-0179770号および同第2014-0179006号、同第2014-0170753；欧州特許EP 2 784 162 B1およびEP 2 771 468 B1；欧州特許出願EP 2 771 468 (EP13818570.7)、EP 2 764 103 (EP13824232.6)、およびEP 2 784 162 (EP14170383.5)；ならびにPCT国際公開公報第2014/093661号が参照され、その全ては、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0230】

本発明に關連する使用のために予想されるCRISPR/Casシステムは、任意の適切なCRISPR酵素を利用することができる。いくつかの態様では、CRISPR酵素は、II型CRISPRシステム酵素である。いくつかの態様では、CRISPR酵素は、Cas9酵素である。いくつかの態様では、Cas9酵素は、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*)、または*S. サーモフィルス* (*S. thermophilus*) のCas9であり、これらの生物由来の変異型Cas9を含み得る。酵素は、Cas9ホモログまたはオーソログであり得る。いくつかの態様では、CRISPR酵素は、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0231】

本明細書記載のCRISPR/Casシステムは、関心対象の連続ゲノム領域内の多数の配列を特異的に標的とするために使用される。標的とすることは、典型的には、細胞集団の各細胞に少なくとも1つのCasタンパク質および本明細書記載のガイドRNAライブラリーの1つまたは複数のガイドRNAを含む操作非天然CRISPR-Casシステムを含む1つまたは複数のベクターのベクターシステムを導入することを含む。

【0232】

10

20

30

40

50

これらの方法において、Casタンパク質および1つまたは複数のガイドRNAは、システムの同じまたは異なるベクター上にあり得、各細胞に組み込まれ、それによって、各ガイド配列は、細胞集団中の各細胞における連続ゲノム領域内の配列を標的とする。Casタンパク質は、前記細胞における発現を確実にするために調節エレメントに、より詳細には細胞集団の細胞における発現に適したプロモーターに、機能的に連結される。特定の様では、プロモーターは、ドキシサイクリン誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーターである。細胞集団の細胞内で転写されるとき、ガイド配列を含むガイドRNAが、連続ゲノム領域中の標的配列に対するCRISPR-Casシステムの配列特異的結合を指示する。典型的には、CRISPR-Casシステムの結合は、Casタンパク質による連続ゲノム領域の切断を誘導する。

10

【0233】

低分子干渉性RNA (siRNA) またはマイクロRNA (miRNA) によって媒介されるRNA干渉 (RNAi) は、遺伝子発現の転写後調節のための強力な方法である。RNAiは、哺乳動物細胞における生体プロセスの研究のために広く使用されており、遺伝子発現の選択的ミュレーションが望ましいヒト疾患への治療アプローチを構成することもできる。miRNAと標的mRNA配列との間の相補性の程度に応じて、同族mRNAの分解を誘導することまたは翻訳減衰によって遺伝子発現の欠如が起こる。内因性miRNAは、一次転写物として転写され、続いてRNase III酵素ドローシャ (1) によってプロセシングされて、システムループ構造を創出する。核外搬出およびダイサーによる切断は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖に分けられる成熟短二本鎖分子 (siRNA) を生成する。ガイド鎖は、標的mRNAの切断を媒介するエフェクター複合体であるRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に負荷され、機能的ガイド鎖はRISCタンパク質と結合し、一方でパッセンジャー鎖は分解する。RISCへのパッセンジャー鎖と比べたガイド鎖の負荷は、siRNAの5'末端の安定性に大きく依存し、より不安定な鎖が優先的にRISCに組み込まれるが、哺乳動物細胞における正確な調節は、不完全に理解される。ガイド鎖の5'末端は、標的同定に重要な「シード領域」を含有する。ドローシャおよびダイサーによる的確な切断が、適切な標的mRNAとの効率的な結合を媒介する所定のシード領域を有するガイドRNAを生成させるために重要である。不正確なプロセシングは、オフターゲット分子との結合を招くが、切断部位の移動も二重鎖末端のヌクレオチド組成を変化させ、そのことは、RISCへの鎖負荷に顕著な影響を有し得る。

20

【0234】

選択された標的ポリペプチドの発現を阻害することは、RNA干渉剤の使用を経由する。RNA干渉 (RNAi) は、選択的分解のために標的ポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAを標的とする低分子干渉性RNA (siRNA) 二重鎖を使用する。遺伝子発現のsiRNA依存性転写後サイレンシングは、siRNAによってガイドされる部位で標的メッセンジャーRNA分子を切断することを伴う。RNAiは、標的遺伝子と同一または高度に類似の配列のRNAの発現または導入が、その標的とされた遺伝子から転写されるメッセンジャーRNA (mRNA) の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) を招き (Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. Virology 76(18):9225を参照されたい)、それにより、標的遺伝子の発現を阻害する、進化上保存されたプロセスである。一様では、RNAは、二本鎖RNA (dsRNA) である。このプロセスは、植物、脊椎動物、および哺乳動物細胞において記載されている。RNAiは、自然界において、長鎖dsRNAからsiRNAと名付けられる二本鎖フラグメントへの前進的切断を促進するdsRNA特異的エンドヌクレアーゼ、ダイサーによって開始される。siRNAは、標的mRNAを認識し、切断するタンパク質複合体（「RNA誘導サイレンシング複合体」または「RISC」と名付けられる）に組み込まれる。RNAiは、核酸分子、例えば合成siRNAまたはRNA干渉剤を導入することによっても開始され、標的遺伝子の発現を阻害またはサイレンシングすることができる。本明細書に使用されるように、「標的遺伝子発現の阻害」は、RNA干渉が誘導されない状況と比較して、標的遺伝子または標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現またはタンパク質活性またはレベルにおける任意の減少を含む。減少は、RNA干渉剤によって標的とされ

30

40

50

ていなかった標的遺伝子の発現または標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれより大きい。

【0235】

本明細書において使用される用語「RNA干渉剤」および「RNA干渉」は、RNA干渉剤が、siRNA、miRNA、shRNAまたは他の二本鎖RNA分子を含むかどうかにかかわらず、二本鎖RNAによって媒介される形態の遺伝子サイレンシングを包含することが意図される。siRNAは、標的遺伝子の発現を例えばRNAiにより阻害するように機能するRNA剤として定義される。siRNAは、化学合成される場合があり、インビトロ転写によって産生される場合があり、またはホスト細胞内で産生される場合がある。一態様では、siRNAは、約15から約40ヌクレオチド長、好ましくは約15から約28ヌクレオチド、より好ましくは約19から約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、22、または23ヌクレオチド長の二本鎖RNA (dsRNA) 分子であり、約0、1、2、3、4,または5ヌクレオチド長を有する、3'および/または5'オーバーハングを各鎖上に含有し得る。オーバーハングの長さは、2つの鎖の間で独立しており、すなわち、1つの鎖上のオーバーハングの長さは、2番目の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA (mRNA) の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) を経由してRNA干渉を促進することができる。

【0236】

siRNAは、また、低分子ヘアピン型 (ステムループとも呼ばれる) RNA (shRNA) も含む。一態様では、これらのshRNAは、短い (例えば、約19から約25ヌクレオチド) アンチセンス鎖に続く、約5から約9ヌクレオチドのヌクレオチドループ、および類似のセンス鎖から構成される。あるいは、センス鎖が、ヌクレオチドループ構造に先行する場合があり、アンチセンス鎖が後続する場合がある。これらのshRNAは、プラスミド、レトロウイルス、およびレンチウイルス中に含有され、例えばpol III U6プロモーター、または別のプロモーターから発現される場合がある (例えば、その全体で参照により本明細書に組み入れられるStewart, et al. (2003) RNA April; 9(4):493-501を参照されたい)。RNA干渉剤の標的遺伝子または配列は、細胞遺伝子またはゲノム配列、例えばBCL11A配列であり得る。siRNAは、標的遺伝子もしくはゲノム配列、またはそのフラグメントと実質的に相同であり得る。これに関連して使用される用語「相同である」は、標的のRNA干渉を引き起こすために、標的mRNAまたはそのフラグメントと実質的に同一、十分に相補的、または類似であることと定義される。ネイティブなRNA分子に加えて、標的配列の発現を阻害または干渉するために適したRNAは、RNA誘導体および類似体を含む。好ましくは、siRNAは、その標的と同一である。siRNAは、好ましくは1つの配列のみを標的とする。siRNAなどのRNA干渉剤のそれぞれは、潜在的オフターゲット効果について、例えば発現プロファイリングによってスクリーニングすることができる。そのような方法は、当業者に公知であり、例えば、Jackson et al. Nature Biotechnology 6:635-637, 2003に記載されている。発現プロファイリングに加えて、配列データベースにおける類似配列について潜在的標的配列がスクリーニングされて、オフターゲット効果を有し得る潜在配列が同定される場合もある。例えば、配列が同一な15個、またはおそらくわずか11個の連続ヌクレオチドが、非標的転写物のサイレンシングを指示するために十分である。したがって、潜在的オフターゲットサイレンシングを回避するために、最初に、BLASTなどの任意の公知の配列比較方法による配列同一性分析を使用して、提案されたsiRNAをスクリーニングする場合がある。siRNA配列は、RISCへのsiRNAのアンチセンス (ガイド) の取り込みを最大化し、それにより、RISCがG9a/GLPまたはEZH1 mRNAを分解のために標的とする能力を最大化するように選択される。これは、アンチセンス鎖の5'末端で最低の結合自由エネルギーを有する配列についてスキャンすることによって達成することができる。より低い自由エネルギーは、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖の5'末端の巻き戻しの強化をもたらし、それにより、アンチセンス鎖がRISCによって取り込まれ、ヒトG9a/GLPま

10

20

30

40

50

たはEZH1 mRNAの配列特異的切断を指示することを確実にする。siRNA分子は、RNAのみを含有する分子に必ずしも限られず、例えば、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含し、リボース糖分子が、別の糖分子または類似の機能を果たす分子に置換された分子も含む。そのうえ、ヌクレオチド残基間にホスホロチオエート結合などの非天然結合を使用することができる。RNA鎖は、フルオロフォアなどのレポーター基の反応性官能基で誘導体化することができる。特に有用な誘導体は、RNA鎖の1つまたは複数の末端で、典型的にはセンス鎖の3'末端で修飾されている。例えば、3'末端の2'-ヒドロキシルを多様な基で容易に選択的に誘導体化することができる。他の有用なRNA誘導体は、2'-O-アルキル化残基または2'-O-メチルリボシル誘導体および2'-O-フルオロリボシル誘導体などの修飾糖質部分を有するヌクレオチドを組み込んでいる。RNA塩基も修飾される場合がある。標的配列の発現を阻害または干渉するために有用な任意の修飾塩基が、使用され得る。例えば、5-ブロモウラシルおよび5-ヨードウラシルなどのハロゲン化塩基を組み込むことができる。塩基がアルキル化される場合もあり、例えば、7-メチルグアノシンをグアノシン残基の代わりに組み込むことができる。成功した阻害をもたらす非天然塩基も組み込むことができる。最も好ましいsiRNA修飾は、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンまたはロックド核酸(LAN)ヌクレオチドおよびホスホジエステルまたは様々な数のホスホロチオエート結合のいずれかを含有するRNA二重鎖を含む。そのような修飾は、当業者に公知であり、例えば、Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチド技法のために確立された化学反応を使用して、siRNA分子に有用な修飾の大部分を導入することができる。好ましくは、修飾は、最低限の2'-O-メチル修飾を含み、好ましくは修飾から2'-O-メチル修飾を除外する。好ましくは修飾からsiRNAの遊離5'-ヒドロキシル基の修飾も除外する。本明細書における実施例は、mRNAを効果的に標的とするshRNA分子などのRNA干渉剤の具体例を提供する。

【0237】

一態様では、核酸は、G9a/GLPまたはEZH1特異的RNA干渉剤またはRNA干渉剤をコードするベクターである。一態様では、RNA干渉剤は、
CTATCTGGCAGTGCAGAATG (SEQ. ID. NO: 1), AGACGTGCAAGCAGGTCTTC (SEQ. ID. NO: 2), TGGATGACTTATGCGTGATT (SEQ. ID. NO: 3), CAACAGAACTTATGGTAGAA (SEQ. ID. NO: 4), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 5),
GCTTCCTCTTCAACCTCAATA (SEQ. ID. NO: 27), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 28), GCTCTTCTTGATTACAGGTA (SEQ. ID. NO: 29), および
GCTACTCGGAAAGGAAACAAA (SEQ. ID. NO: 30)

からなる群より選択されるヌクレオチド配列のうちの1つまたは複数を含む。

【0238】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、核酸は、
CTATCTGGCAGTGCAGAATG (SEQ. ID. NO: 1),

AGACGTGCAAGCAGGTCTTC (SEQ. ID. NO: 2), TGGATGACTTATGCGTGATT (SEQ. ID. NO: 3), CAACAGAACTTATGGTAGAA (SEQ. ID. NO: 4), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 5), GCTTCCTCTTCAACCTCAATA (SEQ. ID. NO: 27), CCGCCGTGGTTGTATTCAATT (SEQ. ID. NO: 28), GCTCTTCTTGATTACAGGTA (SEQ. ID. NO: 29), および
GCTACTCGGAAAGGAAACAAA (SEQ. ID. NO: 30)

からなる群より選択される。

【0239】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、多系列造血前駆細胞を

10

20

30

40

50

、SEQ ID NO : 1 ~ 5、27 ~ 30からなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子を担持するウイルスベクターまたはベクターと接触させる。

【 0 2 4 0 】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤と接触させることは、1回よりも多く起こる。例えば、多系列造血前駆細胞を、SEQ ID NO : 1 ~ 5、27 ~ 30からなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子を担持するウイルスもしくはベクターと最初1回目に接触させた後、または本明細書記載の小分子阻害剤と接触させた後に、接触させた細胞が、洗浄され、次に洗浄された細胞を、最初の接触で使用された同じヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤と2回目に接触させる。

10

【 0 2 4 1 】

本明細書において、遺伝子編集のCas9/CRISPRシステムが、本明細書記載の方法、細胞および組成物で採用されることが考えられている。クラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) / CRISPR関連 (Cas) システムは、RNAプログラム可能なゲノム編集に有用である (例えば、Jinek, M. et al. *Science* (2012) 337(6096):816-821を参照されたい)。

【 0 2 4 2 】

トランスクレア RNA (tracrRNA) は、小分子トランスクレアコード (trans-encoded) RNA である。これは、ヒト病原体である化膿連鎖球菌から最初に発見された。 (Deltcheva E, et al. (2011). *Nature* 471 (7340): 602-7を参照されたい)。細菌および古細菌において、CRISPR/Cas (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート / CRISPR関連タンパク質) は、ウイルスおよびプラスミドから防御するRNA媒介防御システムを構成する。この防御経路は、3段階を有する。最初に、侵入核酸のコピーがCRISPR遺伝子座に組み込まれる。次に、CRISPR RNA (crRNA) が、このCRISPR遺伝子座から転写される。次に、crRNAは、エフェクター複合体に組み込まれ、ここで、crRNAは、複合体を侵入核酸に導き、Casタンパク質はこの核酸を分解する。 (Terns MP and Terns RM (2011). *Curr Opin Microbiol* 14 (3): 321-7を参照されたい)。CRISPR活性化のいくつかの経路があり、その1つは、crRNAの成熟に役割を果たすtracrRNAを必要とする。TracrRNAは、プレcrRNAと相補的であり、それと塩基対を作り、RNA二重鎖を形成する。これは、RNA特異的リボヌクレアーゼであるRNase IIIによって切断されて、crRNA/tracrRNAハイブリッドを形成する。このハイブリッドは、侵入核酸を切断するエンドヌクレアーゼCas9のためのガイドとして作用する。 (Deltcheva E, et al. 前記; Jinek M, et al. (2012), *Science* 337 (6096): 816-21; およびBrouns SJ (2012), *Science* 337 (6096): 808-9を参照されたい)。

20

【 0 2 4 3 】

いくつかの態様では、Cas9/CRISPRシステムのガイドRNAは、公知のEZH1の全ての転写物に存在するEZH1遺伝子のエクソン3を標的とするように設計される。エクソン3の配列は、

ATTACAGCAAGATGGAAATACCAAATCCCCCTACCTCCAAATGTATCACTTACTGGAAAAG
AAAAGTGAAATCTGAATACATGCGACTTCGACAACTTAAACGGCTTCAGGCAAATATGGGT
GCAAAG (SEQ ID NO:6)

30

である。

【 0 2 4 4 】

エクソン3を標的とする非限定的な例示的gRNAは、

40

50

TCGACAACTTAACCGGCTTC
 (SEQ ID NO:7), TGCGACTTCGACAACTTAAA (SEQ ID NO:8), CCTCCAAATGTATCACTTAC
 (SEQ ID NO:9), TAAACGGCTTCAGGCAAATA (SEQ ID NO:10) AAACGGCTTCAGGCAAATAT
 (SEQ ID NO:11), CATTGGAGGTAGGGGATT (SEQ ID NO:12), CCAGTAAGTGATACATTGG
 (SEQ ID NO:13), GTGATACATTGGAGGTAGG (SEQ ID NO:14),
 AAGTGATACATTGGAGGTA (SEQ ID NO:15), AGTGATACATTGGAGGTAG (SEQ ID
 NO:16), TTTCCAGTAAGTGATACATT (SEQ ID NO:17), および TAAGTGATACATTGGAGGT (SEQ
 ID NO:18)

10

である。

【 0 2 4 5 】

他の態様では、Cas9/CRISPRシステムのガイドRNAは、公知のEZH1の全ての転写物にも存在するEZH1遺伝子のエクソン4を標的とするように設計される。エクソン4の配列は、
 GCTTTGTATGTGGCAAATTGCAAAGGTTCAAGAAAAACCCAGATCCTCAATGAAGAAT
 GGAAGAAGCTCGTGTCCAACCTGTTAGTCAATGAAGCCTGTGAGTGGACACCCCTTTCTC
 AAAAAG (SEQ ID NO:19)

20

である。

【 0 2 4 6 】

エクソン4を標的とする非限定的な例示的gRNAは、
 GCTTCATTGACTGAACAGGT
 (SEQ ID NO:20), ACAGGCTTCATTGACTGAAC (SEQ ID NO:21),
 AGAAAAGGGTGTCCACTCAC (SEQ ID NO:22), TCCATTCTTCATTGAGGATC (SEQ ID NO:23),
 CCATTCTTCATTGAGGATCT (SEQ ID NO:24), CCCAGATCCTCAATGAAGAA (SEQ ID NO:1),
 GTATGTGGCAAATTGCAA (SEQ ID NO:25), および CAGTCAATGAAGCCTGTGAG (SEQ ID
 NO:26)

30

である。

【 0 2 4 7 】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、転写因子またはリプログラミング因子または核酸阻害剤の本明細書記載の外因性遺伝子コーディングコピーのいずれかを、開示された骨髄球系前駆細胞または開示されたリバース系列複能性造血前駆細胞より選択される標的細胞に導入するための輸送媒体として使用される。

【 0 2 4 8 】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、転写因子またはリプログラミング因子または核酸阻害剤の記載された外因性遺伝子コーディングコピーを含む本明細書記載の核酸のいずれかを、開示された骨髄球系前駆細胞または開示されたリバース系列複能性造血前駆細胞より選択される標的細胞に導入するための輸送媒体として使用される。

40

【 0 2 4 9 】

一局面では、本明細書は、1つまたは複数のベクターであって、記載された転写因子またはリプログラミング因子または核酸阻害剤のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに含むベクターを提供する。外因性遺伝子コーディングコピーは、細胞内の転写因子またはリプログラミング因子の発現のためである。核酸阻害剤のインビオ発現

50

は、それぞれのヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を減少および／または阻害するために、G9a/GLPまたはEZH1などの標的とされたヒストンメチルトランスフェラーゼのmRNAを分解するためであり、トランスフェクトされた細胞におけるヒストンH3のメチル化を減少させ、それにおける遺伝子発現の抑制を緩和することを目標とする。一態様では、各ベクターは、本明細書記載の転写因子またはリプログラミング因子から本質的になる。一態様では、各ベクターは、記載された転写因子またはリプログラミング因子のうちの2つ以上から本質的になる。

【0250】

一局面では、本明細書は、1つまたは複数のベクターであって、転写因子またはリプログラミング因子または核酸阻害剤の記載された外因性遺伝子コーディングコピーを含む核酸をひとまとめに含むベクターを提供する。核酸は、細胞内の転写因子またはリプログラミング因子の発現のためである。

10

【0251】

一局面では、本明細書は、1つまたは複数のベクターであって、本明細書記載の以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめに含むベクターを提供する。例えば、3つの転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの全てについてのコード化コピーを担持する単一のベクターである。別の局面では、ベクターは、SOX4およびMYBの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめにさらに含む。例えば、SOX4およびMYBの両方についてのコード化コピーを担持する単一のベクターである。別の局面では、ベクターは、DACH1およびNFIAの外因性遺伝子コーディングコピーをひとまとめにさらに含む。例えば、DACH1およびNFIAの両方についてのコード化コピーを担持する単一のベクターである。

20

【0252】

別の局面では、本開示は、本明細書記載の1つもしくは複数のベクターまたは本明細書記載の転写因子もしくはリプログラミング因子もしくは両方の核酸を含むホスト細胞も提供する。

【0253】

別の局面では、本明細書における開示は、本明細書記載の1つもしくは複数のベクターまたは本明細書記載の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAの核酸を含むホスト細胞も提供する。

30

【0254】

別の局面では、ホスト細胞は、本明細書記載の1つもしくは複数のベクターまたは転写因子：SOX4およびMYBの核酸をさらに含む。

【0255】

別の局面では、ホスト細胞は、本明細書記載の1つもしくは複数のベクターまたは本明細書記載のリプログラミング因子もしくは両方、OCT4、SOX2、およびKLF4、ならびに任意でc-MYCもしくはNANOGおよびLIN28、または4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28の核酸をさらに含む。

【0256】

本明細書記載の任意のホスト細胞の一態様では、ホスト細胞は、胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞もしくはB細胞などの免疫細胞、赤血球、線維芽細胞、ケラチノサイト、または骨髄球系前駆細胞である。一態様では、ホスト細胞は、対象から単離される。一態様では、ホスト細胞は、血液疾患と診断された対象から単離される。

40

【0257】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、脾フォーカス形成ウイルスプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター、ドキシサイクリン（Dox）誘導性、またはa-グロビン遺伝子座制御領域および-グロビンプロモーターをさらに含む。一態様では、プロモーターは、その中の核酸分子の標的指向発現を提供する。プロモーターの他の例には、様々な導入遺伝子についてのCMVプロモーターおよびEF

50

1 プロモーター、ならびにEZH1を標的とするshRNAについてのU6プロモーターが非限定的に含まれる。

【0258】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、ウイルスまたは非ウイルスベクターである。細胞における遺伝子送達および発現のためのウイルスベクターの非限定的な例は、レトロウイルス、アデノウイルス（2および5型）、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター（HdAd）、雑種アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ヒト泡沫状ウイルス（HFV）、およびレンチウイルスである。

【0259】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、エピソームベクターである。

【0260】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、組み込み型ベクターである。

【0261】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、非組み込み型ベクターである。

【0262】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ベクターは、切除可能なベクターである。

【0263】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、記載された転写因子のインピボ発現は、調節可能である。すなわち、遺伝子発現のためにベクターに使用されるプロモーターは、誘導性である。

【0264】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一局面では、レンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）、ヒト免疫不全ウイルス2型（HIV-2）、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、およびサル免疫不全ウイルス（SIV）からなる群より選択される。

【0265】

本明細書に使用される用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を表す。ベクターの1種類は、追加的な核酸セグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを表す「プラスミド」である。ベクターの別の種類は、追加的な核酸セグメントをウイルスゲノム中にライゲートすることができるウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入されたホスト細胞において自律的複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、ホスト細胞に導入されるとホスト細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、ホストゲノムと一緒に複製される。そのうえ、ある特定のベクターは、それらが機能的に連結された遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「組み換え発現ベクター」、またはより簡単に「発現ベクター」と称される。一般的に、組み換えDNA技法において有用な発現ベクターは、多くの場合にプラスミドの形態である。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用されている形態であるので、「プラスミド」および「ベクター」は、本明細書において互換的に使用することができる。しかし、本明細書記載の方法および組成物は、等価の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの、そのような他の形態の発現ベクターを含むことができる。

【0266】

10

20

30

40

50

発現ベクター内の「機能的に連結される」は、ヌクレオチド配列の発現を（例えば、インビトロ転写／翻訳システムにおいて、またはベクターが標的細胞に導入されたときに標的細胞において）可能にする方法で、関心対象のヌクレオチド配列が調節配列と連結されることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。調節配列は、多種類のホスト細胞においてヌクレオチド配列の構成性発現を指示するもの、およびある特定のホスト細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）を含む。さらに、DNAを標的とするエンドヌクレアーゼは、DNAを標的とするエンドヌクレアーゼの合成を指示するために調節配列を含むベクターにより特定の間隔で、または特定の期間にわたり送達することができる。発現ベクターの設計は、標的細胞、所望の発現レベルの選択などの要因に依存できることが当業者によって理解されよう。

【0267】

適切なウイルスベクターには、RNAウイルスに基づくベクター、例えばレトロウイルス由来ベクター（例えば、モロニーマウス白血病ウイルス（MLV）由来ベクター）、およびより複雑なレトロウイルス由来ベクター（レンチウイルス由来ベクターなど）；ならびにDNAウイルスに基づくベクター、例えばアデノウイルスに基づくベクターおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）に基づくベクターが非限定的に含まれる。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド送達システムは、レトロウイルスベクター、より好ましくはレンチウイルスベクターを含む。ウイルスベクターの非限定的な例には、ヒト免疫不全ウイルス1（HIV-1）、HIV-2、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス（SIV）およびマエディ／ビスナウイルス由来のレンチウイルスベクターが含まれる。

【0268】

リンパ球系分化能およびリンパ球分化の誘導

別の態様では、本開示は、本明細書記載の方法によって產生される免疫細胞を提供する。これらの免疫細胞は、元の骨髄球系前駆細胞と比較して、ERG、HOXA9、およびRORAの外因性コピーを有するように遺伝的に改変されている。これらの免疫細胞は、元の骨髄球系前駆細胞と比較して、SOX4およびMYBの外因性コピーをさらに有することもできる。これらの免疫細胞は、元の骨髄球系前駆細胞と比較して、DACH1およびNFIAの外因性コピーをさらに有することもできる。

【0269】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを含む免疫細胞を提供する。

【0270】

別の態様では、本開示は、骨髄球系前駆細胞集団由来の免疫細胞であって、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピー、ならびに以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、ならびに任意でc-MYCもしくはNANOGおよびLIN28、または4つのリプログラミング因子：OCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28のそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む免疫細胞を提供する。

【0271】

記載された任意の免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、SOX4またはMYBまたはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

【0272】

記載された任意の免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、DACH1またはNFIAまたはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。DACH1およびNFIAは、本明細書記載のリバース系列MHPCにおけるリンパ球系分化能を高める。

10

20

30

40

50

【0273】

記載された任意の免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、B細胞またはT細胞である。記載された任意の免疫細胞の一態様では、T細胞は、制御性T(T_{Reg})細胞である。記載された任意の免疫細胞の一態様では、T細胞は、ナチュラルキラー細胞である。

【0274】

リバース系列複能性造血前駆細胞は、不死化されており、標的指向性特異性を高めるためのネイティブなT細胞受容体遺伝子座の除去、クラスIおよびクラスII主要組織適合抗原複合体の欠失、ならびにNK細胞媒介溶解を防止するための非標準HLA-GおよびHLA-Eの発現などのさらなる遺伝的修飾が容易にできる、有用なプラットフォームに相当し (Riobos L et al. 2013)、このプラットフォームは、免疫療法、例えば、がん免疫療法のためのユニバーサルT細胞の供給源を提供することができる。記載された任意の免疫細胞の一態様では、免疫細胞は、内因性HLAを編集するためのさらなる遺伝的修飾 (Riobos L et al. 2013を参照されたい)、または標的指向性特異性のための内因性TCRの除去、キメラ抗原受容体 (CAR) のノックインを受けることができる。

10

【0275】

リバース系列MHPCは、また、長期インビトロ培養後にそれらのリンパ球系分化能を保持し、13週間の拡大および分化後に平均約10⁴個のEB細胞から約10⁸個のT細胞を產生する。図1Fを参照されたい。

【0276】

事実上、骨髄中の造血幹細胞 (HSC) は、骨髄球系共通前駆細胞 (CMP) およびリンパ球系共通前駆細胞 (CLP) に分化する前に複能性前駆細胞 (MPP) を生じる。CLPは、骨髄から胸腺に遊走し、そこで、Delta-likeリガンド4 (DLL4) を発現する胸腺上皮細胞が、初期胸腺前駆細胞 (ETP) における古典的Notch 1シグナル伝達をトリガーする。このNotch 1シグナルは、T細胞系列の決定に不可欠であり、初期胸腺細胞分化の間、ダブルネガティブ3 (DN3) 期までさらに必要とされる。これらの初期T細胞発生の間の活性Notchシグナル伝達は、B細胞および骨髄球系細胞 (樹状細胞 (DC) を含む) 分化能などの他の系列分化能を阻害する。-選択の間に、Notchシグナル伝達は、プレT細胞受容体シグナル伝達の結果として解除される。したがって、その後のT細胞発生段階は、非常に低いレベルのNotchシグナル伝達を示す。Notchは、制御性T(T_{Reg})細胞 (具体的には、胸腺T_{Reg}細胞) の発生に影響することも示唆された。Notchシグナル伝達は、Notch 2受容体によって媒介される。Notchシグナル伝達経路は、脊椎動物種および無脊椎動物種の両方で高度に保存されており、これは、多くの異なる細胞運命の決定を調節する。これは、神経発生、血管新生または筋形成などの発生途中のパターン形成に重要であり、T細胞発生および幹細胞維持を調節する。Notchシグナル伝達は、また、成人期にわたる細胞過程に関与する。Notchを介したシグナル伝達は、隣接細胞の間で起こり、受容体およびそのリガンドの両方は、膜貫通タンパク質である。Schmitt T.M., Zuniga-Pfluecker J.C. (2002) Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17:749-756; Mohtashami M. (2010) Direct Comparison of DLL1- and DLL4-Mediated Notch Activation Levels Shows Differential Lymphomyeloid Lineage Commitment Outcomes. *J Immunol.* 185(2):867-76; Ohishi K et al. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest.* 2002 Oct;110(8):1165-74; およびDallas MH et al. Density of the Notch ligand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from hematopoietic stem cells *J Exp Med.* 2005 May 2; 201(9): 1361-1366。

20

30

30

【0277】

したがって、ヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害された複能性造血前駆細胞におけるリンパ球系およびT細胞系に決定された分化を開始するために、これらの細胞は、Notchリガンドに曝露されて、その中のNotchシグナル伝達経路を活性化する。

【0278】

40

50

Notchリガンドは、DSL（デルタ、セレート、LAG-2）ドメインおよび多様な数のEGF様リピートを有する1回貫通型膜貫通タンパク質である。2つのクラスの古典的Notchリガンド、Delta / Delta-likeおよびセレート / Jaggedクラスがある。後者は、膜貫通ドメイン近くにシステインリッチリピートの追加的なドメインを有する。哺乳動物には5つの古典的Notchリガンド：Jagged-1、Jagged-2、DLL1、DLL3およびDLL4がある。これらは、4つのNotch受容体、Notch 1～4と結合することができる。Notch Deltaリガンド、Delta-like 1としても知られているDLL1は、NOTCH2受容体と相互作用するタンパク質である。Shimizu K, et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276 (28): 25753-8; Blaumueller CM, et al., 1997, *Cell* 90 (2): 281-91; Shimizu K, et al., 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20 (18): 6913-22。DLL1は、ヒトにおいてDLL1遺伝子によってコードされるタンパク質である。DLL1は、Notch Deltaリガンドのヒトホモログである。

【0279】

Notchリガンドを提供するいくつかの方法がある。これらは、OP-9-DL1などのストローマ細胞、またはそのようなNotchリガンドを細胞外で発現およびディスプレイもしくは分泌する類似細胞と共に共培養すること、および精製組み換え型NotchリガンドまたはNotch受容体結合フラグメントであって、これらの細胞上で細胞外Notch受容体と接触および結合すると細胞シグナル伝達事象をインビボで誘起するために十分な受容体結合フラグメントを提供することを非限定的に含む。

【0280】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼが阻害された、段階（b）の複能性造血前駆細胞は、Notchリガンドを発現するストローマ細胞と共に培養される。

【0281】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、細胞の共培養は、Flt-3LおよびIL-7を含む培地内で起こる。

【0282】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、細胞の共培養は、無血清培養条件で行われる。

【0283】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、Notchリガンドを発現している細胞は、OP-9細胞である。一態様では、その他の場合にOP9-DL1細胞と称されるOP-9細胞は、DLL1を発現する。別の態様では、その他の場合にOP9-DL4細胞と称されるOP-9細胞は、DLL4を発現する。

【0284】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、notchリガンドは、Delta-like-1 (DLL1)、Delta-like-4 (DLL4)、およびヒトDelta-like-1 (DLL1)の細胞外ドメインがヒトIgG1のFcドメインと融合したものからなる固定化Delta1^{ext}-IgGである。「固定化Delta 1^{ext}-IgG」は、Delta-like 1の細胞外ドメインをヒトIgG1のFcドメインと融合することによって作製された組み換えNotchリガンドを表す。これは、設定可能な(titratable)用量のNOTCHリガンドを提供する合成方法である。Varnum-Finney B et al. *Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling.* *J Cell Sci.* 2000, 23:4313-8。これらの参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。組み換えNotchリガンドおよびFc融合体は、Adipo Gen（商標）で市販されている。

【0285】

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、DLL1またはDLL4は、多系列造血前駆細胞を固定化Delta1^{ext}-IgG、OP9-DL1細胞またはOP9-DL4細胞と共に培養することによって供給される。OP9-DL1細胞は、Notchリガンド、Delta-like 1 (DLL1)を異所性発現する骨髄由来ストローマ細胞株である。

【0286】

10

20

30

40

50

本明細書記載の任意の方法、細胞、または組成物の一態様では、Notchリガンドは、DLL1またはDLL4である。

【0287】

Notchシグナル伝達経路およびOP9-Notchリガンド発現細胞を使用して前駆細胞をT細胞に分化させる方法は、当技術分野において公知である。予めヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤で阻害された多系列造血前駆細胞から操作免疫細胞を産生させるために、本明細書において任意の方法を使用することができる。例えば、実施例の部に記載されている通り、ならびにまた、米国特許第7575925号、同第8772028号、同第8871510号、および同第9206394号ならびに米国特許出願公開第20090217403号、同第20110123502号、同第20110052554号、同第20110027881号、同第20110236363号、同第20120149100号、同第20130281304号、同第20140322808号、同第20140248248号、および同第2014037599号に記載されている通りである。これらの参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0288】

ヒストンメチルトランスフェラーゼが阻害された複能性造血前駆細胞におけるリンパ球系列およびB細胞系列に決定した分化のために、これらの細胞は、(1)B細胞プライミング因子；(2)1つもしくは複数のB系列成長因子を発現している支持細胞との共培養；(3)1つもしくは複数のB細胞活性化因子の不在下もしくは存在下でのCD40Lを発現している支持細胞との共培養；(4)1つもしくは複数のB細胞活性化因子への曝露；または(1)～(4)の組み合わせに、培養期間にわたり曝露される。

【0289】

いくつかの態様では、B細胞プライミング因子は、B系列成長因子であることもできる。いくつかの態様では、B系列成長因子は、B細胞プライミング因子であることもできる。

【0290】

B細胞プライミング因子は、当技術分野において公知である。例えば、IL-3、Flt3リガンド、トロンボポエチン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)、IL-7、およびIL-11である。本明細書に使用される用語「B細胞プライミング因子」は、造血幹細胞および/またはリンパ球系前駆細胞のB系列発生への決定を支持または促進することができる任意の化合物を表す。化合物は、小分子、ポリペプチド、タンパク質、または核酸であることができる。本明細書記載の方法およびシステムに様々なB細胞プライミング因子を使用することができる。B細胞プライミング因子の例には、インターロイキン3(IL-3)、Flt3リガンド、トロンボポエチン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン7(IL-7)、インターロイキン11(IL-11)、抗ホスファターゼ(Sbfl)、およびメカノ成長因子(MGF)が非限定的に含まれる。当業者は、特定の事情に基づいて使用するためのB細胞プライミング因子の量を選択することができるであろう。一般的に、約1から約1000ng/mlのB細胞プライミング因子を本明細書記載の方法またはシステムに使用することができるが、しかし、典型的な状況では、約1から約100ng/mlのB細胞プライミング因子を使用することができる。しかし、いくつかの状況では、より多いまたはより少ない量のB細胞プライミング因子が使用され得る。1種よりも多いB細胞プライミング因子が使用される状況では、各B細胞プライミング因子の量は、同じ場合があり、または各B細胞プライミング因子の量は、相互に異なる場合がある。

【0291】

B細胞活性化因子は、当技術分野において公知である。例えば、CpG DNA、IL-2、IL-10、IL-15、IL-6、IFN、および抗CD40Lである。本明細書に使用される用語「B細胞活性化因子」は、ナイーブB細胞の活性化、好ましくはナイーブB細胞の抗原非依存性活性化を促進することができる任意の化合物を表す。B細胞活性化因子は、小分子、ポリペプチド、タンパク質または核酸であることができる。化合物がナイーブB細胞抗原非依存性活性化を刺激する能力を有するかどうかを判定するために従来方法を使用することができる。例えば、ヒト末梢血から単離されたナイーブB細胞の活性化について化合物を試験する

10

20

30

40

50

ことができる。B細胞活性化因子の非限定的な例には、CpG DNA；IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-15、IFNなどのサイトカイン；抗CD40L；および乳酸が含まれる。当業者は、特定の事情に基づきB細胞活性化因子の量を選択することができるであろう。一般的に、約1から約1000ng/mlのサイトカインB細胞活性化因子を本明細書記載の方法またはシステムに使用することができるが、しかし、典型的な状況では、約1から約150ng/ml、または約1から約100ng/mlのサイトカインB細胞活性化因子を使用することができる。しかし、いくつかの状況では、より多いまたはより少ない量が使用され得る。一般的に、約0.1から約5μMのCpG DNAを使用することができるが、しかし、典型的な状況では、約0.5から約4μM、または約1から約3.5μM、または約1.5から約3μM、または約2から約2.5μMのCpG DNAを使用することができる。1種よりも多いB細胞活性化因子が使用される状況では、各B細胞活性化因子の量は、同じ場合があり、または各B細胞活性化因子の量は、相互に異なる場合がある。

【0292】

B系列成長因子は、当技術分野において公知である。例えば、プレプロB細胞成長刺激因子(PPBSF)、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、インターロイキン3(IL-3)、Flt3リガンド、トロンボポエチン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン11(IL-11)、抗ホスファターゼ(Sbfl)、およびメカノ成長因子(MGF)である。本明細書に使用される用語「B系列成長因子」は、B系列発生の間にB細胞分化の1つまたは複数の段階を促進することができる任意の化合物を表す。B系列成長因子は、小分子、ポリペプチド、タンパク質、または核酸であることができる。B系列発生における段階の非限定的な例には、前駆B細胞から初期プロB細胞の段階、初期プロB細胞から後期プロB細胞の段階、後期プロB細胞からラージプレB細胞の段階、ラージプレB細胞からスマールプレB細胞の段階、スマールプレB細胞から未熟B細胞の段階、および未熟B細胞から成熟B細胞への段階が含まれる。B系列成長因子の例には、インターロイキン7(IL-7)、プレプロB細胞成長刺激因子(PPBSF)、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、インターロイキン3(IL-3)、Flt3リガンド、トロンボポエチン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン11(IL-11)、抗ホスファターゼ(Sbfl)、およびメカノ成長因子(MGF)が非限定的に含まれる。当業者は、特定の事情に基づきB系列成長因子の量を選択することができる。一般的に、約1から約1000ng/mlのB系列成長因子を本明細書記載の方法またはシステムに使用することができる。しかし、典型的な状況では、約1から約300ng/ml、約20から約200ng/ml、約50から約150ng/ml、約80から約150ng/mlのサイトカインB細胞活性化因子を使用することができる。しかし、いくつかの状況では、より多いまたはより少ない量のB系列成長因子が使用される場合がある。1つよりも多いB系列成長因子が使用される状況では、各B系列成長因子の量は、同じ場合があり、または各B系列成長因子の量は、相互に異なる場合がある。

【0293】

細胞分化目的で共培養に使用される支持細胞は、典型的にはストローマ細胞である。様々なストローマ細胞を本明細書記載の方法に使用することができる。ストローマ細胞株の例には、マウスMS5ストローマ細胞株；マウス骨髄由来ストローマ細胞株、例えばS10、S17、OP9およびBMS2細胞株；ヒト骨髄ストローマ細胞株、例えば米国特許第5,879,940号に記載されたものが非限定的に含まれる。この参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。支持細胞またはストローマ細胞は、1つまたは複数のB系列成長因子、例えば成長因子IL-7を発現する。

【0294】

細胞分化の状況で使用される場合の、本明細書に使用される用語「支持細胞またはストローマ細胞」は、複能性造血前駆細胞またはT細胞またはB細胞の成長、増殖、分化、または拡大のための微小環境を創出、促進、または支持することができる任意の細胞を表す。本明細書開示のシステムおよび方法に使用することができる適切な支持細胞には、ストロ

ーマ細胞および線維芽細胞が非限定的に含まれる。

【0295】

いくつかの態様では、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害された複能性造血前駆細胞は、1つまたは複数のB系列成長因子を発現している第1の支持細胞の集団と共に培養される。態様では、第1の支持細胞は、IL-7を発現することができる。別の態様では、第1の支持細胞は、IL-7と、プレプロB細胞成長刺激因子(PPBSF)、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、インターロイキン3(IL-3)、Flt3リガンド、トロンボポエチン、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン11(IL-11)、抗ホスファターゼ(Sbf1)、およびメカノ成長因子(MGF)より選択される少なくとも1つのB系列成長因子とを発現することができる。いくつかの態様では、1つまたは複数のB系列成長因子は、ヒト由来である。いくつかの態様では、1つまたは複数のB系列成長因子は、ヒト以外の哺乳動物由来である。いくつかの態様では、全てのB系列成長因子は、ヒト以外の哺乳動物由来である。

【0296】

B細胞系列へのエントリーおよび決定は、B細胞特異マーカーの出現によってモニターすることができる。多数の初期B系列マーカーが、当技術分野において公知である。例えば、プロB細胞は、CD19およびCD10の共発現(CD19+CD10+)ならびに代替軽鎖の発現欠如によって同定することができる。

【0297】

前駆細胞をB細胞に分化させる方法は、当技術分野において公知である。任意の方法を本明細書において使用して、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤を用いて予め阻害された多系列造血前駆細胞から操作免疫細胞を産生させることができる。例えば、米国特許第8034613号、同第8133727号、および同第8206979号、ならびに米国特許出願公開第20030152558号、同第20040029271号、同第20050153443号、同第20100047854号、同第2012004036号、同第20120040362号、および同第20140273211号である。これらの参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。

【0298】

人工多能性幹細胞

いくつかの態様では、本明細書記載の多能性幹細胞(PSC)は、単離された人工多能性幹細胞(iPSC)由来である。iPSCを使用する利点は、細胞が、最終的な免疫細胞が再導入されるのと同じ対象に由来することである。すなわち、人工多能性幹細胞にリプログラムされた対象から体細胞を得て、次に、対象に投与されるべき改変免疫細胞(例えば、自己由来細胞)にトランスフェクトおよび分化させることができる。前駆細胞は、本質的に自己供給源由来であるので、生着拒絶またはアレルギー応答のリスクは、別の対象または対象群からの細胞の使用と比較して低下する。いくつかの態様では、iPSCを生成させるための細胞は、非自己供給源由来である。加えて、iPSCの使用は、胚性供給源から得られた細胞の必要性を打ち消す。したがって、一態様では、開示された方法に使用されるPSCは、胚性幹細胞ではない。

【0299】

分化は、生理学的状況で一般的に不可逆的であるものの、体細胞を人工多能性幹細胞にリプログラムするために、いくつかの方法が最近開発されている。例示的な方法は、当業者に公知であり、本明細書下記に簡潔に説明されている。

【0300】

本明細書に使用される用語「リプログラミング」は、分化細胞(例えば体細胞)の分化状態を変化または逆戻りさせるプロセスを表す。別の言い方をすると、リプログラミングは、細胞の分化を、細胞のより未分化またはより原始的な型に駆動し戻すプロセスを表す。多数の初代細胞を培養状態に置くことで、完全分化の特徴をいくらかの喪失に導けることに留意すべきである。このように、分化細胞という用語に含まれるそのような細胞を単に培養することで、これらの細胞が非分化細胞(例えば、未分化細胞)または多能性細胞

10

20

30

40

50

になるわけではない。分化細胞から多能性への移行は、培養において分化特徴の部分的喪失に導く刺激を超えたリプログラミング刺激を必要とする。リプログラムされた細胞は、一般的に、培養中に限られた回数の分裂能のみを有する親の初代細胞と比較して、成長能を失わずに長期継代できるという特徴も有する。

【0301】

リプログラムされるべき細胞は、リプログラミング前に部分分化または最終分化のいずれかの状態であることができる。いくつかの態様では、リプログラミングは、分化細胞（例えば体細胞）から多能性状態または複能性状態への分化状態の完全な逆戻りを包含する。いくつかの態様では、リプログラミングは、分化細胞（例えば体細胞）の未分化細胞（例えば胚様細胞）への分化状態の完全または部分的逆戻りを包含する。リプログラミングは、その発現がリプログラミングにさらに寄与する細胞による特定の遺伝子の発現を招くことができる。本明細書記載のある特定の態様では、分化細胞（例えば体細胞）のリプログラミングは、未分化状態を装う分化細胞を生じる（例えば未分化細胞である）。結果として生じた細胞は、「リプログラミングされた細胞」または「人工多能性幹細胞（iPSCまたはiPS細胞）」と称される。

【0302】

リプログラミングは、細胞分化の間に起こる核酸修飾（例えばメチル化）、クロマチン凝縮、エピジェネティックな変化、ゲノムインプリンティングなどの遺伝性パターンのうちの少なくともいくつかの変質、例えば逆戻りを含むことができる。リプログラミングは、すでに多能性である細胞の既存の未分化状態を単に維持すること、またはすでに複能性細胞である細胞（例えば骨髄球系共通幹細胞）の既存の完全未満の分化状態を維持することは別個である。リプログラミングは、また、すでに多能性または複能性である細胞の自己複製または増殖を促進することは別個であるが、本明細書記載の組成物および方法は、いくつかの実施形態ではそのような目的のためにも有用であることができる。

【0303】

体細胞から多能性幹細胞を生成させる（広く「リプログラミング」と称される）ために使用される具体的なアプローチまたは方法は、請求された本発明に重要ではない。したがって、体細胞を多能性表現型にリプログラムする任意の方法が、本明細書記載の方法における使用のために適切である。

【0304】

所定の組み合わせの転写因子を使用して多能性細胞を生成するためのリプログラミング方法論は、体細胞から多能性幹細胞を誘導すると記載されている。山中および高橋は、Oct4、Sox2、Klf4、および任意でc-Mycの直接形質導入により、マウス体細胞を発生能が拡大したES細胞様細胞に変換した。山中および高橋の米国特許第8058065号および同第9045738号を参照されたい。iPSCは、多能性関連転写回路系およびエピジェネティックな景観の多くの回復しているので、ES細胞に似ている。加えて、マウスiPSCは、多能性：具体的には、3つの胚葉の細胞型へのインビトロ分化、奇形腫形成、キメラへの寄与、生殖細胞系列伝達、および四倍体相補性についての標準的アッセイを全て満足する。

【0305】

その後の研究は、類似の形質導入法を使用してヒトiPS細胞を得ることができることを示し、転写因子のトリオ：OCT4、SOX2、およびNANOGが、多能性を支配する転写因子のコアセットとして確立されている。iPS細胞の產生は、ウイルスベクターを使用して、幹細胞関連遺伝子をコードする核酸配列を成体細胞に導入することによって達成することができる。

【0306】

iPS細胞は、最終分化した体細胞、および成体幹細胞または体性幹細胞から生成または派生することができる。すなわち、非多能性前駆細胞をリプログラミングにより多能性または複能性にすることができる。そのような場合、最終分化した細胞をリプログラムするために必要である同じ数のリプログラミング因子を含む必要がない場合がある。さらに、リプログラミングは、リプログラミング因子の非ウイルス性導入によって、例えば、タン

10

20

30

40

50

パク質自身を導入すること、またはリプログラミング因子をコードする核酸を導入すること、または翻訳されるとリプログラミング因子を產生するメッセンジャーRNAを導入することによって、誘導することができる（例えば、Warren et al., *Cell Stem Cell*, 2010 Nov 5;7(5):618-30を参照されたく、この参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる）。リプログラミングは、例えばOct-4（Oct-3/4またはPouf51としても知られている）、Sox1、Sox2、Sox3、Sox15、Sox18、NANOG、Klf1、Klf2、Klf4、Klf5、NR5A2、c-Myc、I-Myc、n-Myc、Rem2、Tert、およびLIN28を含む幹細胞関連遺伝子をコードする核酸の組み合わせを導入することによって達成することができる。一態様では、本明細書記載の方法および組成物を使用するリプログラミングは、Oct-3/4、Soxファミリーのメンバー、Klfファミリーのメンバー、およびMycファミリーのメンバーのうちの1つまたは複数を体細胞に導入することをさらに含むことができる。一態様では、本明細書記載の方法および組成物は、Oct4、Sox2、Nanog、c-MYCおよびKlf4のそれぞれの1つまたは複数をリプログラミングのために導入することをさらに含む。上述のように、リプログラミングのために使用される正確な方法は、本明細書記載の方法および組成物に必ずしも重要ではない。しかし、リプログラミングされた細胞から分化した細胞が、例えばヒトの治療に使用されるとすれば、一態様では、リプログラミングは、ゲノムを変化させる方法によって影響を受けない。したがって、そのような態様では、リプログラミングは、例えばウイルスまたはプラスミドベクターを使用せずに、達成される。

【0307】

出発細胞集団から得られるリプログラミングの効率（すなわち、リプログラミングされた細胞の数）は、Shi, Y., et al (2008) *Cell-Stem Cell* 2:525-528, Huangfu, D., et al (2008) *Nature Biotechnology* 26(7):795-797、およびMarson, A., et al (2008) *Cell-Stem Cell* 3:132-135によって示されるように様々な小分子の添加によって強化することができる。この参考文献は、その全体で参照により本明細書に組み入れられる。したがって、人工多能性幹細胞産生の効率または速度を高める薬剤または薬剤の組み合わせを、患者特異的または疾患特異的iPSCの產生に使用することができる。リプログラミング効率を高める薬剤のいくつかの非限定的な例には、とりわけ、可溶性Wnt、Wnt馴化培地、BIX-01294（G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ）、PD0325901（MEK阻害剤）、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤、バルプロ酸、5'-アザシチジン、デキサメタゾン、スペロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA）、ビタミンC、およびトリコスタチン（TSA）が含まれる。

【0308】

リプログラミング増強剤の他の非限定的な例には、スペロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA（例えば、MK0683、ボリノstatt）および他のヒドロキサム酸）、BML-210、デブデシン（例えば、(-)-デブデシン）、HC毒素、ヌルスクリプト（Nullscript）（4-(1,3-ジオキソ-1H,3H-ベンゾ[デ]イソキノリン-2-イル)-N-ヒドロキシブタノアミド）、フェニル酪酸塩（例えば、フェニル酪酸ナトリウム）およびバルプロ酸（（VPA）および他の短鎖脂肪酸）、スクリプタイト、スラミンナトリウム、トリコスタチンA（TSA）、APHAコンパウンド8、アピシジン、酪酸ナトリウム、ピバロイルオキシメチルブチレート（ピバネクス（Pivanex）、AN-9）、トラポキシンB、クラミドシン、デブシペプチド（FR901228またはFK228としても知られる）、ベンズアミド（例えば、CI-994（例えば、N-アセチルジナリン）およびMS-27-275）、MGCD0103、NVP-LAQ-824、CBHA（m-カルボキシケイ皮酸ビスヒドロキサム酸）、JNJ16241199、ツバシン（Tubacin）、A-161906、プロキサミド、オキサムフラチン、3-CI-UCHA（例えば、6-(3-クロロフェニルウレイド)カブロイックヒドロキサム酸）、AOE（2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシデカン酸）、CHAP31およびCHAP50が含まれる。他のリプログラミング増強剤には、例えば、HDACの優性ネガティブ型（例えば、触媒不活性型）、HDACのsiRNA阻害剤、およびHDACと特異的に結合する抗体が含まれる。そのような阻害剤は、例えば、B IOMOL International、Fukasawa、Merck Biosciences、Novartis、Gloucester Pharmaceuticals、Aton Pharma、Titan Pharmaceuticals、Schering AG、Pharmio

10

20

30

40

50

n、MethylGene、およびSigma Aldrichから入手可能である。

【0309】

本明細書記載の方法で使用するための多能性幹細胞の誘導を確認するために、単離されたクローンを幹細胞マーカーの発現について試験することができる。体細胞から派生した細胞におけるこのような発現で、細胞が人工多能性幹細胞と同定される。幹細胞マーカーは、SSEA3、SSEA4、CD9、Nanog、Fbx15、Ecat1、Esg1、Eras、Gdf3、Fgf4、Cripto、Dax1、Zpf296、Slc2a3、Rex1、Utf1、およびNat1を含む非限定的な群より選択することができる。一態様では、Oct4またはNanogを発現する細胞は、多能性と同定される。そのようなマーカーの発現を同定するための方法は、例えばRT-PCRおよびウエスタンプロットまたはフローサイトメトリー分析などの、コードされるポリペプチドの存在を検出する免疫学的方法を含むことができる。いくつかの態様では、検出は、RT-PCRを伴うのみでなく、タンパク質マーカーの検出も含む。細胞内マーカーは、RT-PCRを介して最良に同定され得るのに対し、細胞表面マーカーは、例えば免疫細胞化学的検査によって容易に同定される。

10

【0310】

単離された細胞の多能性幹細胞の特徴は、iPSCが3つの胚葉のそれぞれの細胞に分化する能力を評価する試験によって確認することができる。一例として、ヌードマウスにおける奇形腫の形成を用いて、単離されたクローンの多能性特徴を評価することができる。細胞は、ヌードマウスに導入され、細胞から生じる腫瘍に組織学的検査および/または免疫組織化学的検査が行われる。3つの胚葉の全てからの細胞を含む腫瘍の成長は、例えば、細胞が多能性幹細胞であることをさらに示す。

20

【0311】

多数の米国特許および米国特許出願公開が、iPSCを生成させる方法および関連する主題を教示および説明している。例えば米国特許第9347044号、同第9347042号、同第9347045号、同第9340775号、同第9341625号、同第9340772、9250230号、同第9132152号、同第9045738号、同第9005975号、同第9005976号、同第8927277号、同第8993329号、同第8900871号、同第8852941号、同第8802438号、同第8691574号、同第8735150号、同第8765470号、同第8058065号、同第8048675号、ならびに米国特許出願公開第20090227032号、同第20100210014号、同第20110250692号、同第20110201110号、同第20110200568号、同第20110306516号、同第20100021437号、同第20110256626号、同第20110044961号、同第20120276070号、同第20120263689号、同第20120128655号、同第20120100568号、同第20130295064号、同第20130029866号、同第20130189786号、同第20130295579号、同第20130130387号、同第20130157365号、同第20140234973号、同第20140227736号、同第20140093486号、同第20140301988号、同第20140170746号、同第20140178989号、同第20140349401号、同第20140065227号、および同第20150140662号である。これらの参考文献は、それらの全体で参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0312】

リプログラミング用の体細胞

40

体細胞は、この用語が本明細書において使用される場合、生殖系列細胞を除く、生物の身体を形成する任意の細胞を表す。精子および卵子、それらが作られる元となる細胞（生殖母細胞）、ならびに未分化幹細胞を除けば、哺乳動物の身体におけるあらゆる細胞型が、分化体細胞である。例えば、内臓、皮膚、骨、血液、および結合組織は、全て、分化体細胞でできている。

【0313】

本明細書記載の組成物および方法で使用するための追加的な体細胞型は、線維芽細胞（例えば、初代線維芽細胞）、筋肉細胞（例えば、筋細胞）、卵丘細胞、神経細胞、乳腺細胞、肝細胞および胰島細胞を含む。いくつかの態様では、体細胞は、初代細胞株または初代もしくは二次細胞株の子孫である。いくつかの態様では、体細胞は、ヒト試料から、例

50

えば、毛包、血液試料、生検（例えば、皮膚生検、または脂肪生検）、スワップ試料（例えば、口腔スワップ試料）から得られ、このため、ヒト体細胞である。

【 0 3 1 4 】

分化体細胞のいくつかの非限定的な例には、上皮細胞、内皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、心細胞、骨格筋細胞、皮膚細胞、免疫細胞、肝細胞、脾細胞、肺細胞、末梢循環血液細胞、消化管細胞、腎細胞、骨髄細胞、および膵細胞が、非限定的に含まれる。いくつかの態様では、体細胞は、脳、肝臓、消化管、胃、腸管、脂肪、筋肉、子宮、皮膚、脾臓、内分泌器官、骨などを非限定的に含む、任意の体細胞組織から単離された初代細胞であることができる。さらに、体細胞は、任意の哺乳動物種由来であることができ、その非限定的な例には、マウス、ウシ、サル、ブタ、ウマ、ヒツジ、またはヒト細胞が含まれる。いくつかの態様では、体細胞は、ヒト体細胞である。

10

【 0 3 1 5 】

リプログラムされた細胞を、疾患の治療的処置に使用されるべき甲状腺前駆細胞の作製に使用する場合、処置される患者から単離された体細胞を使用することが望ましいが、必ずしもその必要はない。例えば、疾患に関する体細胞、疾患の治療的処置に関する体細胞などを使用することができる。いくつかの態様では、リプログラムされた細胞とそれらが派生または作製される元となった体細胞を含む不均一な集団からリプログラムされた細胞を選択するための方法は、任意の公知の手段によって行うことができる。例えば、選択マーカー遺伝子のような薬物耐性遺伝子などを使用して、指標として選択マーカーを使用してリプログラムされた細胞を単離することができる。

20

【 0 3 1 6 】

本明細書開示のリプログラムされた体細胞は、アルカリホスファターゼ (AP) ; ABCG2 ; ステージ特異的胚抗原-1 (SSEA-1) ; SSEA-3 ; SSEA-4 ; TRA-1-60 ; TRA-1-81 ; Tra-2-49/6E ; ERas/ECAT5、E-カドヘリン；-III-チューブリン；-平滑筋アクチン (-SMA)；線維芽細胞成長因子4 (Fgf4)、Cripto、Dax1；ジンクフィンガータンパク質296 (Zfp296)；N-アセチルトランスフェラーゼ-1 (Nat1)；(ES細胞関連転写物1 (ECAT1)；ESG1/DPPA5/ECAT2；ECAT3；ECAT6；ECAT7；ECAT8；ECAT9；ECAT10；ECAT15-1；ECAT15-2；Fthl17；Sal14；未分化胚細胞転写因子 (Utf1)；Rex1；p53；G3PDH；TERTを含むテロメラーゼ；サイレントX染色体遺伝子；Dnmt3a；Dnmt3b；TRIM28；F-ボックス含有タンパク質15 (Fbx15)；Nanog/ECAT4；Oct3/4；Sox2；Kif4；c-Myc；Esrrb；TDGF1；GABRB3；Zfp42、FoxD3；GDF3；CYT25A1；発生多能性関連2 (DPPA2)；T細胞リンパ腫切断点1 (Tcl1)；DPPA3/SteIIa；DPPA4；多能性に関する他の一般的マーカーなどを含む、任意の数の多能性細胞マーカーを発現することができる。他のマーカーは、Dnmt3L；Sox15；Stat3；Grb2；-カテニン、およびBmi1を含むことができる。そのような細胞は、また、人工多能性幹細胞が派生する元となる体細胞の特徴であるマーカーの下方調節によって特徴づけることができる。

30

【 0 3 1 7 】

多能性幹細胞から派生した操作免疫細胞の使用

一態様では、本明細書記載の方法によって産生された操作免疫細胞の集団が、本明細書に提供され、その際、細胞中には、転写因子 : ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含み、ならびに任意で転写因子 : SOX4およびMYBのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含み、または転写因子 : DACH1およびNFI Aのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含み、または転写因子 : SOX4、MYB、DACH1およびNFI Aのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。一態様では、細胞集団は、薬学的に許容される担体をさらに含む。これらの操作免疫細胞を培養拡大して、使用のための細胞数を増加させることができる。

40

【 0 3 1 8 】

本明細書記載の操作免疫細胞は、生物学的研究のための実験室で有用である。例えば、これらの細胞は、遺伝性疾患または欠陥を有する個体由来であることができ、疾患または

50

欠陥の生物学的局面を研究するため、および疾患または欠陥のための潜在的治療薬についてスクリーニングおよび試験するために実験室で使用することができる。

【0319】

あるいは、本明細書記載の操作免疫細胞は、その必要のある対象における細胞補充治療および他の医学的処置に有用である。例えば、化学療法または照射または両方を受けたことがあり、かつ免疫機能および／もしくはリンパ球再構成に欠陥が明らかな患者、またはがん免疫療法が不完全であったことが明らかな患者である。

【0320】

様々な態様では、本明細書記載の操作免疫細胞は、細胞補充治療を必要とする対象に投与される（すなわち、植え込まれる、または移植される）。

10

【0321】

一態様では、対象における細胞補充治療、またはがん、自己免疫障害、血液疾患、もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための方法であって、(a)ドナー対象から体細胞を提供する段階、(b)前述のパラグラフのいずれか記載の体細胞由来の骨髄球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞を生成させる段階；(c)前述のパラグラフのいずれか記載の、結果として生じた多系列造血前駆細胞の集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；(d)前述のパラグラフのいずれか記載のリンパ球系列への分化を促進するために、notchリガンドまたはストローマ細胞または両方の存在下で、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団を分化させる段階、ならびに(e)結果として生じた分化したリンパ球系細胞をレシピエント対象に植え込むかまたは投与する段階を含む方法が、本明細書に提供される。

20

【0322】

上記処置方法の一態様では、ホスト対象およびレシピエント対象は、同じ個体である。

【0323】

上記処置方法の一態様では、ホスト対象およびレシピエント対象は、同じ個体ではないが、少なくともHLA適合性である。

【0324】

血液疾患は、主として血液に影響を及ぼす障害である。非限定的なこのような疾患または障害には、異常ヘモグロビン症（ヘモグロビン分子またはヘモグロビン合成速度の先天性異常）、例えば、鎌状赤血球症、サラセニア、およびメトヘモグロビン血症などの骨髄球系由来障害；貧血（赤血球またはヘモグロビンの欠乏）、悪性貧血；骨髄異形成症候群、好中球減少症（好中球数の減少）、および血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、血小板増加症、血液悪性腫瘍、例えばリンパ腫、骨髄腫、および白血病などの細胞数の減少を招く障害が含まれる。ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、および血管免疫芽細胞性T細胞リンパ腫（AITL）などのリンパ腫；多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞腫などの骨髄腫；急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性特発性骨髄線維症（MF）、慢性骨髄性白血病（CML）、T細胞前リンパ球性白血病（T-PLL）、B細胞前リンパ球性白血病（B-PLL）、慢性好中球性白血病（CNL）、ヘアリー細胞白血病（HCL）、T細胞大型顆粒リンパ球白血病（T-LGL）、および侵攻性NK細胞白血病などの欠陥WBCを増加させる白血病が含まれる。

30

【0325】

糖尿病、関節リウマチおよび多発性硬化症などの自己免疫性疾患。

【0326】

本明細書に使用される用語「投与すること」、「導入すること」および「移植すること」は、所望の効果が生じるように、損傷または修復部位などの所望の部位で、導入された細胞の少なくとも部分的な局在を招く方法または経路による、対象への記載された細胞、例えば造血前駆細胞の配置の文脈において互換的に使用される。細胞、例えば造血前駆細胞、またはそれらの分化した子孫は、植え込まれた細胞または細胞の成分の少なくとも一

40

50

部が生存可能なままである、対象内の所望の位置への送達を招く任意の適切な経路によって投与することができる。

【0327】

様々な態様では、本明細書記載の操作免疫細胞は、対象への投与前に任意でエクスピボで拡大される。他の態様では、操作免疫細胞は、任意でしばらくの間凍結保存され、次に対象への投与前に解凍される。

【0328】

細胞補充治療のために使用される操作免疫細胞は、細胞のレシピエントに対して自己由来／自源性（「自己（self）」）または非自己由来（「非自己（non-self）」、例えば、同種、同系または異種）であることができる。本明細書に使用される「自己由来」は、同じ対象からの細胞を表す。本明細書に使用される「同種」は、比較されている細胞と遺伝的に異なる同じ種の細胞を表す。本明細書に使用される「同系」は、比較される細胞と遺伝的に同一である、異なる対象の細胞を表す。本明細書に使用される「異種」は、比較される細胞と異なる種の細胞を表す。好ましい態様では、本発明の細胞は、同種である。

10

【0329】

様々な態様では、それを必要とする対象に植え込まれるべき本明細書記載の操作免疫細胞は、対象に対して自己由来または同種である。

【0330】

様々な態様では、本明細書記載の操作免疫細胞は、1つもしくは複数のドナー由来であることができるか、または自己由来供給源から得ることができる。本明細書記載の局面のいくつかの態様では、操作免疫細胞は、それを必要とする対象に投与する前に培養して拡大される。

20

【0331】

様々な態様では、本明細書記載の操作免疫細胞は、1つもしくは複数のドナー由来であることができるか、または自己由来供給源から得ることができる。

【0332】

様々な態様では、植え込み前に、レシピエント対象は、化学療法および／または放射線で処置される。

【0333】

一態様では、化学療法および／または放射線は、内因性幹細胞を減少させて、植え込み後の細胞の生着を促すためのものである。

30

【0334】

様々な態様では、植え込み前に、操作免疫細胞または阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞は、レシピエント対象におけるその後の生着を促進するために、プロスタグランジンE2および／または抗酸化剤N-アセチル-L-システイン（NAC）を用いてエクスピボで処置される。

【0335】

様々な態様では、レシピエント対象は、ヒトである。

【0336】

様々な態様では、対象は、HIVもしくは他のウイルス疾患、血液疾患と診断されているか、またはがんの処置を受けている。

40

【0337】

本明細書記載の任意の方法、細胞および組成物の一局面では、対象は、iPSCおよび本明細書記載の操作免疫細胞を產生するために使用される体細胞を供与するように選択される。一態様では、選択された対象は、遺伝性疾患または欠陥を有する。

【0338】

様々な態様では、ドナー対象は、ヒトである。

【0339】

様々な態様では、ドナーまたはレシピエント対象は、動物、ヒトまたは非ヒト、およびげっ歯動物または非げっ歯動物である。例えば、対象は、任意の哺乳動物、例えば、ヒト

50

、他の靈長類、ブタ、マウスもしくはラットなどのげっ歯動物、ウサギ、モルモット、ハムスター、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジもしくはヤギ、またはトリなどの非哺乳動物であることができる。

【0340】

様々な態様では、ドナーまたはレシピエント対象は、HIV、血液疾患またはがんと診断されている。

【0341】

本明細書記載の任意の方法、細胞および組成物の一局面では、生物学的試料または胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞の集団は、ドナー対象から得られる。

10

【0342】

様々な態様では、生物学的試料または本明細書記載の胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞の集団は、1つもしくは複数のドナーに由来することができるか、または自己由来供給源から得ることができる。

【0343】

一態様では、胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞は、ドナー対象から単離され、トランスフェクトされ、培養され（任意で）、同じ対象に移植し戻され、すなわち自己由来細胞移植片である。ここで、ドナーおよびレシピエント対象は、同じ個体である。別の態様では、胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、または造血前駆細胞は、対象（レシピエント）とHLA型がマッチするドナーから単離される。ドナー-レシピエント抗原型のマッチングは、当技術分野において周知である。HLA型は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-Dを含む。これらは、移植のために必要な最小数の細胞表面抗原マッチングに相当する。すなわち、トランスフェクトされた細胞は、異なる対象に移植される、すなわち、レシピエントホスト対象に対して同種である。ドナーまたは対象の胚性幹細胞、体性幹細胞、前駆細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、または造血前駆細胞を、本明細書記載の核酸分子を含むベクターまたは核酸でトランスフェクトすることができ、トランスフェクトされた細胞が培養され、阻害され、開示のように分化し、任意で拡大され、次にレシピエント対象に移植される。一態様では、移植後の操作免疫細胞は、レシピエント対象に生着する。一態様では、移植後の操作免疫細胞は、レシピエント対象における免疫システムを再構成する。トランスフェクトされた細胞を、また、トランスフェクト後に凍結保存して貯蔵されるか、または細胞拡大後に凍結保存して貯蔵することができる。

20

【0344】

操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞は、骨髄除去療法を受けたかまたは受けていない個体における骨髄または臍帯血移植片の部分として投与される場合がある。一態様では、本明細書において考えられる遺伝的改变細胞は、化学除去（chemoablative）または放射線除去（radioablative）骨髄療法を受けた個体への骨髄移植において投与される。

30

【0345】

一態様では、細胞の1用量は、対象に静脈内送達される。一態様では、細胞は、対象に静脈内投与される。

40

【0346】

特定の態様では、患者は、本明細書記載の改变細胞、例えば、操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞の1用量を、約 1×10^5 個/kg、約 5×10^5 個/kg、約 1×10^6 個/kg、約 2×10^6 個/kg、約 3×10^6 個/kg、約 4×10^6 個/kg、約 5×10^6 個/kg、約 6×10^6 個/kg、約 7×10^6 個/kg、約 8×10^6 個/kg、約 9×10^6 個/kg、約 1×10^7 個/kg、約 5×10^7 個/kg、約 1×10^8 個/kg、またはより大きい単回静脈内用量で受ける。

【0347】

ある特定の態様では、患者は、本明細書記載の改变細胞、例えば、操作免疫細胞または

50

ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞の1用量を、少なくとも 1×10^5 個/kg、少なくとも 5×10^5 個/kg、少なくとも 1×10^6 個/kg、少なくとも 2×10^6 個/kg、少なくとも 3×10^6 個/kg、少なくとも 4×10^6 個/kg、少なくとも 5×10^6 個/kg、少なくとも 6×10^6 個/kg、少なくとも 7×10^6 個/kg、少なくとも 8×10^6 個/kg、少なくとも 9×10^6 個/kg、少なくとも 1×10^7 個/kg、少なくとも 5×10^7 個/kg、少なくとも 1×10^8 個/kg、またはより大きい単回静脈内用量で受ける。

【0348】

追加的な態様では、患者は、本明細書記載の改変細胞、例えば、操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞の1用量を、約 1×10^5 個/kgから約 1×10^8 個/kg、約 1×10^6 個/kgから約 1×10^8 個/kg、約 1×10^6 個/kgから約 9×10^6 個/kg、約 2×10^6 個/kgから約 8×10^6 個/kg、約 2×10^6 個/kgから約 8×10^6 個/kg、約 2×10^6 個/kgから約 5×10^6 個/kg、約 3×10^6 個/kgから約 5×10^6 個/kg、約 3×10^6 個/kgから約 4×10^8 個/kg、または任意の介在する個/kgの用量で受ける。

【0349】

一般的に、本明細書記載の操作免疫細胞またはヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害されたリバース系列の多系列造血前駆細胞は、薬学的に許容される担体との懸濁物として、例えば治療用組成物として投与される。治療用組成物は、生理学的に耐容性の担体を、細胞組成物および任意で活性成分としてその中に溶解または分散した本明細書記載の少なくとも1種の追加的な生物活性剤と一緒に含有する。好ましい態様では、治療用組成物は、そう望まれないかぎり、治療目的で哺乳動物またはヒト患者に投与されたときに、実質的に免疫原性でない。当業者は、細胞組成物中に使用されるべき薬学的に許容される担体が、緩衝剤、化合物、凍結保存剤、保存剤、または他の薬剤を、対象に送達されるべき細胞の生存度を実質的に妨害する量で含まないことを認識している。細胞を含む製剤は、例えば、細胞膜の完全性を維持させる浸透圧緩衝剤、および任意で細胞生存度を維持するかまたは投与時の生着を高めるための栄養素を含むことができる。そのような製剤および懸濁物は、当業者に公知であり、かつ/または日常的な実験を使用して本明細書記載の細胞を用いた使用のために適応させることができる。

【0350】

組成物、担体、希釈剤および試薬を表すときに本明細書に使用される用語「薬学的に許容される」、「生理学的に耐容性の」およびその文法的変形は、互換的に使用され、恶心、めまい、胃もたれなどの望まれない生理作用を生じずにこれらの物質を哺乳動物に投与できることを表す。薬学的に許容される担体は、そう望まれないかぎり、混和される薬剤に対する免疫応答の発生を促進しない。その中に溶解または分散された活性成分を含有する薬理学的組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されており、製剤に基づき限定される必要はない。典型的には、そのような組成物は、液体溶液または懸濁物のいずれかとして注射用に調製されるが、使用前に液体中に溶解または懸濁するために適した固体剤形も調製することができる。調製物を乳化させるかまたはリポソーム組成物として提示することもできる。薬学的に許容され、活性成分と適合性で、本明細書記載の治療方法における使用に適した量の賦形剤と、活性成分を混合することができる。適切な賦形剤には、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびその組み合わせが含まれる。加えて、所望であれば、組成物は、活性成分の有効性を高める湿潤または乳化剤、pH緩衝剤などの少量の補助物質を含有することができる。本発明の治療用組成物は、その中の成分の薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される塩には、例えば、塩酸もしくはリン酸のような無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸によって形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基によって形成される）が含まれる。遊離カルボキシル基によって形成される塩も同様に、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来することができる。生理学的に耐容性の担体

10

20

30

40

50

は、当技術分野において周知である。例示的な液体担体は、活性成分および水の他に材料を含有しないか、または生理的pH値のリン酸ナトリウムのような緩衝液、生理食塩水またはリン酸緩衝食塩水のような両方を含有する無菌水溶液である。なおさらに、水性担体は、1つよりも多い緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウムのような塩、デキストロース、ポリエチレンギリコール、ならびに他の溶質も含有することができる。液体組成物はまた、水に加えておよび水を除く液相を含有することができる。そのような追加的な液相の例は、グリセリン、綿実油のような植物油、および水-油エマルションである。特定の障害または状態の処置において有効である本明細書記載の方法で使用される活性薬剤の量は、障害または状態の性質に依存すると考えられ、標準的な臨床技法によって判定することができる。適切な薬学的担体は、本技術分野の標準的な参考教科書であるRemington's Pharmaceutical Sciences, A. Osolに記載されている。例えば、注射による投与に適した非経口組成物は、0.9%塩化ナトリウム溶液中に1.5重量%の活性成分を溶解することによって調製される。

【0351】

一態様では、「薬学的に許容される」担体は、インビトロ細胞培養培地を含まない。

【0352】

いくつかの態様では、記載された操作免疫細胞の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。一態様では、薬学的に許容される担体は、組織または細胞培養培地を含まない。

【0353】

様々な態様では、2回目またはその後の用量の細胞がレシピエント対象に投与される。例えば、2回目およびその後の投与は、以前の投与から約1日から30週間の間に与えることができる。2、3、4回またはより多い合計投与を必要に応じて個体に送達することができる。

【0354】

細胞組成物は、対象において有効な細胞補充処置を招く任意の適切な経路により投与することができる、すなわち、投与は、組成物の少なくとも一部が送達される、対象における所望の位置への送達を招く、すなわち、少なくとも 1×10^4 個の細胞が、ある期間にわたり所望の部位に送達される。投与様式は、注射、注入、または点滴注入を含み、「注射」は、静脈内、動脈内、脳室内、心臓内注射および注入を非限定的に含む。細胞の送達のために、注射または注入による投与が、一般的に好ましい。

【0355】

効力の試験は、本明細書記載の方法を使用する処置の経過途中で行うことができる。処置の開始前に、および次に処置開始後のその後の特定の期間に、特定の病気に関連するいくつかの症状の重症度の測定値が記録される。

【0356】

本発明を、以下の番号付き項目のいずれかにおいて定義することができる。

- [1]. a. 骨髄球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞を生成させる段階；
- b. 結果として生じた多系列造血前駆細胞集団におけるヒストンメチルransフェラーゼを阻害する段階；および
- c. リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団をnotchリガンドまたはストローマ細胞または両方の存在下で分化させる段階を含む、方法。

[2]. a. 以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にインビトロでransフェクトする段階であって、ransフェクトされた細胞において該転写因子が発現されて、骨髄球系および赤血球系分化能(potential)を有する多系列造血前駆細胞集団を產生させる、段階；

 b. リンパ球系分化能を拡大するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団におけるヒストンメチルransフェラーゼを阻害する段階；ならびに

 c. リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞

10

20

30

40

50

集団をnotchリガンドまたは支持ストローマ (supportive stroma) または両方の存在下で分化させる段階を含む、方法。

[3]. 多系列造血前駆細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、RORAのそれぞれを骨髄球系前駆細胞にインピトロで導入することによって產生される、項目1の方法。

[4]. 転写因子：SOX4およびMYBの外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトする段階をさらに含む、項目2または3の方法。

[5]. 転写因子：NFIAおよびDACH1の外因性遺伝子コーディングコピーを骨髄球系前駆細胞にトランスフェクトする段階をさらに含む、項目2、3、または4の方法。

[6]. 骨髄球系前駆細胞が、CD34+ CD45+である、項目1～5のいずれかの方法。

[7]. 多系列造血前駆細胞が、CD34+ CD38陰性／低発現である、項目1～6のいずれかの方法。

[8]. 骨髄球系前駆細胞が、多能性幹細胞集団由来の胚様体前駆細胞である、項目1～7のいずれかの方法。

[9]. 多能性幹細胞集団が、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) または胚性幹細胞 (ESC) である、項目8の方法。

[10]. 人工多能性幹細胞が、リプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4のみ、ならびに任意でc-MYCまたはnanogおよびLIN28を成熟細胞に導入することによって產生される、項目9の方法。

[11]. 成熟細胞が、Bリンパ球 (B細胞)、Tリンパ球 (T細胞)、線維芽細胞、およびケラチノサイトからなる群より選択される、項目10の方法。

[12]. 人工多能性幹細胞が、リプログラミング因子を成熟細胞に2回以上導入することによって產生される、項目9、10または11の方法。

[13]. notchリガンドが、Delta-like-1、Delta-like-4、およびヒトIgG1のFcドメインと融合したヒトDelta-like-1の細胞外ドメインからなる固定化Delta1^{ext}-IgGからなる群より選択される、項目1～12のいずれかの方法。

[14]. 多系列造血前駆細胞を固定化Delta1^{ext}-IgG、OP9-DL1細胞またはOP9-DL4細胞と共に培養することによって、Delta-like-1またはDelta-like-4が供給される、項目13の方法。

[15]. ヒストンメチルトランスフェラーゼが、ヒストン3リシン残基9 (H3K9) および／またはヒストン3リシン残基27 (H3K27) へのメチル基の付加を触媒する、項目1～14のいずれかの方法。

[16]. ヒストンメチルトランスフェラーゼH3K9および／またはH3K27が、小分子または核酸によって阻害される、項目15の方法。

[17]. ヒストンメチルトランスフェラーゼH3K9および／またはH3K27小分子阻害剤が、約10,000グラム／モル未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、または該化合物の塩もしくはエステルもしくは他の薬学的に許容される形態、ペプチド、ペプチド模倣薬、アミノ酸、アミノ酸類似体、ヌクレオチド、またはヌクレオチド類似体である、項目16の方法。

[18]. ヒストンメチルトランスフェラーゼH3K9および／またはH3K27小分子阻害剤が、ヘテロ有機 (heterorganic) 化合物または有機金属化合物である、項目16または17の方法。

[19]. 小分子阻害剤が、BIX-01294、UNC0638、E72、BRD4770、A-366、ケトシン、UNC0224、UNC0631、UNC0646、EPZ005687、EPZ-6438 (E7438)、3-デアザネプラノシンA (DZNep)、EI1、GSK343、GSK126、およびUNC1999からなる群より選択される、項目16～18のいずれかの方法。

[20]. 核酸阻害剤が、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を標的とする核酸である、項目16の方法。

[21]. 核酸阻害剤が、RNA干渉阻害剤またはRNA干渉剤である、項目16または17の方法。

[22]. 核酸阻害剤が、EZH1と結合するアブタマー、EZH1特異的RNA干渉剤、またはEZ

10

20

30

40

50

H1特異的RNA干渉剤をコードするベクターからなる群より選択されるEZH1特異的核酸であり、

該RNA干渉剤が、SEQ ID NO：1～5、27～30からなる群より選択されるヌクレオチド配列のうちの1つまたは複数を含む、
項目21の方法。

[23]. 項目1～22のいずれかの方法によって產生される、免疫細胞。

[24]. 以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性コピーを含む、骨髓球系前駆細胞集団由来の免疫細胞。

[25]. 以下のリプログラミング因子：SOX4およびMYBのそれぞれの外因性コピーをさらに含む、項目24の免疫細胞。

[26]. 以下のリプログラミング因子：NFIAおよびDACH1のそれぞれの外因性コピーをさらに含む、項目24または25の免疫細胞。

[27]. 以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4、および任意でc-MYCのそれぞれの外因性コピーをさらに含む、項目24、25または26の免疫細胞。

[28]. ネイティブなT細胞受容体（TCR）遺伝子座を除去するため、クラスIもしくはクラスII主要組織適合抗原複合体もしくは両方を欠失させるため、非古典的HLA-GもしくはHLA-Eもしくは両方を発現させるため、またはその中の内因性HLAを編集するために、さらに遺伝的に改変されている、項目24～27のいずれかの免疫細胞。

[29]. 項目23～28のいずれかの免疫細胞の集団を含む、組成物。

[30]. 薬学的に許容される担体をさらに含む、項目29の組成物。

[31]. 項目23～28のいずれかの免疫細胞の集団と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

[32]. 対象における細胞補充治療において使用するための、項目31の薬学的組成物。

[33]. a. 項目2～12の方法により、骨髓球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞を生成させる段階；

b. 項目15～22の方法により、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；

c. 項目13～14の方法により、リンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞集団をnotchリガンドまたは支持ストローマまたは両方の存在下で分化させる段階；および

d. 結果として生じた多系列造血前駆細胞をホストに移植する段階

を含む、ホストにおける造血細胞のインビポ生着を改善するエクスピボまたはインビトロの方法。

[34]. 項目23～28の免疫細胞の集団、または項目29～30の組成物、または項目31～32の薬学的組成物をレシピエント対象に投与する段階を含む、細胞補充治療または免疫療法を必要とする対象における細胞補充治療または免疫療法の方法。

[35]. 対象が、化学療法または照射または両方を受けたことがあり、かつ免疫機能もしくはリンパ球再構成における欠陥、または免疫機能およびリンパ球再構成の両方における欠陥が明らかな患者である、項目34の細胞補充治療の方法。

[36]. 対象への植え込み前に、免疫細胞が、レシピエント対象におけるその後の生着を促進するために、プロスタグランジンE2および/または抗酸化剤N-アセチル-L-システイン（NAC）でエクスピボで処理される、項目34または35の細胞補充治療の方法。

[37]. 免疫細胞が、レシピエント対象に対して自己由来である、またはレシピエント対象と少なくともHLA型がマッチする、項目34または35の細胞補充治療の方法。

[38]. 増大したリンパ球系列分化能を含む逆戻り系列を有する、改変または操作骨髓球系前駆細胞。

[39]. 増大したリンパ球系列分化能を含む逆戻り系列を有する改変または操作骨髓球系前駆細胞を含む組成物。

[40]. 記載された改変免疫細胞の製造/產生において使用するための、改変骨髓球系前駆細胞または改変もしくは操作骨髓球系前駆細胞を含む組成物であって、改変骨髓球系前駆

10

20

30

40

50

細胞が、逆戻り系列を有し、かつ増大したリンパ球系列分化能を有し、改変骨髄球系前駆細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、改変骨髄球系前駆細胞または組成物。

[41]. 細胞補充治療における使用のため、またはがん、自己免疫障害、血液疾患、もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための、改変骨髄球系前駆細胞または改変もしくは操作骨髄球系前駆細胞を含む組成物であって、改変骨髄球系前駆細胞が、逆戻り系列を有し、かつ増大したリンパ球系列分化能を有し、改変骨髄球系前駆細胞が、以下の転写因子：ERG、HOXA9、およびRORAのそれぞれの外因性遺伝子コーディングコピーを含む、改変骨髄球系前駆細胞または組成物。

[42]. 項目38～41の改変骨髄球系前駆細胞は、SOX4、またはMYB、またはSOX4およびMYBの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。 10

[43]. 項目38～42の改変骨髄球系前駆細胞は、DACH1、またはNFIA、またはDACH1およびNFIAの両方の外因性遺伝子コーディングコピーをさらに含む。

[44]. 項目38～43の改変骨髄球系前駆細胞は、系列限定CD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞由来である。

[45]. 項目38～44の改変骨髄球系前駆細胞は、以下のリプログラミング因子：OCT4、SOX2、KLF4および任意でc-MYCのそれぞれの外因性コピーをさらに含む。

[46]. (a) ドナー対象から体細胞を提供する段階、(b) 前述の項目のいずれかの体細胞に由来する骨髄球系前駆細胞から多系列造血前駆細胞を生成させる段階；(c) 結果として生じた、前述の項目のいずれかの多系列造血前駆細胞の集団におけるヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害する段階；(d) 前述の項目のいずれかのリンパ球系列への分化を促進するために、結果として生じた多系列造血前駆細胞の集団をnotchリガンドまたはストローマ細胞または両方の存在下で分化させる段階、および結果として生じた分化したリンパ球系細胞をレシピエント対象に植え込む段階を含む、細胞補充治療の方法、または対象におけるがん、自己免疫障害、血液疾患、もしくは他の遺伝性疾患および障害の処置のための方法。 20

[47]. ホスト対象およびレシピエント対象が、同じ個体である、項目46の方法。

[48]. ホスト対象およびレシピエント対象が、同じ個体ではないが、少なくともHLA適合性である、項目46の方法。

【0357】

本発明は、限定するものとして解釈されるべきでない以下の実施例によってさらに例証される。本出願全体にわたり引用される全ての参考文献の内容ならびに図面および表は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0358】

当業者は、日常的な実験のみ用いて本明細書記載の発明の特定の態様の多くの等価物を認識し、または確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【実施例】

【0359】

実験手順

hIPSCの培養

MSC-IPS1 (Park et al., 2008)、CD34-IPSおよびCD45-IPSを使用して全ての実験を行った。ヒトIPS細胞を、マウス胚性線維芽細胞 (GlobalStem) フィーダー上のDMEM/F12 + 20% ノックアウト代用血清 (Invitrogen (商標))、1 mM L-グルタミン、1 mM NEAA、0.1 mM -メルカプトエタノール、および10ng/ml bFGF 中で維持した。培地を毎日交換し、コラゲナーゼIVによる標準的な凝集塊継代を用いて、細胞を7日毎に新鮮フィーダー上に1：4で継代した。

【0360】

EBの分化

以前に記載されたようにEBの分化を行った (Chadwick et al., 2003)。簡潔には、h

10

20

30

40

50

PSCのコロニーをかき取って、回転している非接着性の10cmプレートに2:1の比で入れた。EB培地は、KO-DMEM + 20% FBS (Stem Cell Technologies)、1mM L-グルタミン、1mM NEAA、ペニシリン / ストレプトマイシン、0.1mM -メルカプトエタノール、200 μg/ml h-トランスフェリン、および50 μg/ml アスコルビン酸であった。24時間後に、重力によりEBを沈降させることにより培地を交換し、成長因子 : 50ng/ml BMP 4 (R&D Systems)、200ng/ml SCF、200ng/ml FLT3、50ng/ml G-CSF、20ng/ml IL-6、10ng/ml IL-3 (全て Peprotech) を補充したEB培地で置き換えた。培地を5日目および10日目に交換した。14日目にコラゲナーゼB (Roche) で2時間消化することによってEBを解離させ、続いて酵素不含解離緩衝液 (Gibco) で処理し、80 μm フィルターを通過させて濾過した。解離したEBを10% DMSO、40% FBS凍結溶液中で凍結させた。

10

【 0 3 6 1 】

前駆細胞のソーティング

Lonzaのウェブサイトのpoietics細胞の解凍手順のマニュアルおよび説明のセクションに見出すことができるLonza Poieticsプロトコールに従って、解離したEB細胞を解凍した。解凍された細胞を染色緩衝液 (PBS + 2% FBS) 100 μlあたり 1×10^6 個で再懸濁した。ヒトCD34マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を使用してバルクEB培養物からCD34+細胞をソーティングし、製造業者の説明書通りに磁気カラムセパレーター (MACS) を通過させた。

【 0 3 6 2 】

レンチウイルスおよびshRNAライプラリープラスミド

5Fレンチウイルスプラスミド : HOXA9、ERG、RORA、SOX4、およびMYBをpInducer-21 Dox-誘導性レンチウイルスベクターにクローニングした。各エピジェネティック修飾因子に対する4つのshRNAおよびルシフェラーゼに対する3つのshRNAを、Broad Institute RNAi ConsortiumからpLKO.1またはpLKO.5レンチウイルスベクター中に得た。レンチウイルスプラスミドおよび第三世代パッケージングプラスミドを293T-17細胞 (ATCC) にトランスフェクトすることによってレンチウイルス粒子を産生させた。トランスフェクションの24時間後にウイルスを収集し、23,000rpmで3時間の超遠沈により濃縮した。連続希釈によって293T細胞を用いて全てのウイルスを力価検定した。この試験に使用したshRNAについての全てのTRC番号を表1に提供する。

20

【 0 3 6 3 】

5Fの遺伝子導入および5Fの培養

MACS分離CD34+ EB前駆細胞をレトロネクチン被覆 (10 μg/cm²) 96ウェルプレートに細胞密度 $2 \sim 5 \times 10^4$ 個 / ウェルで播種した。感染培地は、50ng/ml SCF、50ng/ml FLT3、50ng/ml TPO、50ng/ml IL6、10ng/ml IL3 (全て R&D Systems) を有するSFEM (StemCell) であった。レンチウイルス感染を合計体積150 μlで実施した。因子に対する感染多重度 (MOI) は、ERGおよびHOXA9についてMOI = 5、RORA、SOX4、MYBについてMOI = 3、および全てのshRNAについてMOI = 2であった。プレートを2300rpm、RTで30分間遠心分離することによってウイルスを細胞上に濃縮した。感染を24時間行った。遺伝子導入後、5F細胞を、50ng/ml SCF、50ng/ml FLT3、50ng/ml TPO、50ng/ml IL6、および10ng/ml IL3 (全て R&D Systems) を有するSFEM中で培養した。Doxを2 μg/ml (Sigma) で添加した。培養物を密度 $< 1 \times 10^6$ 個/mlで維持し、培地を3~4日毎に交換した。14日間の培養後に、T細胞分化プロトコールにより5Fをプレーティングした。

30

【 0 3 6 4 】

Notchリガンドdelta like 1発現OP9 (OP9-DL1) 細胞株との共培養

OP9-DL1細胞をOP9培地中で単層培養し、OP9培地は、FCS (終濃度20%)、2-メルカプトエタノール (終濃度0.1mM)、可欠アミノ酸 (終濃度0.1mM)、ピルビン酸ナトリウム (終濃度1mM)、ペニシリン (終濃度10U/ml)、L-グルタミン (終濃度1mM)、ストレプトマイシン (終濃度100 μg/ml)、および重炭酸ナトリウム (終濃度2.2g / リットル) を補充した -MEMである。

40

50

【0365】

逆戻り系列複能性造血前駆細胞（上記EB由来前駆細胞としても知られる）を、6ウェルまたは100mm未処理ディッシュのウェル1つあたり細胞密度 $1 \sim 6 \times 10^5$ 個でOP9-DL1の単層上にプレーティングした。培養培地は、SCF（終濃度30ng/ml; R&D systems）、F1t3リガンドおよびIL-7（終濃度各5ng/ml; R&D systems）を含有した。培養7日目に、緩く接着した造血細胞を優しくピペッティングすることによって収集した。その後5日毎に、強いピペッティングにより非接着性iPS細胞由来造血細胞を採取し、70μmナイロンメッシュを通して濾過し、OP9-DL1単層上のOP9培地中に移した。全てのその後の継代で全てのサイトカインを添加した。

【0366】

OP9-DL1細胞との共培養の14日目までに、逆戻り系列複能性造血前駆細胞は、リンパ球様細胞に変換した。これらの細胞は、共培養14日目までにCD25および/またはCD44を発現したので、前駆細胞が胸腺において分化するのと同じ方法でT系列に分化したと考えられる。フィコエリトリンコンジュゲート型抗CD8抗体（クローン53-6.7）、抗CD19抗体（クローン1D3）および抗CD25抗体（クローン7D4）、ならびにアロフィコシアニンコンジュゲート型抗CD4抗体（クローンGK1.5）、抗CD11b抗体（クローンM1/70）および抗CD44抗体（クローンIM7）（全てBiolegend（Tokyo）製）を使用してCD細胞表面マーカーの発現を検証した。

10

【0367】

TCR 遺伝子座（Tcrb）での再配列は、T細胞系列決定の特質であり、通常のT細胞発生の間のCD4/CD8ダブルネガティブ胸腺細胞のダブルポジティブ段階への進行に不可欠である。OP9-DL1細胞上で培養された逆戻り系列複能性造血前駆細胞から発生するT細胞がTCR 遺伝子座の通常の再配列を受けるかどうかを判定するために、TCR 鎖に対する様々な抗体を用いて分化細胞を30日目に染色した。フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲート型TCRパネル（BD biosciences）を使用した。

20

【0368】

多様なパターンのTcrV 遺伝子発現が、分化後の逆戻り系列複能性造血前駆細胞において検出されると予想される。多様性は、ゲノムPCRにより確認することができる。OP9-DL1細胞およびマウス成体胸腺細胞をゲノムPCRベース分析の陽性対照として使用することができる。以前に報告されたPCRプライマーを、Tcr遺伝子再編成の分析のために使用する（Ikawa T, Kawamoto H, Wright L Y et al., "Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent", Immunity, Vol. 20, pp. 349-360.; Kawamoto H, Ohmura K, Fujimoto S et al., "Extensive proliferation of T cell lineage-restricted progenitors in the thymus: an essential process for clonal expression of diverse T cell receptor beta chains" Eur. J. Immunol., Vol. 33, pp. 606-615）。

30

【0369】

正常な胸腺細胞発生の間に、TCR またはTCR を担持するT細胞が、胸腺中で発生する。OP9-DL1細胞上で培養された逆戻り系列複能性造血前駆細胞からT細胞の両集団が発生するかどうかを判定するために、アロフィコシアニンコンジュゲート型抗TCR 抗体（クローンH57-597）、およびフィコエリトリンコンジュゲート型抗TCR 抗体（クローンGL3）を用いて、TCR またはTCR の表面発現について分化済み逆戻り系列複能性造血前駆細胞を分析した。この共培養システムにおいて T細胞および T細胞の両方が分化済み細胞から生成したと予想される。

40

【0370】

同様に、20日間の共培養後の分化済み細胞は、CD4/CD8ダブルポジティブ細胞およびCD8シングルポジティブ細胞である。

【0371】

共培養分化済み細胞上に発現された機能的TCRの確認。この共培養システムにおけるCD4+CD8+分化済み細胞を21日目の培養物からソーティングし、 7.5×10^4 個のT細胞を、分

50

化培地中、IL-2 (終濃度1ng/ml) および抗CD28抗体 (終濃度1μg/ml ; クローン37.5-1) の存在下、プレートに結合した抗CD3抗体 (終濃度10μg/ml ; クローン145-2C11) を用いて3日間刺激した。その後、PMA/イオノマイシンを培養物に添加し、添加されたPMA/イオノマイシンに細胞をさらに6時間曝露した。Cytofix/Cytoperm (登録商標) およびGolgiStop (登録商標) (BD Biosciences) を製造業者の説明書に従って、IFN-についての細胞内染色を行った。フィコエリトリンコンジュゲート型抗CD8抗体 (クローン53-6.7) およびフィコエリトリンコンジュゲート型抗IFN-抗体 (クローンXMG1.2) をIFN-産生分析のために使用した。染色後の細胞をフローサイトメトリーによって分析した。この共培養システムにおけるCD4+CD8+分化済み細胞は、抗CD3抗体および抗CD28抗体によるTCR刺激に応答してIFN-を産生すると予想され、これは、逆戻り系列複能性造血前駆細胞から分化した細胞に機能的TCRが発現されることを示している。

【 0 3 7 2 】

追加的に、この共培養システムにおけるCD4+CD8+分化済み細胞 7.5×10^4 個を、分化培地中のプレート結合抗CD3抗体 (終濃度10μg/ml ; クローン145-2C11) と共に、IL-2 (終濃度2ng/ml) およびTGF-1 (終濃度5ng/ml) の存在下で2日間培養した。正常な成体リンパ球系組織由来のナイーブT細胞で観察されるように、制御性T細胞の特質であるFoxp3陽性細胞集団が強化されると予想される (Chen W, Jin W, Hardegen N et al., "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- induction of transcription factor Foxp3", J. Exp. Med., Vol. 198, pp. 1875-1886)。これらのデータは、この共培養において生成したiPS細胞由来T細胞がTCRまたはサイトカイン受容体を介する刺激に応答できることを示している。

【 0 3 7 3 】

T細胞の分化

14日間の再特異化後に、 1×10^5 個の5FをOP9-DL1ストローマ共培養物中にプレーティングした。30ng/mL SCF、5ng/mL FLT3、5ng/mL (全てR&D Systems) を有する-MEM (Gibco) 、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、20% FBS (Gemini) 、1mM L-グルタミン中で細胞を2ug/mL Dox存在下で20日間、続いてDoxを除去して培養した。機械的解離により細胞を収集し、40uM capを通して濾過し、5~7日毎に新鮮ストローマ上に継代した。35日後に、CD45、CD7、CD3、CD4およびCD8を使用してT細胞発生を評価した。

【 0 3 7 4 】

IMDMで $1 \times$ に希釈したDMEM (10 \times) 50mL中にコラゲナーゼIV 250mg、ヒアルロニダーゼV 100mg、DNase I 6.8mgを含有するEB解離培地中でマウスYS細胞またはAGM細胞を30分間単一細胞に解離させた。複数の胚にわたり細胞をプールし、計数した。75000個の細胞を6ウェルプレート中のOP9-DL1の集密ウェル1個に播種した。細胞をaMEM、20%血清、1% Pen/Strep/L-グルタミン、5ng/mL mIL-7 (R&D) および5ng/mL hFLT3 (R&D) 中で12日間培養した。

【 0 3 7 5 】

B細胞の分化

14日間の再特異化後に、 5×10^4 個の5Fを6ウェルプレート中のMS-5ストローマの単一ウェルにプレーティングした。細胞を、1%ペニシリン/ストレプトマイシン 50ng/mL SCF (R&D) 、10ng/mL FLT3 (R&D) 、25ng/mL IL7 (R&D) および25ng/mL TPO (R&D) を補充したMyelocult H5100 (Stem Cell Technologies) 中で2ug/mL Dox存在下で10日間培養し、続いてDoxを除去した。

【 0 3 7 6 】

マウスB細胞の分化のために、同じ遺伝子型の複数の胚からプールしたYSまたはEPを単一細胞に解離させ、75000個の細胞を6ウェルプレート中のOP9ストローマの集密ウェル上に播種した。細胞をaMEM、10%血清、 5×10^{-5} M B-メルカプトエタノール、1%PSG、50U/mL mIL7 (R&D) および10ng/mL hFLT3 (R&D) 中で培養した。

【 0 3 7 7 】

10

20

30

40

50

クラススイッチアッセイのために、B220 MACSまたはCD19 MACSマイクロビーズ濃縮キット (Miltenyi Biotec) を製造業者の推奨により使用して、B細胞前駆細胞を精製した。6ウェルプレートのウェル1個内の、0.5ug/mL 抗CD40 (Ebioscience, Cat. # 16-0402-86) および25ng/mL IL4 (Ebioscience, Cat. # 14-8041) を補充した完全 RPMI培地中に 5×10^5 個のB220⁺細胞または 5×10^5 個のCD19⁺細胞をブレーティングした。4日目にフローによりクラススイッチを分析した。

【 0 3 7 8 】

コロニーアッセイ

14日間の再特異化後に、10ng/ml IL6 (Peprotech) 、10ng/ml FLT3 (R&D) 、および50ng/ml TPO (R&D) を補充した完全メチルセルロースH3434 (StemCell Technologies) 3ml中に 5×10^4 個の細胞をブレーティングした。混合物を60mmディッシュ2枚に分配し、加湿チャンバー内で14日間維持した。

10

【 0 3 7 9 】

マウス移植

NOD/LtSz-scidIL2Rgnull (NSG) (Jackson Labs) マウスを繁殖させ、Boston Children's Hospital動物飼育施設で飼育した。BCH動物実験委員会によって承認された施設内ガイドラインに従って動物実験を行った。静脈内移植片は、以前に記載されている。簡潔には、移植の24時間前に6~10週齢マウスに照射した (275rad) 。実験の間の一貫性を保証するために、雌性マウスのみを使用した。28.5gインスリン用針を使用して体積100uLで細胞を移植した。飲料水中でスルファトリム (Sulfatrim) を投与して、照射後の感染を予防した。

20

【 0 3 8 0 】

フローサイトメトリー

ヒト細胞のために以下の抗体を使用した：T細胞染色用にCD45 APC-Cy7 (557833, BD Biosciences) 、CD4 PE-Cy5 (IM2636U, Beckman Coulter Immunotech) 、CD8 BV421 (RPA-T8, BD Horizon) 、CD5 BV510 (UCHT2, BD Biosciences) 、TC Rgd APC (555718, BD Biosciences) 、TCRab BV510 (T10B9.1A-31, BD Biosciences) 、CD3 PE-Cy7 (UCHT1, BD Pharmigen) 、CD7 PE (555361, BD Pharmigen) 、CD1a APC (559775, BD Pharmigen) 。B細胞染色用に、CD45 PE-Cy5 (IM2652U, Beckman Coulter Immunotech) 、CD19 PE (4G7, BD) 、CD56 V450 (B159, BD Biosciences) 、CD11b APC-Cy7 (557754, BD Biosciences) 、HSC / 前駆細胞ソーティング用に、CD34 PE-Cy7 (8G12, BD) 、CD45 (557833, BD Biosciences) 、CD38 PE-Cy7 (IM2651U, BD) 、DAPI。骨髄球系および赤血球系の染色用に、CD11b APC-Cy7 (557754, BD Biosciences) 、GLY A PE-Cy7 (A71564, Beckman Coulter) 、CD71 PE (555537, BD Biosciences) 、CD45 PE-Cy5 (IM2652U, Beckman Coulter Immunotech) 。染色緩衝液 (PBS + 2% FBS) 100uLあたり細胞 $< 1 \times 10^6$ 個を用い、各抗体を1:100希釈して、暗条件のRTで30分間、全ての染色を行った。抗マウスIgkおよび陰性ビーズ (BD) を用いた自動補正により補正を行った。BD FortessaまたはBD Ariaサイトメーターで全ての取得を行った。

30

【 0 3 8 1 】

マウス細胞のために以下の抗体を使用した：生着分析用にCD45.2 PE-Cy7 (104, eBioscience) 、CD45.1 FITC (A20, eBioscience) 、B220 PB (RA3-6B2, BD Biosciences) 、Ter119 PE-Cy5 (Ter 119, eBioscience) 、GR1 (RB6-8C5, BD Bioscience) 、CD3 APC (145-2C11, eBioscience) 、CD19 APC-Cy7 (1D3, BD Bioscience) 、MAC1 A700 (M1/70, BD Bioscience) 。HSC / 前駆細胞染色用に、CD45.2 APC-Cy7 (104, BioLegend) 、Sca1 PE-Cy7 (D7, BD Bioscience) 、CD34 AF700 (RAM34, eBioscience) 、CD48 FITC (BioLegend) 、CD150 PE-Cy5 (TC15-12F12.2, BioLegend) 、cKit APC (2B8, eBioscience) 、Fc PE (93, eBioscience) 。RNA seqのソートのために、CD16/32 (93, BioLegend) 、Ter119ビオチン (Ter 119, eBioscience) 、GR1ビオチン (RB6-8C, eBioscience) 、CD3ビオチン (17A2, BioLegend) を用いた。

40

50

eBioscience)、CD5ビオチン(53-6.7, eBioscience)、CD19ビオチン(eBio1D3, eBioscience)、ストレプトアビシンEF450(eBioscience)、CD45 PerCP-Cy5.5(30-F11, eBioscience)、CD144 EF660(eBioBV13, eBioscience)、CD117 APC-EF780(2B8, eBioscience)、CD41 PE-Cy7(eBioMWReg30, eBioscience)。B細胞染色用に、CD45.2 APC-CY7(104, BioLegend)、CD23 PE-Cy7(B3B4, eBioscience)、Ter119 PE-Cy5(Ter 119, eBioscience)、IgM EF660(eB121-15F9, eBioscience)、MAC1 A700(M1/70, BD Bioscience)、CD5 BV510(53-7.3 BD Biosciences)、IgM(11/41, eBioscience)、IgG1 FITC(A85-1, BD)、B220 PE-Cy5(RA3-6B2, BD Biosciences)。T細胞染色用に、CD45.2 APC-CY7(104, BioLegend)、TCRb PE-Cy5(H57-597, BD Biosciences)、CD8 APC-EF780(53-6.7, eBioscience)、CD4 APC(GK1.5, eBioscience)、CD3 AF700(17A2, BioLegend)、TCRgd FITC(GL3, BD Biosciences)。染色緩衝液(PBS+2% FBS)100 μlあたり細胞<1×10⁶個を用い、各抗体を1:100希釈して、暗条件の氷上で30分間、全ての染色を行った。抗マウスIgkおよび陰性ビーズ(BD)を用いた自動補正により補正を行った。BD FortessaまたはBD Ariaサイトメーターで全ての取得を行った。

【0382】

結果

本発明者らは、限られたリンパ球系分化能を有する原始前駆細胞を再特異化することが可能であると以前に実証した。候補因子の選択を拡大するために、本発明者らは、エピジェネティック修飾因子をスクリーニングして、再特異化のための追加の調節層を提供した。本発明者らは、Broad RNAi Consortiumからの低分子ヘアピン型RNA(shRNA)のライブラリーを採用して、多能性へのリプログラミング効率を高めるために以前に実験室で使用されたDNAおよびヒストンメチル化経路における20個の遺伝子を標的とした(図7A)(Onder T. et al. 2012)。

【0383】

確立された再特異化プラットフォームを使用して、本発明者らは、2つのiPSC株(MSC-IPS、CD45-IPS)を造血促進条件で胚様体(EB)に分化させて、CD34⁺CD45⁺骨髄球系前駆細胞を生成させた。次に、本発明者らは、EB由来前駆細胞に5つの転写因子(5Fカクテル:ERG、HOXA9、RORA、SOX4およびMYB)を形質導入し、各エピジェネティック修飾因子を標的とする個別のshRNAを感染させ、確立されたOP9-DL1共培養システムを用いてTリンパ球系分化能についてスクリーニングした。3つの独立したスクリーニングからの結果を図1A~1Fに要約する。上位ヒットを検証後の先導候補はEZH1であった。

【0384】

EZH1は、確定的分化能の重要な抑制因子である。

エピジェネティック因子が確定的分化能の障壁として作用するという仮説を検証するために、本発明者らは、体細胞リプログラミングに影響することが以前に示された20個のDNAおよびヒストンメチル化因子を標的とするshRNAライブラリーを使用する機能喪失表現型スクリーニングを採用した(図7A)(Onder et al. 2012)。本発明者らは、ライブラリーを、胚様体分化から得られた原始CD34⁺前駆細胞に導入した。表現型スクリーニングを容易にするために、本発明者らは、5つの転写因子の所定のセット(5F)を使用してこれらの原始前駆細胞を拡大した(Doulatov et al 2013)。拡大された前駆細胞は、BおよびT細胞分化能の欠如、ならびに胚性グロビンの発現を含む胚特徴を保持していた。本発明者らは、5F細胞に個別のヘアピン(遺伝子1つあたり4×ヘアピン)を形質導入し、OP9-DL1共培養システムを用いてT細胞分化能の出現についてスクリーニングした(Holmes and Zuniga-Pflucker 2009)(図1Aおよび1F)。5週間の共培養後に、CD7、CD3、CD4およびCD8についてのフローサイトメトリーによってT細胞分化能を分析した。本発明者らは、8つのエピジェネティック調節因子のノックダウンが、原始5F細胞からのCD4⁺CD8⁺T細胞分化能を高めたことを見出した(図1B)。上位ヒットの中に、メチル化DNA結合タンパク質のいくつかのメンバー、ヒストンH3リシン9(H3K9)メチルトランスフェラーゼ、PRC2成分、およびSMYD2、SETドメイン含有メチルトランスフェラーゼ(

10

20

30

40

40

50

図1C) があった。H3K9およびH3K27メチルトランスフェラーゼは、以前に、胎児および成体HSCにおける系列決定および自己複製と関連付けられている (Ugarte et al. 2015, Chen et al. 2012, Xie et al. 2014, Hidalgo et al. 2012, Lee et al. 2015)。

【0385】

これらの上位候補を前向きに検証するために、本発明者らは、これらの8つの因子を標的とするshRNA (遺伝子1つあたり2×) を形質導入された5F細胞のT細胞分化能を分析した。独立して、本発明者らは、B細胞分化を支持するマウス骨髄由来ストローマであるMS-5との共培養を用いて、それらのBリンパ球系分化能を試験した (Nishihara et al. 1998, Ohkawara et al. 1998)。対照ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする複数のshRNAを形質導入された5F細胞は、TおよびB細胞分化能を全く示さなかったか、または無視できるレベル (区間、標準偏差付き) で示した。試験された候補のうちEZH1のノックダウンのみが、独立したヘアピンおよびiPSC株にわたり強いTおよびB細胞分化能を誘発した (図2A、2B、2E)。フローサイトメトリー (図2C、2D) およびコロニー形成アッセイ (図2F) によると、EZH1についてのshRNAを形質導入された前駆細胞 (5F+shEZH1) の骨髄-赤血球系分化能は、ルシフェラーゼを標的とするshRNA (5F+shLUC) と比較してほとんど無変化であった。これらの結果は、EZH1の欠失が、原始造血前駆細胞における多リンパ球系列分化能を明らかにすることを示している。

【0386】

他のPRC2成分は、EZH1を表現型コピーしない。

EZH1は、ポリコーム群タンパク質のメンバーである。ポリコーム抑制複合体2 (PRC2) は、ヒストンH3リシン27 (H3K27) 上のメチル化を媒介し、転写調節および幹細胞発生に重要な役割を果たす。EZH1およびEZH2は、PRC2の近縁酵素サブユニットである。十分に特徴づけされた古典的PRC2は、EZH2、EEDおよびSUZから構成される (Onder T. et al., 2012)。EZH1は、EZH2のホモログおよびEEDとの相互作用パートナーとして同定され (Jones CA et al. 1998およびShen X. et al. 2008)、EZH2に対して冗長または相補的役割を果たすと考えられてきた。しかし、最近の研究は、EZH1の転写抑制機能に加えて、それについて新規な遺伝子活性化役割を明らかにした (Mousavi K. et al. 2012およびXu J. et al. 2015)。

【0387】

EZH1は、PRC2の触媒成分であるショウジョウバエzeste E(z)エンハンサーのホモログである (Abel et al. 1996) (Laible et al. 1997, Jones et al. 1998, Shen et al. 2008)。PRC2は、発生学的に調節される遺伝子でのエピジェネティックなサイレンシングを媒介するE(z)、EedおよびSuz12から構成される (Muller et al. 2002, Sparmann and van Lohuizen 2006, Simon and Kingston 2009)。EZH2は、PRC2の一次触媒成分であるものの、EZH1は、Ezh2を機能的に代替することができ (Shen et al. 2008)、とはいえ、Ezh1は、より弱いメチルトランスフェラーゼ活性を有し (Magueron et al. 2008)、RNAポリメラーゼ伸長を促進することができる (Mousavi et al. 2012)。増え続ける証拠は、EZH1およびEZH2が別個の分子的機能を有することを示している。Ezh1は、Ezh2と異なり、それ自体でまたはヌクレオソーム認識タンパク質Suz12との複合体として最も頻繁に見出される。対照的に、Ezh2は、Suz12および足場タンパク質Eedとほぼ常に複合体化している。加えて、EZH2は、体性リプログラミングのために必要であり、EZH1の欠失は、リプログラミングを高める (Onder et al. 2012, Cacchiarelli et al. 2015)。これらの研究は、サブユニット相互作用およびホロ酵素組成に依存したPRC2による複雑なモードのエピジェネティック調節を例証している。

【0388】

確定的造血性分化能におけるPRC2の重要性を精査するために、本発明者らは、5F細胞においてPRC2の各成分をノックダウンし (遺伝子1つあたり2つのshRNA)、T細胞分化を評価した。本発明者らは、各shRNAによる効率的なノックダウンを確認した (図3A)。EZH1のノックダウンは、CD4⁺CD8⁺ T細胞のパーセンテージを劇的に高めた (shLUCと比べて5倍)。SUZ12のノックダウンも、より小さい程度であるがT細胞分化能を高め

10

20

30

40

50

た。しかし、EEDおよびEZH2のノックダウンは、T細胞分化能に影響しなかった（図3Aおよび3C）。EZH1およびEZH2の二重ノックダウンは、EZH2枯渇を表現型コピーしたが、これは、EZH2がEZH1の上位であることを示している（図3B）。したがって、EZH2の欠失は、確定的分化能の回復においてEZH1を表現型コピーしない。この結果を検証するために、本発明者らは、EZH1よりもEZH2に対して150倍高い選択性を有するEZH2/EZH1二重阻害剤GSK126を使用した（McCabe et al. 2012）（図3G、3Iおよび3J）。3uM GSK126で、本発明者らは、コロニー形成アッセイにより評価したとき、部分毒性を有して顕著に減少した全体的H3K27me3を観察した（図3I、3J）。T細胞分化能に対するEZH2阻害の効果を試験するために、本発明者らは、中胚葉分化の初期段階でアクチビン/Nodalシグナル伝達の阻害を介して、Tリンパ球系列分化能を有するhPSCから確定的造血内皮（HE）を生成させた（Kennedy et al. 2012）。DMSO処理細胞において、本発明者らは、3uM GSK126を用いた処理で打ち消された強いCD4+CD8+T細胞集団を観察したが、これは、EZH1と異なり、EZH2がT細胞分化に必要なことを示している（図3H）。

【0389】

EZH1の触媒SETドメインが確定的造血性分化能を制限するために必要であったかどうか判定するために、本発明者らは、ヒトEZH1を標的とするshRNAにより標的とされることを回避するために、完全長マウスEzh1オープンリーディングフレーム（ORF）（mEzh1）または触媒SETドメインを欠失したEzh1（mEzh1 SET）を用いて救済実験を行った（図3D）。本発明者らは、5F+shLUCを用いたいきなる条件でもT細胞を観察せず、以前と同様に5F+shEZH1においてCD4+CD8+T細胞の強固な集団を観察した（図3E、3F）。mEzh1の共発現は、5F+shEZH1細胞のT細胞分化能を完全に打ち消したが（図3E、3F）、これは、マウスORFが確定的造血性分化能を機能的に制限するために十分なことを示している。対照的に、mEzh1 SETの発現は、T細胞分化能を抑制しなかった（図3E、3F）。まとめると、これらのデータは、全般的PRC2阻害ではなく、特異的EZH1阻害が、確定的造血性分化能を解除し、触媒SETドメインがこの分化能を制限するために必要なことを示している。

【0390】

EZH1は、HSCおよびリンパ球系遺伝子を直接調節する。

強化された確定的分化能についての分子的基盤を理解するために、本発明者らは、CD34⁺CD38⁻5F+shLUCおよび5F+shEZH1細胞のRNAシーケンシング分析を行った。EZH1ノックダウンの後に有意に上方調節された遺伝子（104個の遺伝子、>2倍、t検定、p<0.1）を、防御応答、免疫応答およびT細胞共刺激の遺伝子オントロジー（GO）タームについて濃縮した（図4A、4B）。ヒトHSPC階層に関連する転写変化を特異的に分析するために、本発明者らは、最初期パターンの系列決定を捕捉する6つのシグネチャー：HSC、MLP（初期リンパ球系）、HSC_MLP（幹細胞およびリンパ球系）、GMP（骨髄球系）、CM_P_MEP（赤血球系）および前駆細胞（全ての前駆細胞）を使用してGSEAを行った（Doulatov et al. 2010）。リンパ球系列分化能の取得と一致して、HSC_MLPおよびMLPシグネチャーは、5F+shEZH1において高度に濃縮されていた（図4C）。

【0391】

本発明者らは、次に、ATAC-シーケンシングを行って、クロマチンアクセシビリティーの差次的領域を同定した（Buenrostro et al. 2013）。EZH1のノックダウンで有意に上方調節された1500個のATACピークの不偏GREAT分析（McLean et al. 2010）は、T細胞発生、リンパ球活性化および免疫応答に関係する経路における濃縮を明らかにした（図4E、図9A）。逆に、下方調節されたピークは、生殖プロセス、神経および肺発生、ならびに重要なことには胚性造血などの他の細胞発生プロセスに関係する経路において濃縮されていた（図4G、図9B）。さらに、HSC、HSC/MLP、BおよびT細胞シグネチャーは、全て、上方調節されたATACピークの間で有意に濃縮されていたが（図4F、図9C）、これは、EZH1のノックダウンがエピジェネティックなリモデリングを誘導して、HSCおよびリンパ球系関連遺伝子へのアクセシビリティーを解除することを示している。

【0392】

10

20

30

40

50

クロマチンアクセシビリティーおよび遺伝子発現における変化が、EZH1によって直接誘導されたかどうかを判定するために、本発明者らは、5F細胞にエピトープタグ付きEZH1またはEZH2を過剰発現させ、続いてChIP-シーケンシングを行うことによってそのゲノムワイドな占有性を定義した。プロモーター領域でのEZH2結合部位とEZH1結合部位との比較によって、1069個の独特なEZH1結合部位が同定され（図5A）、それらは、抑圧的、二価および活性マークと関連した（図5B、5C）。これらのEZH1結合部位をよりよくアノテーションするために、本発明者らは、独特に結合した転写因子（TF、1069個の遺伝子のうち152個）を定義し、それらを初期HSPC階層のTFシグネチャーと比較した（Laurenti et al. 2013）。著しくは、EZH1結合型TFは、HSC、MLPおよびプロB集団において高度に濃縮されており（図5Dおよび5F）、これらのうちの多数は、二価マークされていた（図5G）。全てのEZH1結合型二価遺伝子のうち、有意な数の遺伝子が、顆粒球／マクロファージ、NK細胞、T細胞およびB細胞特異遺伝子としてアノテーションされる（Novershtern et al. 2011）（図5H）。EZH1結合型TFは、発現に有意な変化を示さなかつたものの、CellNetにより定義される各EZH1結合型TFによって制御される調節後のネットワークが有意に変化した（図5D）。具体的には、EZH1結合型TFおよびそれらのネットワークは、HSPC、BおよびT細胞のGRNにおいて有意に濃縮されていた（図5E）。STAT5A、YAP1、NLRC5、ZNF697およびBACH2などのEZH1結合型TFのネットワークは、BおよびT細胞のGRNにおいて全て有意に上方調節された（データは示さず）。まとめると、これらのデータは、EZH1がHSCおよびMLP転写因子と直接結合し、EZH1の阻害が、幹細胞およびリンパ球系遺伝子調節ネットワークを抑制解除することによって確定的造血性分化能を解除するという説得力のある証拠を提供している。10 20

【0393】

Ezh1欠乏は、胚性リンパ球新生をインビボで高める。

Ezh1の役割をインビボで探るために、本発明者らは、マウス胚における初期リンパ球系発生を最初に検討した。胚体外卵黄嚢（YS）は、造血の最初期部位であるので、原始赤血球系および骨髓-赤血球系前駆細胞のみを生成すると考えられた（Dzierzak and Speck 2008）。しかし、最近の研究は、確定的HSCの出現前の卵黄嚢におけるリンパ球系分化能を報告している（Boiers et al. 2013, Yoshimoto et al. 2012, Yoshimoto et al. 2011）。Ezh1欠乏がこの初期リンパ球系分化能を高めることができるかどうかを判定するために、本発明者らは、野生型（WT）胚およびEzh1ノックアウト（Ezh1^{-/-}）胚からのE9.5卵黄嚢（YS）の系列分析を行った。本発明者らは、WT YSにおけるCD19⁺B220⁺ B細胞（3.64%）およびCD3⁺CD5⁺ T細胞（0.45%）の小集団を検出した（図11A～11C）。これらのリンパ球系集団は、Ezh1^{-/-} YSの方が高頻度の傾向であったが、この増加は有意ではなかった（図11Bおよび11C）。さらに、本発明者らは、母体の循環血が本発明者らの系列分析と交絡する可能性を排除することができなかった。したがって、本発明者らは、E9.5 WTおよびEzh1^{-/-}胚本体から卵黄嚢を切り離し、インビトロでリンパ球系分化を行った。本発明者らは、胚性B細胞の強固な集団を検出し（B-1亜型；AA4.1⁺CD19⁺B220^{lo-neg}）、かつ成体様B-2細胞（AA4.1⁺CD19⁺B220⁺）をほとんど検出しなかった。これは、以前の結果と一致する（Yoshimoto et al. 2012）（図12A）。本発明者らは、WT細胞とEzh1^{-/-}細胞との間にB細胞分化能に有意差を見出さなかつたが、生殖細胞系IgMからIgG1へのクラススイッチの増加に気づいた（図12C）。同様に、本発明者らは、胚本体（EP）におけるWTとEzh1^{-/-}との間のT細胞分化能に差を観察しなかつた（図6Aおよび6B）。対照的に、Ezh1^{-/-} YS前駆細胞は、2～5倍多いCD4⁺CD8⁺ T細胞を生成した（図6Bおよび6D）。これらの初期T細胞は、少ない割合が成体型TCR⁺を発現したが、主として胎児TCR⁺を発現した（図6Cおよび6D）。これらのデータは、Ezh1欠乏がYS前駆細胞のリンパ球系分化能を高めることを実証している。まとめると、これまでの結果は、確定的分化能の代用尺度としてのリンパ球系列運命の抑制に果たすEZH1の役割を提起するものである。30 40

【0394】

Ezh1ハプロ不全は、個体発生におけるHSCの生成を促進する。50

成体レシピエントに再増殖する能力によって定義される真のHSCの出現は、胚性造血から確定的造血への移行をマークする。本発明者らは、EZH1が確定的分化能の門番として作用するならば、HSCがより早く出現し、高い再増殖能を示し得ると予測した。HSCは、約10.5dpcにAGM中に現れるが (Boisset et al. 2010)、それらは、極めて稀であり (胚あたり約1つのHSC)、成体ホストの生着を強く裏付けるわけではない (Bertrand et al. 2005, Muller et al. 1994, North et al. 2002)。したがって、この移行時点に焦点を合わせて、本発明者らは、E10.5のWT、Ezh1^{+/−}およびEzh1^{−/−}胚からAGMおよびYSを単離した (図6E)。Ezh1およびSuz12の発現は、YSからAGMにかけて減少し、一方で、Ezh2およびEedは、AGM中の方が高かった (図6F)。本発明者らは、全AGM (3.5胚当量 (embryo equivalent) (ee)) またはYS (5ee) を、亜致死照射された成体NO D/SCID-IL2R^{null} (NSG) マウスに移植し、造血再構成をモニタリングした。4週間後にWT AGMからの生着が、マウス7匹中3匹で観察された ($11.9 \pm 13.6\%$) が、経時的に減少し、16週間後にマウス7匹中2匹が生着した ($12.2 \pm 11.4\%$) (図6G)。これは、約10.4胚当量 (ee) における1再増殖単位 (repopulating unit) に相当する。WTのAGMを移植されたマウス7匹中1匹のみが長期多系列キメリズムを示し、これは、今回HSCが非常に稀少であったことと一致する。対照的に、Ezh1^{−/−} AGM由来細胞を移植されたマウス8匹中5匹が4週間後に生着し ($36.7 \pm 20.9\%$)、安定なキメリズムを経時的に保持した (16週間; $34.3 \pm 32.9\%$)。よりいっそう顕著には、Ezh1^{+/−}細胞を移植されたマウスは、最高の初期キメリズムを有し ($41.2 \pm 29.2\%$; 5匹中4匹が生着)、それは、経時に増加し ($68.9 \pm 35.6\%$)、大部分が多系列であった (マウス5匹中3匹)。 (図6Gおよび6H)。これは、3.6 Ezh1^{−/−}および2.2 Ezh1^{+/−}胚当量における1再増殖単位に相当し、HSCの頻度における5倍近くの増加である。

【0395】

AGMと同様に、E10.5のYSは、含有するとしてもほとんどHSCを含有しない。これと一致して、本発明者らは、4週間後にレシピエント7匹中5匹 ($3.4 \pm 1.5\%$) に、16週間後にはマウス9匹中3匹のみ ($4.3 \pm 2.9\%$) に、WT YS細胞の低レベルの生着を検出した (図6I)。対照的に、大部分のEzh1^{−/−} ($6.0 \pm 4.9\%$ 、7匹中5匹が生着)、および全てのEzh1^{+/−} YS移植マウス ($8.8 \pm 6.5\%$ 、5匹中5匹が生着) が、安定した長期生着を示した (図6Iおよび6M)。再増殖単位の数は、AGMと類似していた (8.9 ee WT において約1; 4つのEzh1^{−/−}において1、<2つのEzh1^{+/−}において1)。全ての生着マウスを骨髄球系列およびリンパ球系列について再構成した (図6J)。本発明者らは、WT AGMレシピエントと比較してEzh1^{−/−} AGM移植片レシピエントのT細胞グラフトにおける有意な増加を観察した (図6J)。Ezh1^{+/−} AGM生着マウスの腹膜腔におけるB細胞の最大80%は、胚性B-1細胞とは対照的に成体様B-2であった (図13A)。さらに、Ezh1^{−/−}およびEzh1^{+/−} AGMおよびYS生着マウスにおいて、胚性TCR⁺配置に対して、ドナー由来CD45.2+CD3+T細胞の>90%は、成体型TCR⁺を発現した (図13B)。これらのデータは、Ezh1欠乏、および特にハプロ不全が、確定的HSCの生成および成体様リンパ球新生を刺激するという説得力のある証拠を提供する。

【0396】

Ezh1欠損HSCの拡張した自己複製能を判定するために、本発明者らは、二次移植を行った。生着のカットオフとして1%を用いて、本発明者らは、WT AGM (マウス4匹中0匹) またはYS (マウス7匹中0匹) を移植されたマウスにおいて4週間後の末梢血中にドナーの寄与は全く検出されなかった。対照的に、7匹中4匹のEzh1^{−/−} ($4.4 \pm 1.0\%$) および9匹中9匹のEzh1^{+/−} ($57.8 \pm 30.6\%$) AGM移植二次レシピエントが生着した。 (図6Kおよび6L)。Ezh1^{−/−} YSマウスは生着しなかった (10匹中0匹) ものの、本発明者らは、Ezh1^{+/−} YS細胞からキメリズム (マウス7匹中5匹が生着、 $1.5 \pm 0.7\%$) を観察し、それは、移植後16週間までに増加した (マウス7匹中6匹が生着、 $5.3 \pm 4.5\%$) (図6Mおよび6N)。顕著には、Ezh1欠損AGMおよびYSの二次レシピエントの全ては、B、T、および骨髄球系列を有する多系列生着を示した (図6Lおよび6N)。まとめると、Ezh1は、個体発生の間に確定的分化能を独特に抑制し、Ezh1欠損は、胚性幹細胞および前駆細胞の長期多系

10

20

30

40

50

列分化および自己複製能を促進する。

【0397】

本明細書中および明細書全体で引用される参考文献は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0398】

参考文献

1. Dzierzak E and Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 2008 Feb;9(2):129-36.
2. Baron MH and Fraser ST. The specification of early hematopoiesis in the mammal. *Curr Opin Hematol.* 2005 May;12(3):217-21.
3. Tavian M and Péault B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp Hematol.* 2005 Sep;33(9):1062-9.
4. Ferkowicz MJ and Yoder MC. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol.* 2005 Sep;33(9):1041-7.
5. Kennedy M et al. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep.* 2012 Dec 27;2(6):1722-35.

10

20

30

40

50

6. Sturgeon CM et al. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014 Jun;32(6):554-61.
7. Ditadi A et al. Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat Cell Biol.* 2015 May;17(5):580-91.
8. Böiers C et al. Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013 Nov 7;13(5):535-48.
9. Yoshimoto M et al. Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence. *Blood.* 2012 Jun 14;119(24):5706-14.
10. 10 Yoshimoto M et al. Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1468-73.
11. McKinney-Freeman S et al. The transcriptional landscape of hematopoietic stem cell ontogeny. *Cell Stem Cell.* 2012 Nov 2;11(5):701-14.
12. Miranda-Saavedra D et al. BloodExpress: a database of gene expression in mouse hematopoiesis. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D873-9.
13. Sauvageau G et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 6;91(25):12223-7.
14. McGrath KE and Palis J. Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation. *Mol Reprod Dev.* 1997 Oct;48(2):145-53.
15. Doulatov S et al. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell.* 2013 Oct 3;13(4):459-70.
16. Ramos-Mejia V et al. HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood.* 2014 Nov 13;124(20):3065-75.
17. Dou DR et al. Medial HOXA genes demarcate haematopoietic stem cell fate during human development. *Nat Cell Biol.* 2016 Jun;18(6):595-606.
18. 20 Dambacher S et al. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity (Edinb).* 2010 Jul;105(1):24-37.
19. Majewski IJ et al. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity. *PLoS Biol.* 2008 Apr 15;6(4):e93.
20. Majewski IJ et al. Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):731-9.
21. Mochizuki-Kashio M et al. Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011 Dec 15;118(25):6553-61.
22. Hidalgo I et al. Ezh1 is required for hematopoietic stem cell maintenance and prevents senescence-like cell cycle arrest. *Cell Stem Cell.* 2012 Nov 2;11(5):649-62.
23. Xie H et al. Polycomb repressive complex 2 regulates normal hematopoietic stem cell function in a developmental-stage-specific manner. *Cell Stem Cell.* 2014 Jan 2;14(1):68-80.
24. Kinkel SA et al. Jarid2 regulates hematopoietic stem cell function by acting with polycomb repressive complex 2. *Blood.* 2015 Mar 19;125(12):1890-900.
25. Lee SC et al. Polycomb repressive complex 2 component Suz12 is required for hematopoietic stem cell function and lymphopoiesis. *Blood.* 2015 Jul 9;126(2):167-75.
26. Ikeda K et al. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci Rep.* 2016 Jul 19;6:29454.
27. Onder TT et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature.* 2012 Mar 4;483(7391):598-602.
28. Holmes R and Zúñiga-Pflücker JC. The OP9-DL1 system: generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009 Feb;2009(2):pdb.prot5156.
29. Ugarte F et al. Progressive Chromatin Condensation and H3K9 Methylation Regulate the Differentiation of Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2015 Nov 10;5(5):728-40.
30. Chen X et al. G9a/GLP-dependent histone H3K9me2 patterning during human hematopoietic stem cell lineage commitment. *Genes Dev.* 2012 Nov 15;26(22):2499-511.
- 40

31. Nishihara M et al. A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur J Immunol.* 1998 Mar;28(3):855-64.
32. Ohkawara JI et al. Culture system for extensive production of CD19+IgM+ cells by human cord blood CD34+ progenitors. *Leukemia.* 1998 May;12(5):764-71.
33. Abel KJ et al. Characterization of EZH1, a human homolog of Drosophila Enhancer of zeste near BRCA1. *Genomics.* 1996 Oct 15;37(2):161-71.
34. Laible G et al. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* 1997 Jun 2;16(11):3219-32.
35. Jones CA et al. The Drosophila esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression. *Mol Cell Biol.* 1998 May;18(5):2825-34.
36. Shen X et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):491-502.
37. Müller J et al. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):197-208.
38. Sparmann and van Lohuizen 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):846-56.
39. Simon JA and Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Oct;10(10):697-708.
40. Margueron R et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):503-18.
41. Mousavi K et al. Polycomb protein Ezh1 promotes RNA polymerase II elongation. *Mol Cell.* 2012 Jan 27;45(2):255-62.
42. Caccharelli D et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell.* 2015 Jul 16;162(2):412-24.
43. McCabe MT et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* 2012 Dec 6;492(7427):108-12.
44. Doulatov S et al. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol.* 2010 Jul;11(7):585-93.
45. Buenrostro J et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods.* 2013 Dec;10(12):1213-8.
46. McLean CY et al. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol.* 2010 May;28(5):495-501.
47. Laurenti E et al. The transcriptional architecture of early human hematopoiesis identifies multilevel control of lymphoid commitment. *Nat Immunol.* 2013 Jul;14(7):756-63.
48. Novershtern N et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell.* 2011 Jan 21;144(2):296-309.
49. Boisset JC et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):116-20.
50. Bertrand JY et al. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 4;102(1):134-9.
51. Müller AM et al. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity.* 1994 Jul;1(4):291-301.
52. North TE et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity.* 2002 May;16(5):661-72.
53. Rowe RG et al. Engineering Hematopoietic Stem Cells: Lessons from Development. *Cell Stem Cell.* 2016 Jun 2;18(6):707-20.
54. Vo LT and Daley GQ. De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. *Blood.* 2015 Apr 23;125(17):2641-8.
55. Pereira CF, Lemischka IR and Moore K. 'From blood to blood': de-differentiation of hematopoietic progenitors to stem cells. *EMBO J.* 2014 July 17; 33(14): 1511-1513.

10

20

30

40

50

56. Kyba M, Perlingeiro RC and Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*. 2002 Apr 5;109(1):29-37.
57. Chanda B et al. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell*. 2013 Sep 26;155(1):215-27.
58. Orkin SH and Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44.
59. Doulatov S et al. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120-36.
60. Huang HT et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis in vivo. *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15(12):1516-25.
61. Abdalkader L et al. Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms. *Pathology*. 2016 Aug;48(5):467-82. 10
62. Bachmann IM et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):268-73.
63. Varambally S et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002 Oct 10;419(6907):624-9.
64. Yu J et al. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2007 Nov;12(5):419-31.
65. Wang CG et al. EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2010 May 21;16(19):2421-7.
66. Abd Al Kader L et al. In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2. *Virchows Arch*. 2013 Nov;463(5):697-711. 20
67. Morin RD et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):181-5.
68. Yap DB et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2451-9.
69. Xu J et al. Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions. *Mol Cell*. 2015 Jan 22;57(2):304-16.
70. June CH, Riddell SR and Schumacher TN. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Sci Transl Med*. 2015 Mar 25;7(280):280ps7.
71. Themeli M, Rivière I and Sadelain M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immuno-therapy. *Cell Stem Cell*. 2015 Apr 2;16(4):357-66. 30
72. Timmermans F et al. Generation of T cells from human embryonic stem cell-derived hematopoietic zones. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6879-88.
73. Themeli M et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2013 Oct;31(10):928-33.
74. Riolobos L et al. HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther*. 2013 Jun;21(6):1232-41.
75. Fazi F et al. A minicircuity comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 2005 Dec 2;123(5):819-31.
76. Starnes LM et al. NFI-A directs the fate of hematopoietic progenitors to the erythroid or granulocytic lineage and controls beta-globin and G-CSF receptor expression. *Blood*. 2009 Aug 27;114(9):1753-63.
77. Lee JW et al. DACH1 regulates cell cycle progression of myeloid cells through the control of cyclin D, Cdk 4/6 and p21Cip1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 30;420(1):91-5.
78. Lee JW et al. Regulation of HOXA9 activity by predominant expression of DACH1 against C/EBPalpha and GATA-1 in myeloid leukemia with MLL-AF9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 28;426(3):299-305. 40

【 0 3 9 9 】

(表1) RNA干渉および対応するshRNAのための標的転写因子候補

クローンID	記号	NCBI遺伝子ID	分類群ID	遺伝子名	領域	標的配列	SEQ. ID. NO.:
TRCN00003555903	NM_0244670.3	SUV39H2	79723	9606	3UTR	TAATGGAAAGGAGACTATTTA	31
TRCN00003555904	NM_0244670.3	SUV39H2	79723	9606	CDS	CCTAAATGAAAGATAAATA	32
TRCN00003555905	NM_0244670.3	SUV39H2	79723	9606	3UTR	TCAAGGGTCTTACCTATGTTAA	33
TRCN0000011057	NM_0244670.3	SUV39H2	79723	9606	CDS	GCCACCTCTAGACTCTATT	34
TRCN0000275322	NM_003173.2	SUV39H1	6839	9606	CDS	GTACGTGGAGAGATCATTAC	35
TRCN0000275321	NM_003173.2	SUV39H1	6839	9606	CDS	GAATGAGTCCTGCCCAAATA	36
TRCN0000275372	NM_003173.2	SUV39H1	6839	9606	CDS	ATTCGAGTACCTGTGCAGTTA	37
TRCN0000158337	NM_003173.1	SUV39H1	6839	9606	3UTR	CGTGGGGATCATGGCCATT	38
TRCN00000640076	NM_0044456.3	EZH2	2146	9606	CDS	CGGAAATCTTAACCAAGAAT	39
TRCN0000010475	NM_0044456.3	EZH2	2146	9606	3UTR	GAAACAGCTGCCCTAGCTCA	40
TRCN00000018365	NM_0044456.3	EZH2	2146	9606	CDS	TATGATGGTTAACGGTGTACA	41
TRCN00000040073	NM_0044456.3	EZH2	2146	9606	3UTR	TATGGCTTCACCACTGSC	42
TRCN0000276085	NM_020197.2	SMYD2	56950	9606	CDS	CGGCAAAGATCATCCATAAT	43
TRCN0000276083	NM_020197.2	SMYD2	56950	9606	CDS	GCTGTGAAGGAGTTGAATCA	44
TRCN00000276154	NM_020197.2	SMYD2	56950	9606	CDS	GCTCTGTGTGTTGAGGACAGTA	45
TRCN0000276155	NM_020197.2	SMYD2	56950	9606	3UTR	ACTAGTTGAGAAACCTAAA	46
TRCN00000036055	NM_0244757.3	EHMT1	79813	9606	CDS	GCAACGGATACATCTAAATA	47
TRCN0000036057	NM_0244757.3	EHMT1	79813	9606	CDS	CCTGGGTTGAGTCGTAATAA	48
TRCN0000217965	NM_0244757.3	EHMT1	79813	9606	CDS	TGGAGAACTGAGATCATAAA	49
TRCN0000218919	NM_0244757.3	EHMT1	79813	9606	CDS	ACCTCTTGACTCGACATA	50
TRCN00000115668	NM_025256.4	EHMT2	10919	9606	CDS	CCTCTTCGACTTAGACACAA	51
TRCN00000115667	NM_025256.4	EHMT2	10919	9606	3UTR	CACACATTCTGACCAAGAT	52
TRCN0000115670	NM_025256.4	EHMT2	10919	9606	CDS	CGAGAGAGTCATGGCTTT	53
TRCN0000115669	NM_025256.4	EHMT2	10919	9606	CDS	GCTCCAGGAATTAAACAGAT	54
TRCN0000148112	NM_012432.2	SETD81	9859	9606	CDS	GCTCAGATGATAAACCTCTGTA	55
TRCN0000072261	promegaluc.1	レシフェラーゼ	-14	対照	CDS	CACTCGGATATTGATATGTG	56
TRCN00000276105	NM_012432.2	SETD81	9869	9606	CDS	AGTTAGAGACATGGGTAAAC	57
TRCN00000276106	NM_012432.2	SETD81	9869	9606	CDS	CGTGACTCATAGAGGATAT	58

RCN0000276103	NM_012432.2	SE1DB1	9869	9606	3UTR	ATCCCTCCATCCCCATTTG	59
.RCN0000297828	NM_003927.3	MBD2	8932	9606	CDS	GTAAGCAATGATGAGACCTT	60
TRCN000013319	NM_003927.3	MBD2	8932	9606	CDS	GCTTAGTAAATTACAGAAGAA	61
TRCN0000297830	NM_003927.3	MBD2	8932	9606	CDS	GTACGCAAGAAATTGGAAAGAA	62
TRCN000013322	NM_003927.3	MBD2	8932	9606	CDS	CTTGAATACAAACATTGCCAAT	63
TRCN0000358468	NM_002184.2	MBD1	4152	9606	3UTR	GCCTTCCTCACAGAGTTAA	64
TRCN0000072256	promegauc.1	ルシフェラー-#	-14	对照	CDS	ACGCTGAGTACTTCGAAATGT	65
TRCN0000358382	NM_002184.2	MBD1	4152	9606	CDS	GATGATCTGCTCCAAATTTG	66
TRCN0000015429	NM_002184.1	MBD1	4152	9606	CDS	CCGGAAACAGAGAAATGTTAA	67
TRCN0000329862	NM_002184.2	MBD1	4152	9606	CDS	CACCGTGTACGGAGATT	68
TRCN0000355735	NM_001591.3	EZH1	2145	9606	CDS	CTATCTGGCAATGCGGAGATG	1
TRCN0000355734	NM_001591.3	EZH1	2145	9606	CDS	AGACGTGCAAGCAGGTCTTC	2
TRCN0000378151	NM_001591.3	EZH1	2145	9606	3UTR	TGGATGACTTATGCGTGAATT	3
TRCN000002442	NM_001591.2	EZH1	2145	9606	CDS	CAACAGAACTTTATGGTAGAA	4
TRCN000021208	NM_003797.2	EED	8726	9606	CDS	CCAGTGAATCTAATGTCAGTA	69
TRCN000021205	NM_003797.2	EED	8726	9606	CDS	CCAGAGACATACATAGGAATT	70
TRCN0000381067	NM_003797.2	EED	8726	9606	CDS	GTGGATGGGTAGGGGATTTG	71
TRCN000021204	NM_003797.2	EED	8726	9606	CDS	GCAAACCTTTAATGTTGGATT	72
TRCN0000280721	NM_002931.3	RING1	6015	9606	CDS	CTGGAGCTGGTAATGAGAAA	73
TRCN000021989	NM_002931.2	RING1	6015	9606	CDS	GCCTGATCTTAAGATCAT	74
TRCN0000280798	NM_002931.3	RING1	6015	9606	CDS	GTCAGATCAGACCAACGAT	75
TRCN0000352834	NM_002931.3	RING1	6015	9606	CDS	AGACGAGGTATGTGAAGACAA	76
TRCN0000229416	NM_005180.5	BMI1	648	9606	CDS	ATGGATGCCAACATAATA	77
TRCN0000218869	NM_005180.5	BMI1	648	9606	CDS	CAGATGGATGGAAAGTAA	78
TRCN000020156	NM_005180.5	BMI1	648	9606	CDS	CTTAATACTTCCAGATTGAT	79
TRCN0000229418	NM_005180.5	BMI1	648	9606	CDS	TAATGGATATGCCATACATT	80
TRCN0000274442	NM_003926.5	MBD3	53615	9606	CDS	CAAGATGCTGATGAGCAAGAT	81
TRCN0000285209	NM_003926.5	MBD3	53615	9606	CDS	CGGCCCTGAACGCCCTTCGACAT	82
TRCN0000358524	NM_003926.5	MBD3	53615	9606	CDS	GACCTGAGGCCACCTTCGACTTC	83
TRCN0000274441	NM_003926.5	MBD3	53615	9606	CDS	GCGGGTGACCAAGATTACCAA	84

RCN0000298921	NM_015355.2	SUZ12	23512	9606	CDS	GCTGACAATCAAATGAATCAT	85
TRCN0000331118	NM_015355.2	SUZ12	23512	9606	CDS	CGGAATCTCATAGCACCATA	86
TRCN0000338725	NM_015355.1	SUZ12	23512	9606	CDS	GCCTACGTTTACCTGGTTCTT	87
TRCN0000338725	NM_015355.1	SUZ12	23512	9606	CDS	CCAAACCTCTGCACTAGAA	88
TRCN0000342689	NM_003925.1	MBD4	8930	9606	3UTR	GCCTAATGGTGTTGCTTCTT	89
TRCN0000342754	NM_003925.1	MBD4	8930	9606	CDS	GCAACGACTCTTACCGAAATT	90
TRCN0000342688	NM_003925.1	MBD4	8930	9606	CDS	CCACCGACGTAAAGCCTTAA	91
TRCN0000342752	NM_003925.1	MBD4	8930	9606	CDS	GCCAAGTAGTGTAGTTGAGATT	92
TRCN0000021891	NM_001379.1	DNMT1	1786	9606	CDS	GCCCAATGAGACTGACATCAA	93
TRCN0000022250	promegaLut.1	ルシフェラーゼ	-14	参照	CDS	AGAAATCGTGTGAGTGTGAA	94
TRCN0000021893	NM_001379.1	DNMT1	1786	9606	CDS	CGAATACATCAAAGGCAGCAA	95
TRCN0000232751	NM_001379.1	DNMT1	1786	9606	3UTR	GAGGTTCGCTTATCAACTAAAT	96
TRCN0000232748	NM_001379.1	DNMT1	1786	9606	CDS	CCCSAGTATGCCCTATTT	97
TRCN0000236345	NM_032482.2	DOT1L	84444	9606	CDS	TGCCCCAACACGGAGTGTATAT	98
TRCN0000202110	NM_032482.1	DOT1L	84444	9606	CDS	CCGCAAGAAGAAAGCTAAACAA	99
TRCN0000236342	NM_032482.2	DOT1L	84444	9606	CDS	CACATTGGAGAGAGGGGATT	100
TRCN0000202111	NM_032482.1	DOT1L	84444	9606	CDS	CCCGGATCTCAAGCTGGCAT	101
TRCN000035757	NM_022552.3	DNMT3A	1788	9606	CDS	CCAGATGTTCTCTGCTAATAA	102
TRCN000035756	NM_022552.3	DNMT3A	1788	9606	CDS	GCCTCAGAGCTTATACCAAT	103
TRCN000035754	NM_022552.3	DNMT3A	1788	9606	CDS	CCCAAGGTCAAGGAGATT	104
TRCN000035758	NM_022552.3	DNMT3A	1788	9606	CDS	CCACCAAGAAGAGAAAGAAAT	105
TRCN000021242	NM_004992.2	MECP2	4204	9606	CDS	CGCTCTGCAAAGAGGAGAGAT	106
TRCN0000330971	NM_004992.3	MECP2	4204	9606	CDS	GAGAGCGCAAAGACATGTT	107
TRCN000021241	NM_004992.2	MECP2	4204	9606	CDS	CTGGGAAGTATGATGTGATT	108
TRCN0000380871	NM_004992.3	MECP2	4204	9606	CDS	ACCACCTAAGGAAAGCCAAATC	109

【 0 4 0 0 】

配列情報

SEQUENCE LISTING

110 PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE
THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION

120 IMMUNE CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL

150 US 62/383,984

151 2016-09-06

160 111

170 PatentIn version 3.5
210 1
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 1
ctatctggca gtgcgagaat g 21 10
210 2
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 2
agacgtgcaa gcaggtcttt c 21 20
210 3
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 3
tggatgactt atgcgtgatt t 21
210 4
211 21 30
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 4
caacagaact ttatggtaga a 21
210 5
211 21
212 DNA 40
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 5
ccgcccgtgggt ttgtattcat t 21
210 6
211 128
212 DNA
213 Artificial Sequence 50

220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide
400 6
attacagcaa gatggaaata ccaaattcccc ctacacctcaa atgtatcact tactggaaaa 60
gaaaagtgaa atctgaatac atgcgacttc gacaacttaa acggcttcag gcaaataatgg 120
gtgcaaag 128
210 7
211 20
212 DNA 10
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 7
tcgacaacctt aaacggcttc 20
210 8
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence 20
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 8
tgcgacttcg acaacttaaa 20
210 9
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 30
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 9
cctccaaatg tatcacttac 20
210 10
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 40
400 10
taaacggctt caggcaaata 20
210 11
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 50

400 11
aaacggcttc aggcaaata 20
210 12
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 12 10
catttggagg tagggggatt 20
210 13
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 13
ccagtaagtg atacatttgg 20 20
210 14
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 14
gtgatacatt tggaggtagg 20
210 15 30
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 15
aagtgataca ttggaggtta 20
210 16
211 20 40
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 16
agtgatacat ttggaggtag 20
210 17
211 20
212 DNA 50

213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 17
tttccagtaa gtgatacatt 20
210 18
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence 10
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 18
taagtgatac atttggaggt 20
210 19
211 129
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 20
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide
400 19
gctttgtatg tggcaaattt tgcaaagggtt caagaaaaaa cccagatcct caatgaagaa 60
tggagaagc ttctgttcca acctgtttag tcaatgaagc ctgtgagtttgg acacccttt
ctcaaaaag 129
210 20
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence 30
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 20
gcattcattga ctgaacaggt 20
210 21
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 40
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 21
acagggttca ttgactgaac 20
210 22
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 50

oligonucleotide
400 22
agaaaagggt gtccactcac 20
210 23
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 10
400 23
tccatttttc attgaggatc 20
210 24
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 24 20
ccattttca ttgaggatct 20
210 25
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 25
gtatgtggca aattttgcaa 20 30
210 26
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 26
cagtcaatga agcctgtgag 20
210 27 40
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 27
gcttcctctt caacacctaat a 21
210 28
211 21 50

212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 28
ccggccgtgg t ttttattcat t 21
210 29
211 21
212 DNA 10
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 29
gctttttt gattacaggt a 21
210 30
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 20
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 30
gctactcgga aaggaaacaa a 21
210 31
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 30
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 31
taatggaaagg cagactattt a 21
210 32
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 40
 oligonucleotide
400 32
ctctaatgac aagcataatt a 21
210 33
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide 50

400 33
tcaaggttct acctatgtta a 21
210 34
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 34 10
gcccacccttc agacttctat t 21
210 35
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 35
gtacgtggga gagatcattta c 21 20
210 36
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 36
gactgagtcc tgccgcaaat a 21
210 37 30
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 37
agtcgagtac ctgtgcgatt a 21
210 38
211 21 40
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 38
cgttgggatt catggcctat t 21
210 39
211 21
212 DNA 50

213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 39
cgaaaaatctt aaaccaagaa t 21
210 40
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 10
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 40
gaaacagctg ccttagcttc a 21
210 41
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 20
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 41
tatgatggtt aacggtgatc a 21
210 42
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 30
oligonucleotide
400 42
tattgccttc tcaccagctg c 21
210 43
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 40
400 43
cgccaaagat catccatata t 21
210 44
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 44 50

gctgtgaagg agtttgaatc a 21
210 45
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 45
gctctgtgtt tgaggacagt a 21 10
210 46
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 46
acttagttca gaaaccttaa a 21
210 47 20
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 47
gcaacggata catcttaaat a 21
210 48
211 21 30
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 48
cctcggttct gagtcgtata a 21
210 49
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 49
tcgagaagct agagatcata a 21
210 50
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 50

220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 50
acctctttga tctcgacaat a 21
210 51
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 10
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 51
cctcttcgac ttagacaaca a 21
210 52
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 20
oligonucleotide
400 52
cacacattcc tgaccagaga t 21
210 53
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 30
oligonucleotide
400 53
cgagagagtt catggcttt t 21
210 54
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 54 40
gctccaggaa tttaacaaga t 21
210 55
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 55
gctcagatga taacttctgt a 21
50

210 56
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 56
cactcgata tttgatatgt g 21 10
210 57
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 57
agtttagagac atgggtaata c 21 20
210 58
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 58
cgtgacttca tagaggagta t 21 30
210 59
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 59
atccctccca tcccatatgg 21 40
210 60
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 60
gtagcaatga tgagaccctt t 21 50
210 61
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220

223	Description of Artificial Sequence: Synthetic		
oligonucleotide			
400	61		
gcctagtaaa	ttacagaaga a	21	
210	62		
211	21		
212	DNA		
213	Artificial Sequence		
220			
223	Description of Artificial Sequence: Synthetic	10	
oligonucleotide			
400	62		
gtacgcaaga	aatttggaaaga a	21	
210	63		
211	21		
212	DNA		
213	Artificial Sequence		
220			
223	Description of Artificial Sequence: Synthetic	20	
oligonucleotide			
400	63		
cttgaataaca	acattgccaa t	21	
210	64		
211	21		
212	DNA		
213	Artificial Sequence		
220			
223	Description of Artificial Sequence: Synthetic		
oligonucleotide			
400	64	30	
gccttcctc	acagagttaa a	21	
210	65		
211	21		
212	DNA		
213	Artificial Sequence		
220			
223	Description of Artificial Sequence: Synthetic		
oligonucleotide			
400	65		
acgctgagta	cttcgaaatg t	21	40
210	66		
211	21		
212	DNA		
213	Artificial Sequence		
220			
223	Description of Artificial Sequence: Synthetic		
oligonucleotide			
400	66		
gatgattctg	cctccaaatt g	21	
210	67		50

211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 67
ccgggaacag agaatgttta a 21
210 68
211 21 10
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 68
cacccgtat cacggagatt t 21
210 69
211 21
212 DNA 20
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 69
ccagtgaatc taatgtgact a 21
210 70
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 30
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 70
ccagagacat acataggaat t 21
210 71
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 40
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 71
gtgcgatgg taggcgattt g 21
210 72
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 50

oligonucleotide
400 72
gcaaacttta tgtttgggat t 21
210 73
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 10
400 73
ctggagctgg tgaatgagaa a 21
210 74
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 74 20
gccctgatct ctaagatcta t 21
210 75
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 75
gtcagatcg accacaacga t 21 30
210 76
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 76
agacgaggta tgtgaagaca a 21
210 77 40
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 77
attgatgcc a aaccataat a 21
210 78
211 21
50

212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 78
cagattggat cgaaaaat a 21
210 79
211 21
212 DNA 10
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 79
cctaatactt tccagattga t 21
210 80
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 20
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 80
taatggatat tgcctacatt t 21
210 81
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 30
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
400 81
caagatgctg atgagcaaga t 21
210 82
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 40
 oligonucleotide
400 82
cggcctgaac gccttcgaca t 21
210 83
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide 50

400 83
gacctgagca ccttcgactt c 21
210 84
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 84 10
gccggtgacc aagattacca a 21
210 85
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 85
gctgacaatc aaatgaatca t 21 20
210 86
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 86
cgaaatctca tagcaccaat a 21
210 87 30
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 87
gcttacgttt actggtttct t 21
210 88
211 21 40
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 88
ccaaacctct tgccactaga a 21
210 89
211 21
212 DNA 50

213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 89
gcctagtg tgcgtttct t 21
210 90
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 10
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 90
gcaacgactc ttaccgaatt t 21
210 91
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 20
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 91
cccacgacgt aaaggcttta a 21
210 92
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 30
oligonucleotide
400 92
gccaaagt agttcagagt t 21
210 93
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide 40
400 93
gccaatgag actgacatca a 21
210 94
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 94 50

agaatcgtcg tatgcagtga a 21
210 95
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 95
cgactacatc aaaggcagca a 21 10
210 96
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 96
gaggttcgct tatcaactaa t 21
210 97 20
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 97
cccgagttatg cgcccatatt t 21
210 98
211 21 30
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 98
tcgccaacac gagtgttata t 21
210 99
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 99
ccgcaagaag aagctaaaca a 21
210 100
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence 50

220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 100
cacattggag agaggcgatt t 21
210 101
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 10 10
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 101
cccgatctc aagctcgcta t 21
210 102
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 20
oligonucleotide
400 102
ccagatgttc ttgcgctaata a 21
210 103
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic 30
oligonucleotide
400 103
gcctcagagc tattacccaa t 21
210 104
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 104 40
cccaagggtca aggagattat t 21
210 105
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 105
ccaccagaag aagagaagaa t 21 50

210 106
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 106
cgctctgcaaa gaggagaaga t 21 10
210 107
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 107
gagagcgcaa agacattgtt t 21 20
210 108
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 108
ctgggaagta tgatgtgtat t 21 30
210 109
211 21
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 109
accacctaag aagcccaaat c 21 40
210 110
211 20
212 DNA
213 Artificial Sequence
220
223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
400 110
cccagatcct caatgaagaa 20
210 111
211 15
212 DNA
213 Artificial Sequence
220 50

223 Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

220

221 modified_base

222 (6)..(10)

223 a, c, t, g, unknown or other

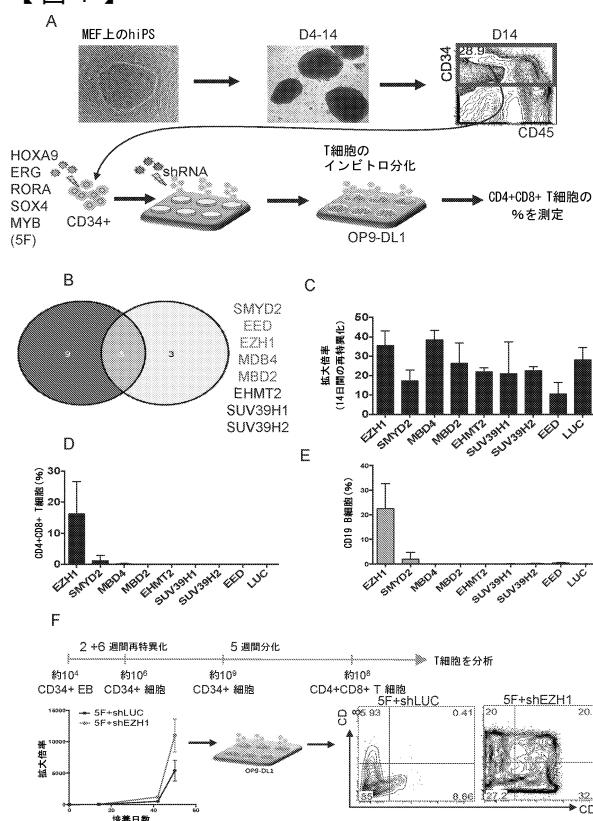
400 111

ttggcnnnnn gccaa

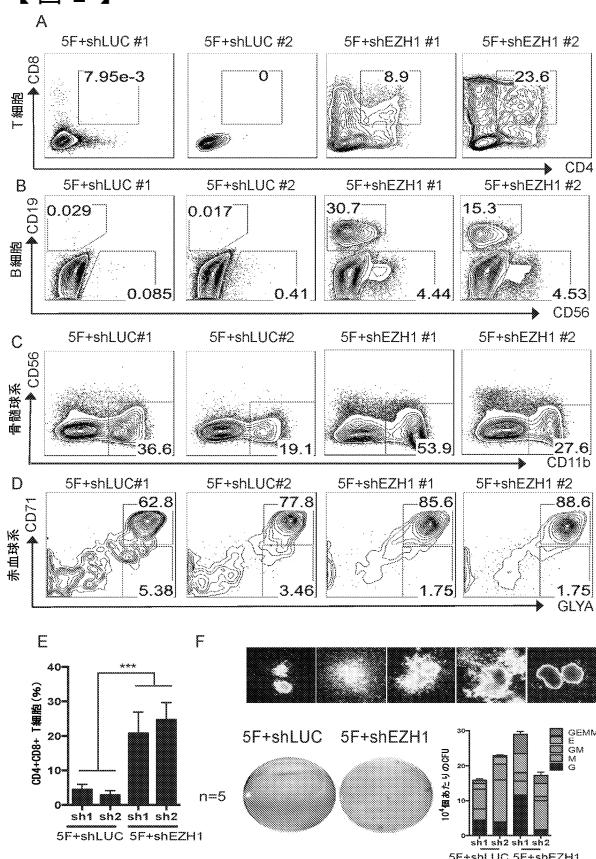
15

【図面】

【図1】



【図2】



10

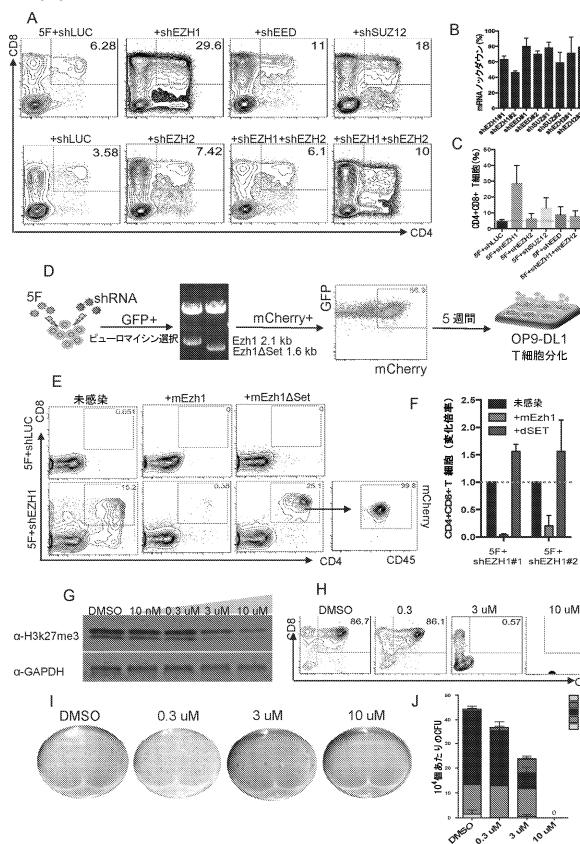
20

30

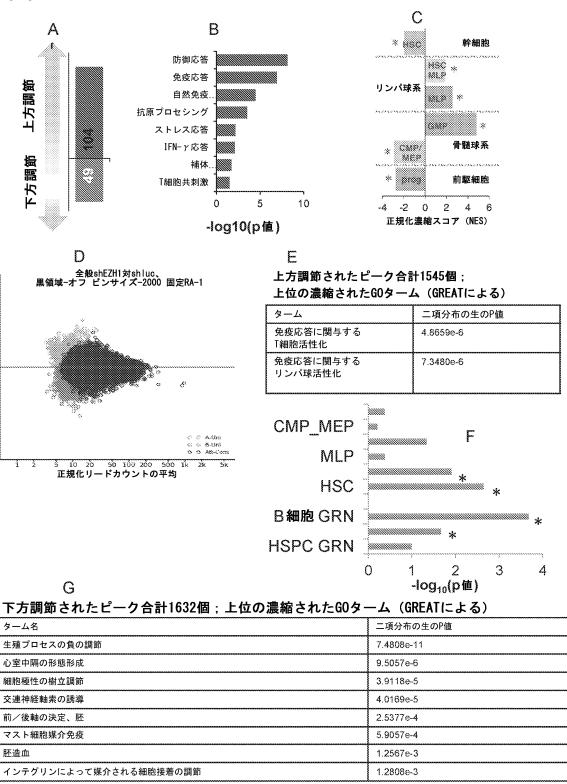
40

50

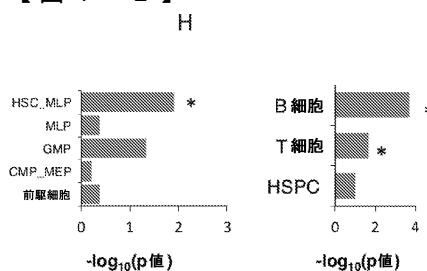
【図3】



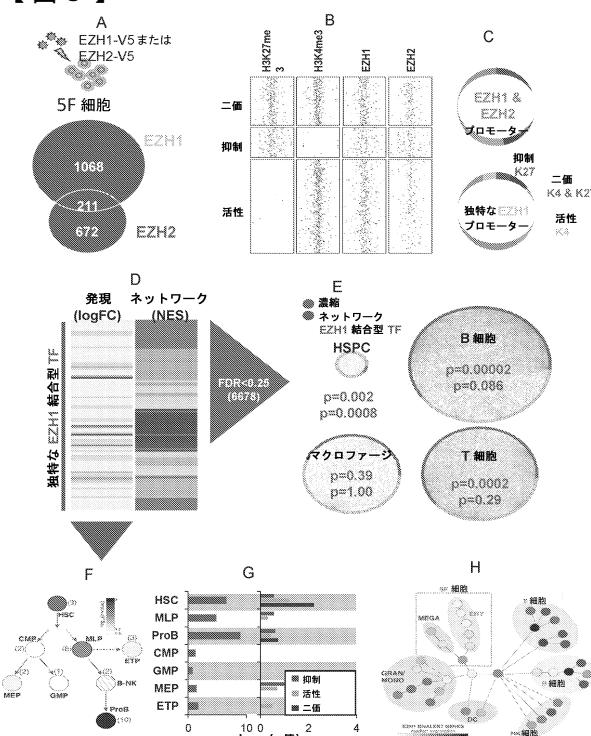
【図4-1】



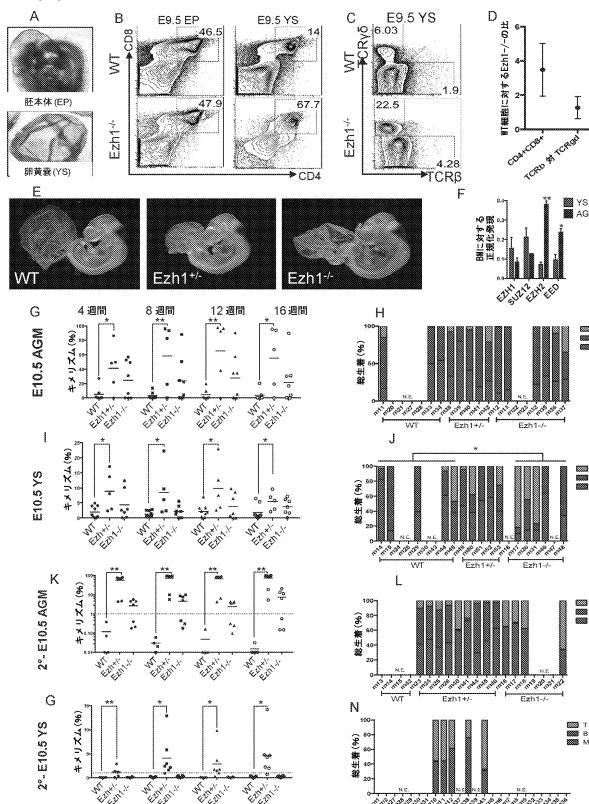
【図4-2】



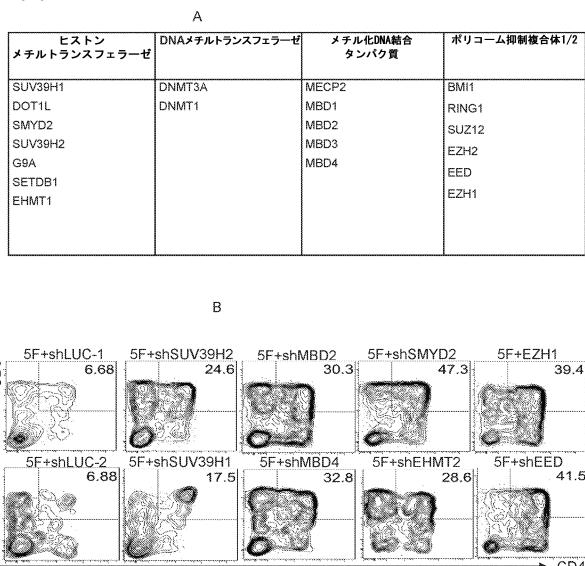
【図5】



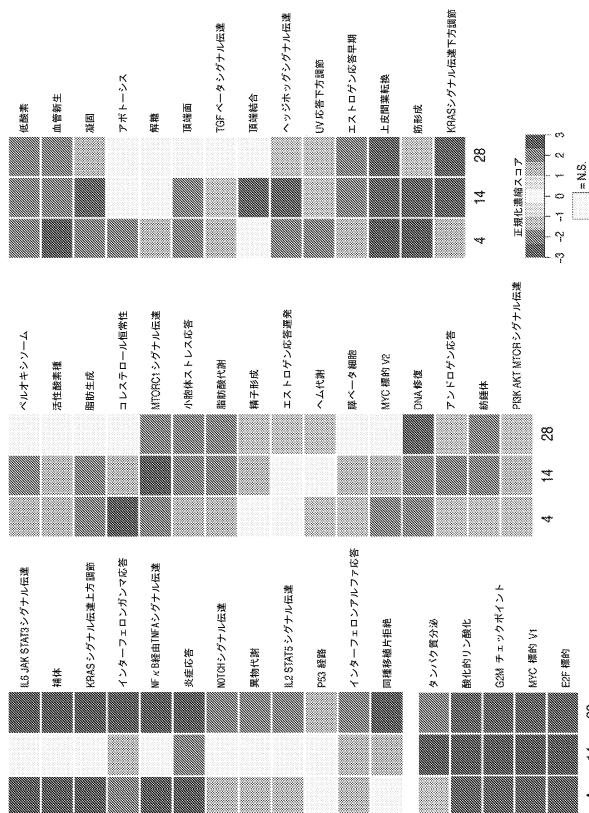
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9 A】

合計988個の最近接遺伝子；濃縮された60タームの上位(DAVIDによる)：

ターム	P値
タンパク質アミノ酸リン酸化	3.0e-4
リン酸代謝プロセス	2.0e-3
細胞内シグナル伝達カスケード	2.6e-3
運動行動	4.1e-3
タンパク質局在	4.3e-3
細胞内輸送	7.0e-3
生物学的接着	7.3e-3
T細胞分化の正の調節	8.8e-3
行動	9.7e-3

10

20

30

40

50

【図 9 B】

合計969個の最近接遺伝子；濃縮されたGOタームの上位(DAVIDによる)：

ターム	P値
管発生	9.9e-5
分泌	1.3e-3
学習または記憶	1.9e-3
発生プロセスの正の調節	2.4e-3
中枢神経系ニューロンの軸索形成	2.6e-3
呼吸システム発生	4.6e-3
細胞防御の組織化	4.8e-3
二、三価無機陽イオン輸送	5.8e-3
肺発生	7.2e-3

10

20

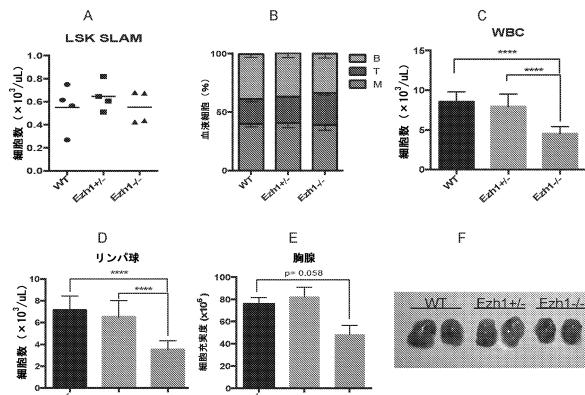
30

40

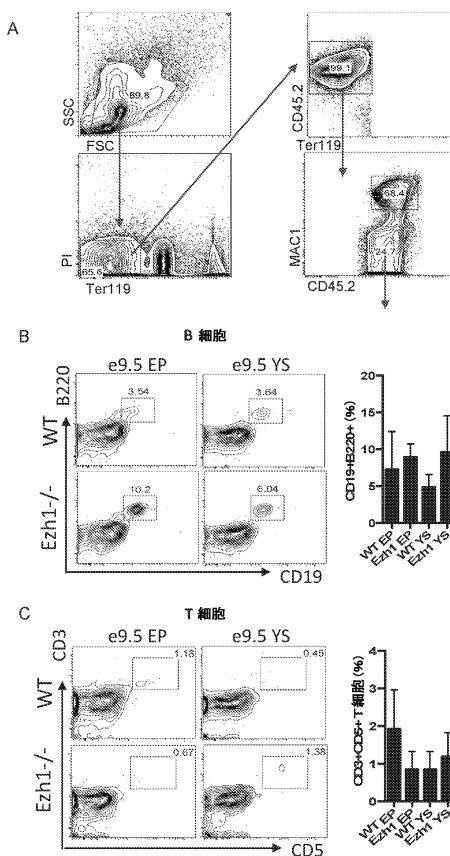
【図 9 C】

名前	全量mRNA	遺伝子	シグナル	被影響遺伝子	重複遺伝子リスト
upregulated_enriched_HSPC GRN	3	20239	28	791	0.03242103
upregulated_enriched_T cell GRN	9	20239	105	791	0.02195017
upregulated_enriched_B cell GRN	16	20239	147	791	0.00021105
upregulated_enriched_CMP_MEP	5	20239	135	791	0.61193848
upregulated_enriched_GMP	10	20239	139	791	0.6368841
upregulated_enriched_HSC	13	20239	144	791	0.00230574
upregulated_enriched_HSC_MLP	11	20239	119	791	0.01243159
upregulated_enriched_MLP	6	20239	133	791	0.41391066
upregulated_enriched_progenitor	6	20239	134	791	0.42655905
downregulated_enriched_HSPC GRN	2	20239	29	781	0.0500069
downregulated_enriched_T cell GRN	2	20239	105	781	0.91693456
downregulated_enriched_B cell GRN	7	20239	147	781	0.34045305
downregulated_enriched_CMP_MEP	7	20239	135	781	0.26681163
downregulated_enriched_GMP	3	20239	139	781	0.09870814
downregulated_enriched_HSC	6	20239	134	781	0.41510746
downregulated_enriched_HSC_MLP	6	20239	119	781	0.38057987
downregulated_enriched_MLP	9	20239	133	781	0.07261612
downregulated_enriched_progenitor	4	20239	134	781	0.75501015

【図 10】

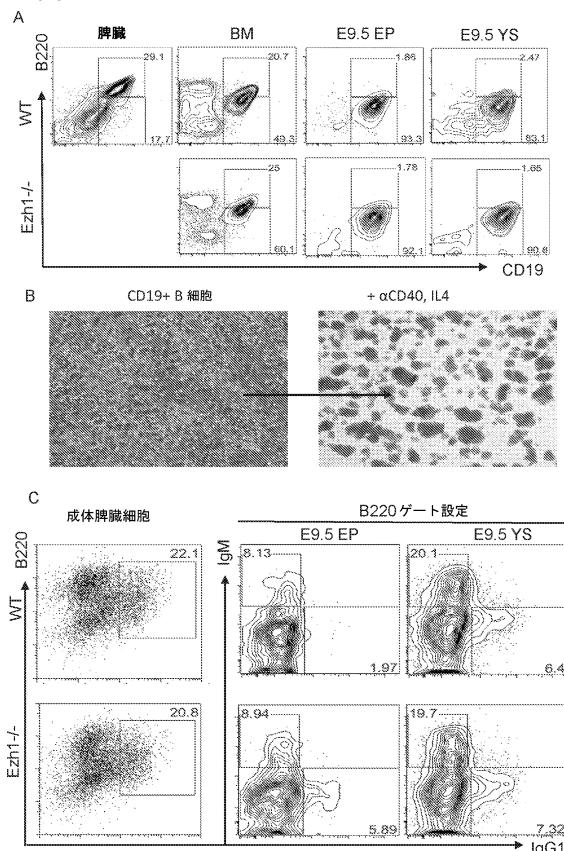


【図 11】

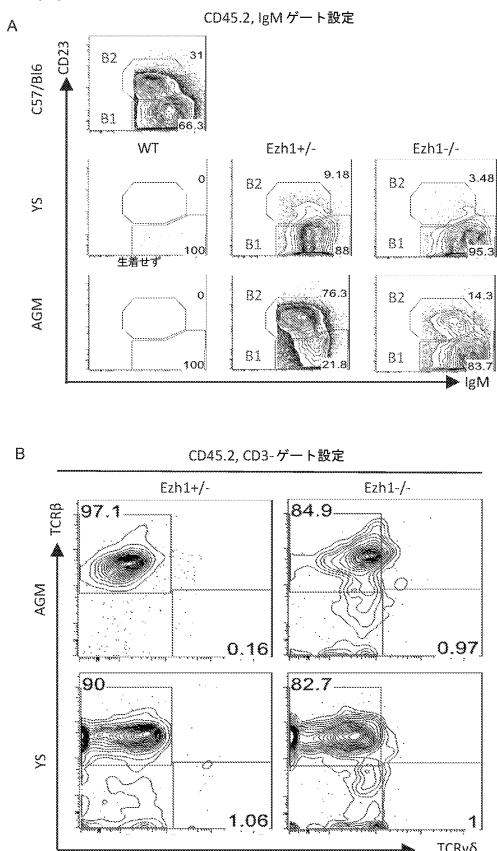


50

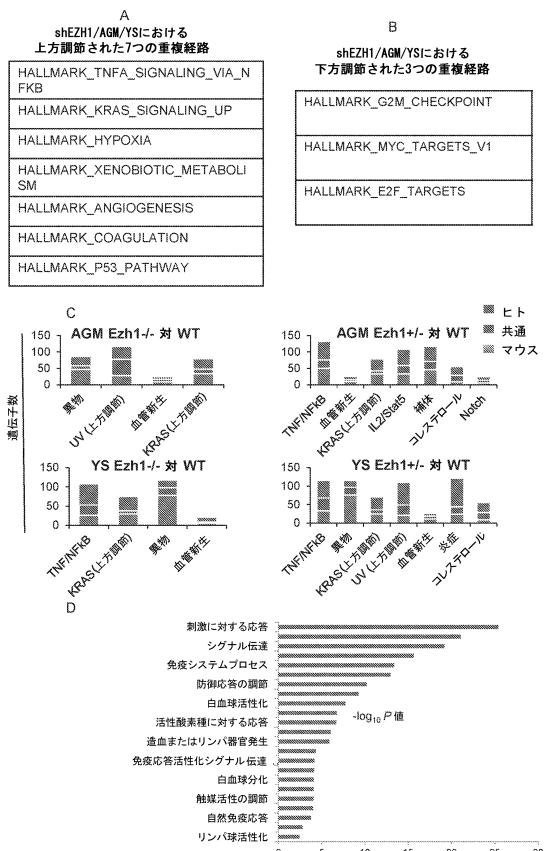
【図12】



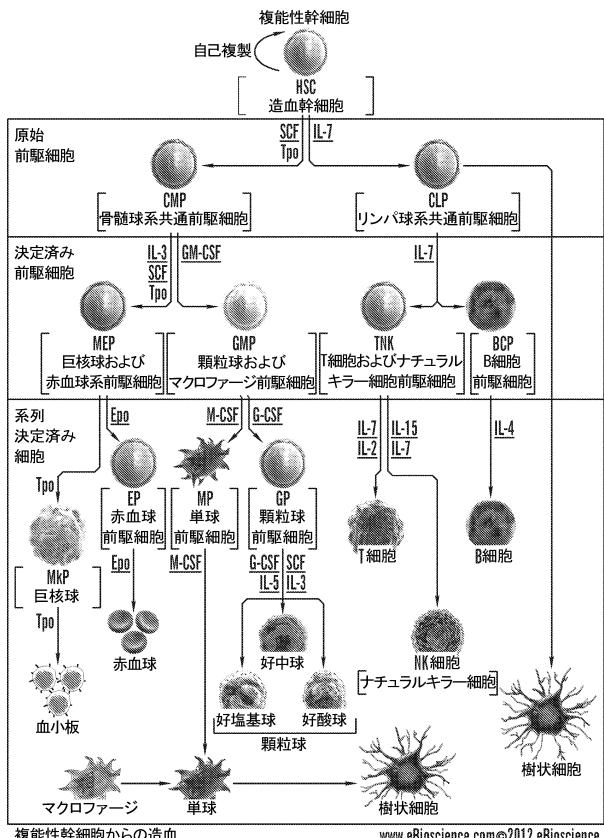
【 図 1 3 】



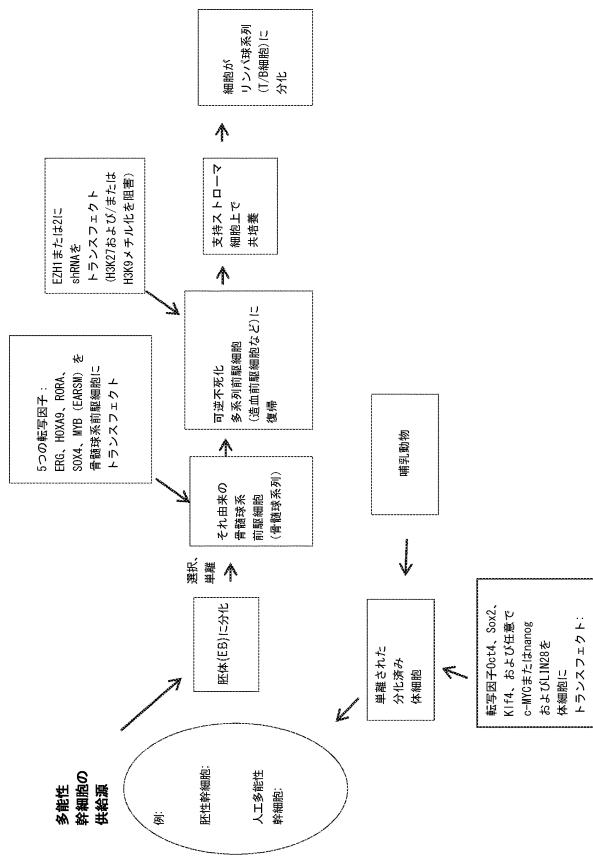
【図 1 4】



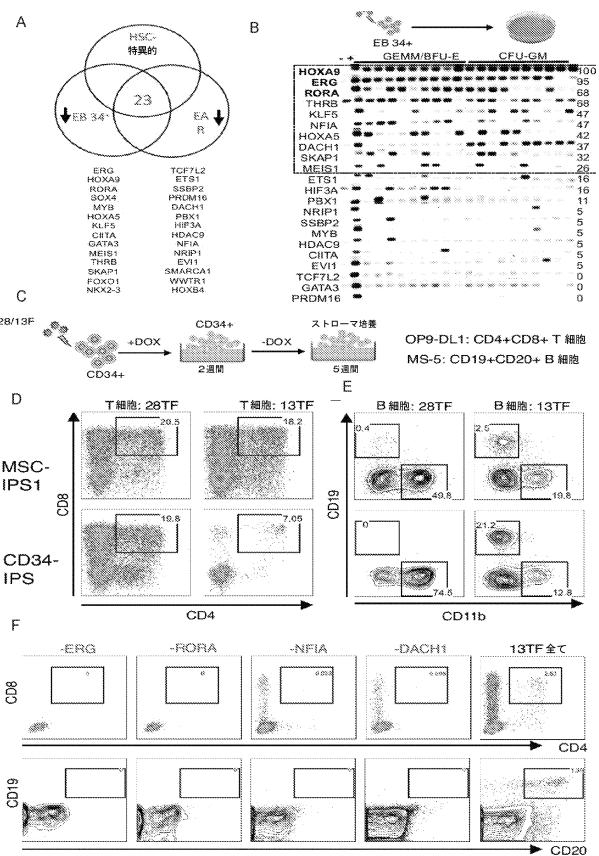
【 図 1 5 】



【図 16】



【図 17】



フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/17 (2025.01)	F I	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	37/02 (2006.01)		A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	7/00 (2006.01)		A 6 1 P	7/00

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヴォー リンダ トイ

アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州 パシフィカ エスプラナード アベニュー 108

アパートメント 184

(72)発明者 デイリー ジョージ キュー .

アメリカ合衆国 0 2 4 9 3 マサチューセッツ州 ウエストン ヤング ロード 50

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表2019-526266 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0129262 (US, A1)

Cell Stem Cell, 2013, Vol.13, pp.459-470

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 12 N 5 / 00

C 12 N 15 / 00

P u b M e d