(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-500023
(P2020-500023A)
(43)公表日　令和2年1月9日(2020.1.9)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	C	4B029
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	A	4B063
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B065
C12Q	1/686	(2018.01)	C12Q	1/686	Z	4C087
C12Q	1/6869	(2018.01)	C12Q	1/6869	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 39 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-526461 (P2019-526461)
(86)(22)出願日　平成29年11月17日 (2017.11.17)
(85)翻訳文提出日　令和1年6月24日 (2019.6.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/062344
(87)国際公開番号　WO2018/094235
(87)国際公開日　平成30年5月24日 (2018.5.24)
(31)優先権主張番号　62/424,208
(32)優先日　平成28年11月18日 (2016.11.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　518031767
ニュー　ヨーク　ステム　セル　ファウンデーション，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，ニューヨーク州　１００１９，サード　フロア　ニュー　ヨーク，６１９　ウェスト　５４番　ストリート
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイクロ流体システムおよびその使用の方法

(57)【要約】
本発明は、マイクロ流体チップ技術を利用して、細胞を含む患者試料を受け入れ、細胞を増殖させ、増殖させた細胞をリプログラミングし、次いでリプログラミングされた細胞をマイクロ流体チップ中に保存する、統合マイクロ流体システムに関する。リプログラミングされた細胞を保存したこれらのマイクロ流体チップは次いで、特定の細胞型への遺伝的分化の状況で用いられ得る。全体として、このシステムおよびワークフローは、下流での診断用途または治療用途ためにあらゆる患者由来のｉＰＳＣの作製を可能にする、病院ベースの装置として適している。

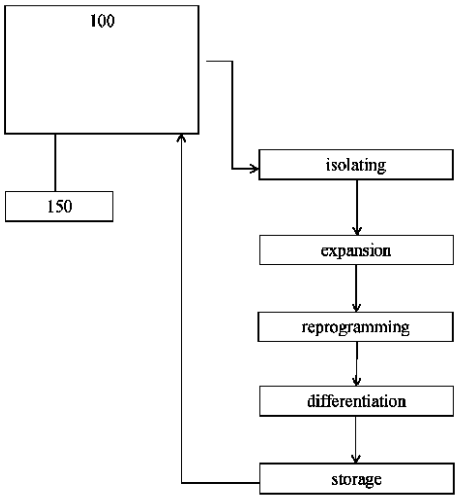


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生物試料を処理するためのマイクロ流体システムであって、
（ａ）該試料を処理するように動作可能な１つまたは複数のマイクロ流体ユニットであって、処理が、
（ｉ）該試料から細胞を単離する工程、
（ｉｉ）任意で、単離された細胞を増殖させて増殖させた細胞の集団を生成する工程、
（ｉｉｉ）単離された細胞または増殖させた細胞をリプログラミングする工程、および
（ｉｖ）（ｉ）、（ｉｉ）、または（ｉｉｉ）の１つまたは複数由来の細胞を保存する工程
を含む、マイクロ流体ユニット；ならびに
（ｂ）処理（ｉ）～（ｉｖ）の１つまたは複数を制御するための指示を含む、１つまたは複数のコンピュータメモリモジュール；ならびに
（ｃ）指示を実行するように構成された、１つまたは複数のコンピュータプロセッサモジュール
を含む、マイクロ流体システム。
【請求項２】
（ｉ）の単離された細胞、（ｉｉ）の増殖させた細胞、（ｉｉｉ）のリプログラミングされた細胞、またはそれらの組み合わせの解析を実施するようにさらに動作可能である、請求項１記載のシステム。
【請求項３】
１つまたは複数のマイクロ流体ユニットが、ｉＰＳＣを分化させて所望の細胞型の細胞を生成するようにさらに動作可能である、請求項１記載のシステム。
【請求項４】
所望の細胞型の細胞に対する解析を実施するようにさらに動作可能である、請求項３記載のシステム。
【請求項５】
所望の細胞型の細胞を保存するようにさらに動作可能である、請求項３記載のシステム。
【請求項６】
単離された細胞が体細胞である、請求項１記載のシステム。
【請求項７】
単離された細胞が白血球である、請求項１記載のシステム。
【請求項８】
前記試料が、全血、血液画分、血清、血漿、尿、汗、リンパ液、糞便、腹水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、創傷ドレナージ液、唾液、滑液、腹水液、骨髄穿刺液、脳脊髄液、鼻汁、羊水、気管支肺胞洗浄液、胸水、末梢血単核球、皮膚細胞、総白血球、リンパ節細胞、脾臓細胞、皮膚生検材料、臍帯血、臍帯組織、および扁桃腺細胞から選択される、請求項１記載のシステム。
【請求項９】
解析が、画像解析、細胞数解析、細胞表面マーカー解析、サイトカイン分泌解析、細胞形態解析、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）解析、配列解析、ＤＮＡ解析、ＲＮＡ解析、遺伝子発現プロファイリング、プロテオーム解析、メタボローム解析、イムノアッセイ、核排除解析、またはそれらの組み合わせを含む、請求項２記載のシステム。
【請求項１０】
細胞を保存する工程が、細胞を凍結することを含む、請求項１記載のシステム。
【請求項１１】
グラフィカルユーザーインターフェースをさらに含む、請求項１記載のシステム。

【請求項１２】
少なくとも２つ、３つ、または４つのマイクロ流体ユニットを含む、請求項１記載のシステム。
【請求項１３】
マイクロ流体ユニットが無線でまたは電気的に連結される、請求項１２記載のシステム。
【請求項１４】
マイクロ流体ユニットが流体連結される、請求項１２記載のシステム。
【請求項１５】
マイクロ流体ユニットが単一収納容器内に配置される、請求項１記載のシステム。
【請求項１６】
細胞がマイクロ流体チップ上に保存される、請求項１記載のシステム。
【請求項１７】
細胞を－８０℃以下で保存するための保存ユニットをさらに含む、請求項１記載のシステム。
【請求項１８】
保存された細胞に関連する試料データを処理および保存するようにさらに動作可能である、請求項１記載のシステム。
【請求項１９】
細胞が、マスター細胞バンクおよび作業用細胞バンクとして保存される、請求項１記載のシステム。
【請求項２０】
細胞をリプログラミングする工程が、細胞を１つまたは複数の核リプログラミング因子と接触させることを含む、請求項１記載のシステム。
【請求項２１】
核リプログラミング因子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または小分子である、請求項２１記載のシステム。
【請求項２２】
分化が、細胞を１つまたは複数の分化因子と接触させることを含む、請求項３記載のシステム。
【請求項２３】
１つまたは複数の分化因子が、ポリペプチド、ベクター無しの遺伝子調節因子オリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、分化因子をコードするメッセンジャーＲＮＡ、または細胞による分化因子の発現に影響を与えるオリゴヌクレオチドである、請求項２２に記載のシステム。
【請求項２４】
生物試料を処理するための方法であって、
（ａ）請求項１～２３のいずれか一項記載のシステムに該試料を適用する工程；ならびに
（ｂ）（ｉ）該試料から細胞を単離すること、
（ｉｉ）任意で、単離された細胞を増殖させて増殖させた細胞の集団を生成すること、
（ｉｉｉ）単離された細胞または増殖させた細胞をリプログラミングすること、および
（ｉｖ）（ｉ）、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）のいずれかからの細胞を保存すること
を含み、それによって生物試料を処理する、該試料をシステムで処理する工程
を含む、方法。
【請求項２５】
リプログラミングされた細胞を分化させて所望の細胞型の細胞を生成する工程をさらに含む、請求項２４記載の方法。

【請求項２６】
（ｉ）の単離された細胞、（ｉｉ）の増殖させた細胞、（ｉｉｉ）のリプログラミングされた細胞、所望の細胞型の細胞、またはそれらの組み合わせを解析する工程をさらに含む、請求項２５記載の方法。
【請求項２７】
解析が、画像解析、細胞数解析、細胞形態解析、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）解析、配列解析、ＤＮＡ解析、ＲＮＡ解析、遺伝子発現プロファイリング、プロテオーム解析、メタボローム解析、イムノアッセイ、核排除解析、またはそれらの組み合わせを含む、請求項２６記載の方法。
【請求項２８】
対象から前記試料を得る工程をさらに含む、請求項２４記載の方法。
【請求項２９】
対象が、疾患または障害を有するか、またはそれらを有するリスクがある、請求項２８記載の方法。
【請求項３０】
システムにより処理した細胞で対象を治療する工程をさらに含む、請求項２９記載の方法。
【請求項３１】
対象が健常な個体である、請求項２８記載の方法。
【請求項３２】
対象が疾患または障害と診断されるまで、前記試料由来の細胞または前記試料から処理した細胞を保存する工程をさらに含む、請求項３０記載の方法。
【請求項３３】
保存された細胞を利用して、疾患または障害を治療する工程をさらに含む、請求項３２記載の方法。
【請求項３４】
対象において疾患または障害を治療する方法であって、
（ａ）対象から試料を得る工程；
（ｂ）請求項１～２３のいずれか一項記載システムに該試料を適用する工程；
（ｃ）（ｉ）該試料から細胞を単離すること、
（ｉｉ）任意で、単離された細胞を増殖させて増殖させた細胞の集団を生成すること、
（ｉｉｉ）単離された細胞または増殖させた細胞をリプログラミングすること、
（ｉｖ）リプログラミングされた細胞を所望の細胞型に分化させること、および
（ｖ）（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、または（ｉｖ）のいずれか由来の細胞を保存すること
含む、該試料をシステムで処理する工程；ならびに
（ｄ）（ｉ）～（ｖ）のいずれかの細胞を対象に投与し、それによって対象において疾患または障害を治療する工程
を含む、方法。
【請求項３５】
（ｉ）の単離された細胞、（ｉｉ）の増殖させた細胞、（ｉｉｉ）のリプログラミングされた細胞、所望の細胞型の細胞、またはそれらの組み合わせを解析する工程をさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項３６】
解析が、画像解析、細胞数解析、細胞形態解析、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）解析、配列解析、ＤＮＡ解析、ＲＮＡ解析、遺伝子発現プロファイリング、プロテオーム解析、メタボローム解析、イムノアッセイ、核排除解析、またはそれらの組み合わせを含む、請求項３５記載の方法。
【請求項３７】

対象において疾患または障害を診断する工程をさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項３８】
請求項１～２３のいずれか一項記載のシステムによって処理された細胞、またはその細胞画分を含む、薬学的組成物。
【請求項３９】
請求項１～２３のいずれか一項記載のシステムによって処理された細胞の１つまたは複数の集団を含む、細胞バンク。
【請求項４０】
各集団が異なる試料に由来する、請求項３９記載の細胞バンク。
【請求項４１】
第２の装置と動作可能に連動された、少なくとも１つ、２つ、３つ、または４つのマイクロ流体ユニットを含む、請求項１記載のシステム。
【請求項４２】
第２の装置が、細胞培養装置、バイオリアクター、診断装置、画像装置、配列決定装置、核酸増幅装置、核酸もしくはタンパク質単離装置、ゲノム解析装置、細胞単離装置、細胞分画装置、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項４１記載のシステム。
【請求項４３】
第２のシステムが、（ｉ）～（ｉｖ）の１つまたは複数を実施するように動作可能な非マイクロ流体装置である、請求項４１記載のシステム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
本出願は、２０１６年１１月１８日に出願された米国特許出願第６２／４２４，２０８号の３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）に基づく優先権の恩典を主張し、該出願の全内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
発明の分野
本発明は概して、マイクロ流体装置の分野に関し、より具体的には、細胞をリプログラミングし、増殖させ、保存し、かつ任意で分化させるためのマイクロ流体システムおよび方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
背景情報
マイクロ流体システムは、医療診断およびバイオテクノロジー研究において重要である。そのようなシステムの構成部品には、非常に小さなウェルおよびチャネルのネットワークが含まれ、それらを通じて、液体が、高精度に制御された量の化学物質、細胞、および分子を送達し、組み合わせることができる。システムは、試薬の混合、バイオ分子の単離および試験、ならびに生細胞の隔離および選別を含む、多様な作業に用いられる。必要とされる高精度な移動、混合、および正確な計測を達成するために、マイクロ流体チップおよび基体は、チップ内に組み込まれるマイクロバルブおよびポンプ、ならびに空気圧式アクチュエータ、電子ソレノイド、空気圧式アクチュエータ、ロボット制御装置、ならびにそれらの装置を制御するのに必要とされる複合コンピュータプログラムおよびシステムなど、複合制御機構を必要とする。
【０００４】
マイクロ流体装置の使用は、標準的なベンチトップ型の方法に対して、例えば無類の量産効果ならびに高度の並列化および統合を含む、多数の利点をもたらす。技術の進歩に伴って、マイクロ流体装置は、大きさがますます小さくなり、ますます複数の作業を実施できるようになる。例えば、マイクロ流体アプローチは、細胞の分離および単離、細胞培養、細胞分化、ならびに細胞リプログラミング因子のスクリーニングに対して別個に提案さ

れている。

【０００５】

幹細胞は、長期間にわたり、細胞分裂を介して自己再生する性質の特定されていない細胞であり、特定の機能をもった細胞、つまり分化細胞へと誘導可能な細胞である。このような性質によって幹細胞は、様々な病状で損傷をうけた細胞や組織を取り替えるための治療で応用するのに大いに将来性がある。胚性幹（ＥＳ）細胞は初期胚の胚盤胞に由来し、内胚葉、外胚葉、および中胚葉（三胚葉）へと発生する能力を有する（つまり、ＥＳは「多能性」である）。インビトロでＥＳ細胞は、自発的に様々な種類の組織に分化する傾向にあり、それらの分化方向を制御するのは難しい場合がある。ヒトＥＳ細胞を回収するために胚の破壊に関連する倫理的な問題は未だ解決しておらず、これらの問題は研究および治療への応用に対する利用可能性を制限している。

【０００６】

成体幹（ＡＳ）細胞は分化した組織中に見られる。成体組織から得られた幹細胞は通常、より限定された範囲の細胞を形成する能力（つまり、「多分化能性」）を有し、典型的には、それらが見られた組織の細胞型にしか分化しないが、最近の報告では、特定の種類のＡＳ細胞には、一定の可塑性があることを示している。また、その増殖能も概して限定的である。

【０００７】

人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、分化した成体細胞から実験的な手法によって作製される。ｉＰＳＣは重要なツール、例えば医学研究を実施するのに重要なツールであると広く認識されている。これまでのｉＰＳＣ作製技術は時間がかかり、労働集約的である。分化した成体細胞、例えば、線維芽細胞をリプログラミングし、培養して、単一のクローンを構成する個々のコロニーを形成させる。今までは、これらの細胞型を同定することが非常に難しかった。なぜならば、細胞の大部分が完全にはリプログラミングされていないｉＰＳＣのクローンだったからである。ｉＰＳＣのクローンに関しては、細胞質に対して核の比率が高い細胞を含む、境界のはっきりとした所望のコロニーを、細胞の形態に基づいて選択するのが標準的である。クローンを同定したら、非常に薄いガラス製の道具を使ってそれらを手動で取り出し、そして、細胞の「フィーダー」層、一般的には、マウスの胚性線維芽細胞（ＭＥＦ）上で培養する。この工程は通常、リプログラミングベクターを導入した１４～２１日後に行われる。その後、クローンをさらに１４～２１日間、またはそれ以上の期間増殖させ、その後、分子的な解析を行う。

【０００８】

他の研究者らは、完全にリプログラミングされた成体線維芽細胞とその下流の分化能を迅速かつより正確に同定および解析するための技術の開発に焦点を当てている（Ｂｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｃｅｌｌ １４４：４３９－４５２（非特許文献１）；Ｂｏｕｌｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２９：２７９－２８６（非特許文献２））。例えば、２０１１年６月１３日に出願され、同定のための蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）の使用と、表面タンパク質のユニークな発現パターンによって特定されたユニークな小集団のその場での選別について記載している、共有の米国特許第１３／１５９，０３０号（特許文献１）も参照のこと。

【０００９】

したがって、幹細胞は、治療への応用、医学研究、薬学的試験などにとって魅力的な細胞の供給源である。患者特異的幹細胞およびリプログラミングされた体細胞の使用は、いくつか例を挙げると、癌および神経疾患の治療などの複数の医療的治療にとって極めて望ましい、免疫学的に適合性を有する細胞置換戦略になる。しかしながら、当技術分野において、最初の患者の血液の処理から患者特異的幹細胞およびリプログラミングされた体細胞を用いる同じ患者の個別化治療までを行う自動化された迅速なアプローチを用いて複数の作業を実施する統合アプローチを利用して、患者特異的な細胞を処理するための改良されたマイクロ流体装置および方法に対する、長期にわたるニーズが依然として残されている。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】米国特許第１３／１５９，０３０号
【非特許文献】
【００１１】
【非特許文献１】Ｂｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｃｅｌｌ １４４：４３９－４５２
【非特許文献２】Ｂｏｕｌｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ ｎｏｌ ２９：２７９－２８６
【発明の概要】
【００１２】
本発明は、時間および費用効率のよいワークフローを研究室および／または医療ベースの環境に提供するために、生物試料を処理するシステムを利用するマイクロ流体ベースのシステムおよび方法を提供する。ワークフロー全体は、患者特異的治療を提供する能力を有する。
【００１３】
したがって、一態様において、生物試料を処理するためのマイクロ流体システムが提供される。システムは、いくつかの試料を処理する工程を実施するように動作可能な１つまたは複数のマイクロ流体ユニットを含み、これにより試料からの細胞または試料に由来する細胞が、保存され、カタログ化され、最終的には試料を採取した患者を治療するために利用することができる。マイクロ流体ユニットは、試料から細胞を単離し、単離された細胞を増殖させ、該細胞をリプログラミングするように動作可能である。システムはまた、リプログラミングされた細胞を患者の治療に使用するのに望ましい細胞型へと分化させるマイクロ流体機能性も含む。処理の任意の点において、システムは、細胞を保存およびカタログ化するための機能性を含む。加えて、システムは、処理の任意の段階で細胞の分析を行い、細胞の定性的および定量的評価を行うように動作可能である。
【００１４】
実施形態において、システムは、処理機能を制御するための指示を含む１つまたは複数のコンピュータメモリモジュールを、指示を実行するように構成された１つまたは複数のコンピュータプロセッサモジュールと共に含む。
【００１５】
別の態様では、本発明は、本開示のマイクロ流体ベースのシステムを利用して生物試料を処理するための方法を提供する。方法は、該試料をシステムに適用する工程、および該試料に対して処理工程を実施して、リプログラミングされた細胞および／またはリプログラミングされた細胞に由来する所望の細胞型の細胞を生成する工程を含む。
【００１６】
別の態様では、本発明は、本開示のマイクロ流体ベースのシステムを利用して対象において疾患または障害を治療する方法を提供する。方法は、（ａ）対象から試料を得る工程；（ｂ）システムに試料を適用する工程；（ｃ）試料をシステムで処理する工程；および（ｄ）対象に処理された細胞を投与し、それによって対象において疾患または障害を治療する工程を含む。
【００１７】
さらに別の態様では、本発明は、マイクロ流体システムによって処理された細胞またはその細胞性画分を含み、薬学的に許容される賦形剤を任意で含む、薬学的組成物を提供する。
【００１８】
なお一層別の態様では、本発明は細胞バンクを提供する。細胞バンクは、本開示のシステムによって処理される細胞の１つまたは複数の集団を含む。実施形態において、各細胞集団は、将来の使用に適切な温度でカタログ化および保存される。

【図面の簡単な説明】
【００１９】
【図１】本発明の一実施形態におけるマイクロ流体システムの概略図である。
【図２】本発明の一実施形態におけるマイクロ流体システムの概略図である。
【図３】本発明の一実施形態における線維芽細胞バンクを獲得するための工程を示す。
【図４】本発明の一実施形態における線維芽細胞バンクから幹細胞アレイを得るための工程を示す。
【図５】本発明の一実施形態におけるｉＰＳＣを生成するためのシステムにおける工程を示すフローチャートである。
【図６Ａ】本発明の一実施形態における自動化されたリプログラミング処理の間の、マルチウェル組織培養プレートを介した、患者試料のフローの例を示す。
【図６Ｂ－１】本発明の一実施形態における自動化されたリプログラミング処理の間の、マルチウェル組織培養プレートを介した、患者試料のフローの例を示す。
【図６Ｂ－２】本発明の一実施形態における自動化されたリプログラミング処理の間の、マルチウェル組織培養プレートを介した、患者試料のフローの例を示す。
【図６Ｃ】本発明の一実施形態における自動化されたリプログラミング処理の間の、マルチウェル組織培養プレートを介した、患者試料のフローの例を示す。
【図７Ａ】本発明の一実施形態におけるワークフローを達成するための機器構成の例を示す。
【図７Ｂ】本発明の一実施形態におけるワークフローを達成するための機器構成の例を示す。
【図７Ｃ】本発明の一実施形態におけるワークフローを達成するための機器構成の例を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
詳細な説明
本発明は、マイクロ流体チップ技術を利用して、患者試料を処理し、患者特異的なリプログラミングされた細胞および任意でリプログラミングされた細胞由来の特定の細胞型の分化した細胞を作製する、統合マイクロ流体システムを提供する。本発明のシステムは、標準化されたｉＰＳＣ株を作製する効率および再現性を大幅に向上させる。典型的には、研究者は手作業でｉＰＳＣを作製しており、このことは、研究者間のばらつきがあることおよび多量の細胞を作製できないことから、該細胞の有用性を限定する。システムは、組織または細胞試料の受け取りから明確に定義されたｉＰＳＣ株のストックのバンク作製まで完全に自動化したシステムによりこれらの課題を回避する。システムは、多数のドナーからの大量な細胞の作製で一貫性および不変性を可能にし、これはｉＰＳＣ技術の使用を促進する。
【００２１】
システムは、１つまたは複数の個別のマイクロ流体チップの形態であってもよい、１つまたは複数のマイクロ流体ユニットを利用して、試料を処理し、リプログラミングされた細胞を作製し、その後の回収および分化のためにマイクロ流体チップ（収容（ｈｏｔｅｌｉｎｇ））形式で該細胞を保持する。次いで、分化および増殖を実施して、所望の細胞型の細胞を作製する。全体として、ワークフローの方法論およびシステムは、下流の診断用途または治療用途でのあらゆる患者からの多能性細胞の作製を可能にする、研究室または病院ベースのシステムとして理想的である。
【００２２】
本組成物および方法を記載する前に、この発明は、記載される特定の組成物、方法、および実験条件に限定されるものではなく、そのような組成物、方法、および条件は変わってもよいことが理解されるべきである。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲においてのみ限定されることから、本明細書において用いられる用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図しないことも理解されるべきである。

【００２３】
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」には、別段の明確な指示がない限り、複数形の記載が含まれる。よって、例えば、「その（ｔｈｅ）方法」への言及には、本開示などを読んだ当業者に明らかになるであろう本明細書において記載されるタイプの１つまたは複数の方法および／または工程が含まれる。
【００２４】
他で定義されていない限り、本明細書において使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する分野における当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似のまたは同等の任意の方法および材料が、本発明の実施または試験において用いることができるが、好ましい方法および材料が本明細書において記載される。
【００２５】
本開示は、生物試料を処理するためのマイクロ流体システムを提供する。システムは、いくつかの試料処理工程を実施するように動作可能な１つまたは複数のマイクロ流体ユニットを含み、これにより、試料からの細胞またはｉＰＳＣなどの試料に由来する細胞を、保存し、カタログ化し、最終的には細胞を採取した患者を治療するのに利用することができる。実施形態において、患者試料から単離された成体細胞から作製されたｉＰＳＣは、患者を治療するための使用に適した所望の細胞型に分化される。
【００２６】
本明細書で使用する場合「成体」は、胎生期以降、つまり、新生児期からその生命の終わりまでの間にいる生物を意味し、例えば、分娩後の胎盤組織、羊水および／または臍帯血から得られた細胞が含まれる。
【００２７】
本明細書で使用する場合「成体分化細胞」という用語は、ある生物の成体から得られ、本発明で記載の自動化されたシステムを使ったｉＰＳＣの作製を受け入れることができる、広い範囲の分化した細胞型を包含する。この成体分化細胞は「線維芽細胞」であることが好ましい。線維芽細胞（より活性の低い形態では「線維細胞」とも呼ばれる）は、間葉に由来する。それらの機能には、細胞外マトリックス成分の前駆体、例えばコラーゲンの分泌がある。組織学的には、線維芽細胞は高度に枝分かれした細胞であるが、線維細胞は一般に、より小さく、紡錘型であると記載されることが多い。いかなる組織由来の線維芽細胞と線維細胞も、本発明において、自動化されたワークフローシステムの出発材料として使用することができる。
【００２８】
本明細書で使用する場合「人工多能性幹細胞」、つまりｉＰＳＣという用語は、その幹細胞が、誘導されたまたは変化した、つまり、リプログラミングされた分化成体細胞から、三胚葉、つまり、中胚葉、内胚葉、および外胚葉の全ての組織に分化可能な細胞へと作製されたものであることを意味する。作製されたｉＰＳＣとは、それらが、自然に見られる細胞ではないことを意味する。
【００２９】
本発明において有用な哺乳類の体細胞としては、例としてではあるが、成体幹細胞、セルトリ細胞、内皮細胞、顆粒上皮細胞、ニューロン、膵島細胞、表皮細胞、上皮細胞、肝細胞、毛包細胞、角化細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球（ＢおよびＴリンパ球）、赤血球、マクロファージ、単球、単核細胞、線維芽細胞、心筋細胞、他の既知の筋細胞、および基本的に、全ての生きている体細胞が挙げられる。特定の実施形態では、線維芽細胞が使用される。本明細書で使用する場合、体細胞という用語は、成体幹細胞を含むことも意図する。成体幹細胞とは、特定の組織の全ての細胞型を生じることが可能な細胞である。成体幹細胞の例としては、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉幹細胞が挙げられる。
【００３０】

本発明の利点の一つとしては、移植、創薬アッセイ、または疾患モデリングでの使用に適した同質遺伝的な、つまり同一遺伝子のヒト細胞を、本質的に制限なく供給できるということが挙げられる。ｉＰＳＣは、免疫拒絶を回避しながら、患者に特異的に合わせられる。そのため、現行の移植方法に伴う重大な問題、例えば、宿主対移植片または移植片対宿主拒絶によって生じ得る、移植した組織に対する拒絶反応が、ｉＰＳＣによって取り除かれる。創薬に用いる場合、この細胞は、創薬に用いる場合にそれぞれの患者の化学物質に対する反応、または疾患モデルにおける個々の患者の疾患症状を示す。ｉＰＳＣのうちの数種、またはヒト由来の体細胞から誘導したｉＰＳＣから調製した完全に分化した体細胞は、細胞のライブラリーとして、ｉＰＳＣバンクで保管することができ、また、そのライブラリー中の１種または複数種のｉＰＳＣを使用して、幹細胞治療を受ける患者による拒絶反応を生じない体細胞、組織、または臓器を調製することができる。

【００３１】

本発明のｉＰＳＣを、いくつかの異なる細胞型に分化させて、当該分野において知られている方法により、様々な障害を治療してもよい。例えば、ｉＰＳＣを誘導して、造血幹細胞、筋細胞、心筋細胞、肝細胞、軟骨細胞、上皮細胞、尿路細胞、ニューロン細胞などに分化させてもよい。次いで分化細胞を、病状の予防または治療のために、患者の体内に移植して戻すか、あるいは、先進的な医学研究または創薬アッセイに使用してもよい。従って、本発明の方法を、特定の細胞型／組織の増強もしくは置換、または細胞の脱分化が望まれる、心筋梗塞、うっ血性心不全、脳卒中／発作、虚血、末梢血管病、アルコール性肝疾患、肝硬変、パーキンソン病、アルツハイマー病、糖尿病、癌、関節炎、創傷治癒、免疫不全、再生不良性貧血、貧血、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、リソソーム蓄積病、多発性硬化症、脊髄損傷、遺伝性障害、および同様の疾患を患っている対象の治療として、または治療法の開発に使用することができる。

【００３２】

「全能性」という用語は、成体内の全ての細胞、ならびに胚体外組織、例えば胎盤を作製する発生能を有する細胞を指す。受精卵（接合体）は、桑実胚（受精後、１６細胞期まで）の細胞（割球）と同様に、全能性である。

【００３３】

本明細書で使用する場合「多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）」という用語は、分化条件で、全三胚葉、つまり、内胚葉（例えば、消化管組織）、中胚葉（血液、筋肉、および血管など）、および外胚葉（例えば皮膚や神経）の特徴を示す細胞型に分化する発生能を有する細胞を指す。多能性細胞の発生能は全能性細胞のものよりも低い。全三胚葉に分化する細胞の能力は、例えば、ヌードマウスのテラトーマ形成アッセイで決定することができる。いくつかの実施形態では、多能性の証拠は、胚性幹（ＥＳ）細胞マーカーの発現でも確認することができるが、細胞または本明細書に記載の組成物および方法を使用して生成した細胞集団の多能性に関する好ましい試験は、その細胞が三胚葉のそれぞれの細胞に分化する発生能を有することを実証することである。いくつかの実施形態では、多能性細胞を、「未分化細胞」と命名する。従って、「多能性」または「多能性状態」という用語は、本明細書で使用する場合、細胞が全三胚葉（内胚葉、中胚葉および外胚葉）に分化するための能力をもたらす、細胞の発生能を指す。当業者であれば、所与の細胞型を生じる胚葉または細胞系列を認識する。多能性状態にある細胞は、典型的には、長期間にわたって、例えば１年を超えて、または３０回を超える継代の間にわたって、インビトロで分裂する能力を有する。

【００３４】

「多分化能性細胞」の参照に関して使用される「多分化能性（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ）」という用語は、３つ全てではなく、１つまたは複数の胚葉の細胞に分化する発生能を有する細胞を指す。従って多分化能細胞は、「部分的に分化した細胞」と言うこともできる。多分化能細胞は当該分野において良く知られており、多分化能性細胞の例としては、成体幹細胞、例えば、造血幹細胞および神経幹細胞が挙げられる。「多分化能性」とは、ある細胞が、所与の細胞系列（他の細胞系列ではなく）の、多くの型の細胞を形成し得る

ことを示している。例えば、多分化能性の造血細胞は、多くの異なる型の血液細胞（赤、白、血小板など）を形成することができるが、ニューロンを形成することはできない。従って「多分化能性」という用語は、全能性および多能性未満の、一定の範囲の発生能を有する細胞の状態を指す。

【００３５】

本明細書で使用する場合「幹細胞」または「未分化細胞」という用語は、自己再生する特徴と、複数の細胞型に分化する発生能を有するが、その発生能に関して特定の意味（つまり、全能性、多能性、多分化能性など）を持たない未分化または部分的に分化した状態にある細胞を指す。幹細胞は、その発生能を維持しながら、増殖可能であり、かつより多くのそのような幹細胞を生じることができる。原理的には、自己再生は２つの主要なメカニズムのいずれかによって起こり得る。幹細胞は非対照に分裂する場合があり、これは、不可避の非対照分化として知られている。この場合、娘細胞の１つは親幹細胞の発生能を保持し、もう一方の娘細胞は、他のいくつかの個別の特定の機能、表現型および／または親細胞由来の発生能を示す。娘細胞自体を誘導して増殖させ、後代を生成することができ、これがその後、親由来の発生能を有する細胞を１つまたは複数維持しながら、１つまたは複数の成熟した細胞型へと分化する。分化細胞は多分化能性細胞に由来し得、多分化能細胞自体は多分化能性細胞などから由来する。このような多分化能性細胞はそれぞれ、幹細胞と見なすことができ、それら幹細胞のそれぞれが生じ得る細胞型の範囲、つまり発生能は、相当に多様になる可能性がある。あるいは、ある集団の幹細胞の一部は対称的に２つの幹細胞に分裂する場合があり、これは確率論的な分化として知られている。その場合、その集団に含まれる幹細胞の一部は完全に維持され、他の細胞は分化した後代のみを生じる。従って、「幹細胞」という用語は、特定の環境では、より特化したまたは分化した表現型に分化する発生能を有し、かつ、特定の環境では、実質的に分化せずに増殖する能力を保持した細胞の小集団を指す。いくつかの実施形態において幹細胞という用語は、一般に、その子孫（後代細胞）が分化によって、例えば、胚性細胞および組織の進行性の多様化で生じるような、個々の特徴を完全に獲得することによって、多くは異なる方向に特殊化している天然に存在する親細胞を指す。一部の分化細胞は、高い発生能を有する細胞を生じる能力ももつ。そのような能力は、天然のものである場合も、または様々な因子を処理することで人工的に誘導されたものである場合もある。幹細胞として生じた細胞は、分化した表現型に向かって進んでいくかも知れないが、「逆方向に」誘導し、幹細胞の表現型を再び発現させることができ、当業者には、「脱分化」または「リプログラミング」または「逆分化（ｒｅｔｒｏｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）」と呼ばれることが多い。

【００３６】

本明細書で使用する場合「胚性幹細胞」という用語は、天然に存在する、胚盤胞の内部細胞塊の多能性幹細胞を指す（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第５，８４３，７８０号；同第６，２００，８０６号；同第７，０２９，９１３号；同第７，５８４，４７９号を参照のこと）。そのような細胞は同様に、体細胞核移植に由来する胚盤胞の内部細胞塊から得ることができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第５，９４５，５７７号、同第５，９９４，６１９号、同第６，２３５，９７０号を参照のこと）。胚性幹細胞は多能性であり、発生する間に、三つの一次胚葉全て（外胚葉、内胚葉および中胚葉）の誘導体を生じる。言い換えれば、胚性幹細胞は、特定の細胞型に所与の十分かつ必須の刺激を与えた場合、成体の２００を上回る細胞型のそれぞれに発生することができる。胚性幹細胞は胚体外膜つまり胎盤には寄与せず、すなわち全能性ではない。

【００３７】

本明細書で使用する場合、胚性幹細胞に特徴的な性質を、「胚性幹細胞表現型」と定義する。従って、ある細胞が、胚性幹細胞表現型をもたない他の細胞から区別できる胚性幹細胞に固有の性質を１つまたは複数有する場合、その細胞は胚性幹細胞の表現型を有する。特徴的な胚性幹細胞の表現型の性質の例としては、特定の細胞表面または細胞内マーカ

ー（タンパク質およびマイクロＲＮＡを含む）の発現、遺伝子発現プロファイル、メチル化のプロファイル、脱アセチル化のプロファイル、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件への応答性などが挙げられるがこれらには限定されない。いくつかの実施形態では、その細胞が「胚性幹細胞表現型」を有しているか否かの決定は、その細胞の１つまたは複数の特徴を、同じ実験室内で培養した胚性幹細胞株の１つまたは複数の特徴と比較することで行われる。

【００３８】

本明細書で使用される「体性幹細胞」という用語は、胚以外の組織、例えば胎性、若齢、および成体の組織に由来する、任意の多能性または多分化能性幹細胞を指す。天然の体性幹細胞は、血液、骨髄、脳、嗅上皮、皮膚、膵臓、骨格筋、および心筋を含む様々な成体組織から単離されている。これらの体性幹細胞はそれぞれ、遺伝子発現、因子応答性、および培養中での形態によって特徴付けることができる。天然に存在する体性幹細胞の例としては、神経幹細胞、神経堤幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、および膵臓幹細胞が挙げられるがこれらには限定されない。本明細書に記載のいくつかの態様では、「体性多能性細胞」とは、本明細書に記載の組成物および方法を使用して、１つまたは複数のリプログラミング因子と接触させる、または１つまたは複数のリプログラミング因子を誘導することで、その発生能を変化させた、つまり多能性の状態まで発生能を高めた体細胞、またはその体細胞の後代を指す。

【００３９】

本明細書で使用する「前駆細胞」という用語は、高い発生能をもつ細胞を、つまり、分化によって生じ得る細胞よりも、より原始的な（例えば、発生経路または進行のより初期の工程にある）細胞の表現型を有する細胞を指す。前駆細胞は有意なまたは非常に高い増殖能を有することが多い。前駆細胞は、発生経路や、その細胞が発生・分化する環境に応じて、より低い発生能をもつ複数の個別の細胞、つまり分化した細胞型を生じるか、または、単一の分化した細胞型を生じる可能性がある。

【００４０】

本明細書で使用する場合「体細胞」という用語は、生殖細胞、着床前の胚に存在する細胞もしくは着床前胚から得られた細胞、またはそのような細胞のインビトロでの増殖によって生じた細胞以外の全ての細胞を指す。言い換えると、体細胞とは、生殖系列細胞の対語として、生物の体を形成する全ての細胞を指す。哺乳類では、生殖系列細胞（「配偶子」としても知られている）は精子と卵子であり、これらは受精の間に融合して、接合体と呼ばれる細胞を生成する。哺乳類の胚全体は、この接合体から発生する。哺乳類の体内にある他のそれぞれの細胞型（精子と卵子、それらが作られる細胞（生殖母細胞）、および未分化で多能性の胚性幹細胞以外）が、体細胞（内部の器官、皮膚、骨、血液、および体細胞から作られている結合組織）である。いくつかの実施形態において体細胞は、「非胚性体細胞」であり、これは、その体細胞が胚には存在しない、または胚から得られた細胞ではないこと、および、胚細胞のインビトロでの増殖によって生じたものではないことを意味している。いくつかの実施形態において体細胞は「成体体細胞」であり、これは、その細胞が胚または胎児以外の器官に存在する、または胚もしくは胎児以外の器官から得られた細胞であること、あるいは、そのような細胞のインビトロでの増殖によって生じたものであることを意味している。別段の指定のない限り、体細胞をリプログラミングするための本明細書に記載の組成物および方法は、インビボおよびインビトロの両方で実施することができる（この場合、インビボでは、体細胞は対象の体内に存在して実施され、インビトロでは、培養において維持されている単離された体細胞を用いて実施される）。

【００４１】

「分化細胞」という用語は、本明細書では、その天然の形態において、多能性でない全ての体細胞を包含すると定義される。従って、「分化細胞」という用語は、部分的に分化した細胞、例えば多分化能性細胞もしくは安定で多能性でない部分的にリプログラミングされた細胞、または本明細書に記載の組成物および方法のいずれかを使用して作製した部分的に分化した細胞も、包含する。いくつかの実施形態では、分化細胞は、安定で中間的

な細胞、例えば、多能性でなく、部分的にリプログラミングされた細胞である。培養中に多数の初代細胞を置くことによって、完全に分化した特徴のいくつかが失われる可能性があることに留意されたい。従って、そのような分化細胞または体細胞を単に培養するだけでは、これらの細胞は、非分化細胞（例えば未分化細胞）または多能性細胞にはならない。分化細胞（安定で多能性でない、部分的にリプログラミングされた細胞の中間体を含む）の多能性への移行には、培養に置いた際に部分的に分化した性質の消失を誘導する刺激を超える、リプログラミング刺激が必要である。リプログラミングされた細胞は、いくつかの実施形態では部分的にリプログラミングされた細胞は、発生能がより低く、通常、限られた回数の分裂しかできない親細胞と比較して、成長能を失うこと無く、長期間にわたって継代し続けられるという特徴も有する。いくつかの実施形態において「分化細胞」という用語は、その細胞が細胞分化過程におかれている場合には、あまり特殊化していない細胞型（つまり、発生能が高い細胞型）（例えば、未分化細胞またはリプログラミングされた細胞）に由来する、より特殊化した細胞型（つまり、発生能の低い細胞型）も指す。

【００４２】

種々の実施形態において、システムは、定方向性ワークフローにおいて一連の処理を実施するよう構成される。システムによって実施される処理は、細胞を単離すること、単離された細胞を増殖させること、増殖させた細胞をリプログラミングすること、リプログラミングされた細胞を所望の細胞型に分化させること、および細胞を保存することを含む。

【００４３】

様々な実施形態において、システムは生物試料から細胞を単離するように構成される。これは、特定の細胞型の分離および単離を含む。実施形態において、生物試料は予め単離された細胞を含んでもよく、この場合には、単離工程を実施する必要はない。マイクロ流体を用いて実施される単離技術および／または分離技術は当技術分野において公知であり、本発明の実施において利用され得る。そのような技術には、これらに限定されないが、細胞の捕獲および分離の方法論が含まれる。

【００４４】

「生物試料」は、インタクトな細胞を含む、患者または対象から採取された生物材料の試料である。生物試料には、体液および組織（例えば、生検材料由来）または組織調製物（例えば、組織切片、ホモジネート等）から採取される試料が含まれる。「体液」は、本発明による使用に適した対象から得られたまたは対象に由来する任意の液体である。そのような液体には、全血、血液画分、例えば、血清および血漿、尿、汗、リンパ液、糞便、腹水、精液、痰、乳頭吸引液、術後漿液腫、創傷ドレナージ液、唾液、滑液、腹水液、骨髄穿刺液、脳脊髄液、鼻汁、羊水、気管支肺胞洗浄液、胸水、末梢血単核球、総白血球、リンパ節細胞、脾臓細胞、ならびに扁桃腺細胞が含まれる。実施形態では、試料は白血球を含むか、または単離された白血球の試料である。

【００４５】

本明細書で用いられる場合「単離された細胞」という用語は、その細胞が本来見出された生物から取り出されている細胞、またはそのような細胞の子孫を指す。任意で、細胞は、例えば他の細胞の存在下で、インビトロで培養されている。任意で、細胞はその後、第二の生物に導入されるか、またはそれを単離したもとの生物（またはそれの由来となった細胞もしくは細胞集団）に再導入される。

【００４６】

本明細書で使用する場合、単離された細胞集団に関する「単離された集団」という用語は、混合されたまたは不均一な細胞集団から取り出され、分離されている細胞の集団を指す。いくつかの実施形態において、単離された集団は、その細胞を単離または濃縮したもとの不均一な集団と比較して「実質的に純粋」な細胞集団である。いくつかの実施形態において、単離された集団は、その多能性細胞の由来である体細胞の不均一な集団と比較して、実質的に純粋な多能性細胞の集団を含む、単離された多能性細胞の集団である。

【００４７】

様々な実施形態において、システムはまた、試料から単離された細胞を利用して細胞増

殖工程を実施するようにも構成される。これは、下流の処理を実施するのに十分な数の細胞が存在することを確実にする。

【００４８】

細胞を増殖させた後に、システムは、増殖させた細胞をリプログラミングする、例えば、ｉＰＳＣを作製する機能性を含む。本明細書で使用する場合「リプログラミング」という用語は、細胞または細胞集団（例えば、体細胞）の発生能を、反転させる過程を指す。言い換えると、リプログラミングとは、細胞がより高い発生能の状態になるように誘導する過程を、つまり、より未分化な状態へと戻す過程を指す。リプログラミングする細胞は、リプログラミングの前には、部分的に分化したまたは完全に分化した細胞のいずれであってもよい。本明細書に記載の態様のいくつかの実施形態では、リプログラミングとは、分化した状態が、多能性の状態に完全にまたは部分的に逆転すること、つまり、細胞の発生能が高まることを包含する。いくつかの実施形態では、リプログラミングとは、その細胞が胚性幹細胞の同等の発生能を有するように、つまり、胚性幹細胞の表現型を示すように、体細胞を多能性の状態に誘導することを包含する。いくつかの実施形態においてリプログラミングは、細胞の分化した状態の部分的な逆転または発生能の部分的な向上、例えば体細胞または単能性細胞の多能性状態への変化も包含する。リプログラミングはまた、本明細書に記載の操作などの操作をさらに行った場合の、多能性状態への完全なリプログラミングに対する感受性がより高い状態にする、細胞の分化状態の部分的な逆転も包含する。そのような操作によって、細胞またはその細胞の後代で、リプログラミングに寄与するまたはリプログラミングを維持する特定の遺伝子の内因性発現が誘導される場合がある。一定の実施形態では、本明細書に記載の合成の修飾されたＲＮＡおよびその方法を用いた細胞のリプログラミングによって、多分化能性状態にあると仮定される細胞（例えば、多分化能性細胞）が生じる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の合成の修飾されたＲＮＡおよびその方法を用いた細胞（例えば体細胞）のリプログラミングによって、多能性様状態または胚性幹細胞表現型と仮定される細胞が生じる。本明細書では、得られた細胞を「リプログラミングされた細胞」、「体性多能性細胞」、および「ＲＮＡ誘導性体性多能性細胞」と呼ぶ。本明細書では「部分的にリプログラミングされた体細胞」という用語は、本明細書で開示の方法によって、発生能が低い細胞からリプログラミングされた細胞を指す。部分的にリプログラミングされた細胞が、多能性の状態に完全にはリプログラミングされておらず、多能性ではない、安定な中間的な状態にある。そのような部分的にリプログラミングされた細胞は、多能性細胞よりは低いが分化能を有する細胞であると本明細書では定義する。部分的にリプログラミングされた細胞は、例えば、三胚葉のうちの１つか２つには分化できるが３つ全部の胚葉には分化できない。

【００４９】

本明細書で使用する場合「リプログラミング因子」という用語は、発生能を変化させる因子であると本明細書では定義する。このような因子には例えば、その発現が細胞、例えば体細胞がより分化していないまたは未分化の状態にリプログラミングするのに寄与する、遺伝子、タンパク質、ＲＮＡ、ＤＮＡ、または小分子がある。リプログラミング因子は、任意の遺伝子、タンパク質、ＲＮＡまたは小分子などであって、インビトロでの細胞のリプログラミング法においてそのうちの１つまたは複数と置き換えることができるものなどの、例えば、細胞を多能性状態にリプログラミングする転写因子（例えばＳＯＸ２、ＯＣＴ３／４、ＫＬＦ４、ＮＡＮＯＧ、ＬＩＮ－２８、ｃ－ＭＹＣなど）であってよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の合成の修飾されたＲＮＡおよびその方法を用いた外因性リプログラミング因子の発現は、細胞をリプログラミングされた状態または部分的にリプログラミングされた状態で安定に維持するのに、外因性の１つまたは複数のリプログラミング因子の発現が必要なくなるように、内因性の１つまたは複数のリプログラミング因子の発現を誘導する。本明細書で使用する場合「インビトロでの多能性状態へのリプログラミング」とは、核移行もしくは細胞質移行または例えば、卵母細胞、胚、生殖細胞、または多能性細胞との細胞融合を必要としないおよび／または伴わない、インビトロでのリプログラミング方法を指す。リプログラミング因子は、「脱分化因子」と言い換え

ることもできる。脱分化因子は発生能を変化させる因子を指し、本明細書では、細胞を脱分化させて、より分化していない表現型へと誘導する、例えばタンパク質またはＲＮＡであると定義する。つまり、脱分化因子は、細胞の発生能を向上させる。

【００５０】

成体細胞をｉＰＳＣ株を形成するように、形質移入および形質転換またはリプログラミングする方法は一般的に、例えば、Ｔａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００７ Ｃｅｌｌ，１３１：８６１－８７２，２００７，Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｓｃｉｅｎｃｅ，ｖｏｌ．３１８，ｐｐ．１９１７－１９２０が知られている。ｉＰＳＣは、リプログラミング因子によって体細胞から誘導される。リプログラミング因子とは、例えば、転写因子を含むことを想定している。成体細胞をリプログラミングするための方法には、例えば、特定の転写因子の組み合わせ、例えばＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４とｃ－Ｍｙｃ遺伝子の組み合わせを導入・発現させることが含まれる。他の研究者らは、成体細胞を形質転換またはリプログラミングするのに、他の転写因子の組み合わせを使用してもよいことを示している。このような他の転写因子には、例えば、Ｔａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００６ Ｃｅｌｌ，１２６：６６３－６７６ ａｎｄ Ｈｕｉｑｕｎ Ｙｉｎ，ｅｔ ａｌ．２００９，Ｆｒｏｎｔ．Ａｇｒｉｃ．Ｃｈｉｎａ ３（２）：１９９-２０８（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、例えば、Ｌｉｎ２８、Ｎａｎｏｇ、ｈＴｅｒｔおよびＳＶ４０ ｌａｒｇｅ Ｔ抗原が挙げられる。

【００５１】

翻訳されたときに、所望の１つまたは複数のタンパク質をもたらすＲＮＡを細胞に直接導入することで、ｉＰＳＣを同様に生成することができる。高等真核細胞は外来の「非自己」ＲＮＡに対する細胞の防御機構を進化させてきた。このような防御機構は最終的に、細胞内タンパク質合成の全体的な阻害を引き起こし、その結果、細胞毒性が生じる。この反応には部分的に、Ｉ型またはＩＩ型インターフェロンの生産が伴い、通常、「インターフェロン応答」または「細胞の自然免疫応答」と呼ばれている。この細胞の防御機構は通常、合成ＲＮＡを異物と見なし、そして、この細胞の自然免疫応答を誘導する。ＲＮＡを用いた、外因性の誘導されたタンパク質の持続的なまたは反復した発現を達成する能力が、この自然免疫応答の誘導によって妨害されている特定の態様では、この反応を回避するまたは低減する様式によって改変されている合成ＲＮＡを使用することが望ましい。自然免疫応答の回避または低減によって、例えば細胞の発生に関する表現型を改変するのに必要な、外因性の導入されたＲＮＡからの持続的な発現が可能になる。一態様において、持続的な発現は、標的細胞またはその後代に、合成の修飾されたＲＮＡを繰り返し導入することで達成される。本発明の方法には、天然のＲＮＡまたは合成ＲＮＡが含まれる。

【００５２】

一態様では、細胞内で目的のタンパク質の外因性の発現を誘導するために、天然の、修飾した、または合成のＲＮＡを細胞に導入することができる。本明細書に記載の修飾した合成のＲＮＡを用いた、目的のタンパク質の外因性の発現を誘導する能力は、例えば、目的のタンパク質を産生する細胞または生物の能力が損なわれるまたは妨げられる、細胞または生物の内因性の遺伝的欠損によって引き起こされる障害の治療に有用である。従っていくつかの実施形態では、本明細書に記載のＲＮＡを含む組成物および方法を、遺伝子治療の目的で使用することができる。

【００５３】

記載のＲＮＡは、細胞の運命および／または発生能を変化させるのに、好都合に使用することができる。外因性ＲＮＡからタンパク質を発現する能力は、細胞の発生能を変化または逆転することのいずれか、つまり細胞のリプログラミング、およびより分化した表現型へと方向付けられた細胞の分化を可能にする。細胞の発生能の変化において重要な面は、細胞またはその直接の後代において、１つまたは複数の発生能を変化させる因子が持続的かつ長期間にわたって発現することが必要だということである。これまでは、そのような持続的な発現は、ＤＮＡまたはウイルスベクターを細胞に導入することによって達成さ

れてきた。これらの方法は、挿入性の突然変異が生成される恐れのあることから、治療への応用には制限される。

【００５４】

本明細書に記載の外因性ＲＮＡから、１つまたは複数の所望のタンパク質を長期間にわたって発現する能力によって、最も恩恵をこうむる分野の一つが、当初より分化した表現型をもっている細胞からの、多能性または多分化能性の細胞の生成である。この態様では、リプログラミング因子をコードしているＲＮＡが、より分化していない表現型、つまりより高い発生能をもつ細胞へとリプログラミングするのに使用される。

【００５５】

本明細書に記載のこの態様および全てのそのような態様のいくつかの実施形態では、合成の修飾されたＲＮＡ分子は、少なくとも２つの修飾されたヌクレオシドを含む。そのような一実施形態では、２つの修飾されたヌクレオシドは、５－メチルシチジン（５ｍＣ）、Ｎ６－メチルアデノシン（ｍ６Ａ）、３，２'－Ｏ－ジメチルウリジン（ｍ４Ｕ）、２－チオウリジン（ｓ２Ｕ）、２'フルオロウリジン、シュードウリジン、２'－Ｏ－メチルウリジン（Ｕｍ）、２'デオキシウリジン（２'ｄＵ）、４－チオウリジン（ｓ４Ｕ）、５－メチルウリジン（ｍ５Ｕ）、２'－Ｏ－メチルアデノシン（ｍ６Ａ）、Ｎ６，２'－Ｏ－ジメチルアデノシン（ｍ６Ａｍ）、Ｎ６，Ｎ６，２'－Ｏ－トリメチルアデノシン（ｍ６２Ａｍ）、２'－Ｏ－メチルシチジン（Ｃｍ）、７－メチルグアノシン（ｍ７Ｇ）、２'－Ｏ－メチルグアノシン（Ｇｍ）、Ｎ２，７－ジメチルグアノシン（ｍ２，７Ｇ）、Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシン（ｍ２，２，７Ｇ）、およびイノシン（Ｉ）からなる群より選択される。本明細書に記載のこの態様およびそのような全ての態様の、そのような一実施形態では、少なくとも２つの修飾されたヌクレオシドは、５－メチルシチジン（５ｍＣ）およびシュードウリジンである。（例えば参照により本明細書に組み込まれる、Ｒｏｓｓｉらに付与されている米国特許第２０１２／００４６３４６号を参照のこと）。

【００５６】

本発明の方法で使用される遺伝子、タンパク質またはＲＮＡには、ＯＣＴ４、ＳＯＸ１、ＳＯＸ２、ＳＯＸ３、ＳＯＸ１５、ＳＯＸ１８、ＮＡＮＯＧ、ＫＬＦ１、ＫＬＦ２、ＫＬＦ４、ＫＬＦ５、ＮＲ５Ａ２、ｃ－ＭＹＣ、１－ＭＹＣ、ｎ－ＭＹＣ、ＲＥＭ２、ＴＥＲＴ、およびＬＩＮ２８が含まれるがこれらには限定されない。

【００５７】

成体線維芽細胞のｉＰＳＣへのリプログラミングには、単一の転写因子が、特定の小分子経路阻害剤と共に使用できることも分かっている。そのような経路阻害剤としては、例えば、トランスフォーミング増殖因子－ベータ（ＴＧＦｂ）経路阻害剤のＳＢ４３１５４２（４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］－ベンズアミド）とＡ－８３－０１［３－（６－メチル－２－ピリジニル）－Ｎ－フェニル－４－（４－キノリニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボチオアミド］、細胞外シグナル調節キナーゼ（ＥＲＫ）と微小管関連タンパク質キナーゼ（ＭＡＰＫ／ＥＲＫ）経路の阻害剤であるＰＤ０３２５９０１（Ｎ－［（２Ｒ）－２，３－ジヒドロキシプロポキシ］－３，４－ジフルオロ－２－［（２－フルオロ－４－ヨードフェニル）アミノ］－ベンズアミド）、βカテニンを安定化することでＷｎｔシグナル伝達を活性化するＧＳＫ３阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１［６－（（２－（（４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（４－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）ピリミジン－２－イル）アミノ）エチル）アミノ）ニコチノニトリル］、リシン－特異的脱メチル化酵素１であるパルナート（Ｐａｒｎａｔｅ）（別名トラニルシプロミン（ｔｒａｎｙｌｃｙｐｒｏｍｉｎｅ））、３'－ホスホイノシチド－依存性キナーゼ－１（ＰＤＫ１）の小分子活性剤であるＰＳ４８［（２Ｚ）－５－（４－クロロフェニル）－３－フェニル－２－ペンテン酸］、ヒストンデアセチラーゼ（ＨＤＡＣ）阻害剤の酪酸ナトリウムおよびバルプロ酸、ミトコンドリアの酸化（例えば、２，４－ジニトロフェノール）、解糖代謝（フルクトース２，６－二リン酸およびシュウ酸）、ＨＩＦ経路の活性化（Ｎ－オキサロイルグリシンおよびケルセチン）を調節する小分子（その全体が参照により本明細書に組

み込まれる、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ７：６５１－６５５）が挙げられる。Ｚｈｕらは、Ｏｃｔ４およびＰａｒｎａｔｅとＣＨＩＲ９９０２１の組み合わせが、成体ヒト表皮角化細胞のリプログラミングに十分であることを示している。

【００５８】

個々のプロトコールは異なるが、リプログラミングのプロトコールは一般的に、組織試料、例えば、皮膚生検材料由来の分化した成体細胞を増殖させること、およびそれらを上述したようなリプログラミング因子と接触させること、例えば、それらに感染させること、つまり、例えば、多能性転写因子の転写産物を含むウイルス構築物などの発現ベクターで形質転換することから構成される。当該分野で知られている方法、例えば、組織を機械的に破砕し、その後酵素を使って解離させて線維芽細胞を放出させる方法、によって線維芽細胞を得て、その後、この線維芽細胞を当該分野で知られている方法、例えばＤｉｍｏｓ ｅｔ．ａｌ．，２００８，Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｖｏｌ．３２１（５８９３）：１２１８－１２２１に記載されている方法によって培養する。

【００５９】

本発明の例示的な態様では、ベクター、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクターを使用するが、いくつかの態様では、ｍＲＮＡ分子を細胞に移行させることを含む形質移入の技術に、ベクターを必要としない。

【００６０】

線維芽細胞への発現ベクターを使った形質移入は、所望のベクターと共に提供される説明に従って行われる。一定の期間おいた後（例えば、形質移入の約２～約１０日後の範囲）、細胞を分離し、ＣＤ１３^{ＮＥＧ}、ＳＳＥＡ４^{ＰＯＳ}およびＴｒａ－１－６０^{ＰＯＳ}表面マーカーに対する、蛍光標識した抗体と接触させる。分離され抗体で標識された細胞を次に、リン酸緩衝生理食塩水で再懸濁し、ｉＰＳＣクローンの自動的な選別と単離に移る。表面マーカー陽性細胞を標識の色または有無によって選別し、組織培地の入った無菌的なチューブ、またはＭＥＦもしくは細胞を含まない生物学的なマトリックスでコーティングしたマルチウェル（６～９６ウェルの）組織培養用プレートに直接入れて、コロニーの形成が目で確認できるようになるまで培養する。

【００６１】

その後、生じたコロニーを顕微鏡下で観察することで、または必要に応じて、蛍光でタグを付けた抗体で標識されたクローンを蛍光顕微鏡で観察することで、ｉＰＳＣであることをさらに確認する。一定の実施形態では必要に応じて、選別と同定を容易にするために、ベクターの１つまたは複数によって、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）発現マーカーも挿入する。多能性ＥＳ細胞系と一致する形態的な特徴を有する複数の個別のコロニーを培養物から回収し、個別に増殖させてモノクローナルな培養物を形成する。

【００６２】

本発明のシステムの好ましい一実施形態では、ｉＰＳＣであることを早い段階で確認し、同定するために、処理した細胞を遺伝的解析にかける。好ましくは、この遺伝的解析はサザンブロット法によって行われるが、マイクロアレイ、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ、定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、全ゲノム配列決定、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリーを含むがこれらには限定されない、他の当該分野で知られている方法を使用してもよい。アルカリホスファターゼの酵素活性の検出、細胞膜表面マーカーであるＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、Ｔｒａ－１－６０、Ｔｒａ－１－８１の発現が陽性であること、およびリプログラミングされたヒト線維芽細胞でのＫＬＦ４、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、Ｓｏｘ２転写因子の発現によっても、そのクローンがｉＰＳＣであることを確認できる。全てのマーカーが存在することが好ましい。

【００６３】

当該分野で知られている任意の形質移入用ベクターがリプログラミング因子として使用でき、それらには例えば、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡおよびそれらの組み合わせなどのＲＮＡが含まれる。用いることができる他の発現ベクタ

ーとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、シンドビスウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、細菌性ファージ、センダイウイルスおよびそれらの組み合わせが挙げられる。使用されるベクターが、例えば非複製性に改変されたセンダイウイルスベクターなどの、複製しないベクターであることが好ましい。好ましいセンダイウイルスベクターは、複製能力がないと同時に、ベクターが保持しているタンパク質をコードしている核酸の生産的な発現を可能にすることを維持しており、それによって、ワクチンが他の細胞へまたは体内へ制御されていない状態で拡がる可能性を全て防いでいる。この種のセンダイベクターは、ＣｙｔｏＴｕｎｅ（商標）－ｉＰＳＣセンダイウイルスベクターキット（ＤＮＡＶＥＣ、ＤＶ－０３０１）として市販されている。

【００６４】

そのようなベクターを成体線維芽細胞に挿入するためには、当該分野で知られている任意の形質移入法、例えば、電気穿孔法、遺伝子銃などを用いてもよい。必要に応じて、化学的な形質移入も、形質移入剤、例えば、ポリマー、リン酸カルシウム、陽イオン脂質、例えば、リポフェクション法などの手段によって行われる。ベクターまたは他の薬剤を成体線維芽細胞に運ぶためには、細胞透過性ペプチドも必要に応じて使用される。簡単に説明すると、細胞透過性ペプチドには、タンパク質由来のペプチド、例えば、タンパク質形質導入ドメインおよび／またはベクターまたは他の薬剤（ペプチドを含む）を細胞に運ぶ両親媒性ペプチドが挙げられる。細胞透過性ペプチドの対象は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｅｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，１５７：１９５-２０６によってまとめられている。他の細胞透過性ペプチドも当該分野で知られており、また、Ｈｅｉｔｚ（上記）に開示されている。他の細胞透過性技術、例えば、リポソームおよびナノ粒子なども、本発明の方法に用いてもよいことが想定される。リポソームおよびナノ粒子に関しても、Ｈｅｉｔｚ（上記）に記載されている。

【００６５】

形質転換した細胞を同定するために、抗体を使用することもできる。ヒト多能性幹細胞の集団を同定し、特徴解析するためには、幹細胞特異的表面タンパク質に対する４つの抗体、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、Ｔｒａ－１－６０およびＴｒａ－１－８１が一般的に使用されている。発生段階特異的胚抗原３および４（ＳＳＥＡ３およびＳＳＥＡ４）は、ヒト２１０２Ｅｐ細胞に存在するガングリオシドの、連続した領域を認識する、２つのモノクローナル抗体である（Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２０：３２９－３３７；Ｋａｎｎａｇｉ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｅｍｂｏ Ｊ ２：２３５５－２３６１）。Ｔｒａ－１－６０とＴｒａ－１－８１抗体は、最初は、ヒト胎児性癌腫（ＥＣ）細胞に対して産生されたが（ＰＷ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ ３：３４７－３６１）、その後、ポドカリキシン（シアロムチンのＣＤ３４関連ファミリーのメンバー）と同定された、ケラタン硫酸化糖タンパク質の炭水化物エピトープを特異的に認識することが分かった（Ｂａｄｃｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５９：４７１５－４７１９；Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００７，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ２：ｅ２３７；Ｓｃｈｏｐｐｅｒｌｅ ａｎｄ ＤｅＷｏｌｆ，２００７，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２５：７２３－７３０）。他のいくつかの表面マーカーが、ＥＳ細胞で発現していること、ならびに、ＣＤ３２６またはＥｐＣａｍ（Ｓｕｎｄｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，２００９，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ ２：１１３－１２４）、ＣＤ２４（熱安定成抗原）およびＣＤ１３３（Ｂａｒｒａｕｄ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ８５，２５０－２５９）（Ｇａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｂｌｏｏｄ １０９：１７４３－１７５１）が含まれることが示されている。Ｃｈａｎら（２００９、上記）は、４つのレトロウイルス因子の形質導入を介したリプログラミングによる、線維芽細胞からの真性ｉＰＳＣの同定は、ライブセルイメージングによって達成でき、かつ、長期にわたる観察によって、線維芽細胞が細胞表面マーカーＣＤ１３およびＤ７Ｆｉｂの発

現を消失し、多能性幹細胞マーカーＳＳＥＡ４およびＴｒａ－１－６０の発現を獲得することを報告した（Ｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，２００９，上記）。

【００６６】

したがって、本発明は、本明細書に記載の方法を用いて生成されたｉＰＳＣ、ならびにそのような細胞の集団をさらに提供する。多様な細胞型に分化する能力を有する、本発明のリプログラミングされた細胞は、多様な適用および治療用途を有する。幹細胞の基本の性質、無限に自己再生する能力および体内であらゆる細胞型に分化できる能力は、それらを治療用途にとって理想的なものにする。

【００６７】

様々な実施形態において、システムは、リプログラミングされた細胞を所望の細胞型に分化させる機能性をさらに含む。幹細胞技術の主要な目標は、幹細胞を所望の細胞型に分化させること、すなわち、方向性付けられた分化、または分化転換を介して細胞を生成することである。本明細書に記載の組成物および方法は、細胞のリプログラミングに有用なだけでなく、このような、細胞の所望の表現型への方向付けられた分化および分化転換にも適用できる。すなわち、リプログラミングに関する本明細書に記載の同じ技術が、リプログラミングされた細胞、またはさらに言えば任意の他の幹細胞もしくは前駆細胞の、所望の細胞型への分化に直接適用可能である。

【００６８】

多種多様なさらなる細胞型が、分化、分化転換、および脱分化によって作製されてもよい。細胞個体発生の文脈において、「分化する」または「分化している」という用語は、その発生過程によって、細胞がその直接前駆細胞よりさらに下流の発生経路に進行している、発生過程を指す相対語である。したがって、いくつかの実施形態では、用語が本明細書において定義されるようなリプログラミングされた細胞は、続いて、その経路のさらに下流の他の型の前駆細胞（組織特異的前駆体など、例えば、心筋細胞前駆体）に分化することができる、系列が限定された前駆細胞（中胚葉幹細胞など）に、次いで、特定の組織型において特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力を保持していてもまたは保持していなくてもよい、最終段階の分化細胞に分化することができる。

【００６９】

分化は典型的には、ｉＰＳＣを１つまたは複数の分化因子と接触させることによって実施される。本明細書で使用する場合「分化因子」という用語は、本明細書で定義されるように、所望の細胞型へ分化するように細胞を誘導する、発生能を変化させる因子、例えば、タンパク質、ＲＮＡ、または小分子などを指す、すなわち、分化因子は細胞の発生能を低下させる。いくつかの実施形態では、分化因子は細胞型特異的ポリペプチドであってよく、しかしながらこのことは必須ではない。特定の細胞型への分化には、２つ以上の分化因子が同時におよび／または連続して発現することを必要する場合もある。本明細書に記載のいくつかの態様では、最初に、細胞または細胞集団の発生能を、本明細書に記載のような合成の修飾されたＲＮＡを用いるリプログラミングまたは部分的なリプログラミングによって向上させ、次に、そのようなリプログラミングによって生成された細胞またはその後代細胞を、分化因子をコードする１つまたは複数の合成の修飾されたＲＮＡと接触させるかまたはそのようなＲＮＡを導入することによって、分化するように誘導し、該細胞またはその後代細胞の発生能を低下させる。

【００７０】

本明細書で使用する場合「多能性の中間的な細胞を形成せずに」という用語は、ある１つの細胞型が別の細胞型へと、好ましくは一工程で、分化転換することを指し；したがって、多能性の中間的な細胞を形成せずに、分化した表現型または細胞の発生能を改変する方法は、細胞をまず脱分化（またはリプログラミング）し、次いで、別の細胞型へと分化させることを必要としない。その代わりに、その細胞型は、より分化していない表現型を経ずに、１つの細胞型から別の細胞型へと、単に「切り替え」られる。したがって、分化転換とは、細胞の発生能の変化を指し、その変化によって、細胞が同じような発生能をもつ異なる細胞になるように誘導される、例えば、肝臓細胞から膵臓細胞へ、膵臓α細胞か

ら膵臓β細胞へ誘導される。本発明のシステムおよび方法は細胞の分化転換によく適している。

【００７１】

様々な態様において、細胞を分化、脱分化、または分化転換するのに有用な分化因子をコードする例示的な遺伝子には、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＯＸ２、ＳＯＸ１７、ＨＮＦ４、ＧＡＴＡ４、ＨＨＥＸ、ＣＥＢＰβ、ＣＥＢＰδ、ＰＲＤＭ１６、ＭＹＯＤ１、ＮＫＸ２．５、ＭＥＦ２ｃ、ミオカルディン、ＲＵＮＸ２、ＰＤＸ、ＮＧＮ、ＳＡＬＬ４、もしくはＳＯＸ９、またはそれらの組み合わせが含まれる。コードされる転写因子には、Ｏｃｔ４、ＮＡＮＯＧ、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ９、Ｓｏｘ１７、ＨＮＦ４α２、ＨＮＦ４α４、ＨＮＦ４α７、ＨＮＦ４α８、ＨＮＦ４γ、ＧＡＴＡ４、Ｈｈｅｘ、ＣＥＢＰβ、ＣＥＢＰδ、ＰＲＤＭ１６、ＭｙｏＤ１、Ｎｋｘ２．５、Ｍｅｆ２ｃ、ミオカルディン、Ｒｕｎｘ２－Ｉ、Ｐｄｘ１、Ｎｇｎ３、Ｓａｌｌ４、またはＲｕｎｘ２－ＩＩが含まれる。例えば、中胚葉または線維芽細胞の脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、および筋細胞への分化は、以下の転写因子：ＣＥＢＰβ／ＣＥＢＰδ（脂肪細胞）、Ｓｏｘ９（軟骨細胞）、Ｒｕｎｘ２（骨細胞）、およびＭｙｏＤ１（筋細胞）を含むキメラタンパク質を用いて実施されてもよい。

【００７２】

マイクロ流体を用いて実施される細胞分化技術は当技術分野において公知であり、かつ本発明の実施において利用され得る。そのような技術には、参照により本明細書に組み入れられるＷＯ２０１３／１８８７４８に記載のものが含まれる。ＷＯ２０１３／１８８７４８には、ある１つの細胞型から別の細胞型へと細胞を分化転換するためのマイクロ流体装置が記載される。細胞は、１つまたは複数のベクター無しの遺伝子調節因子オリゴヌクレオチドと同時にまたはそれと連続して培養され、次いで、培養の細胞マーカーまたは形態が分化転換の完了を示すときに、回収される。適切な遺伝子調節因子オリゴヌクレオチドには、分化因子をコードするマイクロＲＮＡおよびメッセンジャーＲＮＡが含まれる。分化転換のための条件は、マイクロ流体装置の異なる培養チャンバーに細胞を分けることによって最適化される。細胞は、各チャンバー内で異なる添加剤と共に培養され、次いで、比較される。

【００７３】

分化が完了した後、システムは、分化した細胞を増殖させて、下流での使用に十分な数の所望の細胞型を作製するための機能性を有する。

【００７４】

処理の任意の段階で、本発明のシステムは、細胞を保存するための機能性を有する。例えば、単離された細胞が保存されてもよく、増殖した細胞が保存されてもよく、リプログラミングされた細胞が保存されてもよく、分化した細胞が保存されてもよい。保存は、細胞寿命を延長させるのに適した任意の条件下で、例えば、約－８０℃以下で細胞を凍結させることによって、行われてもよい。

【００７５】

さらに、システムは、処理の任意の段階で細胞を解析して、細胞の定性的評価および定量的評価を行う機能性も含む。解析には、当技術分野において公知の任意の種類の細胞解析、例えば、画像解析、細胞数解析、細胞形態解析、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）解析、配列解析、ＤＮＡ解析、ＲＮＡ解析、遺伝子発現プロファイリング、プロテオーム解析、メタボローム解析、イムノアッセイ、核排除解析、またはそれらの組み合わせなどが含まれてもよい。

【００７６】

図１は、処理工程のそれぞれを実施するように構成された単一マイクロ流体ユニット１００を含むシステムの実施形態を例示する。システムは、処理工程を制御するための指示を含むコンピュータメモリモジュールおよび指示を実行するように構成されたコンピュータプロセッサモジュールを含む、単一コンピュータモジュール１４０も含むように示される。

【００７７】
処理工程は１つまたは複数のマイクロ流体ユニットを介して実施されてもよいことが理解される。例えば、図２は、第１のマイクロ流体ユニット１００および第２のマイクロ流体ユニット２００を有するシステムの実施形態を示す。ユニット１００は、細胞単離、細胞増殖、細胞リプログラミング、および任意で細胞保存を実施するように動作可能である。ユニット２００は、細胞分化および保存を実施するように動作可能である。各ユニットは、単一コンピュータモジュール１５０によって制御される。
【００７８】
任意の数の処理工程が単一マイクロ流体ユニットによって実施されてもよいことが想定される。例えば、各処理工程は、異なるマイクロ流体ユニットによって実施されてもよい。本発明の文脈において、マイクロ流体ユニットは、特定の作業、例えば、細胞の単離、増殖、リプログラミング、および分化をチップ上で実施し得るように設計されるマイクロ流体チップとしてフォーマットされてもよい。単一マイクロ流体チップは、様々なユニットをチップ上の異なる位置に整列させた、複数のマイクロ流体ユニットを含んでもよいことも想定される。実施形態において、チップは、マイクロ流体ユニットが処理過程のいくつかの段階で分離されてもよいように、分離可能であってもよい。例えば、リプログラミングは、チップの第１の領域上に配置されたマイクロ流体ユニットによって実施されてもよく、リプログラミングされた細胞の保存は、チップの第２の領域上に配置されたマイクロ流体保存ユニットによって実施されてもよい。この２つの領域は、リプログラミング領域が保存域から分離され、保存域のみを凍結できるように、相互に分離可能であってもよい。
【００７９】
特定の処理作業を達成するために、マイクロ流体ユニットは、それを通じて流体の流れが方向付けられる複数のチャネルを含むように設計され、これらのチャネルは非多孔性基体で形成される。「非多孔性基体」という用語は、フォトリソグラフィーまたは他の適した処理を用いて、その上部に本発明のマイクロ流体ユニットが作製される、固体支持材またはマトリックスを意味する。この材料は典型的には、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）またはポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）または当技術分野において公知の他の適した材料である。
【００８０】
様々な実施形態において、フローチャネルの幅は、約５μｍから約１０００μｍであってよく、より幅の広いフローチャネルでは、約１００μｍ、約１００μｍ以上約１５０μｍ以下、約１５０μｍ以上２００μｍ以下、約２００μｍ以上２５０μｍ以下、約２５０μｍ以上約３００μｍ以下、約３００μｍ以上約３５０μｍ以下、約３５０μｍ以上約４００μｍ以下、約４００μｍ以上約４５０μｍ以下、約４５０μｍ以上約５００μｍ以下、約５００μｍ以上約５５０μｍ以下、約５５０μｍ以上６００μｍ以下、約６００μｍ以上約６５０μｍ以下、約６５０μｍ以上約７００μｍ以下、約７００μｍ以上約７５０μｍ以下、約７５０μｍ以上８００μｍ以下、約８００μｍ以上約８５０μｍ以下、約８５０μｍ以上約９００μｍ以下、約９００μｍ以上約９５０μｍ以下、９５０μｍ以上１０００μｍ以下であってよい。多くの適用において、フローチャネル幅の範囲は約７５μｍから約１２５μｍが好ましい。しかしながら、ある特定の例では、チャネル幅は１０００μｍを上回ってもよい。より幅の狭いチャネルでは、幅は、約５μｍ以上かつ約１００μｍ以下であってよい。チャネル幅は、約１０μｍから約７５μｍ、約１５μｍから約５０μｍ、および約２０μｍから約４０μｍであってよい。いくつかの実施形態では、チャネル幅は、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、または７５μｍである。高さは、約５μｍから約１００μｍ、約１０μｍから約７５μｍ、約１５μｍから約５０μｍ、および約２０から約４０μｍであってよい。いくつかの実施形態では、チャネルの高さは、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、または７５μｍである。断面積は、約２０から約１３０００μｍ^2、約５０から約１００００μｍ^2、約２００から約８００

０μｍ^2、約２５０から約５０００μｍ^2、約５００から約３０００μｍ^{2}であってよく、多くの実施形態では、約１４００から約１６００μｍ^{2}であることが好ましい。いくつかの実施形態では、断面積は、約５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、または約２０００μｍ^{2}である。本発明のマトリックス装置の個別のチャネルの断面の形状は、同じまたは異なっていてもよく、正方形、長方形、他の多角形、円形、楕円形、半円形、および半楕円形などのさまざまな形状を成してもよい。断面の形状および面積は、同じチャネルの中で異なっていてもよく、以前に記載された製造技術および当技術分野において公知である製造技術によって調製することが出来る。正方形または長方形のチャネル形状が概して好まれる。

【００８１】

本発明は一部、機能的構成部品および様々な処理工程に関して記載される。そのような機能的構成部品および処理工程は、特定の機能を実施し、種々の結果を達成するように構成された、任意の数の構成部品、操作、および技術によって認識され得る。例えば、本発明は、様々な生物試料、バイオマーカー、要素、材料、コンピュータ、データ供給源、保存システムおよび媒体、情報収集技術および処理、データ処理基準、統計解析、ならびに回帰分析などを利用してもよく、多様な機能を実行し得る。加えて、本発明は医療診断の文脈において記載されるが、本発明は、任意の数の適用、環境、およびデータ分析と併用して実施されてもよく；記載のシステムは本発明の単なる例示的適用に過ぎない。

【００８２】

本発明の様々な態様による処理するための方法は、任意の適切な形で、例えば、コンピュータシステムに対するコンピュータプログラム操作を用いて、実施されてもよい。本発明の様々な態様による例示的システムは、コンピュータシステム、例えば、プロセッサおよびランダムアクセスメモリを含む通常のコンピュータシステム、例えば、遠隔アクセス可能なアプリケーションサーバー、ネットワークサーバー、パーソナルコンピュータ、またはワークステーションと併用して実施される。コンピュータシステムはまた、さらなるメモリ装置または情報ストレージシステム、例えば、大容量ストレージシステムおよびユーザーインターフェース、例えば、通常のモニター、キーボード、およびトラッキング装置なども適切に含む。その一方で、コンピュータシステムは、任意の適切なコンピュータシステムおよび関連機器を含んでもよく、また任意に適切な形で構成され得る。１つの実施形態において、コンピュータシステムは独立型システムを含む。別の実施形態において、コンピュータシステムは、サーバーおよびデータベースを含むコンピュータのネットワークの一部である。

【００８３】

情報を受け取る、処理する、および解析するのに必要とされるソフトウェアは、単一装置で実施されてもよく、または複数の装置で実施されてもよい。ソフトウェアは、情報の保存および処理がユーザーに対して遠隔で行われるように、ネットワークを介してアクセス可能であってもよい。本発明の様々な態様によるシステムおよびその様々な要素は、バイオマーカー解析を促進するような機能および操作、例えば、データの収集、処理、解析、報告および／または診断などを提供する。本システムは試料に関連する情報を保持し、また、解析および／または診断も促進し得る。例えば、本実施形態において、コンピュータシステムは、細胞の分析に関連する情報を受領、保存、検索、解析、および報告し得る、コンピュータプログラムを実行する。コンピュータプログラムは、様々な機能または操作を実施する複数のモジュール、例えば、生データを処理し、補足データを作成するための処理モジュール、および生データおよび補足データを解析して特定の作業を実施するシステムをもたらすための分析モジュールを含んでもよい。

【００８４】

システムはまた、様々なさらなるモジュールおよび／または個別の機能を提供してもよい。例えば、システムは、例えば、処理機能および解析機能に関連する情報をもたらす報告機能も含んでもよい。システムはまた、例えばアクセスの制限および他の管理機能の実

施など様々な管理機能および運営機能を提供してもよい。
【００８５】
ｉＰＳＣまたはそれらに由来する分化細胞を作製するのに必要とされるプロセスの全てまたはいずれかの部分は、マイクロ流体ユニット、または本発明のシステムのマイクロ流体ユニットに動作可能に接続された類似の自動化された処理を用いて実施されてもよいことが理解される。
【００８６】
様々な実施形態において、本開示のシステムは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第２０１３／０３４５０９４号に開示されるような以下のワークフローシステムにおいて記載される、１つまたは複数のシステム（システム１～８）を利用するか、または該システムと動作可能に連動してもよい。
【００８７】
ワークフローシステム
ワークフローシステムは、それぞれ独立して操作される、４つのユニットに分けられる。
（１）隔離所体細胞単離および成長（システム１）；
（２）隔離所アッセイ（システム２）；
（３）融解、感染および同定（システム３、４、および５）；ならびに
（４）維持、ＱＣ、増殖、および凍結（システム６、７、および８）
【００８８】
加えて、線維芽細胞を保存するための、自動化された－８０貯蔵および回収システム、および１．４ｍＬマトリックスのスクリューキャップ型チューブに入れた、最終的なクローンも本システムの一部である。各ユニットを動作させるシステム、ならびに工程および操作について以下で説明する。
【００８９】
システム１、パートＡ：隔離所での体細胞の単離および成長ワークフロー、生検処理のためのマイコプラズマ予備試験
１．技師は、１週間当たり４０個の生検材料を６ウェルディッシュにプレーティングする；
２．６ウェルプレートを、２００枚のプレートを入れることができる隔離所インキュベーター中で維持する；
３．一体化されたＣｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器を使用して、定期的に培養密度を確認する。
【００９０】
これらの自動化された工程を実施するのに使用してもよいシステムの構成部品としては、一例ではあるが、全てＨａｍｉｌｔｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｏｂｏｔｉｃｓから入手可能な、ＳＴＡＲｌｅｔ Ｍａｎｕａｌ Ｌｏａｄ、１０００μｌのピペット操作チャネルのある、４／８／１２ｃｈ．／ＭＰＨ用、８チャネル用のＭｏｄｕｌａｒ Ａｒｍ、およびｉＳＷＡＰプレート取扱い機が含まれる。遠心分離が必要であるか、望ましい場合には、ＡｇｉｌｅｎｔのＶＳｐｉｎマイクロプレート用遠心器を使用することができる。ソフトウェアは、Ｃｅｌｉｇｏ ＡＰＩソフトウェアであってよい。インキュベーターは、Ｃｙｔｏｍａｔ インキュベーターであってよい。プレートの取扱い用には、Ｃｙｔｏｍａｔ ２４バーコードリーダー、Ｃｙｔｏｍａｔ ２３ｍｍ台、およびＣｙｔｏｍａｔ ４００ｍｍ移動用ステーションを使用することができる。プレートを傾けるためには、Ｍｕｌｔｉ Ｆｌｅｘ傾きモジュールを使用してもよい。システムのコントローラは、Ｗｉｎｄｏｗｓ ＸＰの作動システムで動かす、Ｄｅｌｌ ＰＧであってよい。キャリアパッケージはＱ Ｇｒｏｗｔｈ キャリアパッケージであってよい。
【００９１】
システム１、パートＢ：隔離所の成長ワークフロー、マイコプラズマ試験
１．インキュベーターから、隔離所Ｇｒｏｗｔｈ ＳＴＡＲｌｅｔのデッキに戻し、ＥＬ

ＩＳＡを利用したマイコプラズマ試験用に、培地をウェルからプレートに回収する。
２．９６ウェルアッセイプレートを隔離所アッセイＳＴＡＲｌｅｔに手動で移す。
【００９２】
システム１、パートＣ：マイコプラズマ試験を通過した後の隔離所成長ワークフロー
１．増殖させた線維芽細胞を、複数の凍結用バイアルに分配し、フタをして、－８０℃のＳＡＭに移す。
【００９３】
これらの自動化された工程を実施するのに使用してもよいシステムの構成部品は、ＳＴＡＲｌｅｔ Ａｕｔｏ Ｌｏａｄを使用しても良い以外は、隔離所の成長ワークフローで使用したものと同じ構成部品から選択することができる。スペクトル収集装置としてはＳｐｅｃｔｒａｍａｘ Ｌリーダーを使用することができる。
【００９４】
システム２：隔離所アッセイのワークフロー
１．発光法（glow luminescence method）を用いるＬｏｎｚａ ＭｙｃｏＡｌｅｒｔによる試験。
２．スペクトル収集装置による発光プレートの測定。
【００９５】
これらの自動化された工程を実施するのに使用してもよいシステムの構成部品には、全てＨａｍｉｌｔｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｏｂｏｔｉｃｓから入手可能な、ＳＴＡＲｌｅｔ Ｍａｎｕａｌ Ｌｏａｄ、１０００μｌのピペット操作チャネルのある、４／８／１２ｃｈ．／ＭＰＨ用、８チャネル用のＭｏｄｕｌａｒ Ａｒｍ、およびｉＳＷＡＰプレート取扱い機が含まれる。発光アッセイ用には、ＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ ＨＴリーダーを使用してもよい。システムのコントローラは、Ｗｉｎｄｏｗｓ ＸＰの作動システムで動かすことのできるＤｅｌｌ ＰＧであってよい。キャリアパッケージは、Ｑ Ｇｒｏｗｔｈキャリアパッケージであってよい。
【００９６】
システム３、４、および５：融解、感染および同定
融解モジュールと感染モジュール
１．－８０℃のＳＡＭから凍結用チューブを回収する（６１、１９０）
２．加温ブロック上で融解する（１２２）
３．フタを取る（Ｈａｍｉｌｔｏｎ Ｃａｐｐｅｒ Ｄｅｃａｐｐｅｒ）（１２６）
４．培地を加えて凍結保護物質を希釈する（１２２）
５．スピンする（１２８）
６．プレーティングデータ中に再懸濁する（１２２）
７．６ウェルの１ウェル当たり１つの試料をプレーティングする（６２、１２２）
８．インキュベーターに移動する（１３０、１３２）
９．線維芽細胞を約３～４日間回復させる
１０．Ｃｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器で培養密度を確認する（１２４）
１１．リプログラミング当日に、全ウェルの線維芽細胞を継代する（１２２）
１２．バッチ内で、トリプシンをウェルに通過させる（１２２）
１３．Ｃｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器で細胞を計数する（１２４）
１４．２４ウェルプレートの１～３つのウェルに一定数の細胞をプレーティングし、最小限の枚数の２４ウェルプレートに試料を固定する（６４、１２２）
１５．一晩、プレートをインキュベーターに戻す（１３０、１３２）
１６．プレートを回収し、チューブ形式内のウイルスを融解し、２４ウェルプレートに入っている線維芽細胞のそれぞれのウェルに加える（１３０、１２２）
１７．毎日、培地の一部を交換する（１２２）
【００９７】
磁気選別モジュール
１８．アキュターゼ（ａｃｃｕｔａｓｅ）で培養物を回収し、単一細胞の懸濁液にする（

１３４）
１９．染色用緩衝液で希釈する（１３４）
２０．線維芽細胞表面マーカーに対する磁気ビーズで染色する（１３４）
２１．洗浄工程（１３４）
２２．磁気（Ｄｙｎａｌビーズの場合）またはカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉシステムの場合）にかける（１３４、１３６）
２３．磁気を帯びてない画分を回収し、新しいウェルに移す（１３４）
２４．Ｃｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器で細胞を計数する（１２４）
２５．継代培地に入れた細胞を、９６ウェルプレートの各ウェルにつき１～１０個移すことで、細胞を適切な密度に希釈する（６６、１３４）
２６．４℃のインキュベーターから、新しいマトリゲルまたはマトリックスでコーティングされている９６ウェルプレートを回収する（１４２）
２７．細胞を計数した数に基づいて、例えば、感染１回分のプレート１枚当たり２つの細胞を、９６ウェルマトリックスプレートに分配する（６６、１３４）
２８．プレートをインキュベーターに戻す（１３２）
２９．毎日、培地の一部を交換する（１２２）

【００９８】

コロニー同定モジュール

３０．９６ウェルプレートを、インキュベーターからコロニー同定用の液体取扱い機に戻す（６６、１３２、１３８）
３１．多能性表面マーカーを使った生細胞染色を行う（１３８）
３２．Ｃｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器で撮影（１４０）
３３．コロニーの境界が明確で、単一のマーカーに陽性なコロニーの入ったウェルを同定する（１４０）
３４．技師は当たりを再確認して、継代用に最初の試料から６つの試料を選択し、プレートおよび陽性ウェルのＩＤを回収する。
３５．単一のマーカー陽性コロニーが入ったウェルを選ぶ（１３８）
３６．４℃のインキュベーターから、新しいマトリゲルまたはマトリックスでコーティングされている９６ウェルプレートを回収する（６８、１４２）
３７．選択したウェルを回収し、新しい９６ウェルマトリックスプレートに継代して、最小限の枚数のプレートにクローンを固定し、それぞれを継代培地中でプレーティングする（６８、１３８）
３８．毎日、培地の一部を交換する（１２２）

【００９９】

これらの自動化された工程を実施するのに使用してもよいシステムの構成部品は、１つまたは複数のＣＯＲＥ ９６ ＰＲＯＢＥＨＥＡＤ ＩＩ（１０００μｌモデル）のプローブヘッドを加える以外は、隔離所の成長ワークフローで使用されているものと同じものから選択することができる。

【０１００】

システム６、７、および８：維持、ＱＣ、増殖、および凍結

維持モジュール

３９．コロニーが十分に高い密度になるまで、９６ウェルのマトリックスでコーティングされている新しいプレート中に１：１で連続して継代していく（６８～７２、１６０）
４０．毎日、９６チップヘッドを使っておよそ７５％の培地を交換することで、全てのプレートに栄養を供給する（１６０）
４１．Ｃｙｎｔｅｌｌｅｃｔ Ｃｅｌｉｇｏ血球計算器を用い、コロニーの密度と成長速度を定期的にモニタリングする（１６６）
４２．プレートを複製し、クローンＱＣ用のプレートを作製する（７４～８６、１６０）
４３．最終目標は、性質の良くないクローンを排除し、最初の試料よりも２～３倍品質の高いクローンを残すための複数のＱＣアッセイで使用するために、複数のプレート上でク

ローンを増殖させることである。
４４．ＱＣ工程に合格したクローンを選んで再度整列させ、最小限の枚数のプレートに固定する。同時に、合格しなかったクローンは除去する（８０、８６、１６０）。
４５．この過程を行っている間は毎日、栄養の供給を行う（１６０）
【０１０１】
ＱＣモジュール
４６．細胞を回収する（７４、１５０）
４７．細胞を計数する（１６４）
４８．Ｖ型底プレートに、一定数の細胞（細胞数は、１ウェル当たり５０００～１００００個の範囲）をプレーティングする。１株につき、２～６つの複製を準備する（８４、１５０）
４９．インキュベーターに戻す（１ｇ凝集）（１７２）
５０．２日後に培地の交換を行う（１５０）
５１．インキュベーター中でさらに１２日間インキュベートする（１７２）
５２．２日毎に培地を一部交換する（１５０）
５３．ウェル中に胚様体を残したままウェルから培地を除去するために、核酸調製ステーションに移動させる（８４、１９２）
５４．各試料の複製をまとめて混合するためにＲＮＡ溶解緩衝液で再懸濁し、Ｎａｎｏｓｔｒｉｎｇ ｎＣｏｕｎｔｅｒアッセイでの解析に使用できるプレートを作製する（８４、１９２）
【０１０２】
凍結モジュール
５５．継代し、増殖させた後の９６ウェルプレートから始める（８８）
５６．インキュベーター中で６日間インキュベートする（１７２）
５７．毎日、培地の一部を交換する（１５４）
５８．インキュベーターからプレートを取り出す（８８、１６２）
５９．培地を除去する（完全に除去する）（１５４）
６０．冷えた予備凍結培地（成長培地で希釈したマトリゲル）を加える（１５４）
６１．インキュベーター中で１時間インキュベートする（１７２）
６２．培地を除去する（完全に除去する）（１５４）
６３．冷やした凍結培地を少量加える（１５４）
６４．プレートを密閉する（８８、１６４）
６５．試料を－８０℃の貯蔵庫に移し、凍結させる（１９０）
６６．気相の液体窒素中で保存する
【０１０３】
凍結バイアルの保存
６７．継代し、増殖させた後の９６ウェルプレートから始める（９０）
６８．６日間インキュベートする（１７２）
６９．毎日、培地の一部を交換する（１５４）
７０．ウェルを１：１の割合で２４ウェルプレートに継代する（９２、１５４）
７１．６日間インキュベートする（１７２）
７２．毎日、培地の一部を交換する（１５４）
７３．ウェルを１：１の割合で６ウェルプレートに継代する（９４、１５４）
７４．４～６日間インキュベートする（１７２）
７５．毎日、培地の一部を交換する（１５４）
７６．インキュベーターからプレートを取り出す（１６２）
７７．培地の一部を予備凍結培地に置換する（１５４）
７８．インキュベーター中で１時間インキュベートする（１７２）
７９．通常の継代の場合、細胞を凍結用に回収する（１５４）
８０．マトリックスチューブに移す。１ウェルにつき、チューブは２～３本（９６、１５

４）
８１．スピンして、培地を除去する（１６８、１５４）
８２．冷凍結培地を加える（１５４）
８３．チューブのフタをする（１７０）
８４．試料を－８０℃の貯蔵庫に移す（１９０）
【０１０４】
図３に、生検材料のプレーティング（２）、増殖および継代（４）（液体取扱いロボットによる回転培養）、ＱＣ（６）（自動化されたマイコプラズマ試験）、および（８）液体取扱いロボットによる自動凍結を含む、システム１によって実施される工程を示す。
【０１０５】
図４に、システム２、３、および４によって実施される工程を示す。自動化されたシステムによって線維芽細胞をプレーティングし（１０）、自動化されたシステムでリプログラミング因子を導入し（１２）、自動的な選別および単離によって、ｉＰＳＣを単離し（１４）、自動化されたシステムで所望のクローンを選択して増殖させ（１６）、マーカーアッセイおよび胚様体アッセイにより、多能性の状態を自動的に品質確認し（ＱＣ）（１８）、次いで、所望の細胞を自動的に凍結・貯蔵する（２０）。
【０１０６】
図５は、システム１に含まれる工程（２２）から（６０）を示すフローチャートである。
【０１０７】
図５に、ワークフローの一例と、生検材料から線維芽細胞生成までの決定木を図示する。ワークフローは、隔離所の段階（５８）とＣｌｅａｎの段階（６０）に分けられる。生検材料が設備に投入されたら、技師が生検材料を６ウェルプレートにプレーティングし（２２）、プレートを自動インキュベーターに集める（２４）。所定の時間が経過し、生検材料がプレートに接着したら、液体取扱いロボットが、栄養を供給し、自動顕微鏡で増殖密度を確認するためにプレートを自動インキュベーターから取り出す（２６）。プレートをインキュベーターに戻し、成長させる（２８）。液体取扱い機によって、インキュベーターからプレートを取り出し、培地を、抗生物質および抗真菌剤を含まない培地と交換する（３０）。ロボットによって、プレートはインキュベーターに戻され、さらに５日間インキュベートする（３２）。その後、ロボットによってプレートが取り出され、マイコプラズマ試験用に培地を娘プレートに回収する（３４）。マイコプラズマ試験用に、娘プレートを隔離所アッセイシステムに移動する（３６）。アッセイの陽性シグナルに基づいて選択を行う（３８）。マイコプラズマアッセイの結果、６ウェルプレートの全てのウェルが陽性であったら（４０）それらは廃棄する。６ウェルプレートの全てのウェルが陰性で、マイコプラズマを含まなかったら、そのプレートを隔離所からｃｌｅａｎ成長システムに移す（４６）。いくつかのウェルが陽性で、いくつかのウェルが陰性の場合、陰性のウェルを隔離所中で維持する（４２）。陰性のウェルを新しいプレートに継代し（４４）、インキュベーターに移し、陽性のウェルを含むもとのプレートを廃棄する。これらの培養物を、マイコプラズマの再検査まで進める（２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８）。Ｃｌｅａｎ培養の成長をモニタリングし（５０）、継代し（５２）そして凍結バイアル中で凍結させる（５４、５６）。
【０１０８】
図６Ａ、６Ｂ１、６Ｂ２、および６Ｃに、自動化されたリプログラミング過程を行っている間の、マルチウェル組織培養プレートを介した患者試料のフローの例を図示する。各図の上段は、ワークフローのそれぞれの工程（７０、８８、９８）によって実施される手順のフローを説明するフローチャートである。各図の下段のマルチウェル細胞培養プレートは、プレートマップと共に示されている。例えば、灰色のウェルまたは試料の名前の付いているウェルのグループは、試料の入ったウェルを表している（６１～６８、７２～８６、８８～９６）。手順を介した試料の、プレート間またはウェル間の移動は、矢印で示すように、左から右方向に進行する。図６Ａに示すように、自動化されたｉＰＳＣの誘導

過程は、患者試料と対照の線維芽細胞試料（６１）が、６ウェルプレートの個々のウェルにプレーティングされた時点から開始される（６２）。これらの試料を、リプログラミング因子をコードしているウイルスを用いた感染用またはリプログラミング因子を細胞に導入するための他の手段用に、所定の細胞数で２４ウェルプレートの個々のウェルに継代する（６４）。次の工程では、セルソーティングまたは、好ましくは、磁気ビーズを使用した濃縮によって、リプログラミングされた試料からリプログラミングされていない細胞を除き、９６ウェルプレートの複数のウェルに同じ密度でプレーティングする（６６）。この例では、そのようなプレートのうちの２枚を示している。この例では、６つのウェル（ウェルの中央に書いた点で示す）を、自動撮像装置を使った免疫蛍光解析アッセイによって、多能性表面マーカー陽性で、単一のクローンを含むものと同定する（６６）。これらのクローンを継代し、選んで最小限の９６ウェルプレートに再配列させた（６８）。例として示す図では、出発材料それぞれにつき６つのクローンを示しており、かつ、１６種の出発材料由来のクローンを９６ウェルプレートに並べることができることを示している。プレートの処理を促進するために、この選ぶ工程を複数回の継代にわたって行い、最小限の数のプレート上にクローンを固定することができる。図６Ｂ１および６Ｂ２に示すように、これらのクローンを、ウェル内の幹細胞コロニーの培養密度がそれぞれの出発材料と同程度になるまで、順次継代する（７２）。次に各プレート上の試料を重複プレート上で複製して（７４～８６）、品質管理（６）および適切な幹細胞特徴を示すクローンの選択が行えるようにする。ＱＣ過程を開始するには、このシステムによって、個々のクローンの多能性状態を決定するために必要とされる多能性品質管理アッセイ用のプレートを１枚と（７４）、さらに継代を続けるために、もう１枚のプレートを生成する（７６）。さらに継代を続けるためのプレートを、再度、さらなる品質管理と増殖用に、３枚のプレートに継代する（７８、８０、８２）。１枚のプレートは、核型と遺伝的多様性の解析を行うＱＣアッセイ用に回収する（７８）。２枚目のプレート（８２）は、ｖ底プレートに継代し、ｉＰＳクローンの分化能を評価するＱＣアッセイ用に、胚様体を形成させる（８４）。最後のプレート（８０）はさらに増殖を続ける。前述の多能性ＱＣアッセイによる品質管理に合格しなかった個々のクローン（図６ではウェル中の「×」で示す）についてはそれ以上継続しない。図６Ｂ２で示す例では、固定した単一の９６ウェルプレート（８６）には、それぞれにつき３つのｉＰＳクローンとして３２種類まで、またはクローン１つとして９６種類までのｉＰＳ細胞株（または分化した細胞株）が含まれる。残りのクローンは、残りが１～３クローンになるまで、できるだけ少数のプレートに固定する（８６～９２）。図６Ｃに示すように、これらを、プレートに接着させながら凍結保存するために増殖させるか（８８）、あるいはさらに増殖させて（９２～９４）、その後凍結用バイアル中で凍結保存する（９６）。多能性マーカーを用いたスクリーニングからの任意のまたは全ての情報を図６Ａに示す（７０）。図６Ｂ１に示した品質管理アッセイは、単独でまたは組み合わせて用いることで、自動化された過程において、どのクローンを固定および整列用に選択するかを決定することができる。

【０１０９】

図７Ａ、７Ｂ、７Ｃは、本発明の一実施形態におけるワークフローを達成するために必要とされる機器構成の例を図示している。図７Ａに、線維芽細胞バンクの自動的な増殖および品質管理用のシステム構成を示す。図７Ｂは、患者試料、例えば線維芽細胞を自動的に融解するため、リプログラミング因子を患者試料、例えば線維芽細胞に自動的に導入するため、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳを使った自動化セルソーティング、および自動的なコロニーの同定および再配列のためのシステムの構成を示している。図７Ｃは、ｉＰＳクローンの自動的な増殖、自動的な胚様体産生、および自動的な凍結用のシステム構成を示している。

【０１１０】

本明細書において述べられるように、本開示のシステムを利用して処理される細胞は、下流での使用のために保存されてもよい。例えば、本発明の処理された細胞は、対象を治療するために利用されてもよい。例えば、リプログラミングされた細胞または分化した細

胞は、対象において疾患または障害を治療するために利用されてもよい。したがって、本発明は、本開示のマイクロ流体ベースのシステムを利用して対象において疾患または障害を治療する方法を提供する。方法は、（ａ）対象から試料を得る工程；（ｂ）試料をシステムに適用する工程；（ｃ）試料をシステムで処理する工程；および（ｄ）処理した細胞を対象に投与する工程を含む。

【０１１１】

実施形態において、対象は、試料を得るときに健常である。試料はリプログラミングされた細胞を生成するように処理され、リプログラミングされた細胞はカタログ化され保存される。疾患がありかつ医療的治療の必要があると対象が診断された後、リプログラミングされた細胞は、対象を治療するためにその後用いられる所望の細胞型の分化した細胞を生成するようにさらに処理されてもよい。いくつかの治療では、リプログラミングされた細胞が対象を治療するために用いられてもよい。（外胚葉系列、中胚葉系列、または内胚葉系列の）適切な分化細胞は、本発明の方法によって生成されたｉＰＳＣに由来してもよい。投与様式は、治療されるべき器官／損傷の種類に応じて、当業者によって決定することができる。例えば、ｉＰＳＣまたはそれに由来する分化細胞は、（懸濁物として）注射によって投与されてもよく、または生分解性マトリックス上に移植されてもよい。

【０１１２】

「健常な」、「正常な」、または「臨床的に正常な」という用語は、対象が、疾患と相関する、公知のまたは明らかなまたは現在検出可能な疾患または機能不全を有さないことを意味する。

【０１１３】

別の実施形態において、試料が得られる対象は、疾患または障害と診断されているか、またはそれを有するリスクがある。試料は、リプログラミングされた細胞を生成するように処理され、リプログラミングされた細胞は任意で保存される。対象の医療的治療が決定された後に、リプログラミングされた細胞は、対象を治療するのにその後使用される、所望の細胞型の分化細胞を生成するように、さらに処理されてもよい。一部の治療では、リプログラミングされた細胞が対象を治療するために用いられてもよい。

【０１１４】

「対象」は、任意の動物種、好ましくは、哺乳類種のメンバーであり、ヒトであってもよい。よって、本明細書に記載される方法および組成物は、ヒトおよび家畜の疾患どちらにも適用可能である。さらに、対象は好ましくは生きている生物であるが、本明細書に記載の発明は、加えて死後分析で用いられてもよい。好ましい対象は人であり、最も好ましくは、「患者」であり、本明細書で用いられる場合「患者」は、疾患または状態に対する医療ケアを受けている、生きているヒトを指す。これは、症状の徴候について検査中である、明確な疾病を伴わない人を包含する。対象は、明らかに健常な個体、疾患を患っている個体、または疾患の治療を行っている個体であり得る。

【０１１５】

さらに、ｉＰＳＣまたは分化した細胞を含む組成物、例えば、システムによって調製された有効量の細胞を含む、研究ツールとしてまたは薬学的組成物として利用される組成物もまた、本発明の範囲内であることが企図される。

【０１１６】

加えて本発明は、ｉＰＳＣ、それら由来の分化転換した細胞または分化した細胞と、例えば、１つまたは複数の目的の医用薬剤とを接触させること、および、その後、使用した医用薬剤が接触した細胞に及ぼす影響を検出することによる、医用薬剤を試験する方法に関する。効率を上げるために、医用薬剤を、一連のｉＰＳＣまたはそれら由来の分化細胞に使用する。目的の１つまたは複数の医用薬剤に、好ましく反応するまたは好ましくなく反応する細胞または組織型の同定を可能にするために、細胞は、組織源、分化した細胞型、または対立遺伝子源の点で、様々なものであってよい。

【０１１７】

さらに、本発明の自動化されたシステムによって作製されるｉＰＳＣは、遺伝的欠損、

例えば骨形成不全症、真性糖尿病、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病）、様々な運動神経疾患（ＭＮＤ）（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、原発性側索硬化症（ＰＬＳ）、進行性筋萎縮症（ＰＭＡ））などを修正するために遺伝子を導入するための媒体として使用してもよい。

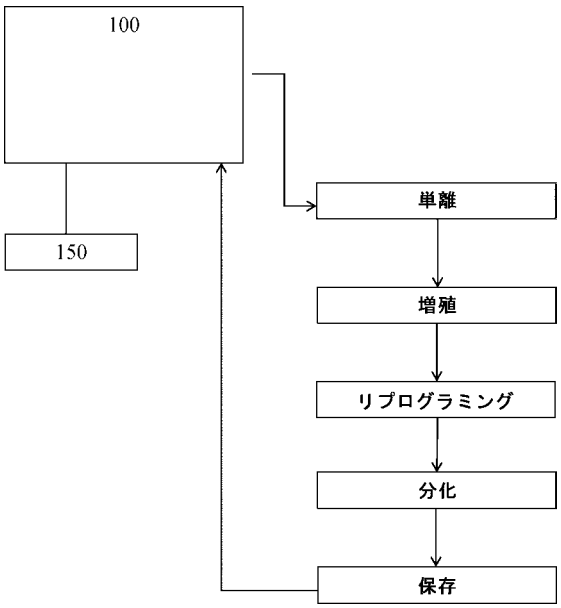
【０１１８】

本発明の自動化されたシステムによって作製されるｉＰＳＣを使用して、生物医学的な研究用の特定の細胞型を提供することもでき、同様に直接または前駆体として、細胞を用いたアッセイ用の、例えば細胞毒性研究（被検化合物が細胞毒性に及ぼす影響を決定するための研究）用の特定の細胞型を産生することもでき、細胞を化合物で処理してその細胞に対する化合物の影響、例えば細胞の分化に対する影響を観察および／または記録することによって、被検化合物の催奇性または発癌性を決定することもできる。

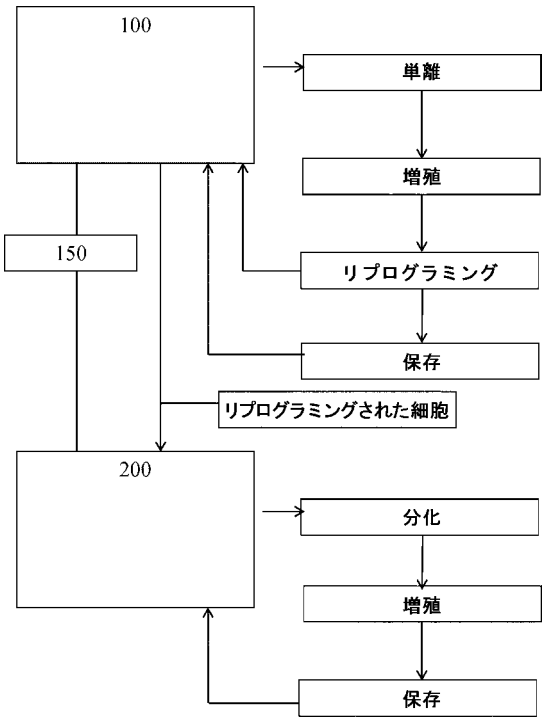
【０１１９】

本発明は、上記実施例を参照して説明されているが、改変および変更が本発明の精神および範囲の範囲内で包含されることが理解されるであろう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

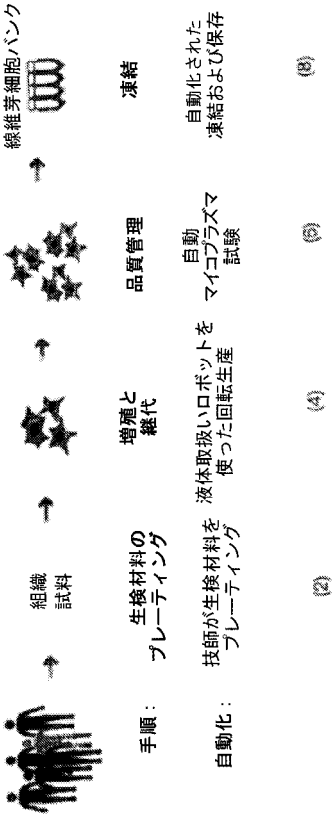
【図１】



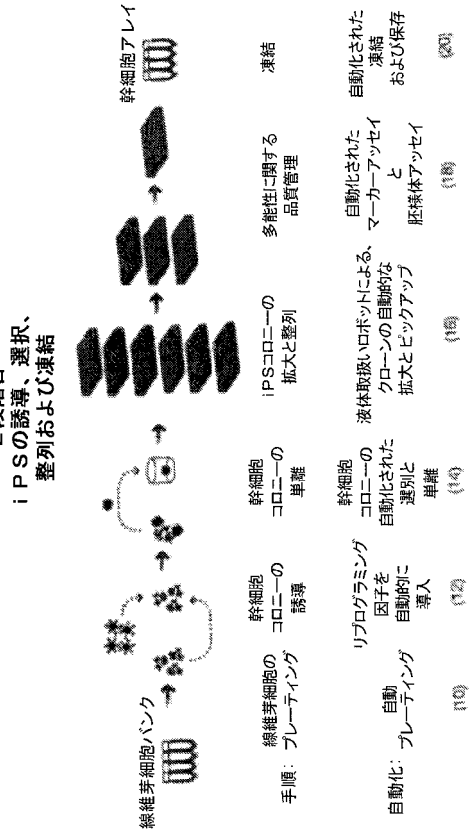
【図２】



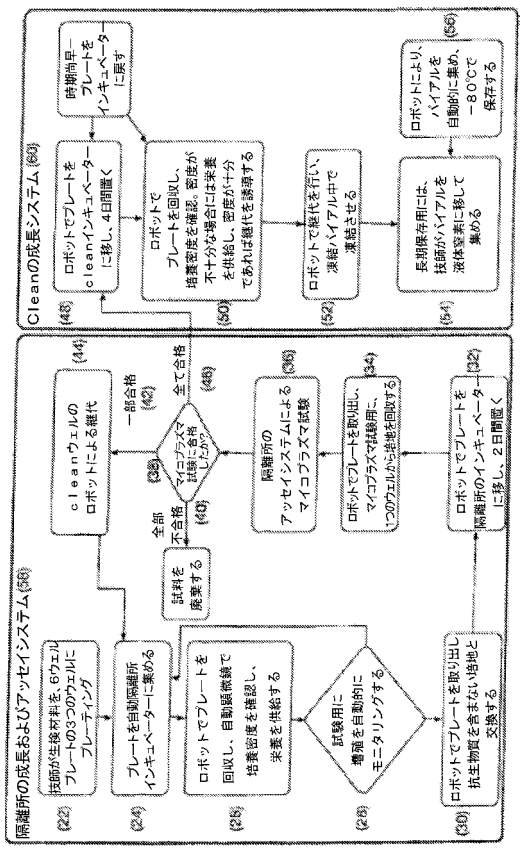
【図３】


1段階目
線維芽細胞バンクの作製
組織
試料
線維芽細胞バンク
(8)
手順：
生検材料の
プレーティング
増殖と
維持
品質管理
凍結
自動化：
技師が生検材料を
プレーティング
液体取扱いロボットを
使った回転生産
自動
マイコプラズマ
試験
自動化された
凍結および保存
(2)
(4)
(6)

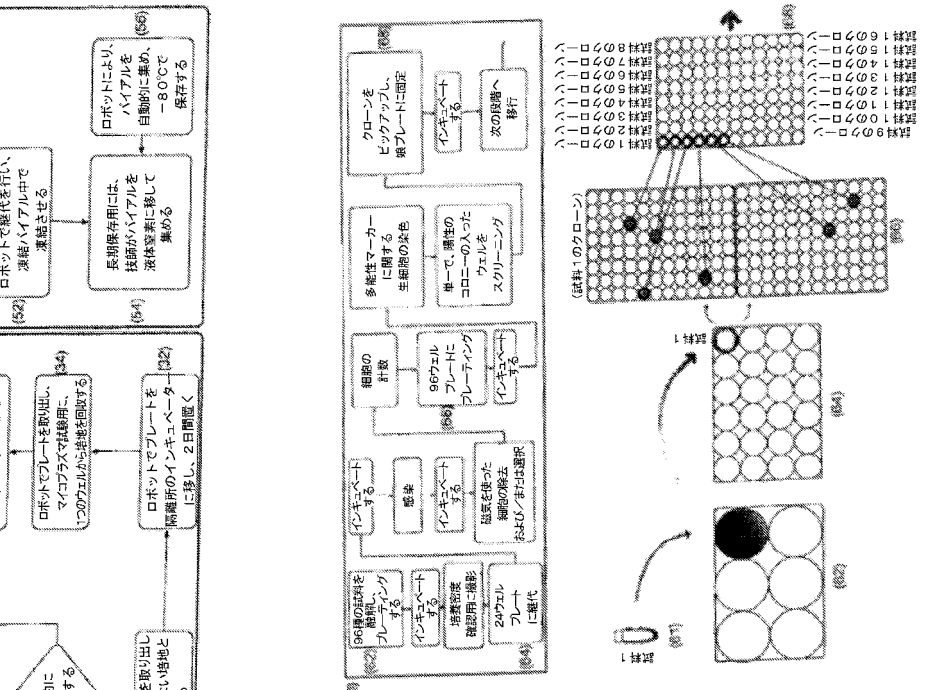
【図４】


2段階目
iPSの誘導、選択、
整列および凍結
幹細胞アレイ
線維芽細胞バンク
手順：
線維芽細胞の
プレーティング
幹細胞
コロニーの
誘導
幹細胞
コロニーの
単離
iPSコロニーの
拡大と整列
多能性に関する
品質管理
凍結
自動化：
自動
プレーティング
リプログラミング
因子を
自動的に
導入
幹細胞
コロニーの
自動化された
選別と
単離
液体取扱いロボットによる、
クローンの自動的な
拡大とピックアップ
自動化された
マーカーアッセイ
と
胚様体アッセイ
自動化された
凍結
および保存
(10)
(12)
(14)
(16)
(18)
(20)

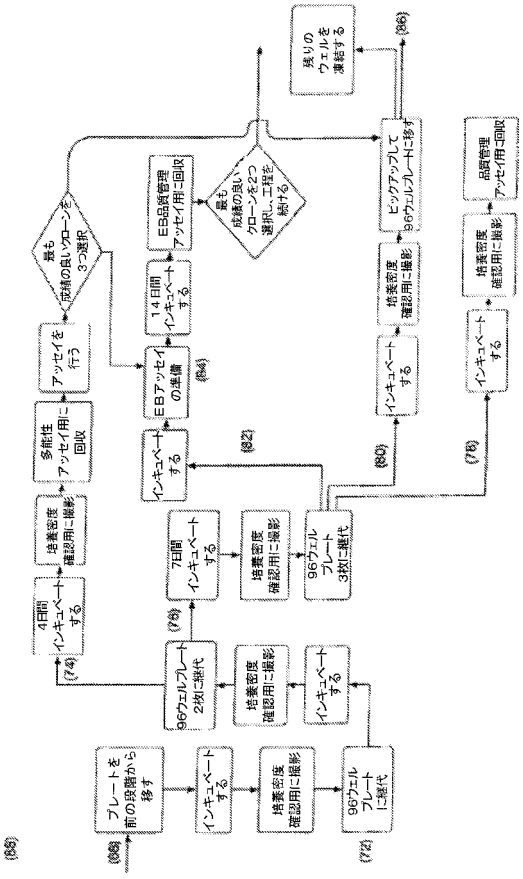
【図５】


隔離所の成長およびアッセイシステム(500)
Cleanの成長システム(503)
技師が生検材料を、6ウェルプレートの3つのウェルにプレーティング
(22)
プレートを自動隔離所インキュベーターに乗める
(24)
ロボットでプレートを回収し、自動顕微鏡で培養密度を確認し、栄養を供給する
(28)
試験用に増殖を自動的にモニタリングする
(26)
cleanウェルのロボットによる維持
(44)
試料を廃棄する
全部不合格
(48)
マイコプラズマ試験に合格したか？
(38)
一部合格
(42)
全て合格
(46)
隔離所のアッセイシステムによるマイコプラズマ試験
(36)
ロボットでプレートを取り出し、マイコプラズマ試験用に、このウェルから培地を回収する
(34)
ロボットでプレートを回収し、技師が生検材料を含まない培地と交換する
(30)
ロボットでプレートを隔離所のインキュベーターに移し、2日間置く
(32)
ロボットでプレートをcleanインキュベーターに移し、4日間置く
(48)
時期尚早－プレートをインキュベーターに戻す
ロボットでプレートを回収し、培養密度を確認。密度が不十分な場合には栄養を供給し、密度が十分であれば継代を誘導する
(50)
ロボットで継代を行い、凍結バイアル中で凍結させる
(52)
長期保存用には、技師がバイアルを液体窒素に移して集める
(54)
ロボットにより、バイアルを自動的に集め、－80℃で保存する
(56)

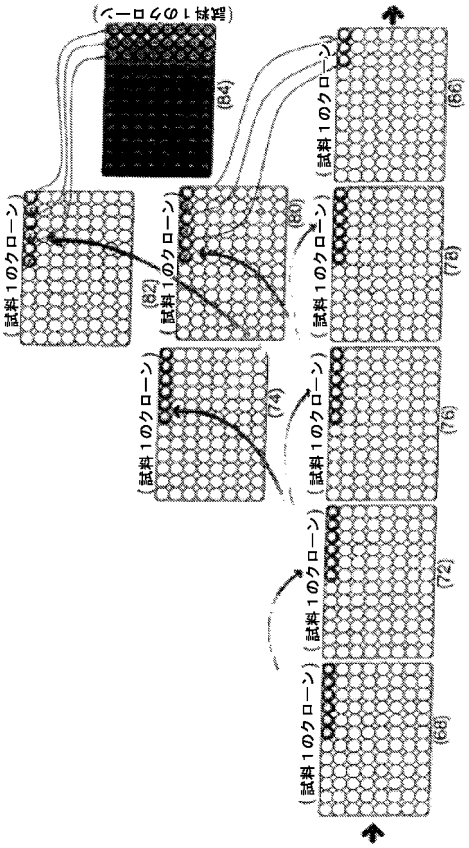
【図６Ａ】


(100)
96種の試料を継代プレーティングする
(102)
インキュベートする
(104)
培養密度確認用に撮影
24ウェルプレートに継代
(106)
(108)
(110)
(112)
(114)
(116)
(118)
(120)
(122)
(124)
(126)
(128)
(130)
(132)
(134)
(136)
(138)
(140)
(142)
(144)
(146)
(148)
(150)
(152)
(154)
(156)
(158)
(160)
(162)
(164)
(166)
(168)
(170)
(172)
(174)
(176)
(178)
(180)
(182)
(184)

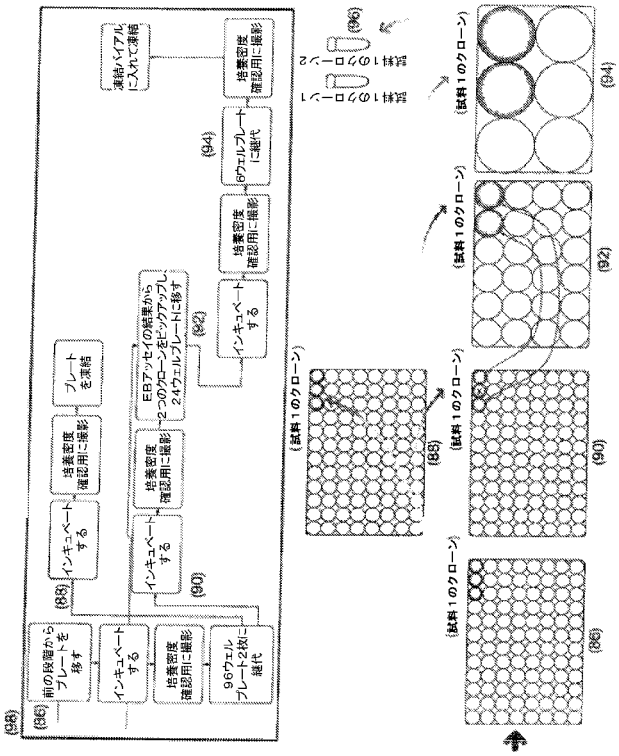
【図６Ｂ－１】



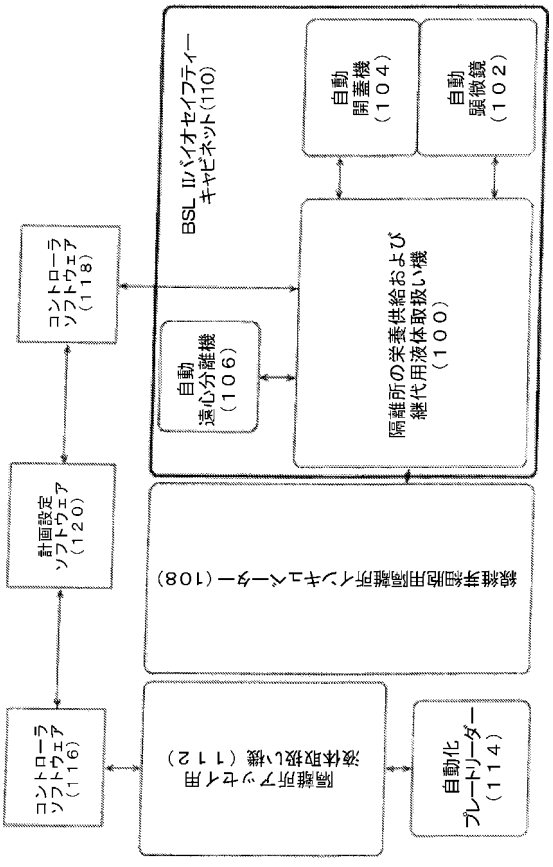
【図６Ｂ－２】



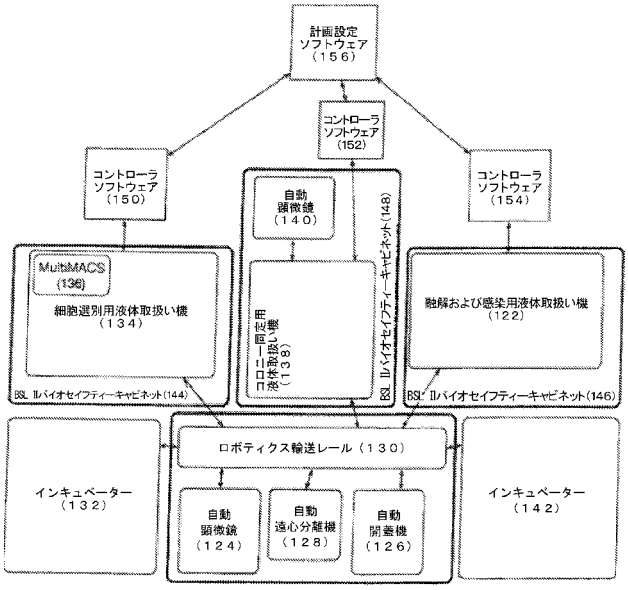
【図６Ｃ】



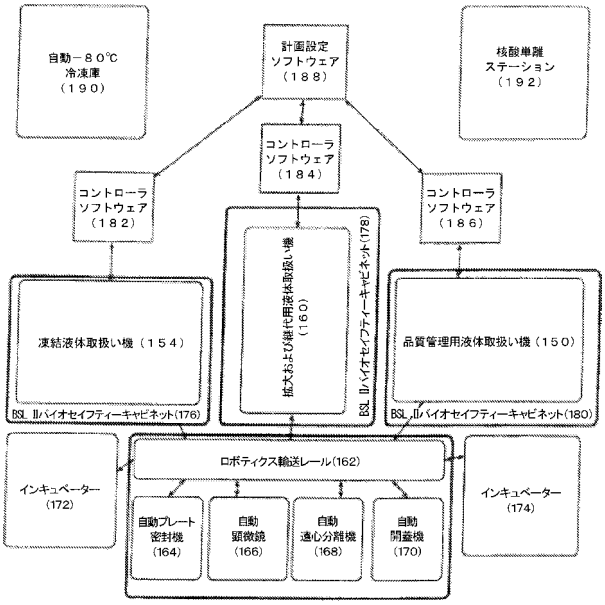
【図７Ａ】



【図７Ｂ】


計画設定
ソフトウェア
（１５６）
コントローラ
ソフトウェア
（１５０）
コントローラ
ソフトウェア
（１５２）
コントローラ
ソフトウェア
（１５４）
自動
顕微鏡
（１４０）
ロボット回収用
液体取扱い機
（１３８）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（148）
MultiMACS
（136）
細胞選別用液体取扱い機
（１３４）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（144）
融解および感染用液体取扱い機
（１２２）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（146）
インキュベーター
（１３２）
ロボティクス輸送レール（１３０）
自動
顕微鏡
（１２４）
自動
遠心分離機
（１２８）
自動
開蓋機
（１２６）
インキュベーター
（１４２）

【図７Ｃ】


自動－８０℃
冷凍庫
（１９０）
計画設定
ソフトウェア
（１８８）
核酸単離
ステーション
（１９２）
コントローラ
ソフトウェア
（１８２）
コントローラ
ソフトウェア
（１８４）
コントローラ
ソフトウェア
（１８６）
凍結液体取扱い機（１５４）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（176）
拡大および維代用液体取扱い機
（１６０）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（178）
品質管理用液体取扱い機（１５０）
BSL IIバイオセイフティーキャビネット（180）
インキュベーター
（172）
ロボティクス輸送レール（162）
自動プレート
密封機
（164）
自動
顕微鏡
（166）
自動
遠心分離機
（168）
自動
開蓋機
（170）
インキュベーター
（174）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/62344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12M 1/34, 3/00, 1/00 (2018.01)
CPC - C12M 47/04, 47/12, 47/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2012/0258488 A1 (ABILEZ, OJ, et al.) 11 October 2012; Abstract; Figures 2, 2 (continued); Paragraphs [0003]-[0005], [0008], [0021], [0022], [0024], [0025], [0032], [0065]-[0068], [0084], [0086]-[0089], [0096], [0099]	1-6, 9-15, 17, 18, 24/1-24/6, 24/9-24/15, 24/17, 24/18, 25/24/1-25/24/6, 25/24/9-25/24/15, 25/24/17, 25/24/18, 26/25/24/1-26/25/24/6, 26/25/24/9-26/25/24/15, 26/25/24/17, 26/25/24/18, 27/26/25/24/1-27/26/25/24/6, 27/26/25/24/9-27/26/25/24/15, 27/26/25/24/17, 27/26/25/24/18, 34/1-34/6, 34/9-34/15, 34/17, 34/18, 35/34/1-35/34/6, 35/34/9-35/34/15, 35/34/17, 35/34/18, 36/35/34/1-36/35/34/6, 36/35/34/9-36/35/34/15, 36/35/34/17, 36/35/34/18, 37/34/1-37/34/6, — -***-Next Page-***-

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 January 2018 (19.01.2018)	13 FEB 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/62344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	-***-Continued from Previous Page-***- US 2012/0258488 A1 (ABILEZ, OJ, et al.) 11 October 2012; Abstract; Figures 2, 2 (continued); Paragraphs [0003]-[0005], [0008], [0021], [0022], [0024], [0025], [0032], [0065]-[0068], [0084], [0086]-[0089], [0096], [0099]	37/34/9-37/34/15, 37/34/17, 37/34/18, 38/1-38/6, 38/9-38/15, 38/17, 38/18, 41-43 —— 7, 8, 16, 19-23, 24/7, 24/8, 24/16, 24/19, 24/20-24/23, 25/24/7, 25/24/8, 25/24/7, 25/24/19, 25/24/20-25/24/23, 26/25/24/7, 26/25/24/8, 26/25/24/16, 26/25/24/19, 26/25/24/20, 26/25/24/22, 26/25/24/23, 27/26/25/24/7, 27/26/25/24/8, 27/26/25/24/16, 27/26/25/24/19-27/26/25/24/23, 28/24/1-28/24/23, 29/28/24/1-29/28/24/23, 30/29/28/24/1-30/29/28/24/23, 31/28/24/1-31/28/24/23, 32/30/29/28/24/1-32/30/29/28/24/23, 33/32/30/29/24/1-33/32/30/29/28/24/23, 34/7, 34/8, 34/16, 34/19-34/23, 35/34/7, 35/34/8, 35/34/16, 35/34/19-35/34/22, 35/34/23, 36/35/34/7, 36/35/34/8, 36/35/34/16, 36/35/34/19-36/35/34/22, 37/34/7, 37/34/8, 37/34/16, 37/34/19-37/34/23, 38/7, 38/8, 38/16, 39/1-39/23, 40/39/1-40/39/23 -***-Next Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/62344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	-***-Continued from Previous Page-***- HASSAN, U et al. A Microfluidic Biochip for Complete Blood Cell Counts at the Point-of-Care. Technology (singap World Sci). 21 February 2016, Vol. 3, No. 4; Pages 201-213. DOI:10.1142/S2339547815500090.	-***-Continued-***- 7, 8, 16, 24/7, 24/8, 24/16, 25/24/7, 25/24/8, 25/24/7, 26/25/24/7, 26/25/24/8, 26/25/24/16, 27/26/25/24/7, 27/26/25/24/8, 27/26/25/24/16, 28/24/1-28/24/18, 29/28/24/1-29/28/24/18, 30/29/28/24/1-30/29/28/24/18, 31/28/24/1-31/28/24/18, 32/30/29/28/24/1-32/30/29/28/24/18, 33/32/30/29/24/1-33/32/30/29/24/18, 34/7, 34/8, 34/16, 35/34/7, 35/34/8, 35/34/16, 36/35/34/7, 36/35/34/8, 36/35/34/16, 39/7, 39/8, 39/16, 40/39/7, 40/39/8, 40/39/16
Y	PAMIES, D, et al. Good Cell Culture Practice for Stem Cells and Stem-Cell-Derived Models. t^ (4) Workshop Report. ALTEX Online First. 23 August 2016, No. 4. http://dx.doi.org/10.14573/altex.1607121; Page 1, Summary; Page 4, Fifth Paragraph – 3 The need for GCCP 2.0; Page 6, Paragraph 6 – Cell Purity, Stability and Functional Integrity.	19, 22, 23, 24/19, 24/22, 24/23, 25/24/19, 25/24/22, 25/24/23, 26/25/24/19, 26/25/24/22, 26/25/24/23, 27/26/25/24/19, 27/26/25/24/22, 27/26/25/24/23, 28/24/19, 28/24/22, 28/24/23, 29/28/24/19, 29/28/24/22, 29/28/24/23, 30/29/28/24/19, 30/29/28/24/22, 30/29/28/24/23. 31/28/24/19, 31/28/24/22, 31/28/24/23, 32/30/29/28/24/19, 32/30/29/28/24/22, 32/30/29/28/24/23, 33/32/30/29/28/24/19, 33/32/30/29/28/24/22, 33/32/30/29/28/24/23, 34/19, 34/22, 34/23, 35/34/19, 35/34/22, 35/34/23, 36/35/34/19, 36/35/34/22, 36/35/34/23, 37/34/19, 37/34/22, 37/34/23, 38/7, 38/8, 38/16, 39/1-39/22, 39/23, 40/39/1-40/39/23 -***-Continued-***-
	-***-Continued on Next Page-***-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/62344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	-***-Continued from Previous Page-***- JONCZYK, R. Review: Living Cell Microarrays: An Overview of Concepts. Microarrays. 26 May 2016, Vol. 5, No. 11. doi:10.3390/microarrays5020011.	-***-Continued-***- 20, 21, 24/20, 24/21, 25/24/20, 25/24/21, 26/25/24/20, 26/25/24/22, 26/25/24/23, 27/26/25/24/20, 27/26/25/24/21, 27/26/25/24/22, 27/26/25/24/23, 28/24/20, 28/24/21, 29/28/24/20, 29/28/24/21, 30/29/28/24/20, 30/29/28/24/21, 31/28/24/20, 31/28/24/21, 32/30/29/28/24/20, 32/30/29/28/24/21, 33/32/30/29/28/24/20, 33/32/30/29/28/24/21, 34/20, 34/21, 35/34/20, 35/34/21, 36/35/34/20, 36/35/34/21, 37/34/20, 37/34/21, 39/20, 39/21, 40/39/20, 40/39/21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6837*	*(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6837	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/071*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		
Ａ６１Ｋ	*35/545*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/545		
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		

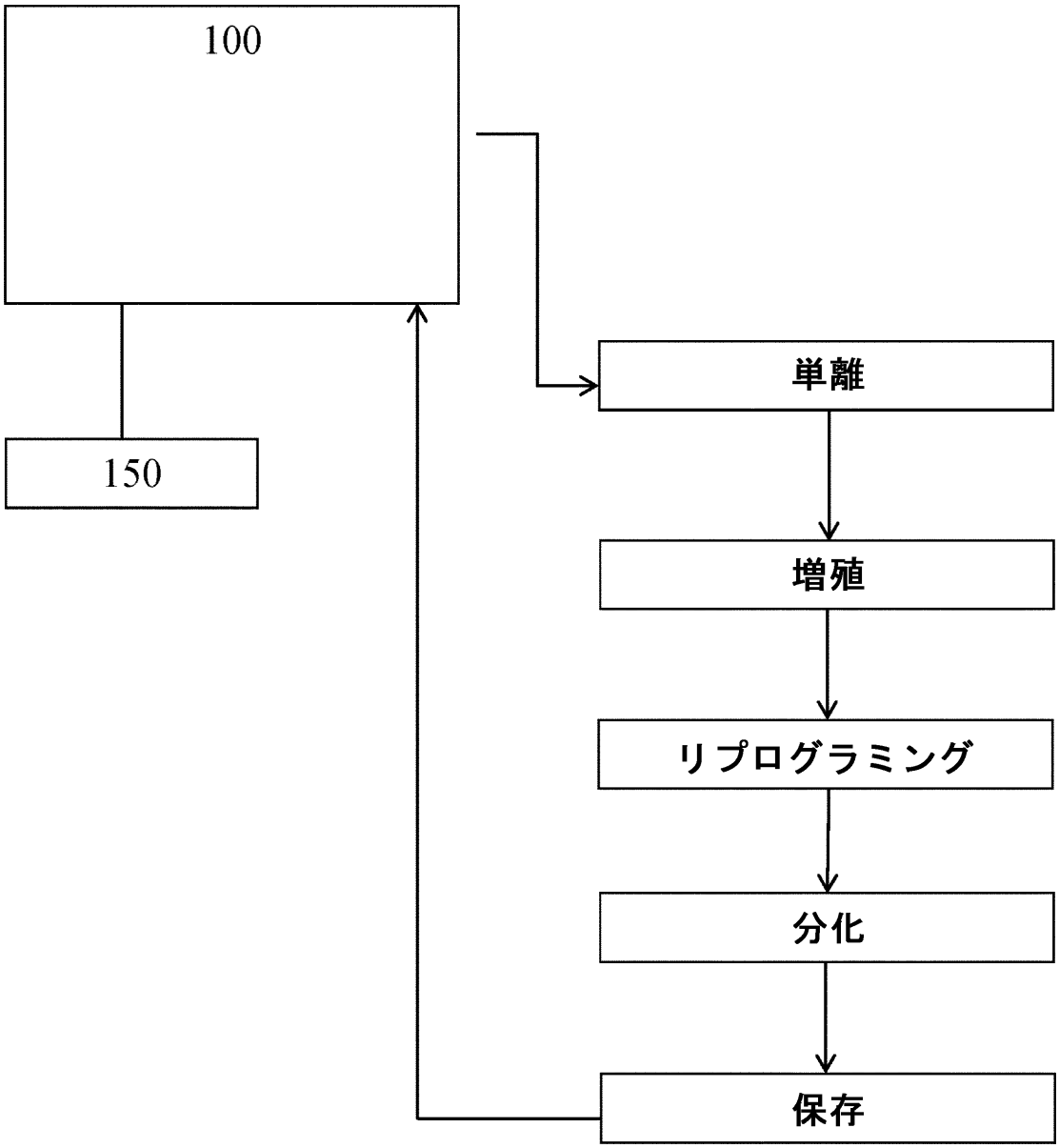
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,E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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＷＩＮＤＯＷＳ

(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺　秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100114889
弁理士　五十嵐　義弘
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ノッグル　スコット
アメリカ合衆国　１００１９　ニューヨーク州　ニューヨーク　ウエスト　フィフティーフォース　ストリート　６１９　サード　フロア
(72)発明者　チャン　スティーブン
アメリカ合衆国　１００１９　ニューヨーク州　ニューヨーク　ウエスト　フィフティーフォース　ストリート　６１９　サード　フロア

Ｆターム(参考)　4B029 AA01 AA09 BB11 CC02 DG08 GA03 GB04 GB05
4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55
QR62 QS25 QS32 QS36 QX02
4B065 AA90X AB01 AC20 CA44 CA46
4C087 AA01 AA03 BB33 BB37 BB64 CA04 NA20 ZA01 ZA02 ZA16
ZA36 ZA55 ZA75 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB26 ZC35

【要約の続き】


100
150
単離
増殖
リプログラミング
分化
保存