

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6602288号  
(P6602288)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/0735</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0735
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/071</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N 5/071
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 60 (全 65 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-506610 (P2016-506610)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成26年4月3日(2014.4.3)</p> <p>(65) 公表番号 特表2016-514481 (P2016-514481A)</p> <p>(43) 公表日 平成28年5月23日(2016.5.23)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2014/032804</p> <p>(87) 国際公開番号 W02014/165663</p> <p>(87) 国際公開日 平成26年10月9日(2014.10.9)</p> <p>審査請求日 平成28年11月8日(2016.11.8)</p> <p>(31) 優先権主張番号 61/808,003</p> <p>(32) 優先日 平成25年4月3日(2013.4.3)</p> <p>(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 510003830 フジフィルム セルラー ダイナミクス、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 11, マディソン, サイエンス ドラ イブ 525, スイート 200, ユ ニバーシティー リサーチ パーク</p> <p>(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス</p> <p>(72) 発明者 ラジェシュ, ディーピカ アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 05, マディソン, リージェント ス トリート 5413</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 浮遊液中で内胚葉前駆細胞を培養するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト自己再生性内胚葉前駆細胞を作製する方法であって、

a) 多能性ヒト幹細胞をアクチビンAまたはノーダルを含む無血清培地中で培養するステップ;

b) ステップa)の細胞を、アクチビンA、BMP4、VEGF、およびFGF2を含む無血清培地中で培養して胚体内胚葉細胞を作製するステップ;

c) ステップb)の胚体内胚葉細胞を洗浄し、予め冷却した基底膜調製物を洗浄した細胞に添加するステップ; および

d) ステップc)で得られた細胞を、無血清培地中にBMP4、VEGF、FGF2、およびEGFを含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞の増殖を選択的に促進するステップであって、ステップd)の前記浮遊培養物が基底膜調製物を含む、ステップ

を含む方法。

【請求項2】

単一ホルモン性膵島ベータ細胞を作製する方法であって、

a) 多能性幹細胞をアクチビンAまたはノーダルを含む無血清培地中で培養するステップ;

b) ステップa)の細胞を洗浄し、予め冷却した基底膜調製物を洗浄した細胞に添加するステップ; および

c) ステップ b) で得られた細胞を、無血清培地中に BMP 4、VEGF、FGF 2、および EGF を含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞の増殖を選択的に促進するステップであって、ステップ c) における前記浮遊培養物が基底膜調製物を含む、ステップ; ならびに

d) 前記内胚葉前駆細胞を島ベータ細胞促進性増殖因子と一緒に培養して、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらすステップを含み、

i) 前記内胚葉前駆細胞を、BMP アンタゴニスト、Wnt 3 A、および FGF 10 と一緒に培養して、前腸内胚葉細胞の形成をもたらすステップ;

ii) 前記前腸内胚葉細胞を、B27、BMP アンタゴニスト、ヘッジホッグ阻害剤、レチノイン酸、および FGF 10 と一緒に培養して、膵臓内胚葉細胞の形成をもたらすステップ;

iii) 前記膵臓内胚葉細胞を、B27、BMP アンタゴニスト、ガンマ - セレクターゼ阻害剤、および ALK 5 阻害剤と一緒に培養して、内分泌前駆細胞の形成をもたらすステップ; および

iv) 前記内分泌前駆細胞を、BMP アンタゴニスト、ALK 5 阻害剤、インスリン、グルコース、およびニコチンアミドと一緒に培養して、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらすステップ

をさらに含む、方法。

【請求項 3】

ステップ a) の前記無血清培地がアクチビン A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ a) の前記培地が Wnt 3 A または GSK 3 阻害剤をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ a) の前記培地が Wnt 3 A または GSK 3 阻害剤を含有しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ a) の前記培養を 4 ~ 12 日間行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ a) の前記培養を 4 ~ 8 日間行う、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ a) の前記培養を接着培養として行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ a) からの前記細胞が、胚体内胚葉細胞および内胚葉前駆細胞の集団を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ a) で使用される前記無血清培地が、TGF - 、潜在型 TGF - 結合タンパク質、ノーダル、GSK 3 阻害剤、フォリスタチン関連タンパク質 (FSRP)、Dickkopf 関連タンパク質 1、インドラクタム V、およびインスリン様増殖因子をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ d) の前記浮遊培養物がアクチビン A をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ d) の前記浮遊培養物が TGF をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ d) の前記培養を少なくとも 7 ~ 40 日間行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ d) の前記培養を少なくとも 7 ~ 25 日間行う、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ d) の前記培養を ROCK 阻害剤の存在下で行う、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

前記 R O C K 阻害剤が Y - 2 7 6 3 2 または H 1 1 5 2 である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記 R O C K 阻害剤を 1 2 時間後に除去する、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記基底膜調製物が 0 . 0 6 ~ 0 . 6 m g / m L の最終濃度で存在する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記基底膜調製物が 0 . 3 m g / m L から 0 . 6 m g / m L の間の最終濃度で存在する、請求項 1 8 に記載の方法。 10

## 【請求項 20】

ステップ d ) の前記浮遊培養物を 5 日毎に解離させ、再集合させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 21】

ステップ d ) の前記浮遊培養物をスピナーフラスコ中で維持する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記スピナーフラスコを 4 0 ~ 7 0 r p m で作動させる、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 23】

ステップ d ) の前記浮遊培養物を静置浮遊培養物として維持する、請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 24】

ステップ d ) の前記内胚葉細胞を 1 m L 当たり細胞 2 5 0 , 0 0 0 ~ 2 , 0 0 0 , 0 0 0 個の初期濃度の浮遊液で培養する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 25】

ステップ d ) の前記内胚葉細胞を 1 m L 当たり細胞 2 5 0 , 0 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 個の初期濃度の浮遊液で培養する、請求項 2 4 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記内胚葉前駆細胞が、C X C R 4、C D 3 4、および C D 1 1 7 ( c - K I T ) を発現する、請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 27】

前記内胚葉前駆細胞が、S o x 1 7、F o x A 1、F o x A 2、および C D 3 1 のうちの少なくとも 1 つをさらに発現する、請求項 2 6 に記載の方法。

## 【請求項 28】

ヒト自己再生性内胚葉前駆細胞の形成は、M E F フィーダー層の存在も M E F 馴化培地の存在も必要としない、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記多能性ヒト幹細胞が胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 30】

ステップ b ) およびステップ d ) の何れか又は両方の培養を 2 0 % 酸素の下で行う、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 31】

ステップ b ) およびステップ d ) の何れか又は両方の培養を低酸素条件下で行う、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記多能性幹細胞をステップ a ) の前に低酸素条件下で維持する、請求項 3 1 に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記内胚葉前駆細胞をステップ d ) の前記培養の前に精製する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 34】

前記島ベータ細胞促進性増殖因子が、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の強力な阻害剤、BMP アンタゴニスト、ヘッジホッグ阻害剤、ガンマ - セレクターゼ阻害剤、ALK5 阻害剤、レチノイン酸、FGF10、B27、および Wnt3A または GSK3 阻害剤を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 35】

前記細胞が、Erg1 をコードする誘導性発現カセットを含み、ステップ iv ) が、Erg1 を発現するように前記細胞を誘導することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 36】

前記細胞が、Gfi1 をコードする誘導性発現カセットを含み、ステップ iv ) が、Gfi1 を発現するように前記細胞を誘導することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 37】

ステップ i ) で使用される前記 BMP アンタゴニストがドルソモルフィンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 38】

ステップ ii )、iii )、および iv ) で使用される前記 BMP アンタゴニストがノギンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 39】

20

ステップ iii ) で使用される前記ガンマ - セレクターゼ阻害剤が DAPT である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 40】

ステップ iii ) および iv ) で使用される前記 ALK5 阻害剤が SB431542 である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 41】

ステップ ii ) で使用される前記ヘッジホッグ阻害剤が KAAD - シクロパミンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 42】

ステップ i )、ii )、および iii ) の前記培養をそれぞれ 3 ~ 5 日間行う、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 43】

ステップ iv ) の前記培養を 4 ~ 10 日間行う、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 44】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞を 1 ~ 4 週間培養する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 45】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞を浮遊培養物で培養する、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記培養が接着培養を含む、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 47】

前記培養を低酸素条件下で行う、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 48】

前記培養物が MEF フィーダー細胞および MEF 馴化培地を含まない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 49】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞が、PDX - 1、インスリン、および C - ペプチドを発現するが、グルカゴンは発現しない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 50】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞がソマトスタチンを発現しない、請求項 49 に記載

50

の方法。

【請求項 5 1】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞が低レベルのソマトスタチンを発現する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞が少なくとも 1 2 % 純粋なものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記単一ホルモン性膵島ベータ細胞が少なくとも 2 0 % 純粋なものである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 G S K 3 阻害剤が C H I R 9 9 0 2 1 である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 5 5】

ヒト自己再生性内胚葉前駆細胞集合体を作製する方法であって、  
 a ) 多能性ヒト幹細胞をアクチビン A またはノーダルを含む無血清培地中で培養するステップ；  
 b ) ステップ a ) の細胞を、アクチビン A、B M P 4、V E G F、および F G F 2 を含む無血清培地中で培養して胚体内胚葉細胞を作製するステップ；  
 c ) ステップ b ) の胚体内胚葉細胞を洗浄し、予め冷却した基底膜調製物を洗浄した細胞に添加するステップ；および  
 d ) 前記胚体内胚葉細胞を、無血清培地中に B M P 4、V E G F、F G F 2、および E G F を含む浮遊培養物で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞集合体の形成をもたらすステップであって、ステップ d ) の前記浮遊培養物が基底膜調製物を含む、ステップを含む方法。

【請求項 5 6】

ステップ a ) の前記無血清培地がアクチビン A を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

ステップ d ) の前記浮遊培養物がアクチビン A をさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

ステップ d ) の前記浮遊培養物が T G F をさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 9】

ヒト自己再生性内胚葉前駆細胞を作製する方法であって、  
 a ) 多能性ヒト幹細胞を、アクチビン A を含む無血清培地中で培養するステップ；  
 b ) ステップ a ) の細胞を、アクチビン A、B M P 4、V E G F、および F G F 2 を含む無血清培地中で培養して胚体内胚葉細胞を作製するステップ；  
 c ) ステップ b ) の胚体内胚葉細胞を洗浄し、予め冷却した基底膜調製物を洗浄した細胞に添加するステップ；および  
 d ) ステップ c ) で得られた細胞を、無血清培地中にアクチビン A、B M P 4、V E G F、F G F 2、および E G F を含む浮遊培養物で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞の増殖を選択的に促進するステップであって、ステップ b ) の前記浮遊培養物が基底膜調製物を含む、ステップを含む方法。

【請求項 6 0】

ステップ d ) の前記浮遊培養物が T G F をさらに含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 3 年 4 月 3 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 8 0 8 , 0 0 3 号の優先権の利益を請求し、その全体の内容が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

本発明は、一般に、内分泌学、幹細胞、および分化細胞の分野に関する。より詳細には、本発明は、浮遊培養で未分化細胞から自己再生性内胚葉前駆細胞 (self-renewing endoderm progenitor cell) を作製することに関する。

【背景技術】

【0002】

膵臓を含めた内胚葉由来組織は、細胞補充療法に潜在的に有用である。多能性幹細胞 (PSC) から、*in vitro*において、胚の形態形成を模倣するサイトカインに逐次的に曝露することによって、発生の中に初期の腸管を形成する胚体内胚葉 (definitive endoderm) およびその誘導系列を生成することが可能である。このようにして、胚性幹細胞 (ESC) および人工多能性幹細胞 (iPSC) から膵臓細胞を作製することができる (D'Amourら、2006年; Gouon-Evansら、2006年)。これらの試験により、移植療法に対するPSC由来の内胚葉組織の有望性が強調されるが、いくつかの障害が残っている。PSCから生成した内胚葉細胞は、未成熟表現型を示す傾向があり、多くの場合、十分に機能しない。例えば、現在*in vitro*においてヒトESCから生成されている大多数の膵ベータ細胞は多ホルモン性であり、グルコース応答性ではない (D'Amourら、2006年; Nostroら、2011年)。移植に使用するための内胚葉細胞を作製することにおけるさらなる障害は、必要な数の細胞を作製するために作製の規模を拡大する能力であり、これは、膵臓細胞に関しては、現在は固体表面で作製する必要性によって限定されている。これらの限定が回避される培養および単離方法を提供することが本発明の目的である。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】D'Amour et al., Production of pancreatic hormone expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, Nat. Biotechnol., 24:1392-1401, 2006.

【非特許文献2】Gouon-Evans et al., BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm, Nat. Biotechnol., 24:1402-1411, 2006.

30

【非特許文献3】Nostro et al., Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells, Development, 138:861-871, 2011.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明では、自己再生性内胚葉前駆細胞 (以下、「EPC」、「EP」、または「EP細胞」) を作製するための効率的な方法をもたらすことによって当技術分野における主要な欠如を克服する。第1の実施形態では、自己再生性内胚葉前駆細胞を作製するための方法であって、a) 多能性幹細胞をアクチビンAまたはノーダルを含む無血清培地中で培養して、内胚葉細胞の誘導をもたらすステップ、およびb) 内胚葉細胞を、無血清培地中にBMP4、VEGF、FGF2、およびEGF、またはそのホモログを含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞の増殖を選択的に促進するステップを含む方法が提供される。一実施形態では、自己再生性内胚葉前駆細胞を作製するための方法であって、a) 多能性幹細胞を、アクチビンAを含む無血清培地中で培養して内胚葉細胞の誘導をもたらすステップ、およびb) 内胚葉細胞を、無血清培地中にアクチビンA、BMP4、VEGF、FGF2、およびEGF、またはそのホモログを含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞の増殖を選択的に促進するステップを含む方法が提供される。一部の態様では、ステップb) の浮遊培養物はTGFをさらに含んでよい。ある特定の態様では、内胚葉細胞は、胚体内胚葉細胞および内胚葉前駆細胞の集団を含む。一部の

40

50

態様では、ステップ b) の内胚葉細胞を、浮遊液中、1 ml 当たり細胞約  $10^4$  個、 $10^5$  個、 $10^6$  個、 $10^7$  個、 $10^8$  個の細胞の初期濃度、またはその中に導き出せる任意の範囲で培養する。内胚葉細胞を、浮遊液中、1 ml 当たり細胞約 250,000 ~ 2,000,000 個、より好ましくは 1 ml 当たり細胞 250,000 ~ 500,000 個の初期濃度で培養することが好ましい。

#### 【0005】

一部の態様では、ステップ a) の無血清培地は、Wnt3A または GSK3 阻害剤をさらに含んでよい。他の態様では、ステップ a) の無血清培地は、Wnt3A または GSK3 阻害剤を含有しなくてよい。GSK3 阻害剤の好ましい例は CHIR99021 である。一部の態様では、ステップ a) の培養を少なくともまたは約 1 日、2 日、3 日、4 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、またはその中に導き出せる任意の範囲で行うことができる。前記培養を約 4 ~ 12 日間、より好ましくは約 5 ~ 8 日間行うことが好ましい。一部の態様では、ステップ a) の培養を接着培養として行うことができる。

10

#### 【0006】

一部の態様では、ステップ b) において使用される内胚葉前駆体 (progenitor) 促進性増殖因子は、TGF- $\beta$ 、潜在型 TGF- $\beta$  結合タンパク質、ノードル、GSK3 阻害剤、フォリスタチン関連タンパク質 (FSRP)、Dickkopf 関連タンパク質 1、インドラクタム V、および/またはインスリン様増殖因子をさらに含んでよい。GSK3 阻害剤の好ましい例は CHIR99021 である。一部の態様では、ステップ b) の培養を少なくともまたは約 1 日、2 日、3 日、4 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、またはその中に導き出せる任意の範囲で行うことができる。一部の態様では、ステップ b) の培養を少なくとも 1 カ月、2 カ月、3 カ月、4 カ月、5 カ月、6 カ月、またはその中に導き出せる任意の範囲で行うことができる。前記培養を少なくとも約 5 ~ 約 40 日間、より好ましくは約 10 ~ 約 15 日間行うことが好ましい。一部の態様では、ステップ b) の培養を ROCK 阻害剤の存在下で行うことができる。ROCK 阻害剤は、Y-27632、H1152、または HA-100 であってよい。一部の態様では、ROCK 阻害剤を培養の最初の約 12 時間後に除去することができる。

20

30

#### 【0007】

一部の態様では、ステップ b) の浮遊培養物は、細胞集団の培養を支持するために、基底膜調製物などのマトリックス成分をさらに含んでよい。マトリックス成分の非限定的な例としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ビトロネクチン、ラミニン、PLO ラミニン、フィブリン塊、フィブロネクチンならびにそれらの混合物、例えば、Matrigel (商標) および溶解させた細胞膜調製物が挙げられる。基底膜調製物は、約 0.06 ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.3 ~ 0.6 mg/ml の最終濃度で存在してよい。

#### 【0008】

一部の態様では、ステップ b) の浮遊培養物を約 1 日毎、2 日毎、3 日毎、4 日毎、6 日毎、7 日毎、8 日毎、9 日毎、10 日毎、11 日毎、12 日毎、13 日毎、14 日毎、15 日毎、またはその中に導き出せる任意の範囲で解離させ、再集合させることができる。好ましくは、浮遊培養物を約 4 ~ 5 日毎に解離させ、再集合させることができる。一部の態様では、ステップ b) の浮遊培養物をスピナーフラスコ中で維持することができる。スピナーフラスコを約 40 ~ 70 rpm で作動させることができる。一部の態様では、ステップ b) の浮遊培養物を静置浮遊培養物として維持することができる。

40

#### 【0009】

一部の態様では、内胚葉前駆細胞は、CXCR4、CD117 (c-KIT)、および CD34 を発現し得る。一部の態様では、内胚葉前駆細胞は、Sox17、FOXA1、FOXA2、および CD31 をさらに発現し得る。前記発現は、タンパク質発現解析、例

50

例えば、E L I S AまたはF A C S解析、またはR N A発現解析、例えば、q R T - P C Rによって検出することができる。一部の態様では、自己再生性内胚葉前駆細胞の形成のためにM E Fフィーダー層またはM E F馴化培地が存在する必要がない。一部の態様では、培養を正常酸素条件下で行う。一部の態様では、培養を低酸素条件下で行う。一部の態様では、ステップa)の前に多能性幹細胞を低酸素条件下で維持することができる。

#### 【0010】

一部の態様では、多能性幹細胞は胚性幹細胞であっても人工多能性幹細胞であってもよい。幹細胞は、多分化能幹細胞、小能性(oligopotent)幹細胞、または単能性幹細胞も含み得る。幹細胞は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞、および皮膚幹細胞などの胎児幹細胞または成体幹細胞も含み得る。ある特定の態様では、

10

幹細胞は、臍部、胎盤、羊水、絨毛膜絨毛、胚盤胞、骨髄、脂肪組織、脳、末梢血、臍帯血、月経血、血管、骨格筋、皮膚、および肝臓から単離することができる。

【0011】

ある特定の態様では、方法は、内胚葉前駆細胞を島ベータ細胞促進性増殖因子(islet beta cell promoting growth factor)と一緒に培養して、単一ホルモン性(mono-hormonal)膵島ベータ細胞の形成をもたらすステップをさらに含む。一部の態様では、内胚葉前駆細胞を、培養する前に精製することができる。前記精製は、C D 3 4、C D 1 1 7、およびC X C R 4などのマーカーの発現に基づいてよい。ある特定の態様では、培養を浮遊培養として実施することができる。一部の態様では、培養を接着培養として実施することができる。島ベータ細胞促進性

20

増殖因子は、A M P活性化プロテインキナーゼ(A M P K)の強力な阻害剤、B M Pアンタゴニスト、ヘッジホッグ阻害剤、ガンマ-セレクターゼ阻害剤、A L K 5阻害剤、レチノイン酸、F G F 1 0、B 2 7、およびW n t 3 AまたはG S K 3阻害剤を含んでよい。G S K 3阻害剤の好ましい例はC H I R 9 9 0 2 1である。一部の態様では、前記さらなる培養をR O C K阻害剤の存在下で行うことができる。R O C K阻害剤はY - 2 7 6 3 2、H 1 1 5 2、またはH A - 1 0 0であってよい。

【0012】

ある特定の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらす方法は、i)内胚葉前駆細胞をB M Pアンタゴニスト、W n t 3 A、およびF G F 1 0と一緒に培養して、前腸内胚葉細胞の形成をもたらすステップ；ii)前腸内胚葉細胞を、B 2 7、B M P

30

#### 【0013】

膵臓内胚葉細胞の形成をもたらすステップ；iii)膵臓内胚葉細胞を、B 2 7、B M Pアンタゴニスト、ガンマ-セレクターゼ阻害剤、およびA L K 5阻害剤と一緒に培養して、内分泌前駆細胞(precursor cell)の形成をもたらすステップ；およびiv)前記内分泌前駆細胞(precursor cell)を、B M Pアンタゴニスト、A L K 5阻害剤、インスリン、グルコース、およびニコチンアミドと一緒に培養して、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらすステップをさらに含む。

ステップi)において使用されるB M PアンタゴニストはドルソモルフィンまたはL D N - 1 9 3 1 8 9であってよい。B M Pアンタゴニストはドルソモルフィンであることが好ましい。ステップii)、iii)、およびiv)において使用されるB M Pアンタゴニストは、ノギン、グレムリン、U S A G - 1、フォリスタチン、P R D C、ケルベロス、ココ、スクレロスチン、またはコーディンであってよい。B M Pアンタゴニストはノギンであることが好ましい。ステップiii)において使用されるガンマ-セレクターゼ阻害剤は、D A P T、R O 4 9 2 9 0 9 7、B M S - 7 0 8 1 6 3、セマガセスタット、M K - 0 7 5 2、Y O - 0 1 0 2 7、L Y - 4 1 1 5 7 5、または(R)-フルルビプロフェンであってよい。ガンマ-セレクターゼ阻害剤はD A P Tであることが好ましい。ステップiii)およびiv)において使用されるA L K 5阻害剤は、S B 4 3 1 5 4 2、A L X - 2 7 0 - 4 4 8、A 8 3 - 0 1、E W - 7 1 9 5、K I 2 6 8 9 4、L Y 2 1 0 9 7 6 1、L Y - 3 6 4 9 4 7、S B - 5 2 5 3 3 4、S B - 5 0 5 1 2 4、S D - 2 0 8

40

50

、 I N - 1 2 3 3、または S K I 2 1 6 2 であってよい。 A L K 5 阻害剤は S B 4 3 1 5 4 2 であることが好ましい。ステップ i i ) において使用されるヘッジホッグ阻害剤は、 K A A D - シクロパミン、ビスモデギブ、 L Y 2 9 4 0 6 8 0、 M R T - 1 0、 M R T - 8 3、または G D C - 0 4 4 9 であってよい。ヘッジホッグ阻害剤は K A A D - シクロパミンであることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

一部の態様では、細胞は、 E r g 1 をコードする誘導性発現カセットを含んでよい。ある特定の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらす方法のステップ i v ) は、 E r g 1 を発現するように細胞を誘導することをさらに含んでよい。一部の態様では、細胞は、 G f i 1 をコードする誘導性発現カセットを含んでよい。ある特定の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらす方法のステップ i v ) は、 G f i 1 を発現するように細胞を誘導することをさらに含んでよい。一部の態様では、細胞は、 E r g 1 と G f i 1 の両方をコードする誘導性発現カセットを含んでよい。ある特定の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞の形成をもたらす方法のステップ i v ) は、 E r g 1 と G f i 1 の両方を発現するように細胞を誘導することをさらに含んでよい。種々の態様では、誘導性発現カセットを細胞のゲノムに組み込むことができる。種々の態様では、誘導性発現カセットをトランスポゾン (例えば、 p i g g y B a c ) に含めることができる。種々の態様では、誘導性発現カセットをエピソームベクターに含めることができる。

10

【 0 0 1 5 】

一部の態様では、ステップ i )、 i i )、および i i i ) の培養を少なくともまたは約 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 6 日、 7 日、 8 日、 9 日、 1 0 日、 1 1 日、 1 2 日、 1 3 日、 1 4 日、 1 5 日、 1 6 日、 1 7 日、 1 8 日、 1 9 日、 2 0 日、またはその中に導き出せる任意の範囲で行うことができる。前記培養を約 3 ~ 5 日間行うことが好ましい。一部の態様では、ステップ i v ) の培養を少なくともまたは約 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 6 日、 7 日、 8 日、 9 日、 1 0 日、 1 1 日、 1 2 日、 1 3 日、 1 4 日、 1 5 日、 1 6 日、 1 7 日、 1 8 日、 1 9 日、 2 0 日、またはその中に導き出せる任意の範囲で行うことができる。前記培養を約 3 ~ 4 0 日間行うことが好ましい。

20

【 0 0 1 6 】

一部の態様では、培養物は、基底膜調製物を含んでよい。一部の態様では、培養を低酸素条件下で行うことができる。一部の態様では、培養物は M E F フィーダー細胞および M E F 馴化培地を欠いてよい。

30

【 0 0 1 7 】

一部の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞は、 P D X、インスリン、 C - ペプチド、および N e u r o D 1、低レベルのソマトスタチンおよび N k x 6 . 1 を発現し、グルカゴンを発現しないものであってよい。前記発現は、 E L I S A または F A C S 解析などのタンパク質発現解析、または q R T - P C R などの R N A 発現解析によって検出することができる。一部の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞は、細胞集団の少なくとも 1 %、 5 %、 1 0 %、 1 5 %、 2 0 %、 2 5 %、 3 0 %、 3 5 %、 4 0 %、 4 5 %、 5 0 %、 6 0 %、 7 0 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 9 9 . 9 % (または任意の中間の範囲)、またはその中に導き出せる任意の範囲である。単一ホルモン性膵島ベータ細胞は約 1 2 % 純粋なものまたは約 2 0 % 純粋なものであることが好ましい。単一ホルモン性膵島ベータ細胞のさらなる特性としては、これだけに限定されないが、グルコース応答性 C - ペプチド放出および糖尿病の動物モデルにおいて膵臓生着によって糖尿病を元に戻す能力が挙げられる。

40

【 0 0 1 8 】

一部の態様では、単一ホルモン性膵島ベータ細胞を 1 ~ 4 週間培養することができる。ある特定の態様では、前記培養は、浮遊培養を含んでよい。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態では、本開示は、自己再生性内胚葉前駆細胞集合体を作製する方法であっ

50

て、a) 多能性幹細胞をアクチビンAまたはノーダルを含む無血清培地中で培養して、内胚葉細胞の誘導をもたらすステップ、およびb) 内胚葉細胞を、無血清培地中にBMP4、VEGF、FGF2、およびEGFまたはそのホモログを含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞集合体の形成をもたらすステップを含む方法を提供する。

【0020】

さらに別の実施形態では、本開示は、自己再生性内胚葉前駆細胞集合体を作製する方法であって、a) 多能性幹細胞を、アクチビンAを含む無血清培地中で培養して内胚葉細胞の誘導をもたらすステップ、およびb) 内胚葉細胞を、無血清培地中にアクチビンA、BMP4、VEGF、FGF2、EGF、およびTGF またはそのホモログを含む浮遊培養物中で培養して、自己再生性内胚葉前駆細胞集合体の形成をもたらすステップを含む方法を提供する。

10

【0021】

種々の態様では、実施形態の細胞を、幹細胞から内胚葉前駆細胞への分化を引き起こすために十分な量の分化因子と接触させることができる。分化因子は、分化因子遺伝子の遺伝子産物を含んでよい。遺伝子産物は、ポリペプチドまたは分化因子遺伝子のRNA転写物であってよい。別の態様では、分化因子は、それらの細胞内への進入および/または核内への進入を容易にするための1つまたは複数のタンパク質形質導入ドメインを含んでよい。そのようなタンパク質形質導入ドメイン、例えば、HIV TATタンパク質形質導入ドメイン、HSV VP22タンパク質形質導入ドメイン、Drosophila Antennapediaホメオドメイン、またはそのバリエーションなどが当技術分野で周知である。

20

【0022】

ある特定の態様では、本方法の出発細胞は、少なくともまたは約 $10^4$ 個、 $10^5$ 個、 $10^6$ 個、 $10^7$ 個、 $10^8$ 個、 $10^9$ 個、 $10^{10}$ 個、 $10^{11}$ 個、 $10^{12}$ 個、 $10^{13}$ 個またはその中に導き出せる任意の範囲の細胞を含んでよい。出発細胞集団の播種密度は、1ml当たり細胞少なくともまたは約10個、 $10^1$ 個、 $10^2$ 個、 $10^3$ 個、 $10^4$ 個、 $10^5$ 個、 $10^6$ 個、 $10^7$ 個、 $10^8$ 個、またはその中に導き出せる任意の範囲であってよい。

【0023】

本発明の方法および/または組成物に関して考察されている実施形態は、本明細書に記載の任意の他の方法または組成物に対して使用することができる。したがって、1つの方法または組成物に関する実施形態を本発明の他の方法および組成物にも同様に適用することができる。

30

【0024】

本明細書において使用される場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」とは、1つまたは複数を意味し得る。請求項(複数可)において使用される場合、「含む(comprising)」という単語と同時に使用される場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語は、1つまたはそれ超を意味し得る。

【0025】

特許請求の範囲における「または(or)」は、代替物のみを指すことまたは代替物が相互排他的であることが明示されていない限り、「および/または」の意味を示すために使用されるが、本開示は代替物のみ、および「および/または」を指すという定義を支持する。本明細書で使用される場合、「別の(another)」とは、少なくとも第2またはそれ超を意味し得る。

40

【0026】

本出願全体を通して、「約」という用語は、値を決定するために使用されるデバイス、方法に関する誤差の固有の変動、または試験対象の間に存在する変動を含む値を示すために使用される。

【0027】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の発明の詳細な説明から明らかになるであ

50

ろう。しかし、発明の詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態が示されているが、この発明の詳細な説明から本発明の主旨および範囲内の様々な変化および改変が当業者に明らかになるので、単に例示として示されていることが理解されるべきである。

【0028】

以下の図は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、これらの図の1つまたは複数を本明細書で提示されている特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することによってよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1A～Dは、アクチピンAまたはノーダルを含む培地中で培養したiPSC由来細胞の特徴付けを示すグラフである。プロットは、CXCR-4発現およびCD117発現に関する表面染色および関連するアイソタイプ対照染色を示す。図1Aは、採取した細胞の前方散乱および側方散乱を示す。図1Bは、集団内に存在する生細胞を示す。図1Cは、アイソタイプ対照抗体の染色プロファイルを示す。図1Dは、CXCR-4発現およびCD117発現に関する細胞表面染色を示す。

【0030】

【図2-1】図2A～Gは、E8培地中で維持したiPSCに由来する内胚葉前駆体（progenitor）集団を含む細胞の特徴付けを示す図である。プロットは、Sox17発現、FoxA1発現、およびFoxA2発現に関する細胞内染色ならびに関連するアイソタイプ対照染色を示す。図2Aは、採取した細胞の前方散乱および側方散乱を示す。図2Bは、集団内に存在する生細胞を示す。図2Cおよび2Eは、アイソタイプ対照抗体の染色プロファイルを示す。図2Dは、FoxA1発現およびSox17発現の細胞内染色を示す。図2Fは、FoxA2発現の細胞内染色を示す。図2Gは、iPSCに由来する内胚葉前駆細胞の免疫染色を示す。

【図2-2】図2A～Gは、E8培地中で維持したiPSCに由来する内胚葉前駆体（progenitor）集団を含む細胞の特徴付けを示す図である。プロットは、Sox17発現、FoxA1発現、およびFoxA2発現に関する細胞内染色ならびに関連するアイソタイプ対照染色を示す。図2Aは、採取した細胞の前方散乱および側方散乱を示す。図2Bは、集団内に存在する生細胞を示す。図2Cおよび2Eは、アイソタイプ対照抗体の染色プロファイルを示す。図2Dは、FoxA1発現およびSox17発現の細胞内染色を示す。図2Fは、FoxA2発現の細胞内染色を示す。図2Gは、iPSCに由来する内胚葉前駆細胞の免疫染色を示す。

【0031】

【図3】図3は、15日にわたる浮遊液中iPSC由来のEP培養物の細胞生存能力および生存を示すグラフである。EPは4つの異なるiPSC株に由来するものであった。グラフは、フローサイトメトリーによって数量化した、存在する生存細胞の数を示す。実験は正常酸素条件下で実施した。

【0032】

【図4】図4は、15日にわたる浮遊液中iPSC由来のEP培養物の細胞生存能力および生存を示すグラフである。EPは4つの異なるiPSC株に由来するものであった。実験は正常酸素条件下で実施した。プロットは、フローサイトメトリーによって数量化した、CXCR-4/CD117(c-kit)/FoxA1/Sox17発現のレベルを示す。

【0033】

【図5】図5は、臓器分化プロトコールに供した15日EPC培養物の細胞生存能力および生存を示すグラフである。実験は正常酸素条件下で実施した。EPC集合体における新生集団を特徴付けるために、集合体を個別化し、分化のプロセスの種々の日数で生存細胞数を決定した。

【0034】

10

20

30

40

50

【図6】図6は、膵臓分化培地に入れた15日EPC培養物からのPDX-1陽性細胞の出現を示すグラフである。実験は正常酸素条件下で実施した。EPC集合体を特徴付けるために、個別化した細胞を、細胞内染色を実施し、陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーによって評価することによってPDX-1の存在について染色した。

【0035】

【図7】図7は、膵臓分化プロセスの種々の日数におけるPDX-1陽性細胞の代表的な染色プロファイルを示すグラフである。実験は正常酸素条件下で実施した。

【0036】

【図8】図8は、膵臓分化培地に入れた3D EPC集合体の位相差画像である。写真は10×および20×の拡大率で取得した。

10

【0037】

【図9】図9は、膵臓分化プロセスの15日目の、15日経過EPC集合体におけるPDX-1発現についての免疫組織化学的染色を示す画像である。実験は正常酸素条件下で実施した。膵臓分化培地中に15日間置いた浮遊培養物中のインタクトな15日目のEPC集合体の、histogelに包埋し、免疫組織化学的染色によってPDX-1の存在について染色した代表的な画像である。写真は10×および20×の拡大率で取得した。

【0038】

【図10】図10A~Iは、膵臓分化プロセスの18日目の、インタクトな15日経過EPC集合体におけるソマトスタチン(somatostatin)発現、グルカゴン発現、およびインスリン発現の免疫組織化学的染色を示す画像である。実験は正常酸素条件下で実施した。膵臓分化培地中に18日間置いた浮遊培養物中のインタクトな15日目のEPC集合体の、histogelに包埋し、免疫組織化学的染色によってソマトスタチン(図10A~C)、グルカゴン(図10D~F)、およびインスリン(図10G~I)の存在について染色した代表的な画像である。写真は20×の拡大率で取得した。

20

【0039】

【図11】図11は、膵臓分化プロセスの18日目の、集合体を解離させた後の、15日経過EPC集合体におけるC-ペプチド発現、グルカゴン発現、およびインスリン発現の細胞内染色を示す散布図である。実験は正常酸素条件下で実施した。散布図は、インスリン発現、グルカゴン発現、ソマトスタチン発現、およびC-ペプチド発現の細胞内染色を示す。左側のプロットは、細胞の前方散乱および側方散乱、その次に採取後の生細胞についての染色を示す。第3のプロットのセットは、iPSC-1131細胞におけるC-ペプチド対グルカゴン染色、C-ペプチド対ソマトスタチン染色、およびインスリン対グルカゴン染色の二重染色プロファイルを示す。第4のプロットおよび第5のプロットは、インスリン、グルカゴン、C-ペプチド、およびソマトスタチンの発現レベルの総百分率を示す。

30

【0040】

【図12】図12は、膵臓分化の20日目の、15日経過EPC集合体の予備qPCR分析を示すグラフである。実験は正常酸素条件下で実施した。

【0041】

【図13】図13は、膵臓分化に25日間供した15日経過EPC集合体のグルコース刺激によるC-ペプチド放出を示すグラフである。放出されたC-ペプチドを細胞100,000個に対して正規化した。陽性対照死体ヒト島：低グルコースで放出されたC-ペプチド146pmolおよび高グルコースで放出されたC-ペプチド257pmol。

40

【0042】

【図14】図14は、膵臓分化プロセスの略図である。

【0043】

【図15】図15は、膵臓分化プロセスの異なる段階の一般的な概要である。列は、上から下に、段階、プロセスの間のその段階が起こる日数、その段階の間の分化プロセスに使用される因子、作製される細胞型、および作製される細胞型のマーカーを示す。

【0044】

50

【図16】図16A~Dは、未分化iPSCからの胚体内胚葉(DE)の生成に対する播種密度の影響を示すグラフである。DE生成をCHIRの不在下および2.5ng/mlのBMP4の存在下で実施した。図16A、各時点における総生存細胞収量。図16B、各時点におけるDE細胞の絶対数/総細胞数の比として決定したDE生成の効率。図16C、細胞内フローサイトメトリーによって数量化した、各時点におけるFoxA1-Sox17発現細胞の百分率。図16D、表面染色によって数量化した、各時点におけるCXCR4-CD117発現細胞の百分率。

【0045】

【図17】図17は、低酸素条件によりDE生成が改善されることを示すグラフである。CXCR4-CD117同時発現細胞の百分率を細胞表面染色によって、フローサイトメトリーによって決定した。FoxA1-FoxA2-Sox17の百分率を、細胞内フローサイトメトリーを使用して数量化した。

10

【0046】

【図18-1】図18A~Eは、MatrigelによりEPCが保存されるが、MEFは必須ではないことを示すグラフである。図18A、Matrigelを用いてまたは用いずに培養したEPC培養物由来の細胞上のDEマーカー(すなわち、CXCR4、CD117、FoxA2、およびFoxA1)の百分率をフローサイトメトリーによって数量化した。効率を生存DE発現細胞の絶対数/総生存細胞数の比として決定した。図18B、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8777についての生存細胞数。図18C、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8777についてのEPCの純度。図18D、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8776についての生存細胞数。図18E、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8776についてのEPCの純度。

20

【図18-2】図18A~Eは、MatrigelによりEPCが保存されるが、MEFは必須ではないことを示すグラフである。図18A、Matrigelを用いてまたは用いずに培養したEPC培養物由来の細胞上のDEマーカー(すなわち、CXCR4、CD117、FoxA2、およびFoxA1)の百分率をフローサイトメトリーによって数量化した。効率を生存DE発現細胞の絶対数/総生存細胞数の比として決定した。図18B、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8777についての生存細胞数。図18C、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8777についてのEPCの純度。図18D、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8776についての生存細胞数。図18E、MEFを用いてまたは用いずに培養した2.038クローン8776についてのEPCの純度。

30

【0047】

【図19A】図19A~Bは、定義済みのフィーダーフリー低酸素条件下での種々のiPSCクローンのEPCサイクリングを示すグラフである。図19A、フィーダーフリーサイクリングの間のEPCの増殖。図19B、サイクリングの間の平均EPC純度。各時点で、EPC培養物の純度をフローサイトメトリーによって決定した。CXCR4/CD117/FoxA1/FoxA2/Sox17の平均発現を数量化した。同じiPSCクローンの種々の実験の実行からのEPCの純度を平均し、標準誤差を算出した。

40

【図19B】図19A~Bは、定義済みのフィーダーフリー低酸素条件下での種々のiPSCクローンのEPCサイクリングを示すグラフである。図19A、フィーダーフリーサイクリングの間のEPCの増殖。図19B、サイクリングの間の平均EPC純度。各時点で、EPC培養物の純度をフローサイトメトリーによって決定した。CXCR4/CD117/FoxA1/FoxA2/Sox17の平均発現を数量化した。同じiPSCクローンの種々の実験の実行からのEPCの純度を平均し、標準誤差を算出した。

【0048】

【図20】図20A~Eは、定義済みのフィーダーフリー低酸素条件下でのEPC培養物のqPCR分析を示すグラフである。図20A、CXCR4遺伝子発現。図20B、CD117遺伝子発現。図20C、Sox17遺伝子発現。図20D、FoxA2遺伝子発現

50

。図20E、FoxA1遺伝子発現。

【0049】

【図21】図21は、CD34の発現を示すグラフである。CD34はEPCの後期マーカーである。CD34の発現を、細胞表面染色を使用してフローサイトメトリーによって数量化した。

【0050】

【図22】図22は、最終段階のEPC培養物の精製を示す図である。個別化した細胞を、CD34、CD117、およびCXCR4に対する、フィコエリトリン(PE)とコンジュゲートした抗体と一緒にインキュベートした後、MACSによって分離し、それにより、陽性画分が約88%の純度で得られる。

10

【0051】

【図23】図23は、MEFを用いずに3D集合体として繁殖させたEPCからベータ細胞を生成するためのスキームである。

【0052】

【図24】図24A~Bは、ベータ細胞を3D集合体として生成することについてのグラフである。2.038AT4細胞に由来する、28日目の最終段階のベータ細胞のフローサイトメトリー分析。細胞を採取し、4%パラホルムアルデヒドを使用して固定し、0.1%サポニンを使用して透過処理し、PDX、NeuroD1、Nkx6.1、ソマトスタチン、グルカゴン、およびC-ペプチドの存在についてフローサイトメトリーによって染色した。陽性細胞の百分率が図24Aに示されている。ソマトスタチン/C-ペプチドおよびグルカゴン/C-ペプチドの染色後に生成したドットプロットが図24Bに示されている。

20

【0053】

【図25】図25は、2Dで繁殖させたEPCからベータ細胞を生成するためのスキームである。

【0054】

【図26A】図26A~Bは、2.038細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。図26A、分化の15日目に採取したベータ細胞を、PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンの発現について細胞内フローサイトメトリーによって数量化した。図26B、非正規化C-ペプチド放出アッセイおよび正規化C-ペプチド放出アッセイ。データを総生存細胞数に対して正規化した。

30

【図26B】図26A~Bは、2.038細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。図26A、分化の15日目に採取したベータ細胞を、PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンの発現について細胞内フローサイトメトリーによって数量化した。図26B、非正規化C-ペプチド放出アッセイおよび正規化C-ペプチド放出アッセイ。データを総生存細胞数に対して正規化した。

【0055】

【図27】図27A~Lは、2.038AT4細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。Dox(1.5μg/ml)誘導をベータ細胞分化の6日目から15日目の間、ベータ細胞分化の8日目から15日目の間、またはベータ細胞分化の10日目から15日目の間に実施した。PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンを細胞内フローサイトメトリーによって数量化するために、ベータ細胞分化の15日目に細胞を採取し、固定し、染色した。15日目における新生ベータ細胞の分析により、PDX(図27A~D)、NeuroD1(図27E~H)、およびソマトスタチン/グルカゴン(Glucagon)/C-ペプチドの存在が明らかになった(図27I~L)。

40

【0056】

50

【図28】図28は、2.038 AT4細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。正規化C-ペプチド放出アッセイおよび非正規化C-ペプチド放出アッセイの結果が示されている。正規化は、各試料について取得した総生存細胞数に基づくものであった。

【0057】

【図29】図29A~Dは、2.038 AT4細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンを細胞内フローサイトメトリーによって数量化するために、ベータ細胞分化の15日目に細胞を採取した。最終段階のベータ細胞の培養物を長期分析するために、ベータ細胞を最終段階の培地に入れた。最大4週間の培養で培養物に単一ホルモン性細胞が存在することが明らかになった。

10

【0058】

【図30】図30A~Dは、2.038 AT4細胞から生成した最終段階のベータ細胞のグルコース応答性を示すグラフである。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。図30A、Dox誘導を伴わない非正規化C-ペプチド放出アッセイ。図30B、Dox誘導を伴わない正規化C-ペプチド放出アッセイ。図30C、Dox誘導を伴う非正規化C-ペプチド放出アッセイ。図30D、Dox誘導を伴う正規化C-ペプチド放出アッセイ。正規化は、各試料について取得した総生存細胞数に基づくものであった。

20

【0059】

【図31】図31A~Gは、2.038 AT4細胞から生成した最終段階のベータ細胞のqPCR分析を示すグラフである。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。図31A、インスリン遺伝子発現。図31B、グルカゴン遺伝子発現。図31C、ソマトスタチン遺伝子発現。図31D、PDX1遺伝子発現。図31E、NeuroD1遺伝子発現。図31F、Nkx6.1遺伝子発現。図31G、ニューロゲニン3遺伝子発現。

【0060】

【図32】図32A~Bは、2.038親細胞および2.038AT4細胞由来のiPSC/C/DE/EPC/ベータ細胞のERG発現およびGFI発現についてのqPCR分析。図32A、ERG遺伝子発現。図32B、GFI1遺伝子発現。

30

【発明を実施するための形態】

【0061】

ヒト胚性幹細胞(ESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)は、体内のあらゆる細胞型に分化する潜在性と共に、*in vitro*において増大することが可能であるので、基礎生物学および多種多様な疾患に対する細胞に基づく療法のどちらに対しても極めて大きな潜在性をもたらすものである。ES/iPS細胞の分化は、胚形成の間に起こる発生のプロセスを模倣すると思われる。これらの幹細胞集団は、成熟細胞型が生成されるまで、潜在性が連続的に制限されながら発生の中間体に降りていく。最初に、一次胚葉、中胚葉、内胚葉および外胚葉が形成され、次いで、それらがさらに成熟して派生細胞型になる。幹細胞補充療法のために特に魅力的な内胚葉由来の組織型の1つは、I型糖尿病を治療するための膵島のベータ細胞である。現在、移植の場を使用するための島が決定的に不足している。移植用の成熟した機能性組織型を生成する能力は、現在、多能性幹細胞を、発生の全ての段階を経て分化させる必要性があることによって限定されている。

40

【0062】

本明細書では、フィーダーフリー条件下で維持した人工多能性幹細胞に由来する内胚葉前駆細胞(EPC)を作製するための方法が提供される。この方法によって引き出されたEP細胞は、単一ホルモン性ベータ細胞を生成することができるものである。プロセスの略図が図14に示されている。プロセスの段階が図15に示されている。

50

## 【0063】

胚体内胚葉（DE）は、一過性の状態であり、直ちに分化し、増殖することができず、独特の形態を有さず、また、内胚葉の運命に十分に委ねられない場合がある。他方では、内胚葉前駆体（EP）細胞（またはEPC）は一過性のものではなく、独特の形態を有し、無制限に培養することができる（Chengら、2013年）。内胚葉前駆細胞は、CXCR4、CD117、FOXA1、FOXA2、CD31、CD34、およびSOX17を発現するとともに特徴付けられる。内胚葉前駆細胞は、*in vitro*または*in vivo*のいずれにおいても、肝臓、膵臓、および腸などの内胚葉系列の細胞を生成することができるが、中胚葉または外胚葉を生成することはできない。同様に、免疫欠損マウスにおいてEP細胞からは奇形腫が形成されない。したがって、DE細胞およびEP細胞は、別個の発生の中間体を示し得、また、異なる発生潜在性を有し得る。

10

## 【0064】

iPSC由来のEP細胞は、CXCR-4、CD117、SOX17、FOXA1、FOXA2、CD34、CD31、およびHNF4Aを発現し、また、浮遊培養で5～40日間維持することができる。EPは、Matrigel、BMP4、VEGF、FGF、EGF2、アクチビン、および任意選択でTGFの存在下、攪拌条件または静置条件で3D集合体として増大し、マーカーの表現型発現を維持する。EP培養物は、膵臓系列の細胞を生成するための培養条件に置くと、D-グルコースを用いた刺激に対して機能的に反応する単一ホルモン性（mono-hormonal）ベータ細胞を生成する。

## 【0065】

20

要約すると、無血清培地中で維持したヒトiPSCからEP細胞を効率的に生成するための培養手順が提供される。EP細胞はそれらの表現型特性を保持し、少なくとも30日にわたって3D培養物として増大する。膵臓分化培地に入れたEP細胞は単一ホルモン性（mono-hormonal）ベータ細胞を生成する。これらの細胞は、ハイスループットなスクリーニング適用のための理想的な細胞型としての機能を果たし、また、治療への適用における使用の潜在性を保持する。

## 【0066】

## 定義

「分化」とは、培養物中または*in vivo*で、特殊化の程度がより低い細胞が特殊化の程度がより高い細胞になって、分化を伴わない同じ条件下で有するものと比べて少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成するプロセスである。「脱分化」とは、部分的に分化したまたは最終分化した細胞が、多能性または多分化能などの以前の発生段階に戻る細胞のプロセスである。「分化転換」とは、1つの分化細胞型が別の分化細胞型に変換されるプロセスである。ある特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が増す順番に、少なくとも約1%、5%、25%またはそれ超であり得る。

30

## 【0067】

「多分化能」とは、細胞が、その後代まで、成体動物において見いだされるいくつかの異なる細胞型を生じさせることができることを意味する。

## 【0068】

「多能性」とは、細胞が、その後代まで、生殖細胞を含めた、成体動物を構成する全ての細胞型を生じさせることができることを意味する。胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、および胚性生殖細胞は、この定義の下で多能性細胞である。

40

## 【0069】

「自己細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、レシピエントと遺伝的に適合するドナー細胞を指す。

## 【0070】

「全能性」という用語は、本明細書で使用される場合、生きて生まれた動物を生じる細胞を指し得る。「全能性の」という用語は、特定の動物の細胞の全てを生じる細胞も指し得る。全能性細胞は、1つまたは複数の核移植ステップで胚を発生させるための手順において利用した場合、動物の細胞の全てを生じさせることができる。

50

## 【 0 0 7 1 】

全能性細胞は、臓器摘出のために有用なもの、例えば、ホメオティック遺伝子を操作することによって臓器または付属器の成長が排除されるように遺伝子改変されたものなどの不完全な動物を生成するためにも使用することができる。さらに、ES細胞に由来するものなどの卵母細胞を子宮内で発達できなくする遺伝子改変により、ヒト由来のES細胞を生殖用のヒト卵母細胞を引き出すためには使用できず、治療的クローニングなどの適用のためにのみ使用できることが確実になる。

## 【 0 0 7 2 】

「胚性幹細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、*in vitro*細胞培養物中で維持されている胚から単離した多能性細胞を指し得る。そのような細胞は、*in vivo*において生殖細胞を含めた成体動物を構成する全ての細胞型を生じさせる能力を培養物中で保持する培養胚から単離された、急速に分裂している培養細胞である。胚性幹細胞は、フィーダー細胞を用いてまたは用いずに培養することができる。胚性幹細胞は、胚盤胞段階の胚および前駆胚盤胞段階の胚を含めた、任意の発生段階にある胚から単離された胚細胞から樹立することができる。胚性幹細胞は、円形細胞の形態を有し得、フィーダー層上で円形細胞集合塊に成長し得る。胚性幹細胞は当業者には周知である。例えば、WO 97 / 3 7 0 0 9 ; Yang & Anderson ( 1 9 9 2 年 ) ; Piedrahitaら ( 1 9 9 8 年 ) ; Wiannyら ( 1 9 9 7 年 ) ; Moore & Piedrahita ( 1 9 9 7 年 ) ; Moore & Piedrahita ( 1 9 9 6 年 ) ; Wheeler ( 1 9 9 4 年 ) ; Hochereau-de Reviers & Perreau ( 1 9 9 3 年 ) ; Strojekら ( 1 9 9 0 年 ) ; Piedrahitaら ( 1 9 9 0 年 ) ; および Evansら ( 1 9 9 0 年 ) を参照されたい。

## 【 0 0 7 3 】

「再プログラミング (*reprogramming*)」または「再プログラミングされた (*reprogrammed*)」という用語は、本明細書で使用される場合、特殊化の程度がより高い細胞を多能性細胞に変換することができる材料および方法を指し得る。

## 【 0 0 7 4 】

「単離された」という用語は、本明細書で使用される場合、別の細胞の群から機械的に分離された細胞を指し得る。細胞の群の例は、発達中の細胞塊、細胞培養物、細胞株、および動物である。

## 【 0 0 7 5 】

「分化細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、特殊化されていない表現型から特殊化された表現型に発達した前駆細胞 (*precursor cell*) を指し得る。例えば、胚細胞は、腸の内側の上皮細胞に分化し得る。分化細胞は、例えば、胎児または生きて生まれた動物から単離することができる。

## 【 0 0 7 6 】

「未分化細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、特殊化されていない表現型を有し、分化することができる前駆細胞 (*precursor cell*) を指し得る。未分化細胞の例は幹細胞である。

II. 内胚葉前駆細胞形成に關与する細胞

## 【 0 0 7 7 】

本発明のある特定の実施形態では、多能性細胞から内胚葉前駆細胞をもたらすための方法および組成物が開示されている。一部の実施形態では、細胞は、これだけに限定されないが、胚性幹細胞、胎児幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞を含めた幹細胞であってよい。

## 【 0 0 7 8 】

## A. 幹細胞

幹細胞は、全てではないにしても大抵の多細胞生物体において見いだされる細胞である。幹細胞は、有糸細胞分裂によって自己再生する能力および多様な範囲の特殊化した細胞型に分化する能力を特徴とする。哺乳動物の幹細胞の2つの広範な型は、胚盤胞において見いだされる胚性幹細胞および成体組織において見いだされる成体幹細胞である。発生中

10

20

30

40

50

の胚では、幹細胞は、特殊化された胚組織の全てに分化し得る。成体生物体では、幹細胞および前駆細胞は、特殊化した細胞を補充する体の修復系としての機能を果たし、また、血液、皮膚、または腸組織などの再生臓器の正常なターンオーバーを維持する。

【 0 0 7 9 】

ヒト胚性幹細胞 ( E S C ) および人工多能性幹細胞 ( i P S C ) は、 *in vitro* における長期間増殖が可能であるが、内胚葉前駆細胞および膵島ベータ細胞を含めた、体の全ての細胞型に分化する潜在性を保持する。内胚葉前駆細胞により、薬物の開発および治療的使用の両方のための、患者に特異的な機能性膵島ベータ細胞の無制限の供給が潜在的にもたらされる。 *in vitro* におけるヒト E S C / i P S C から内胚葉前駆細胞を経た膵島ベータ細胞への分化により、正常な *in vivo* 発生が再現される、すなわち、ヒト E S C / i P S C は、内胚葉分化および内分泌特定化を含めた正常な逐次的な発生段階を経る。その逐次的な発生プロセスには、分化の異なる段階において異なる増殖因子を添加する必要がある。本発明のある特定の態様は、ヒト E S C / i P S C を分化させることにより、十分に機能的な膵島ベータ細胞を提供する。この手法により、ヒト一次成体ベータ細胞と同一ではないとしても高度に類似した機能を有する膵島ベータ細胞が生成される。さらに、無制限の増殖能を有する本発明の内胚葉前駆細胞には、ベータ細胞分化のための出発細胞集団としての独特の利点がある。

10

【 0 0 8 0 】

1 . 胚性幹細胞

胚性幹細胞 ( E S 細胞 ) は、胚盤胞またはそれよりも前の桑実胚段階の胚の内部細胞塊の胚盤葉上層組織に由来する多能性幹細胞である。 E S 細胞は、2つの示差的な性質：多能性および無制限に自己再生する能力によって区別される。 E S 細胞は多能性である、すなわち、3つの一次胚葉：外胚葉、内胚葉、および中胚葉の全ての派生体に分化することができる。さらに、定義済みの条件下で、胚性幹細胞は、それら自体で無制限に繁殖することができる。これにより、継続的な研究または臨床使用のためにそれら自体を無限数産生することができるので、胚性幹細胞を研究および再生医療の両方のための有用なツールとして使用することが可能になる。 E S 細胞は、特定の細胞型のための十分かつ必要な刺激を与えられると、成体の 2 0 0 超の細胞型のそれぞれに発達し得る。しかし、 E S 細胞は、胚体外膜または胎盤には寄与しない。

20

【 0 0 8 1 】

現在まで、ほぼ全ての研究はマウス胚性幹細胞 ( m E S ) またはヒト胚性幹細胞 ( h E S ) を使用して行われてきた。どちらも必須の幹細胞特性を有するが、未分化の状態を維持するために全く異なる環境を必要とする。マウス E S 細胞は、ゼラチンの層上で増殖させることができ、白血病抑制因子 ( L I F ) の存在が必要である。ヒト E S 細胞は、マウス胚線維芽細胞 ( M E F ) のフィーダー層上で増殖させることができ、多くの場合、塩基性線維芽細胞増殖因子 ( b F G F または F G F - 2 ) の存在が必要である。最適な培養条件または遺伝子操作 ( Chambers ら、 2 0 0 3 年 ) がないと、胚性幹細胞は急速に分化する。

30

【 0 0 8 2 】

ヒト胚性幹細胞は、いくつかの転写因子および細胞表面タンパク質が存在することによって定義することもできる。転写因子 O c t - 4、ナノグ、および S o x - 2 は、分化および多能性の維持を導く遺伝子の抑制を確実にするコア調節ネットワークを形成する ( B o y e r ら、 2 0 0 5 年 ) 。 h E S 細胞を同定するために最も一般的に使用される細胞表面抗原としては、糖脂質 S S E A 3 および S S E A 4、ならびにケラタン硫酸抗原 T r a - 1 - 6 0 および T r a - 1 - 8 1 が挙げられる。

40

【 0 0 8 3 】

マウス E S 細胞を得るための方法は周知である。1つの方法では、マウスの 1 2 9 系統由来の着床前胚盤胞をマウス抗血清で処理して栄養外胚葉を除去し、内部細胞塊を、ウシ胎仔血清を含有する培地中、化学的に不活性化したマウス胚線維芽細胞のフィーダー細胞層上で培養する。発達させる未分化 E S 細胞のコロニーをマウス胚線維芽細胞フィーダー

50

層上、ウシ胎仔血清の存在下で継代培養してES細胞の集団を作製する。一部の方法では、血清を含有する培養培地にサイトカイン白血抑制因子(LIF)を添加することにより、マウスES細胞をフィーダー層の不在下で増殖させることができる(Smith、2000年)。他の方法では、骨形成タンパク質およびLIFの存在下で、マウスES細胞を無血清培地中で増殖させることができる(Yingら、2003年)。

#### 【0084】

ヒトES細胞は、以前に記載された方法を使用して胚盤胞から得ることができる(Thomsonら、1995年; Thomsonら、1998年; ThomsonおよびMarshall、1998年; Reubinoffら、2000年)。1つの方法では、5日目のヒト胚盤胞をウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に曝露し、次いで、モルモット補体の1:5希釈物に曝露して、栄養外胚葉細胞を溶解させる。溶解した栄養外胚葉細胞をインタクトな内部細胞塊から除去した後、内部細胞塊を、ガンマ不活性化したマウス胚線維芽細胞のフィーダー層上、ウシ胎児血清の存在下で培養する。9~15日後、内部細胞塊に由来する細胞の集合塊を化学的に(すなわち、トリプシンに曝露する)または機械的に解離させ、ウシ胎児血清およびマウス胚線維芽細胞のフィーダー層を含有する新鮮な培地に再プレティングする。さらに増殖させたら、未分化の形態を有するコロニーをマイクロピペットによって選択し、機械的に解離させて集合塊にし、再プレティングする(米国特許第6,833,269号を参照されたい)。ES様形態は、見たところでは細胞質に対する核の比率が高い緻密なコロニーおよび顕著な核小体と特徴付けられる。生じたES細胞は、簡単なトリプシン処理によって、または個々のコロニーをマイクロピペットにより選択することによって常套的に継代することができる。一部の方法では、線維芽細胞のフィーダー層上、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下でES細胞を培養することによって、血清を用いずにヒトES細胞を増殖させることができる(Amitら、2000年)。他の方法では、Matrigel(商標)またはラミニンなどのタンパク質マトリックス上、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有する「馴化」培地の存在下で細胞を培養することによって、フィーダー細胞層を用いずにヒトES細胞を増殖させることができる(Xuら、2001年)。培地を線維芽細胞と共培養することによって予め馴化する。

#### 【0085】

アカゲザルおよびコモンマーモセットのES細胞を単離するための方法も公知である(ThomsonおよびMarshall、1998年; Thomsonら、1995年; ThomsonおよびOdorico、2000年)。

#### 【0086】

ES細胞の別の供給源は、樹立ES細胞株である。種々のマウス細胞株およびヒトES細胞株が公知であり、それらの増殖および繁殖の条件が定義されている。例えば、マウス129系統の胚の内部細胞塊からマウスCGR8細胞株が樹立されており、CGR8細胞の培養物を、LIFの存在下で、フィーダー層を用いずに増殖させることができる。別の例として、ヒトES細胞株H1、H7、H9、H13、およびH14がThompsonら(1995年)によって樹立された。さらに、H9株のサブクローンH9.1およびH9.2が開発されてきた。事実上、例えば、参照により本明細書に組み込まれるYuおよびThompson(2008年)に記載されているものなどの当技術分野で公知のあらゆるES細胞株または幹細胞株を本発明と共に使用することができることが予測される。

#### 【0087】

本発明と関連して使用するためのES細胞の供給源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊の培養に由来する細胞、または樹立細胞系の培養物から得た細胞であってよい。したがって、本明細書で使用される場合、「ES細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊細胞、内部細胞塊から得たES細胞、およびES細胞株の培養物から得たES細胞を指し得る。

#### 【0088】

### 2. 人工多能性幹細胞

人工多能性幹細胞は、一般にiPS細胞またはiPSCと省略され、非多能性細胞、一般には成体体細胞から人工的に引き出された多能性幹細胞の一種である。人工多能性幹細胞

10

20

30

40

50

胞は、胚性幹細胞などの天然の多能性幹細胞と、同一ではないとしても、多くの点で、例えば、ある特定の幹細胞遺伝子およびタンパク質の発現、クロマチンメチル化パターン、倍加時間、胚葉体形成、奇形腫形成、生存可能なキメラの形成、ならびに潜在能および分化可能性 (differentiability) に関してなどで類似していると考えられているが、天然の多能性幹細胞とのそれらの完全な関連性はまだ評価中である。

【0089】

iPS細胞は、分化した体細胞の再プログラミングによって得られる。胚および胚組織の実験的使用に関する倫理的懸念を緩和するために、胚起源以外のヒト組織に由来する人工多能性細胞の生成が望まれる。人工多能性細胞の治療への適用の見込みが盛んに宣伝されている。医学的適用としては、2、3挙げると、アルツハイマー病、糖尿病および脊髄傷害の治療がある。他の適用としては、疾患モデリングおよび医薬品スクリーニングが挙げられる。

10

【0090】

人工多能性幹細胞は種々の方法によって得られている。ヒト胎児または新生児線維芽細胞に、レンチウイルスによる形質導入を使用して4種の遺伝子、Oct4、Sox2、ナノグおよびLin28をトランスフェクトする(Yuら、2007年)。感染の12~20日後に、ヒトES細胞の形態を有するコロニーが目に見えるようになる。コロニーを選び取り、増大させる。コロニーを構成する人工多能性幹細胞はヒトES細胞と形態学的に類似しており、種々のヒトES細胞マーカーを発現し、マウスに注射すると神経組織、軟骨、および腸上皮を有する奇形腫を形成する。

20

【0091】

別の方法では、成体ヒト皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスによる形質導入を使用して転写因子Oct4、Sox2、c-MycおよびKlf4をトランスフェクトする(Takahashiら、2007年)。トランスフェクトされた細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を補充した培地中、SNLフィーダー細胞(LIFを産生するマウス細胞線維芽細胞株)上にプレATINGする。およそ25日後に、ヒトES細胞コロニーに似ているコロニーが培養物中出现する。ES細胞様コロニーを選び取り、bFGFの存在下、フィーダー細胞上で増大させる。

【0092】

iPS細胞は、2006年に最初にマウス細胞から作製され(Takahashiら、2006年)、2007年にヒト細胞から作製された(Takahashiら、2007年; Yuら、2007年)。これは、研究者が、研究において重要であり治療的使用を潜在的に有する多能性幹細胞を、議論的になる胚の使用を伴わずに得ることが可能になり得るので、幹細胞研究における重要な前進として言及された。マウスまたはヒト組織から人工多能性細胞(iPS細胞)を生成することの最初の上首尾の実証は、転写因子の特異的なセットを発現するレトロウイルスベクターの使用を伴うものであった。James ThomsonおよびShinya Yamanakaの研究室における研究により、レトロウイルスベクターによるマウスまたはヒト線維芽細胞への特異的な転写因子の導入が、それらの細胞を再プログラミングして未分化の多能性幹細胞にするために十分であることが実証された。Thomsonにより使用された因子にはOct4、Sox2、ナノグおよびLin28が含まれる。Yamanakaにより使用された因子にはOct4、Sox2、Klf4およびc-Mycが含まれる。いずれの遺伝子セットによる再プログラミングも、後で再プログラミングされた細胞から消失させ、傷跡のないiPS細胞をもたらすことができる、宿主細胞のゲノムへの組み込みおよび転写因子の発現またはエピソームプラスミドからの発現によって実現される。

30

40

【0093】

細胞特性に基づいて、ES細胞様コロニーの細胞は人工多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞は、ヒトES細胞と形態学的に類似しており、種々のヒトES細胞マーカーを発現する。また、ヒトES細胞の分化がもたらされることが公知の条件下で増殖させると、人工多能性幹細胞は適宜分化する。例えば、人工多能性幹細胞は、内胚葉前駆細胞または

50

隣島ベータ細胞の構造およびマーカーを有する細胞に分化し得る。事実上、例えばYuおよびThompson、2008年に記載されているものを含めた、あらゆるiPS細胞または細胞株を本発明と共に使用することができることが予測される。

【0094】

マウスから人工多能性幹細胞を調製する方法も公知である(TakahashiおよびYamanaka、2006年)。iPS細胞の誘導には、一般には、Soxファミリーの少なくとも1種のメンバーおよびOctファミリーの少なくとも1種のメンバーの発現またはそれへの曝露が必要である。SoxおよびOctは、ES細胞の同一性を特定化する転写調節性階層の中核をなすと考えられている。例えば、Soxは、Sox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15、またはSox-18であってよく、OctはOct-4であってよい。ナノグ、Lin28、Klf4、またはc-Mycのような追加的な因子により再プログラミング効率が増大し得、再プログラミング因子の特異的なセットは、Sox-2、Oct-4、ナノグ、および任意選択でLin-28を含むセットであってよく、Sox-2、Oct4、Klf、および任意選択でc-Mycを含むセットであってよい。

10

【0095】

iPS細胞は、ES細胞と同様に、SSEA-1、SSEA-3およびSSEA-4に対する抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank、National Institute of Child Health and Human Development、Bethesda Md)、およびTRA-1-60およびTRA-1-81に対する抗体(Andrewsら、1987年)を使用した免疫組織化学的検査またはフローサイトメトリーによって同定または確認することができる特有の抗原を有する。iPS細胞の多能性は、およそ $0.5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を生後8~12週間の雄SCIDマウスの後肢の筋肉に注射することによって確認することができる。3つの胚葉のそれぞれの少なくとも1つの細胞型が実証される奇形腫が発生する。

20

【0096】

本発明のある特定の態様では、上記の通りおよびWO2009/149233に記載の通り、Oct4およびSox2などのOctファミリーメンバーおよびSoxファミリーメンバーを含む再プログラミング因子をKlfおよび/またはナノグと組み合わせて使用して体細胞を再プログラミングすることによってiPS細胞を作製する。再プログラミング用の体細胞は、線維芽細胞、ケラチノサイト、造血細胞、間葉細胞、肝臓細胞、胃細胞、または細胞などの、誘導して多能性にするのできる任意の体細胞であってよい。ある特定の態様では、T細胞も再プログラミング用の体細胞の供給源として使用することができる(参照により本明細書に組み込まれるWO2010/141801を参照されたい)。

30

【0097】

再プログラミング因子は、組み込みベクターまたはエピソームベクター、例えば、EBVエレメントに基づく系などの1つまたは複数のベクターに含まれる発現カセットから発現させることができる(参照により本明細書に組み込まれるWO2009/149233; Yuら、2009年を参照されたい)。別の態様では、再プログラミングタンパク質をタンパク質形質導入によって体細胞に直接導入することができる。

【0098】

2.038 AT4細胞は、造血を誘導するように設計されたヒトiPSCである。2.038 AT4細胞は、誘導性遺伝子発現のためにrtTETタンパク質を構成的に発現するように工学的に操作されている。rtTETの発現を可能にするために第3染色体上のヒトRosa26遺伝子座が選択された。LoxP組換え部位(LOX71およびLOX2272)をヒトROSA26遺伝子の第1のイントロンに相同組換えによって導入した。ヒトBCL2遺伝子由来のスプライシングアクセプターシグナル(SA)をLOX71部位の前に置いて、内在性ヒトROSA26プロモーターからの選択マーカーの発現を可能にした。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(Neo)を正の選択のために使用した。ERG1およびGFI1のコード領域をPiggyBactransポゾンに基づく発現ベクターに、rtTET応答性誘導性プロモーターであるTET誘導性プロモータ

40

50

ー ( P t i g h t ) の制御下でクローニングした。 E R G 1 および G F I 1 は誘導性プロモーター P t i g h t の制御下にある。導入遺伝子の発現を誘導するために、細胞をドキサイクリン ( D O X ; 0 . 2 μ g / m l ) で処理する。正確に組み換えられた誘導性細胞はピューロマイシン ( P u r o + ) およびネオマイシン ( N e o + ) に対して耐性である。

#### 【 0 0 9 9 】

2 . 0 3 8 M A F A 細胞は、転写因子 M a F A を過剰発現するように設計されたヒト i P S C である。ネオマイシンと融合した M a F A のコード領域を含有するプラスミドを i P S C に電気穿孔により導入した。ネオマイシン選択を使用して新生クローンを選択した。外因性 M a F A は、 M a F a \_ N e o m y c i n ベクターに存在する r t T E T 応答性誘導性プロモーターである T E T 誘導性プロモーター ( P t i g h t ) の制御下にある。導入遺伝子の発現を誘導するために、細胞をドキサイクリン ( D O X ; 0 . 1 ~ 1 0 μ g / m l ) で処理する。正確に組み換えられた誘導性細胞はネオマイシンに対して耐性である ( N e o + ) 。ポリクローナル集団をさらにサブクローニングして 2 . 0 3 8 M a f a 細胞を引き出した。

10

#### 【 0 1 0 0 】

I I I . 内胚葉前駆体 ( E P ) 細胞特性

細胞は、いくつもの表現型の基準に従って特徴付けることができる。基準としては、これだけに限定されないが、発現した細胞マーカー、酵素活性の検出または定量化、および形態学的特徴および細胞間シグナル伝達の特徴付けが挙げられる。

20

#### 【 0 1 0 1 】

本発明のある特定の態様において具体化される内胚葉細胞は、天然の内胚葉細胞に特有の形態学的特徴を有する。この特徴はそのような物を評価する当業者により容易に理解され、2 D 培養物において増殖させた場合にはドーナツ形態を含む。単一細胞に存在する1つまたは複数のそのような特徴は、内胚葉細胞系列のメンバーである細胞と一致する。細胞が内胚葉細胞に特有の形態学的特徴を有するかどうかの偏りのない決定は、分化した後代細胞、成体または胎児内胚葉細胞、および線維芽細胞、または R P E ( 網膜色素上皮 ) 細胞などの1つまたは複数の陰性対照細胞の顕微鏡写真をコード化し、次いで、その顕微鏡写真を盲検式で評価し、コードを解読して、分化による内胚葉細胞が正確に同定されるかどうかを決定することによって行うことができる。

30

#### 【 0 1 0 2 】

胚体内胚葉は、一過性の状態であり、直ちに分化し、増殖することができず、独特の形態を有さず、また、内胚葉の運命に十分に委ねられない場合がある。他方では、内胚葉前駆体は一過性のものではなく、独特の形態を有し、無制限に培養することができる ( Chen 等、2013年 ) 。内胚葉前駆細胞は、 i n v i t r o または i n v i v o のいずれにおいても、肝臓、膵臓、および腸などの内胚葉系列の細胞を生成することができるが、中胚葉または外胚葉を生成することはできない。同様に、免疫欠損マウスにおいて E P 細胞からは奇形腫が形成されない。したがって、 D E 細胞および E P 細胞は、独特の発生の中間体を示し得、また、異なる発生潜在性を有し得る。

40

#### 【 0 1 0 3 】

膵臓は、およそ手のサイズの臓器であり、胃の下部の後ろに位置する。膵臓は、形態学的かつ生理的に異なる2つの構造：消化に参与する酵素 ( アミラーゼ、リパーゼなど ) および炭酸水素ナトリウムを産生する膵外分泌部、ならびに、血中グルコースの制御に参与するホルモン ( インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、および膵臓ポリペプチド ) を産生する膵内分泌部を含む。膵内分泌部の細胞は、島 ( ランゲルハンス島または膵島 ) の形態で膵臓内に分散する微小臓器として組織化されている。各膵島は、4種の細胞型：アルファ細胞、ベータ細胞、デルタ細胞および P P ( ガンマ ) 細胞ならびにイプシロン細胞で構成される。ベータ細胞は、島の中央に見いだされ、グルコースに反応してインスリンを分泌することができる唯一の細胞である。

#### 【 0 1 0 4 】

50

本発明の細胞は、膵臓内胚葉の系列に特有の表現型マーカーを発現するかどうかに応じて特徴付けることもできる。内胚葉前駆細胞は、CXCR4、CD117、FOXA1、FOXA2、CD31、CD34、およびSOX17を発現するとともに特徴付けられる。膵島ベータ細胞の区別に有用な細胞マーカーの非限定的な例としては、PDX-1、ニューロゲニン3、neuroD1、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、およびC-ペプチドが挙げられる。成熟膵島ベータ細胞マーカーとしては、これだけに限定されないが、PDX1、C-ペプチド、およびインスリンが挙げられる。胎児膵臓の未成熟細胞と類似した未成熟膵島ベータ細胞は多ホルモン性であるが、成熟膵島ベータ細胞は単一ホルモン性であり、グルコース応答性である。

#### 【0105】

本開示において列挙されている内胚葉前駆体タンパク質決定因子は、細胞表面マーカーについてのフロー免疫細胞化学、細胞内マーカーまたは細胞表面マーカーについての免疫組織化学的検査（例えば、固定した細胞または組織切片）、細胞抽出物のウエスタンブロット分析、および培地中に分泌される細胞抽出物または産物についての酵素結合免疫アッセイなどの任意の適切な免疫学的技法を使用して検出することができる。細胞による抗原の発現は、標準の免疫細胞化学またはフローサイトメトリーアッセイにおいて、任意選択で細胞を固定した後に、また、任意選択で、標識を増幅するために、標識された二次抗体または他のコンジュゲート（例えば、ビオチン-アビジンコンジュゲートなど）を使用して、有意に検出可能な量の抗体が抗原に結合する場合に、「抗体により検出可能」とあると言える。

#### 【0106】

特異的なマーカーの発現は、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析によって、または標準の増幅方法において配列特異的なプライマーを使用するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってmRNAレベルで検出することもできる（米国特許第5,843,780号）。本開示において列挙されている特定のマーカーの配列データは、GenBankなどの公共のデータベースから入手することができる。mRNAレベルでの発現は、細胞試料に対する、典型的な制御された実験における標準の手順に従ったアッセイの実行により、標準の時間ウィンドウ内で明白に識別可能なハイブリダイゼーションまたは増幅産物がもたらされる場合に、本開示に記載されているアッセイの1つに従って「検出可能」とあると言える。別段の必要がなければ、対応するmRNAがRT-PCRによって検出可能である場合に、特定のマーカーの発現が示される。タンパク質レベルまたはmRNAレベルで検出される内胚葉前駆体またはベータ細胞特異的なマーカーの発現は、そのレベルが未分化の多能性幹細胞、線維芽細胞、または他の無関係の細胞型などの対照細胞のレベルの少なくとも2倍、好ましくは10倍超または50倍超である場合に、陽性であるとみなされる。

#### 【0107】

細胞は、膵島ベータ細胞系列の細胞に特有の酵素活性を示すかどうかに応じて特徴付けることもできる。例えば、グルコース刺激によるインスリン分泌（GIS）アッセイにより、グルコース刺激への曝露に応答して放出されるC-ペプチドが測定される。このアッセイでは、各島パッチに対するグルコース刺激の指標がもたらされる。指標は、高グルコース濃度で放出されたインスリンと低グルコース濃度で放出されたインスリンの比である。

#### 【0108】

別の態様では、分化によってもたらされるベータ細胞の生物学的機能を、例えば、グルコース刺激に応答して産生されるインスリンのレベル、および分化細胞を移植した際の糖尿病マウスモデルの*in vivo*におけるレスキューを決定することによって評価する。さらに別の態様では、ベータ細胞を、亜鉛含有量が高いことによって同定することができる（Shiroiら、2002年）。

#### 【0109】

内胚葉前駆細胞は、機能アッセイを使用して試験することができる。例えば、細胞をマ

10

20

30

40

50

ウス胚の内胚葉区画内に移植して、当該細胞の、内在性内胚葉を同定し、それと相互作用する能力を試験することができる。

【0110】

細胞を同種の未分化細胞集団内で増殖させることができるのが内胚葉前駆細胞を培養することの利点であることは当業者には容易に理解されよう。そのように、下流の系列を生成するために内胚葉前駆細胞を使用することにより、より特殊化した細胞型の分化の効率が増大し得る。これにより、他の胚葉に由来するものなどの混入細胞型による望ましくない影響の潜在性も低下する。本発明のEP細胞は、免疫染色および蛍光活性化定量化、または他の適切な技法によって決定して、0.1%未満（好ましくは100ppm未満または10ppm未満）が望ましくない細胞型のマーカーまたは他の特徴を担持する場合に、

10

【0111】

本発明のある特定の態様に従って提供される細胞は、一次供給源から得た細胞のいくつもの特徴を有し得る。これらの特徴が特定の細胞に多く存在するほど、内胚葉前駆細胞系列の細胞であることをより強く特徴付けることができる。これらの特徴の少なくとも2つ、3つ、5つ、7つ、または9つを有する細胞がますます好ましい。培養容器または投与用の調製物中に存在し得る特定の細胞集団に関して、これらの特徴の発現が細胞間で均一であることが有利である場合が多い。この状況では、細胞の少なくとも約40%、60%、80%、90%、95%、または98%が所望の特徴を有する集団がますます好ましい

20

【0112】

IV. 内胚葉前駆体およびベータ細胞分化因子

本発明のある特定の態様は、内胚葉前駆体またはベータ細胞分化因子を提供する。本発明者らは、この節で列挙されている遺伝子のアイソフォームおよびバリエーションの全てが本発明に含まれることも意図している。

【0113】

A. 細胞シグナル伝達阻害剤/アンタゴニスト

本発明のある特定の態様では、分化プロセスの少なくとも一部の間に、シグナル伝達カスケードに参与するシグナル伝達因子を阻害する1種または複数種のシグナル伝達阻害剤の存在下で細胞を維持することができる。これらの態様および実施形態では、所望の場合には同じシグナル伝達経路のシグナル伝達の構成成分を阻害する他のシグナル伝達阻害剤で置換してよいことが理解されよう。これは、上流刺激の阻害を含んでよい。同様に、所望の場合には、阻害剤を関連するシグナル伝達経路の他の阻害剤で置換することができる。

30

【0114】

そのようなシグナル伝達阻害剤、例えば、GSK3阻害剤、ALK5阻害剤、BMPアンタゴニストは、少なくともまたは約0.02μM、0.05μM、0.1μM、0.2μM、0.5μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、35μM、40μM、45μM、50μM、100μM、150μM、200μM、500~約1000μM、またはその中に導き出せる任意の範囲の有効濃度で使用することができる。

40

【0115】

キナーゼ阻害剤を同定するためのいくつものアッセイが公知である。例えば、Daviesら(2000年)により、キナーゼをペプチド基質および放射標識したATPの存在下でインキュベートするキナーゼアッセイが記載されている。キナーゼによる基質のリン酸化により、標識が基質に組み入れられる。各反応の一定分量をホスホセルロース紙に固定化し、リン酸で洗浄して遊離のATPを除去する。次いで、インキュベート後の基質の活性を測定し、キナーゼ活性を示す。候補キナーゼ阻害剤の存在下、および不在下での相対的なキナーゼ活性を、そのようなアッセイを使用して容易に決定することができる。Downeyら

50

(1996年)により、キナーゼ阻害剤を同定するために使用することができる、キナーゼ活性についてのアッセイも記載されている。

【0116】

1. グリコーゲンシントラーゼキナーゼ3阻害剤

グリコーゲンシントラーゼキナーゼ3 (GSK3) は、特定の細胞基質内のある特定のセリンおよびトレオニンアミノ酸へのリン酸分子の付加を媒介するセリン/トレオニンプロテインキナーゼである。GSK3によるこれらの他のタンパク質のリン酸化により、通常、標的タンパク質(「基質」とも称される)が阻害される。記載の通り、GSK3は、グリコーゲンシントラーゼをリン酸化し、したがって不活性化することが公知である。GSK3は、損傷を受けたDNAに対する細胞の応答およびWntシグナル伝達の制御にも関係づけられている。GSK3により、ヘッジホッグ(Hh)経路内のCiもリン酸化され、それがタンパク質分解の標的になって不活性形態になる。グリコーゲンシントラーゼに加えて、GSK3は多くの他の基質を有する。しかし、GSK3は、基質を最初にリン酸化する「プライミングキナーゼ」を通常必要とするという点で、キナーゼの中では普通でない。

10

【0117】

GSK3によるリン酸化の結果は、通常、基質の阻害である。例えば、GSK3により別のその基質である転写因子のNFATファミリーがリン酸化されると、これらの転写因子は核に移行することができず、したがって、阻害される。発生の際に組織パターンングを確立するために必要である、Wntシグナル伝達経路におけるその重要な役割に加えて、GSK3は、骨格筋肥大などの状況において誘導されるタンパク質合成のためにも重大である。NFATキナーゼとしてのその役割によっても、分化と細胞増殖の両方の重要な調節因子として位置づけられる。

20

【0118】

GSK3阻害とは、1種または複数種のGSK3酵素の阻害を指し得る。GSK3酵素のファミリーは周知であり、いくつものバリエーションが記載されている(例えば、Schafferら、2003年を参照されたい)。特定の実施形態では、GSK3-を阻害する。GSK3-阻害剤も適切であり、ある特定の態様では、本発明において使用するための阻害剤により、GSK3-とGSK3-の両方を阻害する。GSK3阻害剤により、例えばWnt/-カテニン経路を活性化することができる。

30

【0119】

GSK3阻害剤の特定の実施例としては、これだけに限定されないが、ケンパウロン(Kenpaulone)、1-アザケンパウロン(Azakenpaulone)、CHIR99021、CHIR98014、AR-A014418(例えば、Gouldら、2004年を参照されたい)、CT99021(例えば、Wagman、2004年を参照されたい)、CT20026(例えば、Wagman、2004年を参照されたい)、SB415286、SB216763(例えば、Martinら、2005年を参照されたい)、AR-A014418(例えば、Nobleら、2005年を参照されたい)、リチウム(例えば、Gouldら、2003年を参照されたい)、SB415286(例えば、Frameら、2001年を参照されたい)およびTDZD-8(例えば、Chinら、2005年を参照されたい)が挙げられる。Calbiochemから入手可能な別の例示的なGSK3阻害剤(例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO2008/094597を参照されたい)としては、これだけに限定されないが、BIO(2'-Z, 3'-E)-6-プロモインジルピン(Bromodirubm)-3'-オキシム(GSK3阻害剤IX); BIO-アセトキシム(2'-Z, 3'-E)-6-プロモインジルピン-3'-アセトキシム(GSK3阻害剤X); (5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-(2-フェニルキナゾリン-4-イル)アミン(GSK3阻害剤XIII); ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム(cyclopentadienylniuthenium)複合体(GSK3阻害剤XV); TDZD-84-ベンジル-2-メチル-1, 2, 4-チアジアゾリジン-3, 5-ジオン(GSK3ベータ阻害剤I); 2-チオ(3-ヨードベンジル)-5-(1-ピリジル)-[1, 3, 4]

40

50

- オキサジアゾール ( G S K 3 ベータ阻害剤 I I ) ; O T D Z T 2 , 4 - ジベンジル - 5  
 - オキソチアジアゾリジン - 3 - チオン ( G S K 3 ベータ阻害剤 I I I ) ; アルファ - 4  
 - ジプロモアセトフェノン ( G S K 3 ベータ阻害剤 V I I ) ; A R - A O 1 4 4 1 8 N -  
 ( 4 - メトキシベンジル ) - N ' - ( 5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル ) 尿素  
 ( G S K - 3 ベータ阻害剤 V I I I ) ; 3 - ( 1 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - 1 H -  
 ピロロ [ 2 , 3 - b ] ピリジン - 3 - イル ] - 4 - ピラジン - 2 - イル - ピロール - 2 ,  
 5 - ジオン ( G S K - 3 ベータ阻害剤 X I ) ; T W S 1 1 9 ピロロピリミジン化合物 ( G S K 3  
 ベータ阻害剤 X I I ) ; L 8 0 3 H - K E A P P A P P Q S p P - N H 2 またはそのミリストイル化された形態 ( G S K 3  
 ベータ阻害剤 X I I I ) ; 2 - クロロ - 1 - ( 4 , 5 - ジプロモ - チオフェン - 2 - イル ) - エタノン ( G S K 3  
 ベータ阻害剤 V I ) ; A R - A O 1 4 4 ~ 1 8 ; S B 2 1 6 7 6 3 ; および S B 4 1 5 2 8 6 が挙げられる  
 。

10

## 【 0 1 2 0 】

本明細書で使用される阻害剤は、標的とするキナーゼに特異的であることが好ましい。  
 G S K 3 に対して特異的である C H I R 9 9 0 2 1 を用いて良好な結果が得られている。  
 C H I R 9 9 0 2 1 の使用に適した濃度は 0 . 0 1 ~ 1 0 0 マイクロモル、好ましくは 0  
 . 1 ~ 2 0 マイクロモル、より好ましくは 0 . 3 ~ 1 0 マイクロモルの範囲である。

## 【 0 1 2 1 】

## 2 . A L K 5 阻害剤

T G F - 受容体阻害剤は、一般に T G F シグナル伝達の任意の阻害剤、または、 T G  
 F - 受容体に対する抗体、 T G F - 受容体のドミナントネガティブバリエーション、なら  
 びに T G F - 受容体の発現を抑制する s i R N A およびアンチセンス核酸を含み得る T  
 G F - 受容体 ( 例えば、 A L K 5 ) 阻害剤に特異的な阻害剤を含み得る。例示的な T G  
 F - 受容体 / A L K 5 阻害剤としては、これだけに限定されないが、 S B 4 3 1 5 4 2  
 ( 例えば、 Inman ら、 2 0 0 2 年を参照されたい )、 3 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル )  
 - N - フェニル - 4 - ( 4 - キノリニル ) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド  
 としても公知の A - 8 3 - 0 1 ( 例えば、 Tojo ら、 2 0 0 5 年を参照されたい、また、例  
 えば T o c r i s B i o s c i e n c e から市販されている ) ; 2 - ( 3 - ( 6 - メチ  
 ルピリジン - 2 - イル ) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル ) - 1、 5 - ナフチリジン、 W n  
 t 3 a / B I O ( 例えば、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 0 8 / 0 9 4 5 9  
 7 を参照されたい )、 B M P 4 ( 例えば、 W O 2 0 0 8 / 0 9 4 5 9 7 を参照されたい )  
 、 G W 7 8 8 3 8 8 ( - ( 4 - [ 3 - ( ピリジン - 2 - イル ) - 1 H - ピラゾール - 4 -  
 イル ] ピリジン ( pyridm ) - 2 - イル } - N - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル )  
 ) ベンズアミド ) ( 例えば、 G e l l i b e r t ら、 2 0 0 6 年を参照されたい )、 S M 1 6 ( 例  
 えば、 Suzuki ら、 2 0 0 7 年を参照されたい )、 I N - 1 1 3 0 ( 3 - ( ( 5 - ( 6 - メ  
 チルピリジン - 2 - イル ) - 4 - ( キノキサリン - 6 - イル ) - 1 H - イミダゾール - 2  
 - イル ) メチル ) ベンズアミド ) ( 例えば、 Kim ら、 2 0 0 8 年を参照されたい )、 G W  
 6 6 0 4 ( 2 - フェニル - 4 - ( 3 - ピリジン - 2 - イル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル )  
 ) ピリジン ) ( 例えば、 de G o u v i l l e ら、 2 0 0 6 年を参照されたい )、 S B - 5 0 5 1  
 2 4 ( 2 - ( 5 - ベンゾ [ 1 , 3 ] ジオキソール - 5 - イル - 2 - t e r t - ブチル - 3  
 H - イミダゾール - 4 - イル ) - 6 - メチルピリジン塩酸塩 ) ( 例えば、 D a C o s t a ら、 2  
 0 0 4 年を参照されたい ) ; S U 5 4 1 6 ; レルデリムマブ ( l e r d e l i m u m b )  
 ( C A T - 1 5 2 ) ; メテリムマブ ( m e t e l i m u m a b ) ( C A T - 1 9 2 ) ; G  
 C - 1 0 0 8 ; I D 1 1 ; A P - 1 2 0 0 9 ; A P - 1 1 0 1 4 ; L Y 5 5 0 4 1 0 ;  
 L Y 5 8 0 2 7 6 ; L Y 3 6 4 9 4 7 ; L Y 2 1 0 9 7 6 1 ; S B - 4 3 1 5 4 2 ; S D  
 - 2 0 8 ; S M 1 6 ; N P C - 3 0 3 4 5 ; K i 2 6 8 9 4 ; S B - 2 0 3 5 8 0 ; S D  
 - 0 9 3 ; A L X - 2 7 0 - 4 4 8 ; E W - 7 1 9 5 ; S B - 5 2 5 3 3 4 ; I N - 1 2  
 3 3 ; S K I 2 1 6 2 ; グリベック ( G l e e v e c ) ; 3 , 5 , 7 , 2 ' , 4 ' - ペン  
 タヒドロキシフラボン ( p e n t a h y d r o x y f i a v o n e ) ( M o r i n ) ; アクチピン - M 1 0 8  
 A ; P 1 4 4 ; 可溶性 T B R 2 - F c ; ピリミジン誘導体 ( 例えば、参照により本明細書

20

30

40

50

に組み込まれるWO 2008/006583において列挙されているものを参照されたい) ; およびRothら(2010年)に報告されたインドリノンが挙げられる。

【0122】

さらに、「ALK5阻害剤」は非特異的なキナーゼ阻害剤を包含するものではないが、「ALK5阻害剤」は、例えばSB-431542などの、ALK5に加えてALK4および/またはALK7を阻害する阻害剤を包含するものと理解されるべきである(例えば、Inmanら、2002年を参照されたい)。

【0123】

TGF- $\beta$ /アクチビン経路を阻害することには同様の効果があると考えられている。したがって、TGF- $\beta$ /アクチビン経路の任意の阻害剤(例えば、上流または下流の)を、本明細書に記載のTGF- $\beta$ /ALK5阻害剤と組み合わせ、またはその代わりに使用することができる。例示的なTGF- $\beta$ /アクチビン経路阻害剤としては、これだけに限定されないが、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、SMAD2/3リン酸化の阻害剤、SMAD2/3とSMAD4の相互作用の阻害剤、ならびにSMAD6およびSMAD7の活性化因子/アゴニストが挙げられる。さらに、本明細書に記載されているカテゴリー化は、ただ単に組織化するためのものであり、化合物は経路内の1つまたは複数の点で影響を及ぼす可能性があり、したがって、化合物は定義済みのカテゴリーの1つ超で機能し得ることは当業者には公知である。

10

【0124】

3. ROCK阻害剤

多能性幹細胞、特にヒトES細胞およびiPS細胞は、クローンの単離または増大および分化誘導に重要である細胞の脱離および解離の際にアポトーシスを受けやすい。最近、ROCK関連シグナル伝達経路の阻害剤であるRho関連キナーゼ(ROCK)阻害剤、例えばRho特異的阻害剤、ROCK特異的阻害剤、またはミオシンII特異的阻害剤などの小数の分子のクラスにより、クローンの効率および解離させた多能性幹細胞の生存が増大することが見出された。本発明のある特定の態様では、多能性幹細胞を培養および継代するため、および/または幹細胞を分化させるためにROCK阻害剤を使用することができる。したがって、多能性幹細胞を増殖させる、解離させる、集合体を形成する、または分化させる任意の細胞培養培地、例えば接着培養物または浮遊培養物中にROCK阻害剤が存在してよい。別段の指定のない限り、本明細書では、プレシスタチン(blebbistatin)などのミオシンII阻害剤でROCK阻害剤の実験的使用を置換することができる。

20

30

【0125】

ROCKシグナル伝達経路は、RhoファミリーGTPアーゼ; Rhoの下流の主要なエフェクターキナーゼであるROCK; ROCKの下流の優勢なエフェクターであるミオシンII(Harbら、2008年); および任意の中間、上流、または下流のシグナルプロセッサを含み得る。ROCKにより、ミオシン調節性軽鎖(MRLC)の脱リン酸化によってミオシン機能を負に調節するROCKの主要な下流の標的の1つであるミオシンホスファターゼ標的サブユニット1(MYP1)がリン酸化され、不活性化され得る。

【0126】

ROCKは、Rhoの標的タンパク質としての機能を果たすセリン/トレオニンキナーゼである(3つのアイソフォーム--RhoA、RhoBおよびRhoCが存在する)。これらのキナーゼは、最初に、RhoAに誘導されるストレスファイバーおよび接着斑の形成のメディエーターと特徴付けられた。2つのROCKアイソフォーム-ROCK1(p160ROCK、ROKとも称される)およびROCK2(ROK)-は、N末端キナーゼドメイン、その後、Rho結合性ドメインを含有するコイルドコイルドメインおよびプレクストリン相同性ドメイン(PH)で構成される。どちらのROCKも、ストレスファイバー形成、平滑筋収縮、細胞接着、膜ラフリングおよび細胞運動性に対するRhoAの作用を媒介する細胞骨格調節因子である。ROCKは、ミオシンII、ミオシン軽鎖(MLC)、MLCホスファターゼ(MLCP)ならびにホスファターゼ・テンシン

40

50

・ホモログ ( P T E N ) などの下流の分子を標的とすることによってそれらの生物活性を  
 発し得る。

【 0 1 2 7 】

R O C K 阻害剤の非限定的な例としては、 H A - 1 0 0、 Y - 2 7 6 3 2、 H - 1 1 5  
 2、ファスジル ( F a s u d i l ) ( H A 1 0 7 7 とも称される )、 Y - 3 0 1 4 1 ( 米  
 国特許第 5 , 4 7 8 , 8 3 8 号に記載されている )、 W f - 5 3 6、 H A - 1 0 7 7、ヒ  
 ドロキシル - H A - 1 0 7 7、 G S K 2 6 9 9 6 2 A、 S B - 7 7 2 0 7 7 - B、および  
 それらの誘導体が挙げられる。さらに、他の低分子化合物も R O C K 阻害剤として公知で  
 あるので、そのような化合物またはその誘導体も実施形態に使用することができる ( 例え  
 ば、これによって参照により組み込まれる、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 0 9 2 6  
 1 号、同第 2 0 0 5 / 0 1 9 2 3 0 4 号、同第 2 0 0 4 / 0 0 1 4 7 5 5 号、同第 2 0 0  
 4 / 0 0 0 2 5 0 8 号、同第 2 0 0 4 / 0 0 0 2 5 0 7 号、同第 2 0 0 3 / 0 1 2 5 3 4  
 4 および 2 0 0 3 / 0 0 8 7 9 1 9 号、ならびに国際特許公開第 2 0 0 3 / 0 6 2 2 2 7  
 号、同第 2 0 0 3 / 0 5 9 9 1 3 号、同第 2 0 0 3 / 0 6 2 2 2 5 号、同第 2 0 0 2 / 0  
 7 6 9 7 6 および 2 0 0 4 / 0 3 9 7 9 6 号を参照されたい )。本発明のある特定の態様  
 では、 R O C K 阻害剤の 1 つまたは 2 つまたはそれ超の組合せも使用することができる。  
 本発明のある特定の態様では、 R h o 特異的阻害剤、例えば C l o s t r i d i u m b  
 o t u l i n u m C 3 細胞外酵素など、および / またはミオシン I I 特異的阻害剤も、  
 R O C K 阻害剤として使用することができる。

【 0 1 2 8 】

4 . B M P 経路アンタゴニスト

一実施形態では、 B M P シグナル伝達経路のアンタゴニスト ( すなわち、 B M P シグナ  
 ル伝達アンタゴニストまたは B M P アンタゴニスト ) により、構成的に活性な B M P シグ  
 ナル伝達経路を阻害または下方制御する。一実施形態では、 B M P シグナル経路は、 B M  
 P 2 媒介性シグナル伝達経路または B M P 4 媒介性シグナル伝達経路である。一実施形態  
 では、 B M P シグナル伝達のアンタゴニストにより、 I 型 B M P 受容体シグナルトランス  
 ダクションを阻害する。一実施形態では、 B M P シグナル伝達経路のアンタゴニストによ  
 り、 I 型 B M P 受容体への結合によって I 型 B M P 受容体シグナルトランスダクションを  
 阻害する。一実施形態では、 I 型 B M P 受容体は、 A L K 2、 A L K 3 または A L K 6 を  
 含む。一実施形態では、 B M P シグナル伝達経路のアンタゴニストにより、 S M A D 1、  
 S M A D 5 または S M A D 8 のリン酸化を阻害する。さらに別の実施形態では、 B M P シ  
 グナル伝達経路のアンタゴニストにより、 B M P 2 または B M P 4 の B M P 受容体への結  
 合または I I 型 B M P 受容体と I 型 B M P 受容体の相互作用を阻害する。 B M P シグナル  
 伝達経路のアンタゴニストは、化学薬剤である。化学薬剤としては、これだけに限定され  
 ないが、ドルソモルフィン、 L D N 1 9 3 1 8 9 およびその類似体を挙げることができる。  
 ポリペプチド由来の B M P 経路アンタゴニストとしては、これだけに限定されないが、  
 ノギン、グレムリン、コーディン、フォリスタチン、ケルペロス、 P R D C、 U S A G  
 - 1、ココ、およびスクレロスタチンが挙げられる。

【 0 1 2 9 】

5 . ヘッジホッグ阻害剤

ヘッジホッグ阻害剤としては、これだけに限定されないが、 K A A D - シクロパミン ;  
 G D C - 0 4 4 9 ; アシルチオ尿素、アシル尿素、および報告アシルグアニジン誘導体 (  
 Solinas ら、 2 0 1 2 年 ) において報告された ; フェニルキナゾリノン尿素 ( Brunton ら、  
 2 0 0 8 年 ) において報告された ; シクロパミン類似体 ( Winkler ら、 2 0 0 9 年 ) にお  
 いて報告された ; A Y 9 9 4 4、 L Y 2 9 4 0 6 8 0、 M R T - 1 0、 M R T - 8 3、 G  
 D C - 0 4 4 9、トリパラノール、ジェルピン、イトラコナゾール ( itraconzaole )、ス  
 ルフィソマジン ( s u l f i s o m a d i n e )、ポドフィルム樹脂、コルヒチンが挙げ  
 られる。「ヘッジホッグ阻害剤」という用語は、スムーズド ( s m o o t h e n e d )  
 の活性を低下させ、 H h 経路の標的であるパッチド ( p a t c h e d ) および G I i 1  
 の活性を低下させる薬剤を指すものとする。「ヘッジホッグ阻害剤」という用語は、本明

10

20

30

40

50

細書で使用される場合は、ヘッジホッグタンパク質の正常な機能を直接阻害することによって作用し得る任意の薬剤を指すだけでなく、ヘッジホッグ経路活性を阻害し、したがって、p t cの機能を再現する任意の薬剤も指す。

【0130】

#### 6. ガンマセクターゼ阻害剤

活性な -セクターゼは4種のタンパク質の複合体であり、そのうちのプレセニリン ( P S )により、タンパク質の膜貫通ドメイン内に位置する2つの高度に保存されたアスパラギン酸、D 2 5 7およびD 3 8 5を通じて活性部位がもたらされると考えられている。活性になるには、未成熟 P S がプロセシングされ、他のタンパク質との複合体に組み入れられて安定にならなければならない。これは、「プレセニリナーゼ ( p r e s e n i l i n a s e ) 」と称される酵素によるタンパク質分解性の切断を含み、これにより、成熟プロテアーゼにおいて互いに関連したままのN末端断片およびC末端断片が生じ、各断片は2つの必須のアスパラギン酸のうちの1つを含有する。しかし、この成熟 P S でさえ、複合体の他のメンバーの不在下ではA P Pを切断するのに不十分である。ニカストリン、A p h - 1、およびP e n - 2と同定されたこれらのタンパク質は複合体の成熟化、安定化および輸送を調節するものである。例えば、P e n - 2は、A p h - 1およびニカストリンとの複合体に組み入れられたら、未成熟 P S のプレセニリナーゼによる切断のために必要である。まとめると、4種のタンパク質の複合体により -セクターゼ活性が再構成され得、P S 単独で、時にはそれ自体が、複合体の活性なコアとして提唱されたその役割に基づいて「 -セクターゼ」と称される。

【0131】

これまでに記載された最も特異的かつ有効な -セクターゼ阻害剤としては、P S - 1とP S - 2の両方を阻害するN - t N - f S . S - ジフルオロフェンアセチル - L - アラニル 1 - S - フェニルグリシン - f - ブチルエステル ( D A P T ) が挙げられる。D A P T は、置き換えアッセイにおいて -セクターゼ活性部位について中程度に競合し得る細胞浸透性ジペプチド非遷移状態類似体であり、D A P T の結合部位と活性部位の間にいくつかの重複が示唆される。

【0132】

ペプチド模倣阻害剤としては、Shearmenら ( 2 0 0 0 年 ) に記載されている L - 6 8 5 , 4 5 8 ( ( 5 S ) - ( t - ブトキシカルボニルアミノ ) - 6 - フェニル - ( 4 R ) ヒドロキシ - ( 2 R ) ベンジルヘキサノイル ) - L - l e u - L - p h e - アミド ) が挙げられる。A L X - 2 6 0 - 1 2 7 は、Wolfeら ( 1 9 9 8 年 ) に記載されている、 -セクターゼの可逆的なジフルオロケトンペプチド模倣阻害剤である。光活性化ガンマ - セクターゼ阻害剤は -セクターゼの活性部位を対象とし、Liら ( 2 0 0 0 年 ) に記載されている。スリンダク硫化物 ( S S i d e ) は、組換えアミロイドベータ前駆タンパク質 C 1 0 0 を基質として使用した i n v i t r o ガンマ - セクターゼアッセイにおいてガンマ - セクターゼに直接作用し、ガンマ - セクターゼ活性を優先的に阻害する ( T a k a h a s h i ら ( 2 0 0 3 年 ) ) 。公知のガンマ - セクターゼ阻害剤のさらなる例としては、これだけに限定されないが、R O 4 9 2 9 0 9 7、B M S - 7 0 8 1 6 3、セマガセスタット、M K - 0 7 5 2、Y O - 0 1 0 2 7、L Y - 4 1 1 5 7 5、L Y 2 8 1 1 3 7 6、および ( R ) - フルルビプロフェンが挙げられる。

【0133】

-セクターゼ阻害剤をスクリーニングするための様々なアッセイ、例えば、Takahashiら、( 2 0 0 3 年 ) によるもの、Pinnixら ( 2 0 0 0 年 ) による、A P P の推定 C 末端断片 - ガンマの検出に基づくアッセイ ; McLendonら ( 2 0 0 0 年 ) による、 -セクターゼ活性についての無細胞アッセイも記載されている。

【0134】

#### B. 分化因子

本開示に例示されている内胚葉前駆体促進性増殖因子は、単一ホルモン性隣ベータ細胞にさらに分化し得る細胞の増殖を促進することができる可溶性増殖因子 ( ペプチドホルモ

10

20

30

40

50

ン、サイトカイン、リガンド - 受容体複合体、および他の化合物) を含み得る。そのような作用剤の非限定的な例としては、これだけに限定されないが、基本 FGF (bFGF)、BMP - 4、EGF、アクチビンA、TGFベータ、およびVEGFなどの増殖因子、またはそのアイソフォームもしくはバリエーションが挙げられる。

【0135】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の分化因子はBMP - 4であり、これは、造血前駆細胞の増殖および分化潜在性の調節に重要である (Bhardwajら、2001年; Bhatiaら、1999年; Chadwick 2003年)。BMP - 4は、内胚葉前駆細胞の自己再生の促進もし得る。

【0136】

さらなる実施形態では、1つまたは複数の分化因子は血管内皮増殖因子 (VEGF) であり、これは、胚循環系の形成および血管新生に關与する重要なシグナル伝達タンパク質である。VEGFは、血管内皮および他の細胞型 (例えば、神経細胞、がん細胞、腎臓上皮細胞) を含めた種々の細胞型に影響を及ぼし得る。VEGFの機能はがん、糖尿病、自己免疫疾患、および眼血管疾患を含めた種々の病態において重要であることも示されている。

【0137】

内胚葉前駆体および腓島ベータ細胞をもたらす分化は、細胞を、これだけに限定されないが、アクチビンA、ノードル、Wnt3A、BMP4、VEGF、FGF2/bFGF、EGF、FGF10、B27、TGFベータ、ニコチンアミド、およびレチノイン酸を含めた、この節に記載されている因子の任意の1つまたは複数と接触させることによって実現することができる。また、Erg - 1などのEts転写因子、ならびにGFIは、ベータ細胞分化に直接および/または間接的に關与することが公知である (Kobberupら、2007年; Shroyerら、2005年)。さらに、理論に束縛されることなく、発現が低酸素によって誘導されるHIF - 1は、調節されたベータ細胞機能であることが公知である (Chengら、2010年)。

【0138】

V. 細胞培養

「培養した」という用語は、細胞に關して本明細書で使用される場合、in vitro環境において細胞分裂しているまたは細胞分裂していない1つまたは複数の細胞を指し得る。in vitro環境は、例えば適切な液体培地または寒天などの、細胞をin vitroで維持するために適した当技術分野で公知の任意の培地であってよい。細胞培養のための適切なin vitro環境の特定の実施例は、Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques (1994年); Cells: a laboratory manual (1998年); およびAnimal Cells: culture and media (1994年) に記載されている。

【0139】

「細胞株」という用語は、本明細書で使用される場合、途絶えることなく少なくとも1回継代することができる培養細胞を指し得る。本発明は、無制限に継代することができる細胞株に關する。細胞継代は以下で定義されている。

【0140】

「浮遊液」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞が固体支持体に付着していない細胞培養条件を指し得る。浮遊液中で増殖している細胞を、増殖の間に当業者に周知の装置を使用して攪拌することができる。

【0141】

「単層」という用語は、本明細書で使用される場合、適切な培養条件で増殖している間、固体支持体に付着している細胞を指し得る。適切な増殖条件下で単層において増殖している細胞のごく一部が単層内の細胞に付着し得るが固体支持体には付着しない。

【0142】

「プレーティングした (plated)」または「プレーティング (plating)

10

20

30

40

50

」という用語は、細胞に関して本明細書で使用される場合、*in vitro*において細胞培養物を樹立することを指し得る。例えば、細胞を細胞培養培地中に希釈し、次いで、細胞培養プレート、ディッシュ、またはフラスコに加えることができる。細胞培養プレートは、一般に当業者に公知である。細胞を種々の濃度および/または細胞密度でプレATINGすることができる。

【0143】

「細胞プレATING」という用語は、「細胞継代」という用語に拡大することもできる。本発明の細胞は、当業者に周知の細胞培養技法を使用して継代することができる。「細胞継代」という用語は、(1)細胞を固体支持体または基質から放出させ、これらの細胞を解離するステップ、および(2)細胞を、さらなる細胞増殖のために適した培地中に希釈するステップを伴う技法を指し得る。細胞継代は、培養細胞を含有する液体培地の一部を取り出し、元の培養容器に液体培地を添加して細胞を希釈し、さらに細胞増殖させることも指し得る。さらに、さらなる細胞増殖のために適した培地を補充した新しい培養容器に細胞を添加することもできる。

10

【0144】

「低酸素」および「低酸素条件」という用語は、本明細書で使用される場合、周囲空気の酸素濃度(およそ15%~20%酸素)と比較して低い酸素濃度を特徴とする条件を指し得る。一態様では、低酸素条件は、約10%未満の酸素濃度を特徴とする。別の態様では、低酸素条件は、約1%~10%、1%~9%、1%~8%、1%~7%、1%~6%、1%~5%、1%~4%、1%~3%、または1%~2%、またはその中に導き出せる任意の範囲の酸素濃度を特徴とする。

20

【0145】

「増殖」という用語は、細胞に関して本明細書で使用される場合、ある期間にわたって数が増加し得る細胞の群を指し得る。

【0146】

「恒久的」または「不死化」という用語は、細胞に関して本明細書で使用される場合、*in vitro*環境において培養している間、細胞が途絶えるまで多数回細胞分裂し、細胞数が倍増し得る細胞を指し得る。永久細胞株は、培養物中のかなりの数の細胞が途絶えるまでに10回超倍増し得る。永久細胞株は、培養物中のかなりの数の細胞が途絶えるまでに20回超または30回超倍増し得ることが好ましい。永久細胞株は、培養物中のかなりの数の細胞が途絶えるまでに40回超または50回超倍増し得ることがより好ましい。永久細胞株は、培養物中のかなりの数の細胞が死亡するまでに60回超倍増し得ることが最も好ましい。

30

【0147】

出発細胞および分化細胞は、一般に、培養培地および条件に関して異なる要件を有する。通常は、少なくとも培養の最初の段階を、分化因子を導入した後に、培地の存在下、出発細胞を増殖させるために適することが公知の培養条件下で行う。この後に、分化培地の存在下、分化細胞に適することが公知の条件下でのその後の培養期間が続く。分化のために十分な時間の後、分化細胞を増大させるために、増大培地中で分化細胞をさらに培養することができる。そのような増大培地は、上記の1種または複数種のシグナル伝達阻害剤を含んでもよく、基本的にこれらの阻害剤を含まない培養培地を含んでもよい。

40

【0148】

培養の最初の段階は、最大6日間、より好ましくは最大4日間、および下記の実施形態では、3日間以下、より詳細には最大または約1日の期間にわたることが好ましい。その後の1種または複数種のシグナル伝達阻害剤を含む分化培地中での培養の段階は、少なくともまたは約2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、28日間、29日間、30日間、31日間、32日間、33日間、またはその中に導き出せる任意の範囲の期間にわたることが適切であり、最大120日

50

間、好ましくは最大10日間にわたってよい。内胚葉前駆体またはベータ細胞を生成するために使用される下記の実施形態では、培養の最初の段階は約5日間の期間にわたり、その後の段階は種々の分化培地の存在下で培養毎に約26~44日間にわたった。分化条件は、フィーダー細胞を基本的に含まないものであってよい。別の態様では、分化培地は既知組成のものであってよい。分化を改善するために、分化培地は、高濃度のFGFをさらに含んでよく、TGF- $\beta$ を基本的に含まないものであってよい。いくつかの場合には、培地は、TGF- $\beta$ を含んでよい。

#### 【0149】

##### A. 一般条件

本発明による培養条件は、使用される培地および幹細胞に応じて適切に定義される。本発明のある特定の態様による培地は、TeSR、Essential 8 Medium、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option、IMDM、Medium 199、Eagle MEM、MEM、DMEM、Ham、RPMI 1640およびFischer培地のいずれかなどの動物細胞を培養するために基本培地として使用される培地、ならびにそれらの任意の組合せを使用して調製することができるが、培地は、動物細胞を培養するために使用することができる限りは、これらに特に限定されない。

10

#### 【0150】

本発明による培地は、血清含有培地中であっても無血清培地中であってもよい。無血清培地とは、加工または精製されていない血清を伴わない培地を指し、したがって、それらとしては、精製された血液由来成分または動物組織由来成分（例えば、増殖因子など）を含む培地を挙げることができる。異種動物由来成分の混入を予防する観点から、血清は、幹細胞（複数可）の動物と同じ動物に由来するものであってよい。

20

#### 【0151】

本発明による培地は、任意の血清の代替物を含有してもよく、それを含有しなくてもよい。血清の代替物としては、アルブミンを適切に含有する材料（例えば、脂質リッチアルブミン、アルブミン代用物、例えば組換えアルブミンなど、植物デンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解産物など）、トランスフェリン（または他の鉄輸送体）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆物質、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロール（thioglycerol）、またはそれに対する等価物を挙げることができる。血清の代替物は、例えば、国際公開第98/30679号に開示されている方法によって調製することができる。あるいは、より好都合なように、任意の市販の材料を使用することができる。市販の材料としては、knockout Serum Replacement (KSR)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco)、およびGlutamax (Gibco)が挙げられる。

30

#### 【0152】

本発明の培地は、脂肪酸または脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸など）、ビタミン（複数可）、増殖因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、および無機塩も含有してよい。2-メルカプトエタノールの濃度は、例えば、約0.05~1.0mM、特に約0.1~0.5mMであってよいが、濃度は、幹細胞（複数可）を培養するために適する限りは特にこれに限定されない。

40

#### 【0153】

本発明の細胞（複数可）を培養するために使用される培養容器としては、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリ皿、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンパーズスライド、チューブ、トレー、CellSTACK（登録商標）Chamber、培養バッグ、およびローラーピンを挙げることができるが、その中で細胞を培養することができる限りは特にこれだけに限定されない。幹細胞は、培養物の必要性に応じて、少なくともまたは約0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10ml、20ml、30ml、40ml、50ml、100ml、150ml、2

50

00 ml、250 ml、300 ml、350 ml、400 ml、450 ml、500 ml、550 ml、600 ml、800 ml、1000 ml、1500 ml、またはその中に導き出せる任意の範囲の体積で培養することができる。ある特定の実施形態では、培養容器はバイリアクターであってよく、これは、生物活性のある環境を支持する任意のデバイスまたは系を指し得る。バイリアクターの容積は少なくともまたは約2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、またはその中に導き出せる任意の範囲であってよい。

#### 【0154】

培養容器は細胞接着性であっても非接着性であってもよく、目的に応じて選択することができる。細胞接着性培養容器は、容器表面の細胞に対する接着性を改善するために、細胞外マトリックス(ECM)などの細胞接着用の任意の基材でコーティングすることができる。細胞接着用の基材は、幹細胞またはフィーダー細胞(使用される場合)を付着させることが意図された任意の材料であってよい。細胞接着用の基材としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ピトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、PLOラミニン、フィブリン、トロンピン、およびRetroNectinならびにそれらの混合物、例えば、Matrigel(商標)、および溶解させた細胞膜調製物が挙げられる(Klimanskayaら、2005年)。

10

#### 【0155】

他の培養条件は、適切に定義されたものであってよい。例えば、培養温度は、約30~40、例えば、少なくともまたは約31、32、33、34、35、36、37、38、39であってよいが、特にこれらに限定されない。CO<sub>2</sub>濃度は、約1~10%、例えば、約2~5%、またはその中に導き出せる任意の範囲であってよい。酸素分圧は、少なくともまたは約1%、5%、8%、10%、20%、またはその中に導き出せる任意の範囲であってよい。酸素分圧は、正常酸素の培養物に関しては20%であることが好ましい。正常酸素の培養条件および低酸素の培養条件は以下にさらに記載されている。

20

#### 【0156】

ある特定の態様における本発明の方法は、例えば、細胞の接着培養に使用することができる。この場合、細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することができる。本発明の方法においてフィーダー細胞を使用する場合は、胎児線維芽細胞などの間質細胞をフィーダー細胞として使用することができる(例えば、Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual(1994年); Gene Targeting, A Practical Approach(1993年); Martin(1981年); EvansおよびKaufman(1981年); Jainchilら、(1969年); Nakanoら(1996年); Kodamaら(1982年); および国際特許公開第01/088100号および同第2005/080554号を参照されたい)。

30

#### 【0157】

ある特定の態様における本発明の方法は、担体上での浮遊培養(Fernandesら、2004年)またはゲル/バイオポリマー封入(米国特許出願公開第2007/0116680号)を含めた、細胞の浮遊培養にも使用することができる。細胞の浮遊培養という用語は、細胞を培地中の培養容器またはフィーダー細胞(使用される場合)に対して非接着性条件で培養することを意味する。細胞の浮遊培養は、細胞の解離培養および集合細胞浮遊培養を含む。細胞の解離培養という用語は、浮遊した細胞を培養することを意味し、細胞の解離培養は、複数の細胞で構成される単一細胞の解離培養または小細胞集合体の解離培養である(例えば、細胞約2~400個)。上述の解離培養を継続すると、培養された解離させた細胞がより大きな細胞の集合体を形成し、その後、集合体浮遊培養を実施することができる。集合体浮遊培養は、胚様体培養法(Kellerら、1995年を参照されたい)、およびSFEF法(Watanabeら、2005年; 国際公開第2005/123902号)を含む。

40

50

## 【 0 1 5 8 】

本発明の一部の実施形態の方法に従って浮遊液中で細胞を培養するために使用される培養容器は、内面が、その中で培養された細胞が接着または付着することができないように設計された（例えば、表面への付着または接着を予防するために非組織培養で処理した細胞）適切な純度グレードを有する任意の組織培養容器であってよい。スケーラブルな培養物を得るために、本発明の一部の実施形態に従った培養を、温度、かき混ぜ、pH、および $pO_2$ などの培養パラメータが適切なデバイスを使用して自動的に実施される制御された培養系（好ましくはコンピュータ制御された培養系）を使用して実施することが好ましい。培養パラメータが記録されたら、細胞増大を促進するために、必要に応じて系を培養パラメータの自動調整に設定する。細胞は、動的条件下（すなわち、細胞を浮遊培養で一定の動きに供する条件下）で培養することもでき、それらの増殖能力を保護しながら非動的条件下（すなわち、静置培養）で培養することもできる。細胞の非動的培養のためには、細胞をコーティングしていない58mmのペトリ皿（Greiner、Frickenhausen、Germany）で培養することができる。細胞の動的培養のためには、細胞を、制御ユニットに接続することができ、したがって、制御された培養系をもたらすことができるスピナーフラスコ（例えば、200ml~1000ml、例えば、250mlのもの；100mlのもの；または125mlのErlenmeyer中）で培養することができる。培養容器（例えば、スピナーフラスコ、Erlenmeyer）を継続的に振とうする。本発明の一部の実施形態によると、振とう機を使用して培養容器を毎分90回（rpm）振とうする。本発明の一部の実施形態によると、培養培地を毎日交換する。

10

20

## 【 0 1 5 9 】

## B. 多能性幹細胞の培養

多能性幹細胞の培養物は、集団内の実質的な割合の幹細胞およびそれらの誘導体が胚または成体起源の分化細胞とは区別される未分化細胞の形態学的特性を示す場合、「未分化」と記載される。未分化のES細胞またはiPS細胞は当業者には理解され、一般には、2次元の顕微鏡写真で核/細胞質比が高い細胞のコロニー中に現れ、核小体において顕著である。未分化細胞のコロニーには分化している細胞が近隣し得ることが理解される。

## 【 0 1 6 0 】

ES細胞は、細胞を血清およびフィーダー層、一般にはマウス胚線維芽細胞の存在下で培養することによって未分化の状態を維持することができる。幹細胞を未分化の状態を維持するための他の方法も公知である。例えば、マウスES細胞は、フィーダー層を用いずにLIFの存在下で培養することによって未分化の状態を維持することができる。しかし、マウスES細胞とは異なり、既存のヒトES細胞はLIFには応答しない。ヒトES細胞は、線維芽細胞のフィーダー層上、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下でES細胞を培養することによって（Amitら、2000年）、または、フィーダー層を用いずに、線維芽細胞馴化培地とそれに加えて塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、Matrigel（商標）もしくはラミニンなどのタンパク質マトリックス上で培養することによって（Xuら、2001年；米国特許第6,833,269号）、未分化の状態を維持することができる。

30

40

## 【 0 1 6 1 】

ES細胞を調製し、培養するための方法は、奇形癌および胚性幹細胞を含めた細胞生物学、組織培養物、および発生学における標準の教本および総説において見いだすことができる：A practical approach（1987年）；Guide to Techniques in Mouse Development（1993年）；Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro（1993年）；Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy（1998年）、全て参照により本明細書に組み込まれる。組織培養に使用される標準の方法は、一般には、Animal Cell Culture（1987年）；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells（1987年）；およびCurrent Protocols in Molecular Biology and Short Protocols

50

in *Molecular Biology* (1987年および1995年)に記載されている。

【0162】

体細胞に再プログラミング因子を導入するか、または体細胞を再プログラミング因子と接触させた後、これらの細胞を、多能性および未分化の状態を維持するために十分な培地中で培養することができる。本発明において生成された人工多能性幹(iPS)細胞の培養には、これによって参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2007/0238170号、同第2003/0211603号、および同第2008/0171385号に記載の通り、霊長類の多能性幹細胞、特に胚性幹細胞を培養するために開発された種々の培地および技法を使用することができる。当業者には公知である、幹細胞を培養し、多能性を維持するための追加的な方法を本発明と共に使用することができることが理解される。

10

【0163】

ある特定の実施形態では、未定義の条件を使用することができ、例えば、幹細胞を未分化の状態に維持するために、多能性細胞を線維芽細胞フィーダー細胞または線維芽細胞フィーダー細胞に曝露している培地中で培養することができる。

【0164】

あるいは、TeSR培地(Ludwigら、2006年a; Ludwigら、2006年b)またはEssential 8培地(Chenら、2011年)などの定義済みのフィーダーに依存しない培養系を使用して、多能性細胞を培養し、基本的に未分化の状態に維持することができる。フィーダーに依存しない培養系および培地を使用して多能性細胞を培養し、維持することができる。これらの手法により、マウス線維芽細胞「フィーダー層」を必要とせずに、引き出されたヒトiPS細胞ならびにヒト胚性幹細胞を基本的に未分化の状態のままにすることが可能になる。本明細書に記載の通り、所望の通り費用を低減するために、これらの方法に対して種々の改変を行うことができる。

20

【0165】

種々のマトリックス成分をヒト多能性幹細胞の培養および維持に使用することができる。例えば、それらの全体が参照により組み込まれるLudwigら(2006年a; 2006年b)に記載の通り、Matrigel(商標)、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、PLOラミニン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブリン塊、およびピトロネクチンの組合せを、多能性細胞の増殖のための固体支持体をもたらす手段として培養表面をコーティングするために使用することができる。特に、Matrigel(商標)を使用して、ヒト多能性幹細胞の細胞培養および維持のための基質をもたらすことができる。Matrigel(商標)は、マウス腫瘍細胞から分泌されたゼラチン質のタンパク質混合物であり、BD Biosciences(New Jersey, USA)により市販されている。この混合物は、多くの組織に見いだされる複雑な細胞外の環境に似ており、細胞生物学者により細胞培養のための基材として使用されている。

30

【0166】

C. 細胞継代

本発明のある特定の態様は、細胞を解離するステップをさらに伴い得る。細胞解離は、任意の公知の手順を使用して実施することができる。これらの手順は、キレート化剤(例えば、EDTAなど)、酵素(例えば、トリプシン、コラゲナーゼなど)などを用いた処理、および機械的解離(例えば、ピペティングなど)などの操作を含む。解離の前および/またはその後、ROCK阻害剤またはミオシンII阻害剤を用いて細胞(複数可)を処理することができる。例えば、解離後にのみ細胞(複数可)を処理することができる。

40

【0167】

細胞培養の一部のさらなる実施形態では、培養容器がいっぱいになったら、解離に適した任意の方法によってコロニーを分割して、集合した細胞、またはさらには単一細胞にし、次いでその細胞を継代のために新しい培養容器に入れることができる。細胞継代は、培養した条件下で長期間にわたって細胞を生きたままに維持し、増殖させることを可能にす

50

る技法である。通常、細胞が約70%~100%集密になったら継代する。

【0168】

細胞の単一細胞への解離、その後の単一細胞の継代は、本方法において、分化させるための細胞の増大、細胞選別、および定義済みの播種が容易になること、ならびに培養手順およびクローンの増大の自動化が可能になることなどのいくつかの有利な点を伴って使用することができる。例えば、単一細胞からクローン的に引き出せる後代細胞は遺伝子構造が同種であり得、かつ/または細胞周期が同時に起こり得、それにより標的化分化が増大し得る。単一細胞継代のための典型的な方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0171385号に記載の通りであり得る。

【0169】

ある特定の実施形態では、細胞を単一の個々の細胞、または単一の個々の細胞と細胞を2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ超含む小細胞クラスターの組合せに解離させることができる。解離は、機械力によって、または、クエン酸ナトリウムなどの細胞解離剤、もしくは酵素、例えば、トリプシン、トリプシン-EDTA、TrypLE Selectなどによって実現することができる。

【0170】

細胞の供給源および増大の必要性に基づいて、解離させた細胞を個別にまたは小さなクラスターとして、少なくともまたは約1:2、1:4、1:5、1:6、1:8、1:10、1:20、1:40、1:50、1:100、1:150、1:200など、またはその中に導き出せる任意の範囲の分割比(splitting ratio)で新しい培養容器に移すことができる。浮遊細胞株分割比(split ratio)は、培養物細胞浮遊液の体積に対してなされたものであってよい。継代の間隔は、少なくともまたは約1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、7日毎、8日毎、9日毎、10日毎、11日毎、12日毎、13日毎、14日毎、15日毎、16日毎、17日毎、18日毎、19日毎、20日毎、またはその中に導き出せる任意の範囲であってよい。例えば、異なる酵素的継代プロトコールについての実現可能な分割比(split ratio)は、3~7日毎に1:2、4~7日毎に1:3、および、およそ7日ごとに1:5~1:10、7日ごとに1:50~1:100であってよい。高い分割比(split ratio)を使用する場合、継代の間隔を少なくとも12~14日または過剰な自然発生的な分化または細胞死に起因する細胞の損失が伴わない任意の期間延長することができる。

【0171】

ある特定の態様では、単一細胞継代は、上記の通り、ROCK阻害剤などの、クローニング効率および細胞生存を増大させるために有効な小分子の存在下のものであってよい。そのようなROCK阻害剤、例えば、Y-27632、HA-1077、H-1152、HA-100、またはプレビスタチン(blebbistatin)を有効濃度で、例えば、少なくともまたは約0.02 μM、0.05 μM、0.1 μM、0.2 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、10 μM、15 μM、20 μM、25 μM、30 μM、35 μM、40 μM、45 μM、50 μM~約100 μM、またはその中に導き出せる任意の範囲で使用することができる。

【0172】

D. 酸素正常および低酸素

低酸素培養は、例えば、ProOx C (BioSpherix, Lacona, NY); Hypoxic Glove Box (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, MI); HypOxystation (HypOxygen, Frederick MD); またはHypoxia Chamber (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC)などの当技術分野で公知の種々の培養チャンパーのいずれかを用いて実現することができる。

【0173】

正常酸素条件は、一般に、細胞の培養に関して規範的な酸素レベルを含む。別段の定め

10

20

30

40

50

がなければ、正常酸素条件下での細胞の培養には、当業者に公知の方法、装置および成分を利用することができる。そのような方法を直接利用することもでき、正常酸素の培養条件下での使用に適応させることもできる。

【0174】

本教示の種々の態様では、細胞を増殖させるまたは維持する低酸素の雰囲気や正常酸素雰囲気で置き換えることができる。一部の実施形態では、細胞を低酸素条件下で増殖させることができ、正常酸素条件下で分化させることができる。培養物を低酸素条件下で維持する持続時間は、当業者が常套的な実験によって決定することができる。同様に、低酸素培養後に培養物を正常酸素条件下で維持する持続時間も、当業者が常套的な実験によって決定することができる。

10

【0175】

本明細書で使用される場合、低酸素条件は、外界空気の酸素濃度（およそ15%～20%酸素）と比較して低い酸素濃度を特徴とする。参考として、ヒトの体内のO<sub>2</sub>濃度は、脳では0.5%～7%にわたり、眼では1%～5%にわたり、肝臓、心臓および腎臓では4%～12%にわたり、子宮では3%～5%にわたる。一態様では、低酸素条件は、約10%未満の酸素濃度を特徴とする。別の態様では、低酸素条件は、約1%～10%、1%～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、1%～3%、または1%～2%の酸素濃度を特徴とする。ある特定の態様では、系では培養容器中約1～3%酸素が維持される。低酸素条件は、周囲ガス濃度を制御することが可能な培養装置、例えば、嫌気性チャンバーを使用することによって創出し、維持することができる。

20

【0176】

一般には、増大および播種のために、15%～20%酸素および5%CO<sub>2</sub>を伴う正常な雰囲気下で細胞培養物のインキュベーションを実施し、その時点で低酸素培養物を95%窒素/5%CO<sub>2</sub>で満たした気密チャンバーに分割し、したがって、培養培地中で低酸素環境が創出される。

【0177】

本発明の培養ステップのいずれかで使用される増殖培地または培養培地は、正常酸素条件下であるか低酸素条件下であるかにかかわらず、血清を含んでもよく、血清を含まなくてもよい。さらに、低酸素培養(cultivation)と有酸素培養(cultivation)の両方に同じ培地を使用することができる。

30

【0178】

インキュベーション条件は、低酸素増殖条件を維持するためのpH、温度、およびガス（例えば、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>など）の適切な条件である。

【0179】

VI. マーカーの発現

細胞培養物または細胞集団における特定の細胞型の量を決定するために、培養物中または集団内の特定の細胞型を他の細胞と区別する方法が望ましい。したがって、その存在、不在、および/または相対的な発現レベルが、本発明に従って作製される特定の細胞型に特異的であるマーカーが提供され、同様にそのようなマーカーの発現を検出し、決定するための方法が提供される。

40

【0180】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、材料または物質の作製ならびに材料または物質の作製のレベルまたは量を指す。したがって、特異的なマーカーの発現を決定することは、発現するマーカーの相対量もしくは絶対量のいずれかを検出すること、または単にマーカーの存在または不在を検出することを指す。

【0181】

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

50

る。

【0182】

マーカーの存在、不在、および/または発現レベルは、定量的PCR (qPCR) によって決定することができる。例えば、CXCR-4、CD117、SOX17、FOXA2、FOXA1、CD31、CD34、およびHNF4Aなどのある特定の遺伝子マーカーによって産生される転写物の量を定量的qPCRによって決定する。さらに、免疫組織化学的検査またはフローサイトメトリーを使用して、上記の遺伝子によって発現されるタンパク質を検出することができる。qPCR、フローサイトメトリー、および免疫組織化学的検査を使用して、そのようなマーカーの量または相対的な割合を同定および決定することができる。

10

【0183】

VII. 内胚葉前駆体およびベータ細胞の使用

本発明のある特定の態様の方法および組成物によって提供される内胚葉前駆体およびベータ細胞は、種々の適用において使用することができる。これらとしては、これだけに限定されないが、いくつか挙げると、*in vivo*におけるベータ細胞の移植または埋め込み；細胞傷害性の化合物、発がん物質、突然変異原増殖/制御因子、医薬化合物などの*in vitro*におけるスクリーニング；糖尿病の機構の解明；薬物および/または増殖因子が作動する機構の試験；患者における糖尿病の診断およびモニタリング；遺伝子療法；ならびに生物活性のある産物の産生がある。

【0184】

A. 試験化合物のスクリーニング

本発明の、分化により引き出された内胚葉前駆細胞またはベータ細胞を使用して、本明細書において提供されるベータ細胞の特性に影響を及ぼす因子（例えば、溶媒、小分子薬物、ペプチド、およびポリヌクレオチドなど）または環境条件（例えば、培養条件または操作など）についてスクリーニングすることができる。

20

【0185】

いくつかの適用では、幹細胞（分化したものまたは未分化のもの）を使用して、細胞の膵島ベータ細胞系列に沿った成熟化を促進する、またはそのような細胞の培養物中での長期間の増殖および維持を促進する因子をスクリーニングする。例えば、候補ベータ細胞成熟化因子または増殖因子を異なるウェル中の内胚葉前駆細胞に添加し、次いで、それにより生じたあらゆる表現型の変化をさらなる培養および細胞の使用に関して望ましい基準に従って決定することによってそれらを試験する。

30

【0186】

本発明の特定のスクリーニングへの適用は、薬物研究における医薬化合物の試験に関する。読者は一般に標準の教本である*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*、Academic Press、1997年、および米国特許第5,030,015号を参照する）。本発明のある特定の態様では、内胚葉前駆細胞またはベータ細胞系列に分化する細胞は、短期培養において内胚葉細胞株または一次内胚葉細胞に対して予め実施した標準の薬物スクリーニングおよび毒性アッセイのための試験細胞としての役割を果たす。候補医薬化合物の活性の評価は、一般に、本発明のある特定の態様で提供される内胚葉前駆体またはベータ細胞を候補化合物と混ぜ、化合物に起因する細胞の形態、マーカー表現型、または代謝活性のあらゆる変化を決定し（処理していない細胞または不活性な化合物で処理した細胞と比較して）、次いで、化合物の効果と観察された変化との相互関係を明らかにすることを伴う。化合物が内胚葉前駆細胞またはベータ細胞に対する薬理学的効果を有するように設計されていることを理由に、または、他の箇所に対する影響を有するように設計した化合物がベータ細胞に対する意図されたものではない副作用を有し得ることを理由に、スクリーニングを行うことができる。2種またはそれ超の薬物を組み合わせて（細胞と同時にまたは逐次的に混ぜることによって）試験して、可能性のある薬物間相互作用効果を検出することができる。いくつかの適用では、化合物を、ベータ細胞に対する毒性についてスクリーニングする。例えば、Kuzuyaら、2001年を参照されたい。

40

50

## 【 0 1 8 7 】

## B . ベータ細胞療法および移植

本発明は、おそらく糖尿病に起因してそのような療法を必要とする対象に対する、ある程度の膵臓機能を修復するための、本明細書において提供されるベータ細胞の使用も提供する。例えば、本明細書に開示されている方法によって引き出された膵島ベータ細胞および内胚葉前駆細胞を使用して、糖尿病を治療することができる（例えば、移植片を工学的に作製することによってなど）。

## 【 0 1 8 8 】

本明細書において提供されるベータ細胞の治療への適用に対する適合性を決定するために、細胞をまず適切な動物モデルにおいて試験することができる。1つのレベルでは、細胞を、*in vivo*において生存し、表現型を維持する能力について評価する。本発明で提供されるベータ細胞を免疫不全動物（例えば、SCIDマウス、または化学的にまたは放射線照射によって免疫不全にした動物など）の、腎臓被膜の下、膵臓内、または肝小葉内などのさらに観察しやすい部位に投与する。数日から数週間またはそれ超までの期間後に組織を採取し、多能性幹細胞などの出発細胞型が依然として存在するかどうかに関して評価する。これは、投与される細胞に検出可能な標識（例えば、緑色蛍光タンパク質、または $\beta$ -ガラクトシダーゼなど）をもたらすことによって、または、投与される細胞に特異的な構成的マーカーを測定することによって実施することができる。本発明で提供されるベータ細胞をげっ歯類モデルにおいて試験する場合、投与される細胞の存在および表現型は、ヒト特異的な抗体を使用した免疫組織化学的検査もしくはELISAによって、またはヒトポリヌクレオチド配列に特異的な増幅を引き起こすプライマーおよびハイブリダイゼーション条件を使用したRT-PCR分析によって評価することができる。遺伝子発現をmRNAレベルまたはタンパク質レベルで評価するための適切なマーカーは本開示の他の箇所において提供される。

## 【 0 1 8 9 】

本発明の方法によって提供されるベータ細胞および内胚葉前駆細胞を、糖尿病を治療するそれらの能力について種々の動物モデルにおいて試験することができる。本発明のある特定の態様において使用することができる種々のそのような動物モデルは、例えば、SrinivasanおよびRamarao（2007年）およびKing（2012年）において考察されている。好ましい動物モデルは、実験的な糖尿病が誘導されるようにストレプトゾトシンを用いて処理した免疫無防備状態のマウスである。分化させたベータ細胞を腎臓被膜内に埋め込むことができ、細胞が機能性であれば、糖尿病は逆転する。このアッセイは、一般に、死体島の機能を試験するために使用される。

## 【 0 1 9 0 】

その酵素のプロファイル、または動物モデルにおける有効性に従って望ましい機能特性が実証される、本発明のある特定の態様で提供されるベータ細胞および内胚葉前駆細胞は、それを必要とするヒト対象への直接投与にも適し得る。ベータ細胞を直接膵臓に送達することができる。

## 【 0 1 9 1 】

本発明のある特定の態様で提供されるベータ細胞または内胚葉前駆体は、任意のそれを必要とする対象の療法のために使用することができる。そのような療法に適し得る好ましいヒトの状態は糖尿病である。ヒト療法に関して、用量は、一般に、細胞約 $10^9$ 個から $10^{12}$ 個の間、一般には、細胞約 $5 \times 10^9$ から $5 \times 10^{10}$ 個の間であり、対象の体重、苦痛の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製に関わる能力に関して調整される。治療の様式および適切な用量を決定することの最終責任は管理する臨床医にある。

## 【 0 1 9 2 】

本発明のある特定の態様は、バイオエンジニアリングによって作製された組織移植片の一部を形成する、本明細書において提供されるベータ細胞または内胚葉前駆細胞を含む。そのような組織移植片は、膵組織移植片であってよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 9 3 】

C. 商業目的、治療目的、および研究目的のための配布

製造、配布、および使用のために、本発明の内胚葉前駆体を含めたベータ細胞系列細胞は、一般には、等張性賦形剤または培養培地中の細胞培養物または浮遊物の形態で、任意選択で輸送または保管を容易にするために凍結して供給される。

## 【 0 1 9 4 】

本発明は、製造、分布、または使用の間のいつでも存在する細胞のセットまたは組合せを含む異なる試薬系も包含する。細胞セットは、本開示に記載され、例示されているが、分化由来細胞（ベータ細胞系列細胞、それらの前駆物質および亜型）に限定されない細胞集団の2つのまたはそれ超の任意の組合せを、未分化の幹細胞または他の分化細胞型と組み合わせて含む。セット内の細胞集団は、時には同じゲノムまたはその遺伝子改変された形態を共有する。セット内の各細胞型は一緒に、または、同じ設備内もしくは異なる場所で、同じ時間もしくは違う時間に、同じ実体または取引関係を有する異なる実体の制御下で包装されてよい。

## 【実施例】

## 【 0 1 9 5 】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示されている技法は、本発明者により、本発明の実施においてよく機能することが発見された技法であり、したがって、それを実施するための好ましい方式を構成するとみなせることが当業者には理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態に多くの変更を行うことができ、それでもなお、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを理解するべきである。

## 【 0 1 9 6 】

(実施例1)

胚体内胚葉 (DE) 細胞の生成

TeSRまたはEssential 8培地の存在下、フィーダーフリー条件下でヒトiPSCを維持した。iPSCの単層内胚葉前駆体分化のために、PSCをMatrigelでコーティングしたディッシュに80%集密度でプレーティングした。未分化のiPSCを、10%SFDM、1xグルタミン、MTG ( $4.5 \times 10^{-4}$  M)を補充したRPMI培地中、アクチビンA (100 ng/ml)またはノーダル (100 ng/ml)の存在下、無血清条件下でゼロ日目に培養し、その後、アスコルビン酸 (50  $\mu$ g/ml)、BMP4 (0.5 ng/ml)、bFGF (10 ng/ml)、およびVEGF (10 ng/ml)をさらに補充したRPMI/10%SFDM培地中、無血清条件下で2日間培養した。この後、MTG ( $4.5 \times 10^{-4}$  M)、アスコルビン酸 (50  $\mu$ g/ml)、BMP4 (0.5 ng/ml)、bFGF (10 ng/ml)、アクチビンA (100 ng/ml)およびVEGF (10 ng/ml)を補充したSFDM培地中で、2日後に培地を交換して4日間培養した。SFDM培地はChengら (2012年b)の通り作製した。試料採取のために、細胞の一部を採取し、個別化し、CXCR4およびCD117の表面発現ならびにFoxA1、Sox17、およびFoxA2の細胞内発現について特異的抗体を使用して染色し、フローサイトメトリーを使用して可視化した (図1および図2A~F)。CXCR4、CD117、FoxA2、およびFoxA1の同時発現によって定義されるこの細胞集団は5日目と7日目の間に生成した。DE生成のさらなる最適化およびさらなる実施形態が以下に提供される。

## 【 0 1 9 7 】

(実施例2)

DEの生成に対する播種密度の影響

Matrigel上Essential 8を使用して維持した未分化のiPSCを異なる $1\text{ cm}^2$ 当たりの播種密度 (例えば、5000、15,000、および20,000)で、Matrigel上にプレーティングした。プレーティングの4日後、 $1\text{ cm}^2$ 当

10

20

30

40

50

たり細胞15,000個および1cm<sup>2</sup>当たり細胞20,000個で播種した細胞を、100ng/mLのアクチビンAを含有する90%RPMI/10%SFDP地中に24時間置いた(T0)。次の日に、培養物を、100ng/mLのアクチビンA、2.5ng/mLのBMP4、10ng/mLのVEGF、および10ng/mLのゼブラフィッシュFGF2を含有する培地中に48時間置いた(T1/T2)。最後に、培養物を、100ng/mLのアクチビンA、2.5ng/mLのBMP4、10ng/mLのVEGF、および10ng/mLのゼブラフィッシュFGF2を補充したSFDP地中に次の4~5日間置いた(T3~T6)。このステップ時に、任意選択で、細胞を最大12日間インキュベートすることができる。3日目から6日目まで、TrypLEを使用して細胞を採取した。各時点で消化後の総生存細胞数を決定した(図16A)。CXCR4、CD117同時発現細胞の百分率を表面染色によって決定し(図16D)、FoxA2発現およびFoxA1発現の百分率(図16C)を細胞内フローサイトメトリーによって数量化した。各時点でプロセスの効率をDE発現細胞の絶対数/総細胞数の比として決定した。

10

【0198】

(実施例3)

CHIRの補充はDEの生成に必須ではない

Matrigel上Essential 8を使用して維持した未分化のiPSCをMatrigel上に1cm<sup>2</sup>当たり細胞13,000個の播種密度でプレATINGした。プレATINGの4日後、細胞を、100ng/mLのアクチビンAを含有する90%RPMI/10%SFDP地中に1日置き、その後、100ng/mLのアクチビンA、2.5ng/mLのBMP4、10ng/mLのVEGF、および10ng/mLのゼブラフィッシュFGF2を補充した90%RPMI/10%SFDPと一緒に次の2日間インキュベートした。4日目から12日目まで、細胞を、100ng/mLのアクチビンA、2.5ng/mLのBMP4、10ng/mLのVEGF、および10ng/mLのゼブラフィッシュFGF2を補充したSFDP培地中に置いた。分化の1日目に2μMのCHIRの補充を1つのセットには含めたが、別のセットには含めなかった。7日目にTrypLEを使用して細胞を採取した。各時点で消化後の総生存細胞数を決定した。CXCR4、CD117同時発現細胞の百分率を細胞表面染色によって、フローサイトメトリーによって決定した(表1)。CXCR4/CD1172重陽性細胞の絶対数を算出した。インプットiPSCとアウトプットDEの比も数量化した(表1)。内胚葉誘導のゼロ日目にCHIRを添加することにより、DE形成の効率の上昇はもたらされなかった。

20

30

【表1】

表1.CHIRの補充はDE形成に必須ではない

細胞株	CHIR	形式	CXCR4/ CD117	インプット iPSC、×10 <sup>6</sup>	アウトプット DE、7日目、×10 <sup>6</sup>	効率、 iPSC:DE
2.038	-	T150	40%	5.85	259	1:18
2.038	+	T150	54%	5.85	186	1:17
2.038 (1131)	-	6ウェル	53%	1.95	84	1:23
2.038 (1131)	+	6ウェル	45%	1.95	84	1:19

40

【0199】

(実施例4)

DE誘導に対する低酸素の影響

幹細胞ニッチにおける酸素濃度(通常2%~9%O<sub>2</sub>)は、恒常性を維持すること、胚発生を容易にすること、多数のシグナル伝達カスケードを調節すること、および分化を誘導するために幹細胞多能性を維持することにおいて極めて重大な役割を果たす(Langnerら、2010年)。未分化のiPSC(2.038 AT4EGN)をMatrigel上Essential 8を使用して、低酸素条件下(5%O<sub>2</sub>)、ネオマイシン(100μg/mL)およびピューロマイシン(600ng/mL)の存在下で少なくとも5回

50

の継代にわたって維持した。0.5 mMのEDTAおよびEssential 8培地を使用して細胞を繁殖させた。細胞の播種密度は、Matrigel上1 cm<sup>2</sup>当たり細胞15,000~30,000個で変動させた。

#### 【0200】

iPSCを少なくとも5回の継代にわたって低酸素条件に最適に順応させた後、細胞をMatrigel上に1 cm<sup>2</sup>当たり細胞15,000個の密度でプレATINGした。プレATINGの4日後、細胞を100 ng/mLのアクチビンA、2.5 ng/mLのBMP4、10 ng/mLのVEGF、および10 ng/mLのゼブラフィッシュFGF2を含有するSFD培地中に次の8日間置いた。Matrigel上で維持したiPSCを使用して、Essential 8を正常酸素条件下で使用した並行分化をセットアップした。8日目にTrypLEを使用して両方のセットを採取した。消化後の総生存細胞数を決定し、CXCR4、CD117同時発現細胞の百分率を細胞表面染色によって、フローサイトメトリーによって決定した。FoxA1/FoxA2/Sox17の百分率を、細胞内フローサイトメトリーを使用して数量化した(図17)。

10

#### 【0201】

低酸素条件下で維持したiPSCは正常酸素条件下で維持したiPSCと比較して高い純度でDEを生成する。正常酸素の細胞では約50%のDE陽性染色が実証されたが、低酸素の細胞では、80%~90%のDE陽性染色が発現した。以下に考察されている通り、低酸素条件により、DEを生成するためのプロセスの改善、ならびにEPCのサイクリングの持続時間の増加がもたらされる。プロセスの効率はおよそ1:20(iPSC:DE)であった。

20

#### 【0202】

##### (実施例5)

##### 内胚葉前駆体(EPC)細胞の生成

TrypLEを使用してDE細胞を採取し、個別化した細胞をクエンチ培地中で洗浄した。培養物の総生存細胞数を決定した。細胞を再度洗浄し、生じた細胞ペレットを氷上に置いた。低温の、予め冷却したニートMatrigel溶液を細胞ペレットに0.3 mg/mLから0.6 mg/mLの濃度で添加した。予め冷却した、グルタミン(1x)、MTG(4.5 x 10<sup>-4</sup> M)、アスコルビン酸(50 µg/mL)、100 ng/mLのBMP4、20 ng/mLのEGF、20 ng/mLのFGF2、および20 ng/mLのVEGFを含有し、1 µMのH1152または10 µMのY-27632のいずれかのRock阻害剤を含有する無血清SFD培地を、予め冷却したピペットチップを使用して氷上で細胞とMatrigelの混合物に添加し、気泡の形成を防ぐために穏やかに混合した。最終的な細胞密度は1 mL当たり細胞0.25個から100万個の間であった。生じたMatrigel細胞浮遊液を125スピナーフラスコに移した。スピナーを通常の酸素(20%)および5%CO<sub>2</sub>下に置き、スピナーの速度を40RPMから70RPMの間で変動させた。12~18時間以内に集合体が形成された。次の日に、細胞の集合体を静置し、スピナーから上清培地を廃棄した。細胞の集合体を、グルタミン(1x)、MTG(4.5 x 10<sup>-4</sup> M)、アスコルビン酸(50 µg/mL)、100 ng/mLのBMP4、ならびに、それぞれ20 ng/mLのVEGF、EGFおよびFGF2を含有する無血清SFD培地中に置いた。スピナーに毎日半供給するか48時間毎に完全培地交換を実施した。他の関連する実験では、浮遊集合体を約5日毎に解離、再集合させた。プロセス全体を通して様々な時点でEPC集合体を試料採取した。

30

40

#### 【0203】

試料採取のために、所望の体積の集合体をスピナーから取り出し、集合体を遠心分離によって(1200 rpm、5分)遠心沈澱させた。集合体をトリプシン消化によって個別化し、クエンチし、洗浄し、細胞計数およびFAC染色のために細胞を適切な培地に再浮遊させた。図2Gには、histogelに包埋し、HNF3アルファ、HNF4アルファ、およびSox17発現の存在について染色した、浮遊培養物中のインタクトな15日目のEPC集合体の代表的な画像が示されている。生存細胞の存在を図3に示されている

50

通り数量化した。CXCR4 / CD117 / FoxA1 / Sox17発現のレベルをフローサイトメトリーによって数量化した(図4)。

【0204】

(実施例6)

MatrigelによりDEが保存されるがMEFはEPCサイクリングに必須ではない

MatrigelおよびEssential 8培地を使用して維持した未分化のiPSCから生成した胚体内胚葉細胞を、TrypLEを使用して採取した。採取後、個別化した細胞をクエンチ培地中で洗浄した。培養物の総生存細胞数を決定した。細胞を再度洗浄し、生じた細胞ペレットを氷上に置いた。低温の、予め冷却したニートMatrigel溶液を細胞ペレットに0.3mg/mlの濃度で添加した。予め冷却した、1μMのH1152または10μMのY-27632のいずれかのRock阻害剤を補充した無血清EPCサイクリング培地(IMDM:Ham's F12(3:1)、0.5%B27、0.5%N2、0.1%BSA、1%Glutamax、0.45μMのMTG、50μg/mlのアスコルビン酸、50ng/mlのBMP4、10ng/mlのVEGF、10ng/mlのEGF、50ng/mlのFGF(ゼブラフィッシュFGF2または熱安定性FGF1のいずれか)、2.5ng/mlのアクチビン(Activin)、および0.1ng/mlのTGF)を氷上で細胞とMatrigelの混合物に1ml当たり細胞0.25百万個から0.5百万個の間の最終密度で添加した。生じた細胞浮遊液を125スピナーフラスコに移した、または静置条件下で超低付着容器に入れた。培養物を遠心沈澱させ、12時間後に、Rock阻害剤を欠く新鮮なEPCサイクリング培地に入れた。

【0205】

EPC集合体を遠心沈澱させ、1日おきに新鮮なEPCサイクリング培地を供給した。4日目、8日目、および12日目に培養物を再集合させた。集合体を、TrypLEを使用して5~10分にわたって個別化し、クエンチし、洗浄した。新鮮なMatrigelおよびRock阻害剤の存在下で培養物を再集合させた。12~18時間後に培地を交換し、その時点で、培養物を、Rock阻害剤を欠くEPCサイクリング培地に入れた。

【0206】

EPC培養物を、0.3mg/mlのMatrigelを用いてまたは用いずに、およびEPC100個当たり1個のMEFを用いてまたは用いずに15日間維持した。15日間の最後に、TrypLEまたは0.5%トリプシンまたはディスパーゼ(2mg/ml)とトリプシンの組合せを使用してEPC培養物を採取した。個別化した細胞浮遊液をクエンチし、洗浄し、消化後の総生存細胞数を決定した。DEマーカであるCXCR4、CD117、FoxA2、およびFoxA1の百分率をフローサイトメトリーによって数量化した。プロセスの効率を、実験の最後に得られた生存DE細胞の絶対数/総生存細胞数の比として決定した。

【0207】

Matrigelにより保護されたDE発現細胞の表現型発現の存在(図18A)。EPC培養物の純度はMatrigelの不在下で低下した(図18A)。Matrigelの存在下ではDE生成の効率も増強された。EPCサイクリングの間のMEFの存在は必須ではなかった。3D培養物のEPC純度(図18Cおよび図18E)および収率(図18Bおよび図18D)はMEFの不在下で保持された。

【0208】

(実施例7)

定義済みのフィーダーフリー低酸素条件下でのEPCサイクリング

MatrigelおよびEssential 8培地を使用して維持した種々の未分化iPSCsから生成した胚体内胚葉細胞を、TrypLEを使用して5~10分にわたって採取した。個別化したDEをクエンチし、洗浄した。培養物の総生存細胞数を決定した。細胞を再度洗浄し、生じた細胞ペレットを氷上に置いた。低温の、予め冷却したニートMatrigel溶液を細胞ペレットに0.3mg/mlの濃度で添加した。予め冷却し

た、R o c k 阻害剤 ( 1  $\mu$  M の H 1 1 5 2 ) を補充した T 3 / T 6 培地 ( 1 0 0 n g / m L のアクチビン A、2 . 5 n g / m L の B M P 4、1 0 n g / m L の V E G F、および 1 0 n g / m L のゼブラフィッシュ F G F 2 を補充した S F D 培地 ) を氷上で細胞と M a t r i g e l の混合物に 1 m L 当たり細胞 0 . 2 5 百万個から 0 . 5 百万個の間の最終密度で添加した。生じた細胞浮遊液を 1 2 5 スピナーフラスコに移した。低酸素条件下、スピナーの速度を 7 0 r p m にセットした。培養物を遠心沈澱させ、1 2 ~ 1 8 時間後に、5 0 % T 3 / T 6 培地および R o c k 阻害剤を欠く 5 0 % 無血清 E P C サイクリング培地を含む新鮮な培地に入れた。E P C 集合体を遠心沈澱させ、1 日おきに新鮮な E P C サイクリング培地を供給し、その後、無血清 E P C サイクリング培地を供給した。上記の通り T r y p L E 消化した後、4 日目、8 日目、および 1 2 日目に、0 . 3 m g / m l の M a t r i g e l を用いて培養物を再集合させた。2 . 0 3 8 A T 4 以外の全ての細胞株が R o c k 阻害剤 ( H 1 1 5 2 ) の存在下で再集合した。E P C の継代毎に総生存細胞数を推定した。スピナー培養物を低酸素条件下に置いたままにした。結果により、フィーダーフリー E P C サイクリング相の間の E P C の増殖が示されている ( 図 1 9 A )。2 . 0 3 8 A T 4 ( 1 0 0  $\mu$  g / m L のネオマイシンおよび 6 0 0 n g / m L のピューロマイシンの存在下で維持したものは親 i P S C と比較して最も増殖性であった。この細胞株は、E r g 発現カセットおよび G F I 1 発現カセットを含み、これらの発現はドキシサイクリン誘導によって制御される。2 . 0 3 8 M A F A 細胞 ( E P C サイクリングの間以外は G 4 1 8 の存在下で維持したものは M A F A 発現カセットを含み、この発現は、ドキシサイクリン誘導によって制御される。E P C サイクリングの間の各時点で E P C 培養物の純度をフローサイトメトリーによって決定した。C X C R 4 / C D 1 1 7 / F o x A 1 / F o x A 2 / S o x 1 7 の平均発現を数量化した。同じ i P S C クローンの種々の実験の実行からの E P C の純度を平均し、標準誤差を算出した ( 図 1 9 B )。結果により、フィーダーフリー低酸素条件下でサイクリングした種々の i P S C クローンについての平均純度が約 5 0 % であったことが示される。

#### 【 0 2 0 9 】

( 実施例 8 )

定義済みのフィーダーフリー低酸素条件下での E P C 培養物の q P C R 分析

胚体内胚葉および E P C 集合体サイクリングに関連する遺伝子の発現をリアルタイム R T - P C R によって数量化した ( 図 2 0 )。4 ~ 5 日間毎に、0 . 5 % トリプシン - E D T A を使用して、3 7  $^{\circ}$  C、1 0 ~ 2 0 分にわたって E P C を採取した。細胞を勢いよくピペティングして、単一細胞浮遊液を創出した。R N a s e - f r e e D N a s e を用いて R N A を処理し、Q i a g e n からの R n e a s y P l u s M i n i K i t ( カタログ番号 7 4 1 3 6 ) を製造者の指示に従って使用して単離した。N a n o d r o p 2 0 0 0 を使用して R N A 数量化を実施した。

#### 【 0 2 1 0 】

P r o m e g a からの I m P r o m - I I R T S y s t e m ( カタログ番号 A 3 8 0 0 ) を製造者の指示に従って用いて R N A を逆転写した。T a q M a n G e n e E x p r e s s i o n M a s t e r M i x ( カタログ番号 4 3 6 9 0 1 6 ) および T a q M a n プローブ ( カタログ番号 4 3 3 1 1 8 2 ; C X C R 4 : H s 0 0 2 3 7 0 5 2 \_ \_ m 1 ; C k i t : H s 0 0 1 7 4 0 2 9 \_ \_ m 1 ; S o x 1 7 : H s 0 0 7 5 1 7 5 2 \_ \_ s 1 ; F o x A 1 : H s 0 0 2 7 0 1 2 9 \_ \_ m 1 ; F o x A 2 : H s 0 0 2 3 2 7 6 4 \_ \_ m 1 ; G A P D H : H s 9 9 9 9 9 0 5 \_ \_ m 1 ) を使用して、技術的 3 連で、R o c h e L i g h t C y c l e r で 4 0 サイクル行って r t - q P C R を実施した。誘導倍率を D e l t a C p によって算出し、G A P D H に対して正規化した。遺伝的背景が同じである未分化 i P S C ( 陰性対照 ) では遺伝子発現は見られなかった。陽性対照である W 2 P 1 6 および 2 . 0 3 8 P 2 では未知のものと同様のプロファイルが実証された。

#### 【 0 2 1 1 】

C D 3 4 は、後期 E P C 培養物のマーカーであることが見いだされた。2 . 0 3 8 A T 4、2 . 0 3 8 M A F A 親細胞、および 2 . 0 3 8 親細胞から生成した 3 D E P C 培

10

20

30

40

50

養物をEPCサイクリングの間の種々の継代時に採取し、CD34の存在について染色した。トリプシンを使用してEPC集合体を個別化し、クエンチし、洗浄し、CXCR4およびCD117と一緒にCD34の存在について染色した。EPCサイクリングの異なる段階におけるCD34陽性細胞の百分率を、フローサイトメトリーを使用して数量化した。CD34発現の程度は異なるiPSCクローンについて変動した。2.038に由来するEPCは2%~15%のCD34を発現し、2.038(MAFFA)に由来するEPCは2%~25%のCD34陽性細胞を発現し、2.038AT4は4%~35%のCD34を発現する(図21)。新生CD34細胞はCD117/CXCR4陽性である。

#### 【0212】

(実施例9)

最終段階のEPC培養物の精製

最終段階のEPC培養物を採取し、0.5%トリプシン溶液を使用して個別化した。細胞浮遊液をクエンチし、洗浄し、PEとコンジュゲートしたCXCR-4/CD117/CD34と一緒に4で20分インキュベートした。細胞を洗浄し、磁気抗PE抗体と一緒に4で20分インキュベートした。細胞を洗浄し、MACSカラムを製造者の説明書に従って使用して精製した。陽性画分の純度および細胞数を決定した(図22)。細胞を、Rock阻害剤を補充したEPC改変培地中のニートMatrigelでコーティングしたプレート上に置いた。プレティングの12~18時間後、細胞を、Rock阻害剤を伴わない新鮮なEPC改変培地に入れた。プレティングの5日後、ベータ細胞分化を開始した。

#### 【0213】

(実施例10)

EPC集合体の膵臓分化

浮遊培養で生成したEPCを、膵臓細胞型を生成するために分化培地に入れた(図8)。EPC細胞の膵臓分化のために、Nostroら(2011年)に記載されており、Chengら(2012年a)によってさらに改変されたプロトコールを利用した。プロセス全体を3D培養物として継続した。

#### 【0214】

EPC培養物を15日間増大させ、Wnt3A(3ng/ml)、FGF-10(50ng/ml)およびドルソモルフィン(0.75μM)を含有するSFD培地中で3日間培養して、前腸/中腸内胚葉細胞を生成した。細胞をGlutaMAX(1%)、レチノイン酸を伴わないB27(1%)、アスコルビン酸(50μg/ml)、Pen/Strep(1%)、KAAD-シクロパミン(0.25μM)、トランス-レチノイン酸(2μM)、ノギン(50ng/ml)、およびFGF-10(50ng/ml)を含有する高グルコースDMEM培地中で3日間培養して、膵臓内胚葉細胞を生成した。このステップの後、細胞をGlutaMAX(1%)、レチノイン酸を伴わないB27(1%)、アスコルビン酸(50μg/ml)、Pen/Strep(1%)、SB431542(6μM)、およびノギン(50ng/ml)を含有する高グルコースDMEM培地中で3日間培養した。次に、細胞を以前の、Secretase阻害剤(DAPT、2μM)を補充した高グルコースDMEM培地中で1~2日間培養した。この段階から、細胞をグルコース(40mM)、ニコチンアミド(10mM)、SB431542(6μM)、およびノギン(50ng/ml)を含有するSFD培地中で1~2日間培養した。最後に、細胞をSB431542(5.4μM)、ノギン(50ng/ml)、インスリン(800pM、0.47μl/ml)、およびニコチンアミド(10mM)を含有するSFD培地であって、追加的なグルコース(40mM)を添加した培地と追加的なグルコース添加していない培地を毎日交互に用いて次の10日間培養した。

#### 【0215】

試料採取のために、所望の体積の集合体をスピナーから取り出し、集合体を遠心分離によって(1200rpm、5分間)遠心沈澱させた。集合体をトリプシン消化によって個別化し、クエンチし、洗浄し、プロセスの種々の日数における生存細胞数を決定した(図

10

20

30

40

50

5)。個別化した細胞を、細胞内染色を実施し、陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーによって評価することによってPDX-1の存在について染色した(図6および図7)。インタクトな、15日経過EPC集合体を膵臓分化プロセスの15日目にhistogelに包埋し、PDX-1の存在について免疫組織化学的検査によって染色した(図8)。

#### 【0216】

集合体の分化の状態を評価するために、インタクトな、15日経過EPC集合体を膵臓分化プロセスの18日目にhistogelに包埋し、ソマトスタチン(図10A~C)、グルカゴン(図10D~F)、およびインスリン(図10G~I)の存在について免疫組織化学的検査によって染色した。集合体は、ソマトスタチンおよびグルカゴンの発現については陰性であるがインスリンの発現については陽性であることが見いだされた。膵臓分化の18日目の、15日経過EPC集合体におけるC-ペプチド発現、グルカゴン発現、およびインスリン発現についての細胞内染色を、集合体を解離させた後に実施した(図11)。マーカー発現に関するデータが表2に要約されている。EPCからベータ細胞を生成するためのプロセスの効率は0.3%である。

#### 【表2】

表2.ベータ細胞集合体培養物におけるグルカゴン、C-ペプチド、ソマトスタチンおよびインスリン発現プロファイルの要約

マーカー	ベータ細胞 (IHC染色)	ベータ細胞 (フローサイトメトリー)
インスリン	存在する	1.9%±0.2%
C-ペプチド	ND	1.8%±0.3%
グルカゴン	存在しない	存在しない
ソマトスタチン	存在しない	存在しない
Pdx	存在する	40%-95%

#### 【0217】

集合体の分化の状態をさらに評価するために、RNeasy Mini Kit(Qiagen)を使用して膵臓全体、島、および20日経過した集合体から全RNAを単離し、RNase-free DNase(Qiagen)を用いて処理した。ランダムな六量体およびオリゴ(dT)をSuperscript III Reverse Transcriptase(Applied Biosystems)と共に使用してRNAをcDNAに逆転写した。以前に記載されている通りTaqmanプローブおよびプライマーを使用してLightCycler 480 II(Roche)でqPCRを実施した(Nostroら、2008年)(図12)。発現レベルをハウスキーピング遺伝子であるGAPDHに対して正規化した。

#### 【0218】

C-ペプチド放出アッセイを、Mercodia Ultrasensitive C-peptide ELISA kit(Mercodia)を使用して以前に記載されている通り実施した(D'Amourら、2006年)。簡単に述べると、各iPSCクローンに由来する、ベータ細胞分化プロトコールにおいて25日目を過ぎた集合体を24ウェルプレート中のmillicell PCFインサートに置いた。集合体をKRBH培地1ml中、37および5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>で1時間平衡化した。次に集合体を2.8mMのグルコースを補充したKRBH培地1mlを含有する第2のウェルに入れ、インキュベーションを37および5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>で1時間継続した。最後に、集合体を2.8mMのグルコースを補充したKRBH培地1mlに入れ、インキュベーションを37および5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>で1時間継続した。非常に注意してウェルの移動間に残留した流体全ての集合体を流出させた。残った上清を収集し、-20で保管した。約30のヒト成体島もこのアッセイの陽性対照として使用した。iPSC由来の細胞および死体成体島を2.8mM(基底(Basal))または2.8mM(グルコース(Glu

c o s e ) ) の D - グルコースで刺激した後、T r y P L E を用いて集合体を消化し、試料当たりの総生存細胞数を決定した。C - ペプチド分泌を各試料について取得した総生存細胞数に基づいて正規化した ( 図 1 3 ) 。初代ヒト島は U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n M a d i s o n i s l e t c o r e d i v i s i o n から購入した。

#### 【 0 2 1 9 】

( 実施例 1 1 )

M E F を用いずに 3 D 集合体として繁殖させた E P C からのベータ細胞の生成

2 . 0 3 8 A T 4 E P C 培養物を採取し、0 . 5 % トリプシン溶液を使用して個別化した。生じた細胞浮遊液をクエンチし、洗浄し、M a t r i g e l ( 0 . 3 m g / m l ) と混合した。集合体を低酸素条件下、1 m l 当たり細胞 0 . 3 百万個の細胞密度で E P C サイクリング培地に入れた。最初の 5 日間、細胞に新鮮な E P C サイクリング培地を供給し、再集合の 6 日後に、N o s t r o ら ( 2 0 1 1 年 ) に記載されており、C h e n g ら ( 2 0 1 2 年 a ) によってさらに改変されたプロトコールを使用して 3 D 形式でベータ細胞分化を開始した。3 D 手法のスキームは図 2 3 に提示されている。このスキームでは、E P C を M A C 分離後、ベータ細胞分化の開始前に精製することができる。

10

#### 【 0 2 2 0 】

2 . 0 3 8 A T 4 細胞に由来する 2 8 日目の最終段階のベータ細胞をフローサイトメトリー分析によって分析した。細胞を採取し、4 % パラホルムアルデヒドを使用して固定し、0 . 1 % サポニンを使用して透過処理し、P D X 、 N e u r o D 1 、 N k x 6 . 1 、ソマトスタチン、グルカゴン、および C - ペプチドの存在についてフローサイトメトリーによって染色した。陽性細胞の百分率が図 2 4 A に示されている。ソマトスタチン / C - ペプチドおよびグルカゴン / C - ペプチドについて染色した後に生成したドットプロットが図 2 4 B に示されている。

20

#### 【 0 2 2 1 】

( 実施例 1 2 )

M E F を用いずに 3 D 集合体として繁殖させた E P C からのベータ細胞の生成

2 . 0 3 8 細胞から浮遊培養で生成した E P C を上記の通り M A C S 分離によって精製し、膵臓細胞型を生成するために分化培地に入れた。E P 細胞の膵臓分化のために、N o s t r o ら ( 2 0 1 1 年 ) に記載されており、C h e n g ら ( 2 0 1 2 年 a ) によってさらに改変されたプロトコールを 2 D 形式で利用した。2 D 手法のスキームは図 2 5 に提示されている。

30

#### 【 0 2 2 2 】

E P C 培養物を精製し、E P C サイクリング培地の存在下、ニート M a t r i g e l 上で 5 日間プレーティングした。前腸 / 中腸内胚葉細胞を生成するために、細胞を W n t 3 A ( 3 n g / m l ) 、 F G F - 1 0 ( 5 0 n g / m l ) およびドルソモルフィン ( 0 . 7 5 μ M ) を含有する S F D 培地中に 3 日間置くことによってベータ細胞分化を開始した。膵臓内胚葉細胞を生成するために、細胞を G l u t a M A X ( 1 % ) 、レチノイン酸を伴わない B 2 7 ( 1 % ) 、アスコルビン酸 ( 5 0 μ g / m l ) 、 P e n / S t r e p ( 1 % ) 、 K A A D - シクロパミン ( 0 . 2 5 μ M ) 、トランス - レチノイン酸 ( 2 μ M ) 、ノギン ( 5 0 n g / m l ) 、および F G F - 1 0 ( 5 0 n g / m l ) を含有する高グルコース D M E M 培地中で 3 日間培養した。このステップの後、細胞を G l u t a M A X ( 1 % ) 、レチノイン酸を伴わない B 2 7 ( 1 % ) 、アスコルビン酸 ( 5 0 μ g / m l ) 、 P e n / S t r e p ( 1 % ) 、 S B 4 3 1 5 4 2 ( 6 μ M ) 、およびノギン ( 5 0 n g / m l ) を含有する高グルコース D M E M 培地中で 3 日間培養した。次に、細胞を以前の、 S e c r e t a s e 阻害剤 ( D A P T 、 2 μ M ) を補充した高グルコース D M E M 培地中で 1 ~ 2 日間培養した。この段階から、細胞をグルコース ( 4 0 m M ) 、ニコチンアミド ( 1 0 m M ) 、 S B 4 3 1 5 4 2 ( 6 μ M ) 、およびノギン ( 5 0 n g / m l ) を含有する S F D 培地中で 1 ~ 2 日間培養した。最後に、細胞を S B 4 3 1 5 4 2 ( 5 . 4 μ M ) 、ノギン ( 5 0 n g / m l ) 、インスリン ( 8 0 0 p M 、 0 . 4 7 μ l / m l ) 、およびニコチンアミド ( 1 0 m M ) を含有する S F D 培地であって、追加的なグルコース ( 4 0 m

40

50

M) を添加した培地と追加的なグルコース添加していない培地を毎日交互に用いて次の10日間培養した。単一ホルモン性ベータ細胞の存在が2D形式での分化の10日目から15日目の間に検出された。

#### 【0223】

PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンを細胞内フローサイトメトリーによって定量化するために、分化の15日目にベータ細胞の培養物を採取し、固定し、染色した(図26A)。最終段階の培養物では、12%単一ホルモン性細胞の存在が明らかになった。最終段階の培養物はPDXおよびNeuroD1について陽性であった。最終段階の集合体では、グルコースに対する反応性が明らかになった(図26B)。グルコース応答アッセイを記載の通り実施し、データを細胞数に対して正規化した。

10

#### 【0224】

C-ペプチド放出アッセイをMercoDia Ultrasensitive C-peptide ELISA kit (MercoDia) を使用して以前に記載されている通り実施した(D'Amourら、2006年)。簡単に述べると、各iPSCクローンに由来する、ベータ細胞分化プロトコールにおいて25日目を過ぎた集合体を24ウェルプレート中のmilliCell PCFインサートに置いた。集合体をKRBH培地1ml中、37および5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>で1時間平衡化した。次に集合体を、レベルを1mMから20mMまで段階的に上昇させたグルコースを補充したKRBH培地0.5mlを含有する第2のウェルに入れた。各インキュベーションを37および5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>で20分間続けた。非常に注意してウェルの移動間に残留した流体全ての集合体を流出させた。残った上清を収集し、-20で保管した。実験の最後に、データを正規化するために、TryPLEを用いて集合体を消化し、試料当たりの総生存細胞数を決定した。C-ペプチド分泌を各試料について取得した総生存細胞数に基づいて正規化した。

20

#### 【0225】

(実施例13)

MEFを用いずに3D集合体として繁殖させた2.038AT4 EPCからのベータ細胞の生成

2.038AT4.14EGN(2.038AT4とも称される)細胞を、CHIRを用いず、2.5ng/mlのBMP4を使用したDE誘導の間、Essential 8中、低酸素条件下で維持した。DEを、MEFを伴わないEPCサイクリング培地中、低酸素条件下で維持した。培地は、iPSC培養、DE培養、およびEPCサイクリングのためにネオマイシン(100μg/ml)およびピューロマイシン(600ng/ml)を補充したものであった。7日後に、EPCを採取し、CD34/CXCR4/CD117を使用してMACS精製を実施した。精製された細胞をニートMatrigel上、Rock阻害剤の存在下でプレATINGした。

30

#### 【0226】

再集合の5日後に、Nostroら(2011年)に記載されており、Chengら(2012年a)によってさらに改変されたプロトコールに従って2D形式でベータ細胞分化を開始した。ベータ細胞分化プロセスの異なる段階においてDoxを添加した。ベータ細胞分化の6日目から15日目の間、ベータ細胞分化の8日目から15日目の間、またはベータ細胞分化の10日目から15日目の間にDox(1.5μg/ml)誘導を実施した。PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンを細胞内フローサイトメトリーによって数量化するために、ベータ細胞分化の15日目に細胞を採取し、固定し、染色した。15日目における新生ベータ細胞の分析により、PDX(図27A~D)、NeuroD1(図27E~H)、およびソマトスタチン/グルカゴン/C-ペプチドの存在が明らかになった(図27I~L)。分化の15日目のベータ細胞では、低ソマトスタチン陽性細胞およびグルカゴン陽性細胞の欠如と一緒に、PDX陽性細胞、NeuroD1陽性細胞、およびC-ペプチド陽性細胞の存在が明らかになった。分化プロセスの10日

40

50

日から15日目の間にDoxを添加することにより、最高レベルの単一ホルモン性C-ペプチド陽性細胞が明らかになった。

【0227】

(実施例14)

2.038AT4細胞に由来する、グルコース応答性の最終段階のベータ細胞

C-ペプチド放出アッセイを実施例12に記載の通り実施した。10日目から15日目の間にDox誘導を用いて誘導したベータ細胞の培養物では、1~5mMのグルコースに対する応答が生じた(図28)。細胞数はDox誘導された培養物において非誘導条件と比較して多かった。

【0228】

PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンを細胞内フローサイトメトリーによって数量化するために、ベータ細胞分化の15日目に細胞を採取し、固定し、染色した。最終段階のベータ細胞の培養物を長期分析するために、ベータ細胞を最終段階の培地に入れた。最大4週間の培養について培養物に単一ホルモン性細胞が存在することが明らかになった(図29)。

【0229】

ベータ細胞分化の10日目から15日目の間にDox(1.5μg/ml)を添加して再度実験を実施した。ベータ細胞分化の15日目に細胞を採取し、PDX/NeuroD1/C-ペプチド/グルカゴン/ソマトスタチン発現レベルについて細胞内フローサイトメトリーによってアッセイした。細胞で25%~30%PDX/NeuroD1発現が明らかになった。総C-ペプチドレベルはおよそ10%でありそのうちの5%の細胞が単一ホルモン性だと思われた。グルカゴン発現は記録されなかった。C-ペプチド放出アッセイを上記の通り実施した。結果により、1~15mMのグルコースに対する用量依存的な応答が明らかになった。Dox誘導したベータ細胞の培養物と誘導していないベータ細胞の培養物のどちらもグルコースに対する用量依存的な応答を引き出すことができた(図30)。

【0230】

(実施例15)

最終段階の培養物のqPCR分析

4~5日間毎に、0.5%トリプシン-EDTAを使用して、37、10~20分わたってEPCを採取した。細胞を勢いよくピペティングして、単一細胞浮遊液を創出した。QiagenからのRNeasy Plus Mini Kit(カタログ番号74136)を製造者の指示に従って使用してRNAを単離した。Nanodrop 2000を使用してRNA数量化を実施した。PromegaからのImProm-II RT System(カタログ番号A3800)を製造者の指示に従って用いてRNAを逆転写した。TaqMan Gene Expression Master Mix(カタログ番号4369016)およびTaqManプローブ(カタログ番号4331182; INS: Hs02741908\_\_m1; GCG: Hs01031536\_\_m1; SST: Hs00356144\_\_m1; ニューロゲニン3: Hs01875204\_\_s1; NKX6.1: Hs00232355\_\_m1; PDX1: Hs00236830\_\_m1; NeuroD1: Hs01922995\_\_s1; GAPDH; Hs99999905\_\_m1)を使用して技術的3連で、Roche Light Cyclerで45サイクルを行い、rt-qPCRを実施した(図31)。遺伝的背景が同じである未分化のiPSCを陰性対照として使用した。膵臓全体のRNA(Ambionカタログ番号AM7954)およびUW Islet Coreから提供されたヒト島を陽性対照として使用した。遺伝的背景が同じである未分化のiPSCを陰性対照として使用した。誘導倍率をDelta Cpによって算出し、GAPDHに対して正規化した。

【0231】

(実施例16)

ERG発現およびGFI発現についてのiPSC/DE/EPC/ベータ細胞のqPCR

10

20

30

40

50

## R 分析

2.038細胞および2.038AT4細胞からの異なるプロセスの段階におけるERG転写物のレベル(図32A)およびGFI転写物のレベル(図32B)を数量化した。2.038AT4細胞のDox誘導はベータ細胞分化段階においてのみ適用した。2.038AT4由来の細胞は、分化の段階にかかわらず常にネオマイシン(100μg/mL)およびピューロマイシン(600ng/mL)を含有する培地中で培養した。QiagenからのRNeasy Plus Mini Kit(カタログ番号74136)を製造者の指示に従って使用して、2.038細胞および2.038AT4細胞に由来する未分化iPSC、DE、EPC、およびベータ細胞の培養物からRNAを単離した。Nanodrop 2000を使用してRNA数量化を実施した。PromegaからのImP  
10  
rom-II RT System(カタログ番号A3800)を製造者の指示に従って用いてRNAを逆転写した。TaqMan Gene Expression Master Mix(カタログ番号4369016)およびTaqManプローブ(ERG:Hs01554629\_m1;GFI1:Hs00382207\_m1;GAPDH:Hs99999905\_m1)を使用し、技術的3連で、Roche LightCyclerで45サイクルを行い、rt-qPCRを実施した。誘導倍率をDeltaCpによって算出し、GAPDHに対して正規化した。遺伝的背景が同じである未分化のiPSCを陰性対照として使用した。臍臓全体のRNA(Ambionカタログ番号AM7954)およびUW Islet Coreから提供されたヒト島を陽性対照として使用した。

## 【0232】

2.038AT4 iPSCでは、Dox非誘導選択条件下でERG/GFI転写物の存在が明らかになり、EPCサイクリング全体を通してレベルが維持された。ベータ細胞分化の間のDox誘導により、転写物のレベルのわずかな上昇があった。親2.038EPC培養物では、EPCサイクリングおよびベータ細胞分化の間にERGのレベルが上方制御されることが明らかになった。理論に束縛されることなく、これらのデータにより、サイクリングの間の生存の促進およびEPC培養物の維持におけるERGおよびGFIの役割が示される。Dox誘導した培養物では、非誘導条件よりも細胞数が多く、したがって、これらの転写因子は、EPCに由来するベータ細胞を保存するために役立ち得る。

## 【0233】

本明細書において開示され、特許請求されている方法は全て、本開示に照らして、過度な実験を伴わずに行い、達成することができる。本発明の組成物および方法は好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、主旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法および方法のステップまたは一連のステップに変形を適用することができる。より詳細には、化学的かつ生理的に関連するある特定の薬剤で本明細書に記載の薬剤を置換することができ、同時に、同じまたは同様の結果が実現されることが明らかになる。当業者に対して明らかであるそのような同様の置換および修飾は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の主旨、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

## 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手続き上のまたは他の詳細をもたらずのものである限りでは、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

10

20

30

40

## 【化 1】

U.S. Patent 5,030,015  
U.S. Patent 5,460,964  
U.S. Patent 5,478,838  
U.S. Patent 5,486,359  
U.S. Patent 5,635,387  
U.S. Patent 5,677,136 10  
U.S. Patent 5,681,599  
U.S. Patent 5,716,827  
U.S. Patent 5,736,396  
U.S. Patent 5,750,397  
U.S. Patent 5,759,793  
U.S. Patent 5,811,094  
U.S. Patent 5,827,735  
U.S. Patent 5,827,740 20  
U.S. Patent 5,837,539  
U.S. Patent 5,837,670  
U.S. Patent 5,843,780  
U.S. Patent 6,833,269  
U.S. Patent 6,991,897  
U.S. Patent 7,015,037  
U.S. Patent 7,399,632  
U.S. Patent 7,410,798 30  
U.S. Patent 7,410,773  
U.S. Patent 7,422,736  
U.S. Appln. Serial 61/058,858  
U.S. Appln. Serial 61/172,079  
U.S. Appln. Serial 61/184,546  
U.S. Patent Publn. 2003/0087919

## 【化 2】

- U.S. Patent Publ. 2003/0125344
- U.S. Patent Publ. 2003/0211603
- U.S. Patent Publ. 2004/0002507
- U.S. Patent Publ. 2004/0002508
- U.S. Patent Publ. 2004/0014755
- U.S. Patent Publ. 2005/0192304
- U.S. Patent Publ. 2005/0209261
- U.S. Patent Publ. 2007/0116680
- U.S. Patent Publ. 2007/0238170
- U.S. Patent Publ. 2008/0171385
- International Patent Publ. 2005/123902
- European Patent EP0412700
- PCT Publ. WO 2003/042405
- PCT Appln. WO 2008/006583
- PCT Appln. WO 2008/094597
- PCT Publ. PCT 2005/080554
- PCT Publ. WO 01/088100
- PCT Publ. WO 98/30679
- PCT Publ. WO 97/37009
- PCT Publ. WO 2002/076976
- PCT Publ. WO 2003/059913
- PCT Publ. WO 2003/062225
- PCT Publ. WO 2003/062227
- PCT Publ. WO 2004/039796
- PCT Publ. WO 97/37009
- A practical approach, 1987.
- Alison *et al.*, *Hepatol.*, 29:678-683, 1998.
- Amit *et al.*, *Dev. Bio.*, 227:271-278, 2000.
- Andrews *et al.*, In: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*, Robertson (Ed.), IRL Press, 207-246, 1987.
- Animal Cell Culture, 1987.
- Animal Cells: culture and media*, D. C. Darling, S. J. Morgan John Wiley and Sons, Ltd., 1994.

10

20

30

40

## 【化3】

- Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:34, 2002.
- Bertrand *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 333:393-407, 2003.
- Bhardwaj *et al.*, *Nature Immunol.*, 2:172-180, 2001.
- Bhatia *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1139-1148, 1999.
- Boyer *et al.*, *Cell*, 122(6):947-956, 2005.
- Brunton *et al.*, *J. Med. Chem.*, 51:1108-1110, 2008.
- Byrne *et al.*, *Nature*, 450(7169):497-502, 2007. 10
- Cassiede *et al.*, *J. Bone Miner. Res.*, 11(9):1264-1273, 1996.
- Cells: a laboratory manual* (vol. 1), D. L. Spector, R. D. Goldman, L.A. Leinwand (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- Chadwick, *Blood*, 102:906, 2003.
- Chambers *et al.*, *Cell*, 113(5):643-655, 2003.
- Chen *et al.*, *Nature Methods*, 8:424-429, 2011.
- Cheng *et al.*, Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 10:371-384, 2012a. 20
- Cheng *et al.*, Monolayer endoderm differentiation from human ESCs (June 10, 2012b), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.64.1, on the world wide web at stembook.org.
- Cheng *et al.*, Endodermal stem cell population derived from pluripotent stem cells, *Curr. Opin. Biol.*, 2013.
- Chin *et al.*, *Molecular Brain Res.*, 137(1-2):193-201, 2005.
- Cheng *et al.*, *J. of Clin. Invest.*, 120:2171-2183, 2010.
- Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques* (3.sup.rd edition), R.I. Freshney (ed.), Wiley-Liss, Inc., 1994. 30
- Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 1987; 1995.
- Current Protocols in Stem Cell Biology*, Bhatia *et al.* (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2007.
- DaCosta *et al.*, *Molec. Pharmacol.*, 65(3):744-752, 2004.
- D'Amour *et al.*, Production of pancreatic hormone expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.*, 24:1392-1401, 2006.
- Davidson and Zon, Turning mesoderm into blood: the formation of hematopoietic stem cells during embryogenesis, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 50:45-60, 2000. 40
- Davies *et al.*, *Biochem J.*, 351:95-105, 2000.
- de Gouville *et al.*, *Drug News Perspective*, 19(2):85-90, 2006.
- Downey *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(35):21005-21011, 1996.

## 【化4】

- Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro*, 1993.
- Evans *et al.*, *Theriogenology*, 33:125-129, 1990.
- Evans and Kaufman, *Nature*, 292:154-156, 1981.
- Fernandes *et al.*, *Nature Cell Biology*, 6:1082-1093, 2004.
- Frame *et al.*, *Biochemical J.*, 359:1-16, 2001.
- Gellibert, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 49(7):2210-2221, 2006. 10
- Gene Targeting, A Practical Approach, 1993.
- Gould *et al.*, *Intl. J. Neuropsychopharmacology*, 7:387-390, 2004.
- Gould *et al.*, *Pharmacological Res.*, 48:49-53, 2003.
- Gouon-Evans *et al.*, BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm, *Nat. Biotechnol.*, 24:1402-1411, 2006.
- Gronthos, *Blood*, 84(12):4164-4173, 1994.
- Guide to Techniques in Mouse Development, Methods Enzymol.*, Vol. 225, P. M. Wassarman, M. L. DePamphilis (eds.), 1993. 20
- Harb *et al.*, *PLoS One*, 3(8):e3001, 2008.
- Hill *et al.*, *Exp. Hematol.*, 24(8):936-943, 1996.
- Hochereau-de Reviers and Perreau, *Reprod. Nutr. Dev.*, 33:475-493, 1993.
- Huber *et al.*, Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm, *Blood*, 92:4128-4137, 1998.
- Inman *et al.*, *Molec. Pharmacol.*, 62(1):65-74, 2002.
- In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, J. V. Castell and M. J. Gomez-Lechon (eds.), Academic Press, 1997. 30
- Jainchill *et al.*, *J. Virol.*, 4(5):549-53, 1969.
- Jaiswal *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 64(2):295-312, 1997.
- Johnstone *et al.*, *Exp. Cell. Res.*, 238(1):265-272, 1998.
- Keller *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7(6):862-9, 1995.
- Kim *et al.*, *Xenobiotica*, 38(3):325-339, 2008.
- King, The use of animal models in diabetes research, *British J. of Pharm.*, 166:877-894, 2012.
- Klimanskaya *et al.*, *Lancet.*, 365(9471):1636-41, 2005. 40
- Kobberup *et al.*, *Developmental Dynamics*, 236:3100-3110, 2007.
- Kodama *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 112(1):89-95, 1982.
- Kuzuya *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vascular Biol.*, 21:765, 2001.
- Lengner *et al.*, *Cell*, 141:872-883, 2010.

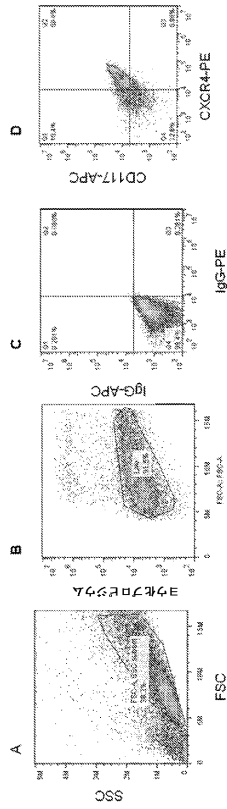
## 【化5】

- Li *et al.*, *Nature*, 405:689-694, 2000.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.
- Makino *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 103(5):697-705, 1999.
- Marshall *et al.*, Polarized expression of bone morphogenetic protein-4 in the human aorta-gonad-mesonephros region, *Blood*, 96:1591-1593, 2000.
- Martin *et al.*, *Nature Immunology*, 6:111-184, 2005. 10
- Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(12):7634-8, 1981.
- McLendon *et al.*, *FASEB J.*, 14:2383-2386, 2000.
- Moore and Piedrahita, *In Vitro Cell Biol. Anim.*, 33:62-71, 1997.
- Moore and Piedrahita, *Mol. Reprod. Dev.*, 45:139-144, 1996.
- Noble *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, 102:6990-6995, 2005.
- Nostro *et al.*, Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell*, 2:60-71, 2008. 20
- Nostro *et al.*, Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells, *Development*, 138:861-871, 2011.
- Piedrahita *et al.*, *Theriogenology*, 34:879-901, 1990.
- Piedrahita *et al.*, *Biol. Reprod.*, 58:1321-1329, 1998.
- Pinnix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:481-487, 2000.
- Potten, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 353:821-830, 1998.
- Rathjen *et al.*, Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy, *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:31-47, 1998. 30
- Reubinoff *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 18:399-404, 2000.
- Ring *et al.*, *Diabetes*, 52:588-595, 2003.
- Roth *et al.*, *J. Med. Chem.*, 53:7287-7295, 2010.
- Schaffer *et al.*, *Gene*, 302(1-2):73-81, 2003.
- Shearmen *et al.*, *Biochemistry*, 39:8698-8704, 2000.
- Shiroi *et al.*, Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione, *Stem Cells*, 20:284-292, 2002. 40
- Shroyer *et al.*, *Genes Dev.*, 19:2412-2417, 2005.
- Smith, In: *Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000.
- Solinas *et al.*, *J. Med. Chem.*, 55:1559-1571, 2012.

## 【化6】

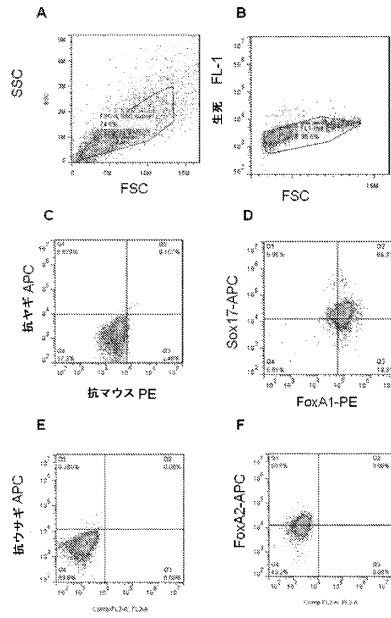
- Srinivasan and Ramarao, Animal models in type 2 diabetes research: An overview, *Indian J. Med. Res.*, 125:451-472, 2007.
- Strojek *et al.*, *Theriogenology*, 33:901-903, 1990.
- Suzuki *et al.*, *Cancer Res.*, 67(5):2351-2359, 2007.
- Takahashi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:18664-18670, 2003.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 126:663-676, 2006. 10
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872, 2007.
- Takahashi and Yamanaka, *Cell*, 126:663-676, 2006.
- Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:7844-7848, 1995.
- Thomson *et al.*, *Science*, 282:1145, 1998.
- Thomson and Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165, 1998.
- Thomson and Odorico, *J. Trends. Biotechnol.*, 18:53-57, 2000.
- Tojo *et al.*, *Cancer Sci.*, 96:791-800, 2005.
- Wagman, *Current Pharmaceutical Design*, 10:1105-1137, 2004. 20
- Watanabe *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 8(3):288-96, 2005.
- Watt, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 353:831, 1997.
- Wheeler, *Reprod. Fert. Dev.*, 6:563-568, 1994.
- Wianny *et al.*, *Biol. Reprod.*, 57:756-764, 1997.
- Winkler *et al.*, *Org. Lett.*, 11:2824-2827, 2009.
- Wolfe *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41:6, 1998.
- Xu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001.
- Yang and Anderson, *Theriogenology*, 38:315-335, 1992. 30
- Ying *et al.*, *Cell*, 115:281-292, 2003.
- Ying, *Nature*, 453:519-23, 2008.
- Yoo *et al.*, *J. Bone Joint Sure. Am.*, 80(12):1745-1757, 1998.
- Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920, 2007.
- Yu *et al.*, *Science*, 324:797-801, 2009.
- Yu and Thompson, *Genes Dev.*, 22(15):1987-1997, 2008.

【 図 1 】



FIGs. 1A-D

【 図 2 - 1 】



FIGs. 2A-F

【 図 2 - 2 】

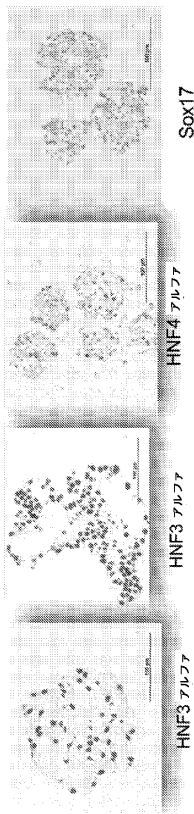


FIG. 2G

【 図 3 】

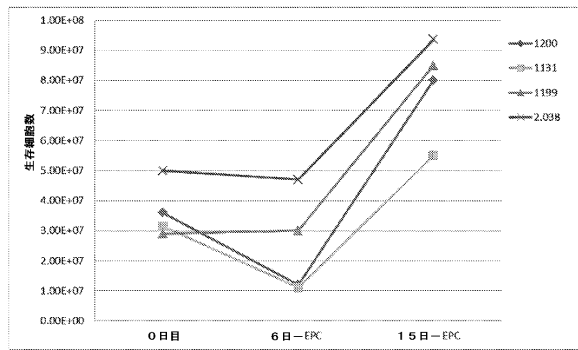


FIG. 3

【 図 4 】

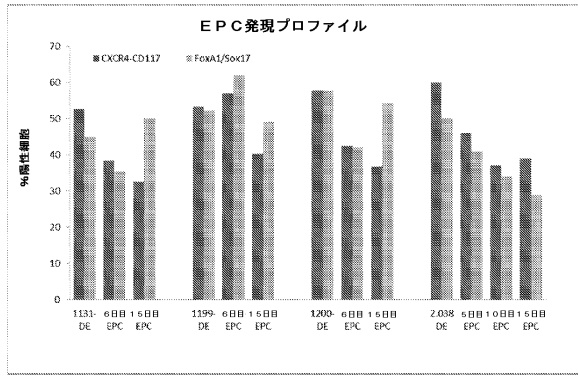


FIG. 4

【 図 6 】

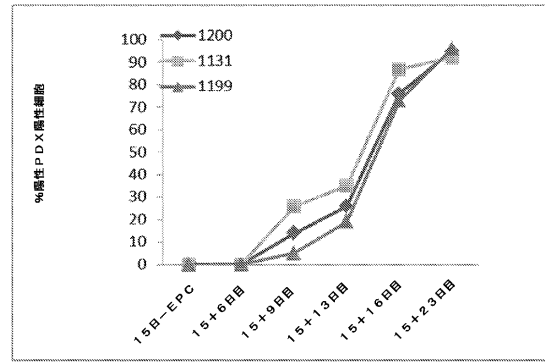


FIG. 6

【 図 5 】

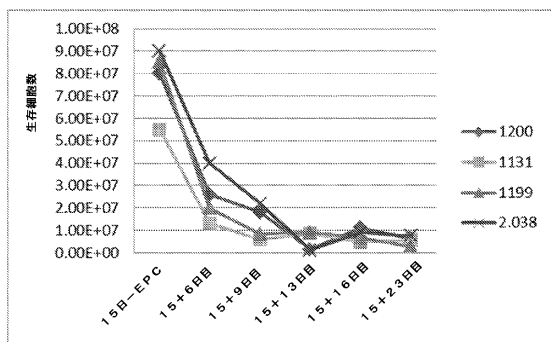


FIG. 5

【 図 7 】

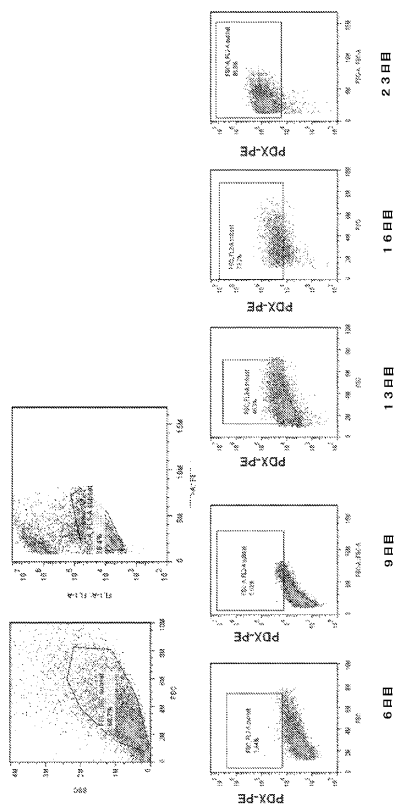


FIG. 7

【 図 8 】

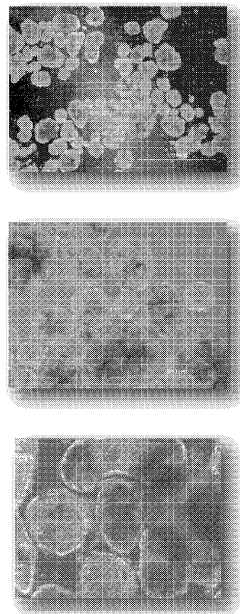


FIG. 8

【図 9】

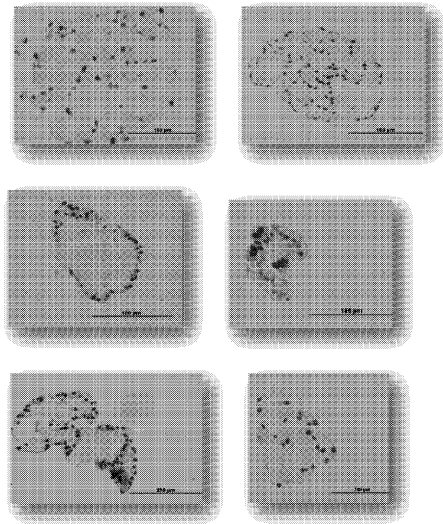
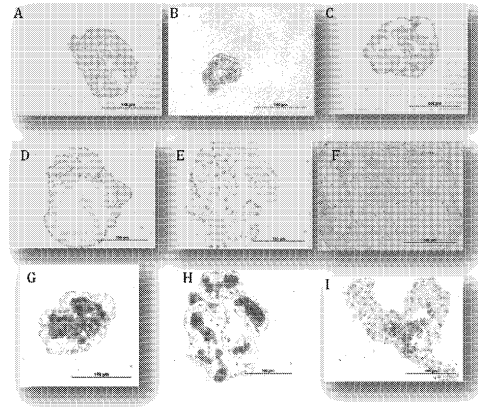


FIG. 9

【図 10 A - I】



FIGs. 10A-I

【図 11】

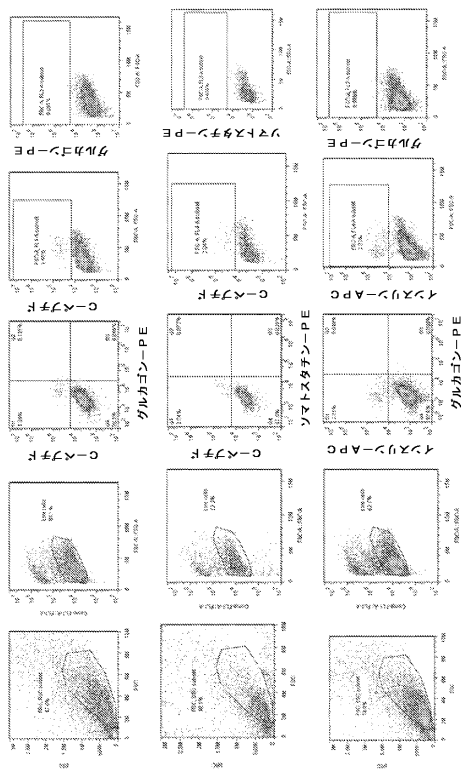


FIG. 11

【図 12】

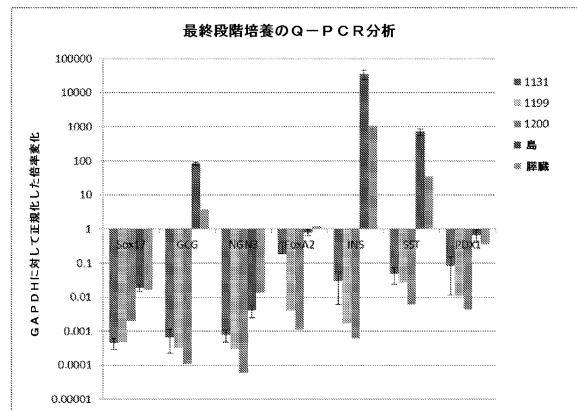


FIG. 12

【 図 13 】

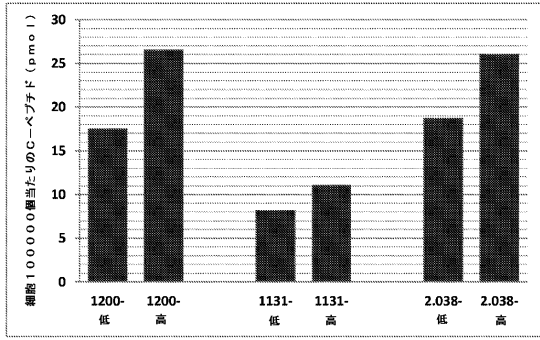


FIG. 13

【 図 14 】

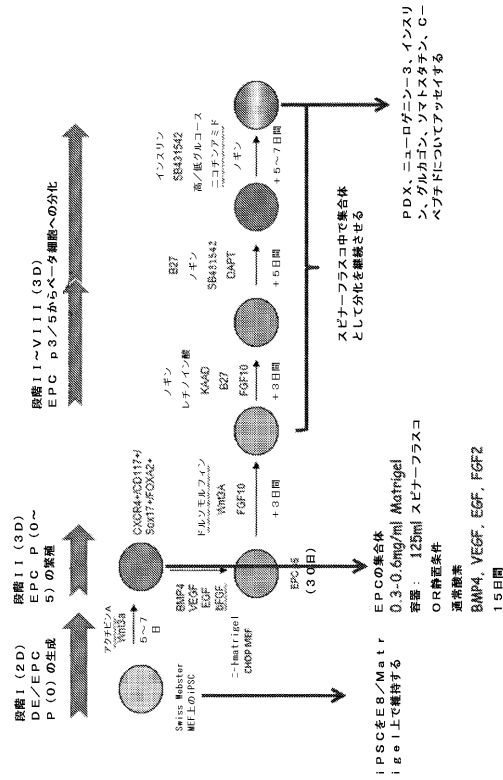


FIG. 14

【 図 15 】

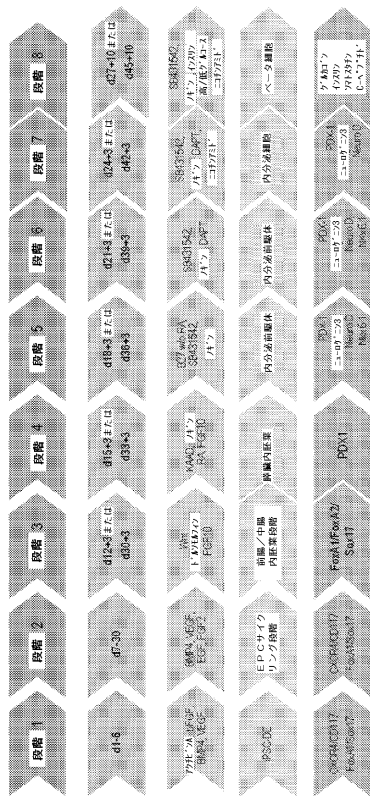
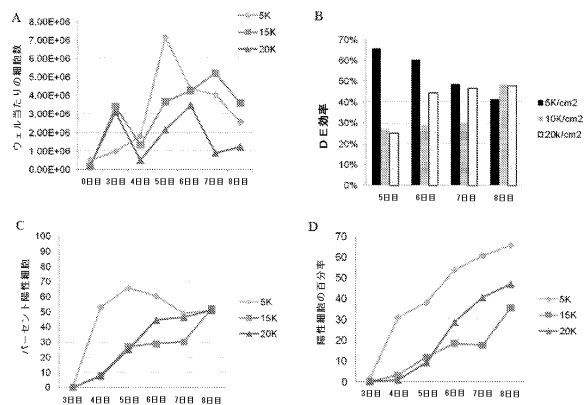


FIG. 15

【 図 16 】



Figs. 16A-D

【 図 17 】

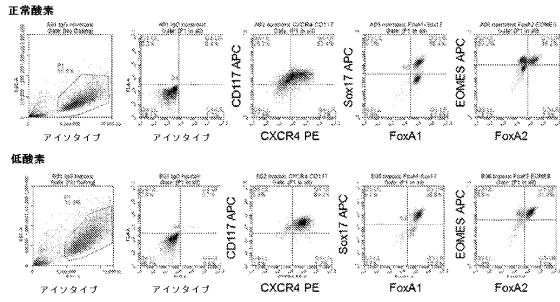


FIG. 17

【 図 18 - 1 】

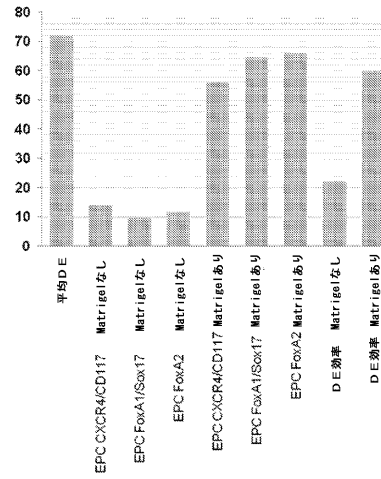
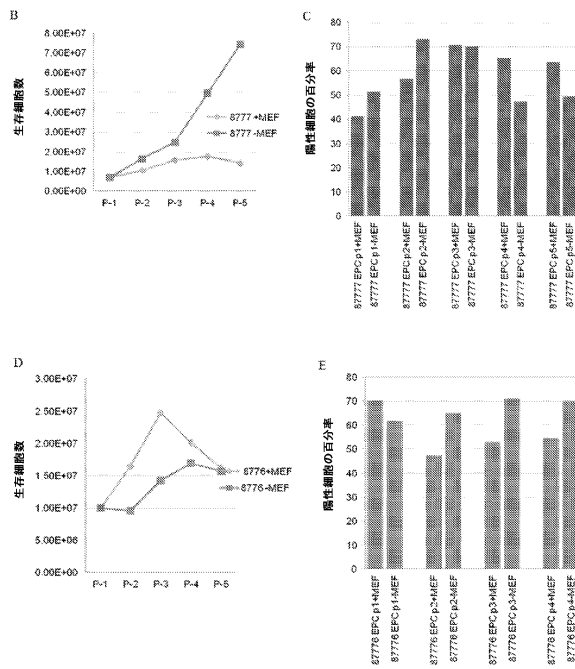


FIG. 18A

【 図 18 - 2 】



FIGS. 18B-E

【 図 19 A 】

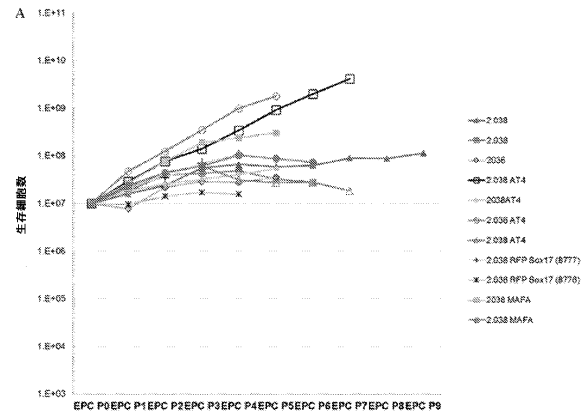


FIG. 19A

【 図 19 B 】

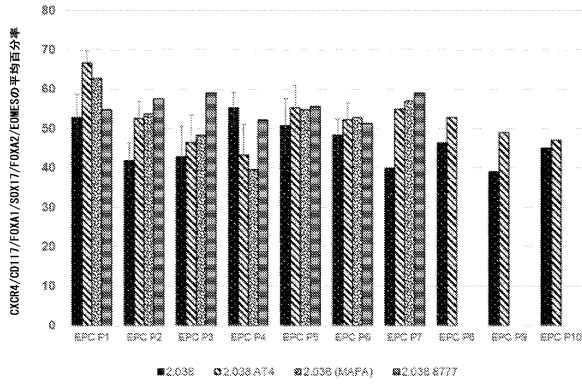
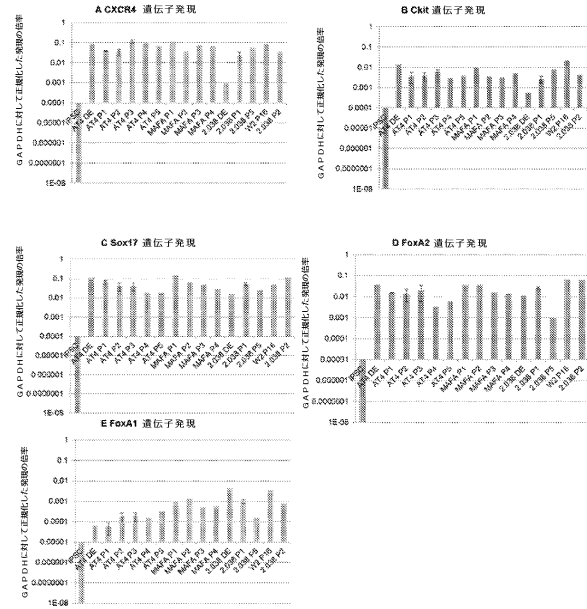


FIG. 19B

【 図 20 】



FIGs. 20A-E

【 図 21 】

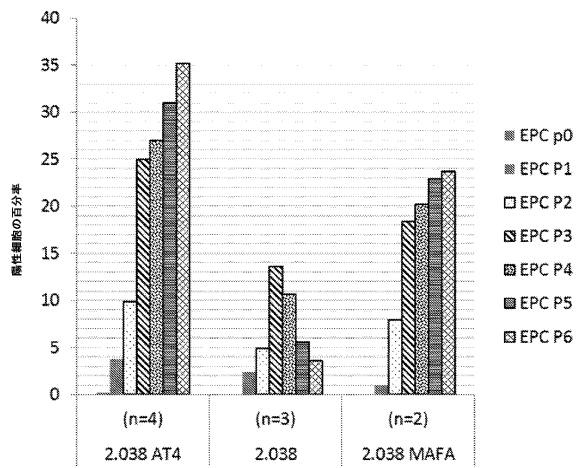


FIG. 21

【 図 22 】

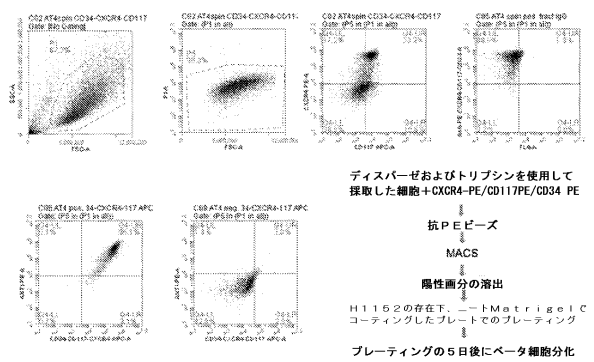


FIG. 22

【 図 23 】

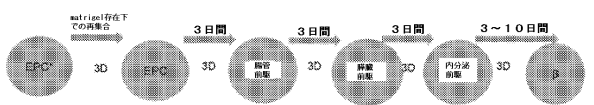
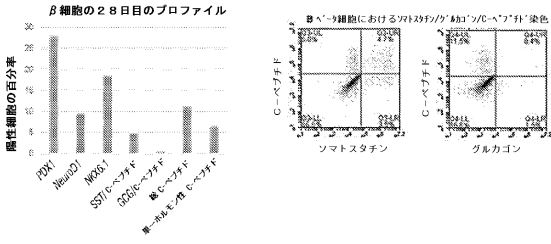


FIG. 23

【 図 2 4 】



FIGs. 24A-B

【 図 2 5 】

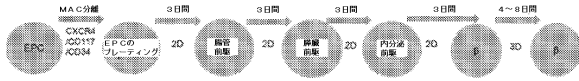


FIG. 25

【 図 2 6 A 】

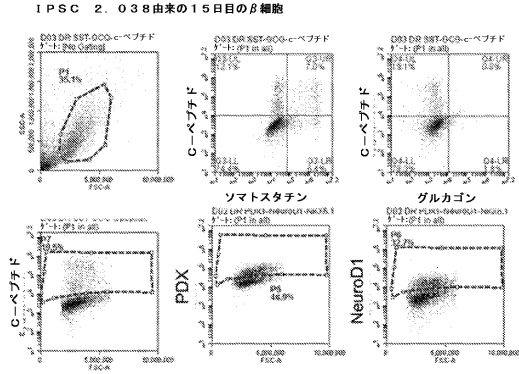


FIG. 26A

【 図 2 6 B 】

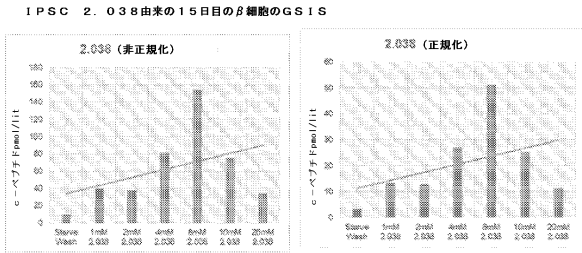
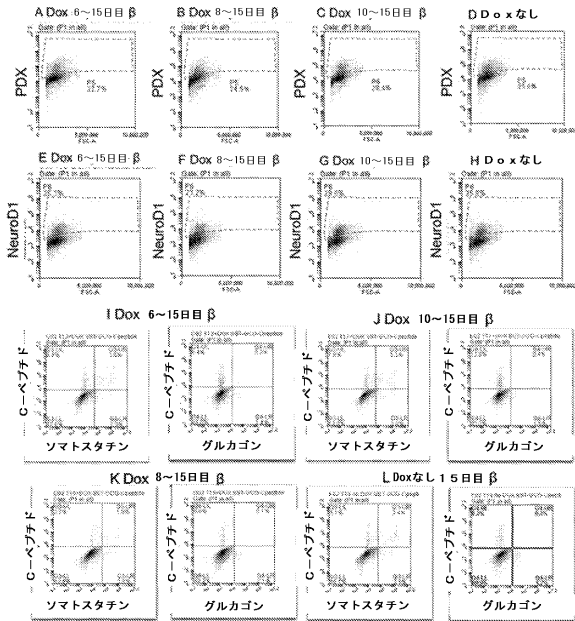


FIG. 26B

【 図 2 7 】



FIGs. 27A-L

【 図 2 8 】

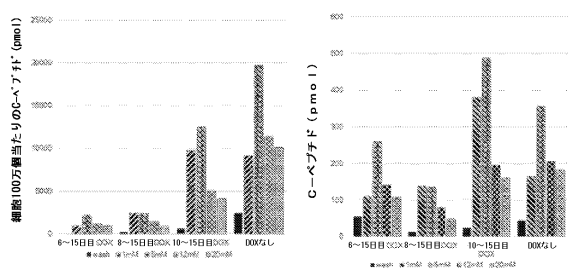
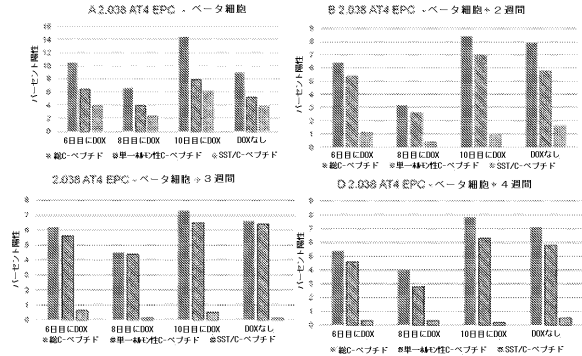


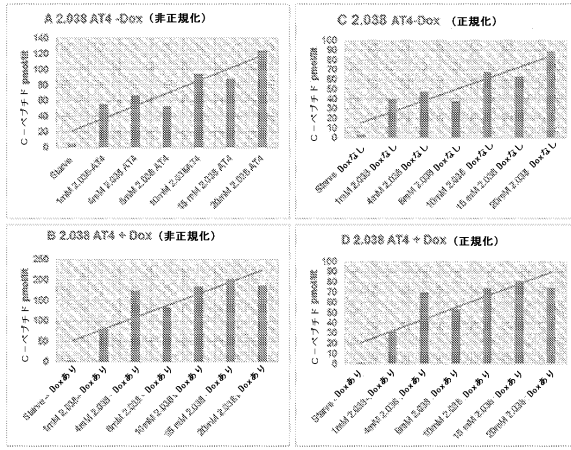
FIG. 28

【 図 2 9 】



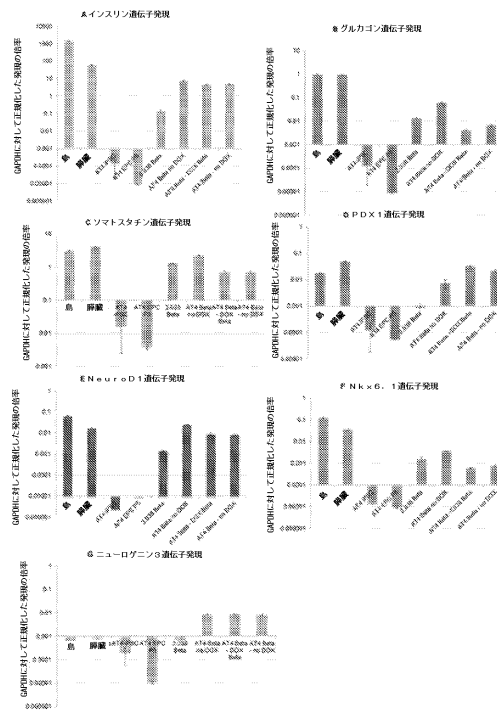
FIGs. 29A-D

【 図 3 0 】



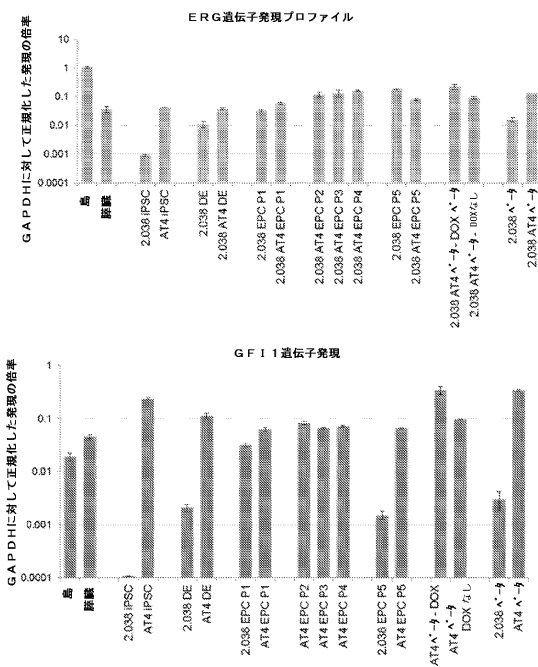
FIGs. 30A-D

【 図 3 1 】



FIGs. 31A-G

【 図 3 2 】



FIGs. 32A-B

---

フロントページの続き

(72)発明者 バートン, サラ アリス  
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53704, マディソン, ウェイリッジ ドライブ 11  
13, ナンバー3

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2012/178215(WO, A1)  
国際公開第2009/027654(WO, A1)  
国際公開第2011/139628(WO, A1)  
Tissue Engineering: Part A, 2009年, Vol.15, No.8, p.2051-2063

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)