

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6581655号
(P6581655)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/071 (2010.01)
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/071
 C 1 2 N 5/0735
 C 1 2 N 5/10

請求項の数 15 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2017-519905 (P2017-519905)	(73) 特許権者	510003830
(86) (22) 出願日	平成27年10月13日 (2015.10.13)		フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-532047 (P2017-532047A)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 11, マディソン, サイエンス ドラ イブ 525, スイート 200, ユ ニバーシティー リサーチ パーク
(43) 公表日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/055284	(74) 代理人	110000109
(87) 国際公開番号	W02016/061071		特許業務法人特許事務所サイクス
(87) 国際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)	(72) 発明者	ユー ジュンイン
審査請求日	平成30年10月12日 (2018.10.12)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 19 マディソン メド スイート ド ライヴ 1265
(31) 優先権主張番号	62/063,720		
(32) 優先日	平成26年10月14日 (2014.10.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞由来セラチノサイトの生成およびセラチノサイト培養の維持

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト多能性幹細胞の分化によって生着可能なヒトセラチノサイト幹細胞を提供する方法であって、

(a) 規定された基本培地の存在下において浮遊培養で多能性幹細胞の凝集体を形成させること；

(b) 開始凝集体の形成を促すために、レチノイン酸および骨形成タンパク質 4 (BMP 4) を含有する開始培地の存在下において浮遊培養で凝集体を培養すること；

(c) セラチノサイト前駆細胞を含む細胞集団の形成を促すために、コレラ毒素および(トランスフォーミング増殖因子ベータレセプター 1 (TGF R 1) キナーゼ阻害剤を含有するセラチノサイト前駆体培地中で開始凝集体を培養すること；および

(d) 生着可能なセラチノサイト幹細胞を含む細胞集団の形成を促すために、コレラ毒素および血管内皮増殖因子 (VEGF) を含むセラチノサイト幹細胞成熟培地中でセラチノサイト前駆細胞を培養すること、

を含み、セラチノサイト幹細胞がサイトセラチン 15 及び CD 49 f を発現する、方法。

【請求項 2】

セラチノサイト幹細胞を、コレラ毒素および TGF R 1 キナーゼ阻害剤を含有するセラチノサイト幹細胞維持培地中における培養中で維持することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

ケラチノサイト幹細胞を、集団が少なくとも 5 倍に倍加するまで維持する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ケラチノサイト幹細胞の純度が少なくとも 90 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

多能性幹細胞が人工多能性幹 (iPS) 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

多能性幹細胞を、(i) 工程 (a) の前に、血清を含まない培地中で、及び / 又は (ii) 工程 (a) の前に、非細胞性マトリックス成分上で、培養する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

工程 (a) で使用される培地が、化学的に規定された培地である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (a) における培養が約 1 日間実施される、工程 (b) における培養が約 1 日 ~ 約 5 日間実施される、工程 (c) における培養が約 8 日間 ~ 約 14 日間実施される、及び / 又は工程 (d) における培養が約 4 日間 ~ 約 8 日間実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (a) における培養がミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤の存在下で実施される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 10】

ケラチノサイト前駆細胞培地が、上皮細胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 1 (FGF1)、サイクリック AMP 類似体、ナイアシンアミド、アスコルビン酸、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (c) 及び / 又は工程 (d) における培養が接着培養として実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (c) 及び / 又は工程 (d) における培養が細胞外マトリックス成分又は非細胞性マトリックス成分上で実施される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 13】

ケラチノサイト前駆細胞がサイトケラチン 14 および / または p63 を発現している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ケラチノサイト前駆細胞培地に含まれるカルシウムのレベルが約 0.2 mM を超えるものではない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

ケラチノサイト幹細胞成熟培地が、EGF、FGF1、サイクリック AMP 類似体、ナイアシンアミド、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本出願は、2014 年 10 月 14 日出願の米国特許出願番号第 62 / 063,720 号の優先権を主張し、その開示全体は、免責条項以外の全体が参照により本明細書中に具体的に組み入れられる。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は基本的に、幹細胞および分化細胞の分野に関する。本発明は、より具体的には

50

、未分化細胞からの人工ケラチノサイト幹細胞（iK C）の生成および初代ケラチノサイトの培養方法に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

ヒト胚性幹細胞（ESC）および人工多能性幹細胞（iPSC）は、ケラチノサイトを含む体の全種類の細胞に分化する能力を維持しながら、インビトロで長期間増殖させることができる。そのためこれらの多能性細胞は、移植治療および化粧品／創薬のいずれにとっても患者特異的な機能性ケラチノサイトの制約のない供給源となる可能性がある。

【0004】

これまで複数のグループによって、マウスおよびヒトES/iPS細胞を上皮ケラチノサイト（サイトケラチン14陽性）に分化させる手法が報告されている。メタロら（2010）は、胚様体にレチノイン酸とBMP4を処理し、フィーダー細胞を使用せず、コラーゲンIVでコーティングした表面上で単層培養を行うことによりヒトES細胞からケラチノサイトを誘導した。カワサキら（2000）は、マウスES細胞からの神経分化を促進するフィーダー細胞を使い、そこにBMP4を加えて神経外胚葉の上皮細胞への決定づけを開始させる方法を報告した。リアンら（2013）は、Srcファミリーキナーゼに属する低分子阻害剤を使ってシンプル（simple）上皮前駆細胞を誘導し、これをさらに、血清を含まない条件で上皮ケラチノサイトに分化させる方法を説明している。しかしながら、これらのいずれの方法によっても、細胞数が2倍を超えて倍加するまたは長期間生着する能力を有する上皮ケラチノサイト幹細胞（サイトケラチン14およびサイトケラチン15の両方が陽性）を生じることはできない。

【発明の概要】

【0005】

一態様では、多能性幹細胞の分化によって生着可能なケラチノサイト幹細胞を生成する方法が提供され、この方法は、（a）規定された基本培地の存在下において浮遊培養で多能性幹細胞の凝集体を形成させること；（b）開始凝集体の形成を促すために、レチノイン酸およびBMP4を含有する開始培地の存在下において浮遊培養でこの凝集体を培養すること；（c）ケラチノサイト前駆細胞を含む細胞集団の形成を促すために、コレラ毒素およびTGFR1キナーゼ阻害剤を含有するケラチノサイト前駆体培地中で開始凝集体を培養すること；および（d）生着可能なケラチノサイト幹細胞を含む細胞集団の形成を促すために、ケラチノサイト幹細胞成熟培地中でこのケラチノサイト前駆細胞を培養すること、を含む。

【0006】

種々の側面においてこの方法は、ケラチノサイト幹細胞維持培地中での培養でケラチノサイト幹細胞を維持することをさらに含む場合がある。特定の側面において、ケラチノサイト幹細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそこから導き出される任意の範囲の期間、維持され得る。細胞は、好ましくは、その集団が少なくとも5倍にまたは少なくとも10倍に倍加するまで維持され得る。特定の側面において、ケラチノサイト幹細胞は、少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または100%の純度であってよい。好ましくは、ケラチノサイト幹細胞は、少なくとも90%または95%の純度でもよい。

【0007】

特定の側面において、多能性幹細胞は、人工多能性幹（iPS）細胞または胚性幹細胞の場合がある。幹細胞にはまた、多分化能性幹細胞、少能性幹細胞、または単能性幹細胞も含まれ得る。幹細胞にはまた、胎生幹細胞または成体幹細胞、例えば上皮幹細胞、および皮膚幹細胞も含まれ得る。特定の側面において、幹細胞は、臍帯、胎盤、羊水、絨毛膜絨毛、胚盤胞、骨髓、脂肪組織、脳、末梢血、臍帯血、経血、血管、骨格筋、皮膚、およ

10

20

30

40

50

び肝臓から単離される場合がある。

【0008】

いくつかの側面では、工程(a)の前に、多能性幹細胞を、血清を含まない培地中で培養してもよい。いくつかの側面では工程(a)の前に、多能性幹細胞を非細胞性マトリックス成分上で培養してもよい。

【0009】

種々の側面において凝集体を形成することは、多能性幹細胞を、本質的に単一の細胞の培養へと分離させることを含む場合がある。特定の側面において、本方法の本質的に単一の培養は、少なくともまたは約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 個の細胞またはそこから導き出される任意の範囲の数の細胞を含み得る。本質的に単一の細胞の培養の初期播種密度は、少なくともまたは約 10 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 個細胞/mL、またはそこから導き出される任意の範囲の密度であってよい。特定の側面において、工程(a)における培地は組成が化学的に規定された培地、例えばT e S R培地などであってよい。いくつかの側面において、工程(a)における培養は、約1、2、または3日間という期間の間、実施してもよい。前記培養することが約1日間実施されることが好ましい。種々の側面において、工程(a)における培養は、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤の存在下で実施してもよい。

【0010】

いくつかの側面において、工程(b)における培養は、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日間、またはそこから導き出される任意の範囲の期間、実施してもよい。前記培養することが約1日~約5日の間、例えば約3日間、実施されることが好ましい。特定の側面において、工程(a)および/または(b)の浮遊培養は、静的な浮遊培養として維持することができる。特定の側面において、工程(a)および/または(b)の浮遊培養は、動的な浮遊培養として維持することもできる。

【0011】

特定の側面において、工程(c)における培養は、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日間、またはそこから導き出される任意の範囲の期間にわたって実施してもよい。前記培養することは、約8日間~約14日間実施すること、例えば、約10日間実施することなどが好ましい。いくつかの側面では、工程(c)における培養を接着培養として実施してもよい。いくつかの側面では、工程(c)における培養を、細胞外マトリックス成分上において実施してもよい。いくつかの側面では、工程(c)における培養を、非細胞性マトリックス成分上において実施してもよい。

【0012】

種々の側面では、ケラチノサイト前駆細胞培地は、EGF、FGF1、サイクリックAMP類似体、ナイアシンアミド、アスコルビン酸、またはこれらの組み合わせをさらに含む場合がある。いくつかの側面では、ケラチノサイト前駆細胞培地はEGFおよびナイアシンアミドをさらに含む場合がある。特定の側面では、ケラチノサイト前駆細胞培地に含まれるカルシウムのレベルは、約0.2mMを超えない場合があり、好ましくは約0.12mMを超えない場合がある。

【0013】

特定の側面においてケラチノサイト前駆細胞は、サイトケラチン14および/またはp63を発現している場合がある。前記発現は、タンパク質の発現解析、例えばELISAもしくはFACS解析、またはRNAの発現解析、例えばqRT-PCRで検出することができる。

【0014】

特定の側面では、工程(d)における培養を少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20

10

20

30

40

50

日間、またはそこから導き出される任意の範囲の期間、実施することができる。前記培養することは、約4日間～約8日間実施すること、例えば、約6日間実施することなどが好ましい。いくつかの側面では、工程(d)における培養を接着培養として実施してもよい。いくつかの側面では、工程(d)における培養を細胞外マトリックス成分上において実施してもよい。いくつかの側面では、工程(d)における培養を非細胞性マトリックス成分上において実施してもよい。

【0015】

種々の側面では、ケラチノサイト幹細胞成熟培地が、コレラ毒素、TGF α R1キナーゼ阻害剤、EGF、FGF1、サイクリックAMP類似体、ナイアシンアミド、またはこれらの組み合わせのうちのいずれかを含む場合がある。

10

【0016】

特定の側面では、ケラチノサイト幹細胞がサイトケラチン15および/またはCD49fを発現している場合がある。前記発現を、タンパク質の発現解析、例えばELISAもしくはFACS解析、またはRNAの発現解析、例えばqRT-PCRで検出することができる。

【0017】

一態様では、ケラチノサイトに及ぼす薬理学的な効果または毒性学的な効果について化合物を評価する方法が提供され、この方法は、(a)本態様の方法によって提供されたケラチノサイトを化合物と接触させること；および(b)この化合物がケラチノサイトに及ぼす薬理学的な効果または毒性学的な効果を評価すること、を含む。

20

【0018】

一態様では、本態様の方法によって生成されたケラチノサイト幹細胞を含む、移植可能な上皮細胞のシートを提供する。いくつかの側面においてこのシートはさらに、移植可能な皮膚上皮細胞のシートとして規定される場合がある。いくつかの側面においてこのシートはさらに、移植可能な角膜上皮細胞のシートとして規定される場合がある。

【0019】

一態様では、治療を必要としている患者の治療方法が提供され、この方法は、本態様の移植可能な上皮細胞のシートを患者に移植することを含む。特定の側面においてこのケラチノサイト幹細胞は、患者にとって自家移植であってもよい。

【0020】

一態様では、ナイアシンアミドおよびBMP4を含有する、規定されたケラチノサイト培地が提供される。特定の側面においてこの培地はさらに、約3mMナイアシンアミドを含むものとして規定されていてもよい。特定の側面においてこの培地はさらに、約0.5ng/mLのBMP4を含むものとして規定されていてもよい。いくつかの側面においてこの培地は、VEGFおよび/またはインスリンをさらに含んでいてもよい。いくつかの側面においてこの培地は、カルシウム、エタノールアミンおよびホスホリルエタノールアミン、トランスフェリン、ヒドロコルチゾン、FGF1、EGF、IGF1、T3、L-カルニチン、サイクリックAMP類似体、および/またはコレラ毒素をさらに含んでいてもよい。いくつかの側面においてこの方法は、80 μ Mのカルシウム、0.1mMのエタノールアミン、0.1mMのホスホリルエタノールアミン、5 μ g/mLのトランスフェリン、0.2 μ g/mLのヒドロコルチゾン、1ng/mLのFGF1、0.5ng/mLのEGF、10ng/mLのIGF1、10nMのT3、5 μ MのL-カルニチン、0.2mMの8-Br-cAMP、100pMのコレラ毒素、3mMのナイアシンアミド、0.5ng/mLのBMP4、25ng/mLのVEGF、および10 μ g/mLのインスリンを含むものとして規定されていてもよい。

30

40

【0021】

本発明のその他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明によって明らかとなるだろう。しかしながら、その詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すものではあるものの、例示のためだけに提供されるものであり、当業者にはこの詳細な説明から、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修正が明らかであると理解さ

50

れる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

以下の図面は本明細書の一部をなしており、かつ、本発明の特定の側面をさらに示すために含まれている。これらの図面の1つ以上を、本明細書に記載の特定の態様に関する詳細な説明と共に参照することで、本発明をより深く理解することができるだろう。

【0023】

【図1】図1：ヒトESC/iPSCから誘導した人工ケラチノサイト幹細胞(iKC)の正常な分化。ケラチノサイト幹細胞は、開始、分化、成熟、および維持の4工程でESC/iPSCから生成することができる。各工程で使用する組成が化学的に規定された培地の全組成(FBSを含まない、およびBSAを含まない)を表1~4に示している。

【0024】

【図2A】図2A-B：iKCの顕微鏡レベルの特徴。(A)3回継代したヒト包皮ケラチノサイトと1回継代したiKCの位相差顕微鏡像。矢印は、明るく見える細胞間の境界を示している。これは、皮膚にバリア機能をもたらしている密着結合を共有しているケラチノサイトに典型的な特徴である。(B)免疫蛍光染色した、ヒト包皮ケラチノサイトおよびiKCの顕微鏡像である。細胞を、培養プレート上において2%のホルムアルデヒドで固定し、抗サイトケラチン14(K14)および抗サイトケラチン15(K15)抗体で染色した。オリンパスIX71倒立顕微鏡で別々の蛍光チャネルを使い、画像を得た。スケールバーは100μmを示している。

【図2B】図2A-B：iKCの顕微鏡レベルの特徴。(A)3回継代したヒト包皮ケラチノサイトと1回継代したiKCの位相差顕微鏡像。矢印は、明るく見える細胞間の境界を示している。これは、皮膚にバリア機能をもたらしている密着結合を共有しているケラチノサイトに典型的な特徴である。(B)免疫蛍光染色した、ヒト包皮ケラチノサイトおよびiKCの顕微鏡像である。細胞を、培養プレート上において2%のホルムアルデヒドで固定し、抗サイトケラチン14(K14)および抗サイトケラチン15(K15)抗体で染色した。オリンパスIX71倒立顕微鏡で別々の蛍光チャネルを使い、画像を得た。スケールバーは100μmを示している。

【0025】

【図3A】図3A-B：iKCの誘導に必須の成分。(A)最適な条件(図1および表1、2を参照のこと)、および1度に培地成分を1つ変更した他の非最適条件において、継代0の、14日間分化させた培養の位相差顕微鏡像。(B)異なる線維芽細胞成長因子(FGF)を使い、継代0の14日間分化させた培養の位相差顕微鏡像と免疫蛍光顕微鏡像。細胞を、培養プレート上において2%のホルムアルデヒドで固定し、抗K14抗体で染色し、さらにDAPIでDNAを対比染色した。オリンパスIX71倒立顕微鏡で別々の蛍光チャネルを使い、画像を得た。スケールバーは100μmを示している。

【図3B】図3A-B：iKCの誘導に必須の成分。(A)最適な条件(図1および表1、2を参照のこと)、および1度に培地成分を1つ変更した他の非最適条件において、継代0の、14日間分化させた培養の位相差顕微鏡像。(B)異なる線維芽細胞成長因子(FGF)を使い、継代0の14日間分化させた培養の位相差顕微鏡像と免疫蛍光顕微鏡像。細胞を、培養プレート上において2%のホルムアルデヒドで固定し、抗K14抗体で染色し、さらにDAPIでDNAを対比染色した。オリンパスIX71倒立顕微鏡で別々の蛍光チャネルを使い、画像を得た。スケールバーは100μmを示している。

【0026】

【図4】図4：ヒトESC/iPSCから分化させたiKCの純度。図1で説明した方法によってiKCを生成し、その後、継代していない時点(P0)と1回継代した時点(P1)で回収した。細胞を2%ホルムアルデヒドで固定し、抗K14-FITC抗体および抗CD49f-PE抗体で染色した。アキュリ(Accuri)フローサイトメーターを使い、染色したiKC、ならびにイソ型対照および3回継代した初代ヒト包皮ケラチノサイトを分析した。

10

20

30

40

50

【0027】

【図5】図5A - B : i K C の成長能および幹細胞性。(A) 維持条件における i K C の増殖能。バーゼン (V e r s e n e) 中の 0 . 1 % トリプシンを使い、i K C を、ゼラチンでコーティングしたヌンクロン (N u n c l o n) 6 ウェルプレートに、1 ウェル当たり細胞 50,000 個の密度で継代した。細胞に隔日で維持培地を与え、プレーティングしてから5日目に、再度継代した。継代ごとに総細胞数を記録し、集団の倍加率を計算した。(B) i K C および初代ケラチノサイトのコロニー形成アッセイ (C F A) 画像。細胞を、6 ウェルプレーに1 ウェル当たり細胞 250 個の密度でプレーティングし、2 週間生育させた。初代ケラチノサイトの最適な成長には、ブランクの、非細胞性培養で処理したプレートを用いた。一方 i K C には、基底膜として天然のラミニン残留物が生じるように予め初代ケラチノサイトを培養しておいたプレートを使用した。培養の終了時に細胞を 2 % のホルムアルデヒドで固定し、ヘキスト (H o e c h s t) で染色した。モレキュラー・デバイス (M o l e c u l a r D e v i c e s) 社のイメージエクスプレス (I m a g e X p r e s s) 高解像度イメージャを使い、プレート全体の画像を取得した。スケールバーは 1 c m を示している。

10

【0028】

【図6】図6A - B : i K C の分化能。(A) マウス脱表皮化真皮 (D E D) における、i K C の分化および層化。トランズウェル中で 2 週間培養した後、凍結切片を作成するために、D E D 移植片を取り除き、O C T コンパウンドに包埋した。切片 (16 μ M) を切り出し、ヘマトキシリンで染色した。移植された細胞の核はピンク色に染まった。括弧は、白色に見える下部の D E D 組織の上にある、生きた細胞の複数の層を示している。(B) F o x N 1 免疫不全ヌードマウスの背中における i K C の生着性。これらの写真は手術の 3 週間後に撮られたもので、i K C (2 複製 (r e p l i c a t e または r e p)) をヒト新生仔包皮線維芽細胞 (h F B) と一緒に移植すると、初代マウスおよびヒトケラチノサイト (m K C および h K C) と同程度に、最初にあった皮膚の創傷を覆い、治すことができることが分かった。h F B だけを移植したマウスは、術後 1 ~ 2 週間の間に死んだ。i K C 移植の方では残存毛がないことに注目されたい。スケールバーは 500 μ M。

20

【0029】

【図7A】図7A D : インスリンおよび I G F は両方とも、ヒト新生仔包皮初代ケラチノサイトの成長を支持する。(A) K C M 1 中で、I G F または様々な濃度のインスリン (0 ~ 10 μ g / m L) のいずれかと共に培養した初代ケラチノサイトの明視野画像。スケールバーは 200 μ m。(B) K C M 1 を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C 及び D) K C M 1 改変物中で培養したケラチノサイトの C F A。6 回継代したもののデータを示している。

30

【図7B - C】図7A D : インスリンおよび I G F は両方とも、ヒト新生仔包皮初代ケラチノサイトの成長を支持する。(A) K C M 1 中で、I G F または様々な濃度のインスリン (0 ~ 10 μ g / m L) のいずれかと共に培養した初代ケラチノサイトの明視野画像。スケールバーは 200 μ m。(B) K C M 1 を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C 及び D) K C M 1 改変物中で培養したケラチノサイトの C F A。6 回継代したもののデータを示している。

40

【図7D】図7A D : インスリンおよび I G F は両方とも、ヒト新生仔包皮初代ケラチノサイトの成長を支持する。(A) K C M 1 中で、I G F または様々な濃度のインスリン (0 ~ 10 μ g / m L) のいずれかと共に培養した初代ケラチノサイトの明視野画像。スケールバーは 200 μ m。(B) K C M 1 を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C 及び D) K C M 1 改変物中で培養したケラチノサイトの C F A。6 回継代したもののデータを示している。

【0030】

【図8A】図8A - E : ナイアシンアミドおよび B M P - 4 は、培養中の初代ケラチノサイトの寿命を長くする。(A) 様々な培地調製物中で培養した初代ケラチノサイトの明視野像 (p 3)。スケールバーは 200 μ m。(B) 様々な培地調製物を使った初代ケラチ

50

ノサイトの長期培養。(C) 様々な培地組成中で培養したケラチノサイト(p 4)を使ったCFA。(DおよびE) KCM1、KCM2、KCM3およびKCM4を使って培養したケラチノサイトを使ったCFAの定量。

【図8B】図8A-E: ナイアシンアミドおよびBMP-4は、培養中の初代ケラチノサイトの寿命を長くする。(A) 様々な培地調製物中で培養した初代ケラチノサイトの明視野像(p 3)。スケールバーは200 μm。(B) 様々な培地調製物を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C) 様々な培地組成中で培養したケラチノサイト(p 4)を使ったCFA。(DおよびE) KCM1、KCM2、KCM3およびKCM4を使って培養したケラチノサイトを使ったCFAの定量。

【図8C】図8A-E: ナイアシンアミドおよびBMP-4は、培養中の初代ケラチノサイトの寿命を長くする。(A) 様々な培地調製物中で培養した初代ケラチノサイトの明視野像(p 3)。スケールバーは200 μm。(B) 様々な培地調製物を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C) 様々な培地組成中で培養したケラチノサイト(p 4)を使ったCFA。(DおよびE) KCM1、KCM2、KCM3およびKCM4を使って培養したケラチノサイトを使ったCFAの定量。

【図8D】図8A-E: ナイアシンアミドおよびBMP-4は、培養中の初代ケラチノサイトの寿命を長くする。(A) 様々な培地調製物中で培養した初代ケラチノサイトの明視野像(p 3)。スケールバーは200 μm。(B) 様々な培地調製物を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C) 様々な培地組成中で培養したケラチノサイト(p 4)を使ったCFA。(DおよびE) KCM1、KCM2、KCM3およびKCM4を使って培養したケラチノサイトを使ったCFAの定量。

【図8E】図8A-E: ナイアシンアミドおよびBMP-4は、培養中の初代ケラチノサイトの寿命を長くする。(A) 様々な培地調製物中で培養した初代ケラチノサイトの明視野像(p 3)。スケールバーは200 μm。(B) 様々な培地調製物を使った初代ケラチノサイトの長期培養。(C) 様々な培地組成中で培養したケラチノサイト(p 4)を使ったCFA。(DおよびE) KCM1、KCM2、KCM3およびKCM4を使って培養したケラチノサイトを使ったCFAの定量。

【0031】

【図9A】図9A-C: VEGFは初代ケラチノサイトの増殖能を高めた。(A) KCM4およびKCM4+VEGF(25 ng/mL)を使って育てた細胞の長期培養。(BおよびC) 継代後期におけるCFAにおけるVEGFの正の効果。

【図9B】図9A-C: VEGFは初代ケラチノサイトの増殖能を高めた。(A) KCM4およびKCM4+VEGF(25 ng/mL)を使って育てた細胞の長期培養。(BおよびC) 継代後期におけるCFAにおけるVEGFの正の効果。

【図9C】図9A-C: VEGFは初代ケラチノサイトの増殖能を高めた。(A) KCM4およびKCM4+VEGF(25 ng/mL)を使って育てた細胞の長期培養。(BおよびC) 継代後期におけるCFAにおけるVEGFの正の効果。

【0032】

【図10A】図10A-C: ケラチノサイトは、コラーゲン1をコーティングしたプラスチック製のプレートまたはコーティングしていないプラスチック製のプレートのいずれかを使って培養することができる。(A) KCM4中で、コラーゲン1をコーティングしたプレートまたはコーティングしていないプレートのいずれかで生育させた、長期細胞培養。(BおよびC) コーティングしていないプレート上で生育させた細胞は、コラーゲン上で生育させた細胞より、CFAにおいて多少よく成長した。

【図10B】図10A-C: ケラチノサイトは、コラーゲン1をコーティングしたプラスチック製のプレートまたはコーティングしていないプラスチック製のプレートのいずれかを使って培養することができる。(A) KCM4中で、コラーゲン1をコーティングしたプレートまたはコーティングしていないプレートのいずれかで生育させた、長期細胞培養。(BおよびC) コーティングしていないプレート上で生育させた細胞は、コラーゲン上で生育させた細胞より、CFAにおいて多少よく成長した。

10

20

30

40

50

【図10C】図10A - C : ケラチノサイトは、コラーゲン1をコーティングしたプラスチック製のプレートまたはコーティングしていないプラスチック製のプレートのいずれかを使って培養することができる。(A) KCM4中で、コラーゲン1をコーティングしたプレートまたはコーティングしていないプレートのいずれかで生育させた、長期細胞培養。(BおよびC) コーティングしていないプレート上で生育させた細胞は、コラーゲン上で生育させた細胞より、CFAにおいて多少よく成長した。

【0033】

【図11】図11 : KCM4中で培養したケラチノサイトは、高レベルのカルシウムにตอบสนองした分化マーカーを発現する。3回継代したケラチノサイトを1.5 mMの Ca^{2+} で3日間処理し、分化マーカーであるケラチン1、ロリクリンおよびフィラグリンの発現を免疫細胞化学によって評価した。スケールバーは200 μm 。

10

【0034】

【図12A】図12A - D : KCM4は、市販されている組成が化学的に規定された培地と同様に機能する。KCM4を、3種類の組成が化学的に規定された培地、つまり、インビトロジェンのケラチノサイト血清を含まない既知組成培地(DKSFM)、エプライフの既知組成の成長補助培地(Growth Supplement)(EDGS)、およびロンザのケラチノサイト既知組成成長培地(KGM-CD)、と比較した。市販の培地中で培養した細胞は、製造業者が推奨しているように、コラーゲンI(C1)をコーティングしてあるプレート上で生育させた。KCM4培養には非コーティング(NC)プレートを使用した。(A)それぞれの培地(P3 DKSFM、EDGSおよびKGM-CDおよびP5 KCM4)中で培養した初代KCの明視野画像。スケールバーは200 μm 。(B)それぞれの培地中で培養した初代ケラチノサイトの長期培養。(CおよびD)それぞれの培地中で培養したケラチノサイトのCFA。コロニーの数と大きさに関しては、KCM4がその他の培地よりも良かった。

20

【図12B】図12A - D : KCM4は、市販されている組成が化学的に規定された培地と同様に機能する。KCM4を、3種類の組成が化学的に規定された培地、つまり、インビトロジェンのケラチノサイト血清を含まない既知組成培地(DKSFM)、エプライフの既知組成の成長補助培地(Growth Supplement)(EDGS)、およびロンザのケラチノサイト既知組成成長培地(KGM-CD)、と比較した。市販の培地中で培養した細胞は、製造業者が推奨しているように、コラーゲンI(C1)をコーティングしてあるプレート上で生育させた。KCM4培養には非コーティング(NC)プレートを使用した。(A)それぞれの培地(P3 DKSFM、EDGSおよびKGM-CDおよびP5 KCM4)中で培養した初代KCの明視野画像。スケールバーは200 μm 。(B)それぞれの培地中で培養した初代ケラチノサイトの長期培養。(CおよびD)それぞれの培地中で培養したケラチノサイトのCFA。コロニーの数と大きさに関しては、KCM4がその他の培地よりも良かった。

30

【図12C】図12A - D : KCM4は、市販されている組成が化学的に規定された培地と同様に機能する。KCM4を、3種類の組成が化学的に規定された培地、つまり、インビトロジェンのケラチノサイト血清を含まない既知組成培地(DKSFM)、エプライフの既知組成の成長補助培地(Growth Supplement)(EDGS)、およびロンザのケラチノサイト既知組成成長培地(KGM-CD)、と比較した。市販の培地中で培養した細胞は、製造業者が推奨しているように、コラーゲンI(C1)をコーティングしてあるプレート上で生育させた。KCM4培養には非コーティング(NC)プレートを使用した。(A)それぞれの培地(P3 DKSFM、EDGSおよびKGM-CDおよびP5 KCM4)中で培養した初代KCの明視野画像。スケールバーは200 μm 。(B)それぞれの培地中で培養した初代ケラチノサイトの長期培養。(CおよびD)それぞれの培地中で培養したケラチノサイトのCFA。コロニーの数と大きさに関しては、KCM4がその他の培地よりも良かった。

40

【図12D】図12A - D : KCM4は、市販されている組成が化学的に規定された培地と同様に機能する。KCM4を、3種類の組成が化学的に規定された培地、つまり、イン

50

ビトロジェンのケラチノサイト血清を含まない既知組成培地 (DKSFM)、エピライフの既知組成の成長補助培地 (Growth Supplement) (EDGS)、およびロンザのケラチノサイト既知組成成長培地 (KGM-CD)、と比較した。市販の培地中で培養した細胞は、製造業者が推奨しているように、コラーゲンI (C1) をコーティングしてあるプレート上で生育させた。KCM4 培養には非コーティング (NC) プレートを使用した。(A) それぞれの培地 (P3 DSKFM、EDGS および KGM-CD および P5 KCM4) 中で培養した初代KCの明視野画像。スケールバーは200 μm。(B) それぞれの培地中で培養した初代ケラチノサイトの長期培養。(C および D) それぞれの培地中で培養したケラチノサイトのCFA。コロニーの数と大きさに関しては、KCM4 がその他の培地よりも良かった。

10

【発明を実施するための形態】

【0035】

初代ヒトケラチノサイトは、傷を受けた皮膚上皮および角膜上皮に使用するための上皮シートの生成に使用される。これら上皮シートの生産には、これまで、新生児包皮ケラチノサイトと自己ケラチノサイトの両方を収集し、インビトロで増やすということが行われてきた。しかしながら、拒絶的な免疫反応が起こることに加え、提供者細胞の質と量により、初代ケラチノサイトの移植が制限されることが多かった。また、ヒトケラチノサイト由来上皮シートは、化粧品の試験および薬剤開発においても必要とされている。提供者由来ケラチノサイトの個々の化合物に対する反応は、提供者が、生理学的条件と病理学的条件の両方においてどのように反応するかに関する貴重な知見をもたらすため、各人に合わせたオーダーメイドの化粧品および皮膚治療への突破口となり得る。

20

【0036】

本明細書では、血清を含まない化学的に規定された細胞培養系において、ヒトESC/iPSCから直接分化させた機能性ケラチノサイト幹細胞を提供する方法、ならびにその機能性ケラチノサイト幹細胞に由来する細胞を提供する。分化と成長の刺激を、開始、分化、成熟、および維持の4段階に沿って、細胞に与える(図1)。この方法を用いることで、細胞が10倍を超えて倍加する、高い増殖能を有する人工ケラチノサイト幹細胞(iKC)を効率的に生成することが可能である。これらのiKCは、上皮ケラチノサイト幹細胞のマーカーである、サイトケラチン14、サイトケラチン15、およびCD49fを発現する。加えて、ヒト皮膚線維芽細胞と混合すると、iKCは免疫不全ヌードマウスの背中に生着可能となり、切除による上皮損傷を厚みの点で完全に治癒した。

30

【0037】

II. 定義

本明細書で使用する場合、「1」または「ひとつ」は、1つ以上であることを意味する場合がある。本明細書に添付の特許請求の範囲で「含んでいる/含む」という語と共に使用される場合、「1」または「ひとつ」という語は、1つまたは1より大きいことを意味し得る。

【0038】

本開示で使われる「または」という用語は、選択肢のうちのどれか1つおよび「および/または」の定義を支持するものであるが、請求項の中で使われる「または」という用語は、選択肢のうちのどれか1つを指すことが明記されているか、または両方を指すことには矛盾が生じるのではない限り、「および/または」の意味で使用される。本明細書で使用する場合「別の(another)」は、少なくとも第二の、または第三以上のものを意味し得る。

40

【0039】

「約/およそ」という用語は、本出願全体を通じて、その値が、その値を決定するのに用いられた装置および方法に固有の誤差、または研究対象間に存在する差異を含むことを示すのに使用される。

【0040】

本明細書で使用する場合、細胞に関する「培養した(cultured)」という用語

50

は、インビトロ環境で細胞分裂をしているまたは細胞分裂をしていない1つ以上の細胞を指す場合がある。インビトロ環境とは、細胞をインビトロで維持するのに好適な当該分野で知られている任意の培地、例えば、例としては好適な液体培地または寒天などであってよい。細胞培養に好適なインビトロ環境の特定の例としては、『動物細胞の培養：基礎技術マニュアル (Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques)』(1994)；『細胞：ラボラトリーマニュアル (Cells: a laboratory manual)』(1998)；および『動物細胞：培養と培地 (Animal Cells: culture and media)』(1994)に記載のものが挙げられる。

【0041】

10

本明細書で使用する場合、「細胞株」という用語は、培養を終了させることなく、少なくとも1回継代することが可能な培養細胞を指す場合がある。本発明は、不定期に継代可能な細胞株に関する。細胞の継代については以下で定義する。

【0042】

本明細書で使用する場合、「浮遊 (suspension)」という用語は、細胞が固相支持体に接していない、細胞培養の条件を指す場合がある。懸濁液中で増殖している細胞は、その増殖中に、当該分野でよく知られている装置を使って攪拌することができる。

【0043】

本明細書で使用する場合、「単層」という用語は、好適な培養条件で増殖している間に、固相支持体に接している細胞を指す場合がある。好適な生育条件下にある単層中で増殖している細胞の一部が、単層中の別の細胞には接しているが、固相支持体には接していないという場合もある。

20

【0044】

本明細書で使用する場合、細胞に関する「プレーティングされた (plated)」または「プレーティング (plating)」という用語は、インビトロで細胞培養を樹立することを指す場合がある。例えば、細胞を細胞用培地で希釈し、その後、細胞培養用のプレート、シャーレ、またはフラスコに入れることができる。細胞培養用のプレートは、当業者に広く知られている。細胞は、様々な濃度でおよび/または細胞密度でプレーティングすることができる。

【0045】

30

「細胞のプレーティング (cell plating)」という用語はまた、「細胞の継代 (cell passaging)」という用語にまで及ぶ場合がある。本発明の細胞は、当業者によく知られた細胞培養技術によって、継代することができる。「細胞の継代」という用語は、(1) 固相支持体または基質から細胞をはがし、これらの細胞を分離させる工程、および(2) これらの細胞を、さらなる細胞増殖に好適な培地で希釈する工程、を含む技術を指す場合がある。細胞の継代はさらに、培養細胞を含む液体培地を一部除去し、元々の培養容器に液体培地を加えて細胞を希釈し、細胞をさらに増殖させることを含む場合もある。加えて、細胞のさらなる増殖に好適な培地を入れておいた新しい培養容器に、細胞が加えられる場合もある。

【0046】

40

本明細書で使用する場合、「低酸素」および「低酸素条件」という用語は、周囲大気の酸素濃度(酸素濃度はおよそ15%~20%)と比べて、酸素濃度が低いことによって特徴付けられる条件を指す場合がある。一側面において低酸素条件は、酸素濃度が約10%未満であることを特徴とする。別の側面において低酸素条件とは、酸素濃度が約1%~10%、1%~9%、1%~8%、1%~7%、1%~6%、1%~5%、1%~4%、1%~3%、もしくは1%~2%、またはそこから導き出される任意の範囲のパーセンテージであることを特徴とする。

【0047】

本明細書で使用する場合、細胞に関する「増殖 (proliferation)」という用語は、時間経過とともに、その数を増やすことができる細胞群を指す場合がある。

50

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用する場合、細胞に関する「永久 (p e r m a n e n t) 」または「不死化 (i m m o r t a l i z e d) 」という用語は、インビトロ環境で培養している間は、細胞が老化するまで、何度も細胞分裂をして細胞数を倍加させる細胞を指す場合がある。永久細胞株は、相当数の細胞が培養中で老化する前に、10を超えて倍加する場合がある。好ましくは、永久細胞株は、相当数の細胞が培養中で老化する前に、20を超えて、または30を超えて倍加し得る。より好ましくは、永久細胞株は、相当数の細胞が培養中で老化する前に、40を超えて、または50を超えて倍加し得る。より好ましくは、永久細胞株は、相当数の細胞が培養中で老化する前に、60を超えて倍加し得る。

【 0 0 4 9 】

10

「分化」とは、培養中またはインビボのいずれかにおいて、分化しない同じ条件にいるよりも、特殊化の程度が低い細胞がより特殊化した細胞になって、少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成する過程である。「脱分化」とは、部分的にまたは完全に分化した細胞が、より以前の発達段階に、例えば多能性または多分化能性に戻る細胞過程である。「分化転換」とは、ある1つの分化した細胞型が、別の細胞型に変換する過程である。特定の条件下では、新しい細胞型の特徴を有する後代の割合は、増殖の傾向に応じて、少なくとも約1%、5%、25%またはそれ以上であってよい。

【 0 0 5 0 】

「多分化能性 (M u l t i p o t e n t) 」とは、ある細胞がその後代を介して、成体に見られる複数の異なる細胞型を生じることが可能であることを意味する。

20

【 0 0 5 1 】

「多能性 (P l u r i p o t e n t) 」とは、ある細胞がその後代を介して、成体に見られる全ての細胞型 (生殖細胞を含む) を生じることが可能であることを意味する。胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、および胚性生殖細胞は、この定義の下では多能性細胞である。

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する場合、「自家細胞」という用語は、受容者と遺伝的に同一の提供者細胞を指す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、「全能性」という用語は、生産動物 (l i v e b o r n a n i m a l) を生じる細胞を指す場合がある。「全能性」という用語はまた、特定の動物の全ての細胞を生じる細胞を指す場合もある。全能性細胞は、1回以上の核移植の工程から胚を発生させるための過程で用いられた時に、ある動物の全ての細胞を生じ得る。

30

【 0 0 5 4 】

全能性細胞はさらに、不完全な動物、例えば、臓器を得るのに有用な動物、例としては、ホメオティック遺伝子の操作によって器官または付属肢が成長しないように遺伝的に改変された動物を生じるのに使われる場合もある。加えて、例えばES細胞に由来する子宮内で発生不可能な卵母細胞を生じる遺伝的改変によって、ヒト由来ES細胞を生殖のためのヒト卵母細胞の誘導には使うことができず、例えば治療用のクローニングへの適用のためだけに使用できることが保証されるだろう。

40

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用する場合、「胚性幹細胞」という用語は、胚から単離され、インビトロでの細胞培養において維持される多能性細胞を指す場合がある。このような細胞は、インビボで動物の成体に含まれる全ての細胞 (生殖細胞を含む) を生じる能力を培養中でも保持している、培養胚から単離された、早い速度で分裂する培養細胞である。胚性幹細胞は、フィーダー細胞を使ってまたは使わずに培養することができる。胚性幹細胞は、胚盤胞期の胚や胚盤胞期前の胚など、発生の任意の段階にある胚から単離された胚性細胞から樹立することができる。胚性幹細胞は丸い形態であり、フィーダー層上で生育させると丸い細胞集塊を形成し得る。胚性幹細胞は当業者によく知られている。例えば、国際公開第97/37009号；ヤングおよびアンダーソン (1 9 9 2) ；ピエドラヒタラ (1 9 9 8

50

); ワイニーら (1997); ムーアおよびピエドラヒタ (1997); ムーアおよびピエドラヒタ (1996); ウィーラー (1994); オシェロー - デレヴィエおよびペロー (1993); ストロジェックら (1990); ピエドラヒタら (1990); ならびにエバンズら (1990) を参照のこと。

【0056】

本明細書で使用する場合、「リプログラミング (reprogramming)」または「リプログラミングされた (reprogrammed)」という用語は、より特殊化した細胞を多能性細胞に変換することができる材料と方法を指す場合がある。

【0057】

本明細書で使用する場合、「単離した (isolated)」という用語は、別の細胞群から機械的に分離された細胞のことを指す場合がある。細胞群の例としては、発達中の細胞塊、細胞培養、細胞株および動物が挙げられる。

10

【0058】

本明細書で使用する場合、「分化型細胞 (differentiated cell)」という用語は、未分化の表現型から特殊化した表現型へと発達した前駆細胞のことを指す場合がある。例えば、胚性細胞は、腸管上皮細胞の裏打ち層 (ライニング、lining) へと分化する場合がある。分化型細胞は、例えば、胎児または生産動物から単離することができる。

【0059】

本明細書で使用する場合、「未分化細胞 (undifferentiated cell)」という用語は、特殊化していない表現型を有し、分化可能な前駆細胞のことを指す場合がある。未分化細胞の例としては幹細胞が挙げられる。

20

【0060】

II. ケラチノサイト幹細胞形成に関わる細胞

本発明の特定の態様では、多能性細胞からケラチノサイト幹細胞を提供するための方法および組成物を開示する。いくつかの態様において多能性細胞は、胚性幹細胞、胎児幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞を含むがこれらには限定されない幹細胞であってよい。

【0061】

A. 幹細胞

30

幹細胞は、全てではないが多くの多細胞生物に見られる細胞である。幹細胞は、細胞の有糸分裂を通して自己再生できること、および様々な種類の特殊化した細胞型に分化できることを特徴とする。哺乳類の幹細胞は、胚盤胞に見られる胚性幹細胞と、成体組織に見られる成体幹細胞、例えば表皮のケラチノサイト幹細胞の2つに大別される。発生途中の胚においては、幹細胞は特殊化した胚性組織の全てに分化することができる。成体生物では、幹細胞および前駆細胞は体の修復系として機能し、特殊細胞を補充し、また、血液、皮膚または腸組織などの再生器官の正常な代謝回転を維持する。

【0062】

ヒト胚性幹細胞 (ESC) および人工多能性幹細胞 (iPSC) は、ケラチノサイト幹細胞を含む身体全ての細胞型に分化する能力を保持しながら、インビトロで長期間、増殖することができる。ケラチノサイト幹細胞は、薬剤開発および治療用途の両方に使用できる患者特異的な機能性ケラチノサイト幹細胞の無制限な供給を実現するという可能性を秘めている。インビトロにおける、ヒトESC/iPSCからケラチノサイト幹細胞への分化は正常なインビボ発生を再現する、すなわち、正常で連続した発達段階をたどる。その連続した発達過程では、様々な成長段階で、種々の成長因子や刺激が加わる必要があるとされる。本発明の特定の側面では、ヒトESC/iPSCを分化させることによって、完全な機能性ケラチノサイト幹細胞を提供する。このアプローチからは、ヒト初代成体ケラチノサイトと、全く同一ではないが、非常によく似た機能を有するケラチノサイト幹細胞は生成される。加えて本発明のケラチノサイト幹細胞は、その増殖能が高いことから、表皮の基底層で見られるケラチノサイト最終分化の開始細胞集団として固有の利点を有

40

50

する。

【 0 0 6 3 】

本明細書中で使用する場合、「発現」とは、材料または物質の産生、ならびに材料または物質の産生のレベルまたは量を指す。したがって、特異的マーカーの発現を決定することは、発現しているマーカーの相対量もしくは絶対量のいずれかを検出すること、または単にマーカーが存在することもしくは存在しないことを検出することを指す。

【 0 0 6 4 】

本明細書中で使用する場合、「マーカー」とは、観察または検出することができるすべての分子を指す。例えば、マーカーとしては、これらに限定されるものではないが、核酸（特定の遺伝子の転写物など）、遺伝子のポリペプチド産物、非遺伝子産物のポリペプチド、糖タンパク質、炭水化物、糖脂質、脂質、リポタンパク質、または低分子が挙げられる。

【 0 0 6 5 】

1. 胚性幹細胞

胚性幹細胞（E S 細胞）は、胚盤胞の内部細胞塊または早期桑実胚の胚盤葉組織に由来する多能性幹細胞である。E S 細胞は、その多能性と無限に自己複製できる能力という2つの特徴的な性質によって、他の細胞から区別される。E S 細胞は多能性を有し、最初の三胚葉、すなわち、外胚葉、内胚葉および中胚葉のすべての誘導体に分化することができる。加えて、規定された条件下では、胚性幹細胞は無限に自己を増殖させることができる。これにより、胚性幹細胞は研究および再生医療に有用なツールとして利用されている。それは、胚性幹細胞が継続研究または臨床用途において、自己を無限に生産できるためである。E S 細胞は、特定の細胞型に関する十分かつ必要な刺激が与えられた場合、成体の200種類を超える細胞型のいずれにも発生することができる。しかしながら胚性幹細胞は、胚体外膜（extra-embryonic membrane）または胎盤には寄与しない。

【 0 0 6 6 】

今日までのほとんどすべての研究は、マウス胚性幹細胞（m E S）またはヒト胚性幹細胞（h E S）を用いて行われてきた。いずれも必須の幹細胞特性を有するが、未分化状態を維持するためには非常に異なる環境が必要である。マウス E S 細胞は、ゼラチン層上で増殖することができ、白血病阻害因子（L I F）の存在を必要とする。ヒト E S 細胞は、マウス胚性線維芽細胞（M E F）のフィーダー層上で生育させることができ、塩基性線維芽細胞成長因子（b F G FまたはF G F - 2）の存在を必要とするが多い。最適な培養条件または遺伝子操作がなければ（チャンバーズら、2003）、胚性幹細胞は急速に分化する。

【 0 0 6 7 】

また、ヒト胚性幹細胞は、いくつかの転写因子および細胞表面タンパク質の存在によっても定義することができる。転写因子のO c t - 4、N a n o g、およびS o x - 2は、分化および多能性の維持につながる遺伝子を確実に抑制する中心的な調節ネットワークを形成する（ボイヤーら、2005）。h E S 細胞を同定するのに最も一般的に使用される細胞表面抗原としては、糖脂質S S E A 3およびS S E A 4ならびにケラタン硫酸抗原T r a - 1 - 6 0およびT r a - 1 - 8 1が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

マウス E S 細胞を得るための方法はよく知られている。一方法では、マウス129系統の着床前胚盤胞をマウス抗血清で処理して栄養外胚葉を除去し、この内部細胞塊を、胎仔ウシ血清を含有する培地中、化学的に不活性化したマウス胚線維芽細胞のフィーダー細胞層上で培養する。発生する未分化 E S 細胞のコロニーを、マウス胚線維芽細胞フィーダー層上、ウシ胎仔血清の存在下で継代培養して、E S 細胞の集団を生産する。いくつかの方法では、血清を含む培地にサイトカイン白血病阻害因子（L I F）を添加することによって、マウス E S 細胞は支持細胞層を使わなくても生育させることができる（スミス、2000）。他の方法では、無血清培地中、骨形成タンパク質およびL I Fの存在下で、マウス E S 細胞を増殖させることができる（インら、2003）。

【0069】

ヒトES細胞は、既に記載のある方法によって（トムソンら、1995；トムソンら、1998；トムソンおよびマーシャル、1998；ルビノフら、2000）、胚盤胞から得ることができる。一方法では、5日目のヒト胚盤胞をウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に曝露し、次いで栄養外胚葉細胞を溶解するために、1：5に希釈したモルモット補体に曝露する。溶解した栄養外胚葉細胞をインタクトな内部細胞塊から除去した後、内部細胞塊を - 不活性化マウス胚線維芽細胞のフィーダー層上、ウシ胎仔血清の存在下で培養する。9～15日後、内部細胞塊に由来する細胞集塊を化学的に（すなわちトリプシンに曝露させて）、または機械的に解離させ、ウシ胎仔血清とマウス胚線維芽細胞のフィーダー層を含む新しい培地に、再プレーティングすることができる。さらに増殖させたら、未分化形態を有するコロニーをマイクロピペットで選択し、機械的に解離させて集塊にし、再プレーティングする（米国特許第6,833,269号を参照のこと）。ES様の形態は、細胞質に対する核の比率が明らかに高く、顕著な核小体を有する小さいコロニーを特徴とする。得られたES細胞は、短時間のトリプシン処理によって、またはマイクロピペットで個々のコロニーを選択することによって、慣習的に継代することができる。いくつかの方法では、ES細胞を、線維芽細胞のフィーダー層上、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で培養することにより、血清を用いずに増殖させることができる（アミットら、2000）。他の方法では、ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有する「馴化」培地の存在下で、マトリゲル（Matrigel）（登録商標）またはラミニンなどのタンパク質マトリックス上で細胞を培養することにより、フィーダー細胞層なしで増殖させることができる（シュウら、2001）。培地は、線維芽細胞と共培養することによって予め馴化しておく。

10

20

【0070】

アカゲザルおよび一般的なマーマセットからのES細胞の単離方法も知られている方法（トムソンおよびマーシャル、1998；トムソンら、1995；トムソンおよびオドリコ、2000）。

【0071】

ES細胞の別の供給源としては、樹立ES細胞株がある。様々なマウス細胞株およびヒトES細胞株が知られており、それらの生育および増殖のための条件も規定されている。例えば、マウスCGR8細胞系はマウス系統129胚の内部細胞塊から樹立された細胞系であり、CGR8細胞の培養物は、フィーダー層を使わずに、LIF存在下で生育させることができる。さらに別の例として、ヒトES細胞株H1、H7、H9、H13およびH14がトムソンら（1995）によって樹立されている。加えて、H9系統のサブクローンH9.1およびH9.2が開発されている。当該分野で知られている、実質的に全てのES細胞株または幹細胞株、例えば、参照することにより本明細書に組み入れられるユウおよびトンプソン（2008）に記載されているようなES細胞株または幹細胞株を本発明と共に使用してもよいことが想定される。

30

【0072】

本発明に関連して使用するES細胞の供給源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊を培養することに由来する細胞、または樹立細胞株の培養物から得られた細胞であってよい。したがって、本明細書中で使用する場合、「ES細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊細胞、内部細胞塊の培養物から得られたES細胞、およびES細胞株の培養物から得られたES細胞を指す場合がある。

40

【0073】

2. 人工多能性幹細胞

通常、iPSC細胞またはiPSCと略される人工多能性幹細胞は、多能性をもたない細胞、一般的には成体の体細胞から人工的に誘導される多能性幹細胞の一種である。人工多能性幹細胞は、天然の多能性幹細胞、例えば胚性幹細胞と多くの点において、例えば、特定の幹細胞遺伝子およびタンパク質の発現、クロマチンのメチル化パターン、倍加時間、胚様体の形成、奇形種の形成、生存可能なキメラの形成、および能力（potency）および

50

分化可能性などの点で、同一ではないとしても類似していると考えられている。しかしながら、天然の多能性幹細胞との関係全体については、現在も評価中である。

【 0 0 7 4 】

i P S細胞は、分化した体細胞をリプログラミングすることによって得られる。胚以外のヒト組織に由来する誘導された人工多能性細胞の生成は、胚および胚組織を実験に用いることに関する倫理的懸念を軽減するために望まれている。人工多能性細胞は治療への用途に関して高く期待されている。医療用途の数例を挙げると、アルツハイマー病、糖尿病および脊髄損傷の治療がある。他の用途には、疾患モデルおよび医薬品のスクリーニングがある。

【 0 0 7 5 】

人工多能性幹細胞は、様々な方法によって得られてきた。ヒト胎児または新生児の線維芽細胞に、レンチウイルス形質導入を用いてO c t 4、S o x 2、N a n o gおよびL i n 2 8の4つの遺伝子を導入する(ユウら、2 0 0 7)。感染1 2 ~ 2 0日後に、ヒトE S細胞形態のコロニーが見えるようになる。コロニーを採取して増殖させる。コロニーを形成する人工多能性幹細胞は、ヒトE S細胞と形態学的に類似し、様々なヒトE S細胞マーカーを発現し、マウスに注入すると、神経組織、軟骨および腸上皮を有する奇形腫を形成する。

【 0 0 7 6 】

別の方法では、成人ヒト真皮線維芽細胞に、レトロウイルス形質導入を用いて、転写因子であるO c t 4、S o x 2、c - M y cおよびK l f 4を導入する(タカハシら、2 0 0 7)。遺伝子導入した細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子(b F G F)を添加した培地に入ったS N Lフィーダー細胞(L I Fを産生するマウス細胞線維芽細胞株)にプレーティングする。約2 5日後、ヒトE S細胞コロニーに似たコロニーが培養中に現れる。このE S細胞様コロニーを採取し、フィーダー細胞上、b F G Fの存在下で増殖させる。

【 0 0 7 7 】

i P S細胞は最初、マウス細胞から2 0 0 6年に(タカハシら、2 0 0 6)、次いでヒト細胞からは2 0 0 7年に産生された(タカハシら、2 0 0 7;ユウら、2 0 0 7)。このことによって研究者らが、研究に重要で治療用途への可能性をもつ多能性幹細胞を、論争的になる胚の使用を伴わずに得ることができるようになったため、これらの業績は幹細胞研究において重要な進歩であったと引用されている。最初に成功したマウスまたはヒトの組織からの人工多能性細胞(i P S細胞)の生成では、特定のセットの転写因子を発現するレトロウイルスベクターが使用されていた。ジェームズ・トムソン(J a m e s T h o m s o n)の研究室およびシンヤ・ヤマナカ(山中伸弥)の研究室の研究から、マウスまたはヒトの線維芽細胞にレトロウイルスベクターを介して特定の転写因子を導入することが、これらの細胞を未分化の多能性幹細胞にリプログラムするのに十分であることが示されている。転写因子として、トムソンはO c t 4、S o x 2、N a n o gおよびL i n 2 8を使用し、ヤマナカは、O c t 4、S o x 2、K l f 4およびc - M y cを使用した。いずれの遺伝子セットを介したリプログラミングも、これら遺伝子セットの宿主細胞ゲノムへの組み込みとこれら転写因子の発現、またはリプログラミングされた細胞からは消失させ、無傷のi P S細胞を生じることが可能なエピソームプラスミドからの発現によって達成される。

【 0 0 7 8 】

細胞の特徴から、E S細胞様コロニーの細胞は人工多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞はヒトE S細胞と形態学的に類似しており、様々なヒトE S細胞マーカーを発現する。また、ヒトE S細胞の分化を引き起こすことが分かっている条件で増殖させると、人工多能性幹細胞はそれに従って分化する。例えば、人工多能性幹細胞を、ケラチノサイト幹細胞の構造とマーカーを有する細胞に分化させることができる。本発明には事実上、ユウおよびトンプソン(2 0 0 8)に記載されているものを含む、あらゆるi P S細胞または細胞株を使用してもよいと予想される。

【 0 0 7 9 】

10

20

30

40

50

マウスから人工多能性幹細胞を調製する方法も知られている（タカハシおよびヤマナカ、2006）。iPS細胞の誘導には通常、Soxファミリーの少なくとも1つのメンバーとOctファミリーの少なくとも1つのメンバーを発現させることまたはそれらに曝露することが必要とされる。SoxおよびOctは、ES細胞の独自性を規定する転写調節階層の中心であると考えられている。例えば、Soxは、Sox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15、またはSox-18であってよく、Octは、Oct-4であってよい。Nanog、Lin28、Klf4、またはc-Mycなどのそれ以外の因子によって、リプログラミング効率が上がる可能性がある。リプログラミング因子の特定のセットとしては、Sox-2、Oct-4、Nanog、および場合によりLin-28を含むセット、またはSox-2、Oct4、Klf、および必要に応じてc-Mycを含むセットがあり得る。

10

【0080】

iPS細胞はES細胞と同様に、SSEA-1、SSEA-3およびSSEA-4に対する抗体（発生学研究用ハイブリドーマバンク（Developmental Studies Hybridoma Bank）、米国国立保健発達研究所（National Health and Human Development）、ベセスダ、メリーランド）およびTRA-1-60およびTRA-1-81（アンドリュースら、1987）に対する抗体を用いて、免疫組織化学またはフローサイトメトリーによって同定または確認され得る特徴的な抗原を有する。iPS細胞の多能性は、8～12週齢の雄のSCIDマウスの後肢筋肉に約 $0.5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を注入することによって確認することができる。各三胚葉の少なくとも1つの細胞型を示す奇形腫が発生する。

20

【0081】

本発明の特定の側面では、iPS細胞は、前述したようにまたは国際公開第2009/149233号に記載されているように、OctファミリーメンバーとSoxファミリーメンバー、例えばOct4とSox2を、Klfおよび/またはNanogと組み合わせる含むリプログラミング因子を用いて体細胞をリプログラミングすることから作製される。リプログラミングする体細胞は、線維芽細胞、ケラチノサイト、造血細胞、間葉細胞、肝細胞、胃細胞、または細胞などの、多能性に誘導することができるいずれの体細胞であってもよい。特定の側面では、T細胞は、リプログラミングする体細胞の供給源としても使用され得る（参照することで本明細書に組み入れられる国際公開第2010/141801号を参照のこと）。

30

【0082】

リプログラミング因子は、組込みベクターまたはエピソームベクター、例えばEBVエレメントを使った系（参照することで本明細書に組み入れられる国際公開第2009/149233号；ユウら、2009年を参照のこと）などの1つ以上のベクターに含まれる発現カセットから発現させることができる。さらなる側面では、タンパク質形質導入によって、リプログラミングタンパク質を体細胞に直接導入することもできる。

【0083】

III. ケラチノサイト幹細胞の特徴

細胞は、多くの表現型基準に従って特徴づけることができる。基準には、発現している細胞マーカーの検出または定量、酵素活性、ならびに形態学的特徴および細胞間シグナル伝達の特徴付けが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0084】

本発明の特定の側面で例示したケラチノサイト幹細胞は、天然のケラチノサイト幹細胞に特徴的な形態学的特徴を有する。単一の細胞にそのような特徴が1つ以上存在することが、その細胞がケラチノサイト幹細胞系列のメンバーであることと一致する。細胞がケラチノサイト幹細胞に特徴的な形態学的特徴を有するかどうかは、分化させた後代細胞、成人または胎児のケラチノサイト幹細胞、および1つ以上の陰性対照細胞（例えば線維芽細胞）、またはメラニン細胞の顕微鏡写真を符号化し、その後、それらの顕微鏡写真を盲検様式で評価し、符号をぶち破りして分化由来のケラチノサイト幹細胞であると正確に同定

50

されたかどうかを決定することにより、偏りなく判断することができる

【0085】

本発明の細胞は、それらがケラチノサイト細胞系列に特徴的な表現型マーカーを発現しているか否かによっても特徴付けることができる。一般的な表皮ケラチノサイトは、サイトケラチン14とp63を発現することを特徴とする。そのような集団内では、最終分化への経路上にコロニー形成ケラチノサイト幹細胞およびケラチノサイト前駆細胞が存在する。ケラチノサイト幹細胞、ケラチノサイト前駆細胞およびより分化したケラチノサイト誘導体を区別するのに有用な細胞マーカーの非限定的な例としては、サイトケラチン15、CD49f、ケラチン1、ロリクリンおよびフィラグリンが挙げられる。

【0086】

本開示に列挙する一般的な上皮ケラチノサイトおよびケラチノサイト幹細胞タンパク質の決定要因は、任意の好適な免疫学的手法によって検出することができる。好適な免疫学的手法の例としては、細胞表面マーカーに関するフロー免疫細胞化学(flow immunocytochemistry)、細胞内マーカーまたは細胞表面マーカーに関する免疫組織化学(例えば、固定細胞または組織切片の)、細胞抽出物のウエスタンブロット分析、および細胞抽出物もしくは培地に分泌された産物の酵素結合免疫測定法が挙げられる。細胞による抗原の発現は、標準的な免疫細胞化学またはフローサイトメトリー検定において、その抗原に有意に検出可能な量の抗体が結合する場合、「抗体で検出可能」だと言える。標準的な免疫細胞化学またはフローサイトメトリーアッセイは、必要に応じて細胞を固定した後に行われ、必要に応じて、二次抗体または他の複合体(例えばビオチン-20

【0087】

特定のマーカーの発現はまた、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析、または標準的な増幅法における配列特異的プライマーを用いたリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってmRNAレベルで検出することができる(米国特許第5,843,780号)。本開示に列挙する特定のマーカーの配列データは、ジバンク(GenBank)などの公開データベースから得ることができる。標準的な手法における典型的な比較対照のある実験において細胞試料に対するアッセイの性能が、標準的な時間内で識別可能なハイブリダイゼーションまたは増幅産物を明確に結果として生じるものである場合、mRNAレベルでの発現は、本開示に記載するアッセイのうちの1つによって「検出可能」であると言える。特に必要のある場合を除き、特定のマーカーに対応するmRNAがRT-PCRによって検出可能であれば、特定のマーカーの発現を示す。タンパク質またはmRNAレベルで検出されたケラチノサイト幹細胞特異的マーカーの発現は、そのレベルが対照細胞、例えば未分化の多能性幹細胞、線維芽細胞、または他の無関係な細胞型のレベルの少なくとも2倍、好ましくは10倍または50倍を超える場合に、陽性であると考えられる。

【0088】

別の側面では、分化させることで生じたケラチノサイト幹細胞の生物学的機能は、例えば、コロニー形成アッセイによって、ケラチノサイト幹細胞がマウスの脱表皮した真皮上で分化および層化する能力を決定することによって、またはケラチノサイト幹細胞のヌードマウスへの生着能力によって、評価してもよい。さらに別の側面では、サイトケラチン15および/またはCD49fの発現によって、ケラチノサイト幹細胞を同定してもよい。ケラチノサイト幹細胞を機能検定によって試験してもよい。例えば、生着する能力を試験するために、細胞をマウス胚の創傷上皮に移植することができる。

【0089】

ケラチノサイト幹細胞を培養することの利点の1つは、細胞を均質な未分化細胞集団として増殖させることができることである。そのため、それらを成熟した系統を生成するために使用すると、より特殊化した細胞型の分化の効率が上がる可能性がある。これはまた、他の胚葉からのものなど、他の細胞型の混入に望ましくない影響が生じる可能性を低減する。本発明のケラチノサイト幹細胞は、関連マーカーまたは免疫染色や蛍光活性型の定50

量もしくは他の適切な技術によって決定される望ましくない細胞型のマーカー又は他の特徴が0.1%未満（好ましくは100ppm未満または10ppm未満）である場合、本質的に、いくつかのまたは全ての細胞型による汚染がないと特徴付けることができる。

【0090】

本発明の特定の側面に従って提供される細胞は、一次供給源から得られた細胞の特徴の多くを有する場合がある。特定の細胞にこれらの特徴が多く含まれるほど、その細胞をケラチノサイト幹細胞系列の細胞として特徴づけることができる。これらの特徴の少なくとも2、3、5、7または9個を有する細胞が、有する特徴が多いほど、好ましい。培養容器または投与のための調製物中に存在し得る特定の細胞集団に関しては、細胞間でこのような特徴が均一に発現していることが有利に働くことが多い。この状況では、細胞の少なくとも約40%、60%、80%、90%、95%または98%が所望の特徴を有する集団が、その割合が多いほど、好ましい。

10

【0091】

IV. ケラチノサイト幹細胞分化因子

本発明の特定の側面では、ケラチノサイト幹細胞分化因子を提供する。本発明者らはまた、本節に列挙した成長因子および化合物のすべてのアイソフォームおよび変異体が本発明に含まれることを意図している。

【0092】

本開示で例示うるケラチノサイト幹細胞促進成長因子は、ケラチノサイト幹細胞の増殖を促進することができる可溶性成長因子（ペプチドホルモン、サイトカイン、リガンド-受容体複合体、および他の化合物）を含み得る。そのような薬剤の非限定的な例としては、酸性FGF（FGF1）、BMP-4、EGF、またはそのアイソフォームまたは変異体などの増殖因子が挙げられるが、これらには限定されない。

20

【0093】

ケラチノサイト幹細胞を提供するための分化は、BMP4、線維芽細胞増殖因子（例えば、FGF1）、上皮細胞成長因子（例えば、EGF）、アスコルビン酸、コレラ毒素、ニコチンアミド、サイクリックAMP類似体（例えば8-Br-cAMP）、TGFRIキナーゼ阻害剤II（TGFRIKi）およびレチノイン酸（例えばオールトランスRA）を含むがこれらに限定されない、本節に記載する任意の1つまたは複数の因子の有効量と細胞を接触させることによって達成できる。「有効量」とは、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は1回以上の投与で投与することができる。因子の有効量とは、ケラチノサイト幹細胞の増殖または分化を促進するのに十分な量であってよい。因子の濃度は、約0.01ng/mL～約500μg/mL、好ましくは約0.1ng/mL～約500ng/mL、最も好ましくは約1ng/mL～100ng/mLの範囲であってよい。

30

【0094】

V. 細胞培養

出発細胞および分化型細胞は、一般に、培地および条件に関して異なる要件を有する。通常、少なくとも培養の初期段階、分化因子の導入後は、出発細胞の成長に適していることが知られている培地の存在下、出発細胞の成長に適していることが知られている培養条件下で培養する。これに続く培養期間は、分化培地の存在下で、分化型細胞に適していることが知られている条件下で培養する。分化するのに十分な時間が経過した後、分化型細胞を、増殖培地中で、この分化細胞を増殖させるためにさらに培養してもよい。そのような増殖培地は、前述したような1つ以上のシグナル伝達阻害剤を含むか、またはこれらの阻害剤を本質的に含まない培地を含むものでもよい。

40

【0095】

培養の初期段階は、好ましくは、最長6日間、より好ましくは最長4日間、そして特定の態様では以下に記載するように、3日間以下、より具体的には最長約1日の期間である。1つ以上のシグナル伝達阻害剤を含む分化培地を使って行われる培養のその後の段階は、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15

50

、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33日間、またはそこから誘導可能な任意の期間であってよく、また、最長120日間、好ましくは最長10日の期間であってよい。ケラチノサイト幹細胞を生成するために使用される以下に記載の具体的な態様では、培養の初期段階は約5日間であり、その後の段階は約26～44日間で、様々な分化培地を使用した。分化条件は、本質的にフィーダー細胞を含まなくてもよい。さらなる側面では、分化培地は組成が化学的に規定された培地であってよい。分化を改善するために、分化培地にさらに高濃度のFGFを含め、本質的にTGF- β を含まないものにしてもよい。場合によっては、培地はTGF- β を含み得る。

【0096】

10

A．基本条件

本発明の培養条件は、使用する培地や幹細胞に応じて適宜決定される。本発明の特定の側面に従う培地は、基礎培地として動物細胞の培養に使用される培地を用いて調製することができる。そのような培地としては、例えば、TeSR、必須(Essential)8培地、BME、BGJb、CMRL 1066、グラスゴーMEM、改良MEM亜鉛オプション(Zinc Option)、IMDM、Medium 199、イーグルMEM、MEM、DMEM、Ham、RPMI 1640、フィッシャー培地のいずれか、ならびにその任意の組み合わせが挙げられるが、培地は動物細胞の培養に用いることが可能であればこれらには限定されない。

【0097】

20

本発明による培地は、血清を含有する培地であっても、血清を含まない培地であってもよい。血清を含まない培地とは、未処理または未精製の血清を含まない培地を意味し、したがって、精製した血液由来成分または動物組織由来成分(例えば、成長因子)を含む培地を含み得る。異種動物由来成分の混入を防止する観点から、幹細胞と同じ動物から血清を得ることができる。

【0098】

本発明による培地は、血清の代替物を含有していてもよいし、含有していなくてもよい。血清の代替物としては、アルブミン(例えば、脂質に富むアルブミン、組換えアルブミンなどのアルブミン代替物、植物性デンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解物)、トランスフェリン(または他の鉄輸送体)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、またはそれらの均等物を含む。血清の代替物は、例えば、国際公開第98/30679号に開示されている方法によって調製することができる。あるいは、市販されている任意の材料をより便利に使用することができる。市販されている材料には、ノックアウト血清置換(knockout Serum Replacement)(KSR)、既知組成の脂質濃縮物(Lipid concentrated)(ギブコ)、およびグルタマックス(Glutamax)(ギブコ)がある。

30

【0099】

本発明の培地はさらに、脂肪酸または脂質、アミノ酸(非必須アミノ酸など)、ビタミン、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、および無機塩を含む場合がある。2-メルカプトエタノールの濃度は、例えば、約0.05～1.0mM、特に約0.1～0.5mMとすることができるが、幹細胞を培養するのに適した濃度であればこれに限定されない。

40

【0100】

本発明の細胞の培養に用いる培養容器としては、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、シャーレ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレイ、セルスタック(CellSTACK)(R)チャンバー、培養用バッグ、ローラーボトルなどが挙げられるが、その中で細胞を培養することができれば、特にこれらには限定されるものではない。幹細胞は、培養の必要性に応じて、少なくともまたは約0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、

50

100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml、またはそこから導き出される任意の範囲の量で培養することができる。特定の態様において培養容器はバイオリアクターであってもよく、バイオリアクターとは、生物学的に活性な環境を支援する任意の装置またはシステムを意味し得る。バイオリアクターの容量は、少なくともまたは約2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、またはそこから導き出される任意の範囲の容量であってよい。

【0101】

培養容器は、細胞接着性でも非接着性でもよく、目的に応じて選択することができる。細胞接着性培養容器は、細胞の容器表面への接着性を改善するために細胞外マトリックス（ECM）のような細胞を接着するための任意の基質でコーティングすることができる。細胞接着のための基質は、幹細胞またはフィーダー細胞（使用される場合）を接着させることを目的とした、いかなる物質であってもよい。細胞接着の基質としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ピトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、PLOラミニン、フィブリン、トロニン、およびレトロネクチン（Retronectin）、ならびにそれらの混合物が挙げられ、例えばマトリゲル（Matrigel）（登録商標）、および溶解した細胞膜調製物（クリマンスカヤら、2005）がある。

【0102】

他の培養条件も適宜設定することができる。例えば、培養温度は約30～40、例えば少なくともまたは約31、32、33、34、35、36、37、38、39とすることができるが、特にそれらに限定されない。CO₂濃度は、約1～10%、例えば約2～5%、またはそこから導き出される任意の範囲の温度とすることができる。酸素圧は、少なくともまたは約1、5、8、10、20%またはそこから導き出される任意の範囲のパーセンテージであってよい。酸素圧は、酸素正常状態での培養の場合、好ましくは20%である。

【0103】

特定の側面における本発明の方法は、例えば、細胞の接着培養に使用することができる。この場合、細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することができる。本発明の方法でフィーダー細胞を使用する場合、胎児線維芽細胞などの間質細胞をフィーダー細胞として使用することができる（例えば、ホーガンら、『マウス胚の操作、実験マニュアル（Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual）』（1994）；『遺伝子標的、実践的な手法（Gene Targeting, A Practical Approach）』（1993）；マーティン（1981）；エバンズおよびカウフマン（1981）；ジェインチルら（1969）；ナカノら（1996）；コダマら（1982）；ならびに国際公開第01/088100号および同第2005/080554号を参照のこと）。

【0104】

特定の側面において本発明の方法は、担体を使った浮遊培養（フェルナンデスら、2004）またはゲル/バイオポリマーカプセル化（米国特許公開第2007/0116680号）による浮遊培養などの、細胞の浮遊培養にも使用することができる。細胞の浮遊培養という用語は、細胞を、培養容器または培地中のフィーダー細胞（使用される場合）に接着しない条件で培養することを意味する。細胞の浮遊培養には、細胞の解離培養および細胞の凝集浮遊培養が含まれる。細胞の解離培養という用語は、懸濁した細胞を培養することを意味し、細胞の解離培養には、単細胞または複数の細胞（例えば、約2～400細胞）からなる小細胞凝集物の解離培養が含まれる。前述の解離培養を継続すると、培養された解離細胞がより大きな細胞集合体を形成し、その後、凝集浮遊培養を行うことができる。凝集浮遊培養には、胚様体培養法（ケラーら、1995を参照のこと）およびSFE B法（ワタナベら、2005；国際公開第2005/123902号）が含まれる。

20

40

50

ts for Application to Human Biology and Gene Therapy)』(1998年)などの、細胞生物学、組織培養および発生学の標準的な教科書および総説に見出すことができる。組織培養に使用される標準的な方法は、基本的に、『動物細胞の培養(Animal Cell Culture)』(1987);『哺乳類細胞への遺伝子導入ベクター(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)』(1987)および『分子生物学の最新手法(Current Protocols in Molecular Biology)』『分子生物学の手短なプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)』(1987年と1995年)に記載されている。

10

【0109】

体細胞にリプログラミング因子を導入するかまたはリプログラミング因子と接触させた後、これらの細胞を多分化能および未分化状態を維持するのに十分な培地で培養することができる。本発明で生成される人工多能性幹(iPS)細胞の培養には、参照することにより本明細書に組み入れられる、米国特許公開第2007/0238170号、同第2003/0211603号、および同第2008/0171385号に記載されているような、霊長類の多能性幹細胞、より具体的には胚性幹細胞、を培養するために開発された様々な培地および技術を使用することができる。当然のことながら、当業者に知られているような多能性幹細胞を培養および維持するためのこれ以外の方法も、本発明と共に使用することができる。

20

【0110】

特定の態様では、未定義の条件を使用することができる。例えば、幹細胞を未分化状態に維持するために、多能性細胞を、線維芽細胞フィーダー細胞上でまたは線維芽細胞フィーダー細胞に曝露した培地上で培養することができる。

【0111】

あるいは、多能性細胞は、TeSR培地(ラドウィグら、2006a;ラドウィグら、2006b)または必須(Essential)8培地(チェンら、2011)のような、定義したフィーダー細胞非依存性の培養系を用いて、本質的に未分化の状態では培養および維持することができる。フィーダー細胞非依存性の培養系および培地を使用して、多能性細胞を培養および維持してもよい。これらのアプローチにより、誘導したヒトiPS細胞ならびにヒト胚性幹細胞を、マウス線維芽細胞の「フィーダー層」を必要とせずに、本質的に未分化の状態にとどめることができる。本明細書に記載するように、必要に応じて、費用を削減するために、これらの方法に様々な変更を施してもよい。

30

【0112】

ヒト多能性幹細胞の培養および維持には、様々なマトリックス成分を使用することができる。例えば、マトリゲル(登録商標)、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニン、PLOラミニン、コラーゲンI、コラーゲンIV、フィブリンクロット、およびビトロネクチンを組み合わせて、参照によりその全体が組み入れられるラドウィグら(2006a;2006b)に記載されているように、多能性細胞を成長させるための固体支持体を提供する手段として、培養表面をコーティングすることができる。具体的には、細胞の培養およびヒト多能性幹細胞の維持のための基質を提供するために、マトリゲル(登録商標)を使用してもよい。マトリゲル(登録商標)は、マウス腫瘍細胞によって分泌されるゼラチン状タンパク質の混合物であり、BDバイオサイエンス(BD Biosciences)(ニュージャージー、米国)から市販されている。この混合物は、多くの組織で見出される複雑な細胞外環境に似ており、細胞培養用の基質として細胞生物学者によって使用されている。

40

【0113】

C. 細胞の継代

本発明の特定の側面には、さらに、細胞を解離する工程を含めることができる。細胞の解離は、知られている手法のいずれかを用いて行うことができる。そのような手法には、

50

キレート剤（EDTAなど）、酵素（例えばトリプシン、コラゲナーゼ）などによる処理、および機械的な解離（例えばピペット操作）などの操作による処理が含まれる。解離の前および/または解離後に、細胞をROCK阻害剤またはミオシンII阻害剤で処理してもよい。例えば、細胞を、解離後にのみ処理してもよい。

【0114】

細胞培養のいくつかのさらなる態様では、培養容器がいっぱいになると、解離に適した任意の方法によって、コロニーを凝集した細胞または未だ単一の細胞に分割し、継代のために新しい培養容器に入れる。細胞継代は、細胞を生存状態に保ち、培養条件下で長時間増殖させることを可能にする技術である。細胞は通常、それらが約70%~100%コンフルエントに達したときに継代される。

10

【0115】

本発明において、細胞を単細胞に解離し、次いでこの単細胞の継代を行うことは、細胞増殖の促進、細胞ソーティング、ならびに分化のための規定された播種、および培養手順およびクローン拡大の自動化を可能にするような、複数の利点に繋がる可能性がある。例えば、単一の細胞からクローンとして誘導される後代細胞は、遺伝子構造が均一で、および/または細胞周期が同調しており、これによって標的とした分化が高まる可能性がある。単一細胞を継代するための例示的な方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公報第2008/0171385号に記載されている。

【0116】

特定の態様では、細胞を個々の細胞に、または個々の細胞と、2、3、4、5、6、7、8、9、10細胞またはそれ以上の数の細胞から構成される小さい細胞クラスターとの組み合わせに解離させてもよい。解離は、機械的な力、または細胞を解離させる薬剤、例えばクエン酸ナトリウム、または酵素、例えば、トリプシン、トリプシン-EDTA、TrypLEセレクトなどによって行うことができる。

20

【0117】

細胞の供給源および増殖の必要性に基づいて、解離させた細胞を個々にまたは小さいクラスターごとに新しい培養容器に移してもよく、このときの分配比は、例えば、少なくともまたは約1:2、1:4、1:5、1:6、1:8、1:10、1:20、1:40、1:50、1:100、1:150、1:200、またはもしくはこの範囲から導き出される任意の範囲であってよい。浮遊培養の細胞株の分配比は、培養細胞懸濁液の量によって決めることができる。継代の間隔は、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日ごと、もしくはこの範囲から導き出される任意の日数ごとであってよい。例えば、酵素を使用した異なるプロトコールにおいて達成可能な分配比は、1:2の比で3~7日ごと、1:3の比で4~7日ごと、および1:5~1:10の比でおおよそ7日ごと、1:50~1:100の比で7日ごとであってよい。分配比が高い場合には、継代間隔を少なくとも12~14日、または過度の自発的な分化もしくは細胞死に起因する細胞消失が起きない任意の期間に延長してもよい。

30

【0118】

特定の側面では、単一細胞継代は、クローニング効率や細胞の生存率を高めるのに有効な低分子、例えば上述のROCK阻害剤の存在下で行ってもよい。このようなROCK阻害剤としては、例えば、Y-27632、HA-1077、H-1152、HA-100またはプレバスタチンを、有効な濃度で、例えば、少なくともまたは約0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50~約100 μ M、もしくはこの範囲から導き出される任意の濃度で使用する事ができる。

40

【0119】

VI. マーカーの発現

細胞培養または細胞集団における特定の細胞型の量を決定するためには、培養または集団に含まれている他の細胞から特定の細胞型を区別する方法が望まれる。したがって、そ

50

の存在、非存在および／または相対発現レベルが本発明に従って作製された特定の細胞型に特異的なマーカーが、そのようなマーカーの発現を検出および決定するための方法として提供される。

【0120】

マーカーの発現の有無および／またはその発現レベルは、定量的PCR（qPCR）によって決定することができる。例えば、サイトケラチン14、サイトケラチン15、P63、またはCD49fなどの特定の遺伝子マーカーによって産生される転写産物の量を、定量的qPCRによって決定する。さらに、免疫組織化学またはフローサイトメトリーを用いて、前述の遺伝子によって発現するタンパク質を検出することができる。qPCR、フローサイトメトリー、および免疫組織化学を用いて、そのようなマーカーの量または相対的な割合を同定および決定することができる。

10

【0121】

VII. ケラチノサイト幹細胞の使用

本発明の特定の側面の方法および組成物によって提供されるケラチノサイト幹細胞は、様々な応用に用いることができる。そのような例としては、これらには限定されないが、ケラチノサイト幹細胞をインビボで移植または留置すること；細胞傷害性化合物、発がん物質、変異生成／制御因子、医薬化合物などをインビトロでスクリーニングすること；薬剤および／または成長因子が機能するメカニズムについて研究すること；遺伝子治療；ならびに生物学的に活性な製品の生産が挙げられる。

20

【0122】

A. 試験化合物のスクリーニング

本発明のケラチノサイト幹細胞およびそれから誘導したケラチノサイトを使用して、本明細書で提供するケラチノサイトの特徴に影響を及ぼす因子（溶媒、低分子薬、ペプチド、およびポリヌクレオチドなど）または環境条件（培養条件もしくは操作など）をスクリーニングすることができる。

【0123】

いくつかの応用例では、幹細胞（分化したものまたは未分化のもの）を使用して、細胞がケラチノサイト細胞系列に沿って成熟するのを促進する因子、または長期間培養においてそのような細胞を増殖させるまたは維持するのを促進する因子をスクリーニングする。例えば、候補となったケラチノサイト成熟因子または成長因子を別々のウェルに入れ、そこにケラチノサイト幹細胞を加え、その後、結果として表れた表現型の変化の全てを、さらなる培養のためのおよび細胞の使用に関する望ましい基準に従って決定することによって試験する。

30

【0124】

本発明の特定のスクリーニング例は、薬剤研究において医薬化合物を試験することおよび化粧品を試験することに関する。読者は通常、一般的な教科書である、医薬研究におけるインビトロ法、アカデミックプレス、1997、および米国特許第5,030,015号を参照する。本発明の特定の側面では、ケラチノサイト系統に分化した細胞は、これらが既に短期間培養においてケラチノサイト細胞系統または初代ケラチノサイト細胞について実施されているため、標準的な薬物スクリーニングおよび毒性アッセイに試験細胞として使用することができる。候補医薬化合物の活性評価には通常、本発明の特定の側面で提供されたケラチノサイトを候補化合物と混合すること、その化合物に起因する全ての形態的な変化、マーカーの表現型の変化、または細胞の代謝活性の変化を決定すること（未処理の細胞または不活性化合物で処理した細胞と比較する）、次いで、化合物の影響と観察された変化とを関連づけること、が含まれる。スクリーニングは、その化合物がケラチノサイトに対して薬理学的効果をもつように設計されているため、あるいは他の場所に影響を及ぼすように設計された化合物は、ケラチノサイトに意図しない副作用をもたらすかもしれないので、実施してもよい。生じる得る薬剤間相互作用を検出するために、2種類以上の薬剤を組み合わせる場合もある（細胞と同時に、または順次混合することによって）。いくつかの例では、化合物をケラチノサイトに対する毒性の点からスクリーニ

40

50

ングする（例えば、クズヤら、2001を参照のこと）。

【0125】

B．上皮シートの生成と移植

本発明はまた、おそらく創傷に起因して、そのような治療を必要とする対象の上皮機能にある程度の回復させるための、本明細書で提供されるケラチノサイトの使用を提供する。例えば、本明細書で開示した方法によって誘導されたケラチノサイトおよびケラチノサイト幹細胞は、熱傷を治療するために（例えば、移植片の操作などのために）使用することができる。

【0126】

本明細書で提供されるケラチノサイトの治療目的での適性を決定するために、細胞を最初に適切な動物モデルで試験することができる。あるレベルでは、細胞は、例えばマウス（実施例1のように）またはヒトの死体に由来する脱表皮化真皮を接種することによって、皮膚細胞に分化および層化する能力について評価することができる。別のレベルでは、細胞を、インビボでそれらが表現型を残存および維持する能力について評価してもよい。本明細書で提供されるケラチノサイトは、免疫不全動物（ヌードマウスや、または化学的にまたは放射線の照射によって免疫不全化した動物）の、それ以降も観察できる部位に投与することができる。例えば、全層皮膚の一部分をヌードマウスの背面から手術によって除去し、続いて周囲の皮膚の下にシリコンドームチャンバーを挿入する。線維芽細胞およびケラチノサイトを、ドームの上部の穴を通して創傷に塗布する。手術の数週間後、移植部位を最初に作った創傷の治癒について分析する。数週間またはそれ以上の期間が経過した後、組織を回収し、多能性幹細胞などの出発細胞型が依然として存在するかどうか否かを評価することができる。このことは、投与する細胞を検出可能な標識（例えば、緑色蛍光タンパク質または - ガラクトシダーゼ）で標識することによって、または投与する細胞に特異的な構成的マーカーを測定することによって実施することができる。本明細書で提供するケラチノサイトをげっ歯類モデルを使って試験する場合、投与した細胞の有無および表現型は、ヒト特異的抗体を用いる免疫組織化学もしくはELISA、または、特定のヒトポリヌクレオチド配列を増幅するプライマーおよびハイブリダイゼーション条件を用いるRT-PCR解析によって、評価することができる。mRNAまたはタンパク質レベルで遺伝子発現を評価するために好適なマーカーは、本開示の別の場所で提供する。

【0127】

本発明の方法により提供されるケラチノサイトは、種々の動物モデルを使い、上皮創傷を治癒するその能力に関して試験してもよい。ケラチノサイトを皮膚線維芽細胞と混合し、皮膚創傷上に移植した場合、細胞が機能性であれば創傷は少なくとも部分的に治癒する。このアッセイは一般的に、初代ケラチノサイトの機能を試験するために用いられる。

【0128】

それらの酵素プロファイルまたは動物モデルにおける有効性に従って所望の機能的特徴を示す、本発明の特定の側面で提供されるケラチノサイトはまた、それを必要とするヒト対象に直接投与するのにも適している。ケラチノサイトを、角膜に投与してもよい。

【0129】

本発明の角膜上皮シートは、角膜が損傷した患者への移植材料（角膜上皮の代替物）として使用することができる。移植においては、移植片を外科用縫合糸で周囲の組織に固定することにより移植片を固定し、生存させることが好ましい。さらに、移植後は、一時的に治療用コンタクトレンズで覆うことにより、移植部分の表面を保護することが好ましい。角膜上皮シートは、コラーゲン層上に形成された細胞層を含んでいてもよく、これは、細胞層に加えて提供される。コラーゲン層は、羊膜由来であってもよい。コラーゲン層を有する角膜上皮シートは、所定の細胞を基質としてのコラーゲン層に播種し、その後培養することにより得ることができる。

【0130】

本発明の特定の側面において提供されるケラチノサイト幹細胞は、それを必要とするいかなる対象もの治療に使用することができる。そのような治療に適切であり得る好ましい

10

20

30

40

50

ヒトの状態は熱傷である。治療様式および適切な用量を決定するための最終的な責任は管理医師にある。

【0131】

本発明の特定の側面は、生体工学によって作られた組織移植片の一部を形成する、本明細書で提供されるケラチノサイトまたはケラチノサイト幹細胞を含む。このような組織移植片は、上皮シート移植片であってもよい。

【0132】

グリーンおよび共同研究者らは、ヒト上皮ケラチノサイトを培養する方法を記載しており（レインワルドおよびグリーン、1975）、この方法は、他の培養上皮細胞にまで拡張されている。このような培養条件からは、広い熱傷面、潰瘍および他の皮膚創傷への移植に適した層化した上皮シートが得られる（ガリコら、1984；ハイテンら、1986）。この手順で得られる培養上皮は、一時的な創傷被覆材のための同種移植片としても使用されている（フィリップスら、1989；ポリバー・フローレスら、1990）。上皮細胞培養は、体表面再建のための強力なツールとなっている。

【0133】

上皮シートの有効期間が限られているため、それらの使用は、製造施設からあまり離れていない医療施設に限定されている。病院へ輸送するために上皮シートをディスペンサーで分離した後の有効期間は短い。そのため、培養シートの保存方法が確立できれば、それをバンク化することができ、また、世界中に輸送することができるようになる。この点に関しては、いくつかの戦略が試みられている。何人かの著者らは、凍結保護剤としてのグリセロールまたはジメチルスルホキシドの使用と、それに続く特定の凍結プロトコルに基づく凍結保存法を開発した（米国特許第5,298,417号を参照のこと）。その他のものは、細胞浸透性ガラス形成剤（特にグリセロール）と非浸透性保護剤（好ましくはポリビニルピロリドン（PVP）、デキストランまたはヒドロキシエチルデンプン）の両方を含む培地を有する凍結保存された培養上皮シートを開発した（米国特許第5,145,770号を参照のこと）。さらに他のものは、凍結保存成分を洗い流す必要がなく、乾燥保存の選択肢を有する凍結保存された培養上皮シートを開発した（米国特許第6,548,297号を参照のこと）。

【0134】

次いで、ケラチノサイトのシートを、iPS細胞の作製元の哺乳動物に移植する。

【0135】

C. 商用、治療用および研究目的での流通

製造、流通および使用の目的では、ケラチノサイト幹細胞を含む本発明のケラチノサイト系統の細胞は、通常、等張性の賦形剤または培地に入った細胞培養または懸濁液という形態で、必要に応じて、輸送または保管を容易にするために凍結されて、供給される。

【0136】

本発明はまた、製造、流通または使用のどんな時にも存在する一組または組み合わせの細胞を含んでいる種々の試薬系も含む。一組の細胞は、本開示で記載の2種以上の細胞集団の任意の組み合わせ、例えば、これらには限定されないが、分化させた細胞（ケラチノサイト細胞系列の細胞、それらの前駆細胞およびサブタイプ）と未分化幹細胞または他の分化した細胞型の組み合わせが挙げられる。ある組に含まれている細胞集団は、同じゲノムまたはそれらの遺伝的変型を共有していることがある。ある組に含まれているそれぞれの細胞型は、一緒に梱包してもまたは同じ設備に含まれる別々の容器に入れても、あるいは別々の場所にあっても、同時にもしくは時間的に別々にあっても、同じ実体の管理下にあってもまたは取引関係のあるいは別の実体の管理下にあってもよい。

【実施例】

【0137】

VIII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を示すために含まれるものである。当業者であれば理解できるように、以下の実施例で開示される技術は、本発明の実践において最もう

10

20

30

40

50

まく機能することが発明者らによって発見された技術であり、そのため、その実践に関する好ましい形態であると見なすことができる。しかしながら、当業者は、本開示を踏まえて、開示されている特定の態様に多くの変更を施すことができ、それでもなお、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果が得られることを理解する。

【0138】

実施例1 - 多能性幹細胞からの機能性ケラチノサイトの分化

ケラチノサイト幹細胞は、ヒトESC/iPSCから、開始、分化、成熟、および維持の4つの工程から生成することができる(図1)。開始工程(0~3日目)では、全トランスレチノイン酸(RA)と神経分化を抑制する因子であるBMP4の相乗作用により、ESC/iPSCの凝集体を外胚葉に運命づけられるように誘導した。0日目に、hESC/iPSCを回収し、およそ50%コンフルエントの表面培養物を、アキュターゼ(Accutase)で37℃で5分間消化することで、単一細胞になるよう個別化した。単一細胞をmTeSR培地で1回洗浄し、 0.7×10^6 細胞/mLの密度で、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤HA-100($10 \mu\text{M}$)を添加した5mLのTeSR培地を入れた超低付着T25フラスコに播種した。T25フラスコを、5%CO₂細胞培養インキュベーター中、15rpmで振とうしているベリーダンサー(Belly Dancer)攪拌機上に置いた。1日目に、hESC/iPSC凝集体を開始培地(表1)で1回洗浄し、その後1日目から3日目までは、5mLの開始培地中、毎日培地を交換しながらインキュベートした。分化工程(4~14日目)では、継続的にEGF、FGF1、アスコルビン酸、コレラ毒素、8-Br-cAMP、TGFRIキナーゼ阻害剤II(TGFRKi)、および高濃度のナイアシンアミドに曝露することによって、単層の(committed simple)上皮前駆細胞を、サイトケラチン14(K14)陽性でかつp63陽性のケラチノサイト前駆体へと変化させた。4日目に、T25フラスコから上皮凝集体を回収して分化培地(表2)に入れ、アキュターゼと共に37℃で20分間インキュベートした。部分的に消化された凝集体を分化培地で1回洗浄し、凝集体を1ウェルあたり約20個の密度で、ビトロネクチンまたはラミニンでコーティングしたヌンクロン(Nunc lon)6ウェルプレートにプレーティングした。細胞には2日毎に分化培地を与えた。15日目にケラチノサイト前駆体(K14+)をバーゼン(Versene)に溶解したトリプシン(0.1%)で2分間消化して継代し、ゼラチンまたはラミニンでコーティングしたヌンクロン6ウェルプレート上において成熟培地(表3)中に、1ウェルあたり50,000個の細胞密度でプレーティングした。その後、ケラチノサイト前駆細胞を成熟条件下(15~20日目、継代1)で、ケラチノサイト幹細胞マーカーであるサイトケラチン15(K15)とCD49fが高レベルで発現するまで、継続して培養した。ケラチノサイト幹細胞が生成された後の維持工程(20日目以降)では、中程度の生育条件(表4)を適用して、細胞を成長・増殖させた。各工程における組成が化学的に規定された培地(FBSおよびBSAを含まない)の全組成を表1~4に示す。

【0139】

顕微鏡を使ってiKCの特徴付けを行った結果、よりコンパクトで、個々のiKCは初代ケラチノサイトよりもサイズが小さいことが分かった(図2A)。iKCのフロー分析からも、iKCが初代ケラチノサイトよりも小さいことが示唆された。継代3のヒト包皮ケラチノサイトと継代1のiKCの位相差画像から、皮膚にバリア機能をもたらしている密着結合を共有しているケラチノサイトに典型的な特徴の、明るく見える細胞間の境界が明らかになった(図2A)。ヒト包皮ケラチノサイトおよびiKCの免疫蛍光画像から、培養した初代ケラチノサイト(P3)が、細胞質でK14を発現しているが、K15の発現を消失していることが示された(図2B)。P0(継代0)では、iKCは多様なレベルでK14を発現していたが、K15は発現していなかった。P1(継代1)では、iKCはK14をより均一に発現し、細胞の一部は、ケラチノサイト幹細胞マーカーであるK15を高レベルで発現していた。

【0140】

iKCを誘導するのに重要な成分を同定するための実験を行った。最初に、最適条件(

図1および表1～2に記載)と、1回につき1つの成分だけを変更した様々な非最適条件で、継代0の、14日目の分化培養物を得た。得られた培養物の画像を位相差を用いて取得した(図3A)。培地にコレラ毒素とTGF β 1が含まれていないと、iKCsを効率的に誘導することができないことが判明した。さらに、EGFとナイアシンアミドの濃度が十分でない場合、分化過程が不完全であった。同様に、培地中のカルシウムレベルが高すぎると(1mM)、シンプル(simple)の上皮前駆細胞のさらなる分化が起こらず、ケラチノサイトにならなかった。次に、異なる線維芽細胞増殖因子(FGF)を用いて、継代0、14日目の分化培養物を得た。得られた培養物を、抗K14抗体による免疫蛍光染色により画像化した。FGF1は細胞を効率的に誘導して、成熟ケラチノサイトマーカーであるK14を発現させていたが、FGF2とFGF7は均一なK14の発現を促進しなかった(図3B)。

10

【0141】

ヒトESC/iPSCから分化させたケラチノサイトの純度を評価するために、ケラチノサイトを図1に記載の方法によって作製し、継代0(P0)および継代1(P1)の終了時に回収した。得られた培養物ならびに継代3の初代ヒト包皮ケラチノサイトを、抗K14-FITCと抗CD49f-PE抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。陽性対照の初代ケラチノサイトは、98.1%の細胞がK14+/CD49f+であるという結果を示し、これは、基底層ケラチノサイトの発現プロファイルと一致した(図4)。P0とP1の終了時にiKCsフロー分析を行った結果、K14+/CD49f+細胞の割合は、それぞれ、90.2%および91.8%であった。これらの結果は、図1に記載の分化プロトコルから、K14とCD49fを発現している高純度のケラチノサイトが生成されたことを示している。

20

【0142】

維持条件におけるiKCsの増殖能を測定するために、iKCsを、パーゼン中の0.1%トリプシンで処理し、ゼラチンでコーティングしたヌンクロン6ウェルプレートに、1ウェル当たり50,000個の細胞を継代した。細胞に一日おきに維持培地を与え、各プレートの5日後に再び継代した。集団倍加率を計算するために、各継代で合計細胞数を記録した。iKCsは、老化に達する前に5回継代することができた(図5A)。iKCsの集団倍加率は累計で11.6に達した。

【0143】

iKCsの幹細胞性を決定するために、コロニー形成アッセイ(CFA)を行った。細胞を6ウェルプレートに250細胞/ウェルでプレートングし、2週間生育させた。初代ケラチノサイトについては、ブランクの細胞の入っていない培養で処理したプレートを最適な成長のために使用した。一方、iKCsについては、前もって初代ケラチノサイトの培養に使用し、基底膜として天然のラミニン沈着物を有しているプレートを用いた。培養終了時に、細胞を2%ホルムアルデヒドで固定し、ヘキストで染色した。プレート全体を、モレキュラー・デバイス社の(Molecular Devices)イメージエクスプレス(ImageXpress)高解像度イメージャで画像化した。結果から、初代ケラチノサイトが、通常のケラチノサイト集団には不十分なケラチノサイト幹細胞に由来する、約15個の個別の大きなコロニーを形成したことが示された(図5B)。iKCsは培養期間中に大きく増殖したが、細胞間の増殖能力はより均一であった(図5B)。継代1(P1)でiKCsは、コロニー形成アッセイにおいて2週間以内にほぼ完全なコンフルエントまで増殖した。

30

40

【0144】

iKCsがマウス脱表皮化真皮(DED)上で分化および層化する能力を調べた。DEDを作製するために、マウス新生仔の背中の皮膚を外科的に切除し、約1cm²の丸い断片に切り取った。次いで皮膚組織をパーゼン中、4で一晩インキュベートして、表皮と真皮との結合を緩めた。12時間インキュベーションした後、表皮をピンセットで除去した。残った真皮を70%エタノールおよびPBSで、それぞれ3回繰り返しすすいだ。次いで、清潔な真皮の液体窒素による凍結と室温での解凍を10サイクル繰り返し、組織を

50

失活させた。得られた組織を1%のペニシリン - ストレプトマイシン (Pen strep) を含むPBSに移し、4℃で24時間おいた。この時点で、DEDは直ちに使用しても、または-20℃で保存してもよい。DED上に細胞を播種するために、DEDをPBSから取り出し、ケラチノサイト維持培地に浸漬した。目的の細胞を、トリプシンを使って表面培養から引きはがし、維持培地に集めた。約100万個の細胞を約100μlの維持培地に再懸濁した。最初に、DEDをトランズウェル (Transwell) (コーニング) の上部チャンバーに置き、次いで、細胞懸濁液をDEDの上にそっと加えた。細胞が沈降するように5分間おいた。2週間、1.5mLの維持培地をDED移植片にトランズウェルの底から供給した。1日おきに維持培地を交換した。トランズウェル中で2週間培養した後、DED移植片を引き上げ、凍結切片を作製するためにOCTコンパウンドに包埋した。切片(16μm)を切り出し、移植した細胞の核がピンク色に染まるよう、ヘマトキシリンで染色した。DED移植の結果から、継代1のiKCが、初代ヒトケラチノサイトと同様に、マウスDED上で分化し、層を形成することができることが示された(図6A)。

【0145】

次に、iKCの、FoxN1ヌードマウスの背部に生着する能力を試験した。FoxN1免疫不全ヌードマウスをイソフルラン吸入により麻酔した。このヌードマウスの背部からおよそ1cm²の全層皮膚(表皮および真皮)を丸く、外科的に切除した。その創傷の収縮によって固くなった周囲の皮膚の下に、シリコンドームチャンバーをしっかりと挿入した。シリコンドームチャンバーは、移植細胞が生存および成長するための湿潤環境を提供するだけでなく、周囲の自己皮膚が広がって創傷を治癒するのを防止する。150μlのDMEMに、100万個の真皮線維芽細胞(FB)と100万個のケラチノサイト(KC)を懸濁し、ドーム上部の穴を通して傷口の中心にそっと乗せた。細胞を移植した10分後にイソフルランを除去した。マウスは個別に飼育し、術後最初の4日間は鎮痛剤を与えた。手術の1週間後、シリコンチャンバーを創傷から除去した。手術の3週間後、マウスを安楽死させて移植部位を分析した。外科手術の3週間後に撮影した写真から、iKC(2複製)が初代マウスおよびヒトケラチノサイトと同程度に皮膚の初期創傷を覆い、治癒することができることが示された(図6B)。注目すべきことに、iKC移植片には、初代ケラチノサイトではしばしば見られる毛嚢幹細胞がないため、残存毛を欠いていた。

10

20

30

【表 1】

表 1. iKC分化用開始培地の組成

	MW	μ M		MW	μ M
アミノ酸			無機塩		
グリシン	75	100	硫酸鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	278	5
L-アラニン	89	100	塩化マグネシウム(無水物)	95	600
L-アルギニン塩酸塩	211	1000	硫酸マンガン($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169	0.001
L-アスパラギン- H_2O	150	100	塩化ニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	238	0.0005
L-アスパラギン酸	133	30	塩化カリウム(KCl)	75	1500
L-カルニチン HCl	197	50	炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3)	84	14000
L-システイン塩酸塩- H_2O	176	240	塩化ナトリウム(NaCl)	58	121500
L-グルタミン酸	147	100	メタケイ酸ナトリウム($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	261	0.5
L-グルタミン	146	6000	リン酸水素二ナトリウム	142	2000
L-ヒスチジン塩酸塩- H_2O	210	280	亜セレン酸ナトリウム無水物 (Na_2SeO_3)	173	0.022
L-イソロイシン	131	470	塩化スズ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	226	0.0005
L-ロイシン	131	500	硫酸亜鉛($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	288	0.5
L-リジン塩酸塩	183	100	その他		
L-メチオニン	149	82	チミジン	242	3
L-フェニルアラニン	165	77	アデニン-HCl	171.6	180
L-プロリン	115	300	D-グルコース(デキストロース)	180	6000
L-セリン	105	600	リボ酸	206	1
L-トレオニン	119	170	フェノールレッド-HCl	376	3.3
L-トリプトファン	204	27	ヘペス(HEPES)	238	25180
L-チロシン二ナトリウム塩(無水)	261	52	プトレシン2HCl	161	1
L-バリン	117	300	ピルビン酸ナトリウム	110	500
ビタミン類			酢酸ナトリウム	82	3670
ビオチン	244	0.06	分化活性化因子		
塩化コリン	140	100	8-ブロモ-cAMP	430	200
パントテン酸D-カルシウム	238	2	コレラ毒素	84000	0.0001
葉酸	441	1.8	アスコルビン酸	172	174
ナイアシンアミド	122	0.3	トリヨードチロニン	651	0.01
ピリドキシン塩酸塩	206	0.3	エタノールアミン	61	100
リボフラビン	376	0.1	ホスホリルエタノールアミン	141	100
チアミン塩酸塩	337	1	アポ-トランスフェリン	76000	0.066
ビタミンB12	1355	0.3	ヒドロコルチゾン	362	0.552
i-イノシトール	180	100	オールトランス(All-trans)レチノイン酸	300	1
無機塩			インスリン	5808	0.0172
メタバナジン酸アンモニウム	117	0.005	BMP4	34000	7.35E-04
モリブデン酸アンモニウム	1236	0.001	FGF1	15800	3.16E-04
塩化カルシウム(CaCl_2)(無水物)	111	90	EGF	3400	1.56E-02
硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	250	0.011	IGF1	7655	1.31E-03

10

20

30

40

【表 2】

表2. iKC分化用分化培地の組成

	MW	μ M		MW	μ M
アミノ酸			無機塩		
グリシン	75	100	硫酸鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	278	5
L-アラニン	89	100	塩化マグネシウム(無水物)	95	600
L-アルギニン塩酸塩	211	1000	硫酸マンガン($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169	0.001
L-アスパラギン- H_2O	150	100	塩化ニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	238	0.0005
L-アスパラギン酸	133	30	塩化カリウム(KCl)	75	1500
L-カルニチン HCl	197	50	炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3)	84	14000
L-システイン塩酸塩- H_2O	176	240	塩化ナトリウム(NaCl)	58	121500
L-グルタミン酸	147	100	メタケイ酸ナトリウム($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	261	0.5
L-グルタミン	146	6000	リン酸水素二ナトリウム	142	2000
L-ヒスチジン塩酸塩- H_2O	210	280	亜セレン酸ナトリウム無水物 (Na_2SeO_3)	173	0.022
L-イソロイシン	131	470	塩化スズ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	226	0.0005
L-ロイシン	131	500	硫酸亜鉛($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	288	0.5
L-リジン塩酸塩	183	100	その他		
L-メチオニン	149	82	チミジン	242	3
L-フェニルアラニン	165	77	アデニン-HCl	171.6	180
L-プロリン	115	300	D-グルコース(デキストロース)	180	6000
L-セリン	105	600	リボ酸	206	1
L-トレオニン	119	170	フェノールレッド-HCl	376	3.3
L-トリプトファン	204	27	ヘペス(HEPES)	238	25180
L-チロシン二ナトリウム塩(無水)	261	52	ブトレシン 2HCl	161	1
L-バリン	117	300	ピルビン酸ナトリウム	110	500
ビタミン類			酢酸ナトリウム	82	3670
ビオチン	244	0.06	分化活性化因子		
塩化コリン	140	100	8-ブromo-cAMP	430	200
パントテン酸D-カルシウム	238	2	コレラ毒素	84000	0.0001
葉酸	441	1.8	アスコルビン酸	172	174
ナイアシンアミド	122	0.3	トリヨードチロニン	651	0.01
ピリドキシン塩酸塩	206	0.3	エタノールアミン	61	100
リボフラビン	376	0.1	ホスホリルエタノールアミン	141	100
チアミン塩酸塩	337	1	アポトランスフェリン	76000	0.066
ビタミンB12	1355	0.3	ヒドロコルチゾン	362	0.552
i-イノシトール	180	100	インスリン	5808	0.0172
無機塩			FGF1	15800	3.16E-04
メタバナジン酸アンモニウム	117	0.005	EGF	6400	1.56E-02
モリブデン酸アンモニウム	1236	0.001	IGF1	7655	1.31E-03
塩化カルシウム(CaCl_2)(無水物)	111	90	TGFRKi(10~14日目)	287.3	1
硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	250	0.011	ナイアシンアミド(8~14日目)	122	3000

10

20

30

【表 3】

表3. iKC分化用成熟培地の組成

	MW	μ M		MW	μ M
アミノ酸			無機塩		
グリシン	75	100	硫酸鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	278	5
L-アラニン	89	100	塩化マグネシウム(無水物)	95	600
L-アルギニン塩酸塩	211	1000	硫酸マンガン($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169	0.001
L-アスパラギン- H_2O	150	100	塩化ニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	238	0.0005
L-アスパラギン酸	133	30	塩化カリウム(KCl)	75	1500
L-カルニチン HCl	197	50	炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3)	84	14000
L-システイン塩酸塩- H_2O	176	240	塩化ナトリウム(NaCl)	58	121500
L-グルタミン酸	147	100	メタケイ酸ナトリウム($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	261	0.5
L-グルタミン	146	6000	リン酸水素二ナトリウム	142	2000
L-ヒスチジン塩酸塩- H_2O	210	280	亜セレン酸ナトリウム無水物(Na_2SeO_3)	173	0.022
L-イソロイシン	131	470	塩化スズ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	226	0.0005
L-ロイシン	131	500	硫酸亜鉛($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	288	0.5
L-リジン塩酸塩	183	100	その他		
L-メチオニン	149	82	チミジン	242	3
L-フェニルアラニン	165	77	アデニン-HCl	171.6	180
L-プロリン	115	300	D-グルコース(デキストロース)	180	6000
L-セリン	105	600	リボ酸	206	1
L-トレオニン	119	170	フェノールレッド-HCl	376	3.3
L-トリプトファン	204	27	ヘペス(HEPES)	238	25180
L-チロシン二ナトリウム塩(無水)	261	52	ブトレシン 2HCl	161	1
L-バリン	117	300	ピルビン酸ナトリウム	110	500
ビタミン類			酢酸ナトリウム	82	3670
ビオチン	244	0.06	分化活性化因子		
塩化コリン	140	100	8-ブロモ-cAMP	430	200
パントテン酸D-カルシウム	238	2	コレラ毒素	84000	0.0001
葉酸	441	1.8	アスコルビン酸	172	5.833333
ナイアシンアミド	122	0.3	トリヨードチロニン	651	0.01
ピリドキシン塩酸塩	206	0.3	エタノールアミン	61	100
リボフラビン	376	0.1	ホスホリルエタノールアミン	141	100
チアミン塩酸塩	337	1	アポトランスフェリン	76000	0.066
ビタミンB12	1355	0.3	ヒドロコルチゾン	362	0.552
i-イノシトール	180	100	インスリン	5808	0.0172
無機塩			FGF1	15800	3.16E-04
メタパナジン酸アンモニウム	117	0.005	EGF	6400	1.56E-03
モリブデン酸アンモニウム	1236	0.001	IGF1	7655	1.31E-03
塩化カルシウム(CaCl_2)(無水物)	111	90	VEGF	19165	1.30E-03
硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	250	0.011	ナイアシンアミド	122	3000

10

20

30

【表 4】

表4. iKC用維持培地の組成

	MW	μ M		MW	μ M
アミノ酸			無機塩		
グリシン	75	100	硫酸鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	278	5
L-アラニン	89	100	塩化マグネシウム(無水物)	95	600
L-アルギニン塩酸塩	211	1000	硫酸マンガン($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169	0.001
L-アスパラギン- H_2O	150	100	塩化ニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	238	0.0005
L-アスパラギン酸	133	30	塩化カリウム(KCl)	75	1500
L-カルニチン HCl	197	50	炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3)	84	14000
L-システイン塩酸塩- H_2O	176	240	塩化ナトリウム(NaCl)	58	121500
L-グルタミン酸	147	100	メタケイ酸ナトリウム($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	261	0.5
L-グルタミン	146	6000	リン酸水素二ナトリウム	142	2000
L-ヒスチジン塩酸塩- H_2O	210	280	亜セレン酸ナトリウム無水物 (Na_2SeO_3)	173	0.022
L-イソロイシン	131	470	塩化スズ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	226	0.0005
L-ロイシン	131	500	硫酸亜鉛($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	288	0.5
L-リジン塩酸塩	183	100	その他		
L-メチオニン	149	82	チミジン	242	3
L-フェニルアラニン	165	77	アデニン-HCl	171.6	180
L-プロリン	115	300	D-グルコース(デキストロース)	180	6000
L-セリン	105	600	リボ酸	206	1
L-トレオニン	119	170	フェノールレッド-HCl	376	3.3
L-トリプトファン	204	27	ヘペス(HEPES)	238	25180
L-チロシン二ナトリウム塩(無水)	261	52	プトレシン 2HCl	161	1
L-バリン	117	300	ピルビン酸ナトリウム	110	500
ビタミン類			酢酸ナトリウム	82	3670
ビオチン	244	0.06	分化活性化因子		
塩化コリン	140	100	8-ブロモ-cAMP	430	200
パントテン酸D-カルシウム	238	2	コレラ毒素	84000	0.0001
葉酸	441	1.8	トリヨードチロニン	651	0.01
ナイアシンアミド	122	0.3	エタノールアミン	61	100
ピリドキシリン塩酸塩	206	0.3	ホスホリルエタノールアミン	141	100
リボフラビン	376	0.1	アポトランスフェリン	76000	0.066
チアミン塩酸塩	337	1	ヒドロコルチゾン	362	0.552
ビタミンB12	1355	0.3	インスリン	5808	0.0172
i-イノシトール	180	100	FGF1	15800	3.16E-04
無機塩			EGF	6400	1.56E-04
メタバナジン酸アンモニウム	117	0.005	IGF1	7655	1.31E-03
モリブデン酸アンモニウム	1236	0.001	VEGF	19165	1.30E-03
塩化カルシウム(CaCl_2)(無水物)	111	90	ナイアシンアミド	122	3000
硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	250	0.011	TGFRKi(10~14日目)	287.3	0.1

10

20

30

40

【表 5】

表5. H1 ESCからのケラチノサイト幹細胞分化誘導効率

0日目に加えた H1 ESCの数	14日目に回収された ケラチノサイトの数	効率
3,500,000	44,640,000	12.75
3,500,000	31,680,000	9.05
3,500,000	48,240,000	13.78
		平均 11.86±2.49

10

【0146】

実施例2 - 初代ケラチノサイトの増殖および維持

本明細書では、初代ヒトケラチノサイトの増殖および維持に用いる、組成が化学的に規定された培地を提供する。この培地を用いれば、初代ケラチノサイトを、それらのコロニー形成能力を維持しながら、集団を40倍以上に倍加させ、増殖させることができる。この培地はまた、インビトロおよびインビボいずれの用途においても、ヒトESC/iPSCをケラチノサイト様細胞に分化させるのに使うことができる。

【0147】

初代ヒトケラチノサイトを培養するための組成が化学的に規定された培地（KCM、ケラチノサイト培養培地）は、基礎培地としてMCDB 153を使用しており、さらにアミノ酸が添加されたものであった（表6）。完全培地には、カルシウム（80 μM）、EOP（エタノールアミンおよびホスホリエタノールアミン共に0.1 mM）、トランスフェリン（5 μg/mL）、ヒドロコルチゾン（0.2 μg/mL）、FGF1（1 ng/mL）、EGF（0.5 ng/mL）およびIGF1（10 ng/mL）が添加されていた。初代ケラチノサイトの培養を最適化するために、T3（10 nM）、L-カルニチンHCl（5 μM）、8-Br-cAMP（0.2 mM）、コレラ毒素（100 pM）、ナイアシンアミド（3 mM）、BMP4（0.5 ng/mL）、VEGF（25 ng/mL）およびインスリン（表で示すように、IGFに加えて、またはその代わりに0~10 μg/mL）を種々の培地組成で試験した（表7）。

20

【表 6】

表6. 添加したアミノ酸

KCM基本培地	最終濃度(mg/L)
ヒスチジン	47.68
イソロイシン	67.548
メチオニン	13.48
フェニルアラニン	13.96
トレオニン	21.91
トリプトファン	6.12
チロシン	10.39

30

40

【表 7】

表7. 組成が化学的に規定されたヒト初代ケラチノサイト培地(KCM)に加えた成長因子と低分子添加剤

成分	濃度	KCM1	KCM2	KCM3	KCM4
カルシウム	0.08mM	0.08mM	0.08mM	0.08mM	0.08mM
EOP	0.1mM	0.1mM	0.1mM	0.1mM	0.1mM
トランスフェリン	5 μ g/mL	5 μ g/mL	5 μ g/mL	5 μ g/mL	5 μ g/mL
ヒドロコルチゾン	0.2 μ g/mL	0.2 μ g/mL	0.2 μ g/mL	0.2 μ g/mL	0.2 μ g/mL
FGF1	1ng/mL	1ng/mL	1ng/mL	1ng/mL	1ng/mL
EGF	0.5ng/mL	0.5ng/mL	0.5ng/mL	0.5ng/mL	0.5ng/mL
IGF	0-10ng/mL	10ng/mL	10ng/mL	10ng/mL	10ng/mL
T3	0-10nM		10nM	10nM	10nM
L-カルニチンHCl	0-5 μ M		5 μ M	5 μ M	5 μ M
8-Br-cAMP	0-0.2mM		0.2mM	0.2mM	0.2mM
コレラ毒素	0-100pM		100pM	100pM	100pM
ナイアシンアミド	0-3mM			3mM	3mM
BMP4	0-0.5ng/mL				0.5ng/mL
VEGF	0-25ng/mL				
インスリン	0-10 μ g/mL				

10

【0148】

様々な培地で生育させた細胞の機能を評価するために、形態学、集団倍加、およびコロニー形成アッセイ(CFA)の3つの測定基準を使用した。

【0149】

20

ケラチノサイトの成長に対するインスリンおよびIGFの効果を決めるために、研究を行った。細胞は、0 μ g/mLを含むすべての濃度のインスリンで良好に成長した。しかし、高濃度のインスリン(1 μ g/mL以上)で培養したケラチノサイトは、継代後期(p6)では、分化した大きな細胞を多く含み、IGFと低濃度のインスリン(0.05 μ g/mLおよび0 μ g/mL)を加えて生育させた細胞はそれよりも小さく、互いがより密着しているように見えた(図7A)。さらに、KCM1中で初代ケラチノサイトを長期間培養すると、IGFを加えて培養した細胞の成長速度は、インスリンと共に生育した細胞と同程度であった(図7B)。様々な変更を加えたKCM1で培養したケラチノサイトのCFAを、CFAの開始時に、示した培地からKCM1(10 μ g/mLインスリン)に切り替えて試験した。ケラチノサイトをKCM1(10 μ g/mLインスリン)で12日間培養し、コロニーサイズを測定した。IGFまたはインスリンのいずれかを添加したKCM1中で増殖させた細胞は、CFAの点では同様に機能した(図7C)。コロニー数またはサイズのいずれの条件についても統計学的に有意な差はなかった。

30

【0150】

培養初代ケラチノサイトの寿命に対する、ナイアシンアミドおよびBMP-4の効果を決めた。コーティングしていないプラスチックプレート上において、KCM1、KCM2、KCM3、およびKCM4中で生育させたケラチノサイトはすべて、ケラチノサイトに典型的なコロニー増殖パターンを示した(図8A)。ナイアシンアミドを添加すると(KCM3およびKCM4)細胞が小さくなった。これは、ケラチノサイト幹細胞に不随する表現型である。さらに、様々な培地組成中で長期培養した初代ケラチノサイトについて調べた(図8B)。最も単純な組成のKCM1では、集団がおおよそ12倍になるまで、ケラチノサイトの成長が支えられた。培地にT3、L-カルニチン、8-Br-cAMP、およびコレラ毒素を添加すると(KCM2)、細胞は約19倍に増加した。ナイアシンアミド(KCM3)を加えると、増殖能がさらに増強され、集団もおおよそ26倍に倍加した。BMP4を加えると(KCM4)、集団は有意に倍加した(おおよそ40倍)。種々の培地組成中で培養したケラチノサイト(P4)を使い、CFAを行った。集団倍加率を高めた成分はさらに、CFAではコロニー数およびサイズを増加させた(図8C~E)。KCM4で生育させたケラチノサイトは、継代9(集団倍加率はおおよそ35倍)まで、CFAでコロニーを形成する能力を維持した。BMP4およびナイアシンアミドが、寿命の延長およびコロニー形成能力の維持に関与するKCM4の重要な成分であることが見出され

40

50

た。すなわち、BMP4およびナイアシンアミドによって、培養中の初代ケラチノサイト幹細胞の幹細胞性が維持された。

【0151】

初代ケラチノサイトの増殖能に対するVEGFの効果进行测试した。KCM4およびKCM4 + VEGF (25 ng/mL) で成長させた初代ケラチノサイトの長期培養においては、KCM4培地へのVEGFの添加は形態学的差異を示さなかったが、ケラチノサイトの増殖能を向上させた(図9A)。さらに、VEGFは、継代後期においてCFAに正の効果を発揮することが見出された。例えば、集団倍加率が約35倍(KCM4についてはP10、KCM4 + VEGFについてはP8)の細胞では、KCM4での平均コロニーサイズは585単位であったが、KCM4 + VEGFでの平均コロニーサイズは1370単位であった(図9B)。コロニーの成長を支えるためには、KCM4に5 µg/mLのインスリンを添加する必要があることに注目されたい。

10

【0152】

ケラチノサイトは、コラーゲン1をコーティングしたプラスチックプレート上でも、コーティングをしていないプラスチックプレート上でも培養可能であることが判明した。コラーゲン1コーティングまたは非コーティングプレートのいずれかをを用い、KCM4中で細胞を長期培養した場合、どちらの表面でも、ケラチノサイトの成長速度に差はなかった(図10A)。しかしながら、非コーティングプレート上で増殖した初代ケラチノサイトは、コラーゲン上で増殖したものよりもCFAの点で、わずかに良好に機能した(図10B~C)。例えば、21.5倍に倍加した細胞(NCについてはP6、C1についてはP7)をC1上で培養すると、1ウェル当たり平均して40.3個のコロニーが生じ、その平均コロニーサイズは1033単位であったが、NC上で培養した細胞は1ウェル当たり平均80.7個のコロニーを生じ、その平均コロニーサイズは1564単位であった。

20

【0153】

KCM4で培養したケラチノサイトは、高カルシウムにตอบสนองして分化マーカーを発現することが分かった。継代3のケラチノサイトを1.5 mMのCa²⁺で3日間処理し、分化マーカーのケラチン1、ロリクリンおよびフィラグリンの発現を免疫細胞化学によって評価した。3つの分化マーカーの発現は全て、高Ca²⁺処理ウェルで検出され、未処理ウェルでは検出されなかった(図11)。

【0154】

30

KCM4は、市販の組成が化学的に規定された培地と同様に機能することが分かった。KCM4を、3種類の組成が化学的に規定された培地、つまり、インビトロジェンの組成が化学的に規定されたケラチノサイト血清を含まない培地(DKSFM)、エピライフの組成が化学的に規定された成長補助培地(Growth Supplement)(EDGS)、およびロンザのケラチノサイト組成が化学的に規定された成長培地(KGM-CD)、と比較した。市販の培地中で培養した細胞は、製造業者が推奨しているように、コラーゲンをコーティングしてあるプレート上で生育させた。異なる培地中で生育させた細胞は、異なる形態を示した。KCM4およびDKSFMで培養した細胞は両方ともコロニーで増殖したが、EDGSおよびKGM-CDで培養した細胞はより運動性があり、成長するにつれて、プレートをより均一に覆った(図12A)。KCM4およびKGM-CD培養細胞は、基本的に、DKSFMまたはEDGS培養細胞よりも小さかった。異なる培地中で初代ケラチノサイトを長期培養すると(図12B)、KGM-CDで培養した細胞は最も速く成長したが、集団がわずか26倍に倍加した後に老化した。EDGSで培養された細胞は、わずかに遅い速度で成長し、50倍を超える集団倍加率を達成した。初期の継代では、KCM4およびDKSFM培養細胞は同程度に遅い速度で成長した。DKSFM細胞は21倍に倍加した後に老化したが、KCM4細胞は40倍を超えて倍加し、成長した。種々の培地中で培養したケラチノサイトについて、CFAを行った(図12C~D)。KCM4で培養した細胞は、市販の培地で培養した細胞よりもわずかにCFAが良好であった。DKSFMおよびKGM-CDで培養されたケラチノサイトは、KCM4およびEDGSで培養されたケラチノサイトと比較して、形成したコロニーが少なく、より早

40

50

い時点でコロニー形成能を失った。KCM4で培養したケラチノサイトは、継代後期でより多くのコロニーを形成し、また、EDGSで培養したケラチノサイトと比較して、より大きなコロニーを形成することができた。

【0155】

方法

【0156】

新生仔包皮からの初代ケラチノサイトの単離。包皮は、バンダービルト大学病院のヒト組織協働ネットワーク (Cooperative Human Tissue Network) から購入した。皮下脂肪を各組織から除去した。包皮を、3 mL の TeSR 基本培地に溶解したディスパーゼ (5 mg/mL) 中で、表皮側を下にして4 で約16時間

10

インキュベートした。表皮を真皮から剥がし、2 mL の 0.05% トリプシンと共に37 で5分間インキュベートした。細胞懸濁液をしっかりとピペティングし、細胞を無傷の表皮片から外し、次いで、80 μ m の細胞フィルターに通した。0.5 mg/mL のトリプシン阻害剤でトリプシンを中和した。細胞を1200 rpm で4分間遠心分離した。細胞を以下のようにケラチノサイト培養培地にプレーティングした。図7および8では、新たに単離したケラチノサイトをプレーティングし、P1を通して、10 μ g/mL のインスリンを含むKCM1で培養した。細胞はP1の終わりに凍結した。解凍したら、細胞をKCM1 (10 μ g/mL インスリン) 中で1継代分増殖させ、示した組成の培地に変更した。図9、10および12では、KCM4にVEGFを添加した以外はケラチノサイトの培養に使用したのと同じ培地に播種した。この条件では、P3の開示時にVEGFを

20

【0157】

初代ケラチノサイトの培養。ケラチノサイトを示した培地中で維持し、4~5日ごとに継代した (約80%コンフルエンスの時点で)。継代には、ケラチノサイトを、パーゼンに溶解した0.1%トリプシンと共に、37 で5分間インキュベートした。トリプシンを0.5 mg/mL のトリプシン阻害剤で中和した。細胞を1200 rpm で4分間遠心分離した。セロメーター (Cellometer) (ネクセロム (Nexcelom)) を用いて細胞を計数した。細胞を、示したケラチノサイト培地を入れた6ウェルプレートに、1ウェル当たり25,000~50,000個の密度でプレーティングした。培地を1日おきに交換した。

30

【0158】

初代ケラチノサイトの分化。ケラチノサイトをKCM4中で培養し、80%~90%コンフルエンスに達した時点で、細胞を1.5 mM の Ca^{2+} で3日間処理するか、または固定した (カルシウム無処理対照)。分化マーカーであるK1、ロリクリン、およびフィラグリンの発現をポリクローナルウサギ抗体 (コバンス (Covance)) を用いた免疫細胞化学法によって調べ、細胞を評価した。

【0159】

形態分析。細胞は、培養物の全体的な健康状態、および典型的なケラチノサイトの形態および成長パターンについて視覚的に評価した。

40

【0160】

集団倍加。細胞をおよそ80%のコンフルエンスに達した時点で連続的に継代することにより、老化するまで維持した。各継代の細胞倍加の総数は、以下の式を用いて計算した： $3.32 \log (N / N_0)$ 。N₀は、各継代の開始時にプレートされた細胞の数を示し、Nは、各継代の終了時に回収された細胞の数である。

【0161】

コロニー形成アッセイ (CFA)。細胞を低密度 (6ウェルプレートに1ウェル当たり250細胞の密度) でプレーティングし、8~12日間生育させた。図7および8では、CFAの開始時に、細胞を示した培地からKCM1 (10 μ g/mL インスリン) に切り

50

替えた。ケラチノサイトをKCM1(10 µg/mLインスリン)中で12日間培養し、コロニーサイズを測定した。図9、10および12では、ケラチノサイトを維持するために使用した培地を用いてCFAを実施した。コロニーの成長を支えるには、KCM4に5 µg/mLのインスリンを添加する必要があった。コロニーを8日間生育させ、コロニーサイズを測定した。

【0162】

培養後、プレートを固定し、ヘキストで染色した。イメージエクスプレス高解像度イメージャ(モレキュラー・デバイス)を使い、プレート全体を40倍の倍率で画像化した。イメージ(Image)Jソフトウェアを使用し、1ウェルあたりの総コロニー数を数え、各コロニーのサイズを測定した。コロニー数を棒グラフで示す。ここで、棒の高さは各継代の1ウェル当たりの平均コロニー数を表し、エラーバーは標準偏差を表している。コロニーサイズは箱ひげ図で示しており、ここで、中心線は中央値を表し、箱が四分位範囲を表し、ひげが5~95パーセンタイルを表している。この範囲外のデータは個別にプロットされる。

【0163】

本明細書で開示し、特許請求した方法の全ては、本開示を踏まえれば過度の実験を行うことなく作成および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様の観点から説明してきたが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法に、およびその工程に、またはその工程の順序に、変更を施すことができることは当業者には明らかである。より具体的には、同じまたは同様の結果が達成されるのであれば、本明細書に記載の薬剤を、化学的および生理学的に関連する特定の薬剤と置き換えてもよいと理解される。そのような当業者に明らかな類似した置き換えおよび修正は、添付の特許請求項によって定義されるように、本発明の精神、範囲および概念に含まれると見なされる。

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に示す手法その他の補足となる詳細な例を提供する範囲において、具体的に参照することによって本明細書に組み入れられる。

米国特許第5,030,015号

米国特許第5,145,770号

米国特許第5,298,417号

米国特許第5,843,780号

米国特許第6,548,297号

米国特許第6,833,269号

米国特許公報第2003/0211603号

米国特許公報第2007/0116680号

米国特許公報第2007/0238170号

米国特許公報第2008/0171385号

国際公開第97/37009号

国際公開第98/30679号

国際公開第01/88100号

国際公開第2005/080554号

国際公開第2005/123902号

国際公開第2009/149233号

国際公開第2010/141801号

実践的な取り組み(Practical approach)、1987。

アミットら、発生生物学雑誌(Dev. Bio.)、227:271-278、2000

。

アンドリュースら、『奇形腫および胚性幹細胞(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells)』ロバートソン編、IRL出版、207-246、1987。

- 動物細胞の培養 (Animal Cell Culture)、1987。
 ボリバー・フローレスら、熱傷 (Burns)、16:3-8、1990。
 ボイヤーら、セル (Cell)、122(6):947-956、2005。
 チャンバーズら、セル、113(5):643-655、2003。
 チェンら、ネイチャー・メソッズ、8:424-429、2011。
 動物細胞の培養: 基本操作マニュアル (Culture of Animal Cells) (第3次改訂版)、R.I. フレッシュニー編、ワイリー・リス出版、1994。
 分子生物学の最新手法 (Current Protocols in Molecular Biology) および分子生物学の手短なプロトコール (Short Protocols in Molecular Biology)、1987; 1995。 10
 インビトロ胚性幹細胞分化 (Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro)、1993。
 エバンズら、家畜繁殖学 (Theriogenology)、33:125-129、1990。
 エバンズおよびカウフマン、ネイチャー (Nature)、292:154-156、1981。
 フェルナンデスら、ネイチャー・セル・バイオロジー (Nature Cell Biology)、6:1082-1093、2004。
 ガリコら、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (New Eng. J. Med.)、311:448-451、1984。 20
 遺伝子標的、実践的な手法 (Gene Targeting, A Practical Approach)、1993。
 哺乳類細胞への遺伝子導入ベクター (Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)、ミラー-J およびカロスMP編、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、ニューヨーク、1987。
 マウスの発生における技術ガイド (Guide to Techniques in Mouse Development)、アベルソンJN; サイモンMI; デパムフィRL編、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、1993。
 ハイテンら、米国皮膚科学会誌 (J. Am. Acad. Dermatol.)、14:399-405、1986。 30
 オシェロー・デレヴィエおよびペロー、レプロダクション・ネイチャー・ディベロップメント (Reprod. Nutr. Dev.)、33:475-493、1993。
 ホーガンら、マウス胚の操作; 実験の手引き (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual)、遺伝子と発生 (Genes Dev.)、9:1559-1678、1994。
 医薬品研究におけるインビトロ法 (In vitro Methods in Pharmaceutical Research)、J.V. カステルおよびM.J. ゴメス・レチョン編、アカデミック出版、1997。
 ジェインチルら、ウイルス学雑誌 (J. Virol.)、4(5):549-553、1969。 40
 カワサキら、間質細胞誘導活性によるES細胞からの中脳ドーパミン作動性ニューロンの誘導 (Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity)、ニューロン (Neuron)、28:31-40、2000。
 ケラーら、細胞生物学の最新の知見 (Curr. Opin. Cell Biol.)、7(6):862-9、1995。
 クリマンスカヤら、ランセット (Lancet)、365(9471):1636-41、2005。 50

コダマら、細胞生理学雑誌 (J . C e l l . P h y s i o l .) 、 1 1 2 (1) : 8 9 - 9 5 、 1 9 8 2 。

クズヤら、動脈硬化症と血栓症と血管生物学 (A r t e r i o s c l . T h r o m b . V a s c u l a r B i o l .) 、 2 1 : 7 6 5 、 2 0 0 1 。

リアンら、Srcファミリーキナーゼの低分子阻害剤はヒト多能性幹細胞の単層上皮分化を促進する (A S m a l l M o l e c u l e I n h i b i t o r o f S r c F a m i l y K i n a s e s P r o m o t e s S i m p l e E p i t h e l i a l D i f f e r e n t i a t i o n o f H u m a n P l u r i p o t e n t S t e m C e l l s) 、 P r o S W a n (P L O S O N E) 、 8 : e 6 0 0 1 6 、 2 0 1 3 。

10

ラドヴィグら、ネイチャー・バイオテクノロジー (N a t . B i o t e c h n o l .) 、 2 4 (2) : 1 8 5 - 1 8 7 、 2 0 0 6 b 。

ラドヴィグら、ネイチャー・メソッズ (N a t . M e t h o d s) 、 3 (8) : 6 3 7 - 4 6 、 2 0 0 6 a 。

マーティン、米国科学アカデミー紀要 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A) 、 7 8 (1 2) : 7 6 3 4 - 8 、 1 9 8 1 。

メタロら、ヒト胚性幹細胞由来ケラチノサイトは、改変した組織構築物内では上皮転写プログラムを示し、上皮になる (H u m a n E m b r y o n i c S t e m C e l l - D e r i v e d K e r a t i n o c y t e s E x h i b i t a n E p i d e r m a l T r a n s c r i p t i o n P r o g r a m a n d U n d e r g o E p i t h e l i a l M o r p h o g e n e s i s i n E n g i n e e r e d T i s s u e C o n s t r u c t s) 、 組 織 工 学 (T i s s u e E n g .) パートA、16 : 2 1 3 - 2 2 3 、 2 0 1 0 。

20

ムーアおよびピエドラヒタ、動物のインビトロ細胞生物学 (I n V i t r o C e l l B i o l . A n i m .) 、 3 3 : 6 2 - 7 1 、 1 9 9 7 。

ムーアおよびピエドラヒタ、分子生殖発生学 (M o l . R e p r o d . D e v .) 、 4 5 : 1 3 9 - 1 4 4 、 1 9 9 6 。

ナカノら、異なる前駆体からの未分化型および高分化型赤血球のインビトロでの発達 (I n V i t r o D e v e l o p m e n t o f P r i m i t i v e a n d D e f i n i t i v e E r y t h r o c y t e s f r o m D i f f e r e n t P r e c u r s o r s) 、 サイエンス、272 : 7 2 2 - 7 2 4 、 1 9 9 6 。

30

フィリップスら、米国皮膚科学会誌 (J . A m . A c a d . D e r m .) 、 2 1 : 1 9 1 、 1 9 8 9 。

ピエドラヒタら、家畜繁殖学 (T h e r i o g e n o l o g y) 、 3 4 : 8 7 9 - 9 0 1 、 1 9 9 0 。

ピエドラヒタら、生物学的生殖学 (B i o l . R e p r o d .) 、 5 8 : 1 3 2 1 - 1 3 2 9 、 1 9 9 8 。

ラスジェンら、胚性幹細胞の特徴と用途 (P r o p e r t i e s a n d u s e s o f E m b r y o n i c S t e m C e l l s) : ヒト生物学および遺伝子治療への応用に関する意見 (P r o s p e c t s f o r A p p l i c a t i o n t o H u m a n B i o l o g y a n d G e n e T h e r a p y) 、 生殖・繁殖発生学 (R e p r o d . F e r t i l . D e v .) 、 1 0 : 3 1 - 4 7 、 1 9 9 8 。

40

ルビノフら、ネイチャー・バイオテクノロジー (N a t . B i o t e c h n o l .) 、 1 8 : 3 9 9 - 4 0 4 、 2 0 0 0 。

レインワルドおよびグリーン、セル、6 : 3 3 1 - 3 4 3 、 1 9 7 5 。

スミス、『マウス胚性幹細胞の由来と特性』、細胞および発生生物学年次報告 (A n n u . R e v . C e l l . D e v . B i o l .) 、 2 0 0 0 。

ストロジェックら、家畜繁殖学 (T h e r i o g e n o l o g y) 、 3 3 : 9 0 1 - 9 0 3 、 1 9 9 0 。

タカハシら、生物化学雑誌 (J . B i o l . C h e m .) 、 2 7 8 : 1 8 6 6 4 - 1 8 6 7 0 、 2 0 0 3 。

タカハシら、セル (C e l l) 、 1 2 6 (4) : 6 6 3 ~ 7 6 、 2 0 0 7 。

タカハシら、セル (C e l l) 、 1 3 1 : 8 6 1 ~ 8 7 2 、 2 0 0 7 。

50

タカハシおよびヤマナカ、セル(Cell)、126:663~676、2006
 トムソンら、米国科学アカデミー紀要(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、92:7844-7848、1995。
 トムソンら、サイエンス(Science) 282:1145、1998。
 トムソンおよびマーシャル、発生生物学の最新のトピック(Curr. Top. Dev. Biol.)、38:133-165、1998。
 トムソンおよびオドリコ、生物工学のトレンド(J. Trends. Biotechnol.)、18:53-57、2000。
 ワタナベら、ネイチャー・ニューロサイエンス(Nature Neurosci.)、8(3):288-296、2005。
 ウィーラー、保護および増殖発生学(Reprod. Pert. Dev.)、6:563-568、1994。
 ワイナーら、生物学的生殖学(Biol. Reprod.)、57:756-764、1997。
 シュウら、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nat. Biotechnol.)、19:971-974、2001。
 ヤングおよびアンダーソン、家畜繁殖学(Theriogenology)、38:315-335、1992。
 インら、セル(Cell)、115:281-292、2003。
 ユウら、サイエンス(Science)、318:1917~1920、2007
 ユウら、サイエンス(Science)、324(5928):797~801、2009
 ユウおよびトムソン、遺伝子と発生(Genes Dev.)、22(15):1987~97、2008

10

20

【図1】

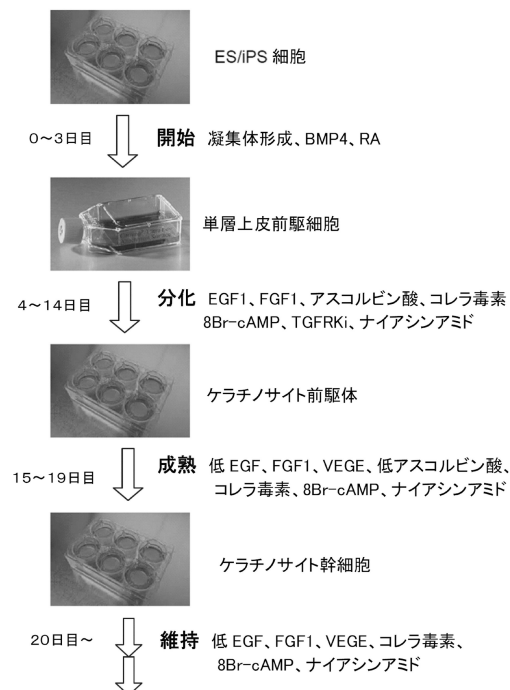


図1

【図2A】

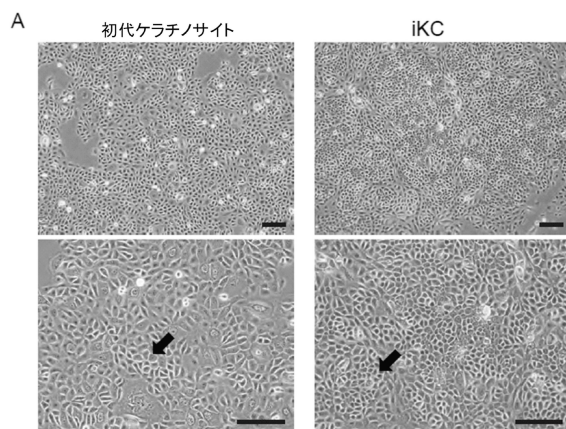


図2A

【図 2 B】

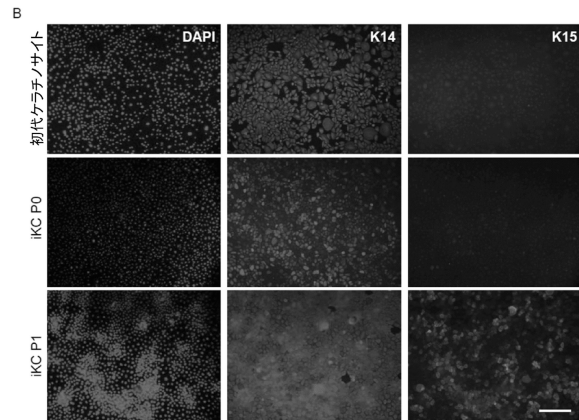


図2B

【図 3 B】

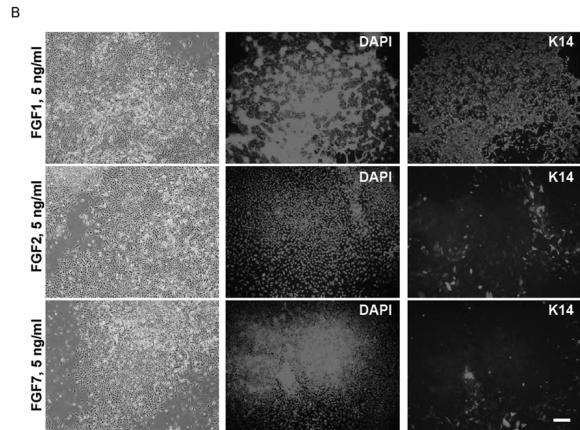


図3B

【図 3 A】

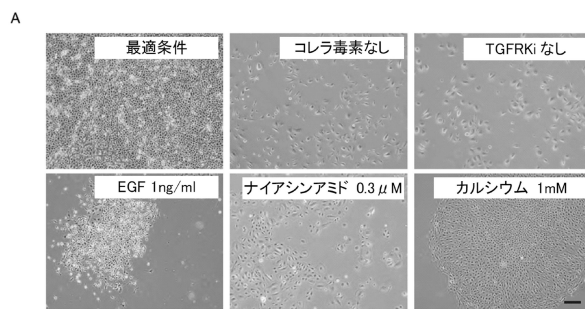


図3A

【図 4】

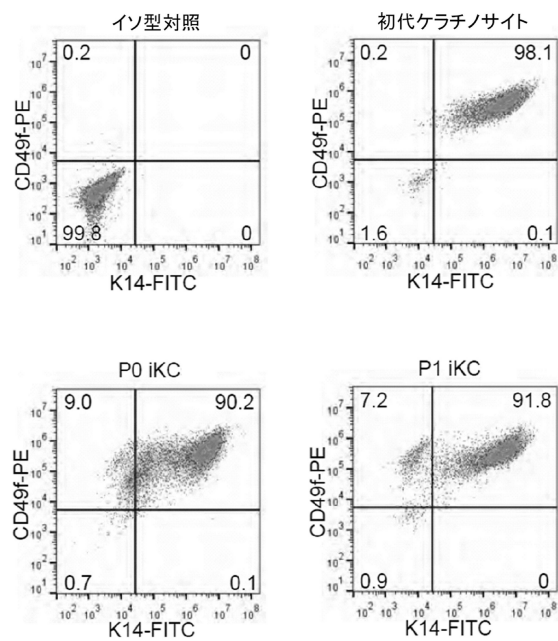


図4

【図 5】

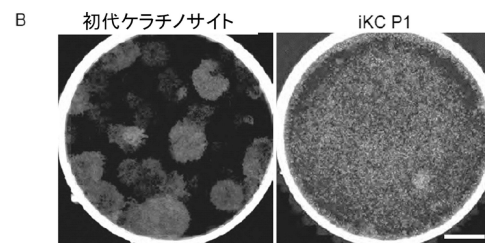
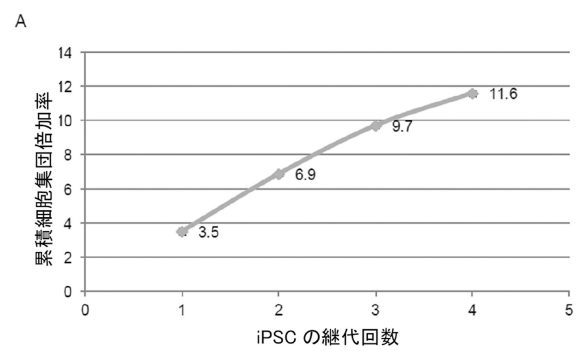


図5A, B

【図 6】

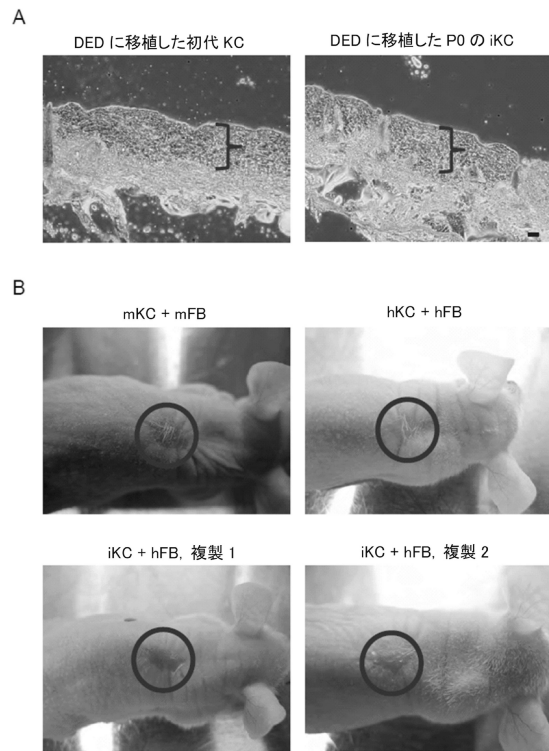


図6A, B

【図 7 A】

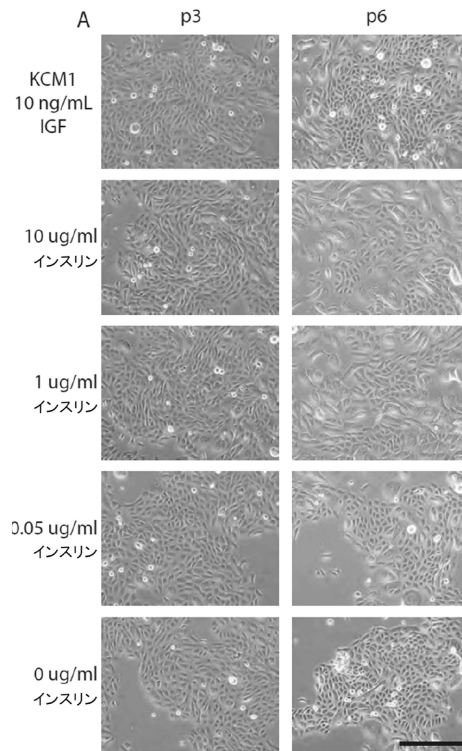


図7A

【図 7 B - C】

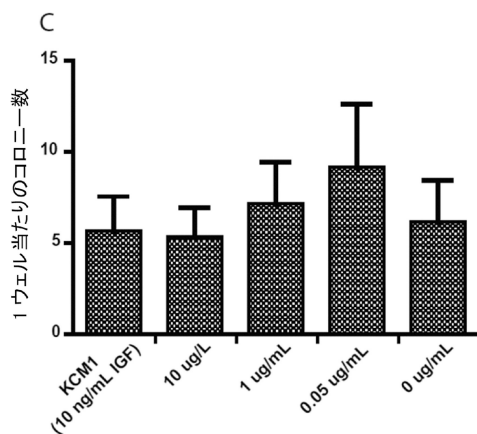
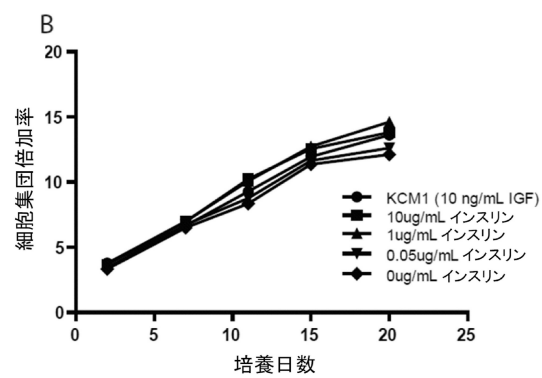


図 7 B, C

【図 7 D】

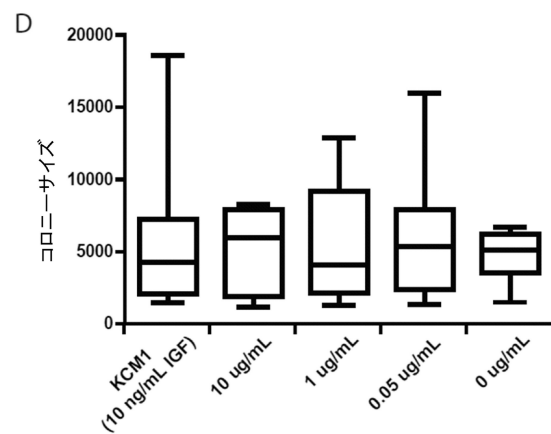
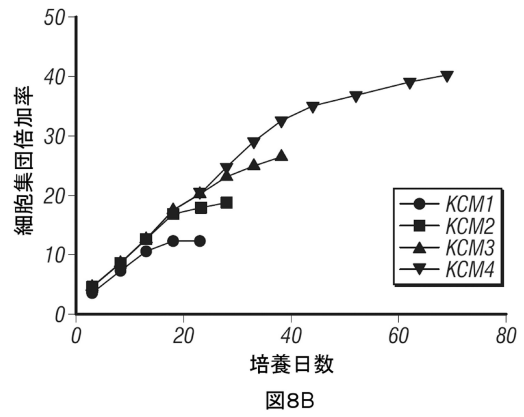


図7D

【 図 8 B 】



【 図 8 D 】

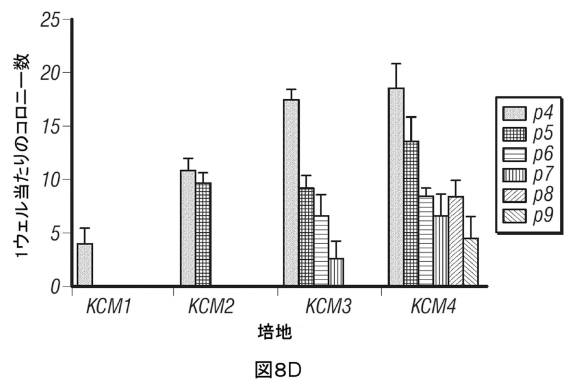
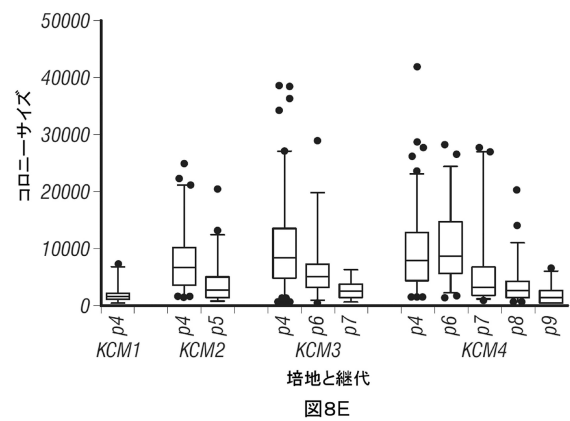


図8C



【図 9 A】

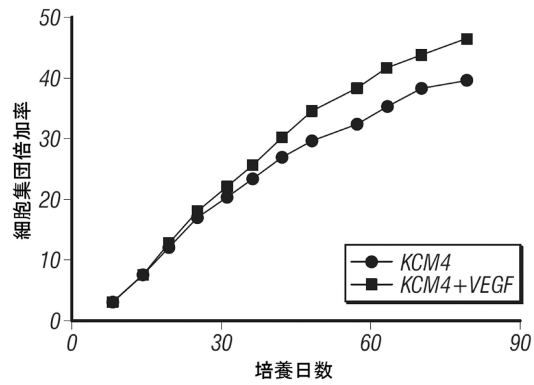


図9A

【図 9 C】

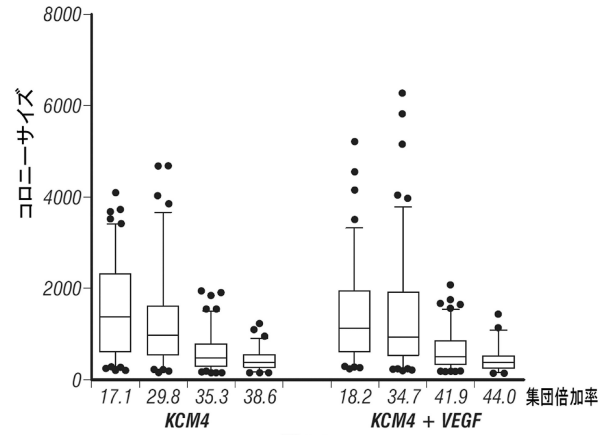


図9C

【図 9 B】

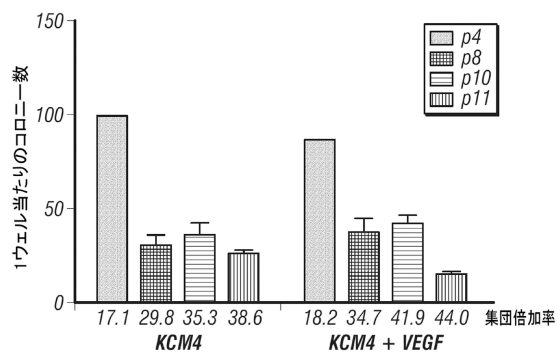


図9B

【図 10 A】

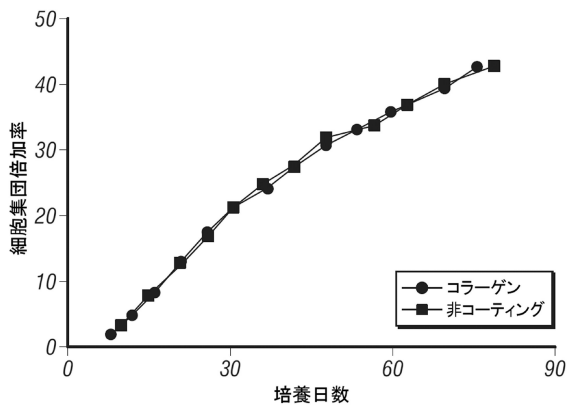


図10A

【図 10 C】

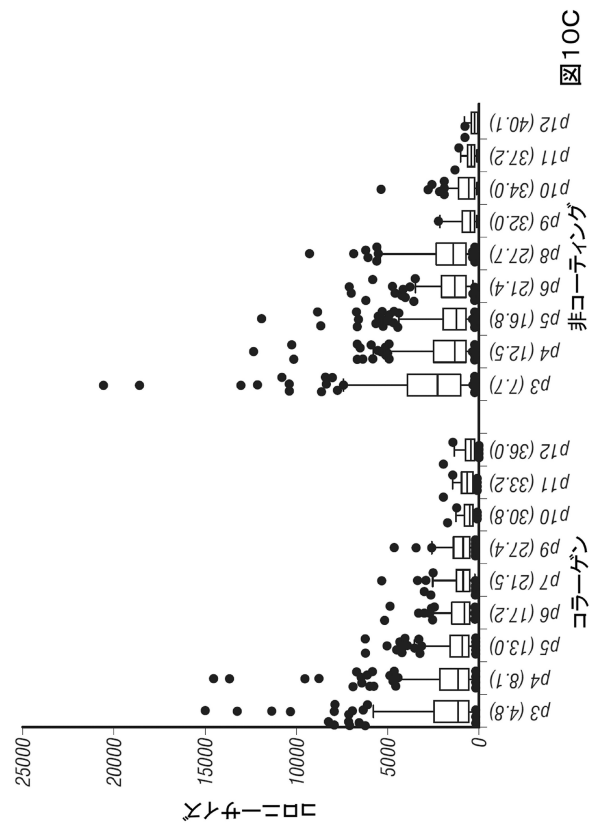


図10C

【図 10 B】

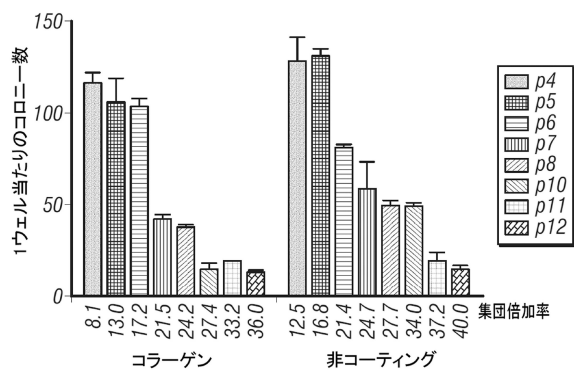


図10B

【図 1 1】

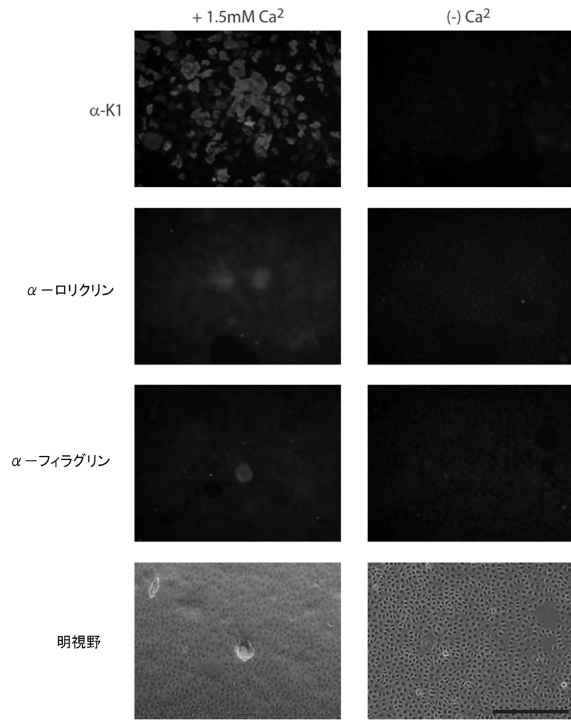


図 11

【図 1 2 A】

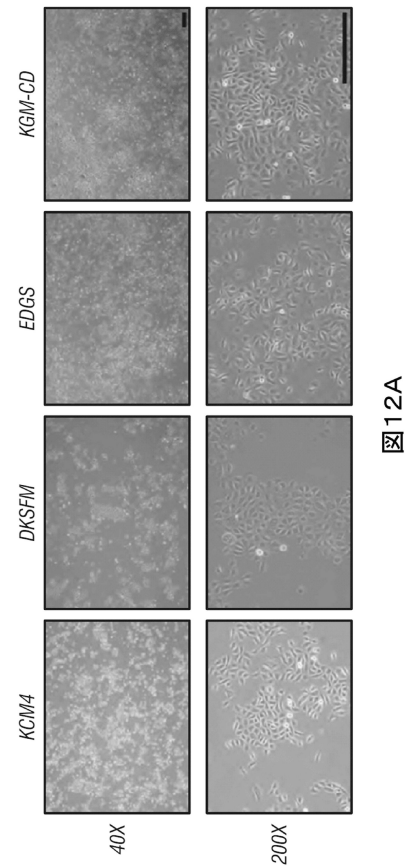


図 12A

【図 1 2 B】

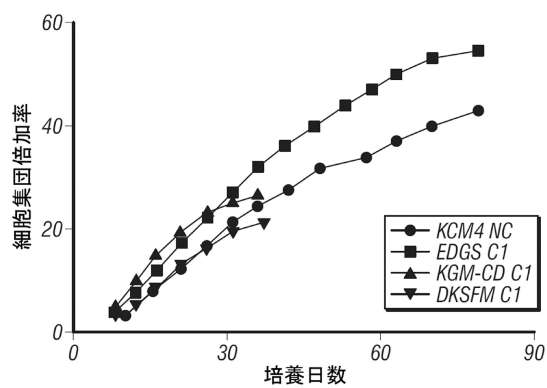


図 12B

【図 1 2 D】

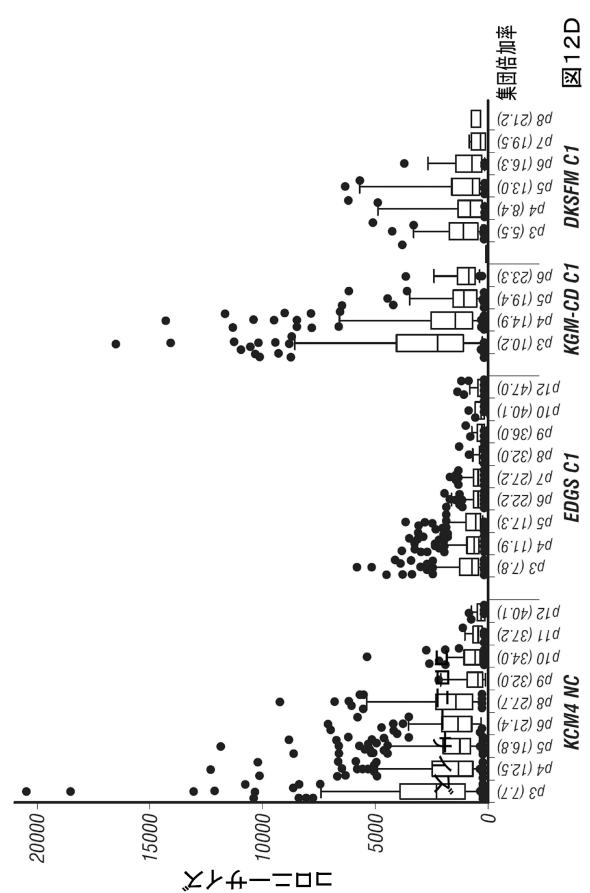


図 12D

【図 1 2 C】

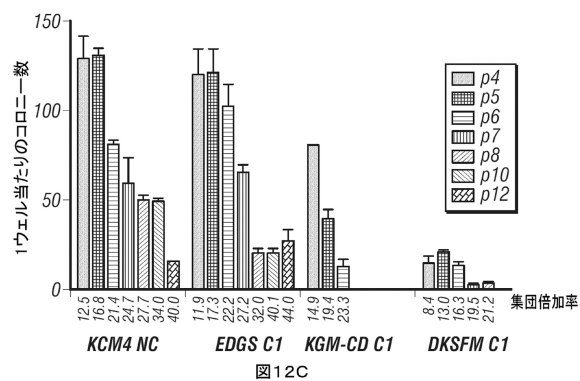


図 12C

フロントページの続き

- (72)発明者 チャン イン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53715 マディソン サウス ヒル ドライヴ 4095
- (72)発明者 ハームズ リサ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン コーチマン プレイス 5466

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 国際公開第2010/134619(WO, A1)
Stem Cells, 2008年, Vol.26, p.372-380
Differentiation, 2004年, Vol.72, p.387-395

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 1/00 - 7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)