

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504311

(P2017-504311A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/071 (2010.01)
A 61 K 35/545 (2015.01)
A 61 K 35/30 (2015.01)
A 61 P 27/02 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/071
A 61 K 35/545
A 61 K 35/30
A 61 P 27/02

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5
4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2016-538000 (P2016-538000)
(86) (22) 出願日 平成26年12月8日 (2014.12.8)
(85) 翻訳文提出日 平成28年8月3日 (2016.8.3)
(86) 國際出願番号 PCT/IB2014/066703
(87) 國際公開番号 WO2015/087231
(87) 國際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
(31) 優先権主張番号 61/914,445
(32) 優先日 平成25年12月11日 (2013.12.11)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 597014501
ファイザー・リミテッド
P f i z e r L i m i t e d
イギリス国ケント州サンドウェイッチ, ラム
ズゲイト・ロード (番地なし)
R a m s g a t e R o a d, S a n d
w i c h, K e n t, E n g l a n d
(74) 代理人 100133927
弁理士 四本 能尚
(74) 代理人 100137040
弁理士 宮澤 純子
(74) 代理人 100147186
弁理士 佐藤 真紀
(74) 代理人 100174447
弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】網膜色素上皮細胞を生成する方法

(57) 【要約】

本発明は、網膜色素上皮細胞を生成する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 多能性細胞を第1のSMA-D阻害剤および第2のSMA-D阻害剤の存在下で培養するステップと、

(b) ステップ(a)の細胞を、BMP経路活性化剤の存在下ならびに第1および第2のSMA-D阻害剤の非存在下で培養するステップと、

(c) ステップ(b)の細胞を再播種するステップと
を含む、網膜色素上皮(RPE)細胞を生成する方法。

【請求項 2】

ステップ(a)において、細胞を単層として培養する、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

ステップ(b)において、細胞を単層として培養する、請求項1または2に記載の方法。
。

【請求項 4】

ステップ(a)において、細胞を懸濁培養で培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ(b)において、細胞を懸濁培養で培養する、請求項1、2または4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

多能性細胞が胚性幹細胞または人工多能性幹細胞から選択される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 7】

多能性細胞がヒト細胞である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

多能性細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

多能性細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

多能性細胞を、ヒト胚の破壊を必要としない手段によって得る、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 11】

第1のSMA-D阻害剤がBMP1型受容体ALK2の阻害剤である、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

第1のSMA-D阻害剤がBMP1型受容体ALK2およびALK3の阻害剤である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

第1のSMA-D阻害剤が、Smad1、Smad5および/またはSmad8のリン酸化を妨げる、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 14】

第1のSMA-D阻害剤がドルソモルフィン誘導体である、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

第1のSMA-D阻害剤が、ドルソモルフィン、ノギン、またはコーディンから選択される、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

第1のSMA-D阻害剤が、4-(6-(4-(ピペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル)キノリン(LDN193189)、またはその塩もしくは水和物である、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 17】

ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度が0.5nM~10μMである、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度が500nM~2μMである、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度が約1μMである、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

第2のSMA-D阻害剤がALK5の阻害剤である、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

第2のSMA-D阻害剤がALK5およびALK4の阻害剤である、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

第2のSMA-D阻害剤がALK5およびALK4およびALK7の阻害剤である、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

第2のSMA-D阻害剤が、
20

4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド；

2-メチル-5-(6-(m-トリル)-1H-イミダゾ[1,2-a]イミダゾール-5-イル)-2H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール；

2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン；

2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン；

4-(2-(6-メチルピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)フェノール；
30

2-(4-メチル-1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)チエノ[3,2-c]ピリジン；

4-(5-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ピラゾール-3-イル)ベンズアミド；

2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-N-(ピリジン-4-イル)ブテリジン-4-アミン；

6-メチル-2-フェニルチエノ[2,3-d]ピリミジン-4(3H)-オン；

3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド(A 83-01)；2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン(SB-505124)；
40

7-(2-モルホリノエトキシ)-4-(2-(ピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン(LY2109761)；

4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン(LY364947)；もしくは

4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド(SB-431542)

またはその塩もしくは水和物から選択される、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

第2のS M A D 阻害剤が4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド(S B-431542)である、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度が0.5nM~100μMである、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度が1μM~50μMである、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度が約10μMである、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

ステップ(a)において、多能性細胞を少なくとも1日間培養する、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

ステップ(a)において、多能性細胞を少なくとも2日間培養する、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

ステップ(a)において、多能性細胞を2~10日間培養する、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

ステップ(a)において、多能性細胞を3~5日間培養する、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

ステップ(a)において、多能性細胞を約4日間培養する、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

ステップ(a)の前に、細胞を単層として少なくとも細胞1000個/cm²の初期密度で培養する、請求項1から32のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 4】

ステップ(a)の前に、細胞を単層として細胞100000~500000個/cm²の初期密度で培養する、請求項1から33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

BMP経路活性化剤がBMPを含む、請求項1から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

BMP経路活性化剤が、BMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15から選択されるBMPを含む、請求項1から35のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 7】

BMP経路活性化剤がBMPホモ二量体である、請求項1から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

BMP経路活性化剤がBMPヘテロ二量体である、請求項1から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

BMP経路活性化剤が、BMP2/6ヘテロ二量体、BMP4/7ヘテロ二量体、またはBMP3/8ヘテロ二量体である、請求項1から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

50

BMP 経路活性化剤が BMP 4 / 7 ヘテロ二量体である、請求項 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

ステップ (b) において、BMP 経路活性化剤の濃度が 1 ng / mL ~ 10 µg / mL である、請求項 1 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

ステップ (b) において、BMP 経路活性化剤の濃度が 50 ng / mL ~ 500 ng / mL である、請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

ステップ (b) において、BMP 経路活性化剤の濃度が約 100 ng / mL である、請求項 1 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 4 4】

ステップ (b) において、前記細胞を少なくとも 1 日間培養する、請求項 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

ステップ (b) において、前記細胞を 2 日間 ~ 20 日間培養する、請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

ステップ (b) において、前記細胞を約 3 日間培養する、請求項 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 4 7】

ステップ (c) において、前記細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

ステップ (c) において、前記細胞を細胞 100000 ~ 1000000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 1 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

ステップ (c) において、前記細胞を細胞約 500000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 1 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

ステップ (c) において、前記細胞を Matrigel (登録商標)、フィプロネクチン、または Cellstart (登録商標) 上に再播種する、請求項 1 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 5 1】

(d) ステップ (c) の再播種した細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で培養するステップと、

(e) ステップ (d) の細胞を再播種するステップと、

(f) ステップ (e) の再播種した細胞を培養するステップとをさらに含む、請求項 1 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

ステップ (d) において、細胞を少なくとも 1 日間培養する、請求項 5 1 に記載の方法。 40

【請求項 5 3】

ステップ (d) において、細胞を少なくとも 3 日間培養する、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ステップ (d) において、細胞を 3 ~ 20 日間培養する、請求項 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

ステップ (d) において、アクチビン経路活性化剤の濃度が 1 ng / mL ~ 10 µg /

50

mLである、請求項51から54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤の濃度が約100ng/mLである、請求項51から55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤がアクチビンAである、請求項51から56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

ステップ(d)において、細胞をcAMPの存在下で培養する、請求項51から57のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項59】

ステップ(d)において、cAMPの濃度が約0.5mMである、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞1000個/cm²の密度で再播種する、請求項51から59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

ステップ(e)において、前記細胞を細胞20000~50000個/cm²の密度で再播種する、請求項51から60のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項62】

ステップ(e)において、前記細胞を細胞約20000個/cm²の密度で再播種する、請求項51から61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項63】

ステップ(e)において、前記細胞をMatrigel(登録商標)、フィブロネクチン、またはCellstart(登録商標)上に再播種する、請求項51から62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

ステップ(f)において、細胞を少なくとも5日間培養する、請求項51から63のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項65】

ステップ(f)において、細胞を少なくとも14日間培養する、請求項51から64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

ステップ(f)において、細胞を10~35日間培養する、請求項51から65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

ステップ(f)において、細胞を約28日間培養する、請求項51から66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

ステップ(f)において、細胞をcAMPの存在下で培養する、請求項51から67のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項69】

ステップ(f)において、cAMPの濃度が約0.5mMである、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

ステップ(b)は、細胞をBMP経路活性化剤の存在下で培養した後、細胞を少なくとも10日間、BMP経路活性化剤の非存在下で培養することをさらに含み、

ステップ(c)は、敷石状の形態を有するステップ(b)の細胞を再播種することを含み、前記方法は、

(d)ステップ(c)の再播種した細胞を培養するステップ

50

をさらに含む、請求項 1 から 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

ステップ(b)において、細胞を少なくとも 20 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

ステップ(b)において、細胞を 30 ~ 50 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する、請求項 7 0 または 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

ステップ(b)において、細胞を約 40 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する、請求項 7 0 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7 4】

ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 7 0 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

ステップ(c)において、細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 7 0 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7 6】

ステップ(c)において、細胞を細胞約 200000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 7 0 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

ステップ(c)において、前記細胞を Matrigel (登録商標)、フィブロネクチン、または Cellstart (登録商標) 上に再播種する、請求項 7 0 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

ステップ(d)において、細胞を少なくとも 5 日間培養する、請求項 7 0 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

ステップ(d)において、細胞を 10 ~ 40 日間培養する、請求項 7 0 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8 0】

ステップ(d)において、細胞を約 14 日間培養する、請求項 7 0 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

ステップ(d)において、細胞を cAMP の存在下で培養する、請求項 7 0 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

ステップ(d)において、cAMP の濃度が約 0.5 mM である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

以下の追加のステップ：

40

(e) ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、

(f) ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップと

をさらに含む、請求項 7 0 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

ステップ(e)において、細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

50

ステップ(e)において、細胞を細胞約 2 0 0 0 0 0 個 / cm^2 の密度で再播種する、請求項 8 3 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

ステップ(e)において、前記細胞を M a t r i g e l (登録商標)、フィブロネクチン、または C e l l s t a r t (登録商標) 上に再播種する、請求項 7 0 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

ステップ(f)において、細胞を少なくとも 1 0 日間培養する、請求項 7 0 から 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

ステップ(f)において、細胞を 1 5 ~ 4 0 日間培養する、請求項 7 0 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

ステップ(f)において、細胞を約 2 8 日間培養する、請求項 7 0 から 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

R P E 細胞を回収するステップをさらに含む、請求項 1 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

R P E 細胞を精製するステップをさらに含む、請求項 1 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

蛍光活性化細胞選別(F A C S)または磁気活性化細胞選別(M A C S)によって R P E 細胞を精製するステップをさらに含む、請求項 1 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

。

【請求項 9 4】

前記 R P E 細胞を精製するステップが、
- 細胞を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗 C D 5 9 抗体と接触させるステップと、
- F A C S を使用して、抗 C D 5 9 抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記 R P E 細胞を精製するステップが、
- 細胞を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗 C D 5 9 抗体と接触させるステップと、
- M A C S を使用して、抗 C D 5 9 抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 6】

すべてのステップにおいて、細胞を単層として培養する、請求項 1 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 7】

- R P E 細胞を再播種することと、
- 再播種した R P E 細胞を培養することと
を含む方法によって R P E 細胞を拡大する、請求項 1 から 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

細胞を細胞 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 個 / cm^2 の密度で再播種する、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

細胞を細胞 1 0 0 0 0 ~ 3 0 0 0 0 個 / cm^2 の密度で再播種する、請求項 9 7 または 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

10

20

30

40

50

細胞を細胞約20000個/cm²の密度で再播種する、請求項97から99のいずれか一項に記載の方法。

【請求項101】

細胞をMatrikel(登録商標)、フィブロネクチン、またはCellstart(登録商標)上に再播種する、請求項97から100のいずれか一項に記載の方法。

【請求項102】

細胞を少なくとも7日間、少なくとも14日間、少なくとも28日間、または少なくとも42日間培養する、請求項97から101のいずれか一項に記載の方法。

【請求項103】

細胞を約49日間培養する、請求項97から102のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項104】

細胞をSMADE阻害剤、cAMPまたはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養する、請求項97から103のいずれか一項に記載の方法。

【請求項105】

前記薬剤が、アデニルシクラーゼ活性化剤、好ましくはフォルスコリン、またはホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤、好ましくはPDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE7、PDE8、PDE10および/もしくはPDE11阻害剤から選択される、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

前記細胞をcAMPの存在下で培養する、請求項104または105に記載の方法。

20

【請求項107】

cAMPの濃度が0.01mM~1Mである、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

cAMPの濃度が約0.5mMである、請求項106または107に記載の方法。

【請求項109】

(a) RPE細胞を少なくとも細胞1000個/cm²の密度で播種するステップと、
(b) 前記RPE細胞を、SMADE阻害剤、cAMP、またはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養するステップと
を含む、RPE細胞を拡大する方法。

【請求項110】

ステップ(a)において、細胞を細胞5000~10000個/cm²の密度で播種する、請求項109に記載の方法。

30

【請求項111】

ステップ(a)において、細胞を細胞約2000個/cm²の密度で播種する、請求項109または110に記載の方法。

【請求項112】

ステップ(a)において、細胞をMatrikel(登録商標)、フィブロネクチン、またはCellstart(登録商標)上に播種する、請求項109から111のいずれか一項に記載の方法。

【請求項113】

ステップ(b)において、細胞を少なくとも7日間、少なくとも14日間、少なくとも28日間、または少なくとも42日間培養する、請求項109から112のいずれか一項に記載の方法。

【請求項114】

ステップ(b)において、細胞を約49日間培養する、請求項109から113のいずれか一項に記載の方法。

【請求項115】

前記薬剤が、アデニルシクラーゼ活性化剤、好ましくはフォルスコリン、またはホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤、好ましくはPDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE7、PDE8、PDE10および/もしくはPDE11阻害剤から選択される、

40

50

請求項 109 から 114 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 116】

ステップ (b) において、細胞を cAMP の存在下で培養する、請求項 109 から 114 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 117】

cAMP の濃度が 0.01 mM ~ 1 M である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

cAMP の濃度が約 0.5 mM である、請求項 116 または 117 に記載の方法。

【請求項 119】

ステップ (b) において、細胞を SMAD 阻害剤の存在下で培養する、請求項 109 から 114 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 120】

SMAD 阻害剤が、2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン、6-(1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)キナゾリン-4(3H)-オン、または 4-メトキシ-6-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)キノリンである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

生成された RPE 細胞が敷石状の形態を有しており、色素性であり、以下の RPE マーカー、MITF、PMEL17、CRALBP、MERTK、BEST1 および ZO-1 のうちの少なくとも 1 つを発現する、請求項 1 から 120 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 122】

生成された RPE 細胞が VEGF および PEDF を分泌する、請求項 1 から 121 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

すべてのステップを、異種成分を含まない条件下で実施する、請求項 1 から 122 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 124】

請求項 1 から 123 のいずれか一項に記載の方法によって得られた RPE 細胞。

【請求項 125】

請求項 1 から 123 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる RPE 細胞。

。

【請求項 126】

請求項 124 または 125 に記載の RPE 細胞を含む医薬組成物。

【請求項 127】

請求項 124 もしくは 125 に記載の RPE 細胞または請求項 126 に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、前記対象において網膜疾患を処置する方法。

【請求項 128】

a) 多能性細胞の集団を提供するステップと、
b) 多能性細胞の RPE 細胞への分化を誘導するステップと、
c) 細胞集団を、CD59 を発現する細胞について濃縮するステップと
を含む、RPE 細胞を生成する方法。 40

【請求項 129】

ステップ c) が、
- 細胞を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗 CD59 抗体と接触させるステップと、
- FACS を使用して、抗 CD59 抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、請求項 128 に記載の方法。

【請求項 130】

ステップ c) が、
- 細胞を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗 CD59 抗体と接触させるステップと、 50

- M A C S を使用して、抗 C D 5 9 抗体と結合する細胞を選択するステップとを含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

a) R P E 細胞および非 R P E 細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
b) 細胞集団を、 C D 5 9 を発現する細胞について濃縮することによって、細胞集団中の R P E 細胞のパーセンテージを増加させるステップと
を含む、 R P E 細胞を精製する方法。

【請求項 1 3 2】

ステップ b) が、
- 細胞集団を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗 C D 5 9 抗体と接触させるステップと、
- F A C S を使用して、抗 C D 5 9 抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

ステップ b) が、
- 細胞集団を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗 C D 5 9 抗体と接触させるステップと、
- M A C S を使用して、抗 C D 5 9 抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

非 R P E 細胞が多能性細胞または R P E 前駆体である、請求項 1 3 1 から 1 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、多能性細胞から網膜色素上皮 (R P E) 細胞を生成する方法に関する。また、本発明は、そのような方法によって得られたまたは得ることができる細胞、ならびに網膜疾患の処置におけるその使用にも関する。また、本発明は、 R P E 細胞を拡大するためのプロセスにも関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

網膜色素上皮とは、下にある脈絡膜 (網膜の後ろにある血管の層) と上にある網膜視細胞 (たとえば、光受容器、桿体、および錐体) との間の神経感覚網膜の外にある色素細胞層である。網膜色素上皮は、光受容器および網膜の機能および健康にとって重大である。網膜色素上皮は、光色素を再循環させること、ビタミン A を送達、代謝、および保管すること、桿体光受容器外節を貪食すること、鉄および低分子を網膜と脈絡膜との間で輸送すること、ブルッフ膜を維持すること、ならびに迷光を吸収してより良好な画像解像度を可能にすることによって、光受容器の機能を維持する。網膜色素上皮の変性は、脈絡膜欠如、糖尿病性網膜症、黄斑変性症 (加齢黄斑変性症が含まれる) 、網膜色素変性症、およびスタルガルト病などの、光受容器の損傷および盲目をもたらすいくつかの視力を変化させる病気に関連づけられている網膜剥離、網膜異形成、または網膜萎縮を引き起こす場合がある。

【0 0 0 3】

そのような疾患の潜在的な処置は、 R P E 細胞を、疾患を患っている者の網膜内に移植することである。網膜色素上皮細胞を移植することによってそれを補充することで、変性が遅延、停止、または逆転される、網膜の機能が改善される、およびそのような状態から生じる盲目が予防される場合があると考えられている。動物モデルにおいて、光受容器の救出および視覚的機能の維持を R P E 細胞の網膜下移植によって達成できることが実証されている (たとえば、 C o f f e y , P J ら、 N a t . N e u r o s c i . 、 2 0 0 2 : 5 、 5 3 ~ 5 6 、 S a u v e , Y ら、 N e u r o s c i e n c e 、 2 0 0 2 : 1 1 4 、 3 8 9 ~ 4 0 1 を参照) 。したがって、網膜疾患の処置のための細胞移植の供給源として、

10

20

30

40

50

RPE細胞を、たとえば多能性細胞から生成する方法を見つけることに高い興味が持たれている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

マウスおよび非ヒト霊長類の胚性幹細胞の、RPE細胞へと分化する潜在性、ならびに移植後に生存して網膜変性症を減弱させる潜在性が実証されている。ヒト胚性幹細胞のRPE細胞への自発的分化が示されている（たとえばWO2005/070011を参照）。しかし、そのようなプロセスの効率および再現性は低かった。したがって、良好に制御されており、再現性があり、効率的であり、ならびに／またはスケールアップに適しており、薬物スクリーニング、疾患モデリングおよび／または治療的使用のためにRPE細胞を生成することに適している、RPE細胞を生成する方法の必要性が存在する。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明はRPE細胞を生成する方法に関する。これらの方法は、ヒト胚性幹細胞（hESC）などの多能性細胞の頑強かつ再現性がある分化を提供してRPE細胞を生じさせることが実証されている。さらに、本明細書中に提供する方法は容易にスケールアップ可能であり、高収率のRPE細胞を与える。本明細書中に開示する方法は、たとえば、それだけには限定されないが、異種成分を含まない条件下でhESCなどの多能性細胞を再現性よくかつ効率的にRPE細胞へと分化させるために使用することができる。

20

【0006】

RPE細胞を生成する方法を本明細書中に提供する。一部の実施形態では、方法は、
(a)多能性細胞を第1のSMAD阻害剤および第2のSMAD阻害剤の存在下で培養するステップと、
(b)ステップ(a)の細胞を、骨形成タンパク質（BMP）経路活性化剤の存在下ならびに第1および第2のSMAD阻害剤の非存在下で培養するステップと、
(c)ステップ(b)の細胞を再播種するステップとを含む。

【0007】

前記方法の一部の実施形態では、方法は、
(d)ステップ(c)の再播種した細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で培養するステップと、
(e)ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、
(f)ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップとをさらに含む。

30

【0008】

前記方法の別の実施形態では、
ステップ(b)は、細胞をBMP経路活性化剤の存在下で培養した後、細胞を少なくとも10日間、BMP経路活性化剤の非存在下で培養することをさらに含み、
ステップ(c)は、敷石状の形態を有するステップ(b)の細胞を再播種することを含み、前記方法は、
(d)ステップ(c)の再播種した細胞を培養するステップとをさらに含む。

40

【0009】

また、RPE細胞を拡大する方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、
(a)RPE細胞を細胞1000～100000個/cm²の密度で播種するステップと、
(b)前記RPE細胞を、SMAD阻害剤、cAMP、またはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養するステップとを含む。

50

【0010】

また、

a) RPE細胞および非RPE細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
b) 細胞集団を、CD59を発現する細胞について濃縮することによって、細胞集団中のRPE細胞のパーセンテージを増加させるステップと
を含む、RPE細胞を精製する方法も提供する。

【0011】

また、本明細書中に開示する方法によって得られたまたは得ることができるRPE細胞も提供する。

【0012】

また、医薬組成物も提供する。医薬組成物は、網膜疾患を患っている対象の眼内への移植に適したRPE細胞を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、RPE細胞を支持するのに適した構造を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は多孔性膜およびRPE細胞を含む。一部の実施形態では、膜の孔は直径が約0.2μm～約0.5μmであり、孔の密度は約1×10⁷～約3×10⁸個の孔/cm²である。一部の実施形態では、RPE細胞を支持したコーティングで膜の片側をコーティングする。一部の実施形態では、コーティングは糖タンパク質を含み、好ましくはラミニンまたはビトロネクチンから選択される。一部の実施形態では、コーティングはビトロネクチンを含む。一部の実施形態では、膜はポリエステル製である。

【0013】

また、対象において網膜疾患を処置する方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、本発明のRPE細胞を、網膜疾患を患っているまたはその危険性がある対象に投与することによって、網膜疾患を処置することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】早期および後期再播種方法の具体例の略図である。

【図1B】SMAD阻害剤を用いた処理中の様々な時点での免疫細胞化学によって測定した、PAX6およびOCT4を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図1B：LDN/SBで誘導した試料。

【図1C】SMAD阻害剤を用いた処理中の様々な時点での免疫細胞化学によって測定した、PAX6およびOCT4を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図1C：LDN/SBで誘導していない試料。

【図1D】2日間(LDN/SB 2D)または5日間(対照+)のSMAD阻害剤を用いた処理の後に、免疫細胞化学によって測定した、PAX6(上のグラフ)およびOCT4(下のグラフ)を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図2A】様々な条件下でqPCRによって測定した、Mitf(上のグラフ)およびSilv(PMEL17)(下のグラフ)の相対的発現を示すグラフである。図2Aおよび2Bは、ステップ(a)後のBMP経路活性化剤を用いた処理がMITFおよびPMEL17の発現の誘導に重大であることを示す。

【図2B】免疫細胞化学によって測定した、MITF(上のグラフ)およびPMEL17(下のグラフ)を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図2Aおよび2Bは、ステップ(a)後のBMP経路活性化剤を用いた処理がMITFおよびPMEL17の発現の誘導に重大であることを示す。

【図3】様々なBMP経路活性化剤を用いた処理の後に免疫細胞化学(上のグラフ)またはqPCR(下のグラフ)によって測定した、MITFを発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図3は、様々なBMP経路活性化剤を本明細書中に開示する方法のステップ(b)において使用できることを示している。

【図4A】様々な条件下で免疫細胞化学によって測定した、CRALBPを発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図4B】様々な条件下で免疫細胞化学によって測定した、MERTKを発現する細胞の

10

20

30

40

50

パーセンテージを示すグラフである。

【図4C】様々な条件下でqPCRによって測定した、R1b p1(CRALBP)(上のグラフ)およびMift(下のグラフ)の相対的発現を示すグラフである。

【図4D】様々な条件下でqPCRによって測定した、Merk(上のグラフ)およびBest1(下のグラフ)の相対的発現を示すグラフである。

【図4E】様々な条件下でqPCRによって測定した、Silv(PMEL17)(上のグラフ)およびTyrl(下のグラフ)の相対的発現を示すグラフである。

【図5】様々な条件下で免疫細胞化学によって測定した、D9-19でのCRALBPを発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図5は、アクチビンAが本明細書中に開示する方法において使用するために適切なアクチビン経路活性化剤であり、アクチビンAへの短時間の曝露がRPEマーカーの発現を誘導するために十分であることを示す。

【図6】細胞を異なるプレート上に異なる播種密度で再播種し(早期再播種の実施形態のステップ(e))、cAMPを含んでいてもよい培地中で培養した場合に、免疫細胞化学によって測定した、96ウェルプレート中、D9-19-20でのPMEL17(上のグラフ)およびCRALBP(下のグラフ)を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図6および7は、とりわけ、ステップ(e)において様々な播種密度を使用できることを示している。

【図7】細胞を異なるプレート上に異なる播種密度で再播種し(早期再播種の実施形態のステップ(e))、cAMPを含んでいてもよい培地中で培養した場合に、免疫細胞化学によって測定した、384ウェルプレート中、D9-19-20でのPMEL17(上のグラフ)およびCRALBP(下のグラフ)を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。図6および7は、とりわけ、ステップ(e)において様々な播種密度を使用できることを示している。

【図8A】SMAD阻害剤、BMP経路活性化剤を用いた処理、および49日目まで基本培地中で培養した後の、後期再播種の実施形態の49日目(ステップ(b))での細胞を示す図である。

【図8B】再播種後に12日間の培養(ステップ(d))の後の細胞を示す図である。

【図8C】再播種後に15日間の培養の後の、免疫細胞化学によって測定した、PMEL17(上のグラフ)およびCRALBP(下のグラフ)を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図9A】定方向分化によって生じた7つのRPE試料の主成分分析(PCA)プロットを、自発的分化および脱分化対照によって生じたRPE細胞と共に示す図である。

【図9B】試験した遺伝子のそれぞれの、試料のクラスター形成への貢献を示す、PCAに使用したローディングプロットを示す図である。

【図9C】定方向分化によって得られたRPE細胞(実施例1および8中に開示した早期および後期再播種の両方)、自発的分化によって得られたRPE細胞、ならびにhES細胞の全ゲノム転写物プロファイリングの比較を示す図である。

【図10A】10週目における、Transwell(登録商標)の上および下のチャンバーの使用済み培地中のVEGFの濃度対PEDFの濃度の比を示すグラフである。図10Aは、本発明の方法によって得られる細胞がRPE細胞であるという結論と一致している。

【図10B】再播種ステップ(c)の後に培養した細胞の使用済み培地中のPEDFおよびVEGFの増加を示すグラフである。図10Bは、本発明の方法によって得られる細胞がRPE細胞であるという結論と一致している。

【図11A】RPE細胞の拡大中に起こる上皮間葉転換および間葉上皮転換の略図である。

【図11B】様々な条件下でRPE細胞の拡大後に得られた細胞数(画像処理したフレームあたりのヘキスト陽性核)を示すグラフである。図11Bは、cAMPまたはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の使用が拡大ステップの収率を増加させることを示す。

【図11C】任意選択でcAMPの存在下でRPE細胞の拡大後に免疫細胞化学によって

10

20

30

40

50

測定した、P M E L 1 7 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 1 D】任意選択でフォルスコリンなどの細胞内 c A M P を増加させる薬剤の存在下で R P E 細胞の拡大後に免疫細胞化学によって測定した、P M E L 1 7 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 1 E】c A M P の存在下で拡大した R P E 細胞における、E d U の取り込みのパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 1 F】c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に得られた細胞数 / c m² を示すグラフである。

【図 1 1 G】任意選択で c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に免疫細胞化学によって測定した、D 1 4 での K i 6 7 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 1 H】任意選択で c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に免疫細胞化学によって測定した、D 1 4 での P M E L 1 7 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 1 I】任意選択で c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での M i t f の発現を示すグラフである。

【図 1 1 J】任意選択で c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での S i l v の発現を示すグラフである。

【図 1 1 K】任意選択で c A M P の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での T y r の発現を示すグラフである。

【図 1 2 A】S M A D 阻害剤の存在下で拡大した R P E 細胞における E d U の取り込みのパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 2 B】任意選択で S M A D 阻害剤の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での B e s t 1 の発現を示すグラフである。

【図 1 2 C】任意選択で S M A D 阻害剤の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での R 1 b p 1 の発現を示すグラフである。

【図 1 2 D】任意選択で S M A D 阻害剤の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、5 週目での G r e m 1 の発現を示すグラフである。

【図 1 3 A】T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で拡大した R P E 細胞における、1 4 日目での E d U の取り込みのパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 B】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に免疫細胞化学によって測定した、D 1 4 での P M E L 1 7 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 C】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、B e s t 1 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 D】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、M e r k t を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 E】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、G r e m 1 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 F】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、P M E L を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 G】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、L r a t を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 3 H】任意選択で T G F 1 および T G F 2 リガンドに対する抗体の存在下で R P E 細胞の拡大後に q P C R によって測定した、R p e 6 5 を発現する細胞のパーセンテージを示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図14A】フローサイトメトリーによって選別した抗CD59抗体で染色した細胞における、qPCRによって測定したhESCマーカーの相対的発現を示すグラフである。

【図14B】フローサイトメトリーによって選別した抗CD59抗体で染色した細胞における、qPCRによって測定したRPEマーカーの相対的発現を示すグラフである。

【図15A】RPE細胞におけるiPSCの分化中に免疫細胞化学によって測定した、D2、D9でのOCT4を発現する細胞のパーセンテージを示す図である。

【図15B】RPE細胞におけるiPSCの分化中に免疫細胞化学によって測定した、D2、D9でのLHX2を発現する細胞のパーセンテージを示す図である。

【図15C】RPE細胞におけるiPSCの分化中に免疫細胞化学によって測定した、D2、D9でのPAX6を発現する細胞のパーセンテージを示す図である。

【図15D】RPE細胞におけるiPSCの分化中に免疫細胞化学によって測定した、D2、D9およびD9-19でのCRALBPを発現する細胞のパーセンテージを示す図である。

【図15E】iPSCを出発物質として使用した定方向分化プロトコルにおいて、2回目の再播種(D9-19-45)の後にqPCRによって測定した、Best1を発現する細胞のパーセンテージを示す図である。ESDDとは、hESCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。IPSSDDとは、iPSCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。

【図15F】iPSCを出発物質として使用した定方向分化プロトコルにおいて、2回目の再播種(D9-19-45)の後にqPCRによって測定した、Merk1を発現する細胞のパーセンテージを示す図である。ESDDとは、hESCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。IPSSDDとは、iPSCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。

【図15G】iPSCを出発物質として使用した定方向分化プロトコルにおいて、2回目の再播種(D9-19-45)の後にqPCRによって測定した、S11vを発現する細胞のパーセンテージを示す図である。ESDDとは、hESCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。IPSSDDとは、iPSCを出発物質として使用した定方向分化によって得られるRPE細胞を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

一部の実施形態では、用語「多能性細胞」とは、適切な条件下で3つの胚葉の細胞種へと分化することができる細胞をいう(たとえば、外胚葉、中胚葉、および内胚葉の細胞種へと分化することができる)。また、多能性細胞は、未分化状態で長期間 *in vitro* 培養を維持することもできる。好ましい実施形態では、多能性細胞は、脊椎動物、特に哺乳動物、好ましくはヒト、靈長類、またはげっ歯類起源のものである。好ましい多能性細胞はヒト多能性細胞である。多能性細胞の例は胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である。一部の実施形態では、多能性細胞は、ヒト胚の破壊を含まない方法によって得る。

【0016】

一部の実施形態では、多能性細胞は胚性幹細胞(ESc)である。

【0017】

一部の実施形態では、EScとは、胚に由来する幹細胞をいう。一部の実施形態では、胚は、*in vitro*で受精させた胚から得る。

【0018】

一部の実施形態では、EScとは、細胞系として連續継代された胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊に由来する細胞をいう。一部の実施形態では、前記胚盤胞は、*in vitro*で受精させた胚から得る。一部の実施形態では、前記胚盤胞は、単為発生的に活性化されて胚盤胞段階へと分割および発生する不受精卵母細胞から得る。

【0019】

EScは当業者に知られている方法によって得られ得る(たとえば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれているUS5843780を参照)。

10

20

30

40

50

【0020】

たとえば、胚盤胞からのhESCの単離には、透明帯を除去し、栄養外胚葉細胞を溶解して穏やかなピペット操作によって無傷の内部細胞塊から取り去る内部細胞塊を免疫手術によって単離する。その後、内部細胞塊を、その成長を可能にする適切な培地を含有する組織培養フラスコ内に播種する。9～15日間の後、内部細胞塊に由来する成長物を機械的解離または酵素消化のいずれかによって凝集塊へと解離し、その後、細胞を新鮮な組織培養培地に再播種する。未分化の形態を示すコロニーをマイクロピペットによって個別に選択し、凝集塊へと機械的に解離し、再播種する。その後、生じるESCを1～2週間毎にルーチン的に分割する。

【0021】

10

一部の実施形態では、用語ESCとは、胚の1つまたは複数の割球を、好ましくは胚の残りの部分を破壊せずに単離した細胞をいう（たとえば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれているUS20060206953またはUS20080057041を参照）。

【0022】

好ましい実施形態では、多能性細胞はヒト胚性幹細胞である。好ましい実施形態では、多能性細胞は、胚を破壊せずに得られたヒト胚性幹細胞である。好ましい実施形態では、多能性細胞は、MA01、MA09、ACT-4、H1、H7、H9、H14、WA25、WA26、WA27、Shef-1、Shef-2、Shef-3、Shef-4、またはACT30胚性幹細胞などの十分に確立された細胞系に由来するヒト胚性幹細胞である。

20

【0023】

一部の実施形態では、ESCは、その供給源またはそれらを生成するために使用した具体的な方法にかかわらず、(i)3つすべての胚葉の細胞へと分化する能力、(ii)少なくともOct-4およびアルカリホスファターゼの発現、ならびに(iii)免疫無防備状態の動物内に移植した場合に奇形腫を生じる能力に基づいて同定することができる。

【0024】

一部の実施形態では、多能性細胞は人工多能性幹細胞(iPSC)である。

【0025】

30

一部の実施形態では、iPSCは、たとえば成体体細胞などの非多能性細胞から、たとえば因子の組合せを発現させるまたはその発現を誘導することにより前記体細胞を再プログラミングすることによって導かれる多能性細胞である。iPSCは、市販されているか、または当業者に知られている方法によって得ることができる。iPSCは、たとえば、胎児、出産後、新生児、若年性、または成体の体細胞を使用して作製することができる。特定の実施形態では、体細胞を多能性幹細胞に再プログラミングするために使用できる因子には、たとえば、Oct4(Oct3/4とも呼ばれる)、Sox2、c-Myc、およびKlf4の組合せが含まれる。他の実施形態では、体細胞を多能性幹細胞に再プログラミングするために使用できる因子には、たとえば、Oct-4、Sox2、Nanog、およびLin28の組合せが含まれる（たとえばその全体で本明細書中に参照により組み込まれているEP2137296を参照）。一部の実施形態では、iPSCは、低分子化合物の組合せを使用して体細胞を再プログラミングすることによって得られる（たとえばその全体で本明細書中に参照により組み込まれているScience、341巻、6146号、651～654頁を参照）。

40

【0026】

好ましい実施形態では、多能性細胞はヒト人工多能性幹細胞である。好ましい実施形態では、多能性細胞はヒト成体体細胞に由来する人工多能性幹細胞である。

【0027】

iPSCは、たとえば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれている、US20090068742、US20090047263、US20090227032、US20100062533、US20130059386、WO2008118820、

50

またはWO 2009006930中に開示されている方法を使用して得ることができる。

【0028】

一部の実施形態では、用語「S M A D 阻害剤」とは、スマールマザーズアゲインストデカペンタブレジック(S M A D)タンパク質シグナル伝達の阻害剤をいう。

【0029】

一部の実施形態では、用語「第1のS M A D 阻害剤」とは、B M P 1型受容体A L K 2の阻害剤をいう。一部の実施形態では、第1のS M A D 阻害剤は、B M P 1型受容体A L K 2およびA L K 3の阻害剤である。一部の実施形態では、第1のS M A D 阻害剤は、S m a d 1、S m a d 5および/またはS m a d 8のリン酸化を妨げる。一部の実施形態では、第1のS M A D 阻害剤はドルソモルフィン誘導体である。一部の実施形態では、第1のS M A D 阻害剤は、ドルソモルフィン、ノギン、コーディン、または4-(6-(4-(ピペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル)キノリン(L D N 1 9 3 1 8 9)から選択される。好ましい実施形態では、第1のS M A D 阻害剤は4-(6-(4-(ピペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル)キノリン(L D N 1 9 3 1 8 9)、またはその塩もしくは水和物である。

10

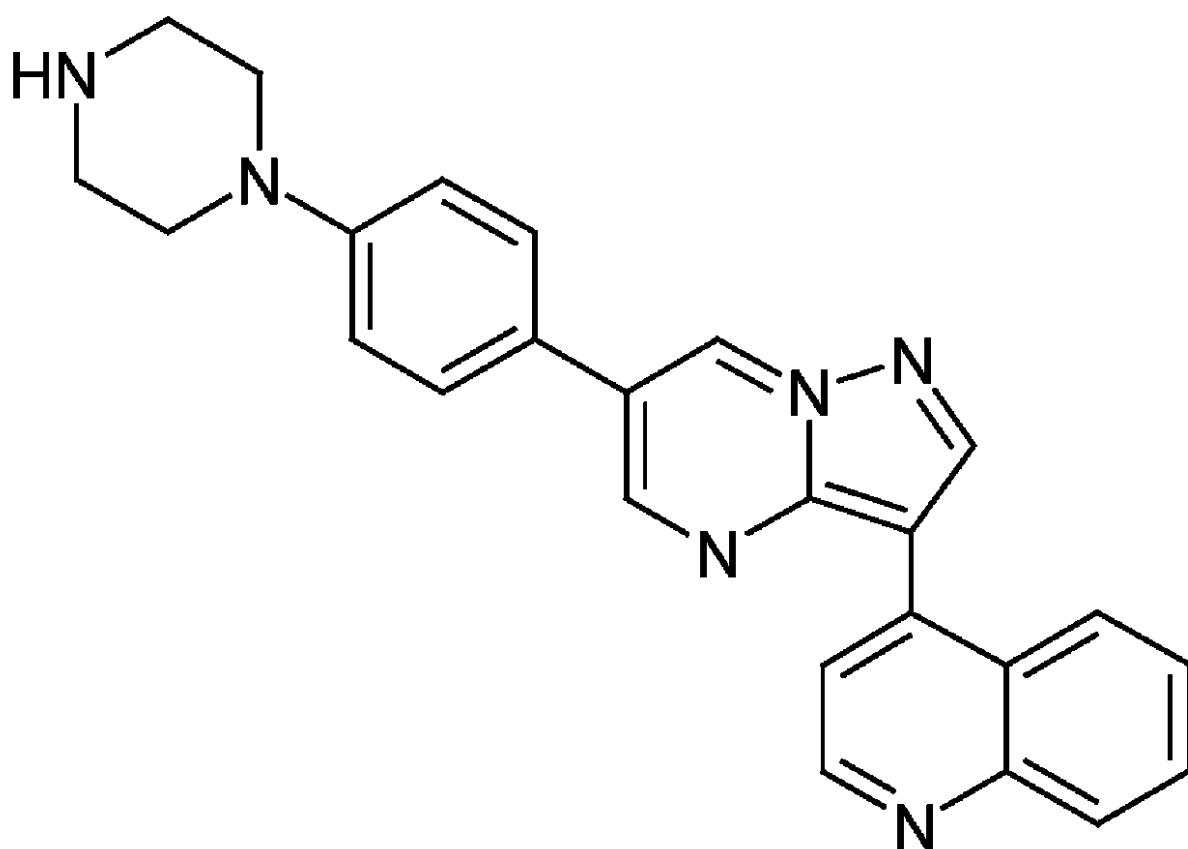
【0030】

L D N 1 9 3 1 8 9は以下の式の市販の化合物である。

【0031】

【化1】

20



30

40

【0032】

一部の実施形態では、用語「第2のS M A D 阻害剤」とは、トランスフォーミング成長因子-スーパーファミリーI型アクチビン受容体様キナーゼ(A L K)受容体の阻害剤をいう。一部の実施形態では、第2のS M A D 阻害剤はA L K 5の阻害剤である。一部の実施形態では、第2のS M A D 阻害剤はA L K 5およびA L K 4の阻害剤である。一部の実施形態では、第2のS M A D 阻害剤はA L K 5およびA L K 4およびA L K 7の阻害剤である。一部の実施形態では、第2のS M A D 阻害剤は4-(4-(ベンゾ[d][1,

50

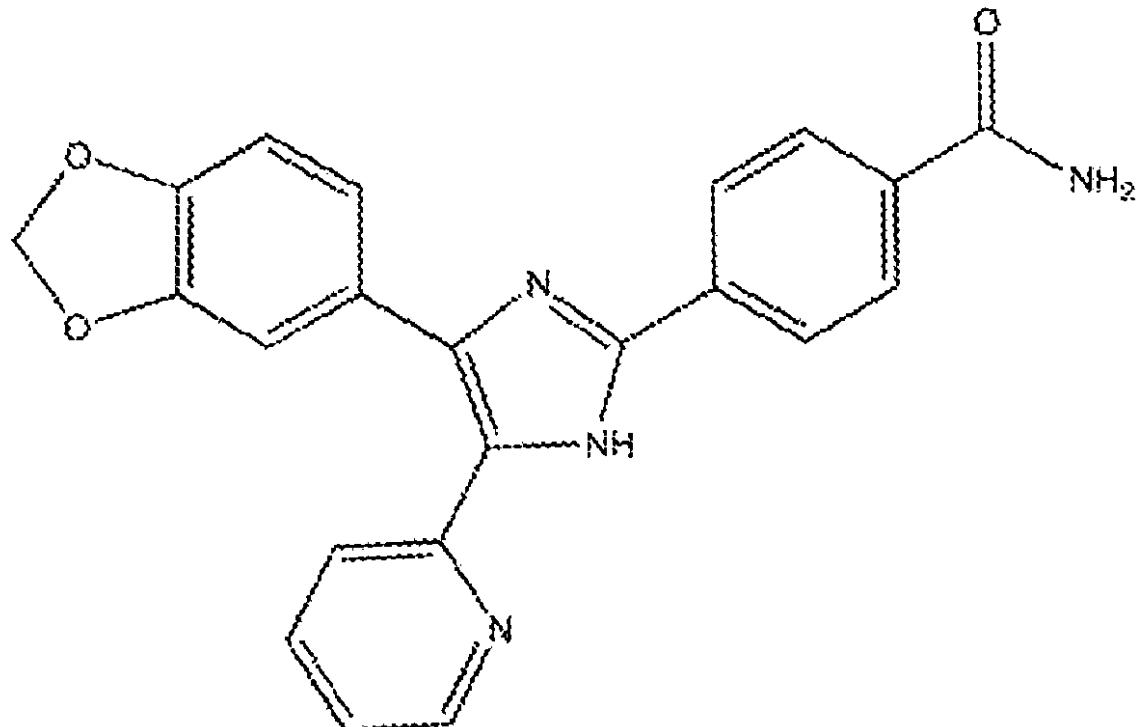
3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド(SB-431542)、またはその塩もしくは水和物である。

【0033】

SB-431542は以下の式の市販の化合物である。

【0034】

【化2】



10

20

【0035】

一部の実施形態では、第2のSMA阻害剤は、

4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド；
 2-メチル-5-(6-(m-トリル)-1H-イミダゾ[1,2-a]イミダゾール-5-イル)-2H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール；
 2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン；
 2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン；
 4-(2-(6-メチルピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)フェノール；
 2-(4-メチル-1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)チエノ[3,2-c]ピリジン；
 4-(5-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ピラゾール-3-イル)ベンズアミド；
 2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-N-(ピリジン-4-イル)ブテリジン-4-アミン；もしくは
 6-メチル-2-フェニルチエノ[2,3-d]ピリミジン-4(3H)-オン
 またはその塩もしくは水和物から選択される。

【0036】

上記化合物は市販されているか、または当業者に知られている方法によって調製することができる(たとえばSurmaczら、stem Cells, 2012; 30: 18

50

75~1884を参照)。

【0037】

一部の実施形態では、第2のSMA D阻害剤は、3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド(A83-01)、2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン(SB-505124)、7-(2-モルホリノエトキシ)-4-(2-(ピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン(LY2109761)、または4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン(LY364947)から選択される。

10

【0038】

一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPを含む。一部の実施形態では、BMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15から選択されるBMPを含む。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPホモ二量体、好ましくはBMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15のホモ二量体である。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPホモ二量体、好ましくはBMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15から選択されるBMPを含む。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPヘテロ二量体であり、好ましくは、BMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15から選択されるBMPを含む。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPヘテロ二量体であり、好ましくは、BMP2、BMP3、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP9、BMP10、BMP11、またはBMP15から選択されるBMPを含む。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMP2/6ヘテロ二量体、BMP4/7ヘテロ二量体、またはBMP3/8ヘテロ二量体である。一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMP4/7ヘテロ二量体である。

20

【0039】

一部の実施形態では、BMP経路活性化剤はBMPシグナル伝達の低分子活性化剤である(たとえばその全体で本明細書中に参照により組み込まれているPLOS ONE、2013年3月、8巻(3)、e59045を参照)。

30

【0040】

一部の実施形態では、用語「網膜色素上皮細胞」または「RPE細胞」とは、成体RPE細胞、好ましくは成体ヒトRPE細胞の形態的および機能的特質を有する細胞をいう。

【0041】

一部の実施形態では、RPE細胞は、成体RPE細胞、好ましくは成体ヒトRPE細胞の形態的特質を有する。一部の実施形態では、RPE細胞は敷石状の形態を有する。一部の実施形態では、RPE細胞は色素性である。RPE細胞の形状、形態、および色素沈着は視覚的に観察することができる。

【0042】

一部の実施形態では、RPE細胞は、以下のRPEマーカーのうちの少なくとも1つを発現する:MITF、S17、CRALBP、MERTK、BEST1およびZO-1。一部の実施形態では、RPE細胞は、以下のRPEマーカーのうちの少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つを発現する:MITF、PMEL17、CRALBP、MERTK、BEST1およびZO-1。一部の実施形態では、RPEマーカーの発現は免疫細胞化学によって測定する。一部の実施形態では、RPEマーカーの発現は、実施例セクションに詳述するように、免疫細胞化学によって測定する。一部の実施形態では、マーカーの発現は定量的PCRによって測定する。一部の実施形態では、RPEマーカーの発現は、実施例セクションに詳述するように、定量的PCRによって測定する。

40

【0043】

一部の実施形態では、RPE細胞はOct4を発現しない。

50

【0044】

一部の実施形態では、RPE細胞は、成体RPE細胞、好ましくは成体ヒトRPE細胞の機能的特質を有する。一部の実施形態では、RPE細胞はVEGFを分泌する。一部の実施形態では、RPE細胞はPEDFを分泌する。一部の実施形態では、RPE細胞はPEDFおよびVEGFを分泌する。一部の実施形態では、RPE細胞によるVEGFおよび/またはPEDFの分泌は、定量的免疫アッセイによって測定する。一部の実施形態では、RPE細胞によるVEGFおよび/またはPEDFの分泌は、実施例中に開示するように測定する。

【0045】

好ましい実施形態では、RPE細胞は、敷石状の形態を有しており、色素性であり、MITF、PMEL17、CRALBP、MERTK、BEST1およびZO-1の少なくとも1つを発現する。好ましい実施形態では、RPE細胞は、敷石状の形態を有しており、色素性であり、MITF、PMEL17、CRALBP、MERTK、BEST1およびZO-1の少なくとも2つを発現する。好ましい実施形態では、RPE細胞は、敷石状の形態を有しており、色素性であり、MITF、PMEL17、CRALBP、MERTK、BEST1およびZO-1の少なくとも2つを発現し、VEGFおよびPEDFを分泌する。

10

【0046】

パラメータを「低い値と高い値との間」として定義する場合、そのような低い値および高い値は、定義した範囲の一部としてみなされるべきである。

20

【0047】

早期再播種

一実施形態では（早期再播種の実施形態）、本発明は、
(a) 多能性細胞を第1のSMA-D阻害剤および第2のSMA-D阻害剤の存在下で培養するステップと、
(b) ステップ(a)の細胞を、BMP経路活性化剤の存在下ならびに第1および第2のSMA-D阻害剤の非存在下で培養するステップと、
(c) ステップ(b)の細胞を再播種するステップとを含む、RPE細胞を生成する方法に関する。

30

【0048】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を少なくとも1日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間または少なくとも4日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を2~10日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を2~6日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を3~5日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、多能性細胞を約4日間培養する。

【0049】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度は0.5nM~10μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度は1nM~5μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度は1nM~2μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度は500nM~2μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度は約1μMである。好ましい実施形態では、第1のSMA-D阻害剤はLDN193189である。

40

【0050】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、第2のSMA-D阻害剤の濃度は0.5nM~100μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第2のSMA-D阻害剤の濃度は100nM~50μMである。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第2のSMA-D阻害剤の濃度は1μM~50μMである。一部の実施形態では、

50

ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度は 5 μ M ~ 2 0 μ M である。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度は少なくとも 5 μ M である。一部の実施形態では、ステップ(a)において、第2のS M A D 阻害剤の濃度は約 1 0 μ M である。好ましい実施形態では、第2のS M A D 阻害剤は S B - 4 3 1 5 4 2 である。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、B M P 経路活性化剤の濃度は 1 n g / m L ~ 1 0 μ g / m L である。一部の実施形態では、ステップ(b)において、B M P 経路活性化剤の濃度は 5 n g / m L ~ 1 μ g / m L である。一部の実施形態では、ステップ(b)において、B M P 経路活性化剤の濃度は 5 0 n g / m L ~ 5 0 0 n g / m L である。一部の実施形態では、ステップ(b)において、B M P 経路活性化剤の濃度は約 1 0 0 n g / m L である。好ましい実施形態では、B M P 経路活性化剤は B M P 4 / 7 ヘテロ二量体である。

10

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 1 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 1 日間、少なくとも 2 日間、少なくとも 3 日間または少なくとも 4 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 3 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 2 ~ 2 0 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 2 ~ 1 0 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 2 ~ 6 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 2 ~ 4 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を約 3 日間培養する。

20

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態では、ステップ(a)の前に、細胞を単層として少なくとも細胞 2 0 0 0 0 個 / c m² の初期密度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)の前に、細胞を単層として少なくとも細胞 1 0 0 0 0 0 個 / c m² の初期密度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)の前に、細胞を単層として細胞 2 0 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 0 個 / c m² の初期密度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)の前に、細胞を単層として細胞 1 0 0 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 0 個 / c m² の初期密度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(a)の前に、細胞を単層として細胞約 2 4 0 0 0 0 個 / c m² の初期密度で培養する。

30

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 1 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 1 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 2 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 1 0 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞 2 0 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞 1 0 0 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞約 5 0 0 0 0 0 個 / c m² の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞をフィブロネクチン、m a t r i g e l (登録商標)、またはC e l l s t a r t (登録商標)上に再播種する。

40

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、本発明は、上記に開示したステップ(a)、(b)および(c)を含み、

(d)ステップ(c)の再播種した細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で培養するステップと、

(e)ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、

50

(f) ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップと
をさらに含む、RPE細胞を生成する方法に関する。

【0056】

一部の実施形態では、アクチビン経路活性化剤はアクチビンA経路活性化剤である。一部の実施形態では、アクチビン経路活性化剤はアクチビンAまたはアクチビンBを含む。好ましい実施形態では、アクチビン経路活性化剤はアクチビンAである。

【0057】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で少なくとも1日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で少なくとも3日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で1~50日間、3~30日間または3~20日間培養する。

10

【0058】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で少なくとも1日間培養し、細胞をアクチビン経路活性化剤なしで少なくとも3日間さらに培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で少なくとも3日間培養し、細胞をアクチビン経路活性化剤なしで少なくとも4日間さらに培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で1~10日間培養し、細胞をアクチビン経路活性化剤なしで5~30日間さらに培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で約3日間培養し、細胞をアクチビン経路活性化剤なしで5~30日間さらに培養する。

20

【0059】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤の濃度は1ng/mL~10μg/mLである。一部の実施形態では、ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤の濃度は1ng/mL~1μg/mLである。一部の実施形態では、ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤の濃度は10ng/mL~500ng/mLである。一部の実施形態では、ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤は約100ng/mLの濃度のアクチビンAである。

30

【0060】

一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞1000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞20000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞100000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞20000~500000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞20000~100000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞約20000個/cm²の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞をフィブロネクチン、matrigel(登録商標)、またはCellstart(登録商標)上に再播種する。

40

【0061】

一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも5日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも7日間、少なくとも14日間、または少なくとも21日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも14日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を5~40日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を10~35日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を21~35日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を約28日間培

50

養する。

【0062】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を c A M P の存在下、好ましくは 0.01 mM ~ 1 M の濃度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 0.1 mM ~ 5 mM の c A M P の存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 0.5 mM の c A M P の存在下で培養する。

【0063】

一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を c A M P の存在下、好ましくは 0.01 mM ~ 1 M の濃度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を 0.1 mM ~ 5 mM の c A M P の存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を 0.5 mM の c A M P の存在下で培養する。

10

【0064】

また、本開示には、ステップ(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および/または(f)の上記に開示した実施形態を組み合わせた方法も含まれる。

【0065】

好ましい実施形態では、本発明は、

(a)ヒト E S C またはヒト i P S C を、500 nM ~ 2 μM の L D N 1 9 3 1 8 9 および 5 μM ~ 20 μM の S B - 4 3 1 5 4 2 の存在下で 3 ~ 5 日間培養するステップと、

(b)ステップ(a)の細胞を、50 ng / mL ~ 500 ng / mL の B M P 2 / 6 ヘテロ二量体、B M P 4 / 7 ヘテロ二量体、または B M P 3 / 8 ヘテロ二量体の存在下ならびに L D N 1 9 3 1 8 9 および S B - 4 3 1 5 4 2 の非存在下で 2 ~ 6 日間培養するステップと、

(c)ステップ(b)の細胞を細胞 1 0 0 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種するステップと、

(d)ステップ(c)の再播種した細胞を、約 10 ng / mL ~ 500 ng / mL のアクチビン A の存在下で 3 ~ 30 日間培養するステップと、

(e)ステップ(d)の細胞を細胞 2 0 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種するステップと、

(f)ステップ(e)の再播種した細胞を 10 ~ 35 日間培養するステップとを含む、網膜色素上皮細胞を生成する方法に関する。

20

30

【0066】

後期再播種

代替実施形態では(後期再播種の実施形態)、R P E 細胞を生成する方法は、

(a)多能性細胞を第1の S M A D 阻害剤および第2の S M A D 阻害剤の存在下で培養するステップと、

(b)ステップ(a)の細胞を、B M P 経路活性化剤の存在下ならびに第1および第2の S M A D 阻害剤の非存在下で培養し、その後、

前記細胞を少なくとも 10 日間、B M P 経路活性化剤の非存在下で培養するステップと、

(c)敷石状の形態を有するステップ(b)の細胞を再播種するステップと、

(d)ステップ(c)の再播種した細胞を培養するステップとを含む。

40

【0067】

また、早期再播種の実施形態のステップ(a)、(b)および(c)に関連して上記に開示した実施形態は、後期再播種の実施形態のステップ(a)、(b)および(c)の実施形態である。

【0068】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 20 日間、B M P 経路活性化剤の非存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 30 日間、B M P 経路活性化剤の非存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を少なくとも 40 日間、B M P 経路活性化剤の非存在下

50

で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 10 ~ 60 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を 30 ~ 50 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、細胞を約 40 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養する。

【 0 0 6 9 】

一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 20000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を少なくとも細胞 100000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞 20000 ~ 5000000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞 50000 ~ 1000000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(c)において、細胞を細胞約 200000 個 / cm^2 の密度で再播種する。

10

【 0 0 7 0 】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を少なくとも 3 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を少なくとも 5 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を少なくとも 10 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を少なくとも 14 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 10 ~ 40 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 10 ~ 20 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を約 14 日間培養する。

20

【 0 0 7 1 】

一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を cAMP の存在下、好ましくは 0.01 mM ~ 1 M の濃度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 0.1 mM ~ 5 mM の cAMP の存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(d)において、細胞を 0.5 mM の cAMP の存在下で培養する。

30

【 0 0 7 2 】

一部の実施形態では、この方法は、以下の追加のステップをさらに含む：

- (e) ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、
- (f) ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップと。

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞 20000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞 100000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞 20000 ~ 5000000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞 50000 ~ 1000000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm^2 の密度で再播種する。一部の実施形態では、ステップ(e)において、細胞を細胞約 200000 個 / cm^2 の密度で再播種する。

40

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも 10 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも 14 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも 20 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも 25 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を少なくとも 40 日間培養する。一部の実

50

施形態では、ステップ(f)において、細胞を 10 ~ 60 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を 15 ~ 40 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(f)において、細胞を約 28 日間培養する。

【 0075 】

また、本開示には、ステップ(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および/または(f)の上記に開示した実施形態を組み合わせた方法も含まれる。

【 0076 】

好みの実施形態では、本発明は、

(a)ヒト ESC またはヒト iPSC を、500 nM ~ 2 μM の LDN193189 および 5 μM ~ 20 μM の SB-431542 の存在下で 3 ~ 5 日間培養するステップと、
10

(b)ステップ(a)の細胞を、50 ng / mL ~ 500 ng / mL の BMP2 / 6 ヘテロ二量体、BMP4 / 7 ヘテロ二量体、または BMP3 / 8 ヘテロ二量体の存在下ならびに LDN193189 および SB-431542 の非存在下で 2 ~ 6 日間培養し、その後

、前記細胞を 30 ~ 50 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養するステップと

(c)敷石状の形態を有するステップ(b)の細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm² の密度で再播種するステップと、
20

(d)ステップ(c)の再播種した細胞を 10 ~ 20 日間培養するステップと、

(e)ステップ(d)の細胞を細胞 50000 ~ 500000 個 / cm² の密度で再播種するステップと、
20

(f)ステップ(e)の再播種した細胞を 15 ~ 40 日間培養するステップと
を含む、RPE 細胞を生成する方法に関する。

【 0077 】

本明細書中に開示する方法(早期再播種および後期再播種が含まれる)によって調製した RPE 細胞は、当業者に知られている様々な方法によって回収することができる。たとえば、RPE 細胞は、機械的解体またはパバインもしくはトリプシンなどの酵素を用いた解離によって回収することができる。

【 0078 】

本明細書中に開示する方法によって調製した RPE 細胞は、たとえば、それだけには限
30
定されないが、蛍光活性化細胞選別(FACS)または磁気活性化細胞選別(MACS)などの技法によってさらに精製することができる。これらの技法には、RPE 特異的細胞表面タンパク質に対する抗体の使用(陽性選択)が含まれる。好みの実施形態では、前記 RPE 特異的細胞表面タンパク質は CD59 である。FACS では、RPE 細胞を、特定の RPE 細胞表面マーカーを標的とする抗体とコンジュゲートさせた蛍光体で標識することができる。サイトメーターを使用してこれらの標識された細胞を精製して、いかなる汚染細胞種も含まない、高度に均質かつ精製された RPE 集団を生じることができる。同様に、MACS では、磁気ナノ粒子とコンジュゲートさせた抗体で RPE 細胞を標識し、磁場を適用することによってさらに精製することができる。また、潜在的な汚染細胞種を標的とする抗体を使用することによって陰性選択を提供することもでき、その結果これらは除去され、純粋な RPE 集団の生成にも貢献する。
40

【 0079 】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する RPE 細胞を生成する方法は、CD59 を発現する細胞中の細胞集団を濃縮するための精製ステップを含む。CD59 を発現する細胞中の細胞集団を濃縮することは、成熟 RPE 細胞を濃縮し、最終 RPE 細胞集団中に存在する可能性があり得る多能性細胞および/または RPE 前駆体などの残留汚染細胞を除去する手段である。

【 0080 】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する RPE 細胞を生成する方法は、

- 細胞を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗 CD59 抗体と接触させるステップと、
- FACS を使用して、抗 CD59 抗体と結合する細胞を選択するステップと

を含む、精製ステップを含む。

【0081】

好ましい実施形態では、抗CD59抗体はカタログ#560747(BD Biosciences)の抗体である。

【0082】

一部の実施形態では、本明細書中に開示するRPE細胞を生成する方法は、実施例13bに開示されている精製ステップを含む。

【0083】

一部の実施形態では、本明細書中に開示するRPE細胞を生成する方法は、

-細胞を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗CD59抗体と接触させるステップと、
-MACSを使用して、抗CD59抗体と結合する細胞を選択するステップと
を含む、精製ステップを含む。

10

【0084】

たとえばカタログ#560747(BD Biosciences)の抗体などの市販の抗CD59抗体を本発明において使用することができる。

【0085】

一部の実施形態では、上記に開示した精製ステップを早期再播種方法のステップ(e)の後に行う。一部の実施形態では、上記に開示した精製ステップを早期再播種方法のステップ(f)の後に行う。一部の実施形態では、上記に開示した精製ステップを後期再播種方法のステップ(c)の後に行う。一部の実施形態では、上記に開示した精製ステップを後期再播種方法のステップ(d)の後に行う。

20

【0086】

一部の実施形態では、本発明は、

a)多能性細胞の集団を提供するステップと、
b)多能性細胞のRPE細胞への分化を誘導するステップと、
c)細胞集団を、CD59を発現する細胞について濃縮するステップと
を含む、RPE細胞を生成する方法に関する。

【0087】

一部の実施形態では、本発明は、

a)多能性細胞の集団を提供するステップと、
b)多能性細胞のRPE細胞への分化を誘導するステップと、
c) -細胞を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗CD59抗体と接触させるステップと、
-FACSを使用して、抗CD59抗体と結合する細胞を選択するステップと
によって、細胞集団を、CD59を発現する細胞について濃縮するステップと
を含む、RPE細胞を生成する方法に関する。

30

【0088】

一部の実施形態では、本発明は、

a)多能性細胞の集団を提供するステップと、
b)多能性細胞のRPE細胞への分化を誘導するステップと、
c) -細胞を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗CD59抗体と接触させるステップと
、
-MACSを使用して、抗CD59抗体と結合する細胞を選択するステップと
によって、細胞集団を、CD59を発現する細胞について濃縮するステップと
を含む、RPE細胞を生成する方法に関する。

40

【0089】

ステップbにおいて、RPE細胞における多能性細胞の分化は、たとえば自発的分化または定方向分化の方法などの当業者に知られている任意の方法に従って行うことができる。具体的には、ステップbにおいて、多能性細胞のRPE細胞への分化は、本明細書中に参照により組み込まれているWO08/129554、WO09/051671、WO2011/063005、US2011269173、US20130196369、WO

50

2013/184809、WO08/087917、WO2011/028524、またはWO2014/121077中に開示されている任意の方法に従って行うことができる。

【0090】

一部の実施形態では、本発明は、

- a) RPE細胞および非RPE細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
- b) 細胞集団を、CD59を発現する細胞について濃縮することによって、細胞集団中のRPE細胞のパーセンテージを増加させるステップとを含む、RPE細胞を精製する方法に関する。

【0091】

一部の実施形態では、本発明は、

- a) RPE細胞および非RPE細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
- b) - 細胞集団を、蛍光体とコンジュゲートさせた抗CD59抗体と接触させるステップと、
 - FACSを使用して、抗CD59抗体と結合する細胞を選択するステップとによって、細胞集団中のRPE細胞のパーセンテージを増加させるステップとを含む、RPE細胞を精製する方法に関する。

【0092】

一部の実施形態では、本発明は、

- a) RPE細胞および非RPE細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
- b) - 細胞集団を、磁気粒子とコンジュゲートさせた抗CD59抗体と接触させるステップと、
 - MACSを使用して、抗CD59抗体と結合する細胞を選択するステップとによって、細胞集団中のRPE細胞のパーセンテージを増加させるステップとを含む、RPE細胞を精製する方法に関する。

【0093】

一部の実施形態では、非RPE細胞は多能性細胞またはRPE前駆体である。

【0094】

一部の実施形態では、用語「RPE前駆体」とは、RPE細胞へと分化するように誘導されているが、分化プロセスが完全に完了していない、hESCなどの多能性細胞に由来する細胞をいう。一部の実施形態では、そのような「RPE前駆体」は、成体RPE細胞の1つまたは複数の形態的および機能的特質を含み、成体RPE細胞の少なくとも1つの形態的および機能的特質を欠く。一部の実施形態では、RPE前駆体は、OCT4、NANOG、またはLIN28のうちの1つまたは複数を発現する。

【0095】

本明細書中に開示する方法の一部の実施形態では、たとえばプレート培養などの接着条件下で二次元培養において細胞を培養する。好ましい実施形態では、細胞を単層として培養する。一部の実施形態では、細胞を、たとえばそれだけには限定されないが、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、Cellstart(登録商標)、BME pathclear(登録商標)、またはMatrigel(登録商標)(Becton, Dickinson and Company)などの細胞支持物質上で培養する。一部の実施形態では、細胞を単層として、たとえば、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、Cellstart(登録商標)、BME pathclear(登録商標)、またはMatrigel(登録商標)上で培養する。好ましい実施形態では、細胞を単層としてMatrigel(登録商標)上で培養する。好ましい実施形態では、細胞を単層としてフィブロネクチンまたはビトロネクチン上で培養する。

【0096】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法の一部のステップは、懸濁培養などの

10

20

30

40

50

非接着条件下で三次元培養において行い得る。懸濁培養では、細胞の大多数が液体培地中に単一細胞、細胞クラスターおよび/または細胞凝集体として自由に浮遊している。細胞を、当業者に知られている方法に従って、三次元系において培養することができる（たとえば、Kellerら、Current Opinion in Cell Biology、7巻(6)、862～869(1995)またはWatanabeら、Nature Neuroscience、8、288～296(2005)を参照）。

【0097】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法の一部のステップをたとえばそれだけには限定されないが懸濁培養などの三次元培養で実施し、一部のステップを二次元培養（たとえば細胞を単層として培養する）で実施する。一部の実施形態では、ステップ（a）および/または（b）を懸濁培養で実施し、以下のステップを二次元培養（たとえば細胞を単層として培養する）で実施する。

10

【0098】

一部の実施形態では、細胞を播種する前にRho関連プロテインキナーゼ（ROCK）阻害剤と共にインキュベートする。一部の実施形態では、細胞をステップ（a）の前にROCK阻害剤と共にインキュベートする。ROCK阻害剤は、解離したヒト胚性幹細胞の生存を許可する物質である（K.Watanabeら、Nat.Biotech.、25：681～686(2007)を参照）。本発明の方法において使用することができるROCK阻害剤の例は、それだけには限定されないが、Y-27632、H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、GSK269962A、およびSB-772077-Bである。一部の実施形態では、ROCK阻害剤はY-27632である。一部の実施形態では、ステップ（a）の前に、多能性細胞をROCK阻害剤の存在下で播種する。一部の実施形態では、細胞をROCK阻害剤の存在下で、播種後1または2日間培養する。一部の実施形態では、本発明の方法の1回目の再播種をROCK阻害剤の存在下で実施する。一部の実施形態では、細胞をROCK阻害剤の存在下で1回目の再播種後1または2日間培養する。

20

【0099】

本発明の方法では、細胞を、多能性細胞、好ましくはヒト多能性細胞の培養に適切な任意の基本培地中で培養することができる。一部の実施形態では、細胞を、ヒト胚性幹細胞の培養に適切な基本培地中で培養する。

30

【0100】

適切な基本培地の例には、それだけには限定されないが、IMDM培地、培地199、イーグル最小必須培地（EMEM）、AMEM培地、ダルベッコ変法イーグル培地（D MEM）、KO-DMEM、ハムF12培地、RPMI1640培地、フィッシャー培地、グラスゴーMEM、T es R1、T es R2、エッセンシャル8、およびその混合物が含まれる。一部の実施形態では、培地は血清を含む。一部の実施形態では、培地は無血清である。好ましい実施形態では、基本培地はT es R1またはT es R2である。

【0101】

望ましい場合は、培地は、1つまたは複数の血清代替物、たとえば、アルブミン、トランスフェリン、ノックアウト血清代替物（KSR）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン先駆体、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、B27補充剤、およびN2補充剤、ならびに脂質、アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン、成長因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルベート、緩衝剤、および無機塩などの1つまたは複数の物質をさらに含有し得る。

40

【0102】

本発明の方法における細胞培養に使用する基本培地は、必要に応じて、たとえば、それだけには限定されないが、SMAD阻害剤、BMP経路活性化剤、アクチビン経路活性化剤、および/またはcAMPを補充することができる。

【0103】

上記に開示した方法の一部の実施形態では、ステップ（a）で使用する細胞はhESC

50

またはヒト I P S c であり、方法は、異種成分を含まない条件下、すなわちヒト以外の動物に由来するいかなる材料も使用せずに実施する。たとえば、方法を、異種成分を含まない条件下で実施する場合、培地および細胞支持物質は、ヒト以外の動物に由来するいかなる材料も含まない。

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、再播種は、播種した細胞を解離すること、好ましくは細胞の単層を解離することと、解離した細胞を播種することとを含む。好ましくは、たとえば、トリプシン、コラゲナーゼ I V、コラゲナーゼ I 、ディスパーゼ、または市販の細胞解離緩衝液などの酵素を使用して細胞を解離する。好ましくは、T r y p L E S e l e c t (登録商標)を使用して細胞を解離する。

10

【 0 1 0 5 】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法によって得られたまたは得ることができる R P E 細胞をさらに拡大する。一部の実施形態では、拡大ステップを二次元培養にて、接着条件下で実施する。一部の実施形態では、拡大ステップは、

- R P E 細胞を再播種することと、
 - 再播種した R P E 細胞を培養することと
- を含む。

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞支持物質上に再播種する。適切な細胞支持物質には、たとえば、それだけには限定されないが、コラーゲン、ゼラチン、ポリ - L - リシン、ポリ - D - リシン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、C e l l s t a r t (登録商標)、M a t r i g e l (登録商標)、またはB M E p a t h c l e a r (登録商標) (B M E P a t h C l e a r (登録商標)は、エンゲルプレス - ホルム - スウォーム (E H S) 腫瘍から精製した基底膜の可溶形であり、主にラミニン、コラーゲン I V、エンタクチン、およびヘパリン硫酸プロテオグリカンから構成される) が含まれる。好ましい実施形態では、細胞支持物質は、M a t r i g e l (登録商標)、フィブロネクチン、またはC e l l s t a r t (登録商標)から選択され、好ましくはC e l l s t a r t (登録商標)である。

20

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種する。一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞 5 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種する。一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞 1 0 0 0 0 ~ 4 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種する。一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞 1 0 0 0 0 ~ 3 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種する。一部の実施形態では、R P E 細胞を細胞約 2 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種する。

30

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態では、再播種した細胞を少なくとも 7 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を少なくとも 1 4 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を少なくとも 2 8 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を少なくとも 4 2 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を 2 1 日間 ~ 7 0 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を 3 0 日間 ~ 6 0 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を約 4 9 日間培養する。

40

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、R P E 細胞を c A M P の存在下、好ましくは 0 . 0 1 m M ~ 1 M の濃度で培養する。一部の実施形態では、R P E 細胞を 0 . 1 m M ~ 5 m M の c A M P の存在下で培養する。一部の実施形態では、R P E 細胞を約 0 . 5 m M の c A M P の存在下で培養する。

【 0 1 1 0 】

一部の実施形態では、R P E 細胞を、c A M P の細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、前記薬剤はアデニルシクラーゼ活性化剤、好ましくは

50

フォルスコリンである。一部の実施形態では、前記薬剤は、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、好ましくはPDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE7、PDE8、PDE10および/またはPDE11阻害剤である。一部の実施形態では、前記薬剤は、PDE4、PDE7および/またはPDE8阻害剤である。

【0111】

一部の実施形態では、RPE細胞を、SMAD阻害剤の存在下、好ましくは1nM~100μMの濃度で培養する。一部の実施形態では、RPE細胞を10nM~10μMのSMAD阻害剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、RPE細胞を約10nM~1μMのSMAD阻害剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、前記SMAD阻害剤はTGF-I型受容体（ALK5）および/またはTGF-II型受容体の阻害剤である。好ましい実施形態では、前記SMAD阻害剤はALK5阻害剤である。一部の実施形態では、前記阻害剤は、2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン、6-(1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)キナゾリン-4(3H)-オン、または4-メトキシ-6-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)キノリンである。また、本発明において使用することができるSMAD阻害剤の例は、たとえば、EP2409708A1またはYingling JMら、Nature Reviews/Drug Discovery、3巻：1011~1022(2004)中にも見つけることができる。

10

20

【0112】

一部の実施形態では、RPE細胞を、cAMPまたはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤、好ましくはcAMPの存在下で培養し、拡大ステップの収率は、同様の条件下で前記薬剤またはcAMPなしと比較した場合に増加する。

30

【0113】

また、本発明は、前記RPE細胞を、SMAD阻害剤、cAMP、またはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養するステップを含む、RPE細胞を拡大する方法にも関する。一部の実施形態では、本発明は、

(a) RPE細胞を少なくとも細胞1000個/cm²の密度で播種するステップと、
(b) 前記RPE細胞を、SMAD阻害剤、cAMP、またはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養するステップと
を含む、RPE細胞を拡大する方法に関する。

30

【0114】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を、たとえば、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、Cellstart(登録商標)、Matrigel(登録商標)、またはBME pathclear(登録商標)から選択される細胞支持物質上に播種する。好ましい実施形態では、ステップ(a)において、細胞支持物質は、Matrigel(登録商標)、フィブロネクチン、またはCellstart(登録商標)から選択され、好ましくはCellstart(登録商標)である。

40

【0115】

一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を細胞1000~100000個/cm²の密度で播種する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を細胞5000~100000個/cm²の密度で播種する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を細胞10000~40000個/cm²の密度で播種する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を細胞10000~30000個/cm²の密度で播種する。一部の実施形態では、ステップ(a)において、RPE細胞を細胞約20000個/cm²の密度で播種する。

【0116】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE細胞を少なくとも7日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を少なくとも14日間培養する。一部の実施形

50

態では、ステップ(b)において、再播種した細胞を少なくとも 28 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、再播種した細胞を少なくとも 42 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、再播種した細胞を 21 日間～70 日間培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、再播種した細胞を 30 日間～60 日間培養する。一部の実施形態では、再播種した細胞を約 49 日間培養する。

【 0 1 1 7 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を cAMP の細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、前記薬剤はアデニルシクラーゼ活性化剤、好ましくはフルスコリンである。一部の実施形態では、前記薬剤は、ホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤、好ましくは PDE 1、PDE 2、PDE 3、PDE 4、PDE 7、PDE 8、PDE 10 および / または PDE 11 阻害剤である。一部の実施形態では、前記薬剤は、PDE 4、PDE 7、および / または PDE 8 阻害剤である。

10

【 0 1 1 8 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を cAMP の存在下、好ましくは 0.01 mM～1 M の濃度で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を 0.1 mM～5 mM の cAMP の存在下で培養する。一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を約 0.5 mM の cAMP の存在下で培養する。

【 0 1 1 9 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を cAMP または cAMP の細胞内濃度を増加させる薬剤、好ましくは cAMP の存在下で培養し、RPE 細胞を拡大する方法の収率は、前記薬剤または cAMP なしの同じ方法と比較して増加する。

20

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態では、ステップ(b)において、RPE 細胞を、SMAD 阻害剤の存在下、好ましくは 1 nM～100 μM の濃度で培養する。一部の実施形態では、RPE 細胞を 10 nM～10 μM の SMAD 阻害剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、RPE 細胞を約 10 nM～1 μM の SMAD 阻害剤の存在下で培養する。一部の実施形態では、前記 SMAD 阻害剤は TGF-Ⅰ 型受容体(ALK5)および / または TGF-Ⅱ 型受容体の阻害剤である。好ましい実施形態では、前記 SMAD 阻害剤は ALK5 阻害剤である。一部の実施形態では、前記阻害剤は、2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン、6-(1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)キナゾリン-4(3H)-オン、または 4-メトキシ-6-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)キノリンである。また、本発明において使用することができる SMAD 阻害剤の例は、たとえば、EP2409708A1 または Yingling JM ら、Nature Reviews / Drug Discovery, 3 卷: 1011～1022 (2004) 中にも見つけることができる。

30

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書中に開示する方法によって得られた RPE 細胞に関する。一部の実施形態では、本発明は、本明細書中に開示する方法によって得ることができる RPE 細胞に関する。

40

【 0 1 2 2 】

本明細書中に開示する方法によって得られたまたは得ることができる RPE 細胞を、研究ツールとして使用することができる。たとえば、RPE 細胞は、in vitro モデルにおいて、その生存、再生、および / もしくは機能を促進する新規薬物の開発のために、または RPE 細胞に対して毒性もしくは再生効果を有する化合物の高スループットスクリーニングのために使用することができる。

【 0 1 2 3 】

本明細書中に開示する方法によって得られたまたは得ることができる RPE 細胞は治療において使用することができる。一部の実施形態では、RPE 細胞は網膜疾患の処置に使

50

用することができる。

【0124】

一部の実施形態では、RPE細胞を、網膜疾患を患っている対象の眼内への移植に適切な医薬組成物中に配合する。

【0125】

一部の実施形態では、眼内への移植に適切な医薬組成物は、RPE細胞を支持するのに適した構造とRPE細胞とを含む。そのような医薬組成物の非限定的な例は、その全体で本明細書中に参照により組み込まれているWO2009/127809、WO2004/033635、WO2012/009377、またはWO2012177968に開示されている。

10

【0126】

好ましい実施形態では、医薬組成物は多孔性膜およびRPE細胞を含む。一部の実施形態では、膜の孔は直径が0.2μm～0.5μmであり、孔の密度は $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$ 個の孔/cm²である。一部の実施形態では、RPE細胞を支持したコーティングで膜の片側をコーティングする。一部の実施形態では、コーティングは糖タンパク質を含み、好ましくはラミニンまたはビトロネクチンから選択される。好ましい実施形態では、コーティングはビトロネクチンを含む。一部の実施形態では、膜はポリエステル製である。

【0127】

代替実施形態では、医薬組成物は、対象の眼内への移植に適切な培地中の懸濁液中のRPE細胞を含む。そのような医薬組成物の例は、その全体で本明細書中に参照により組み込まれているWO2013/074681に開示されている。

20

【0128】

本明細書中に開示する方法によって得られたRPE細胞は、対象の眼内の様々な標的部位に移植し得る。一実施形態に従って、RPE細胞の移植は、眼の網膜下空間（光受容器外節と脈絡膜との間）への移植である。さらに、硝子体空間、網膜内層および網膜外層、網膜周辺部、ならびに脈絡膜内を含めた、さらなる眼球区画内への移植を検討することができる。

【0129】

RPE細胞の眼内への移植は、当分野で知られている様々な技法によって行うことができる（たとえば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれている米国特許第5962027号、第6045791号、および第5,941,250号を参照）。

30

【0130】

一部の実施形態では、移植は、経扁平部硝子体切除手術、続いて小さな網膜の開口部から網膜下の空間内に細胞を送達することによって行う。一部の実施形態では、RPE細胞は、適切なデバイスを使用して眼内に移植する（たとえば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれているWO2012/099873またはWO2012/004592を参照）。

【0131】

一部の実施形態では、移植は、対象の眼内への直接注射によって行う。

【0132】

一部の実施形態では、本明細書中に開示する方法によって得られたRPE細胞は、網膜疾患の処置に使用することができる。一部の実施形態では、本発明は、対象における網膜疾患の処置に使用するための、本明細書中に開示する方法によって得られたもしくは得ることができるRPE細胞、またはそのような細胞を含む医薬組成物に関する。一部の実施形態では、本発明は、対象において網膜疾患を処置する医薬品を製造するための、本明細書中に開示する方法によって得られたもしくは得ることができるRPE細胞、またはそのような細胞を含む医薬組成物の使用に関する。一部の実施形態では、本発明は、本明細書中に開示する方法によって得られたもしくは得ることができるRPE細胞、またはそのような細胞を含む医薬組成物を対象に投与することによって、対象において網膜疾患を処置する方法に関する。

40

50

【0133】

一部の実施形態では、対象は哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0134】

一部の実施形態では、網膜疾患は、網膜の機能不全、網膜の傷害、および／または網膜色素上皮の喪失もしくは劣化に関連する疾患である。一部の実施形態では、網膜疾患は、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、遺伝性もしくは後天性黄斑変性症、加齢関連黄斑変性症（AMD）、ベスト病、網膜剥離、脳回転状萎縮、脈絡膜欠如、パターンジストロフィーおよびRPE細胞の他のジストロフィー、糖尿病性網膜症、またはシュタルガルト病から選択される。好ましい実施形態では、網膜疾患は網膜色素変性症または加齢関連黄斑変性症（AMD）である。好ましい実施形態では、網膜疾患は加齢関連黄斑変性症である。

10

【実施例】

【0135】

（実施例1）

早期再播種を用いた定方向分化

すべての作業は無菌的な組織培養フード内で実施した。Shef-1 hESCは、Matrigel（BD）上、TeSR1培地（Stem Cell Technologies）中でルーチン的に培養した。WA26 hESC（Wicel11）は、エッセンシャル8培地（Life Technologies）中、ヒトビトロネクチン（Life Technologies）上でルーチン的に培養した。培養物は、コロニーをより小さな凝集体へと解離するために0.5 mMのEDTA溶液（Sigma）を使用して、週に2回継代し、その後、これを、10 μMのY-27632（Rock阻害剤）（Sigma）を含有する培地に再播種した。培養培地は毎日交換した。

20

【0136】

Shef1またはWA26 hESC（Wicel11）を10 μMのY-276352（Rock阻害剤）と共に35分間、37℃でインキュベートした。培地を除去し、細胞を5 mLのPBS（-MgCl₂、-CaCl₂）（本明細書中以降PBS（-/-））で洗浄した。2 mLのTrypLE select（登録商標）を加え、細胞を37℃/5%のCO₂、加湿したインキュベーター内で6~8分間インキュベートした。DMEM KSRXF培地は以下のように調製した。

30

【0137】

【表1】

成分	カタログ番号	体積 (mL)
ノックアウト(KO)DMEM	10829-018 (Life Technologies)	308
異種成分を含まないノックアウト血清代替物	12618-012 (Life Technologies)	80
グルタマックスI	35050 (Life Technologies)	4
2-メルカプトエタノール(70uLを100mLのKO DMEMで希釈)	M3148 (Sigma)	4
非必須アミノ酸	11140-035 (Life Technologies)	4

40

【0138】

TeSR2完全培地（TeSR2）は以下のように調製した。

【0139】

【表2】

成分	カタログ番号	体積 (mL)
TesR2 基本培地	05860 (Stem cell technologies)	78
TesR2 5×補充物	05860 (Stem cell technologies)	20
TesR2 250×補充物	05860 (Stem cell technologies)	0.4

【0140】

10

5 mL の D M E M K S R X F 培地を加え、ピペットで吸ったり吐いたりして単一細胞懸濁液を得た。懸濁液を 15 mL のファルコンチューブに移し、300 × g で 4 分間遠心分離した。上清を吸引し、ペレットを 5 mL の T e s R 2 完全培地（登録商標）に再懸濁させた。細胞懸濁液を 40 μm の細胞ストレーナーに通して 50 mL のファルコンチューブに入れ、その後、細胞ストレーナーを 1 mL の T e s R 2 完全培地（登録商標）で洗浄した。細胞を 1300 rpm で 4 分間遠心分離した。上清を吸引し、ペレットを、5 μM の Y 2 7 6 3 5 2 を補充した 3 mL の T e s R 2 完全培地（登録商標）に再懸濁させた。T 2 5 フラスコを所要のマトリックス、たとえば M a t r i g e l またはフィブロネクチンでコーティングした。M a t r i g e l を冷蔵庫内で終夜解凍し、使用前にノックアウト D M E M で 1 : 15 に希釈した。フィブロネクチンを P B S (- / -) で 1 : 10 に希釈した。2.5 mL の希釈したマトリックスを使用して T 2 5 フラスコをコーティングし、3 時間、37 でインキュベートした。細胞を計数し、コーティングした培養容器内に適切な密度で播種して单層を得た。T 2 5 フラスコでは、細胞を細胞 2 4 0 0 0 0 個 / c m² の密度、10 mL の総体積、5 μM の Y 2 7 6 3 5 2 を含む T e S R 2 中で播種した。この時点を 0 日目として指定する。播種の 24 時間後（1 日目）、培地を吸引し、10 mL / フラスコの T e s R 2 完全培地（R o c k 阻害剤なし）で置き換えた。播種の 48 時間後（2 日目）、培地を吸引し、10 mL / フラスコの、1 μM の L D N 1 9 3 1 8 9 および 10 μM の S B - 4 3 1 5 4 2 を含有する D M E M K S R X F 培地で置き換えた。2 つの阻害剤を含む培地を毎日補充した。6 日目に、培地を吸引し、10 mL / フラスコの、100 ng / mL の B M P 4 / 7 ヘテロ二量体を含有する D M E M K S R X F で置き換えた。B M P 4 / 7 を含む新鮮な培地を毎日補充した。

20

【0141】

30

9 日目に、以下のように細胞を再播種した（早期再播種 1）。まず、培養容器、たとえば、T 1 2 . 5 フラスコ、96 ウエルの C e l l B i n d プレート、または 384 ウエルの C e l l B i n d プレートを、所要のマトリックス、たとえば、M a t r i g e l 、フィブロネクチン、または C e l l s t a r t でコーティングした。M a t r i g e l を冷蔵庫内で終夜解凍し、使用前に D M E M で 1 : 15 に希釈した。フィブロネクチンを P B S (- / -) で 1 : 10 に希釈した。C e l l s t a r t を P B S (+ M g C l₂ 、+ C a C l₂) (本明細書中以降 P B S (+ / +)) で 1 : 50 に希釈した。1.5 mL の希釈したマトリックスを使用して T 1 2 . 5 フラスコをコーティングし、3 時間、37 でインキュベートした。次に、10 μM の Y 2 7 6 3 5 2 をそれぞれの T 2 5 フラスコの細胞（分化プロトコルの 9 日目）に加え、37 で 35 分間インキュベートした。培地を吸引し、細胞を 5 mL の P B S (- / -) で 2 回洗浄した。2.5 mL の T r y p L E s e l e c t (登録商標) をそれぞれのフラスコに加え、細胞がフラスコから浮き上がるまで、フラスコを 37 に 15 ~ 25 分間移した。5 mL の D M E M K S R X F 培地をそれぞれのフラスコに加え、フラスコの表面を洗浄するために使用した。細胞懸濁液を 40 μm の細胞ストレーナーに通した。細胞を 400 × g で 5 分間、室温で遠心分離した。上清を吸引し、ペレットを 10 mL の D M E M K S R X F 培地 (+ 5 μM の Y 2 7 6 3 5 2) に再懸濁させた。上清を吸引し、ペレットを 10 mL の D M E M K S R X F 培地 (5 μM の Y 2 7 6 3 5 2) に再懸濁させた。細胞を計数し、コーティングした培養容器に

40

50

細胞 5 0 0 0 0 0 個 / cm^2 の密度で播種した。再播種の 2 4 時間後（すなわち D 1 0 であり、分化プロトコルの D 9 - 1 ともいうことができる）、培地を D M E M K S R X F + 1 0 0 n g / m L のアクチビン A に変えた。週に 3 回、培地に新鮮なアクチビン A を補充した。

【 0 1 4 2 】

D 9 - 1 9 の後（すなわち D 2 8 日）、細胞を再播種して R P E 細胞の均質集団が得られた（早期再播種 2）。培地を吸引し、細胞を 5 m L の P B S (- / -) で 2 × 洗浄した。2. 5 m L の A c c u t a s e をそれぞれのフラスコに加え、細胞がフラスコから浮き上がるまで、3 7 で約 3 5 分間インキュベートした。5 m L の D M E M K S R X F 培地をそれぞれのフラスコに加え、フラスコの表面を洗浄するために使用した後、7 0 μm のストレーナーを介して内容物を 5 0 m L のファルコンチューブ内に移した。細胞を 4 0 0 × g で 5 分間、室温で遠心分離した。上清を吸引し、ペレットを 1 0 m L の D M E M K S R X F 培地に再懸濁させた。血球計算器を使用して細胞を計数し、コーティングした培養容器（たとえば P B S (+ / +) で 1 : 5 0 に希釈した C e l l s t a r t ）内の D M E M K S R X F 培地中に、様々な密度、たとえば 1 2 0 0 0 0 / cm^2 で播種した。新鮮な培地を週に 2 回補充した。

10

【 0 1 4 3 】

細胞の培養を 1 4 日間維持した。生じた R P E 細胞を、とりわけ R P E マーカー (P M E L 1 7 、 Z O 1 、 B E S T 1 、 C R A L B P) の発現を免疫細胞化学および q P C R によって試験することによって、特徴づけた。9 0 % を超える細胞が R P E マーカー P M E L 1 7 を発現していた。

20

【 0 1 4 4 】

このプロトコルは、R P E マーカー P M E L 1 7 ならびに C R A L B P および M E R T K などの他の成熟 R P E マーカーを発現する R P E 細胞の生成をもたらした。

20

【 0 1 4 5 】

このプロトコルは、多能性細胞の単層を S M A D 阻害剤、好ましくは L D N 1 9 3 1 8 9 および S B - 4 3 1 5 4 2 で処理すること、続いて、たとえば組換え B M P 4 / 7 ヘテロ二量体タンパク質を使用して B M P 経路を活性化することを含む。L D N 1 9 3 1 8 9 / S B - 4 3 1 5 4 2 および B M P 4 / 7 の処置に続いて、細胞を再播種し（早期再播種 1）、アクチビン A で処理することができる。アクチビン A を用いた処理に続いて、細胞の基本培地内への 2 回目の再播種を行うことができ（早期再播種 2）、培養を維持して純粋な R P E 細胞培養物が得られる。これにより、均質な R P E 細胞培養物の生成がもたらされる。

30

【 0 1 4 6 】

いかなる理論にも束縛されずに、S M A D 阻害剤を使用した T G F シグナル伝達の阻害は、前方神経外胚葉 (A N E) に向かう h E S C の分化をもたらすと考えられている。続く B M P 4 / 7 などの B M P 経路活性化剤を用いた処理は、眼分野に向かう A N E の分化を誘導する。続く再播種およびアクチビン A を用いた任意選択の処理は、R P E 運命に向かう分化をもたらした。

40

【 0 1 4 7 】

したがって、本開示は、h E S C を頑強かつ再現性をもって分化させて、純粋な R P E 細胞を生じる方法を提供する。さらに、このプロトコルは容易にスケール変更可能であり、高収率を与える。上記方法は、異種成分を含まない条件下で h E S C を R P E 細胞へと再現性よくかつ効率的に分化させるために使用することができる。

【 0 1 4 8 】

(実施例 2)

S M A D 阻害剤を用いた処理

本実施例は、h E S C に対する S M A D 阻害剤の効果を例示する。

【 0 1 4 9 】

2. 1. S M A D 阻害剤を用いた処理は A N E の形成をもたらす

50

Shef-1 hESCを、Matrigelでコーティングした96ウェルプレート上に細胞125000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、細胞を1μMのLDN193189および10μMのSB-431542で処理し、試料を2日目、6日目、8日目、および10日目に固定した。免疫細胞化学を、PAX6(ANEのマーカー)の発現およびOCT4(多能性hESCのマーカー)の下方制御について実施した。LDN193189およびSB-431542で誘導した試料において、分化の時間経過にわたるPAX6タンパク質の均一な誘導およびOCT4の均一な減少が見られた(図1B)。これは、96ウェルプレートの1つのウェルの全表面上のみでなく、プレート内のすべてのウェル中で同様に観察され、このことは、プレート間/プレート内の変動が低い頑強な誘導であることを示している。対照的に、LDN193189およびSB-431542で処理せず、培地単独中で維持した試料は、この時間経過の終わりに低レベルのPAX6およびより高いレベルのOCT4を発現し、このことは、LDN193189およびSB-431542の非存在下でANEの効率的な誘導が起らなかったことを示している(図1C)。

10

【0150】

2.2.2日間のSMAD阻害剤を用いた処理

Shef-1 hESCを、Matrigelでコーティングした96ウェルプレート上に細胞125000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、細胞を、表1に記載した様々な長さの時間の間、1μMのLDN193189および10μMのSB-431542で処理した。

20

【0151】

【表3】

表1

	2-0日目	2-1日目	2-2日目	2-3日目	2-4日目	2-5日目
対照+	LDN/SB	LDN/SB	LDN/SB	LDN/SB	LDN/SB	LDN/SB
対照-	DMEM KSRXF	KSRXF	KSRXF	KSRXF	KSRXF	KSRXF
LDN/SB 2日間	LDN/SB	LDN/SB	DMEM KSRXF	DMEM KSRXF	DMEM KSRXF	DMEM KSRXF

30

【0152】

細胞をPAX6およびOCT4について免疫染色した。PAX6の上方制御およびOCT4の下方制御のレベルは、試験したすべての条件において同様であった(図1C)。このことは、少なくとも2日間のLDN193189/SB-431542がANEの誘導をもたらすことを示している。

【0153】

(実施例3)

RPEマーカーの誘導

40

(実施例3.1)

BMP経路の活性化によるMITFの誘導

本実施例は、RPEマーカーの発現に対するBMP経路活性化剤の効果を例示する。Shef-1 hESCを、Matrigelでコーティングした96ウェルプレート上に細胞125000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、1μMのLDN193189および10μMのSB-431542を4日間施用した。未誘導の対照の細胞は未処理のままにした。6日目に、100ng/mlのBMP4/7または100ng/mlのアクチビンA+10mMのニコチニアミドを培地に3日間加えたか、何も加えなかつた。9日目に、BMP4/7またはアクチビンAおよびニコチニアミドを取り除き、細胞をDMEM KSRXF単独中で4日間処理した。試料をRNA抽出およびqPCR分析

50

用に調製した。結果を図2Aに要約する。

【0154】

BMP4/7は、未誘導またはLDN193189/SB-431542のみで処理した対照と比較して、RPE遺伝子、たとえばMITFおよびPME17の発現を誘導した。さらに、アクチビンA+ニコチニアミドは、BMP4/7の代わりとなることはできなかった(図2A)。また、免疫細胞化学を、LDN193189/SB-431542、続いてBMP4/7で処理した試料にも行い、これにより、RPEマーカー、たとえばMITFおよびPME17の発現が確認された(図2B)。これらの結果は、BMP経路活性化剤がMITFの発現およびPME17の発現を強力に誘導することを実証している。

10

【0155】

(実施例3.2)

Shef-1 hESCを、2日目から6日目に1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542で処理し、続いて6日目から9日目に100ng/mlのBMP4/7で処理した(誘導細胞)。未誘導の細胞はLDN/SBおよびBMP4/7のどちらにも曝露せずに維持する。細胞が眼分野の運命に拘束された場合に発現されることが知られているマーカーである、PAX6、LHX2、OTX2、SOX11、およびSOX2について免疫細胞化学を行った。多能性のマーカーであるOCT4は、誘導細胞において2日目から9日目に下方制御される。PAX6、LHX2、OTX2、SOX11、およびSOX2は2日目から9日目に上方制御され、この上方制御は未誘導の試料では達成されなかった。このことは、定方向分化プロトコルが細胞を眼分野の状態に向かって誘導し、その後これがRPE運命に向かって拘束されることを示している。

20

【0156】

(実施例4)

代替BMP経路活性化剤の使用

本実施例は、RPEマーカーの発現に対する様々なBMP経路活性化剤の効果を例示する。

【0157】

Shef-1 hESCを、Matrigelでコーティングした96ウェルプレート上に細胞125000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542を4日間施用した。6日目に、50~200ng/mlのBMP4/7ヘテロ二量体または200ng/mlのBMP4、300ng/mlのBMP7、100ng/mlのBMP2/6を3日間の期間加えた。9日目に、BMPを取り除き、細胞をDMEM KSRXF単独中で4日間維持した。13日目に、MITFの発現を免疫染色およびqPCR分析によって試験した。BMP4/7ヘテロ二量体または他のBMPのいずれかによる処理は、同様のレベルまでのMITFの発現を誘導した(図3)。このことにより、BMP4/7を他のBMPで置換できることが示された。

30

【0158】

これらの結果は、様々なBMP経路活性化剤を使用してMITFの発現を誘導できることを実証している。

40

【0159】

(実施例5)

1回目の再播種ステップ

Shef-1 hESCを、MatrigelでコーティングしたT25フラスコ上に細胞240000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542を4日間施用した。6日目に、100ng/mlのBMP4/7を培地に3日間加えた。細胞を、分化プロトコルの6日目、9日目、または12日目のいずれかに、DMEM KSRXF単独または100ng/mlのアクチビンA、0.5mMのcAMP、もしくは100ng/mlのBMP4/7のいずれ

50

かを補充したD M E M K S R X F 中に、様々な密度で再播種した。6日目に再播種した細胞は、再播種後の3日間、100ng / m l のB M P 4 / 7 を補充したD M E M K S R X F 中で維持した後、アクチビンA、c A M P 、またはB M P 4 / 7 に切り替えた。12日目に再播種した細胞は、9日目から12日目はD M E M K S R X F 単独中で維持した後に再播種した。再播種した細胞はB M P 4 / 7 の存在下で生存せず、この条件は続く分析を放棄した。実施例10(a)中に開示されているように自発的分化によって得られた成熟R P E 細胞試料は、定方向分化の1回目の再播種ステップの際に得られた集団と成熟R P E 細胞との間の類似度を比較するための対照として使用した。再播種の19日後、細胞を免疫細胞化学のために固定し、試料をq P C R のために収集した。成熟R P E マーカー、たとえばC R A L B P およびM E R T K を用いた免疫細胞化学により、D 9 にアクチビンAの存在下で再播種することが最適であり、高レベルのR P E マーカーの発現をえたことが示された(図4 A および4 B)。また、マーカーのパネルを用いたq P C R 分析も、9日目が再播種の最適な時であることを示した(図4 C 、4 D および4 E)。細胞を再播種の前後に様々なマトリックス、たとえば、M a t r i g e l 、C e l l s t a r t 、またはフィブロネクチン上で培養した場合に同様の結果が得られた。

10

【0160】

(実施例6)

アクチビンAへの曝露時間

本実施例は、R P E の分化に対するアクチビンAの曝露期間の効果を例示する。

【0161】

20

W A 2 6 h E S C (W i c e l l) を、M a t r i g e l でコーティングしたT 2 5 フラスコ上に細胞2 4 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で播種した。播種後の2日目に、1 μ M のL D N 1 9 3 1 8 9 および1 0 μ M のS B - 4 3 1 5 4 2 を4日間施用した。6日目に、100ng / m l のB M P 4 / 7 を培地に3日間加えた。9日目に、細胞を、M a t r i g e l またはC e l l s t a r t でコーティングした9 6 ウエルのC e l l B i n d プレート内に細胞5 0 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種した。細胞を、様々な長さの時間、たとえば、3日間、5日間、10日間または18日間の間、D M E M K S R X F 単独または100ng / m l のアクチビンAを補充したD M E M K S R X F のいずれかの中で維持した。D 9 - 1 8 に、細胞を免疫染色のために固定し、R P E 細胞のマーカーであるC R A L B P について染色した。C R A L B P の発現のレベルは試験したすべてのアクチビンA処理において同様であった(図5)。これらの結果は、アクチビンAへの短時間の曝露がR P E 細胞の分化を誘導するために十分であることを実証している。

30

【0162】

(実施例7)

様々な密度での2回目の再播種ステップ

W A 2 6 h E S C (W i c e l l) を、M a t r i g e l でコーティングしたT 2 5 フラスコ上に細胞2 4 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で播種した。播種後の2日目に、1 μ M のL D N 1 9 3 1 8 9 および1 0 μ M のS B - 4 3 1 5 4 2 を4日間施用した。6日目に、100ng / m l のB M P 4 / 7 を培地に3日間加えた。9日目に、細胞を、M a t r i g e l またはC e l l s t a r t のいずれかでコーティングしたT 1 2 . 5 フラスコ内に細胞5 0 0 0 0 0 個 / c m ² の密度で再播種した。細胞を、100ng / m l のアクチビンAを補充したD M E M K S R X F 中で19日間維持した。D 9 - 1 9 に、細胞を、C e l l s t a r t でコーティングした9 6 ウエルまたは3 8 4 ウエルプレート内に様々な密度で再播種した(早期再播種2)。細胞を20日間、培地単独または0 . 5 m M のc A M P を補充した培地中で維持した。D 9 - 1 9 - 2 0 に、細胞をR P E マーカー用の免疫染色のために固定した。9 6 および3 8 4 ウエルの様式はどちらも、> 9 5 % のP M E L 1 7 の発現および約6 0 % のC R A L B P の発現という同様の結果を与えた(図6および7)。さらに、成熟R P E 細胞の別のマーカーであるZ O 1 の発現が、免疫染色によって確認された。

40

【0163】

50

(実施例 8)

後期再播種を用いた定方向分化

9日目までのプロトコル、実施例1中で上記に開示したプロトコルと同一であった。

【0164】

9日目に、培地を10mLのDMEM-KSRXF/フラスコで置き換えた。週に3回、新鮮な培地に変えながら、細胞を50日目までこの培地の中で維持した。50日目前後に、敷石状の細胞がフラスコ内に見られ、異なる形態の他の細胞が散在していた。また、フラスコの中心領域は、いくつかの領域が高い密度で神経突起を有する独特な形態を有していた。

【0165】

再播種を実施するために、培地をフラスコから取り除き、細胞を5mLのPBS(- / -)で1回洗浄した。5mLのPBSをフラスコに加え、細胞スクレーパーを使用して中心の高密度領域を搔爬して廃棄した。フラスコを5mLのPBS(- / -)で再度洗浄した。5mLのAccutaseをフラスコに加え、細胞がフラスコから浮き上がるまで、37℃で約50分間インキュベートした。5mLのDMEM-KSRXF培地をそれぞれのフラスコに加え、フラスコの表面を洗浄するために使用した後、70μmのストレーナーを介して内容物を50mLのファルコンチューブ内に移した。細胞を400×gで5分間、室温で遠心分離した。上清を吸引し、ペレットを10mLのDMEM-KSRXF培地に再懸濁させた。血球計算器を使用して細胞を計数し、コーティングした培養容器(たとえばPBS(+ / +)で1:50に希釈したCellstart)内のDMEM-KSRXF培地中に、様々な密度、たとえば200000/cm²で播種した。新鮮な培地を週に2回補充した。

10

20

【0166】

細胞の培養を14日間維持した。免疫細胞化学およびqPCRによってRPEマーカー(PMEL17、ZO1、BEST1、CRALBP)の発現を試験することによって、生じたRPE細胞を特徴づけた。RPE細胞の成熟度の指標であるVEGFおよびPEDFタンパク質の分泌を分析することによって、RPE細胞の機能性を試験した。

30

【0167】

したがって、本開示は、hESCを頑強かつ再現性をもって分化させて、RPE細胞を生じる方法を提供する。さらに、このプロトコルは容易にスケール変更可能であり、高収率を与える。上記方法は、異種成分を含まない条件下でhESCをRPE細胞へと再現性よくかつ効率的に分化させるために使用することができる。

40

【0168】

(実施例9)

様々なコーティング上での後期再播種

Shef-1 hESCを、MatrigelでコーティングしたT25フラスコ上に細胞240000個/cm²の密度で播種した。播種後の2日目に、1μMのLDN193189および10μMのSB-431542を4日間施用した。6日目に、BMP4/7を培地に3日間加えた。その後、細胞を培地単独中に50日目まで維持した。50日目に、敷石状の細胞が見られたフラスコの外縁(図8A)を収集し、Matrigel、Cellstart、またはフィブロネクチンでコーティングしたプレート上に、96ウェルまたは48ウェルの様式で、細胞200000個/cm²の密度で播種した。敷石状が見られなかった、フラスコの内部の高密度領域を収集し、別で播種した(図8A)。再播種した細胞を培地単独または0.5mMのcAMPを補充した培地中に維持した。内部の高密度領域から再播種した細胞は高い割合のニューロンを生じさせ、これを廃棄した。外縁から培養した細胞は敷石状の細胞を生じさせ、これらはcAMPの存在下でより濃く色素性であった(図8B)。さらに、免疫染色によって観察して、細胞はPMEL17、ZO-1、CRALBP、ベストロフィン、およびMERTKなどのRPEマーカーを発現した。再播種の15日後でのPMEL17およびCRALBPの免疫染色の定量により、どちらのマーカーも70%を超える発現が示された(図8C)。同様の表現型が試験した

50

すべてのコーティング上で得られた。

【0169】

(実施例10)

定方向分化によって得られたRPE細胞は自発的に分化したRPE細胞に酷似している
a)自発的に分化したRPE細胞の調製

Shef-1 hESCをコロニーとして、20%のKSR (GIBCO)、1%の非必須アミノ酸溶液 (GIBCO)、1 mMのL-グルタミン、0.1 mMの-D-メルカプトエタノール、30 µg / mlのゲンタマイシン (GIBCO)、および4 ng / mlのヒト組換えbFGFを補充したノックアウトDMEM (GIBCO)中の不活化マウス胚性線維芽細胞 (iMEF) もしくは不活化ヒト真皮線維芽細胞 (iHDF) 上で、またはmTeSR1培地 (StemCell Technologies) 中のMatrigel (BD) 上のいずれかでフィーダーフリーで培養した。超コンフルエントとなるまで(播種の約2週間後)すべての培養物に毎日供給した後、上述のノックアウトDMEM培地と同じであるがbFGFを含まないものに変えた。RPEコロニーが出現し、切り出すのに十分大きくなるまで、フラスコに週に3回供給した。その後、コロニーをメスで切除し、PBS (-/-)で洗浄し、Accutase (GIBCO)を用いて1~1.5時間、振盪水浴中でインキュベートした。解離したRPE細胞を、70 µmの細胞ストレーナーを通して濾し、700 × gで5分間遠心分離し、上述のbFGFを含まない温かいノックアウトDMEM培地中に再懸濁させた。RPE細胞を計数し、(典型的には細胞38000~50000個 / cm²で)細胞外基質(典型的には、細胞培養インキュベーター内で2時間コーティングした、PBS (+/+)中に1:50のCellStart (Life Technologies))でコーティングした48ウェルプレート内に播種した。これらを、典型的には0.5 ml / ウェルで週に2回供給しながら7または16週間(細胞は0日目に播種)培養した後、RNA抽出を行った。

【0170】

脱分化RPE細胞試料を、上記と同じプロトコルであるが脱分化のために細胞2500個 / cm²で播種し、4または5週間培養することによって生成した。

【0171】

b)定方向分化によって得られたRPE細胞と自発的分化からの試料の比較

定量的PCRによって、RPE細胞および他のマーカーのパネルについて、実施例8に開示したように定方向分化から得られた試料を、自発的分化によって得られた試料と比較した。自発的に分化したRPE細胞は7または16週間のいずれかの間培養したものである。脱分化試料は、上皮表現型を達成せず、その代わりに紡錘状かつ脱分化に保たれたため、これらを対照として使用した。これらは、qPCRによって試験した遺伝子が上皮RPE細胞と非RPE様細胞との区別をつけることができるかどうかを見るために含めた。

【0172】

図9Aは、定方向分化によって生じた7つのRPE細胞試料の主成分分析(PCA)プロットを、自発的分化および脱分化対照によって生じたRPE細胞と共に示す。平均を中心とした、単位分散スケーリングしたmRNA転写物データのPCAモデルのローディングプロットも示し、これは、試験した遺伝子のそれぞれの、試料のクラスター形成への貢献を示している(図9B)。PCAを使用して、試料の全体的な変動を可視化した。最初の2つの成分のスコアプロットは、脱分化試料がホテリングのT²乗の楕円の外側にクラスター化し、RPEの表現型と陽性に相關するマーカー、MERTK、PME17、チロシナーゼ、ベストロフィン、RPE65、およびCRALBPのレベルが低いことによって特徴づけられていることを明らかにし、このことは、これらが分化したRPE細胞と似ておらず、試験した遺伝子がRPEと非RPEの表現型とを区別できたことを示している。さらに、定方向分化によって生成されたRPE細胞は自発的分化によって生成されたRPE細胞試料とクラスター形成し、したがって、分化したRPE細胞に関連する適切な特徴を保有する。

【0173】

10

20

30

40

50

次に、定方向分化によって得られた R P E 細胞（実施例 1 および 8 中に開示した早期および後期再播種の両方）の全ゲノム転写物プロファイリングを行い、自発的分化によって得られた R P E 細胞の転写物プロフィールと比較した。図 9 C に示す主成分分析から明白な試料のクラスター形成は、実施例 1 および 8 に開示した早期および後期再播種プロトコルのどちらに由来する細胞も、自発的分化に由来する R P E 細胞のものに類似しているが、h E S C とは明白に異なる、ゲノムワイドな遺伝子発現プロフィールを有することを実証している。

【 0 1 7 4 】

関連する研究では、自発的分化によって得られた R P E 細胞が、その遺伝子発現シグネットチャに関してネイティブ R P E 細胞に類似していたことが確認された。

10

【 0 1 7 5 】

（実施例 1 1 ）

定方向分化によって得られた R P E 細胞は V E G F および P E D F タンパク質を分泌する
a) 早期再播種方法によって得られた R P E

実施例 1 中に開示した早期再播種プロトコルの再播種 2 (D 9 - 1 9 - 5 0) の後に得られた細胞を、 Transwell (登録商標) 上に細胞 1 1 6 0 0 0 個 / Transwell (登録商標) の密度で播種し、 1 0 週間の期間培養した。 Transwell (登録商標) の 2 つのチャンバーは別々のものとして維持し、 培地を混合させなかった。 培地を上および下のチャンバーから収集し、 V E G F および P E D F の分泌について分析した。 図 1 0 A に示すように、 [V E G F] : [P E D F] の比は、下のチャンバーから収集した培地中でより高く、上のチャンバーからの培地中でより低く、これは、より高い V E G F の基底外側分泌およびより高い P E D F の頂端分泌を示している。このことは、本明細書中に開示した定方向分化方法によって得られた R P E が極性かつ機能的であることを示している。

20

【 0 1 7 6 】

b) 後期再播種方法によって得られた R P E

後期再播種では、 Shef - 1 h E S C を、 Matrigel でコーティングした T 2 5 フラスコ上に細胞 2 4 0 0 0 0 個 / cm² の密度で播種した。播種後の 2 日目に、 1 μM の L D N 1 9 3 1 8 9 および 1 0 μM の S B - 4 3 1 5 4 2 を 4 日間施用した。 6 日目に、 1 0 0 n g / m l の B M P 4 / 7 を培地に 3 日間加えた。 9 日目以降では、細胞を培地単独中に維持し、 6 4 日目にフラスコの外縁を収集し、 Matrigel でコーティングした Transwell (登録商標) 上に細胞 4 0 0 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種した。 Transwell (登録商標) はオーバーフローによって週に 2 回供給した。 V E G F および P E D F レベルを定量するために、 Transwell (登録商標) 上への播種後の 1 2 日目以降に一定間隔で使用済み培地を収集した。 V E G F および P E D F の測定は、「メソスケールディスカバー」 (M S D) に基づく多分析物手法を使用して、 製造業者のプロトコルに従って行った。 図 1 0 B に示すように、 V E G F および P E D F レベルは培養中に時間とともに増加し、これは、成熟度の指標である R P E 細胞による能動分泌を示している。これらの結果は、本明細書中に記載した方法によって得られた細胞が R P E であることを実証している。

30

【 0 1 7 7 】

（実施例 1 2 ）

R P E 細胞の拡大

R P E 細胞の増殖は分化した上皮形態の喪失に関連しており、その代わりに細胞は外見が細長く線維芽球様となる。この明らかな「脱分化」には、コンフルエントな細胞の単層が立方形の色素性 R P E 細胞という特徴的な表現型となる「再分化」の段階が続く (V u g l e r ら、 E x p N e u r o l . 、 2 0 0 8 年 1 2 月 ; 2 1 4 (2) : 3 4 7 ~ 6 1) 。拡大中に起こるこの脱分化と再分化のパラダイムは、上皮間葉転換 (E M T) 、 続いて間葉上皮転換 (M E T) として記載されている (T a m i y a ら、 I O V S 、 2 0 1 0 年 5 月、 5 1 卷、 5 号) (図 1 1 A) 。

40

50

【0178】

a) cAMPまたはcAMPの細胞内濃度を増加させる薬剤の存在下での拡大はRPE細胞の収率および成熟度を増加させる

自発的分化によって生成したRPE細胞を培地単独中に細胞40000個/cm²または培地+0.5mMのcAMP中に細胞20000個/cm²で播種した。培地を週に3回変えた。増殖マーカーKi67の発現を15日目に免疫細胞化学によって測定し、cAMPの存在下で播種した細胞におけるKi67の発現の増加が観察された。35日目に、細胞を固定し、ヘキスト染色を使用して核を染色した。染色された核の数は細胞数に等しい。細胞20000個/cm²の密度で播種した細胞においてcAMPを補充した際に細胞数の増加が観察され、この増加は、培地単独中に細胞40000個/cm²の播種密度で得られた細胞数に等しかった(図11B)。このことは、cAMPを培養中に取り込ませることによって収率が倍化することを示している。また、細胞を、RPEマーカーであるPME17についても免疫染色した。細胞にcAMPを補充し、細胞20000個/cm²で播種した場合にPME17の発現が増加し、この増加は、細胞を細胞4000個/cm²というより高い密度で播種した場合に見られるレベルに類似していた(図11C)。このことは、拡大ステップ中のcAMPの存在はRPEマーカーの発現を増加させ、したがって増加した成熟度を示すことを示している。

10

【0179】

さらに、cAMPの細胞内濃度を増加させる他の化学薬品、たとえばアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンも、細胞の収率およびPME17の発現の増加に関してcAMPに対して同様の効果を有する。自発的分化によって生成したRPE細胞を、培地単独中に細胞40000個/cm²または10μMのフォルスコリンを含む培地中に細胞20000個/cm²で播種した。培地を週に3回変え、細胞を14日目に免疫染色した。cAMPで見られた効果と同様、フォルスコリンの存在下でPME17の発現が増加した(図11D)

20

【0180】

b) 全ゲノム転写物プロファイリング

RPE細胞の拡大に対するcAMPの効果のさらなる理解を得るために、細胞を細胞10000個/cm²および細胞20000個/cm²の密度で、培地単独または0.5mMのcAMPを補充した培地中に播種する時間経過を設定した。これらを、細胞4000個/cm²で培地単独中に播種したRPE細胞と比較した。培地を週に3回変えた。試料を播種後のD3、D15、およびD35に収集し、全ゲノム転写物の分析を3連で行った。より低い密度で播種したがcAMPを補充した細胞とより高い密度で播種したが培地単独であった細胞とを比較して、RPEマーカーであるTYR、TYRP1、MITF、RPE65、BEST1、およびMERTKの発現は、試験したすべての時点で類似していた。

30

【0181】

c) cAMPで処理したRPEにおけるEdUの取り込み

Ki67の免疫細胞化学を行うことに加えて、細胞におけるEdUの取り込みを、cAMPの存在下でRPE細胞の増殖を測定するための追加のアッセイとして使用した。Ki67は、細胞周期のすべての活動期(G1、S、G2、および有糸分裂)中で発現されるが、休止細胞(G0)では存在しなかった。しかし、Ki67の生物学的機能は大部分が未だ不明であり、Ki67を発現するすべての細胞が有糸分裂を完了するかどうかは不明確である。増殖を測定するための補完的な技法は、EdUなどのチミジン類似体のDNA内への取り込みを測定することであり、これは、EdU標識期間中に細胞周期のS期を通過する細胞の同定を容易にする。

40

【0182】

hESC細胞の自発的分化によって得られたRPEを細胞38000個/cm²の密度で播種し、0.5mMのcAMPの存在下または非存在下で8週間の期間維持した。EdUの取り込みを、播種後の2日目、3日目、5日目、7日目、14日目、21日目、56

50

日目の時点で測定した。結果は、EdUについて陽性に染色される細胞のパーセンテージとして表す。cAMPで処理した細胞において7日目、14日目、および21日目の時点で%のEdUの増加が見られ、このことは、cAMPが、RPEの拡大のこれらの段階で増殖を増加させたことを示している(図11E)。細胞数の定量は、1フレームあたり画像処理したヘキスト陽性核の数から外挿した。キャプチャーしたそれぞれの画像フレームの大きさは0.0645×0.0645mmであり、ウェルの総表面積は6mm²であった。したがって、ウェル内の全細胞数は、1画像あたりのヘキスト陽性核の数に、6/(0.0645×0.0645)の商(1442.2に等しい)を乗じた数にほぼ等しかった。cAMPを加えた際に全細胞数の増加が観察され、このことは、cAMPの添加による増加した増殖がRPE数の増加をもたらしたことを見ている(図11F)。

10

【0183】

d) cAMPの用量

RPEを細胞20000個/cm²の密度で播種し、以下の範囲のcAMP濃度、500μM、50μM、5μM、0.5μM、および0.05μMで、14日間の期間処理した。対照の設定には、培地単独中に細胞40000個/cm²および細胞20000個/cm²で播種した細胞が含まれていた。14日間の終わりに、細胞を固定し、増殖のマーカーであるKi67ならびにRPEの同定および純度のマーカーであるPME17の発現を測定するために免疫細胞化学を行った。核は核色素ヘキストで対比染色した。

【0184】

500μMのcAMPの用量は、細胞20000個/cm²で播種した細胞におけるKi67の発現を、培地単独中に2倍の細胞40000個/cm²の密度で播種したRPEの発現に類似のレベルまで誘導した(図11G)。さらに、500μMのcAMPの用量で処理した際に、PME17の発現が増加した。cAMP処理なしでは、細胞2000個/cm²で播種した細胞は、PME17の発現が低かった(図11H)。

20

【0185】

このデータは、50μMより高い用量が、増殖およびRPEの表現型の発生に対するcAMPの効果を誘導するために十分であることを示している。好ましくは、500μM以上の用量を使用してRPE細胞の増殖を誘導することができる。

【0186】

e) RPEをcAMPの存在下で細胞20000個/cm²または培地単独中に細胞40000個/cm²のいずれかの密度で拡大した後に得られるRPEパッチの同等性。

自発的分化によって得られたRPEの懸濁液を、細胞20000個/cm²または細胞40000個/cm²のいずれかの密度で、48ウェルの様式で播種した。細胞20000個/cm²で播種した細胞は500μMのcAMPで処理した一方で、細胞40000個/cm²で播種した細胞は培地単独中で10週間の期間維持した。拡大の期間の終わりに、Accutaseを使用して両条件からの細胞を浮かせ、これを使用して細胞116000個/Transwell(登録商標)の密度でTranswells(登録商標)に播種した。5週間の期間、培地単独中でTranswells(登録商標)の培養を維持した。両条件におけるVEGFおよびPEDFのレベルを定量するために、使用済み培地を週に1回収集した。培養期間の終わりに、パッチを切断し、RPEマーカーZO1について免疫染色した。Transwell(登録商標)の外側領域を、RPEマーカーのパネルの遺伝子発現の、qPCRに基づく分析のために使用した。

40

【0187】

拡大の終わりに、どちらの拡大条件からの細胞も同様の形態を示しており、特徴的な色素性の敷石状細胞の存在を示したことが観察された。Transwell(登録商標)培養中にVEGFおよびPEDFの分泌のレベルを定量し、cAMPの存在下で細胞20000個/cm²の密度または培地中で細胞40000個/cm²で拡大した培養物から得られたかどうかにかかわらず、Transwells(登録商標)の両方の組から比較可能なVEGF:PEDF比が得られた。遺伝子発現に関しては、2つの拡大条件から設定したTranswells(登録商標)からRPE遺伝子(Mitf, Slc1v, Tyr

50

) の比較可能な発現が観察された (図 11 I、11 J、および 11 K)。さらに、RPE マーカー ZO-1 のタンパク質発現は 2 つの条件間で比較可能であった。

【0188】

要約すると、データは、培地中に細胞 40000 個 / cm² または cAMP の存在下で半分の播種密度、すなわち細胞 20000 個 / cm² で Transwells (登録商標) 上で培養し拡大した RPE 間に相違はなかったことを示している。

【0189】

f) SMAD 阻害剤の存在下での拡大は RPE 細胞の増殖を増加させる

1. TGF 受容体 (TGFBR) の低分子阻害剤は RPE の増殖および RPE マーカーの発現を増加させる

10

表 2 に列挙する TGFBR 阻害剤を、RPE の増殖および RPE マーカーの発現に対する効果について調査した。

【0190】

【表 4】

表 2

化合物番号	構造	名称	参考文献
1		2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2009), 19(8), 2277-2281
2		6-(1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)キナゾリン-4(3H)-オン	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2012), 22(10), 3392-3397
4		4-メトキシ-6-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)キノリン	WO200426306

20

30

40

【0191】

実施例 10 a 中に開示したように Shef-1 hESC 細胞から得られ、細胞 2500 個 / cm² の密度で播種した RPE に、化合物を 10 μM、1 μM、および 0.1 μM の濃度で加えた。化合物を 10 日間の期間培地中に維持した。細胞を 10 μM の EdU に 4 時間の期間曝露させ、その後、細胞を固定し、製造業者の推奨に従って Click-iT (登録商標) EdU (Invitrogen、カタログ # C10337) キットを使用して取り込まれた EdU を検出することによって、増殖を評価した。ビヒクル処理と比較した増殖の増加が、3 つすべての化合物で処理した際に観察された (図 12 A を参照)。

50

T G F B R 阻害剤によって引き起こされた増殖がR P E の表現型の獲得に影響を与えたかどうかを試験するために、q P C R を実施してR P E マーカー Best 1 および R 1 b p 1 の転写レベルを測定した。化合物で処理した際にR P E マーカーの発現の増加が観察された（図 12 B および 12 C を参照）。また、脱分化R P E のマーカーである G rem 1 のレベルも確認し、これは化合物で処理した試料中でより低かったことが判明した（図 12 D を参照）。

【 0 1 9 2 】

このデータは、T G F B R 阻害剤によるS M A D シグナル伝達の阻害が増殖およびR P E の表現型の達成を増加させることを示している。

【 0 1 9 3 】

2 . 抗体に基づくS M A D シグナル伝達の阻害はR P E の増殖およびR P E マーカーの発現を増加させる

S M A D シグナル伝達を阻害する代替手段として、1 D 1 1 として知られる、T G F 1 およびT G F 2 リガンドに対する中和抗体を使用した（The Journal of Immunology、142巻、1536～1541、5号、1989年3月）。実施例 10 a に開示したようにShef-1 h E S C 細胞から得られたR P E を細胞 5 0 0 0 個 / c m² の密度で播種し、抗体 1 D 1 1 を 1 μ g / m l および 10 μ g / m l の濃度で培地に加えた。抗体を 14 日間の期間培地中に維持した。細胞を 10 μ M のE d U に 4 時間の期間曝露させ、その後、細胞を固定し、製造業者の推奨に従ってクリックケミストリーを使用して取り込まれたE d U を検出することによって、増殖を評価した。中和抗体を用いて処理した際に、ビヒクル処理と比較した増殖の増加が用量依存的な様式で観察された（図 13 A ）。このことにより、T G F 1 およびT G F 2 を阻害する抗体による、R P E におけるS M A D シグナル伝達の阻害が、R P E の増殖を増加させることが示された。

【 0 1 9 4 】

T G F の阻害によって引き起こされた増殖がR P E の表現型の獲得に影響を与えたかどうかを試験するために、免疫染色およびq P C R によってR P E マーカーのレベルを確認した。P M E L 1 7 の発現の増加は、タンパク質（図 13 B を参照）および転写のどちらのレベルでも見られ、他のR P E マーカーのパネルの転写レベルの増加および脱分化R P E マーカー G R E M 1 のレベルの減少も見られた（図 13 C ～ 13 H を参照）。

【 0 1 9 5 】

このデータは、T G F 1 およびT G F 2 経路を阻害する抗体によるS M A D シグナル伝達の阻害が増殖およびR P E の表現型の達成を増加させることを示している。

【 0 1 9 6 】

（実施例 13 ）

R P E 細胞の精製

a) 細胞表面マーカーの発現を同定するためのスクリーニング

早期再播種を用いた定方向分化プロトコルに従うことによって、細胞をShef 1 . 3 h E S C から得た。細胞を 9 日目までM a t r i g e l 上で培養し、C e l l s t a r t (再播種 1) 上に再播種し、ここでこれを 19 日間培養し、続いてC e l l s t a r t (再播種 2) 上に再播種し、ここでこれを 15 日間培養した後、この実験に使用した。細胞を、細胞 1 0 0 0 0 0 個 / c m² の密度で、M a t r i g e l でコーティングした 3 8 4 ウエルプレート上に播種した。細胞を 7 日間培養した後、B D L y o p l a t e ヒト細胞表面マーカースクリーニングパネル（B D B i o s c i e n c e s 、カタログ # 5 6 0 7 4 7 ）を使用して、細胞表面タンパク質の発現のスクリーニングを行った。バイオイメージングによる細胞のスクリーニングには製造業者の推奨に従った。細胞染色の画像をマーカーの陽性発現について分析した。また、R P E の同定を確認するために、細胞をR P E マーカーであるP M E L 1 7 、C R A L B P 、およびZ O 1 についても染色した。C D 5 9 は、アイソタイプのバックグラウンドを超えてR P E 細胞中で発現されることが

10

20

30

40

50

同定された。

【0197】

b) 早期再播種を用いた定方向分化プロセスからの試料におけるCD59のフローサイトメトリー

フローサイトメトリーを使用してCD59の発現を定量した。定方向分化プロトコルからの以下の細胞の試料を分析用に調製した。

1 / Shef1 hESC (0日目)、

2 / 6日目 (2日目から6日目までの1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542)、

3 / 9日目 (LDN/SB-BMP4/7) : 2日目から6日目までの1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542ならびに6日目から9日目までのBMP4/7を含まない培地) 10

4 / 9日目 (LDNSB+BMP4/7) : 2日目から6日目までの1 μ MのLDN193189および10 μ MのSB-431542ならびに6日目から9日目までの100ng/mlのBMP4/7)

5 / 再播種2後に得られたRPE試料の2つの複製 : 2日目から6日目までのLDN/SB、6日目から9日目までのBMP4/7、D9にアクチビンAの存在下で再播種して2週間の期間、その後、培地単独中で3ヶ月の期間。

【0198】

すべての試料はAccutaseを使用して収集した。細胞を、緑色(FL2)チャネルが蛍光であるLive/Dead固定可能死細胞染色キット(Invitrogen、カタログ#L23101)を使用して、Live/Dead色素を用いて染色した。細胞を1%のPFAで固定し、PBS(-/-)で3回洗浄した。遠心分離を300×gで5分間行った。細胞を、PBS(-/-)+2%のBSA中に細胞約 1×10^6 個/100 μ Lで再懸濁させた。PEマウス抗ヒトCD59抗体(BD Pharmingen、カタログ#560953)を使用して細胞をCD59について染色した。1回の試験あたり20 μ Lの抗体を100 μ Lの実験試料中で使用した。試料を30分間、光から保護して室温でインキュベートした。試料を2回洗浄した後、Accuri C6フローサイトメーターで分析するために150 μ LのPBS(-/-)+2%のBSAに再懸濁させた。未染色の細胞およびアイソタイプ対照(PEマウスIgG2a、eBioscienceカタログ#12-4724-41)を用いて染色した細胞からなる陰性対照も行った。

ゲートをかけて細片およびダブレットを除去し、生細胞染色について陽性に染色される集団のみを選択することによって、フローサイトメトリー分析を行った。この分析からの結果を表3に示す。

【0199】

【表5】

表3: 定方向分化の時間経過から得られた試料における、フローサイトメトリーによる陽性CD59染色のパーセンテージ

試料	0日目	6日目	9日目 (LDNSB-BMP4/7)	9日目 (LDNSB+BMP4/7)	2回目の再播種後のRPE	
					RPE1	RPE2
未染色	6.6	0.1	4.2	0.5	0.9	0
アイソタイプPE	5.8	0.1	4.2	0.5	1.1	1.2
CD59 PE	6.3	0	4.9	0.7	99	99.4

【0200】

このことは、CD59は再播種前の定方向分化プロトコルの早期の時点で発現されておらず、2回目の再播種後に得られる成熟RPE中でのみ発現されることを示している。したがって、CD59を発現する細胞の選別は、成熟RPEを濃縮し、最終RPE培養物中

10

20

30

40

50

に残留汚染細胞として存在する可能性があり得る任意の R P E 前駆体または他の C D - 5 9 陰性細胞を除去するための手段であり得る。

【 0 2 0 1 】

c) 定方向分化プロトコルの再播種 2 の後に得られた S h e f 1 h E S C および R P E を用いた添加実験

R P E に対する C D 5 9 の発現の特異性を示すために、添加実験を行った。早期再播種を用いた定方向分化プロトコルの再播種 2 の後に得られた S h e f 1 h E S C および R P E を、 A c c u t a s e を使用して収集した。細胞を、遠赤 (F L 4) チャネルが蛍光である L i v e / D e a d 固定可能死細胞染色キット (I n v i t r o g e n 、 カタログ # L 1 0 1 2 0) を使用して、 L i v e / D e a d 色素を用いて染色した後、 1 % の P F A で固定し、 P B S (- / -) + 2 % の B S A で同じ濃度に再懸濁させた。以下の比の h E S C および R P E を一緒に混合して 1 0 0 μ L の最終体積を得た： 1 0 0 % の R P E + 0 % の h E S C 、 7 5 % の R P E + 2 5 % の h E S C 、 5 0 % の R P E + 5 0 % の h E S C 、 2 5 % の R P E + 7 5 % の h E S C 、 0 % の R P E + 1 0 0 % の h E S C 。すべての試料に対して、 C D 5 9 および多能性 E S 細胞のマーカー T R A - 1 - 6 0 についてフローサイトメトリーを行った。未染色の細胞および適切なアイソタイプ対照を用いて染色した細胞からなる陰性対照も行った。試料を A c c u r i C 6 フローサイトメーターで分析した。ゲートをかけて細片およびダブルットを除去し、生細胞染色について陽性に染色される集団のみを選択することによって、フローサイトメトリー分析を行った。この分析からの結果を表 4 および 5 に示す。

10

20

30

40

【 0 2 0 2 】

【 表 6 】

表 4: フローサイトメトリーによる%CD59 陽性染色

CD59	スパイク		検出
	Shef (%)	RPE (%)	
未染色	0	100	0
アイソタイプ	0	100	0
	0	100	94.5
	75	25	30.5
	50	50	58.6
	25	75	76.4
	100	0	2.1

【 0 2 0 3 】

【表7】

表5: フローサイトメトリーによる%TRA-1-60陽性染色

Tra160	スパイク		検出
	RPE (%)	Shef (%)	
未染色	0	100	0.1
アイソタイプ	0	100	1
	0	100	73.4
	75	25	18.5
	50	50	34.1
	25	75	54.4
	100	0	0.5

10

20

30

40

【0204】

これらの結果は、検出されたCD59のレベルが試料中に存在するRPEの割合に相関しており、抗体が試料中に存在する他の非RPE細胞を区別できることを示している。さらに、試料中に添加した非RPE hESC細胞の割合は検出された%TRA-1-60に相関する。したがって、CD59を発現する細胞の選別は、成熟RPEを濃縮し、最終RPE培養物中に残留汚染細胞として存在する可能性があり得る任意のhESCまたはRPE前駆体を除去するための手段であり得る。

【0205】

d) CD59陽性RPEをESCおよびRPE細胞の混合集団から選別するためのフローサイトメトリーの使用

CD59選別を使用して混合集団からRPEを濃縮することが可能であることを示すために、同数のhESCおよびRPE細胞（早期再播種2の後に得られたもの）と一緒に混合した。この混合物からの試料を、選別前の集団として別に保管した。残りの混合物をPEマウス抗ヒトCD59抗体（BD Pharmingen、カタログ#560953）で染色した。1回の試験あたり20μLの抗体を、1×10⁶個の細胞を含有する100μLの実験試料中で使用した。試料を30分間、光から保護して室温でインキュベートした。試料を2回洗浄した後、1mLのPBS（-/-）+2%のBSAあたり1×10⁶個の細胞の密度で再懸濁させた。CD59陽性細胞をinflux v7サイトメーター上で選別し、CD59陰性集団とは別々に収集した。RNAを選別前のCD59陽性およびCD59陰性画分から抽出した。qPCRを使用して、ESおよびRPEマーカーのパネルの発現を確認した。このことにより、CD59陽性画分がRPEマーカーBest1、Silv、R1bp1で濃縮され（図14Bを参照）、CD59陰性画分がESマーカーNanog、 Pou5f1、およびLin28で濃縮された（図14Aを参照）ことが示された。このことは、CD59のフロー選別がRPE細胞を混合集団から濃縮し、非RPE細胞種を除去できることを示している。

【0206】

（実施例14）

50

定方向分化プロトコルを誘導多能性細胞 (iPSC) で行った。iPSCを健康なボランティアから得られた赤芽球から生成し、CytoTune-iPS再プログラミングキット (Life Technologies、A13780-01/02) を使用して再プログラミングした。iPSCをE8培地中に細胞240000個/cm²の密度で播種し、早期再播種を用いた定方向分化プロトコルの9-19日目まで分化させた。誘導細胞とは、2日目から6日目までLDN193189/SB-431542で処理し、続いて6日目から9日目までBMP4/7で処理した細胞をいう。未誘導の細胞は、LDN193189/SB-431542およびBMP4/7のどちらにも曝露せずに維持する。免疫染色を目的のマーカーについて行った。図15A-15Dに見られるように、誘導されたiPSCは、誘導されたhESCと同様に、9日目にOCT4を下方制御し、PAX6およびLHX2を上方制御した。9日目にアクチビンAの存在下で再播種した後、iPSCはRPEマーカーCRALBPを上方制御した。9-19日目での2回目の再播種ステップおよび45日間の期間の培養の後、iPSCに由来するRPEは、RPEマーカーのパネルを、実施例8のプロトコルによって得られた、定方向分化によってES細胞に由来するRPEで見られるものと同様のレベルまで発現した(図15E、15F、および15Gを参照)。したがって、これらの結果は、定方向分化プロトコルは、RPEを生成するためにiPSCに伝達可能であることを実証している。

10

【0207】

上記実施例では以下の方法を使用した。

20

【0208】

免疫細胞化学：

免疫細胞化学を96ウェルまたは384ウェルの様式で実施した。培地を吸引し、50μLの4%のパラホルムアルデヒド(PFA)をそれぞれのウェルに加え、35分間、室温でインキュベートした。PFAを吸引し、細胞を3×100uLのPBS(+/-)で洗浄した。細胞を1時間、室温の暗所で、ブロッキング緩衝液(PBS(+/-)/5%の正常ロバ血清(NDS)/0.3%のTriton X100)中でインキュベートした。1°抗体をPBS(+/-)/1%の正常ロバ血清(NDS)/0.3%のTriton X100中で構成した。60μLの1°抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、1時間、室温の暗所でインキュベートした。溶液を吸引し、細胞を3×100uLのPBS(+/-)で洗浄した。2°抗体をPBS(+/-)/1%の正常ロバ血清(NDS)/0.3%のTriton X100中で構成した。60uLの2°抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、1時間、室温の暗所でインキュベートした。溶液を吸引し、細胞を3×100uLのPBS(+/-)で洗浄した。ヘキスト33342溶液をPBS(+/-)で1:5000(2μg/mLの最終濃度)に希釈し、50μLをそれぞれのウェルに加え、少なくとも6分間、室温の暗所でインキュベートした。溶液を吸引し、細胞を1×PBS(+/-)で洗浄し、その後、100μLのPBS(+/-)をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、画像処理まで冷蔵庫内で保管。画像は、IXM Meta Express プラットフォーム上にて10×、20×倍率でキャプチャーした。

30

【0209】

【表8】

抗体	1°または2°	種	供給業者	カタログ番号	希釀率
抗 CRALBP	1°	マウス	Pierce	MA1-813	1:200
抗 PMEL17	1°	マウス	Dako	M0634	1:35
抗 Z01	1°	ウサギ	Invitrogen	18-7430	1:200
抗 MERTK	1°	ウサギ	Abcam	Ab52968	1:50
抗 BEST1	1°	マウス	Millipore	MAB5466	1:100
488nm 抗マウス	2°	ロバ	Life Technologies	A21202	1:1000
594nm 抗マウス	2°	ロバ	Life Technologies	A21203	1:1000
488nm 抗ウサギ	2°	ロバ	Life Technologies	A21206	1:1000
594nm 抗ウサギ	2°	ロバ	Life Technologies	A21207	1:1000

【0210】

分子生物学的技法：

RNA抽出

培地を吸引し、細胞を $100 \mu L$ の PBS (- / -) で洗浄した。 $100 \mu L$ の RLT 緩衝液 (1 % の 2 - メルカプトエタノール) をそれぞれのウェルに加え、ピペットで吸ったり吐いたりした後、溶解物を、さらに $250 \mu L$ の RLT 緩衝液 (1 % の 2 - メルカプトエタノール) を含有する $2 mL$ のチューブに移した。試料は処置まで -80 で保管した。製造業者のプロトコルに従って、Qiacube 上でのカラム DNase 消化を含めた RNAeasy マイクロキット (Qiaagen) を使用して RNA を抽出した。 RNA は $14 \mu L$ の RNase を含まない水で溶出させた。

【0211】

cDNA合成

cDNA は、Applied Biosystems の High Capacity RNA - to - cDNA キットを使用して合成した。

【0212】

【表9】

	1×反応混合液
2×RT 緩衝液	10
20×RT 酵素	1
RNA	4
ヌクレアーゼを含まない H ₂ O	5
合計	20

【0213】

マスター ミックス ($16 \mu L$) を 96 ウェルプレートのウェル内に分取し、 $4 \mu L$ の RNA をそれぞれのウェルに加えた。ヌクレアーゼを含まない水を 1 つのウェルに加えて鉄型なしの対照とした。その後、プレートを $1000 rpm$ で 1 分間遠心分離して収集し、

10

20

30

40

50

プレートをサーマルサイクラーに移し、以下のプロトコルを使用して cDNA を合成した。

【0214】

【表10】

ステップ	温度	時間
1	37°C	60 分間
2	95°C	5 分間
3	4°C	保持

10

【0215】

cDNA 試料を 80 uL のヌクレアーゼを含まない水で希釈し、さらに使用するまで -20 で保管した。

【0216】

定量的 PCR

Applied Biosystems の Taqman Gene Expression Mastermix を使用して、qPCR マスター ミックスを以下のようにそれぞれのアッセイについて構成した。

【0217】

【表11】

	1×反応混合液
2x Taqman Gene Expression Mastermix	10
プライマー/プローブ混合物	1
ヌクレアーゼを含まない水	7
cDNA/鑄型	2
合計	20

20

30

【0218】

マスター ミックス (18 uL) を 96 ウェルプレートのウェル内に分取し、2 uL の cDNA (または対照) をそれぞれのウェルに加えた。対照は、cDNA 合成からの鑄型なしの対照、水、および自発的に分化した RPE cDNA であった。それぞれの試料を 2 連で実行した。その後、プレートを 1000 rpm で 1 分間遠心分離して収集し、プレートをサーマルサイクラーに移し、以下のプロトコルを使用して qPCR アッセイを実行した。

【0219】

40

【表12】

ステップ	温度	時間
1	50°C	2分間
2	95°C	10分間
3	95°C	15秒間
4	60°C (データ収集)	1分間
5	ステップ3へ進む、49×	
6	40°C	2分間

【0220】

データはマイクロソフト社のエクセルにエクスポートし、2[△]-DCT方法を使用して分析した。

【0221】

【表13-1】

実施例10においてqPCRによって試験した遺伝子のリスト:

遺伝子	分類	Taqman アッセイ ID
GAPDH	参照	Hs99999905_m1
HPRT1	参照	Hs99999909_m1
IPO8	参照	Hs00183533_m1
LHX2	眼領域	Hs00180351_m1
SIX3	眼領域	Hs00193667_m1
TBX5	眼領域	Hs00361155_m1
OTX2	早期RPE/神経外胚葉	Hs00222238_m1
PAX6	早期RPE/神経外胚葉	Hs01088112_m1
BEST1	RPE	Hs00188249_m1
MERTK	RPE	Hs00179024_m1
MITF	RPE	Hs01117294_m1
RLBP1	RPE	Hs00165632_m1
RPE65	RPE	Hs00165642_m1
SILV	RPE	Hs00173854_m1
TYR	RPE	Hs01099965_m1
TYRP1	RPE	Hs00167051_m1
TJP1	密着帯	Hs00268480_m1
CRX	網膜	Hs00230899_m1
RX	網膜	Hs00429459_m1
Ki67	増殖	Hs01032443_m1
THBS1	細胞表面相互作用	Hs00962908_m1
ITGAV	細胞表面相互作用	Hs00233808_m1
GREM1	上皮間葉転換	Hs00171951_m1
FOXC2	上皮間葉転換	Hs00270951_s1
CPA4	上皮間葉転換	Hs00275311_m1
CDKN1B	上皮間葉転換	Hs00153277_m1
RRS1	上皮間葉転換	Hs00534971_s1
BMP7	上皮間葉転換	Hs00233476_m1
SFRP5	上皮間葉転換	Hs00169366_m1

10

20

30

40

【0222】

【表 13-2】

FRZB	上皮間葉転換	Hs00173503_m1
DCT	上皮間葉転換	Hs01098278_m1
CDH1	上皮間葉転換	Hs01023894_m1
VEGFA	分泌因子	Hs00900055_m1
PEDF	分泌因子	Hs01106937_m1
SFTP D	分泌因子	Hs00358340_m1
ASIP	分泌因子	Hs00181770_m1
IGFBP1	分泌因子	Hs00426285_m1
C3	分泌因子	Hs00163811_m1
LIF	分泌因子	Hs00171455_m1
IL8	分泌因子/免疫調節	Hs00174103_m1
CCL2	分泌因子/免疫調節	Hs00234140_m1
HLA-A	免疫調節	Hs01058806_g1
HLA-DMA	免疫調節	Hs00185435_m1
IL-10	免疫調節	Hs00961622_m1
IL-6	免疫調節	Hs00174131_m1
ATP1B1	イオンチャネル	Hs00426868_g1
TRPM1	イオンチャネル	Hs00170127_m1
TRPM3	イオンチャネル	Hs00257553_m1

10

20

30

40

【図 1 - 1】

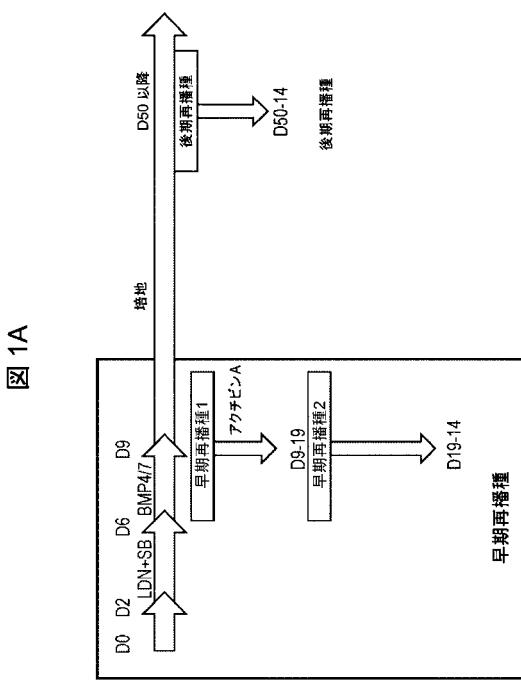


図 1A

【図 1 - 2】

図 1B

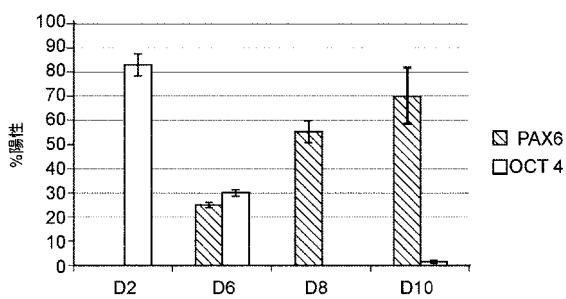
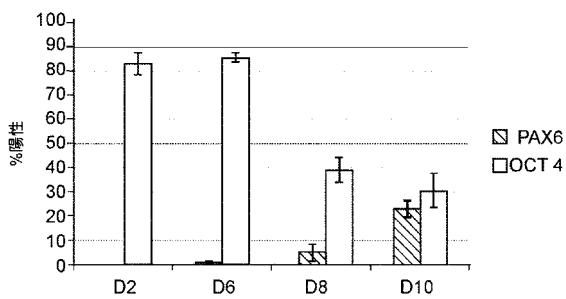
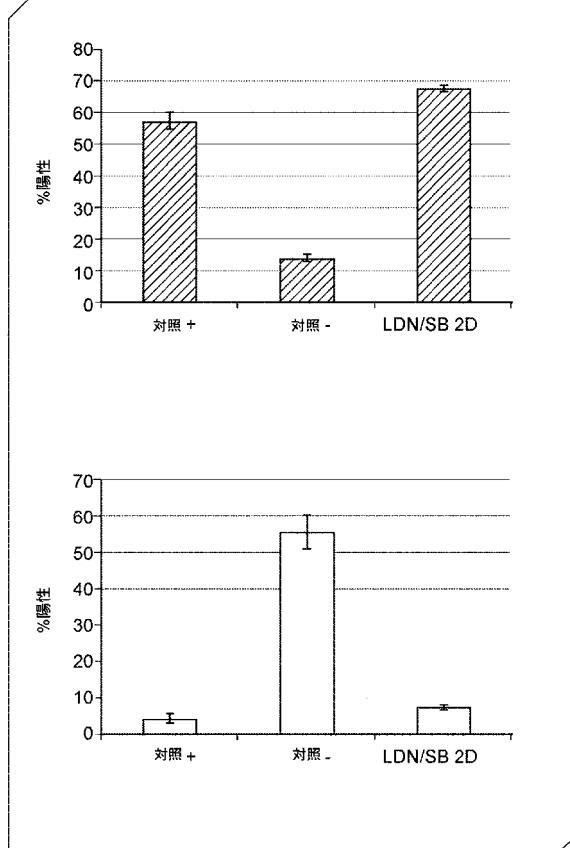


図 1C



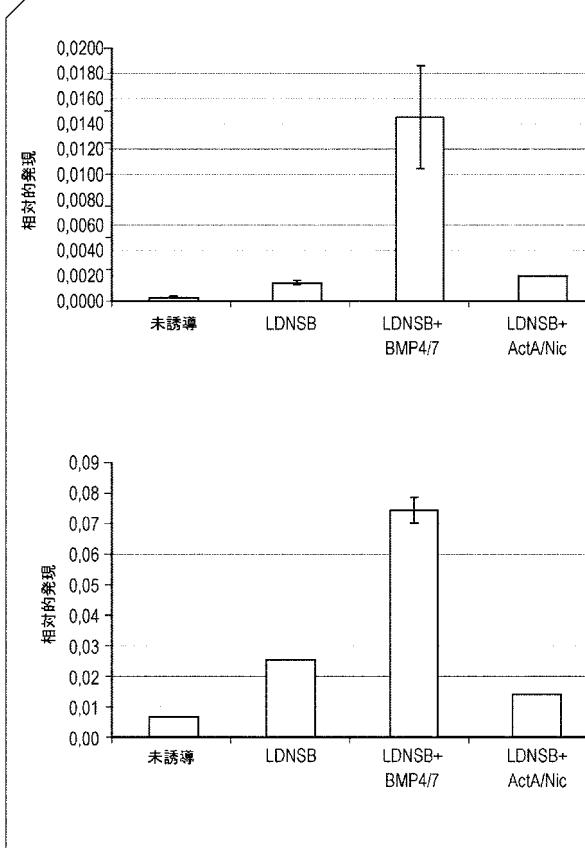
【図 1 - 3】

図 1D



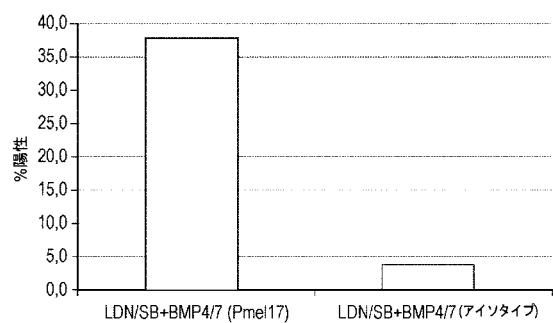
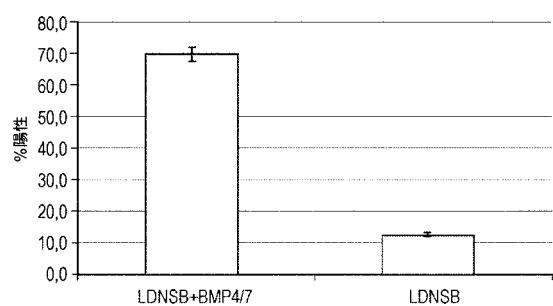
【図 2 - 1】

図 2A



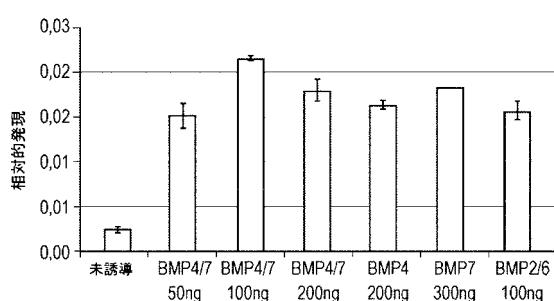
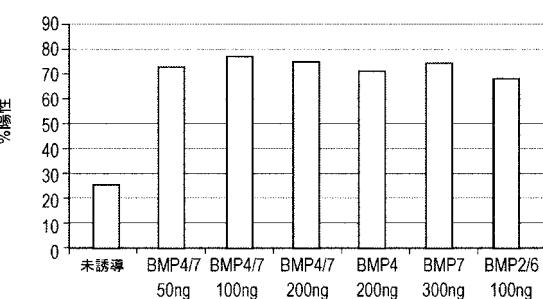
【図2-2】

図2B



【図3】

図3



【図4-1】

図4A

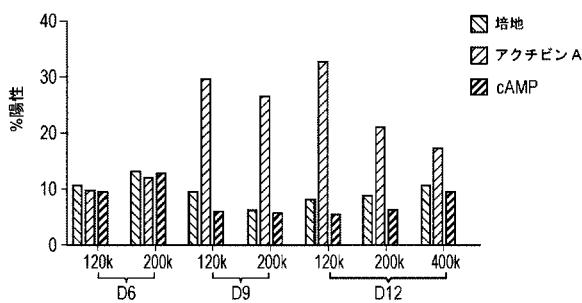
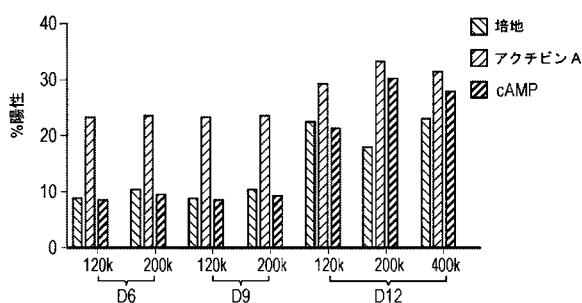
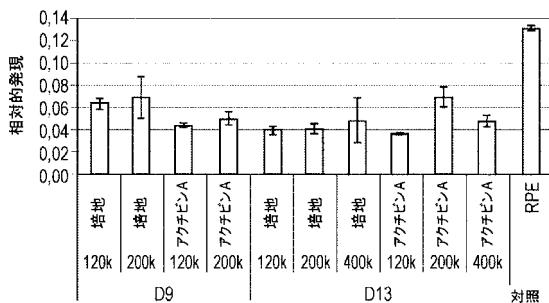
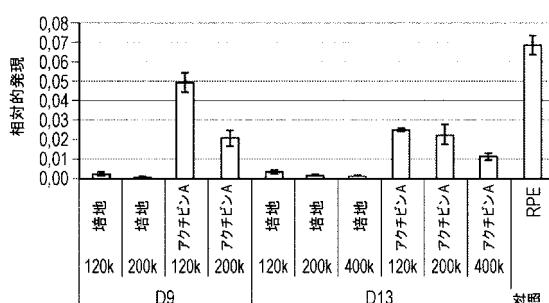


図4B



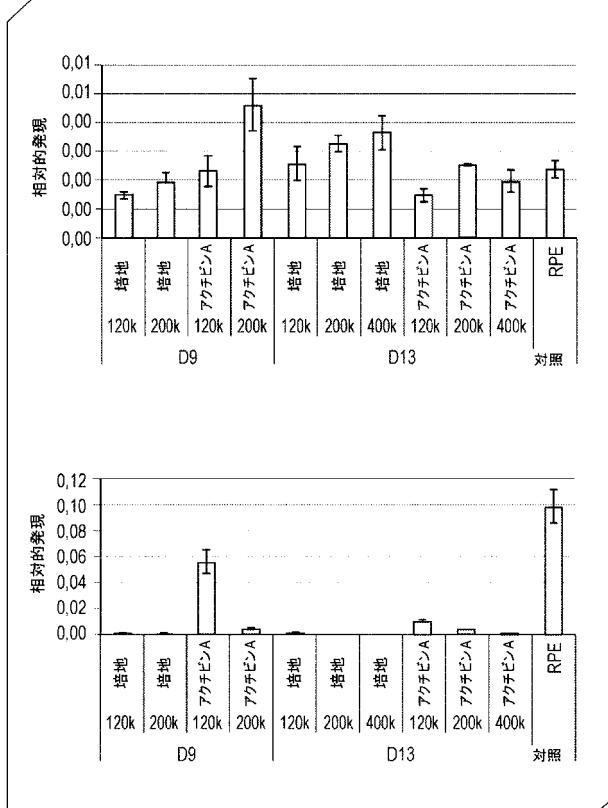
【図4-2】

図4C



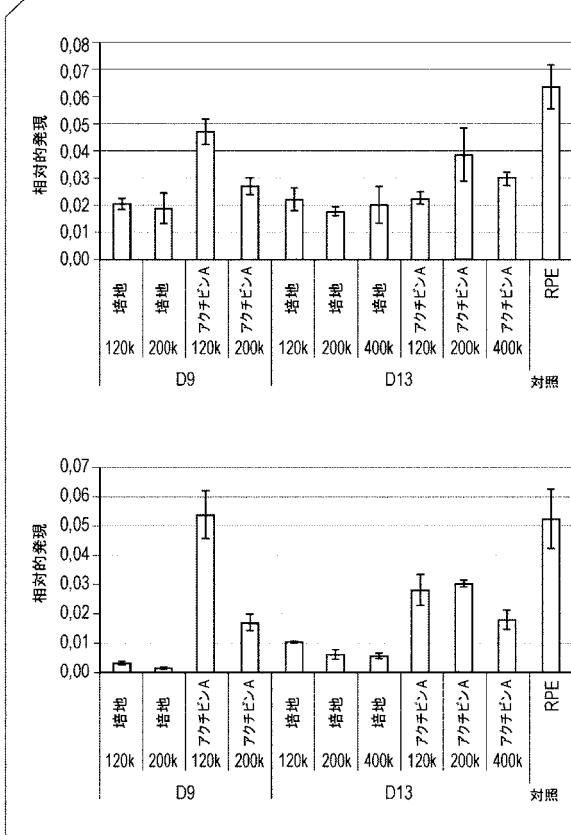
【図4-3】

図4D



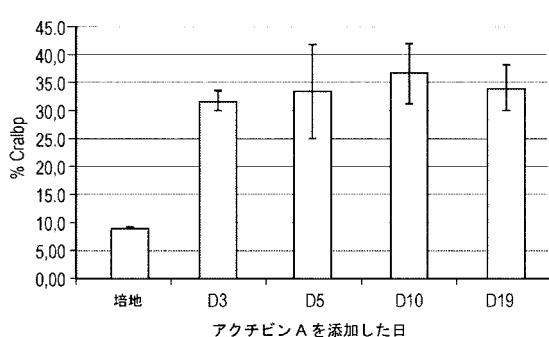
【図4-4】

図4E



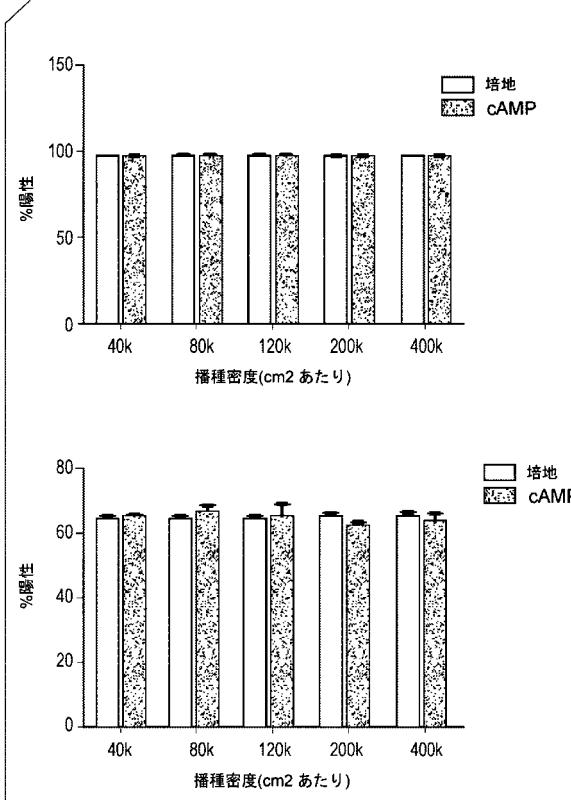
【図5】

図5

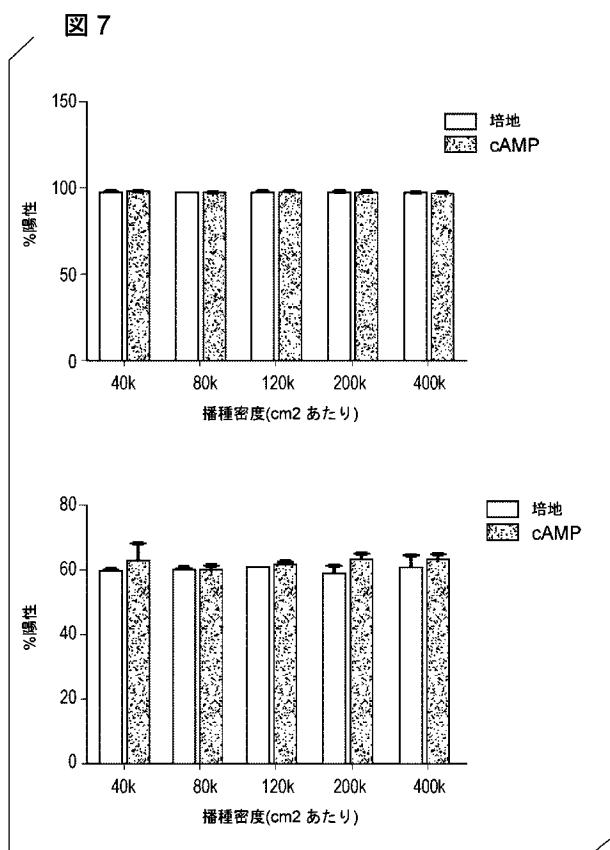


【図6】

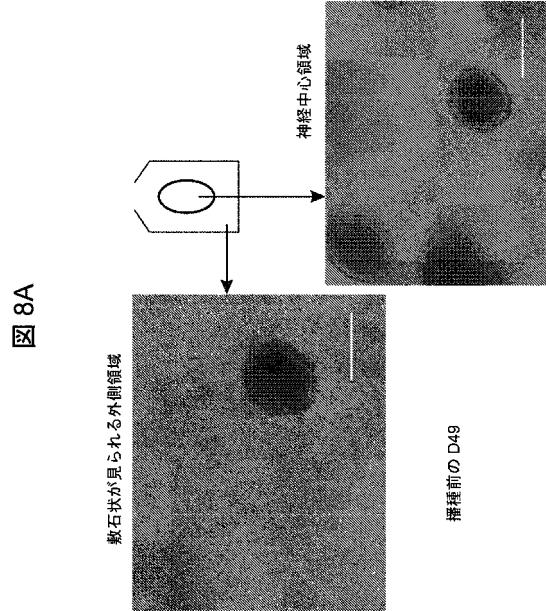
図6



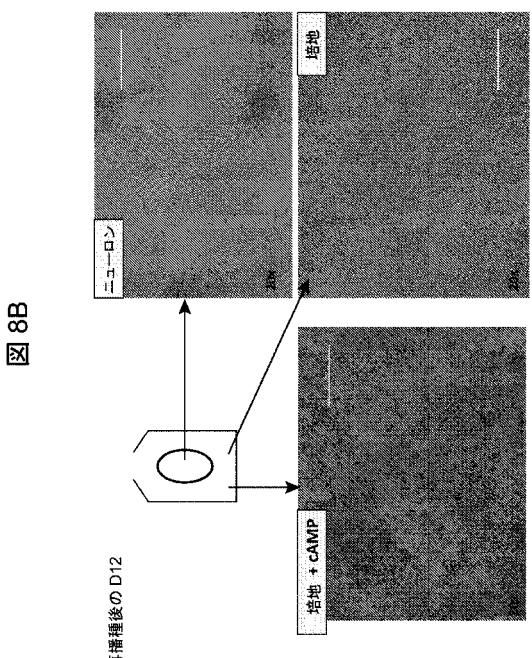
【図7】



【図8-1】

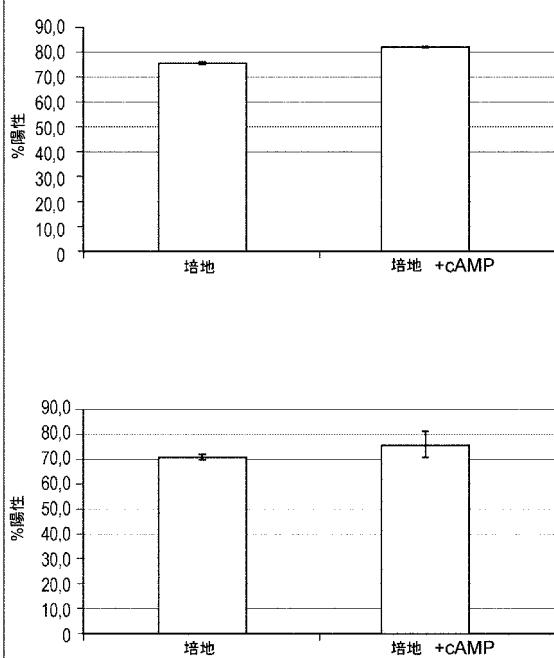


【図8-2】

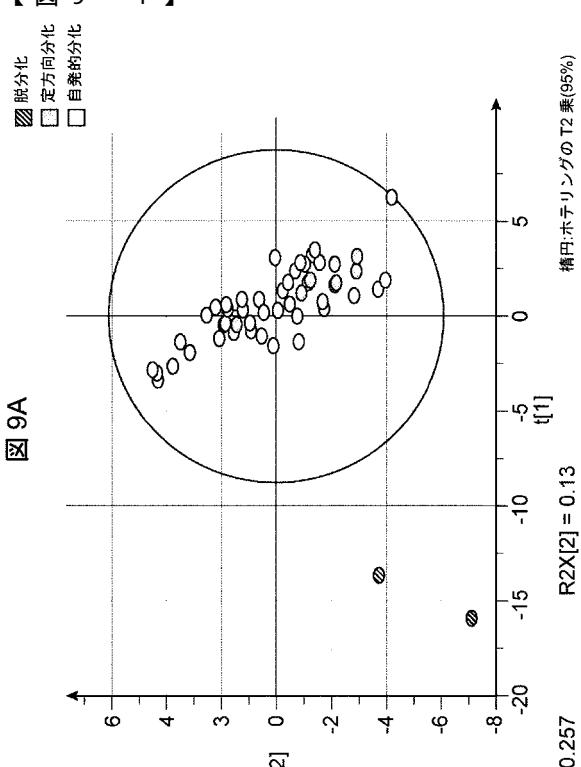


【図8-3】

図8C



【図 9 - 1】



【図 9 - 3】

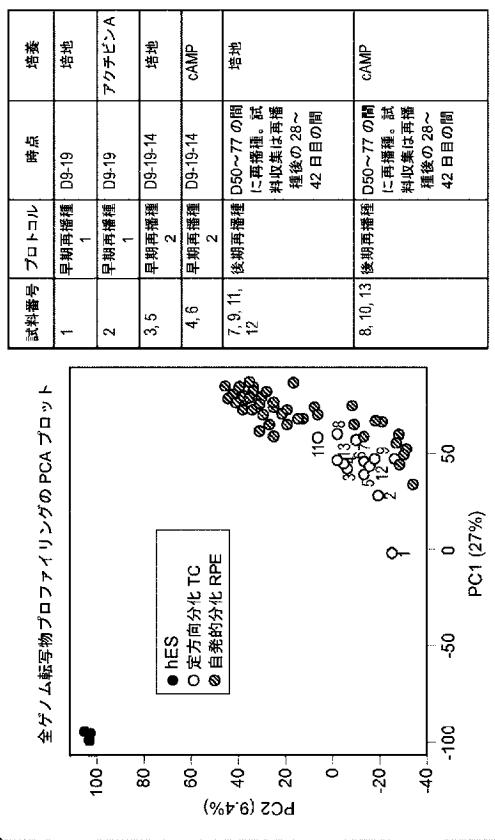


図 9C

■ 脱分化
■ 定方向分化
□ 自発的分化

【図 9 - 2】

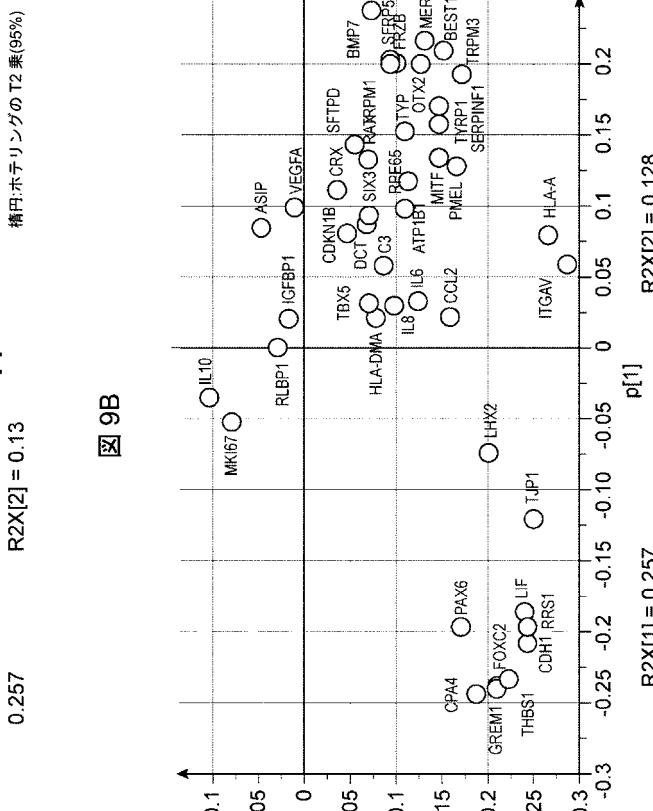
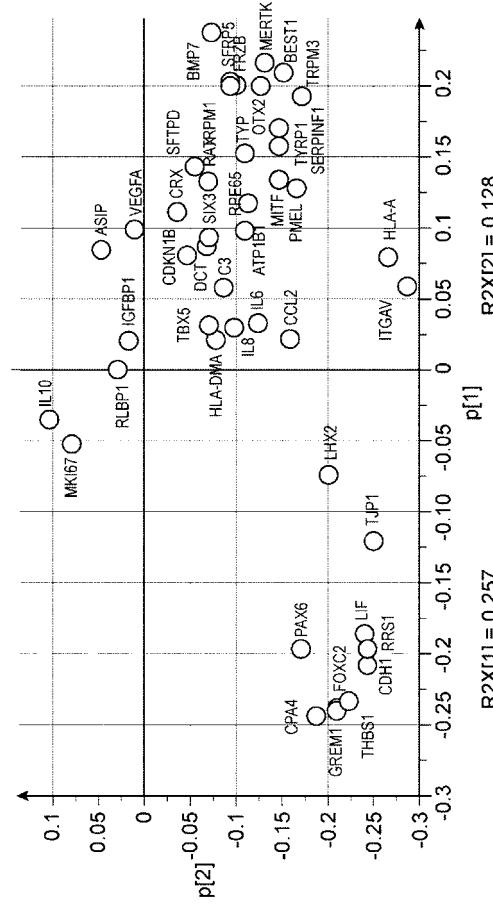
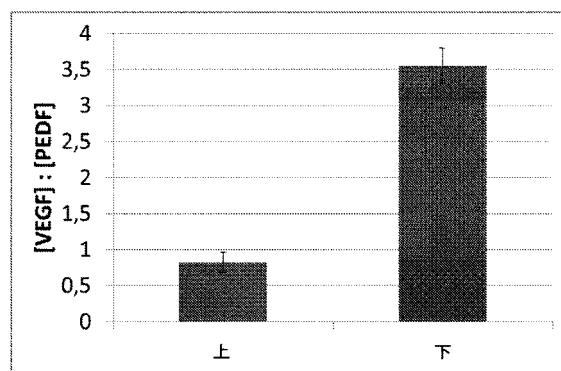


図 9B



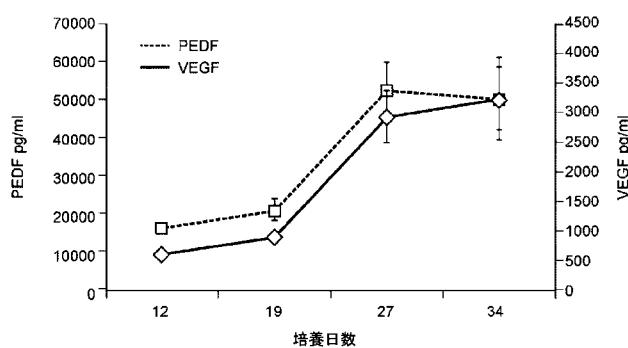
【図 10 - 1】

図 10A



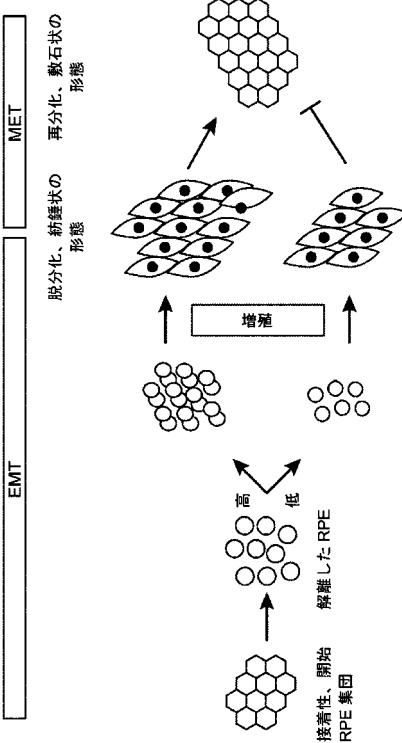
【図 10 - 2】

図 10B



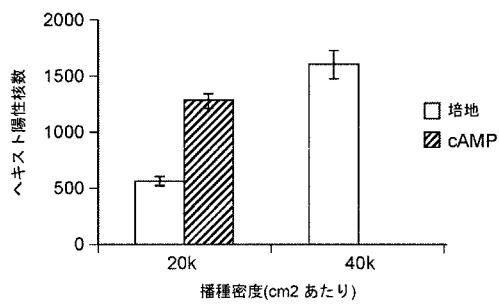
【図 11 - 1】

図 11A



【図 11 - 2】

図 11B



【図 11 - 3】

図 11D

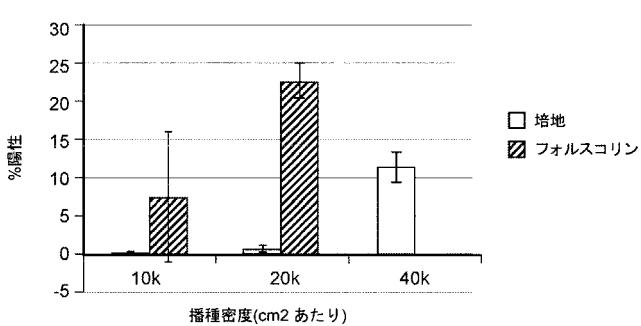
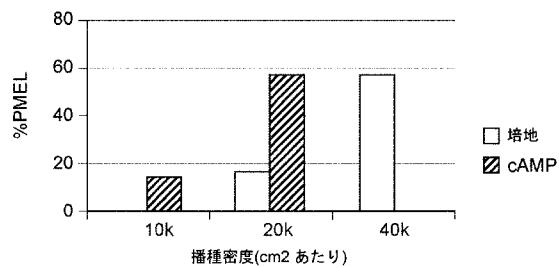


図 11C



【図 1 1 - 4】

図 11E

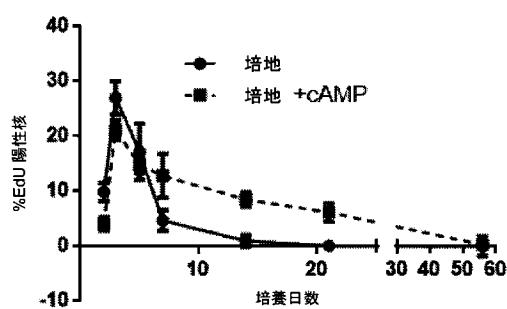
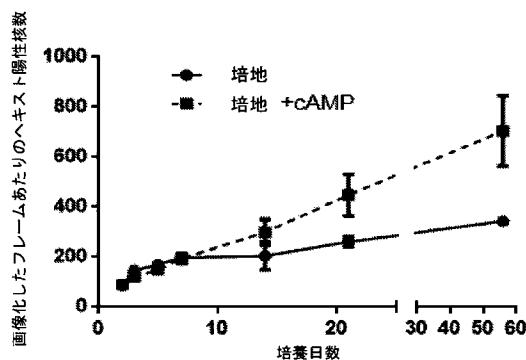


図 11F



【図 1 1 - 5】

図 11G

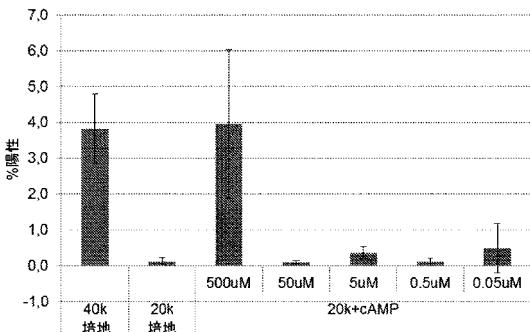
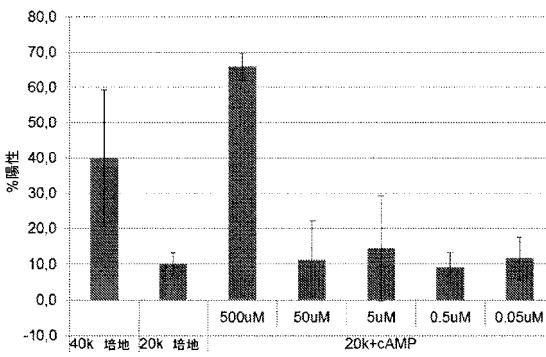


図 11H



【図 1 1 - 6】

図 11I

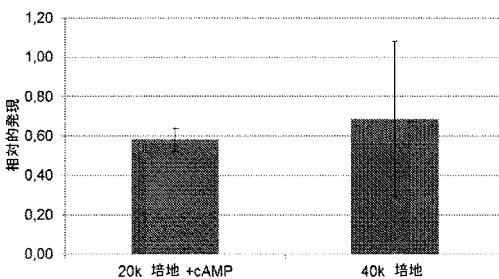
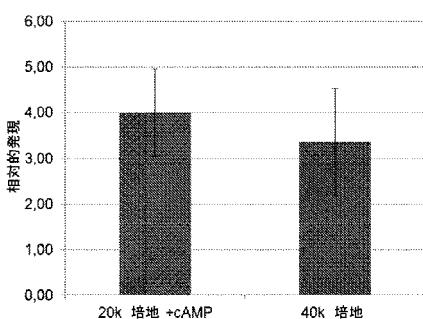
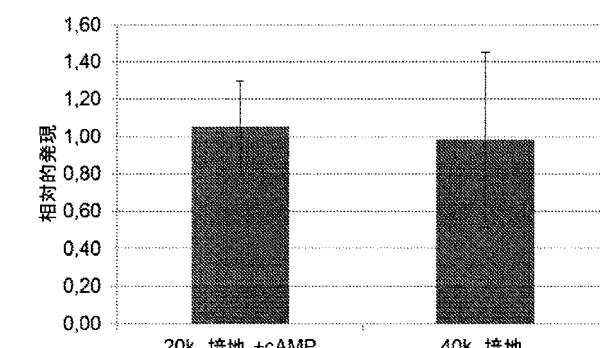


図 11J



【図 1 1 - 7】

図 11K



【図 12-1】

図 12A

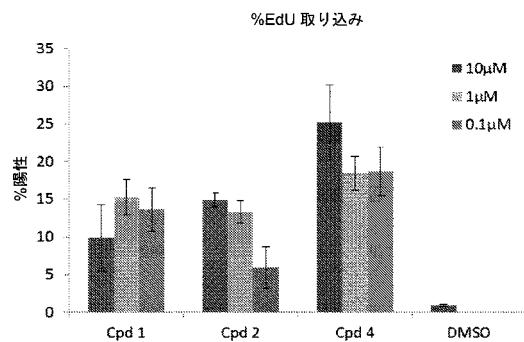


図 12B

【図 12-2】

図 12C

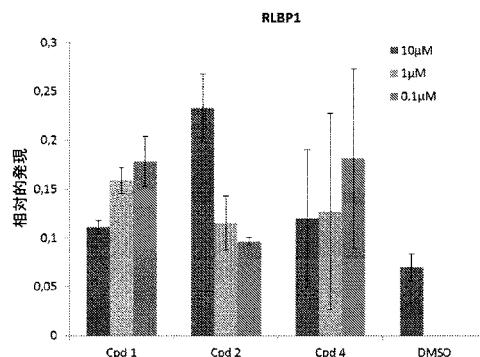
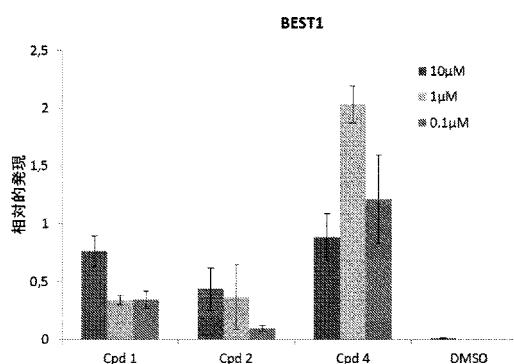


図 12D



【図 13-1】

図 13A

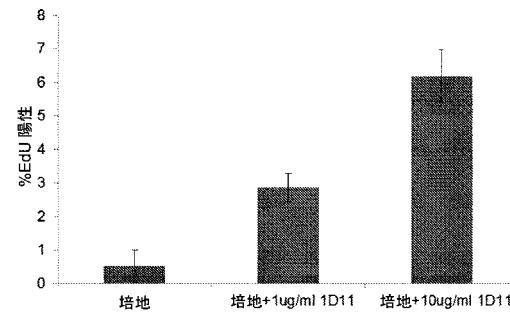


図 13B

【図 13-2】

図 13C

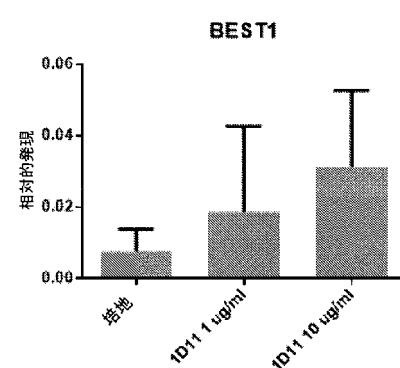
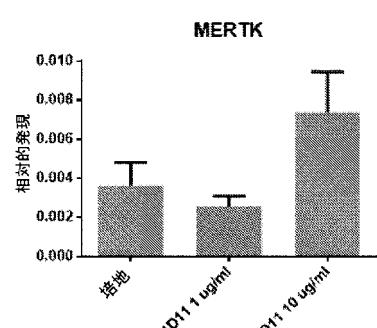
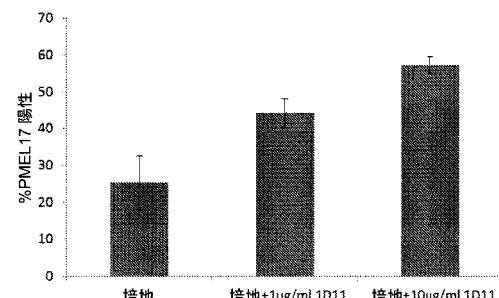


図 13D



【図 13-3】

図 13E

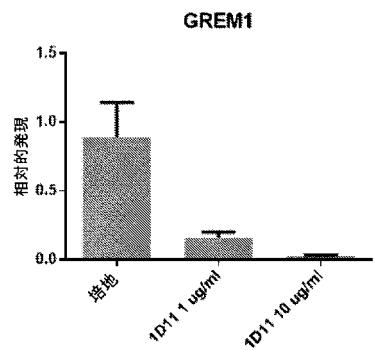


図 13F

【図 13-4】

図 13G

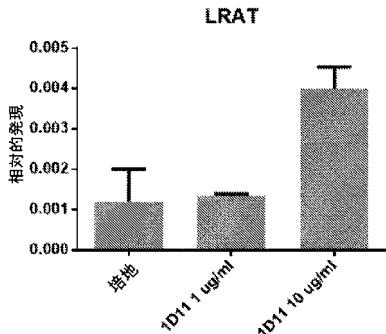
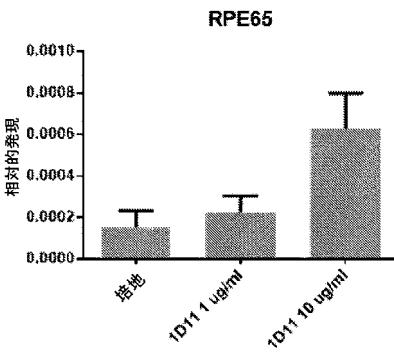
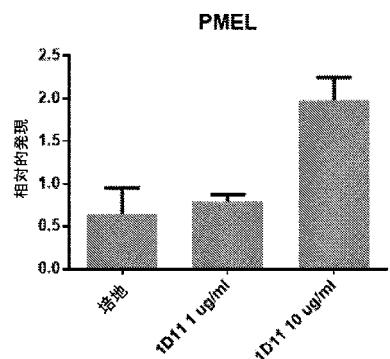


図 13H



【図 14】

図 14A

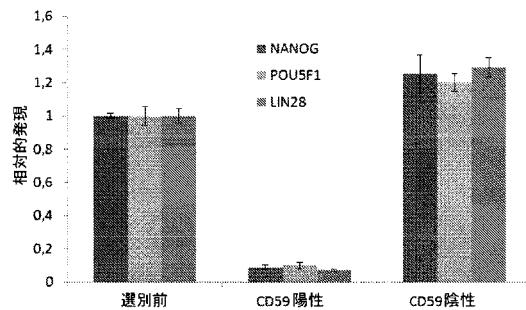
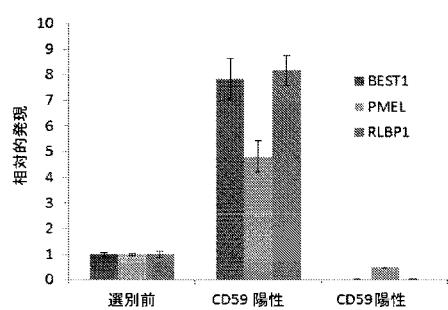


図 14B



【図 15-1】

図 15A

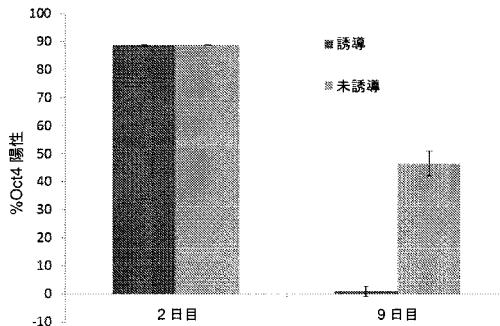
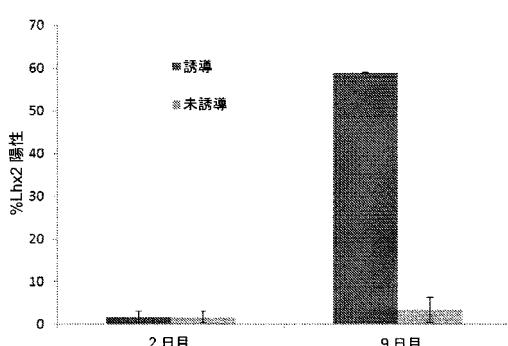


図 15B



【図 15 - 2】

図 15C

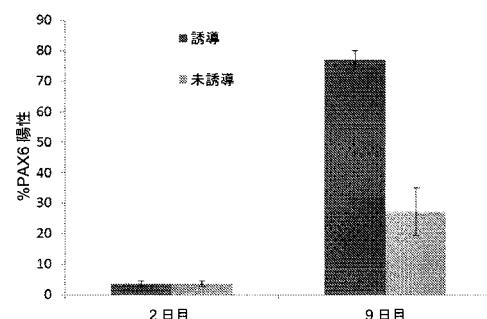


図 15D

【図 15 - 3】

図 15E

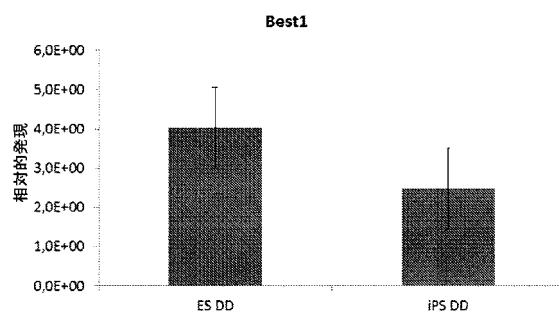
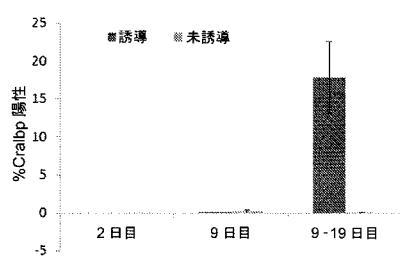
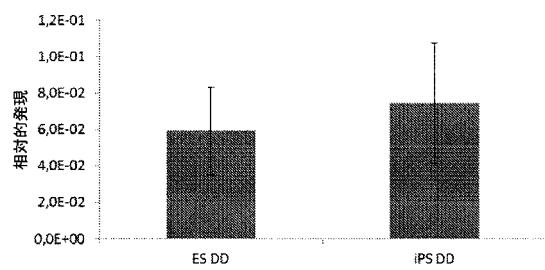


図 15F

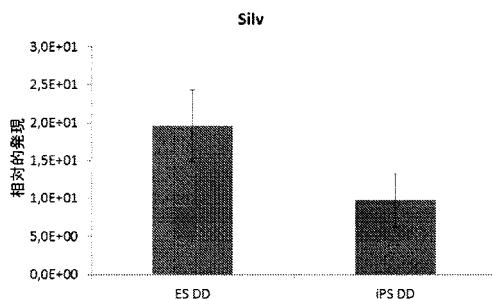


Merkt



【図 15 - 4】

図 15G



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/066703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/079
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMANDA-JAYNE F. CARR ET AL: "Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration", TRENDS IN NEUROSCIENCES, vol. 36, no. 7, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 385-395, XP055173782, ISSN: 0166-2236, DOI: 10.1016/j.tins.2013.03.006 the whole document Differentiation of RPE from HESCs; page 389 -----	124-127
A	Differentiation of RPE from HESCs; page 389 ----- -/-	1-108

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

12 May 2015

26/05/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou-Bourges, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2014/066703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OSAKADA FUMITAKA ET AL: "In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 122, no. 17, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 3169-3179, XP002604161, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.050393 abstract figure 2A	124-127
A	-----	1-108
A	WO 2011/149762 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; STUDER LORENZ [US]; CHAMBERS STUART) 1 December 2011 (2011-12-01) claims 19-21	1-108
A	----- STUART M CHAMBERS ET AL: "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 275-280, XP055007827, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1529 abstract	1-108
X	----- MARIA IDELSON ET AL: "Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells", CELL STEM CELL, vol. 5, no. 4, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 396-408, XP055046648, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2009.07.002 abstract figure 3	124-127
A	----- -/-	1-108

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2014/066703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEYER JASON S ET AL: "Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 106, no. 39, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 16698-16703, XP009132378, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0905245106 [retrieved on 2009-08-25]	124-127
A	abstract Eye Field Specification from Human Embryonic Stem Cells; page 16698 - page 16699	1-108
X	----- S. OKAMOTO ET AL: "Induction of Retinal Pigment Epithelial Cells from Monkey iPS Cells", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 52, no. 12, 6 September 2011 (2011-09-06), pages 8785-8790, XP055173843, ISSN: 0146-0404, DOI: 10.1167/iovs.11-8129	124-127
A	abstract -----	1-108
X	----- D. E. BUCHHOLZ ET AL: "Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium", STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE : SCTM, vol. 2, no. 5, 18 April 2013 (2013-04-18), pages 384-393, XP055114659, ISSN: 2157-6564, DOI: 10.5966/sctm.2012-0163	124-127
A	abstract figure 1A -----	1-108
X	----- JOSEPH REYNOLDS ET AL: "Human embryonic stem cell applications for retinal degenerations", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, vol. 123, 20 July 2013 (2013-07-20), pages 151-160, XP055173858, ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/j.exer.2013.07.010	124-127
A	the whole document page 153 -----	1-108
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2014/066703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YA FATOU NJIE-MBYE ET AL: "Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, vol. 98, 3 March 2012 (2012-03-03), pages 16-22, XP028418334, ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/J.EXER.2012.03.001 [retrieved on 2012-03-14] abstract -----	109-127
A	Ruchira Singh ET AL: "Retinal Cell Biology Functional Analysis of Serially Expanded Human iPS Cell- Derived RPE Cultures", 1 October 2013 (2013-10-01), pages 6767-6778, XP055188833, Retrieved from the Internet: URL: http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2202986 [retrieved on 2015-05-12] abstract page 6771, left-hand column -----	109-123
A	S. K. PARAPURAM ET AL: "Differential Effects of TGF and Vitreous on the Transformation of Retinal Pigment Epithelial Cells", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 50, no. 12, 2 July 2009 (2009-07-02), pages 5965-5974, XP055188841, ISSN: 0146-0404, DOI: 10.1167/iovs.09-3621 abstract figure 1 -----	109-123
A	GAMM DAVID M ET AL: "A novel serum-free method for culturing human prenatal retinal pigment epithelial cells", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE - IOVS, ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY, US, vol. 49, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 788-799, XP009142647, ISSN: 0146-0404, DOI: 10.1167/IOVS.07-0777 abstract ----- -/-	109-123

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/066703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUNG-CHI CHEN ET AL: "Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition", LABORATORY INVESTIGATION, vol. 92, no. 5, 5 March 2012 (2012-03-05), pages 676-687, XP055188845, ISSN: 0023-6837, DOI: 10.1038/labinvest.2011.201 abstract</p> <p>-----</p>	109-123
X	<p>J Liversidge ET AL: "CD59 and CD48 expressed by rat retinal pigment epithelial cells are major ligands for the CD2-mediated alternative pathway of T cell activation", The Journal of Immunology, 15 May 1996 (1996-05-15), pages 3696-3703, XP055188855, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL:http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/156/10/3696 [retrieved on 2015-05-12] abstract page 3698, left-hand column</p> <p>-----</p>	128-134

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/066703

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

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

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ IB2014/ 066703

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-108(completely); 124-127(partially)

A method for producing retinal pigment epithelial (RPE) cells comprising the steps of:
(a) culturing pluripotent cells in the presence of a first SMAD inhibitor and a second SMAD inhibitor;
(b) culturing the cells of step (a) in the presence of a BMP pathway activator and in the absence of the first and second SMAD inhibitors; and,
(c) replating the cells of step (b).
RPE cells, pharmaceutical composition, method for treatment

2. claims: 109-123(completely); 124-127(partially)

A method for expanding RPE cells comprising the following steps:
(a) plating RPE cells at a density of at least 1000 cells/cm², and,
(b) culturing said RPE cells in the presence of SMAD inhibitor, cAMP or an agent which increases the intracellular concentration of cAMP.
RPE cells, pharmaceutical composition, method for treatment

3. claims: 128-134

A method for producing RPE cells comprising:
a) providing a population of pluripotent cells;
b) inducing the differentiation of pluripotent cells into RPE cells, and,
c) enriching the cell population for cells expressing CD59.
A method for purifying RPE cells comprising:
a) providing a cell population comprising RPE cells and non RPE cells;
b) increasing the percentage of RPE cells in the cell population by enriching the cell population for cells expressing CD59.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2014/066703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011149762	A2	01-12-2011	AU 2011258634 A1	06-12-2012
			CA 2800500 A1	01-12-2011
			EP 2577318 A2	10-04-2013
			JP 5677698 B2	25-02-2015
			JP 2013532961 A	22-08-2013
			JP 2015038150 A	26-02-2015
			US 2013183674 A1	18-07-2013
			WO 2011149762 A2	01-12-2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 パールー チャウダリー

イギリス国 C B 2 1 6 G S ケンブリッジ州 グレイト・アビントン市 グランタ・パーク
ポートウェイ・ビルディング ニューセンティス内

(72)発明者 ベアタ サーマツ - コードレ

イギリス国 C B 2 1 6 G S ケンブリッジ州 グレイト・アビントン市 グランタ・パーク
ポートウェイ・ビルディング ニューセンティス内

(72)発明者 ヘザー ドーン エレン ブース

イギリス国 C B 2 1 6 G S ケンブリッジ州 グレイト・アビントン市 グランタ・パーク
ポートウェイ・ビルディング ニューセンティス内

(72)発明者 ポール ジョン ホワイティング

イギリス国 C B 2 1 6 G S ケンブリッジ州 グレイト・アビントン市 グランタ・パーク
ポートウェイ・ビルディング ニューセンティス内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BB04 BB13 BC50 CA44
4C087 AA01 AA03 BB56 BB64 NA14 ZA33