

(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2021-530232

(P2021-530232A)

(43) 公表日 令和3年11月11日 (2021.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 O	4 C 0 8 1
C 1 2 N 5/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-502525 (P2021-502525)
 (86) (22) 出願日 令和1年7月17日 (2019.7.17)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年3月11日 (2021.3.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/042117
 (87) 国際公開番号 W02020/018615
 (87) 国際公開日 令和2年1月23日 (2020.1.23)
 (31) 優先権主張番号 62/698, 965
 (32) 優先日 平成30年7月17日 (2018.7.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/698, 973
 (32) 優先日 平成30年7月17日 (2018.7.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 The Regents of the
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 607-5200, オークランド、フラン
 クリン ストリート 1111, 12番
 フロア
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 230118913
 弁護士 杉村 光嗣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫改変された多能性細胞から分化させた細胞

(57) 【要約】

本発明は、普遍的に許容可能な「容易に入手可能である」低免疫原性多能性細胞及びその分化した心臓、内皮、神経、膵島又は網膜色素細胞を提供する。このような低免疫細胞は、それを必要とする患者を処置するために使用される。本細胞は、免疫応答を惹起する主要免疫抗原を欠き、食作用性のエンドサイトーシスを回避するために改変されている。

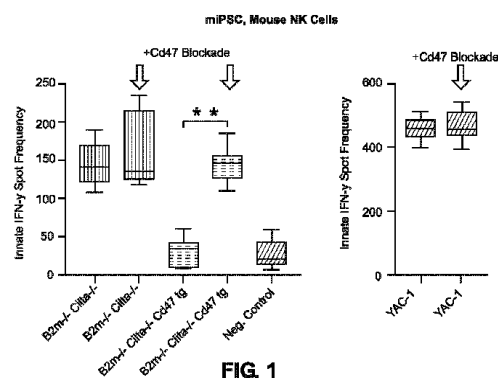


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

低免疫誘導多能性幹細胞（H I P 細胞）から分化させられた単離低免疫心臓細胞であって、

内在性 - 2 ミクログロブリン（B 2 M）遺伝子活性及び内在性クラス I I トランス活性化因子（C I I T A）遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇している、単離低免疫心臓細胞。

【請求項 2】

前記 H I P 細胞がヒト i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でヒト C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 に記載の単離低免疫心臓細胞。

10

【請求項 3】

前記 H I P 細胞がマウス i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でマウス C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 4】

B 2 M 遺伝子活性の前記排除が、前記 B 2 M 遺伝子の両アレルを破壊するクラスター化された規則的配置の短回文配列リピート（C R I S P R）/ C a s 9 反応の結果である、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の単離低免疫心臓細胞。

20

【請求項 5】

C I I T A 遺伝子活性の前記排除が、前記 C I I T A 遺伝子の両アレルを破壊する C R I S P R / C a s 9 反応の結果である、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 6】

前記 H I P 細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 7】

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（H S V - t k）遺伝子であり、前記トリガー物質がガンシクロビルである、請求項 6 に記載の単離低免疫心臓細胞。

30

【請求項 8】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 7 に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 9】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 7 に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 10】

前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ（E s c h e r i c h i a c o l i）シトシンデアミナーゼ（C D）遺伝子であり、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン（5 - F C）である、請求項 6 に記載の単離低免疫心臓細胞。

40

【請求項 11】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 10 に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 12】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 10 に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 13】

前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードし、前記トリガー物質が二量体誘導化合物（C I D）である、請求項 6 に記載の単離低免疫心臓細胞。

50

【請求項 14】

前記誘導型カスパーゼ9タンパク質が、配列番号6に対して少なくとも90%の配列同一性を含む、請求項13に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 15】

前記誘導型カスパーゼ9タンパク質が、配列番号6のアミノ酸配列を含む、請求項13に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 16】

前記CIDが化合物AP1903である、請求項13～15の何れか1項に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 17】

前記単離低免疫心臓細胞が、心筋細胞、結節心筋細胞、伝導性心筋細胞、作業心筋細胞、心筋細胞前駆体、心筋細胞祖先細胞、心臓幹細胞及び心臓筋肉細胞からなる群から選択される、請求項13～16の何れか1項に記載の単離低免疫心臓細胞。

【請求項 18】

心臓状態又は疾患に罹患している患者を処置する方法であって、請求項1～17の何れか1項に記載の単離低免疫心臓細胞集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 19】

前記組成物が治療的に有効な担体をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記投与が、前記患者の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射又は点滴を含む、請求項18又は19に記載の方法。

【請求項 21】

前記心臓状態又は疾患が、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、他の心筋症、心筋炎、心筋虚血性再灌流障害、心室機能不全、心不全、うっ血性心不全、冠動脈疾患、末期心疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心臓、動脈炎又は循環器疾患からなる群から選択される、請求項18～20の何れか1項に記載の方法。

【請求項 22】

インビトロ分化によって低免疫多能性細胞(HIP細胞)集団から低免疫心臓細胞集団を作製する方法であって、前記HIP細胞において、内在性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性及び内在性クラスIIトランス活性化因子(CIITA)遺伝子活性が排除され、CD47発現が上昇しており、

前記方法が、

(a) GSK阻害剤を含む培地中でHIP細胞集団を培養し；

(b) 前駆心臓細胞集団を作製するために、WNTアンタゴニスを含む培地中で前記HIP細胞集団を培養し；

(c) 心臓細胞集団を作製するために、インスリンを含む培地中で前記前駆心臓細胞集団を培養することを含む、方法。

【請求項 23】

前記GSK阻害剤が、CHIR-99021、その誘導体又はその変異体である、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記GSK阻害剤が、約2 μ M～約10 μ Mの範囲の濃度である、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項 25】

前記WNTアンタゴニスが、IWR1、その誘導体又はその変異体である、請求項22

10

20

30

40

50

～ 24 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 WNT アンタゴニスが、約 $2 \mu\text{M}$ ～ 約 $10 \mu\text{M}$ の範囲の濃度である、請求項 22 ～ 25 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

グルコース不含培地中で段階 (c) の前記前駆心臓細胞集団を培養することをさらに含む、請求項 22 ～ 26 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 HIP 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (c) の前記前駆心臓細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - tk) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) シトシンデアミナーゼ (CD) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - FC) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (CID) である、請求項 22 ～ 27 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 HIP 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (d) の前記心臓細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - tk) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) シトシンデアミナーゼ (CD) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - FC) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (CID) である、請求項 22 ～ 28 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

非心臓細胞から前記低免疫心臓細胞集団を単離することをさらに含む、請求項 22 ～ 29 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

単離した低免疫心臓細胞集団を凍結保存することをさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

低免疫多能性幹細胞 (HIP 細胞) から分化させられた単離低免疫内皮細胞であって、内在性 - 2 ミクログロブリン (B2M) 遺伝子活性及び内在性クラス II トランス活性化因子 (CIITA) 遺伝子活性が排除され、CD47 発現が上昇している、単離低免疫内皮細胞。

【請求項 33】

前記 HIP 細胞がヒト iPSC であり、前記 B2M 遺伝子がヒト B2M 遺伝子であり、前記 CIITA 遺伝子がヒト B2M 遺伝子であり、前記 CD47 発現上昇が、プロモーターの制御下でヒト CD47 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 iPSC に導入した結果である、請求項 32 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 34】

前記 iPS HIP 細胞 C がマウス iPSC であり、前記 B2M 遺伝子がマウス B2M 遺伝子であり、前記 CIITA 遺伝子がマウス B2M 遺伝子であり、前記 CD47 発現上昇が、プロモーターの制御下でマウス CD47 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 iPS C に導入した結果である、請求項 32 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 35】

B2M 遺伝子活性の前記排除が、前記 B2M 遺伝子の両アレルを破壊する、クラスター化された規則的配置の短回文配列リピート (CRISPR) / Cas9 反応の結果である、請求項 32 ～ 34 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

C I I T A 遺伝子活性の前記排除が、前記 C I I T A 遺伝子の両アレルを破壊する C R I S P R / C a s 9 反応の結果である、請求項 32 ~ 35 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 37】

前記 H I P 細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む、請求項 32 ~ 36 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 38】

前記自殺遺伝子が、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子であり、前記トリガー物質がガンシクロビルである、請求項 37 に記載の単離低免疫内皮細胞。

10

【請求項 39】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 38 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 40】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 38 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 41】

前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子であり、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) である、請求項 37 に記載の単離低免疫内皮細胞。

20

【請求項 42】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 41 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 43】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 41 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 44】

前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードし、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 41 に記載の単離低免疫内皮細胞。

30

【請求項 45】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を含む、請求項 44 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 46】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 44 に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 47】

前記 C I D が化合物 A P 1 9 0 3 である、請求項 44 ~ 46 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞。

【請求項 48】

前記単離低免疫内皮細胞が、毛細血管内皮細胞、血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、脳内皮細胞及び腎臓内皮細胞からなる群から選択される、請求項 44 ~ 46 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞。

40

【請求項 49】

血管状態又は疾患に罹患している患者を処置する方法であって、治療的有効量の請求項 32 ~ 48 の何れか 1 項に記載の単離低免疫内皮細胞集団を含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 50】

前記組成物が治療的に有効な担体をさらに含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

50

前記投与が、前記患者の組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射又は点滴を含む、請求項 49 又は 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記血管状態又は疾患が、血管損傷、循環器疾患、血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、高血圧、虚血性組織損傷、虚血肢、脳卒中、神経障害及び脳血管疾患からなる群から選択される、請求項 49～51 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

インビトロ分化による低免疫多能性幹細胞（HI P 細胞）集団から低免疫内皮細胞集団を作製する方法であって、前記 HI P 細胞において、内在性 - 2 ミクログロブリン（B 2 M）遺伝子活性及び内在性クラス I I トランス活性化因子（C I I T A）遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇しており、

10

前記方法が、

（a）G S K 阻害剤を含む第 1 の培地中で HI P 細胞集団を培養し；

（b）前駆内皮細胞集団を作製するために V E G F 及び b F G F を含む第 2 の培地中で前記 HI P 細胞集団を培養し；

（c）低免疫内皮細胞集団を作製するために R O C K 阻害剤及び A L K 阻害剤を含む第 3 の培地中で前記前駆内皮細胞集団を培養すること

を含む、方法。

【請求項 54】

20

前記 G S K 阻害剤が、C H I R - 9 9 0 2 1、その誘導体又はその変異体である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記 G S K 阻害剤が約 1 μ M ～ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 53 又は 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記 R O C K 阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、その誘導体又はその変異体である、請求項 53～55 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

前記 R O C K 阻害剤が約 1 μ M ～ 約 2 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 53～56 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 58】

前記 A L K 阻害剤が、S B - 4 3 1 5 4 2、その誘導体又はその変異体である、請求項 53～55 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

前記 A L K 阻害剤が約 0 . 5 μ M ～ 約 1 0 μ M の濃度範囲である、請求項 53～56 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

前記第 1 の培地が 2 μ M ～ 約 1 0 μ M の C H I R - 9 9 0 2 1 を含む、請求項 53～59 の何れか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 61】

前記第 2 の培地が、5 0 n g / m L V E G F 及び 1 0 n g / m L b F G F を含む、請求項 53～60 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記第 2 の培地が Y - 2 7 6 3 2 及び S B - 4 3 1 5 4 2 をさらに含む、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記第 3 の培地が 1 0 μ M Y - 2 7 6 3 2 及び 1 μ M S B - 4 3 1 5 4 2 を含む、請求項 53～62 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 64】

50

前記第3の培地がVEGF及びbFGFをさらに含む、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記第1の培地及び/又は前記第2の培地がインスリンを欠く、請求項53～64の何れか1項に記載の方法。

【請求項66】

前記HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、前記第2の培地がトリガー物質をさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(Escherichia coli)シトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子である場合、前記トリガー物質が5-フルオロシトシン(5-FC)であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物(CID)である、請求項53～65の何れか1項に記載の方法。

10

【請求項67】

前記HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、前記第3の培地がトリガー物質をさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(Escherichia coli)シトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子である場合、前記トリガー物質が5-フルオロシトシン(5-FC)であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物(CID)である、請求項53～66の何れか1項に記載の方法。

20

【請求項68】

非内皮細胞から前記低免疫内皮細胞集団を単離することをさらに含む、請求項53～67の何れか1項に記載の方法。

【請求項69】

前記単離した低免疫内皮細胞集団を凍結保存することをさらに含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

低免疫多能性幹細胞(HIP細胞)から分化させられた単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン(DN)であって、

30

内在性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性及び内在性クラスIIトランス活性化因子(CIITA)遺伝子活性が排除され、CD47発現が上昇している、単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン(DN)。

【請求項71】

前記HIP細胞がヒトiPSCであり、前記B2M遺伝子がヒトB2M遺伝子であり、前記CIITA遺伝子がヒトB2M遺伝子であり、前記CD47発現上昇が、プロモーターの制御下でヒトCD47遺伝子の少なくとも1コピーを前記iPSCに導入した結果である、請求項70に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項72】

40

前記HIP細胞がマウスiPSCであり、前記B2M遺伝子がマウスB2M遺伝子であり、前記CIITA遺伝子がマウスB2M遺伝子であり、前記CD47発現上昇が、プロモーター制御下でマウスCD47遺伝子の少なくとも1コピーを前記iPSCに導入した結果である、請求項70に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項73】

B2M遺伝子活性の前記排除が、前記B2M遺伝子の両アレルを破壊するクラスター化された規則的配置の短回文配列リピート(CRISPR)/Cas9反応の結果である、請求項70～72の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項74】

CIITA遺伝子活性の前記排除が、前記CIITA遺伝子の両アレルを破壊するCR

50

ISPR/Cas9反応の結果である、請求項70～73の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項75】

前記HIP細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む、請求項70～74の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項76】

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子であり、前記トリガー物質がガンシクロビルである、請求項75に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項77】

前記HSV-tk遺伝子が、配列番号4に対して少なくとも90%の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項76に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項78】

前記HSV-tk遺伝子が、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項76に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項79】

前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(Escherichia coli)シトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子であり、前記トリガー物質が5-フルオロシトシン(5-FC)である、請求項75に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項80】

前記CD遺伝子が、配列番号5に対して少なくとも90%の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項79に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項81】

前記CD遺伝子が、配列番号5のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項79に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項82】

前記自殺遺伝子が、誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードし、前記トリガー物質が二量体誘導化合物(CID)である、請求項75に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項83】

前記誘導型カスパーゼ9タンパク質が、配列番号6に対して少なくとも90%の配列同一性を含む、請求項82に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項84】

前記誘導型カスパーゼ9タンパク質が配列番号6のアミノ酸配列を含む、請求項82に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項85】

前記CIDが化合物AP1903である、請求項82～84の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項86】

前記単離低免疫ドーパミン作動性ニューロンが、神経幹細胞、神経祖先細胞、未熟ドーパミン作動性ニューロン及び成熟ドーパミン作動性ニューロンからなる群から選択される、請求項82～85の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン。

【請求項87】

神経変性疾患又は状態に罹患している患者を処置する方法であって、治療的有効量の請求項70～86の何れか1項に記載の単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項88】

前記組成物が治療的に有効な担体をさらに含む、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

前記単離低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団が生体分解性足場上にある、請求項8

10

20

30

40

50

7又は88に記載の方法。

【請求項90】

前記投与が移植又は注入を含む、請求項87～89の何れか1項に記載の方法。

【請求項91】

前記神経変性疾患又は状態が、パーキンソン病、ハンチントン病及び多発性硬化症からなる群から選択される、請求項87～90の何れか1項に記載の方法。

【請求項92】

インビトロ分化によって低免疫多能性細胞（HIP細胞）集団から低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を作製する方法であって、前記HIP細胞中で、内在性 - 2ミクログロブリン（B2M）遺伝子活性及び内在性クラスIIトランス活性化因子（CIITA）遺伝子活性が排除され、CD47発現が上昇しており、

10

前記方法が、

（a）未熟ドーパミン作動性ニューロン集団を作製するために、ソニックヘッジホッグ（SHH）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、線維芽細胞増殖因子8（FGF8）、WNT1、レチノイン酸、GSK3 阻害剤、ALK阻害剤及びROCK阻害剤からなる群から選択される1つ以上の因子を含む第1の培地中で前記HIP細胞集団を培養し；

（b）低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を作製するために、前記第1の培地とは異なる第2の培地中で前記未熟ドーパミン作動性ニューロン集団を培養すること、

20

を含む、方法。

【請求項93】

前記GSK3 阻害剤が、CHIR - 99021、その誘導体又はその変異体である、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

前記GSK3 阻害剤が、約2 μM～約10 μMの範囲の濃度である、請求項92又は93に記載の方法。

【請求項95】

前記ALK阻害剤が、SB - 431542、その誘導体又はその変異体である、請求項92～94の何れか1項に記載の方法。

【請求項96】

30

前記ALK阻害剤が、約1 μM～約10 μMの範囲の濃度である、請求項92～95の何れか1項に記載の方法。

【請求項97】

前記第1の培地及び/又は第2の培地が動物血清を欠く、請求項92～96の何れか1項に記載の方法。

【請求項98】

前記HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階（a）の前記未熟ドーパミン作動性ニューロン集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV - tk）遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ（Escherichia coli）シトシンデアミナーゼ（CD）遺伝子である場合、前記トリガー物質が5 - フルオロシトシン（5 - FC）であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物（CID）である、請求項92～95の何れか1項に記載の方法。

40

【請求項99】

前記HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階（b）の前記ドーパミン作動性ニューロン集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV - tk）遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ（Escherichia coli）シトシンデアミナーゼ（CD）遺伝子である

50

場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 9 2 ~ 9 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

非ドーパミン作動性ニューロンから前記低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を単離することをさらに含む、請求項 9 2 ~ 9 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記単離された低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を凍結保存することをさらに含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス I I トランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇している、低免疫誘導多能性幹細胞 (H I P 細胞) から分化させられた単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 3】

前記 H I P 細胞がヒト i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でヒト C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 0 2 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 4】

前記 H I P 細胞がマウス i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でマウス C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 0 2 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 5】

B 2 M 遺伝子活性の前記排除が、前記 B 2 M 遺伝子の両アレルを破壊するクラスター化された規則的配置の短回文配列リピート (C R I S P R) / C a s 9 反応の結果である、請求項 1 0 2 ~ 1 0 4 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 6】

C I I T A 遺伝子活性の前記排除が、前記 C I I T A 遺伝子の両アレルを破壊する C R I S P R / C a s 9 反応の結果である、請求項 1 0 2 ~ 1 0 5 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 7】

前記 H I P 細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む、請求項 1 0 2 ~ 1 0 6 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 8】

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子であり、前記トリガー物質がガンシクロビルである、請求項 1 0 7 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 0 9】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 1 0 8 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 0】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 1 0 8 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 1】

前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子であり、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) である、請求項 1 0 7 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 2】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク

10

20

30

40

50

質をコードする、請求項 1 1 1 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 3】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 1 1 1 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 4】

前記自殺遺伝子が、誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードし、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 0 7 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 5】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む、請求項 1 1 4 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 6】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 4 に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 7】

前記 C I D が化合物 A P 1 9 0 3 である、請求項 1 1 4 ~ 1 1 6 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 8】

前記単離低免疫膵島細胞が、膵島祖先細胞、未熟膵島細胞及び成熟膵島細胞からなる群から選択される、請求項 1 1 4 ~ 1 1 7 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞。

【請求項 1 1 9】

治療的有効量の請求項 1 0 2 ~ 1 1 8 の何れか 1 項に記載の単離低免疫膵島細胞集団を含む組成物を投与することを含む、糖尿病に罹患している患者を処置する方法。

【請求項 1 2 0】

前記組成物が治療的に有効な担体をさらに含む、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記単離低免疫膵島細胞集団が生体分解性足場上にある、請求項 1 1 9 又は 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記投与が移植又は注入を含む、請求項 1 1 9 ~ 1 2 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

インビトロ分化により低免疫原性多能性細胞 (H I P 細胞) 集団から低免疫膵島細胞集団を作製する方法であって、低免疫原性 i P S C において、内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス I イトランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇しており、

前記方法が、

(a) 未熟膵島細胞集団を作製するために、インスリン様増殖因子 (I G F)、トランスフォーミング増殖因子 (T G F)、線維芽細胞増殖因子 (E G F)、上皮増殖因子 (E G F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、ソニックヘッジホッグ (S H H) 及び血管内皮細胞増殖因子 (V E G F)、トランスフォーミング増殖因子 - (T G F) スーパーファミリー、骨形成タンパク質 - 2 (B M P 2)、骨形成タンパク質 - 7 (B M P 7)、G S K 3

阻害剤、A L K 阻害剤、B M P 1 型受容体阻害剤及びレチノイン酸からなる群から選択される 1 つ以上の因子を含む第 1 の培地中で前記 H I P 細胞集団を培養し；

(b) 膵島細胞集団を作製するために、前記第 1 の培地とは異なる第 2 の培地中で前記未熟膵島細胞集団を培養すること

を含む方法。

【請求項 1 2 4】

前記 G S K 3 阻害剤が、C H I R - 9 9 0 2 1、その誘導體又はその変異体である、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記 G S K 3 阻害剤が、約 2 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 1 2 3 又

10

20

30

40

50

は 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記 A L K 阻害剤が、S B - 4 3 1 5 4 2、その誘導体又はその変異体である、請求項 1 2 3 ~ 1 2 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 A L K 阻害剤が、約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 1 2 3 ~ 1 2 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記第 1 の培地及び / 又は第 2 の培地が動物血清を欠く、請求項 1 2 3 ~ 1 2 7 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 2 9】

前記 H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (a) の前記未熟臍島細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 2 3 ~ 1 2 8 の何れか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 3 0】

前記 H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (b) の前記臍島細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 2 3 ~ 1 2 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

非臍島細胞から前記低免疫臍島細胞集団を単離することをさらに含む、請求項 1 2 3 ~ 1 3 0 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 3 2】

前記単離された低免疫臍島細胞集団を凍結保存することをさらに含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

低免疫誘導多能性幹細胞 (H I P 細胞) から分化させられた単離低免疫網膜色素上皮 (R P E) 細胞であって、

内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス I I トランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇している、単離低免疫網膜色素上皮 (R P E) 細胞。

40

【請求項 1 3 4】

前記 H I P 細胞がヒト i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がヒト B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でヒト C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 3 3 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 3 5】

前記 H I P 細胞がマウス i P S C であり、前記 B 2 M 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C I I T A 遺伝子がマウス B 2 M 遺伝子であり、前記 C D 4 7 発現上昇が、プロモーターの制御下でマウス C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 コピーを前記 i P S C に導入した結果である、請求項 1 3 3 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

50

【請求項 1 3 6】

B 2 M 遺伝子活性の前記排除が、前記 B 2 M 遺伝子の両アレルを破壊するクラスター化された規則的配置の短回文配列リピート (C R I S P R) / C a s 9 反応の結果である、請求項 1 3 3 ~ 1 3 5 の何れか 1 項に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 3 7】

C I I T A 遺伝子活性の前記排除が、前記 C I I T A 遺伝子の両アレルを破壊する C R I S P R / C a s 9 反応の結果である、請求項 1 3 3 ~ 1 3 6 の何れか 1 項に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 3 8】

前記 H I P 細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む、請求項 1 3 3 ~ 1 3 7 の何れか 1 項に記載の単離改変 R P E 細胞。

【請求項 1 3 9】

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子であり、前記トリガー物質がガンシクロビルである、請求項 1 3 8 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 0】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 1 3 9 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 1】

前記 H S V - t k 遺伝子が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 1 3 9 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 2】

前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子であり、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) である、請求項 1 3 8 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 3】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含むタンパク質をコードする、請求項 1 4 2 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 4】

前記 C D 遺伝子が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、請求項 1 4 2 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 5】

前記自殺遺伝子が、誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードし、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 3 8 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 6】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む、請求項 1 4 5 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 7】

前記誘導型カスパーゼ 9 タンパク質が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 5 に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 8】

前記 C I D が化合物 A P 1 9 0 3 である、請求項 1 4 5 ~ 1 4 7 の何れか 1 項に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 4 9】

前記単離低免疫 R P E 細胞が、R P E 祖先細胞、未熟 R P E 細胞、成熟 R P E 細胞及び機能的 R P E 細胞からなる群から選択される、請求項 1 4 5 ~ 1 4 8 の何れか 1 項に記載の単離低免疫 R P E 細胞。

【請求項 1 5 0】

治療的有効量の請求項 1 3 3 ~ 1 4 9 の何れか 1 項に記載の単離低免疫 R P E 細胞集団を含む組成物を投与することを含む、眼科状態に罹患している患者を処置する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 5 1】

前記組成物が、治療的に有効な担体をさらに含む、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記単離低免疫 R P E 細胞集団が生体分解性足場上にある、請求項 1 5 0 又は 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記投与が、前記患者の網膜への移植又は注入を含む、請求項 1 5 0 ~ 1 5 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記眼科状態が、滲出型黄斑変性、萎縮型黄斑変性、若年性黄斑変性、レーバー先天黒内障、網膜色素変性症及び網膜剥離からなる群から選択される、請求項 1 5 0 ~ 1 5 3 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 5 5】

インビトロ分化によって低免疫多能性細胞 (H I P 細胞) 集団から低免疫網膜色素上皮 (R P E) 細胞集団を作製する方法であって、前記 H I P 細胞において、内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス I イトランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇しており、

前記方法が、

(a) 前駆 R P E 細胞集団を作製するために、アクチビン A、b F G F、B M P 4 / 7、D K K 1、I G F 1、ノギン、B M P 阻害剤、A L K 阻害剤、R O C K 阻害剤及び V E G F R 阻害剤からなる群から選択される因子の何れか 1 つを含む第 1 の培地中で前記 H I P 細胞集団を培養し；

20

(b) 低免疫 R P E 細胞集団を作製するために、前記第 1 の培地とは異なる第 2 の培地中で前記前駆 R P E 細胞集団を培養すること

を含む、方法。

【請求項 1 5 6】

前記 A L K 阻害剤が、S B - 4 3 1 5 4 2、その誘導体又はその変異体である、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記 A L K 阻害剤が、約 2 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 1 5 5 又は 1 5 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 5 8】

前記 R O C K 阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、その誘導体又はその変異体である、請求項 1 5 5 ~ 1 5 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記 R O C K 阻害剤が、約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である、請求項 1 5 5 ~ 1 5 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の培地及び / 又は第 2 の培地が動物血清を欠く、請求項 1 5 5 ~ 1 5 9 の何れか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 6 1】

前記 H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (a) の前駆 R P E 細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 5 5 ~ 1 6 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

50

前記 H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (b) の前記 P R E 細胞集団を培養することをさらに含み、

前記自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、前記トリガー物質がガンシクロビルであるか、前記自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、前記トリガー物質が 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は前記自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、前記トリガー物質が二量体誘導化合物 (C I D) である、請求項 1 5 5 ~ 1 6 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

非 R P E 細胞から前記低免疫 R P E 細胞集団を単離することをさらに含む、請求項 1 5 5 ~ 1 6 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記単離した低免疫 R P E 細胞集団を凍結保存することをさらに含む、請求項 1 6 3 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

本願は、全てその全体において本明細書中で参照により組み込まれる、2018年7月17日に提出の米国仮特許出願第62/698,965号明細書、2018年7月17日に提出の同第62/698,973号明細書、2018年7月17日に提出の同第62/698,978号明細書、2018年7月17日に提出の同第62/698,981号明細書及び2018年7月17日に提出の同第62/698,984号明細書の優先権を主張する。

【0002】

再生細胞療法は、損傷臓器及び組織を再生させるための重要で有望な処置である。移植用の臓器は入手が困難であり、待機時間が長いことから、当然のことだが、容易に入手可能な細胞株を患者に移植することによって組織を再生可能であることは好ましい。再生細胞療法は、動物モデル (例えば心筋梗塞後) での移植後に障害組織を回復させるための有望な最初の結果を示した。しかし、移植レシピエントの免疫系が同種物質を拒絶する傾向があることにより、治療の潜在的効果が大きく低下し、このような処置の周囲の起こり得るプラス効果が低下する。

【0003】

従って、本発明は、普遍的に許容可能な「容易に入手可能である」低免疫原性多能性細胞及びその分化した心臓、内皮、神経、膵島又は網膜色素細胞を提供する。このような低免疫細胞が、それを必要とする患者を処置するために使用される。これらの細胞は、免疫応答を惹起する主要免疫抗原を欠き、食作用性のエンドサイトーシスを回避するように改変される。

【背景技術】

【0004】

再生細胞療法は、損傷臓器及び組織を再生させるための重要で有望な治療である。移植用の臓器は入手が困難であり、待機時間が長いことから、当然のことだが、容易に入手可能な細胞株を患者に移植することによって組織を再生可能であることは好ましい。再生細胞療法は、動物モデル (例えば心筋梗塞後) での移植後に障害組織を回復させるための有望な最初の結果を示した。しかし、移植レシピエントの免疫系が同種物質を拒絶する傾向があることにより、治療の潜在的効果が大きく低下し、このような処置の周囲の起こり得るプラス効果が低下する。

【0005】

自己誘導多能性幹細胞 (i P S C) は理論的に患者特異的な細胞に基づく臓器修復ストラテジーのための無限の細胞供給源を構成する。しかし、それらの作製は、技術及び製造

10

20

30

40

50

の面で困難な点があり、何らかの急性処置モダリティーを概念的に妨げる冗長な工程である。同種 i P S C に基づく治療法は、製造の観点からより容易であり、十分にスクリーニングされ、標準化された高品質の細胞生成物の作製を可能にする。しかし、それらが同種起源であるため、このような細胞生成物は拒絶される。細胞の抗原性の低下又は排除により、普遍的に許容可能な細胞生成物が作製され得る。多能性幹細胞は3つ胚葉のあらゆる細胞タイプに分化し得るので、幹細胞療法の適用の可能性は幅広い。移植部位の臓器環境で分化及び成熟を継続する祖先細胞を移植することによって、エクスピボ又はインピボで分化が行われ得る。エクスピボ分化によって、研究者又は医師が手順を密に監視することが可能になり、細胞の適正な集団が移植前に作製されることが確実になる。

【0006】

10

しかし、殆どの場合、臨床移植療法において、未分化多能性幹細胞は、それらが奇形腫を形成する傾向ゆえに回避される。むしろ、このような治療法は、分化した細胞（例えば心不全に罹患している患者の心筋に移植する幹細胞由来心筋細胞）を使用する傾向がある。このような多能性細胞又は組織の臨床適用は、それらの移植後の細胞の増殖及び生存を制御する「安全機能」から利益を得る。

【0007】

本技術は、疾患又は欠損細胞を再生させるか又は置き換えるために使用される細胞を作製することが可能な幹細胞を追求する。迅速に増殖し、多くの可能な細胞タイプに分化するので、多能性幹細胞（P S C）が使用され得る。

【0008】

20

今まで、P S C に基づくアプローチの前臨床での成功は、免疫抑制又は免疫欠損モデルでのみ、又は細胞が封入され、宿主の免疫系から保護される場合にのみ、達成されている。しかし、同種臓器移植で使用されるような全身的な免疫抑制は、再生アプローチに正当なものではない。免疫抑制薬は、重い副作用があり、感染及び悪性腫瘍のリスクを顕著に上昇させる。

【0009】

当技術分野において、再生医学で使用され得る、低免疫原性多能性幹細胞から作製される細胞が求められている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

いくつかの態様では、低免疫多能性幹細胞（H I P 細胞）から分化した、単離された改変低免疫心臓、内皮、神経、膵島又は網膜色素細胞が本明細書中で提供される。H I P 細胞は、例えば、内在性 - 2 ミクログロブリン（B 2 M）遺伝子活性が低下しているか又は排除されており、内在性クラス I I トランス活性化因子（C I I T A）遺伝子活性が低下しているか又は排除されており、C D 4 7 発現が上昇している。

【0011】

一部の実施形態では、H I P 細胞はヒト改変誘導多能性幹細胞（ヒト改変 i P S C）であり、B 2 M 遺伝子はヒト B 2 M 遺伝子であり、C I I T A 遺伝子はヒト B 2 M 遺伝子であり、C D 4 7 発現上昇は、プロモーターの制御下でヒト C D 4 7 遺伝子の少なくとも1コピーを細胞に導入した結果である。ある一定の実施形態では、H I P は、マウス改変誘導多能性幹細胞（マウス改変 i P S C）であり、B 2 M 遺伝子はマウス B 2 M 遺伝子であり、C I I T A 遺伝子はマウス B 2 M 遺伝子であり、C D 4 7 発現上昇は、プロモーターの制御下でマウス C D 4 7 遺伝子の少なくとも1コピーを細胞に導入した結果である。一部の例では、B 2 M 遺伝子活性の排除は、B 2 M 遺伝子の両アレルを破壊するクラスター化された規則的配置の短回文配列リピート（C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s）（C R I S P R）/ C a s 9 反応の結果である。一部の例では、C I I T A 遺伝子活性の排除は、C I I T A 遺伝子の両アレルを破壊する C R I S P R / C a s 9 反応の結果である。

40

【0012】

50

一部の実施形態では、本方法は、H I P細胞を死に誘導するトリガー物質により活性化される自殺遺伝子をさらに含む。一部の実施形態では、自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子であり、トリガー物質はガンシクロビルである。一部の例では、H S V - t k 遺伝子は、配列番号4に対して少なくとも90%の配列同一性を含むタンパク質をコードする。他の例では、H S V - t k 遺伝子は、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。

【0013】

他の実施形態では、自殺遺伝子はエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子であり、トリガー物質は5 - フルオロシトシン (5 - F C) である。一部の例では、C D 遺伝子は、配列番号5に対して少なくとも90%の配列同一性を含むタンパク質をコードする。他の例では、C D 遺伝子は、配列番号5のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。

10

【0014】

他の実施形態では、自殺遺伝子は誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードし、トリガー物質は二量体誘導化合物 (C I D) である。一部の例では、誘導型カスパーゼ9タンパク質は、配列番号6に対して少なくとも90%の配列同一性を含む。他の例では、誘導型カスパーゼ9タンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。一部の例では、C I D は化合物 A P 1 9 0 3 である。

【0015】

一部の実施形態では、単離低免疫心臓細胞は、心筋細胞、結節心筋細胞、伝導性心筋細胞、作業心筋細胞、心筋細胞前駆体、心筋細胞祖先細胞、心臓幹細胞及び心臓筋肉細胞からなる群から選択される。

20

【0016】

一部の態様では、心臓状態又は疾患に罹患している患者を処置する方法が本明細書中で提供される。本方法は、治療的有効量の、本明細書中に記載の単離された改変低免疫心臓細胞の何れか1つの集団を含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。

【0017】

一部の実施形態では、投与は、患者の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射又は点滴を含む。

30

【0018】

一部の実施形態では、心臓状態又は疾患は、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、他の心筋症、心筋炎、心筋虚血性再灌流障害、心室機能不全、心不全、うっ血性心不全、冠動脈疾患、末期心疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心臓、動脈炎又は循環器疾患からなる群から選択される。

【0019】

一部の態様では、インビトロ分化により低免疫多能性細胞 (H I P細胞) 集団から低免疫心臓細胞集団を作製する方法が本明細書中で提供され、H I P細胞において、内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス I I トランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇している。本方法は、(a) G S K 阻害剤を含む培地中で H I P細胞集団を培養し；(b) 前駆心臓細胞集団を作製するために、W N T アンタゴニスを含む培地中で H I P細胞集団を培養し；(c) 低免疫心臓細胞集団を作製するために、インスリンを含む培地中で前駆心臓細胞集団を培養することを含む。

40

【0020】

一部の実施形態では、G S K 阻害剤は、C H I R - 9 9 0 2 1、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、G S K 阻害剤は、約 2 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である。一部の実施形態では、W N T アンタゴニスは、I W R 1、その誘導体又はその変異体で

50

ある。一部の例では、WNTアンタゴニスは、約 $2\mu\text{M}$ ～約 $10\mu\text{M}$ の範囲の濃度である。

【0021】

一部の実施形態では、本方法は、HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階(c)の前駆心臓細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(Escherichia coli)シトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子である場合、トリガー物質は5-フルオロシトシン(5-FC)であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物(CID)である。ある一定の実施形態では、本方法は、HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階(d)の低免疫心臓細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(Escherichia coli)シトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子である場合、トリガー物質は5-フルオロシトシン(5-FC)であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ9タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物(CID)である。

10

【0022】

一部の実施形態では、本方法は、非心臓細胞から低免疫心臓細胞集団を単離することをさらに含む。他の実施形態では、本方法は、単離した低免疫心臓細胞集団を凍結保存することをさらに含む。

20

【0023】

一部の実施形態では、単離された改変低免疫内皮細胞は、毛細血管内皮細胞、血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、脳内皮細胞及び腎臓内皮細胞からなる群から選択される。

【0024】

一部の態様では、血管状態又は疾患に罹患している患者を処置する方法が本明細書中で提供される。一部の実施形態では、本方法は、単離された改変低免疫内皮細胞集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む。

【0025】

本方法は、本明細書中に記載の単離された改変低免疫内皮細胞のうち何れか1つの集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、投与は、患者の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射又は点滴を含む。

30

【0026】

一部の実施形態では、血管状態又は疾患は、血管損傷、循環器疾患、血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、高血圧、虚血性組織損傷、虚血肢、脳卒中、神経障害及び脳血管疾患からなる群から選択される。

【0027】

一部の態様では、インビトロ分化によって低免疫原性多能性幹細胞(HIP細胞)の集団から低免疫内皮細胞集団を作製する方法が本明細書中で提供され、HIP細胞において、内在性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性及び内在性クラスIIトランス活性化因子(CIITA)遺伝子活性が排除されており、CD47発現が上昇している。本方法は、(a)GSK阻害剤を含む第1の培地中でHIP細胞集団を培養し；(b)前駆内皮細胞集団を作製するために、VEGF及びbFGFを含む第2の培地中でHIP細胞集団を培養し；(c)低免疫内皮細胞集団を作製するために、ROCK阻害剤及びALK阻害剤を含む第3の培地中で前駆内皮細胞集団を培養することを含む。

40

【0028】

一部の実施形態では、GSK阻害剤は、CHIR-99021、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、GSK阻害剤は約 $1\mu\text{M}$ ～約 $10\mu\text{M}$ の範囲の濃度である。

50

一部の実施形態では、ROCK阻害剤は、Y - 27632、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、ROCK阻害剤は約1 μ M ~ 約20 μ Mの範囲の濃度である。一部の実施形態では、ALK阻害剤は、SB - 431542、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、ALK阻害剤は約0.5 μ M ~ 約10 μ Mの濃度範囲である。

【0029】

一部の実施形態では、第1の培地は2 μ M ~ 約10 μ MのCHIR - 99021を含む。一部の実施形態では、第2の培地は、50 ng/mL VEGF及び10 ng/mL bFGFを含む。他の実施形態では、第2の培地はY - 27632及びSB - 431542をさらに含む。様々な実施形態では、第3の培地は10 μ M Y - 27632及び1 μ M SB - 431542を含む。ある一定の実施形態では、第3の培地はVEGF及びbFGFをさらに含む。特定の例では、第1の培地及び/又は第2の培地はインスリンを欠く。

10

【0030】

一部の実施形態では、本方法は、低免疫内皮細胞集団を非内皮細胞から単離することをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、単離した低免疫内皮細胞集団を凍結保存することをさらに含む。

【0031】

一部の実施形態では、単離低免疫ドーパミン作動性ニューロンは、神経幹細胞、神経祖先細胞、未熟ドーパミン作動性ニューロン及び成熟ドーパミン作動性ニューロンからなる群から選択される。

20

【0032】

一部の態様では、神経変性疾患又は状態に罹患している患者を処置する方法が本明細書中で提供される。一部の実施形態では、本方法は、単離低免疫ドーパミン作動性ニューロンの何れか1つの集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離低免疫ドーパミン作動性ニューロンの集団は生体分解性足場上にある。投与は移植又は注入を含み得る。一部の実施形態では、神経変性疾患又は状態は、パーキンソン病、ハンチントン病及び多発性硬化症からなる群から選択される。

【0033】

一部の態様では、インビトロ分化によって低免疫誘導多能性幹細胞(HIP細胞)集団から低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を作製する方法が本明細書中で提供され、HIP細胞において、内在性 - 2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性及び内在性クラスIIトランス活性化因子(CIITA)遺伝子活性が排除され、CD47発現が上昇している。一部の実施形態では、本方法は、(a)未熟ドーパミン作動性ニューロンの集団を作製するために、ソニックヘッジホッグ(SHH)、BDNF、EGF、bFGF、FGF8、WNT1、レチノイン酸、GSK3阻害剤、ALK阻害剤及びROCK阻害剤からなる群から選択される1つ以上の因子を含む第1の培地中でHIP細胞集団を培養し；(b)ドーパミン作動性ニューロン集団を作製するために、第1の培地とは異なる第2の培地中で未熟ドーパミン作動性ニューロン集団を培養することを含む。

30

【0034】

一部の実施形態では、GSK阻害剤は、CHIR - 99021、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、GSK阻害剤は、約2 μ M ~ 約10 μ Mの範囲の濃度である。一部の実施形態では、ALK阻害剤は、SB - 431542、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、ALK阻害剤は、約1 μ M ~ 約10 μ Mの範囲の濃度である。一部の実施形態では、第1の培地及び/又は第2の培地は動物血清を欠く。

40

【0035】

一部の実施形態では、本方法は、HIP細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階(a)の未熟ドーパミン作動性ニューロン集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSV - tk)遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ(E

50

Escherichia coli) シトシンデアミナーゼ (CD) 遺伝子である場合、トリガー物質は 5 - フルオロシトシン (5 - FC) であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物 (CID) である。

【0036】

一部の実施形態では、本方法は、非ドーパミン作動性ニューロンから低免疫ドーパミン作動性ニューロン集団を単離することを含む。

【0037】

一部の実施形態では、単離低免疫膵島細胞は、膵島祖先細胞、未熟膵島細胞及び成熟膵島細胞からなる群から選択される。

【0038】

一部の態様では、糖尿病に罹患している患者を処置する方法が本明細書中で提供される。本方法は、本明細書中に記載の単離低免疫膵島細胞の何れか 1 つの集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離低免疫膵島細胞集団は生体分解性足場上にある。一部の例では、投与は移植又は注入を含む。

【0039】

一部の態様では、インビトロ分化により低免疫多能性細胞 (HIP 細胞) の集団から低免疫膵島細胞集団を作製する方法が本明細書中で提供され、HIP 細胞において、内在性 - 2 ミクログロブリン (B2M) 遺伝子活性及び内在性クラス II トランス活性化因子 (CIITA) 遺伝子活性が排除され、CD 47 発現が上昇している。本方法は、(a) 未熟膵島細胞集団を作製するために、インスリン様増殖因子 (IGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、線維芽細胞増殖因子 (EGF)、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、ソニックヘッジホッグ (SHH) 及び血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、トランスフォーミング増殖因子 - (TGF) スーパーファミリー、骨形成タンパク質 - 2 (BMP2)、骨形成タンパク質 - 7 (BMP7)、GSK3 阻害剤、ALK 阻害剤、BMP 1 型受容体阻害剤及びレチノイン酸からなる群から選択される 1 つ以上の因子を含む第 1 の培地中で HIP 細胞集団を培養し；(b) 低免疫膵島細胞集団を作製するために、第 1 の培地とは異なる第 2 の培地中で未熟膵島細胞集団を培養することを含む。

【0040】

一部の実施形態では、GSK 阻害剤は、CHIR - 99021、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、GSK 阻害剤は、約 2 μ M ~ 約 10 μ M の範囲の濃度である。一部の実施形態では、ALK 阻害剤は、SB - 431542、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、ALK 阻害剤は、約 1 μ M ~ 約 10 μ M の範囲の濃度である。一部の実施形態では、第 1 の培地及び / 又は第 2 の培地は動物血清を欠く。

【0041】

一部の実施形態では、本方法は、HIP 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (a) の未熟膵島細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - tk) 遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) シトシンデアミナーゼ (CD) 遺伝子である場合、トリガー物質は 5 - フルオロシトシン (5 - FC) であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物 (CID) である。

【0042】

特定の実施形態では、本方法は、HIP 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (b) の膵島細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - tk) 遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) シトシンデアミナーゼ (CD) 遺伝子である場合、トリガー物質は 5 - フルオ

10

20

30

40

50

ロシトシン (5 - F C) であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物 (C I D) である。

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態では、本方法は、非膵島細胞から低免疫膵島細胞集団を単離することを含む。一部の実施形態では、本方法は、単離した低免疫膵島細胞集団を凍結保存することをさらに含む。

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態では、単離低免疫 R P E 細胞は、R P E 祖先細胞、未熟 R P E 細胞、成熟 R P E 細胞及び機能的 R P E 細胞からなる群から選択される。

【 0 0 4 5 】

一部の態様では、眼科状態に罹患している患者を処置する方法が本明細書中で提供される。本方法は、本明細書中に記載の単離低免疫 R P E 細胞集団の何れか 1 つの集団の治療的有効量を含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離低免疫 R P E 細胞集団は生体分解性足場上にある。一部の実施形態では、投与は、患者の網膜への移植又は注入を含む。一部の実施形態では、眼科状態は、滲出型黄斑変性、萎縮型黄斑変性、若年性黄斑変性、レーバー先天黒内障、網膜色素変性症及び網膜剥離からなる群から選択される。

【 0 0 4 6 】

一部の態様では、インビトロ分化により低免疫多能性細胞 (H I P 細胞) 集団から低免疫網膜色素上皮 (R P E) 細胞集団を作製する方法が本明細書中で提供され、H I P 細胞において、内在性 - 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子活性及び内在性クラス II トランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子活性が排除され、C D 4 7 発現が上昇している。本方法は、(a) 前駆 R P E 細胞集団を作製するために、アクチビン A、b F G F、B M P 4 / 7、D K K 1、I G F 1、ノギン、B M P 阻害剤、A L K 阻害剤、R O C K 阻害剤及び V E G F R 阻害剤からなる群から選択される因子の何れか 1 つを含む第 1 の培地中で H I P 細胞集団を培養し；(b) 低免疫 R P E 細胞集団を作製するために、第 1 の培地とは異なる第 2 の培地中で前駆 R P E 細胞集団を培養することを含む。

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、A L K 阻害剤は、S B - 4 3 1 5 4 2、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、A L K 阻害剤は、約 2 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である。一部の実施形態では、R O C K 阻害剤は、Y - 2 7 6 3 2、その誘導体又はその変異体である。一部の例では、R O C K 阻害剤は、約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度である。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、第 1 の培地及び / 又は第 2 の培地は動物血清を欠く。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、本方法は、H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (a) の前駆 R P E 細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、トリガー物質は 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物 (C I D) である。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、本方法は、H I P 細胞が自殺遺伝子を含む場合、トリガー物質を含む培地中で段階 (b) の P R E 細胞集団を培養することをさらに含み、自殺遺伝子が単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子である場合、トリガー物質はガンシクロビルであるか、自殺遺伝子がエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) 遺伝子である場合、トリガー物質は 5 - フルオロシトシン (5 - F C) であるか、又は自殺遺伝子が誘導型カスパーゼ 9 タンパク質をコードする場合、トリガー物質は二量体誘導化合物 (C I D) である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、本方法は、非 R P E 細胞から低免疫 R P E 細胞集団を単離することをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、単離した低免疫 R P E 細胞集団を凍結保存することをさらに含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 2 】

【 図 1 】 図 1 は、マウス N K 細胞（およそ 9 5 % N K 細胞及び 5 % マクロファージ）と温置したマウス B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S C の E l i s p o t の結果を示す。

【 図 2 】 図 2 は、ヒト N K 細胞（およそ 9 5 % N K 細胞及び 5 % マクロファージ）と温置したヒト B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S C の E l i s p o t の結果を示す。

【 図 3 】 図 3 は、ヒト N K 細胞（およそ 9 5 % N K 細胞及び 5 % マクロファージ）と温置したマウス B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S C の E l i s p o t の結果を示す。

【 図 4 】 図 4 は、マウス N K 細胞（およそ 9 5 % N K 細胞及び 5 % マクロファージ）と温置したヒト B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S C の E l i s p o t の結果を示す。

【 図 5 】 図 5 は、ヒトマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識ヒト B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S C の食作用アッセイの結果を示す。

【 図 6 】 図 6 は、マウスマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識マウス B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S C の食作用アッセイの結果を示す。

【 図 7 】 図 7 は、マウスマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識ヒト B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S C の食作用アッセイの結果を示す。

【 図 8 】 図 8 は、ヒトマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識マウス B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S C の食作用アッセイの結果を示す。

【 図 9 】 図 9 は、分化方法のダイアグラムを提供する。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、分化開始直前にマトリゲル（商標）上で培養したヒト i P S C を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、培地交換前の分化第 2 日の細胞を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 2 】 図 1 2 は、培地交換前の分化第 3 日の細胞を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、培地交換前の分化第 5 日の細胞を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 4 】 図 1 4 は、培地交換前の分化第 7 日の細胞を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 5 】 図 1 5 は、培地交換前の分化第 9 日の細胞を示す（ 1 0 0 × 拡大率）。

【 図 1 6 】 H I P - C M 細胞を分化させ、r t P C R により示されるように濃縮した。

【 図 1 7 】 図 1 7 は、移植後 2 8 日に h i C M が拒絶されず、他の臓器に移動しなかったことを示す。

【 図 1 8 】 図 1 8 は、心筋梗塞 2 8 日後のレシピエント心臓の組織病理学及びトリクローム染色を示す。h i C M の同種レシピエントにおける梗塞サイズが顕著に縮小し、左心室のサイズも顕著に縮小した。

【 図 1 9 A 】 図 1 9 A は、左心室パラメーターの顕著な改善を表す詳細な P V - l o o p 分析を示す。

【 図 1 9 B 】 図 1 9 B は、駆出率（E F、拡張期の最後のその心室中の血液の体積に対する、拍あたりの心室から駆出される血液体積の比）及び 1 回拍出量（S V、1 回の収縮において心室により駆出される血液の体積）により測定した場合に、h i C M が心臓機能を回復させたことを示す。

【 図 1 9 C 】 図 1 9 C は、心室 1 回仕事係数（S W、大動脈への 1 回拍出量を駆出するために左心室により行われる仕事）及び心臓出力（C O、単位時間に心室により汲み出される血液量）により測定した場合に、h i C M が心臓機能を回復させたことを示す。

【 図 2 0 】 図 2 0 は、野生型又は B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g h i C M

10

20

30

40

50

が同種ヒト化マウスに筋肉内移植された分析の結果を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、低免疫 h i C M 細胞も心筋梗塞後の移植後に生存したことを示す。

【図 2 2】図 2 2 は、分割前の M E F 上のマウス低 I P S C コロニーを示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 3】図 2 3 は、分化開始直前のゼラチン上の E S C マウス低 I P S C を示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 4】図 2 4 は、5 μ M C H I R から 2 μ M C H I R に分化培地を交換する前の、分化第 2 日の細胞を示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 5】図 2 5 は、培地を交換する前の、E C 分化第 4 日の細胞を示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 6】図 2 6 は、分化第 7 日の E C 細胞を示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 7】図 2 7 は、第 1 2 及び 1 4 日後及び M A C S 選別前の細胞を示す (1 0 0 x 拡大率)。

【図 2 8】図 2 8 は、m i P S C 及び H I P 細胞の両方からの E C 細胞が、V E - カドヘリン発現を含め、分化した遺伝子発現プロファイルを示し、親細胞はその発現プロファイルを示さなかったことを示す r t P C R を示す。

【図 2 9】図 2 9 は、後肢虚血マウスモデルに移植された野生型及び低免疫誘導内皮細胞の生体発光分析を示す (A . フェモリス (大腿輪、A . f e m o r a l i s) の除去後)。全動物の B L I 値をプロットした。B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g の移植片が全て生き残った一方で、非常に免疫原性が高い w t m E C は 1 5 日以内に拒絶され、経時的な B L I シグナル低下を示した。

【図 3 0】N K 細胞殺傷時の C d 4 7 過剰発現の阻害効果を評価した。B 2 m - / - C i i t a - / - m i P S C 又は B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g m i P S C 由来の m i E C を用いて、N K 細胞での I F N - γ E l i s p o t を行った。B 2 m - / - C i i t a - / - m i P S C からの派生物のみが N K 細胞殺傷に感受性があった。

【図 3 1】図 3 1 は、B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g h i P S C が対応する h i E C 派生物に首尾よく分化したことを示す。r t P C R は、全派生物が多能性遺伝子発現を失ったことを示す。

【図 3 2】野生型又は B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g h i E C 移植片を同種ヒト化 N S G - S G M 3 マウスに注入した。5 日後に I F N - γ E l i s p o t を行った。低免疫細胞は I F N - γ 応答を誘発しなかったが、野生型は誘発した。

【発明を実施するための形態】

【0053】

A . 導入

本発明は、低免疫原性多能性 (H I P) 細胞由来の (から分化した) 心臓細胞の作製及び最終的にはそれを必要とする患者への移植を提供する。

【0054】

P C T / U S 1 8 / 1 3 6 8 8 号明細書に記載のように、低免疫原性多能性 (H I P) 細胞は、免疫反応を惹起し得る主要免疫抗原を欠き、食作用を回避するように改変される。これにより、特異的な組織及び臓器を生成させるための「容易に入手可能な」細胞生成物の誘導が可能になる。ヒト患者においてヒト同種 H I P 細胞派生物を使用可能であることの利点により、一般に同種移植で見られる長期の補助免疫抑制療法及び薬物使用を回避することができるようになることを含め、顕著な有益性が得られる。細胞療法は、各患者に対する個々の処置を必要とせずに使用し得るので、コストも顕著に削減される。

【0055】

自己細胞供給源から作製される細胞生成物は、数個又は 1 個の単一の抗原性突然変異でさえも免疫拒絶に対する対象になり得ることが示されている。従って、自己細胞生成物は、本質的に非免疫原性ではない。また、細胞操作及び品質管理は非常に労力及びコストがかかるので、自己細胞は、急性処置の選択肢に対しては容易に利用可能となり得ない。従って、様々なヒト疾患を処置するために使用するための、普遍的に許容可能な多くのタイ

10

20

30

40

50

ブの細胞に分化し得るH I P細胞などの普遍的な細胞供給源が当技術分野で必要とされる。

【0056】

本願は、それらの全体において本開示が参照により本明細書中に組み込まれる2018年1月14日提出の国際出願第PCT/US18/13688号明細書及び2017年1月13日提出の米国仮特許出願第62/445,969号明細書に関連し、特に実施例、図面、図面の説明及び低免疫原性多能性幹細胞を作製すること及び他の細胞タイプへこのような細胞を分化させることについての説明に関する。

【0057】

B. 定義

10

「多能性細胞」という用語は、未分化状態に留まりながら自己更新及び増殖し得、適正な条件下で特別な細胞タイプに分化するように誘導され得る細胞を指す。「多能性細胞」という用語は、本明細書中で使用される場合、胚性幹細胞及び、胎児、羊膜又は体細胞の幹細胞を含め、他のタイプの幹細胞を包含する。代表的なヒト幹細胞株はH9ヒト胚性幹細胞株を含む。さらなる代表的な幹細胞株は、National Institutes of Health Human Embryonic Stem Cell Registry and the Howard Hughes Medical Institute HUES collection (その全体において本明細書中で参照により組み込まれるCowan, C. A. et al., New England J. Med. 350:13. (2004)に記載のとおり)を通じて利用可能にされるものを含む。

20

【0058】

「多能性幹細胞」は、本明細書中で使用される場合、3つの胚葉：内胚葉（例えば胃腸連、消化管、肺など）、中胚葉（例えば筋肉、骨、血液、泌尿生殖器組織など）又は外胚葉（例えば表皮組織及び神経系組織）の何れかに分化する能力を有する。「多能性幹細胞」という用語は、本明細書中で使用される場合、「誘導多能性幹細胞」又は「iPSC」、非多能性細胞由来の多能性幹細胞のタイプも包含する。親細胞の例は、様々な手段により多能性の未分化表現型を誘導するように初期化されている体細胞を含む。このような「iPS」又は「iPSC」細胞は、ある特定の制御遺伝子の発現を誘導することにより、又はある特定のタンパク質の外因性適用により、作製され得る。iPS細胞の誘導のための方法は当技術分野で公知であり、以下でさらに記載する（例えば、Zhou et al., Stem Cells 27(11):2667-74(2009); Huangfu et al., Nature Biotechnol. 26(7):795(2008); Wolftjen et al., Nature 458(7239):766-770(2009);及びZhou et al., Cell Stem Cell 8:381-384(2009);これらのそれぞれはそれらの全体において本明細書中に参照により組み込まれる）。誘導多能性幹細胞(iPSC)の作製を以下で概説する。本明細書中で使用される場合、「hiPSC」は、ヒト誘導多能性幹細胞であり、「miPSC」はマウス誘導多能性幹細胞である。

30

【0059】

「多能性幹細胞の特徴」は、他の細胞から多能性幹細胞を区別する細胞の特徴を指す。適切な条件下で、3つの胚葉（内胚葉、中胚葉及び外胚葉）の全てからの細胞系列と関連する特徴をまとめて示す細胞タイプへの分化が起き得る子孫を生じさせる能力は、多能性幹細胞の特徴である。分子マーカーのある特定の組み合わせの発現又は非発現も多能性幹細胞の特徴である。例えば、ヒト多能性幹細胞は、少なくとも数個及び一部の実施形態では、次の非限定リスト：SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、ALP、Sox2、E-カドヘリン、UTF-1、Oct4、Rex1及びNanogからのマーカーの全てを発現する。多能性幹細胞に関連する細胞形態学も多能性幹細胞の特徴である。本明細書中で記載のように、細胞は、内胚葉性の祖先細胞及び/又は肝細胞へと初期化されるという多能性を経る必要はない。

40

【0060】

50

本明細書中で使用される場合、「多能性」又は「多能性細胞」は、限定数の他の特定の細胞タイプを生じさせ得る細胞タイプを指す。例えば、誘導多能性細胞は、内胚葉性細胞を形成可能である。さらに、多能性血液幹細胞は、リンパ球、単球、好中球などを含め、血液細胞のいくつかのタイプにそれ自身分化し得る。

【0061】

本明細書中で使用される場合、「少能性」という用語は、成体幹細胞が数種類の異なる細胞タイプにしか分化する能力がないことを指す。例えば、リンパ系又は骨髓幹細胞は、それぞれリンパ系又は骨髓系列の何れかの細胞を形成させることが可能である。

【0062】

本明細書中で使用される場合、「単能性」という用語は、1つの細胞タイプを形成する細胞の能力を意味する。例えば、精原幹細胞が形成可能であるのは精子細胞のみである。

10

【0063】

本明細書中で使用される場合、「全能性」という用語は、細胞が生物全体を形成させる能力を意味する。例えば哺乳動物において、全能性であるのは、接合体及び第1の卵割段階の卵割球のみである。

【0064】

本明細書中で使用される場合、「非多能性細胞」は、多能性細胞ではない哺乳動物細胞を指す。このような細胞の例としては、分化した細胞並びに祖先細胞が挙げられる。分化した細胞の例としては、骨髓、皮膚、骨格筋肉、脂肪組織及び末梢血液から選択される組織からの細胞が挙げられるが限定されない。代表的な細胞タイプとしては、線維芽細胞、肝細胞、筋芽細胞、ニューロン、骨芽細胞、破骨細胞及びT細胞が挙げられるが限定されない。誘導多能性細胞、内胚葉性祖先細胞及び肝細胞を作製するために使用される出発細胞は非多能性細胞であり得る。

20

【0065】

分化した細胞としては、多能性細胞、少能性細胞、単能性細胞、祖先細胞及び最終分化した細胞が挙げられるが限定されない。特定の実施形態では、能力が低い細胞は、より強力な細胞に対して「分化している」とみなされる。

【0066】

「体細胞」は、生物の体を形成する細胞である。体細胞は、生物において、臓器、皮膚、血液、骨及び結合組織を構成する細胞を含むが、生殖細胞は含まない。

30

【0067】

細胞は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物由来であり得る。代表的な非ヒト哺乳動物としては、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ及び非ヒト霊長類が挙げられるが限定されない。一部の実施形態では、細胞は、成人ヒト又は非ヒト哺乳動物由来である。一部の実施形態では、細胞は新生児ヒト、成人又は非ヒト哺乳動物由来である。

【0068】

本明細書中で使用される場合、「対象」又は「患者」という用語は、何らかの動物、例えば家畜化された動物、動物園の動物又はヒトを指す。「対象」又は「患者」は、イヌ、ネコ、鳥、家畜又はヒトのような哺乳動物であり得る。「対象」及び「患者」の具体例としては、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、脳、神経組織、血液、骨、骨髓などに関連する疾患又は障害がある個体（特にヒト）が挙げられるが限定されない。

40

【0069】

哺乳動物細胞は、ヒト又は非ヒト哺乳動物由来であり得る。代表的な非ヒト哺乳動物としては、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ及び非ヒト霊長類（例えばチンパンジー、マカク及び類人猿）が挙げられるが限定されない。

【0070】

「低免疫原性多能性細胞」、「低免疫多能性細胞」又は「HIP細胞」は、本明細書中で、その多能性の特徴を保持し、また同種宿主に移植したときに免疫学的拒絶応答の低下

50

が起こる多能性細胞を意味する。好ましい実施形態では、H I P細胞は免疫応答を生じさせない。従って、「低免疫原性」又は「低免疫」は、本明細書中で概説されるように免疫改変前の親（即ち「野生型」又は「w t」）細胞の免疫応答と比較した場合、免疫応答が顕著に低下しているか又は排除されていることを指す。多くのケースで、H I P細胞は、免疫学的にサイレントであり、また多能性の可能性を保持する。H I Pの特徴に対するアッセイを以下で概説する。

【0071】

「H L A」又は「ヒト白血球抗原」複合体は、ヒトにおいて主要組織適合遺伝子複合体（M H C）タンパク質をコードする遺伝子複合体である。H L A複合体を構成するこれらの細胞表面タンパク質は、抗原に対する免疫応答の制御に関与する。ヒトにおいて、2つのM H C、クラスI及びクラスII、「H L A - I」及び「H L A - II」がある。H L A - Iは、細胞内部からペプチドを提示する3つのタンパク質、H L A - A、H L A - B及びH L A - Cを含み、H L A - I複合体により提示される抗原は、キラーT細胞（C D 8 + T細胞又は細胞傷害性T細胞としても知られる）を引き付ける。H L A - Iタンパク質は、 β -2ミクログロブリン（B 2 M）と会合する。H L A - IIは、5つのタンパク質、H L A - D P、H L A - D M、H L A - D O B、H L A - D Q及びH L A - D Rを含み、これらはTリンパ球に対して細胞の外側から抗原を提示する。これはC D 4 + 細胞（Tヘルパー細胞としても知られる）を刺激する。遺伝子がヒト（H L A）由来であるか又はマウス（M H C）由来であるかに依存するので、「M H C」又は「H L A」の何れかの使用は限定することを意味しないことを理解されたい。従って、これは哺乳動物細胞に関するもので、これらの用語は本明細書中で交換可能に使用され得る。

10

20

【0072】

「遺伝子ノックアウト」は、本明細書中で、それが存在する宿主細胞において特定の遺伝子を不活性にして、その結果、関心のあるタンパク質が産生されないか又は不活性形態になるかの何れかになる工程を意味する。当業者により理解されるように、及び下でさらに記載されるように、これは、遺伝子から核酸配列を除去するか又はその配列を他の配列で妨害するか、読み枠を変更するか又は核酸の制御因子を変更することを含め、多くの様々な方法により遂行され得る。例えば関心のある遺伝子のコード領域の全て又は一部を除去し得るか、又は「ナンセンス」配列で置き換え得、プロモーターなどの制御配列の全て又は一部を除去し得るか又は置き換え得、翻訳開始配列を除去し得るか又は置き換え得るなどである。

30

【0073】

「遺伝子ノックイン」は、本明細書中で、宿主細胞に遺伝子機能を追加する工程を意味する。これにより、コードされるタンパク質のレベル上昇が起こる。当業者により理解されるように、これは、遺伝子の1つ以上のさらなるコピーを宿主細胞に付加するか又はタンパク質発現を向上させる内在性遺伝子の制御因子を変化させることを含め、いくつかの方法で遂行され得る。これは、プロモーターを修飾するか、異なるプロモーターを付加するか、エンハンサーを付加するか又は他の遺伝子発現配列を修飾することにより遂行され得る。

40

【0074】

「 β -2ミクログロブリン」又は「B 2 M」又は「 β 2 M」タンパク質は、以下で示されるアミノ酸及び核酸配列を有するヒト β 2 Mタンパク質を指し；このヒト遺伝子は受入番号NC _ 000015 . 10 : 44711487 - 44718159を有する。

【0075】

「C D 4 7タンパク質」タンパク質は、下で示されるアミノ酸及び核酸配列を有するヒトC D 4 7タンパク質を指し；このヒト遺伝子は受入番号NC _ 000003 . 12 : 108043094 - 108094200を有する。

【0076】

「C I I T Aタンパク質」タンパク質は、下で示されるアミノ酸及び核酸配列を有するヒトC I I T Aタンパク質を指し；ヒト遺伝子は受入番号NC _ 000016 . 10 : 1

50

0 8 6 6 2 0 8 - 1 0 9 4 1 5 6 2 を有する。

【0077】

細胞との関連での「野生型」は、天然で見出される細胞を意味する。しかし多能性幹細胞との関連で、本明細書中で使用される場合、これは、多能性を生じさせる核酸変化を含有し得るが、低免疫原性を達成するための本発明の遺伝子編集手順を経なかった i P S C も意味する。

【0078】

「同系」は、本明細書中で、宿主生物の遺伝学的類似性又は同一性及び免疫学的適合性がある細胞移植を指し；例えば免疫応答は生じない。

【0079】

「同種」は、本明細書中で、免疫応答が生じる宿主生物及び細胞移植物の遺伝学的相違を指す。

【0080】

「B 2 M - / - 」は、本明細書中で、二倍体細胞において両染色体で B 2 M 遺伝子が不活性化されていることを意味する。本明細書中で記載のように、これは様々な方法で行われ得る。

【0081】

「C I I T A - / - 」は、本明細書中で、二倍体細胞において両染色体で C I I T A 遺伝子が不活性化されていることを意味する。本明細書中で記載のように、これは様々な方法で行われ得る。

【0082】

「C D 4 7 t g」（「導入遺伝子」を表す）又は「C D 4 7 +」は本明細書中で、一部の例では C D 4 7 遺伝子の少なくとも 1 個のさらなるコピーを有することにより、宿主細胞が C D 4 7 を発現することを意味する。

【0083】

「O c t ポリペプチド」は、転写因子のオクタマーファミリーの天然のメンバー又は、最も近縁な天然ファミリーメンバーと比較して類似の（少なくとも 50 %、80 % 又は 90 % 活性以内）転写因子活性を維持するそれらの変異体又は、天然のファミリーメンバーの少なくとも D N A 結合ドメインを含むポリペプチドの何れかを指し、転写活性化ドメインをさらに含み得る。代表的な O c t ポリペプチドとしては、O c t - 1、O c t - 2、O c t - 3 / 4、O c t - 6、O c t - 7、O c t - 8、O c t - 9 及び O c t - 11 が挙げられる。O c t 3 / 4（本明細書中で「O c t 4」と呼ぶ）は、P O U ドメイン、P i t - 1、O c t - 1、O c t - 2 及び u r i c - 8 6 で保存される 150 アミノ酸配列、を含有する（その全体において参照により本明細書中に組み込まれる、R y a n , A . K . & R o s e n f e l d , M . G . , G e n e D e v . 11 : 1207 - 1225（1997）を参照）。一部の実施形態では、変異体は、天然の O c t ポリペプチドファミリーメンバーと、例えば上記で列挙されるものなど又は G e n b a n k 受入番号 N P - 002692 . 2（ヒト O c t 4）又は N P - 038661 . 1（マウス O c t 4）で列挙されるものなどと比較して、それらの配列全体にわたり、少なくとも 85 %、90 % 又は 95 % のアミノ酸配列同一性を有する。O c t ポリペプチド（例えば O c t 3 / 4 又は O c t 4）は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ又は他の動物由来であり得る。一般に、操作される細胞の種と同じ種のタンパク質が使用される。O c t ポリペプチドは、非多能性細胞において多能性を誘導するのを助け得る多能性因子であり得る。

【0084】

「K l f ポリペプチド」は、K r u p p e l 様因子（K l f）のファミリーの天然のメンバー、ショウジョウバエ胚パターン調節因子 K r u p p e l のものと同様のアミノ酸配列を含有するジンクフィンガータンパク質又は、最も近縁な天然のファミリーメンバーと比較して類似の（少なくとも 50 %、80 % 又は 90 % 活性以内）転写因子活性を維持する天然メンバーの変異体、又は天然のファミリーメンバーの少なくとも D N A 結合ドメインを含むポリペプチドの何れかを指し、転写活性化ドメインをさらに含み得る。（その全

10

20

30

40

50

体において本明細書中で参照により組み込まれる、D a n g , D . T . , P e v s n e r , J . & Y a n g , V . W . , C e l l B i o l . 3 2 : 1 1 0 3 - 1 1 2 1 (2 0 0 0) を参照)。代表的なK l f ファミリーメンバーとしては、K l f 1、K l f 2、K l f 3、K l f - 4、K l f 5、K l f 6、K l f 7、K l f 8、K l f 9、K l f 10、K l f 11、K l f 12、K l f 13、K l f 14、K l f 15、K l f 16 及びK l f 17 が挙げられる。K l f 2 及びK l f - 4 は、マウスにおいてi P S 細胞を作製可能な因子であることが分かり、関連する遺伝子K l f 1 及びK l f 5 もそうであったが、効率は低かった(その全体において本明細書中で参照により組み込まれる、N a k a g a w a , e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 6 : 1 0 1 - 1 0 6 (2 0 0 7) 参照)。一部の実施形態では、変異体は、天然のK l f ポリペプチドファミリーメンバー、例えば上で列挙されるものなど又はG e n B a n k 受入番号C A X 1 6 0 8 8 (マウスK l f 4) 若しくはC A X 1 4 9 6 2 (ヒトK l f 4) で列挙されるものなどと比較して、それらの全配列にわたり少なくとも85%、90%又は95%のアミノ酸配列同一性を有する。K l f ポリペプチド(例えばK l f 1、K l f 4 及びK l f 5) は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ又は他の動物由来であり得る。一般に、操作される細胞の種と同じ種のタンパク質が使用される。K l f ポリペプチドは、多能性因子であり得る。K l f 4 遺伝子又はポリペプチドの発現は、開始細胞又は開始細胞集団において多能性の誘導を助け得る。

【0085】

「M y c ポリペプチド」は、M y c ファミリーの天然メンバーの何れかを指す(例えばその全体において本明細書中で参照により組み込まれるA d h i k a r y , S . & E i l e r s , M . , N a t . R e v . M o l . C e l l B i o l . 6 : 6 3 5 - 6 4 5 (2 0 0 5) を参照)。これは、最も近縁な天然のファミリーメンバーと比較した場合に類似の(即ち少なくとも50%、80%又は90%活性以内)転写因子活性を維持する変異体も含む。これは、天然のファミリーメンバーの少なくともDNA結合ドメインを含むポリペプチドをさらに含み、転写活性化ドメインをさらに含み得る。代表的なM y c ポリペプチドは、例えばc - M y c、N - M y c 及びL - M y c を含む。一部の実施形態では、変異体は、天然のM y c ポリペプチドファミリーメンバー、例えば上で列挙されるものなど、又はG e n B a n k 受入番号C A A 2 5 0 1 5 (ヒトM y c) で列挙されるものなど、と比較して、それらの全配列にわたり、少なくとも85%、90%又は95%のアミノ酸配列同一性を有する。M y c ポリペプチド(例えばc - M y c) は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ又は他の動物由来であり得る。一般に、操作される細胞の種と同じ種のタンパク質が使用される。M y c ポリペプチドは多能性因子であり得る。

【0086】

「S o x ポリペプチド」は、S R Y 関連H M G - b o x (S o x) 転写因子の天然メンバーの何れかを指し、最も近縁な天然のファミリーメンバーと比較した場合に類似の(即ち少なくとも50%、80%又は90%活性以内)転写因子活性を維持する高移動度群(H M G)ドメイン又はそれらの変異体の存在を特徴とする。これは、天然のファミリーメンバーの少なくともDNA結合ドメインを含むポリペプチドも含み、転写活性化ドメインをさらに含み得る(例えばその全体において本明細書中で参照により組み込まれるD a n g , D . T . e t a l . , I n t . J . B i o c h e m . C e l l B i o l . 3 2 : 1 1 0 3 - 1 1 2 1 (2 0 0 0) を参照)。代表的なS o x ポリペプチドとしては、例えばS o x 1、S o x - 2、S o x 3、S o x 4、S o x 5、S o x 6、S o x 7、S o x 8、S o x 9、S o x 10、S o x 11、S o x 12、S o x 13、S o x 14、S o x 15、S o x 17、S o x 18、S o x - 21 及びS o x 30 が挙げられる。S o x 1 は、S o x 2 と同様の効率でi P S 細胞をもたらしことが示されており、遺伝子S o x 3、S o x 15 及びS o x 18 もi P S 細胞を産生させることが示されているが、S o x 2 よりも幾分効率が低い(その全体において本明細書中で参照により組み込まれるN a k a g a w a , e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 6 : 1 0 1 - 1 0 6 (2 0 0 7) を参照)。一部の実施形態では、変異体は、天然のS o x ポリペプチド

10

20

30

40

50

ファミリーメンバー、例えば上で列挙されるものなど又はGenBank受入番号CAA83435(ヒトSox2)に挙げられるものなどと比較して、それらの全配列にわたり少なくとも85%、90%又は95%のアミノ酸配列同一性を有する。Soxポリペプチド(例えばSox1、Sox2、Sox3、Sox15又はSox18)は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ又は他の動物由来であり得る。一般に、操作される細胞の種と同じ種のタンパク質が使用される。Soxポリペプチドは多能性因子であり得る。本明細書中で論じるように、SOX2タンパク質はiPSCの作製において特定の用途がある。

【0087】

「分化した低免疫原性多能性細胞」又は「分化したHIP細胞」又は「dHIP細胞」は、本明細書中で、低免疫原性を保持するように改変されているiPS細胞を意味し(例えばB2M及びCIITAのノックアウト及びCD47のノックイン)、次に対象への最終的な移植のための細胞タイプに分化させられる。従って、例えばHIP細胞は、肝細胞(「dHIP肝細胞」)、ベータ様膵臓細胞又は膵島オルガノイド(「dHIPベータ細胞」)、内皮細胞(「dHIP内皮細胞」)などへと、分化させられ得る。

10

【0088】

パーセント「同一性」という用語は、2つ以上の核酸又はポリペプチド配列という観点で、以下に記載の配列比較アルゴリズム(例えばBLASTP及びBLASTN又は当業者にとって利用可能な他のアルゴリズム)の1つを使用して、又は目視検査によって測定した場合、比較し、一致が最大となるように並べたとき、同じであるヌクレオチド又はアミノ酸残基が指定のパーセンテージとなる2つ以上の配列又はサブ配列を指す。適用に依存して、パーセント「同一性」は、比較される配列の領域にわたり、例えば機能的ドメインにわたり存在し得るか又は、或いは、比較しようとする2つの配列の全長にわたり存在し得る。配列比較の場合、一般的には1つの配列を、試験配列が比較される参照配列とする。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次に、配列比較アルゴリズムが、指定されるプログラムパラメーターに基づき、参照配列に対する試験配列についてパーセント配列同一性を計算する。

20

【0089】

比較のための配列の最適アライメントは、例えばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)の類似性方法(similarity method)に対する検索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータライズドインプリメンテーション(computerized implementation)によって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. の、GAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)又は目視検査(一般にAusubel et al., 以下を参照)によって、遂行され得る。

30

40

【0090】

パーセント配列同一性及び配列類似性を決定するのに適切なアルゴリズムの一例はBLASTアルゴリズムであり、これはAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)に記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアはNational Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov/)を通じて公開されている。

【0091】

「阻害剤」、「活性化因子」及び「修飾因子」は、生物学的関連分子の機能又は発現に影響を及ぼす。「修飾因子」という用語は、阻害剤及び活性化因子の両方を含む。これら

50

は、標的分子の発現又は活性に対するインビトロ及びインビボアッセイを用いて同定され得る。

【0092】

「阻害剤」は、例えば発現を阻害するか又は標的分子又はタンパク質に結合する物質である。これらは、部分的又は全体的に刺激を遮断し得るか又はプロテアーゼ阻害剤活性を有し得る。これらは、記載される標的タンパク質の活性の不活性化、脱感作又は下方制御を含め、活性化を軽減、低下、防止又は遅延させ得る。修飾因子は、標的分子又はタンパク質のアнтаゴニストであり得る。

【0093】

「活性化因子」は、例えば標的分子又はタンパク質の機能又は発現を誘導又は活性化する物質である。これらは、結合して、標的分子活性を刺激し得るか、上昇させ得るか、開き得るか、活性化し得るか、又は促進し得る。活性化因子は標的分子又はタンパク質のアゴニストであり得る。

10

【0094】

「相同体」は、ヌクレオチド配列、ペプチド配列、機能又は構造レベルで参照分子と同様である生理活性分子である。相同体は、参照配列とある一定のパーセント同一性を共有する配列誘導体を含み得る。従って、一実施形態では、相同又は誘導体配列は、少なくとも70パーセントの配列同一性を共有する。特定の実施形態では、相同又は誘導体配列は、少なくとも80又は85パーセントの配列同一性を共有する。特定の実施形態では、相同又は誘導体配列は、少なくとも90パーセントの配列同一性を共有する。特定の実施形態では、相同又は誘導体配列は、少なくとも95パーセントの配列同一性を共有する。より具体的な実施形態では、相同又は誘導体配列は、少なくとも50、55、60、65、70、75、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98又は99パーセントの配列同一性を共有する。相同又は誘導体核酸配列はまた、高ストリンジェンシーハイブリッド形成条件下で参照核酸配列に結合し続けるそれらの能力によっても定められ得る。参照分子に対して構造又は機能的類似性を有する相同体は、参照分子の化学誘導体であり得る。構造及び機能的相同体並びに誘導体について検出し、作製し、スクリーニングする方法は当技術分野で公知である。

20

【0095】

「ハイブリッド形成」は一般に、相補鎖がそれらの融解温度を下回る環境で存在するときに変性DNAが再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の度合いが高いほど、使用され得る相対温度は高くなる。結果として、より高い相対温度はよりストリンジェンシーの高い反応条件を作る傾向があり、一方でより低い温度はストリンジェンシーがより低くなるということになる。ハイブリッド形成反応のストリンジェンシーのさらなる詳細及び説明については、その全体において本明細書中で参照により組み込まれるAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)を参照。

30

【0096】

ハイブリッド形成反応の「ストリンジェンシー」は、当業者により容易に決定可能であり、一般にプローブの長さ、洗浄温度及び塩濃度に依存する経験的計算である。一般に、正確なアニーリングのためには、プローブが長いほど高い温度が必要となり、一方でプローブが短いほど必要な温度は低くなる。

40

【0097】

「ストリンジェントな条件」又は「高ストリンジェンシー条件」は、本明細書中で定義される場合、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば50で0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを使用するもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミドなどの変性剤、例えば42で、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/Ph6.5の50Mmリン酸ナトリウム緩衝液、750Mm塩化ナトリウム、75M

50

mクエン酸ナトリウム入りの50% (v/v) ホルムアミド、を使用するもの；又は(3) 42 で、50%ホルムアミド、5xSSC (0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50Mmリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハート溶液、超音波処理サケ精子DNA (50 µl/mL)、0.1%SDS及び10%硫酸デキストランを使用し、0.2xSSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中で42 で10分間洗浄し、続いて55 でEDTA含有0.1xSSCからなる10分間の高ストリンジェンシー洗浄を行う、溶液中での一晚のハイブリッド形成により同定され得る。

【0098】

本願全体を通じて与えられる全ての最大の数値制限は、全てのより低い数値制限が本明細書中で明らかに書かれているかのように、全てのより低い数値制限を含むものとする。本願全体を通じて与えられる全ての最小の数値制限は、全てのより高い数値制限が本明細書中で明らかに書かれているかのように、全てのより高い数値制限を含むものとする。本願全体を通じて与えられる全ての数値範囲は、全てのより狭い数値範囲が全て本明細書中で明らかに書かれているかのように、このようなより広い数値範囲内に入る全てのより狭い数値範囲を含む。

10

【0099】

本明細書中で使用される場合、「修飾」という用語は、親分子から修飾された分子を物理的に区別する変化を指す。一実施形態では、本明細書中に記載の方法に従い調製されるCD47、HSVtk、EC-CD又はiCasp9変異体ポリペプチド中のアミノ酸変化は、野生型タンパク質、天然の突然変異体タンパク質又はこのような変異体ポリペプチドの修飾を含まない別の改変タンパク質など、本明細書中に記載の方法に従い修飾されていない対応する親とそれを区別する。別の実施形態では、変異体ポリペプチドは、未修飾ポリペプチドと変異体ポリペプチドの機能を区別する1つ以上の修飾を含む。例えば、変異体ポリペプチド中のアミノ酸変化は、その受容体結合プロファイルに影響を及ぼす。他の実施形態では、変異体ポリペプチドは、置換、欠失又は挿入修飾又はそれらの組み合わせを含む。別の実施形態では、変異体ポリペプチドは、未修飾ポリペプチドの親和性と比較して、受容体に対してその親和性を向上させる1つ以上の修飾を含む。

20

【0100】

一実施形態では、変異体ポリペプチドは、対応するネイティブ又は親配列と比較して、1つ以上の置換、挿入又は欠失を含む。ある一定の実施形態では、変異体ポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31~40、41~50又は51個以上の修飾を含む。

30

【0101】

「エピソームベクター」は、本明細書中で、細胞の細胞質に存在し得、自律的に複製し得る遺伝子ベクターを意味し；例えば、これは宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれない。多くのエピソームベクターが当技術分野で公知であり、下で記載する。

【0102】

遺伝子との関連での「ノックアウト」は、ノックアウトを有する宿主細胞が遺伝子の機能的タンパク質産物を産生しないことを意味する。本明細書中で概説するように、ノックアウトは、様々な方法で、コード配列の全て又は一部を除去し、機能的タンパク質が産生されないように（短縮又はナンセンス配列の何れか）フレームシフト突然変異を導入し、遺伝子が転写されないように調節因子（例えばプロモーター）を除去又は改変し、mRNAなどへの結合を通じて翻訳を妨害することによる結果であり得る。一般に、ノックアウトは、細胞の子孫も永久的にノックアウトを保有するようにゲノムDNAレベルでもたらされる。

40

【0103】

遺伝子の文脈において、「ノックイン」は、ノックインを有する宿主細胞が細胞において活性のあるより機能的なタンパク質を有することを意味する。本明細書中で概説するよ

50

うに、ノックインは、様々な方法で、通常はタンパク質をコードする導入遺伝子 (t g) の少なくとも 1 コピーの細胞への導入により、行われ得るが、これはまた、調節コンポーネントを置き換えることによっても、例えば内在性遺伝子に構成的プロモーターを付加することによって、行われ得る。一般に、ノックイン技術の結果、宿主細胞への導入遺伝子のさらなるコピーの組み込みが起こる。

【 0 1 0 4 】

V I I . 低免疫原性多能性細胞

本発明は、マウス及びヒト H I P 細胞を作製し、野生型細胞を用いて開始し、それらを多能性にし (例えば誘導多能性幹細胞又は i P S C を作製) 、次いで i P S C 集団から H I P 細胞を作製するための、組成物及び方法を提供する。

10

【 0 1 0 5 】

内在性 B 2 M 遺伝子の両アレルを不活性化する 1 つ以上の変化 ; 内在性 C I I T A 遺伝子の両アレルを不活性化する 1 つ以上の変化 ; 及びヒト H I P 幹細胞において C D 4 7 遺伝子の発現上昇を引き超す 1 つ以上の変化を含む、低免疫原性多能性 (H I P) 幹細胞が本明細書中で提供され ; ヒト H I P 幹細胞は、前記 B 2 M 及び C I I T A の変化を含むが前記 C D 4 7 遺伝子発現上昇を含まない誘導多能性幹細胞 (i P S C) により発揮される第 2 の N K 細胞応答よりも低い第 1 のナチュラルキラー (N K) 細胞応答をもたらし、第 1 及び第 2 の N K 細胞応答は、B 2 M 及び C I I T A の変化を含むが C D 4 7 遺伝子発現上昇を含まないヒト H I P 又は i P S C の何れかとともにインビトロで温置される N K 細胞からの I F N - レベルを決定することによって測定される。H I P 幹細胞はマウス H I P 幹細胞であり得る。一部の実施形態では、H I P 幹細胞はヒト H I P 幹細胞である。

20

【 0 1 0 6 】

低免疫原性多能性細胞は、H L A - I 機能低下、H L A - I I 機能低下及び N K 細胞殺傷に対する感受性の低下の結果として、対象への移植時に、より拒絶されにくくなり得る。

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態では、低免疫原性多能性細胞は、 - 2 ミクログロブリンタンパク質発現が低下しているか又はそれを欠く。好ましい実施形態では、 - 2 ミクログロブリンタンパク質をコードする遺伝子が削除されるか又はノックアウトされる。より好ましい実施形態では、 - 2 ミクログロブリンタンパク質は、配列番号 1 に対して少なくとも 9 0 % (例えば 9 1 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 又は 1 0 0 %) の配列同一性を有する。より好ましい実施形態では、 - 2 ミクログロブリンタンパク質は配列番号 1 の配列を有する。

30

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態では、H L A - A タンパク質発現の低下により H L A - I 機能が低下する。好ましい実施形態では、H L A - A タンパク質をコードする遺伝子は削除又はノックアウトされる。一部の実施形態では、H L A - B タンパク質発現低下によって H L A - I 機能が低下する。好ましい実施形態では、H L A - B タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。一部の実施形態では、H L A - C タンパク質発現低下によって H L A - I 機能を低下させる。好ましい実施形態では、H L A - C タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。別の実施形態では、低免疫原性多能性細胞は H L A - I 機能を含まない。

40

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、低免疫原性多能性細胞は、C I I T A タンパク質発現が低下しているか又はそれを欠く。好ましい実施形態では、C I I T A タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。より好ましい実施形態では、C I I T A タンパク質は、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % (例えば 9 1 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 又は 1 0 0 %) の配列同一性を有する。より好ましい実施形態では、C I I T A タンパク質は配列番号 2 の配列を有する。

【 0 1 1 0 】

50

一部の実施形態では、H L A - D P タンパク質発現の減少により H L A - I I 機能が低下する。好ましい実施形態では、H L A - D P タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。一部の実施形態では、H L A - D R タンパク質発現低下により H L A - I I 機能が低下する。好ましい実施形態では、H L A - D R タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。一部の実施形態では、H L A - D Q タンパク質発現低下により H L A - I I 機能が低下する。好ましい実施形態では、H L A - D Q タンパク質をコードする遺伝子が削除又はノックアウトされる。本発明は、H L A - I I 機能を含まない低免疫原性多能性細胞を提供する。

【0111】

本発明は、マクロファージ食作用又は N K 細胞殺傷に対する感受性が低下した低免疫原性多能性細胞を提供する。感受性の低下は、C D 4 7 タンパク質の発現上昇により起こる。一部の実施形態では、C D 4 7 発現上昇は、内在性 C D 4 7 遺伝子遺伝子座に対する修飾の結果である。他の実施形態では、C D 4 7 発現上昇は、C D 4 7 導入遺伝子によるものである。好ましい実施形態では、C D 4 7 タンパク質は、配列番号 3 に対して少なくとも 90% (例えば 91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の配列同一性を有する。より好ましい実施形態では、C D 4 7 タンパク質は配列番号 3 の配列を有する。

【0112】

本方法の別の実施形態では、マクロファージ食作用に対する多能性細胞の感受性を低下させるタンパク質の発現上昇は、内在性遺伝子遺伝子座に対する修飾の結果である。好ましい実施形態では、内在性遺伝子遺伝子座は C D 4 7 タンパク質をコードする。別の実施形態では、タンパク質発現上昇は、導入遺伝子の発現の結果である。好ましい実施形態では、導入遺伝子は C D 4 7 タンパク質をコードする。より好ましい実施形態では、C D 4 7 タンパク質は、配列番号 3 に対して少なくとも 90% (例えば 91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の配列同一性を有する。より好ましい実施形態では、C D 4 7 タンパク質は配列番号 3 の配列を有する。

【0113】

一部の実施形態では、H I P 細胞における C D 4 7 タンパク質のレベルは、対応する多能性幹細胞、例えば胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞でのレベルよりも高い。一部の例では、マウス H I P 細胞でのマウス C D 4 7 タンパク質のレベルは、対応するマウス多能性幹細胞でのレベルよりも高い (例えば少なくとも 0.5 倍高い、少なくとも 1.0 倍高い、少なくとも 1.5 倍高い、少なくとも 2 倍高い、少なくとも 3 倍高い、少なくとも 4 倍高い、少なくとも 5 倍高い、少なくとも 6 倍高い、少なくとも 7 倍高い、少なくとも 8 倍高い、少なくとも 8 倍以上高い)。ある特定の例では、ヒト H I P 細胞でのヒト C D 4 7 タンパク質のレベルは、対応するヒト多能性幹細胞のレベルよりも高い (例えば少なくとも 0.5 倍高い、少なくとも 1.0 倍高い、少なくとも 1.5 倍高い、少なくとも 2 倍高い、少なくとも 3 倍高い、少なくとも 4 倍高い、少なくとも 5 倍高い、少なくとも 6 倍高い、少なくとも 7 倍高い、少なくとも 8 倍高い、少なくとも 8 倍以上高い)。

【0114】

本方法の別の実施形態は、低免疫原性多能性又は分化した子孫細胞の死滅を引き起こすトリガーにより活性化される自殺遺伝子を発現させることをさらに含む。好ましい実施形態では、自殺遺伝子は、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ遺伝子 (H S V - t k) であり、トリガーはガンシクロビルである。より好ましい実施形態では、H S V - t k 遺伝子は、配列番号 4 に対して少なくとも 90% (例えば 91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%) の配列同一性を有するタンパク質をコードする。より好ましい実施形態では、H S V - t k 遺伝子は、配列番号 4 の配列を有するタンパク質をコードする。

【0115】

本方法の別の実施形態では、自殺遺伝子は、エシェリキア・コリ (E s c h e r i c h

10

20

30

40

50

i a c o l i) シトシンデアミナーゼ遺伝子 (E C - C D) であり、トリガーは 5 - フルオロシトシン (5 - F C) である。好ましい実施形態では、E C - C D 遺伝子は、配列番号 5 に対して少なくとも 90 % (例えば 91 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 %) の配列同一性を有するタンパク質をコードする。より好ましい実施形態では、E C - C D 遺伝子は、配列番号 5 の配列を有するタンパク質をコードする。

【 0 1 1 6 】

本方法の別の実施形態では、自殺遺伝子は誘導性カスパーゼタンパク質をコードし、トリガーは特異的な二量体誘導化合物 (C I D) である。本方法の好ましい実施形態では、本遺伝子は、配列番号 6 に対して少なくとも 90 % (例えば 91 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 %) の配列同一性を含む誘導性カスパーゼタンパク質をコードする。より好ましい実施形態では、本遺伝子は、配列番号 6 の配列を含む誘導性カスパーゼタンパク質をコードする。より好ましい実施形態では、C I D は A P 1 9 0 3 である。

10

【 0 1 1 7 】

A . 遺伝子変化のための方法

本方法は、多能性細胞及び H I P 細胞の両方を作製するために細胞内又は無細胞条件下で核酸配列を修飾する方法を含む。代表的な技術としては、相同組み換え、ノックイン、Z F N (ジンクフィンガーヌクレアーゼ)、T A L E N (転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ)、C R I S P R (クラスター化された規則的配置の短回文配列リピート (c l u s t e r e d r e g u l a r l y I n t e r s p a c e d s h o r t p a l i n d r o m i c r e p e a t s)) / C a s 9 及び他の部位特異的なヌクレアーゼ技術が挙げられる。これらの技術により、所望の遺伝子座部位での 2 本鎖 D N A 破壊が可能になる。これらの制御された 2 本鎖破壊は、特異的な遺伝子座部位で相同組み換えを促進する。この工程は、配列を認識し結合するエンドヌクレアーゼでの、染色体など、核酸分子の特異的な配列を標的とすることに焦点を当て、核酸分子での 2 本鎖破壊を誘導する。2 本鎖破壊は、エラープローン非相同末端結合 (N H E J) 又は相同組み換え (H R) の何れかにより修復される。

20

【 0 1 1 8 】

当業者により認められるように、本発明の多能性細胞を改変するために多くの様々な技術を使用し得、本明細書中で概説するように低免疫原性になるように i P S C を改変する。

30

【 0 1 1 9 】

一般に、これらの技術は、個々に又は組み合わせて使用され得る。例えば H I P 細胞の作製において、C D 4 7 の機能性をノックインするためのウイルス技術 (例えばレンチウイルス) とともに、改変細胞での活性 B 2 M 及び / 又は C I I T A タンパク質の発現を低下させるために C R I S P R が使用され得る。また、当業者により認められるように、一実施形態は、C D 4 7 機能性をノックインするためのレンチウイルスの最終段階とともに、B 2 M をノックアウトするための C R I S P R 段階、続いて C I I T A をノックアウトするための C R I S P R 段階を連続的に利用したが、これらの遺伝子は様々な技術を使用して様々な順序で操作され得る。

40

【 0 1 2 0 】

下でより詳細に論じるように、初期化遺伝子の一過性発現は一般に多能性幹細胞を作製 / 誘導するために行われる。

【 0 1 2 1 】

a . C R I S P R 技術

一実施形態では、当技術分野で公知のように、クラスター化された規則的配置の短回文配列リピート (C l u s t e r e d r e g u l a r l y i n t e r s p a c e d s h o r t p a l i n d r o m i c r e p e a t s) / C a s (「 C R I S P R 」) 技術を使用して、細胞を操作する。開始 i P S C を作製するため又は i P S C から H I P 細胞

50

胞を作製するために、C R I S P Rを使用し得る。C R I S P Rに基づく多数の技術があり、例えば参照により本明細書によって組み込まれるDoudna and Charpentier, Science doi: 10.1126/science.1258096を参照。C R I S P R技術及びキットは市販されている。

【0122】

b. TALEN技術

一部の実施形態では、本発明のHIP細胞は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)法を使用して作製される。TALENは、実際に何らかの所望のDNA配列に結合し、切断するように改変され得るヌクレアーゼと組み合わせられた制限酵素である。TALENキットは市販されている。

10

【0123】

c. ジンクフィンガー技術

一実施形態では、Znフィンガーヌクレアーゼ技術を使用して細胞を操作する。Znフィンガーヌクレアーゼは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることにより作製される人工的制限酵素である。ジンクフィンガードメインは特異的な所望のDNA配列を標的とするために改変され得、これにより、ジンクフィンガーヌクレアーゼが複雑なゲノム内でユニークな配列を標的とすることが可能になる。内在性DNA修復機構の長所により、C R I S P R及びTALENと同様に、より高等な生物のゲノムを適正に改変するためにこれらの試薬を使用し得る。

20

【0124】

d. ウイルスに基づく技術

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター及びセンダイウイルスベクターの使用を含むが限定されない、本発明のHIP細胞を作製するために(並びにiPSCのオリジナル作製(original generation)のため)使用し得る多岐にわたるウイルス技術がある。iPSCの作製において使用されるエピソームベクターを下で記載する。

【0125】

e. 干渉RNAを使用した遺伝子の下方制御

他の実施形態では、HLA分子で使用されるタンパク質をコードする遺伝子は、RNAi技術により下方制御される。RNA干渉(RNAi)は、しばしば特異的なmRNA分子の分解を引き起こすことにより、RNA分子が遺伝子発現を阻害する過程である。2つのタイプのRNA分子-マイクロRNA(miRNA)及び低分子干渉RNA(siRNA)-がRNA干渉の中心となる。これらは、標的mRNA分子に結合し、それらの活性を上昇又は低下させる。RNAiは、ウイルス及びトランスポゾン由来のものなどの寄生性の核酸に対する細胞防御を助ける。RNAiは発生にも影響を与える。

30

【0126】

sdRNA分子は、19~21塩基のガイド(アンチセンス)鎖を含む非対称siRNAのクラスである。これらは、5'ホスフェート、2'Ome又は2'F修飾ピリミジン及び6個のホスホチオエートを3'位置に含有する。これらは、3'複合化ステロール部分、2個のホスホチオエートを3'位置に、及び2'Ome修飾ピリミジンを含有するセンス鎖も含有する。両鎖は、3を超えない長さの未修飾プリンの連続ストレッチとともに2'Omeプリンを含有する。sdRNAは、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第8,796,443号明細書で開示される。

40

【0127】

これらの技術の全てに対して、本明細書中で概説するように組み換え核酸を作製するために周知の組み換え技術が使用される。ある一定の実施形態では、組み換え核酸(所望のポリペプチド、例えばCD47又は破壊配列の何れかをコードする)は、発現コンストラクト中で1つ以上の制御ヌクレオチド配列に操作可能に連結され得る。制御ヌクレオチド配列は、一般に処置しようとする宿主細胞及び対象に適切である。様々な宿主細胞に対して、多くのタイプの適切な発現ベクター及び適切な調節配列が当技術分野で公知である。

50

一般的には、1つ以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列及びエンハンサー又は活性化因子配列が挙げられ得るが限定されない。当技術分野で公知のような構成的又は誘導性プロモーターも企図される。プロモーターは、天然のプロモーター又は複数のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターの何れかであり得る。発現コンストラクトは、プラスミドなど、エピソーム上で細胞中に存在し得るか、又は発現コンストラクトは染色体に挿入され得る。特定の実施形態では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にするために選択可能マーカー遺伝子を含む。ある一定の実施形態は、少なくとも1個の調節配列に操作可能に連結される変異体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。本明細書中での使用のための調節配列は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメントを含む。ある一定の実施形態では、発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞の選択、発現させようとする特定の変異体ポリペプチド、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御するための能力又はベクターによりコードされる何らかの他のタンパク質、例えば抗生物質マーカーなど、の発現のために設計される。

10

20

30

40

50

【0128】

適切なプロモーターの例としては、例えば次の遺伝子からのプロモーター：ハムスターのユビキチン/S27aプロモーター（国際公開第97/15664号パンフレット）、サル空胞化ウイルス40（SV40）初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）の末端反復配列領域、マウス乳癌ウイルスプロモーター（MMTV）、モロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列領域及びヒトサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターが挙げられる。他の異種哺乳動物プロモーターの例は、アクチン、免疫グロブリン又は熱ショックプロモーターである。一部の実施形態では、伸長因子1-アルファプロモーターが使用される。

【0129】

さらなる実施形態では、哺乳動物宿主細胞での使用のためのプロモーターは、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス（英国特許第2,211,504号明細書、1989年7月5日公開）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40（SV40）などのウイルスのゲノムから得られ得る。さらなる実施形態では、異種哺乳動物プロモーターが使用される。例としては、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター及び熱ショックプロモーターが挙げられる。SV40の初期及び後期プロモーターは、都合よく、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として得られる。Fiers et al., Nature 273:113-120 (1978)。ヒトサイトメガロウイルスの前初期プロモーターは、都合よく、HindIII-E制限断片として得られる。Greenaway, P. J. et al., Gene 18:355-360 (1982)。前述の参考文献はそれらの全体において参照により組み込まれる。

【0130】

B. 多能性細胞の作製

本発明は、多能性細胞から非免疫原性多能性細胞を作製する方法を提供する。従って、第1段階は多能性幹細胞を提供することである。

【0131】

マウス及びヒト多能性幹細胞（一般にiPSCと呼ばれ；マウス細胞の場合はmiPSC又はヒト細胞の場合はhiPSC）の作製は一般に当技術分野で公知である。当業者により認められるように、iPSCの作製のために様々な異なる方法がある。4つの転写因子、Oct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf4のウイルス導入を使用して、マウス胚又は成体線維芽細胞から最初の誘導が行われた；その全体において、及び具体的には文献中で概説される技術に対して、参照により本明細書によって組み込まれるTakahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006)

を参照。そのときから、多くの方法が開発された；両者ともそれらの全体において、及び特に h i P S C を作製するための方法について、参照により本発明により明確に組み込まれる、概説に対する Seki et al., World J. Stem Cells 7 (1) : 116 - 125 (2015) 及び Lakshmi pathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013 を参照（例えば後者の参考文献の第3章を参照）。

【0132】

一般に、i P S C は、通常はエピソームベクターを使用して導入される、宿主細胞中での1つ以上の「初期化因子」の一過性発現により作製される。これらの条件下で少量の細胞が i P S C になるように誘導される（選択マーカーが使用されないので一般にこの段階の効率は低い）。細胞が「初期化」され、多能性になると、これらはエピソームベクターを失い、内在遺伝子を使用して因子を産生する。このエピソームベクターの喪失の結果、「ゼロフットプリント (zero footprint)」細胞と呼ばれる細胞が得られる。（特に宿主細胞のゲノムにおいて）遺伝子修飾が少ないほど良いのでこれは望ましい。従って、得られる h i P S C に永久的な遺伝子修飾がないことが好ましい。

10

【0133】

また当業者により認識されるように、使用され得るか又は使用される多くの初期化因子が変動し得る。一般に、より少ない初期化因子が使用される場合、多能性状態への細胞の形質転換の効率が低下し、「多能性」も低下し、例えばより少ない初期化因子では、十分に多能性ではないが、より少ない細胞タイプにのみ分化可能であり得る細胞が得られ得る。

20

【0134】

一部の実施形態では、1個の初期化因子、O C T 4 が使用される。他の実施形態では、2つの初期化因子、O C T 4 及び K L F 4 が使用される。他の実施形態では、3つの初期化因子、O C T 4、K L F 4 及び S O X 2 が使用される。他の実施形態では、4つの初期化因子、O C T 4、K L F 4、S O X 2 及び c - M y c が使用される。他の実施形態では、S O K M N L T ; S O X 2、O C T 4 (P O U 5 F 1)、K L F 4、M Y C、N A N O G、L I N 2 8 及び S V 4 0 L T 抗原から選択される、5、6又は7個の初期化因子が使用され得る。

30

【0135】

一般に、当技術分野で公知のもの及び市販のものなど、エピソームベクターにおいてこれらの初期化因子遺伝子が提供される。例えば、ThermoFisher/Invitrogenは、h i P S C のゼロフットプリント (zero footprint) 作製のためのセンダイウイルス初期化キットを販売しており、カタログ番号 A 3 4 5 4 6 を参照。ThermoFisherは、E B N A に基づく系も販売しており、カタログ番号 A 1 4 7 0 3 を参照。

【0136】

さらに、利用可能な多くの市販 h i P S C 株がある；例えばゼロフットプリント (zero footprint)、ウイルス組み込みのないヒト i P S C 細胞株である Gibco (登録商標) エピソーム h i P S C 株、K 1 8 9 4 5 を参照 (Burridge et al., 2011、上出も参照)。

40

【0137】

一般に、当技術分野で公知のように、i P S C は、本明細書中で記載のように初期化因子を一過性に発現させることにより、C D 3 4 + 臍帯血細胞、線維芽細胞など、非多能性細胞から作製される。

【0138】

例えば、成功した i P S C はまた、初期化効率が低下するものの、C - M y c を省略して O c t 3 / 4、S o x 2 及び K l f 4 のみを使用して作製された。

50

【0139】

一般に、iPSCは、KLF4、Nanog、OCT4、SOX2、ESRRB、TBX3、c-Myc及びTCL1を含むある一定の因子の発現を特徴とする。本発明の目的のためのこれらの因子の新しい発現又は発現上昇は、内在遺伝子座の誘導若しくは調整を介し得るか又は導入遺伝子からの発現からのものであり得る。

【0140】

例えば、マウスiPSCは、その全体において、及び具体的にはmiPSCの作製のための方法及び試薬に対して、参照により本明細書によって組み込まれるDieckmann et al., Sci Rep. 2015, Jan. 28; 5: 8081 (doi: 10.1038/srep08081)の方法を使用して作製され得る。また、例えば全体において及び具体的には本明細書中で概説される方法に対して、参照により本明細書によって組み込まれるBurrIDGE et al., PLoS One, 2011 6(4): 18293も参照。

10

【0141】

一部の例では、細胞の多能性は、一般にPCT/US18/13688号明細書で示されるように、又は本明細書中で概説されるように、及び実施例で分化反応を遂行することにより、例えば初期化因子についてアッセイすることにより、本明細書中で概説されるように測定されるか又は確認される。

【0142】

C. 低免疫原性多能性細胞の作製

本発明は、本明細書中で定められるように、患者への低免疫原性細胞の作製、操作、増殖及び移植を対象とする。多能性細胞からのHIP細胞の作製は3個という少ない遺伝子変化により行われ、その結果、細胞活性の破壊が最小限となるが、細胞に対して免疫サイレンシングを与える。

20

【0143】

本明細書中で論じられるように、一実施形態は、MHC I及びII（細胞がヒトである場合はHLA I及びII）のタンパク質活性の低下又は排除を利用する。これは、それらの構成成分をコードする遺伝子を変化させることにより行われ得る。一実施形態では、遺伝子のコード領域又は調節配列は、CRISPRを使用して破壊される。別の実施形態では、干渉RNA技術を使用して、遺伝子翻訳を減少させる。第3の変化は、CD47など、マクロファージ食作用に対する感受性を調節する遺伝子における変化であり、これは一般的にウイルス技術を使用した遺伝子の「ノックイン」である。

30

【0144】

低免疫多能性細胞（HIP細胞）のさらなる説明は、2018年1月14日提出の国際出願第PCT/US18/13688号明細書及び2017年1月13日提出の米国仮特許出願第62/445,969号明細書で見出され得、その全体におけるこれらの開示は本明細書中で、参照により、特に実施例、図面、図面の説明及び低免疫原性多能性幹細胞の作製及び他の細胞タイプへのこのような細胞の分化の説明が組み込まれる。

【0145】

一部の例では、CRISPRは遺伝子修飾のために使用されており、細胞株の高効率編集を可能にするCas9コンストラクトを含有するhiPSC細胞が使用され得；例えばLife TechnologiesからのHuman Episomal Cas9 iPSC細胞株、A33124を参照。

40

【0146】

1. HLA - I低下

本発明のHIP細胞は、MHC I機能（細胞がヒト細胞由来である場合はHLA I）の低下を含む。

【0147】

当業者により認められるように、機能の低下は、遺伝子から核酸配列を除去するか、配列を他の配列で妨害するか、又は核酸の調節コンポーネントを変化させることを含め、多

50

くの方法において遂行され得る。例えば、関心のある遺伝子のコード領域の全て又は一部を除去し得るか、又は「ナンセンス」配列で置換し得、フレームシフト突然変異を作製し得、プロモーターなどの調節配列の全て又は一部を除去又は置換し得、翻訳開始配列を除去又は置換し得るなどである。

【0148】

当業者により認められるように、多能性細胞におけるMHC I機能（細胞がヒト細胞である場合はHLA I）の良好な低下は、当技術分野で公知の技術を使用して、及び下に記載のように；例えば、HLA複合体に結合する標識される抗体を使用したFACS技術；例えばヒト主要組織適合HLAクラスI抗原のアルファ鎖に結合する市販のHLA-A、B、C抗体を使用して、測定され得る。

10

【0149】

B2M変化

一実施形態では、多能性幹細胞、本明細書中で開示されるヒト配列、におけるHLA-I活性の低下は、-2ミクログロブリン遺伝子の発現を破壊することにより行われる。この変化は一般に本明細書中で、遺伝子「ノックアウト」と呼び、本発明のHIP細胞において、これは宿主細胞において両アレル上で行われる。一般に、両破壊を行うための技術は同じである。

【0150】

特に有用な実施形態は、遺伝子を破壊するためにCRISPR技術を使用する。一部の例では、遺伝子のコード領域に小さい欠失/挿入を導入するためにCRISPR技術が使用され、機能的タンパク質が産生されないようになり、しばしば、フレームシフト突然変異の結果、停止コドンが生じ、短縮された非機能的タンパク質が作製されるようになる。

20

【0151】

従って、有用な技術は、マウスでのB2M遺伝子又はヒトでのB2M遺伝子のコード配列を標的とするために設計されるCRISPR配列を使用することである。遺伝子編集後、遺伝子移入したiPSC培養物を単一細胞に解離させる。単一細胞をフルサイズのコロニーになるように増殖させ、CRISPR切断部位からの異常な配列の存在についてスクリーニングすることによりCRISPR編集について試験する。両アレルで欠失があるクローンを拾う。このようなクローンは、PCRにより示されるようにB2Mを発現せず、FACS分析により示されるようにHLA-Iを発現しなかった（例えば実施例1及び6参照）。

30

【0152】

B2M遺伝子が不活性化されているか否かを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書中に記載されている。一実施形態では、本アッセイは、B2Mタンパク質に対する抗体で探索する、細胞溶解物のウエスタンブロットである。別の実施形態では、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）又は逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）は、不活性変化の存在を確認する。

【0153】

さらに、HLA I複合体が細胞表面上で発現されないことを確認するために細胞を試験し得る。これは、上で論じるような1つ以上のHLA細胞表面構成成分に対する抗体を使用して、FACS分析によりアッセイされ得る。

40

【0154】

両アレルでB2M遺伝子を抑制しようとする場合、他のものでは不良な結果であったことは注目すべきことである。例えばGornal usse et al., Nature Biotech. Doi/10.1038/nbt.3860)を参照。

【0155】

2. HLA-II低下

HLA Iの低下に加えて、本発明のHIP細胞は、MHC II機能（細胞がヒト由来の場合はHLA II）も欠く。

【0156】

50

当業者により認められるように、機能の低下は、遺伝子からの核酸配列の除去、遺伝子への核酸配列の付加、読み枠の破壊、配列を他の配列で妨害すること又は核酸の調節コンポーネントの変化を含む、多くの方法で遂行され得る。一実施形態では、関心のある遺伝子のコード領域の全て又は一部を除去し得るか又は「ナンセンス」配列で置換し得る。別の実施形態では、プロモーターなどの調節配列を除去又は置換し得、翻訳開始配列を除去又は置換し得るなどである。

【0157】

多能性細胞又はそれらの派生物におけるMHC II機能（細胞がヒト由来の場合はHLA II）の低下の成功は、タンパク質に対する抗体を使用してウエスタンブロッティング、FACS技術、RPA技術、RT-PCR技術などの当技術分野で公知の技術を使用して測定され得る。

10

【0158】

CIIITAの変化

一実施形態では、HLA-II活性の低下は、多能性幹細胞においてCIIITA遺伝子の発現を破壊することにより行われ、そのヒト配列は本明細書中で示す。この変化は一般に、本明細書中で遺伝子「ノックアウト」と呼ばれ、本発明のHIP細胞において、宿主細胞中の両アレル上で行われる。

【0159】

CIIITA遺伝子が不活性化されているか否かを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書中に記載される。一実施形態では、本アッセイは、CIIITAタンパク質に対する抗体で探索する細胞溶解物のウエスタンブロットである。別の実施形態では、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）又は逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）は、不活性化する変化の存在を確認する。

20

【0160】

さらに、HLA-II複合体が細胞表面上で発現されないことを確認するために、本細胞を試験し得る。再び、このアッセイは当技術分野で公知のように行われ（PCT/US 18/13688号明細書、例えばPCT/US 18/13688号明細書の図21参照）、一般に、下で概説されるようなヒトHLAクラスII HLA-DR、DP及び殆どのDQ抗原に結合する市販抗体に基づいて、ウエスタンブロット又はFACS分析の何れかを使用して行われる。

30

【0161】

特に有用な実施形態は、CIIITA遺伝子を破壊するためにCRISPR技術を使用する。全てのMHC II分子に対する必須の転写因子である、マウスにおけるCiita遺伝子又はヒトにおけるCIIITA遺伝子のコード配列を標的とするためにCRISPRを設計した。遺伝子編集後、遺伝子移入したiPSC培養物を単一細胞に解離させた。これらをフルサイズのコロニーに増殖させ、CRISPR切断部位からの異常な配列の存在についてスクリーニングすることによりCRISPR編集の成功について試験した。欠失のあるクローンは、PCRにより判定した場合、CIIITAを発現せず、FACS分析により判定した場合、MHC II/HLA-IIを発現しなかった。

【0162】

3. マクロファージ食作用及び/又はNK細胞殺傷の低下

HLA-I及びII（又はMHC-I及びII）の減少に加えて、一般的にはB2M及びCIIITAノックアウトを使用して、本発明のHIP細胞は、マクロファージ食作用及びNK細胞殺傷に対する感受性が低下している。得られたHIP細胞は、1つ以上のCD47トランス遺伝子により、免疫マクロファージ及び自然経路を「回避する」。

【0163】

HIP細胞及びHIP細胞由来の細胞がNK細胞殺傷及び/又はマクロファージ食作用を逃れるか又は回避するための能力は、PCT/US 18/13688号明細書の図14A~14C及び34A~34Cで示され、その内容、特に図面、図面の説明及び実施例が本明細書中で参照により組み込まれる。例えば、図14B~14Cは、マウスHIP細胞

50

(例えば B2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 トランスジェニックマウス i P S C) が N K 細胞による C D 1 0 7 a 発現の誘導ができず、従って N K 細胞応答を惹起しなかったことを示す。さらに、このようなマウス H I P 細胞が N K 細胞の活性化又は I F N の放出を誘導しなかったことが示された。N K 細胞を H I P 細胞由来の分化細胞 (内皮細胞、平滑筋細胞及び心筋細胞など) と温置した場合、N K 細胞応答は誘導されなかった (例えば P C T / U S 1 8 / 1 3 6 8 8 号明細書の図 3 4 A ~ 3 4 C) を参照。

【 0 1 6 4 】

C D 4 7 発現上昇

一部の実施形態では、マクロファージ食作用及び N K 細胞殺傷感受性の低下は、H I P 細胞表面上での C D 4 7 上昇によるものである。これは、「ノックイン」又はトランスジェニック技術を使用して当業者により認められるように、いくつかの方法で行われる。一部の例では、C D 4 7 発現上昇は、1 つ以上の C D 4 7 導入遺伝子によるものである。

10

【 0 1 6 5 】

従って、一部の実施形態では、C D 4 7 遺伝子の 1 コピー以上を H I P 細胞に誘導性又は構成的プロモーターの制御下で付加するが、後者が好ましい。一部の実施形態では、レンチウイルスコンストラクトが本明細書中で記載のように使用されるか、又は当技術分野で公知である。C D 4 7 遺伝子は、当技術分野で公知のような適切なプロモーターの制御下で、宿主細胞のゲノムに組み込み得る。

【 0 1 6 6 】

B 2 M - / - C I I T A - / - i P S C から H I P 細胞株を作製した。プラストサイジンマーカーを使用して、C D 4 7 を発現するレンチウイルスベクターを含有する細胞を選択した。C D 4 7 遺伝子配列を合成し、プラストサイジン耐性があるプラスミドレンチウイルス p L e n t i 6 / V 5 に D N A をクローニングした (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A) 。

20

【 0 1 6 7 】

一部の実施形態では、内在性 C D 4 7 遺伝子の調節配列を変化させることにより、例えば構成的プロモーターへと、又は異なる誘導性プロモーターへと、内在性プロモーターを交換することにより、C D 4 7 遺伝子の発現を上昇させ得る。これは一般に C R I S P R などの公知の技術を使用して行われ得る。

【 0 1 6 8 】

変化させたら、抗 C D 4 7 抗体を使用した、ウエスタンブロット、E L I S A アッセイ又は F A C S アッセイなど、実施例に記載のものなどの公知の技術を使用して、十分な C D 4 7 発現の存在をアッセイし得る。一般に、「十分」は、この文脈において、N K 細胞殺傷及び / 又はマクロファージ食作用を抑制する H I P 細胞表面上での C D 4 7 の発現の上昇を意味する。それらの M H C I が排除されると、細胞上の天然発現レベルが低すぎて N K 細胞溶解からそれらを保護できない。

30

【 0 1 6 9 】

4 . 自殺遺伝子

一部の実施形態では、本発明は、「自殺遺伝子」又は「自殺スイッチ」を含む低免疫原性多能性細胞 (H I P 細胞) を提供する。これらは、望ましくない方式で増殖し、分裂する場合に低免疫原性多能性細胞の死を引き起こし得る「安全スイッチ」として機能するように組み込まれる。「自殺遺伝子」消失アプローチは、特異的な化合物により活性化された場合のみ細胞死滅を引き起こすタンパク質をコードする遺伝子移入ベクターにおいて自殺遺伝子を含む。自殺遺伝子は、選択的に無毒性化合物を強毒性代謝産物に変換する酵素をコードし得る。この結果は、酵素を発現する細胞を特異的に除去している。一部の実施形態では、自殺遺伝子はヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子であり、トリガーはガンシクロビルである。他の実施形態では、自殺遺伝子はエシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (E C - C D) 遺伝子であり、トリガーは 5 - フルオロシトシン (5 - F C) である (両者ともそれらの全体において参照により本明細書中で組み込まれる、B a r e s e e t a l . , M o l . T

40

50

herap. 20(10):1932-1943(2012), Xu et al., Cell Res. 8:73-8(1998))。

【0170】

他の実施形態では、自殺遺伝子は誘導性カスパーゼタンパク質である。誘導性カスパーゼタンパク質は、アポトーシスを誘導可能なカスパーゼタンパク質の少なくとも一部を含む。一実施形態では、カスパーゼタンパク質の一部は配列番号6で例示される。好ましい実施形態では、誘導性カスパーゼタンパク質はiCasp9である。これは、ヒトカスパーゼ9をコードする遺伝子に一連のアミノ酸を通じて連結される、F36V突然変異がある、ヒトFK506-結合タンパク質、FKBP12の配列を含む。FKBP12-F36Vは、低分子二量体化剤AP1903に高い親和性で結合する。従って本発明でのiCasp9の自殺機能は二量体誘導化合物(CID)の投与により惹起される。一部の実施形態では、CIDは低分子薬AP1903である。二量体化はアポトーシスの迅速な誘導を引き起こす。(それぞれがそれらの全体において本明細書中に参照により組み込まれる、国際公開第2011146862号パンフレット; Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:18(2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant. 13:913-924(2007)参照)。

10

【0171】

5. HIP細胞表現型に対するアッセイ及び多能性の保持

HIP細胞が作製されたら、一般に本明細書中に及び実施例に記載のように、これらをそれらの低免疫原性及び/又は多能性保持についてアッセイし得る。

20

【0172】

例えば、PCT/US18/13688号明細書の図13及び図15で例示されるような多くの技術を使用して、低免疫原性をアッセイし得る。これらの技術には、同種宿主への移植及び宿主免疫系を回避するHIP細胞増殖(例えば奇形腫)についての監視が含まれる。ルシフェラーゼを発現させるために、HIP派生物に対して形質導入を行い、次に生体発光イメージングを使用して追跡し得る。同様に、HIP細胞が宿主動物において免疫反応を引き起こさないことを確認するために、HIP細胞に対する宿主動物のT細胞及び/又はB細胞応答を試験する。Elispot、ELISA、FACS、PCR又はマスサイトメトリー(CYTOF)によってT細胞機能を評価する。FACS又はルミネックスを使用して、B細胞応答又は抗体応答を評価する。さらに又は或いは、一般にPCT/US18/13688号明細書の図14A~14Cで示されるように、自然免疫応答、例えばNK細胞殺傷を回避するためのその能力について細胞をアッセイし得る。インビトロ又はインビボでNK細胞リトリティック(lytolytic)活性を評価する(図15で示されるように)。

30

【0173】

同様に、多くの方法で多能性の保持が試験される。一実施形態では、一般に本明細書中に記載され、PCT/US18/13688号明細書の図29で示されるように、ある種の多能性特異的な因子の発現によって、多能性をアッセイする。さらに又は或いは、多能性の指標としてHIP細胞を1つ以上の細胞タイプに分化させる。

40

【0174】

D. HIP細胞の好ましい実施形態

HIP細胞として又はHIP細胞の分化産物としての何れかでヒト患者などの同種宿主に移植された場合に多能性を示すが宿主免疫応答を生じさせない低免疫原性多能性幹細胞(「HIP細胞」)が本明細書中で提供される。

【0175】

一実施形態では、ヒト多能性幹細胞(hiPSC)は、a)各アレルでのB2M遺伝子の破壊(例えばB2M-/-)、b)各アレルでのCIITA遺伝子の破壊(例えばCIITA-/-)及びc)CD47遺伝子の過剰発現(CD47+、例えばCD47遺伝子の1つ以上のさらなるコピーを導入すること又はゲノム遺伝子を活性化することを通じて

50

）により低免疫原性が付与される。これにより、h i P S C 集団 B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g が付与される。好ましい実施形態では、細胞は非免疫原性である。別の実施形態では、H I P 細胞に、上記のようであるが、必要なときにインビボで細胞を死滅させるために誘導される誘導性自殺遺伝子を含むことによりさらに修飾される非免疫原性 B 2 M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g が与えられる。

【 0 1 7 6 】

E . H I P 細胞の維持

作製されたら、i P S C の維持のために知られているように H I P 細胞を未分化状態に維持し得る。例えば分化を防ぎ、多能性を維持する培地を使用してマトリゲル上で H I P 細胞を培養する。

10

【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、H I P 細胞を凍結保存する。異なる細胞タイプへの分化前に細胞を凍結保存し得る。言い換えると、分化前に、本明細書中に記載の H I P 細胞を凍結融解し、分化方法に供する前に培養する。他の実施形態では、H I P 細胞は分化前に凍結保存しない。一部の実施形態では、分化した H I P 細胞を患者への投与前に凍結保存する。他の実施形態では、分化した H I P 細胞を患者への投与前に凍結保存しない。

【 0 1 7 8 】

F . H I P 細胞の分化

本発明は、対象への続く移植のために異なる細胞タイプに分化させる H I P 細胞を提供する。当業者により認められるように、分化のための方法は、公知の技術を使用して所望の細胞タイプに依存する。懸濁液中で細胞を分化させ、次に細胞生存を促進するためにマトリゲル、ゼラチン又はフィブリン/トロロンビン形態などのゲルマトリクス形態に入れる。当技術分野で公知のように、例えば、一般に細胞特異的マーカーの存在を評価することによって分化をアッセイする。

20

【 0 1 7 9 】

一部の実施形態では、肝細胞機能の喪失又は肝臓の肝硬変に対処するために、H I P 細胞を肝細胞に分化させる。H I P 細胞を肝細胞に分化させるために使用され得る多くの技術がある；例えばそれらの全体において、及び特に分化のための方法及び試薬に対して、参照により本明細書により明確に全て組み込まれる、P e t t i n a t o e t a l . , d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / s p r e 3 2 8 8 8 , S n y k e r s e t a l . , M e t h o d s M o l B i o l 6 9 8 : 3 0 5 - 3 1 4 (2 0 1 1) , S i - T a y e b e t a l . , H e p a t o l o g y 5 1 : 2 9 7 - 3 0 5 (2 0 1 0) 及び A s g a r i e t a l . , S t e m C e l l R e v (: 4 9 3 - 5 0 4 (2 0 1 3) を参照。一般に関連する肝細胞及び/又はアルブミン、アルファフェトプロテイン及びフィブリノーゲンを含むが限定されない特異的なマーカーの存在を評価することによって、当技術分野で公知のように分化をアッセイする。アンモニアの代謝、L D L 貯蔵及び取り込み、I C G 取り込み及び放出及びグリコーゲン貯蔵など、分化は機能面でも測定され得る。

30

【 0 1 8 0 】

一部の実施形態では、I 型糖尿病 (T 1 D M) に対処するための移植用に H I P 細胞をベータ様細胞又は膵島オルガノイドに分化させる。細胞系は T 1 D M に対処するための有望な方法であり、例えば参照により本明細書中で組み込まれる E l l i s e t a l . , d o i / 1 0 . 1 0 3 8 / n r g a s t r o . 2 0 1 7 . 9 3 を参照。さらに P a g l i u c a e t a l . は、h i P S C からの細胞分化の成功について報告している (その全体において、及び特にヒト多能性幹細胞からの機能的ヒト細胞の大規模産生についてそこで概説される方法及び試薬に対して、参照により本明細書によって組み込まれる d o i / 1 0 . 1 0 6 / j . c e l l . 2 0 1 4 . 0 9 . 0 4 0 を参照) 。さらに、V e g a s e t a l . は、ヒト多能性幹細胞からのヒト細胞の産生と、その後の宿主による免疫拒絶を回避するための封入を示す ; (d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / n m . 4 0 3 0 、その全体において、特にヒト多能性幹細胞からの機能的ヒト細胞の大規模産生につい

40

50

てそこで概説される方法及び試薬に対して、参照により本明細書によって組み込まれる)。

【0181】

一般に、インスリンを含むが限定されない細胞関連の又は特異的なマーカーの存在を評価することによって、当技術分野で公知のように分化をアッセイする。グルコース代謝の測定など、分化はまた機能面でも測定され得、一般的にはその全体において、及び具体的にはそこで概説されるバイオマーカーに対して、参照により本明細書によって組み込まれる Muraro et al., doi: 10.1016/j.cells.2016.09.002 を参照。

【0182】

dHIP ベータ細胞を作製したら、門脈/肝臓、網、胃腸粘膜、骨髄、筋肉又は皮下嚢にこれらを移植し得る(細胞懸濁液として、又は本明細書中で論じるようなゲルマトリクス内の何れかで)。

【0183】

一部の実施形態では、視力を脅かす眼疾患に対処するために、HIP細胞を網膜色素上皮(RPE)に分化させる。その全体において、及び特に分化技術及び試薬についてそこで概説される方法及び試薬に対して、参照により本明細書によって組み込まれる Kamao et al., Stem Cell Reports 2014:2:205-18 で概説される技術を使用して、ヒト多能性幹細胞をRPE細胞に分化させた; RPE細胞のシート作製のための技術及び患者への移植に対してその全体においてまた組み込まれる Mandai et al., doi: 10.1056/NEJMoa1608368 も参照。

【0184】

当技術分野で公知のように、一般的には、RPE関連及び/又は特異的なマーカーの存在を評価することにより、又は機能性を測定することにより、分化をアッセイし得る。例えばその全体において、及び具体的には結果セクションの第1段落で概説されるマーカーに対して、参照により本明細書によってまた組み込まれる Kamao et al., doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.007 も参照。

【0185】

一部の実施形態では、心血管系疾患に対処するためにHIP細胞を心筋細胞に分化させる。カーディオミオクト(cardiomyocyte)のhiPSCの分化について、技術は当技術分野で公知であり、実施例で論じる。当技術分野で公知のように、一般に心筋細胞関連の又は特異的なマーカーの存在を評価することによって、又は機能面を測定することによって分化をアッセイし得る; 例えばその全体において、及び具体的に心筋細胞を含む幹細胞を分化させる方法に対して、参照により本明細書によって組み込まれる Loh et al., doi: 10.1016/j.Cell.2016.06.001 を参照。

【0186】

一部の実施形態では、新しい血管を形成させて末梢動脈性疾患に対処するために、内皮コロニー形成細胞(ECFC)へとHIP細胞を分化させる。内皮細胞を分化させるための技術は公知である。例えば、その全体において、及び具体的にはヒト多能性幹細胞からの内皮細胞の作製のため、及びまた移植技術のための方法及び試薬に対して、参照により組み込まれる Prasain et al., doi: 10.1038/nbt.3048 を参照。一般に内皮細胞関連又は特異的なマーカーの存在を評価することにより、又は機能面で測定することにより、当技術分野で公知のように分化をアッセイし得る。

【0187】

一部の実施形態では、自己免疫甲状腺炎に対処するために、甲状腺祖先細胞及び甲状腺ホルモンを分泌し得る甲状腺濾胞オルガノイドへとHIP細胞を分化させる。甲状腺細胞を分化させるための技術は当技術分野で公知である。例えばその全体において、及び具体的にはヒト多能性幹細胞からの甲状腺細胞作製のための方法及び試薬に対して、及びまた

10

20

30

40

50

移植技術に対して、参照により本明細書によって明確に組み込まれる、Kurmann et al., doi: 10.106/j.stem.2015.09.004を参照。一般的に、甲状腺細胞に関連するか又は特異的なマーカーの存在を評価することにより、又は機能面で測定することにより、当技術分野で公知のように分化をアッセイし得る。

【0188】

VIII. HIP細胞由来の低免疫心臓細胞

一部の実施形態では、心臓細胞は、本明細書中に記載のHIP細胞由来である。例えばヒト心臓細胞は、ヒトHIP細胞を分化させることによって作製され得る。同様に、マウス心臓細胞はマウスHIP細胞を分化させることによって作製され得る。このような心臓細胞は低免疫心臓細胞である。

10

【0189】

誘導又は胚性多能性幹細胞を心臓細胞に分化させるための有用な方法が、例えば米国特許第20170152485号明細書、同第20170058263号明細書、同第20170002325号明細書、同第20160362661号明細書、同第20160068814号明細書、同第9062289号明細書、同第7897389号明細書及び同第7452718号明細書に記載される。

【0190】

誘導又は胚性多能性幹細胞から心臓細胞を作製するためのさらなる方法は、例えばXu et al., Stem Cells and Development, 2006, 15(5): 631-9、Burrige et al., Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28及びChen et al., Stem Cell Res, 2015, 15(2): 365-375に記載される。

20

【0191】

様々な実施形態において、HIP細胞（例えばマウスHIP細胞及びヒトHIP細胞）は、BMP経路阻害剤、WNTシグナル伝達活性化因子、WNTシグナル伝達阻害剤、WNTアゴニスト、WNTアンタゴニスト、Src阻害剤、EGFR阻害剤、PCK活性化因子、サイトカイン、増殖因子、心臓作用物質、化合物などを含む培地中で培養され得る。

【0192】

WNTシグナル伝達活性化因子としてはCHIR99021が挙げられるが限定されない。PCK活性化因子としてはPMAが挙げられるが限定されない。WNTシグナル伝達阻害剤としては、KY02111、SO3031(KY01-I)、SO2031(KY02-I)及びSO3042(KY03-I)及びXAV939から選択される化合物が挙げられるが限定されない。Src阻害剤としてはA419259が挙げられるが限定されない。EGFR阻害剤としてはAG1478が挙げられるが限定されない。

30

【0193】

iPSCから心臓細胞を作製するための物質の非限定例としては、アクチビンA、BMP-4、Wnt3a、VEGF、可溶性fryzzledタンパク質、シクロスポリンA、アンジオテンシンII、フェニレフリン、アスコルビン酸、ジメチルスルホキシド、5-アザ-2'-デオキシシチジンなどが挙げられる。

【0194】

本発明の細胞は、心臓細胞へのHIP細胞の分化を支持及び/又は促進するために、合成面などの面上で培養され得る。一部の実施形態では、この面は、選択される1つ以上のアクリレート単量体のホモポリマー又はコポリマーを含むが限定されないポリマー物質を含む。アクリレート単量体及びメタクリレート単量体の非限定例としては、テトラ（エチレングリコール）ジアクリレート、グリセロールジメタクリレート、1,4-ブタンジオールジメタクリレート、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート、ジ（エチレングリコール）ジメタクリレート、テトラ（エチレングリコール）ジメタクリレート、1,6-ヘキサジオールプロポキシレートジアクリレート、ネオペンチルグリコールジアクリレート、トリメチロールプロパンベンゾアートジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレート（1EO/OH）メチル、トリシクロ[5.2.1.02,6]デカン-ジ

40

50

メタノールジアクリレート、ネオペンチルグリコールエトキシレートジアクリレート及びトリメチロールプロパントリアクリレートが挙げられる。アクリレートは、当技術分野で公知のように合成されるか又は Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. 及び Sartomer, Inc. などの市販業者から入手される。

【0195】

ポリマー性物質は、支持物質の表面上に分散され得る。細胞を培養するのに適切な有用な支持物質は、セラミック物質、ガラス、プラスチック、ポリマー又はコポリマー、それらの何らかの組み合わせ又は別の物質上のある物質のコーティングを含む。一部の例では、ガラスとしては、ソーダ石灰ガラス、パイレックスガラス、Vycor ガラス、石英ガラス、ケイ素又はこれらの誘導体などが挙げられる。

10

【0196】

一部の例では、プラスチック又は樹状ポリマーを含むポリマーとしては、ポリ(塩化ビニル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(ビニル酢酸-マレイン酸無水物)、ポリ(ジメチルシロキサン)モノメタクリレート、環状オレフィンポリマー、フルオロカーボンポリマー、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンイミン又はこれらの誘導体などが挙げられる。一部の例では、コポリマーとしては、ポリ(ビニル酢酸-コ-マレイン酸無水物)、ポリ(スチレン-コ-マレイン酸無水物)、ポリ(エチレン-コ-アクリル酸)又はこれらの誘導体などが挙げられる。

【0197】

本発明の改変心臓細胞としては、心筋細胞、結節心筋細胞、伝導性心筋細胞、作業心筋細胞、心筋細胞前駆体、心筋細胞祖先細胞、心臓幹細胞及び心臓筋肉細胞が挙げられるが限定されない。一部の実施形態では、心筋細胞前駆体は、成熟(最終段階)心筋細胞を含む子孫を生じさせることが可能である(脱分化又は初期化なし)細胞を指す。心筋細胞前駆細胞は、GATA-4、Nkx2.5 及び転写因子のMEF-2ファミリーから選択される1つ以上のマーカーを使用して同定され得ることが多い。一部の例では、心筋細胞は、次のリストからの1つ以上のマーカー(時として少なくとも3又は5個のマーカー)を発現する未熟心筋細胞又は成熟心筋細胞を指す: 心臓トロポニンI(cTnI)、心臓トロポニンT(cTnT)、サルコメアミオシン重鎖(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-カドヘリン、1-アドレノセプター(1-AR)、ANF、転写因子のMEF-2ファミリー、クレアチンキナーゼMB(CK-MB)、ミオグロビン又は心房性ナトリウム利尿因子(ANF)。一部の実施形態では、改変心臓細胞は自発的な周期的収縮活性を示す。一部の例では、適切なCa²⁺濃度及び電解質バランスである適切な組織培養環境中で心臓細胞を培養する場合、培地に何らかさらなる構成成分を添加することなく、細胞が細胞の1つの軸を横断して周期的に収縮し、次いで収縮から解放されることが観察され得る。一部の実施形態では、心臓細胞は低免疫心臓細胞である。

20

30

【0198】

処置なしで左心室壁組織の55%を瘢痕組織にする心臓クライオインジャリーに対する動物モデルにおいて、本明細書中で記載のように調製される心臓細胞の有効性を評価し得る(Liet al., Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996; Sakai et al., Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999; Sakai et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999)。処置の成功によって、瘢痕の面積が減少し、瘢痕の拡大が制限され、収縮期、拡張期及び最大圧により判定した場合、心臓機能が改善し得る。心臓損傷はまた、左前下行枝動脈の遠位部分で塞栓形成コイルを使用してモデルを作製し得(Watanabe et al., Cell Transplant. 7:239, 1998)、処置の有効性を組織学及び心臓機能により評価し得る。

40

【0199】

一部の実施形態では、改変心臓細胞(例えば低免疫心臓細胞)を患者、例えばそれを必要とするヒト患者に投与する。小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、他の心筋症、心筋炎

50

、心筋虚血性再灌流障害、心室機能不全、心不全、うっ血性心不全、冠動脈疾患、末期心疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心臓、動脈炎又は循環器疾患に罹患している患者に心臓細胞を投与し得る。一部の例では、患者は心筋梗塞になっている。特定例では、患者は冠動脈バイパス術を受けている。

【0200】

組織及び/又は単離細胞を心臓に移植するために、周知の外科手術技術を使用して患者に改変心臓細胞を移植し得る。一部の実施形態では、注射(例えば心筋内注射、冠動脈内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、経皮的注射)、点滴及び移植によって細胞を患者の心臓組織に導入する。

【0201】

改変心臓細胞の投与(送達)としては、皮下又は、静脈内、動脈内(例えば冠動脈内)、筋肉内、腹腔内、心筋内、経心内膜、経心外膜、鼻腔内投与並びにクモ膜下腔を含む非経口及び点滴技術が挙げられるが限定されない。

【0202】

一部の実施形態では、改変心臓細胞を投与された患者に心臓薬も投与する。併用療法での使用に適切な心臓薬の代表的な例としては、増殖因子、増殖因子をコードするポリヌクレオチド、血管新生剤、カルシウムチャネル遮断剤、降圧剤、有糸分裂阻害薬、イノトロピック剤(inotropic agent)、抗アテローム剤、抗凝固薬、ベータブロッカー、抗不整脈剤、抗炎症剤、血管拡張薬、血栓溶解剤、心臓グリコシド、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、原虫阻害物質、ナイトレート、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP); 抗悪性腫瘍薬、ステロイドなどが挙げられるが限定されない。

【0203】

様々な方法において本発明の方法による治療の効果を監視し得る。例えば、処置の有効性を判定するために心電図(ECG)又はホルターモニターを利用し得る。ECGは、心臓リズム及び電気インパルスを目安であり、治療が対象の心臓で電気的状態の崩壊を改善又は維持したか、予防したか又は遅延させたか否かを判定するための非常に有効な非侵襲的方法である。心臓の異常、不整脈障害などを監視するために長時間にわたり装着され得るホルター心電図、携帯型ECGの使用も、治療の有効性を評価するための信頼性の高い方法である。心室機能の改善を判定するためにECG又は核研究を使用し得る。

【0204】

当業者により認められるように、細胞タイプ及びこれらの細胞の最終的な用途の両方に依存する当技術分野で公知の技術を使用して、分化させたHIP派生物を移植する。一般に、患者において静脈内で又は特定の位置での注射の何れかにより、本発明の分化したHIP細胞を移植する。特定の位置に移植した場合、それらを維持しながら分散を防ぐためにゲルマトリクス中で細胞を懸濁し得る。

【0205】

IX. HIP細胞由来の内皮細胞

一部の実施形態では、内皮細胞は本明細書中に記載のHIP細胞由来である。例えば、ヒトHIP細胞を分化させることによりヒト内皮細胞を作製し得る。同様に、マウスHIP細胞を分化させることによりマウス内皮細胞を作製し得る。このような内皮細胞は低免疫内皮細胞である。

【0206】

誘導又は胚性多能性幹細胞を内皮細胞に分化させるための有用な方法は、例えば米国特許出願公開第2004/0009589号明細書、国際公開第2011/090684号パンフレット及び同第2012/006440号パンフレットに記載される。

【0207】

様々な実施形態で、GSK3阻害剤、ALK阻害剤、BMP経路阻害剤、ROCK阻害剤、WNTシグナル伝達活性化因子、WNTシグナル伝達阻害剤、WNTアゴニスト、WNTアンタゴニスト、Src阻害剤、EGFR阻害剤、PCK活性化因子、サイトカイン、

10

20

30

40

50

増殖因子、内皮細胞分化化合物、内皮細胞促進化合物などを含む培地中でH I P細胞（例えばマウスH I P細胞及びヒトH I P細胞）を培養し得る。

【0208】

W N Tシグナル伝達活性化因子（例えばG S K 3阻害剤）としてはC H I R - 9 9 0 2 1が挙げられるが限定されない。P C K活性化因子としてはP M Aが挙げられるが限定されない。W N Tシグナル伝達阻害剤としては、K Y 0 2 1 1 1、S O 3 0 3 1（K Y 0 1 - I）、S O 2 0 3 1（K Y 0 2 - I）及びS O 3 0 4 2（K Y 0 3 - I）及びX A V 9 3 9から選択される化合物が挙げられるが限定されない。S r c阻害剤としてはA 4 1 9 2 5 9が挙げられるが限定されない。E G F R阻害剤としてはA G 1 4 7 8が挙げられるが限定されない。

10

【0209】

i P S Cから内皮細胞を作製するための物質の非限定例としては、アクチビンA、B M P - 4、W n t 3 a、V E G F、可溶性f r i z z l e dタンパク質、シクロスポリンA、アンジオテンシンI I、フェニレフリン、アスコルビン酸、ジメチルスルホキシド、5 - アザ - 2' - デオキシシチジンなどが挙げられる。

【0210】

H I P細胞の低免疫内皮細胞への分化を支持及び/又は促進するための合成面など、面上で本発明の細胞を培養し得る。一部の実施形態では、この面は、選択される1つ以上のアクリラート単量体のホモポリマー又はコポリマーを含むが限定されないポリマー材料を含む。アクリラート単量体及びメタクリラート単量体の非限定例としては、テトラ（エチレングリコール）ジアクリラート、グリセロールジメタクリラート、1, 4 - ブタンジオールジメタクリラート、ポリ（エチレングリコール）ジアクリラート、ジ（エチレングリコール）ジメタクリラート、テトラ（エチレングリコール）ジメタクリラート、1, 6 - ヘキサジオールプロポキシラートジアクリラート、ネオペンチルグリコールジアクリラート、トリメチロールプロパンベンゾアートジアクリラート、トリメチロールプロパンエトキシラート（1 E O / O H）メチル、トリシクロ[5.2.1.02,6]デカン - ジメタノールジアクリラート、ネオペンチルグリコールエトキシラートジアクリラート及びトリメチロールプロパントリアクリラートが挙げられる。アクリラートは当技術分野で公知のように合成されるか又はP o l y s c i e n c e s , I n c . , S i g m a A l d r i c h , I n c . 及びS a r t o m e r , I n c . などの市販業者から得られる。

20

30

【0211】

一部の実施形態では、ポリマーマトリクス上に内皮細胞を播種し得る。一部の例では、ポリマーマトリクスは生体分解性である。適切な生体分解性マトリクスは当技術分野で周知であり、コラーゲン - G A G、コラーゲン、フィブリン、P L A、P G A及びP L A / P G Aコポリマーが挙げられる。さらなる生体分解性物質としては、ポリ（無水物）、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（プロピルフメラート）、ポリ（カプロラクトン）、ポリアミド、ポリアミノ酸、ポリアセタール、生体分解性ポリシアノアクリラート、生体分解性ポリウレタン及び多糖類が挙げられる。

【0212】

非生体分解性ポリマーも使用され得る。他の非生体分解性、また生体適合性ポリマーとしては、ポリピロール、ポリアニリン、ポリチオフェン、ポリスチレン、ポリエステル、非生体分解性ポリウレタン、ポリ尿素、ポリ（エチレン酢酸ビニル）、ポリプロピレン、ポリメタクリラート、ポリエチレン、ポリカーボネート及びポリ（エチレンオキシド）が挙げられる。ポリマーマトリクスは、例えば粒子、スポンジ、チューブ、球、鎖、コイル状鎖、毛細管ネットワーク、フィルム、繊維、メッシュ又はシートとして、何らかの形状で形成され得る。天然又は合成細胞外マトリクス材料及び因子を含むようにポリマーマトリクスを修飾し得る。

40

【0213】

支持材料の面上にポリマー性物質を分散させ得る。細胞培養に適切な有用な支持材料としては、セラミック物質、ガラス、プラスチック、ポリマー又はコポリマー、それらの何

50

らかの組み合わせ又は別の物質上のある物質のコーティングが挙げられる。一部の例では、ガラスとしては、ソーダ石灰ガラス、パイレックスガラス、vycorガラス、石英ガラス、ケイ素又はこれらの誘導体などが挙げられる。

【0214】

一部の例では、樹状ポリマーを含むプラスチック又はポリマーとしては、ポリ(塩化ビニル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(ビニル酢酸-マレイン酸無水物)、ポリ(ジメチルシロキサン)モノメタクリレート、環状オレフィンポリマー、フルオロカーボンポリマー、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンイミン又はこれらの誘導体などが挙げられる。一部の例では、コポリマーとしては、ポリ(ビニル酢酸-コ-マレイン酸無水物)、ポリ(スチレン-コ-マレイン酸無水物)、ポリ(エチレン-コ-アクリル酸)又はこれらの誘導体などが挙げられる。

10

【0215】

本発明の改変内皮細胞は1つ以上の内皮細胞マーカーを発現し得る。このようなマーカーの非限定例としては、VE-カドヘリン(CD144)、ACE(アンジオテンシン変換酵素)(CD143)、BNH9/BNF13、CD31、CD34、CD54(ICAM-1)、CD62E(E-セレクチン)、CD105(エンドグリン)、CD146、エンドカン(ESM-1)、Endoglyx-1、エンドムチン、エオタキシン-3、EPAS1(内皮PASドメインタンパク質1)、第VII因子関連抗原、FLI-1、Flk-1(KDR、VEGFR-2)、FLT-1(VEGFR-1)、GATA2、GBP-1(グアニル酸-結合タンパク質-1)、GRO-アルファ、HEX、ICAM-2(細胞間接着分子2)、LM02、LYVE-1、MRB(マジックラウンドアバウト)、ヌクレオリン、PAL-E(パソロジスク・アナトミー・ライデン-エンドセリウム(pathologische anatomie Leiden-endothelium))、RTK、sVCAM-1、TALI、TEM1(腫瘍内皮マーカー1)、TEM5(腫瘍内皮マーカー5)、TEM7(腫瘍内皮マーカー7)、トロンプモジュリン(TM、CD141)、VCAM-1(血管細胞接着分子-1)(CD106)、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)、vWF(フォン・ウィルブランド因子)、ZO-1、内皮細胞-選択的接着分子(ESAM)、CD102、CD93、CD184、CD304及びDLL4が挙げられる。

20

【0216】

内皮細胞としては、内皮祖先細胞、毛細血管内皮細胞、動脈内皮細胞、静脈内皮細胞、リンパ血管内皮細胞、他の血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、脳血管閉門の内皮細胞、心臓内皮細胞、腎臓内皮細胞及び肝臓内皮細胞が挙げられるが限定されない。異なる内皮細胞のタイプ及び特徴は、Atkins et al., Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2011, 31: 1476-1484及び米国特許第5,980,088号明細書に記載されている。一部の実施形態では、本発明の単離改変内皮細胞は、血管内皮細胞、脳内皮細胞、腎臓内皮細胞及び大動脈内皮細胞からなる群から選択される。好ましい実施形態では、内皮細胞は毛細血管内皮細胞である。

30

【0217】

一部の実施形態では、障害/状態を処置するか若しくは障害/状態の症状を回復させるのに有用な、酵素、ホルモン、受容体、リガンド又は薬物などであるが限定されない関心のあるタンパク質をコードする外因性遺伝子を発現させるために、改変内皮細胞が遺伝子修飾される。内皮細胞を遺伝子修飾するための標準的方法は例えば米国特許第5,674,722号明細書に記載されている。

40

【0218】

このような内皮細胞は、疾患の予防又は処置に有用なポリペプチド又はタンパク質の構成的合成及び送達を提供するために使用され得る。このように、ポリペプチドは個体の血流又は身体他の領域(例えば中枢神経系)に直接分泌される。一部の実施形態では、インスリン、血液凝固因子(例えば第VII因子又はフォン・ウィルブランド因子)、ア

50

ルファ - 1 抗トリプシン、アデノシンデアミナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、インターロイキン（例えば IL - 1、IL - 2、IL - 3）などを分泌させるために、内皮細胞が修飾され得る。

【0219】

ある一定の実施形態では、移植される移植片との関連でそれらの性能を改善する方法で改変内皮細胞を修飾し得る。非限定的代表例としては、腔内血餅形成を防ぐための血小板溶解薬の分泌又は発現、平滑筋肥大による管腔狭窄を防ぐための平滑筋増殖の阻害剤の分泌及び内皮細胞増殖を刺激するための内皮細胞分裂促進因子又は自己分泌因子の発現及び / 又は分泌及び移植片管腔の内皮細胞の裏打ちの広がり又は持続時間の改善が挙げられる。

10

【0220】

一部の実施形態では、特異的な臓器又は肢への分泌生成物の治療レベルの送達のために改変内皮細胞を利用する。例えば、インビトロで改変された（形質転換された）内皮細胞で裏打ちされた血管移植物を特異的な臓器又は肢に移植し得る。形質導入された内皮細胞の分泌生成物は、灌流される組織に対して高濃度で送達され、それにより標的とされる解剖学的位置に所望の効果を到達させる。

【0221】

他の実施形態では、血管形成する腫瘍において内皮細胞により発現されるときに血管形成を破壊又は阻害する遺伝子を含むように改変内皮細胞を遺伝子修飾する。一部の例では、腫瘍処置の完了時に移植された内皮細胞の負の選択を可能にする、本明細書中

20

【0222】

一部の実施形態では、改変内皮細胞を患者、例えばそれを必要とするヒト患者に投与する。循環器疾患、血管疾患、末梢血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、末梢血管閉塞性疾患、脳卒中、再灌流障害、虚血肢、神経障害（例えば末梢神経障害又は糖尿病性神経障害）、臓器不全（例えば肝不全、腎不全など）、糖尿病、関節リウマチ、骨粗しょう症、血管損傷、組織損傷、高血圧、冠動脈疾患による狭心症及び心筋梗塞、腎臓血管高血圧、腎臓動脈狭窄による腎不全、下肢の跛行などであるが限定されない疾患又は状態に罹患している患者に内皮細胞を投与し得る。ある一定の実施形態では、患者は、一部の例では脳血管疾患によるものであり得る一過性虚血性発作又は脳卒中に罹患したことがあるか又は罹患している。一部の実施形態では、例えばアテローム性動脈硬化症、心筋梗塞及び虚血肢で起こるような組織虚血を処置するために、及び損傷血管を修復するために、改変内皮細胞を投与する。一部の例では、移植片の生体工学で細胞を使用する。

30

【0223】

例えば、虚血性組織の修復、血管及び心臓弁の形成、人工血管の改変、損傷のある血管の修復及び改変組織での血管形成の誘導（例えば移植前）のための細胞療法において改変内皮細胞を使用し得る。さらに、腫瘍を標的とし、処置するための薬剤を送達するために内皮細胞をさらに修飾し得る。

【0224】

具体的な実施形態では、血管細胞又は血管新生を必要とする組織に対する修復又は置換の方法が本明細書中で提供される。この方法は、このような組織での血管新生を促進するために、このような処置を必要とするヒト患者に単離内皮細胞を含む組成物を投与することを含む。血管細胞又は血管新生を必要とする組織は、とりわけ、心臓組織、肝臓組織、膵臓組織、腎臓組織、筋肉組織、神経組織、骨組織であり得、これらは、損傷があり、過剰な細胞死を特徴とする組織、損傷のリスクがある組織又は人工的に改変された組織であり得る。

40

【0225】

ある一定の実施形態では、血管再建術で使用される人工移植片（例えば Dacron 及び Gortex などの合成物質から形成される血管）を改善するために改変内皮細胞を使

50

用する。例えば、人工動脈移植物は、生体臓器又は肢を灌流する疾患のある動脈を置換するために使用されることが多い。他の実施形態では、人工心臓弁の表面をカバーして弁の表面の血栓形成性を低下させることにより血栓形成のリスクを低下させるために改変内皮細胞を使用する。

【0226】

組織及び/又は単離細胞を血管に移植するための周知の外科的技術を使用して、改変内皮細胞を患者に移植し得る。一部の実施形態では、注射（例えば心筋内注射、冠動脈内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、経皮的注射）、点滴、埋め込み及び移植によって、患者の心臓組織に細胞を導入する。

【0227】

改変内皮細胞の投与（送達）としては、静脈内、動脈内（例えば冠動脈内）、筋肉内、腹腔内、心筋内、経心内膜、経心外膜、鼻腔内投与並びにくも膜下腔内及び点滴技術を含む皮下又は非経口が挙げられるが限定されない。

【0228】

当業者により認められるように、細胞タイプ及びこれらの細胞の最終的な用途の両方に依存する当技術分野で公知の技術を使用して、分化したHIP派生物を移植する。一般に、静脈内で又は患者の特定の位置での注射によるかの何れかで本発明の分化したHIP細胞を移植する。特定の位置で移植する場合、それらが定着する一方で分散を防ぐためにゲルマトリクス中で細胞を懸濁し得る。

【0229】

X. HIP細胞由来の低免疫ドーパミン作動性ニューロン

一部の実施形態では、ドーパミン作動性(DA)ニューロンは本明細書中に記載のHIP細胞由来である。例えば、ヒトHIP細胞を分化させることによりヒトDAニューロンを作製し得る。同様に、マウスHIP細胞を分化させることによりマウスDAニューロンを作製し得る。このようなDAニューロンは低免疫DAニューロンである。

【0230】

多能性幹細胞をDAニューロンに分化させるための有用な方法は、例えば米国特許第9,968,637号明細書及び同第7,674,620号明細書に記載されており、この開示は、本願を含めそれらの全体において、本明細書中で参照により組み込まれる。ヒト多能性幹細胞からDA細胞を作製するためのさらなる方法は、例えばKim, J. - H., et al., Nature, 2002, 418, 50-56; Bjorklund, L. M., et al., PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349; Grow, D. A., et al., Stem Cell Transl Med. 2016, 5(9): 1133-44及びCho, M. S., et al., PNAS, 2008, 105: 3392-3397で見出され得る。

【0231】

「ドーパミン作動性ニューロン」という用語は、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ドーパミン合成に対する律速酵素を発現する神経細胞を指す。好ましくは、ドーパミン作動性ニューロンは神経伝達物質ドーパミンを分泌し、ドーパミン-TH-ヒドロキシラーゼの発現は僅かであるか又はない。ドーパミン作動性ニューロンは、次のうち1つ以上を発現し得る：ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、1-芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ、小胞モノアミン輸送体2、ドーパミン輸送体、Nurr-1及びドーパミン-2受容体(D2受容体)。ドーパミン作動性ニューロンは、神経幹細胞、神経祖先細胞、未熟ドーパミン作動性ニューロン及び成熟ドーパミン作動性ニューロンを含む。

【0232】

「神経幹細胞」という用語は、神経細胞経路に沿って部分的に分化し、例えばネスチンを含むいくつかの神経マーカーを発現する多能性細胞のサブセットを指す。神経幹細胞は、ニューロン又はグリア細胞（例えば星状細胞及び乏突起膠細胞）に分化し得る。「神経祖先細胞」という用語は、FOX A2及び低レベルの-チューブリンを発現するが、チロシンヒドロキシラーゼを発現しない（即ちFOX A2 + / -チューブリンLO/TH

10

20

30

40

50

- 表現型を有する) 培養された細胞を指す。このような神経祖先細胞は、例えば本明細書中に記載のものなど、適切な因子の培養時に、様々な神経サブタイプ; 特に様々なドーパミン作動性神経サブタイプを分化させる能力を有する。

【0233】

増殖培地中でHIP細胞及びHIP細胞由来のDANニューロンを培養し得る。例示的な増殖培地としては、ヒト胚性幹細胞培地(hESC培地)、ダルベッコ改変イーグル培地、哺乳動物細胞培地(DMEM)、ハムF12培地、Neurobasal(商標)(ThermoFisher)、Knockout Serum Replacer(KOSR)、最小必須培地イーグル-アルファ改変(アルファMEM)、Knockout DMEM(KO-DMEM)、N-2(ThermoFisher)、MS-5間質性細胞培地などが挙げられるが限定されない。

10

【0234】

DANニューロンの分化、増殖、拡大、維持及び/又は成熟を促進する有用な添加物としては、Wnt1、線維芽細胞増殖因子2(FGF2)、FGF8、FGF8a、ソニックヘッジホッグ(SHH)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF-)、TGF- 3、インターロイキン1ベータ(IL1)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、GSK-3阻害剤(例えばCHIR-99021)、TGF- 阻害剤(例えばSB-431542)、B-27サプリメント、ドルソモルフィン、プルモルファミン、ノギン、レチノイン酸、cAMP、アスコルビン酸、GlutaMax(商標)、ニューロツリン、Knockout Serum Replaceme 20
nt、N-アセチルシス테인、c-キットリガンド、その修飾形態、その模倣物、その類似体及びその変異体が挙げられるが限定されない。一部の実施形態では、WNT経路、NOTCH経路、SHH経路、BMP経路、FGF経路、TGF 経路などを活性化又は阻害する1つ以上の因子の存在下でDANニューロンを分化させる。分化プロトコル及びその詳細な記載は、例えば米国特許第9,968,637号明細書及び同第7,674,620号明細書、Kim,J.-H.,et al.,Nature,2002,418,50-56;Bjorklund,L.M.,et al.,PNAS,2002,99(4),2344-2349;Grow,D.A.,et al.,Stem Cells Transl Med.2016,5(9):1133-44及びCho,M.S.,et al.,PNAS,2008,105:3392-3397で提供され 30
、発明を実施するための形態、実施例、方法、オンライン方法及び結果を含むそれらの全体での開示が本明細書中で参照により組み込まれる。

【0235】

DAN分化の特徴を調べ、監視し、DAN表現型を評価するために、分子及び遺伝子マーカーの何れかの数の発現が評価され得る。例えば遺伝子マーカーの存在は、当業者にとって公知の様々な方法により決定され得る。分子マーカー発現は、qPCRに基づくアッセイ、免疫アッセイ、免疫細胞化学アッセイ、免疫プロッティングアッセイなどであるが限定されない定量法によって決定され得る。

【0236】

DANニューロンのための代表的なマーカーとしては、TH、 -チューブリン、ペアードボックスタンパク質(Pax6)、インスリン遺伝子エンハンサータンパク質(ISL1)、ネスチン、ジアミノベンジジン(DAB)、Gタンパク質活性化内向き整流カリウムチャンネル2(GIRK2)、微小管結合タンパク質2(MAP-2)、核内受容体関連1タンパク質(NURR1)、ドーパミン輸送体(DAT)、フォークヘッドボックスタンパク質A2(FOXA2)、FOX3、ダブルコルチン及びLIMホメオボックス転写因子1-ベータ(LMX1B)などが挙げられる。

40

【0237】

DANニューロンは、細胞電気生理学的メーカー(maker)によっても評価され得る。細胞の電気生理学は、当業者にとって公知のアッセイを使用することによって評価され得る。例えば、全細胞及び穿孔処理パッチクランプ、細胞の電気生理学的活性を検出する

50

ためのアッセイ、細胞の活動電位の大きさ及び持続時間を測定するためのアッセイ及びD A細胞のドーパミン産生を検出するための機能アッセイである。

【0238】

一部の実施形態では、D Aニューロン分化は、自発的な律動的活動電位及び脱分極電流の注入時のスパイク周波数順応 (spike frequency adaptation) を伴う高周波活動電位を特徴とする。他の実施形態では、D A分化はドーパミン産生を特徴とする。産生されるドーパミンのレベルは、その最大振幅の半分に到達した点の活動電位の幅 (スパイクの最大幅の半分) を測定することにより計算される。

【0239】

一部の実施形態では、神経変性疾患又は状態を処置するために、H I P細胞由来のD Aニューロンを患者、例えばヒト患者に投与する。一部の例では、神経変性疾患又は状態はパーキンソン病、ハンチントン病及び多発性硬化症からなる群から選択される。他の実施形態では、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、トゥレット症候群 (TS)、統合失調症、精神病及びうつなどの精神神経障害の1つ以上の症状を処置するか又は寛解させるためにD Aニューロンを使用する。また他の実施形態では、D Aニューロン障害がある患者を処置するためにD Aニューロンを使用する。

10

【0240】

患者において静脈内で又は特定の位置への注射よるか何れかで、分化したD Aニューロンを移植し得る。一部の実施形態では、変性によりパーキンソン病 (PD) が起こるD Aニューロンを置き換えるために、分化したD A細胞を脳の、黒質 (特に緻密な領域に又はその隣)、腹側被蓋野の領域 (VTA)、尾状核、被殻、側坐核、視床下核又は何らかのそれらの組み合わせに移植する。分化したD A細胞を細胞懸濁液として標的領域に注入し得る。或いは、このような送達装置に含有される場合、分化したD A細胞を支持マトリクス又は足場に埋め込み得る。一部の実施形態では、足場は生体分解性である。他の実施形態では、足場は生体分解性ではない。足場は天然又は合成 (人工) 材料を含み得る。

20

【0241】

細胞組成物の治療処方物の一般的な原理は、参照により本明細書中で具体的に組み込まれるCell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996及びHematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000で見出される。一部の実施形態では、分化したD Aニューロンは医薬組成物の形態で供給される。リボソーム、微粒子又はマイクロカプセルなどであるが限定されない適切なビヒクルを使用することにより、D Aニューロンの送達を達成し得る。他の実施形態では、分化したD Aニューロンは、等張賦形剤を含む医薬組成物中で投与される。本医薬組成物は、ヒト投与のために十分に無菌的な条件下で調製される。

30

【0242】

当業者により認められるように、分化したH I P派生物は、細胞タイプ及びこれらの細胞の最終的な用途の両方に依存する当技術分野で公知の技術を使用して移植されるか又は植え込まれる。一般に、患者の特定の位置に本発明の分化したH I P細胞を移植又は注入する。特定の位置に移植した場合、それらが定着する一方で分散を防ぐために細胞をゲルマトリクス中で懸濁し得る。

40

【0243】

X I . H I P細胞由来の低免疫膵島細胞

一部の実施形態では、膵島細胞 (膵臓ベータ細胞とも呼ばれる) は本明細書中に記載のH I P細胞由来である。例えば、ヒトH I P細胞を分化させることによりヒト膵島細胞を作製し得る。同様に、マウスH I P細胞分化させることによりマウス膵島細胞を作製し得る。このような膵島細胞は低免疫膵島細胞である。

50

【0244】

一部の実施形態では、膵島細胞は、本明細書中に記載のHIP細胞由来である。膵島細胞への多能性幹細胞の分化に有用な方法は、例えば米国特許第9,683,215号明細書、同第9,157,062号明細書及び同第8,927,280号明細書に記載される。

【0245】

一部の実施形態では、本明細書中で開示されるような方法により作製される膵島細胞はインスリンを分泌する。一部の実施形態では、膵島細胞は、例えば限定されないがグルコースに应答したインスリン分泌及びベータ細胞マーカーの発現など、内在性膵島細胞の少なくとも2つの特徴を示す。

10

【0246】

代表的なベータ細胞マーカー又はベータ細胞前駆マーカーとしては、c-ペプチド、Pdx1、グルコース輸送担体2 (Glut2)、HNF6、VEGF、グルコキナーゼ (GCK)、プロホルモンコンバーターゼ (PC1/3)、Cdc3p1、NeuroD、Ng3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptf1a、Isl1、Sox9、Sox17及びFoxA2が挙げられるが限定されない。

【0247】

一部の実施形態では、単離膵島細胞は、グルコース上昇に应答してインスリンを産生する。様々な実施形態では、単離膵島細胞は、グルコース上昇に应答してインスリンを分泌する。一部の実施形態では、細胞は、玉石細胞形態及び/又は約17µm~約25µmの直径などの個別の形態を有する。

20

【0248】

一部の実施形態では、低免疫膵島細胞にHIP細胞を分化させる方法は、FGF10を含む培地中でHIP幹細胞を培養することを含む。一部の例では、培地は、角化細胞増殖因子 (KGF)、上皮増殖因子 (EGF)；トランスフォーミング増殖因子- (TGF)、トランスフォーミング増殖因子- (TGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、Wnt3a、アクチビンA、Nodal、KAAD-CYC、(塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、ニコチンアミド、インドラタム (indolactam)V、HDAC阻害剤、IDE1及びIDE2からなる群から選択される1つ以上の分化因子を含む。一部の実施形態では、次の：インスリン様増殖因子 (IGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、線維芽細胞増殖因子 (EGF)、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、ソニックヘッジホッグ (SHH) 及び血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、トランスフォーミング増殖因子- (TGF) スーパーファミリー、骨形成タンパク質-2 (BMP2)、骨形成タンパク質-7 (BMP7)、GSK3 阻害剤、ALK阻害剤、BMP1型受容体阻害剤、レチノイン酸及び何らかのそれらの組み合わせのうち1つ以上を含む培地中で細胞を培養することにより、HIP細胞を膵島細胞に分化させ得る。

30

【0249】

一部の実施形態では、単独で本明細書中で記載のように、低免疫多能性幹細胞 (HIP細胞) 集団を式 (I) の化合物の1つ以上、例えばIDE1又はIDE2に接触させ得るか又は曝露し得、他の実施形態では、多能性幹細胞集団は、米国特許第8,927,280号明細書に開示されるような式 (I) の化合物と多能性細胞を接触させるのと同時に (例えばそれと組み合わせで)、それに続いて又はその前の何れかで、少なくとも1個のさらなる物質と接触させ得る。

40

【0250】

一部の実施形態では、米国特許第8,927,280号明細書で開示されるような式 (I) の化合物と組み合わせた使用のためのさらなる化合物としては、トランスフォーミング増殖因子- (TGF) ファミリーメンバー (例えばNodal又はアクチビンA)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリーメンバー (例えばFGF10)、Wnt増殖因子ファミリーメンバー (例えばWnt3a)、骨形成タンパク質 (BMP) 及び/又はAKT/P13K経路のメンバーの物質が挙げられ得るが限定されない。TGF-ベータ

50

3 / BMP 経路の定義及び詳細は、当技術分野、例えば Kawabata M. 及び Miyazono K., J. Biochem. (Tokyo), 125, 9-16 (1999); Wrana J. L., Miner. Electrolyte Metab., 24, 120-130 (1998); 及び Markowitz S. D. 及び Roberts A. B., Cytokine Growth Factor Rev., 7, 93-102 (1996) で開示される。一部の実施形態では、多能性幹細胞は、シクロパミン、TGFファミリーメンバー (TGF-アルファ、アクチビンA、アクチビンB、TGF-1、TGF-ベータ-3)、エキセンディン4、ニコチンアミド、n-ブチラート、DMSO、全トランス型レチノイン酸、GLP-I、骨形成タンパク質 (BMP-2、BMP-5、BMP-6、BMP-7)、インスリン様増殖因子 (IGF-I、IGF-II)、線維芽細胞増殖因子 (FGF7、FGF10、bFGF、FGF4)、他の増殖因子 (EGF、ベータセルリン、成長ホルモン、HGF)、他のホルモン (プロラクチン、コレシトキニン (cholecystokinin)、ガストリンI、胎盤性ラクトゲン)、TGF-ファミリーアンタゴニスト (ノギン、フォリスタチン、コーディン)、IBMX、ワートマニン、デキサメタゾン、Reg、INGAP、cAMP又はcAMP活性化因子 (フォルスコリン) 及び/又は細胞外マトリクス構成成分 (ラミニン、フィブロネクチン) を含むが限定されない、少なくとも1つのさらなる化合物又は因子と組み合わせ式 (I) の化合物、例えば IDE 1 及び/又は IDE 2、に曝露され得る。

10

【0251】

一部の実施形態では、細胞を臍島細胞に分化させるために、HIP細胞を少なくとも1つのヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 (例えばクラスI / II HDAC 阻害剤) と接触させる。ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) は、アセチル基をヒストンにおいてe-N-アセチルリジンアミノ酸から除去する酵素のクラスである。代表的なHDACとしては、クラスI HDAC: HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8; 及びクラスII HDAC: HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7A、HDAC9、HDAC10が挙げられる。I型哺乳動物HDACとしては、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8及びHDAC11が挙げられる。II型哺乳動物HDACとしては、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9及びHDAC1が挙げられる。

20

【0252】

多くのHDACの負の制御因子の構造クラス (例えばHDAC阻害剤) が開発され、例えば低分子量カルボキシラート (例えば約250amu未満)、ヒドロキサミン酸、ベンズアミド、エポキシケトン、環状ペプチド及びハイブリッド分子である (例えばその全体において参照により本明細書によって組み込まれるDrummond D C, Noble C O, Kirpotin D B, Guo Z, Scott G K, et al. (2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 495-528, (本明細書中の具体例を含む) を参照)。I / II型HDACの負の制御因子の非限定例としては、ヒドロキサム酸スベロイルアニリド (SAHA (例えばMK0683、ポリノスタット) 及び他のヒドロキサム酸)、BML-210、デブデシン (例えば、(-)-デブデシン)、HCTキシン、Nullscript (4-(1,3-ジオキソ-1H,3H-ベンゾ [de] イソキノリン-2-イル)-N-ヒドロキシブタンアミド)、フェニルブチラート (例えばフェニル酪酸ナトリウム) 及びバルプロ酸 ((VPA) 及び他の短鎖脂肪酸)、スクリプタイド、スラミンナトリウム、トリコスタチンA (TSA)、APHA化合物8、アピシジン、酪酸ナトリウム、酪酸ピバロイルオキシメチル (Pivane x、AN-9)、トラボキシニンB、クラミドシン、デブシペプチド (FR901228又はFK228としても知られる)、ベンズアミド (例えばCI-994 (即ちN-アセチルジナリン) 及びMS-27-275)、MGCD0103、NVP-LAQ-824、CBHA (m-カルボキシケイ皮酸ビスヒドロキサミン酸)、JNJ162411

30

40

50

99、ツバシン、A-161906、プロキサミド、オキサムフラチン、3-Cl-UCHA（即ち6-（3-クロロフェニルウレイド）カブロンヒドロキサム酸）、AOE（2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシデカン酸）、CHAP31、CHAP50、IDE1及びIDE2が挙げられる。他の阻害剤としては、例えばHDACのドミナントネガティブ形態（例えば触媒的に不活性な形態）、HDACのsiRNA阻害剤及びHDACに特異的に結合する抗体が挙げられる。阻害剤は、例えばBIOMOL International、Fukasawa、Merck Biosciences、Novartis、Gloucester Pharmaceuticals、Aton Pharma、Titan Pharmaceuticals、Schering AG、Pharmion、MethylGene及びSigma Aldrichから市販されている。一部の実施形態では、IDE1又はIDE2は好ましいヒストンデアセチラーゼ阻害剤である。

10

【0253】

例えば細胞外マトリクス（ECM）の1つ又は複数の構成成分とHIP細胞の単層を重ねて接触させることにより、HIP細胞の分化を達成し得る。一部の実施形態では、ラミニン、例えばラミニン1；コラーゲン、例えばコラーゲンIV；エンタクチン；ヘパリン硫酸プロテオグリカン；ナイドジェンの1つ以上である細胞外マトリクス構成成分とHIP細胞の層を接触させる。細胞外マトリクス構成成分は、基底膜由来物質、例えば、細胞、例えば腫瘍細胞、例えばEngelbreth-Holm-Swarm（EHS）腫瘍細胞、が沈着した基底膜であり得る。一部の実施形態では、細胞外マトリクス構成成分は、Becton-Dickensonから市販されているマトリゲル（商標）である。細胞外構成成分は、1つ以上の増殖因子、1つ以上のマトリクスメタロプロテイナーゼ（MMP）、例えばMMP-2、MMP-3及びそれらの組み合わせをさらに含み得る。

20

【0254】

少なくとも1、2、3、5、7、10、12、14、16、18、21、25、28、30、35、40、42、48、50日又はそれを超える期間にわたり、細胞外マトリクス又は細胞外マトリクスの1つ又は複数の構成成分の存在下でHIP細胞を培養し得る。

【0255】

一部の実施形態では、HIP由来膵島細胞は、患者、例えばそれを必要とするヒト患者に投与され得る。一部の例では、患者は、このような細胞を使用して処置され得る疾患、障害又は状態を有する。言い換えると、HIP由来膵島細胞の投与は、当技術分野で周知のように、インスリン代謝に付随する少なくとも1つの有害作用又は症状を軽減又は緩和し得る。一部の実施形態では、患者は、インスリン機能異常のためにグルコース利用が異常である疾患を含み得る不十分なインスリン活性を特徴とする疾患を有する。インスリン機能異常は、インスリン産生（例えば発現及び/又は細胞小器官を通じた輸送、例えば細胞喪失の結果起こるインスリン欠乏など）；分泌（例えばインスリン分泌応答の障害）；インスリン分子そのものの形態（例えば一次、二次又は三次構造）；標的細胞におけるインスリンの効果（例えば末梢組織を含む体の組織でのインスリン抵抗性）；及びインスリンに対する標的細胞の応答における何らかの異常性又は機能障害を含み得る。

30

【0256】

対象、特にヒト対象に膵島細胞を投与する一般的方法が本明細書中に記載されている。例えば、対象における標的部位への細胞の注入又は移植によって膵島細胞を対象に投与し得る。さらに、対象において細胞の注入又は移植により導入を促進する送達装置に細胞を挿入し得る。このような送達装置としては、チューブ、例えばレシピエント対象の身体に細胞及び液体を注入するためのカテーテルが挙げられる。好ましい実施形態では、チューブはさらに、対象に所望の位置で本発明の細胞が導入され得る針、例えばシリンジを有する。異なる形態で、このような送達装置、例えばシリンジに膵島細胞を挿入し得る。例えば、このような送達装置中に含有される場合、溶液中で細胞を懸濁し得るか又は支持マトリクス中に埋め込まれ得る。

40

【0257】

50

本明細書中で使用される場合、「溶液」という用語は、本発明の細胞が生存可能なままである薬学的に許容可能な担体又は希釈剤を含む。薬学的に許容可能な担体及び希釈剤としては、生理食塩水、水性緩衝液、溶媒及び／又は分散媒体が挙げられる。このような担体及び希釈剤の使用は当技術分野で周知である。溶液は好ましくは、無菌性であり、細胞及び溶液をシリンジに通し得る程度に流動性である。一部の実施形態では、溶液は、製造及び保管の条件下で安定であり、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの使用を通じて細菌及び真菌などの微生物の混入作用から防御される。このような溶液は、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤中で本明細書中に記載の臍島細胞を組み込み、続いて滅菌処理することにより調製され得る。

【0258】

10

臍島細胞が組み込まれ得るか又は埋め込まれ得る支持マトリクスとしては、レシピエント適合性であり、レシピエントにとって有害ではない生成物に分解するマトリクスが挙げられる。天然及び／又は合成生体分解性マトリクスは、このようなマトリクスの例である。天然の生体分解性マトリクスとしては、例えば哺乳動物由来の凝固血漿及びコラーゲンマトリクスが挙げられる。合成の生体分解性マトリクスとしては、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの合成ポリマーが挙げられる。合成ポリマーの他の例及び細胞をマトリクスに組み込むか又は埋め込む方法は当技術分野で公知である。例えば米国特許第4,298,002号明細書及び同第5,308,701号明細書を参照。マトリクスは、インビボで脆弱な臍臓細胞に対する支持及び／又は保護を提供する。

【0259】

20

当業者により認められるように、細胞タイプ及びこれらの細胞の最終的用途の両方に依存する当技術分野で公知の技術を使用して、分化したHIP派生物を移植するか又は植え込む。一般に患者の特定の位置に本発明の分化したHIP細胞を移植又は注入する。特定の位置に移植した場合、それらが定着する一方で分散を防ぐためにゲルマトリクス中で細胞を懸濁し得る。

【0260】

XII. HIP細胞由来の低免疫網膜色素上皮(RPE)細胞

一部の実施形態では、網膜色素上皮(RPE)細胞は、本明細書中に記載のHIP細胞由来である。例えばヒトRPE細胞は、ヒトHIP細胞を分化させることにより作製し得る。同様にマウスRPE細胞はマウスHIP細胞を分化させることにより作製し得る。このようなRPE細胞は低免疫RPE細胞である。

30

【0261】

本明細書中に記載のHIP細胞は、RPE祖先細胞、未熟RPE細胞、成熟RPE細胞及び機能的RPE細胞を含む網膜色素上皮(RPE)細胞に分化し得る。

【0262】

胚性多能性幹細胞をRPE細胞に分化させるための有用な方法は、例えば米国特許第9,458,428号明細書及び同第9,850,463号明細書に記載され、それらの全体における開示は、明細書を含め、参照により本明細書中に組み込まれる。ヒト胚又は誘導多能性幹細胞からRPE細胞を作製するためのさらなる方法は、例えばLambert et al., PNAS, 2006, 103(34): 12769-12774; Mellough et al., Stem Cells, 2012, 30(4): 673-686; Idelson et al., Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 396-408; Rowland et al., Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(2): 457-466, Buchholz et al., Stem Cells Trans Med, 2013, 2(5): 384-393及びda Cruz et al., Nat Biotech, 2018, 36: 328-337で見出され得る。

40

【0263】

「RPE」細胞という用語は、ネイティブRPE細胞と同様又は実質的に同様である遺伝子発現プロファイルを有する色素網膜上皮細胞を指す。多能性幹細胞由来のこのような

50

RPE細胞は、平面基質上で密集するまで増殖させる場合、ネイティブRPE細胞の多角形の平面シート形態を保持し得る。

【0264】

増殖培地中でHIP細胞及びHIP細胞由来のRPE細胞を培養し得る。例示的な増殖培地としては、X-VIVO 10 (商標) (Lonza Biosciences)、X-VIVO 15 (商標) (Lonza Biosciences)、MTESR2 (商標) (幹細胞技術)、NUTRISTEM (商標) (StemGent) 及びHESCGRO (商標) (Millipore) が挙げられるが限定されない。5~40%ゼノフリーKnockout Serum Replacement (XF-KOSR (商標)、Invitrogen) を補給したLonza X-VIVO 10 (商標)、MX-302 (B-27サプリメント入りのイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM))、Essential 8 (商標) 培地、ダルベッコ改変イーグル培地哺乳動物細胞培地 (DMEM)、ハムF12培地、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、最少必須培地イーグル (MEM)、Roswell Park Memorial Institute 培地 1640 (RPMI-1640)、MCDDB培地など。

10

【0265】

RPE細胞の分化、増殖、拡大、維持及び/又は成熟を促進する有用な添加物としては、BMPシグナル伝達の阻害剤 (例えばLDN-193189、ドルソモルフィン、コーディン、セルブルス (cerburus) 及びノギン)、WNTシグナル伝達の阻害剤 (例えばDickkopf 関連タンパク質 (DKK1)、IWP-2、IWP-3、IWP-4、XAV939、デクリーテッド (decrypted) frizzled 関連タンパク質 (SFRP1 及び SFRP2) 及びWnt阻害因子1 (WIF-1))、FGFシグナル伝達の阻害剤 (例えばSU5402、AZD4547 及びPD173074)、インスリン様増殖因子 (IGF1)、ニコチンアミド、安息香酸、3-アミノ安息香酸、6-アミノニコチンアミド、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の阻害剤 (例えば3-アミノベンズアミド、イニバリブ (BSI 201)、オラパリブ (AZD-2281) 及びルカパリブ (AG014699、PF-01367338)、ペリパリブ (ABT-888)、CEP9722、MK4827 及びBMN-673)、ROCK阻害剤 (例えばY-27632、チアゾピビン、GSK429286A 及びファスジル)、塩基性線維芽細胞増殖因子1 (bFGF1)、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、SUN13837、F2A4-K-NS、トリコスタチンA、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、BMP-4、BMP-7、TGF-1、血管作動性腸ペプチド (VIP)、フォルスコリン、ロリプラム、B-27サプリメント、Knockout Serum Replacement、N2サプリメント、タウリン、プロゲステロン、ビタミンA、プレビスタチン、その修飾形態、その模倣物、その類似体及びその変異体が挙げられるが限定されない。分化プロトコル及びその詳細な説明は、例えばそれらの全体におけるその開示が発明を実施するための形態、実施例、方法、オンライン法及び結果を含め、本明細書中に参照により組み込まれる、米国特許第9,458,428号明細書及び同第9,850,463号明細書及びda Cruz et al., Nat Biotech, 2018, 36:328-337で提供される。

20

30

40

【0266】

一部の実施形態では、低免疫RPE細胞を分化させるか、増殖させるか又は細胞培養基質上に固定化する。代表的な細胞培養基質は、次のもの、マトリゲル (商標) (Corning Life Sciences) などの一般的に使用される基質、マウス胚性線維芽細胞フィード細胞層、ヒト胚性線維芽細胞、ヒト卵管上皮又はヒト包皮線維芽細胞フィーダー層である。Synthemax (商標) (Corning Life Sciences)、CELLstart (商標) (Invitrogen)、GELstart (商標) (Invitrogen) 及びStemAdhere (商標) (Primorigen) などであるが限定されない、ゼノフリー基質も使用され得る。さらなる細胞培養基

50

質は、精製ヒトビトロネクチン、組み換えヒトビトロネクチン、組み換えヒトフィブロネクチン（例えばR e t r o N e c t i n（登録商標）；T a k a r a B i o）、精製ヒトラミニン、組み換えラミニン、組み換えラミニン511、組み換えラミニン521、ポリ-D-リジンなどを含むものの1つ以上を含み得る。

【0267】

ある一定の実施形態では、R P E細胞を合成基質などの生体適合性基質上に分化、増殖又は固定させる。非限定基質としては、ポリマー性基質、ポリエステル膜、ポリエチレンテレフタレート（P E T）膜、ポリ（D L - 乳酸 - コ - グリコール酸）（P L G A）膜、延伸ポリテトラフルオロエチレン（e P T F E）膜、ポリカプロラクトン膜、メチルメタクリレート及びポリ（エチレングリコール）から作製されるエレクトロスピンニング人工足場などが挙げられる。代表的な基質は、例えばその全体における開示が本明細書中で参照により組み込まれる米国特許第8,808,687号明細書に記載される。基質のための適切な材料の代表例としては、パリレンポリプロピレン、ポリイミド、ガラス、ニチノール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、コラーゲン、化学的に処理したコラーゲン、ポリエーテルスルホン（P E S）、ポリ（グリセロール - セバシン酸）P G S、ポリ（スチレン - イソブチル - スチレン）、ポリウレタン、エチル酢酸ビニル（E V A）、ポリエーテルエーテルケトン（P E E K）、K y n a r（ポリビニリデンフルオリド；P V D F）、ポリテトラフルオロエチレン（P T F E）、ポリメチルメタクリレート（P M M A）、P e b a x、アクリリック、ポリオレフィン、ポリジメチルシロキサン（P D M S）及び他のシリコーンエラストマー、ポリプロピレン、ヒドロキシアペタイト（h y d r o x y a p e t i t e）、チタン、金、銀、白金、他の金属及び合金、セラミック、プラスチック及びそれらの混合物又は組み合わせが挙げられるが限定されない。基質を構築するために使用されるさらなる適切な材料としては、ポリ - パラ - キシレン（例えばパリレンA、パリレンA M、パリレンC、アンモニア処理パリレン、ポリドーバミンで処理したパリレンCを含むが限定されないパリレン）、ポリ（乳酸）（P L A）、ポリエチレン - 酢酸ビニル、ポリ（乳酸 - コ - グリコール酸）（P L G A）、ポリ（D, L - ラクチド）、ポリ（D, L - ラクチド - コ - トリメチレンカーボネート）、コラーゲン、ヘパリン処理コラーゲン、変性コラーゲン、修飾コラーゲド（c o l l a g e d）（例えばゼラチンを伴うシリコーン）、他の細胞増殖マトリクス（S Y N T H E M A X（商標）など）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（グリコール酸）及び/又は他のポリマー、コポリマー又はブロックコポリマー、環状アルギニン - グリシン - アスパラギンを含むポリ（カプロラクトン）、環状又は直鎖状アルギニン - グリシン - アスパラギン酸、ポリカプロラクトン及びポリエチレングリコールのブレンド物（P C L - P E G）、熱可塑性ポリウレタン、シリコーン修飾ポリエーテルウレタン、ポリ（カーボネートウレタン）又はポリイミドが挙げられるが限定されない。代表的な熱可塑性ポリウレタンは、脂肪族ポリウレタン、芳香族ポリウレタン、ポリウレタンハイドロゲル形成物質、親水性ポリウレタン又はそれらの組み合わせを含み得るポリマー又はコポリマーである。非限定例としては、エラストン（ポリ（エーテルウレタン））、例えばエラストン（商標）80A、L u b r i z o l、T e c o p h i l i c（商標）、P e l l e t h a n e（商標）、C a r b o t h a n e（商標）、T e c o t h a n e（商標）、T e c o p l a s t（商標）及びE s t a n e（商標）などが挙げられる。シリコーン修飾ポリエーテルウレタンとしては、C a r b o s i l（商標）20又はP u r s i l（商標）20 80Aなどが挙げられ得る。ポリ（カーボネートウレタン）としては、B i o n a t e（商標）80A又は同様のポリマーが挙げられ得る。

【0268】

一部の実施形態では、基質は生体分解性である。他の実施形態では、基質は非生体分解性である。特定の実施形態では、基質は、1つ以上の生体分解性構成成分及び1つ以上の非生体分解性構成成分を含む。

【0269】

R P E分化の特徴を調べ、監視し、R P E表現型を評価するために、分子及び遺伝子マ

ーカーのいくつかの数の発現を評価し得る。例えば、当業者にとって公知の様々な方法により、遺伝子マーカーの存在を判定し得る。qPCRに基づくアッセイ、免疫アッセイ、免疫細胞化学アッセイ、免疫プロットイングアッセイなどであるが限定されない定量法により分子マーカーの発現を判定し得る。

【0270】

RPE細胞に対する代表的なマーカーとしては、ペアードボックスタンパク質(Pax6)、Raxホメオボックスタンパク質(Rax)、LIM/ホメオボックスタンパク質2(Lhx2)、ホメオボックスタンパク質SIX3、チロシナーゼ酵素(TYR)、小眼球症関連転写因子(MITF)、細胞性レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)、トリプシン-1(陽イオン性トリプシノーゲン、TYRP1)、トリプシン-2(陰イオン性トリプシノーゲン、TYRP2)、プレメラノソームタンパク質(PMEL17)、シルバー遺伝子座タンパク質相同体(SILV)、ceh-10ホメオドメイン含有相同体(Chx10)、ベストロフィン-1(BEST)及び網膜色素上皮特異的な65kDaタンパク質(RPE65)が挙げられる。

10

【0271】

RPE細胞はまた、細胞生理学的マーカー及び形態学的マーカーによっても評価し得る。細胞の形態を調べるために、免疫細胞化学及び電子顕微鏡を使用し得る。当業者にとって公知の機能アッセイを使用してRPE細胞を評価し得る。例えば、HIP細胞由来のRPE細胞の特徴を調べるために、色素上皮由来因子(PEDF)分泌プロファイリング、杆体外節(ROS)食作用アッセイ、11-シスレチノールへのトランスレチノール変換に対するアッセイ、増殖因子の極性分泌を調べるためのアッセイ及び電子障壁を作るタイトジャンクションを検出するためのアッセイを使用し得る。

20

【0272】

分化の一部の実施形態では、多能性幹細胞は神経誘導を受け、1つ以上の網膜前駆細胞マーカー、Pax6、Rax、Lhx2、Six3又は何らかの他の分子、神経誘導の生理学的又は形態学的マーカーを発現する。他の実施形態では、分化している細胞は、RPE特異化を受け、及び/又はロゼット構造を形成する。細胞が分化し続けているので、ロゼット構造は平坦になり未熟RPE細胞の層又はシートになり得る。未熟RPE細胞の層は、多角形及び/又は六角形の形状の平面状の細胞を含み得る。

30

【0273】

一部の実施形態では、低免疫RPEを、必要とする患者に移植する。黄斑変性罹患患者又はRPE細胞損傷患者にRPE細胞を移植し得る。一部の実施形態では、患者は、加齢性黄斑変性(AMD)、早期AMD、中期AMD、後期AMD、非血管新生加齢性黄斑変性、萎縮型黄斑変性(萎縮型加齢性黄斑変性)、滲出型黄斑変性(滲出型加齢性黄斑変性)、若年性黄斑変性(JMD)(例えばシュタルガルト病、ベスト病及び若年性網膜分離症)、レーバー先天黒内障又は網膜色素変性症を有する。他の実施形態では、患者は網膜剥離に罹患している。

【0274】

必要とする患者に移植され得るRPEパッチを作製するために、本明細書中に記載の基質の何れかにRPE細胞を固定化し得る。RPE細胞の1つ以上の層を含むパッチを眼の組織に外科手術により投与するか又は送達し得る。一部の例では、神経網膜又は網膜下の空間にパッチを送達する。ある一定の実施形態では、内視鏡により、カテーテルに基づく方法を介して、血管内に、筋肉内に、又は特定の眼組織のための当技術分野で公知の他の手段により、パッチを送達する。パッチの配置は、立体生物顕微鏡、眼底写真、スペクトルドメイン光干渉断層撮影(SD-OCT)及び当業者により認められる他の方法を使用して決定され得る。

40

【0275】

当業者により認められるように、細胞タイプ及びこれらの細胞の最終的用途の両方に依存する当技術分野で公知の技術を使用して、分化したHIP派生物を移植するか又は埋め込む。一般に、患者の特定の位置に本発明の分化したHIP細胞を移植又は注入する。特

50

定の位置に移植する場合、それらが定着する一方で分散することを防ぐために、ゲルマトリクス中で細胞を懸濁し得る。

【0276】

本明細書中に記載の本発明がより詳細に理解され得るように、次の実施例を説明する。これらの実施例は単なる例示目的であり、何ら本発明を限定するものとして解釈されるものではないことを理解されたい。

【実施例】

【0277】

X I I I . 実施例

実施例 1 : マウス誘導多能性幹細胞の作製

本明細書中に記載の方法の出典は Dieckmann et al., Sci Rep, 2015, 8081 である。

【0278】

マウスのマウス尾部先端の線維芽細胞を分離し、IV型コラゲナーゼ (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) で単離し、10%胎児ウシ血清 (FBS)、L-グルタミン、4.5 g/L グルコース、100 U/mL ペニシリン及び 100 µg/mL ストレプトマイシンを含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) とともに、加湿インキュベーター中、37 °C、20% O₂ 及び 5% CO₂ で維持した。

【0279】

次に Neon Transfection 系を使用し、4個の初期化因子、Oct 4、KLF 4、Sox 2 及び c-Myc を発現する新規コドン最適化ミニイントロン (mini-intronic) プラスミド (co-MIP) (DNA 10 ~ 12 µm) を使用して、1 × 10⁶ 個のマウス線維芽細胞を初期化した。遺伝子移入後、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) フィーダー層上に線維芽細胞を播種し、酪酸ナトリウム (0.2 mM) 及び 50 µg/mL アスコルビン酸の添加により線維芽細胞培地中で維持した。

【0280】

ESC様コロニーが出現したとき、DMEM、20% FBS、L-グルタミン、非必須アミノ酸 (NEAA)、β-メルカプトエタノール及び 10 ng/mL 白血病阻害因子 (LIF) を含有するマウス iPSC 培地に培地を変えた。2回の継代後、マウス iPSC を 0.2%ゼラチンコーティングプレートに移し、さらに増殖させた。全ての継代で、磁気活性化細胞選別 (MACS) を使用して、マウス多能性マーカー SSEA-1 について iPSC を選別した。

【0281】

上記方法によりマウス低免疫原性 iPSC を作製するために単離マウス iPSC を使用し得る。

【0282】

実施例 2 : ヒト誘導多能性幹細胞の作製

Gibco (商標) ヒトエピソーム iPSC 株 (カタログ番号 A18945、ThermoFisher) は、3プラスミド、7因子 (SOKMNL T; SOX 2、OCT 4 (POU5F1)、KLF 4、MYC、NANOG、LIN28 及び SV40 L T 抗原) EBNA に基づくエピソーム系を使用して、CD34 + 臍帯血から得た。この iPSC 株は、初期化事象からのゲノムへの組み込みがなかったため、ゼロフットプリント (zero footprint) であるとみなされる。全ての初期化遺伝子不含であることが示された。ヒト iPSC を凍結融解し、培養し、継代するためのプロトコールは製品マニュアルで提供される。

【0283】

インビボ奇形腫アッセイ及びインビトロ多能性遺伝子発現アッセイ (例えば PCR 及びアレイ) によって又は多能性マーカーに対する蛍光染色によってヒト iPSC の多能性を判定し得る。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 4 】

G i b c o (商 標) ヒトエピソーム i P S C 株は、正常な核型及び、O C T 4、S O X 2 及び N A N O G (R T - P C R に よ り 示 さ れ る よ う に) 及 び O C T 4、S S E A 4、T R A - 1 - 6 0 及 び T R A - 1 - 8 1 (I C C に よ り 示 さ れ る よ う に) の よ う な 多 能 性 マーカーの内在性発現を有する。全ゲノム発現及びエピジェネティックプロファイリング分析から、このエピソーム h i P S C 株がヒト胚性幹細胞株とは分子的に区別できないことが示される (Q u i n t a n i l l a e t a l . , P l o S O n e , 2 0 1 4 , 9 (1) : e 8 5 4 1 9) 。 定 方 向 分 化 及 び 奇 形 腫 分 析 で 、 こ れ ら の h i P S C は 外 胚 葉 性、内胚葉性及び中胚葉性の系列に対するそれらの分化能を保持した (B u r r i d g e e t a l . , P L o S O n e , 2 0 1 1 , 6 (4) : e 1 8 2 9 3) 。 さ ら に 血 管、造血系、神経及び心臓系列が安定的な効率で導かれた (B u r r i d g e e t a l . , 上 出) 。

【 0 2 8 5 】

【表 1】

表1.ヒトiPSC(例えばCas9 iPSC)を培養するための例示的プロトコール

表題	ヒト iPSC 培養	
導入	誘導多能性幹細胞は、全 3 つの胚葉(外胚葉、内胚葉及び中胚葉)を代表する、分化した子孫を生じさせる能力を有する。インビトロで多能性細胞を増殖させ、特異的な細胞タイプを作製するために直接的分化にそれらを供することができることは、疾患又は傷害により損傷を受けている組織を置き換えるか又は回復させるための細胞に基づく治療の開発に重要である。	
材料	1. Essential 8 Flex 培地(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 A2858501)	10
	2. Revita Cell Supplement (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 A2644501)	
	3. 希釈マトリゲル(Corning、カタログ番号 356231)、Knockout DMEM (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 10829)中で希釈	
	4. Versene(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 15040066)	
	5. 10cm ² 細胞培養プレート(Corning、カタログ番号 353003)	
プロトコール		特記事項
1.	1x10cm ² ディッシュ中で 1x バイアルを凍結融解、およそ 4~5 日後、細胞は 60~70%培養密度に達し、分割できる状態になる。	
2.	冷 Knockout DMEM 中でマトリゲルを 1:40 で再構成し、よく混合する。30 分間、37℃インキュベーター中にディッシュを置いて、プレートをすぐに使用するか、又はパラフィンで密封し、最長で 7 日間 2~8℃で保管。	30
3.	Essential 8 Flex 培地中、希釈マトリゲル(KO DMEM 中 1:40)コーティング 10cm ² ディッシュ上で Cas9 ヒト iPSC を培養。	細胞を 37℃ /5%CO ₂ で温置。
4.	培地を毎日交換し、37℃で 9 分間にわたり Versene を使用して 3~4 日ごとに 1:6 で細胞を継代。	穏やかにピペッティングする。攪拌してはいけない。 4℃にて 800rpm で 4 分間遠心分離。
5.	最初の 24 時間、分割した後、Revita Cell Supplement を培地中で 1:100 で添加。	40

【 0 2 8 6 】

上記方法によりヒト低免疫原性 iPSC (HIP 細胞) を作製するために単離ヒト iPSC を使用し得る。

【 0 2 8 7 】

実施例 3 : 低免疫原性多能性細胞は、NK 細胞殺傷及びマクロファージ食作用に対してよ

10

20

30

40

50

り感受性が低かった。

低免疫原性多能性細胞（例えばマウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSC及びヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSC）の能力及び免疫自然応答経路を逃れるための能力を評価するために、実施例を行った。

【0288】

特に、酵素結合免疫スポット（Elispot）アッセイを行った。マウスHIP細胞又はヒトHIP細胞（マウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSC又はヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSC）とNK細胞を同時培養し、IFN 放出を測定した（例えばElispotプレートリーダーを使用して自然IFN スポット頻度を測定した）。一部の例において、抗CD47抗体を使用することによってCD47を遮断した。

10

【0289】

およそ95%NK細胞及び5%マクロファージなどのマウスNK細胞と同時培養したマウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSCは、NK細胞活性化を刺激できなかった（図1）。ElispotアッセイにおいてマウスB2m - / - Ciita - / - iPSCは、NK細胞によるIFN 放出を惹起し、一方でマウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSCは惹起しなかった。CD47の遮断（例えば抗CD47抗体の使用）は、マウスB2m - / - Ciita - / - iPSCにおいて効果がなかった。しかし、CD47遮断は、B2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSCが有した防御を完全に消失させた。NK細胞を活性化し、従ってIFN を放出させることが知られているYAC-1細胞を対照とした。

20

【0290】

ヒトNK細胞と同時培養したヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSCもNK細胞活性化を刺激できなかった。図2は、ElispotアッセイにおいてヒトB2M - / - CIITA - / - iPSCがNK細胞によるIFN 放出を惹起し、一方でヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSCは惹起しなかったことを示す。CD47の遮断は、ヒトB2M - / - CIITA - / - iPSCにおいて効果がなかったが、これはヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSCが有した保護を消失させた。NK細胞を活性化し、従ってIFN を放出することが知られているK562細胞を対照とした。

30

【0291】

図3は、ヒトNK細胞（およそ95%NK細胞及び5%マクロファージ）とともに温置したマウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSCのElispotの結果を示す。マウスB2m - / - Ciita - / - iPSC及びマウスB2m - / - Ciita - / - CD47tg iPSCは、ヒトNK細胞によるIFN 放出を惹起した。CD47の遮断は、NK細胞応答に対して効果がなかった。YAC-1細胞は、ヒトNK細胞による強いIFN 放出を誘発し、これを対照とした。

【0292】

図4は、マウスNK細胞（およそ95%NK細胞及び5%マクロファージ）とともに温置したヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSCのElispotの結果を示す。ヒトB2M - / - CIITA - / - iPSC及びヒトB2M - / - CIITA - / - CD47tg iPSCは、マウスNK細胞によるIFN 放出を惹起した。CD47の遮断はNK細胞応答に対して効果がなかった。ヒトK562細胞は、マウスNK細胞による強いIFN 放出を誘導し、これを対照とした。

40

【0293】

本発明のHIP細胞がマクロファージ食作用に対して感受性であるか否かを判定するために、マクロファージ食作用アッセイも行った。簡潔に述べると、本明細書中に記載のHIP細胞を蛍光シフェラーゼで標識し、マクロファージと同時培養した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、HIP細胞の生存能又は存在を分析した。

【0294】

50

図5は、ヒトマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼで標識されるヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの食作用アッセイの結果を示す。マクロファージと温置した場合、ヒトB2M - / - C I I T A - / - i P S Cの生存能シグナルは顕著に減弱した。一方で、ヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの生存能シグナルはヒトマクロファージの存在下で変化しなかった。全てのH I P細胞を死滅させたT r i t o n X - 1 0 0を対照として使用した。C D 4 7の遮断によって、ヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの防御特性が排除され、それらがマクロファージ食作用又は排除に対して感受性になった。

【0295】

図6は、マウスマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識マウスB2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S Cの食作用アッセイの結果を示す。

10

【0296】

マクロファージと温置した場合、マウスB2m - / - C i i t a - / - i P S Cの生存能シグナルが顕著に低下した。一方で、マウスマクロファージの存在下でマウスB2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S Cの生存能シグナルは変化しなかった。全てのH I P細胞を死滅させたT r i t o n X - 1 0 0を対照として使用した。C D 4 7の遮断によって、マウスB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの保護機能が排除され、それらがマクロファージ食作用又は排除に対して感受性になった。全てのH I P細胞を死滅させたT r i t o n X - 1 0 0を対照として使用した。

20

【0297】

図7は、マウスマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識ヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの食作用アッセイの結果を示す。ヒトB2M - / - C I I T A - / - i P S C及びヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cの両方の生存能シグナルは、マウスマクロファージと同時培養した場合、顕著に低下した。全てのH I P細胞を死滅させたT r i t o n X - 1 0 0を対照として使用した。

【0298】

図8は、ヒトマクロファージと同時培養した蛍ルシフェラーゼ標識マウスB2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S Cの食作用アッセイの結果を示す。ヒトマクロファージと同時培養した場合、マウスB2m - / - C i i t a - / - i P S C及びマウスB2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S Cの両方の生存能シグナルが顕著に低下した。全てのH I P細胞を死滅させたT r i t o n X - 1 0 0を対照として使用した。

30

【0299】

本明細書中で提供される結果から、マウスB2m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g i P S C及びヒトB2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g i P S Cは、NK細胞活性化及びマクロファージ食作用など、自然免疫応答を逃れることが可能であったことが示される。

【0300】

実施例4：ヒト誘導多能性幹細胞由来の心筋細胞の作製

ヒトH I P細胞由来心筋細胞(C M)を作製するための方法を本明細書中で提供する。代表的な実施形態では、ヒトH I P細胞を心筋細胞のインビトロ単層に分化させた。本明細書中に記載の代表的な手順の出典は、その全体において、及び具体的には細胞を分化させるための技術に対して、参照により本明細書によって組み込まれる、S h a r m a e t a l . , J V i s E x p , 2 0 1 5 , 9 7 , d o i : 1 0 . 3 7 9 1 / 5 2 6 2 8であった。

40

【0301】

6ウェルプレート中で希釈マトリゲル(356231, C o r n i n g)上にヒトH I P細胞を播種し、E s s e n t i a l 8 F l e x培地(T h e r m o F i s h e r)中で維持した。培地を24時間ごとに交換した。

【0302】

細胞が90%~100%培養密度になった後、分化を開始させ(図10)、第0日のC

50

M分化培地から、2 % B - 27 マイナスインスリン (G i b c o、カタログ番号 A 1 8 9 5 6 0 1) 及び 2 μ M ~ 8 μ M C H I R - 9 9 0 2 1 (S e l l e c k C h e m、カタログ番号 S 1 2 6 3) を含有する 5 m L の R P M I 1 6 4 0 (G i b c o、カタログ番号 6 1 8 7 0) に交換した。一部の例では、C H I R - 9 9 0 2 1 の濃度は 6 μ M であった。分化第 0 日 ~ 第 2 日には培地交換を行わなかった。

【 0 3 0 3 】

第 2 日 (図 1 1) に、C H I R - 9 9 0 2 1 なしで 2 % B - 27 マイナスインスリンを含有する R P M I 1 6 4 0 へと C M 分化培地を交換した。細胞を撹拌しないように注意した。

【 0 3 0 4 】

第 3 日 (図 1 2) に、C M 分化培地から、2 % B - 27 マイナスインスリン及び 5 μ L I W R 1 (W N T 阻害剤、S e l l e c k C h e m、カタログ番号 S 7 0 8 6) を含有する R P M I 1 6 4 0 へと交換した。細胞を撹拌しないように注意した。培地交換した後、37 インキュベーター中で 48 時間、細胞を乱さないようにした。分化第 3 日 ~ 第 5 日には培地交換を行わなかった。

【 0 3 0 5 】

第 5 日 (図 1 3) に、培地交換して C M 分化培地から 2 % B - 27 マイナスインスリンを含有する R P M I 1 6 4 0 培地に戻し、48 時間温置した。第 5 日の C M 分化培地は、第 2 日の培地と同じであった。培地交換後、37 インキュベーター中で 48 時間、細胞を乱さないようにした。

【 0 3 0 6 】

第 7 日 (図 1 4) に、C M 分化培地から、B 27 プラスインスリン (G i b c o、カタログ番号 1 7 5 0 4 0 4 4) を含有する R P M I 1 6 4 0 へと交換し、その後 1 日ごとに同じ培地で培地交換した。およそ第 8 日 ~ 第 10 日で最初に心筋細胞の自発的拍動が見られた。

【 0 3 0 7 】

分化の 10 日後 (図 1 5)、細胞面積の 50 % 超が拍動した。枝様構造は非常に明白であった。一部の例では、細胞は最終分化し、もはや増殖しなかった。細胞が拍動してから、第 7 日の C M 分化培地中で心筋細胞の培養を維持した。培地を 1 日おきに交換した。

【 0 3 0 8 】

一部の例では、分化した細胞が拍動しなかった場合又は小さな拍動領域があった場合、細胞をグルコース飢餓に供した。グルコース飢餓によって非心筋細胞が培養プレートから剥がれた。分化第 10 日に、B - 27 プラスインスリン (G i b c o、カタログ番号 1 7 5 0 4 0 4 4) を含有するグルコースなしの R P M I 1 6 4 0 (G i b c o、カタログ番号 1 1 8 7 9) を含む精製培地へと培地交換した。精製培地中で細胞を 3 日間にわたり維持した (分化第 13 日まで) 。

【 0 3 0 9 】

第 13 日に、培養中で心筋細胞を維持するために第 7 日の C M 分化培地へと培地交換した。一部の例では、第 14 日に精製手順 (グルコース飢餓) を反復し、第 17 日に培地を C M 分化培地に交換するようにした。残りの細胞は高度に精製された心筋細胞であった。

【 0 3 1 0 】

第 7 日の第 7 日 C M 分化培地中で単離及び精製心筋細胞を維持した。培地を 1 日おきに交換した。一部の実施形態では、1 枚の 6 ウェルプレートにおいて約 1×10^6 個の心筋細胞を播種した。

【 0 3 1 1 】

凍結培地中で拍動する心筋細胞を凍結し、液体窒素中で保管した。一部の例では、凍結培地は、90 % 熱不活性化 F C S 及び 10 % D M C O 又はゼノフリー同等物を含んだ。凍結融解後、心筋細胞は拍動し続けた。

【 0 3 1 2 】

図 9 は分化方法のダイアグラムを提供する。図 10 は、分化開始直前のマトリゲル (商

10

20

30

40

50

標)上で培養したヒトiPSCを示す(100x拡大率)。図11は、培地交換前の分化第2日の細胞を示す(100x拡大率)。単層に細胞が残り、およそ10%が浮遊細胞であった。培地交換前に分化培地が黄色味を帯びた。図12は、培地交換前の分化第3日の細胞を示す(100x拡大率)。単層に細胞が残り、およそ20%が浮遊細胞であった。分化第2日と比較して培地の黄色味は少なかった。一部の小胞様構造が単層で見られた。図13は、培地交換前、分化第5日の細胞を示す(100x拡大率)。単層に細胞が残り、およそ15%が浮遊細胞であった。心筋細胞は他の細胞クラスターの上に出現した。図14は、培地交換前、分化第7日の細胞を示す(100x拡大率)。単層に細胞が残り、およそ15%が浮遊細胞であった。枝様構造が見えた。図15は、培地交換前、分化第9日の細胞を示す(100x拡大率)。拍動する心筋細胞が見え、写真でより暗く見えた。

10

【0313】

実施例5：誘導心筋細胞に分化させたマウスHIP細胞

mHIP細胞をマウス誘導心筋細胞(hmICM)に分化させた。分化前に、フィーダー細胞を除去するために、ゼラチンコーティングディッシュ上でmHIP細胞及びmiPSCを2回継代した。第0日に、コーティングのない10cmプレートで2日間、MEM/ハムF12(3:1、両方ともCorning)+0.5%N2-サプリメント、1%B27レチノイン酸、0.05%BSA、1%pen-strep、1%グルタミン(Gibco)、5mg/mLアスコルビン酸及び40nL/mL MTG(両方ともSigma-Aldrich)中で細胞80,000個/mLを用いて分化を開始させた。第2日に、コーティングのない10cmプレートにおいて2日間、0.5%N2-サプリメント、1%B27レチノイン酸、0.05%BSA、1%pen-strep、1%グルタミン(全てGibco)、5mg/mLアスコルビン酸及び40nL/mL MTG(Sigma-Aldrich)入りのMEM/ハムF12(3:1、両方ともCorning)中に細胞を移した。第4日に、1%グルタミン、50µg/mLアスコルビン酸、5ng/mL VEGF、500µg/mL hFGFb及び25ng/mL hFGF10(R&D Systems)を含有するSP34培地中でゼラチンコーティング6ウェルプレートに細胞を播種した。第7日に、1%グルタミン及び50µg/mLアスコルビン酸を含有するSP34培地へと培地交換し、1日おきに交換した。第11~14日前後に細胞拍動が開始し、それらの機能を示した。

20

【0314】

陰性選択のために抗CD15 mAbコーティング磁気マイクロビーズ(Miltenyi)を使用して、製造者のプロトコルに従いMACSを使用した分離によって細胞を濃縮した。hiCMs及びmiCMを含有するフロースルーを再び播種し、異なるアッセイに使用した。Gata4及びMhy6に対するrtPCRによって分化を確認した(図16)。Gata4フォワードプライマー(配列番号7は、

30

5'-CTGTCAATCTCACTATGGGCA-3'

リバースプライマー(配列番号8は、

5'-CCAAGTCCGAGCAGGAATTT-3'

Mhy6フォワードプライマー(配列番号9)は、

5'-ATCATTTCCCAACGAGCGAAG-3'

40

リバースプライマー(配列番号10)は、

5'-AAGTCCCAATAGAGAAATGCGG-3'であった。

【0315】

分化は免疫蛍光(IF)によっても確認した。一次抗体は、-サルコメアアクチニン(EA-53、Abcam)又はトロポニンI(ab47003、Abcam)に対するものであり、続いて対応する二次抗体はAF488又はAF555(Invitrogen)と複合化したものであった(データは示さない)。

【0316】

実施例6：移植した低mCMは同種レシピエントにおいて長期生存する。

同種レシピエントマウス(BALB/c)の梗塞境界域にhiCM及びmiCMを移植

50

した。細胞株は、ルシフェラーゼ(+)であり、luc(+)CMを生じさせ、インビボで生体発光(BLI)により追跡した。

【0317】

ルシフェラーゼを発現させるためのHIP細胞及びiPSC形質導入。Flucを発現させるために細胞に対して形質導入を行った。100,000個のmHIP細胞又はmiPSCをゼラチンコーティング6ウェルプレートに播種し、37及び5%CO₂で一晩温置した。翌日、培地を交換し、再改変EF1aプロモーター(GenTarget, San Diego, CA)下でルシフェラーゼII遺伝子を発現する1バイアルのFlucレンチウイルス粒子を1.5mL培地に添加した。36時間後、1mLの培地を添加した。さらに24時間後、完全培地交換を行った。2日後、D-ルシフェリン(Promega, Madison, WI)を添加することにより、ルシフェラーゼ発現を確認した。IVIS 200(Perkin Elmer Waltham, MA)により最大光子s⁻¹cm⁻²/ステラジアンでシグナルを定量した。

10

【0318】

hiCMは拒絶されず、移植後28日で他の臓器に移動しなかった(図17)。hiCMは、同種移植後、免疫認識を逃れ、長期生存を示した。注入は心臓筋肉へのものだったので、移植細胞を光学的にマッピングした。hiCMの結果、「スーパー細胞」生着が起こったが、miCMではなかった(データを示さない)。

【0319】

光学的マッピング:

20

全心臓ランゲンドルフ標本。手術から4~5週間後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させた。ヒアス(hears)を素早く切除し、組成(mmol/L)93NaCl、20NaHCO₃、1Na₂HPO₄、1MgSO₄、5KCl、1.8CaCl₂、20酢酸Na、20グルコースの氷冷改変タイロッド液に入れた。カニユーレに大動脈を介して心臓を組み込み、95%O₂/5%CO₂ガス混合物を通気させることによりpHを7.4に維持しながら37にて同じタイロッド液を使用して9mL/minで逆行性に灌流した。次に、収縮を阻害し、動きの人為現象を最小限にするために10mmol/L 2,3-ブタンジオンモノオキシム(BDM)及び10μmol/Lブレビスタチン(Enzo Life Sciences, Exeter, United Kingdom)を含有するタイロッド液へと灌流液を切り替えた。左心室(LV)のイメージングを可能にするために特注のPerspexチャンバーに心臓を水平に置いた。心臓の近くに置いた2Ag/AgClディスク電極を使用して、実験の間中、偽性心電図(ECG)を監視し、参照電極は灌流浴槽中に置いた。200ms(5Hz)のサイクル長で生理学的心内膜から心外膜の伝導経路を介して心臓のペーシングを可能にするために、単独の刺激装置に接続される2本の白金電極を右心房(RA)付属器上に置いた。

30

【0320】

以前に詳述されるように光学的測定を行った(その全体において参照により本明細書中に組み込まれるKelly et al., Circ. Arrhythmia Electrophysiol 6:809-17(2013))。簡潔に述べると、10分間にわたり2mM電圧感受性色素(ジ-4-ANEPPS)の50μLボラスを心臓に負荷した。590nmのロングパス発光フィルターとともにCardioCMOS-SM128カメラ(Redshift Imaging, Decatur, GA)を使用して、LVからの広視野の単一光子落射蛍光記録を作製した。470nmのLED光により励起がもたらされた。画像解像度は128x128ピクセル/フレームであり、2.5kHzのフレーム率で記録を行った。Ti:Sapphire 690~1080nm波長可変レーザー(Chameleon Ultra II, Coherent, Santa Clara, CA)を備えたZeiss LSM 510 NLO正立顕微鏡(Carl Zeiss, Jena, Germany)を使用して2光子(2P)レーザー走査顕微鏡(2PLSM)を遂行した。これらの2P測定は、高度の深さ分解能をもたらし、電気的活性を示す別々の組織層の同定を可能にする(Rubart, 2004)。ジ-4-ANE

40

50

P P Sを920 nmで励起し、それぞれ510～560 nm及び590～650 nmの2つのバイアルカリPMT検出器によって発光を回収し、比率計測による測定を行うことが可能になる。心外膜表面で観察される細胞配向の方向で、短いスキャンの場合は0.39 msのスキャン時間及び長いスキャンの場合は1.93 msのスキャン時間でラインスキャンを行った。トリガー心拍の到着後にラインスキャンを開始し、心臓のペースを調整するために使用される電気刺激心拍により同調させた。

【0321】

NZで梗塞瘢痕から離れた心筋において、可視的な瘢痕の端部のBZで、NZに隣接して、及び瘢痕の中心に向かってIZ内で、連続的広視野及び2P電圧記録を作成した。BZ及びIZ内でレムナント電気活性の領域を同定するために10x/0.3 NA対物レンズ(Carl Zeiss, Jena, Germany)を使用した広視野の電氣的マッピングを最初に使用した。次に、電気活性領域をさらに局在化させるために、40x/0.8 NA対物(Carl Zeiss, Jena, Germany)を用いて電気シグナルを示す領域で、広視野の電氣的マッピングを反復した。最後に、フレームスキャンモードで2P励起を使用して光軸面の構造をイメージングし、次に、心外膜表面の下方で個別の深さでラインスキャンモードを使用して電気シグナルを記録した。面の下方で50 µmで開始し、シグナル対ノイズ比(S/N)が低すぎて明らかな活動電位(AP)シグナルを区別できなくなるまで、深度を深めて(50～100 µm段階)一連の記録を行った。明確な構造を可視化する能力は深い層ほど低下し、識別可能な画像が得られ得る最大深度はゾーンに依存し得るが、ラインスキャン記録からの電気シグナルは常に、構造が画像化され得る層を超えて記録され得る。従って、より深い層での組織構造の画像から直接電気活性の源を同定することは可能ではなかった。1対の高感度GaAsP PMT検出器を利用し、FluoVolt及びRhod2 AMの組み合わせを使用し、840 nmで励起して、改変正立2Pレーザー走査装置(Intelligent Imaging Innovations; Denver, CO)を使用して、分析の一部を行った。より高い感度設定で知見を検証するためにこれらを使用した。

10

20

【0322】

瘢痕における電気活性源の決定。瘢痕における電気活性の細胞源を決定するために、Fura-2/AMを心筋に予め負荷することにより電圧シグナルが測定された領域で細胞内Ca²⁺の測定を行った。シグナルが残留筋細胞から生じた場合、電気刺激に応答してCa²⁺過渡応答(CaTs)が予想される。しかし、電圧シグナルが異常な筋細胞又は他の細胞実体(即ち線維芽細胞又は筋線維芽細胞)から生じていた場合、CaTsは、電気刺激に応答して生じ得ない(Chilton et al., 2007)。

30

【0323】

Fura-2を排出する陰イオン輸送体を遮断し、従って細胞における色素保持を向上させるために1 mmol/Lプロベネシドとともにこれらの実験用のタイロード液を補給した(その全体において本明細書中で参照により組み込まれるDi Virgilio et al., Biochem. J. 256: 959-63 (1988))。DMSO-プルロニック酸F-127(25% w/v)中の1 mmol/L保存液としてFura-2/AMを調製した。色素の100 µLポラスを灌流ライン中のバブルトラップに注入して、色素の希釈及び心臓への緩徐な添加を可能にした。蛍光シグナルが低い又は時間依存的に喪失するがゆえに必要とされる場合、色素のさらなるポラスを注入した。Fura-2/AMは760 nmで2P励起し、ショートパス650 nmダイクロイックミラーを通じて蛍光発光を誘導し、510～560 nmで回収した。同じ焦点面で同じスキャンライン及び1.93 msスキャン時間を使用して何らかの電圧シグナルが検出された直後にCa²⁺測定を行った。

40

【0324】

データ分析及び解釈。3x3ピクセルアレイから広視野の電圧シグナルを平均した。正確なサイクル長の時間及びラインスキャン率からの情報を利用して、25回の連続刺激(記録の5 s)からの平均電圧又はCa²⁺トレースを並べて生成させる特注ソフトウェア

50

を使用して、2 P 電圧及び Ca^{2+} シグナルを処理した。平均したトレースから A P シグナルの特徴を分析した。これらの測定は、10 ~ 90 % 上昇過程の立ち上がり時間 (T R i s e) 及び 50 % 活性化から 50、75 及び 90 % 再分極の A P 持続時間を含んだ (それぞれ A P D 50、A P D 75 及び A P D 90)。刺激時間に対する L V 壁におけるその時点での A P の到達時間として活性化時間を決定した。

【0325】

単回刺激心拍 (シグナル) 後のトレース全体のピーク振幅を拡張期中のトレースのピーク振幅 (ノイズ) により除したものとして S / N を計算した (補足図面 S 1)。1 の S / N 値は、ベースラインのノイズを超え、上回るシグナルは示さなかった。個々のトレース及び対応する S / N 値の観察に基づいて、 $S / N > 1.4$ を有意義な一過性シグナル (電圧又は Ca^{2+}) とみなした。動き又はノイズスパイクにより生じる人為的シグナルを除外するために $S / N > 1.4$ の全てのトレースをさらに精査した。全データを平均 \pm 標準誤差として表した。スチューデントの t 検定を使用してデータ群を比較した。

10

【0326】

心筋梗塞後 28 日でのレシピエント心臓の組織病理及びトリクローム染色から、h i C M の同種レシピエントにおける梗塞サイズも左心室サイズも顕著に縮小したことが明らかになった。各 150 μ m のギャップがある 25 枚のスライドから梗塞の長さを測定した (10 番目のスライドごと、各スライドにおいて 3 枚の切片で 5 μ m ; スライド 1 ~ 250)。発明者らは、h i C M 細胞を受容したレシピエントにおいてアルファ - サルコメア陽性ドナー心筋細胞及び未熟血管構造を同定した。一方、同種 m i C M では細胞は検出されなかった (図 18)。

20

【0327】

詳細な P V - l o o p 分析から、左心室パラメーターの顕著な改善が明らかになった。I T から、同種細胞の生存だけでなく、それらが生着し、心筋梗塞後の心臓を機能面で回復させたことが示された (図 19 A)。m i C M (緑) 又は h i C M 「スーパー細胞」 (赤) 注入の何れかを受けた梗塞心臓の P V - l o o p 分析。

【0328】

次のパラメーターは、h i C M が心臓機能を回復させたことを示し：駆出率 (E F) は、心拍あたりの心室から駆出される血液体積の、拡張末期の心室の血液体積に対する比である。1 回の拍出量 (S V) は、1 回の収縮で心室により駆出される血液体積である。これは、拡張末期の体積と収縮末期の体積との間の差である (図 19 B)。心室の 1 回仕事係数 (S W) は、大動脈への 1 回拍出量を駆出するために左心室により行われる作業として定義される。心臓出力 (C O) は、単位時間に心室により拍出される血液量として定義される (図 19 C)。収縮末期の血圧体積関係 (E S P V R) は、任意の心腔体積で心室により発現され得る最大血圧を示す。E S P V R は、前負荷、後負荷及び心拍の変化に対して比較的感受性が低い。これによって、駆出率、心臓出力及び 1 回拍出量のような他の血行動態パラメーターを超える収縮機能の指標改善が起こる。

30

【0329】

心筋梗塞の結果、P - V - ループ分析で体積が増加し、圧力が低下し、心臓のポンプ機能が低下する。心筋梗塞後に H I P - 心筋細胞を注入した場合、圧力及び体積の変化が妨げられ、心臓再生及びリモデリング予防が示される。

40

【0330】

実施例 7 : h i C M に分化させたヒト H I P 細胞

ヒト H I P 細胞を低免疫心筋細胞に分化させた。6 ウェルプレート中の希釈マトリゲル (356231、C o r n i n g) 上に h H I P 細胞を播種し、E s s e n t i a l 8 F l e x 培地 (T h e r m o F i s h e r) 中で維持した。90 % 培養密度で分化を開始させ、2 % B - 27 マイナスインスリン (G i b c o) 及び 6 μ M C H I R - 99021 (S e l l e c k c h e m) を含有する 5 mL の R P M I - 1640 へと培地を交換した。2 日後、C H I R 不含の 2 % B - 27 マイナスインスリンを含有する R P M I - 1640 へと培地交換した。第 3 日に、さらに 2 日間、5 μ L の I W R 1 を培地に添加し

50

た。第5日に、培地を交換して2% B-27 マイナスインスリン培地を含有するRPMI-1640に戻し、48時間置いた。第7日に、B27 プラスインスリンを含有するRPMI-1640 (Gibco) へと培地交換し、その後3日ごとに同じ培地で培地交換を行った。

【0331】

分化後第10日に心筋細胞の精製を行った。簡潔に述べると、低グルコース培地へと培地交換し、3日間維持した。第13日に、培地を交換して、B27 プラスインスリンを含有するRPMI-1640に戻した。第14日に再びこの手順を反復した。

【0332】

トロポニン(cTNT、データは示さない)に対してrtPCRにより分化表現型を確認した。フォワードプライマー(配列番号11)は：

5' - G A G G C A C C A A G T T G G G C A T G A A C G A - 3'、

リバースプライマー(配列番号12)は：

5' - G G C A G C G G A A G A G G A T G C T G A A' であった。

【0333】

免疫蛍光(IF)染色でも分化表現型を確認した。一次抗体は - サルコメアアクチニン(EA-53、Abcam)及びトロポニンI(ab47003、Abcam)に対するものであり、続いて対応する二次抗体はAF488又はAF555(Invitrogen)と複合化されたものであった。細胞核をDAPIで染色した。Leica SP5レーザー共焦点顕微鏡(Leica)を使用してイメージングを行った(データは示さない)。

【0334】

心筋細胞の自発的拍動は、最初に分化第10日前後で見られた。心筋細胞はヒト心臓組織と同様の拍動数を示し、心臓刺激(イソプレナリンによる)及び心臓抑制(cardiac blocking)(ベラパミルによる)に感受性がある。

【0335】

実施例8：ヒト化マウスにおけるhiCM細胞生存同種間移植

Jackson Laboratories (Sacramento, CA) から購入した同種ヒト化マウス(ヒト化NSG-SGM3マウス(18~30週)への移植後に低免疫心筋細胞が生存した。ヒトCD34+造血系幹細胞生着NSG-SGM3マウスは、多系統ヒト免疫細胞を発現させ、宿主に対してドナー細胞免疫反応性がないT細胞依存性免疫応答を示す機能的ヒト免疫系を示す。動物を無作為に実験群に割り当てた。全ての動物でヒトCD45+細胞集団間のCD3+細胞のパーセンテージを評価し、CD3パーセンテージはWTとB2M-/-CIITA-/-CD47tg群との間で有意差はなかった(その全体において本明細書中で参照により組み込まれるDeuse et al., Nat Biotech 37(3):252-258(2019))。

【0336】

同種ヒト化マウスの筋肉内に移植した野生型又はB2M-/-CIITA-/-CD47tg hiCMは、さらなるヒト化マウスモデルでマウスデータを確認した。生体発光(BLI)により心筋細胞を長軸方向に追跡した。時間経過とともに全wt hiCM移植物が拒絶された(動物5匹)。5つのB2M-/-CIITA-/-CD47tg hiCM移植片全てが永久的に生存した(図20)。心筋梗塞後の移植の後にも低免疫hiCM細胞が生存した(図21)。

【0337】

実施例9：マウス誘導多能性幹細胞由来の内皮細胞の作製

ヒトiPSC由来内皮細胞(EC)を作製するための方法が本明細書中で提供される。代表的な実施形態では、マウスiPSC(マウスHIP細胞など)を内皮細胞のインビトロ単層に分化させ得る。

【0338】

このプロトコールは、6ウェル方式プレート又は10cmディッシュを使用することを

10

20

30

40

50

含む。標準的トリプシンで細胞をトリプシン処理した。しかし、トリプシン処理した細胞を遠心分離しなかった。むしろ、使用したトリプシンの体積の3倍を超える体積の培地中で、トリプシン処理したコロニーを再懸濁した。

【0339】

分化（およそ12日）前、マウス胚性線維芽細胞（MEF）を凍結融解した - MEF 培地を使用してゼラチンコーティングプレート上で 1×10^6 個の MEF / ウェル（6 ウェルプレート）。1バイアルの iPSC を凍結融解し、MEF 上、3枚の6ウェルに移した。ESC 培地を毎日交換した。MEF 上でコロニーを ESC 培地中で 1 : 3 ~ 1 : 6 に分割した（凍結融解からおおよそ8日後）。分割前に MEF 上で NT - ESC コロニーを観察した（100x 拡大率）。ESC 培地中で 1 : 3 ~ 1 : 6 でゼラチン上に MEF からコロニーを分割した（前分化からおおよそ4日後；第 - 2 日とも呼ぶ）。

10

【0340】

第0日～第2日に、分化プロトコルを開始するために細胞を70～85%培養密度にした。EC 分化培地 # 1 は、RPMI 及び B - 27 サプリメントマイナスインスリン（Life Technologies）及び $5 \mu\text{M}$ CHIR - 99021（ Selleck Chemicals , Houston , TX , USA ）を2日間、含んだ。約2.5 mL の培地 / 6 ウェルプレート又は10 cm プレートを使用した。第0～2日は培地を交換しなかった。細胞を動かさずにインキュベーター中に置いておいた。

【0341】

第2日～第4日に、細胞培養物の形態を観察した。RPMI 及び B - 27 サプリメントマイナスインスリンを含有し、 $2 \mu\text{M}$ CHIR - 99021 を含む EC 分化培地 # 2 へと培地を交換した。細胞のかき混ぜを回避するように注意した。

20

【0342】

第4日～第7日に、RPMI 培地マイナスインスリンを含む内皮細胞（EC）分化培地 # 3 を使用した。第4日及び第6日に培地交換を実施した。未分化細胞クラスターは浮遊したままであり、最初の EC コロニーが出現した。

【0343】

第7日～第17日に、EC コロニーはプレートで密集状態になるまで増殖し続けた。内皮細胞（EC）分化培地 # 3 は、VEGF、FGF、ROCK 阻害剤、SB431542 及び Y - 27632 を補給した EC 培地（Lonza , Benicia , California）を含む。EC 分化中、およそ1日おきに培地を交換した（第7日、第9日、第11日及び第13日など）。

30

【0344】

材料及び試薬

トリプシン：Gibco、カタログ番号12605 - 010

ゼラチンコーティング：EmbryoMax（登録商標）0.1%ゼラチン溶液、カタログ番号ES - 006 - B。プレート表面を溶液で被覆し、コーティングしたプレートを使用まで37℃で保管した。

【0345】

MEF 培地：DMEM + glutamax + ビルビン酸ナトリウム、4.5 g / L グルコース（Gibco）、15% FBS、NEAA 及び 1% ペニシリン / ストレプトマイシン（P / S）入り。

40

【0346】

第0日～第2日用の EC 培地：RPMI 及び B - 27 サプリメントマイナスインスリン（Life Technologies、カタログ番号A1895601、 $5 \mu\text{M}$ CHIR - 99021（Selleck Chemicals , Houston , TX , USA、カタログ番号S2924）及び 1% P / S。

【0347】

第2日～第4日用の EC 培地：RPMI 及び B - 27 サプリメントマイナスインスリン（Life Technologies、カタログ番号A1895601、 $2 \mu\text{M}$ CH

50

IR-99021 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA, カタログ番 S2924) 及び 1% P/S。

【0348】

第0日～第2日培地用に 5 μ M (1:2000) に CHIR 保存溶液 (10 mM) を培地中で希釈した。第2日～第4日の培地用に 2 μ M (1:5000) になるように培地中で CHIR 保存溶液を希釈した。

【0349】

第4日～第7日用の EC 培地 (RPMI 培地 マイナスインスリン) : RPMI 及び B-27 サプリメント マイナスインスリン、50 ng/mL 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、10 ng/mL 線維芽細胞増殖因子塩基性 (FGFb; R&D Systems)、10 μ M Y-27632 (ROCK 阻害剤) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 及び 1 μ M SB431542 (Sigma-Aldrich) 入り、3日間。

【0350】

第7日～第14日用の EC 培地 (Lonza からの EC 培地) : EGM-2 Single Quots 培地 (又は CC-3162 EGMTM-2 Bullet Kit TM, EBM TM-2 プラス Growth Supplement の Single Quots TM、500 mL)、10 μ M Y-27632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)、1 μ M SB431542 (Sigma-Aldrich)、25 ng/mL VEGF 及び 2 ng/mL FGF。

【0351】

CD31+ 細胞を選別し、多能性幹細胞由来のマウス EC から選択した。MACS を含む磁気ビーズに基づく選別方法を実施した。例えば CD31+ 細胞の陽性選択のために CD31 マイクロビーズ (Miltenyi、カタログ番号 130-097-418) を使用した。第12日～第14日の後及び MACS 選別前の細胞 (100 \times 拡大率) を観察した。EC コロニーは 80%～90% 培養密度であり、未分化細胞クラスターが存在した。紡錘形態で長い細胞は間葉系の分化細胞に相当した。

【0352】

CD31+ 細胞の MACS 選択のための代表的プロトコールは次のとおりである。

1. 細胞を PBS で 1 回洗浄。
2. トリプシン: 0.5 mL / ウェル; 37 $^{\circ}$ C で 5 分間温置。
3. 培地 (第7日～14日培地)、1 mL / ウェルでトリプシン処理を停止。
4. 1000 μ L - エッペンドルフピペットを使用: 凝集塊を分解させるためにウェルを再懸濁。
5. 凝集塊を除去するために 50 mL ファルコンチューブにおいて黄色の 100 μ m メッシュフィルターを使用し、50 mL チューブ中で細胞を回収。
6. 50 mL チューブを 300 g、5 分間、4 $^{\circ}$ C でスピニング。
7. 50 mL チューブ中でペレットが見られる。大きなペレット = app. 90 Mio 細胞。
8. 10 個の Mio 細胞あたりを計算: 90 μ L MACS 緩衝液 + 10 μ L ビーズ。
9. 乾燥した細胞ペレットを得るために上清を除去。
10. MACS 緩衝液中で 1000 μ L エッペンドルフピペットを使用してペレットを再懸濁。
11. 黄色の 200 μ L エッペンドルフピペットでビーズを 10 に添加し再懸濁。
12. ボルテックス処理 (非常に短時間)。
13. 4 $^{\circ}$ C (冷蔵庫) で 30 分間温置。
14. 50 mL チューブに緩衝液を添加することにより 1～2 mL MACS 緩衝液 / 10 個の Mio 細胞で洗浄。
15. 300 g で 5 分間、4 $^{\circ}$ C にて遠心分離。

16. MidiMACSカラムを磁石に置く。カラムに3 mL MACS緩衝液を添加（「プライミング」として）。カラム下：50 mLファルコンチューブ。

17. 細胞ペレットから上清を除去（ペレットは乾燥させる必要あり）。

18. ペレット上で500 μ L MACS緩衝液を添加（ペレットサイズにかかわらず常に500 μ Lを使用）。

19. カラムに500 μ L（細胞+MACS緩衝液）を添加し、カラムを通過するまで待機。

20. 3 mLの純粋なMACS緩衝液をカラムに添加し、カラムを通過するまで待機：3回実施（洗浄段階）。

21. 磁石からカラムを除去し、15 mLファルコンチューブに置く。

22. 5 mL MACS緩衝液をカラムに添加し、「スタンプ」又は「プランジャー」を使用：15 mLファルコンチューブに5 mLを押し入れてCD31+細胞を溶出。

23. 300 gで5分間4にて細胞をスピン。

24. ペレット化（大きい場合およそ5~10 Mio）：1x6ウェルプレートに播種（ゼラチンコーティング）。

25. 培地：第7日~第14日用のEC分化培地。MACS後に第3日前にプレートを動かさなかった；その前にインキュベーターからプレートを出さない。

26. 第5日まで第7日~14日にわたり分化培地を維持。

27. MACS選別後、第5日に培地を交換：Lonza EGM-2 Single Quots培地（CC-3162 EGMTM-2 BulletKitTM、EBMTM-2プラスGrowth SupplementsのSingle QuotsTM、500 mL）+10 μ M Y-27632。

28. 1日おきに培地交換。ゼラチンコーティングプレート上で細胞を維持。

29. 必要な場合、トリプシンを用いて細胞を1：3に分割した。

30. ECの特徴を調べるために、当業者にとって公知の方法により、免疫細胞化学、LDLアッセイ及び/又はチューブ形成アッセイを実施した。

【0353】

図22は、分割前のMEFのNT-ESCコロニーを示す（100x拡大率）。図23は、分化開始直前のゼラチン上のNT-ESCを示す（100x拡大率）。図24は、5 μ M CHIRから2 μ M CHIRに分化培地を交換する前の分化第2日の細胞を示す（100x拡大率）。CHIRは中胚葉性分化を引き起こす。非中胚葉性細胞は凝集塊を形成し、浮遊して見え得る。図25は、培地交換前のEC分化第4日の細胞を示す（100x拡大率）。ECコロニーは、浮遊する未分化細胞凝集塊の下に出現する。図26は、分化第7日のEC細胞を示す（100x拡大率）。ECコロニーが見え、より密集している。数個の未分化細胞クラスターのみが見えた。図27は、第12日~第14日後及びMACS選別前の細胞を示す（100x拡大率）。

【0354】

実施例10 - マウス内皮細胞（miEC）に分化したHIP細胞

HIP iPSC及びmiPSCを内皮細胞（miEC）に分化させたが、HIP細胞由来miECのみが同種宿主において長期間生存した。6ウェルプレート中のゼラチン上にHIP及びmiPSCを播種し、マウスiPSC培地中で維持した。細胞が60%培養密度に到達した後、分化を開始させ、2% B-27マイナスインスリン（両者ともGibco）及び5 μ M CHIR-99021（ Selleckchem, Munich, Germany）を含有するRPMI-1640へと培地を交換した。第2日に、削減培地（reduced media）：2% B-27マイナスインスリン（両者ともGibco）及び2 μ M CHIR-99021（ Selleckchem）を含有するRPMI-1640へと培地を交換した。第4日~第7日に、RPMI-1640 EC培地、2% B-27マイナスインスリンプラス50 ng/mLマウス血管内皮細胞増殖因子（mVEGF；R&D Systems, Minneapolis, MN）、10 ng/mLマウス線維芽細胞増殖因子塩基性（mFGFb；R&D Systems）、10 μ M Y-2

7632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) 及び $1 \mu\text{M}$ SB431542 (Sigma-Aldrich) を含有する RPMI-1640 に細胞を曝露した。第7日から内皮細胞クラスターが見られ、EGM-2 Single Quots 培地 (Lonza) プラス 10% FCS hi (Gibco)、 25 ng/mL mVEGF、 2 ng/mL mFGFb、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Sigma-Aldrich) 及び $1 \mu\text{M}$ SB431542 中で細胞を維持した。21日後に分化工程を完了し、分化工程中に未分化細胞が剥離した。精製のために、抗CD15 mAb コーティング磁気マイクロビーズ (Miltenyi, Auburn, CA) を使用して製造者のプロトコルに従い、細胞を MACS 精製に通した。

【0355】

rtPCR) 及び免疫蛍光により内皮細胞分化を確認した。EGM-2 Single Quots 培地 プラス サプリメント 及び 10% FCS hi 中でフロースルーからの高度精製 HIP 及び miEC を培養した。3~4日ごとに細胞を 1:3 に継代するために TrypLE を使用した。上記のように PCR を行った。次のプライマーを使用した: VE-カドヘリン フォワードプライマー (配列番号 13): $5' - \text{GGATGCAGAGGCTCACAGAG} - 3'$ 及び リバースプライマー (配列番号 14): $5' - \text{CTGGCGGTTCACGTTGGACT} - 3'$ 。miPSC 及び HIP 細胞の両方からの EC 細胞は、VE-カドヘリン 発現を含め、分化した遺伝子発現 プロファイル を示し、親細胞はそれを示さなかった (図 28)。

【0356】

CD31 (ab28364, Abcam) 及び VE-カドヘリン (sc-6458, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) に対する免疫蛍光 (IF) によってもそれらの表現型を確認した。簡潔に述べると、PBS 中の 4% パラホルムアルデヒドで細胞を 15 分間固定した。細胞膜を透過処理液 (ASB-0102, Applied StemCell) で透過処理し、続いてブロッキング溶液 (ASB-0103, Applied StemCell) を使用し、一次抗体と温置した。可視化のために、AF488 又は AF555 (Invitrogen) と複合化した二次抗体と細胞を温置した。DAPI での核染色後、画像を得て、Leica SP5 レーザー共焦点顕微鏡 (Leica) で分析した。miPSC 及び HIP 細胞の両方からの EC 細胞が CD31 及び VE-カドヘリン に対して両方陽性に染色された (データは示さない)。

【0357】

免疫蛍光アッセイによってチューブ形成も確認した。 2.5×10^5 個の miEC を $5 \mu\text{M}$ CFSE 及び $0.1 \mu\text{g/mL}$ Hoechst (両方とも Thermo Fisher) で室温にて 10 分間染色し、24 ウェルプレートにおいて 10 mg/mL 未希釈 マトリゲル (356231, Corning, Corning, NY) 上に播種した。48 時間後、IF によりチューブ形成を可視化した (データは示さない)。

【0358】

実施例 6 - mHIP 細胞由来内皮細胞は同種移植で生存する

同種低 mEC は、後肢虚血モデルにおいてインビボで生存した。A. フェモリス (大腿輪、A. femoralis) の除去後、Fluc+wt 又は B2M-/- CIIITA-/- CD47tg mEC の移植物を同種マウスに移植し、BLI により長軸方向に追跡した。群あたり 15 匹の動物を使用した。

【0359】

生体発光イメージング (BLI) の場合、D-ルシフェリン 蛍カリウム塩 (375 mg/kg ; Biosynth AG, St. Gallen, Switzerland) を PBS (pH 7.4) (Gibco, Invitrogen) 中で溶解させ、麻酔下のマウスの腹腔内に注射した ($250 \mu\text{L}$ / マウス)。IVIS 200 system (Xenogen) を使用して動物を画像化した。最大光子 / 秒 / cm^2 / ステラジアン (p/s/cm²/sr) の単位で関心のある領域 (ROI) の生体発光を定量した。Living I

10

20

30

40

50

mageソフトウェア(Media Cybernetics)を使用してROIからの最大シグナルを測定した。第0日、第1日及び第30日まで1日おき、及びその後10日ごとにマウスを監視した。

【0360】

全動物のBLI値をプロットした。免疫原性が非常に高いwt mECは15日以内に拒絶され、経時的にBLIシグナル低下を示し、一方でB2M-/-CIITA-/-CD47tg移植物は全て生存した(図29)。

【0361】

実施例11-mHIP細胞由来EC細胞はインビトロで免疫応答を逃れる

HIP細胞由来内皮細胞は、インビトロでIFN- γ 又はナチュラルキラー応答を誘発しなかった。

【0362】

Elispotアッセイ。一方向性の酵素結合免疫スポット(Elispot)アッセイの場合、細胞注入から5日後にレシピエント脾臓細胞を脾臓から単離し、応答細胞として使用した。ドナー細胞をマイトマイシンで処理し(50 μ g/mLで30分)、刺激細胞として使用した。100,000個の刺激細胞を1 \times 10⁶個のレシピエント応答脾臓細胞と24時間温置し、Elispotプレートリーダーを使用してIFN- γ 及びIL-4スポットの頻度を数え上げた。

【0363】

ドナー特異的抗体。56に30分間加熱することによって、レシピエントマウスからの血清を非働化した。等量の血清及び細胞懸濁液(5 \times 10⁶/mL)を4で45分間温置した。FITC複合化ヤギ抗マウスIgM(Sigma-Aldrich)で細胞を標識し、フローサイトメトリー(BD Bioscience)により分析した。

【0364】

インビトロでのマウスNK細胞Elispotアッセイ。ポリI:C注射(200 μ L滅菌生理食塩水中の150ngポリI:C、腹腔内(i.p.)、Sigma-Aldrich)後に、NK細胞を新鮮なBALB/c脾臓から単離した。赤血球溶解後、抗CD49b mAbコーティング磁気ビーズ選別により細胞を精製し、応答細胞として使用した。この細胞集団は>99%CD3-であり、NK細胞(>90%)及び、骨髓細胞を含む他の細胞(<10%)を含有した。Elispot原理を使用して、IL-2(1ng/mL、Peprotech, Rocky Hill, NJ)の存在下でNK細胞をB2m-/-Ciita-/-又はB2m-/-Ciita-/-Cd47tg miPSCと同時培養し、それらのIFN- γ 放出を測定した。YAC-1細胞(Sigma-Aldrich)を陽性対照とした。マイトマイシン処理(50 μ g/mLで30分間)刺激細胞をNK細胞とともに(1:1)24時間温置し、Elispotプレートリーダーを使用してIFN- γ スポット頻度を数え上げた。

【0365】

wt miPSC由来miECのC57BL/6又はBALB/cレシピエントへの注入から5日後、IFN- γ Elispotアッセイのために脾臓細胞を回収した(箱は中央値とともに25th~75thパーセンタイル、ひげは最小-最大、群あたり動物6匹、両側スチューデントt検定)。IFN- γ 応答は、全ての同種レシピエントにおいて非常により強かった。5日後にレシピエント血清と温置したwt miPSC由来miECに対するIgM結合の平均蛍光(MFI)(箱は中央値とともに25th~75thパーセンタイル、ひげは最小-最大、群あたり動物6匹、両側スチューデントt検定)。全ての同種レシピエントにおいて顕著により強いIgM応答があった(図30)。

【0366】

同様に、C57BL/6又はBALB/cレシピエントにB2m-/-Ciita-/-CD47tg miPSC由来miECを注入し、5日後にIFN- γ Elispotを実施した(箱は中央値とともに25th~75thパーセンタイル、ひげは最小-最大、群あたり動物6匹、両側スチューデントt検定)。B2m-/-Ciita-/-C

10

20

30

40

50

d 4 7 t g m i P S C 由来 m i E C への I g M 結合の平均蛍光 (M F I))、5 日後にレシピエント血清と温置した (箱は中央値とともに 2 5 t h ~ 7 5 t h パーセントイル、ひげは最小 - 最大、群あたり 6 匹、両側スチューデント t 検定)。同種レシピエントにおいて測定可能な I F N - 応答又は I g M 応答はなかった。NK 細胞殺傷に対する C d 4 7 過剰発現の阻害効果を評価するために、B 2 m - / - C i i t a - / - m i P S C 又は B 2 m - / - C i i t a - / - C D 4 7 t g m i P S C 由来の m i E C を用いて NK 細胞での I F N - E l i s p o t を実施した (箱は中央値とともに 2 5 t h ~ 7 5 t h パーセントイル、ひげは最小 - 最大、独立実験 6 回、ボンフェローニの事後検定との A N O V A)。B 2 m - / - C i i t a - / - m i P S C からの派生物のみが NK 細胞殺傷に感受性であった (図 3 0)。

10

【 0 3 6 7 】

実施例 1 2 - H I P 細胞由来内皮細胞形態学

H I P 細胞由来内皮細胞は典型的な E C 形態を示した。マトリゲル中の B 2 m - / - C i i t a - / - C d 4 7 t g m i E C 移植片を同種 B A L B / c マウスの皮下に移植した。これらの低免疫原性派生物は、同種レシピエントにおいて経時的に、インビボでさらに成熟したか又はそれらの形態を変化させた。

【 0 3 6 8 】

1 : 1 希釈マトリゲル (C o r n i n g) 中の 8 0 0 , 0 0 0 個の B 2 m - / - C i i t a - / - C d 4 7 t g m i E C を同種 B A L B / c マウスに注入した。5 6 日まで複数の時間点でマトリゲルプラグを回収し、1 % グルタルアルデヒド入りの P B S 中の 4 % パラホルムアルデヒド中で 2 4 時間固定した。試料を脱水し、パラフィン中で包埋し、5 μ M の厚さの切片に切った。組織病理に対して、切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色し (C a r l R o t h)、倒立光学顕微鏡で画像を撮影した。細胞の源が免疫蛍光染色で示された。切片を再水和し、抗原回収及びブロッキングを行った。ルシフェラーゼ (a b 2 1 1 7 6)、V E - カドヘリン (S C - 6 4 5 8) に対する抗体及び A F 4 8 8 又は A F 5 5 5 (I n v i t r o g e n) と複合化した対応する二次抗体とともに試料を温置した。細胞核を D A P I で対比染色し、L e i c a S P 5 レーザー共焦点顕微鏡 (L e i c a , W e t z l a r , G e r m a n y) で画像を撮影した。

20

【 0 3 6 9 】

m i E C 及び免疫細胞の同時染色実験に対して、V E - カドヘリン (S C - 6 4 5 8 、S i g m a) 及び C D 3 (a b 1 6 6 6 9 、A b c a m) に対する一次抗体を使用し、続いて A F 4 8 8 又は A F 5 5 5 (I n v i t r o g e n) と複合化された対応する二次抗体を使用した。未熟な血管形成が観察された。データは示さない。

30

【 0 3 7 0 】

移植した m i E C が、第 1 4 日前後に環状構造において組織化を開始し、第 3 週前後で赤血球を含有した原始的血管を形成した (データは示さない)。

【 0 3 7 1 】

実施例 6 から動物から採取した細胞の灌流ドブラー (P e r i s c a n P I M I I " (P E R I M E D L t d . , I t a l y) から新しい血管形成が明らかになり、低 E C 群で肢をレスキューした (データは示さない)。

40

【 0 3 7 2 】

実施例 1 3 - 内皮細胞に分化したヒト H I P 細胞

ヒト H I P 細胞を h i E C 細胞に分化させた。野生型 h i P S C 及びヒト H I P 細胞を 6 ウェルプレート中の希釈マトリゲル (3 5 6 2 3 1、C o r n i n g) 上に播種し、E s s e n t i a l 8 F l e x 培地 (T h e r m o F i s h e r) 中で維持した。6 0 % 培養密度で分化を開始させ、2 % B - 2 7 マイナスインスリン (両方とも G i b c o) 及び 5 μ M C H I R - 9 9 0 2 1 (S e l l e c k c h e m) を含有する R P M I - 1 6 4 0 へと培地を交換した。第 2 日に、削減培地 (r e d u c e d m e d i a) : 2 % B - 2 7 マイナスインスリン (G i b c o) 及び 2 μ M C H I R - 9 9 0 2 1 (S e l l e c k c h e m) を含有する R P M I - 1 6 4 0 へと培地を交換した。第 4 日 ~ 第 7

50

日に、RPMI - 1640 EC 培地、2 % B - 27 マイナスインスリン + 50 ng / mL ヒト血管内皮細胞増殖因子 (VEGF; R&D Systems)、10 ng / mL ヒト線維芽細胞増殖因子塩基性 (FGFb; R&D Systems)、10 μM Y - 27632 (Sigma - Aldrich) 及び 1 μM SB431542 (Sigma - Aldrich) を含有する RPMI - 1640 に細胞を曝露した。第7日から内皮細胞クラスターが見え、EGM - 2 Single Quots 培地 (Lonza) + 10 % FCS hi (Gibco)、25 ng / mL VEGF、2 ng / mL FGFb、10 μM Y - 27632 (Sigma - Aldrich) 及び 1 μM SB431542 (Sigma - Aldrich) 中で細胞を維持した。14日後に分化工程を完了させ、未分化細胞が分化工程中に剥離した。精製のために、20 μM PluriSln - 1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) で48時間、細胞を処理した。EGM - 2 Single Quots 培地 (Lonza) + サプリメント及び 10 % FCS hi (Gibco) 中で高度精製 EC を培養した。3 ~ 4 日ごとに細胞を 1 : 3 で継代するために、TrypLE Express を使用した。

【0373】

それらの表現型を確認するために上記のように IF 染色を実施した。CD31 (ab28364、Abcam) 及び VE - カドヘリン (sc - 6458、Santa Cruz Biotechnology) に対して一次抗体を使用し、続いて AF488 又は AF555 (Invitrogen) と複合化された対応する二次抗体を使用した。細胞核を DAPI で染色した。Leica SP5 レーザー共焦点顕微鏡 (Leica) を使用してイメージングを行った。VE - カドヘリン (フォワード (配列番号 15) : 5' - AAGATGCAGAGGCTCATG - 3' 及び リバースプライマー (配列番号 16) : 5' - CATGAGCCCTCTGCATCTT - 3') に対する PCR を上記のように行った。

【0374】

wt hiPSC (a) 及び B2M - / - CIIITA - / - CD47tg hiPSC (b) の、対応する hiEC 派生物への分化に成功した。hiPSC 及び HIP 細胞の両方からの EC 細胞は、CDH5 発現を含む分化した遺伝子発現プロファイルを示し、親細胞は示さなかった。共焦点免疫蛍光により、miEC は CD31 及び VE - カドヘリンに対して陽性であった。全ての派生物はそれらの多能性遺伝子の発現を喪失した (2つの独立した実験の代表的写真) (図31及びデータは示さない)。

【0375】

実施例 14 - hiEC 細胞はヒト化マウス中で生存した

ヒト HIP 細胞は、ヒト化免疫系を有するマウスに移植され、生存した。ヒト化 NSG - SGM3 マウス (18 ~ 30 週) は Jackson Laboratories (カタログ番号 SMG3 - CD34, Sacramento, CA) から購入した。ヒト CD34 + 造血系幹細胞 (HSE) - 生着 NSG - SGM3 マウスは多系統ヒト免疫細胞を発現した。これらは、宿主に対するドナー細胞免疫反応性がない T 細胞依存性免疫反応を示す機能的ヒト免疫系を示した。動物を無作為に実験群に割り当てた。全動物においてヒト CD45 + 細胞集団中の CD3 + 細胞のパーセンテージを評価し、CD3 パーセンテージは野生型と B2M - / - CIIITA - / - CD47tg 群との間で有意差はなかった。全てのヒト化 NSG - SGM3 マウスは HLA - A 型であり、細胞移植物に対するミスマッチの数を計算した。hiEC 群での Elisport アッセイにおいて、常に2個のミスマッチがあった。

【0376】

同種ヒト化 NSG - SGM3 マウスに野生型又は B2M - / - CIIITA - / - CD47tg hiEC 移植物を注入した。5日後に IFN - Elisport を実施した (平均 ± s.d.、動物 3 匹 / 群、両側スチューデント t 検定)。ナイーブマウスでのバックグラウンドスポット頻度が示される (平均 ± s.d.、4 匹 / 群、両側スチューデント t 検定)。5日後に、何れかの hiEC に対する IgM 結合の I, MFI をレシピエント

10

20

30

40

50

血清と温置した（平均 \pm s.d.、3 匹 / 群、両側スチューデント t 検定）。ナイーブマウスにおけるバックグラウンド蛍光を示す（平均 \pm s.d.、3 匹 / 群、スチューデント t 検定）。B2M - / - C I I T A - / - h i E C 又は B2M - / - C I I T A - / - C D 4 7 t g h i E C を用いてヒト NK 細胞での I F N - E l i s p o t を実施した（箱は中央値とともに 25 t h ~ 75 t h パーセンタイル、ひげは最小 - 最大、群あたり 6 匹、ボンフェローニ事後検定とともに A N O V A ）（図 3 2 ）。

【 0 3 7 7 】

本明細書中で開示又は参照する全ての刊行物及び特許文書は、それらの全体において参照により組み込まれる。前述の記載は、例示及び説明の目的のためにのみ与えられている。この記載は、開示される正確な形態に本発明を限定するものではない。

10

【 0 3 7 8 】

本発明の範囲は、本明細書に添付される特許請求の範囲により定められるものとする。

【 0 3 7 9 】

非公式配列リスト

配列番号 1 - ヒト - 2 - ミクログロブリンタンパク質

【 化 1 】

MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSPKIVKW
DRDI

20

配列番号 2 - ヒト C I I T A タンパク質、160 アミノ酸 N - 末端

【 化 2 】

MRCLAPRPAGSYLSEPQGSSQCATMELGPLEGGYLELLNSDADPLCLYHFYDQMDL
AGEEEIELYSEPD TDTINCDQFSRLLCDMEGDEETREAYANIAELDQYVFQDSQLEGL
SKDIFKHIGPDEVIGESMEMPAEVGQKSQKRPFPEELPADLKHWP

配列番号 3 - ヒト C D 4 7 タンパク質

【 化 3 】

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYV
KWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSKDAVSHTGNY
TCEVTELTREGETIHELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGM
DEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSKLNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIG
LTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE

30

配列番号 4 - 単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) タンパク質

【 化 4 】

MASYPCHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRLEQKMPTLLRVYIDG
PHGMGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWQVLGASETIANIYTTQHRDLQGEIS
AGDAAVVMTSAQITMGMPYAVTDAVLAPHVGGEAGSSHAPPPALTLIFDRHPIAAL
LCYPAARYLMGSMTPQAVLAFVALIPTPLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERL
DLAMLAAIRRVYGLLANTVRYLQGGGSWWEDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRP
HIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDLYNVFAWALDVLAKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRD
ALLQLTSGMVQTHVTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

40

配列番号 5 - エシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) シトシンデアミナーゼ (C D) タンパク質

50

【化 5】

MSNNALQTIINARLPGEGLWQIHLQDGKISIDAQSGVMPITENSLDAEQGLVIPPFV
 EPHIHLDTTQTAGQPNWNQSGTLFEGIERWAERKALLTHDDVKQRAWQTLKWQIA
 NGIQHVRTHVDVSDATLTALKAMLEVQKEVAPWIDLQIVAFPQEGILSYPNGEALLE
 EALRLGADVVGAIHPFEFTREYGVESLHKTFALAQKYDRLIDVHCDEIDDEQSRFVET
 VAALAHHEGMGARVTASHTTAMHSYNGAYTSRLFRLLKMSGINFVANPLVNIHLQG
 RFDTPKRRGITRVKEMLESGINVCFGHDDVDFDPWYPLGTANMLQVLHMGLHVCQ
 LMGYGQINDGLNLITHHSARTLNLQDYGIAAGNSANLILPAENGFDALRRQVPVRY
 SVRGGKVIASSTQPAQTTVYLEQPEAIDYKR

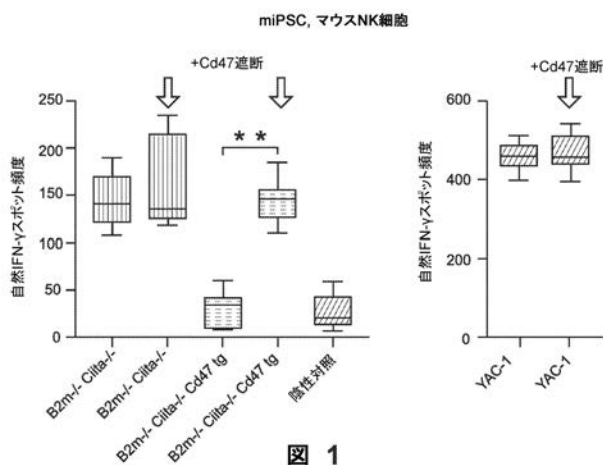
10

配列番号 6 - 短縮ヒトカスパーゼ 9 タンパク質

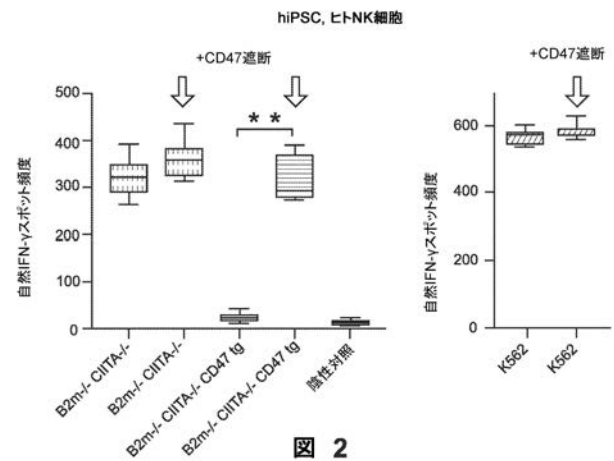
【化 6】

GFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNWNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
 RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
 TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS

【図 1】



【図 2】



【 図 3 】

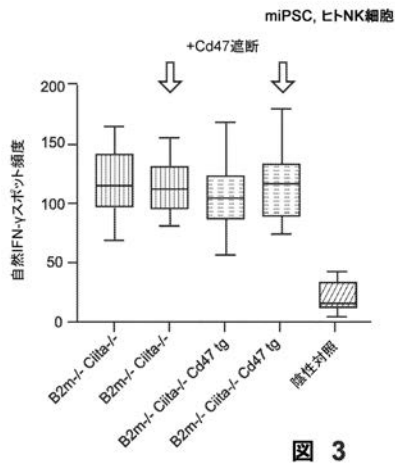


図 3

【 図 4 】

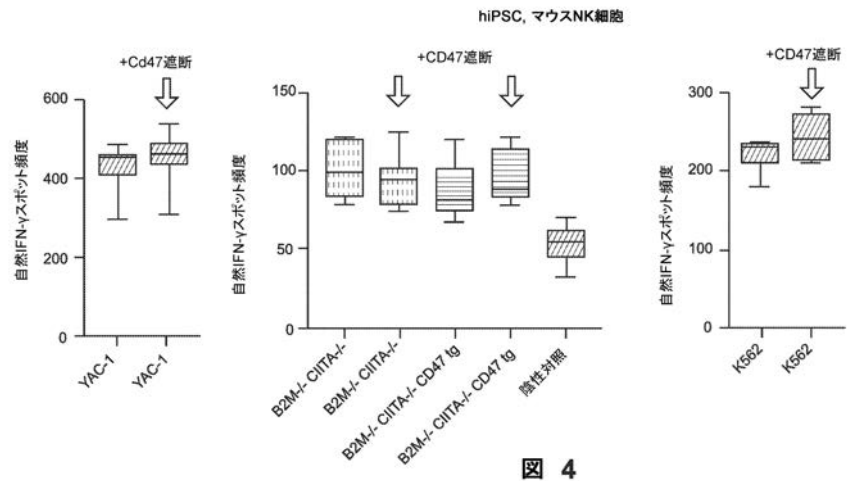


図 4

【 図 5 】

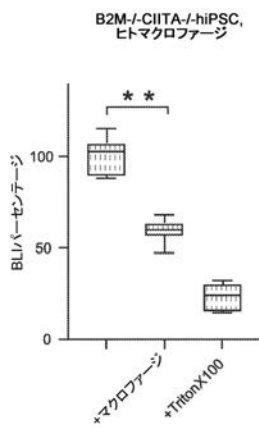


図 5

【 図 6 】

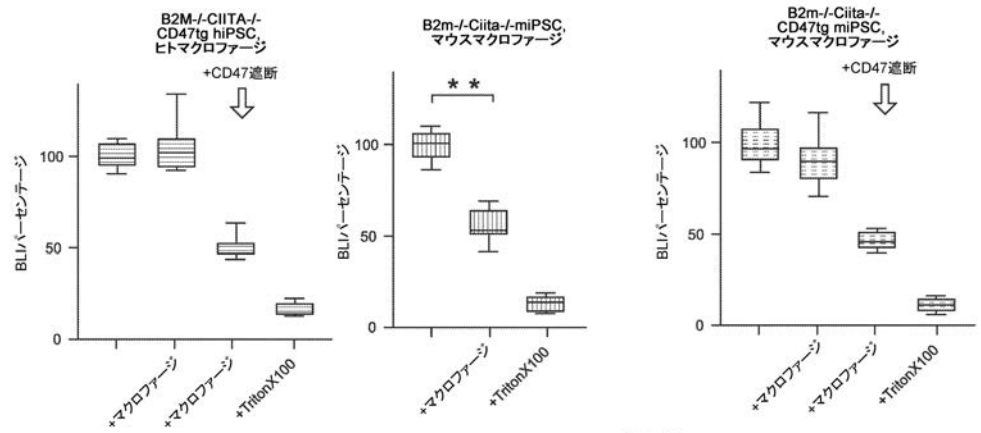


図 6

【 図 7 】

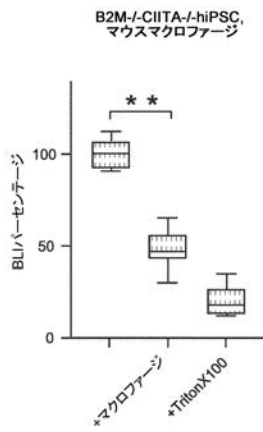


図 7

【 図 8 】

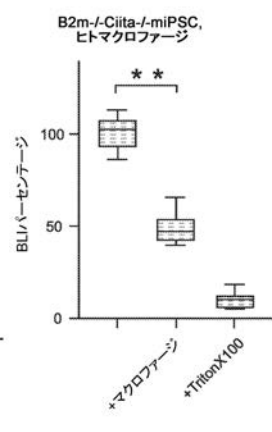
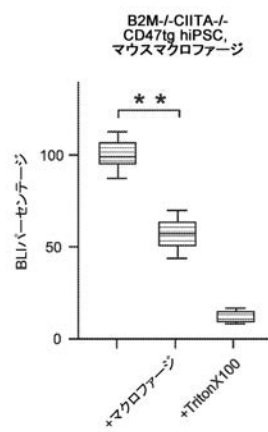
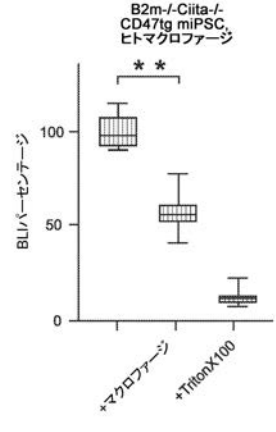


図 8



【 図 9 】

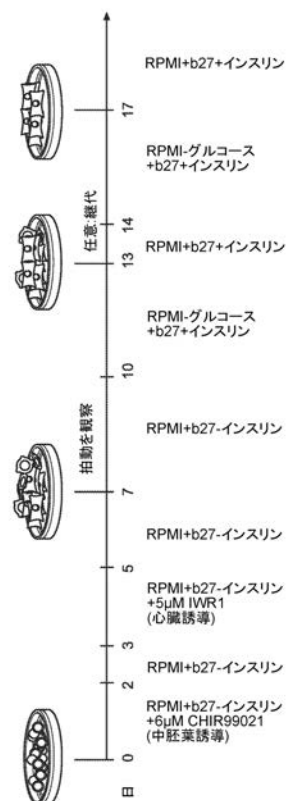


図 9

【 図 10 】

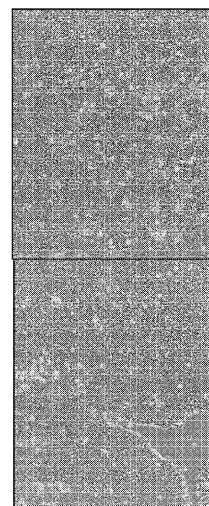


FIG. 10

【図 1 1】

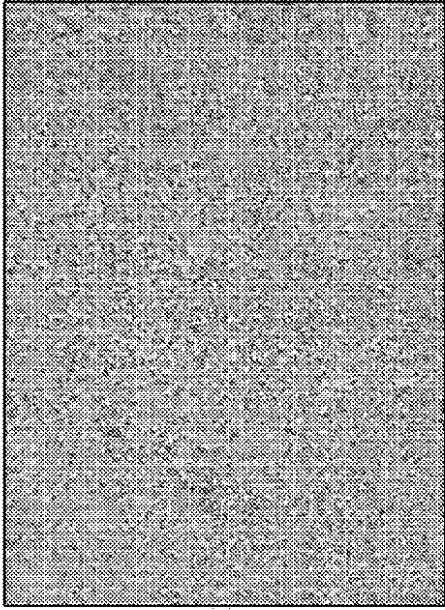


FIG. 11

【図 1 2】

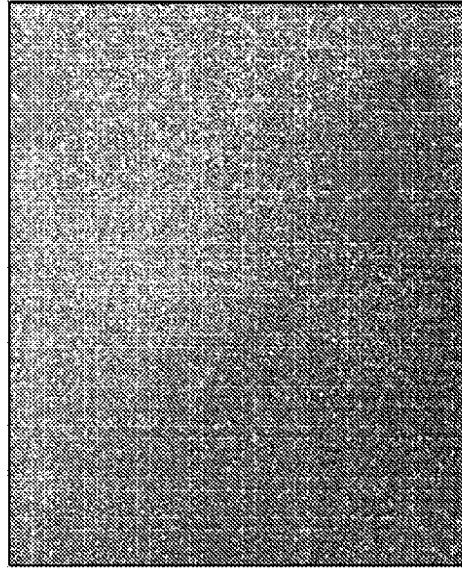


FIG. 12

【図 1 3】

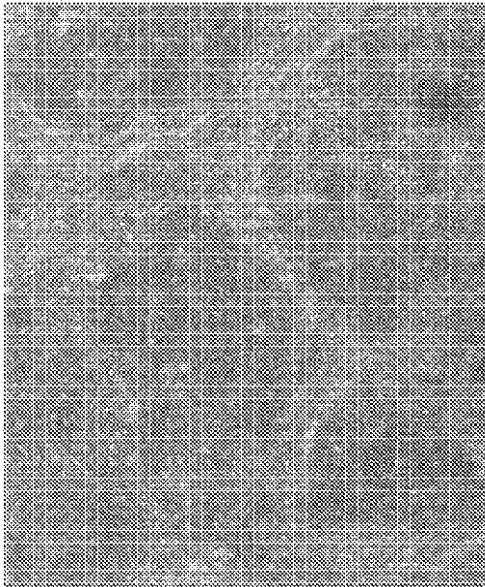


FIG. 13

【図 1 4】

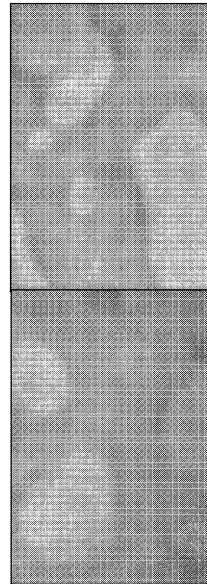


FIG. 14

【 図 1 5 】

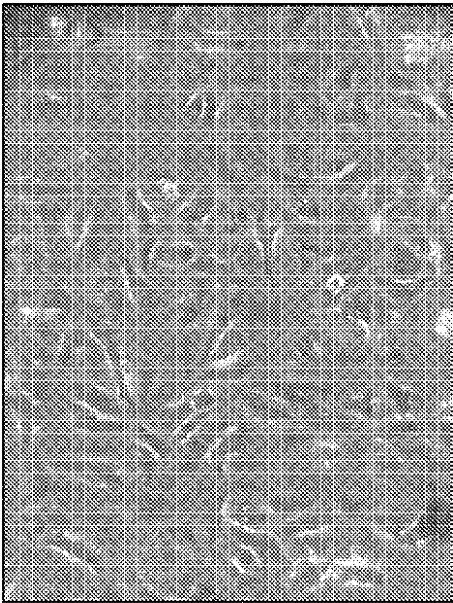


FIG. 15

【 図 1 6 】

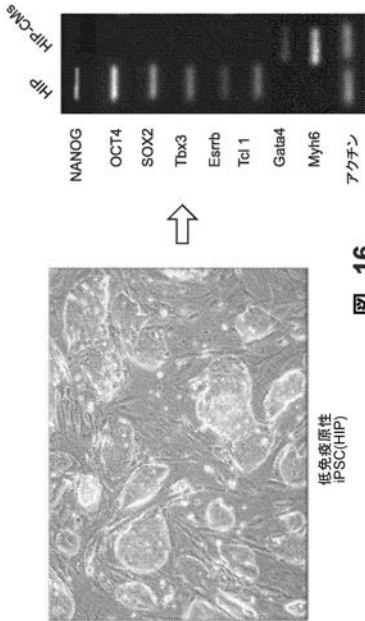


図 16

【 図 1 7 】

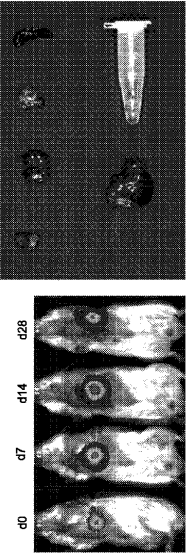


FIG. 17

【 図 1 8 】

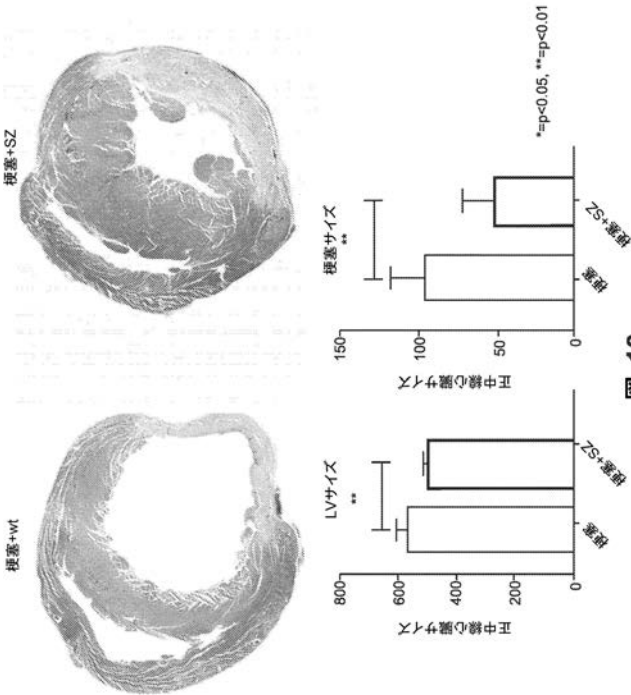


図 18

【 図 1 9 B 】

EF

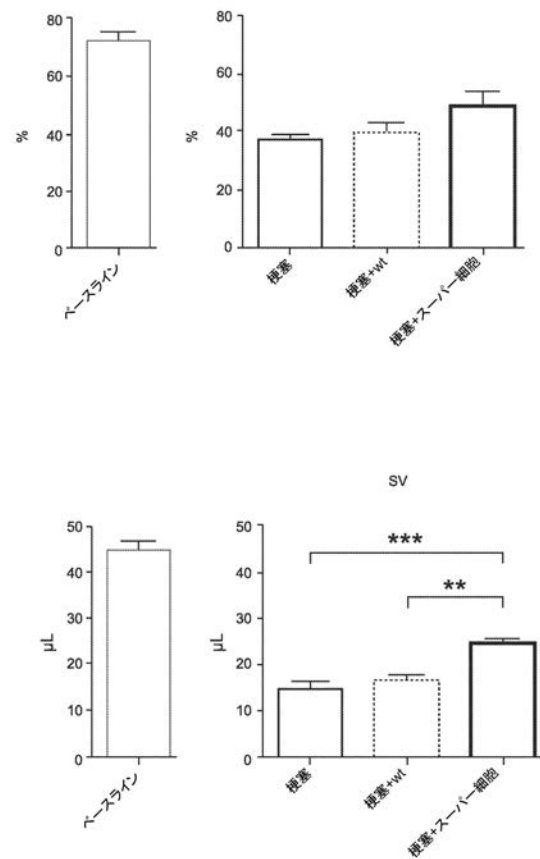


図 19B

【 図 2 0 】

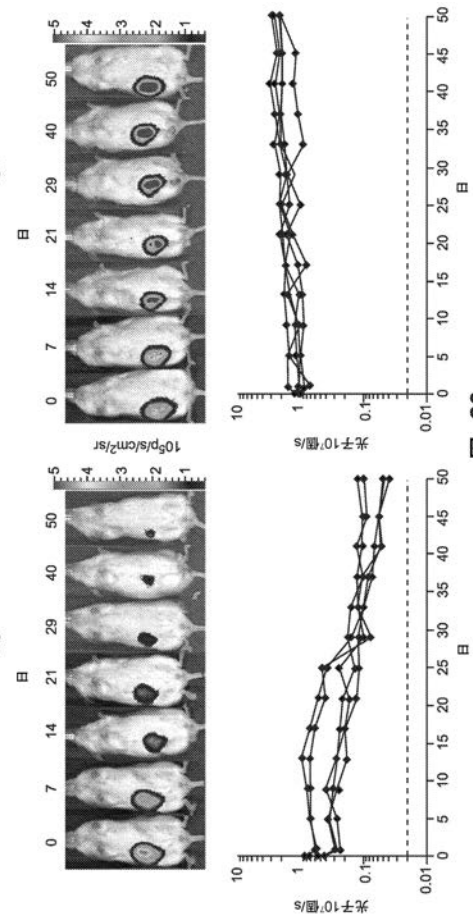
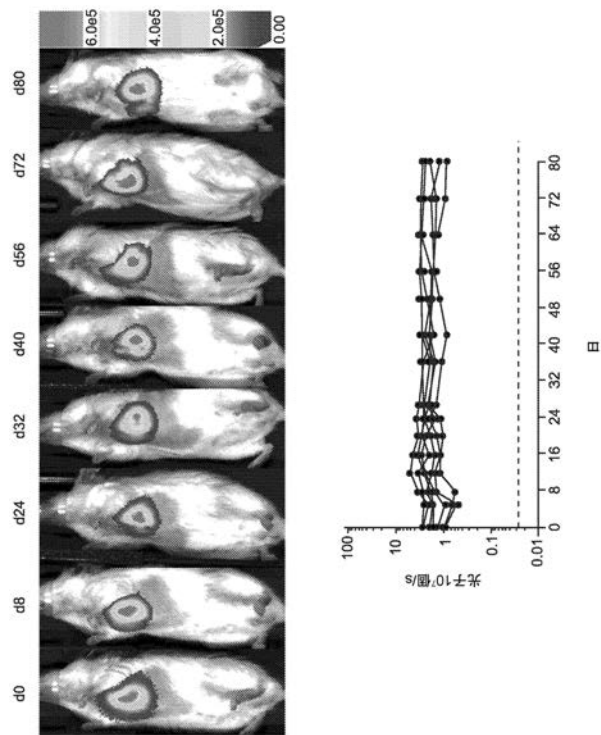


图 20

【 図 2 1 】



【 図 2 2 】

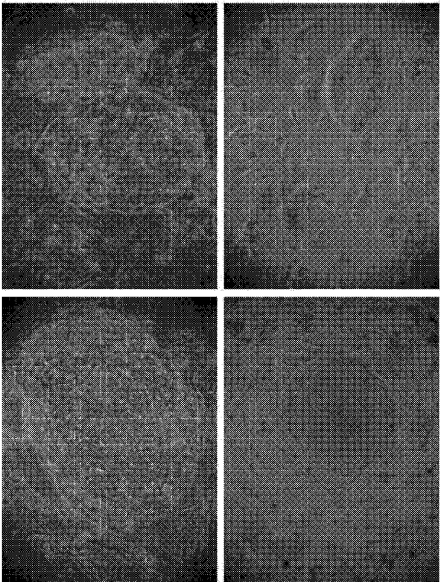


FIG. 22

【 図 2 3 】

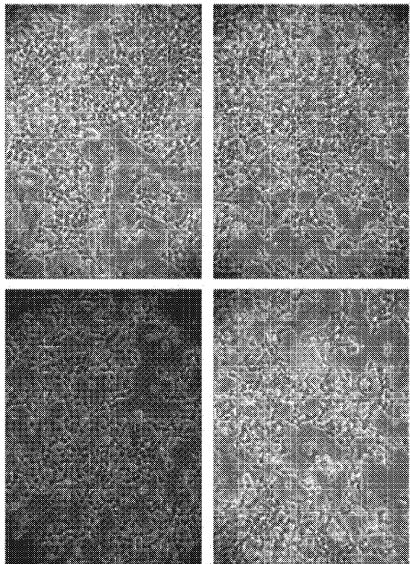


FIG. 23

【 図 2 4 】

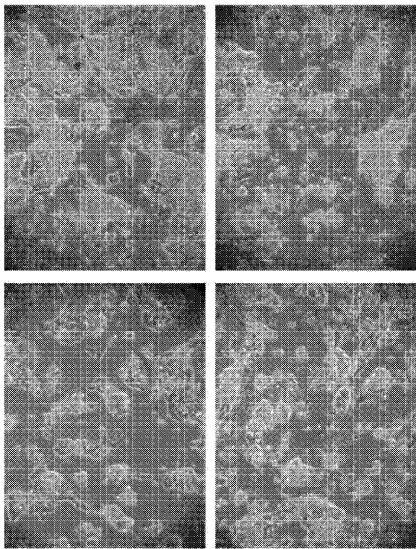


FIG. 24

【 図 2 5 】

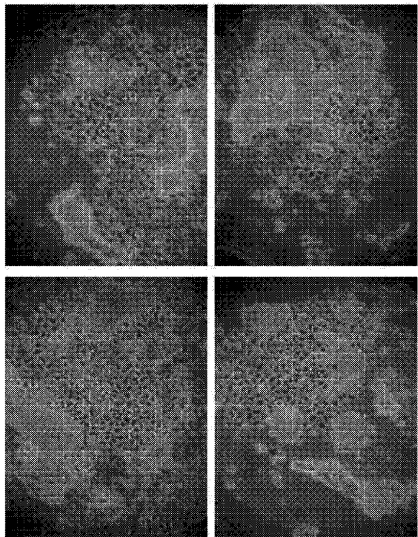


FIG. 25

【 図 2 6 】

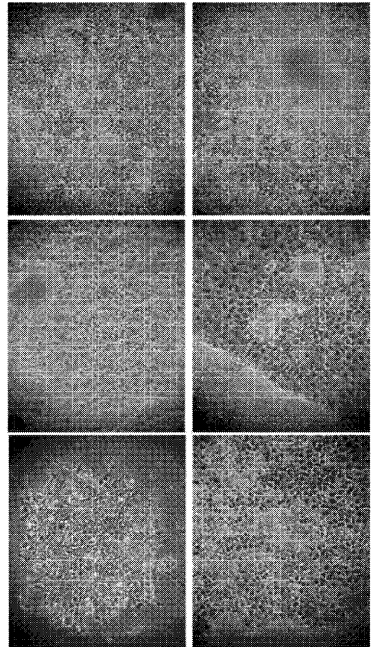


FIG. 26

【 図 2 7 】

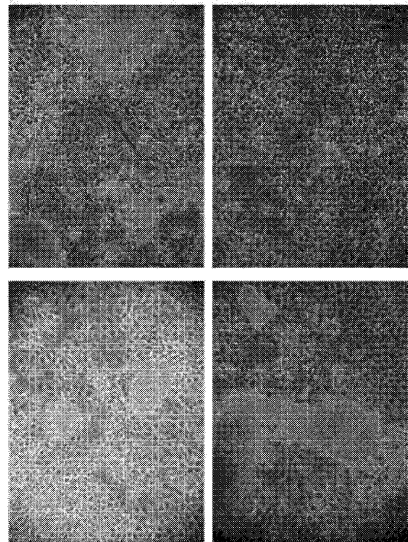


FIG. 27

【 図 2 8 】

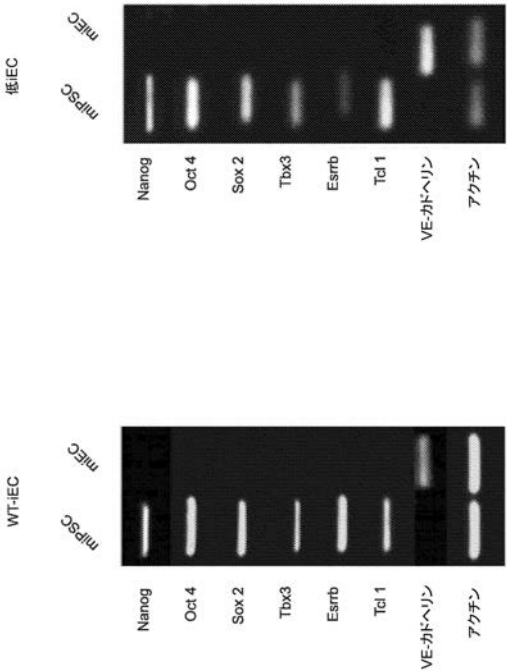
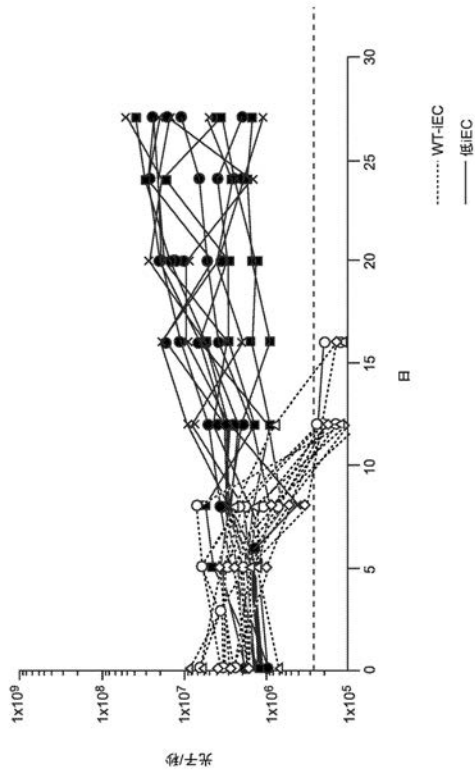


図 28

【図 29】



【図 31】

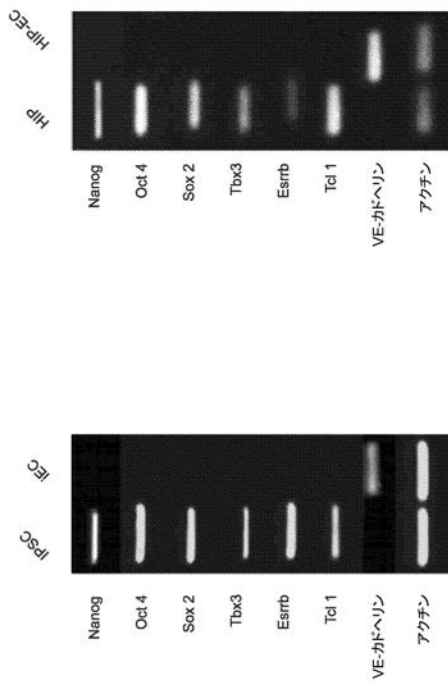


図 29

図 31

【図 30】

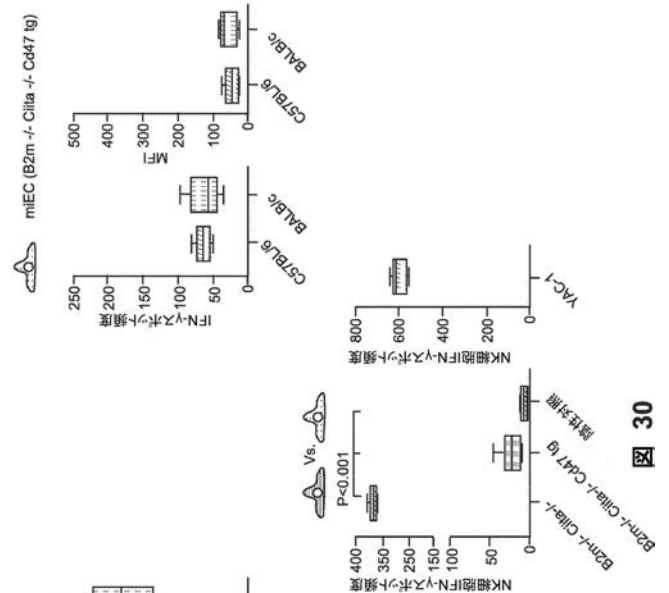


図 30

【図 32】

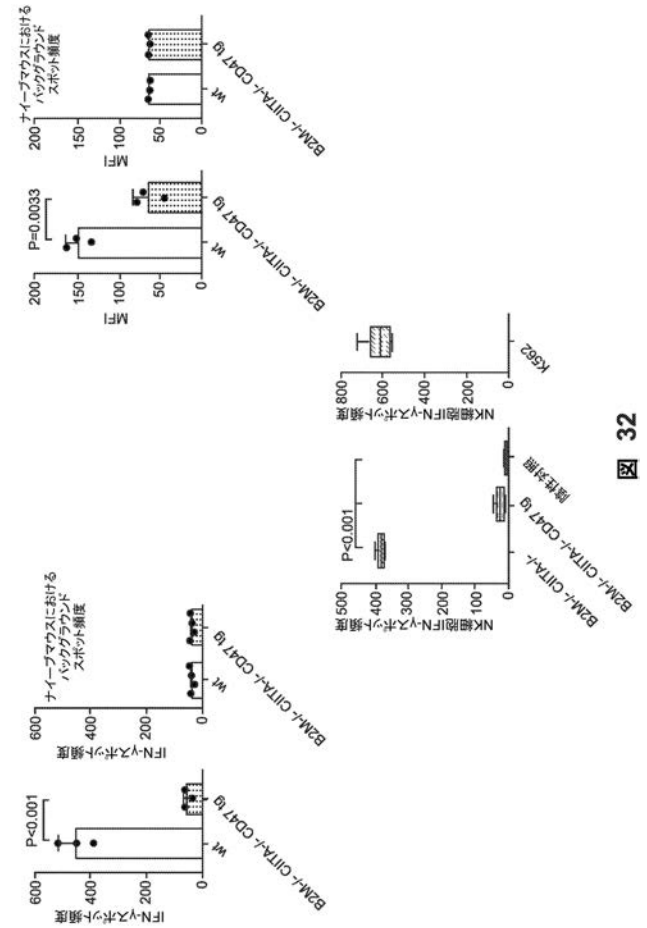


図 32

【配列表】

2021530232000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/42117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 5/0735, 15/09, 15/63, 15/85 (2019.01)

CPC - A61K 39/001; C12N 5/06, 5/0606, 5/0696

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	WO 2016/183041 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 17 November 2016; page 2, lines 14-21; page 3, lines 2-16; page 5, lines 1-5; page 16, lines 8-16; page 27, line 26 - page 28, line 2; page 39, lines 17-22; page 40, lines 1-3; page 80, lines 19-24; claim 47	1-2, 4/1-2
Y	WO 2017/039445 A1 (PLURIONICS B.V.) 09 March 2017; abstract; page 8, lines 16-17; page 10, lines 24-30; page 12, lines 1-3; page 13, lines 26-29; page 14, lines 28-37; page 28, line 33; page 29, lines 8-9	3, 4/3, 22-23, 24/22-23
Y	WANG et al. 'Targeted Disruption of the β 2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells' Stem Cells Translational Medicine 2015; 4:1234-1245; page 1242, column 1, first paragraph. http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2015-0049	22-23, 24/22-23
Y	US 2012/0282174 A1 (WEISSMAN et al.) 08 November 2012; paragraph [0129]	3, 4/3

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

09 December 2019 (09.12.2019)

Date of mailing of the international search report

07 JAN 2020

Name and mailing address of the ISA/US

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

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/42117

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-21, 25-31, 36-52, 56-69, 74-91, 95-101, 106-122, 126-132, 137-154, 158-164
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 4/1-3, 22-23, 24/22-23

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/42117

***-Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking: ***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-4 and 22-24 are directed toward hypimmune cardiac cells and methods of producing the cells.

Group II, Claims 32-35 and 53-55 are directed toward hypimmune endothelial cells, and methods of producing the cells.

Group III, Claims 70-73 and 92-94 are directed toward hypimmune dopaminergic neurons, and methods of producing the neurons.

Group IV, Claims 102-105 and 123-125 are directed toward hypimmune pancreatic islet cells and methods of producing the cells.

Group V, Claims 133-136 and 155-157 are directed toward hypimmune retinal pigmented epithelium cells and methods of producing the cells.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include cardiac cells, not present in any other Groups; the special technical features of Group II include endothelial cells, not present in any other Groups; the special technical features of Group III include dopaminergic neurons, not present in any other Groups; the special technical features of Group IV include pancreatic islet cells, not present in any other Groups; the special technical features of Group V include retinal pigmented epithelium cells, not present in any other Groups.

Groups I-V share the technical features including: isolated hypimmune cells differentiated from a hypimmune induced pluripotent stem cell (HIP cell), wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated and CD47 expression has been increased; and a method of producing a population of hypimmune cells from a population of hypimmune pluripotent cells (HIP cells) by in vitro differentiation, wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated and CD47 expression has been increased in the HIP cells, the method comprising: (a) culturing a population of HIP cells in a culture medium. Groups I and II share the technical features including: (a) culturing a population of HIP cells in a culture medium comprising a GSK inhibitor.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/183041 A2 to President and Fellows of Harvard College (hereinafter 'Harvard') in view of WO 2017/039445 A1 to Plurionics B.V. (hereinafter 'Plurionics').

Harvard discloses isolated hypimmune cells differentiated from a hypimmune induced pluripotent stem cell (HIP cell) (isolated hypimmune cells differentiated from a hypimmune induced pluripotent stem cell (HIP cell); page 5, lines 1-5; page 27, line 26 - page 28, line 2), wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated (wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated; page 3, lines 2-8) and CD47 expression has been increased (CD47 expression has been increased; page 3, lines 9-16, page 16, lines 8-16); and a method of producing a population of hypimmune cells from a population of hypimmune pluripotent cells (HIP cells) by in vitro differentiation (a method of producing a population of hypimmune cells from a population of hypimmune pluripotent cells (HIP cells) by in vitro differentiation page 5, lines 1-5), wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated (wherein endogenous B-2 microglobulin (B2M) gene activity and endogenous class II transactivator (CIITA) gene activity have been eliminated; page 3, lines 2-8) and CD47 expression has been increased in the HIP cells (CD47 expression has been increased in the HIP cells; page 3, lines 9-16, page 16, lines 8-16, the method comprising: (a) culturing a population of HIP cells in a culture medium (the method comprising: (a) incubating (culturing) a population of HIP cells under appropriate conditions (in a culture medium); page 5, lines 1-5); Harvard further discloses wherein the differentiated hypimmune cells include cardiomyocytes (wherein the differentiated hypimmune cells include cardiomyocytes; page 5, lines 1-5).

Harvard does not disclose culturing a population of HIP cells in a culture medium comprising a GSK inhibitor.

Plurionics discloses a method of differentiation of pluripotent stem cells into a population of cardiomyocytes (a method of differentiation of pluripotent stem cells into a population of cardiomyocytes; abstract, page 8, lines 16-17), including incubation in a culture medium comprising a GSK inhibitor (incubation in a culture medium comprising CHIR-99021 (a GSK inhibitor); page 13, lines 26-29; page 28, line 33; page 29, lines 8-9; see instant disclosure, paragraph [0019] for the use of CHIR-99021 as the GSK inhibitor).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Harvard to have used a GSK inhibitor, including CHIR-99021 to induce differentiation of the stem cells into cardiomyocytes, as disclosed by Plurionics, to produce hypimmunogenic cardiomyocytes useful for implantation or transplantation.

Since none of the special technical features of the Groups I-V inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Harvard and Plurionics references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 L 27/58 (2006.01)	A 6 1 L 27/38	3 0 0
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 L 27/58	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/38	1 2 0
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 L 27/38	1 0 0
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 K 35/44	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	A 6 1 K 35/30	
	A 6 1 P 25/16	
	A 6 1 P 25/14	
	C 1 2 N 15/31	

(31)優先権主張番号 62/698,978

(32)優先日 平成30年7月17日(2018.7.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/698,981

(32)優先日 平成30年7月17日(2018.7.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/698,984

(32)優先日 平成30年7月17日(2018.7.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(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. バイレックス

2. プルロニック

(74)代理人 100181847

弁理士 大島 かおり

(72)発明者 ソニヤ シュレプファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1
111 トゥエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォ

ルニア内

(72)発明者 トバイアス デュース

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 7 オークランド フランクリン ストリート 1

1 1 1 トゥエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォ

ルニア内

F ターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AB01 BA01 BA25 CA44

4C081 AB12 AB21 BA12 BA13 DA15

4C087 AA01 AA02 AA03 BB33 BB45 BB47 BB65 MA17 MA66 NA14

ZA02 ZA18 ZA33 ZA36 ZA42 ZA45 ZC35