

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6517702号
(P6517702)

(45) 発行日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日(2019.4.26)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	5/071	(2010.01)	C 12 N	5/071	Z N A
C 12 N	15/113	(2010.01)	C 12 N	15/113	Z
A 61 K	35/39	(2015.01)	A 61 K	35/39	
A 61 P	3/10	(2006.01)	A 61 P	3/10	
C 07 K	14/485	(2006.01)	C 07 K	14/485	

請求項の数 14 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-556262 (P2015-556262)
(86) (22) 出願日	平成26年2月6日(2014.2.6)
(65) 公表番号	特表2016-506736 (P2016-506736A)
(43) 公表日	平成28年3月7日(2016.3.7)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/015156
(87) 國際公開番号	W02014/124172
(87) 國際公開日	平成26年8月14日(2014.8.14)
審査請求日	平成29年2月1日(2017.2.1)
(31) 優先権主張番号	13/761,078
(32) 優先日	平成25年2月6日(2013.2.6)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	508255333 ヴィアサイト インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サンディエゴ ジェネラル アトミックス コート 3550
(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(74) 代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(74) 代理人	100111235 弁理士 原 裕子
(72) 発明者	アグルニック、アラン ディー。 アメリカ合衆国 92129 カリフォルニア州 サンディエゴ アローヨ グランデ ロード 7384

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脱分化したリプログラミングされた細胞から導出された細胞組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

in vitroヒト臍内胚葉細胞集団、ノギン、KGF、EGF、およびERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質を含み、前記ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質がヘレグリン-1を含む、

組成物。

【請求項 2】

前記ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質がさらにヘレグリン-4を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

さらにrhokinase阻害剤を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項1または2に記載の組成物を生成する方法であって、

前腸内胚葉細胞集団をノギン、KGF、EGF、および前記ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を含む前記組成物を生成するステップを含む方法。

【請求項 5】

前腸内胚葉細胞の培養物をrhokinase阻害剤と接触させることをさらに含む、請求項4に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

r h o キナーゼ阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、ファスジル、H - 1 1 5 2 P、W f - 5 3 6、Y - 3 0 1 4 1、およびROCKのアンチセンス核酸からなる群から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

r h o キナーゼ阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、ファスジル、H - 1 1 5 2 P、W f - 5 3 6、およびY - 3 0 1 4 1からなる群から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

R h o キナーゼ阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、ファスジル、およびH - 1 1 5 2 Pからなる群から選択される、請求項7に記載の方法。 10

【請求項 9】

請求項 1 または 2 に記載の組成物を生成する方法であって、

a . 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞を、TGF 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を含む第 1 の培地と in vitro で接触させるステップと、

b . TGF 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を欠く第 2 の培地でステップ(a)の細胞を in vitro で培養し、それにより前腸内胚葉細胞を生成するステップと、

c . ステップ(b)の前腸内胚葉細胞をノギン、KGF、EGF、および前記 ERBB 受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を含む前記組成物を生成するステップとを含む方法。 20

【請求項 10】

非内分泌細胞が CHGA 陰性 (CHGA-) 細胞である、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

内分泌細胞が CHGA 陽性 (CHGA+) 細胞である、請求項9に記載の方法。

【請求項 12】

CHGA 陰性 (CHGA-) 細胞がさらにNKX6.1 を発現する、請求項10に記載の方法。 30

【請求項 13】

前腸内胚葉細胞を r h o キナーゼ阻害剤と接触させることをさらに含む、請求項9 ~ 12のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

r h o キナーゼ阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、ファスジル、H - 1 1 5 2 P、W f - 5 3 6、Y - 3 0 1 4 1、およびROCKのアンチセンス核酸からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2013年2月6日に出願された米国特許出願第13/761,078号、表題 CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLSの優先権を主張し、それは、2010年4月22日に出願された米国特許出願第12/765,714号、表題 CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLSの一部継続出願であり、それは、米国特許法第119(e)条の下で、2009年4月22日に出願された米国特許仮出願第61/171,759号、表題 CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLSの優先権を主張する非仮出願であり、それらの開示は参照により完全に本明細書に組み込 40

まれる。

【0002】

配列表

本出願は、電子フォーマットの配列表とともに出願されている。配列表は、2013年1月28日に作成された、CYTHERA068P1.TXTという名称のサイズが8.92Kbのファイルで提供される。配列表の電子フォーマットの情報は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0003】

本発明は、一般に、細胞培養物の単離、維持および使用に関する。より具体的には、本発明は、人工多能性幹細胞から導出された細胞組成物に関する。

10

【背景技術】

【0004】

多能性細胞の重要な用途は、細胞療法でのそれらの使用である。多能性幹細胞には、ヒト胚性幹(hES)細胞、ヒト胚性生殖(hEG)細胞が含まれるが、これらに限定されない。さらに他のタイプの多能性細胞が存在し、例えば、脱分化したマウスおよびヒトの幹細胞、すなわち分化した体性成体細胞は脱分化して多能性様幹細胞になる。ES細胞に類似した多能性および成長能力を有する細胞を確立するために誘導されるこれらの脱分化した細胞は、「人工多能性幹(iPS)細胞」、「胚性幹細胞様細胞」、「ES様細胞」またはそれらの同等物とも呼ばれる。そのような細胞は、潜在的に存続可能な代替多能性細胞である。iPS細胞の治療的適用には、糖尿病および他の疾患を治療するための前臨床研究でこれらの細胞が安定であり、適当な安全性プロファイルを示すことを実証することが必要である。多能性状態への分化したヒト体性細胞のリプログラミングは、患者および疾患特異的幹細胞を可能にする。Takahashi, K.らCell, 1~12, 2007およびJu, J.らScience 2007を参考されたい。TakahashiらおよびJuらは、iPS細胞を生成するために4つの遺伝子を成体および胎児/新生児の線維芽細胞に各々導入した:Oct4、Sox2、Klf4およびc-myc、Takahashiら; Oct4、Sox2、NanogおよびLin28、Juら。いずれの場合にも、iPS細胞は、hES細胞形態、マーカー発現、長期にわたる増殖、正常な核型および多能性などの、hES細胞の一部の特徴を有していた。

20

【0005】

iPS細胞は関連する倫理論争なしで細胞療法に基づく再生医療を提供することができるが、iPS細胞の分化特性、例えばin vitroでの分化潜在能力および分化効率はなお不明であり、iPS細胞のための指向性分化方法は実証されていない。したがって、iPS細胞の詳細な分化特性および指向性分化効率を判定し、実証する必要性がある。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本明細書に記載される実施形態は、多能性細胞、例えば人工多能性幹(iPS)細胞などの脱分化したリプログラミングされた細胞から導出された細胞組成物を提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

一実施形態は、ヒト細胞を含む組成物およびヒト細胞を含むin vitro細胞培養物を作製する方法を提供し、ヒト細胞の少なくとも約15%は胚体内胚葉細胞であり、胚体細胞は脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される。一態様では、胚体内胚葉細胞は、それから導出される腸管または器官の細胞に分化することができる多分化能細胞である。

【0008】

別の実施形態は、ヒト細胞を含む組成物およびヒト細胞を含むin vitro細胞培養物を作製する方法を提供し、ヒト細胞の少なくとも約15%は胰臓-十二指腸ホメオボックス因子1(PDX1)陽性の前腸内胚葉細胞であり、PDX1陽性の前腸内胚葉細胞

50

は脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される。一態様では、PDX1陽性の前腸内胚葉細胞は、PDX1、SOX9、PROX1およびHNF6に関して共陽性である。

【0009】

さらなる実施形態は、ヒト細胞を含む組成物およびヒト細胞を含むin vitro細胞培養物を作製する方法を提供し、ヒト細胞の少なくとも約15%は臍臓-十二指腸ホメオボックス因子1(PDX1)陽性の臍臓前駆細胞であり、PDX1陽性の臍臓前駆細胞は脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される。一態様では、PDX1陽性の臍臓前駆細胞は、PDX1およびNKX6.1に関して共陽性である。

【0010】

さらなる別の実施形態は、ヒト細胞を含む組成物およびヒト細胞を含むin vitro細胞培養物を作製する方法を提供し、ヒト細胞の少なくとも約15%はNeurogenin3(NGN3)陽性の内分泌先駆細胞であり、NGN3内分泌先駆細胞は脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される。一態様では、NGN3陽性の内分泌先駆細胞は、NGN3、PAX4およびNKX2.2に関して共陽性である。

本明細書に記載される細胞培養組成物のさらなる実施形態は、脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出された分化した細胞およびERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質を含む、in vitroヒト臍臓内胚葉細胞培養物を含む。

本明細書に記載される追加の実施形態は、インスリンを生成する方法に関する。一部のそのような実施形態では、この方法は、(a)脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出された少なくとも前腸内胚葉細胞培養物および/または少なくともPDX1陰性前腸内胚葉細胞培養物をERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質とin vitroで接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む臍臓内胚葉細胞集団を生成するステップと、(b)ステップ(a)の臍臓内胚葉細胞集団またはステップ(a)の細胞亜集団をin vivoで移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌する、ステップとを含む。

本明細書に記載されるさらなる他の実施形態は、インスリンを生成する方法であって、(a)脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞を、TGF受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を含む第1の培地とin vitroで接触させるステップと、(b)TGF受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を欠く第2の培地でステップ(a)の細胞をin vitroで培養し、それにより、少なくとも前腸内胚葉細胞および/または少なくともPDX1陰性前腸内胚葉細胞を生成するステップと、(c)ステップ(b)の細胞をERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を生成するステップと、(d)ステップ(c)の細胞集団またはステップ(c)の細胞亜集団をin vivoで移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌する、ステップとを含む方法に関する。本明細書に記載されるさらに他の実施形態は、少なくとも前腸内胚葉細胞、少なくともPDX1陰性前腸内胚葉細胞および/または少なくともPDX1陽性臍臓内胚葉細胞を含む集団を、ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質およびrhοキナーゼ阻害剤と接触させ、それにより、in vivoでグルコース応答性インスリン分泌細胞に成熟することが可能な細胞集団を生成することに関する。

本明細書に記載されるさらに他の実施形態は、少なくとも前腸内胚葉細胞、少なくともPDX1陰性前腸内胚葉細胞および/または少なくともPDX1陽性臍臓内胚葉細胞を含む集団を、ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質およびrhοキナーゼ阻害剤と接触させ、それにより、in vivoでグルコース応答性インスリン分泌細胞に成熟することが可能な細胞集団を生成することに関する。

本明細書で使用される場合、語句「少なくとも前腸内胚葉細胞」、「少なくともPDX1陰性前腸内胚葉細胞」および「少なくともPDX1陽性臍臓内胚葉細胞」は、細胞集団

10

20

30

40

50

の細胞のいくつかまたは一部が、臍島細胞へのそれらの分化の中で、iPSCから前腸内胚葉細胞またはそれ以上、iPSCからPDX1陰性前腸内胚葉細胞またはそれ以上、および/またはiPSCからPDX1陽性臍臓内胚葉細胞またはそれ以上に分化していることを意味する。

本明細書で使用される場合、細胞集団の細胞に言及するとき、語句「いくつか」および/または「一部」は、細胞集団が、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも95%を超える指定された細胞型の細胞を含むことを意味する。 10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】脱分化したリプログラミングされた細胞、または本明細書でiPS細胞とも呼ばれる細胞の凝集懸濁培養の写真画像である。

【0012】

【図2A-L】OCT4(図2A)、BRACHYURY(図2B)、CER1(図2C)、GSC(図2D)、FOXA2(図2E)、FOXA1(図2F)、HNF6(図2G)、PDX1(図2H)、PTF1A(図2I)、NKX6.1(図2J)、NGN3(図2K)およびINS(図2L)の相対的な遺伝子発現レベルを示す棒グラフである。 20 発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子、サイクロフィリンGおよびTATA結合タンパク質(TBP)発現の平均発現レベルに標準化される。グラフは、データセット中の最も低いデータポイントからの上方制御倍率を表す。

【0013】

【図3A-3D】(3A)PDX-1；(3B)NKX6.1；(3C)PTF1A；および(3D)Dapiに特異的な抗体を使用したステージ4分化からのヒトiPS細胞培養物の免疫細胞化学(ICC)の顕微鏡写真である。

【0014】

【図4A-4D】(図4A)グルカゴン、(図4B)インスリン、(図4C)ソマトスタチンおよび(図4D)Dapiに特異的なリガンドを使用した、ステージ4分化からのiPS細胞培養の免疫細胞化学(ICC)の写真である。 30

【図5A-B】R&D SystemsからのProteome Profiler(商標)ヒトホスホRTK抗体アレイで提供されるアレイ位置図およびアレイキーを示す図である。図5Aの位置図は、RTK抗体の座標または位置を示す。RTKファミリーおよび抗体のアイデンティティまたは名前は、図5Bのキーに記載される。したがって、現像したフィルムで観察される陽性シグナルは、図5Aのように透明画をオーバーレイし、図5BのRTKの名前でオーバーレイ(図5A)の上の座標を参照することによってシグナルを同定することによって、同定することができる。

【図6A-D】4つの異なる条件(実施例5に記載されるように、図A、B、CおよびD)下のiPS細胞導出臍臓内胚葉細胞(PEC)のRTKアレイ分析を示す図である。特定のRTKのチロシンリン酸化が、高強度から低強度のシグナルの同定によって観察される。IGF1R/IRおよびERBB(EGFR)ファミリーメンバーが同定されるか、四角で囲まれる。 40

【図7A-C】表9に示すように、実験E2314、E2356およびE2380(図7A)、E2347(図7B)ならびにE2354(図7C)の移植されたマウスの血清中のヒトCペプチドおよびインスリンの濃度を示すグラフである。空腹時、ならびに腹腔内グルコース投与の30分および60分後に、ヒトCペプチドの血清レベルについてPECを移植したマウスを指示された移植後時点で分析した。図7Cで、細胞封入デバイス(Encaptra(登録商標)EN20またはEN20、Viacyte、San Diego、CA)でPECを封入し、一部の場合には、デバイスは微穿孔を有した(pEN2 50

0、ViaCyte、San Diego、CA)。そのようなデバイスは、米国特許第8,278,106号に記載され、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【図8A-8B】実験#2347のSTZ処置マウスの血中グルコース分析の結果を示すグラフである。図8Aは、13匹の各マウスの血中グルコースを示し(ヘレグリンの有る無しによるベースライン)、図8Bは、各処置の合わせた平均測定値を示す(ヘレグリンの有る無しによるベースライン)。STZによる処置(0日目)の最大14日前までにiPEC移植片を移植した13匹のマウスについて、同じマウスについてSTZ処置の後、および移植片を外植した後の、ランダムな非絶食血中グルコースレベルの測定値を示す。STZ処置動物は、移植片の移植から約26週後にSTZを与えられた(0日目)。移植片移植から28週後、STZ処置の開始からおよそ2週後に、iPEC移植片を外植した(取り出した)。各動物につき、非絶食血中グルコース測定値を経時的に収集した。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、本明細書に含まれる本発明の好ましい実施形態および実施例の以下の詳細な説明を参照することによって容易に理解することができる。しかし、本化合物、組成物、および方法の開示および記載の前に、本発明は、特定の細胞型、特定のフィーダー細胞層、特定の条件、または特定の方法などに限定されず、それ自体変わり得ることが理解されるべきである。多数の改変および変形が当業者には明らかであろう。本明細書において使用される用語は、単に特定の実施形態を記載するためのものであり、限定的なものではないことも理解されるべきである。

【0016】

定義

本明細書で表される数値範囲は、記載されている終点を含み、示された数値範囲の終点間の全ての整数を記載するものであることが理解されよう。

【0017】

特に断りのない限り、本明細書で使用される用語は、当業者による従来の使用に従って理解される。また、本明細書および添付の特許請求の範囲の目的に関して、別段に特定されていない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される成分の分量、材料の百分率または割合、反応条件を表す数、および他の数値は全て、全ての場合に「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。したがって、それに反する指示がない限り、以下の明細書および添付されている特許請求の範囲に記載されている数値パラメータは、本発明によって得られるべき所望の性質に応じて変動し得る近似値である。最低限、かつ特許請求の範囲への均等論の適用を限定しようとするものではなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告されている有意な桁数に照らして、および通常の丸め技法を適用することによって解釈されるべきである。

【0018】

本明細書に記載の実施形態の実施には、別段に特定されていない限り、細胞生物学、分子生物学、遺伝学、化学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技法が使用される。

【0019】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、单数形「a」、「an」および「the」には、文脈が明らかに別に指示しない限り、複数形が含まれることを理解するべきである。したがって、例えば、「細胞」への言及には1つまたは複数のそのような異なる細胞が含まれ、「方法」への言及には、本明細書に記載される方法に代えて改変または置換することができる、当業者に公知である同等のステップおよび方法への言及が含まれる。

【0020】

「細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、個々の細胞、細胞系、またはそのような細胞から導出される培養物を指す。「培養物」とは、同じまたは異なる種類の単離された細胞を含む組成物を指す。

10

20

30

40

50

【0021】

本明細書で使用される場合、「全能性幹細胞」という句は、卵細胞と精子細胞の融合から生成する細胞などの、生物体を構成する全ての細胞に分化する能力を有する細胞を指す。受精卵の最初の数回の分裂によって生成する細胞も全能性であり得る。これらの細胞は、胚および胚体外細胞系列に分化することができる。例えばES細胞などの多能性幹細胞は、いかなる胎児または成体の細胞型も生じ得る。しかし、これらは、胚体外組織に発達する能力を欠くので、単独では胎児または成体動物に発達することはできない。胚体外組織は、一部において、胚体外内胚葉から導出され、遠位内胚葉(*parietal endoderm*) (ライヘルト膜) および近位内胚葉(*visceral endoderm*) (卵黄嚢の一部を形成する) にさらに分類することができる。遠位内胚葉および近位内胚葉はどちらも胚の発生を支持するが、それら自体は胚構造を形成しない。胚体外中胚葉および胚体外外胚葉を含めた他の胚体外組織も存在する。

10

【0022】

一部の実施形態では、「多能性細胞」を、内胚葉系列、より詳細には、臍臓内胚葉型細胞に分化させるための出発材料として使用する。本明細書で使用される場合、「多能性」または「多能性細胞」またはその等価物とは、細胞培養物中で増殖することができ、かつ多分化能の性質を示す種々の系列限定的な細胞集団に分化することができる細胞を指し、例えば、多能性ES細胞および人工多能性幹(iPS)細胞はどちらも、3種の胚細胞系列のそれぞれを生じ得る。しかし、多能性細胞は、生物体全体を生成することはできない場合がある。すなわち、多能性細胞は全能性ではない。

20

【0023】

ある特定の実施形態では、出発材料として使用される多能性細胞は、hES細胞、hEG細胞、iPS細胞、さらには单為発生細胞などを含めた幹細胞である。本明細書で使用される場合、「胚(embryonic)」とは、単一の接合体から始まり、もはや発生した配偶子細胞以外の多能性または全能性細胞を含まない多細胞構造で終わる生物体の様々な発生ステージを指す。「胚(embryonic)」という用語は、配偶子融合によって導出された胚に加えて、体細胞核移植によって導出された胚も指す。さらに別の実施形態では、多能性細胞は胚から導出されたまたは直接導出されたものではなく、例えば、iPS細胞は、非多能性細胞、例えば多分化能細胞または最終分化した細胞から導出されたものである。

30

【0024】

ヒト多能性幹細胞は、分化を導く遺伝子の抑制および多能性の維持を確実にするコア調節複合体を形成する転写因子Oct-4、Nanog、およびSox-2などのいくつかの転写因子および細胞表面タンパク質、ならびに糖脂質SSEA3、SSEA4およびケラタン硫酸抗原、Tra-1-60およびTra-1-81などの細胞表面抗原が存在すると定義または特徴付けることもできる。

【0025】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞」または「iPS細胞」または「iPSC」という句は、非多能性細胞、一般には成体の体細胞、または、例えば線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、ニューロン、表皮細胞などの最終分化した細胞から、リプログラミング因子と称される特定の遺伝子または遺伝子産物を挿入することによって人工的に調製された多能性幹細胞の一種を指す。その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる、Takahashiら、Cell、131:861-872(2007); Wernigら、Nature、448:318-324(2007); Parkら、Nature、451:141-146(2008)を参照されたい。人工多能性幹細胞は、hES細胞などの天然のヒト多能性幹細胞と、ある特定の幹細胞遺伝子およびタンパク質の発現、クロマチンメチル化パターン、倍加時間、胚葉体形成、奇形腫形成、生存可能なキメラ形成、ならびに発生能および分化可能性(differentiability)を含めた多くの点で実質的に類似している。ヒトiPS細胞により、胚の使用を伴うことなく多能性幹細胞の供給源がもたらされる。

40

50

【0026】

i P S 細胞を生成するために様々な方法を用いることができ、それらは本明細書において下でさらに詳細に記載される。しかし、全ての方法は、Sox - 2、Oct - 4、Nanog および任意選択で Lin - 28 をコードする発現力セット、または Sox - 2、Oct - 4、Klf4 および任意選択で c - myc をコードする発現力セット、または Sox - 2、Oct - 4 および任意選択で Esrrb をコードする発現力セットなどの特定のリプログラミング因子を用いる。これらのリプログラミング因子をコードする核酸は、同じ発現力セット、異なる発現力セット、同じリプログラミングベクター、または異なるリプログラミングベクターの中にあってもよい。Oct - 3 / 4 および Sox 遺伝子ファミリーの特定のメンバー (Sox - 1、Sox - 2、Sox - 3 および Sox - 15) は、10 その不在により誘導を不可能にする、誘導プロセスに関与する大事な転写制御因子である。Oct - 3 / 4 (Pou5f1) は八量体 (「Oct」) 転写因子のファミリーの 1 つであり、多能性の維持で重要な役割をする。例えば、通常 Oct - 3 / 4 + の細胞、例えば割球および胚性幹細胞中の Oct - 3 / 4 の不在は、自発的な栄養芽細胞分化につながり、一方、Oct - 3 / 4 の存在は、胚性幹細胞の多能性および分化潜在能力をもたらす。さらに、「Oct」ファミリーの他の遺伝子、例えば Oct 1 および Oct 6 は多能性を誘導せず、したがって、この多能性誘導プロセスは Oct - 3 / 4 に帰することができる。20 Oct - 3 / 4 に類似の多能性の維持に関連する遺伝子の別のファミリーは、Sox ファミリーである。しかし、Sox ファミリーは多能性細胞型に限定的でなく、多分化能および単能性幹細胞にも関連する。Sox ファミリーは誘導プロセスでも働くことが見出されている。上記 Takahashi ら、2006 による初期研究では、Sox 2 が使用された。それ以来、Sox 1、Sox 3、Sox 15 および Sox 18 遺伝子によっても i P S 細胞が生成されている。Klf ファミリーの遺伝子 (Klf - 1、Klf 2、Klf 4 および Klf 5) の Klf 4 は、当初はマウス i P S 細胞の生成の因子として、上記 Yamamoto ら 2006 によって同定された。本明細書において、S. Yamamoto からのヒト i P S 細胞は、h I P S 細胞の細胞療法適用を探索するために使用した。しかし、上記 Yular 2007 は、Klf 4 が必要とされないこと、および実際ヒト i P S 細胞を生成することができなかったことを報告した。Klf 1、Klf 2 および Klf 5 を含む Klf ファミリーの他のメンバーは、i P S 細胞を生成することが可能である。30 最後に、Myo ファミリー (C - myc、L - myc および N - myc) 、がんと結びつけられているがん原遺伝子；c - myc は、マウスおよびヒトの i P S 細胞の生成と結びつけられた因子であったが、上記 Yular (2007) は、c - myc がヒト i P S 細胞の生成のために必要とされなかつたことを報告した。

【0027】

本明細書で使用される場合、「多分化能」または「多分化能細胞」またはその等価物は、限られた数の他の特定の細胞型を生じさせることができる細胞型を指す。すなわち、多分化能細胞は 1 つまたは複数の胚細胞の運命に傾倒し、したがって、多能性細胞とは対照的に、3 種の胚細胞系列のそれぞれ、ならびに胚体外細胞を生じさせることができない。多分化能細胞は、多能性細胞よりも分化しているが、最終分化はしていない。したがって、多能性細胞の発生能は多分化能細胞よりも高い。体細胞をリプログラミングすることまたは i P S 細胞を生じさせるために使用することができる発生能決定因子としては、これだけに限定されないが、Oct - 4、Sox 2、FoxD3、UTF1、Stell1a、Rex1、ZNF206、Sox15、Myb12、Lin28、Nanog、DPPA2、ESG1、Otx2 またはこれらの組合せなどの因子が挙げられる。40

本明細書で使用される場合、「ERBB 受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質」としては、これだけに限定されないが、ERBB 受容体に結合する少なくとも 16 種の異なる EGFR ファミリーリガンド : EGF (上皮成長因子) 、AG または AREG (アンフィレギュリン) 、および TGF - アルファ (形質転換成長因子 - アルファ) 、Btc (ベータセルリン) 、HBEGF (ヘパリン結合性 EGF) 、および Ereg (エピレギュリン) 、ニューレグリン - 1、- 2、- 3 および - 4 (またはヘレグリン - 1、- 2、- 3 お50

および - 4などのニューグレリン（またはヘレグリン）が挙げられる。しかし、本発明では、4種のE R B B受容体のいずれか1つまたはこれらの組合せに結合して、内因性キナゼドメインの活性化およびその後のリン酸化を導くホモ二量体受容体複合体およびヘテロ二量体受容体複合体の形成を誘導することができる任意のリガンドが意図されている。表11も参照されたい。

本明細書に記載されるインスリンの生成方法の一部の実施形態は、グルコース刺激に応答してインスリンを分泌するインスリン生成細胞にin vivoで成熟することができる臍臓内胚葉細胞を動物に提供することによって、糖尿病の動物を処置するか、動物の血液中のグルコース濃度を制御することを含むことができる。

【0028】

本明細書に記載される一態様は、適当な条件の下で培養されるときに異なる細胞系統に選択的に、および一部の態様では選択的、可逆的に発達することが可能である、多能性または先駆細胞の集団を含む。本明細書で使用される場合、「集団」という用語は、同じ識別特徴を有する複数の細胞の細胞培養物を指す。「細胞系列」という用語は、最も早期の先駆細胞から完全成熟細胞（すなわち特殊化した細胞）までの細胞型の発達の全ステージを指す。「先駆細胞」または「前駆細胞」とは、細胞分化経路内の、より成熟した細胞に分化することができる任意の細胞であってよい。そのように、先駆細胞は、多能性細胞であってもよく、部分的に分化した多分化能細胞または可逆的に分化した細胞であってもよい。「先駆細胞集団」という用語は、より成熟または分化した細胞型に発達することができる細胞の群を指す。先駆細胞集団は、多能性の細胞、幹細胞系列に制限された細胞（すなわち、外胚葉系列の全てには発達できない細胞、または、例えばニューロン系列の細胞にのみ発達することができる細胞）、および可逆的に幹細胞系列に制限された細胞を含み得る。したがって、「前駆細胞」または「先駆細胞」という用語は、「多能性細胞」または「多分化能細胞」であり得る。

【0029】

本明細書で使用される場合、「リプログラミング」、「リプログラミングされた」という用語またはそれと同等の用語は、培養またはin vivoにおいて、リプログラミングなしで同じ条件下でそれが有するであろう能力よりも測定可能な程度高い、少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成する能力を細胞に付与するプロセスを指す。本明細書に記載される特定の実施形態では、体細胞は、多能性細胞に「リプログラミングされる」。特定の態様では、十分な増殖の後に、in vivoまたはin vitro細胞培養において、測定可能な程度の割合の細胞が新しい多能性細胞型の表現型の特徴を提示するとき、体細胞はリプログラミングされている。リプログラミングなしでは、そのような体細胞は、新しい多能性細胞型の表現型の特徴を提示する後代を生成しないだろう。リプログラミングなしでも体細胞が新しい多能性細胞型の表現型の特徴を提示する後代を生成することができた場合は、これらの体細胞からの新しい多能性細胞型の表現型の特徴を提示する後代の割合は、リプログラミング前よりも測定可能な程度高い。

【0030】

本明細書で使用される場合、語句「分化プログラミング」は、培養またはin vivoにおいて、分化リプログラミングなしで同じ条件下でそれが有するであろうよりも、新しい分化状態の少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成するように細胞を変化させるプロセスを指す。このプロセスには、分化、脱分化および分化転換が含まれる。したがって、本明細書で使用される場合、語句「分化」は、より特殊化していない細胞がより特殊化した細胞型になるプロセスを指す。対照的に、語句「脱分化」は、部分的または最終的に分化した細胞がより初期の発達段階、例えば多能性または多分化能を有する細胞に戻る細胞プロセスを指す。さらに対照的に、語句「分化転換」は、1つの分化細胞型を別の分化細胞型に転換するプロセスを指す。

【0031】

本明細書で使用される場合、「多能性細胞から発達する」、「多能性細胞から分化する」、「多能性細胞から成熟する」または「多能性細胞から生成する」、「多能性細胞から

10

20

30

40

50

導出された」、「多能性細胞から分化する」という用語および等価の表現は、例えば、その開示が参照により本明細書に完全に組み込まれる国際特許出願第PCT/US2007/015536号、表題「METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES」に記載の、*in vivo*において移植されたPDX1胰臓内胚葉細胞から成熟する内分泌細胞の場合では、*in vitro*または*in vivo*において多能性細胞から分化した細胞型が生成することを指す。そのような用語は全て、少なくとも2種の異なる細胞系列に分化する潜在性を有するステージから特殊化および最終分化した細胞になるまでの細胞の進行を指す。そのような用語は、本出願の目的に関して互換的に使用することができる。本明細書に記載の実施形態では、そのような分化を可逆的なものにし、したがって、多能性または少なくとも2種以上の細胞系列に分化する能力を選択的に取り戻すことができるような培養条件が意図されている。

【0032】

「フィーダー細胞」という用語は、*in vitro*で成長し、少なくとも1種の因子を細胞培養中に分泌し、また、培養物中の別の目的の細胞の成長を支持するために使用することができる細胞培養物を指す。本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞層」は、「フィーダー細胞」という用語と互換的に使用され得る。フィーダー細胞は、培養皿の表面がフィーダー細胞で、重なり合って増幅する前の完全な層で覆われた単層を含んでもよく、細胞のクラスターを含んでよい。好ましい実施形態では、フィーダー細胞は、接着性の单層を含む。

【0033】

本明細書で使用される場合、「クラスター」、「凝集塊」または「凝集体」という用語は互換的に使用することができ、単細胞に解離していない一群の細胞を一般に指す。クラスターは、より小さいクラスターに解離することができる。この解離は本来一般的に手動である（例えば、パストールピペットを使用する）が、他の解離手段が企図される。凝集懸濁多能性または多分化能細胞培養物は、実質的に、国際公開PCT/US2007/062755、表題COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING DIFFERENTIAL CELLSおよびPCT/US2008/082356、表題STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOFに記載されている通りであり、それらは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0034】

同様に、多能性細胞培養物または多能性凝集懸濁培養物をフィーダー細胞の使用を伴わない規定された条件において成長させる実施形態は「フィーダーフリー」である。フィーダーフリー培養方法では、多能性細胞培養物のスケーラビリティおよび再現性が増し、例えばフィーダー細胞または他の動物を供給源とする培養物構成成分に由来する感染因子によるコンタミネーションのリスクが低下する。フィーダーフリー方法は、Bodnarらに対する米国特許第6,800,480号(Geron Corporation, Menlo Park, Californiaに譲渡された)にも記載されている。しかし、米国特許第6,800,480号特許とは対照的に、本明細書に記載の実施形態は、多能性細胞培養物、多分化能細胞培養物または分化した細胞培養物のいずれであるかにかかわらず、フィーダーフリーであり、内在性または外因性の細胞外マトリックスをさらに含有しない；すなわち、本明細書に記載の培養物は、フィーダーフリーであるだけでなく、細胞外マトリックスフリーである。例えば、米国特許第6,800,480号では、線維芽細胞を培養し、線維芽細胞を*in situ*で溶解し、次いで、溶解後に残ったものを洗浄することによって細胞外マトリックスが調製される。あるいは、米国特許第6,800,480号では、コラーゲン、胎盤マトリックス、フィブロネクチン、ラミニン、メロシン、テネイシン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、アグリカン、ビゲリカン、トロンボスpongin、ビトロネクチン、およびデコリンから選択される単離されたマトリックス構成成分または構成成分の組合せからも細胞外マトリックスが調製さ

10

20

30

40

50

れ得る。本明細書に記載の実施形態では、フィーダー層または線維芽細胞層を成長させ、細胞を溶解して細胞外マトリックスを生成することによって細胞外マトリックスを生成することもなく、最初にコラーゲン、胎盤マトリックス、フィプロネクチン、ラミニン、メロシン、テネイシン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、アグリカン、ビグリカン、トロンボスponジン、ピトロネクチン、およびデコリンから選択される細胞外マトリックス構成成分または細胞外マトリックス構成成分の組合せを用いて組織培養容器をコーティングする必要もない。したがって、多能性細胞、多分化能細胞および分化した細胞用の本明細書に記載の凝集懸濁培養物には、外因的に添加された細胞外マトリックスまたはマトリックス構成成分である細胞外マトリックスコーティングを生成するフィーダー層、溶解したフィーダー細胞または線維芽細胞は必要なく、参照により本明細書に完全に組み込まれる国際出願 PCT / US2008 / 080516、表題METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM 10 に記載の通り、可溶性ヒト血清構成成分の使用により、フィーダー細胞またはフィーダー単層の必要性を克服し、同様に、フィーダー細胞もしくは線維芽細胞または外因的に添加された細胞外マトリックス構成成分に由来する内在性の細胞外マトリックスの必要性も克服される。

【0035】

好みしい実施形態では、培養方法は、動物を供給源とする産物を含まない。別の好みしい実施形態では、培養方法はゼノフリーである。さらに好みしい実施形態では、本明細書に記載の培養方法はヒト細胞治療薬の商業的な製造のための1つまたは複数の条件または要件を満たすかまたはそれを上回っていた。 20

【0036】

多能性細胞の集団をある特定の補足的な成長因子の存在下でさらに培養して、異なる細胞系列であるか、またはそれに発達することになる細胞の集団を得ることができ、または、異なる細胞系列に発達することが可能になるように選択的に逆行させることができる。「補足的な成長因子」という用語は、その最も広範な文脈で使用され、多能性細胞の成長を促進するため、細胞の生存を維持するため、細胞の分化を刺激するため、および/または、細胞の分化の逆行を刺激するために有効である物質を指す。さらに、補足的な成長因子は、フィーダー細胞からその培地中に分泌される物質であってよい。そのような物質としては、これだけに限定されないが、サイトカイン、ケモカイン、小分子、中和抗体、およびタンパク質が挙げられる。成長因子は、細胞の発生および維持ならびに組織の形態および機能を制御する細胞間シグナル伝達ポリペプチドも含んでよい。好みしい実施形態では、補足的な成長因子は、幹細胞因子(stee1 cell factor)(SCF)、オンコスタチンM(OSM)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、インターロイキン-6(IL-6)と可溶性インターロイキン-6受容体(IL-6R)の組合せ、線維芽細胞成長因子(FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、腫瘍壞死因子(TNF)、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)からなる群から選択される。 30

【0037】

本明細書に記載の細胞を生成するためのある特定のプロセスでは、成長因子を、添加後に細胞培養物または細胞集団から除去する。例えば、アクチビンA、アクチビンB、GDF-8、またはGDF-11などの成長因子を添加し、それらを添加してから約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約7日以内、約8日以内、約9日以内または約10日以内に除去することができる。一部の実施形態では、分化因子を細胞培養物から除去することはしない。 40

【0038】

分化プロセスの効率は、これだけに限定されないが、細胞の成長条件、成長因子濃度および培養ステップのタイミングを含めたある特定のパラメータを変更することによって調整することができるので、本明細書に記載の分化手順により、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55 50

%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約95%超の、人工多能性細胞を含む多能性細胞から多分化能細胞または分化した細胞、例えば、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1陽性前腸内胚葉、PDX1陽性臍臓内胚葉またはPDX1/NKX6.1共陽性臍臓内胚葉、内分泌先駆体またはNGN3/NKX2.2共陽性内分泌先駆体、およびホルモン分泌内分泌細胞またはINS、GCG、GHRL、SST、PP単独陽性内分泌細胞への変換をもたらすことができる。前原条(primitive streak)細胞または中内胚葉細胞の単離を使用するプロセスでは、実質的に純粋な前原条細胞または中内胚葉細胞集団を回収することができる。

【0039】

多能性幹細胞から導出された様々な細胞組成物が、本明細書に記載される。一実施形態は、iPS細胞およびそれから導出された細胞を含む。本明細書に記載される実施形態に関連するが異なるさらに他のプロセスおよび組成物は、2003年12月23日に出願の米国特許仮出願第60/532,004号、表題DEFINITIVE ENDODERM; 2004年4月27日に出願の米国特許仮出願第60/566,293号、表題PDX1 EXPRESSING ENDODERM; 2004年7月9日に出願の米国特許仮出願第60/586,566号、表題CHEMOKINE CELL SURFACE

RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM; 2004年7月14日に出願の米国特許仮出願第60/587,942号、表題CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM; 2004年12月23日に出願の米国特許出願第11/021,618号、表題DEFINITIVE ENDODERM、および2005年4月26日に出願の米国特許出願第11/115,868号、表題PDX1 EXPRESSING ENDODERM; 2005年6月23日に出願の米国特許出願第11/165,305号、表題METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM; 2005年10月27日に出願の米国特許仮出願第60/730,917号、表題PDX1 - EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM; 2005年11月14日に出願の米国特許仮出願第60/736,598号、表題MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM; 2006年3月2日に出願の米国特許仮出願第60/778,649号、表題INSULIN - PRODUCING CELLS AND METHOD OF PRODUCTION; 2006年7月26日に出願の米国特許仮出願第60/833,633号、表題INSULIN - PRODUCING CELLS AND METHOD OF PRODUCTION; 2006年10月18日に出願の米国特許仮出願第60/852,878号、表題ENRICHMENT OF ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, IMMATURE PANCREATIC ISLET CELLS AND MATURE PANCREATIC ISLET CELLS USING NCAM; 2006年10月27日に出願の米国特許出願第11/588,693号、表題PDX1 - EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM; 2007年3月2日に出願の米国特許出願第11/681,687号、表題ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE - EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION; 2007年7月5日に出願の米国特許出願第11/773,944号、表題METHODS OF

PRODUCING PANCREATIC HORMONES; 2007年9月13日に出願の米国特許出願第60/972,174号、表題METHODS OF TREATMENT FOR DIABETES; 2007年9月24日に出願の米国特許出願第11/860,494号、表題METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION; 2007年10月3日に

10

20

30

40

50

出願の米国特許出願第60/977,349号、表題CELL SURFACE MARKERS OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS；および2008年4月8日に出願の米国特許出願第12/099,759号、表題METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES；および2008年4月21日を出願の米国特許出願第12/107,020号、表題METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HUMANE EMBRYONIC STEM CELLSに見出すことができ、それらの開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0040】

hES細胞から導出された内胚葉系列細胞を生成するための一般的な方法は、上記の関連する米国特許出願、ならびにD'Amourら、2005 Nat Biotechnol. 23: 1534-41、およびD'Amourら、2006 Nat Biotechnol. 24(11): 1392-401に記載され、それらの開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。D'Amourらにより、5段階の分化プロトコル：ステージ1（大部分は胚体内胚葉生成がもたらされる）、ステージ2（大部分はPDX1陰性前腸内胚葉生成がもたらされる）、ステージ3（大部分はPDX1陽性前腸内胚葉生成がもたらされる）、ステージ4（大部分は臍臓内胚葉または臍臓内分泌前駆体生成がもたらされる）およびステージ5（大部分はホルモン発現内分泌細胞生成がもたらされる）が記載されている。

【0041】

「栄養外胚葉」という用語は、HAND1、Eomes、MASH2、ESXL1、HCG、KRT18、PSG3、SFXN5、DLX3、PSX1、ETS2、およびERBB遺伝子からなる群から選択されるマーカーの発現が、非栄養外胚葉細胞または細胞集団におけるHAND1、Eomes、MASH2、ESXL1、HCG、KRT18、PSG3、SFXN5、DLX3、PSX1、ETS2、およびERBBの発現レベルと比較して相対的に高い多分化能細胞を指す。

【0042】

「胚体外内胚葉」は、SOX7遺伝子、SOX17遺伝子、THBD遺伝子、SPARC遺伝子、DAB1遺伝子、またはAFP遺伝子からなる群から選択されるマーカーの発現レベルが、非胚体外内胚葉細胞または細胞集団におけるSOX7、SOX17、THBD、SPARC、DAB1、またはAFPの発現レベルと比較して相対的に高い多分化能細胞を指す。

【0043】

「前原条細胞」という用語は、FGF8マーカー遺伝子および/またはNODALマーカー遺伝子の発現レベルが、BRACHURY低、FGF4低、SNAI1低、SOX17低、FOXA2低、SOX7低およびSOX1低と比較して相対的に高い多分化能細胞を指す。

【0044】

「中内胚葉細胞」という用語は、brachyuryマーカー遺伝子、FGF4、SNAI1、MIXL1および/またはWNT3マーカー遺伝子の発現レベルが、SOX17低、CXCR4低、FOXA2低、SOX7低およびSOX1低と比較して相対的に高い多分化能細胞を指す。

【0045】

「胚体内胚葉(DE)」という用語は、腸管または腸管から導出された器官の細胞に分化することができる多分化能内胚葉系列細胞を指す。ある特定の実施形態によると、胚体内胚葉細胞は哺乳動物細胞であり、好ましい実施形態では、胚体内胚葉細胞はヒト細胞である。本発明の一部の実施形態では、胚体内胚葉細胞は、ある特定のマーカーを発現する、またはある特定のマーカーを有意に発現することができない。一部の実施形態では、SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3、GSC、FGF17、V

10

20

30

40

50

WF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1およびCRIPT1から選択される1種または複数種のマーカーが胚体内胚葉細胞において発現される。他の実施形態では、OCT4、アルファ-フェトプロテイン(AFP)、トロンボモジュリン(TM)、SPARC、SOX7およびHNF4アルファから選択される1種または複数種のマーカーが胚体内胚葉細胞において発現されないまたは有意には発現されない。胚体内胚葉細胞集団およびそれを生成する方法は、米国特許出願第11/021,618号、表題DEFINITIVE ENDODERM、2004年12月23日出願にも記載され、それは本明細書に完全に組み込まれる。

【0046】

さらに他の実施形態は、「PDX1陰性前腸内胚葉細胞」または「前腸内胚葉細胞」と呼ばれる細胞培養物、またはその同等物に関する。一部の実施形態では、前腸内胚葉細胞は、SOX17、HNF1(HNF1B)、HNF4アルファ(HNF4A)およびFOXA1マーカーを発現するが、PDX1、AFP、SOX7またはSOX1を実質的に発現しない。PDX1陰性前腸内胚葉細胞集団およびその生成方法も、2006年10月27日に出願の米国特許出願第11/588,693号、表題PDX1-expressing dorsal and ventral foregut endodermに記載され、それは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

10

【0047】

本明細書に記載される他の実施形態は、「PDX1陽性の背側に偏った前腸内胚葉細胞」(背側のPDX1陽性前腸内胚葉細胞)または単に「PDX1陽性内胚葉」の細胞培養物に関する。一部の実施形態では、PDX1陽性内胚葉細胞は、表1から選択される1つまたは複数のマーカーおよび/または表2から選択される1つまたは複数のマーカーを発現し、これらも同様に、2006年10月27日に出願の関連する米国特許出願第11/588,693号、表題PDX1 EXPRESSING DOSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM、および2005年4月26日に出願の米国特許出願第11/115,868号、表題PDX1-expressing endodermに記載され、これらは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

20

【表1】

表1－背側と腹側のPDX1陽性前腸内胚葉の両方で発現されるマークー

遺伝子記号	Unigene	LocusLink	OMIM	SeqDerivedFrom	遺伝子記述子
ANXA4	Hs.422986	307	106491	NM_001153	アネキシンA4
ASCL1	Hs.524672	429	100790	BC001638	achaete—scute複合体様1 (Drosophila)
BNC1	Hs.459153	646	601930	NM_001171	バソクリン(basonuclin) 1
C10orf30	Hs.498740	222389		AW195407	第10染色体読取り棒30
C2orf23	Hs.368884	65055	609139	BE535746	第2染色体読取り棒23
C9orf150	Hs.445356	286343		AI972386	第9染色体読取り棒150
CDH6	Hs.171054	1004	603007	BC000019	カドヘリン6、2型、K-カドヘリン(胎児の腎臓)
DACH1	Hs.129452	1602	603803	AI650353	ダックスファント同族体1 (Drosophila)
DUSP9	Hs.144879	1852	300134	NM_001395	二重特異性ホスファターゼ9
ELMOD1	Hs.495779	55531		AL359601	ELMOドメイン含有1
FLJ21462_f1s	Hs.24321			AW236803	CDNAクローンIMAGE: 5273964、部分的cds
FLJ22761	Hs.522988	80201		W81116	仮定的タンパク質FLJ22761
GABRA2	Hs.116250	2555	137140	NM_000807	ガンマアミノ酪酸(GABA)A受容体、アルファ2
GRIA3	Hs.377070	2892	305915	BC032004	グルタミン酸受容体、イオンチャネル型(iontrophic)、AMPA3
HNF4G	Hs.241529	3174	605966	AI916600	肝細胞核因子4、ガンマ
IDH2	Hs.513141	3418	147650	U52144	イソクエン酸脱水素酵素2(NADP+)、ミトコンドリア
IL6R	Hs.135087	3570	147880	AV700030	インターロイキン6受容体
KCNJ2	Hs.1547	3759	170390	AF153820	カリウム内側整流チャネル、サブファミリーJ、メンバ-2
KLF3	Hs.298658	51274		AA130132	Kruppel様因子3(塩基性)
LGALS3	Hs.531081	3958	153619	AW085690	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン3)
LGALS3	///				レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン3)／／／ガラクチン3内部遺伝子
GALIG	Hs.531081	3958///	153619	BC001120	
LIPC	Hs.188630	3990	151670	NM_000236	リバーゼ、肝
MEIS1	Hs.526754	4211	601739	NM_002398	Meis1、骨髓性同種志向性ウイルスの組込み
NR2F1	Hs.519445	7025	132890	AI951185	部位1同族体(マウス)
ONECUT2	Hs.194725	9480	604894	NM_004852	核内受容体サブファミリー2、F群、メンバ-1
PAPPA	Hs.494928	5069	176385	AA148534	妊娠関連の血漿プロテインA、パッパリシン(pappalysin) 1
PDE3B	Hs.445711	5140	602047	NM_000753	ホスホジエステラーゼ3B、cGMP阻害
PGPEP1	Hs.131776	54858		NM_017712	ピログリタミルペチダーゼ
PMS2L1	Hs.520575	5379	605038	D38503	減数分裂後分離増加2様1

遺伝子記号	Unigene	LocusLink	OMIM	SeqDerivedFrom	遺伝子記述子
SERPINF2	Hs.159509	5345	262850	NM_000934	セリン(またはシスチン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードF (アルファ2抗プラスミン、色素上皮層由来因子)、メンバ-2
SLC27A2	Hs.11729	11001	603247	NM_003645	溶質輸送体ファミリー-27 (脂肪酸輸送体)、メンバ-2
SLN	Hs.334629	6588	602203	NM_003063	Sarcolipin
SOX9	Hs.2316	6662	114290	NM_000346	SRY(性決定領域Y)-ポックスク9(屈曲肢異形成、常染色体性転換)
SULT2A1	Hs.515835	6822	125263	U08024	スルホランスフエラーゼファミリー、サイトゾル、2A、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)選好、メンバ-1
TFPI	Hs.516578	7035	152310	BF511231	組織因子経路阻害剤(リポプロテイン関連凝固阻害剤)
ZHX1	Hs.521264	11244	604764	AI123518	ジンクフィンガーおよびメオボックス1
ZNF467	Hs.112158	168544		BF549732	ジンクフィンガータンパク質
ZNF503	Hs.195710	84858		AA603467	zinc finger protein 503
	Hs.142869			AI935586	転写された遺伝子座

【表2】

表2—背側に偏ったPDX1陽性前腸内胚葉で発現されるマーカー

遺伝子記号	Unigene	LocusLink	OMIM	SeqDerivedFrom	遺伝子記述子
PTGIS	Hs.302085	5740	145500	NM_000961 NM_000965	プロスタグランジン12(プロスタサイクリン)合成酵素// プロスタグランジン12(プロスタサイクリン)合成酵素
RARB	Hs.436538	5915	180220	D31815	レチノイン酸受容体、 β
RGN	Hs.77854	9104	300212	U69563	レギュカルチン(regucalcin)(老化指標タンパク質30) RhoアミリーグTPアーゼ1
RND1	Hs.124940	27289	609038	NM_003015 AV690866	分泌されたF2関連タンパク質5 血清／糖質コルチコイド調節キナーゼ様
SFRP5	Hs.279565	6425	604158	N30257	溶質輸送体ファミリー-16(モノカルボン酸輸送体)、メンバ-10 溶質輸送体ファミリー-16(モノカルボン酸輸送体)、メンバ-2
SGKL	Hs.380877	23658	607591	NM_006517	溶質輸送体ファミリー-1(神経膠高親和性グルタミン酸輸送体)、メンバ-3
SLC16A10	Hs.520321	117247	300095	NM_004172	溶質輸送体ファミリー-30(亜鉛輸送体)、メンバ-4
SLC16A2	Hs.75317	6567	600111	NM_013309	ナトリウムおよび塩化物活性化ATP感受性カリウムチャネル SLC16A2
SLC1A3	Hs.481918	6507	602095	AI732637	ST8アルファ-N-アセチルニユーラミニドアリファ-2,8-ジアリルトルヌフェラーゼ3
SLC30A4	Hs.162989	7782	AL080239	NM_015879	wingless型MMTV組込み部位ファミリー、メンバ-5A// wingless型MMTV組込み部位ファミリー、メンバ-5A
SLICK	Hs.420016	343450			異常性およびポリトローフ型レトロウイルス受容体
SLTRK4	Hs.272284	139065			CDNAFLJ10720fs、クローンNT2RP3001116
ST8SIA3	Hs.298923	51046			転写された遺伝子座
					CDNAFLJ31660fs、クローンNT2RI20004410
					AL137310
WNT5A	Hs.152213	7474	164975	AJ968085	40
XPR1	Hs.227656	9213	605237	AF089744	
				AK001582	30
				AJ955541	
				AL137310	20
					10

【0048】

本明細書に記載される方法によって生成されるものなどのPDX1陽性前腸内胚葉細胞は、完全に分化した臍臓ホルモン分泌または内分泌細胞、例えばインスリン生成細胞を生成するために使用することができる前駆体である。本発明の一部の実施形態では、PDX1

X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、PDX 1 陽性前腸内胚葉細胞を形成するように、PDX 1 を実質的に発現しない胚体内胚葉細胞（PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞；本明細書では胚体内胚葉とも呼ばれる）を分化させることによって生成される。

【0049】

本明細書で使用される場合、「膵臓内胚葉」、「膵臓上皮（pancreatic epithelial）」、「膵臓上皮（pancreatic epithelium）」（全て「PEC」と省略することができる）「膵臓前駆体」、「PDX-1 陽性膵臓内胚葉または膵臓内胚葉細胞（「PEC」）などのその等価物は全て、先駆または前駆膵臓細胞である。本明細書に記載の PEC は、ステージ 4 分化（約 12 ~ 14 日目）後の前駆細胞集団であり、少なくとも 2 つの主要な別個の集団：i) N K X 6 . 1 を発現するが、C H G A を発現しない（または C H G A 陰性、C H G A - ）膵臓前駆細胞；および ii) C H G A を発現する複数ホルモン性（polyhormonal）内分泌細胞（C H G A 陽性、C H G A + ）を含む。理論に束縛されることなく、N K X 6 . 1 を発現するが C H G A を発現しない細胞集団は、PEC のより活性かつ治療的な構成成分であると仮定され、一方、C H G A 陽性複数ホルモン性内分泌細胞の集団は *in vivo* でグルカゴン発現膵島細胞にさらに分化および成熟すると仮定される。それらの開示はともに参考により本明細書に完全に組み込まれる、Kelly ら（2011）Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells、Nat Biotechnol 29(8) : 750 - 756、2011 年 7 月 31 日オンライン出版および Schulz ら（2012）、A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells、PLoS One 7(5) : 1 - 17、e37004 を参照されたい。10

さらに、時には、膵臓内胚葉細胞は、すぐ上に記載されている PEC を指すのではなく、一般に少なくともステージ 3 およびステージ 4 型細胞を指して使用される。使用および意味は文脈から明らかになろう。このように多能性幹細胞、ならびに少なくとも hES 細胞および hIPS 細胞から導出される膵臓内胚葉は、他の内胚葉系の系列細胞型とは、PDX 1、N K X 6 . 1、PTF1A、CPA1、cMYC、NGN3、PAX4、ARX および N K X 2 . 2 マーカーから選択されるマーカーの発現が差次のまたは高いレベルであるが、膵臓内分泌細胞の特質である遺伝子、例えば C H G A、I N S、G C G、G H R L、S S T、M A F A、P C S K 1 および G L U T 1 は実質的に発現しないことに基づいて区別される。さらに、NGN3 を発現するいくつかの「内分泌前駆細胞」は他の非膵臓構造（例えば、十二指腸）に分化することができる。一実施形態では、本明細書に記載される NGN3 発現内分泌前駆体は、成熟した膵臓系列細胞、例えば膵臓内分泌細胞に分化する。膵臓内胚葉または内分泌前駆細胞集団およびその方法は、米国特許出願第 11 / 773,944 号、表題 Methods of producing pancreatic hormones、2007 年 7 月 5 日出願、および米国特許出願第 12 / 107,020 号、表題 METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS、2008 年 4 月 21 日出願にも記載され、それらの開示は参考により本明細書に完全に組み込まれる。3040

【0050】

本明細書で使用される場合、「内分泌先駆細胞」は、ニューロゲニン 3 (NEUROG3) を発現し、限定されずに膵島ホルモン発現細胞などの内分泌系の細胞にさらに分化することができる、胚体内胚葉系列の多分化能細胞を指す。内分泌先駆細胞は、より低い特異性で分化した胚体内胚葉系列細胞、例えば PDX 1 陽性膵臓内胚葉細胞と比較して、同じくらい多くの異なる細胞、組織および／または器官タイプには分化することができない。50

【0051】

本明細書で使用される場合、「膵島ホルモン発現細胞」、「膵臓内分泌細胞」またはその同等物は、*in vitro*で多能性細胞から誘導された、複数ホルモン性または単一ホルモン性であってもよい細胞を指す。したがって、内分泌細胞は、ヒト膵島細胞の機能の少なくとも一部を有する、1つまたは複数の膵臓ホルモンを発現することができる。膵島ホルモン発現細胞は、成熟していても未熟であってもよい。未熟な膵島ホルモン発現細胞は、特定のマーカーの差次の発現に基づくか、それらの機能的能力、例えばグルコース応答性に基づいて、成熟した膵島ホルモン発現細胞から区別することができる。

【0052】

本明細書に記載の実施形態では、限定培地、馴化培地、フィーダーフリー培地、無血清培地などを含めた多くの幹細胞培地培養物または成長環境が想定される。本明細書で使用される場合、「成長環境」または「環境」という用語またはその等価物は、未分化の幹細胞または分化した幹細胞（例えば、靈長類胚性幹細胞）が*in vitro*で増殖する環境である。環境の特徴は、細胞を培養する培地、および存在する場合には支持構造（例えば、固体表面上の基質など）を含む。多能性細胞を培養または維持するためおよび/または多能性細胞を分化させるための方法は、PCT/US2007/062755、表題COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS、2007年2月23日出願；米国特許出願第11/993,399号、表題EMBRYONIC STEM CELL CULTURE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF、2007年12月20日出願；および米国特許出願第11/875,057号、表題Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum、2007年10月19日出願にも記載され、それらの開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

10

20

【0053】

「本質的に」または「実質的に」という用語は、ある成分または細胞が、最小または少ない量で任意の細胞凝集懸濁液タイプ、例えば本明細書に記載される懸濁液中の細胞凝集体中に存在することが、「本質的または実質的に均一」、「本質的または実質的にホモ細胞性」であること、あるいは、「本質的にhES細胞」、「本質的または実質的に胚体内胚葉細胞」、「本質的または実質的に前腸内胚葉細胞」、「本質的または実質的にPDX1陰性前腸内胚葉細胞」、「本質的または実質的にPDX1陽性前膵臓内胚葉細胞」、「本質的または実質的にPDX1陽性膵臓内胚葉または前駆細胞」、「本質的または実質的にPDX1陽性膵臓内胚葉端細胞」、「本質的または実質的に膵臓内分泌先駆細胞」、「本質的または実質的に膵臓内分泌細胞」等で構成されることを意味する。

30

【0054】

細胞培養中または細胞集団内の細胞に関して、「を実質的に含まない」という用語は、細胞培養物または細胞集団が含まれないと特定された細胞型が、細胞培養物または細胞集団中に存在する細胞の総数の約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満の量で存在することを意味する。

40

【0055】

細胞培養物は、含有する血清が減少しているまたは血清を実質的に含まないまたは血清を含まない培地中で成長させることができる。ある特定の培養条件下で、血清濃度は約0%（v/v）から約10%（v/v）の範囲とすることができます。例えば、いくつかの分化プロセスでは、培地の血清濃度は、約0.05%（v/v）未満、約0.1%（v/v）未満、約0.2%（v/v）未満、約0.3%（v/v）未満、約0.4%（v/v）未満、約0.5%（v/v）未満、約0.6%（v/v）未満、約0.7%（v/v）未満、約0.8%（v/v）未満、約0.9%（v/v）未満、約1%未満（v/v）、約2%未満（v/v）、約3%未満（v/v）、約4%未満（v/v）、約5%未満（v/v）

50

v)、約6%未満(v/v)、約7%未満(v/v)、約8%未満(v/v)、約9%未満(v/v)または約10%(v/v)未満であってよい。いくつかのプロセスでは、血清を用いずに、または血清代替物を用いずに前原条細胞を成長させる。さらに他のプロセスでは、B27の存在下で前原条細胞を成長させる。そのようなプロセスでは、B27サプリメントの濃度は約0.1%(v/v)から約20%(v/v)までにわたってよい。

【0056】

さらに他のプロセスでは、B27の存在下で未成熟臍島ホルモン発現細胞を成長させる。そのようなプロセスでは、B27サプリメントの濃度は約0.1%(v/v)から約20%(v/v)までの範囲であってもよく、約20%(v/v)を超える濃度であってもよい。ある特定のプロセスでは、培地中のB27の濃度は、約0.1%(v/v)、約0.2%(v/v)、約0.3%(v/v)、約0.4%(v/v)、約0.5%(v/v)、約0.6%(v/v)、約0.7%(v/v)、約0.8%(v/v)、約0.9%(v/v)、約1%(v/v)、約2%(v/v)、約3%(v/v)、約4%(v/v)、約5%(v/v)、約6%(v/v)、約7%(v/v)、約8%(v/v)、約9%(v/v)、約10%(v/v)、約15%(v/v)または約20%(v/v)である。あるいは、添加するB27サプリメントの濃度は、市販のB27ストック溶液の強度の倍数として測定することができる。例えば、B27はInvitrogen(Carl s bad, CA)から50×ストック溶液として入手可能である。十分な量のこのストック溶液を十分な体積の成長培地に添加することにより、所望の量のB27が補充された培地を生成する。例えば、50×B27ストック溶液10mlを成長培地90mlに添加することにより、5×B27が補充された成長培地を生成することになる。培地中のB27サプリメントの濃度は、約0.1×、約0.2×、約0.3×、約0.4×、約0.5×、約0.6×、約0.7×、約0.8×、約0.9×、約1×、約1.1×、約1.2×、約1.3×、約1.4×、約1.5×、約1.6×、約1.7×、約1.8×、約1.9×、約2×、約2.5×、約3×、約3.5×、約4×、約4.5×、約5×、約6×、約7×、約8×、約9×、約10×、約11×、約12×、約13×、約14×、約15×、約16×、約17×、約18×、約19×、約20×および約20×超であってよい。

【0057】

本明細書で使用される場合、例えば成長因子、分化因子などの「外因的に添加された」化合物とは、培養物または馴化培地に関しては、培養物または培地にすでに存在していてもよい任意の化合物または成長因子を補うために培養物または培地に添加される成長因子を指す。例えば、一部の実施形態では、細胞培養物および/または細胞集団は、外因的に添加されたレチノイドを含まない。

【0058】

本明細書で使用される場合、「レチノイド」とは、レチノール、レチナールまたはレチノイン酸ならびにこれらの化合物のいずれかの誘導体を指す。好ましい実施形態では、レチノイドはレチノイン酸である。

【0059】

「FGFファミリー成長因子」、「線維芽細胞成長因子」または「線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバー」は、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22およびFGF23からなる群から選択されるFGFを意味する。一部の実施形態では、「FGFファミリー成長因子」、「線維芽細胞成長因子」または「線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバー」とは、公知の線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバーとの相同性および/またはそれと同様の機能を有する任意の成長因子を意味する。

【0060】

本明細書で使用される場合、「発現」は、材料または物質の生成ならびに材料または物

質の生成のレベルまたは量を指す。したがって、特定のマーカーの発現を決定することは、発現されるマーカーの相対量または絶対量を検出することまたは単にマーカーが存在するかしないかを検出することを指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、「マーカー」は、観察または検出することができる任意の分子を指す。例えば、マーカーとしては、これだけに限定されないが、特定の遺伝子の転写物などの核酸、遺伝子のポリペプチド産物、非遺伝子産物ポリペプチド、糖タンパク質、炭水化物、糖脂質、脂質、リボタンパク質または小分子（例えば、分子量が10,000 amu未満の分子）を挙げることができる。

【0062】

本明細書に記載の大多数のマーカーについて、公式の Human Genome Organization (HUGO) 遺伝子記号が提供される。HUGO Gene Nomenclature Committeeにより開発されるそのような記号により、命名されたヒト遺伝子および遺伝子産物のそれぞれに対して特有の略語が提供される。当業者はこれらの遺伝子記号を容易に認識することができ、また、対応する独特のヒト遺伝子および／またはタンパク質配列と容易に関連付けることができる。

【0063】

HUGOによる名称によると、以下の遺伝子記号は次のように定義される：GHR L - グレリン；APP - 島アミロイドポリペプチド；INS - インスリン；GCG - グルカゴン；ISL1 - ISL1 転写因子；PAX6 - ペアードボックス遺伝子6；PAX4 - ペアードボックス遺伝子4；NEUROG3 - ニューロゲニン3 (NGN3)；NKX2 - 2 - NKX2 転写因子関連遺伝子座2 (NKX2.2)；NKX6 - 1 - NKX6 転写因子関連遺伝子座1 (NKX6.1)；IPF1 - インスリンプロモーター 因子1 (PDX1)；ONECUT1 - ワンカットドメイン、ファミリーメンバー1 (HNF6)；HLXB9 - ホメオボックスB9 (HB9)；TCF2 - 転写因子2、肝臓 (HNF1b)；FOXA1 - フォークヘッドボックスA1；HGF - 肝細胞成長因子；IGF1 - インスリン様成長因子1；POU5F1 - POUドメイン、クラス5、転写因子1 (OCT4)；NANOG - Nanog ホメオボックス；SOX2 - SRY (性決定領域Y) - ボックス2；CDH1 - カドヘリン1、1型、E - カドヘリン (E-CAD)；T-brachyury ホモログ (BRACH)；FGF4 - 線維芽細胞成長因子4；WNT3 - 無翅型MMTV組み込み部位ファミリー、メンバー3；SOX17 - SRY (性決定領域Y) - ボックス17；GSC - グースコイド；CER1 - (ケルベロス1、システインノットスーパーファミリー、ホモログ (CER))；CXCR4 - ケモカイン (C-X-Cモチーフ)受容体4；FGF17 - 線維芽細胞成長因子17；FOXA2 - フォークヘッドボックスA2；SOX7 - SRY (性決定領域Y) - ボックス7；SOX1 - SRY (性決定領域Y) - ボックス1；AFP - アルファ - フェトプロテイン；SPARC - 分泌タンパク質、酸性、システインリッチ (オステオネクチン)；およびTHBD - トロンボモジュリン (TM)、NCAM - 神経系細胞接着分子；SYP - シナプトフィジン；ZIC1 - Zic ファミリーメンバー1；NEF3 - 神経フィラメント3 (NFM)；SST - ソマトスタチン；MAFA - v-maf 筋腱膜線維肉腫癌遺伝子ホモログA；MAFB - v-maf 筋腱膜線維肉腫癌遺伝子ホモログB；SYP - シナプトフィジン；CHGA - クロモグラニンA (副甲状腺分泌型タンパク質1)。

【0064】

非HUGO遺伝子記号に対応する完全遺伝子名、ならびに本明細書で使用することができる他の略記号を以下に提供する：SS - ソマトスタチン (SOM)；PP - 脾臓ポリペプチド；Cペプチド - 接続ペプチド；Ex4 - エキセンディン4；NIC - ニコチニアミドおよびDAPT - N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシンt - プチルエステル；RA - レチノイン酸；RPMI - Roswell Park Memorial Institute 培地；CMRL - Connaghan Medical Research Labs 培地；FBS - ウシ胎児血清；N

10

20

30

40

50

B P 10 - N C A M 結合タンパク質 10 ; P T F 1 a - 脳臓特異的転写因子 1 a。

【 0 0 6 5 】

多能性細胞から種々の多分化能および / または分化した細胞への進行は、遺伝子、または遺伝子マーカーの相対的な発現量、特定の細胞の特性を、第 2 の遺伝子または対照遺伝子、例えばハウスキーピング遺伝子の発現と比較して決定することによってモニタリングすることができる。いくつかのプロセスでは、ある特定のマーカーの発現を、マーカーが存在するかしないかを検出することによって決定する。あるいは、ある特定のマーカーの発現は、細胞培養物または細胞集団の細胞中でマーカーが存在するレベルを測定することによって決定することができる。そのようなプロセスでは、マーカーの発現の測定は定性的であっても定量的であってもよい。マーカー遺伝子によって生成するマーカーの発現を定量化する 1 つの方法は、定量的 P C R (Q - P C R) を使用することによるものである。Q - P C R を実施する方法は当技術分野で周知である。当技術分野で公知の他の方法も、マーカー遺伝子発現を定量化するために使用することができる。例えば、マーカー遺伝子の発現産物は、目的のマーカー遺伝子産物に特異的な抗体を使用することによって検出することができる。10

【 0 0 6 6 】

いくつかのプロセスでは、以下の遺伝子の高発現により、細胞のある特定の集団が示される。例えば、S O X 1 7 、 S O X 7 、 A F P または T H B D により胚体外内胚葉が示され、N O D A L および / または F G F 8 により前原条が示され、b r a c h y u r y 、 F G F 4 、 S N A I 1 および / または W N T 3 により中内胚葉が示され、C E R 、 G S C 、 C X C R 4 、 S O X 1 7 および F O X A 2 により胚体内胚葉細胞が示され、S O X 1 7 、 F O X A 2 、 F O X A 1 、 H N F 1 B および H N F 4 A により前腸内胚葉（または P D X 1 陰性内胚葉）が示され、P D X 1 、 H N F 6 、 S O X 9 および P R O X 1 により P D X 1 陽性内胚葉が示され、P D X 1 、 N K X 6 . 1 、 P T F A 1 、 C P A および c M Y C により脳臓上皮（P E または脳臓前駆体）が示され、N G N 3 、 P A X 4 、 A R X および N K X 2 . 2 により内分泌先駆細胞が示され、I N S 、 G C G 、 G H R L 、 S S T および P P により種々の内分泌細胞が示され、M A F A 遺伝子発現がM A F B 遺伝子発現に対して相対的に高いことにより、インスリン分泌内分泌細胞が示され、M A F A 遺伝子発現に対するM A F B の相対的な高発現により、グルカゴン分泌内分泌細胞が示される。20

【 0 0 6 7 】

用語線維芽細胞成長因子 7 (F G F 7) およびケラチノサイト成長因子 (K G F) は、同義である。30

【 0 0 6 8 】

人工多能性幹 (i P S) 細胞を生成するための方法

本明細書に記載の実施形態は、いかなる 1 つの型の i P S 細胞にも、いかなる 1 つの i P S 細胞の生成方法にも限定されない。種々の方法が存在するので、実施形態は限定的なものではない、または i P S 細胞の生成の効率のレベルに左右される。本明細書に記載の実施形態は i P S 細胞の内胚葉系列細胞への分化およびその使用にあてはまる。

【 0 0 6 9 】

アデノウイルス、プラスミド、または C r e - l o x P 3 もしくは p i g g y B A C 転位を使用したリプログラミング因子の切除を使用する、人工多能性幹細胞 (i P S C) を生じさせるためのウイルスによる方法、ウイルスによらない方法および非組込み型ウイルスによる方法が記載されている。参照により本明細書に完全に組み込まれる、S t a d t f e l d , M . ら、S c i e n c e 3 2 2 、 9 4 5 - 9 4 9 (2 0 0 8) ; O k i t a , K . ら、S c i e n c e 3 2 2 、 9 4 9 - 9 5 3 (2 0 0 8) ; K a j i , K . ら、N a t u r e 4 5 8 、 7 7 1 - 7 7 5 (2 0 0 9) ; S o l d n e r , F . ら、C e l l 1 1 1 3 6 、 9 6 4 - 9 7 7 (2 0 0 9) ; および W o l t j e n , K . ら、N a t u r e 4 5 8 、 7 6 6 - 7 7 0 (2 0 0 9) を参照されたい。同様に、それらもまた参照により本明細書に完全に組み込まれる、M a c k , A . らに対する米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 0 0 3 7 5 7 号 (2 0 1 0 年 1 月 7 日公開) および S h i らに対する P C T / U 40

S 2 0 0 9 / 0 3 7 4 2 9 も参照されたい。しかし、これらの方法のリプログラミング効率は低く (< 0 . 0 0 3 %) 、切除にもかかわらずベクター配列が残留する可能性があり、それにより、それらの治療への適用が限定される。例えば、上記の転写因子の宿主ゲノムへのウイルスによる組み込みおよび過剰発現は腫瘍形成に関連付けられており、導入遺伝子の発現が残留することは、E S 細胞およびi P S 細胞を区別する潜在的な特徴である。参照により本明細書に完全に組み込まれる、S o l d e r , F . ら、C e l l 1 3 6 : 9 6 4 - 9 7 7 (2 0 0 9) ; F o s t e r ら、O n c o g e n e 2 4 : 1 4 9 1 - 1 5 0 0 (2 0 0 5) ; およびH o c h e d l i n g e r , K . ら、C e l l 1 2 1 : 4 6 5 - 4 7 7 (2 0 0 5) を参照されたい。

【 0 0 7 0 】

10

本発明の他の実施形態では、i P S C を生じさせるための方法はエプスタイン・バーウィルス由来のエピソームベクターを含む。参照により本明細書に完全に組み込まれる、Y u , J . ら、S c i e n c e 3 2 4 、7 9 7 - 8 0 1 (2 0 0 9) およびM a c k , A . らに対する米国特許出願公開第2 0 1 0 0 0 0 3 7 5 7 号、2 0 1 0 年1月7日公開を参照されたい。これらの方法では、癌遺伝子S V 4 0 を含めた7種の因子の組合せを有する3つの別々のプラスミドが必要である。

【 0 0 7 1 】

本発明の別の実施形態では、i P S C を生じさせるための方法は、マウス細胞およびヒト胎児細胞および新生児細胞由来のタンパク質に基づくi P S C を含む。参照により本明細書に完全に組み込まれる、Z h o u , H . ら、C e l l S t e m C e l l 4 、3 8 1 - 3 8 4 (2 0 0 9) ; およびK i m , D . ら、C e l l S t e m C e l l 4 、4 7 2 - 4 7 6 (2 0 0 9) を参照されたい。これらの方法体系は、化学的処理(例えば、Z h o u ら、2 0 0 9 、上記の場合ではバルプロ酸) または多数回の処理(K i m ら、2 0 0 9 、上記) を使用して実現される。

20

【 0 0 7 2 】

本発明の別の実施形態では、細菌の複製開始点および抗生物質耐性遺伝子を欠くスーパーコイルD N A 分子であるミニサークルベクターまたはプラスミドを使用することができる。参照により本明細書に完全に組み込まれる、C h e n , Z . - Y . ら、M o l . T her . 8 、4 9 5 - 5 0 0 (2 0 0 3) ; C h e n , Z . - Y . ら、H u m . G e n e T her . 1 6 、1 2 6 - 1 3 1 (2 0 0 5) ; およびJ i a , F ら、N a t u r e M e t h o d s A d v a n c e P u b l i c a t i o n O n l i n e 7 F e b r u a r y 2 0 1 0 を参照されたい。これらの方法体系では、外因性サイレンシング機構の活性化が低いので、より高いトランスフェクション効率およびより長期の異所性発現でi P S C が生じる。

30

【 0 0 7 3 】

本発明のさらに別の実施形態では、糖尿病患者、A L S 、脊椎筋ジストロフィーおよびパーキンソン患者を含めた種々の疾患のヒト患者からi P S 細胞を生じさせることができる。参照により本明細書に完全に組み込まれる、M a e h r ら、P N A S U S A 1 0 6 (3 7) : 1 5 7 6 8 - 7 3 (2 0 0 9) ; D i m o s ら、S c i e n c e 、3 2 1 : 1 2 1 8 - 2 1 (2 0 0 8) ; E b e r t ら、N a t u r e 4 5 7 : 2 7 7 - 8 0 (2 0 0 9) ; P a r k ら、C e l l 1 3 4 : 8 7 7 - 8 8 6 (2 0 0 8) ; およびS o l d n e r ら、C e l l 1 3 6 : 9 6 4 - 9 7 7 を参照されたい。特定の疾患有する患者からh I P S 細胞を生成することの少なくとも1つの利点は、導出された細胞がヒト疾患の遺伝子型および細胞応答を含有することである。現存するヒトi P S 細胞株の少なくとも一部が列挙されている表3も参照されたい。この情報は、文献および例えばN a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h (N I H) S t e m C e l l R e g i s t r y , t h e H u m a n E m b r y o n i c S t e m C e l l R e g i s t r y およびU n i v e r s i t y o f M a s s a c h u s e t t s M e d i c a l S c h o o l , W o r c e s t e r , M a s s a c h u s e t t s , U S A にあるI n t e r n a t i o n a l S t e m C e l l R e g i s t r y を含めた

40

50

公的に利用可能なデータベースから得られるものである。これらのデータベースは、細胞株が利用可能になり登録が得られた時に定期的に更新されている。

本明細書に記載の組成物および方法の複数の実施形態では、これだけに限定されないが、CyT49、CyT212、CyT203、CyT25、(少なくとも本出願の出願時に、ViaCyte Inc.、3550 General Atomics Court、San Diego CA 92121から市販されていた)、BG01、BG02およびMEL1を含めたhESCなどのヒト多能性幹細胞、ならびにiPSC-482c7およびiPSC-603(Cellular Dynamics International, Inc., Madison, Wisconsin)、ならびにiPSC-G4(以下「G4」)およびiPSC-B7(以下、「B7」)(Shinya Yamanaka, Center for iPS Cell Research, Kyoto University)などの人工多能性幹(iPS)細胞を含めた種々の分化可能な霊長類多能性幹細胞の使用が意図されており、G4およびB7を使用した試験は、本明細書に詳しく記載されている。ある特定のこれらのヒト多能性幹細胞はNational Institutes of Health(NIH)などの国際登録機関に登録され、NIH Human Stem Cell Registryに列挙されている(例えば、CyT49の登録番号は0041である)。他の入手可能な細胞株はstemcells.nih.gov/research/registryのワールドワイドウェブにも見出すことができる。さらに他の細胞株、例えば、BG01およびBG01vは、それぞれWisconsin International Stem Cell(WISC)Bankの関係団体であるWiCell(登録商標)(カタログ名、BG01)およびATCC(カタログ番号SCRC-2002)によって第三者に販売および配布されている。本明細書に記載の他の細胞株はWiCell(登録商標)またはATCCなどの生物学的リポジトリによって登録または配布されていない場合があるが、そのような細胞株は原理研究者、研究室および/または施設から直接または間接的に公に入手可能である。細胞株および試薬の公開要求は、例えば生命科学の当業者にとっては通例である。一般には、これらの細胞または材料の譲渡は、細胞株または材料の所有者と受取人の間の標準の材料譲渡契約を介する。これらの型の材料譲渡は、特に生命科学における研究環境では頻繁に生じる。実際、出願人は、CyT49(2006)、CyT203(2005)、CyT212(2009)、CyT25(2002)、BG01(2001)、BG02(2001)、BG03(2001)およびBG01v(2004)を含めた細胞が導出され特徴付けられた時から、営利および非営利産業パートナーおよび共同研究者とのそのような契約を通じて常套的に細胞の譲渡を受けてきた。前記の一覧の各細胞株の隣の括弧内の年は、細胞株または材料が公的に入手可能かつ不死のものになった(例えば細胞バンクが作製された)年を示し、したがって、組成物を作製するためおよび本明細書に記載の方法を実施するためにこれらの細胞株が樹立された時から別の胚の破壊は実施または要求されていない。

2006年8月、Klimanskayaらは、hESCは単一の割球から誘導することができ、したがって胚を無傷にしておき、それらの破壊を引き起こさないことを実証した。顕微操作技術を使用して各胚から生検を実施し、十九(19)個のES細胞様増生および二(2)個の安定したhESC系が得られた。これらのhESC系は六(6)カ月以上も未分化状態に維持することができ、正常な核型、ならびにOct-4、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Nanogおよびアルカリ性ホスファターゼを含む多能性のマーカーの発現を示した。これらのhESCは、in vitroで全て三つ(3つ)の胚性胚葉の誘導体を分化、形成すること、およびin vivoでテラトーマの形で形成することができる。胚の破壊なしで新しい幹細胞系を作製するこれらの方法は、ヒト胚を使用することの倫理上の懸念に対処する。その開示が参照により本明細書に完全に組み込まれる、Klimanskayaら(2006)Nature 444:481~5頁、Epub 2006年8月23日を参照。しかし、Klimanskayaらは、誘導したhESC系を他のhESCと共に培養した。後に、2008 40 50

年に、Chung Y. らは、hESCとの共培養なしで単一の割球から再びhES細胞系を得ることができた。参照により本明細書に完全に組み込まれる、Chung Y. ら、Cell Stem Cell 2008、2(2)、113~117頁を参照。したがって、本明細書に記載される組成物および方法、特に人工多能性幹細胞または遺伝的に脱分化した多能性幹細胞に関連するようなそのような組成物および方法は、ヒト胚の破壊を必要としない。

表3および表4は、それぞれ、ある特定のiPSCおよびhESCの包括的ではない一覧であり、研究目的および/または商業目的で世界的に利用可能であり、本発明の方法および組成物での使用に適している。表3および表4の情報は、文献および例えばNational Institutes of Health(NIH) Human Stem Cell Registry、Human Embryonic Stem Cell RegistryおよびUniversity of Massachusetts Medical School、Worcester、Massachusetts、USAにあるInternational Stem Cell Registryを含めた公的に利用可能なデータベースから得られるものである。これらのデータベースは、細胞株が利用可能になり登録が得られた時に定期的に更新されている。

本明細書に記載のヒトイPSC(少なくともiPSC-603およびiPSC-482-c7)はCellular Dynamics International, Inc.(Madison, Wisconsin, USA)により提供されたものである。

【表3】

表3:ヒト人工多能性幹(hIPS)細胞系のリスト

University of Wisconsin-Madison(USA)	<p>1. IPS(FORESKIN)-1 (正常 ;46XY; Yu, J. ら[Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917~20頁。</p> <p>2. IPS(FORESKIN)-2 (Normal; 46XY; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>3. IPS(FORESKIN)-3 (Normal; 46XY; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>4. IPS(FORESKIN)-4 (Normal; 46XY; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>5. IPS(IMR90)-1 (Normal; 46XX; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>6. IPS(IMR90)-2 (Normal; 46XX; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>7. IPS(IMR90)-3 (Normal; 46XX; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>8. IPS(IMR90)-4 (Normal; 46XX; Yu, J., et al. [Thomson] <i>Science</i>. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.)</p> <p>9. IPS-SMA-3.5 (Normal; 46XY; 1型脊髄筋萎縮; Ebert, A. D. ら2009. <i>Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient</i> <i>Nature</i>. 457:277~80頁</p> <p>10. IPS-SMA-3.6 (Normal; 46XY; Type 1 Spinal Muscular Atrophy; Ebert, A. D., et al. 2009. <i>Induced pluripotent stem cells from a spinal</i></p>	10 20 30
--------------------------------------	--	----------------

	muscular atrophy patient Nature. 457:277-80) 11. IPS-WT (Normal; 46XX; Type 1 Spinal Muscular Atrophy; Ebert, A. D., et al. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient Nature. 457:277-80)	
University of California, Los Angeles(USA)	<p>1. IPS-1(Karumbayaram, S. ら2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806~811頁; Lowry, W. E. ら2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci USA. 105:2883~8頁)</p> <p>2. IPS-2 (Karumbayaram, S. et al. 2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806-811; Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>3. IPS-5 (Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>4. IPS-7 (Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>5. IPS-18 (Karumbayaram, S. et al. 2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806-811; Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>6. IPS-24 (Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>7. IPS-29 (Lowry, W. E., et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p>	10
Mt. Sinai Hospital (Samuel Lunenfeld Research Institute; USA)	<p>1. 60 (Woltjen, K. ら2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239) : 766~70頁)</p> <p>2. 61 (Woltjen, K. et al. 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239):766-70)</p> <p>3. 66 (Woltjen, K. et al. 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature 458(7239):766-70)</p> <p>4. 67 (Woltjen, K. et al. 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature 458(7239):766-70)</p> <p>5. HIPSC117 (Kaji K ら2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239) : 771~5頁)</p> <p>6. HIPSC121 (Kaji K, et al. 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239):771-5)</p>	30
		40

	7. HIPSC122 (Kaji K, et al. 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239):771-5)	
Children's Hospital Boston (USA)	<p>1. 551-IPS8 (Park IH ら 2008。Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature 451:141~6頁)</p> <p>2. ADA-IPS2 ((ADA-SCID) アデノシンデアミナーゼ欠損症関連の重度の複合免疫欠損 (GGG>AGG、エクソン7、ADA遺伝子); Park, I. H. ら 2008。Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877~86頁)</p> <p>3. ADA-IPS3 ((ADA-SCID) Adenosine Deaminase Deficiency-related Severe Combined Immunodeficiency (GGG>AGG, exon 7, ADA gene); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cel 1134(5):877-86)</p> <p>4. BJ1-IPS1 (Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>5. BMD-IPS1 (男性;(BMD) ベッカー筋ジストロフィー(ジストロフィンの未確認の突然変異); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>6. BMD-IPS4 (Normal; 46XY; (BMD) Becker Muscular Dystrophy (Unidentified mutation in dystrophin); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>7. DH1CF16-IPS1 (Normal; 46XY; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>8. DH1CF32-IPS2 (Male; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>9. DH1F-IPS3-3 (Normal; 46XY; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>10. DMD-IPS1 ((Normal; 46XY; DMD) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (エクソン45~52の欠失、ジストロフィン遺伝子); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>11. DMD-IPS2 (Male; (DMD) Duchenne Muscular Dystrophy (Deletion of exon 45-52, dystrophin gene); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>12. DS1-IPS4 (Male; ダウン症候群(21トリソミー)); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>13. DS2-IPS1 (Male; Down syndrome (Trisomy 21)); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>14. DS2-IPS10 (Male; Down syndrome (Trisomy 21)); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>15. GD-IPS1 (Male; (GD) ゴーシェ病III型 (AAC>AGC、エクソン9、G挿入、cDNAのヌクレオチド84、GBA遺伝子); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>16. GD-IPS3 (Male; (GD) Gaucher Disease type III (AAC > AGC, exon 9, G-insertion, nucleotide 84 of cDNA, GBA gene); Park, I. H. et al. 2008.</p>	10
		20
		30
		40

	Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
17.	HFIB2-IPS2 (Park, I. H. ら2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180~6頁)	10
18.	HFIB2-IPS4 (Park, I. H., et al. 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park, I. H. et al. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature 451:141-6)	
19.	HFIB2-IPS5 (Park, I. H., et al. 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park, I. H. et al. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature 451:141-6)	
20.	JDM-IPS1 (Normal, 46XX; 若年性真性糖尿病(多因子性); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
21.	JDM-IPS1 (Normal, 46XX; Juvenile diabetes mellitus (multifactorial); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
22.	JDM-IPS2 (Female; Juvenile diabetes mellitus (multifactorial); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	20
23.	JDM-IPS3 (女性 ; Juvenile diabetes mellitus (multifactorial); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
24.	LNSC-IPS2 (Female; レッシーナイハン症候群(保因者、HPRT1のヘテロ接合; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
25.	MRC5-IPS7 (Male; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
26.	MRC5-IPS12 (Normal; 46XY; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	30
27.	MRC5-IPS1 (Male; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
28.	PD-IPS1 (Male; パーキンソン病(多因子性); Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
29.	SBDS-IPS1 (Male; スワックマン-ボジアン-ダイアモンド症候群(IV2 + 2T>C およびIV3 - 1G>A, SBDS遺伝子; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
30.	SBDS-IPS2	40
31.	SBDS-IPS3 (Normal; 46XY; Swachman-Bodian-Diamond syndrome (IV2 + 2T>C and IV3 - 1G>A, SBDS gene; Park, I. H. et al. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)	
Harvard University(USA)	1. A29a (46XX; [ALS]筋萎縮性側索硬化症(L144F[Leu144>Phe]スーパーオキシドスムターゼ(SOD1)遺伝子の優性対立遺伝子)	

(USA)	<p>Phe] dominant allele of the superoxide dismutase (SOD1) gene; 白人:Dimos, J. T. ら2008。Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motorneurons Science. 321:1218~21頁)</p> <p>2. A29b (46XX; (ALS) Amyotrophic Lateral Sclerosis (L144F [Leu144 > Phe] dominant allele of the superoxide dismutase (SOD1) gene; Caucasian; Dimos, J. T., et al. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons Science. 321:1218-21)</p> <p>3. A29c (46XX; (ALS) Amyotrophic Lateral Sclerosis (L144F [Leu144 > Phe] dominant allele of the superoxide dismutase (SOD1) gene; Caucasian; Dimos, J. T., et al. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons Science 321:1218-21)</p>	10
Salk Institute(USA)	<p>1. HAIR-iPS1(Aasen, T. ら[Belmonte, J. C.]2008。Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nat Biotechnol 26:1276~84頁)</p> <p>2. HAIR-iPS2 (Aasen, T., et al [Belmonte, J. C.] 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nat Biotechnol 26:1276-84)</p>	
Royan Institute(Iran)	<p>1. R.1.H.iPSC.1(OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; ヒト線維芽細胞) 2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 9. RP2.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS細胞) 10.LCA.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS cells) 11.USH.1.H.iPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 12.RP.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 13.ARMD.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Human fibroblasts) 14.LHON.1.H.iPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS cells) 15.CNS.1.H.iPSC.10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS cells) 16.CNS.2.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS cells)</p>	20 30
Centre of Regenerative Medicine in Barcelona (Spain)	<p>1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc;ヒト包皮ケラチノサイト; 46XY) 2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); ヒト表皮ケラチノサイト) 3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc human foreskin keratinocytes; 46XY) 4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Epidermal keratinocytes; 46XY) 5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Epidermal keratinocytes; 46XY)</p>	40

Universite Paris-Sud 11 (France)	<ol style="list-style-type: none"> 1. PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 一次羊膜細胞; 46XX; Lentivirus) 2. PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; B-Thalassemia affected; 46XY; レンチウイルス) 3. PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; B-Thalassemia affected; 46XY; Lentivirus) 4. PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; B地中海貧血症罹患; 46XY; Lentivirus) 5. PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; Down Syndrome; 47XY, +21; Lentivirus) 6. PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; ダウン症候群; 47XY, +21; Lentivirus) 7. PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Primary Amniocytes; 46XY; レトロウイルス (Retrotivirus)) 8. PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; Primary Amniocytes; 46XY; Retrotivirus) 9. PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; Primary Amniocytes; 46XY; Lentivirus) 10. PB10 (Oct4, Sox2; Primary Amniocytes; 46XY, Lentivirus) 	10
Kyoto University (Japan)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 201B1 (human fibroblast; 46XX) 2. 201B2 (human fibroblast; 46XX) 3. 201B3 (human fibroblast; 46XX) 4. 201B6 (human fibroblast; 46XX) 5. 201B7 (human fibroblast; 46XX) 6. 243H1 (human fibroblast) 7. 243H7 (human fibroblast) 8. 246B1 (Normal, 46XX) 9. 246B2 (Normal, 46XX) 10. 246B3 (Normal, 46XX) 11. 246B4 (Normal, 46XX) 12. 246B5 (Normal, 46XX) 13. 246B6 (Normal, 46XX) 14. 246G1 (human fibroblast; Takahashi, K. ら2007。Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861~72頁) 15. 246G3 (human fibroblast; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 16. 246G4 (human fibroblast; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of 	20 30 40

	pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
	17.246G5 (human fibroblast; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	10
	18.246G6 (human fibroblast; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
	19.253F1 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
	20.253F2 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
	21.253F3 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
	22.253F4 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	20
	23.253F5 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)	
Shanghai Institutes for Biological Sciences(China)	24.HAFDC-IPS-6(Li C. ら2009。Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells Hum Mol Genet. 2009年11月15日;18(22):4340~9頁) 25.IPS-S(Liao, J. ら2008。Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem(iPS)cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors Cell Res. 18:600~3頁)	30

【 0 0 7 4 】

別の利点は、そのような h I P S 細胞が免疫学的に適合した自己細胞集団であり、患者に特異的な細胞により、疾患の起源および進行を試験することが可能になることである。したがって、疾患の根本原因を理解することが可能であり、それにより、疾患に対する予防的処置および治療的処置の開発を導く洞察がもたらされ得る。

【 0 0 7 5 】

多能性ヒト胚性幹(h E S)細胞

一部の実施形態は、胚体内胚葉細胞および最終的には、これだけに限定されないが、前腸内胚葉、臍臓内胚葉、内分泌先駆細胞および / または臍島ホルモン発現細胞を含めた任意の内胚葉系列由来細胞型を、ヒト胚性幹(h E S)細胞を出発材料として使用して導出するための方法を対象とする。これらの h E S 細胞は、桑実胚、胚内部細胞塊または胚の生殖隆起から得られるものを起源とする細胞であってよい。ヒト胚性幹細胞は、当技術分野で公知の方法を使用して、培養物中、実質的な分化を伴わずに多能性の状態で維持することができる。そのような方法は、例えば、米国特許第 5 , 4 5 3 , 3 5 7 号、同第 5 , 6 7 0 , 3 7 2 号、同第 5 , 6 9 0 , 9 2 6 号、同第 5 , 8 4 3 , 7 8 0 号、同第 6 , 2 0 0 , 8 0 6 号および同第 6 , 2 5 1 , 6 7 1 号に記載され、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【 0 0 7 6 】

いくつかのプロセスでは、多能性幹細胞、例えば h E S 細胞は、フィーダー層上で維持

される。そのようなプロセスでは、多能性細胞を多能性の状態で維持することを可能にする任意のフィーダー層を使用することができる。ヒト胚性幹細胞の培養 (cultivation) に一般に使用されるフィーダー層の1つは、マウス線維芽細胞の層である。つい最近、多能性細胞の培養 (cultivation) において使用するためのヒト線維芽細胞フィーダー層が開発された（その開示は参考により本明細書に完全に組み込まれる米国特許出願公開第2002/0072117号）。代替のプロセスでは、フィーダー層を使用せずに多能性細胞を維持することが可能になる。多能性細胞をフィーダーフリー条件下で維持する方法は、米国特許出願公開第2003/0,175,956号に記載されており、その開示は参考により本明細書に完全に組み込まれる。

【0077】

10

本明細書に記載の多能性細胞は、血清を含むまたは含まない、細胞外マトリックスを含むまたは含まない、FGFを含むまたは含まない培養物中で維持することができる。いくつかの多能性細胞の維持手順では、血清代替物を使用する。多能性細胞または多分化能細胞を培養し、分化させるためのこれらおよび他の方法は、それぞれ、PCT/US2007/062755、2007年2月23日出願、表題COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING DIFFERENTIAL CELLSおよびPCT/US2008/080516、2008年10月20日出願、表題METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOtent STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUMに記載され、それらは参考により本明細書に完全に組み込まれる。

【0078】

20

本明細書に記載の発明は全てのhES細胞株、および少なくとも、表4に列挙されているものと共に有用である。この情報は、文献および例えば、National Institutes of Health(NIH) Stem Cell Registry、Human Embryonic Stem Cell RegistryおよびUniversity of Massachusetts Medical School、Worcester、Massachusetts、USAにあるInternational Stem Cell Registryを含めた公的に利用可能なデータベースから得られるものである。これらのデータベースは、細胞株が利用可能になり登録が得られた時に定期的に更新されている。本出願の出願日現在、International Stem Cell Registryに掲載された254個のiPSC系、および121個のhESC系があった。以下の表4は列挙されているhESCおよびiPSCの全てを含むものではなく、潜在的に入手可能な多能性幹細胞の例である。

30

【表4】

表4:ヒト胚幹(hES)細胞系のリスト

施設(国名)	名称
U.S.A.	
BresaGen, Inc. , Athens, Georgia(USA)	BG01, BG02, BG03; BG04; BG01v
Invitrogen(USA)	BG01v/hOG
CyThera, Inc. , San Diego, California(USA)	CyT49, CyT203, CyT25
Geron Corporation, Menlo Park, California(USA)	GE01, GE07, GE09, GE13, GE14, GE91, GE92 (H1, H7, H9, H13, H14, H9.1, H9.2)
University of California, San Francisco, California(USA)	UC01, UC06 (HSF-1, HSF-6); UCSFB1, UCSFB2, UCSFB3, UCSFB4, UCSFB5, UCSFB6, UCSFB7, UCSFB8, UCSFB9 & UCSFB10
Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin(USA)	WA01, WA07, WA09, WA13, WA14 (H1, H7, H9, H13, H14)
Children's Hospital Corporation(USA)	CHB-1, CHB-2 CHB-3 CHB-4, CHB-5, CHB-6, CHB-8, CHB-9, CHB-10, CHB-11 & CHB-12
The Rockefeller University(USA)	RUES1, RUES2 & RUES3
Harvard University(USA)	HUES1, HUES2, HUES3, HUES4, HUES5, HUES6, HUES7, HUES8, HUES9, HUES10, HUES11, HUES12, HUES13, HUES14, HUES15, HUES16, HUES17, HUES18, HUES19, HUES20, HUES21, HUES22, HUES23, HUES24, HUES25, HUES26, HUES27; HUES28; HUES48; HUES49; HUES53; HUES55 & HUES 56
Mt Sinai Hospital—Samuel Lunenfeld Research Institute(USA)	CA1 & CA2
Children's Memorial Hospital(USA)	CM-1, CM-2, CM-5, CM-6, CM-7, CM-8, CM-11, CM-12, CM-13, CM-14, CM-16
The University of Texas Health Science Center at Houston(USA)	CR1 & CR2
California Stem Cell, Inc. (USA)	CSC14
University of Connecticut School of Medicine/Dentistry(USA)	CSC14, CT1, CT2, CT3, & CT4
The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College(USA)	FY-3PN; FY-hES-1; FY-hES-3; FY-hES-5; FY-hES-7 & FY-hES-8
Advanced Cell Technology, Inc. (USA)	MA 01; MA 09; MA 42; MA 50; MA135; NED 1; NED 2; NED 3 & NED 4
Stanford University(USA)	MFS5
New York University School of Medicine(USA)	NYUES1; NYUES2; NYUES3; NYUES4; NYUES5; NYUES6 & NYUES7
Reprogenetics, LLC(USA)	RNJ7
University of California, Los Angeles(USA)	UCLA1; UCLA2 & UCLA3
Eastern Virginia Medical School(USA)	ES-76; ES-78-1; ES-78-2
Reproductive Genetics Institute(USA)	RG-222; RG-230; RG-249; RG-308; RG-313;

10

20

30

40

	RG-148; 筋緊張性ジストロフィー1(DM1), 罹患, 46,XY; RG-153; DYSTROPHIA MYOTONICA 1 (DM1), affected, 46,XX; RG-170; 筋ジストロフィー、ベッカ一型(BMD), affected, 46,XY; RG-186; ハンチントン舞蹈病(HD), affected, 46,XX; RG-194; HUNTINGTON DISEASE (HD), affected, 46,XY; RG-233; ヘモグロビンB遺伝子座(HBB)、罹患(HbS/ HbS-鎌状赤血球性貧血), 46,XX; RG-245; エメリードライフス筋ジストロフィー、 X連鎖(EDMD), 保因者, 47,XXY;	10
	RG-246; EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, X-LINKED (EDMD), affected, 46,XY; RG-271; 捻転ジストニー1(DYT1)、常染色体優性、 罹患(N/GAG欠失), 46,XY;	20
	RG-283; 筋ジストロフィー、デュシェンヌ型(DMD), affected, 46,XY; RG-288; 囊胞性線維症(CF)、罹患(デルタF508 /デルタF508), 46,XY; RG-289; CYSTIC FIBROSIS (CF), affected (deltaF508/deltaF508), 46,XX;	30
	RG-301; MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE TYPE(DMD) affected, 46,XY; RG-302; MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE TYPE(DMD), carrier, 46,XX; RG-315; 神経線維腫症、I型(NF1), affected(R19 47X/N), 46,XY; RG-316; 結節硬化、1型(TSC1), affected(N/IVS7+1 G-A);	40
	RG-316; TUBEROUS SCLEROSIS, TYPE 1(TSC1), affected(N/IVS7+1 G-A); RG-320; TUBEROUS SCLEROSIS, TYPE 1(TSC1), affected(N/IVS7+1 G-A); RG-326; 膝窩翼状片症候群(PPS), affected(R84H/N), 46,XY;	
	RG-328; 顔面肩甲上腕筋ジストロフィー1A(FSHD), affected, 46,XY; RG-330; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected, 46,XY;	
	RG-333; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected, 46,XX;	
	RG-356; ヘモグロビンアルファ遺伝子座(HBA)、 罹患(-アルファ/-), 46,XX;	

	<p>RG-357; EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, X-LINKED (EDMD), affected, 46,XY;</p> <p>RG-358; EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, X-LINKED (EDMD), affected, 46,XY;</p> <p>RG-399; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected, 46,XX;</p> <p>RG-401; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected, 46,XX;</p> <p>RG-402; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected, 46,XX;</p> <p>RG-403; FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY 1A (FSHD), affected;</p> <p>RG-404; 脊髄筋萎縮、I型(SMA1), affected, 46,XY;</p> <p>RG-406; TORSION DYSTONIA 1, AUTOSOMAL DOMINANT (DYT1), affected (N/GAG del);</p> <p>RG-413; 乳がん、家族性(BRCA2)、罹患(N/IVS7 GT欠失) & 多発性内分泌腫瘍、I型(MEN1)、罹患(N/30364bp欠失);</p> <p>RG-414; 多発性内分泌腫瘍、I型(MEN1)、罹患(N/30364bp欠失);</p> <p>RG-415; HUNTINGTON DISEASE (HD), affected;</p> <p>RG-416; 囊胞性線維症(CF)、罹患(デルタF508/1717-1 G-A);</p> <p>RG-417; CYSTIC FIBROSIS (CF), affected (deltaF508/1717-1 G-A);</p> <p>RG-418; ヘモグロビンB遺伝子座(HBB)、罹患(cd8+G/619欠失);</p> <p>RG-420; HEMOGLOBIN B LOCUS (HBB), affected (cd8+G/619del);</p> <p>RG-422; 囊胞性線維症(CF)、罹患(N1303K/デルタF508);</p> <p>RG-423; 囊胞性線維症(CF)、保因者(N/デルタF508);</p> <p>RG-424; 多発性内分泌腫瘍、2型(MEN2B); affected (M918T/N);</p> <p>RG-426; ペリツエーウスマーレツバッヒャー病(PMLD), affected;</p> <p>RG-428; TUBEROUS SCLEROSIS, TYPE 1 (TSC1), affected (N/IVS7+1 G-A);</p>	10
		20
		30
		40

南アメリカ	
Instituto de Biociencias, Sao Paulo(Brazil)	BR-1

中東	
----	--

Technion—Israel Institute of Technology, Haifa (Israel)	TE03, TE04, TE06 (I 3, I 4, I 6)
Hadassah University Hospital (Israel)	HAD 1; HAD 2; HAD 3; HAD 4; HAD 5; HAD 6
Hebrew University of Jerusalem	HEFX1
Technion—Israel Institute of Technology	I3; I3.2; I3.3; 14; 16; 16.2; J3; J3.2
Royal Institute (Iran)	ARMD.1.H.iPSC.2; BOM.1.H.iPSC.1; CNS.1.H.iPSC.10; CNS.2.H.iPSC.7; FHC.1.H.iPSC.3; GSD.1.H.iPSC.7; HER.1.H.iPSC.1; LCA.1.H.iPSC.1; LHON.1.H.iPSC.5; R.1.H.iPSC.1; R.1.H.iPSC.4; R.1.H.iPSC.9; Royal H1; Royal H10; Royal H2; Royal H3; Royal H4; Royal H5; Royal H6; Royal H7; Royal H8; Royal H9; RP.1.H.iPSC.2; RP.2.H.iPSC.3; TYR.1.H.iPSC.1; USH.1.H.iPSC.6

10

欧洲	
Cellartis AB, Gotenberg (Sweden)	SA001, SA002 (Sahlgrenska 1, Sahlgrenska 2); SA002.2; SA003; AS034.1; AS034.1.1; AS034.2; AS038; AS046; FC018; ASo85; AS094; SA111; SA121; SA142; SA167; SA181; SA191; SA196; SA202; SA203; SA211; SA218; SA240; SA279; SA348; SA352; SA399; SA461; SA502; SA506; SA521; SA540; SA611
Karolinska Institutet (Sweden)	HS181; HS207; HS235; HS237; HS293; HS306; HS346; HS351; HS356; HS360; HS361; HS362; HS363; HS364; HS366; HS368; HS380; HS382; HS400; HS401; HS402; HS415; HS420; HS422; HS426; HS429; HS429A; HS429B; HS429C; HS429D; HS475; HS480; HS481; HS539
Goteborg University, Goteborg (Sweden)	SA04-SA19 (Sahlgrenska 4-Sahlgrenska 19)
Karolinska Institute, Stockholm (Sweden)	KA08, KA09, KA40, KA41, KA42, KA43 (hICM8, hICM9, hICM40, hICM41, hICM42, hICM43)
Geneva University (Switzerland)	CH-ES1
University of Basel (Switzerland)	CH-ES3; CH-ES3; CH-ES5
Roslin Cells Ltd (UK)	RC2; RC3; RC4; RC5
University of Newcastle upon Tyne (UK)	NCL-1; NCL-2; NCL-3; NCL-4; NCL-5; NCL-6; NCL-7; NCL-8; NCL-9
Roslin Institute (Edinburgh) & Geron Corporation (UK)	RH1; RH2; RH3; RH4; RH5; RH6; RH7; RH9;
University of Manchester (UK)	Man 2
King's College London (UK)	KCL-001 (旧称、WT3)
The University of Sheffield, Sheffield (UK)	SHEF-1; SHEF-2; SHEF-3; SHEF-4; SHEF-5; SHEF-6; SHEF-7; SHEF-8
Universities of Edinburgh & Oxford; University of Cambridge (UK)	Edi-1; Edi-2; Edi-3; Edi-4
Roslin Cells Ltd, Roslin Institute, Universities of Edinburgh & Manchester, Central Manchester & Manchester Children's University Hospital NHS Trust (UK)	RCM-1; RC-1; RC-2; RC-3; RC-4; RC-5; RC-6; RC-7; RC-8; RC-9; RC-10

20

30

40

Manchester Children's University Hospitals NHS Trust (UK)		
King's College London & Guy's Hospital Trust/Charitable Foundation of Guy's & St Thomas (UK)	KCL-003-CF1 (formerly CF1); KCL-005-HD1; KCL008-HD-2; KCL009-トランス-1; KCL-001 (WT-3); KCL-001 (WT-4)	
Stem Cell Sciences Ltd. Australia (SCS) & Australian Stem Cell Centre (ASCC)	MEL-1; MEL-2; MEL-3; MEL-4	10
University of Edinburgh (UK)	CB660	
Axordia Ltd. (UK)	Shef-1; Shef-2; Shef-3; Shef-4; Shef-5; Shef-6; Shef-7	
University of Nottingham (UK)	Nott-1; Nott-2	
Centre of Regenerative Medicine in Barcelona (Spain)	ES-2; ES-3; ES-4; ES-5; ES-6; ES-7; ES-8; ES-9; ES-10; ES-11EM; cFA404-KiPS4F-1; cFA404-KiPS4F-3; KiPS3F-7; KiPS4F-1; KiPS4F-8	
Principe Felipe Centro de Investigacion (Spain)	VAL-3; VAL-4; VAL-5; VAL-6M; VAL-7; VAL-8; VAL-9; VAL-10B	
Universite Libre de Bruxelles (Belgium)	ERA-1; ERA2; ERA-3; ERAMUC-1; ERAMUC-1	
Vrije Universiteit Brussel (Belgium)	VUB01; VUB02; VUB06; VUB07; VUB03_DM1; VUB04_CF; VUB05_HD; VUB08_MFS; VUB09_FSHD; VUB10_SCA7; VUB11_FXS; VUB13_FXS; VUB14; VUB19_DM1; VUB20_CMT1A; VUB22_CF; VUB23_OI; VUB24_DM1; VUB26; VUB27; VUB28_HD_MFS	
Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals NHS (UK)	Man 1; Man 2	
Universite Paris-Sud 11 (France)	CL01; CL02; CL03; PB04; PB05; PB05-1; PB06; PB06-1; PB07; PB08; PB09; PB10	20
INSERM (France)	OSCAR; STR-I-155-HD; STR-I-171-GLA; STR-I-189-FRAXA; STR-I-203-CFTR; STR-I-209-MEN2a; STR-I-211-MEN2a; STR-I-221-Sca2; STR-I-229-MTMX; STR-I-231-MTMX; STR-I-233-FRAXA; STR-I-251-CFTR; STR-I-301-MFS; STR-I-305-APC; STR-I-315-CMT1a; STR-I-347-FRAXA; STR-I-355-APC; STR-I-359-APC	
Masaryk University (Czech Republic)	CCTL 6; CCTL 8; CCTL 9; CCTL 10; CCTL 12; CCTL 13; CCRL 14	
Aalborg University (Denmark)	CLS1; CLS2; CLS3; CLS4	
University of Copenhagen (Denmark)	LRB001; LRB002; LRB003; LRB004; LRB005; LRB006; LRB007; LRB008; LRB009; LRB010; LRB011; LRB013; LRB014; LRB016; LRB017; LRB018;	
University of Southern Denmark	KMEB1; KMEB2; KMEB3; KMEB4; KMEB	
University of Helsinki (Finland)	FES21; FES22; FES29; FES30; FES61; FES75	
University of Tampere (Finland)	Regea 06/015; Regea 06/040; Regea 07/027; Regea 07/046; Regea 08/013; Regea 08/017; Regea 08/023; Regea 08/056	
Leiden University Medical Center (Netherlands)	HESC-NL1; HESC-NL2; HESC-NL3; HESC-NL4	40
Russian Academy of Sciences (Russia)	ESM01; ESM02; ESM03;	
Instanbul Memorial Hospital (Turkey)	MINE: NS-2; NS-3; NS-4; NS-5; NS-6; NS-7; NS-8; NS-9; NS-10; OZ-1; OZ-2; OZ-3; OZ-4; OZ-5; OZ-6; OZ-7; OZ-8	

オーストラリア	
Monash University(Australia)	Envy
Prince of Wales Hospital, Sydney(Australia)	E1C1; E1C2; E1C3; E1C4; Endeavour 1; Endeavour 2; hES3.1; hES3.2; hES3.3
Sydney IVF Limited (Australia)	SIVF01; SIVF03; SIVF05; SIVF06; SIVF07; SIVF08; SIVF09; SIVF10; SIVF11; SIVF12; SIVF13

アジア	
Kyoto University(Japan)	201B1; 201B2; 201B3; 201B6; 201B7; 243H1; 243H7; 246G1; 246G3; 246G4; 246G5; 246G6; khES-1; khES-2; khES-3;
Singapore Stem Cell Consortium	ESI-013; ESI-014; ESI-017; ESI-027; ESI-035; ESI-049; ESI-051; ESI-053
ES Cell International Pte Ld(Singapore)	ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06 (HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6
Maria Biotech Co. Ltd. —Maria Infertility Hospital Medical Institute、Seoul(Korea)	MB01, MB02, MB03; MB04; MB05; MB06; MB07; MB08; MB09
MizMedi Hospital—Seoul National University、Seoul(Korea)	MI01 (Miz-hES1); Miz-hES2; Miz-hES3; Miz-hES4; Miz-hES5; Miz-hES6; Miz-hES7; Miz-hES8; Miz-hES9; Miz-hES10; Miz-hES11; Miz-hES12; Miz-hES13; Miz-hES14; Miz-hES15;
Pochon CHA University College of Medicine(Korea)	CHA-hES3; CHA-hES4
Seoul National University (Korea)	SNUhES1; SNUhES2; SNUhES3; SNUhES4; SNUhES11; SNUhES16
National Centre for Biological Sciences／Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore(India)	NC01, NC02, NC03 (FCNCBS1, FCNCBS2, FCNCBS3); BJT-hem19; BJT-hem20
Reliance Life Sciences, Mumbai(India)	RL05, RL07, RL10, RL13, RL15, RL20, RL21 (RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10,
National Institute for Research in Reproductive Health(India)	KIND-1; KIND-2
Tata Institute of Fundamental Research(India)	FCNCBS1; FCNCBS2; FCNCBS3
Kaohsiung Medical University(Taiwan)	T1; T2; T3; T4; T5
Central South University(China)	chESC-3 (H3); chESC-8; chESC-20; chESC-22; EBNA1+H9
Graduate University of Chinese Academy of Sciences(China)	hPES-1; hPES-2
Huazhong University of Science and Technology(China)	hES-8; hES18
Peking University Third Hospital(China)	B4; B7; PKU1; PKU2
Shanghai Jiao Tong University Schoolof Medicine(China)	SHhES1
Shanghai Second Medical University(China)	SH1; SH2; SH4; SH7; SH28; SH35; SH35a; SH38; SH39; SH42
Sun Yat-sen University(China)	CHES-1; SYSU-1; SYSU-2
Sun Yat-sen University Second Affiliated Hospital(China)	CHE-1; CHE-2; CHE-3
The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College(China)	FY-hES-5; FY-hES-9; FY-hES-10;; FY-hES-11

【0079】

多能性脱分化体細胞

最近、ある特定の核リプログラミング因子を使用した試験により、多能性幹細胞または多能性様幹細胞を患者自身の体細胞から導出することが可能になった。これらの細胞は人

10

20

30

40

50

人工多能性幹(iPS)細胞とも称される。本発明では、Shinya Yamanaka、Kyoto Universityにより提供された種々のiPS細胞株について記載されている。しかし、他のiPS細胞株、例えばJames Thomsonら、A1.に記載されているものは本発明によるものである。参照により本明細書に完全に組み込まれる、米国特許出願公開第20090047263号、国際公開WO2005/80598、米国特許出願公開第20080233610号および国際公開WO2008/11882を参照されたい。したがって、本明細書で使用される場合、「人工多能性幹(iPS)細胞」とは、他の多能性幹細胞、例えばhES細胞、hEG細胞、pPS(靈長類多能性幹)細胞、単為発生細胞などと同様の性質を有する細胞を意味する。

【0080】

核プログラミング因子は、米国特許出願公開第20090047263号、国際公開WO2005/80598、米国特許出願公開第20080233610号および国際公開WO2008/11882に記載されており、卵、胚、またはES細胞を使用せずに、分化した細胞のリプログラミングを誘導するために使用される。本発明で使用され、記載されているものと同様の核リプログラミング因子を使用することによって体細胞から誘導されたiPS細胞を調製するための方法は特に限定されない。好ましい実施形態では、体細胞および人工多能性幹細胞が増殖し得る環境で核リプログラミング因子を体細胞と接触させる。本明細書に記載のある特定の実施形態の利点は、卵、胚、または胚性幹(ES)細胞の不在下で核リプログラミング因子を体細胞と接触させることによって人工多能性幹細胞を調製することができることである。核リプログラミング因子を使用することによって、体細胞の核をリプログラミングしてiPS細胞または「ES様細胞」を得ることができる。

【0081】

本明細書に記載の多能性幹細胞は、hES細胞であるかiPS細胞であるかにかかわらず、これだけに限定されないが、アルカリホスファターゼ(AP)；ABC G2；ステージ特異的胚抗原-1(SSEA-1)；SSEA-3；SSEA-4；TRA-1-60；TRA-1-81；Tra-2-49/6E；ERas/ECAT5、E-カドヘリン；. . . III - チューブリン；. アルファ. - 平滑筋アクチン(アルファ. - SMA)；線維芽細胞成長因子4(Fgf4)、クリプト(Cripto)、Dax1；ジンクフインガータンパク質296(Zfp296)；N-アセチルトランスフェラーゼ-1(Nat1)；(ES細胞関連転写物1(ECAT1)；ESG1/DPPA5/ECAT2；ECAT3；ECAT6；ECAT7；ECAT8；ECAT9；ECAT10；ECAT15-1；ECAT15-2；Fth117；Sal14；未分化胚細胞転写因子(Utf1)；Rex1；p53；G3PDH；TERTなどのテロメラーゼ；サイレントX染色体遺伝子；Dnmt3a；Dnmt3b；TRIM28；F-ボックス含有タンパク質15(Fbx15)；Nanog/ECAT4；Oct3/4；Sox2；Klf4；c-Myc；Esrrb；TDGF1；GABRB3；Zfp42；FoxD3；GDF3；CYP25A1；発生多能性関連2(developmental pluripotency-associated 2)(DPPA2)；T細胞リンパ腫ブレイクポイント1(T-cell lymphoma breakpoint 1)(Tcl1)；DPPA3/Stell1a；DPPA4などの任意の数の多能性細胞マーカーを発現し得る。本発明は本明細書において列挙されているマーカーに限定されず、細胞表面マーカー、抗原、ならびにEST、RNA(マイクロRNAおよびアンチセンスRNAを含む)、DNA(遺伝子およびcDNAを含む)およびその一部を含めた他の遺伝子産物などのマーカーを包含することが理解される。

【0082】

一実施形態では、本明細書で使用されるiPS細胞株は、以下の核リプログラミング因子遺伝子を含有する：Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、およびSoxファミリー遺伝子。ある1つのiPS細胞株では、以下の3種類の遺伝子：Oct3/4、Klf4、およびSox2のそれぞれが提供される。以下の3種類の遺伝子：Oct3/4、Klf4、およびSox2のそれぞれが提供される。

10

20

30

40

50

アミリー遺伝子、*Klf*ファミリー遺伝子、および*Myo*cファミリー遺伝子、例えば、*Oct3/4*、*Klf4*および*c-Myc*のそれぞれの他の*iPS*細胞株遺伝子産物を使用した。したがって、核リプログラミング因子は*Myo*cファミリー遺伝子を含んでもよく含まなくともよいことが理解される。

【0083】

本明細書に記載されており、当技術分野でも公知の核リプログラミング因子は、分化した成体の体細胞から*iPS*細胞を生じさせるために使用することができ、また、これはリプログラミングされる体細胞の型に限定されない、すなわち、任意の種類の体細胞をリプログラミングまたは脱分化させることができる。体細胞のリプログラミングには卵および/または胚が必要ないので、*iPS*細胞は哺乳動物細胞であってよく、したがって、患者または疾患に特異的な多能性幹細胞を生じさせる機会がもたらされる。

10

【0084】

多能性幹細胞の凝集懸濁液

個々の細胞をポリマー足場、マトリックスおよび/またはゲルに播種することに基づく、以前に公知の組織工学の方法とは対照的に、本明細書に記載の実施形態では、多能性幹細胞から形成された細胞凝集懸濁液、単一細胞懸濁液またはそれから導出された分化した単一細胞懸濁液を使用することができる。幹細胞凝集懸濁液の処理および/または製造ならびにその細胞の分化の方法は、国際出願PCT/US2007/062,755およびPCT/US2008/082,356に記載され、それらは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

20

【0085】

一実施形態では、多能性幹細胞培養物、例えば*hES*または*iPS*細胞培養物の単細胞懸濁液から、多能性幹細胞凝集懸濁液を生成する方法が提供される。多能性幹細胞は線維芽細胞フィーダーで最初に培養することができるか、またはフィーダーフリーであってもよい。*hES*細胞を単離し、それらをヒトフィーダー細胞の上で培養する方法は、米国特許第7,432,104号に記載され、それは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0086】

本明細書で使用される場合、「単一細胞懸濁液」という用語またはその等価物は、多能性、多分化能もしくは最終分化した単一細胞懸濁液、または多能性細胞もしくは多分化能細胞から任意の機械的手段または化学的手段によって導出された単一細胞懸濁液を指す。一次組織、付着した培養物中の細胞、および凝集体から細胞クラスターを解離させて単一細胞懸濁液を形成するためのいくつかの方法、例えば、物理的な力（細胞スクレーパー、口径が狭いピペットを通しての粉碎、細針穿刺吸引、ボルテックスによる脱凝集および細かいナイロンメッシュまたはステンレス鋼メッシュを通した強制的な濾過などの機械的解離）、酵素（例えばトリプシン、コラゲナーゼ、アキュターゼ（商標）などの酵素による解離）、またはその両方の組合せが存在する。さらに、多能性細胞、多分化能細胞または分化した細胞の単一細胞への解離を支持することができる方法および培養培地条件は、多ウェルプレートアッセイのための増殖、細胞選別、および規定された播種のために有用であり、また、培養順およびクローン増殖の自動化を可能にする。

30

【0087】

他の実施形態は、分化培地、例えば作用物質、好ましくはTGF ファミリーの受容体を活性化することが可能であるTGF ファミリーメンバー、例えばアクチビンA、アクチビンB、GDF-8、GDF-11およびNodalを含有する分化培地に、多能性幹細胞凝集懸濁液を直接に生成する方法を提供する。内胚葉の生成のための成長因子は、国際出願番号PCT/US2008/065,686に記載され、それは参照により完全に本明細書に組み込まれる。分化培地で細胞凝集懸濁液を生成する方法は、同様に本明細書に記載される、多能性幹細胞培地、例えばPCT/US2007/062,755に記載されるヘレグリンをベースとしたDC-HAI F培地に基づくStemPro（登録商標）*hES* SFM (*In vitro*)で細胞凝集懸濁培養物の生成を提供する他の

40

50

方法から区別することができる。

【0088】

本明細書に記載の実施形態は、多能性接着培養物から、多能性細胞を、未分化の状態での増殖を可能にする接着性成長培養条件で培養し、接着性多能性細胞培養物を单一細胞懸濁培養物に解離させ、单一細胞懸濁培養物を、单一細胞懸濁培養物を单一細胞懸濁培養物から懸濁液中の多能性由来細胞凝集体が形成されるまでの期間にわたって搅拌することによって懸濁液中のhES由来細胞凝集体の形成を可能にする第1の分化培養条件と接触させ、それにより、懸濁液中の多能性由来細胞凝集体を生じさせることによって懸濁液中の多能性細胞凝集体を生じさせるための方法に関する。好ましい実施形態では、单一細胞懸濁培養物の搅拌は、約80rpm～160rpmで回転されることによって実施する。本明細書に記載のある特定の他の実施形態では、多能性幹細胞の凝集、成長、増殖、増大および／または細胞塊を容易にするためにrhοキナーゼ阻害剤を使用する。10

【0089】

本明細書に記載される実施形態は、未分化状態での増大を可能にする接着性成長培養条件でhES細胞を培養し；未分化hES細胞をhES細胞の分化に適する第1の分化培養条件と接触させて、接着性多能性由来細胞をもたらし；接着性のhES由来細胞を单一細胞懸濁培養物に解離させ；单一細胞懸濁培養物が懸濁状の多能性由来細胞凝集体を形成するそのような時期まで单一細胞懸濁培養物を搅拌することによって、单一細胞懸濁培養物を、懸濁状のhES由来細胞凝集体の形成を可能にする第2の分化培養条件と接触させ、それにより懸濁状の多能性由来細胞凝集体を生成することによって、多能性由来单一細胞懸濁液から懸濁状の多能性由来細胞凝集体を生成する方法にも関する。好ましい実施形態では、单一細胞懸濁培養物の搅拌は、約80rpmから160rpmの回転によって実施される。20

【0090】

好ましい実施形態では、製造規模の懸濁培養は、細胞密度を最大にしながら細胞生存力を維持する方法として、培地の連続灌流を利用する。この関係において、培地交換は、接着細胞および懸濁凝集体に異なった影響を及ぼす流体剪断を培養物に寄与する。培地が細胞表面を接線方向に越流するので、固定された接着細胞は流体剪断応力を受ける。対照的に、凝集体は剪断力の負荷に応答して自由に転がるので、懸濁凝集体が受ける凝集体表面を横切る剪断応力はかなりより弱い。長期間の剪断応力は接着性の多能性細胞に有害であり、最適な生存および機能のために懸濁凝集形式が好ましいと予想される。したがって、多能性幹細胞および／または多能性幹細胞から導出された多分化能前駆細胞の生成のための効率的な製造プロセスの必要性、ならびに剪断速度および剪断応力に関する上記の観察された機構に基づき、本明細書に記載される実施形態は、初めて、懸濁液形式、特に細胞凝集懸濁液形式の、多能性幹細胞から導出された多能性幹細胞および／または多分化能前駆細胞の生成のための製造方法を提供する。30

【0091】

さらに別の実施形態では、hES細胞凝集懸濁液を、血清を実質的に含まない培地中、さらに、外因的に添加された線維芽細胞成長因子(FGF)の不在下で培養した。これは、血清を含まないが、FGFなどの外因的に添加された成長因子を含有する培地中でhES細胞を培養することが必要なThomson, J.に対する米国特許第7,005,252号とは区別される。一部の実施形態では、iPS細胞凝集懸濁液を、血清を実質的に含まない培地中で、かつ／または、さらに、外因的に添加された線維芽細胞成長因子(FGF)の不在下で培養する。40

【0092】

サイズおよび形状の両方が異なるかもしれない既知の方法によって生成される細胞凝集体と対照的に、本明細書に記載される細胞凝集体および方法はサイズおよび形状の狭い分布を有し、すなわち、細胞凝集体はサイズおよび／または形状が実質的に均一である。細胞凝集体のサイズ均一性は、分化性能および培養均一性のために重要である。基本的な物質輸送分析を凝集体に適用すると、等しい透過性を仮定する限り、大きな凝集体の中央へ50

の酸素および栄養素の拡散は、より小さい凝集体への拡散と比較して遅くなると予想される。臍臓系列細胞への凝集 E S 細胞または i P S 細胞の分化は特定の成長因子の一時的適用に依存するので、異なる径の凝集体の混合物による培養物は、細胞凝集体の均一な（サイズおよび形状）培養物と比較して非同期化される可能性がある。細胞凝集体のこの混合物は異質性をもたらし、結果として分化性能が劣り、最終的に製造、規模拡大および生産に適合しない可能性がある。したがって、本明細書で使用される場合、語句「実質的に均一」または「サイズおよび形状が実質的に均一」またはその同等物は、凝集体の均一性の広がり程度を指し、約 20 % 以下である。別の実施形態では、凝集体の均一性の広がり程度は、約 15 %、10 % または 5 % 以下である。

【0093】

10

凝集体当たりの細胞の正確な数は重要ではないが、各凝集体のサイズ（したがって、凝集体当たりの細胞の数）は酸素および栄養分が中心細胞に拡散する最大限度によって限定されること、およびこの数は細胞型およびその細胞型の栄養素の要件に応じても変動し得ることが当業者には理解されよう。細胞凝集体は、凝集体当たり最小数の細胞（例えば、2つまたは3つの細胞）を含んでもよく、凝集体当たり何百ものまたは何千もの細胞を含んでもよい。一般には、細胞凝集体は、凝集体当たり数百から数千の細胞を含む。本発明の目的上、細胞凝集体は、一般には約 50 ミクロンから約 600 ミクロンまでのサイズであるが、細胞型に応じて、サイズはこの範囲を下回ることも上回ることもある。一実施形態では、細胞凝集体は、約 50 ミクロンから約 250 ミクロンまでのサイズ、または約 75 ~ 200 ミクロンのサイズであり、約 100 ~ 150 ミクロンのサイズであることが好みしい。

【0094】

20

さらに他の方法では胚様体（E B）の作製が記載されている。本明細書で使用される場合、「胚様体」、「凝集体（aggregate body）」という用語またはその等価物は、E S 細胞が単層培養物中で過成長した際、または、未定義の培地中の懸濁培養物中で維持された、または非定方向プロトコルによって多数の胚葉組織に分化した際に生じる分化した細胞および未分化の細胞の凝集体を指す。すなわち、E B は、本明細書に記載の多能性幹細胞の単一細胞懸濁液から形成されることもなく、E B は、多能性由来多分化能細胞の接着培養物から形成されることもない。これらの特徴単独により、本発明は胚葉体から明白に区別される。

【0095】

30

分化した細胞と未分化の細胞の混合物であり、一般にはいくつかの胚葉由来の細胞からなり、ランダムな分化をたどる胚様体とは対照的に、本明細書に記載の細胞凝集体は、基本的にまたは実質的に均一な細胞であり、多能性、多分化能、二分化能、または単能性型の細胞、例えば、胚細胞、胚体内胚葉、前腸内胚葉、P D X 1 陽性臍臓内胚葉、臍臓内分泌細胞などの凝集体として存在する。

【0096】

本明細書に記載される実施形態は、大規模製造に容易に適用することができるプロセスを使用して、サイズおよび形状が実質的に均一である細胞凝集体を繰り返し生成することが可能な費用効率の高い製造プロセスまたは方法を提供することによって、上記の問題に対処する。特定の一実施形態では、分化可能な細胞は、本発明の細胞培地を用いて懸濁培養で増殖させる。別の特定の実施形態では、分化可能な細胞は懸濁状態で維持および増殖することができ、すなわち、それらは未分化のままであるか、さらに分化することを阻止される。細胞培養との関連で「増殖させる」という用語は、当技術分野で使用されるように使用され、細胞の増殖および細胞数の増加、好ましくは存続可能な細胞数の増加を指す。具体的な実施形態では、約 1 日、すなわち約 24 時間を超えて培養することによって、細胞を培養懸濁液で増殖させる。より具体的な実施形態では、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7 日、または少なくとも 2、3、4、5、6、7、8 週の間培養することによって、細胞を懸濁培養で増殖させる。

【0097】

40

50

本発明のさらに他の実施形態は、分化した多能性幹細胞培養物、例えば、上記 d' Amour 2005 および 2006 に記載されるステージ 1、2、3、4 および 5 からの細胞を含む、本明細書に記載される多能性細胞から生成される細胞から形成される細胞凝集懸濁液を生成する方法を提供する。したがって、本明細書に記載される細胞凝集体を作製する方法はいかなる 1 つの多能性または多分化能細胞または細胞ステージにも限定されず、むしろ、使用方法および細胞型最適化の必要性によってどの方法が好ましいかが決定される。

【0098】

多能性細胞、例えば hES または iPS 細胞、および他の多能性細胞源、例えば胚性生殖または単為生殖生物細胞から導出された細胞の凝集懸濁培養物を生成するための本明細書に記載の方法は、実質的に、2007 年 2 月 23 日に出願された表題が Compositions and methods for culturing differentia l cells である PCT/US2007/062,755、および 2008 年 10 月 20 日に出願された表題が Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum である PCT/US2008/080,516 に記載されている通りであり、それらは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0099】

本明細書に記載の方法では、例えば、Bodnar らに対するものであり、Geron Corporation に譲渡された米国特許第 6,800,480 号に記載の通り最初に培養容器を細胞外マトリックスでコーティングする必要は全くない。本明細書に記載の一部の実施形態では、iPS 細胞は、他の多能性幹細胞、例えば hES および iPS 細胞が、実質的に、参照により本明細書に完全に組み込まれる 2008 年 10 月 20 日に出願の、表題が Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum である米国特許出願 PCT/US2008/080,516 に記載されるように可溶性ヒト血清を使用して培養されるのと同じ方法で培養することができる。

【0100】

本明細書に記載の方法では、Thomson, J. に対するものであり、Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF) に譲渡された、参照により本明細書に完全に組み込まれる米国特許第 7,005,252 号に記載の通り単に線維芽細胞フィーダー層以外の供給源から供給される外因的に添加された線維芽細胞成長因子 (FGF) は全く必要ない。

【0101】

多分化能および分化した細胞組成物

本明細書に記載の方法によって生成する細胞組成物は、多能性幹細胞、前原条、中内胚葉、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1 陽性前腸内胚葉、PDX1 陽性臍臍内胚葉または PDX1/NKX6.1 共陽性臍臍内胚葉、内分泌先駆体または NGN3/NKX2.2 共陽性内分泌先駆体、およびホルモン分泌内分泌細胞または INS、GCG、GHL、SST、PP 単独陽性内分泌細胞を含む細胞培養物を含み、培養物中の細胞の少なくとも約 5 ~ 90 % が、生成された前原条、中内胚葉、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1 陽性前腸内胚葉、PDX1 陽性臍臍内胚葉または PDX1/NKX6.1 共陽性臍臍内胚葉、内分泌先駆体または NGN3/NKX2.2 共陽性内分泌先駆体、およびホルモン分泌内分泌細胞または INS、GCG、GHL、SST、PP 単独陽性内分泌細胞である。

【0102】

本明細書に記載の一部の実施形態は、幹細胞および iPS 細胞などの多能性細胞と、前原条、中内胚葉または胚体内胚葉などの多分化能細胞の両方、ならびに、PDX1 陽性前腸内胚葉、PDX1 陽性臍臍内胚葉または PDX1/NKX6.1 共陽性臍臍内胚葉、内

10

20

30

40

50

分泌先駆体またはN G N 3 / N K X 2 . 2 共陽性内分泌先駆体、およびホルモン分泌内分泌細胞またはI N S 、G C G 、G H R L 、S S T 、P P 単独陽性内分泌細胞などの、より分化しているが、なお潜在的に多分化能である細胞を含む細胞集団および細胞培養物などの組成物に関する。例えば、本明細書に記載の方法を使用して、多能性幹細胞および他の多分化能細胞または分化した細胞の混合物を含む組成物を生成することができる。一部の実施形態では、約95の多能性細胞ごとに少なくとも約5の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物が生成する。他の実施形態では、約5の多能性細胞ごとに少なくとも約95の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物が生成する。さらに、他の比の多分化能細胞または分化した細胞と多能性細胞を含む組成物が考えられる。例えば、約1,000,000の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約100,000の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約10,000の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約1000の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約500の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約100の多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、約5の多能性細胞ごと、および約1までの多能性細胞ごとに少なくとも約1の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物、および約1の多能性細胞ごとに少なくとも約1,000,000の多分化能細胞または分化した細胞を含む組成物が考えられる。

10

20

【0103】

本明細書に記載の一部の実施形態は、少なくとも約5%の多分化能細胞または分化した細胞から少なくとも約99%の多分化能細胞または分化した細胞までを含む細胞培養物または細胞集団に関する。一部の実施形態では、細胞培養物または細胞集団は哺乳動物細胞を含む。好ましい実施形態では、細胞培養物または細胞集団はヒト細胞を含む。例えば、ある特定の実施形態は、ヒト細胞を含む細胞培養物であって、ヒト細胞の少なくとも約5%～少なくとも約99%が多分化能細胞または分化した細胞である細胞培養物に関する。他の実施形態は、ヒト細胞を含む細胞培養物であって、ヒト細胞の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または99%超が多分化能細胞または分化した細胞である細胞培養物に関する。細胞培養物または細胞集団がヒトフィーダー細胞を含む複数の実施形態では、細胞培養中のヒトフィーダー細胞を考慮せずに上記の百分率を算出する。

30

【0104】

多能性、多分化能または分化細胞は、前原条、内胚葉系中胚葉、胚体内胚葉の細胞、ならびにそれらから導出される細胞、組織および／または器官に分化すること、またはさらに分化することが可能である。内胚葉系中胚葉細胞は、中胚葉細胞および／または胚体内胚葉細胞、ならびにこれらの系列のいずれかから導出される細胞、組織および／または器官に分化することが可能である。一部の実施形態では、前原条細胞は、内胚葉系中胚葉中間体を通して、中胚葉または胚体内胚葉系列のいずれかの最終分化細胞に変換される。例えば、そのようなプロセスは、ヒト内胚葉由来組織、例えば胰臓、肝臓、肺、胃、腸、甲状腺、上皮小体、胸腺、咽頭、胆嚢および膀胱の効率的な生成のための基礎を提供することができる。重要なことに、前原条細胞および／または内胚葉系中胚葉細胞の生成は、機能的インスリン生成 細胞への多能性幹細胞の分化での初期段階である。別の例として、前原条細胞および／または内胚葉系中胚葉細胞の分化は、ヒト中胚葉由来組織、例えば血球、心血管組織、骨格組織ならびに他の構造および結合組織の効率的な生成のための基礎を提供することができる。

40

50

【0105】

本明細書に記載の組成物および方法には、いくつかの有用な特徴がある。例えば、多分化能細胞、例えば、前原条細胞および／または中内胚葉細胞を含む細胞培養物および細胞集団、ならびにそのような細胞培養物および細胞集団を生成するための方法は、ヒト発生の初期をモデリングするために有用である。さらに、本明細書に記載の組成物および方法は、真性糖尿病などの病態への治療介入としても機能し得る。例えば、前原条細胞および／または中内胚葉細胞は限られた数の組織のみの供給源として機能するので、純粋な組織または細胞の型の発生において使用することができる。前原条細胞を生成するためのいくつかのプロセスでは、出発材料として使用される多能性細胞は、多能性幹細胞、例えばhES細胞、hEG細胞またはiPS細胞である。

10

【0106】**栄養外胚葉細胞**

本明細書に記載の方法を使用して、他の細胞型を実質的に含まない、栄養外胚葉細胞を含む組成物を生成することができる。本明細書に記載の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する栄養外胚葉細胞集団または細胞培養物では、HAND1、Eomes、MASH2、ESXL1、HCG、KRT18、PSG3、SFXN5、DLX3、PSX1、ETS2、およびERBB遺伝子からなる群から選択されるマーカーの発現が、非栄養外胚葉細胞または細胞集団におけるHAND1、Eomes、MASH2、ESXL1、HCG、KRT18、PSG3、SFXN5、DLX3、PSX1、ETS2、およびERBBの発現レベルと比較して実質的に高い。

20

【0107】**前原条細胞**

本明細書に記載の方法を使用して、他の細胞型を実質的に含まない、前原条細胞を含む組成物を生成することができる。本明細書に記載の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する前原条細胞集団または細胞培養物は、FGF8マーカー遺伝子および／またはNODALマーカー遺伝子を、BRAUCHURY低、FGF4低、SNAI1低、SOX17低、FOXA2低、SOX7低およびSOX1低と比較して実質的に発現する。

【0108】**胚体外細胞**

本明細書に記載の方法を使用して、他の細胞型を実質的に含まない、胚体外細胞を含む組成物を生成することができる。原始内胚葉細胞、近位内胚葉細胞および遠位内胚葉細胞は胚体外細胞である。原始内胚葉細胞は近位内胚葉細胞および遠位内胚葉細胞を生じる。近位内胚葉細胞は、卵黄嚢の一部を形成する内胚葉細胞である。近位内胚葉細胞は、栄養分の取り込みおよび輸送の両方において機能する。遠位内胚葉細胞は、ライヘルト膜として公知の胚体外組織と近接している。遠位内胚葉細胞の役割のうちの1つは、基底膜の構成成分の生成である。まとめると、近位内胚葉細胞および遠位内胚葉細胞は、多くの場合、胚体外内胚葉と称されるものを形成する。名称に示されている通り、胚体外内胚葉細胞は発生の間に形成される胚構造を生じない。対照的に、本明細書に記載の胚体内胚葉細胞および他の内胚葉系列または臍臓の系列細胞は、胚性であるまたは胚細胞から導出されたものであり、胚発生の間に形成される腸管から導出された組織を生じる。本明細書に記載の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する胚体外細胞集団または細胞培養物では、SOX7遺伝子、SOX17遺伝子、THBD遺伝子、SPARC遺伝子、DAB1遺伝子、FTNF4alpha遺伝子またはAFP遺伝子からなる群から選択されるマーカーの発現が、少なくとも、他の細胞型または細胞集団、例えば胚体内胚葉では発現されないSOX7、SOX17、THBD、SPARC、DAB1、またはAFPの発現レベルと比較して実質的に高い。

40

【0109】**中内胚葉(mesendoderm)細胞**

本明細書に記載の方法を使用して、他の細胞型を実質的に含まない、中内胚葉細胞を含

50

む組成物を生成することができる。本明細書に記載の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する中内胚葉細胞集団または細胞培養物は、FGF4、SNAI1、MIXL1および/またはWNT3マーカー遺伝子からなる群から選択されるマーカーの発現が、SOX17低、CXCR4低、FOXA2低、SOX7低およびSOX1低と比較して実質的に高い。

【0110】

スクリーニング方法

一部の実施形態では、スクリーニング方法を使用して、ヒト多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、前原条細胞、中内胚葉細胞、胚体内胚葉細胞、前腸内胚葉またはPDX1陰性前腸内胚葉細胞、PDX1陽性前腸内胚葉またはPDX1陽性臍臓内胚葉細胞または臍臓前駆細胞、内分泌先駆細胞、および/または内分泌細胞などの多能性細胞、多分化能細胞および/または分化した細胞などのある特定の細胞集団を得る。次いで、細胞集団に候補分化因子をもたらす。候補分化因子をもたらす前またはそれとほぼ同時である第1の時点でのマーカーの発現を決定する。あるいは、候補分化因子をもたらした後にマーカーの発現を決定することができる。第1の時点の後であり、かつ候補分化因子を細胞集団にもたらすステップの後である第2の時点で、同じマーカーの発現を再度決定する。候補分化因子が臍臓先駆細胞の分化を促進することができるかどうかを、第1の時点におけるマーカーの発現と第2の時点におけるマーカーの発現を比較することによって決定する。第2の時点におけるマーカーの発現が第1の時点におけるマーカーの発現と比較して増加または減少した場合、当該候補分化因子は臍臓前駆細胞の分化を促進することになる。

10

【0111】

本明細書に記載のスクリーニング方法の一部の実施形態では、ヒト胚体内胚葉、PDX-1陰性前腸内胚葉、PDX-1陽性前腸内胚葉、PDX-1陽性臍臓内胚葉、または臍臓前駆体または内分泌先駆細胞を含む細胞集団または細胞培養物を利用する。例えば、細胞集団は、PDX-1陽性臍臓内胚葉または臍臓前駆細胞の実質的に精製された集団であってよい。例えば、細胞集団はヒト臍臓前駆細胞の濃縮された集団であってよく、細胞集団内のヒト細胞の少なくとも約50%~97%がヒト臍臓前駆細胞であり、残りは、内分泌先駆体または内分泌細胞および他の細胞型で構成される。

【0112】

20

本明細書に記載のスクリーニング方法の複数の実施形態では、細胞集団を候補(試験)分化因子と接触させる、または他のやり方で候補(試験)分化因子をもたらす。候補分化因子は、上記の細胞のいずれか、例えばヒト臍臓前駆細胞の分化を促進する潜在性を有し得る任意の分子を含んでよい。本明細書に記載の一部の実施形態では、候補分化因子は、細胞の1種または複数種の型に対する分化因子であることが分かっている分子を含む。代替の実施形態では、候補分化因子は、細胞分化を促進することが分かっていない分子を含む。好ましい実施形態では、候補分化因子は、ヒト臍臓前駆細胞の分化を促進する事が分かっていない分子を含む。

【0113】

本明細書に記載されるスクリーニング方法の一部の実施形態では、候補分化因子は小分子を含む。好ましい実施形態では、小分子は約10,000amu以下の分子量を有する分子である。

40

【0114】

本明細書に記載される他の実施形態では、候補分化因子は、大分子、例えばポリペプチドを含む。ポリペプチドは、限定されずに、糖タンパク質、リボタンパク質、細胞外基質タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン、インターロイキンまたは成長因子を含む、任意のポリペプチドであってよい。好ましいポリペプチドには、成長因子が含まれる。

【0115】

本明細書に記載されるスクリーニング方法の一部の実施形態では、候補分化因子は、ア

50

ンフィレグリン、B リンパ球刺激物質、IL - 16、サイモポイエチン、TRAIL / Apo - 2、プレB 細胞コロニー促進因子、内皮分化関連因子1 (EDF1)、内皮単球活性化ポリペプチドII、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、ナチュラルキラー細胞促進因子 (NKEFA)、骨形成タンパク質2、骨形成タンパク質8 (骨形成タンパク質2)、骨形成タンパク質6、骨形成タンパク質7、結合組織成長因子 (CTGF)、CGI - 149 タンパク質 (神経内分泌分化因子)、サイトカインA3 (マクロファージ炎症タンパク1 - アルファ)、グリア芽細胞腫細胞分化関連タンパク質 (GBDR1)、肝癌由来成長因子、ニューロメディンU - 25 先駆体、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、血管内皮細胞成長因子B (VEGF - B)、T 細胞特異的 RANTES 先駆体、胸腺樹状細胞由来因子1、トランスフェリン、インターロイキン - 1 (IL1)、インターロイキン - 2 (IL2)、インターロイキン - 3 (IL3)、インターロイキン - 4 (IL4)、インターロイキン - 5 (IL5)、インターロイキン - 6 (IL6)、インターロイキン - 7 (IL7)、インターロイキン - 8 (IL8)、インターロイキン - 9 (IL9)、インターロイキン - 10 (IL10)、インターロイキン - 11 (IL11)、インターロイキン - 12 (IL12)、インターロイキン - 13 (IL13)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、エリスロポエチン、トロンボポエチン、ビタミンD3、上皮成長因子 (EGF)、脳由来神経栄養因子、白血病抑制因子、甲状腺ホルモン、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、aFGF、FGF - 4、FGF - 6、FGF - 7 / ケラチノサイト成長因子 (KGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、血小板由来成長因子 - BB、神経成長因子、アクチビンA、トランスフォーミング成長因子 1 (TGF - 1)、インターフェロン - 、インターフェロン - 、インターフェロン - 、腫瘍壞死 - 、腫瘍壞死因子 - 、バースト促進活性 (BPA)、赤血球促進活性 (EPA)、PGE2、インスリン成長因子 - 1 (IGF - 1)、IGF - II、ニューロトロphins (Neurotrophin) 成長因子 (NGF)、ニューロトロphins - 3、ニューロトロphins 4 / 5、線毛神経栄養因子、神経膠由来のネキシン、デキサメタゾン、- メルカプトエタノール、レチノイン酸、ブチルヒドロキシアニソール、5 - アザシチジン、アンホテリシンB、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、イソブチルキサンチン、インドメタシン、- グリセロールホスフェート、ニコチンアミド、DMSO、チアゾリジンジオン、TWS119、オキシトシン、バソプレシン、メラニン細胞刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、リポトロピン、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、ヒト絨毛ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、ゴナドトロピン放出因子、プロラクチン放出因子、プロラクチン抑制因子、成長ホルモン放出因子、ソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン放出因子、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、副甲状腺ホルモン、グルカゴン様ペプチド1、グルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド、ガストリン、セクレチン、コレシストキニン、モチリン、血管作用性小腸ペプチド、サブスタンスP、膵臓ポリペプチド、ペプチドチロシン、神経ペプチドチロシン、インスリン、グルカゴン、胎盤性ラクトゲン、リラキシン、アンジオテンシンII、カルシトリオール (calcitriol)、心房性ナトリウム利尿ペプチドおよびメラトニン、チロキシン、トリヨードサイロニン、カルシトニン、エストラジオール、エストロン、プロゲステロン、テストステロン、コルチゾル、コルチコステロン、アルドステロン、エピネフリン、ノルエピネフリン、アンドロスチエン (androstiene)、カルシトリオール、コラーゲン、デキサメタゾン、- メルカプトエタノール、レチノイン酸、ブチルヒドロキシアニソール、5 - アザシチジン、アンホテリシンB、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、イソブチルキサンチン、インドメタシン、- グリセロールホスフェート、ニコチンアミド、DMSO、チアゾリジンジオンおよびTWS119 からなる群から選択される1つまたは複数の成長因子を含む。

【0116】

本明細書に記載されるスクリーニング方法の一部の実施形態では、候補分化因子は、1つまたは複数の濃度で細胞集団に提供される。一部の実施形態では、候補分化因子は、細

10

20

30

40

50

胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度が約 0.1 n g / m l から 10 m g / m l であるように、細胞集団に提供される。一部の実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 1 n g / m l から約 1 m g / m l である。他の実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 10 n g / m l から約 100 μ g / m l である。さらに他の実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 100 n g / m l から約 10 μ g / m l である。好ましい実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 5 n g / m l から約 1000 μ g / m l である。

【 0 1 1 7 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるスクリーニング方法のステップは、第 1 の時点および第 2 の時点で少なくとも 1 つのマーカーの発現を判定することを含む。これらの実施形態のいくつかでは、第 1 の時点は候補分化因子を細胞集団に提供する前かほぼ同じ時期であってもよい。あるいは、一部の実施形態では、第 1 の時点は、候補分化因子を細胞集団に提供する後である。一部の実施形態では、第 1 の時点で複数のマーカーの発現が判定される。

10

【 0 1 1 8 】

少なくとも 1 種のマーカーの発現を第 1 の時点で決定することに加えて、本明細書に記載のスクリーニング方法の一部の実施形態では、少なくとも 1 種のマーカーの発現を、第 1 の時点の後であり、かつ細胞集団に候補分化因子をもたらした後である第 2 の時点で決定することが意図されている。そのような実施形態では、第 1 の時点と第 2 の時点の両方で同じマーカーの発現を決定する。一部の実施形態では、第 1 の時点と第 2 の時点の両方で複数種のマーカーの発現を決定する。そのような実施形態では、第 1 の時点と第 2 の時点の両方で同じ複数種のマーカーの発現を決定する。一部の実施形態では、それぞれが第 1 の時点の後であり、かつそれが細胞集団に候補分化因子をもたらした後である複数の時点でマーカーの発現を決定する。ある特定の実施形態では、Q - P C R によってマーカーの発現を決定する。他の実施形態では、免疫細胞化学によってマーカーの発現を決定する。

20

【 0 1 1 9 】

本明細書に記載のスクリーニング方法のある特定の実施形態では、第 1 の時点および第 2 の時点において発現が決定されるマーカーは、臍臓前駆細胞から臍島組織を構成する最終分化した細胞の先駆体である細胞への分化に関連するマーカーである。そのような細胞としては、未成熟臍島ホルモン発現細胞を挙げることができる。

30

【 0 1 2 0 】

本明細書に記載のスクリーニング方法の一部の実施形態では、細胞集団に候補分化因子をもたらすステップと第 2 の時点におけるマーカーの発現を決定するステップの間に十分な時間を経過させることができる。細胞集団に候補分化因子をもたらすステップと第 2 の時点におけるマーカーの発現を決定するステップの間の十分な時間は、約 1 時間の短さから約 10 日間の長さまであってよい。一部の実施形態では、少なくとも 1 種のマーカーの発現を、細胞集団に候補分化因子をもたらした後に多数回決定する。一部の実施形態では、十分な時間は、少なくとも約 1 時間、少なくとも約 6 時間、少なくとも約 12 時間、少なくとも約 16 時間、少なくとも約 1 日間、少なくとも約 2 日間、少なくとも約 3 日間、少なくとも約 4 日間、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 6 日間、少なくとも約 7 日間、少なくとも約 8 日間、少なくとも約 9 日間、少なくとも約 10 日間、少なくとも約 11 日間、少なくとも約 12 日間、少なくとも約 13 日間、少なくとも約 14 日間、少なくとも約 1 週間、少なくとも約 2 週間、少なくとも約 3 週間、少なくとも約 4 週間、少なくとも約 5 週間、少なくとも約 6 週間、少なくとも約 7 週間、または少なくとも約 8 週間である。

40

【 0 1 2 1 】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、第 2 の時点におけるマーカーの発現が第 1 の時点におけるこのマーカーの発現と比較して増加または減少したかどうかをさらに決定する。少なくとも 1 種のマーカーの発現の増加または減少により、候補分化因子が内分

50

泌先駆細胞の分化を促進することができる事が示される。同様に、複数種のマーカーの発現を決定する場合、第2の時点における複数種のマーカーの発現が第1の時点におけるこの複数種のマーカーの発現と比較して増加または減少したかどうかをさらに決定する。マーカーの発現の増加または減少は、第1の時点および第2の時点での細胞集団におけるマーカーの量、レベルまたは活性を測定することまたは他のやり方で評価することによって決定することができる。そのような決定は、他のマーカー、例えばハウスキーピング遺伝子発現との比較的なものであってもよく、絶対的なものであってもよい。第2の時点におけるマーカーの発現が第1の時点と比較して増加するある実施形態では、増加の量は、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、少なくとも約100倍または少なくとも約100倍超である。一部の実施形態では、増加の量は、2倍未満である。第2の時点におけるマーカーの発現が第1の時点と比較して減少する実施形態では、減少の量は、少なくとも約2分の1、少なくとも約5分の1、少なくとも約10分の1、少なくとも約20分の1、少なくとも約30分の1、少なくとも約40分の1、少なくとも約50分の1、少なくとも約60分の1、少なくとも約70分の1、少なくとも約80分の1、少なくとも約90分の1、少なくとも約100分の1または少なくとも約100分の1未満である。一部の実施形態では、減少の量は2分の1を下回らない。
10

【0122】

多分化能細胞または分化した細胞の生成のモニタリング
20

多能性細胞から多分化能細胞、多分化能細胞から臍臓前駆体またはホルモン内分泌細胞などのさらに多分化能の細胞または分化した細胞への進行は、内分泌細胞における島ホルモンの発現およびプロインスリンからインスリンおよびCペプチドへのプロセシングなどの、遺伝子マーカーおよび表現型マーカーを含めた特定の細胞に特有のマーカーの発現を決定することによってモニタリングすることができる。いくつかのプロセスでは、ある特定のマーカーの発現を、マーカーが存在するかしないかを検出することによって決定する。あるいは、ある特定のマーカーの発現は、細胞培養物または細胞集団の細胞中でマーカーが存在するレベルを測定することによって決定することができる。例えば、ある特定のプロセスでは、未成熟臍島ホルモン発現細胞に特有のマーカーの発現、ならびに多能性細胞、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1陽性前腸内胚葉、内分泌先駆体、胚体外内胚葉、中胚葉、外胚葉、成熟臍島ホルモン発現細胞および/または他の細胞型に特有のマーカーの有意な発現の欠如を決定する。
30

【0123】

他の胚体内胚葉系列の分化の程度がより低い細胞型の生成のモニタリングに関連して記載されている通り、プロット転写法および免疫細胞化学などの定性的技法または半定量的技法を使用して、マーカーの発現を測定することができる。あるいは、マーカーの発現は、Q-PCRなどの技法を使用することによって正確に定量化することができる。さらには、ポリペプチドレベルでは、臍島ホルモン発現細胞のマーカーの多くは分泌タンパク質であることが理解されよう。このように、ELISAなどの細胞外マーカー含有量を測定するための技法を利用することができる。
40

【0124】

例えば、一実施形態では、PDX1はPDX1陽性前腸内胚葉と関連したマーカー遺伝子である。このように、本発明の一部の実施形態では、PDX1の発現が判定される。他の実施形態では、限定されずにSOX17、HNF6、SOX9およびPROX1などの、PDX1陽性前腸内胚葉で発現される他のマーカーの発現も判定される。PDX1は特定の他の細胞型（すなわち、内臓内胚葉および特定の神経外胚葉）が発現することもできるので、本発明の一部の実施形態は、内臓内胚葉および/または神経外胚葉と関連したマーカー遺伝子発現の不在または実質的な不在を実証することに関する。例えば、一部の実施形態では、限定されずにSOX7、AFP、SOX1、ZIC1および/またはNFMを含む、内臓内胚葉および/または神経細胞で発現されるマーカーの発現が判定される。
50

【0125】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法によって生成されるPDX1陽性前腸内胚葉細胞培養物は、SOX7、AFP、SOX1、ZIC1またはNFMマーカー遺伝子を発現する細胞を実質的に含まない。特定の実施形態では、本明細書に記載されるプロセスによって生成されるPDX1陽性前腸内胚葉細胞培養物は、近位内胚葉、遠位内胚葉および/または神経細胞を実質的に含まない。

【0126】

本明細書に記載される多能性細胞（例えば、上記D'Amourら2006に記載されるステージまたはステップ1~5の結果として生成される細胞）の発達の進行は、発達経路に沿う各hES由来またはiPS由来の細胞型の特徴であるマーカーの発現を判定することによって監視することができる。一部のプロセスでは、hES由来またはiPS由来の細胞型の同定および特徴づけは、特定のマーカーの発現または複数のマーカーの異なる発現レベルおよびパターンによる。すなわち、1つまたは複数のマーカーの存在または不在、高発現または低発現は細胞型の特徴を表し、それを特定する。さらに、特定のマーカーは一過性の発現を有することができ、それによりそのマーカーは発達の1つのステージの間に高度に発現され、発達の別のステージでは弱く発現される。特定のマーカーの発現は、標準化または規格化された対照マーカーと比較して細胞培養物または細胞集団の細胞にそのマーカーが存在するレベルを測定することによって判定することができる。そのようなプロセスでは、マーカー発現の測定は、定性的であっても定量的であってもよい。マーカー遺伝子によって生成されるマーカーの発現を定量化する1つの方法は、定量的PCR(Q-PCR)の使用による。Q-PCRの実施方法は、当技術分野で周知である。

10

【0127】

本発明の一部の実施形態では、マーカーの存在、不在および/または発現レベルは、定量的PCR(Q-PCR)によって判定される。例えば、特定の遺伝子マーカー、例えばSOX17、CXCR4、OCT4、AFP、TM、SPARC、SOX7、CDX2、MIXL1、GATA4、HNF3、HNF4アルファ、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1および本明細書に記載される他のマーカーによって生成される転写産物の量は、定量的Q-PCRによって判定される。

【0128】

他の実施形態では、免疫組織化学的検査を使用して、上記の遺伝子によって発現されるタンパク質を検出する。さらに他の実施形態では、Q-PCRを免疫組織化学的な技法またはフローサイトメトリー技法と併せて使用して、細胞型を有効かつ正確に特徴付け、同定し、目的の細胞型におけるそのようなマーカーの量および相対的割合の両方を決定することができる。一実施形態では、Q-PCRにより、細胞が混在する集団を含有する細胞培養物におけるRNA発現のレベルを数量化することができる。しかし、Q-PCRでは、目的のマーカーまたはタンパク質が同じ細胞で共発現されるかどうかをもたらすまたは認定することはできない。別の実施形態では、Q-PCRをフローサイトメトリー法と併せて使用して細胞型を特徴付け、同定する。したがって、本明細書に記載の方法と、例えば上記のものなどを組み合わせて使用することによって、内胚葉系列型細胞を含めた種々の細胞型の完全な特徴付けおよび同定を実現および実証することができる。

20

【0129】

例えば、好ましい一実施形態では、臍臓前駆体または臍臓内胚葉またはPDX-1陽性臍臓内胚葉は、Q-PCRおよび/またはICCによって実証される通り少なくともPDX1、NKX6.1、PTF1A、CPAおよび/またはcMYCを発現するが、そのような細胞は、PDX1陽性発現細胞と同定されるためには、ICCによって実証される通り少なくともPDX1およびNKX6.1を共発現し、SOX17、CXCR4、またはCERを含めた他のマーカーを発現しない。同様に、in vitroまたはin vivoで成熟ホルモン分泌臍臓細胞を適切に同定するために、例えばインスリン分泌細胞において、C-ペプチド（成熟かつ機能性の細胞におけるプロインスリンの適切なプロセシングの産物）およびインスリンが共発現されることがICCによって実証される。

40

50

【0130】

さらに、当技術分野で公知の他の方法も、マーカー遺伝子発現を定量化するために使用することができる。例えば、マーカー遺伝子産物の発現は、目的のマーカー遺伝子産物に特異的な抗体を使用することによって検出することができる（例えば、ウエスタンプロット、フローサイトメトリー分析など）。ある特定のプロセスでは、hES由来細胞に特有のマーカー遺伝子の発現ならびにhES由来細胞に特有のマーカー遺伝子の有意な発現の欠如。hES由来細胞型を特徴付け、同定するためのさらに別の方法は、上に示されている関連出願に記載され、それらは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0131】

増幅アッセイで使用するのに適する増幅プローブ／プライマー組合せは、以下の通りである：インスリン（INS）（GenBank NM_000207）：プライマー-AAGGGCCATCAAGCAGATCA（配列番号1）；CAGGGAGGCCGCACTCACAA（配列番号2）；Nkx6.1（NM_006168）：プライマー-CTGGCTGTACCCCTCATCA（配列番号3）；CTTCCTCGTCTTTGTCCAACAA（配列番号4）；Pdx1（NM_000209）：プライマー-AAGTCTACCAAAGCTCACGCG（配列番号5）；GTAGGCGGCCGCTGC（配列番号6）；Nggn3（NM_020999）：プライマー-GCTCATCGCTCTCTATTCTTTGC（配列番号7）；GGTTGAGGCGTCATCCTTTCT（配列番号8）；FOXA2（HNF3B）（NM_021784）：プライマー-GGGAGCGGTGAAGATGGA（配列番号9）；TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA（配列番号10）；グルカゴン（GCG）（NM_002054）：プライマー-AAGCATTACTTTGTGGCTGGATT（配列番号11）；TGATCTGGATTTCTCCTCTGTGTC（配列番号12）；HNF6（NM_030712）：プライマー-CGCTCCGCTTAGCAGCAT（配列番号13）；GTGTTGCCCTCATCCTCCCATT（配列番号14）；HNF4アルファ（NM_000457）：プライマー-GAAGAAGGAAGGCCGTCAGA（配列番号15）；GACCTTCGAGTGCTGATCCG（配列番号16）；Sox17（NM_022454）：プライマー-GGCGCAGCAGAATCCAGA（配列番号17）；NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN（配列番号18）；HLxB9（NM_005515）：プライマー-CACCGCGGGCATGATC（配列番号19）；ACTTCCAGGAGGTTCGA（配列番号20）；Nkx2.2（NM_002509）：プライマー-GGCCCTCAGTACTCCCTGCA（配列番号21）；GGGACTTGGAGCTTGAGTCCT（配列番号22）；PTF1a（NM_178161）：プライマー-GAAGGTCATCATCTGCCATCG（配列番号23）；GGCCATAATCAGGGTCGCT（配列番号24）；SST（NM_001048）：プライマー-CCCCAGACTCCGTCAGTTTC（配列番号25）；TCCGTCAGGTTGGGTTTCAG（配列番号26）；PAX6（NM_000280）：プライマー-CCAGAAAGGATGCCCTCATAAAGG（配列番号27）；TCTGCGGCCCTAGTTA（配列番号28）；Oct4プライマー-TGGGCTCGAGAAGGATG TG（配列番号29）；GCATAGTCGCTGCTTGATCG（配列番号30）；MIXL1プライマー-CCGAGTCCAGGATCCAGGTA（配列番号31）；CTCTGACGCCGAGACTTGG（配列番号32）；GATA4プライマー-CCCTCTTGC AATGCGGAAAG（配列番号33）；CGGGAGGAGGGCTCTCACT（配列番号34）；GSCプライマー-GAGGAGAAAGTGAGGGCTGGTT（配列番号35）；CTCTGATGAGGACCGCTTCTG（配列番号36）；CERプライマー-ACAGTGCCCTTCAGGCCAGACT（配列番号37）；ACA ACTACTTTTACAGCCTTCGT（配列番号38）；AFPプライマー-GAGAAACCCACTGGAGATGAACA（配列番号39）；CTCATGGCAAAGTTCTTCCAGAA（配列番号40）；SOX1プライマー-ATGCACCGCTACGACATGG（配列番号41）；CTCATGTA G C C C T

10

20

30

40

50

G C G A G T T G (配列番号42) ; Z I C 1 プライマー - C T G G C T G T G G C A A G G T C T T C (配列番号43) C A G C C C T C A A A C T C G C A C T T (配列番号44) ; N F M プライマー - A T C G A G G A G C G C A C A A C (配列番号45) T G C T G G A T G G T G T C C T G G T (配列番号46)。他のプライマーは、F G F 17 (Hs 00182599_m1)、V W F (Hs 00169795_m1)、C M K O R 1 (Hs 00604567_m1)、C R I P 1 (Hs 00832816_g1)、F O X Q 1 (Hs 00536425_s1)、C A L C R (Hs 00156229_m1)およびC H G A (Hs 00154441_m1)を含め、A B I Taqmanを通して入手できる。

【0132】

10

I n v i v o におけるP D X 1 陽性膵臓内胚葉(ステージ1～4)の生成およびインスリン生成の要約

特定の内胚葉系列および膵臓内胚葉系列細胞の生成のための方法が本明細書で提供され、関連出願、例えば2007年7月5日に出願の米国特許出願第11/773,944号、表題M E T H O D S O F P R O D U C I N G P A N C R E A T I C H O R M O N E S の別の箇所で述べられ、それは2007年3月2日に出願の米国特許出願第11/681,687号、表題E N D O C R I N E P R E C U R S O R C E L L S , P A N C R E A T I C H O R M O N E - E X P R E S S I N G C E L L S A N D M E T H O D S O F P R O D U C T I O N の一部継続出願であり、それらは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

20

【0133】

簡単に述べると、多能性幹細胞、例えばh E S 細胞およびi P S 細胞に関する本発明の定方向分化法は、少なくとも4つまたは5つのステージで説明することができる。ステージ1は、多能性幹細胞からの胚体内胚葉の生成であり、約2～5日、好ましくは2日または3日かかる。多能性幹細胞は、R P M I 、T G F スーパーファミリーメンバー成長因子、例えばアクチビンA、アクチビンB、G D F - 8 またはG D F - 11 (100ng / m l)、W n t ファミリーメンバーまたはW n t 経路アクチベータ、例えばW n t 3 a (25ng / m l)、あるいはr h o キナーゼまたはR O C K 阻害剤、例えばY - 2 7 6 3 2 (10μ) を含む培地に懸濁させ、成長、生存および増殖を増強するだけでなく細胞間接着を促進する。約24時間後に、培地を、血清、例えば0.2%F B S など、およびT G F スーパーファミリーメンバー成長因子、例えばアクチビンA、アクチビンB、G D F - 8 またはG D F - 11 など(100ng / mL)、あるいはr h o キナーゼまたはR O C K 阻害剤を含有するR P M I を含む培地と交換し、さらに24時間(1日目)～48時間(2日目)置く。あるいは、アクチビン/W n t 3 a を含む培地中に約24時間置いた後、その後の24時間、アクチビンを単独で含む培地(すなわち、培地はW n t 3 a を含まない)で細胞を培養する。重要なことに、胚体内胚葉の生成には、低血清含有量、およびそれにより、低インスリンまたはインスリン様成長因子含有量の細胞培養条件が必要である。本明細書に完全に組み込まれるM c L e a n ら(2007)S t e m C e l l s 2 5 : 2 9 - 3 8 を参考されたい。M c L e a n らにより、ステージ1においてh E S 細胞をわずか0.2μg / mLの濃度のインスリンと接触させることは、胚体内胚葉の生成にとって有害であり得ることも示された。また別の当業者により、多能性細胞から胚体内胚葉へのステージ1分化が実質的に本明細書およびD'Amourら(2005)に記載の通り改変された。例えば、少なくとも、A g a r w a l ら、E f f i c i e n t D i f f e r e n t i a t i o n o f F u n c t i o n a l H e p a t o c y t e s f r o m H u m a n E m b r y o n i c S t e m C e l l s 、S t e m C e l l s (2008)26:1117-1127; B o r o w i a k ら、S m a l l M o l e c u l e s E f f i c i e n t l y D i r e c t E n d o d e r m a l D i f f e r e n t i a t i o n o f M o u s e およびH u m a n E m b r y o n i c S t e m C e l l s 、(2009)C e l l S t e m C e l l 4:348-358; およびB r u n n e r ら、D i s t i n c t D N A m e t h y l a t i o n

30

40

40

50

patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. (2009) Genome Res. 19: 1044 - 1056。他の内胚葉系列細胞を導出するためには胚体内胚葉の適切な分化、特定化、特徴付けおよび同定が必要である。このステージにおける胚体内胚葉細胞は、SOX17およびHNF3 (FOXA2) を共発現し、少なくともHNF4アルファ、HNF6、PDX1、SOX6、PROX1、PTF1A、CPA、cMYC、NKX6.1、NGN3、PAX3、ARX、NKX2.2、INS、GSC、GHRL、SST、またはPPは評価できるほどには発現しない。

【0134】

10

ステージ2はステージ1から胚体内胚葉細胞培養物をとり、懸濁培養物をITSの1:1000希釈液中の0.2%FBSなどの低い血清レベル、25ngのKGF（またはFGF7）、あるいはROCK阻害剤を有するRPMIと24時間（2日目から3日目）インキュベートして、成長、生存、増殖を増強し、細胞間接着を促進することによって、前腸内胚葉またはPDX1陰性前腸内胚葉を生成する。24時間後に（3日目～4日目）、培地を、TGF阻害剤を含まないが、その代わりに、細胞の成長、生存および増殖を増強するためにROCK阻害剤をなお含む同じ培地と交換し、さらに24時間（4日目～5日目）～48時間（6日目）置く。前腸内胚葉を適切に特定化するための重要なステップはTGFファミリー成長因子の除去である。したがって、2.5μMのTGF阻害剤番号4またはTGF I型受容体であるアクチビン受容体様キナーゼ（ALK）の特異的な阻害剤である5μMのSB431542などのTGF阻害剤をステージ2細胞培養物に添加することができる。ステージ2で生成した前腸内胚葉またはPDX1-陰性前腸内胚葉細胞は、SOX17、HNF1 およびHNF4アルファを共発現し、胚体内胚葉、PDX1陽性臍臍内胚葉または臍臍前駆細胞または内分泌先駆体ならびに单一または複数ホルモン型細胞の特質である、少なくともSOX17およびHNF3 (FOXA2) も、HNF6、PDX1、SOX6、PROX1、PTF1A、CPA、cMYC、NKX6.1、NGN3、PAX3、ARX、NKX2.2、INS、GSC、GHRL、SST、またはPPも評価できるほどには共発現しない。

【0135】

20

ステージ3（5～8日目）では、ステージ2から前腸内胚葉細胞培養物を取得し、1% B27、0.25μMのKAADシクロパミン、0.2μMのレチノイン酸（RA）などのレチノイドまたは3nMのTTNPBなどのレチノイン酸類似体、および50ng/mlのノギン中、DMEMまたはRPMIにより、約24時間（7日目）～48時間（8日目）にわたってPDX1陽性前腸内胚葉細胞を生成する。具体的には、出願人らは、およそ2003年からDMEM-高グルコースを使用しており、その時点の全ての特許および非特許開示物では、「DMEM-高グルコース」などの言及がなくてもDMEM-高グルコースが使用されている。これは、一部において、Gibcoなどの製造者が、例えばDMEM（Cat番号11960）およびKnockout DMEM（Cat番号10829）などのように、DMEMをそのように名付けていなかったことが理由である。本出願の出願日時点で、GibcoはさらなるDMEM製品を提供しているが、従来通り、例えばKnockout DMEM（Cat番号10829-018）など、それらの高グルコースを含有するある特定のDMEM産物に「高グルコース」と付けていないことに注目すべきである。したがって、DMEMが記載されているそれぞれの場合に、高グルコースを含有するDMEMを意味すると推定することができ、これは、この分野における研究開発を行っている他者には明らかなことであった。さらに、ROCK阻害剤またはrhοキナーゼ阻害剤、例えばY-27632などを使用して、成長、生存、増殖を増強することおよび細胞間接着を促進することができる。ステージ3で生成したPDX1陽性前腸細胞は、PDX1およびHNF6、ならびにSOX9およびPROXを共発現し、上のステージ1およびステージ2に記載されている胚体内胚葉細胞もしくは前腸内胚葉（PDX1陰性前腸内胚葉）細胞またはPDX1陽性前腸内胚葉細胞を示すマーカーは評価できるほ

30

40

50

どには共発現しない。

【0136】

ステージ4(8~14日目)では、ステージ3から培地を取得し、それを、1%v o l / v o lのB27サプリメント、それに加えて50ng/mLのKGFおよび50ng/mLのEGF、および時にはさらに50ng/mLのノギン中、D MEMを含有する培地と交換する。再び、成長、生存、増殖を増強し、細胞間接着を促進するために、Y-27632などのROCK阻害剤を使用することができる。ステージ4から生成されるPDX1陽性膵臓内胚葉細胞は、少なくともPDX1およびNkx6.1、ならびにPTF1Aを共発現し、上においてステージ1、2および3で記載される胚体内胚葉または前腸内胚葉(PDX1陰性前腸内胚葉)細胞の指標となるマーカーをあまり発現しない。

10

【0137】

あるいは、ステージ4からの細胞は、約1~6日間(15日目から20日目)の1体積/体積%のB27サプリメント中のD MEM含有培地で、ステージ5でさらに分化させて、内分泌先駆体もしくは前駆体型の細胞および/または単一および複数ホルモン性の膵臓内分泌型の細胞をステージ4細胞から生成することができる。ステージ5から生成される内分泌先駆細胞は、少なくともNGN3およびPAX4ならびにNkx2.2を共発現し、上においてステージ1、2、3および4で記載される、胚体内胚葉または前腸内胚葉(PDX1陰性前腸内胚葉)またはPDX1陽性膵臓内胚葉もしくは前駆細胞の指標となるマーカーを感知し得るほどには発現しない。

【0138】

ステージ4で生成したPDX1陽性膵臓内胚葉をマクロ封入デバイスにローディングし、完全に含有させ、患者に移植し、PDX1陽性膵臓内胚葉細胞をin vivoで膵臓ホルモン分泌細胞、例えばインスリン分泌性細胞に成熟させる。PDX1陽性膵臓内胚葉細胞の封入およびin vivoにおけるインスリンの生成は、米国特許出願第12/618,659号('659出願')、表題「ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS」、2009年11月13日出願に詳細に記載されている。'659出願は、仮特許出願第61/114,857号、表題「ENCAPSULATION OF PANCREATIC PROGENITORS DERIVED FROM HES CELLS」、2008年11月14日出願；および米国特許仮出願第61/121,084号、表題「ENCAPSULATION OF PANCREATIC ENDODERM CELLS」、2008年12月9日出願の優先権を主張するものである。これらの出願の各々の開示は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

20

【0139】

本明細書に記載の方法、組成物およびデバイスは、現在、好ましい実施形態を表し、例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。その変化および他の使用は本発明の主旨の範囲内に包含され、本開示の範囲によって定義されることが当業者には想起されよう。したがって、本明細書に開示されている発明に対して、本発明の範囲および主旨から逸脱することなく様々な置換および改変を行うことができるが当業者には明らかになろう。

40

【0140】

例えば、多能性細胞、例えばhES細胞およびiPS細胞から胚体内胚葉を生成するために、成長因子またはシグナル伝達タンパク質のTGF-スーパーファミリーのメンバーであるアクチビンAが使用されるが、参照により本明細書に完全に組み込まれる国際特許出願第PCT/US2008/065686号、表題「GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM」、2008年6月3日出願に記載されているものなど他のTGF-スーパーファミリーメンバー、例えばGDF-8およびGDF-11を、胚体内胚葉を生成するために使用することができる。

50

【 0 1 4 1 】

ステージ2のPDX1陰性前腸内胚葉細胞をステージ3のPDX1陽性前腸細胞に分化させるためにレチノイン酸(RA)を使用する。しかし、4-[(E)-2-(5、6、7、8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレンイル)-1-プロペニル]安息香酸(またはTTNPB)などの他のレチノイドまたはレチノイン酸類似体および同様の類似体(例えば、4-HBTTPB)を使用することができる。

【 0 1 4 2 】

ノギンは、例えば、骨形成タンパク質-4 (BMP4)などのTGF-スーパーファミリーシグナル伝達タンパク質のメンバーを不活化するタンパク質である。しかし、コードインおよびねじれ原腸形成 (Twisted Gastrulation) (Tsg) などの他のBMP4阻害剤または抗BMP中和抗体によっても、BMPとその細胞表面受容体の結合を妨げ、それにより、BMPシグナル伝達を有効に阻害することができる。あるいは、ヒトノギンの遺伝子はクローニングされ、配列決定されている。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,075,007号を参照されたい。ノギン配列の解析により、Kunitz型プロテアーゼ阻害剤との相同性を有するカルボキシ末端領域が示され、これにより、潜在的に他のKunitz型プロテアーゼ阻害剤がBMPの阻害に関して同様の効果を有し得ることが示されている。

10

【 0 1 4 3 】

最後に、本明細書および米国出願第12/618,659号に記載され、参照により本明細書に完全に組み込まれているマクロ封入デバイスは、再度、単に例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。特に、デバイスのサイズ、デバイス内のチャンバーまたは亜区画が複数であること、またはポートが複数であること、さらにはデバイスのローディングおよび抽出の機構などのデバイス設計の変化は全て本発明の主旨の範囲内に包含される。したがって、本明細書に記載の分化方法への種々の置換および改変だけでなく、封入デバイスへの種々の置換および改変も同様に、本明細書に開示されている発明に対して、本発明の範囲および主旨から逸脱することなく行うことができる事が当業者には明らかになろう。

20

[0 1 4 4]

胚体内胚葉の生成および組成物（ステージ1）

一部のプロセスでは、胚体内胚葉への分化は、胚体内胚葉への分化を促進するのに十分な量で TGF スーパーファミリーの成長因子を多能性細胞培養物に供給することによって達成される。胚体内胚葉の生成のために有益である TGF スーパーファミリーの成長因子は、Nodal / アクチビン、GDF-8、-9、-10、-11 等または BMP サブグループから選択される。一部の好ましい分化プロセスでは、成長因子は、Nodal、アクチビン A、アクチビン B、GDF-8、GDF-11 および BMP 4 からなる群から選択される。さらに、成長因子 Wnt3a、他の Wnt ファミリーメンバー、および Wnt 経路アクチベータが胚体内胚葉細胞の生成のために有益である。ある特定の分化プロセスでは、前述の成長因子のいずれかの組合せを使用することができる。この方法および他の方法は米国特許第 7,510,876 号に詳細に記載され、それは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

30

[0 1 4 5]

多能性細胞を胚体内胚葉細胞に分化させるためのプロセスの一部に関して、上記の成長因子は、成長因子が培養物中に、多能性細胞の少なくとも一部分から胚体内胚葉細胞への分化を促進するために十分な濃度で存在するように細胞に供給される。いくつかのプロセスでは、上記の成長因子は、細胞培養物中に少なくとも約 5 ng / mL、少なくとも約 10 ng / mL、少なくとも約 25 ng / mL、少なくとも約 50 ng / mL、少なくとも約 75 ng / mL、少なくとも約 100 ng / mL、少なくとも約 200 ng / mL、少なくとも約 300 ng / mL、少なくとも約 400 ng / mL、少なくとも約 500 ng / mL、少なくとも約 1000 ng / mL、少なくとも約 2000 ng / mL、少なくとも約 3000 ng / mL、少なくとも約 4000 ng / mL、少なくとも約 5000 ng

40

/ mL または約 5 0 0 0 n g / mL 超の濃度で存在する。

【 0 1 4 6 】

胚体内胚葉細胞への多能性細胞の分化のある特定のプロセスでは、前述の成長因子はそれらが添加された後に細胞培養物から除去される。例えば、成長因子を添加してから約 1 日以内、約 2 日以内、約 3 日以内、約 4 日以内、約 5 日以内、約 6 日以内、約 7 日以内、約 8 日以内、約 9 日以内または約 10 日以内にそれらを除去することができる。好みしいプロセスでは、成長因子を添加した約 4 日後にそれらを除去する。

【 0 1 4 7 】

本明細書に記載されるプロセスの一部の実施形態では、胚体内胚葉細胞はさらなる分化の前に濃縮、単離および / または精製される。そのような実施形態では、胚体内胚葉細胞は、任意の公知の方法を使用して濃縮、単離および / または精製することができる。好みしい実施形態では、胚体内胚葉細胞は、2004年12月23日に出願の米国特許出願第 11/021,618 号、表題DEFINITIVE ENDODERM、および 2005 年 11 月 14 日に出願の米国特許仮出願第 60/736,598 号、表題 MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM に記載される方法の 1 つまたは複数を使用して濃縮、単離および / または精製され、その開示は、参照により完全に本明細書に組み込まれる。

10

【 0 1 4 8 】

好みしい実施形態では、ハウスキーピング遺伝子などの対照遺伝子のレベルに標準化され、比較されるとき、本明細書で生成され、記載される胚体内胚葉細胞は、比較的高いレベルの C E R 、 G S C 、 C X C R 4 、 S O X 1 7 および F O X A 2 遺伝子発現を有する。

20

【 0 1 4 9 】

P D X 1 陰性前腸内胚葉の生成および組成物（ステージ 2）

胚体内胚葉細胞は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞を生成するこれらの細胞のさらなる分化によって、臍臓分化の方向に特定化することができる。本明細書に記載される分化プロセスの一部では、胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物ならびに濃縮または精製された細胞集団は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物および / または濃縮された細胞集団へのさらなる分化のために使用することができる。

【 0 1 5 0 】

一般的に、S O X 1 7 陽性胚体内胚葉細胞の細胞培養物または細胞集団で T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達を低減、除去 (e l i m i n a t i n g) または取り除く (r e m o v i n g) ことによって、胚体内胚葉細胞は P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞に分化する。一部の実施形態では、T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達を低減または除去することは、外部から加えられる T G F スーパーファミリー成長因子、例えばアクチビン A を希釈するか、胚体内胚葉の細胞培養物または細胞集団から除去することによって媒介される。他の実施形態では、T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達は、T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達をブロックする化合物、例えばフォリスタチンおよび / またはノギンを胚体内胚葉細胞に供給することによって低減または除去される。一部の実施形態では、T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達は、胚体内胚葉細胞へのヒト多能性細胞の分化の後の約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日または約 10 日を超える間、低減または除去することができる。

30

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、F G F ファミリー成長因子および / またはヘッジホッグ経路阻害剤を胚体内胚葉細胞培養物または細胞集団に供給することによって、前腸内胚葉細胞への胚体内胚葉細胞の分化が増強される。そのような実施形態では、F G F ファミリー成長因子および / またはヘッジホッグ経路阻害剤は、胚体内胚葉細胞培養物での T G F スーパーファミリー成長因子シグナル伝達の低減または除去から約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日の後、または約 10 日を超える日数の後に供給される。好みしい実施形態では、F G F ファミリー成長因子および / また

40

50

はヘッジホッグ経路阻害剤は、胚体内胚葉細胞培養物での TGF スーパーファミリー成長因子シグナル伝達の低減または除去とほぼ同じ時期に供給される。

【0152】

好ましい実施形態では、胚体内胚葉細胞培養物または細胞集団に供給される FGF ファミリー成長因子は、FGF10 および / または FGF7 である。しかし、他の FGF ファミリー成長因子または FGF ファミリー成長因子類似体もしくは模倣体を FGF10 および / または FGF7 の代わりに、またはそれに加えて供給することができるが理解される。例えば、FGF1、FGF2、FGF3、および FGF23 までのそれらからなる群から選択される FGF ファミリー成長因子を供給することができる。そのような実施形態では、FGF ファミリー成長因子および / または FGF ファミリー成長因子類似体もしくは模倣体は、少なくとも約 10 ng / ml、少なくとも約 25 ng / ml、少なくとも約 50 ng / ml、少なくとも約 75 ng / ml、少なくとも約 100 ng / ml、少なくとも約 200 ng / ml、少なくとも約 300 ng / ml、少なくとも約 400 ng / ml、少なくとも約 500 ng / ml または少なくとも約 1000 ng / ml の濃度で存在するように細胞培養物の細胞に供給される。10

【0153】

他の好ましい実施形態では、ヘッジホッグ阻害剤は、KAAD - シクロパミンである。しかし、他のヘッジホッグ阻害剤を使用することができるが理解される。そのような阻害剤には、KAAD - シクロパミン類似体、ジェルビン、ジェルビン類似体、ヘッジホッグ経路遮断抗体、および当業者に公知であるヘッジホッグ経路機能の任意の他の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。単独で、または FGF ファミリー成長因子と併用されるとき、ヘッジホッグ阻害剤は少なくとも約 0.01 μM から 50 μM の濃度で供給することができる。20

【0154】

胚体内胚葉細胞からの PDX1 陰性前腸内胚葉細胞の集団の生成のため的好ましいプロセスでは、TGF スーパーファミリー成長因子シグナル伝達は、胚体内胚葉へのヒト多能性細胞の実質部分の分化から約 2 日の間低減または除去される（例えば、下の実施例に記載される 3 日、4 または 5 日分化プロトコルの後）。同じ頃に、胚体内胚葉細胞の細胞培養物または細胞集団に、ノギンおよび KAAD - シクロパミン、例えば、2 mM の RA または 3 nM の TTNPB の存在下の DMEM 培地中に 50 ng / ml のノギンおよび 0.25 μM の KAAD - シクロパミンを供給する。30

【0155】

一部の実施形態では、PDX1 陰性前腸内胚葉細胞は、レチノイン酸 (RA) などのレチノイドを含有する培地と細胞を接触させるか、さもなければそれを細胞に供給することによって、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞にさらに分化させることができる。一部の実施形態では、少なくとも約 1 nM から 50 μM の濃度で存在するように、レチノイドを細胞培養物の細胞に供給する。そのような実施形態では、レチノイドは、胚体内胚葉細胞培養物での TGF スーパーファミリー成長因子シグナル伝達の低減または除去から約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日の後、または約 10 日を超える日数の後に細胞に供給される。好ましい実施形態では、TGF スーパーファミリー成長因子シグナル伝達の低減または除去から約 2 ~ 3 日後に、約 0.05 μM の RA から約 2 μM の RA が PDX1 陰性前腸内胚葉細胞培養物に供給される。40

【0156】

本明細書に記載される分化プロセスの一部では、前述の分化因子は添加された後に細胞培養物から除去される。例えば、前述の分化因子は、添加してから約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日または約 10 日以内に除去することができる。

【0157】

好ましい実施形態では、ハウスキーピング遺伝子などの対照遺伝子のレベルに標準化されるとき、本明細書で生成され、記載される PDX1 陰性前腸内胚葉細胞は、比較的高い50

レベルのSOX17、FOXA1、HNF1BおよびHNF4A遺伝子発現を有する。特に、HNF4A遺伝子発現レベルは、例えば胚体内胚葉培養物からのTGFスーパーファミリー成長因子シグナル伝達（例えば、アクチビン）の除去まで実質的に増加しない。

【0158】

PDX1陽性前腸内胚葉の生成および組成物（ステージ3）

PDX1陰性前腸内胚葉細胞は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞またはPDX1陽性臍臍内胚葉またはそれらの等価物を生成するこれらの細胞のさらなる分化によって、臍臍分化の方向にさらに特定化することができる。本明細書に記載される分化プロセスの一部では、胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物ならびに濃縮または精製された細胞集団は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物および/または濃縮された細胞集団へのさらなる分化のために使用することができる。10

【0159】

一般的に、レチノイン酸（RA）などのレチノイドをSOX17陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物に供給することによって、PDX1陰性前腸内胚葉細胞をPDX1陽性前腸内胚葉細胞に分化させる。分化プロセスの一部では、培養物中のPDX1陰性前腸内胚葉細胞には、RAの添加の前かそれとほぼ同じ時期に線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバーも供給される。好ましい線維芽細胞成長因子は、FGF-7である。別の好ましいプロセスでは、線維芽細胞成長因子は、任意の線維芽細胞成長因子、または線維芽細胞成長因子2受容体IIIb（FGFR2（IIIb））を刺激するかさもなければそれと相互作用するリガンドを含む。さらに好ましいプロセスでは、FGFファミリー成長因子は、ヘッジホッグ経路阻害剤と併用される。好ましいヘッジホッグ経路阻害剤は、KAAD-シクロパミンである。特に好ましい分化プロセスでは、RA存在下でのPDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物に、FGF-10および/またはKAAD-シクロパミンが供給される。ある特定のプロセスでは、RA存在下でBMP4がFGF10および/またはKAAD-シクロパミンとともに含まれてもよい。一部のプロセスでは、レチノイドは、GFスーパーファミリー成長因子のメンバーおよび/またはConnauth Medical Research Labs培地（CRM L培地）（Invitrogen、Carlsbad、CA）と併用される。20

【0160】

本明細書に記載される分化プロセスの実施形態の一部に関して、レチノイドおよび/または前述の分化因子の組合せは、これらの因子がPDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性前腸内胚葉細胞培養物または細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。30

【0161】

他のプロセスでは、FGF-10は、少なくとも約1ng/ml、少なくとも約2ng/ml、少なくとも約5ng/ml、少なくとも約10ng/ml、少なくとも約25ng/ml、および50μまでの濃度で存在するように、細胞培養物の細胞に供給される。本発明の一部の実施形態では、線維芽細胞成長因子または線維芽細胞成長因子2受容体IIIb（FGFR2（IIIb））を刺激するかさもなければそれと相互作用するリガンドが、単独で、またはヘッジホッグ経路阻害剤と組み合わせて供給される。40

【0162】

PDX1陰性前腸内胚葉細胞からのPDX1陽性前腸内胚葉細胞の集団の生成のための好ましいプロセスでは、PDX1陰性前腸内胚葉細胞の細胞培養物または濃縮された細胞集団に、FGF-7、KAAD-シクロパミンおよびレチノイン酸（RA）、例えば2μのRA存在下のCRM L培地中の25ng/mlのFGF-7および0.2μのKAAD-シクロパミンが供給される。

【0163】

本明細書に記載される一部のプロセスでは、TGFシグナル伝達因子、例えばアクチビンAおよび/またはアクチビンB、GDF-8、GDF-11等は、レチノイドおよび/または線維芽細胞成長因子およびヘッジホッグ阻害剤と一緒に細胞培養物に供給される50

。例えばそのようなプロセスでは、アクチビンAおよび/またはアクチビンBおよび/またはGDF-8および/またはGDF-11は、少なくとも約5ng/ml、少なくとも約10ng/ml、少なくとも約25ng/ml、少なくとも約50ng/ml、少なくとも約75ng/ml、少なくとも約100ng/ml、少なくとも約200ng/ml、少なくとも約300ng/ml、少なくとも約400ng/ml、少なくとも約500ng/mlまたは少なくとも約1000ng/mlの濃度で細胞培養物に供給される。

【0164】

一部のプロセスでは、分化因子および/またはCRM L培地は、多能性細胞からの分化の開始から約1日、2日、3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日後、または約10日を超える日数の後に、PDX1陰性前腸内胚葉細胞に供給される。好ましいプロセスでは、分化因子および/またはCRM L培地は、多能性幹細胞からの分化の開始から約3日、または4日、または5日後にPDX1陰性前腸内胚葉細胞に供給される。

10

【0165】

本明細書に記載されるある特定のプロセスでは、前述の分化因子は添加された後に細胞培養物から除去される。例えば、前述の分化因子は、添加してから約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日または約10日以内に除去することができる。

【0166】

これらおよび他の方法は、2005年10月27日に出願の米国特許仮出願第60/730,917号、表題PDX1 - EXPRESSION DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERMに詳細に記載され、PDX1陽性前腸内胚葉細胞は、2005年4月26日に出願の米国特許出願第11/115,868号、表題PDX1 EXPRESSION ENDODERMに見出すことができ、その開示は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

20

【0167】

好ましい実施形態では、ハウスキーピング遺伝子などの対照遺伝子のレベルに標準化され、比較されるとき、本明細書で生成され、記載されるPDX1陽性前腸内胚葉細胞は、比較的高いレベルのPDX1、NKX6.1、PTF1A、CPAおよびcMYC遺伝子発現を有する。

30

【0168】

PDX1陽性臍臓内胚葉の生成および組成物（ステージ4）

PDX1陽性臍臓内胚葉または「臍臓上皮」またはより一般に臍臓前駆体の生成および組成物は、2008年7月2日に出願の米国特許出願第12/167,227号、表題METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONESに詳細に記載され、それは米国特許第7,534,608号として2009年5月19日に公布された。第12/167,227号出願は、2007年7月5日に出願の米国特許出願第11/773,944号、表題METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONESの継続出願であり、それは2007年3月2日に出願の米国特許出願第11/681,687号、表題ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE - EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTIONの一部継続出願である。これらの出願の各々の開示は、参照により完全に本明細書に組み込まれる。

40

【0169】

第12/167,227号出願の実施例22は、本明細書ステージ1～4に記載される細胞培養条件の様々な変更を詳細に記載する。一般に、ステージ3のPDX1陽性前腸内胚葉型の細胞は、1体積/体積%のB27サプリメント中のDMEMに加えてノギン、または別のBMP4特異的阻害剤を含有する培地で、約1～3日、または約1～4日、または1～5日、または約1～6日の間培養される。ステージ4の終わりに、PDX1陽性臍臓内胚葉が生成され、その細胞はPDX1およびNKX6.1ならびにPTF1Aを少な

50

くとも共発現する。細胞培養物は、ステージ5の单一もしくは複数ホルモン性内分泌細胞、またはステージ1の胚体内胚葉細胞、またはステージ2のPDX1陰性前腸内胚葉細胞、またはステージ3のPDX1陽性前腸内胚葉細胞の指標となる細胞を認め得る程には発現しない。

【0170】

内分泌先駆細胞の生成および組成物（ステージ5）

本明細書に記載される一部の実施形態は、多能性細胞から開始して内分泌先駆細胞を生成する方法に関する。上記の通り、内分泌先駆細胞は、最初に多能性細胞を分化させて胚体内胚葉細胞を生成し、次に胚体内胚葉細胞をさらに分化させてPDX1陽性前腸内胚葉細胞を生成することによって生成することができる。そのような実施形態では、PDX1陽性前腸内胚葉細胞は、多分化能内分泌先駆細胞にさらに分化し、それはヒト膵島ホルモン発現細胞に分化することが可能である。10

【0171】

一実施形態では、PDX1陽性前腸内胚葉細胞は、内分泌先駆細胞の生成に十分な時間、レチノイン酸などのレチノイドの存在下でPDX1陽性前腸内胚葉細胞のインキュベーションを続けることによって内分泌先駆細胞に分化する。一部の実施形態では、内分泌先駆細胞の生成に十分な時間は、細胞培養物中の細胞の一部でのPDX1マーカーの発現の後の約1時間から約10日間である。一部の実施形態では、レチノイドは細胞培養物中に、細胞培養物中の細胞の一部でのPDX1マーカーの発現の後の約1時間、約2時間、約4時間、約6時間、約8時間、約10時間、約12時間、約16時間、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日、または約10日を超える日数維持される。20

【0172】

本明細書に記載される一部のプロセスでは、内分泌先駆細胞に細胞培養物または細胞集団中のPDX1陽性前腸内胚葉細胞を分化させるために使用されるレチノイドの濃度は、約1nMから約100μである。

【0173】

一部の好ましい実施形態では、ヒトPDX1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物または細胞集団へのガンマセクレターゼ阻害剤の供給によって、PDX1陽性前腸内胚葉細胞から膵臓内分泌先駆細胞への分化が媒介される。好ましい一実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル-L-アラニル)]-S-フェニルグリシンt-ブチルエステル(DAPT)である。30

【0174】

他の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、分化プロセスの開始時に、例えば多能性ステージに供給され、膵島ホルモン発現細胞への分化の間ずっと細胞培養物中に残存する。さらに他の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、分化の開始の後に、しかしPDX1陽性前腸内胚葉ステージへの分化の前に加えられる。好ましい実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、PDX1陽性内胚葉への胚体内胚葉の変換を促進する分化因子の供給と同じ頃に、細胞培養物または細胞集団に供給される。他の好ましい実施形態では、細胞培養物または細胞集団中の細胞の実質的な部分がPDX1陽性前腸内胚葉細胞に分化した後に、ガンマセクレターゼ阻害剤は細胞培養物または細胞集団に供給される。40

【0175】

内分泌先駆細胞へのPDX1陽性前腸内胚葉細胞の分化に関する一部の実施形態に関して、ガンマセクレターゼ阻害剤は、内分泌先駆細胞へのPDX1陽性細胞の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。一部の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、約0.01μから約1000μの濃度で細胞培養物または細胞集団に存在する。好ましい実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、約0.1μから約100μの濃度で細胞培養物または細胞集団に存在する。

【0176】

本明細書に記載される内分泌先駆細胞を生成するプロセスのある特定の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、前に供給された1つまたは複数の分化因子が細胞培養物から除去された後に供給される。例えば、前に供給される1つまたは複数の分化因子は、ガンマセクレターゼ阻害剤の添加より約1日から10日前、または約10日以上前に除去することができる。他の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、前に供給されたか、ガンマセクレターゼ阻害剤と同じ頃に供給された1つまたは複数の分化因子を含む細胞培養物または細胞集団に供給される。好ましい実施形態では、前に供給されたかガンマセクレターゼ阻害剤と同じ頃に供給された分化因子としては、FGF-10、KAAD-シクロパミン、アクチビンA、アクチビンB、GDF-8、GDF-11、BMP4および/またはRAが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0177】

本明細書に記載の本発明の一部の実施形態では、分化する細胞培養物または細胞集団に、ガンマセレクターゼ阻害剤とほぼ同じ時間にエキセンディン4をもたらす。ある特定の実施形態では、エキセンディン4を、細胞培養物または細胞集団中に少なくとも約0.1ng/mLから、1000ng/mLまでの濃度で存在するようにもたらす。

【0178】

PDX1陽性前腸内胚葉細胞からの内分泌先駆細胞の生成のための好ましいプロセスでは、PDX1陽性前腸内胚葉細胞の細胞培養物または細胞集団は、3μのDAPTおよび40ng/mLのエキセンディン4が供給される。特に好ましい実施形態では、細胞はCMRLで分化する。別の特に好ましいプロセスでは、PDX1陽性前腸内胚葉細胞からの内分泌先駆細胞の生成のために、PDX1陽性前腸内胚葉細胞の細胞培養物または細胞集団には、2μのRAの存在下で3μのDAPTおよび40ng/mLのエキセンディン4が供給される。

20

【0179】

NGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現は、内分泌先駆細胞において分化の状態に応じて様々な異なるレベルにわたって誘導されることが理解されよう。そのように、本明細書に記載の一部の実施形態では、内分泌先駆細胞または細胞集団におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現は、非内分泌先駆細胞または細胞集団、例えば、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、PDX1陽性前腸内胚葉細胞、未成熟臍島ホルモン発現細胞、成熟臍島ホルモン発現細胞、胚体外内胚葉細胞、中胚葉細胞および/または外胚葉細胞におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現の少なくとも約2倍～少なくとも約10,000倍である。他の実施形態では、内分泌先駆細胞または細胞集団におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現は、非内分泌先駆細胞または細胞集団、例えば、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、PDX1陽性前腸内胚葉細胞、未成熟臍島ホルモン発現細胞、成熟臍島ホルモン発現細胞、胚体外内胚葉細胞、中胚葉細胞および/または外胚葉細胞におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現の少なくとも約4倍、少なくとも約6倍～10,000倍である。一部の実施形態では、内分泌先駆細胞または細胞集団におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現は、非内分泌先駆細胞または細胞集団、例えば、多能性細胞様iPS細胞およびhES細胞、胚体内胚葉細胞、PDX1陽性前腸内胚葉細胞、未成熟臍島ホルモン発現細胞、成熟臍島ホルモン発現細胞、胚体外内胚葉細胞、中胚葉細胞および/または外胚葉細胞におけるNGN3、NKX2.2および/またはPAX4マーカーの発現よりもはるかに高い。

30

【0180】

本発明の別の実施形態は、ヒト内分泌先駆細胞などのヒト細胞を含む細胞培養物または細胞集団などの組成物であって、ヒト細胞の少なくとも約2%においてNGN3マーカーの発現がAFP、SOX7、SOX1、ZIC1、NFM、MAFA、SYP、CHGA、INS、GCG、SST、GHLR、および/またはPAX6マーカーの発現よりも大きい組成物に関する。他の実施形態では、ヒト細胞の少なくとも約5%～98%においてNGN3マーカーの発現がAFP、SOX7、SOX1、ZIC1、NFM、MAFA、

40

50

S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6マーカーの発現よりも大きい。一部の実施形態では、細胞培養物または細胞集団中の、N G N 3の発現がA F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6マーカーの発現よりも大きいヒト細胞の百分率は、フィーダー細胞を考慮せずに算出する。

【0181】

本発明の一部の実施形態は、ヒト内分泌先駆細胞を含む細胞培養物または細胞集団などの組成物であって、ヒト細胞の少なくとも約2%から少なくとも約98%超までにおいてN K X 2 . 2 および／またはP A X 4 の発現がA F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6 マーカーの発現よりも大きい組成物に関することが理解されよう。一部の実施形態では、ヒト細胞の少なくとも約5%～ヒト細胞の98%においてN K X 2 . 2 および／またはP A X 4 の発現がA F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6 マーカーの発現よりも大きい。一部の実施形態では、細胞培養物または細胞集団中の、N K X 2 . 2 および／またはP A X 4 の発現がA F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6 マーカーの発現よりも大きいヒト細胞の百分率は、フィーダー細胞を考慮せずに算出する。

【0182】

本発明の追加の実施形態は、in vitroで胚体内胚葉から分化した哺乳動物細胞、例えばin vitroで胚体内胚葉から分化したヒト細胞を含む組成物、例えば細胞培養物または細胞集団に関し、in vitroで胚体内胚葉から分化した細胞の少なくとも約2%では、N G N 3、N K X 2 . 2 および／またはP A X 4 マーカーの発現は、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R Lおよび／またはP A X 6 マーカーの発現より大きい。他の実施形態では、in vitroで胚体内胚葉から分化した細胞の少なくとも約5%からin vitroで胚体内胚葉から分化した細胞の98%で、N G N 3、N K X 2 . 2 および／またはP A X 4 マーカーの発現は、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R Lおよび／またはP A X 6 マーカーの発現より大きい。

【0183】

本明細書に記載のプロセスを使用して、他の細胞型を実質的に含まない、内分泌先駆細胞を含む組成物を生成することができる。本発明の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する内分泌先駆細胞集団または細胞培養物は、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 および／またはN F Mマーカーを有意に発現する細胞を実質的に含まない。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する細胞培養物の内分泌先駆細胞集団は、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1、N F M、M A F A、S Y P、C H G A、I N S、G C G、S S T、G H R L、および／またはP A X 6 マーカーを有意に発現する細胞を実質的に含まない。

【0184】

本発明の一実施形態では、マーカーの発現に基づく内分泌先駆細胞の記述は、高N G N 3、高N K X 2 . 2 、高P A X 4、低A F P、低S O X 7、低S O X 1、低Z I C 1、低N F M、低M A F A；低S Y P；低C H G A；低I N S、低G C G、低S S T、低G H R Lおよび／または低P A X 6である。

【0185】

未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成

本明細書に記載される実施形態は、多能性細胞から開始して未熟な膵島ホルモン発現細胞を生成する方法に関する。上記の通り、未熟な膵島ホルモン発現細胞は、最初に多能性細胞を分化させて胚体内胚葉細胞を生成し、胚体内胚葉細胞を分化させて前腸内胚葉細胞

10

20

30

40

50

を生成し、前腸内胚葉を分化させて PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を生成し、次に PDX1 陽性前腸内胚葉細胞をさらに分化させて内分泌先駆細胞を生成することによって生成することができる。一部の実施形態では、内分泌先駆細胞を未熟な膵島ホルモン発現細胞にさらに分化させることによって、そのプロセスを継続する。

【0186】

本発明の一部の実施形態では、細胞が NGN3 を実質的に発現することを停止し、PA X6 の発現を開始するのに十分な時間、および細胞が少なくとも 1 つの膵島細胞ホルモンを発現する能力を有するように、ガンマセクレターゼ阻害剤との内分泌先駆細胞の培養物のインキュベーションを続けることによって、内分泌先駆細胞から未熟な膵島ホルモン発現細胞への分化が進行する。一部の実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、内分泌先駆細胞の誘導の約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日後、または約 10 日以上後に除去される。好ましい一実施形態では、ガンマセクレターゼ阻害剤は、N - [N - (3 , 5 - ジフルオロフェナセチル - L - アラニル)] - S - フェニルグリシン t - プチルエステル (DAPT) である。10

【0187】

本明細書に開示される未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成のある特定のプロセスは、ヒト内分泌先駆細胞を含む細胞培養物または細胞集団への、ニコチニアミド、エキセンディン 4、肝細胞成長因子 (HGF)、インスリン様成長因子 1 (IGF1) からなる群から選択される 1 つまたは複数の因子の供給によって媒介される。一部の実施形態では、上記の因子の全 4 つは、一緒に供給される。一部の実施形態では、上記の因子の 1 つまたは複数は、内分泌先駆細胞の分化の前に細胞培養物に供給され、内分泌先駆細胞への細胞培養物中の細胞の少なくとも一部の分化の間、細胞培養物に残存する。他の実施形態では、上記の因子の 1 つまたは複数は内分泌先駆細胞への細胞の実質的な部分の分化時かその頃に細胞培養物に供給され、細胞の少なくとも実質的な部分が未熟な膵島ホルモン発現細胞に分化するまで細胞培養物に残存する。本発明の一部の実施形態では、上記の因子の 1 つまたは複数は、分化プロセスの開始時に、例えば多能性細胞ステージに供給され、未熟な膵島ホルモン発現細胞への分化の間ずっと細胞培養物中に残存する。20

【0188】

本明細書に開示される未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成のための一部のプロセスでは、ニコチニアミド、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) またはニコチン酸が、未熟な膵島ホルモン発現細胞への内分泌先駆細胞の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。一部の実施形態では、ニコチニアミドは、少なくとも約 0 . 1 mM、少なくとも約 0 . 5 mM から 1 0 0 0 mM の濃度で、細胞培養物または細胞集団に存在する。30

【0189】

本明細書に開示される未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成のための他のプロセスでは、エキセンディン 4 が未熟な膵島ホルモン発現細胞への内分泌先駆細胞の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。一部の実施形態では、エキセンディン 4 は、少なくとも約 1 ng / ml、少なくとも約 5 ng / ml から 1 0 0 0 ng / ml の濃度で、細胞培養物または細胞集団に存在する。40

【0190】

本明細書に開示される未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成のためのさらに他のプロセスでは、HGF が未熟な膵島ホルモン発現細胞への内分泌先駆細胞の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。一部の実施形態では、HGF は、少なくとも約 1 ng / ml、少なくとも約 5 ng / ml から 1 0 0 0 ng / ml の濃度で、細胞培養物または細胞集団に存在する。

【0191】

本明細書に開示される未熟な膵島ホルモン発現細胞の生成のためのさらに他のプロセスでは、IGF1 が未熟な膵島ホルモン発現細胞への内分泌先駆細胞の少なくとも一部の分50

化を促進するのに十分な濃度で細胞培養物または細胞集団に存在するように細胞に供給される。一部の実施形態では、IGF1は、少なくとも約1ng/mlから1000ng/mlの濃度で、細胞培養物または細胞集団に存在する。

【0192】

本明細書に記載の未成熟臍島ホルモン発現細胞を生成するためのプロセスのある特定の実施形態では、ニコチニアミド、エキセンディン4、HGFおよびIGF1のうちの1種または複数種を、前に供給された1種または複数種の分化因子を細胞培養物から除去した後に供給する。他の実施形態では、ニコチニアミド、エキセンディン4、HGFおよびIGF1のうちの1種または複数種を、ニコチニアミド、エキセンディン4、HGFおよびIGF1のうちの1種または複数種よりも前に供給された、またはほぼ同時に供給された1種または複数種の分化因子を含む細胞培養物または細胞集団に供給する。好ましい実施形態では、ニコチニアミド、エキセンディン4、HGFおよびIGF1のうちの1種または複数種よりも前に供給される、またはほぼ同時に供給される分化因子としては、これだけに限定されないが、DAPT、FGF-10、KAAD-シクロパミン、アクチビンA、アクチビンB、BMP4および/またはRAが挙げられる。10

【0193】

本発明の別の実施形態は、ヒト未成熟臍島ホルモン発現細胞などのヒト細胞を含む細胞培養物または細胞集団などの組成物であって、ヒト細胞の少なくとも約2%においてMAFB、SYP、CHGA、NKX2.2、ISL1、PAX6、NEUROD、PDX1、HB9、GHLR、IAPP、INS、GCG、SST、PP、および/またはC-ペプチドマーカーの発現がNGN3、MAFA、MOX1、CER、POU5F1、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1および/またはNFMマーカーの発現よりも大きい組成物に関する。他の実施形態では、ヒト細胞の少なくとも約5%において、ヒト細胞の少なくとも約10%～ヒト細胞の95%においてまたはヒト細胞の少なくとも約98%においてMAFB、SYP、CHGA、NKX2.2、ISL1、PAX6、NEUROD、PDX1、HB9、GHLR、IAPP、INS、GCG、SST、PP、および/またはC-ペプチドマーカーの発現がNGN3、MAFA、MOX1、CER、POU5F1、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1および/またはNFMマーカーの発現よりも大きい。20

【0194】

一部の実施形態では、MAFB、SYP、CHGA、NKX2.2、ISL1、PAX6、NEUROD、PDX1、HB9、GHLR、IAPP、INS、GCG、SST、PPおよび/またはCペプチドの発現がNGN3、MAFA、MOX1、CER、POU5F1、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1および/またはNFMマーカーの発現より大きい場合、細胞培養物または集団中のヒト細胞の百分率は、フィーダー細胞に関係なく計算される。30

【0195】

本発明のある特定の実施形態では、未成熟臍島ホルモン発現細胞を含む細胞培養物および/または細胞集団は、グレリン、インスリン、ソマトスタチンおよび/またはグルカゴンから選択される、1種または複数種の分泌されたホルモンを含む培地も含む。他の実施形態では、培地は、C-ペプチドを含む。好ましい実施形態では、培地中の1種または複数種の分泌されたホルモンまたはC-ペプチドの濃度は、細胞内DNA1μg当たり少なくとも約1pmolのグレリン、インスリン、ソマトスタチン、グルカゴンまたはC-ペプチドから、細胞内DNA1μg当たり少なくとも約1000ピコモル(pmol)のグレリン、インスリン、ソマトスタチン、グルカゴンまたはC-ペプチドまでの範囲である。40

【0196】

インスリンをin vivoで生成させる方法

一部の実施形態では、上記のin vitroで導出された臍臓前駆細胞またはPDX-1陽性臍臓内胚葉型細胞またはその等価物を哺乳動物対象に移植する。これらの方法は50

、国際出願第PCT/US2007/015536号、表題「METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES」に詳しく記載され、それは参照により本明細書に完全に組み込まれる。好ましい実施形態では、哺乳動物対象はヒト対象である。特に好ましい対象は、生理的に高い血中グルコース濃度に応答して十分なレベルのインスリンを生成する対象の能力が限定される状態を有すると同定された対象である。任意の特定の哺乳動物種についての生理的に高い血中グルコースレベルを構成する血中グルコースレベルの範囲は、当業者には容易に決定することができる。認識される疾患または状態をもたらすいかなる持続的な血中グルコースレベルも、生理的に高い血中グルコースレベルとみなされる。

【0197】

10

本発明のさらなる実施形態は、*in vitro*多能性幹細胞またはその後代、例えば、PDX-1陽性前腸内胚葉細胞、PDX-1陽性臍臍内胚葉もしくは臍臍前駆細胞、NGN3陽性内分泌先駆体などの内分泌先駆体などの多分化能細胞、またはインスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン(somatostatin)分泌細胞、グレリン分泌細胞、もしくは臍臍ポリペプチド分泌細胞などの機能的な分化したホルモン分泌細胞から導出される*in vivo*インスリン分泌細胞に関する。上記の最終分化した細胞または多分化能細胞のいずれも、宿主、または哺乳動物に移植し、宿主血中グルコースレベルに応答してインスリンを分泌する細胞などの生理的に機能的なホルモン分泌細胞に成熟させることができる。好ましい実施形態では、細胞は*in vivo*で奇形腫を形成せず、そのように形成された場合には、移植の領域に局在したままであり、容易に切除または除去することができる。特に好ましい実施形態では、細胞は、*in vitro*における分化プロセスの間、または哺乳動物に*in vivo*で移植された際、または*in vivo*で機能的な島に成熟および発達する際に、いかなる核型異常も含有しない。

20

【0198】

さらに、本明細書に記載の実施形態は、工学的に操作されたまたは遺伝子組換えされた、多能性細胞、ヒトiPS細胞などの多能性細胞から本明細書において提供される説明に基づいて導出された多分化能細胞または分化した細胞に関するが、iPS細胞では、hES細胞およびhES由来細胞と同様の生理機能および遺伝子マーカーの発現プロファイルが実証されるので、iPS細胞は*in vivo*における同様の生理的特性を有することが予測される。

30

【0199】

臍臍前駆体を封入する方法

一部の実施形態では、本明細書に記載の多能性細胞、多分化能細胞および分化した細胞組成物を生物学的および/または非生物学的機械デバイスに封入することができ、封入されたデバイスにより、細胞組成物が宿主から分離および/または隔離される。

【0200】

40

封入の方法は、2008年11月14日に出願の米国特許出願第61/114,857号、表題ENCAPSULATION OF PANCREATIC PROGENITORS DERIVED FROM HES CELLS、および2008年12月12日に出願の米国特許出願第61/121,086号、表題ENCAPSULATION OF PANCREATIC ENDODERM CELLSに詳細に記載され、それは参照により完全に本明細書に組み込まれ、半透膜、例えばTheracyte(商標)またはGoreデバイスを使用する臍臍内胚葉細胞の封入を記載する。

【0201】

一実施形態では、hES由来の細胞は、生体適合性のポリエチレンギコール(PEG)を使用して封入される。PEGをベースとした封入は、米国特許第7,427,415号、表題IMPLANTATION OF ENCAPSULATED BIOLOGICAL MATERIALS FOR TREATING DISEASES;米国特許第6,911,227号、表題GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALS;および米国特許第6,911,227号、

50

第5, 529, 914号、第5, 801, 033号、第6, 258, 870号、表題GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALSでさらに詳細に記載され、それらは参照により完全に本明細書に組み込まれ、ポリエチレングリコールを使用する細胞凝集体のコンフォーマルコーティングを記載する。

【0202】

一実施形態では、封入デバイスは、多能性由来細胞、例えば、PDX-1陽性前腸内胚葉細胞、PDX-1陽性臍臓内胚葉もしくは前駆細胞、NGN3陽性内分泌先駆体などの内分泌先駆体、または、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、グレリン分泌細胞、もしくは臍臓ポリペプチド分泌細胞などの機能的な分化したホルモン分泌細胞を、移植された細胞集団が通過するのを防ぎ、それらをデバイス内に保持すると同時に、ある特定の分泌されたポリペプチド、例えばインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、臍臓ポリペプチドなどの通過を可能にする半透膜の中に含有する。あるいは、デバイスは血管化膜などの複数の膜を有する。

【0203】

ヒト多能性幹細胞、例えばhES細胞およびiPS細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着を増強および促進するための作用物質の使用

膜を介した細胞外シグナルの伝達により細胞調節に影響を及ぼし、今度はそれにより、細胞内の生化学的な経路をモジュレートすることができる。タンパク質のリン酸化は、細胞内シグナルが分子から分子へ伝搬され、最終的に細胞の応答がもたらされる1つの経過を表すものである。これらのシグナルトランスダクションカスケードは、高度に調節されており、多くの場合、多くのプロテインキナーゼおよびホスファターゼが存在することによって証明されるように、重複している。ヒトにおいて、タンパク質チロシンキナーゼは、糖尿病、がんを含めた多くの病態の進行において重要な役割を有することが分かっていることが報告されており、また、多種多様な先天性の症候群に関連付けられている。セリントレオニンキナーゼ、例えばRhoキナーゼは、阻害された場合に、糖尿病、がん、および種々の炎症性心血管障害およびAIDSを含めたヒト疾患の治療と関連し得る酵素のクラスである。現在までに同定されている大多数の阻害剤は、ATP結合部位で作用する。そのようなATP競合阻害剤は、ATP結合部位のあまり保存されていない領域を標的とするそれらの能力による選択性が実証されている。

【0204】

低分子GTP結合性タンパク質のRhoキナーゼファミリーは、RhoA～EおよびRhoG、Rac1およびRac2、Cdc42、およびTC10を含む少なくとも10種のメンバーを含む。阻害剤は、多くの場合、ROK阻害剤もしくはROCK阻害剤またはRhoキナーゼ阻害剤と称され、これらは、本明細書では互換的に使用される。RhoA、RhoB、およびRhoCのエフェクタードメインは同じアミノ酸配列を有し、同様の細胞内標的を有すると思われる。RhoキナーゼはRhoの最初の下流メディエーターとして作動し、2つのアイソフォーム：(ROCK2)および(ROCK1)として存在する。Rhoキナーゼファミリータンパク質は、それらのN末端ドメイン内に触媒(キナーゼ)ドメインを有し、その中央部分にコイルドコイルドドメインを有し、それらのC末端領域内に推定プレクストリン相同性(PH)ドメインを有する。ROCKのRho結合性ドメインはコイルドコイルドドメインのC末端部分に局在し、GTPと結合した形態のRhoとの結合により、キナーゼ活性の増強がもたらされる。Rho/Rhoキナーゼ媒介性経路は、アンジオテンシンII、セロトニン、トロンビン、エンドセリン-1、ノルエピネフリン、血小板由来成長因子、ATP/ADPおよび細胞外ヌクレオチド、およびウロテンシンIIなどの多くのアゴニストによって開始されるシグナルトランスダクションにおいて重要な役割を果たす。Rhoキナーゼは、その標的エフェクター/基質のモジュレーションを通じて、平滑筋収縮、アクチン細胞骨格組織化、細胞の接着および運動性ならびに遺伝子発現などの種々の細胞機能において重要な役割を果たす。動脈硬化症の発病と関連すると認知されているいくつもの細胞機能の媒介においてRhoキナーゼタンパク質が果たす役割により、これらのキナーゼの阻害剤も種々の動脈硬化性心血管疾患を治療

10

20

30

40

50

または予防するために有用であり得、また、内皮収縮に関与する。

【0205】

一部の実施形態では、これだけに限定されないが、Rhoキナーゼ阻害剤Y-27632、ファスジル(HA1077とも称される)、H-1152PおよびITS(インスリン/トランスフェリン/セレン; Gibco)、Wf-536、Y-30141(米国特許第5,478,838号に記載され、それは参照により本明細書に完全に組み込まれる)およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸(例えば、siRNA)、競合的ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害性抗体、抗体-scFv断片、ドミナントネガティブバリアントおよびその発現ベクターなどの細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着を促進し、かつ/または支持する作用物質を種々の細胞培養培地条件に添加する。さらに、ROCK阻害剤として他の低分子化合物が公知であるので、そのような化合物またはその誘導体も本発明において使用することができる(例えば、参照により本明細書に完全に組み込まれる米国特許出願第20050209261号、同第20050192304号、同第200400014755号、同第20040002508号、同第20040002507号、同第20030125344号および同第20030087919、ならびに国際特許公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号および同第2004/039796号を参照されたい)。
10

【0206】

本発明では、1種または2種またはそれ以上のROCK阻害剤の組合せも使用することができる。これらの作用物質は、一部において、解離したhES細胞、iPSまたは分化した細胞培養物、例えば、胚体内胚葉、前腸内胚葉、臍臓内胚葉、臍臓上皮、臍臓前駆体集団、内分泌前駆体および集団などの再会合を促進することによって機能する。同様に、作用物質は、細胞解離が行われない場合にも機能し得る。ヒト多能性幹細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着の増大は、細胞が懸濁液中の細胞凝集体から生成したものであるか、または接着プレート培養物(細胞外マトリックスの構成成分を含みまたは含まずに、血清を含みまたは含まずに、線維芽細胞フィーダーを含みまたは含まずに、FGFを含みまたは含まずに、アクチビンを含みまたは含まずに)から生成したものであるかとは独立して実現された。これらの細胞集団の生存率の増加により、セルソーターを使用する精製系が容易になり、改善され、したがって、細胞の回収の改善が可能になる。Y27632などのRhoキナーゼ阻害剤の使用により、解離した単一細胞の段階的な継代の間、または低温保存からのそれらの生存が促進されることにより、分化した細胞型の增幅も可能になり得る。Y27632などのRhoキナーゼ阻害剤はヒト多能性幹細胞(例えばhES細胞およびiPS細胞)およびそれが分化した細胞に対して試験されてきたが、Rhoキナーゼ阻害剤は、他の細胞型、例えば、一般に、これだけに限定されないが、腸、肺、胸腺、腎臓ならびに網膜色素上皮と同様の神経系細胞型を含めた上皮細胞に適用することができる。
20
30

【0207】

細胞培養培地中のROCK阻害剤の濃度は、その濃度により所望の効果が実現される、例えば、細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着の増強、増加、および/または促進が実現される限りは、下記の実施例に記載されているものに限定されない。種々のROCK阻害剤を種々の条件下で最適化することが必要な場合があることが当業者には理解されよう。例えば、Y-27632を使用する場合、好ましい濃度は、約0.01~約1000μM、より好ましくは約0.1~約100μM、なおより好ましくは約1.0~約50μM、最も好ましくは約5~20μMの範囲であり得る。ファスジル/HA1077を使用する場合、上述のY-27632濃度の約2倍または3倍で使用することができる。H-1152を使用する場合、上述のY-27632濃度の量のおよその分数、例えば、約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50または1/60で使用することができる。使用するROCK阻害剤の濃度は、一部において、阻害剤の生物活性および効力ならびにそれが使用される条件に左右される。
40
50

【0208】

R O C K 阻害剤を用いて処理する時間および期間は、成長、生存、増殖（細胞集団）および細胞間接着の増強、増加、および／または促進などの所望の効果に応じて限定される場合もさえない場合もある。しかし、R O C K 阻害剤の添加は、実施例 7 によりよく記載されている通り、驚くべき様式で分化にも影響を及ぼし得る。下記の実施例には、約 12 時間、24 時間、48 時間、またはそれ以上にわたって処理されたヒト多能性幹細胞培養物および／または分化した細胞培養物が記載されている。

【0209】

R O C K 阻害剤を用いて処理されるヒト多能性幹細胞培養物の密度も同様に、それが、細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着の増強、増加、および／または促進などの所望の効果が実現される密度である限りは限定されない。播種される細胞の細胞密度は、これだけに限定されないが、接着培養物または懸濁培養物の使用、使用する細胞培養培地の特定のレシピ、成長条件および培養細胞の意図された使用を含めた種々の因子に応じて調整することができる。細胞培養物の密度の例としては、これだけに限定されないが、1 m l 当たり細胞 0.01×10^5 個、1 m l 当たり細胞 0.05×10^5 個、1 m l 当たり細胞 0.1×10^5 個、1 m l 当たり細胞 0.5×10^5 個、1 m l 当たり細胞 1.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 1.2×10^5 個、1 m l 当たり細胞 1.4×10^5 個、1 m l 当たり細胞 1.6×10^5 個、1 m l 当たり細胞 1.8×10^5 個、1 m l 当たり細胞 2.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 3.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 4.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 5.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 6.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 7.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 8.0×10^5 個、1 m l 当たり細胞 9.0×10^5 個、または1 m l 当たり細胞 10.0×10^5 個、またはそれ以上、例えば、1 m L 細胞 5×10^7 個まで、またはそれ以上、または間の任意の値が挙げられ、良好な細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着を伴って培養された。

【0210】

T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質の使用

さらに別の実施形態では、T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質は、成長因子のT G F スーパーファミリーのメンバーを含み、本明細書に記載されている。本明細書で使用される場合、「T G F スーパーファミリーメンバー」またはその等価物とは、T G F - 1、T G F - 2、T F - 3、G D F - 1 5、G D F - 9、B M P - 1 5、B M P - 1 6、B M P - 3、G D F - 1 0、B M P - 9、B M P - 1 0、G D F - 6、G D F - 5、G D F - 7、B M P - 5、B M P - 6、B M P - 7、B M P - 8、B M P - 2、B M P - 4、G D F - 3、G D F - 1、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン C、
、および、B M P - 1 4、G D F - 1 4、M I S、インヒビンアルファ、L e f t y 1、L e f t y 2、G D N F、ニュールツリン（Ne u r t e u r i n）、パーセフィンおよびアルテミンなどのサブファミリーを含めた30種を超える構造的に関連するタンパク質を指す。Changら（2002）Endocrine Rev. 23(6) : 787-823 を参照されたい。

【0211】

T G F ファミリーメンバーは、T G F ファミリーメンバーに応答して細胞の性質の変化を伝達する、または他のやり方で引き起こすことに関与するポリペプチドまたは相互作用の1種または複数種を刺激する化合物であるT G F シグナル伝達経路活性化因子によって置き換えること、またはそれと併せて使用することができる。T G F シグナル伝達経路はT G F ファミリーメンバー自体を含む。T G F スーパーファミリーメンバーは、I I型およびI型セリン・トレオニンキナーゼ受容体およびS m a dとして公知の細胞内エフェクターを通じたシグナル伝達によってシグナルを核に伝達する。これらの受容体は、協同的に作用してリガンドに結合し、シグナルを伝達するI型受容体およびI I型受容体として公知の2つのサブファミリーに入る（A t t i s a n o ら、M o l C e l l B i o l 1 6(3)、1 0 6 6 - 1 0 7 3 (1 9 9 6)）。リガンドはI型受容体およびI I型受容体の細胞表面に結合し、リン酸化によるI型受容体の活性化を促進する。

10

20

30

40

50

この活性化された複合体が今度は細胞内 Smad を活性化し、それが転写を調節する多サブユニット複合体に集合する。TGFベータスーパーファミリーのメンバーは、2つのシグナル伝達サブグループ：TGF / アクチビンと機能的に関連するもの、およびBMP / GDFサブファミリーと関連するものに分けられる。大部分のTGFリガンドは、最初にI型受容体に結合し、次いで、このリガンド / I型受容体複合体がII型受容体を動員またはリン酸化すると考えられている (Mathews, L S, Endocrin Rev: Mol Cell Biol. 15: 310 - 325 (1994); Massague, Nature Rev: Mol Cell Biol. 1: 169 - 178 (2000))。II型受容体キナーゼは、I型受容体キナーゼをリン酸化および活性化することにより、次いで、Smadタンパク質をリン酸化および活性化する。TGF / アクチビンリガンドはTGF およびアクチビンII型受容体に結合し、このアクチビン型経路を通じてSmad-2、Smad-3、NodalおよびLeftyシグナルを活性化することができる。BMP / GDFリガンドはBMP II型受容体に結合し、Smad1、Smad5、およびSmad8を活性化することができる。Derijckx, Rら、Cell 95, 737 - 740 (1998) を参照されたい。リガンド刺激の際、Smadは核内に移動し、転写複合体の構成成分として機能する。

【0212】

TGF シグナル伝達は、種々の機構を通じて正におよび負に調節される。陽性調節では、シグナルが生物学的活性のために十分なレベルまで増幅される。TGF スーパーファミリーリガンドがII型受容体に結合し、これによりI型受容体が動員およびリン酸化される。次いで、I型受容体により、受容体により調節されるSMAD (R-SMAD、例えばSMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5、およびSMAD8) がリン酸化され、そこで共通のメディエーターSmadまたはco-SMADに結合することができる。R-SMAD / co-SMAD複合体は核内に蓄積され、そこで転写因子としての機能を果たし、標的遺伝子発現の調節に関与する。例えば、成長分化因子としては1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、および15が挙げられる。また、好ましい一実施形態では、GDF8およびGDF11はTGF ファミリーメンバーであり、同様にTGF シグナル伝達経路活性化因子(陽性調節)でもあり、ActRII受容体の細胞外リガンド結合性ドメイン部分に結合し、次いでActRIIと複合体を形成し、それによりSmad7負の制御因子の阻害およびSmad2 / Smad3複合体のリン酸化を導くことによって作用する。Smad2 / Smad3複合体はSmad4と会合して特定の遺伝子の発現を調節する。

【0213】

TGF シグナル伝達の負の調節は、細胞外、膜、細胞質および核レベルで起こる。TGF によって開始されるシグナル伝達を抑圧するために、シグナル伝達を妨害することができる。これは、TGF 受容体およびSMADタンパク質相互作用をブロックするかそれと競合するタンパク質などの、TGF 受容体(複数可)とSMADタンパク質の間の相互作用と拮抗またはそれを阻止する、当技術分野で公知である任意の手段によって達成することができる。あるいは、シグナル伝達経路に沿うシグナル伝達を阻止するために、当技術分野で公知である任意の手段によって、TGF 受容体またはSMADタンパク質の転写または翻訳を変化させることができる。様々なTGF メンバータンパク質の正および負の調節は、下の因子のいくつかのより詳細な記載によってさらに例示される。

【0214】

任意の作用物質の使用と同様に、細胞培養培地中の任意のTGF スーパーファミリーメンバーの濃度は、その濃度により、例えばTGF 受容体ファミリーメンバーが活性化されることなどの所望の効果を実現することができる限りは、下記の実施例に記載されているものに限定されない。例えば、アクチビン、例えば、アクチビンAおよび/またはアクチビンB、またはGDF8およびGDF-11を使用する場合、好ましい濃度は、約10～約300nM、より好ましくは約50～約200nM、なより好ましくは約75～約150nM、最も好ましくは約100～125nMの範囲であり得る。当業者は、任意

10

20

30

40

50

の濃度を容易に試験することができ、当技術分野における標準の技法を使用して、そのような濃度の有効性を決定すること、例えば、任意の細胞型について遺伝子マーカー (gene marker) パネルの発現および非発現を決定することによって分化を評価することができる。

【0215】

ヒト多能性幹細胞を分化させるために使用されるこれらおよび他の成長因子は、2008年6月3日に出願の米国特許出願第12/132,437号、表題GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERMでさらに詳細に記載され、それは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0216】

本発明を一般に記載したが、本明細書において提供される、単に例示するためのものであり、限定するものではないある特定の実施例を参照することにより、さらなる理解を得ることができる。

【実施例】

【0217】

上述のものが本発明の好ましい実施形態に関連すること、および本発明の範囲を逸脱しないでそこに多数の変更を加えることができることも理解するべきである。本発明は以下の実施例でさらに例示されるが、それらはその範囲に制限を加えるものと決して解釈されではならない。逆に、様々な他の実施形態、改変形およびその同等物を用いることができるることを明らかに理解するべきであり、それらは、本明細書の説明を読んだ後ならば、本発明の精神および/または添付の特許請求の範囲を逸脱しないで、当業者が思いつくことができる。

【0218】

(実施例1)

胚体内胚葉および内胚葉中間体を経た臍臓の前駆体および内分泌細胞へのヒトiPS細胞の分化

臍臓前駆体、内分泌前駆体およびホルモン発現内分泌細胞などの臍臓細胞型の集団を生成するために、約2週（または14日）にわたる四（4）ステージ手順を使用して、懸濁凝集体でヒト人工多能性幹（iPS）細胞を分化させた。本明細書で用いたヒトiPS細胞系は、S. Yamanaka、京都大学、日本およびCellular Dynamics International, Inc. (CDI) によって提供された。

【0219】

本明細書に記載されるiPS細胞は、Shinya Yamanakaによって最初に、その後CDIによって提供された。未分化iPS細胞は、20%ノックアウト血清代替物を含有するDMEM/F12において、有糸分裂不活性化マウス胚線維芽細胞上で、または好ましくはフィーダーフリー（線維芽細胞フィーダー細胞層なし）で増殖させた。アクチューゼを使用して未分化iPS細胞を単細胞に解離させることによって分化を開始し、RNAの単離と分析のために細胞試料をとった。細胞は、1:5000希釈のインスリン-トランスフェリン-セレン(ITS)、アクチビンA(100ng/mL)、wnt3a(50ng/mL)およびrhοキナーゼまたはROCK阻害剤、Y-27632を10μで含有するRPMI+0.2体積/体積%FBSに、1ミリリットルにつき細胞数1,000,000~2,000,000で再懸濁させ、回転プラットホームの上に置いた超低付着6ウェルプレートに入れ、約100rpmで回転させた。培養物は、分化プロセスの残りの間、培地を毎日交換し、100rpmで回転させた。iPSCの成長、継代および増殖は、実質的に米国特許第7,961,402号および第8,211,699号に記載されている通りであり、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0220】

多能性細胞、例えばhESまたはiPS細胞、および多能性細胞から導出された細胞の凝集懸濁培養物を生成するための本明細書に記載の方法は、実質的に、2007年2月23日に出願された表題がCompositions and methods for

10

20

30

40

50

culturing differential cellsであるPCT/US2007/062755、および2008年10月20日に出願された表題がMethods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serumであるPCT/US2008/080516に記載されている通りであり、それらは参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0221】

本明細書に記載される方法は、例えば、Geron Corporationに帰属する、Bodnarらへの米国特許第6,800,480号に記載のように、培養容器を細胞外マトリクスで先ずコーティングすることによって促進することができる。他の多能性幹細胞、例えばhESおよびiPS細胞を培養するための他の方法と同様に、この方法は、実質的に2008年10月20日に出願された表題がMethods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serumである、参照により本明細書に完全に組み込まれる米国特許出願PCT/US2008/080516に記載されるように、可溶性ヒト血清を使用して培養することができる。10

【0222】

本明細書に記載される方法は、Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF) に帰属する、参照により本明細書に完全に組み込まれるThomson, J.への米国特許第7,005,252号に記載されるように、線維芽細胞フィーダー層だけ以外の供給源から供給される、外部から加えられた線維芽細胞成長因子 (FGF) によって促進することができる。20

【0223】

回転の最初の約24時間の間に、互いに付着した単細胞は細胞凝集体を形成し、RNAの単離と分析のために十分な細胞試料をとった。細胞凝集体は、直径が約60ミクロンから120ミクロンであった。iPS細胞試料を回転プラットホームに置いてから約1日（または24時間）後に、培養に、1:5000希釈のITS、アクチビンA（100~200ng/mL）、およびWnt3a（50~100ng/mL）を含有するRPMI+0.2体積/体積%FBSを約1日間（0日目から1日目まで）、およびさらに1日間、またはWnt3aのないこと以外は同じ培地を（1日目から2日目）与えた。RNAの単離および分析のために毎日の細胞試料をとった。2日間の分化の後、培養物に、1:1000希釈のITS、KGF（またはFGF7、25ng/mL）およびTGF阻害剤n0.4（2.5μM）を含有するRPMI+0.2体積/体積%FBSを1日間（または24時間、2日目から3日目まで）与えた。次の2日間（3日目から5日目）、TGF阻害剤を培地から除いたこと以外は同じ成長因子カクテル培地をiPS細胞凝集懸濁液に与えた。再び、このステージ（ステージ2または5日目）の終わりに、RNA単離のために細胞試料をとった。ステージ3（5日目から8日目）については、TTNPB [4-[E-2-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレンイル)-1-プロペニル]安息香酸]（3nM）、KAAD-シクロパミン（0.25μ）およびノギン（50ng/mL）を含有するDMEM+1体積/体積%B27サブリメントに細胞培養培地を代えた。再び、このステージ（ステージ3または8日目）の終わりに、RNAの単離と分析のために細胞試料をとった。ステージ4（8日目から14日目）については、ノギン（50ng/mL）、KGF（50ng/mL）およびEGF（50ng/mL）を含有するDMEM+1体積/体積%B27サブリメントに培地を代えた。再び、ステージ4（または14日目）の終わりに、RNAの単離と分析のために細胞試料をとった。30

【0224】

分化中の様々なマーカー遺伝子の遺伝子発現を測定するために、リアルタイムPCRを実施した。特異的マーカーまたは遺伝子の遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子、サイクロフィリンGおよびTATA結合タンパク質（TBP）発現の平均発現レベルに先ず標40

準化した。次に標準化した相対的な遺伝子発現は、未分化 iPS 細胞での発現レベルに対して棒グラフに表示され、したがって様々な分化マーカーの上方制御倍率を表す。OCT4については、遺伝子発現は、データセットの最低の試料（14日目）を設定するために標準化され、したがって分化中の下方制御倍率を表す。

【0225】

図2A～Lは、未分化iPS細胞中の同じ遺伝子の発現レベルと比較した、同定された遺伝子（例えば、Oct4、Brachyury、Cer1、GSC、FOXA2、FOXA1、HNF6、PDX1、PTF1A、NKX6.1、NGN3およびINS）の相対的な遺伝子発現を示す棒グラフである。遺伝子の発現レベルをハウスキーピング遺伝子（対照）のセットに標準化し、2つの異なる時点での遺伝子発現レベルを比較することにより、その遺伝子または発現マーカーに上方制御か下方制御があることが示された。OCT4（図2A）については、遺伝子発現を標準化し、最低レベルの発現の試料を1に設定した（14日目）。したがって、図2Aによって示されるように、OCT4の相対的な発現レベルは、分化中（X軸、ステージ0から4、または0日目から14日目）の下方制御倍率（y軸）を表す。

【0226】

図2Aに示すように、OCT4（POU5F1）は未分化iPS細胞において高レベルで発現され、その後分化中（0日目から14日目）は下方制御を示す。14日目までには、OCT4発現レベルは未分化細胞で観察される発現レベルから3000倍を超えて減少した。対照的に、最初の2日間（1日目および2日目）中にbrachyury遺伝子（BRACHYURY、図2B）発現の一過性の上方制御があった。brachyuryの一過性の上方制御は、アクチビンAおよびwnt3aの適用による多能性/iPS細胞の内胚葉系中胚葉へ誘導された分化の結果であった。3日目のステージ1の終わりまでのCER1、GSCおよびFOXA2の上方制御によって示されるように（図2C～E）、内胚葉系中胚葉はアクチビンAへの連続曝露によって2日目および3日目の間に胚体内胚葉にさらに分化した。分化の6日目までのFOXA1の上方制御、FOXA2発現の維持ならびにCER1およびGSCの下方制御によって示されるように（図2C～F）、ステージ2の間に、胚体内胚葉は腸管内胚葉に分化するようさらに誘導された。8日目までのHNF6およびPDX1の上方制御によって示されるように（図2G～H）、ステージ3の間、レチノイド、シクロパミンおよびノギンへの曝露の結果、腸管内胚葉は後部前腸/PDX1発現内胚葉に分化するようさらに誘導された。14日目までのPTF1A、NKX6-1、NGN3およびINSの上方制御によって示されるように（図2I～L）、ステージ4の間、KGfおよびEGFへの曝露の結果、後部前腸/PDX1発現内胚葉は、臍前駆体、内分泌前駆体およびホルモン発現内分泌細胞に分化するようさらに誘導された。

【0227】

（実施例2）

Rhoキナーゼ阻害剤は、iPS細胞の成長、生存、増殖および細胞間接着を促進する様々なhESおよびiPS細胞系を分化させる方法は、実質的にここで、および実施例1に記載される通りである。分化の間の成長、生存、増殖および細胞間接着を増強および促進するために、ステージ1、2、3、4および5について記載される培養条件に加えて、アポトーシス阻害剤および/またはRhoキナーゼもしくはROCK阻害剤を培地に加えた。一般的に約10μMのRhoキナーゼ阻害剤、例えばY-27632を、各ステージで細胞培養に加えた。あるいは、少なくともステージ1および2、ならびにステージ4および5、またはその任意の組合せでRhoキナーゼ阻害剤を加えた。分化したiPS懸濁液（凝集体）細胞培養の形態および遺伝子マーカー発現プロファイルは、hES細胞から導出された懸濁細胞培養のそれに実質的に類似する。

【0228】

図3および4は、それぞれステージ4と5からのiPS細胞培養の免疫細胞化学（ICC）を示す。図3は、PDX1/NKX6.1共陽性細胞など、PDX1陽性臍内胚葉

10

20

30

40

50

(膵臓上皮または膵臓前駆体とも呼ばれる)の特徴を示す典型的な遺伝子マーカーを発現する、ステージ4からの細胞凝集体を示す。図3に示されていないが、ステージ4細胞は、インスリン(INS)、グルカゴン(GCG)、ソマトスタチン(SST)および膵臓ポリペプチド(PP)などのステージ5細胞の特色をより示すホルモン分泌タンパク質または遺伝子マーカーを発現しない。図4は、ステージ5からのホルモン発現細胞の細胞凝集体を示す。これらのICC結果は、QPCRを使用してさらに確認された。しかし、QPCRは試料または細胞培養で発現されるRNAの全レベルの全集団研究であるので、それは任意の1つの細胞が複数のマーカーを発現することを確定的に示すことができない。

【0229】

(実施例3)

10

iPS導出膵臓前駆体の封入

現在まで、iPS細胞の生成方法およびiPS細胞の生成のための供給源が報告されている。しかし、特定の疾患、例えば糖尿病を治療するための細胞療法での潜在的使用のための、任意の機能性分化細胞への任意のiPS細胞の分化に関する十分な記載はない。

【0230】

ヒトiPS細胞から導出されたステージ4のPDX1陽性の膵臓内胚葉または膵臓前駆細胞培養が、グルコース感受性インスリン分泌細胞にin vivoで発達および成熟することが完全に可能かどうか判定するために、実質的に実施例1および2に記載のような膵臓前駆体集団を、参照により本明細書に完全に組み込まれる2009年11月13日に出願された米国特許出願12/618,659、表題ENCAPSULATION OF

20

PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS;ならびに米国特許第7,534,608号および第7,695,965号、表題METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONESに記載のものに実質的に類似のマクロ封入デバイスに加えた。簡潔には、実質的に約 3×10^6 細胞数を有する、5-10-20μLの重力沈降細胞懸濁凝集体を各デバイスに加えた。

【0231】

次に、哺乳動物、例えば免疫不全SCID/Bgマウスへの移植のためにデバイス内の封入細胞を調製したが、ラット、ブタ、サルまたはヒト患者などより大きな動物に移植することができる。封入細胞を移植する方法およびデバイスは、実質的に、GELFOAMマトリックスに移植されて精巣上体の脂肪パッド(EFP)の下に移植される膵臓前駆細胞等、米国特許出願第12/618,659号、米国特許第7,534,608号および第7,695,965号に記載される通りである。

30

【0232】

これらの研究で免疫抑制は必要でなかったが、デバイス内の前駆体が完全に成熟してグルコース応答性になるまで、最初の中間期間の間特定の哺乳動物のために免疫抑制が必要とされることがある。一部の哺乳動物では、免疫抑制レジメンは約1、2、3、4、5、6週間以上であってもよく、哺乳動物次第である。

【0233】

移植された細胞は、in vivoで分化させ、さらに成熟させた。移植された細胞が例えば天然に存在するベータ細胞のように正常な生理機能を有するかどうか判定するために、ヒトCペプチドのレベルの検査によってヒトイインスリンのレベルを判定する。ヒトCペプチドはヒトプロインスリンから切断または処理され、したがって、内因性マウスCペプチドでなくヒトCペプチドの特異的検出は、インスリン分泌が移植された(外因性)細胞から導出されたことを示す。移植片を有する動物は、それらへのアルギニンまたはグルコース、好ましくはグルコースのボーラス注射によって、2、3または4週ごとにヒトCペプチドのレベルを検査する。その後成熟したベータ細胞(分化した多能性iPS細胞から導出された)は、天然に存在するか内因性のベータ細胞と同様に生理的に機能的で、グルコース応答性であるはずである。一般的に、50pMまたは平均基礎(閾値)レベルを上回るヒトCペプチドの量が、移植された前駆体からの今ではベータ細胞の機能の指標で

40

50

ある。

【0234】

参照により本明細書に完全に組み込まれるKroonら(2008)、前掲、米国特許出願12/618,659、米国特許第7,534,608号；第7,695,965号および第7,993,920号に記載のものと同様に、hIPS細胞から導出された封入臍臓前駆体は、天然に存在する島のそれと同様の内分泌、腺房および管細胞を有する、機能性の臍島クラスターに成熟することが期待される。また、移植前のhIPS細胞から導出された精製または濃縮された臍臓前駆体も、機能性の臍島に成熟および発達し、in vivoでインスリンを生成することが予想される。様々な分化した細胞集団を精製、濃縮するための特定の実施形態は、2008年4月8日に出願された米国特許出願12/107,020、表題METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HES CELLS、現在の米国特許第8,338,170号にさらに詳細に記載され、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。凍結保存されたhIPS細胞から導出された臍臓前駆体は、移植の前に解凍し、培養に適合させることができ、その結果、in vivoで成熟してインスリンを生成することができるさらに予想される。hIPS細胞から導出された移植された臍臓前駆体を有する糖尿病誘導動物では、低血糖を改善することができる。10

【0235】

要約すると、マクロ封入デバイス中のhIPS細胞から導出された完全封入臍臓前駆細胞は、生理的に機能的な臍島に成熟し、in vivoでグルコースに応答してインスリンを生成することが予想される。20

【0236】

(実施例4)

臍臓前駆体およびホルモン分泌細胞組成物

それぞれ表5a、5bおよび6に示すように、フローサイトメトリーを用いて、分化したhIPS細胞集団を、PDX1陽性の臍臓内胚葉または臍臓前駆細胞(ステージ4)；および内分泌または内分泌先駆細胞(ステージ5)の含有量について分析した。表5bは表5aのそれと同じデータセットであるが、比較のために表9のそれと同様に提示する。全体のPDX1+およびNKG6.1+数はNKG6.1+/PDX1+/CHGA-細胞集団(表5aの第5列)のそれと重複するので、表5a集団は互いに重複する、例えば全細胞数は100%を超える。表5bはPDX1+だけおよび三重陰性(残留)データを含み、それは表5aでは示されない。in vivo機能を判定するために、これらのiPCE移植片の特定のもの、ならびに実質的に類似の処方を使用する他のものを動物に移植したが、ヒト血清Cペプチドのレベルはどの潜在的治療目的のためにも十分に安定的でなかった(データは示さず)。示す値は、所与の集団に属する全細胞の百分率である。懸濁細胞凝集体中にある臍臓前駆体(NKG6.1(+))/PDX1(+)/クロモグラニンA(-))の数およびNKG6.1+/PDX1-/CHGA-の非常に小さい集団は、hES細胞から導出された臍臓前駆細胞懸濁凝集体で観察されたものと一致し、2008年11月4日に出願された米国特許出願12/264,760、表題STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOFに記載され、参照により本明細書に完全に組み込まれる通り、ESCSステージで凝集した。内分泌物および/または内分泌先駆細胞のレベルも、参照により本明細書に完全に組み込まれる2008年4月8日に出願された米国特許出願12/107,020、表題METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HES CELLS中のhES由来の細胞培養物で得られたものと実質的に一致していた。hES由来の細胞の懸濁凝集体と同様に、分化の特定のステージ(例えば、ステージ4)で培地中の異なる成長因子の濃度を変化させることは、臍臓内胚葉、内分泌、PDX1陽性の内胚葉または非臍臓細胞304050

型の特定の集団を増加および / または減少させるはずである。

【表5】

表5a;ステージ4膵臓前駆細胞組成(全細胞のパーセント)

Exp. #	iPS 細胞系	PDX1+	NKX6.1+	膵臓内胚葉 (NKX6.1(+)/PDX1(+) /クロモグラニンA(-))	内分泌 (クロモグラニンA+)
1	G4	56.4	39.2	33.3	12.7
2	B7	88.3	40.9	30.4	42.3
3	B7	84.1	53.1	38.8	51.8
4	B7	94.0	43.7	32.7	49.5

10

表5b;ステージ4膵臓前駆細胞組成(全細胞のパーセント)

Exp. #	条件	PEC			
		CHGA+ (内分泌)	CHGA- NKX6.1+ PDX1+ or - (膵臓前駆体, >96% PDX1+)	CHGA- NKX6.1- PDX1+ (PDX1+ だけ)	CHGA- NKX6.1- PDX1- (三重陰性; 残留細胞)
1	ベースライン	12.7	33.3	10.6	42.7
2	ベースライン	42.3	30.4	18.5	7.9
3	ベースライン	51.8	38.8	8.4	0.5
4	ベースライン	49.5	32.7	16.3	1.2

20

【表6】

30

表6;ステージ5内分泌細胞組成(全細胞のパーセント)

Exp. #	iPS細胞系	インスリン+	グルカゴン+	ソマトスタチン+
5	B7	15.9	15.0	12.1
6	B7	17.4	15.9	10.5

【0237】

(実施例5)

PEC受容体チロシンキナーゼ

上記の方法は、上記のS chulzら(2012)をもとにした下の表7に記載されるものと実質的に同じである。本明細書に記載されるこれらおよび他の方法は、それらの開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる米国特許第7,964,402号；第8,211,699号；第8,334,138号；第8,008,07号；および第8,153,429号等の、出願人の多くの特許および非特許公開文書に見出すことができる。

40

【表7】

表7:hESCから導出される臍臓内胚葉細胞(PEC)を作製するための標準製造法

時点(日) d(-1)	ステージ (1~4)	培地条件	ローラー ^{ボトル} 速度 (rpm)	6ウェル トレイ 速度 (rpm)	
d0	1	r0.2FBS-ITS1:5000 A100 W50	5-10	95	10
d1		r0.2FBS-ITS1:5000 A100	5-10	95	
d2	2	r0.2FBS-ITS1:1000 K25 IV	5-10	95	
d3		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5-10	95	
d4		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5-10	105	
d5	3	db-CTT3 N50	5-10	105	
d6		db-CTT3 N50	5-10	105	
d7		db-CTT3 N50	5-10	105	
d8	4	db-N50 K50 E50	5-10	105	
d9		db-N50 K50 E50	5-10	95	
d10		db-N50 K50 E50(又はフィードなし)	5-10	95	20
d11		db-N50 K50 E50	5-10	95	
d12		db-N50 K50 E50	5-10	95	

hESC_Agg.: hESC凝集体; XF HA: 10v/v%の異物フリーノックアウト血清代替物、1v/v%の非必須アミノ酸、0.1mMの2-メルカプトエタノール、1v/v%のペニシリン/ストレプトマイシン(全てLife Technologiesから)、10ng/mLのヘレグリン-1 β (Peprotech)および10ng/mLのアクチビンA (R&D Systems)を追加したGlutaMAX含有DMEM/F12; SP: StemPro (登録商標)hESC SFM (Life Technologies); r0. 2FBS: RPMI1640 (Mediatech); O. 2%FBS (HyClone)、1×GlutaMAX-1 (Life Technologies)、1v/v%ペニシリン/ストレプトマイシン; ITS: インスリントラヌスフェリンーセレン (Life Technologies)、1:5000または1:1000に希釈; A100: 100ng/mL組換えヒトアクチビンA(R&D Systems); W50: 50ng/mL組換えマウスWnt3A (R&D Systems); K25: 25ng/mL組換えヒトKGF(R&D Systems); IV: 2.5 μ MTGF β RIキナーゼ阻害剤IV(EMD Bioscience); dB: 0. 5×B-27補助剤(Life Technologies)、1×GlutaMAXおよび1v/v%ペニシリン/ストレプトマイシンを追加したDMEM HIグルコース (HyClone); CTT3: 0. 25 μ MのKAAD-シクロパミン(Toronto Research Chemicals)および3nMのTTNPB (Sigma-Aldrich); N50: 50ng/mLの組換えヒトノギン(R&D Systems); K50: 50ng/mLの組換えヒトKGF (R&D Systems); E50: 50ng/mLの組換えヒトEGF(R&D Systems); フィードなし: 指示された日に細胞が再フィードされなかったことを示す; dB, DMEM(高グルコース)

【0238】

動物に移植されたiPS細胞および臍臓前駆体に上の方法を適用したとき、同じ方法をhESCおよびhES導出臍臓前駆体に適用したときと比較して、出願人は同じく安定した(robust)in vivo機能を一貫して得たとは限らない。iPS細胞がhESCの形態および遺伝子発現パターンを有し、in vitroで胚様体およびin vivoでテラトーマを形成することができるヒト多能性幹細胞であり、それらが3つの胚葉全てからの細胞を形成することができるることを示していることを考慮すると、これは意外であった。少なくとも、例えば上記の、Yular(2007); 米国特許出願公開第2009/0047263号、国際特許出願公開WO2005/80598; 米国特許出願公開第2008/0233610号; および国際特許出願公開WO2008/11882、を参照。これらの参考文献は、iPS細胞がESCの定義基準を満たすことを記載する。したがって、完全に機能性のグルコース応答性細胞にin vitroでさらに成熟および発達する、hESから導出された臍臓前駆細胞を与えるin vitro分化プロトコルにおいて、iPS細胞がESCの代用となることができることが予想される。しかし、上

の方法を使用する一貫しない *in vivo* 機能データを考慮し、出願人は、臍臓前駆体および / または臍臓内胚葉細胞 (PEC) 、すなわち、hESC から導出された PEC で一貫して観察されている *in vivo* 機能の実質的に類似の安定したレベルを提供することが可能である hIPSC (または「 iPPEC 」) からのステージ 4 由来の細胞に特異的である分化培地の処方を探索しようと努めた。

【 0239 】

出願人は、 PEC に存在する内分泌 (CHGA + 細胞) 細胞が複数ホルモン性内分泌細胞であり、 *in vivo* でグルコース応答性インスリン分泌細胞を有する島を生成する PEC 中の細胞の亜集団でないことを前に報告した。上記 Kellyl (2011) を参考されたい。むしろ、それは、非内分泌細胞集団 (CHGA - 細胞) 、特に、 *in vivo* で機能性の島を実際に生成する PEC であると考えられている、 NKX6.1 および PDX-1 を共発現するものである。したがって、出願人は、内分泌および非内分泌亜集団の相対比をモジュレートするか、変化させるか、シフトすることが、後の *in vivo* 機能に影響を及ぼすかどうかを探査した。

【 0240 】

hESC で受容体 - リガンドシグナル伝達を解読する以前の努力は、自己複製を促進する成長因子の同定に成功を収め、規定の培地培養条件の開発を可能にした。上記 Wang ら (2007) を参考されたい。Wang らは、ERBB3 に結合して ERBB2 との二量体化を誘導し、その場面で hESC の自己複製に影響を及ぼすリガンドとしてヘレグリン - 1 を同定した。ERBB は受容体チロシンキナーゼ (RTK) であり、 RTK は、成長因子および他の細胞外シグナル伝達分子の受容体として作用する、広く発現される膜貫通タンパク質である。リガンド結合の結果、それらは細胞質テール中の特定の残基でチロシンリン酸化を受け、 RTK 媒介シグナル伝達に関与する他のタンパク質基質の結合のためのシグナル伝達カスケードを始動する。細胞の生存、増殖および運動性の調節を含むいくつかの発達過程における RTK 機能、およびがん形成でのそれらの役割は文書で十分に立証されている。ERBB チロシンキナーゼ受容体は、発達中の胎児のヒト臍臓全体で発現されることも知られていたが、特定の ERBB 受容体およびそれらのリガンドの特異的役割は知られていない。Mari-Anne Huotari ら (2002) ERRB Signaling Regulates Lineage Determination of Developing Pancreatic Islet Cells in Embryonic Organ Culture, Endocrinology 143(11) : 4437 ~ 4446 頁を参考されたい。

【 0241 】

上記 Wang ら (2007) によって実証される胎児のヒト臍臓での多能性幹細胞の自己複製およびそれらの発現、ならびにヒト胎児臍臓での ERBB RTK 発現での ERBB RTK シグナル伝達の役割のために、次に出願人は、分化の間の PEC 特定化、または自己複製の促進による増殖、または生理的に機能する島ホルモン分泌細胞への *in vivo* 成熟を促進するいくつかの他の未知の機構を向上させる可能性がある受容体およびリガンドを同定する努力の中で、 hESC から導出された *in vitro* の臍臓内胚葉細胞 (PEC) で RTK の潜在的な活性化の調査に取りかかった。以下の変更を除いて実質的に表 8 に記載のように、分化凝集体の懸濁液で PEC を生成した。

【 0242 】

RTK ブロット分析のために、 4 つの PEC 試料を生成した。 d b - N50 K50 E50 での PEC 凝集体の「定常状態」試料を、ステージ 4 の終わり (または d13) に収集した。「絶食させた」試料は、 d b (DMEM 高グルコースまたは 0.5 × B - 27 サプリメント (Life Technologies) を追加した DMEM 高グルコース) 培地だけ (成長因子なし) を与え、 d13 に収集した、 d12 PEC 凝集体を表した。 2 つの「パルス投与」試料は、 d12 に d b 培地を与えてそこで培養し、次に d13 に、収集する前に 15 分間、 d b - K50 E50 培地または 2% FBS 含有 d b 培地のいずれかを与えた。そのような条件は、ステージ 4 条件で活性であった RTK の検出、ならび

10

20

30

40

50

に KGF、EGF およびインスリン（B27サプリメントに存在する）または血清のパルス投与でどのような応答を導き出すことができるか検出することを意図した。血清パルス投与は、PEC に存在し、本ステージ 4 条件で活性化することができるが刺激されない RTK を潜在的に同定する、広域な成長因子刺激を意図した。

【0243】

RTK 分析は、事実上前掲の Wang ら（2007）で前に記載される通りに実施した。簡潔には、Proteome Profiler（商標）ヒトホスホ RTK 抗体アレイ（R&D Systems）を、製造業者の指示通りに使用した。1%NP-40、20 mM トリス-HCl（pH 8.0）、137 mM NaCl、10%グリセロール、2.0 mM EDTA、1.0 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、10 μg/mL アプロチニン、および 10 μg/mL ロイペプチドでタンパク質溶解物を調製した。500 μg の新鮮なタンパク質溶解物を、42 個の抗 RTK 抗体および 5 つの陰性対照抗体のための重複（duplicate）スポット、ならびに 8 つの抗ホスホチロシン陽性対照スポットの点在するニトロセルロース膜と一緒にキュベートした（図 5 A）。配列された抗体はリン酸化および非リン酸化 RTK の細胞外ドメインを捕捉し、結合したホスホ RTK は、化学発光を使用して西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）にコンジュゲートされた汎抗ホスホチロシン抗体で検出される。RTK アレイレイアウトについては図 5 を、ならびにアレイ中の RTK の一覧については下の表 8 を参照されたい。

【表 8】

20

表8: PECのRTK分析のための受容体チロシンキナーゼ(RTK)のリスト

受容体ファミリー	RTK	Receptor Family	RTK
EGF R	EGFR	ROR	ROR2
EGF R	ERBB2	Tie	Tie-1
EGF R	ERBB3	Tie	Tie-2
EGF R	ERBB4	NGF R	TrkA
FGF R	FGF R1	NGF R	TrkB
FGF R	FGF R2A	NGF R	TrkC
FGF R	FGF R3	VEGF R	VEGF R1
FGF R	FGF R4	VEGF R	VEGF R2
インスリン R	インスリン R	VEGF R	VEGF R3
インスリン R	IGF-1R	MuSK	MuSK
Axl	Axl	Eph R	EphA1
Axl	Dtk	Eph R	EphA2
Axl	Mer	Eph R	EphA3
HGF R	HGF R	Eph R	EphA4
HGF R	MSP R	Eph R	EphA6
PDGF R	PDGF Ra	Eph R	EphA7
PDGF R	PDGF Rb	Eph R	EphB1
PDGF R	SCF R	Eph R	EphB2
PDGF R	Flt-3	Eph R	EphB3
PDGF R	M-CSF R	Eph R	EphB4
RET	c-Ret	Eph R	EphB6
ROR	ROR1	インスリン R	ALK

30

40

【0244】

RTK プロットの分析（図 6 A）は、hESC で以前に観察されたものと同様に、インスリン受容体および IGF 1 受容体（それぞれ IR、IGF 1 R）が全ての条件でリン酸

50

化され、活性化されたことを示した。上記Wangら(2007)を参照されたい。EGF受容体(EGFR、ERBB1としても知られる)は定常状態条件でリン酸化されたが、それはステージ4培地中のEGFの存在を考慮すると予想されていたことである。実際、ERBB2の低レベルのリン酸化が、定常状態および絶食条件の両方で検出された。EGFRおよびERBB2の両方のリン酸化は各パルス投与条件で上昇し、リガンドのパルス投与に応答する活性化を検出するアッセイの能力を確認した。リン酸化されたVEGFR3も全ての条件で検出され、パルス投与試料で上昇した。このことは、PECが内因性VEGFR3リガンドを生成することを示唆し、可能性のある候補はVEGFCおよびDであった。血清パルス投与は、低レベルのERBB3リン酸化を含め、さらなる受容体を活性化するようであった。リン酸化ERBB2/3の検出は、ヘレグリン様EGFファミリーメンバーがPECでシグナル伝達を活性化することができるることを示唆する。TIE-2は2つのアンギオポエチン受容体の1つであり、血清に応答して低いレベルでリン酸化されるようであった。アンギオポエチン1およびアンギオポエチン4はTie-2のリガンドを活性化することが公知であるが、アンギオポエチン2およびアンギオポエチン3は、場面依存性競合的アンタゴニストとして機能する。HGF受容体(HGFR)も血清パルス投与に応答してリン酸化され、肝細胞成長因子もPECでシグナル伝達を導き出すことができることを示唆した。最後に、エフリンB2-RTK(EPHB2)の低レベルのリン酸化が検出されたが、エフリン/Ephシグナル伝達は膜結合細胞間シグナル伝達系であり、PEC分化で容易に活用されるようではない。興味深いことに、ERBB4はリン酸化されなかった。したがって、RTK分析は、PECでリン酸化されるか、または異なる条件、例えば血清に応答してリン酸化することができるいくつかの受容体を鮮明にした。これらの結果は、いくつかの可溶性リガンドがPECでRTKシグナル伝達を導き出すことができ、細胞の増殖、分化および/または特定化に潜在的に影響を与え、したがって、機能性の臍島への後のin vivo成熟に潜在的に影響を及ぼすことができることを示唆する。

【0245】

(実施例6)

ヘレグリンおよびFGF2成長因子は、hESC組成物から導出されたPECに影響を及ぼす

上の実施例5に記載のように特定の条件下で特定のRTKが活性化(またはリン酸化)されることを実証したRTK分析を考慮し、また、少なくともERBB2およびERBB3がPECで活性化される(ステージ1~4から13日間の分化後に)ようであったので、出願人はステージ3および4の細胞に適用したときのヘレグリンの影響を判定しようと努めた。

【0246】

ヘレグリンおよびFGFを使用して予備研究を実施した。これらの研究の特定のものに、Rhöキナーゼ阻害剤、Y-27632が含まれた。これらの予備研究は、10ng/mlヘレグリン-1(Wangら(2007)に開示されるのと同じ濃度およびヘレグリン異性体)によるステージ1での1日間の多能性幹細胞の処置は、ヘレグリン-1(Hrg1)のない懸濁培養でのhES導出細胞凝集体の凝集体サイズと比較して、懸濁培養でhES導出細胞凝集体の細胞凝集体サイズを増加させた。細胞凝集体サイズの増加は、動物での後の移植および機能検査のためにより大きな細胞量をもたらす点で有利である。さらに、Hrg1がステージ3で10ng/mlから50ng/mlに増加したとき、凝集体ディスクサイズが増加した。この結果は、FGF2の不在下での培養と比較して50ng/mlの別の成長因子、FGF2がステージ3で使用されたときも観察された。細胞凝集体サイズの増加は、ステージ3培養をFGF2曝露にさらなる日数、例えば2日間と比較して3日間の50ng/mlのFGF2に曝露させたときも観察された。

【0247】

表9は、ステージ3および/またはステージ4にHrg1およびFGF2で処置したPEC細胞のフローサイトメトリー分析の要約を提供する。内分泌細胞はCHGA陽性(

またはCHGA+）細胞と表し、非内分泌細胞はCHGA陰性（またはCHGA-）細胞と表す。内分泌物（CHGA+）および非内分泌細胞（CHGA-）は、他のマーカーで陽性に染色することができ、例えばPDX1および／またはNKX6.1に陽性に染色される。試験したマーカーのいずれにも染色しない細胞は、三重陰性細胞または残留細胞（CHGA-/NKX6.1-/PDX1）と表す。

【表9】

表9:hESCから導出され、ヘレグリンおよび／またはFGF2で処置された
PECのフローサイトメトリー分析

処置	PEC		
	CHGA+ (内分泌)	CHGA-, NKX6.1+, PDX1+ (非内分泌)	CHGA- NKX6.1- PDX1- (三重陰性／ 残留細胞)
No Hrg & No FGF2	32.9	54.01	13.1
Stg 3 Hrg10	30.3	61.2	8.55
Stg 3Hrg50	28.9	64.2	6.9
2d Stg 3 FGF2-50	11.9	79	9.15
3d Stg 3 FGF2-50	0.33	76.9	22.7

10

20

Hg、ヘレグリン-β ; FGF2、線維芽細胞成長因子2; Hrg10, 10ng/mL
ヘレグリン-1β ; Hrg50, 50ng/mLヘレグリン-1β ; 2dFGF-50、
ステージ3で50ng/mLのFGF2を2日間; 3d FGF2-50、ステージ3で
50ng/mLのFGF2を3日間

【0248】

細胞凝集体サイズの増加がPEC亜集団に影響を及ぼすかどうか判定するために、PEC集団の組成物をフローサイトメトリーによって分析した。細胞を分化するためにHrg1 および FGF2 が使用されなかった対照培養と比較して、PEC 非内分泌亜集団（CHGA-）は、ステージ3で10ng/mLのHrg1 の添加により54.01%から61.2%に増加し、ステージ3で50ng/mLのHrg1 の添加により54.01%から64.2%に増加した。内分泌亜集団（CHGA+）は、10ng/mLのHrg1 の処置であまり影響を受けなかつたが、50ng/mLでよりそうであった。一方、残留細胞の相対レベルは減少し、50ng/mLのHrg1 でより減少した。したがって、Hrg1 処置による細胞凝集体サイズの増加は、内分泌および残留亜集団と比較して非内分泌亜集団の増加に大部分帰された。

30

【0249】

ステージ3培養でのFGF2の影響も同様であったが、Hrg1 のそれよりさらに顕著であった。例えば、PEC 非内分泌亜集団（CHGA-）は、Hrg1 でそうであつたように増加した。これらの培養でのFGF2の主要な影響は、内分泌亜集団の実質的な減少であった。ある場合には、これらの細胞は、3日間の処置でほとんど検出不能であった（32.9%から0.33%）。したがって、FGF2で処置した培養の細胞凝集体サイズの増加は、非内分泌、一部の場合には残留細胞亜集団の増加（ステージ3の3日間で13.1%から22.7%）に大部分帰された。

40

【0250】

したがって、ヘレグリンおよび／またはFGF2は、PEC集団での細胞の特定化において役割を果たすようである。多能性幹細胞との関連で使用されるとき、ヘレグリン単独で細胞再生において役割を果たすと上記のWangら（2007）が報告したことを考慮すると、これは意外である。

【0251】

50

(実施例 7)

ヘレグリンによる i P S 由来の細胞培養物の処置によって P E C の i n v i v o 移植片機能を向上させる方法

i P E C を生成するために i P S C に適用したときの表 7 による方法は、動物で安定した i n v i v o 機能を提供しなかったので、出願人は i P E C 生成のための他の方法を探索した。表 7 に示す標準方法の変更としては、限定されずに以下のものが挙げられる：任意の i P S C の継代回数の最適化； B M P シグナル伝達のレベルをモジュレートすること；増大および分化の間の i P S C 懸濁凝集パラメータをモジュレートすること（例えばせん断力、回転速度等）；成長因子、例えば W n t 、アクチビンおよび r h o キナーゼ阻害剤の濃度、使用時期および使用期間の最適化；ならびに、分化プロトコルの 1 から 4 の様々なステージでの、細胞の量、増殖、分化、生存等を向上させるための候補としての他の成長因子による処置（例えば E R B B リガンド）。ステージ 1 ~ 4 の間の i P S C の分化方法をどのように最適化することができるか判断するために、これらの多くの反復実験を単独で、または組合せて検証した。そのような最適化された分化方法は、移植したときに、 h E S C について観察および報告されたものに類似した安定したグルコース応答性インスリン分泌細胞を i n v i v o でもたらした i P E C 集団を生成する。下の表 10 は、後に i n v i v o でグルコース応答性島細胞に成熟する i P E C に i P S C を分化させることができが実証された、ヘレグリンの有る無しのベースライン条件を記載する。ベースライン条件は、ヘレグリンがステージ 3 および 4 で加えられたこと以外、本明細書の実施例 1 、 2 および 5 ならびに表 7 に記載されるものに類似していた。 3 0 n g / m L の r g 1 を使用したが、 1 0 n g / m L から 5 0 n g / m L の濃度、または 5 0 n g / m L を超える濃度でさえも適する。さらに、実施例 2 に記載の通り、 R h o キナーゼ阻害剤、 Y - 2 7 6 3 2 の添加が分化培養で維持された。

10

20

【表10】

表10:iPSCから導出される臍臓内胚葉細胞(PEC)を作製するためのベースラインおよびヘレグリン分化培地処方の比較

ベースライン(ヘレグリンなし)	ステージ (1~4)	ヘレグリンのあるベースライン	
iPSC			
20%KSR-F10 A10 Y10 r0.2FBS-ITS1:5000 A100 W100 Y10 r0.2FBS-ITS1:5000 A100 Y10	Agg. 1	20%KSR-F10 A10 Y10 r0.2FBS-ITS1:5000 A100 W100 Y10 r0.2FBS-ITS1:5000 A100 Y10	10
r0.2FBS-ITS1:1000 IV K25 Y10 r0.2FBS-ITS1:1000 K25 Y10 r0.2FBS-ITS1:1000 K25	2	r0.2FBS-ITS1:1000 IV K25 Y10 r0.2FBS-ITS1:1000 K25 Y10 r0.2FBS-ITS1:1000 K25	
db- CTT3 N50 db- CTT3 N50 db- CTT3 N50	3	db- CTT3 N50 H30 db- CTT3 N50 H30 db- CTT3 N50 H30	
db- N50 K50 E50 Y10 db- N50 K50 E50 Y10 db-N50 K50 E50 (またはフィードなし) db- N50 K50 E50 Y10 db- N50 K50 E50 Y10	4	db- N50 K50 E50 H30 Y10 db- N50 K50 E50 H30 Y10 db-N50 K50 E50 (またはフィードなし) db- N50 K50 E50 H30 Y10 db- N50 K50 E50 H30 Y10	20

iPSC Aggs:iPSC凝集体;KSR:ノックアウト血清(Life Technologies);
F10:10ng/mLのbFGF(R&D Systems);A10:10ng/mLのアクチビンA
(R&D Systems);A100:100ng/mLのアクチビンA;r0.2FBS:
RPMI1640(Mediatech);0.2%FBS(HyClone)、1×GlutaMAX-1
(Life Technologies)、1v/v%ペニシリン/ストレプトマイシン;
ITS:インスリントラスフェリンーセレン(Life Technologies)、
1:5000または1:1000に希釈;A100:100ng/mLの組換えヒトアクチビンA
(R&D Systems);K25:25ng/mLの組換えヒトGF(R&D Systems);
CTT3:0.25μMのKAAD-シクロパミン(Toronto Research Chemicals)
および3nMのTTNPB(Sigma-Aldrich);N50:50ng/mLの組換えヒトノギン
(R&D Systems);K50:50ng/mLの組換えヒトKGF(R&D Systems);
E50:50ng/mLの組換えヒトEGF(R&D Systems);Y10:10μMのY-27632;
保存液20mM、2000X;H30:30ng/mLのヘレグリン(保存液100μg/ml);db、
DMEM(高グルコース)

10

20

30

【0252】

ステージ3および4の細胞亜集団に及ぼすヘレグリンまたはヘレグリンおよびrhοキナーゼ阻害剤の添加の影響を判定するために、iPCE集団をフローサイトメトリーによって分析した。表11は、表10に示す配合、ならびにアクチビン濃度を200ng/mlに増加させることによって改変した配合を使用した、様々なiPCE集団のフローサイトメトリー分析の要約を提供する。さらに、表11は、各セットの実験(ヘレグリンの有る無しのベースライン)で用いた一般的な条件、およびiPCE集団中の細胞型(内分泌、非内分泌、PDX1だけおよび三重陰性または残留細胞亜集団)の相対的百分率を示す。表11は、各実験で生成された細胞のin vivo機能に関するデータも開示する。

40

【表 1 1】

表11:ヘレグリン処置iPS由来の細胞培養物からのiPEC組成物

Exp. No.	条件	PEC				in vivo 機能
		CHGA+ (内分泌)	CHGA- NKX6.1+ PDX1+ (非内分泌)	CHGA- NKX6.1- PDX1+ (PDX1だけ)	CHGA- NKX6.1- PDX1- (三重陰性/ 残留細胞)	
E2314	BL -hIPSC Hg30 St 3+4	19.83 9.00	65.59 64.21	11.32 16.83	3.20 9.88	図7A
E2344	BL - hIPSC Hg30 St 3+4	56.51 36.13	36.15 49.00	5.45 11.23	1.80 2.75	移植なし
E2347	BL - hIPSC Hg30 St 3+4	49.78 17.27	37.16 68.91	10.97 12.30	2.11 1.68	図7B & 8A-B
E2380	BL - hIPSC Hg30 St 3+4	41.16 45.91	38.18 29.72	12.08 17.24	9.10 7.03	FIG. 7A
E2354	BL-hESC Hg30 St3+4 - hESC	33.39 16.18	62.01 73.00	2.89 8.10	1.75 1.86	図7C

BL、ベースライン条件; hIPSC、ヒト人工多能性幹細胞; Hg30、30ng/mL
のヘレグリン-11; St3+4、ステージ3および4; hESC、ヒト胚性幹細胞、
CHGA、クロモグラニンA

【0253】

特定の条件において、PEC (hESC、E2354) および iPEC (E2314、E2344、E2347) 集団中の細胞亜集団の比は変化した。例えば、時には、ベースライン(ヘレグリンなし)条件と比較して、内分泌(CHGA+)細胞の百分率は減少し、非内分泌細胞(CHGA- / NKX6.1+ / PDX1+)の百分率は増加した。ヘレグリンがこれらのPECおよびiPEC集団中の非内分泌細胞と比較した内分泌細胞の割合の変化の原因となるようであったが、実験#2380 (E2380) では、ヘレグリンの添加によって内分泌(CHGA+)細胞のレベルは減少せずに増加した。

【0254】

PECおよびiPEC集団の構成の変化が in vivo 機能に影響を及ぼしたかどうかを判定するために、表11に記載される大部分の実験からのPECおよびiPEC移植片を、実質的に本明細書ならびに上記の Schulz (2012) および Kroonら (2008) 、および上記の米国特許第 7,534,608 号；第 7,695,965 号；第 7,993,920 号および第 8,278,106 号を含む出願人の他の特許および非特許出版物に前述の通り、マウスに移植した。簡潔には、PECおよびiPEC集団を生分解性の半透過性細胞封入デバイスに全て封入し、そのいくつかは微穿孔を含んでいた。デバイスは出願人によって製造され、2009年11月13日に出願された米国特許第 8,278,106 号、表題 ENCAPSULATION OF PANCREATIC

10

20

30

40

50

CELLS FROM HUMAN PLURIPOENT STEM CELLS で詳細に記載され、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。グルコース刺激インスリン分泌 (G S I S) アッセイを、移植の約 56 日後から実施した。グルコース投与の前 (空腹時)、およびグルコース投与の 30 分後および / または 60 分後の組合せで血液を収集した。グルコース投与に応答した血清中のヒト C ペプチド濃度を測定することによって、移植片機能を評価した。

【 0 2 5 5 】

血清に放出されるヒト C ペプチドの量は、放出されるインスリンの量の指標となる。C ペプチドはプロインスリンおよびプレプロインスリンの A および B 鎖を接続または連結する短い 31 アミノ酸ペプチドであり、機能性ベータまたはインスリン分泌細胞によって分泌される。上記 K r o o n l a (2 0 0 8) および他によって前述される通り、ヒト C ペプチドの測定は、移植細胞による新規生成インスリンの放出の評価に適当である。したがって、これらの動物の血清中のヒト C ペプチドのレベルは、成熟した P E C および i P E C 移植片の in vivo 機能の尺度である。ヒト C ペプチドは、移植後少なくとも 8 週までに血清で検出された。追加の数週の移植および絶食により、グルコース刺激 C ペプチドレベルは増加し、C ペプチドのピークレベルはグルコース投与の 60 分後から 30 分後にシフトし、それは、インスリン細胞の成熟に従う、グルコース投与へのより速い応答の指標となる。機能を示すことができなかったか、不良な健康状態のために屠殺された少数のマウスがいた。しかし、これらのマウスはさもなければ高機能を示した動物のコホート中 10 にあり、したがって、移植細胞が分化して機能する能力がないということよりも移植の失敗を示唆した。

【 0 2 5 6 】

図 7 A ~ C は、E 2 3 4 4 以外の表 1 1 に示す実験の全てについての、グルコース投与後の血清中のヒト C ペプチドレベルを示す。図 7 A ~ C は、ベースライン対照と比較して、ヘレグリン処置からもたらされた移植片が血清中ヒト C ペプチドのより高いレベルを一般に有したこと示す。例えば、図 7 A では実験 2 3 8 0 において、ヘレグリンなしで調製したもの (ベースライン) と比較して、ヘレグリン処置からもたらされた移植片の約 5 倍の増加 (グルコース投与の 60 分後に 9 3 3 p M : 2 0 0 p M) がある。実験 2 3 5 4 (図 7 C) はベースライン対照と比較してヘレグリン処置からもたらされた移植片で血清 C ペプチドのより高いレベルを示さないので、ヘレグリンは、h E S C から生成される P E C により少ない影響を及ぼすようである。さらに、h E S C から導出された P E C (C y T 2 0 3) と i P S C から導出された i P E C を比較すると、i P E C 移植片は、P E C 移植片と同等の機能を in vivo で有する (例えば、図 7 A および図 7 B (i P S C 移植片) を図 7 C (C y T 2 0 3 h E S C) と比較する)。このように、i P E C 移植片は、P E C 移植片と同じくらい頑強である。さらに、内分泌および非内分泌亜集団で同じシフトを有しなかった E 2 3 8 0 からの i P E C も優れた機能を示したので、i P E C 集団のいくつか (例えば E 2 3 1 4 、 E 2 3 4 7 および E 2 3 5 4) に影響を及ぼすように見えた、内分泌細胞対非内分泌細胞の相対比は、in vivo 機能に影響を及ぼさないようであった (図 7 A ~ C を参照)。

【 0 2 5 7 】

グルコース刺激インスリン分泌を試験することに加えて、宿主動物のベータ細胞を破壊した場合に、h E S C から導出された P E C によって維持される正常血糖と同様の正常血糖をそれらが単独で維持することができるかどうか判定するために、成熟した i P E C 移植片を試験した。これは、ヒトベータ細胞と比較してマウスベータ細胞に対してより強い細胞毒性を示すベータ細胞毒素、ストレプトゾトシン (S T Z) を使用して、移植されたマウスのベータ細胞を破壊することを必要とした。S T Z 処置の前後に各マウスについて、ランダムな非絶食血中グルコースを測定した。S T Z 処置から 13 日目の i P E C 移植片の外植の結果、高血糖が再開した (血中グルコースの急騰を記す) が、それは内因性マウス臍臓ではなく i P E C 移植片による糖尿病の制御を実証する (図 8 A および図 8 B を参考する)。

10

20

30

40

50

【0258】

さらに、分化のステージ1～4の間にヘレグリンおよびrh_oキナーゼ阻害剤が与えられたときに、相乗効果があるようであった（表10を参照する）。例えば、rh_oキナーゼ阻害剤なしでステージ3および4でヘレグリンによって処置したiPSCは、目にみえて劣る細胞量をもたらし、移植を不可能にした。ヘレグリンおよびrh_oキナーゼ阻害剤の相乗効果のさらなる傍証が、実験のいくつか、例えばE2356、E2380で明白であったが、そこではrh_oキナーゼ阻害剤単独によるベースライン条件は、rh_oキナーゼ阻害剤とヘレグリンによる移植片と同じくらい安定的には機能しなかった（図7AおよびBを参照）。ヘレグリン単独の添加が提供した細胞量は移植に不十分であり、rh_oキナーゼ阻害剤単独の添加（ベースライン条件）は不良なin vivo機能を有したので、ヘレグリンおよびrh_oキナーゼ阻害剤による処置は相加的でなかったようである。このように、ヘレグリンだけまたはrh_oキナーゼ阻害剤だけの提供は、2つを組み合わせた合計の影響に実質的に同等でない。すなわち、単独ではいずれもin vivoで安定したグルコース応答性をもたらさないが、組み合わせるとそれらはhES由来の細胞のそれと同等のグルコース応答性をもたらす。したがって、ヘレグリンおよびrh_oキナーゼ阻害剤の両方の提供は、それらの組み合わせた影響が各々別々の影響の合計より大きいので相乗的であるようであった。すなわち、rh_oキナーゼ阻害剤およびヘレグリンで処置したiPECはin vivoで成熟してグルコース刺激インスリン分泌を示し、糖尿病マウスモデルで正常血糖を維持することができた（図7A～Bおよび図8A～Bを参照されたい）。

10

20

【0259】

ERBB機能性は、リガンド結合、受容体二量体化および受容体輸送を必要とする。各過程での変動は、受容体およびそれらが制御する下流シグナルの差次の調節をもたらす場合がある。例えば、異なるERBBリガンドはERBB受容体に異なる親和性で結合し、それによってERBB二量体構成体のパターンおよび動態力学を変化させる。表12は、リガンドおよび受容体結合複合体の多くの可能な異なる組合せを示す。この系の複雑性に関するレビューは、Odaら(2005)A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling、Mol. Syst. Biol.、1(2005)およびLazzarara(2009)Quantitative modeling perspectives on the ERBB system of cell regulatory processes、Experimental Cell Research 315(4):717～725頁によって提供され、その開示は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

30

【表12】

表12:ERRB受容体チロシンキナーゼおよびそれらのリガンド

		ERRB受容体チロシンキナーゼ			
		ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
リガンド	EGF	X			
	TGF α	X			
	HB-EGF	X			X
	EPR	X			X
	EPG	X			
	b-Cell	X			X
	AR	X			
	Hrg1			X	X
	Hrg2			X	X
	Hrg3				X
Hrg4				X	

ERRB受容体チロシンキナーゼ: ErbB1(Her1、または上皮成長因子受容体、EGFRとも命名される); ErbB2(ヒト上皮成長因子受容体、またはHer2;またはNeuとも命名される); ErbB3(Her3とも命名される)、ErbB4(Her4とも命名される)、ERRBリガンド: EGF、上皮成長因子; TGF α 、トランスフォーミング成長因子 α ; HB-EGF、ヘパリン結合EGF様成長因子; EPR、エピレグリン; EPG、エピゲン; AR、アンフィレグリン、Hrg1、ヘレグリン-1またはニューレグリン-1; Hrg2、ヘレグリン-2またはニューレグリン-2; Hrg3、ヘレグリン-3またはニューレグリン-3; Hrg4、ヘレグリン-4またはニューレグリン-4; ヘレグリンは、ニューレグリンと互換的に使用される。

【0260】

Huotariらは、ニューレグリン-4がグルカゴン(アルファ)細胞を代償にしてソマトスタチン(デルタ)細胞の数を増加させることによって内分泌細胞亜集団の相対レベルをモジュレートすることができること、およびニューレグリン-4は、内分泌(例えば、-インスリン、-グルカゴン、-ソマトスタチン、PP-腎臓ポリペプチド)細胞に対する外分泌(例えば、アミラーゼ)細胞の比に影響を及ぼさないことを示唆した。しかし、これらの研究は、E12.5日目のマウスから得られたホールマウント器官組織培養の上でニューレグリン-4をインキュベートすることによって実施された。これらのマウス外植細胞集団は、本明細書に記載されるステージ3(例えばPDX1陰性前腸内胚葉)および/またはステージ4(PDX1陽性前腸内胚葉)細胞集団よりさらに分化していた。ニューレグリン-4はERBB4(RTK)だけに結合するので、ホールマウントマウス培養物の内分泌亜集団だけをこの関係においてニューレグリン-4によってモジュレートすることができる。したがって、Hrg1はERBB3に結合してERBB2/3の二量体化を誘導することができるので、本明細書に記載されるように、異なるERBBリガンド、例えばHrg1によるステージ3(PDX1陰性前腸内胚葉)および/またはステージ4(PDX1陽性前腸内胚葉)細胞の処置が、Huotariにおけるように相対的な内分泌亜集団をモジュレートするとは予想され得ない。しかし、図6に示すようにPECでのERBB2および3の低レベルの発現のために、ステージ3および4型の細胞が低いレベルか高いレベルのERBB2および3を発現してHrg1に結合するかどうかは不明であった。

【0261】

さらに、異なる場面で、出願人はHrg1がERRB2/3に結合して、多能性幹細胞の自己複製を促進したことを記載していた(Wangら(2007)を参照する)。Hrg1

10

20

30

40

50

g 1 がステージ 3 および 4 の場面で同じ能力で作用することができる可能性があるが、出願人は P E C の生成のための大部分の細胞増大が多能性幹細胞ステージ（ステージ 0 ）で起こることを以前に記載した。ステージ 0 の間、 h E S C は約二（ 2 ）週の間成長、継代および増殖させられる。したがって、細胞増殖または細胞増殖をもたらす自己複製のほとんどは、ステージ 1 ~ 4 の間には起こらない。上記 S c h u l z ら（ 2012 ）を参照されたい。さらに、 E R R B 2 / 3 がステージ 3 および 4 の間に存在すると仮定すると、誘導される分化に影響を与えるのと反対に多能性幹細胞と同様の効果（自己複製）をヘレグリンが有すると予想し得る。そうすると、機能の差は、場面に、すなわち多能性幹細胞か、内胚葉または臍臓系列の細胞型かに依存するようである。

【 0262 】

10

要約すると、前腸内胚葉（ステージ 3 ）および P D X 1 発現臍臓内胚葉細胞（ステージ 3 の終わりおよびステージ 4 ）へのヘレグリンまたはヘレグリンおよび r h o キナーゼ阻害剤の i n v i t r o での提供は、移植されたときに i n v i v o で成熟してグルコース応答性インスリン分泌細胞に発達する P E C および i P E C 集団を生成した（図 7 および 8 を参照する）。ヘレグリンまたはヘレグリンおよび r h o キナーゼ阻害剤のそのような使用は、ここで初めて報告された。そのような使用および影響は、特許または非特許文献で前に記載されたものからは認識できない。

【 0263 】

20

本明細書に記載される Q - P C R 結果は免疫細胞化学（ I C C ）によってさらに確認することができ、当業者が容易に実施することができる事が理解される。

【 0264 】

本明細書に記載される方法、組成物およびデバイスは、現在好ましい実施形態の代表であり、例示的であり、本発明の範囲を限定することを意図していない。当業者は、本発明の精神に包含され、開示の範囲によって規定される、それへの変更および他の使用を思いつくであろう。したがって、本発明の範囲および精神を逸脱しない範囲で、様々な置換および改変を本明細書に開示される本発明に加えることは、当業者には明らかであろう。

【 0265 】

30

下の請求項およびこの開示全体において、語句「から事実上なる」は、語句の後に掲載される任意の要素を含むことを意味し、掲載される要素について開示で特定される活性または作用に干渉しないか寄与しない他の要素に限定される。したがって、語句「から事実上なる」は、掲載される要素は必要とされるか必須であるが、他の要素は任意選択であり、掲載される要素の活性か作用にそれらが影響を及ぼすかどうかによって存在しても存在しなくてもよいことを示す。さらに、数値、例えば量、濃度、百分率、割合または範囲が列挙される実施形態では、言及される値は、「少なくとも約」その数値、「約」その数値、または「少なくとも」その数値であってもよいことが理解される。

【 0266 】

実施形態

実施形態 1 . i n v i t r o ヒト臍臓内胚葉細胞培養物。

40

実施形態 2 . 臍臓内胚葉細胞が多能性細胞から導出される、実施形態 1 に記載の細胞培養物。

実施形態 3 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触している、実施形態 1 または 2 に記載の細胞培養物。

実施形態 4 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質が、 E G F （上皮成長因子）、 A R E G （アンフィレグリン）、 T G F - アルファ（トランスフォーミング成長因子 - アルファ）、 B t c （ベータセルリン）、 H B E G F （ヘパリン結合 E G F ）、 E r e g （エピレグリン）、ニューレグリンまたはヘレグリンである、実施形態 3 に記載の細胞培養物。

実施形態 5 . 臍臓内胚葉細胞が臍臓前駆細胞および複数ホルモン性内分泌細胞を含む、

50

実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 6 . 脾臓前駆細胞が N K X 6 . 1 を発現するが C H G A を発現しない、実施形態 5 に記載の細胞培養物。

実施形態 7 . 複数ホルモン性内分泌細胞が C H G A を発現する、実施形態 5 に記載の細胞培養物。

実施形態 8 . 脾臓内胚葉細胞が C H G A 陽性および C H G A 陰性細胞を含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 9 . 脾臓内胚葉細胞の少なくとも 30 % は C H G A 陰性細胞である、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 10 . 脾臓内胚葉細胞の少なくとも 50 % は P D X 1 陽性細胞である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。 10

実施形態 11 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がヘレグリン - 4 である、実施形態 3 に記載の細胞培養物。

実施形態 12 . 線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触している、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 13 . F G F が F G F - 7 である、実施形態 12 に記載の細胞培養物。

実施形態 14 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および F G F と接触している、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 15 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。 20

実施形態 16 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質、 F G F および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 1 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の細胞培養物。

実施形態 17 . i n v i t r o ヒト脾臓内胚葉集団。

実施形態 18 . 脾臓内胚葉細胞が多能性細胞から導出される、実施形態 17 に記載の細胞集団。

実施形態 19 . 多能性細胞がヒト胚性幹細胞または脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞である、実施形態 18 に記載の細胞集団。

実施形態 20 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触している、実施形態 17 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 21 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質が、 E G F (上皮成長因子) 、 A R E G (アンフィレグリン) 、 T G F - アルファ (トランスフォーミング成長因子 - アルファ) 、 B t c (ベータセルリン) 、 H B E G F (ヘパリン結合 E G F) 、 E r e g (エピレグリン) 、 ニューレグリンまたはヘレグリンである、実施形態 20 に記載の細胞集団。 30

実施形態 22 . 脾臓内胚葉細胞が脾臓前駆細胞および複数ホルモン性内分泌細胞を含む、実施形態 17 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 23 . 脾臓前駆細胞が N K X 6 . 1 を発現するが C H G A を発現しない、実施形態 22 に記載の細胞集団。

実施形態 24 . 複数ホルモン性内分泌細胞が C H G A を発現する、実施形態 22 に記載の細胞集団。 40

実施形態 25 . 脾臓内胚葉細胞が C H G A 陽性および C H G A 陰性細胞を含む、実施形態 17 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 26 . 脾臓内胚葉細胞の少なくとも 30 % は C H G A 陰性細胞である、実施形態 17 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 27 . 脾臓内胚葉細胞の少なくとも 50 % は P D X 1 陽性である、実施形態 17 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 28 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がヘレグリン - 4 である、実施形態 20 に記載の細胞集団。

実施形態 29 . 細胞培養物が線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触している、実施形態 17 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 50

実施形態 3 0 . F G F が F G F - 7 である、実施形態 2 9 に記載の細胞集団。

実施形態 3 1 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および F G F と接触している、実施形態 1 7 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 3 2 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 1 7 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 3 3 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質、 F G F および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 3 4 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触しているヒト臍臓内胚葉細胞を含む in vivo 細胞集団。 10

実施形態 3 5 . 脇臓内胚葉細胞が多能性細胞から導出される、実施形態 3 4 に記載の細胞集団。

実施形態 3 6 . 多能性細胞がヒト胚性幹細胞または脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞である、実施形態 3 5 に記載の細胞集団。

実施形態 3 7 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質が、 E G F (上皮成長因子)、 A R E G (アンフィリゲリン)、 T G F - アルファ (トランスフォーミング成長因子 - アルファ)、 B t c (ベータセルリン)、 H B E G F (ヘパリン結合 E G F)、 E r e g (エピレグリン)、ニューレグリンまたはヘレグリンである、実施形態 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 20

実施形態 3 8 . 脇臓内胚葉細胞が脇臓前駆細胞および複数ホルモン性内分泌細胞を含む、実施形態 3 4 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 3 9 . 脇臓前駆細胞が N K X 6 . 1 を発現するが C H G A を発現しない、実施形態 3 8 に記載の細胞集団。

実施形態 4 0 . 複数ホルモン性内分泌細胞が C H G A を発現する、実施形態 3 8 に記載の細胞集団。

実施形態 4 1 . 脇臓内胚葉細胞が C H G A 陽性および C H G A 陰性細胞を含む、実施形態 3 4 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 4 2 . 脇臓内胚葉細胞の少なくとも 3 0 % は C H G A 陰性細胞である、実施形態 3 4 ~ 4 1 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 30

実施形態 4 3 . 脇臓内胚葉細胞の少なくとも 5 0 % は P D X 1 陽性である、実施形態 3 4 ~ 4 2 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 4 4 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がヘレグリン - 4 である、実施形態 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 4 5 . ヒト脇臓内胚葉細胞が線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触している、実施形態 3 4 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 4 6 . F G F が F G F - 7 である、実施形態 4 5 に記載の細胞集団。

実施形態 4 7 . ヒト脇臓内胚葉細胞が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および F G F と接触している、実施形態 3 4 ~ 4 6 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 4 8 . ヒト脇臓内胚葉細胞が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 3 4 ~ 4 7 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 40

実施形態 4 9 . ヒト脇臓内胚葉細胞が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質、 F G F および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 3 4 ~ 4 8 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 5 0 . インスリンを生成する方法であって、

a . 前腸内胚葉細胞を E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより脇臓内胚葉を含む細胞集団を生成するステップと、

b . ステップ (a) の脇臓内胚葉を in vivo で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答 50

してインスリンを分泌するステップと
を含む方法。

実施形態 5 1 . インスリンを生成する方法であって、

a . 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出された前腸内胚葉細胞を E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と *i n v i t r o* で接触させ、それにより、内分泌および非内分泌細胞集団を含む細胞集団を生成するステップと、

b . ステップ (a) の細胞集団を *i n v i v o* で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップと

を含む方法。

10

実施形態 5 2 . インスリンを生成する方法であって、

a . 脾臓内胚葉細胞を *i n v i v o* で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップ

を含む方法。

実施形態 5 3 . 脾臓内胚葉細胞が前腸内胚葉細胞を E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させることによって作製される、実施形態 5 2 に記載の方法。

実施形態 5 4 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質が、 E G F (上皮成長因子)、 A R E G (アンフィレグリン)、 T G F - アルファ (トランスフォーミング成長因子 - アルファ)、 B t c (ベータセルリン)、 H B E G F (ヘパリン結合 E G F)、 E r e g (エピレグリン)、 ニューレグリンまたはヘレグリンである、実施形態 5 0 ~ 5 2 および 5 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

実施形態 5 5 . 前腸内胚葉細胞が線維芽細胞成長因子 (F G F) とさらに接触している、実施形態 5 0 ~ 5 2 および 5 3 ~ 5 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 5 6 . F G F が F G F - 7 である、実施形態 5 5 に記載の方法。

実施形態 5 7 . 前腸内胚葉細胞が r h o キナーゼ阻害剤とさらに接触している、実施形態 5 0 ~ 5 2 および 5 3 ~ 5 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 5 8 . 前腸内胚葉細胞が r h o キナーゼ阻害剤および F G F とさらに接触している、実施形態 5 0 ~ 5 2 および 5 3 ~ 5 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 5 9 . r h o キナーゼ阻害剤が、 Y - 2 7 6 3 2 、 ファスジル、 H - 1 1 5 2 P 、 W f - 5 3 6 、 Y - 3 0 1 4 1 、 R O C K のアンチセンス核酸、 R N A 干渉誘導核酸、競合的ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害性抗体、抗体 - S c F V 断片、そのドミナントネガティブバリアント、誘導体および発現ベクターからなる群から選択される、実施形態 5 7 ~ 5 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

実施形態 6 0 . r h o キナーゼ阻害剤が、 Y - 2 7 6 3 2 、 ファスジル、 H - 1 1 5 2 P 、 W f - 5 3 6 および Y - 3 0 1 4 1 およびそれらの誘導体からなる群から選択される、実施形態 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 6 1 . R h o キナーゼ阻害剤が、 Y - 2 7 6 3 2 、 ファスジルおよび H - 1 1 5 2 P 、 およびそれらの誘導体からなる群から選択される、実施形態 5 7 ~ 6 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

実施形態 6 2 . 脾臓内胚葉が内分泌および非内分泌細胞集団を含む、実施形態 5 0 に記載の方法。

実施形態 6 3 . 内分泌細胞集団が C H G A 陽性 (C H G A +) 細胞である、実施形態 6 2 に記載の方法。

実施形態 6 4 . 非内分泌細胞集団が C H G A 陰性 (C H G A -) である、実施形態 6 2 に記載の方法。

実施形態 6 5 . 非内分泌細胞集団が N K X 6 . 1 を発現する、実施形態 6 2 に記載の方法。

実施形態 6 6 . 脾臓内胚葉の少なくとも 3 0 % は C H G A 陰性である、実施形態 5 0 に記載の方法。

50

実施形態 67. 膵臓内胚葉の少なくとも 50% は PDX1 陽性である、実施形態 50 に記載の方法。

実施形態 68. インスリンを生成する方法であって、

a. 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞を、 TGF 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を含む第 1 の培地と in vitro で接触させるステップと、

b. TGF 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を欠く第 2 の培地でステップ (a) の細胞を in vitro で培養し、それにより前腸内胚葉細胞を生成するステップと、

c. (b) の前腸内胚葉細胞を ERBB チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を生成するステップと、

d. (c) の細胞集団を in vivo で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップと
を含む方法。

実施形態 69. 非内分泌細胞が CHGA 陰性 (CHGA-) 細胞である、実施形態 68 に記載の方法。

実施形態 70. 内分泌細胞が CHGA 陽性 (CHGA+) 細胞である、実施形態 68 ~ 69 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 71. CHGA 陰性 (CHGA-) 細胞が NKX6.1 を発現する、実施形態 69 に記載の方法。

実施形態 72. (b) の前腸内胚葉細胞を rhö キナーゼ阻害剤と接触させる、実施形態 69 に記載の方法。

実施形態 73. (b) の前腸内胚葉細胞を FGF と接触させる、実施形態 69 に記載の方法。

実施形態 74. (b) の前腸内胚葉細胞を rhö キナーゼ阻害剤および FGF と接触させる、実施形態 69 に記載の方法。

実施形態 75. rhö キナーゼ阻害剤が、 Y-27632 、 fasigil 、 H-1152P 、 Wf-536 、 Y-30141 、 ROCK のアンチセンス核酸、 RNA 干渉誘導核酸、競合的ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害性抗体、抗体 - ScFV 断片、そのドミナントネガティブバリエント、誘導体および発現ベクターからなる群から選択される、実施形態 72 ~ 74 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 76. 内分泌細胞と比較して胰臓内胚葉細胞集団中の非内分泌細胞の比率を増加させる方法であって、

前腸内胚葉細胞を ERBB チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより胰臓内胚葉細胞集団中の非内分泌細胞の比率を増加させるステップを含む方法。

実施形態 77. 前腸内胚葉細胞を FGF と接触させる、実施形態 76 に記載の方法。

実施形態 78. 前腸内胚葉細胞を rhö キナーゼ阻害剤と接触させる、実施形態 76 に記載の方法。

実施形態 79. 前腸内胚葉細胞を FGF および rhö キナーゼ阻害剤とさらに接触させる、実施形態 76 に記載の方法。

実施形態 80. 移植された胰臓内胚葉のグルコース応答性を向上させる方法であって、前腸内胚葉細胞を ERBB チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより胰臓内胚葉を含む細胞集団を生成するステップと、

胰臓内胚葉を in vivo で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞が、前腸内胚葉細胞を ERBB チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させることなく作製した胰臓内胚葉から導出されたインスリン分泌細胞よりもよくインスリンを分泌するステップと
を含む方法。

10

20

30

40

50

実施形態 8 1 . 脾臓内胚葉細胞が脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される、実施形態 8 0 に記載の方法。

実施形態 8 2 . インスリンを生成する方法であって、(a) 生細胞を E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させるステップと、(b) ステップ a の最後に細胞を移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップとを含む方法。

実施形態 8 3 . 生細胞が前腸内胚葉または P D X 1 隆性前腸内胚葉である、実施形態 8 2 に記載の方法。

実施形態 8 4 . 生細胞が脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出される、実施形態 8 2 ~ 8 3 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

実施形態 8 5 . 内分泌および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団。

実施形態 8 6 . 内分泌および非内分泌細胞亜集団が多能性細胞から導出される、実施形態 8 5 に記載の細胞集団。

実施形態 8 7 . 多能性細胞がヒト胚性幹細胞または脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞である、実施形態 8 6 に記載の細胞集団。

実施形態 8 8 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質が、 E G F (上皮成長因子)、 A R E G (アンフィレグリン)、 T G F - アルファ (トランスフォーミング成長因子 - アルファ)、 B t c (ベータセルリン)、 H B E G F (ヘパリン結合 E G F)、 E r e g (エピレグリン)、ニューレグリンまたはヘレグリンである、実施形態 8 5 ~ 8 7 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 20

実施形態 8 9 . 非内分泌細胞は N K X 6 . 1 を発現するが C H G A を発現しない、実施形態 8 5 ~ 8 8 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 0 . 内分泌細胞が C H G A を発現する、実施形態 8 5 ~ 8 9 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 1 . 細胞の少なくとも 3 0 % は C H G A 隆性細胞である、実施形態 8 5 ~ 9 0 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 2 . 細胞の少なくとも 5 0 % は P D X 1 陽性である、実施形態 8 5 ~ 9 1 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 30

実施形態 9 3 . E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がヘレグリン - 4 である、実施形態 8 5 ~ 9 2 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 4 . 細胞培養物が線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触している、実施形態 8 5 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 5 . F G F が F G F - 7 である、実施形態 9 4 に記載の細胞集団。

実施形態 9 6 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および F G F と接触している、実施形態 8 5 ~ 9 5 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 7 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 8 5 ~ 9 6 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

実施形態 9 8 . 細胞培養物が E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質、 F G F および r h o キナーゼ阻害剤と接触している、実施形態 8 5 ~ 9 7 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 40

実施形態 9 9 . インスリンを生成する方法であって、(a) 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞を、 T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を含む第 1 の培地と i n v i t r o で接触させるステップと、(b) T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を欠く第 2 の培地でステップ (a) の細胞を i n v i t r o で培養し、それにより、少なくとも前腸内胚葉または少なくとも P D X 1 隆性前腸内胚葉細胞を生成するステップと、(c) (b) の細胞を E R B B チロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を生成するステップと、(d) (c) の細胞集団を i n v i v o で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグ 50

ルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップとを含む方法。

実施形態 100 . インスリンを生成する方法であって、(a) PDX1陽性細胞を ERBBチロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させるステップと、(b) (a)の細胞集団を in vivo で移植し、成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップとを含む方法。

実施形態 101 . rhōキナーゼ阻害剤がステップ a 、 b または c で加えられる、実施形態 68 または 99 に記載の方法。

実施形態 102 . rhōキナーゼ阻害剤がステップ a 、 b および c で加えられる、実施形態 68 または 99 に記載の方法。 10

実施形態 103 . rhōキナーゼ阻害剤がステップ a および b で加えられる、実施形態 68 または 99 ~ 100 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 104 . ERBBチロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がステップ a または c で加えられる、実施形態 68 または 99 に記載の方法。

実施形態 105 . ERBBチロシンキナーゼ受容体活性化作用物質がステップ a および c で加えられる、実施形態 68 または 99 に記載の方法。

実施形態 106 . in vivo でグルコース応答性インスリン分泌細胞に成熟することが可能な細胞集団を生成する方法であって、少なくとも前腸内胚葉、少なくとも PDX1陰性前腸内胚葉の集団、または少なくとも PDX1陽性臍臍内胚葉細胞の集団を、ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と接触させ、それにより、in vivo でグルコース応答性インスリン分泌細胞に成熟することが可能な細胞集団を生成するステップを含む方法。 20

実施形態 107 . 脘臍内胚葉を生成する方法であって、

a . 前腸内胚葉細胞を ERBBチロシンキナーゼ受容体活性化作用物質と接触させ、それにより臍臍内胚葉を含む細胞集団を生成するステップ
を含む方法。

実施形態 108 . 前腸内胚葉細胞を線維芽細胞成長因子 (FGF) と接触させることをさらに含む、実施形態 107 に記載の方法。

実施形態 109 . FGF が FGF - 7 である、実施形態 108 に記載の方法。

実施形態 110 . 前腸内胚葉細胞を rhōキナーゼ阻害剤と接触させることをさらに含む、実施形態 107 ~ 109 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

実施形態 111 . 前腸内胚葉細胞を rhōキナーゼ阻害剤および FGF と接触させることをさらに含む、実施形態 107 ~ 109 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 112 . 脘臍内胚葉の少なくとも 30 % は CHGA 陰性である、実施形態 107 ~ 111 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 113 . 脘臍内胚葉の少なくとも 50 % は PDX1 陽性である、実施形態 107 ~ 112 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 114 . 前腸内胚葉細胞が多能性細胞から導出される、実施形態 50 、 76 、 107 ~ 113 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 115 . 多能性細胞がヒト胚性幹細胞または脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞である、実施形態 50 、 76 、 107 ~ 114 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

実施形態 116 . 多能性細胞がヒト胚性幹細胞または脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞である、実施形態 1 に記載の細胞培養物。

実施形態 117 . 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出された分化した細胞および ERBB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質を含む、 in vitro ヒト臍臍内胚葉細胞集団。

実施形態 118 . ERRB受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質が EGF 成長因子またはリガンドを含む、実施形態 117 に記載の臍臍内胚葉細胞集団。

実施形態 119 . EGF 成長因子またはリガンドが、ヘレグリン - 1 、ヘレグリン - 2 50

およびヘレグリン - 3 およびヘレグリン - 4 からなる群から選択されるヘレグリンアイソフォームを含む、実施形態 118 に記載の臍臓内胚葉細胞集団。

実施形態 120 . ヘレグリンアイソフォームがヘレグリン - 1 およびヘレグリン - 4 を含む、実施形態 119 に記載の臍臓内胚葉細胞集団。

実施形態 121 . リガンドヘレグリンアイソフォームがヘレグリン - 4 を含む、実施形態 119 に記載の臍臓内胚葉細胞集団。

実施形態 122 . インスリンを生成する方法であって、

a . 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞から導出された前腸内胚葉細胞培養物を E R B B 受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と in vitro で接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を生成するステップと

10

b . ステップ (a) の亜集団を in vivo で成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌する、ステップと
を含む方法。

実施形態 123 . 前腸内胚葉細胞培養物を rh o キナーゼ阻害剤と接触させることをさらに含む、実施形態 122 に記載の方法。

実施形態 124 . rh o キナーゼ阻害剤が、Y - 27632 、ファスジル、H - 1152 P 、Wf - 536 、Y - 30141 、R O C K のアンチセンス核酸、R N A 干渉誘導核酸、競合的ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害性抗体、抗体 - S c F V 断片、ドミニントネガティブバリアント、それらの誘導体およびそれらの発現ベクターからなる群から選択される、実施形態 123 に記載の方法。

20

実施形態 125 . rh o キナーゼ阻害剤が、Y - 27632 、ファスジル、H - 1152 P 、Wf - 536 、Y - 30141 およびそれらの誘導体からなる群から選択される、実施形態 123 に記載の方法。

実施形態 126 . Rh o キナーゼ阻害剤が、Y - 27632 、ファスジル、H - 1152 P およびそれらの誘導体からなる群から選択される、実施形態 125 に記載の方法。

実施形態 127 . インスリンを生成する方法であって、

a . 脱分化した遺伝的にリプログラミングされた細胞を、T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を含む第 1 の培地と in vitro で接触させるステップと、

30

b . T G F 受容体ファミリーメンバーを活性化する作用物質を欠く第 2 の培地でステップ (a) の細胞を in vitro で培養し、それにより前腸内胚葉細胞を生成するステップと、

c . ステップ (b) の前腸内胚葉細胞を E R B B 受容体チロシンキナーゼ活性化作用物質と接触させ、それにより、内分泌細胞および非内分泌細胞亜集団を含む細胞集団を生成するステップと、

d . ステップ (c) の細胞亜集団を in vivo で成熟させ、それによりインスリン分泌細胞を得るステップであって、インスリン分泌細胞がグルコース刺激に応答してインスリンを分泌するステップと
を含む方法。

40

実施形態 128 . 非内分泌細胞が C H G A 陰性 (C H G A -) 細胞である、実施形態 127 に記載の方法。

実施形態 129 . 内分泌細胞が C H G A 陽性 (C H G A +) 細胞である、実施形態 127 に記載の方法。

実施形態 130 . C H G A 陰性 (C H G A -) 細胞が N K X 6 . 1 をさらに発見する、実施形態 127 に記載の方法。

実施形態 131 . 前腸内胚葉細胞を rh o キナーゼ阻害剤と接触させることをさらに含む、実施形態 127 に記載の方法。

実施形態 132 . rh o キナーゼ阻害剤が、Y - 27632 、ファスジル、H - 115

50

2P、Wf-536、Y-30141、ROCKのアンチセンス核酸、RNA干渉誘導核酸、競合的ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害性抗体、抗体-ScFV断片、ドミナントネガティブバリエント、それらの誘導体およびそれらの発現ベクターからなる群から選択される、実施形態131に記載の方法。

【図1】

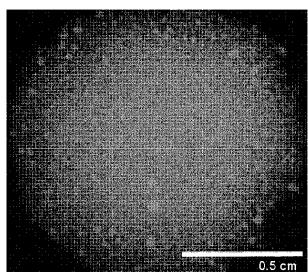


FIG. 1

【図2A-B】

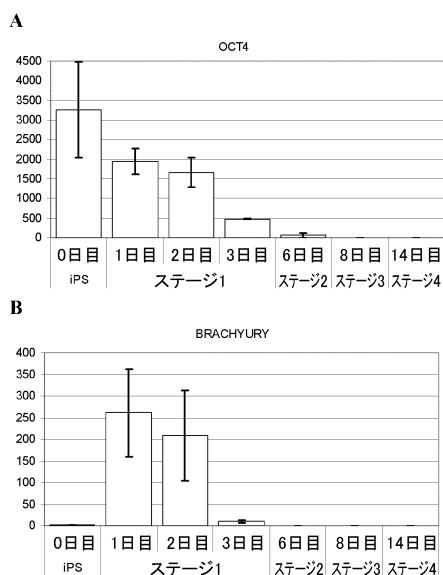


FIG. 2A-B

【図 2 C - D】

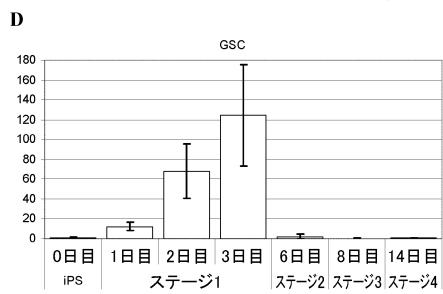
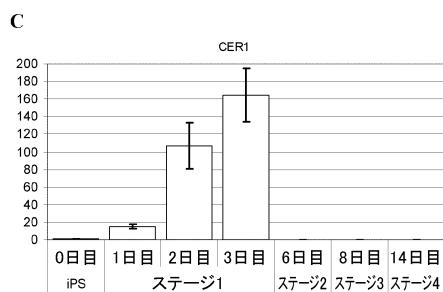


FIG. 2C-D

【図 2 E - F】

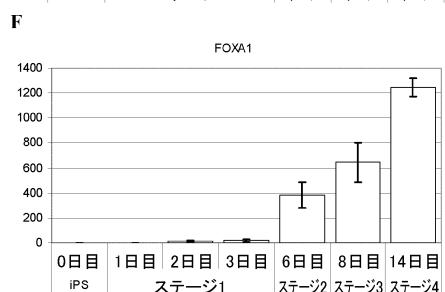
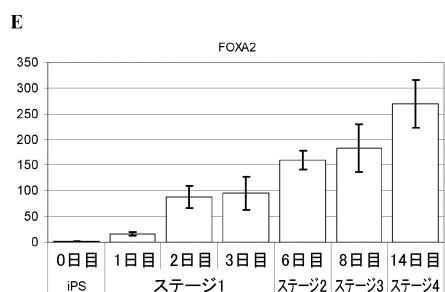


FIG. 2E-F

【図 2 G - H】

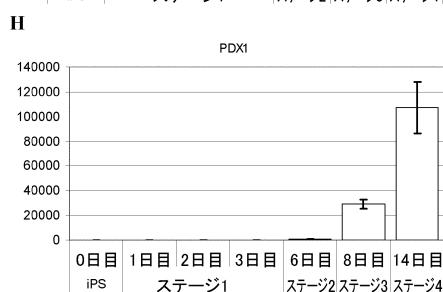
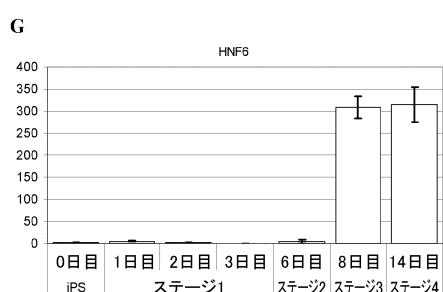


FIG. 2G-H

【図 2 I - J】

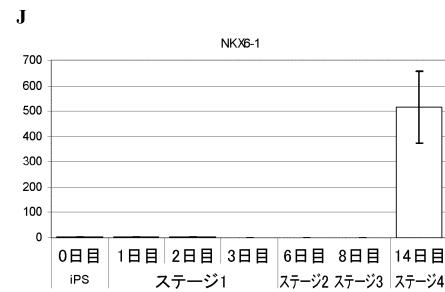
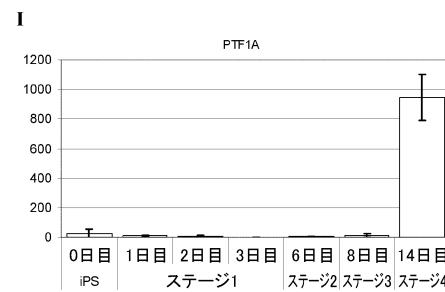


FIG. 2I-J

【図2 K - L】

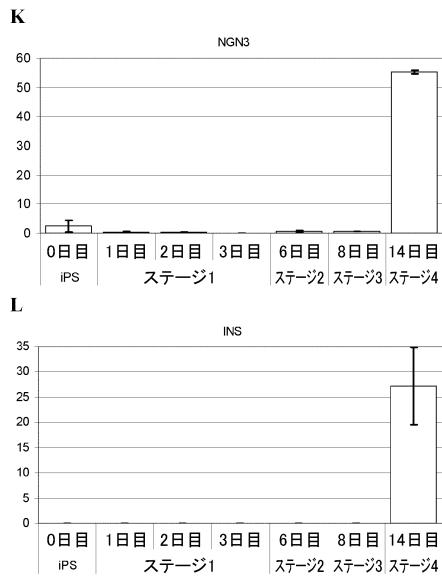
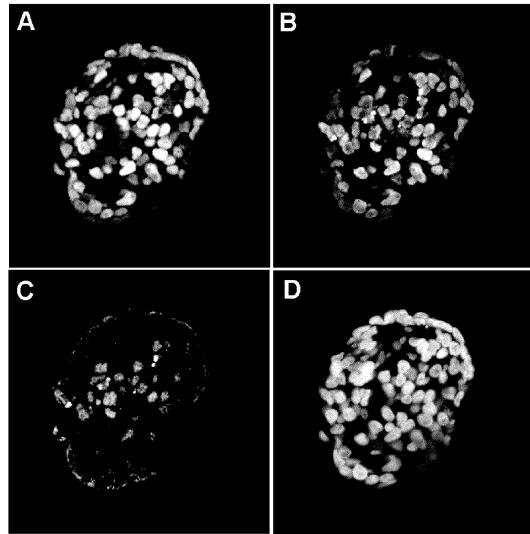


FIG. 2K-L

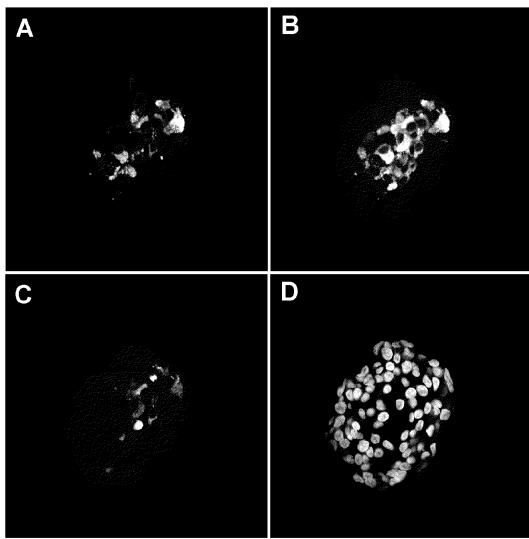
【図3】

ステージ4分化時のG4 hIPS細胞系を使用したE2021
(PDX1陽性胰臓内胚葉細胞)

A) *Pdx1*
B) *Nkx6.1*
C) *Ptf1a*
D) *Dapi*

FIG. 3

【図4】



ステージ5のE2021 G4 hIPS細胞系

- A) グルカゴン
- B) インスリン
- C) ソマトスタチン
- D) *Dapi*

FIG. 4

【図5】

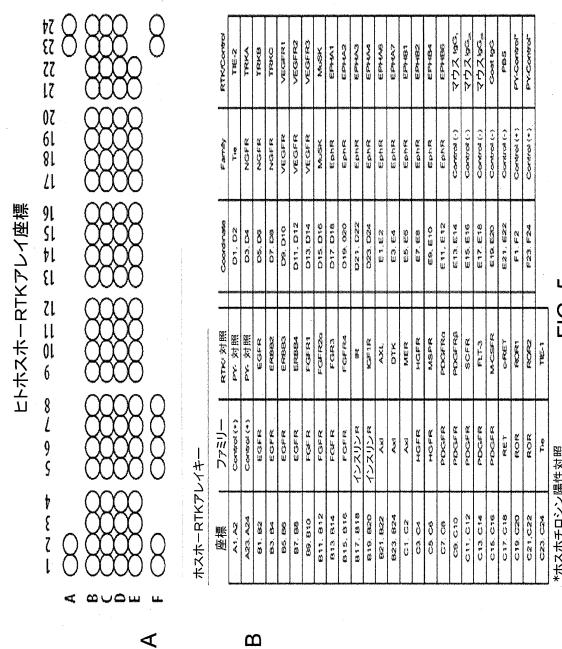


FIG. 5

*ホヌホース-RTKアレイ照

【図 6】

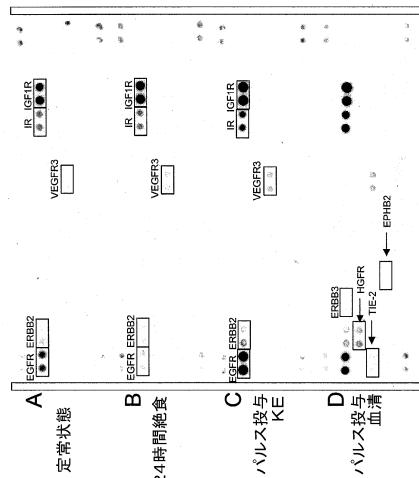


FIG. 6

【図 7 A】

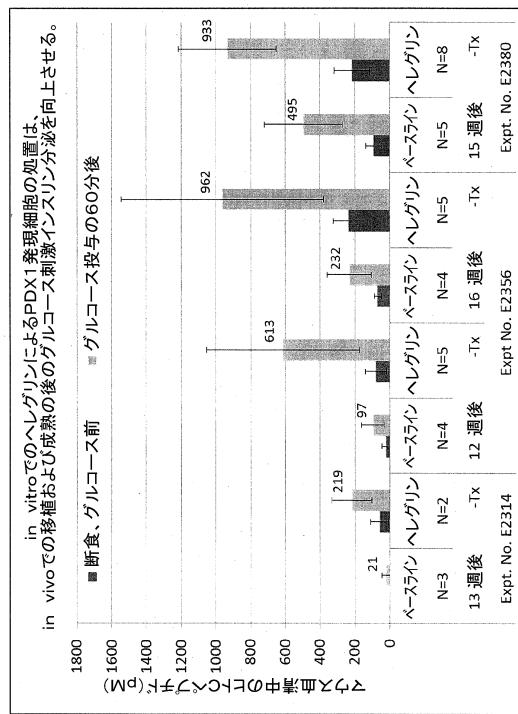


FIG. 7A

【図 7 B】

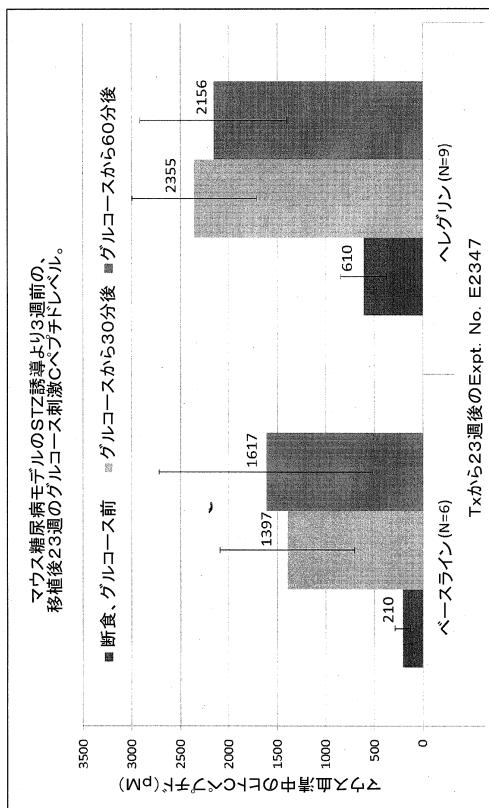


FIG. 7B

【図 7 C】

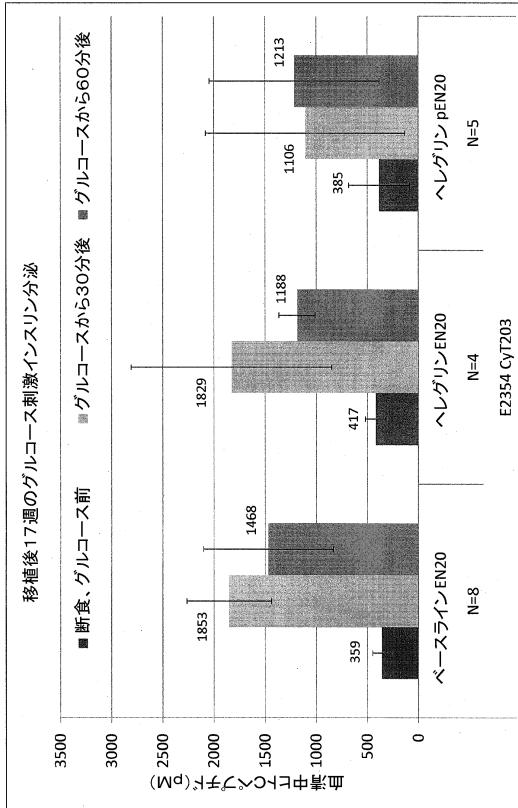


FIG. 7C

【図 8 A】

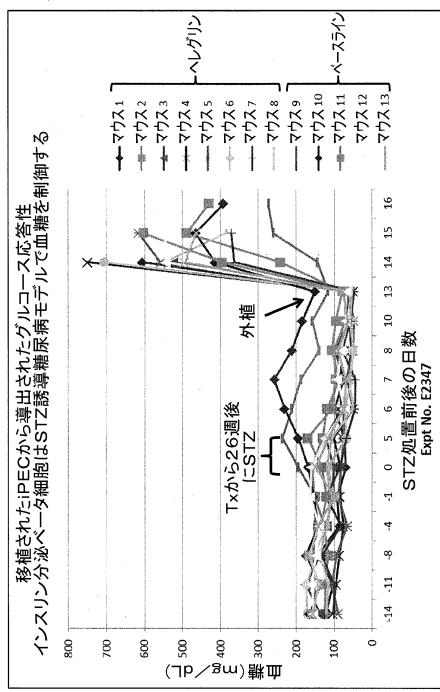


FIG. 8A

【図 8 B】

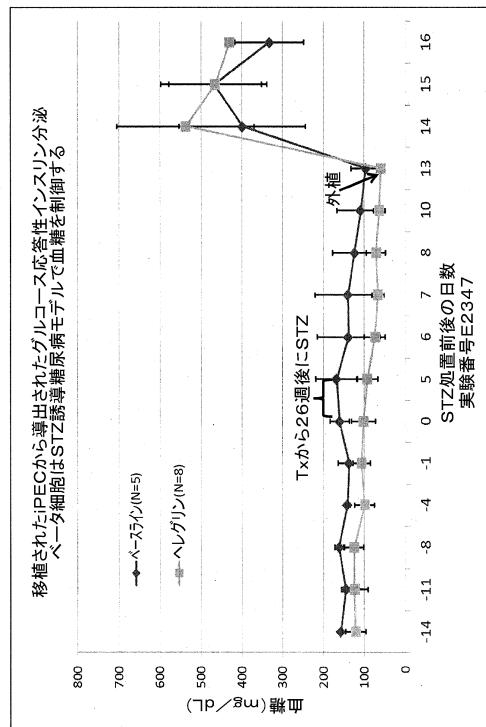


FIG. 8B

【配列表】

0006517702000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07K 14/475 (2006.01) C 07K 14/475

(72)発明者 ケリー、オリビア
アメリカ合衆国 92111 カリフォルニア州 サンディエゴ クイン コート 6921
(72)発明者 オオイ ユキ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラホヤ ギルマン コート 8110
(72)発明者 ロビンス、アラン
アメリカ合衆国 30606 ジョージア州 アセンズ コディ ブラフ 1050
(72)発明者 シュルツ、トーマス
アメリカ合衆国 30605 ジョージア州 アセンズ オーク メドー ドライブ 162

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表2012-525148 (JP, A)
米国特許出願公開第2010/0272695 (US, A1)
Br. J. Cancer, 2004年, Vol. 91, pp. 2034-2041
STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2012年 9月20日, Vol. 21, No. 14, pp. 2642-2655
Diabetologia, 2011年, Vol. 54, pp. 2325-2336
PLoS ONE, 2012年 5月, Vol. 7, Issue 5, e37004(pp. 1-17)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 12N 5 / 071 - 5 / 0735
C 12N 5 / 10
C 12N 15 / 00 - 15 / 90
P u b M e d
D W P I (D e r w e n t I n n o v a t i o n)