

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-104141

(P2017-104141A)

(43) 公開日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	4 C 0 8 7
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 L 27/36 1 0 0	
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-55801 (P2017-55801)	(71) 出願人	510003830
(22) 出願日	平成29年3月22日 (2017.3.22)		セルラー ダイナミクス インターナショナル、インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2015-86666 (P2015-86666) の分割		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 リサーチ パーク
原出願日	平成22年10月19日 (2010.10.19)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/252, 919		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成21年10月19日 (2009.10.19)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋細胞の生成

(57) 【要約】

【課題】心筋細胞の生成の提供。

【解決手段】多能性幹細胞の分化から心筋細胞を生成するための方法および組成物を提供する。例えば、ある態様において、ROCK阻害剤の存在下で、大体積の懸濁培養物中の多能性幹細胞を分化させることを含む方法を記載する。さらなる態様において、様々な幹細胞クローンおよび様々なバッチの培養培地間の変動性を克服する、幹細胞を心筋細胞に分化させるための方法を提供する。心筋細胞の生成を増大するための方法であって、該方法は：a)凝集物形成を促進する条件下で懸濁培養物中の選択された細胞クローンからの多能性幹細胞をインキュベートするステップと、b)選択されたバッチの培養培地から調製される心臓分化培地中で該幹細胞を心筋細胞に分化させるステップとを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願図面に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2009年10月19日に出願された米国仮出願第61/252,919号（この全内容は、参考として本明細書に援用される）の優先権の利益を主張する。この出願の主題はまた、2010年10月19日に出願されたUS S N第61/394,589号（この全体の開示は、放棄することなくその全体が参考として本明細書に具体的に援用される）の主題にも関する。

10

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、概ね、幹細胞の発生の分野に関する。より具体的には、本発明は、多能性幹細胞からの心筋細胞の分化の誘導に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

心筋細胞は最終分化していると考えられている。小さな割合の心筋細胞には増殖能力があることがあるが、損傷し、または死滅した心筋細胞を十分に置き換えるにはこれでは十分ではない。心筋細胞の死は、例えば、冠状血管が血栓によって閉塞され、他の冠状血管から周囲の心筋に必要なエネルギー源が供給され得ない場合に起こる。機能的な心筋細胞の喪失は慢性心不全をもたらすことがある。

20

【0004】

心筋細胞の増殖能力は、心筋損傷後の心臓を再生するのに十分ではない。様々なステージの虚血性心疾患を有する患者に対する従来の薬理学的治療により、心臓の機能、生存、および生活の質は改善される。しかし、虚血性心疾患は米国および欧州において依然として最も生命を脅かす疾患であり、したがって虚血性心疾患を有する患者に対する臨床成績をさらに改善するのに代替治療が必要である。近年、骨格筋芽細胞、成体心筋幹細胞、骨髄幹細胞、および胚性幹細胞などの移植に対する可能性のある細胞源の数の増大によって刺激されて、細胞置換療法に対する焦点が強化されている。

30

【0005】

「正常な」心臓機能を復旧するのに可能性のある経路は、新しい機能的な心筋細胞による、損傷または死滅した心筋細胞の置換である。多能性幹細胞、例えば、ヒト胚性幹（ES）細胞または人工多能性幹細胞（iPS）細胞は、心筋細胞の置換に対して可能性のある細胞の源である。多能性幹細胞の心筋細胞への分化は、自発的に、または誘導時のいずれかに達成され得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、多能性幹細胞から心筋細胞系統の細胞を大幅に豊富にした集団を得るパラダイムの開発の途上には数々の障害が立ちはだかっている。霊長類起源の多能性細胞の相対的な脆弱性、これらの培養における困難、培養環境中に存在する様々な因子に対するこれらの繊細な感受性および依存性、ならびに分化方法の低い効率および広い変動性の結果として起こるものもある。したがって、特に大規模に生成するために、多能性幹細胞の心筋細胞への分化の誘導を改善する必要性がある。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、臨床応用における必要性を満たすための、特に大規模かつ高効率の生成のための、多能性幹細胞を心筋に分化させるための方法を提供することによって、当技術分野

50

における主要な欠陥を克服するものである。

【0008】

多能性幹細胞を分化させるための手順は、特異的な増殖因子の添加によるなど特定の系統の発生を推進する *in vivo* の環境を模倣しようとする培養条件を使用するのが好ましい。*in vitro* で分化させた場合、1) 細胞自体からの内因性の発現、2) その中で多能性幹細胞が培養され、および／または引き続き分化させられる血清および／または培地（非限定的な例として、TeSR、mTeSR、RPMI 培地、補充DMEM-F12またはその希釈物が含まれる）、ならびに3) 外因性の増殖因子の添加を含めた数々の源が増殖因子の環境に寄与する。増殖因子の内因性の発現に関して、本発明者らは、クローン毎の変動性および細胞の一次培養物における違いによる変動性を認めている。さらに、本発明者らは、多能性幹細胞の培養および分化において用いられる培養培地の増殖因子含量におけるバッチ毎の変動性が（ときには劇的に）存在し、培養も分化も細胞系統の分化に対する予測不可能性を導入することを決定している。

10

【0009】

多能性幹細胞の分化の手順における前述の変動性を是正するために、本発明者らは、所与の分化培養物中の増殖因子の環境に寄与する全ての源の説明となる技術を開発し、これらの源は最適の分化を達成するために、用いられる各バッチまたは培地のロットに対して、および各々の個々の幹細胞クローンに対して独立に「バランスが取れている」。これは、発生上のシグナル伝達経路を変調するための分化因子の添加によって達成され得る。例として、1) ある経路におけるシグナルの合計を低減するためのアンタゴニストの添加、2) ある経路のシグナルの合計を増大するためのアゴニストの添加、または3) シグナルを最適化するためのアゴニストおよびまたはアンタゴニストの組合せが含まれる。

20

【0010】

心筋細胞の生成を増大するために、凝集物形成を促進する条件下で懸濁培養物中の選択された細胞系から多能性幹細胞をインキュベートし、選択されたバッチの培養培地から調製された心臓分化培地中で幹細胞を心筋細胞に分化させることを含む方法を提供する。例えば、培養培地は、TeSR、mTeSR、またはRPMI 培地、補充DMEM-F12またはその希釈物である。心筋細胞の分化の場合、理論によって拘泥しようとするものではないが、TGF β シグナル伝達経路が、最適の心臓分化の条件を達成するためにある種の増殖因子の外部からの添加を調整することによって細かく制御され得ることが企図される。特に、BMPシグナル伝達およびアクチビンシグナル伝達は、用いられる特定のバッチの培地および多能性細胞クロンの（例えば、iPS系からの）特定のバッチに最適化され得る2つの例示のTGF β シグナル伝達経路である。2つのシグナル伝達経路間の相対的な活性比は、最適の心筋細胞分化条件にとって重要であり得る。このように、分化因子は、BMPシグナル伝達および／またはアクチビンシグナル伝達の正のモジュレーターまたは阻害剤を含み得る。例えば、BMPシグナル伝達阻害剤はドルソモルフィンを含み、アクチビンシグナル伝達阻害剤はSB431542を含む。

30

【0011】

このように、本発明のいくつかの態様によると、心臓分化培地は、培養培地中の1つまたは複数の分化因子のレベルを、選択された細胞クローンまたは細胞系の心臓分化および使用される培養培地バッチに好適であると決定される量に調整することによって、培養培地から調製される。特定の態様において、選択された細胞クローンは人工多能性幹（iPS）細胞クローンである。本明細書下記（実施例8）に記載するのは、あらゆる所与の培地のバッチおよび使用される多能性細胞クローンに対して添加すべき好適な量の増殖因子を別々に決定するための例示の手順である。特定の培地のバッチおよび細胞クローンに対して調整が決定された後、調整は分化の手順中に組み入れられ、各々のバッチおよびクローンに誘えられた高度に再現性のある分化手順を提供する。

40

【0012】

選択された細胞クローンは接着培養物または懸濁培養物中の単一の多能性幹細胞に由来するのが典型的である。例えば、選択された細胞クローンが、例えばRh関連キナーゼ

50

(R O C K) 阻害剤またはミオシン I I 阻害剤を含む培地中で、細胞の増殖を促進する条件下、単一の多能性幹細胞をインキュベートすることを含むプロセスによって、単一の多能性幹細胞に由来するのが好ましい。このようなミオシン I I 阻害剤はブレビスタチン (b l e b b i s t a t i n) であってよい。多能性幹細胞の出発数は、少なくとも、もしくは多くても約 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 細胞であってよく、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。

【0013】

ある態様において、凝集物形成を促進する条件は、外部から添加される R O C K 阻害剤、ミオシン I I 阻害剤、線維芽細胞増殖因子 (F G F)、または肝細胞増殖因子 (h e p a t i c g r o w t h f a c t o r) (H G F) を含む。多能性幹細胞から形成される凝集物は、少なくとも、または多くて直径約 5、10、15、20、25、30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500 μm であってよい。直径は、平均の (m e a n)、中央の、または平均の (a v e r a g e) 直径であってよい。懸濁培養物は、少なくとも、または多くて約 2 ml、5 ml、10 ml、20 ml、30 ml、40 ml、50 ml、100 ml、200 ml、500 ml、1 リットル、3 リットル、5 リットル、10 リットル、20 リットル、25 リットル、30 リットル、40 リットル、50 リットルの体積を有してよく、またはバイオリアクター中など、これらに由来するあらゆる範囲であってよい。

【0014】

心臓分化培地は、外部から調整される線維芽細胞増殖因子 (F G F)、肝細胞増殖因子、または用いられ、もしくはスクリーニングされるあらゆる分化因子も含み得る。このような F G F、または T G F β シグナル伝達モジュレーターなどの他の分化因子は、少なくとも、または多くても約 0.1、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200 ng / ml の量、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。

【0015】

所望の細胞を選択または富化するために、多能性幹細胞および／または多能性幹細胞から分化した心筋細胞は、1 つまたは複数の導入遺伝子を含んでいてよい。例えば、1 つまたは複数の導入遺伝子は、心筋細胞特異的なプロモーターの制御下で選択マーカーおよび／またはスクリーニング可能マーカーをコードしている。方法は分化した心筋細胞を富化する、または精製することをさらに含み得る。

【0016】

ある態様において、培養培地中でそのレベルを調整された分化因子は、骨形成タンパク質のシグナル伝達経路のモジュレーター、アクチビン A / ノーダル、血管内皮増殖因子 (V E G F)、ディックコップ (d i c k k o p f) ホモログ 1 (D K K 1)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、インスリン様成長因子 (i n s u l i n g r o w t h f a c t o r) (I G F)、および／または上皮増殖因子 (E G F) の 1 つまたは複数を含む。例えば、分化因子は、BMP 2、BMP 4、BMP 10、アクチビン A、b F G F、I G F、E G F、BMP シグナル伝達阻害剤、アクチビンシグナル伝達阻害剤、またはこれらの組合せを含み得る。特に、BMP シグナル伝達阻害剤はドルソモルフィンを含むことができ、アクチビン A シグナル伝達阻害剤は S B 4 3 1 5 4 2 を含み得る。

【0017】

ある態様において、分化培地は、心筋細胞の分化用など、1 つまたは複数の分化因子の添加の量を調整することによって、選択されたバッチの培養培地から調製することができた。さらなる態様において、分化培地は、やはり心筋細胞の分化用など、1 つまたは複数の分化因子の添加のタイミングを調整することによって、選択されたバッチの培養培地から調製することができた。

【0018】

あらゆる所与の培地バッチおよび使用される多能性細胞クローンに添加しなければならない増殖因子の好適な量および／またはタイミングを別々に決定することを伴う方法も提

10

20

30

40

50

供する。特定の培地バッチおよび細胞クローンに対して調整が決定された後、調整は分化手順中に組み入れられ、各バッチおよびクローンに求めた高度に再現性のある分化手順を提供する。

【0019】

ある態様において、方法は、心筋細胞など、選択された系統に分化させるのに好適な1つまたは複数の分化因子の添加の量を決定することを含み得る。この決定は、試験期間の間に様々な量の分化因子を添加した選択されたバッチからの培養培地中の選択されたクローンからの細胞の分化を試験することを含み得る。例えば、試験期間の間に様々な量の分化因子を加えることができる。試験期間は、分化因子の特定の濃度の試験条件に対して同じであっても、または変化してもよい。例えば、試験期間は、分化前約1、2、3、4、5、6、7日、または分化後1、2、3、4、5日から始まり、分化後6、7、8、9、10、11、12、もしくは13日目に終了することができる（あらゆる中間の期間も含まれてよい）。同じ濃度の分化因子を、毎日、または2、4、8、16、24、48時間毎、またはあらゆる中間の間隔で変えることができる。

10

【0020】

このような様々な量の分化因子は、様々な比率のBMP／アクチビンシグナル伝達活性での条件を含み得る。これは、BMP、アクチビン、BMPシグナル伝達阻害剤、および／またはアクチビンシグナル伝達阻害剤の量を変化させることによって実現され得る。例えば、この変動は以下の様々な条件の1つまたは複数を含み得る：様々な濃度のBMP4単独、様々な濃度のアクチビンA単独、様々な濃度のBMPシグナル伝達阻害剤、様々な濃度のアクチビンシグナル伝達阻害剤、ならびに様々な濃度のBMP4およびアクチビンAの組合せ。

20

【0021】

心筋細胞の好適な分化条件を決定するために、試験は、各条件に対する中胚葉または心筋細胞の分化効率を測定し、最高の分化効率を有する条件を、選択された多能性幹細胞クローンが心筋細胞に分化するのに、および使用される培養培地の選択されたバッチに好適であるとして選択することをさらに含み得る。分化効率の測定は、分化後少なくとも、または約5、6、7、8、9、10、11、12、13日、またはあらゆる中間の時間範囲に、中胚葉マーカーの発現を測定することを含み得る。中胚葉マーカーの非限定的な例には、KDR、PDGFR- α 、CXCR4、CKIT^{negative}、N-カドヘリン、および／またはMESP1が含まれる。他の態様において、分化効率の測定は、分化後約、または少なくとも14日の心筋細胞マーカーの発現を測定することを含む分化効率の測定を含み得る。好適な条件を選択した後、方法は、選択されたバッチの培養培地から調製された分化培地中で幹細胞を心筋細胞に分化させることを含むことができ、分化培地は試験期間の間に選択された条件下、選択されたバッチの培養培地から調製された。

30

【0022】

少なくとも、または約90%（例えば、少なくとも、もしくは約90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の心筋細胞を含む、少なくとも、または約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 5×10^8 、 10^9 、 10^{10} 細胞（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の単離された細胞集団も提供することができる。

40

【0023】

ある一実施形態において、a) 懸濁培養物が凝集物促進培地を含む、凝集物形成を促進する条件下、懸濁培養物中で多能性幹細胞をインキュベートし、b) 次いで、心臓分化に適する懸濁培養物中で幹細胞を心筋細胞に分化させることを含む、心筋細胞の生成を増大するための方法も提供することができる。例えば、心臓分化に適する懸濁培養物の体積は5ミリリットルを超えてよい。凝集物促進培地はRho関連（ROCK）阻害剤を含むことができ、ある態様において、ROCK阻害剤はROCK特異的阻害剤であってよい。

【0024】

「生成の増大」の語は、別段の指摘がなければ、細胞の絶対数における増加を意味して

50

もよく、または非心筋細胞の細胞に比した心筋細胞のパーセント値における増大を意味してもよく、または両方でもよい。いくつかの実施形態において、方法は、心筋細胞の絶対数における増大に関係することができることが企図される。他の実施形態において、方法は心筋細胞のパーセント値における増大に関係してよい。さらなる実施形態において、心筋細胞の絶対数およびパーセント値両方における増大が存在してよい。

【0025】

さらなる一態様において、方法は、c)凝集物が形成した後、および／または分化後、複数の懸濁培養物をプールし、d)心筋細胞を富化することをさらに含む。

【0026】

いくつかの実施形態において、方法は、心筋細胞を少なくとも5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくはこれらに由来するあらゆるパーセント値を含む、少なくとも、または約 10^7 、 10^8 、 10^9 、または最高約 10^{10} 細胞（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の細胞集団をもたらす。

10

【0027】

別の一実施形態において、a)多能性幹細胞の凝集物を含む多能性幹細胞集団を得、b)幹細胞を心筋細胞に分化させる心臓誘導培地（CIMとも呼ばれる）を含む懸濁培養物中で多能性幹細胞をインキュベートすることを含む、心筋細胞を調製するための方法が存在する。心臓誘導培地は、線維芽細胞増殖因子（FGF）など、幹細胞を心筋細胞に分化させるのに有効な1つまたは複数の心臓誘導剤を含み得る。方法は、心筋細胞の大規模な生成に特に適する。多能性幹細胞の凝集物は懸濁培養物中で形成されてよく、懸濁培養物は、バイオリアクター中など、約0.5mlと約25リットルの間であってよい。いくつかの実施形態は、標準のペトリ皿または96ウェルプレートより体積の大きい空間における細胞の増殖を伴い、その結果いくつかの実施形態はこのような容器の使用を除外する。

20

【0028】

本発明のある実施形態において、心筋細胞の大規模な生成を実行することができる。本明細書で用いられる「大規模」は、少なくとも 1.0×10^6 細胞/mlの濃度を有する少なくとも500mlの体積の細胞培養物の使用を意味する。体積は、少なくとも、または約500ml、600ml、700ml、800ml、1リットル、2リットル、3リットル、5リットル、10リットル、20リットル、もしくは最高25リットルであってよく、またはバイオリアクター中など、これらに由来するあらゆる範囲であってよい。懸濁培養物中の細胞濃度は、少なくとも、または約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 細胞/mlであってよく、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。細胞は、これらを凝縮し、および／または細胞培養物の体積を低減するなどによって、生成後に操作されてよい。

30

【0029】

ある態様において、心筋細胞を大規模に生成するために、懸濁培養物は、少なくとも、または約10、15、20、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、150、200、250、300rpm、またはこれらに由来するあらゆる範囲の速度で動かすことができる。運動は、非限定的な例として、攪拌、振盪、または回転を含み得る。

40

【0030】

多能性幹細胞は1つまたは複数の導入遺伝子を含むことができ、例えば、方法のあらゆるステップを、トランスジェニック細胞を選択するための条件下で行うことができる。さらなる一態様において、心筋細胞は、FGFの添加を欠く心臓維持培地中でインキュベートしてもよい。上記に記載したステップb)など、本発明のステップは、少なくとも1、2、3、4、5、6日、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15週、もしくは最高106日、またはこれらに由来するあらゆる時間の範囲続くことができる。さらなる態様において、方法は、c)凝集物が形成した後、および／または分化後、複数の懸濁培養物をプールし、d)心筋細胞に対して濃縮することをさらに

50

含む。いくつかの実施形態において、方法は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の心筋細胞を含む、少なくとも、または約 10^7 、 10^8 、 10^9 、または最高約 10^{10} 細胞（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の細胞集団をもたらす。

【0031】

他の実施形態は、a)凝集物形成を促進する条件下、ROCK阻害剤およびFGFを含む凝集物促進培地を含む5ミリリットルを超える懸濁培養物中でトランスジェニックiPS細胞の集団を増殖させ、b)次いで、心筋細胞の分化を促進する条件下、FGFを含む心臓誘導培地を含む懸濁培養物中でiPS細胞を心筋細胞に分化させることを含む心筋細胞を調製するための方法に関する。ある態様において、トランスジェニックiPS細胞の集団は、単一のトランスジェニックiPS細胞にクローン的に由来してよい。さらなる一態様において、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）を含む少なくとも、または約 10^7 、 10^8 、 10^9 、または最高約 10^{10} 細胞（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の細胞集団の心筋細胞が上記に記載した方法によって生成され、方法は、c)凝集物が形成した後および／または分化した後複数の懸濁培養物をプールし、d)心筋細胞に対して濃縮することをさらに含む。

【0032】

ある種のさらなる実施形態において、方法は、心筋細胞を生成または調製するための出発材料として多能性幹細胞を伴い、これらは胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹細胞、または体細胞の核移植によって由来する胚性幹細胞であってよい。ある一態様において、多能性幹細胞は、単一の多能性幹細胞にクローン的に由来してよく、単細胞にクローン的に由来する細胞の実質的な部分を含んでよく、または細胞の複数の集団のプールであってよく、この場合、細胞の各集団は単細胞にクローン的に由来する。単細胞から多能性幹細胞を得るための例示の一プロセスは、細胞の増殖を促進する条件下、ROCK阻害剤を含む培地中で単一の多能性幹細胞をインキュベートすること、例えば、接着培養物条件下でインキュベートすることを含み得る。ステップa)において凝集物を形成するために懸濁培養物中で多能性幹細胞を増殖させる前に、単一の多能性幹細胞を開始源として、1回、2回、3回、4回、または好ましくは少なくとも5回継代してもよい。別の態様において、多能性幹細胞は、単細胞を超えて含むiPS細胞集団に由来してもよい。

【0033】

なおさらなる態様において、約 10^7 個から約 10^{10} 個の多能性幹細胞を、凝集物を形成するために、ステップa)における懸濁培養物中で最初にインキュベートしてもよい。多能性幹細胞の凝集物は、ROCK阻害剤を含む凝集物促進培地と多能性幹細胞をインキュベートすることによって形成されてよく、ROCK阻害剤は、少なくとも、または約0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1、1.5、2、2.5、5 μ M、またはこれらに由来するあらゆる範囲を含めた細胞の増殖もしくは生存を促進するのに有効なあらゆる濃度など、約0.05から約5 μ Mであってよい。

【0034】

ある態様において、凝集物促進培地など、培養培地は、例えば、少なくとも、または約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200ng/ml、またはこれらに由来するあらゆる範囲など、約5ng/mlから200ng/mlの濃度の線維芽細胞増殖因子（FGF）を含み得る。場合により、例えば、少なくとも、または約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200ng/ml、またはこれらに由来するあらゆる範囲の濃度の肝細胞増殖因子（HGF）も含まれていてよい。

【0035】

凝集物促進培地は、心筋細胞の濃縮または選択に用いられ得るゼオシンなどの抗生物質をさらに含み得る。分化前に多能性幹細胞によって形成される凝集物は、直径少なくとも、または約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400 μm （もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）であってよく、別の一態様において、少なくとも約20%、30%、40%、50%、80%、90%、95%、または99%（もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の凝集物が、少なくとも、または約10、15、20、25、30、35、40、45、50、80、100、150、200、250、300、400、500、1000細胞、またはこれらに由来するあらゆる範囲を含み得る。ある態様において、実質的な部分（例えば、約50%、80%、90%、95%、99%を超えて、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲）の凝集物が直径約80から200 μm である。分化は、凝集サイズを変えることによって操作され得る空間的な手がかり、および様々な細胞型の間の相互作用によって導かれるので、凝集物のサイズの最適な範囲がほぼ均一であれば、心筋細胞の分化を助けることができる。

10

【0036】

心臓分化のステップにおけるように、幹細胞を分化させるための懸濁培養物は、FGFを有する心臓誘導培地など、心臓分化に適するあらゆる心臓誘導培地を含むことができ、これらは少なくとも、または約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200 ng/ml 、またはこれらに由来するあらゆる範囲など、約5から約200 ng/ml の濃度を有することができる。さらなる一態様において、分化のための懸濁培養物、または心臓誘導培地は、ROCK阻害剤の添加を含まなくてよい。

20

【0037】

ある一態様において、上記に記載したあらゆる方法のステップa)またはb)におけるこのような懸濁培養物は、少なくとも、または約2 ml 、5 ml 、10 ml 、20 ml 、30 ml 、40 ml 、50 ml 、100 ml 、200 ml 、500 ml 、1リットル、3リットル、5リットル、10リットル、20リットル、もしくは最高25リットルであってよく、またはバイオリアクター中など、これらに由来するあらゆる範囲であってよい。方法の実施形態は、ステップa)の後など、複数の懸濁培養物をプールすることをさらに含み得る。例えば、凝集した細胞の複数の懸濁培養物を幹細胞の分化の前にプールしてもよく、または心筋細胞など、分化した幹細胞の複数の懸濁培養物をプールしてもよい。

30

【0038】

いくつかのさらなる態様において、トランスジェニックiPS細胞などの多能性幹細胞は、選択マーカーをコードする導入遺伝子など、1つまたは複数の導入遺伝子を含むことができ、この導入遺伝子は、例えば、抗生物質耐性、またはスクリーニング可能マーカー（蛍光もしくは発光でもよい）を付与する。凝集物促進培地または心臓誘導培地は、導入遺伝子を発現する細胞の選択を可能にする抗生物質を含み得る。心筋細胞を選択または濃縮するために、導入遺伝子は組織特異的プロモーターの制御下であってよく、この場合組織特異性は心筋細胞に対するものである。

40

【0039】

さらに、ある態様において、方法は分化した心筋細胞の濃縮または精製をさらに含み得る。ある一実施形態において、心筋細胞は1つまたは複数の選択可能な、またはスクリーニング可能な導入遺伝子を発現することができ、導入遺伝子は心筋細胞の濃縮または精製に用いられてよい。例えば、導入遺伝子は抗生物質耐性遺伝子であってよい。心筋細胞の濃縮または単離のために、このような導入遺伝子は、ミオシンプロモーターまたはトロポニンTプロモーターなど、心筋細胞に特異的であるプロモーターの制御下であってよい。

【0040】

さらなる実施形態は、少なくとも90%（例えば、少なくとも、もしくは約90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくはこれらに由来するあらゆる

50

る範囲)のトランスジェニック心筋細胞を含む、少なくとも、または約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 細胞(もしくはこれらに由来するあらゆる範囲)の単離された細胞集団を提供する。特定の一例において、細胞集団は、心筋細胞に特異的なプロモーターの下で導入遺伝子を含み得る。

【0041】

いくつかの実施形態において、a)トランスジェニック人工多能性幹(iPS)細胞から細胞集団を得、b)凝集物形成を促進する条件下、ROCK阻害剤およびFGFを有する凝集物形成培地を含む5ミリリットルから25リットルの少なくとも1つの懸濁培養物中でトランスジェニックiPS細胞の集団を増殖させ、c)場合により、iPS細胞凝集物を含む複数の懸濁培養物をプールし、d)次いで、FGFを有する心臓誘導培地を含む懸濁培養物中、プールしたiPS細胞凝集物を心筋細胞に分化させ、e)心筋細胞に対して濃縮することを含む、少なくとも90%(例えば、少なくとも、または約90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲)を含む、少なくとも、または約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 細胞(もしくはこれらに由来するあらゆる範囲)の細胞集団が存在することができる。

【0042】

本発明の方法および/または組成物の状況において論じる実施形態は、本明細書に記載するあらゆる他の方法または組成物に関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適用することができる。

【0043】

核酸に関して本明細書で用いられる、「コードする」または「コードしている」の語は、本発明が当業者によって容易に理解されるように用いられるが、これらの語は、それぞれ「含む」または「含んでいる」と交換可能に用いられてよい。

【0044】

本明細書の明細書で用いられる「1つの(a)」または「1つの(an)」は1つまたは複数を意味することができる。本明細書の請求項(1つまたは複数)で用いられる通り、「含んでいる」という言葉と組み合わせて用いられる場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」は1つ、または1つを超えるものを意味することができる。

【0045】

特許請求の範囲における「または」の語の使用は、代替物のみを意味するように明確に指摘されなければ、または代替物が相互に排他的でなければ、「および/または」を意味するように用いられるが、本開示は代替物および「および/または」のみを意味する定義を支持するものである。本明細書で用いられる「別の(another)」は少なくとも2番目またはそれを超えて意味することができる。

【0046】

本出願を通して「約」の語は、値が装置に固有の誤差変動を含むことを示すために用いられ、方法は値、または試験対象間に存在する変動を決定するのに用いられる。

【0047】

本発明の他の目的、特徴、および利点は以下の発明を実施するための形態から明らかになるであろう。しかし、この発明を実施するための形態から本発明の精神および範囲内で様々な変更および改変が当業者には明らかになるので、発明を実施するための形態および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであるが、例示のみによって示されることを理解されたい。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

心筋細胞の生成を増大するための方法であって、該方法は：

a)凝集物形成を促進する条件下で懸濁培養物中の選択された細胞クローンからの多能性幹細胞をインキュベートするステップと、

b)選択されたバッチの培養培地から調製される心臓分化培地中で該幹細胞を心筋細胞

に分化させるステップと

を含み、該培養培地中の1つまたは複数の分化因子のレベルを、該選択された細胞クローンの心臓分化および採用される培養培地バッチに好適であると決定された量に調整することによって、該分化培地は該培養培地から調製された、方法。

(項目2)

前記選択された細胞クローンが人工多能性幹(iPS)細胞クローンである、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記選択された細胞クローンが接着培養物中の単一の多能性幹細胞に由来する、項目1に記載の方法。

10

(項目4)

細胞増殖を促進する条件下で、Rho関連キナーゼ(ROCK)阻害剤またはミオシンII阻害剤を含む培地中で前記単一の多能性幹細胞をインキュベートすることを含むプロセスによって、前記選択された細胞クローンが単一の多能性幹細胞に由来する、項目3に記載の方法。

(項目5)

約 10^6 個から約 10^{10} 個の前記多能性幹細胞をステップa)における前記懸濁培養物中で最初にインキュベートする、項目1に記載の方法。

(項目6)

凝集物形成を促進する前記条件が、外部から添加されるROCK阻害剤、ミオシンII阻害剤、線維芽細胞増殖因子(FGF)、または肝細胞増殖因子(HGF)を含む、項目1に記載の方法。

20

(項目7)

前記ミオシンII阻害剤がプレバスタチンである、項目4または6のいずれかに記載の方法。

(項目8)

心臓分化の前に前記多能性幹細胞から形成された前記凝集物が直径約10nmから400μmである、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記幹細胞に分化させるための前記懸濁培養物が5ミリリットルから25リットルまでの体積を有する、項目1に記載の方法。

30

(項目10)

前記多能性幹細胞および／または該多能性幹細胞から分化した心筋細胞が1つまたは複数の導入遺伝子を含んでいる、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記1つまたは複数の導入遺伝子が、心筋細胞特異的なプロモーターの制御下の選択マーカーおよび／またはスクリーニング可能マーカーをコードしている、項目10に記載の方法。

(項目12)

分化した前記心筋細胞を富化または精製するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

40

(項目13)

前記心臓分化培地が、5ng/mlから200ng/mlの量の外部から添加された線維芽細胞増殖因子(FGF)を含む、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記懸濁培養物が約15rpmから100rpmの速度で回転または振盪される、項目1に記載の方法。

(項目15)

前記培養培地が、TESR、mTESR、RPMI培地、補充DMEM-F12またはその希釈物である、項目1に記載の方法。

50

(項目 16)

前記培養培地中でそのレベルが調整されている前記分化因子が、骨形成タンパク質、アクチビンA／ノーダル、血管内皮増殖因子 (VEGF)、ディックコップホモログ1 (DKK1)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、および／または上皮増殖因子 (EGF) のシグナル伝達経路のモジュレーターの1つまたは複数を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 17)

前記分化因子が、BMP2、BMP4、BMP10、アクチビンA、bFGF、IGF、EGF、BMPシグナル伝達阻害剤、アクチビンシグナル伝達阻害剤、またはこれらの組合せを含む、項目 16 に記載の方法。

10

(項目 18)

前記BMPシグナル伝達阻害剤がドルソモルフィンを含む、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記アクチビンAシグナル伝達阻害剤がSB431542を含む、項目 17 に記載の方法。

(項目 20)

少なくとも99%の心筋細胞を含む、約 5×10^8 から 10^{10} 細胞の単離された細胞集団。

【0048】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に表す特定の実施形態の発明を実施するための形態と組み合わせて、これらの図面の1つまたは複数を参照することによってより理解され得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、クエン酸ナトリウム細胞分割／ダブルスタックのスケールアップ実験デザインを示す図である。

【図2】図2A～CはiPS6.1およびiPS6.1MRBに対する倍加時間を示す図である。これらのグラフは、iPS6.1およびiPS6.1MRBの両方に対する、ディスパーゼ分割したT150対照細胞およびクエン酸ナトリウム分割したダブルスタック細胞の倍加時間を示す。

30

【図3】図3は、クエン酸ナトリウムでのダブルスタック分割において維持されたiPS6.1およびiPS6.1MRB両方のMRBに対して行った核型試験の結果を示す図である。図1A～B：ULA T75またはT25フラスコのマーキング。

【図4】図4A～Dは、ダブルスタック (DS) およびT150フラスコ中iPS6.1細胞から形成された凝集物 (14日目) を示す図である。

【図5】図5A～Cは、ダブルスタック (DS) におけるiPS6.1MRB細胞から形成された凝集物 (14日目) を示す図である。

【図6】図6A～Bは、T150フラスコ中iPS6.1MRB細胞から形成された凝集物 (14日目) を示す図である。

【図7】図7A～Cは、DSからの、第2ラウンドのiPS MRB14日目の凝集物を示す図である。

40

【図8】図8A～Cは、ディスパーゼおよびクエン酸ナトリウム細胞分割両方での4継代または7継代後のiPS6.1およびiPS6.1MRB細胞のフローサイトメトリー多能性分析を示す図である。

【図9】図9は、T150フラスコ (対照) およびクエン酸ナトリウムを含むダブルスタックにおける、ディスパーゼで継代したiPS6.1およびiPS6.1MRB細胞から産生された心筋細胞の細胞データを編集した図である。

【図10】図10A～Bは、フラスコ中供給線の印付けを示す図である。

【図11】図11A～Bは、フラスコからの培地の吸引を示す図である。

【図12】図12は、iPS単細胞密度実験デザインを示す図である。

50

【図 1 3】図 1 3 A～B は、凝集物中に組み入れられた開始の i P S 細胞の計数を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 A～E は、c T N T 染色による、分化した心筋細胞のフローサイトメトリ分析を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 A～D は、異なる開始の i P S 細胞密度から分化した心臓細胞の計数を示す図である。

【図 1 6】図 1 6 A～C は、回転培養における i P S 細胞を示す画像である。

【図 1 7】図 1 7 A～D は、細胞凝集物を示す画像である。

【図 1 8】図 1 8 は、H_{1 1 5 2}における心筋細胞形成のための単細胞凝集物形成の実験デザイン 1 を示す図である。

【図 1 9】図 1 9 は、ディスパーゼと一緒に維持された細胞を用いた心筋細胞の形成のための凝集物形成の実験デザイン 2 を示す図である。

【図 2 0】図 2 0 は、H_{1 1 5 2}における心筋細胞形成のための単細胞凝集物形成の実験デザイン 1 からの凝集物形成を示す画像である。

【図 2 1】図 2 1 は、ディスパーゼと一緒に維持された細胞を用いた心筋細胞の形成のための凝集物形成の実験デザイン 2 からの凝集物形成を示す画像である。

【図 2 2】図 2 2 は、H_{1 1 5 2}の試験期間および凝集物の形成の実験 1 を示す図である。

【図 2 3】図 2 3 は、H_{1 1 5 2}の試験期間および凝集物の形成の実験 2 を示す図である。

【図 2 4】図 2 4 A～J は、分化 1 4 日目の凝集物数における差を示す実験 1 からの画像を示す図である。図 2 4 A は、1 日の H_{1 1 5 2}での 3 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 B は、2 日の H_{1 1 5 2}での 3 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 C は、1 日の H_{1 1 5 2}での 5 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 D は、2 日の H_{1 1 5 2}での 5 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 E は、1 日の H_{1 1 5 2}での 7 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 F は、2 日の H_{1 1 5 2}での 7 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 G は、1 日の H_{1 1 5 2}での 1 0 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 H は、2 日の H_{1 1 5 2}での 1 0 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 I は、1 日の H_{1 1 5 2}での 1 5 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。図 2 4 J は、2 日の H_{1 1 5 2}での 1 5 e 5 細胞／m l の開始の接種を示す図である。

【図 2 5】図 2 5 は、4 8 時間 H_{1 1 5 2}を含む条件下の心臓細胞生成に対する H_{1 1 5 2}の利点を示す繰返し結果を示す図である。

【図 2 6】図 2 6 は、H_{1 1 5 2}に長時間曝露すると、独立のメカニズムによるものではなく、細胞密度によって純度に影響を及ぼすことを示唆する、実験 1 からの最終の細胞計数および純度のプロットを示す図である。

【図 2 7】図 2 7 は、H_{1 1 5 2}に長時間曝露すると、独立のメカニズムによるものではなく、細胞密度によって純度に影響を及ぼすことを示唆する、実験 2 からの最終の細胞計数および純度のプロットを示す図である。

【図 2 8】図 2 8 は、I P S 6 . 1 細胞に対して 1 日量の H_{1 1 5 2}を投与した、細胞の生存に対する、様々な濃度の H_{1 1 5 2}の効果を示す図である。

【図 2 9】図 2 9 A～B は、様々な濃度の H G F および F G F の存在下の i P S 細胞の心臓誘導を示す図である。H G F 濃度の関数としての心筋細胞の収量および i P S 細胞の変換効率。エラーバーは、1 つの実験における n = 3 の T 2 5 フラスコに対する S E M (平均値の標準誤差)を表す。

【図 3 0】図 3 0 A～B は、様々な濃度の H G F および F G F の存在下の i P S 細胞の心臓誘導を示す図である。エラーバーは、1 つの実験における n = 3 の T 2 5 フラスコに対する S E M を表す。

【図 3 1 A】図 3 1 A～C は、H G F 濃度の関数としての、心筋細胞収量 (図 3 1 A)、H 9 - T G Z 細胞変換効率比 (図 3 1 B)、および C M 純度 (図 3 1 C) を示す図である

10

20

30

40

50

。各点は、凝集物形成の効率が低いことによる、2日目の複数のT25フラスコからまとめた1本のT25フラスコを表す。

【図31B】図31A～Cは、HGF濃度の関数としての、心筋細胞収量（図31A）、H9-TGZ細胞変換効率比（図31B）、およびCM純度（図31C）を示す図である。各点は、凝集物形成の効率が低いことによる、2日目の複数のT25フラスコからまとめた1本のT25フラスコを表す。

【図31C】図31A～Cは、HGF濃度の関数としての、心筋細胞収量（図31A）、H9-TGZ細胞変換効率比（図31B）、およびCM純度（図31C）を示す図である。各点は、凝集物形成の効率が低いことによる、2日目の複数のT25フラスコからまとめた1本のT25フラスコを表す。

【図32A】図32A～Cは、HGF濃度の関数としての、心筋細胞収量（図32A）、H9-TGZ細胞変換効率比（図32B）、およびCM純度（図32C）を示す図である。エラーバーは、1つの実験における $n=3$ のT25フラスコに対するSEMを表す。

【図32B】図32A～Cは、HGF濃度の関数としての、心筋細胞収量（図32A）、H9-TGZ細胞変換効率比（図32B）、およびCM純度（図32C）を示す図である。エラーバーは、1つの実験における $n=3$ のT25フラスコに対するSEMを表す。

【図32C】図32A～Cは、HGF濃度の関数としての、心筋細胞収量（図32A）、H9-TGZ細胞変換効率比（図32B）、およびCM純度（図32C）を示す図である。エラーバーは、1つの実験における $n=3$ のT25フラスコに対するSEMを表す。

【図33】図33A～Dは、様々な濃度のBMP（ 1 ng/mL 、 10 ng/mL ）、ドルソモルフィン（ 2 uM 、 0.2 uM ）、アクチビンA（ 1 ng/mL 、 10 ng/mL ）、SB-431542（ 10 uM 、 0.1 uM ）、およびアクチビンA（ 6 ng/mL ）とBMP4（ 10 ng/mL ）との組合せを利用した増殖因子／阻害剤のスクリーニングの結果を示す図である。図33Cは培養物15mlに対する実際のデータであり、図33Dは図33Cのデータに基づいて計算した1Lスケールアップ（生成用の計画として）を表す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

I. 方法および組成物

様々な異なる方法および組成物を本明細書に記載する。ある実施形態は、心筋細胞を生成するプロセスを改善するいくつかの重要な利点に関するものである。まず第一に、凝集物のサイズを懸濁培養物中で制御できることが発見され、これにより、最適の回転速度、接種濃度、および／または心臓の誘導までの時間などによる心臓の誘導に最適な条件が提供される。いくつかの実施形態において、このような方法は分化細胞の均一性および収量を増大する。第二に、ROCK阻害剤が懸濁培養物と組み合わせられて、バイオリアクターなど大体積の培養ベッセルにおける細胞の生存および分化を改善している。いくつかの実施形態において、ROCK阻害剤のインキュベーションの濃度および／または期間が最適化されている。さらに、本明細書において、あらゆる所与の培地のバッチまたは使用される多能性細胞クローンに対する心臓分化を劇的に改善するのに使用することができる増殖因子の添加における好適な調整を決定するための例示的な技術を提供する。

【0051】

心筋細胞の細胞集団の生成におけるさらなる進歩も下記に記載する。本開示によって生成される細胞の顕著な均一性および機能的性質により、これらの細胞が*in vitro*で心臓組織を研究するのに、および心臓疾患の処置における心臓組織再生のための新たな治療モダリティを開発するのに価値あるものとなる。

【0052】

II. 定義

「多能性」は、あらゆる3つの胚葉、すなわち内胚葉（内側の胃の内壁、消化管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、または外胚葉（表皮組織、および神経系）など、1つまたは複数の組織または器官を構成する全ての細胞に分化する可能性を有する幹

10

20

30

40

50

細胞を意味する。本明細書で用いられる「多能性幹細胞」（またはPSC）は、全能性細胞、胚性幹細胞、または人工多能性幹細胞の子孫など、あらゆる3つの胚葉に由来する細胞に分化することができる細胞を意味する。

【0053】

通例iPS細胞またはiPSCと略記される「人工多能性幹細胞」は、リプログラミング因子を導入もしくは接触させることによって、典型的には成体の体細胞である非多能性細胞、または線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、神経細胞、上皮細胞などの最終分化細胞から人工的に調製される一タイプの多能性幹細胞を意味する。

【0054】

「胚性幹（ES）細胞」は初期胚に由来する多能性幹細胞である。

10

【0055】

「懸濁培養物」は、細胞、または細胞の凝集物が液体培地中に懸濁されて増加する培養物を意味する。

【0056】

「ROCK阻害剤」と略記される「Rho関連キナーゼ阻害剤」は、小分子、siRNA、miRNA、アンチセンスRNAなど、Rho関連キナーゼまたはその細胞中のシグナル伝達経路の機能を阻害または低減するあらゆる物質を意味する。本明細書で用いられる「ROCKシグナル伝達経路」は、細胞中のRho-ROCK-ミオシンIIシグナル伝達経路、その上流のシグナル伝達経路、またはその下流のシグナル伝達経路など、ROCK関連シグナル伝達経路に関与するあらゆるシグナルプロセッサーを含み得る。ROCK阻害剤の例には、それだけには限定されないが、Rho特異的阻害剤、ROCK特異的阻害剤、MLCK（ミオシン制御軽鎖）-特異的阻害剤、またはミオシンII特異的阻害剤が含まれる。

20

【0057】

「凝集物促進性培地」の語は、作用機序に関していかなる制限なしに、幹細胞の凝集物形成を増強するあらゆる培地を意味する。

【0058】

「心臓誘導培地」または「心臓分化培地」の語は、作用機序に関していかなる制限なしに幹細胞の心筋細胞への分化を増強するあらゆる培地を意味する。

【0059】

「心臓維持培地」の語は、作用機序に関していかなる制限なしに心筋細胞の維持に適するあらゆる培地を意味する。

30

【0060】

「凝集物」、すなわち胚様体の語は、多能性幹細胞が非特異的な様式において分化させられる場合に出現する分化細胞、および部分的分化細胞を含む不均一なクラスターを意味する。

【0061】

「心筋細胞」は、一般にあらゆる心筋細胞系統の細胞を意味し、別段の特定がなければ、いかなる制限なしに、心筋細胞の個体発生のある段階の細胞に適用すると理解することができる。例えば、心筋細胞は、心筋細胞前駆細胞および成熟心筋細胞の両方を含み得る。

40

【0062】

特定のタンパク質を「コードする」「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、または「フラグメント」は、好適な制御配列の制御下におかれた場合にin vitroまたはin vivoで、ポリペプチドなどの遺伝子生成物に転写され、場合により翻訳もされる核酸分子である。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAの形態のいずれかにおいて存在することができる。DNAの形態において存在する場合、核酸分子は一本鎖（すなわちセンス鎖）でも、または二本鎖でもよい。コード領域の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。遺伝子には、それだけには限定されないが

50

、原核生物または真核生物の mRNA からの cDNA、原核生物または真核生物の DNA からのゲノム DNA 配列、および合成の DNA 配列が含まれ得る。転写終結配列は、通常、遺伝子配列に対して 3' に位置する。

【0063】

「導入遺伝子」の語は、外来の核酸など、人工または天然の手段によって細胞または生物体中に導入された遺伝子、核酸、またはポリヌクレオチドを意味する。外来の核酸は様々な生物体または細胞からであってよく、または生物体もしくは細胞内に天然に存在する核酸のさらなるコピーの 1 つまたは複数であってよい。非限定的な例として、外来の核酸は、天然の細胞の染色体位置とは異なる染色体位置にあり、または他の点で天然に見られるものと異なる核酸配列が側面にある。

10

【0064】

「プロモーター」の語は、本明細書において、その通常の意味において、DNA 制御配列を含むヌクレオチド領域を意味するのに用いられ、この場合、制御配列は、RNA ポリメラーゼに結合することができ、下流（3' 方向）のコード配列の転写を開始することができる遺伝子に由来する。

【0065】

III. 多能性幹細胞の源

「多能性幹細胞」の語は、3つの胚層全て、すなわち内胚葉、中胚葉、および外胚葉の細胞を生じることができる細胞を意味する。理論上、多能性幹細胞は身体のあらゆる細胞に分化することができるが、多能性を実験的に決定することは、典型的に、多能性細胞が各胚層のいくつかの細胞型に分化することに基づく。本発明のいくつかの実施形態において、多能性幹細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹（ES）細胞である。他の実施形態において、多能性幹細胞は、体細胞をリプログラミングすることによって由来する人工多能性幹細胞である。ある実施形態において、多能性幹細胞は、体細胞の核移植によって由来する胚性幹細胞である。

20

【0066】

A. 胚性幹細胞

胚性幹（ES）細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性細胞である。ES細胞は、発生中の胚の外側の栄養外胚葉層を除去し、次いで非増殖細胞のフィーダー層上で内部塊細胞を培養することによって単離することができる。好適な条件下で増殖性の未分化 ES細胞のコロニーが生成される。このコロニーを取り去り、個々の細胞に解離し、次いで新鮮なフィーダー層上に再塗抹することができる。再塗抹された細胞を引き続き増殖させ、未分化 ES細胞の新しいコロニーを生成することができる。次いで、この新しいコロニーを取り去り、解離し、再び再塗抹し、増殖させる。未分化の ES細胞を「継代培養」または「継代」するこのプロセスを数回繰り返して、未分化の ES細胞を含む細胞系を生成することができる（米国特許第 5,843,780 号、第 6,200,806 号、第 7,029,913 号）。「初代細胞培養物」は、胚盤胞の内部細胞塊などの組織から直接得た細胞の培養物である。「継代培養物」は初代細胞培養物に由来するあらゆる培養物である。

30

【0067】

マウス ES細胞を得るための方法は周知である。一方法において、マウス 129 株からの着床前の胚盤胞をマウス抗血清で処理して栄養外胚葉を除き、内部細胞塊を、ウシ胎児血清を含む培地中で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。発生する未分化 ES細胞のコロニーを、ウシ胎児血清の存在下、マウス胚線維芽細胞フィーダー層上で継代培養して ES細胞の集団を生成する。いくつかの方法において、血清添加培養培地にサイトカイン白血病抑制因子（LIF）を添加することによって、マウス ES細胞をフィーダー層の非存在下で増殖させることができる（Smith、2000 年）。他の方法において、マウス ES細胞を、骨形成タンパク質および LIF の存在下、無血清培地中で増殖させることができる（Ying ら、2003 年）。

40

【0068】

50

ヒトES細胞は先に記載した方法を用い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; Reubinfoffら、2000年)。一方法において、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希釈に曝露して栄養外胚葉細胞を溶解する。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、ガンマ線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日から15日後、内部細胞塊に由来する細胞クランプを、化学的(すなわち、トリプシンに曝露)または機械的に解離し、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む新鮮な培地中に再塗抹することができる。さらに増殖させたら、未分化な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、機械的にクランプに解離し、再塗抹する(米国特許第6,833,269号を参照されたい)。ES様の形態は、核対細胞質比が明らかに高く、核小体が顕著な密集したコロニーを特徴とする。得られたES細胞は、簡単なトリプシン処理によって、またはマイクロピペットによる個々のコロニーの選択によって、日常的に継代することができる。いくつかの方法において、ヒトES細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、線維芽細胞のフィーダー層上でES細胞を培養することによって、血清なしで増殖させることができる(Amitら、2000年)。他の方法において、ヒトES細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子を含む「条件」培地の存在下、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で細胞を培養することによって、フィーダー細胞層なしで増殖させることができる(Xuら、2001年)。培地を、線維芽細胞と同時培養することによって予め馴らしておく。

【0069】

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)。

【0070】

ES細胞の別の源は確立されたES細胞系である。様々なマウス細胞系およびヒトES細胞系が公知であり、これらの増殖および繁殖のための条件は規定されている。例えば、マウスCGR8細胞系はマウス129系統の胚の内部細胞塊から確立されており、CGR8細胞の培養物は、フィーダー層なしでLIFの存在下で増殖させることができる。さらなる一例として、ヒトES細胞系H1、H7、H9、H13、およびH14はThompsonらによって確立された。さらに、H9系統のサブクローンH9.1およびH9.2が開発されている。例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、YuおよびThompson、2008年に記載されているものなど、当技術分野において公知である実質的にあらゆるES細胞または幹細胞系が、本発明とともに用いることができることが予想される。

【0071】

本発明と関連して用いるためのES細胞の源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊の培養に由来する細胞、または確立された細胞系の培養物から得られた細胞であってよい。このように、本明細書で用いられる通り、「ES細胞」の語は、胚盤胞の内部細胞塊の細胞、内部細胞塊の培養物から得られたES細胞、およびES細胞系の培養物から得られたES細胞を意味することができる。

【0072】

多能性細胞は身体のあらゆる細胞に分化することができる。ES細胞の多能性は様々な方法で決定されている(Martin、1982年)。一試験において、胚盤胞の内部細胞塊に由来するマウスES細胞を、別の胚盤胞の孔中に注射する。注射された胚盤胞は偽妊娠メスマウスの子宮中に沈着して、注射されたレシビエントの胚盤胞細胞のキメラである子孫を生成する。別の一試験において、マウスES細胞を成年マウス中に注射して奇形腫と呼ばれる腫瘍を生成する。このような腫瘍は、内胚葉、中胚葉、および外胚葉に由来する様々な細胞型を含み得る。ある実施形態において、1つまたは複数の奇形腫由来の細

胞を培養し、または神経細胞もしくは神経関係細胞に分化させてもよい。ヒトES細胞の多能性は、免疫不全マウスにおける奇形腫の形成によっても試験することができる。第三の試験は、ES細胞をより特殊化した細胞に分化させるように培養条件を変えることである。例えば、マウスES細胞は、フィーダー層を除去し、培養培地にLIFを添加することによって様々な細胞型に自発的に分化することができる。同様に、ヒトES細胞は、フィーダー層を除去し、ES細胞を懸濁液中の非接着性の表面上で増殖させることによって自発的に分化することができる（Itskovitz-Eldorら、2000年；Rubinoffら、2000年；Roachら、1993年）。このような条件下、ES細胞は、神経細胞および心筋細胞の特徴を有する細胞を含む胚様体と呼ばれる細胞凝集物を形成することができる。これらの試験全てにおいて、ES細胞の多能性は、内胚葉、中胚葉、および外胚葉起源の細胞を産生するこれらの能力によって示される。

10

【0073】

ES細胞は、これらが生成するタンパク質によって特徴付けることができる。例えば、ES細胞を特徴付けるのに以下のマーカータンパク質が用いられている：ステージ特異的胚性抗原SSEA-1、ステージ特異的胚性抗原SSEA-3、ステージ特異的胚性抗原SSEA-4、腫瘍拒絶抗原-1-60（TRA1-60）、腫瘍拒絶抗原-1-81（TRA1-81）、アルカリホスファターゼ（AP）、および転写因子Oct-4。表1に示す通り、マウス、ヒト、および霊長動物の細胞は、これらのマーカーを発現するパターンが異なる。例えば、SSEA-1はマウスES細胞において発現されるがヒトまたはサルES細胞では発現されず、TRA1-60はヒトおよびサルのES細胞において発現されるがマウスES細胞では発現されない。

20

【0074】

【表1】

表1. ES細胞マーカー発現

マーカー	マウス	ヒト	サル
<u>SSEA-1</u>	<u>あり</u>	<u>なし</u>	<u>なし</u>
<u>SSEA-2</u>	<u>なし</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>
<u>SSEQ-3</u>	<u>なし</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>
<u>TRA1-60</u>	<u>なし</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>
<u>TRA1-81</u>	<u>なし</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>
<u>AP</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>
<u>Oct-4</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>	<u>あり</u>

30

B. 人工多能性幹細胞

人工多能性幹（iPS）細胞はES細胞の特徴を有するが、分化した体細胞のリプログラミングによって得られる細胞である。人工多能性幹細胞は様々な方法によって得られている。一方法において、成体ヒト皮膚線維芽細胞を、レトロウイルスの形質導入を用いて、転写因子Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4で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）を補った培地中、SNLフィーダー細胞（LIFを生成するマウス細胞線維芽細胞系）上に塗抹する。およそ25日後、培養物中にヒトES細胞コロニーに似たコロニーが現れる。ES細胞様コロニーを拾い、bFGFの存在下、フィーダー細胞上に広げる。

40

【0075】

細胞の特徴に基づくと、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細胞に形態学的に類似しており、様々なヒトES細胞マーカーを発

50

現する。また、ヒトES細胞の分化をもたらすことが公知の条件下で増殖させた場合、人工多能性幹細胞はそれに応じて分化する。例えば、人工多能性幹細胞は、神経細胞の構造を有し、神経細胞のマーカーを有する細胞に分化することができる。YuおよびThompson、2008年において記載されているものなどを含む、実質的にあらゆるiPS細胞または細胞系を本発明で用いることができることが予想される。

【0076】

別の一方法において、ヒト胎児または新生児の線維芽細胞を、レンチウイルスの形質導入を用いて、Oct4、Sox2、Nanog、およびLin28の4つの遺伝子と一緒にトランスフェクトする(Yuら、2007年)。感染12~20日後、ヒトES細胞の形態を有するコロニーが見えるようになる。このコロニーを拾い、拡大する。コロニーを構成する人工多能性幹細胞はヒトES細胞に形態学的に類似しており、様々なヒトES細胞マーカーを発現し、マウス中に注射後、神経組織、軟骨、および腸上皮を有する奇形腫を形成する。

10

【0077】

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細胞の誘導は、Soxファミリーからの少なくとも1メンバーおよびOctファミリーからの少なくとも1メンバーの発現、またはこれらへの曝露を必要とするのが典型的である。SoxおよびOctはES細胞のアイデンティティを特定する転写の階層的制御に重要であると考えられている。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。Nanog、Lin28、Klf4、またはc-Mycなど、さらなる因子がリプログラミングの効率を増大することがあり、リプログラミング因子の特定のセットは、Sox-2、Oct-4、Nanog、および場合によりLin-28を含むセットであってよく、またはSox-2、Oct4、Klf、および場合によりc-Mycを含むセットであってよい。

20

【0078】

ES細胞などのiPS細胞は、SSEA-1、SSEA-3、およびSSEA-4 (Developmental Studies Hybridoma Bank、National Institute of Child Health and Human Development、Bethesda Md.)、ならびにTRA-1-60およびTRA-1-81に対する抗体を用いて、免疫組織化学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徴的な抗原を有する(Andrewsら、1987年)。胚性幹細胞の多能性はおよそ $0.5 \sim 10 \times 10^6$ 細胞を、8~12週齢のSCIDオスマウスの後肢の筋肉中に注射することによって確認することができる。3つの胚葉の各々の少なくとも1つの細胞型を実証する奇形腫が発生する。

30

【0079】

本発明のある態様において、iPS細胞は、上記に記載した通り、KlfまたはNanogと組み合わせられた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リプログラミング因子を用いた、体細胞のリプログラミングから作成される。本発明における体細胞は、線維芽細胞、ケラチノサイト、造血細胞、間葉系細胞、肝細胞、胃の細胞、またはβ細胞など、多能性に誘発され得るあらゆる体細胞であってよい。ある態様において、T細胞もリプログラミング用の体細胞の源として用いることができる(参照によって本明細書に組み入れられる、米国出願第61/184,546を参照されたい)。

40

【0080】

リプログラミング因子は、組込みベクターまたはエピソームベクターなど(例えば、EBVエレメントベース系)の1つまたは複数のベクター中に含まれる発現カセットから発現されてよい(参照によって本明細書に組み入れられる、米国出願第61/058,858号、Yuら、2009年を参照されたい)。さらなる一態様において、リプログラミングタンパク質が、タンパク質形質導入によって体細胞中に直接導入され得る(参照によ

50

て本明細書に組み入れられる、米国出願第 61 / 172, 079 号を参照されたい)。

【0081】

C. 体細胞核移植によって由来する胚性幹細胞

多能性幹細胞は体細胞核移植によって調製することができ、体細胞核移植ではドナーの核が紡錘体のない卵母細胞中に移植される。核移植によって生成された幹細胞は、ドナーの核と遺伝学的に同一である。一方法において、アカゲザルの皮膚線維芽細胞からのドナーの線維芽細胞核を、紡錘体のない、成熟した中期 I I のアカゲザル卵母細胞の細胞質中に電気融合によって導入する (Byrne ら、2007 年)。融合した卵母細胞をイオノマイシンに曝露することによって活性化し、次いで胚盤胞段階までインキュベートする。次いで、選択された胚盤胞の内部細胞塊を培養して、胚性幹細胞系を生成する。胚性幹細胞系は正常の E S 細胞の形態を示し、様々な E S 細胞マーカーを発現し、*in vitro* および *in vivo* の両方で複数の細胞型に分化する。本明細書で用いられる「E S 細胞」の語は、受精した核を含む胚に由来する胚性幹細胞を意味する。E S 細胞は核移植によって生成される胚性幹細胞と区別され、これらは「体細胞核移植によって由来する胚性幹細胞」と呼ばれる。

10

【0082】

I V. 多能性幹細胞の培養

培養条件に応じて、多能性幹細胞は分化細胞または未分化細胞のコロニーを生成することができる。「分化する」の語は、細胞の発生経路を下る進行を意味する。「分化した」の語は、別の細胞との比較において発生経路を下る細胞の進行を記載する相対的な語である。例えば、多能性細胞は身体のある細胞を生じることができ、造血細胞など、より分化した細胞はより少数の細胞型しか生じない。

20

【0083】

多能性幹細胞の培養物は、集団における幹細胞および幹細胞の誘導体のかなりの比率が未分化細胞の形態学的特徴を示し、これらが胚または成体起源の分化細胞と明らかに区別される場合、「未分化」と記載される。未分化の E S 細胞または i P S 細胞は当業者によって認められ、高比率の核／細胞質および顕著な核小体を有する細胞のコロニーにおいて二次元の顕微鏡の視野において出現するのが典型的である。未分化細胞のコロニーは分化している隣接細胞を有することがあることが理解される。

【0084】

ある態様において、本方法に対する出発細胞は、少なくとも、または約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 細胞、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲を含み得る。出発細胞の集団は、少なくとも、または約 10 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 細胞／ m^2 、またはこれらに由来するあらゆる範囲の播種密度を有することができる。

30

【0085】

A. E S 細胞の培養

E S 細胞は、血清およびフィーダー層、典型的にはマウス胚線維芽細胞の存在下で細胞を培養することによって未分化状態において維持することができる。幹細胞を未分化状態において維持するための他の方法も公知である。例えば、マウス E S 細胞は、フィーダー層なしで L I F の存在下で培養することによって未分化状態において維持することができる。しかし、マウス E S 細胞とは異なり、ヒト E S 細胞は L I F に応答しない。ヒト E S 細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、線維芽細胞のフィーダー層上で E S 細胞を培養することによって (Amitt ら、2000 年)、またはフィーダー層なしで、および線維芽細胞条件培地プラス塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、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で培養することによって未分化状態を維持することができる (Xu ら、2001 年、米国特許第 6, 833, 269 号)。

40

【0086】

E S 細胞を調製および培養するための方法は、全て参照によって本明細書に組み入れられる、*teratocarcinomas and embryonic stem c*

50

ells: 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)を含めた、細胞生物学、組織培養、および発生学における標準の教科書および概説において見ることができる。組織培養に用いられる標準方法は、概ね、Animal Cell Culture (1987年); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987年); ならびに Current Protocols in Molecular Biology および Short Protocols in Molecular Biology (1987年および1995年)に記載されている。

10

【0087】

B. iPS細胞の培養

体細胞をリプログラミング因子に導入または接触した後、これらの細胞を、多能性および未分化状態を維持するのに十分な培地中で培養してもよい。本発明において生成された人工多能性幹(iPS)細胞の培養は、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許公開第20070238170号、および米国特許公開第20030211603号、および米国特許公開第20080171385号に記載されているように、霊長動物の多能性幹細胞、より詳しくは胚性幹細胞を培養するために開発された様々な培地および技術を用いることができる。当業者には公知である通り、多能性幹細胞の培養および維持のためのさらなる方法を本発明と一緒に用いることができることが理解される。

20

【0088】

ある実施形態において、不確定の条件を用いてもよく、例えば、幹細胞を未分化状態に維持するために、多能性細胞を線維芽細胞の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た培地上で培養することができる。あるいは、多能性細胞を、TeSR培地など、規定された、フィーダー非依存性培養系を用いて本質的に未分化状態において培養および維持してもよい(Ludwigら、2006年a; Ludwigら、2006年b)。フィーダー非依存性培養系および培地を用いて多能性細胞を培養および維持してもよい。これらの取組みにより、ヒト胚性幹細胞は、マウス線維芽細胞の「フィーダー層」を必要とせずに本質的に未分化状態にとどまることができる。本明細書に記載する通り、所望により費用を低減するために、これらの方法に対して様々な改変を行うことができる。

30

【0089】

ヒト多能性幹細胞の培養および維持において様々なマトリックス成分を用いることができる。例えば、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニン、およびビトロネクチンを組み合わせて用いて、その全文が参照によって組み入れられる、Ludwigら(2006年a; 2006年b)に記載されている通り、多能性細胞の増殖用の固体支持体を提供する手段として培養表面をコーティングしてもよい。

【0090】

Matrigel(商標)も、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提供するのに用いることができる。Matrigel(商標)は、マウス腫瘍細胞によって分泌されたゼラチン状のタンパク質混合物であり、BD Bioscience(New Jersey、米国)から市販されている。この混合物は、多くの組織において見られる複雑な細胞外環境に似ており、細胞生物学者によって細胞培養のための基質として用いられている。

40

【0091】

C. ROCK阻害剤およびミオシンIIATP分解酵素阻害剤

多能性幹細胞、特にヒトES細胞およびiPS細胞は、細胞の脱離および解離の際にアポトーシスを受けやすく、これらはクローンの単離または拡大、および分化の誘導に重要

50

である。最近、R h o 関連キナーゼ (R O C K) 阻害剤など、小クラスの分子が、解離された多能性幹細胞のクローンの効率および生存を増大することが見出されており、これらは、R h o -特異的阻害剤、R O C K -特異的阻害剤、またはミオシン I I -特異的阻害剤など、R O C K 関連シグナル伝達経路に対する阻害剤である。本発明のある態様において、R O C K 阻害剤を、多能性幹細胞の培養および継代、ならびに／または幹細胞の分化に用いることができる。したがって、R O C K 阻害剤は、粘着性培養物または懸濁培養物など、多能性幹細胞が増殖し、解離し、凝集物を形成し、または分化を受けるあらゆる細胞培養培地中に存在することができる。

【0092】

R O C K シグナル伝達経路は、R h o ファミリー G T P 加水分解酵素、R O C K、R h o の下流のメジャーエフェクターキナーゼ、ミオシン I I、R O C K の下流の優勢なエフェクター (H a r b ら 2 0 0 8 年)、およびあらゆる中間体、上流または下流のシグナルプロセッサーを含み得る。R O C K は、ミオシン制御軽鎖 (M R L C) の脱リン酸によってミオシンの機能を負に制御する R O C K 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 (M Y P T 1) をリン酸化および不活性化することができる。

10

【0093】

C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m C 3 細胞外酵素および／またはミオシン I I 特異的阻害剤などの R h o 特異的阻害剤を、本発明のある態様において R O C K 阻害剤として用いることができる。本明細書において別段の記載がなければ、プレビスタチンなどのミオシン I I 阻害剤は、R O C K 阻害剤の実験的な使用の代わりとなることができる。

20

【0094】

ミオシン I I は、筋肉収縮におけるその役割に対して最初に研究されたが、筋肉以外の細胞においても機能する。ミオシン I I (従来のミオシンとしても知られている) は各々がアミノ酸約 2 0 0 0 個の長さである 2 つの重鎖を含み、これらの重鎖は頭部および尾部のドメインを構成する。これら重鎖の各々は N 末端頭部ドメインを含み、C 末端尾部はコイルドコイルの形態を呈し、2 個の重鎖を一緒に保持している (使用者の杖におけるように、2 匹のヘビが互いに巻きついているのを想像されたい)。このように、ミオシン I I は頭部を 2 個有する。ミオシン I I は 4 個の軽鎖 (頭部 1 個あたり 2 個) も含み、これらは頭部と尾部との間の「頸部」領域で重鎖に結合している。これらの軽鎖はしばしば本質的な軽鎖および制御軽鎖と呼ばれる。例示のミオシン I I 特異的阻害剤はプレビスタチンまたはその誘導体であってよい。

30

【0095】

R O C K は、R h o (R h o に対して R h o A、R h o B、および R h o C の 3 つのイソ型が存在する) に対する標的タンパク質として役立つセリン／スレオニンキナーゼである。これらのキナーゼは、最初、R h o A 誘発性ストレス線維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。R O C K の 2 つのイソ型である R O C K 1 (p 1 6 0 R O C K、R O K β と呼ばれる) および R O C K 2 (R O K α) は N 末端キナーゼドメイン、その後 R h o -結合性ドメインを含むコイルドコイルドメイン、およびプレクストリン相同ドメイン (P H) からなる。R O C K は両方とも細胞骨格調節物質であり、ストレス線維の形成、平滑筋の収縮、細胞接着、膜ラフリング、および細胞の運動性に対する R h o A の効果を媒介する。R O C K は、ミオシン I I、ミオシン軽鎖 (M L C)、M L C ホスファターゼ (M L C P)、ならびにホスファターゼおよびテンシンのホモログ (P T E N) など、下流の分子を標的化することによってその生物学的活性を発揮することができる。

40

【0096】

例示の R O C K -特異的阻害剤は、R O C K 1 を選択的に標的化し (しかし、R O C K 2 はやはり阻害し)、T N F - α および I L - 1 β を阻害する Y - 2 7 6 3 2 である。Y - 2 7 6 3 2 は細胞透過性であり、A T P と競合することによって R O C K 1 / R O C K

50

2を阻害する ($IC_{50} = 800 \text{ nM}$)。その全文において記載するように参照によって本明細書に組み入れられる、Ishizakiら (2000年)。他のROCK阻害剤には、例えば、H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、ヒドロキシル-HA-1077、GSK269962A、およびSB-772077-Bが含まれる。その各々がその全文において記載するように参照によって本明細書に組み入れられる、Doeら (2007年)；Ishizakiら、上述；Nakajimaら、(2003年)；およびSasakiら (2002年)。

【0097】

ROCK阻害剤の他の非限定的な例には、H-1152、およびFasudil (HA1077とも呼ばれる)、Y-30141 (米国特許第5,478,838号に記載される)、およびこれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンスの核酸、核酸を誘発するRNA干渉 (例えば、siRNA)、競合ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害抗体、抗体-ScFVフラグメント、ドミナントネガティブバリエーション、およびこれらの発現ベクターが含まれる。さらに、他の低分子量化合物はROCK阻害剤として公知であるので、これらの化合物またはこれらの誘導体も実施形態において用いることができる (例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許公開第20050209261号、第20050192304号、第20040014755号、第20040002508号、第20040002507号、第20030125344号、および第20030087919号、ならびに国際特許公開第2003/062227号、第2003/059913号、第2003/062225号、第2002/076976号、および第2004/039796号を参照されたい)。本発明において、1つまたは2つまたはそれを超えるROCK阻害剤の組合せも用いることができる。

【0098】

いくつかの実施形態にしたがって、幹細胞を培地中でROCK阻害剤で処理することができる。それによって、本発明の方法において用いられる培地はすでにROCK阻害剤を含んでいてよく、またはその代わり、本発明の方法は培地にROCK阻害剤を添加するステップを伴うことができる。培地中のROCK阻害剤の濃度は、幹細胞の生存率の改善など所望の効果を達成することができる限り特に制限されない。このようなROCK阻害剤、例えば、Y-27632、HA-1077、またはH-1152などは、少なくとも、または約0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、500から約1000 μM 、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲の効果的な濃度で用いられてよい。これらの量は、ROCK阻害剤の、独立の、または1つもしくは複数のROCK阻害剤と組み合わせた量を意味することができる。

【0099】

例えば、Y-27632をROCK阻害剤として用いる場合、これは約0.01 μM から約1000 μM 、より具体的には約0.1 μM から約100 μM 、さらにより具体的には約1.0 μM から約30 μM 、最も具体的には約2.0 μM から20 μM 、またはこれらに由来するあらゆる範囲の濃度で用いることができる。Fasudil/HA1077をROCK阻害剤として用いる場合、これは前述のY-27632の濃度の約2倍で用いることができる。H-1152をROCK阻害剤として用いる場合、これは前述のY-27632の濃度の約50分の1で用いることができる。

【0100】

ROCK阻害剤で処理するための時間は、幹細胞の生存率の改善などの所望の効果を達成することができる期間である限り特に制限されない。例えば、幹細胞がヒト胚性幹細胞などの多能性幹細胞である場合、処理するための時間は、解離前、少なくとも、または約10、15、20、25、30分から数時間 (例えば、少なくとも、もしくは約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、8時間、12時間、16時間、24時間、36時間、48時間、もしくはこれらに由来するあらゆる範囲) である。解離後、多能性幹細胞を、ROCK阻害剤で、所望の効果を達成するのに、例えば、少なくとも、または約

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、24、48時間、またはそれを超えて処理することができる。

【0101】

R O C K 阻害剤で処理する幹細胞（1つまたは複数）の密度は、幹細胞の生存率の改善などの所望の効果を達成することができる密度である限り特に制限されない。これは、例えば、約 1.0×10^1 から 1.0×10^7 細胞 / ml であり、より具体的には約 1.0×10^2 から 1.0×10^7 細胞 / ml、さらにより具体的には約 1.0×10^3 から 1.0×10^7 細胞 / ml、最も具体的には約 3.0×10^4 から 2.0×10^6 細胞 / ml である。

【0102】

ある実施形態において、幹細胞を R O C K 阻害剤の存在下で培養して、低密度（単細胞もしくは小型の凝集物に解離した）での生存性、クローニング効率、または継代効率を改善する。本発明のある実施形態において、幹細胞を、フィーダー細胞、フィーダー細胞抽出物、および／または血清の非存在下で培養する。幹細胞を、継代培養または継代する前に、例えば、継代培養または継代の前少なくとも1時間、R O C K 阻害剤の存在下で培養することができる。あるいは、またはさらに、幹細胞を、継代培養または継代の間または後に R O C K 阻害剤の存在下で維持する。

【0103】

ある実施形態において、幹細胞を、多くて、または少なくとも約4、8、12時間、約2時間、約4時間、または約6日、またはこれらに由来するあらゆる範囲、R O C K 阻害剤の存在下に維持する。他の実施形態において、幹細胞を少なくとも1継代から5継代、R O C K 阻害剤の存在下に維持する。場合により、例えば、約4、8、12時間後、または約2日後、または約4日後、または約6日後、またはこれらに由来するあらゆる範囲、R O C K 阻害剤を、引き続き培養培地から取り除く。他の実施形態において、少なくとも1、2、3、4、5継代、またはそれを超えて、またはこれらに由来するあらゆる範囲の後、R O C K 阻害剤を取り除く。

【0104】

本発明にしたがって R O C K 阻害剤で処理する幹細胞は、解離した細胞であってよく、または非解離の細胞であってよい。解離した細胞は、細胞の解離（例えば、後に記載する解離）を促進するように処理された細胞を意味する。解離した細胞には、単細胞、および数細胞（典型的には、約2から50個、2から20個、または2から10個）の小型の細胞クラump（凝集物）を形成した細胞が含まれる。解離した細胞は、懸濁した（浮遊している）細胞であってよく、または接着細胞であってよい。例えば、ヒト E S 細胞などの E S 細胞は、解離（および／または解離後の懸濁培養物）などの特定の条件に感受性である。本発明の方法は、幹細胞が、今までに細胞死が生じた条件にさらされた場合に、特定の使用を有する。

【0105】

本発明のある態様は、幹細胞を解離するステップをさらに伴うことができる。幹細胞の解離は、あらゆる公知の手順を用いて行うことができる。これらの手順には、キレート化剤（例えば、E D T A）、酵素（例えば、トリプシン、コラゲナーゼ）などでの処理、および機械的な解離（例えば、ピペッティング）などの操作が含まれる。幹細胞（1つまたは複数）を、解離の前および／または後に R O C K 阻害剤で処理することができる。例えば、幹細胞（1つまたは複数）を解離の後だけに処理してもよい。

D. 幹細胞培養条件

本発明による培養条件は、用いる培地および幹細胞に応じて好適に規定される。本発明による培地は、基本培地として動物細胞を培養するのに用いられる培地を用いて調製することができる。基本培地として、あらゆる T e S R、B M E、B G J b、C M R L 1066、G l a s g o w M E M、I m p r o v e d M E M Z i n c O p t i o n、I M D M、199培地、イーグルMEM、 α MEM、DMEM、Ham、RPMI 1640、および F i s c h e r の培地、ならびにこれらのあらゆる組合せを用いることがで

10

20

30

40

50

きるが、培地は動物細胞を培養するのに用いることができる限りこれらに特に制限されない。

【0106】

本発明による培地は、血清添加培地でも、または無血清培地でもよい。無血清培地は、未加工または未精製の血清を含まない培地を意味し、したがって精製した血液由来の成分または動物組織由来の成分（例えば、増殖因子）を有する培地を含み得る。外来の動物由来成分での汚染を防ぐ局面から、血清は、幹細胞（1つまたは複数）と同じ動物由来であってよい。

【0107】

本発明による培地は、あらゆる血清の代替物を含んでいても、または含んでいなくてもよい。血清の代替物には、アルブミン（例えば、脂質に富むアルブミン、アルブミン代替物、例えば、組換えアルブミン、植物デンプン、デキストラン、およびタンパク質加水分解物）、トランスフェリン（または他の鉄トランスポーター）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール（3'-thioglycerol）、またはこれらの同等物を好適に含んでいる材料が含まれ得る。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、さらなる便宜上、あらゆる市販の材料を用いることができる。市販の材料には、ロックアウト血清代替物（KSR）、脂肪酸濃縮液（Chemically-defined Lipid concentrated）（Gibco）、およびGlutamax（Gibco）が含まれる。

【0108】

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）、ビタミン（1つまたは複数）、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、および無機塩も含み得る。2-メルカプトエタノールの濃度は、例えば、約0.05mMから1.0mM、特に約0.1mMから0.5mMであってよいが、濃度は、幹細胞（1つまたは複数）を培養するのに好適である限り特にこれらに限定されない。

【0109】

幹細胞（1つまたは複数）を培養するのに用いられる培養ベッセルには、特にそれだけには限定されないが、その中で幹細胞を培養することができるのであれば、フラスコ、組織培養用フラスコ、シャーレ、ペトリ皿、組織培養用シャーレ、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、チャンバースライド、試験管、トレイ、CellSTACK（登録商標）チャンバー、培養バッグ、およびローラーボトルが含まれてよい。幹細胞は、培養物の必要性に応じて、少なくとも、または約0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml、またはこれらに由来するあらゆる範囲の体積の培養物であってよい。ある一実施形態において、培養ベッセルはバイオリアクターであってよく、バイオリアクターは、生物学的に活性な環境を支持するあらゆる装置または系を意味することができる。バイオリアクターは、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、またはこれらに由来するあらゆる範囲の体積を有してよい。

【0110】

培養ベッセルは、細胞接着性でも、または非接着性でもよく、目的に応じて選択される。細胞接着性の培養ベッセルは、ベッセル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、細胞接着用のあらゆる基質でコーティングされていてよい。細胞接着用の基質は、幹細胞またはフィーダー細胞（使用する場合は）を付着することを意図するあらゆる材料であってよい。細胞接着のための基質には、コラーゲン、

ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、およびフィブロネクチン、ならびにこれらの混合物、例えば、Matrigel（商標）、および溶解した細胞膜調製物が含まれる（Klimanskayaら、2005年）。

【0111】

他の培養条件を好適に規定することができる。例えば、培養温度は約30℃から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。CO₂濃度は約1から10%、例えば、約2から5%、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。酸素分圧は、少なくとも、または約1、5、8、10、20%、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。

10

【0112】

本発明の方法を、例えば、幹細胞の接着培養に用いることができる。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。フィーダー細胞を本発明の方法において用いる場合、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用いることができる（例えば、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual（1994年）；Gene Targeting, A Practical Approach（1993年）；Martin（1981年）；Evansら（1981年）；Jainchillら、（1969年）；Nakanoら、Science（1996年）；Kodamaら（1982年）；ならびに国際公開第01/088100号および第2005/080554号を参照されたい）。

20

【0113】

本発明の方法を、担体上の懸濁培養（Fernandesら、2007年）またはゲル／生体高分子のカプセル化（米国特許第20070116680号）を含む、幹細胞の懸濁培養にも用いることができる。幹細胞の懸濁培養の語は、幹細胞を、培地における培養ベッセルまたはフィーダー細胞（用いる場合）に関して非接着性の条件下で培養することを意味する。幹細胞の懸濁培養は、幹細胞の解離培養、および幹細胞の凝集物懸濁培養を含む。幹細胞の解離培養の語は懸濁した幹細胞を培養することを意味し、幹細胞の解離培養には、単細胞の幹細胞の解離培養、または複数の幹細胞（例えば、細胞およそ2から400個）からなる小型細胞の凝集物の解離培養が含まれる。前述の解離培養を継続する場合、培養した、解離した細胞は幹細胞のより大きな凝集物を形成し、その後凝集物懸濁培養を行うことができる。凝集物懸濁培養には、胚様体の培養方法（Kellerら、1995年を参照されたい）およびSFEb法（Watanabeら、2005年）；国際公開第2005/123902号が含まれる。本発明の方法は、懸濁培養における幹細胞の生存率および／または分化効率を著しく改善することができる。

30

【0114】

E. 単細胞継代

多能性幹細胞の培養のいくつかの実施形態において、培養容器がいっぱいになった後、コロニーを、解離に適するあらゆる方法によって、凝集した細胞、またはさらに単細胞に分割し、次いで、細胞を継代用に新しい培養容器中に配置する。細胞の継代または分割は、長期間、細胞の生存状態を保ち、培養条件下で増殖するのを可能にする技術である。細胞は通常、約70%～100%のコンフルエントであるときに継代される。

40

【0115】

多能性幹細胞の単細胞解離およびその後の単細胞継代は本発明の方法において用いることができ、細胞の拡大、細胞の選別、および分化に対して規定される接種の促進、ならびに培養手順およびクローン拡大の自動化の付与など、いくつかの利点がある。例えば、単細胞にクローン的に由来する子孫細胞は、遺伝構造において均一であってよく、および／または細胞周期が同調してよく、これらは標的化された分化を増大し得る。単細胞継代に対する例示の方法は、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20080171385号に記載される通りであってよい。

【0116】

50

ある実施形態において、多能性幹細胞を、個々の単細胞、または個々の単細胞と細胞2、3、4、5、6、7、8、9、10個もしくはそれを超えて含む小型の細胞クラスターとの組合せに解離することができる。解離は、機械的な力によって、または細胞解離剤、例えばクエン酸ナトリウム、もしくは酵素（例えば、トリプシン、トリプシン-E D T A、TrypLe Selectなど）によって実現することができる。

【0117】

多能性幹細胞の供給源および拡大の必要性に基づき、解離した細胞を、個々に、または小型のクラスターにおいて、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、またはこれらに由来するあらゆる範囲などの分割比で、新しい培養容器に移すことができる。懸濁細胞系の分割比は、培養細胞懸濁液の体積に基づいて行うことができる。継代の間隔は、少なくとも、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日毎、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。例えば、異なる酵素的な継代プロトコールに対する達成可能な分割比は、3~7日毎1:2、4~7日毎1:3、およびおよそ7日毎1:5から1:10、7日毎1:50から1:100であってよい。高い分割比を用いる場合、継代の間隔は少なくとも12~14日、または過剰な自発的な分化または細胞死による細胞の喪失のないあらゆる期間に延長することができる。

【0118】

ある態様において、単細胞継代は、上記に記載したR O C K阻害剤など、クローニング効率および細胞の生存を増大するのに有効な小型分子の存在下であってよい。このようなR O C K阻害剤、例えば、Y-27632、HA-1077、H-1152、またはプレビスタチンは、少なくとも、または約0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50から約100 μ M、またはこれらに由来するあらゆる範囲など、有効な濃度で用いることができる。

【0119】

V. 心臓分化のための方法

多能性幹細胞の分化は、接着したコロニーにおいて、または細胞凝集物形成（例えば、低接着の環境中）によってなど、様々なやり方で誘導されてよく、この場合、これら凝集物は胚様体（EB）と呼ばれる。EB内の分子の、および細胞の形態学的なシグナルおよびイベントは、発生中の胚におけるこのような細胞の天然の個体発生の多くの局面を模倣する。しかし、現在、制御された環境中で大量の心臓細胞を生成するのに満足な方法は残存しない。本発明のある態様は、非静的な懸濁培養物を用いて、凝集物のサイズおよび分化収量を制御し、商業規模で心筋細胞を生成する方法を開示するものである。

【0120】

A. 凝集物形成

胚様体（EB）は、ES細胞またはiPS細胞などの多能性幹細胞に由来する細胞の凝集物であり、何年もの間マウス胚性幹細胞で研究がなされていた。in vivoの分化に固有のいくつかの手がかりを繰り返すために、本発明のある態様は中間のステップとして3次元の凝集物（すなわち、胚様体）を用いることができる。凝集すると分化が開始し、細胞は限られた程度に胚の発生を繰り返し始める。これらは栄養外胚葉組織（胎盤を含んでいる）を形成することはできないが、生物体に存在する実質的に全ての他の型の細胞が発生することができる。本発明は、凝集物形成後の心臓分化をさらに促進することができる。

【0121】

細胞の凝集は、懸滴、非組織培養物で処理したプレート上の塗抹、またはスピナーフラスコ上によって押し付けられてよく、いずれの方法も細胞が表面に接着して典型的なコロニー増殖を形成するのを防ぐ。上記に記載した通り、R O C K阻害剤を、多能性幹細胞を培養するための凝集物形成の前に、間に、または後に用いることができる。

【0122】

多能性幹細胞を、細胞培養の技術分野において公知のあらゆる方法を用いて凝集物促進培地中に接種してもよい。例えば、多能性幹細胞を単一のコロニーとして、またはクローンの群として凝集物促進培地中に接種してもよく、多能性幹細胞をまた本質的に個々の細胞として接種してもよい。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞を、当技術分野において公知の機械的方法または酵素的方法を用いて本質的に個々の細胞に解離する。非限定的な例として、多能性幹細胞を、細胞と培養表面との間、および細胞と細胞自体との間の連結を破壊するタンパク質分解酵素に曝露してもよい。凝集物形成および分化のために多能性幹細胞を個別化するのに用いることができる酵素には、それだけには限定されないが、T r y p I Eなどの様々な商業用製剤におけるトリプシン、またはA c c u t a s e（登録商標）などの酵素の混合物が含まれてよい。

10

【0123】

ある実施形態において、多能性細胞を、培養物表面上の培養物形成用の培養培地に、本質的に個々の（もしくは分散した）細胞として添加または接種することができる。その中に細胞を接種する培養培地は、T e S R培地またはm T e S R培地、およびR O C K阻害剤などの生存因子を含み得る。例えば、分散された多能性細胞を、約 10^4 細胞/mlから約 10^{10} 細胞/mlの密度で培養培地中に接種する。より具体的に、多能性細胞を、約 10^5 細胞/mlから約 10^7 細胞/mlの、または約 0.5×10^6 細胞/mlから約 3×10^6 細胞/mlの密度で接種する。これらの実施形態において、培養物表面は、当技術分野における標準の無菌的細胞培養方法に適合性の本質的にあらゆる材料、例えば、非接着性の表面からなっていてよい。培養物表面は、本明細書に記載するマトリックス成分をさらに含み得る。ある実施形態において、マトリックス成分を培養物表面に適用した後、表面を細胞および培地と接触させてもよい。

20

【0124】

B. 心筋細胞の分化

心筋細胞系統の細胞は、所望の表現型を有する細胞を富化する特殊な増殖環境中で培養する、または分化させることによって（所望の細胞の増殖（o u t g r o w t h）によって、または他の細胞型の阻害もしくは死滅いずれかによって）非分化の幹細胞から得ることができる。

【0125】

ある態様において、i P S細胞は、開示した方法を組み入れる細胞懸濁液中、心臓細胞に分化させることができる。分化は、上記に記載した通り、例えば、多能性幹細胞培養物の増殖によって、またはE Bを形成させる低接着の性質を有する基質を有する培養ベッセル中の懸濁液中で多能性幹細胞を培養することによって、胚様体または凝集物を形成することによって開始することができる。多能性幹細胞は、短時間のコラゲナーゼ消化によって収集し、クラスターに解離し、非接着性の細胞培養プレートに塗抹することができる（参照によって組み入れられる、W O 01/51616；米国特許第6,602,711号）。場合により、E Bは、アルギネートまたは他の適切な栄養透過性マトリックス中にカプセル化して生成することができ、これはE Bの直径の均一性、および生成される細胞の粘度を改善する助けとなり得る（参照によって組み入れられる、W O 03/004626、Z a n d s t r aら）。プロセスがE B形成を伴っても、または伴わなくても、血清または血清同等物を含む培地を使用すると、心筋細胞系統の収縮性の細胞の増殖を促進する（例えば、ウシ胎児血清約20%、またはR P M Iなどの適切な増殖培地中B27もしくはN2などの血清添加剤）。心臓の分化のさらなる例示的な方法は、胚様体（E B）法（参照によって組み入れられる、Z h a n gら、2009年）、O P 9間質細胞法（参照によって組み入れられる、N a r a z a k iら、2008年）、または増殖因子／化学法（全てその全文が参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許公開第20080038820号、第20080226558号、第20080254003号、および第20090047739号を参照されたい）を含み得る。

30

40

【0126】

心筋細胞の表現型を促進するために、細胞を、心筋細胞型の細胞の増殖または生存を増

50

強し、または他の細胞型の増殖を阻害する因子および因子の組合せと一緒に培養することができる。効果は、細胞自体に対する直接的な効果によるものでも、または次に心筋細胞の形成を増強する別の細胞型に対する効果によるものでもよい。例えば、胚盤葉下層または胚盤葉上層の同等の細胞の形成を誘発し、またはこれらの細胞にこれら自体の心臓促進性エレメントの生成をもたらす因子は、全て心臓作用性因子または心筋細胞の分化のための分化因子の範疇内に入る。

【0127】

例えば、心臓の分化のための誘導培地には、それだけには限定されないが、心臓前方の外植片、心臓前中胚葉条件培地、HGFなどの中胚葉分泌性増殖因子が含まれてよい。

【0128】

本発明のある態様において、分化因子を添加するタイミングおよび量を、幹細胞の心筋細胞への分化の好適な条件を求めてスクリーニングしてもよい。特定の一態様において、分化因子は、細胞の発生に關与する増殖因子であってよい。分化因子には、それだけには限定されないが、骨形成タンパク質のシグナル伝達経路の1つまたは複数のモジュレーター、アクチビンA／ノーダル、血管内皮増殖因子（VEGF）、ディックコップホモログ1（DKK1）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、インスリン様成長因子（IGF）、および／または上皮増殖因子（EGF）が含まれてよい。

【0129】

それだけには限定されないが、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパリン、ヘパラン硫酸（heparin sulfate）、レチノイン酸、上皮増殖因子ファミリー（EGF）のメンバー、線維芽細胞増殖因子ファミリー（FGF）のメンバー（FGF2、FGF7、FGF8、および／またはFGF10を含む）、血小板由来増殖因子ファミリー（PDGF）のメンバー、トランスフォーミング増殖因子（TGF）／骨形成タンパク質（BMP）／増殖および分化因子（GDF）因子ファミリーのアンタゴニスト（それだけには限定されないが、ノギン、フォリスタチン、コーディン、グレムリン、ケルベロス（cerberus）／DANファミリータンパク質、ベントロピン（ventropin）、および無羊膜、またはこれらの変異体もしくは機能的フラグメントを含む）を含む、さらなる因子を細胞の分化の環境における最適の濃度またはタイミングに対してスクリーニングすることができることが企図される。TGF／BMP／GDFアンタゴニストは、TGF／BMP／GDF受容体－Fcキメラの形態において添加してもよい。スクリーニングすることができる他の因子には、Notch受容体ファミリーによってシグナル伝達を活性化または不活性化することができる分子（それだけには限定されないが、デルタ様およびジャグド（jagged）ファミリーのタンパク質、ならびにノッチプロセッシングもしくは切断の阻害物質、またはこれらの変異体もしくは機能的フラグメントが含まれる）が含まれる。他の増殖因子には、インスリン様成長因子ファミリー（IGF）のメンバー、インスリン、ウイングレス関連（wingless related）（WNT）因子ファミリー、およびヘッジホッグ（hedgehog）因子ファミリー、またはこれらの変異体、もしくは機能的フラグメントが含まれてよい。さらなる因子をスクリーニングし、または添加して、中胚葉幹／前駆体、内胚葉幹／前駆体、中胚葉幹／前駆体、または最終的な内胚葉幹／前駆体の増殖および生存、ならびにこれら前駆体の誘導体の生存および分化を促進してもよい。

【0130】

多能性幹細胞の中胚葉層の細胞への分化を誘発し、または心筋細胞系統の細胞へのさらなる分化を促進すると考えられている分化因子には、以下の非限定的な例が含まれる：

トランスフォーミング増殖因子ベータ関連リガンド（TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、および以下に説明するTGF- β スーパーファミリーの他のメンバーによって例示される）。リガンドはTGF- β 受容体に結合し、I型およびII型セリンキナーゼを活性化し、Smadエフェクターのリン酸化を引き起こす。

【0131】

アクチビンAおよびアクチビンBなどのモルフォゲン（TGF- β スーパーファミリー

10

20

30

40

50

のメンバー)。

【0132】

インスリン様成長因子 (例えば、IGF I および IGF II)。

【0133】

骨形態形成タンパク質 (BMP-2 および BMP-4 によって例示される TGF- β スーパーファミリーのメンバー)。

【0134】

線維芽細胞増殖因子 (bFGF、FGF-4、および FGF-8 によって例示される)、サイトゾルのキナーゼ raf-1 およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) を活性化する他のリガンド、および上皮増殖因子 (EGF) などの他のマイトジェン。

10

【0135】

DNA のメチル化に影響を及ぼし、心筋細胞関連遺伝子の発現を変更するヌクレオチド類似体 (例えば、5-アザデオキシシチジン)。

【0136】

下垂体ホルモンオキシトシン、または一酸化窒素 (NO)。

【0137】

同じ受容体に対するアゴニスト活性を有する特異的な抗体または合成化合物。

【0138】

向心臓葉の効果的な組合せの例示には、モルフォゲン様アクチビン A および複数の増殖因子、例えば、初期拘束段階の間に TGF- β および IGF ファミリーに含まれるもの、場合によりさらなるカルディオトロピン (cardiotropin) で補われるもの、例えば、1 つまたは複数の線維芽細胞増殖因子、骨形態形成タンパク質、および血小板由来成長因子の使用が含まれる。

20

【0139】

理論によって拘泥しようとするものではないが、ある態様において、心筋細胞の分化などに最適な特異的な系統の分化条件を達成するために、TGF- β シグナル伝達経路はある種の増殖因子の外部からの添加のタイミングおよびレベルを調整することによってきめ細かく制御することができることが企図される。ある態様において、分化因子の添加は、選択された幹細胞クローンと選択された培養培地との組合せに対する TGF- β シグナル伝達経路活性の活性における、特に、BMP シグナル伝達とアクチビンシグナル伝達との間の相対的な活性比など、異なる TGF- β シグナル伝達経路の相対的な活性における、変動性を説明する助けとなり得る。

30

【0140】

トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) シグナル伝達経路は、成体生物および発生中の胚の両方において、細胞の増殖、細胞の分化、アポトーシス、細胞のホメオスタシス、および他の細胞機能を含めた多くの細胞のプロセスに関与する。TGF- β シグナル伝達経路が制御する細胞のプロセスは広範囲であるにもかかわらず、そのプロセスは比較的単純である。TGF- β スーパーファミリーのリガンドは II 型受容体に結合し、II 型受容体は I 型受容体をリクルートし、リン酸化する。次いで、I 型受容体は、今度は、coSMAD SMAD4 に結合することができる受容体制御型 SMAD (R-SMAD) をリン酸化する。R-SMAD/coSMAD 複合体は核に蓄積し、核においてこれらは転写因子として働き、標的の遺伝子発現の制御に参加する。

40

【0141】

幹細胞は、後生動物の身体の数多くの胚および成体細胞型を産生する上で、自己複製能および多能性を表す (Rossi ら、2008 年による再考)。TGF- β および FGF などの増殖因子は、幹細胞の自己複製および分化を制御する。FGF2 は、培養物中のマウスおよびヒトの胚性幹細胞 (ESC) の自己複製を支持する最も広く用いられている増殖因子であり、TGF- β /アクチビンのリガンドおよび受容体を誘発し、一方で BMP 様の活性を抑制する (Greber ら、2007 年; Ogawa ら、2007 年)。さらに、T

50

G F β / ノーダル I 型受容体ファミリーの薬理的阻害剤は、ヒトおよびマウス E S C の自己複製を抑制する (O g a w a ら、2007 年)。概して、T G F β は多能性前駆細胞の分化を阻害し、B M P はこれらの分化を誘発する (W a t a b e および M i y a z o n o、2009 年)。

【0142】

E S C の自己複製を促進するために、T G F β / ノーダルのシグナル伝達は S M A D 2 および S M A D 3 を活性化し、これらは、重大な幹細胞転写因子の 1 つである N a n o g を直接誘発する (X u, R. H. ら、2008 年)。T G F β および F G F のシグナル伝達は、S m a d 複合体の N a n o g プロモーターに対する結合を増強することによって相乗する。興味深いことに、N A N O G は、E S C において T G F β (自己複製因子) と B M P (分化因子) との間の拮抗作用に対する分子リンクを提供する。N a n o g は S M A D 1 に結合し、その転写活性を阻害し、初期の中胚葉の分化および発生後期の組織特異的分化を促進する B M P シグナル伝達の可能性を制限する (S u z u k i ら、2006 年)。この例は、これらの経路の転写およびシグナル伝達因子を求めたゲノム全体にわたるスクリーニングの結果として、E S C の自己複製および分化のさらなる制御因子に拡張する可能性がある (C h e n ら、2008 年)。

【0143】

リガンドの T G F ベータスーパーファミリーには、骨形成タンパク質 (B M P)、増殖および分化因子 (G D F)、抗ミュー管ホルモン (A M H)、アクチビン、ノーダル、および T G F β が含まれる。シグナル伝達は、T G F ベータスーパーファミリーリガンドの T G F ベータ I I 型受容体に対する結合で始まる。I I 型受容体はセリン / スレオニン受容体キナーゼであり、これは I 型受容体のリン酸化を触媒する。各クラスのリガンドは特異的な I I 型受容体に結合する。哺乳動物において、7 つの公知の I 型受容体、5 つの I I 型受容体が存在する。

【0144】

アクチビンには、アクチビン A、アクチビン B、およびアクチビン A B の 3 種が存在する。アクチビンは胚発生および骨形成に関与する。これらはまた、下垂体ホルモン、性腺ホルモン、および視床下部ホルモン、ならびにインスリンを含む、多くのホルモンを制御する。これらは神経細胞生存因子でもある。

【0145】

B M P は骨形成タンパク質受容体 2 型 (B M P R 2) に結合する。これらは、骨形成、細胞分化、前側 / 後側の軸の特定化、増殖、およびホメオスタシスを含めた多数の細胞機能に関与する。

【0146】

T G F ベータファミリーには、T G F β 1、T G F β 2、T G F β 3 が含まれる。B M P S 同様、T G F ベータは肺発生および細胞分化に関与するが、これらはアポトーシスおよび他の機能にも関与する。これらは T G F ベータ受容体 2 型 (T G F B R 2) に結合する。

【0147】

ノーダルはアクチビン A 受容体、I I B 型 A C V R 2 B に結合する。これは、次いで、アクチビン A 受容体 I B 型 (A C V R 1 B)、またはアクチビン A 受容体 I C 型 (A C V R 1 C) のいずれかと受容体複合体を形成することができる。

【0148】

T G F ベータシグナル伝達経路 (表 2 4) は、広範囲の細胞のプロセスに関与し、引き続き非常に厳重に制御される。経路が正および負の両方で変調される様々なメカニズムが存在する。リガンドおよび R - S M A D に対してアゴニストが存在し、阻受容体が存在し、R - S M A D および受容体はユビキチン化されている。

【0149】

【表 2 - 1】

表24. TGFベータシグナル伝達経路

TGFベータ スーパーファミリー リガンド	II型受容体	I型受容体	<u>R-SMAD</u>	coSMAD	リガンド 阻害剤
アクチビンA	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	フォリスタ チン
GDF1	ACVR2A	ACVR1B (ALK4)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
GDF11	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	
骨形成タンパク質	BMPR2	BMPR1A (ALK3), BMPR1B (ALK6)	SMAD1 SMAD5, SMAD8	SMAD4	ノギン、コ ーディン、 DAN
ノーダル	ACVR2B	ACVR1B (ALK4), ACVR1C (ALK7)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	レフティ
TGFβ	TGFβRII	TGFβRI (ALK5)	SMAD2 , SMAD3	SMAD4	LTBP1, THBS1, デ コリン

ある実施形態において、本発明の組成物および方法は、好適または最適な分化の条件を決定するための、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF-β）、またはTGF-βファミリーメンバー、またはこれらの変異体もしくは機能的フラグメントの活性の調節を含む。

【0150】

本明細書で用いられる、「TGF-βファミリーのメンバー」などの語は、TGF-βファミリーの公知のメンバーとの相同性によって、またはTGF-βファミリーの公知のメンバーとの機能における類似性によってのいずれかで、TGF-βファミリーに属すると当業者によって一般的に特徴付けられる増殖因子を意味する。本発明の特定の実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーが存在する場合、TGF-βファミリーメンバーのこれらの変異体または機能的フラグメントはSMAD2または3を活性化する。ある実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーは、ノーダル、アクチビンA、アクチビンB、TGF-β、骨形成タンパク質-2（BMP2）、および骨形成タンパク質-4（BMP4）からなる群から選択される。一実施形態において、TGF-βファミリーのメンバーはアクチビンAである。

【0151】

ノーダルが存在する場合、これはおよそ0.1 ng/mlからおよそ2000 ng/ml、より好ましくはおよそ1 ng/mlからおよそ1000 ng/ml、より好ましくはおよそ10 ng/mlからおよそ750 ng/ml、またはより好ましくはおよそ25 ng/mlからおよそ500 ng/mlの濃度で変化してよい。アクチビンAが用いられる場合は、およそ0.01 ng/mlからおよそ1000 ng/ml、より好ましくはおよそ0.1 ng/mlからおよそ100 ng/ml、より好ましくはおよそ0.1 ng/mlからおよそ25 ng/mlの濃度、または最も好ましくはおよそ6 ng/mlからおよそ20 ng/mlの濃度で変化してよいことが企図される。TGF-βが存在する場合は、およそ0.01 ng/mlからおよそ100 ng/ml、より好ましくはおよそ0.1 ng/mlからおよそ50 ng/ml、またはより好ましくはおよそ0.1 ng/mlか

10

20

30

40

50

らおよそ 20 ng/ml の濃度で存在してよいことが企図される。

【0152】

ある実施形態において、組成物および方法は、アクチビン／ノーダルシグナル伝達の阻害剤または不活性化剤を含む。本明細書で用いられる「アクチビン／ノーダルシグナル伝達の阻害剤または不活性化剤」は、1つまたは複数のアクチビン／ノーダルタンパク質の活性、またはあらゆるこれらの上流もしくは下流のシグナル伝達組成物に、その可能なシグナル伝達経路のいずれかによって拮抗する薬剤を意味する。非限定的な例として SB-431542 が含まれる。

【0153】

ある実施形態において、組成物および方法は、BMPシグナル伝達の阻害剤または不活性化剤を含む。本明細書で用いられる「BMPシグナル伝達の阻害剤または不活性化剤」は、1つまたは複数の BMP タンパク質の活性、またはあらゆるこれらの上流もしくは下流のシグナル伝達組成物に、その可能なシグナル伝達経路のいずれかによって拮抗する薬剤を意味する。BMPシグナル伝達を不活性化するのに用いられる化合物（1つまたは複数）は、当技術分野では公知のあらゆる化合物であってよく、または後で発見されるものであってよい。BMPシグナル伝達の阻害剤の非限定的な例には、ドルソモルフィン、GDF-3、ドミナントネガティブ、切断した BMP 受容体、可溶性 BMP 受容体、BMP 受容体-Fc キメラ、ノギン、フォリスタチン、コーディン、グレムリン、ケルベロス/DAN ファミリータンパク質、ベントロピン、高用量アクチビン、および無羊膜が含まれる。

【0154】

本発明を練り上げる間に、*in vitro* の分化の最終段階からインスリン様成長因子 II (IGF II) および関連の分子などの省略されていた因子が、心臓遺伝子発現のレベルを実際に増大することが見出された。無関係の研究において、IGF II は線維芽細胞において GSK3β のレベルを低減することが見出されている (Scalia ら、2001 年)。IGF II は、したがって、培養培地中に存在し、または細胞によって分泌される Wnt タンパク質の効果を増強することができる。Wnt タンパク質は通常、細胞質の分子である β-カテニンを安定化し、核の移動を引き起こし、β-カテニンは転写因子 TCF の一部分を含んでいる。これは、複数の遺伝子の転写活性を変更する。Wnt の非存在下、β-カテニンはキナーゼ GSK3β によってリン酸化され、GSK3β は β-カテニンを不安定化し、β-カテニンを細胞質中に維持もする。

【0155】

IGF II などの Wnt 活性化物質は明らかに心筋細胞の分化を制限するので、本発明のある態様は、多能性幹細胞の心筋細胞の分化の程度または割合を増大するために、Wnt アンタゴニストと培養することを含み得る。Wnt シグナル伝達は、DKK-1 または Crescent (Wnt に結合し、不活性化する分泌型タンパク質) のいずれかをコードする合成 mRNA の注入によって (Schneider ら、2001 年)、または DKK-1 をコードするレトロウイルスに感染させることによって (Marvin ら、2001 年) 阻害され得る。あるいは、Wnt 経路は、キナーゼ GSK3β の活性を増大することによって、例えば、細胞を IL-6 またはグルココルチコイドなどの因子と培養することによって阻害され得る。

【0156】

ある実施形態において、多能性幹細胞、細胞凝集物、または分化した幹細胞を培養するのに FGF または FGF と HGF との組合せが用いられ、これらは幹細胞の心臓誘導を促進し得る。例えば、FGF を、少なくとも、または約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250 ng/ml、またはこれらに由来するあらゆる範囲の濃度で添加することができる。場合により、例えば、少なくとも、または約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250 ng/ml、また

はこれらに由来するあらゆる範囲の濃度の肝細胞増殖因子（HGF）も含まれていてよい。

【0157】

C. 非静置培養

ある態様において、非静置培養を多能性幹細胞の心臓誘導に用いることができる。大規模のEBおよび心筋細胞を引き続き生成するのに懸濁培養を用いることができるが、静置培養は形成するEBのサイズおよび形状に対する制御がほとんどなく、このことは、EBから分化する心筋細胞の収量および質に直接影響を及ぼす。非静置培養は、例えば、振盪、回転、もしくは攪拌のプラットフォーム、または培養ベッセル、特に大体積の回転式バイオリアクターを用いることによって、制御された運動速度に維持された細胞とのあらゆる培養物であってよい。かき混ぜは栄養分および細胞老廃物の循環を改善することがあり、より均一な環境を提供することによって細胞凝集物を制御するのにも用いられ得る。例えば、回転速度を、少なくとも、または多くて約25、30、35、40、45、50、75、100rpm、またはこれらに由来するあらゆる範囲に設定することができる。多能性幹細胞、細胞凝集物、分化した幹細胞、またはこれらに由来する心筋細胞のための非静置培養におけるインキュベーション期間は、少なくとも、または約4時間、8時間、16時間、または1、2、3、4、5、6日、または1、2、3、4、5、6、7週、またはこれらに由来するあらゆる範囲であってよい。

【0158】

VI. 心筋細胞系統の細胞のキャラクタリゼーション

本発明の技術にしたがって得た細胞を、数々の表現型の判定基準にしたがってキャラクタリゼーションすることができる。多能性幹細胞系に由来する心筋細胞および前駆細胞は、他の源からの心筋細胞の形態学的特徴を有することが多い。これらは、紡錘体、円形、三角形、または多角形の形状であってよく、これらは免疫染色によって検出できるサルコメアの構造に特徴的な横紋を示すことがある。これらは、平らな細胞のシート、または基質に付着したままの、もしくは懸濁液中に浮遊する凝集物であってよく、電子顕微鏡によって検査すると典型的な筋節および心房顆粒を示す。

【0159】

多能性幹細胞由来の心筋細胞およびそれらの前駆体は、以下の心筋細胞特異的マーカーの少なくとも1つを有するのが典型的である：

横紋筋の収縮を制御するためのカルシウム感受性分子スイッチを提供するトロポニン複合体のサブユニットである心臓トロポニンI（cTnI）。

【0160】

心臓トロポニンT（cTnT）。

【0161】

発生中の心臓において持続する、マウス胚初期発生中に心臓中胚葉において発現される心臓転写因子であるNkx2.5。

【0162】

細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つ（およびしばしば少なくとも3、5、またはそれを超えて）を発現するのが典型的でもある：

発生中の心臓および胎児心筋細胞において発現されるが、成体において下方制御されるホルモンである心房性ナトリウム利尿因子（ANF）。これは心臓細胞において高度に特異的に発現されるが、骨格筋細胞では発現されないので、心筋細胞に対する良好なマーカーであると考えられている。

【0163】

ミオシン重鎖（MHC）、特に心臓特異的であるβ鎖、
タイチン、トロポミオシン、アルファ筋節アクチン、およびデスミン、
心臓中胚葉において高度に発現されるが発生中の心臓において持続する転写因子である、GATA-4。これは多くの心臓遺伝子を制御し、心発生において役割を果たす
心臓中胚葉において発現され、発生中の心臓において持続する転写因子である、MEF

－ 2 A、M E F－ 2 B、M E F－ 2 C、M E F－ 2 D、
 心臓細胞間の接着を媒介する、N－カドヘリン、
 心筋細胞間にギャップ結合を形成する、コネキシン 4 3、
 β 1－アドレナリン受容体 (β 1－A R)、
 心筋梗塞後に血清中で上昇する、クレアチンキナーゼ M B (C K－M B) およびミオグロビン、
 α －心臓アクチン、初期増殖応答－ I、およびサイクリン D 2。

【0164】

組織特異的マーカーは、細胞表面マーカーに対するフローイムノサイトメトリーまたはアフニティー吸着、細胞内または細胞表面マーカーに対する免疫細胞化学（例えば、固定された細胞もしくは組織切片の）、細胞抽出物のウエスタンブロット分析、および細胞抽出物または培地中に分泌された生成物のための酵素結合免疫吸着検定法など、あらゆる適切な免疫学的技術を用いて検出することができる。c T n I および c T n T などの心臓マーカーを他のイソ型から区別する抗体は、S i g m a および S p e c t r a l D i a g n o s t i c s などの供給業者から市販されている。場合により細胞の固定後に、および場合により標識した二次抗体を用いて、著しく検出可能な量の抗体が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抗原に結合する場合は、細胞による抗原の発現は、抗体検出性であると言われる。

【0165】

組織特異的遺伝子生成物の発現は、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 m R N A レベルで、または、公的に入手できる配列データ (G e n B a n k) を用いた標準の増幅方法における配列特異的プライマーを用いた逆転写酵素開始 (r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e i n i t i a t e d) ポリメラーゼ連鎖反応 (R T－P C R) によって検出することもできる。タンパク質または m R N A レベルで検出される組織特異的マーカーの発現は、レベルが、少なくとも、または約 2、3、4、5、6、7、8、または 9 倍、より詳しくは 10、20、30、40、または 50 倍を超えて、未分化の多能性幹細胞または他の非関連の細胞型などの対照の細胞を上回る場合に陽性とみなされる。

【0166】

マーカーが所望の表現型の細胞の表面上で同定された後、これらを免疫選択法に用いて、イムノパニングまたは抗体媒介性蛍光活性化細胞選別などの技術によってその集団をさらに富化することができる。

【0167】

好適な環境下、多能性幹細胞由来の心筋細胞は、しばしば自発的な周期的な収縮活性を示す。これは、これらの細胞を好適な $C a^{2+}$ 濃度および電解質のバランスで適切な組織培養環境中で培養する場合、細胞は、細胞の軸の 1 つにわたって収縮し、次いで培養培地にいかなる追加の成分を添加しなくても収縮から開放されることが観察され得る。収縮は周期的であり、これは通常のパッファー中、1 分あたり約 6 回と 200 回との間の収縮の頻度、しばしば 1 分あたり約 20 回と約 90 回との間の収縮の頻度で、収縮が規則的または不規則的に繰り返すことを意味する。個々の細胞は、それ自体自発的な周期的な収縮活性を示すことがあり、または組織、細胞凝集物、または培養された細胞塊において周囲の細胞と協調した自発的な周期的な収縮活性を示すことがある。

【0168】

細胞の収縮活性は、収縮の性質および頻度に対する培養条件の影響にしたがって特徴付けることができる。利用可能な $C a^{2+}$ 濃度を低減し、または他の点で $C a^{2+}$ の膜貫通型の輸送を妨害する化合物は、しばしば収縮活性に影響を及ぼす。例えば、L 型カルシウムチャネルブロッカーのジルチアゼムは、用量依存的に収縮活性を阻害する。一方、イソプレナリンおよびフェニレフリンなどのアドレナリン受容体アゴニストは、正の変時効果を有する。細胞の機能的性質のさらなるキャラクタリゼーションは、 $N a^{+}$ 、 K^{+} 、および $C a^{2+}$ に対するチャネルを特徴付けることを伴うことができる。心筋細胞様作用の電

10

20

30

40

50

位に対するパッチクランプ分析によって、電気生理学を研究することができる。Igelmundら、1999年；Wobusら、1995年；およびDoevendansら、2000年を参照されたい。

【0169】

機能的属性により *in vitro* で細胞およびその前駆体の特徴付ける様式が提供されるが、本開示において言及されるいくつかの使用には必要ではないことがある。例えば、機能的、または電気生理学的性質全てではないが、上記に列挙したマーカーのいくつかを保有する細胞を豊富にした細胞集団の混合は、損傷された心臓組織に移植し、心臓機能を補足するのに必要とされる機能的性質を *in vivo* で獲得するのが可能である場合、治療的にかなり有益であり得る。

10

【0170】

確立された多能性幹細胞系に由来する場合、本発明の細胞集団および単離細胞は、これらが由来する系と同じゲノムを有すると特徴付けることができる。これは、染色体DNAが多能性幹細胞と心臓細胞との間で90%を超えて同一であることを意味し、これは心臓細胞が未分化の系から正常の有糸分裂の経過によって得られる場合に推論され得る。心筋細胞の系統の細胞が親細胞集団に由来するという特徴は、いくつかの点において重要である。特に、未分化細胞の集団は、例えば、患者を組織適合性型の心臓同種移植に予め寛容化することができる集団など、さらなるパッチの心臓細胞、または治療において有用であり得る別の細胞型のいずれかである、共有ゲノムを有するさらなる細胞を生成するのに用いることができる（US 2002/0086005；WO 03/050251）。

20

【0171】

VII. 分化細胞の遺伝子改変

本発明の細胞は、分化の前または後のいずれかに細胞を遺伝子操作することによって、1つまたは複数の遺伝子改変を含むようになされてよい（US 2002/0168766）。人為的操作のあらゆる適切な手段によってポリヌクレオチドが細胞中に移動される場合に、または細胞がポリヌクレオチドを受け継いだ最初に改変された細胞の子孫である場合、細胞は「遺伝子改変された」または「トランスジェニック」と言われる。例えば、細胞は、制限された発生上の系統の細胞または最終分化した細胞に進行する前または後のいずれかに、テロメラーゼ逆転写酵素を発現するように細胞を遺伝子改変することによって、その複製の可能性を増大するように処理加工されてよい（US 2003/0022367）。

30

【0172】

本発明の細胞は、組織の再生に関与するその能力を増強するために、または投与部位に治療用遺伝子を送達するために、遺伝子改変されてもよい。ベクターは、分化細胞の型において汎特異的または特異的に活性のいずれかであるプロモーターに作動可能に連結している、所望の遺伝子に対する公知のコード配列を用いてデザインされる。特に興味深いのは、FGF、心房性ナトリウム利尿因子などの向心臓因子、クリプト（*cripto*）、ならびに心臓転写制御因子（例えば、GATA-4、Nkx2.5、およびMEF2-C）など、様々なタイプの1つまたは複数の増殖因子を発現するように遺伝子改変された細胞である。投与部位でこれらの因子が生成されると、機能的な表現型の採用を促進し、投与された細胞の有益な効果を増強し、または処置部位周囲の宿主細胞の増殖もしくは活性を増大することができる。

40

【0173】

本発明のある実施形態において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、選択マーカーまたはスクリーニング可能マーカーなど、発現ベクター中のマーカーを含むことによって、*in vitro* または *in vivo* で同定され得る。このようなマーカーは、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にする細胞への同定可能な変化を付与し、または心臓特異的なプロモーター（例えば、心臓トロポニンI（*cTnI*）、心臓トロポニンT（*cTnT*）、横紋筋ミオシン重鎖（*MHC*）、GATA-4、Nkx2.5、N-カドヘリン、 β 1-アドレナリン受容体、ANF、転写因子のMEF-2ファミリー、クレアチン

50

キナーゼMB（CK-MB）、ミオグロビン、または心房性ナトリウム利尿因子（ANF）のプロモーター）を用いることによって分化した心臓細胞を富化する、もしくは同定するのを助ける。

【0174】

一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする性質を付与するものである。正の選択マーカーは、マーカーの存在によりその選択が可能になるものであり、負の選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を妨げるものである。正の選択マーカーの一例は薬物耐性マーカーである。

【0175】

通常、薬物選択マーカーが含まれると形質転換体のクローニングおよび同定における助けとなり、例えば、ネオマイシン、ブラストサイジン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は有用な選択マーカーである。条件の実行に基づいて形質転換体の判別を可能にする表現型を付与するマーカーの他に、その基盤が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能マーカーを含めた他のタイプのマーカーも企図される。あるいは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などのスクリーニング可能酵素も利用することができる。当業者であれば、おそらくFACS分析と併用する免疫学的マーカーを使用する方法も知っている。用いるマーカーは、遺伝子生成物をコードする核酸と同時に発現することができるのであれば重要でないと考えられている。選択マーカーおよびスクリーニング可能マーカーのさらなる例は当業者には周知である。

【0176】

VIII. 心筋細胞およびその前駆体の使用

本発明のある態様は、心筋細胞系統の多数の細胞を生成する方法を提供する。これらの細胞集団は、数々の重要な調査、開発、および商業上の目的に用いることができる。

【0177】

A. 薬物スクリーニング

本発明の心筋細胞は、このような細胞およびその様々な子孫の特徴に影響を及ぼす因子（例えば、溶媒、小分子薬物、ペプチド、オリゴヌクレオチド）または環境条件（例えば、培養条件もしくは操作）を求めて商業的にスクリーニングするのに用いることができる。

【0178】

いくつかの適用において、多能性幹細胞（非分化または分化）は、後期心筋細胞前駆体、もしくは最終分化細胞への成熟を促進する因子をスクリーニングするために、または長期間培養物中のこのような細胞の増殖および維持を促進するために用いられる。例えば、候補の成熟因子または増殖因子を異なるウェル中の細胞に添加し、次いでさらなる培養物および細胞の使用に対する望ましい評価基準にしたがって、結果として生じるあらゆる表現型の変化を決定することによって、候補の成熟因子または増殖因子を試験する。

【0179】

本発明の他のスクリーニングの応用は、医薬化合物の、心筋組織の維持または修復に対する効果の試験に関する。スクリーニングは、化合物が細胞に対して薬理学的効果を有するようにデザインされているという理由から、または他で効果を有するようにデザインされる化合物がこの組織型の細胞に対して意図されない副作用を有し得るという理由から、のいずれかで行われてよい。スクリーニングは、本発明のあらゆる前駆細胞または最終分化細胞を用いて行うことができる。

【0180】

読者は、一般に、標準的な教科書である *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997年、および米国特許第5,030,015号を参照されたい。候補の医薬化合物の活性の評価は、本発明の分化細胞を、単独で、または他の薬物との併用いずれかの候補の化合物と組み合わせることを一般的に伴う。研究者は、形態学、マーカーの表現型、または

化合物に起因する細胞の機能的活性（非処理の細胞、または不活性な化合物で処理した細胞と比べて）におけるあらゆる変化を決定し、次いで化合物の効果を観察される変化と関連させる。

【0181】

細胞の生存能、生存、形態学、ならびにある種のマーカーおよび受容体の発現に対する効果によって、まず第一に細胞毒性を決定することができる。薬物の染色体DNAに対する効果は、DNA合成または修復を測定することによって決定することができる。特に細胞周期における予定外の時間の、または細胞の複製に必要とされるレベルを超えた $[^3\text{H}]$ ーチミジンもしくはBrdUの組入れは、薬物効果と一致する。不必要な効果には、中期延展位によって決定される異常な割合の姉妹染色分体交換も含み得る。読者は、さらなる詳細にVickers (In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997年、375～410頁)を参照されたい。

10

【0182】

細胞機能の効果は、細胞培養物またはin vivoのいずれかにおいて、マーカーの発現、受容体の結合、収縮活性、または電気生理学など、心筋細胞の表現型または活性を観察するためのあらゆる標準のアッセイを用いて評価することができる。薬剤候補を、これらが収縮の程度または頻度を増大するかまたは低減するかなど、薬剤候補の収縮活性に対する効果を試験することもできる。効果が観察される場合、化合物の濃度を滴定して半数有効量を決定することができる(ED₅₀)。

20

【0183】

B. 動物試験

本発明のある態様は、代謝機能における先天性異常、疾患状態の効果、または著しい外傷の結果など、あらゆる認知される必要性に対する心筋の組織維持または修復を増強するための、心筋細胞および心筋細胞の前駆体の使用も提供する。

【0184】

細胞組成物の治療的投与に対する適合性を決定するために、細胞を、適切な動物モデルにおいて最初に試験することができる。一レベルにおいて、in vivoで細胞が生存し、その表現型を維持する能力に対して細胞を評価する。細胞組成物を免疫不全の動物（例えば、ヌードマウス、または化学的にもしくは照射によって免疫不全にされた動物）に投与する。再増殖の期間の後、組織を収集し、多能性幹細胞由来の細胞が依然として存在するか否かについて評価する。

30

【0185】

これは、予め標識し（例えば、BrdUもしくは $[^3\text{H}]$ チミジンで）、または引き続き構成的細胞マーカーを検出することによって（例えば、ヒト特異的抗体を使用して）検出できる標識（例えば、緑色蛍光タンパク質もしくは β -ガラクトシダーゼ）を発現する細胞を投与することによって行うことができる。投与した細胞の存在および表現型は、免疫組織学的に、もしくはヒト特異的抗体を用いてELISAによって、または公開されている配列データにしたがってヒトポリヌクレオチドに特異的である増幅をもたらすプライマーおよびハイブリダイゼーション条件を用いてRT-PCR分析によって評価することができる。

40

【0186】

適合性は、多能性幹細胞に由来する心筋細胞の細胞集団での処置の結果として起こる心臓の回復の程度を評価することによっても決定することができる。このような試験には数々の動物モデルが利用できる。例えば、前側左心室壁の表面に接触させて、予め冷却したアルミニウム棒を配置することによって、心臓を低温傷害してもよい(Murryら、1996年; Reineckeら、1999年; 米国特許第6,099,832号; Reineckeら、2004年)。より大型の動物では、左心室前壁上に液体N₂中冷却した30～50mm銅製ディスクプローブを約20分間配置することによって低温傷害を生じさせることができる(Chiuら、1995年)。左冠状動脈主幹部に結紮することによ

50

って、梗塞を誘発することができる（Liら、1997年）。傷害した部位を、本発明の細胞調製物で処置し、心臓組織を、傷害領域における細胞の存在に対して組織学的に試験する。左心室拡張終期圧、発生圧、圧力上昇率、および圧減衰率などのパラメーターを決定することによって、心臓機能をモニタリングすることができる。

【0187】

C. ヒトにおける治療使用

十分な試験の後、本発明の分化細胞は、このような処置を必要とするヒト患者または他の対象における組織の再構成または再生に用いることができる。細胞が意図する組織部位に移植または遊走し、機能的に欠損した領域を再構成または再生できるやり方で細胞を投与する。心臓機能を再構成することができる細胞を、心腔、心膜、または心筋の内部の所望の位置に直接投与するように適応される特殊な装置が利用可能である。

10

【0188】

望ましい場合には、多能性幹細胞由来の心筋細胞の同種移植片を受ける患者を、移植される細胞の免疫拒絶を低減するように処置することができる。企図される方法には、シクロスポリンAなどの伝統的な免疫抑制薬の投与（Dunnら、Drugs、61巻、1957頁、2001年）、または多能性幹細胞由来の細胞の適合する集団を用いた免疫寛容の誘発（WO 02/44343；米国特許第6,280,718号；WO 03/050251）が含まれる。別の取組みは、例えば、アロプリノールでの処置など、対象中に移植したときに細胞によって生成される尿酸の量を低減するように心筋細胞の細胞集団を適応させることである。あるいは、または合わせて、アロプリノール、または尿酸オキシダーゼなどの尿酸を代謝する酵素を投与することによって、患者を準備する（PCT/US 04/42917）。

20

【0189】

本発明による再生医療を受けるのに適する患者には、冠動脈性心疾患、心筋症、心内膜炎、先天性心臓血管欠損、およびうっ血性心不全など、様々な種類の急性および慢性の心臓状態を有する患者が含まれる。処置の有効性は、臨床的に認められている判定基準、例えば、瘢痕組織または瘢痕組織の血管再生によって占められる面積における低減、および狭心症の頻度および重症度における低減；または発生圧、収縮期圧、拡張末期圧、患者の移動性、および生活の質に置ける改善によってモニタリングすることができる。

【0190】

本発明の心筋細胞は、ヒトに投与するのに十分に無菌の条件下で調製される等張の賦形剤を含む、医薬組成物の形態で供給することができる。ある態様において、細胞を、プロテアーゼを用いて、または単細胞もしくは小型のクラスターの懸濁液にする穏やかな機械的操作によって分散するのが望ましいことがある。移植時の細胞死の危険性を低減するために、細胞を、投与の約24時間前に熱ショックによって処理し、または約0.5 U/mLのエリスロポエチンで培養してもよい。

30

【0191】

医薬製剤における一般的原則に、読者は、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy、1996年；およびHematopoietic Stem Cell Therapy、2000年を参照されたい。細胞の受け手および組成物のあらゆる付随するエレメントの選択が、投与に用いられる経路および装置にしたがって適応される。組成物はまた、心筋細胞の移植または機能的な移動を促進する1つまたは複数の他の成分を含み、または伴うこともできる。適切な成分には、心筋細胞の接着を支持もしくは促進するマトリックスタンパク質、または相補的な細胞型、特に内皮細胞が含まれる。

40

【0192】

本発明は、製造、流通、または使用の間のあらゆる時間に存在する1セットまたは組合せの細胞を含む試薬系も含む。細胞のセットは、本開示に記載される2つまたはそれを超える細胞集団のあらゆる組合せを含み、例を挙げると、それだけには限定されないが、し

50

ばしば同じゲノムを共有する、非分化の多能性幹細胞または他の分化細胞型と組み合わせられた、1タイプの分化細胞（心筋細胞、心筋細胞前駆体など）である。セットにおける各細胞型は一緒に、または同じ設備において別々の容器に、または異なる場所で、同時に、または異なる時間に、取引関係を共有する同じ実体または異なる実体の制御下で包装されてよい。

【0193】

本発明の医薬組成物は、場合により、心筋の疾患状態または異常を改善するための心筋細胞の細胞機能の再構成など、所望の目的で、書面の指示と一緒に適切な容器中に包装することができる。

【実施例】

10

【0194】

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。当業者であれば、後に続く実施例において開示する技術は、本発明の実践において十分に機能することが本発明者らによって発明された技術を表し、したがってそれを実践するための好ましい様式を構成するとみなされ得ることを理解されたい。しかし、当業者であれば、本開示に鑑みて、開示される特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、また本発明の精神および範囲から逸脱せずに同様のまたは類似の結果を依然として得ることができることを理解されたい。

【0195】

（実施例1）

20

自動化のための単細胞分割

iPS細胞を、6ウェルプレート中TeSR培地（Stem Cell Technologiesから）中Matrigel（商標）上に維持した。培地を吸引した後、0.05%トリプシン1ml/ウェルを加え、細胞を37℃で7分間インキュベートした。等体積のA1培地（1μM H-1152（またはHA-100）（EMD）、0.5mg/mlダイズトリプシン阻害物質を含むTeSR培地（Invitrogen））を細胞に加えた。次いで、細胞を、A1培地を含むMatrigel（商標）をコーティングしたベッセル中に接種し、24時間毎にTeSR培地を供給した。

【0196】

（実施例2）

30

クエン酸ナトリウムでの単細胞のヒトiPS細胞の継代

解離したiPS細胞を、Ca²⁺およびMg²⁺を含まないD-PBS（ダルベッコのリン酸緩衝食塩水）ですすぎ、培地を吸引した。次いで、細胞を好適な量（すなわち、6ウェルプレートの1ウェルに対して1mL、T-150フラスコに対して15mLなど）の15mMクエン酸ナトリウム、165mM KCl、pH7.3、OSM340と、室温で6~15分間インキュベートした。インキュベーション後、クエン酸ナトリウム水溶液を、依然としてゆるく接着している細胞と一緒に吸引した。細胞を1μM H1152を有する好適な量のTeSR中に再懸濁し、Matrigel（商標）表面のベッセルに分配した。

【0197】

40

T150フラスコからCorning Double Stacksまでの出発材料の生成をスケールアップするために、およびクエン酸ナトリウムで単細胞/小型クランプとしてiPS細胞が継代される能力を評価するために、iPS6.1およびiPS6.1MRBを単細胞または小型細胞クランプとして15mMクエン酸ナトリウムでダブルスタック中に継代し、T150対照フラスコをディスパーゼで分割して維持した（実験デザインは図1を参照されたい）。ダブルスタックのクエン酸ナトリウム条件は約30時間の良好な典型的な倍加時間を有した（図2A~C）。4継代および7継代に、細胞を、心発生、多能性パネル、および核型で評価した。細胞をクエン酸ナトリウムで4回分割し、正常の核型を維持した（図3）。凝集物の画像、および心筋細胞に対するcTnT染色を、分割後14日目に分析した（図4A~D、図5A~C、図6A~B、図7A~C）。クエン酸

50

ナトリウムおよびディスパーゼで継代した後の i P S 細胞の多能性のプロファイルを、5つの多能性マーカーを用いてフローサイトメトリーによって比較した（図 8 A ~ C）。i P S 細胞を、クエン酸ナトリウム法で少なくとも 4 回継代するのは安全と思われる。

【0198】

これらの i P S 細胞をクエン酸ナトリウムで継代した後、心発生も分析し、データを図 9 にまとめた。図は、T 1 5 0 フラスコ（対照）中ディスパーゼで正常に継代した i P S 6 . 1 および i P S 6 . 1 M R B 細胞、ならびにクエン酸ナトリウムでダブルスタック中で継代した細胞から産生される心筋細胞を示す。最後の 3 つの「スピナー」試料は、様々なダブルスタック収集物から残されたダブルスタック i P S 6 . 1 M R B 細胞に由来する。クエン酸ナトリウムでのダブルスタック中で継代した細胞での 1 L スピナーにおいて、平均収量 1.1×10^6 細胞 / L が得られた。

10

【0199】

上記に記載した実験およびデータは、i P S 6 . 1 および i P S 6 . 1 M R B などの i P S 細胞を分割する手段としてのクエン酸ナトリウムの使用を支持するものである。この分割方法をダブルスタックフラスコと組み合わせることにより、大量の出発材料が、より簡単に効率的に生成できるようになる。クエン酸ナトリウム分割細胞ははるかにより均等に広がり、細胞は、ディスパーゼで分割した細胞よりもさらに単層に増殖させることができる。これにより、本発明者らは、各フラスコに対して表面積および T e S R 利用 / 細胞の両方を最大化できるようになる。クエン酸ナトリウムは、ディスパーゼを用いた場合に細胞を掻き取るために細胞の上部に接近する必要性の問題も解決する。本発明者らは、クエン酸ナトリウムで少なくとも 4 回 i P S 細胞を安全に継代することができ（ディスパーゼで維持される細胞から）、正常の核型、心発生の可能性、および多能性を維持する細胞を依然として有することができると思われる。

20

【0200】

（実施例 3）

1 L スピナーフラスコ中の懸濁凝集物による i P S 細胞の心筋細胞への誘導

以下の実験において、ヒト多能性幹細胞を、1 L スピナーフラスコ中懸濁凝集物により T e S R 培地中 M a t r i g e l（商標）上で維持し、心筋細胞に拡大した。

【0201】

i P S - M R B 細胞を、通常継代される準備ができるときまでに、T e S R 培地（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s から）中で M a t r i g e l（商標）上に維持した。本実施例を通して i P S 細胞を T - 1 5 0 フラスコ中で増殖させたが、他の培養の様式において出発細胞用に秤量することができる。T - 1 5 0 フラスコ 5 本の i P S 細胞を収集し、培地を吸引し、細胞を室温の組換えトリプシン様酵素である T r y p L e（商標）（I n v i t r o g e n）1 2 m L と 3 7 ° C で 7 分間インキュベートした。次いで、細胞を、1 0 % ウシ胎児血清（F C S）（C h e m i c o n）とともに 1 2 m l D M E M / F 1 2（G I B C O）を含む 5 0 m l コニカルチューブ 5 本に移した（各 T - 1 5 0 フラスコに対しチューブ 1 本）。次いで、細胞を 1 2 0 0 r p m で 5 分間ペレットにし、上清を吸引した。ペレットを凝集物促進培地 1 0 m L（2 5 μ g / m l ゲンタマイシン、1 μ M H 1 1 5 2 を含み、5 0 n g / m l ヒト組換え H G F ありまたはなしの T e S R 培地）中に再懸濁した。再懸濁したペレットを、必要であれば、1 本の 2 5 0 m l コニカルチューブ中に合わせた（後の希釈を可能にする体積）。細胞を、C E D E X H i R E S 細胞計数器を用いて計数し、次いで 1.0×10^6 細胞 / m L に希釈した。希釈した細胞ストックの各 5 0 0 m L を、1 L スピナーフラスコ 1 本中に分配し（後で希釈するためにスピナーフラスコ中室内に放置）、フラスコを速度 5 0 R P M のマグネチックスターラーのプラットフォーム上に配置した（気体を移動させるために 2 回めいっぱいまわして両方のサイドキャップを緩めた）。

30

40

【0202】

翌日（1 日目）、細胞を含むフラスコを細胞培養フード中にセットし、懸濁した凝集物を 3 0 分間フラスコの底部に沈降させた。使用済みの培地を、2 m L 吸引ピペットを用い

50

て吸引し、およそ100mLをフラスコ中に残した（設定後、細胞のフィルムが底部上に形成した場合は、フラスコを各方向、前後に振盪しこれらを破壊した後、培地を加える）。凝集物移行培地（50%TeSR培地、45%DMEM含有GlutaMax（商標）、5%ES用FCS、25 μ g/mLゲンタマイシン、1 μ M H1152、および50ng/mL HGFありまたはなし）をパイプライン機械を用いてフラスコに加えてオリジナルの体積とした。フラスコを、7%CO₂インキュベーター内部の攪拌プラットフォーム上に戻し、攪拌器を50 $\pm$ 1RPMで作動開始させた（気体を移動させるために2回めいっぱいまわして両方のサイドキャップを緩めた）。

【0203】

2日目、細胞を含むフラスコを細胞培養フード中にセットし、懸濁した凝集物を15分間フラスコの底部に沈降させた。使用済みの培地を吸引し、およそ100mLをフラスコ中に残した。凝集懸濁液をフラスコ中穏やかに混合し、心臓誘導培地（90%TeSR培地、10%ES用FCS、25 μ g/mLゲンタマイシン、50ng/mLヒト組換えbFGF、および50ng/mLヒト組換えHGFありまたはなし）をパイプライン機械を用いて各フラスコに加えて1L（2 $\times$ 希釈）とした。フラスコを、7%CO₂インキュベーター内部の攪拌プラットフォーム上に戻し、攪拌器を50 $\pm$ 1RPMで作動開始させた（気体を移動させるために2回めいっぱいまわして両方のサイドキャップを緩めた）。

【0204】

3日目、細胞を含むフラスコを細胞培養フード中にセットし、懸濁した凝集物を15分間フラスコの底部に沈降させた。使用済みの培地を吸引し、およそ100mLをフラスコ中に残した。スピナーフラスコを前後に振盪して大型のクランプを壊した。心臓誘導培地を各フラスコに戻して加えて、3～7日目に対するオリジナル体積に戻し、8、10、12日目の代わりに心臓維持培地を交換した。毎回の培地の交換の後に、フラスコを7%CO₂インキュベーター内部の攪拌プラットフォームに戻し、攪拌器を50 $\pm$ 1RPMで作動開始させた（気体を移動させるために2回めいっぱいまわして両方のサイドキャップを緩めた）。

【0205】

14日目に収集時のフラスコ1本あたり全細胞を計数し、収集時のcTNTまたはRFP純度により、細胞培養物を分析した。凝集物の計数を2日目および最終段階にも行い、凝集物の写真を撮影した。

【0206】

（実施例4）

Tフラスコ中懸濁凝集物によるiPS細胞の心筋細胞への誘導

iPS細胞またはhES細胞（iPS6.1細胞、iPS6.1-MRB細胞、もしくはH9-TGZ細胞のいずれか）を、通常継代される準備ができるまで、TeSR培地（Stem Cell Technologiesから）中Matrigel（商標）上に維持した。出発細胞をT-150フラスコ中で増殖させたが、他の培養の様式において秤量することができた。

【0207】

凝集物の形成に対して、最初の日（0日目）、超低接着（ULA）のT75またはT25フラスコを、供給線をマーキングすることによって準備した。供給線マーキング用の型板を、低接着フラスコの上部側面上の浮き上がった縁に対して配置し（図10A）、フラスコ上にマジック（アルコール耐性）インキで線を引いた（図10B）。次いで、フラスコにラベル付けした。

【0208】

一度に最高5本のT150フラスコの細胞を収集し、細胞を試験し、60～80%のコンフルエントであることが検証された。培地を吸引し、室温のTrypLE12mLを加えて37℃で7分間インキュベートした。一方、50mLコニカルチューブ1本を、10%FCSを有する12mL DMEM/F12を加えることによって各T150用に準備した。7分のインキュベーション後、フラスコを軽く叩いて残りの細胞を追い出し、準備

10

20

30

40

50

した50 mLチューブ中に細胞をピペティングした。次いで、細胞を、遠心分離器を用いて1200 rpm 5分間でペレットにし、細胞ペレットを乱さずに上清を吸引した。細胞ペレットを、実施例3に記載した通り、10 mL凝集形成培地中に再懸濁した。

【0209】

複数の細胞のチューブを、必要であれば、1本の250 mLコニカルチューブ中に合わせた（後の希釈を可能にする体積）。細胞を、SOP EQ-15にしたがってCEDEX HiRES細胞計数器を用いて計数し、次いで 1.0×10^6 細胞/mLに希釈した。15 mLの希釈した細胞ストック各々を、各ULA T75（またはULA T25 1本あたり5 mL）フラスコ中に分配した。

【0210】

フラスコ／プレートを7% CO₂ インキュベーター内部のロッカーのプラットフォーム上に配置して24 ± 4時間インキュベートした。ロッカーが十分にバランスが取れていることを確認されたい。ロッカーを、T75フラスコに対して7.5 ± 2 RPM、またはT25フラスコに対して15 ± 1 RPMで作動する攪拌器で開始させた。ロッカーのRPMを測定するために、時計またはタイマーを用いて時間を記録し、60秒における完全なサイクルの数を計数した。RPMの読みが指定の範囲内になるまで回転器の速度を調整し再測定した。フラスコを加え、または取り除くときは常に、再測定および再調節を適宜行った。

【0211】

翌日（1日目）、細胞を凝集物移行培地に供給し、図11Aに示す通り、フラスコを45°の角度で短い縁上に傾けることによって細胞を供給し、10分間、懸濁した凝集物をフラスコの底部の隅に沈降させた。パストゥールピペットをフラスコに引いた供給線まで下ろして使用済みの培地を吸引した（図11B）。損傷した表面に凝集物がくっつくことがあるので、ピペットでフラスコの低接着表面を引っ搔かないように注意を払わなければならない。フラスコを真っ逆さまにし、15 mL/T75（または5 mL/T25）フラスコを凝集移行培地に穏やかに加えた。

【0212】

フラスコ／プレートを7% CO₂ インキュベーター内部のロッカーのプラットフォーム上に配置して24 ± 4時間インキュベートした。ロッカーを、T75フラスコに対して7.5 ± 2 RPM、またはT25フラスコに対して15 ± 1 RPMで作動する攪拌器で開始させた。回転速度を上記に記載した通りに調整した。

【0213】

2日目、細胞を希釈し、T25またはT75フラスコに分配した。最初に、さらなるULA T25またはT75フラスコを、上記に記載した通り供給線をマークし、ラベル付けすることによって準備した。図11Aに示す通り、フラスコを45°の角度で短い縁上に傾けることによって細胞を供給し、10分間、懸濁した凝集物をフラスコの底部の隅に沈降させた。パストゥールピペットをフラスコ上に引いた供給線に下ろして使用済みの培地を吸引した（図11B）。フラスコを真っ逆さまにし、15 mL/T75（または5 mL/T25）フラスコに好適な体積の心臓誘導培地を穏やかに加えた（T75フラスコに対して30 mL、またはT25フラスコに対して10 mL）。細胞の大型のクラumpが形成した場合、再懸濁した凝集物を、200 μm滅菌メッシュフィルターを通して50 mLコニカルチューブ中にろ過した後処理加工してもよい。

【0214】

次いで、細胞を好適なサイズのフラスコに分配した。T25フラスコに接種する場合、完全に再懸濁した凝集物5 mLをT25フラスコ各6本に移した。目標は、250万個の細胞から形成された凝集物を各T25中に接種することである（すなわち、1 mLあたり50万細胞）。細胞の生存または凝集物の個数に対して修正してはならない。T75フラスコに接種する場合、完全に再懸濁した凝集物15 mLをT75フラスコ各2本に移した。目標は、細胞750万個から形成された凝集物を各T75中に接種することである（すなわち、1 mLあたり50万細胞）。細胞の生存または凝集物の個数に対して修正しては

ならない。

【0215】

フラスコ／プレートを7%CO₂インキュベーター内部のロッカープラットフォーム上に配置して24±4時間インキュベートした。ロッカーを、T75フラスコに対して7.5±2RPM、またはT25フラスコに対して15±1RPMで作動する攪拌器で開始させた。回転速度を上記に記載した通りに調整した。

【0216】

3～13日目、図11Aに示す通り、フラスコを45°の角度で短い縁上に傾けることによって細胞を準備し、10分間、懸濁した凝集物をフラスコの底部の隅に沈降させた。パストールピペットをフラスコ上に引いた供給線まで下ろして使用済みの培地を吸引した(図11B)。

10

【0217】

フラスコを真っ逆さまにし、以下に記載する培地を穏やかに加えた(T25フラスコ1本あたり培地5mL、またはT75フラスコ1本あたり培地15mL)：3、4、5、6、7日目：心臓誘導培地；8、10、12日目：心臓維持培地。

【0218】

フラスコ／プレートを7%CO₂インキュベーター内部のロッカーのプラットフォーム上に配置して24±4時間インキュベートした。ロッカーを、T75フラスコに対して7.5±2RPM、またはT25フラスコに対して15±1RPMで作動する攪拌器で開始した。回転速度を上記に記載した通りに調整した。

20

【0219】

細胞の培養を終了し、14日目に分析し、収集時のフラスコ1本あたりの全細胞数、cTNT純度(またはGFp純度)を収集時に分析した。凝集物を、2日目および収集時に計数し、画像化した。

【0220】

(実施例5)

凝集物の形成

iPS細胞をディスパーゼで処理し、次いでTrypLe(商標)(Invitrogen)とインキュベートして細胞を解離した。解離したiPS細胞を分割し、1:6希釈によって継代した。TrypLe(商標)の分割および継代を1回繰り返した。0.5×10⁶、1×10⁶、2×10⁶、および3×10⁶細胞/mlの4つの密度のiPS細胞を凝集物形成用に接種した(図12)。異なる開始の密度のこれらiPS細胞の凝集物形成および心臓誘導手順を、実施例4に記載したのと本質的に同じに行った。ステップ収率(すなわち凝集物中に組み入れられる細胞のパーセント値)、凝集物のサイズ、心臓細胞の収率を測定し、図13～17において検出する。異なる回転速度での凝集物の形成も以下の表2において比較した。

30

【0221】

【表 2 - 2】

表2. 凝集物形成および回転速度

	スピナー#1	スピナー#2	P 値
0 日目のスピナー速度	50 rpm	70 rpm	
試料数 ($50 \mu\text{m}^2$ と $1000 \mu\text{m}^2$ との間の面積を有するもの)	171	151	
平均面積 (μm^2)	235.32	137.44371	
STD 面積 (μm^2)	124.55897	94.20054	2.36234E-14

10

単細胞分割技術と組み合わせた、ROCK 阻害剤およびトリプシンを用いて H1 および iPS 細胞から凝集物を形成する本発明者らによる以前の実験は、単細胞を用いて懸濁培養物中に拍動性の心筋細胞を形成することが可能であるという原理の証明を示した。この情報により、iPS 細胞を用いた高スループットおよび高段階収量（すなわち凝集物中に組み入れられる細胞のパーセント値）での凝集物形成方法を開発する目標を有する実験の指定がもたらされた。以下の実験の目的は、ROCK 阻害剤である H1152 が、TrypLE で個別化された iPS 細胞を自己凝集させ、心臓分化培地中で心筋細胞を形成させることを示すことである。

20

【0222】

以下の源から重大な試薬を得た：DMEM および Glutamax は Gibco（#10567）から；ウシ胎児血清は Chemicon（#ES-009B）から；ヒト組換え HGF（hrHGF）およびヒト組換え塩基性 FGF は R&D systems（それぞれ 234-FSE および 294-HGN）から得た。ゲンタマイシンは Gibco（#15750）から得た。H1152 は Calbiochem（#55550）から得た。

30

【0223】

本実施例に記載する第 1 の実験（実験 1、図 18 を参照されたい）は、心筋細胞の分化に対する単細胞凝集物の形成の可能性を示すものであった。第 2 の実験（実験 2、図 19 を参照されたい）は、ディスパーゼで維持した細胞を用いた単細胞凝集物の可能性を示していた。心筋細胞の分化の条件を、実験 1 および 2 に対してそれぞれ表 3～4 および表 5～6 に要約する。

【0224】

【表 3】

表3. 実験1における心筋細胞の分化条件の要約

条件	解離試薬	ベッセル1 個あたりの 細胞数	ベッセル	注
静的	TrypLEトリプシン	18.5e6	T75	静的、NAB培養、15日目にアッセイ
動的	TrypLEトリプシン	18.5e6	T75	2時間後回転器上に配置、0日後CS培養した細胞、15日目にアッセイ

40

【0225】

【表 4】

表4. 実験1からの実験パラメーター

パラメーター	方法	時間点
細胞形態学	位相差顕微鏡 検査	1日目、3日目、および心臓プロセス終了時の15日目
細胞計数	Cedexによる細胞計数	心臓プロセス終了時
心筋細胞の分化	フローサイトメリー	心臓プロセス終了時

10

【0226】

【表 5】

表5. 実験2における心筋細胞の分化条件の要約

条件	解離試薬	ベッセル1 個あたりの 細胞数	ベッセル	注
3e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	1.5e6	T25	1日目静的、次いで攪拌
5e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	2.5e6	T25	1日目静的、次いで攪拌
7e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	3.75e6	T25	1日目静的、次いで攪拌
10e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	5e6	T25	1日目静的、次いで攪拌

20

【0227】

【表 6】

表6. 実験2からの実験パラメーター

パラメーター	方法	時間点
細胞形態学	位相差顕微鏡 検査	8日目、各供給前に凝集物も計数する
細胞計数	Cedexによる細胞計数	心臓プロセス終了時
心筋細胞の分化	フローサイトメリー	心臓プロセス終了時

30

実験1および2からの細胞形態学および凝集物の写真を、それぞれ図20～21に示す。1日後、凝集物形成培地において、iPS細胞の凝集は明らかに見ることができ、これらの凝集物はサイズにおいてより均一である傾向があり、次いで凝集物はディスパーゼ法を用いて形成した。図20～21に表すデータは、異なる接種密度にわたる、および単細胞として維持される細胞とディスパーゼで維持される細胞との間の一貫した凝集物の形成を示す。

40

【0228】

細胞を両方の実験に対してやはり計数し（表7～8）、細胞計数は、分化プロセスの終了時15日目にフラスコ1本あたりの細胞数を表していた。

【0229】

【表 7】

表7. 実験1からの細胞／凝集物の計数

	凝集物／T75フラスコ	細胞／凝集物	全細胞／T75フラスコ
かき混ぜた	739 ± 155	3112	2.3*10 ⁶
静的	4140 ± 945	1787	7.4*10 ⁶

【0 2 3 0】

10

【表 8】

表8. 実験2からの平均細胞計数

	フラスコ1本あたりの平均細胞計数 (単位:100万)
T25_3e5	0.112 ± 0.129
T25_5e5	0.343 ± 0.161
T25_7e5	0.587 ± 0.333
T25_10e5	0.951 ± 0.229

20

心筋細胞の分化もトロポニン T 染色を用いて分析した（表 9 ～ 10）。トロポニン T の結果は、分化プロセス終了時の 15 日目のフラスコ 1 本あたりの心筋細胞数を表していた。

【0 2 3 1】

【表 9】

表9. 実験1からの心筋細胞の分化

	15日目の トロポニンT+ のパーセント (複製1)	15日目の トロポニンT+ のパーセント (複製2)	15日目の MF20+ のパーセント (複製1)	15日目の MF20+ のパーセント (複製2)
静的	1.07	0.94	1.02	0.96
かき混ぜた	9.01	8.77	6.99	7.36

30

【0 2 3 2】

【表 10】

表10. 実験2からの心筋細胞の分化

	フラスコ1本あたりの平均細胞計数(単位:100万)	トロポニンT +の平均%	心筋細胞の 平均収量	iPS対CM の平均比率	cTnT細胞 ノリットル ×の平均数
T25_3e5	0.112 ± 0.129	11.66 ± 1.86	11726 ± 12908	491 ± 639	1.95e6 ±2.15e6
T25_5e5	0.343 ± 0.161	11.87 ± 1.60	40227 ± 17737	75 ± 44	6.70e6 ±2.95e6
T25_7e5	0.587 ± 0.333	7.07 ± 0.74	40200 ± 19175	98 ± 47	6.69e6 ±3.19e6
T25_10e5	0.951 ± 0.229	5.53 ± 0.33	52723 ± 14268	99 ± 25	8.78e6 ±2.37e6

10

本実施例において示す実験は、心筋細胞の分化における単細胞凝集物の形成の可能性を実証するものであった。単細胞を用いることは、細胞接種密度のさらなる最適化を可能にする分化システムに入れる細胞数の容易な定量化、および分化プロセスにわたるいっそうの制御を可能にする。実験からのデータは、心筋細胞の収量が、ディスパーゼ法からのデータと等しく、またはそれを超えることを示している。H1 1 5 2およびT r y p L Eの使用により、凝集物を形成する拡張可能な高スループット方法を可能にする。

20

【0 2 3 3】

(実施例 6)

H 1 1 5 2 持続時間および凝集物形成

化合物H 1 1 5 2 は、個別化した多能性細胞が自己凝集するのを可能にすることが示されていた。本実施例の目的は、化合物での1日または2日処置の、心筋細胞の発生に対する効果を見ることであった。H 1 1 5 2 での開始の試験は、培地中に化合物を含んでいた：T e S R培地で1日目に1 μ Mおよび凝集物移行培地中の化合物で2日目に0. 5 μ M。1日間1 μ MだけH 1 1 5 2 化合物を含んでいた新方法を採用した後、開始の細胞の生存での効率の喪失があると思われ、拡大されたH 1 1 5 2 が心発生に負の影響を及ぼさずに細胞の生存を増大するか否かの、この試験における決定をもたらした。図2 2～2 3に示す通り2つの実験をデザインした。心筋細胞の分化条件および実験のパラメーターを、実験1および2に対してそれぞれ表1 1～1 2および表1 3～1 4に要約した。重要な試薬および材料は、先の実施例に記載した通りに入手した。

30

【0 2 3 4】

心筋細胞の分化における1 4日後の実験1からの最終結果(表1 5)。H 1 1 5 2 曝露の持続期間を4 8時間に延ばすと、各細胞密度の条件におけるc T n T収量を増大した。心筋細胞の分化における1 4日後の実験2からの最終結果(表1 6)。H 1 1 5 2 曝露の持続期間を4 8時間に延ばすと、3 e 5および5 e 5細胞/mLで最初に接種した培養物におけるc T n T収量を増大した。実験に対する凝集物の形成および心臓の分化の結果を図2 4 A～Jおよび図2 5～2 7に表した。

40

【0 2 3 5】

1 μ MのH 1 1 5 2 で2日処理すると、各実験における細胞の生存に著しい増大があった。1日処理と2日処理との間にc T n T陽性細胞の純度における違いがあり、これは細胞の生存、したがって細胞密度に相関する。本発明者らは、拡大したH 1 1 5 2 処理での純度における低減は、細胞密度全体の増大によるが、H 1 1 5 2 の心筋細胞に対する直接効果の可能性も依然としてあることに思いをめぐらしていた。化合物の2日処理による細胞生存における増大はc T n T純度における低減よりも著しく、大収量のc T n T陽性細胞のより大きな収量をもたらす。

【0 2 3 6】

50

様々な濃度のH1152の効果も、1日用量のH1152のIPS6.1細胞に対する細胞生存に対して試験した(図28)。このデータは、1 μ Mの濃度は凝集物形成に最適の濃度であったことを示唆していた。

【0237】

【表11】

表11. 実験1における心筋細胞の分化条件の要約

条件	解離試薬	ベッセル1 個あたりの 細胞数	ベッセル	注
3e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	1.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
5e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	2.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
7e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	3.75e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
10e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
15e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	7.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
3e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	1.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中のH1152、48 時間曝露 @ 1 μ M
5e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	2.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中のH1152、48 時間曝露 @ 1 μ M
7e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	3.75e6	T25	心臓形成培地および移行培地中のH1152、48 時間曝露 @ 1 μ M
10e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中のH1152、48 時間曝露 @ 1 μ M
15e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	7.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中のH1152、48 時間曝露 @ 1 μ M

【0238】

【表12】

表12. 実験1に対する実験パラメーター

パラメーター	方法	時間点
細胞形態学	位相差顕微鏡検査	14日目
細胞計数	Cedexによる細胞計数	心臓プロセス終了時
心筋細胞の分化	フローサイトメリー	心臓プロセス終了時

【0239】

【表 1 3】

表13. 実験2における心筋細胞の分化条件の要約

条件	解離試薬	ベッセル1 個あたりの 細胞数	ベッセル	注
3e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	1.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
5e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	2.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
10e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
15e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	7.5e6	T25	心臓形成培地のみ中のH1152、24時間曝露 @ 1 μ M
3e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	1.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中H1152、48時間曝露 @ 1 μ M
5e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	2.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中H1152、48時間曝露 @ 1 μ M
10e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中H1152、48時間曝露 @ 1 μ M
15e5 細胞/ml	TrypLEトリプシン	7.5e6	T25	心臓形成培地および移行培地中H1152、48時間曝露 @ 1 μ M

10

20

【 0 2 4 0】

【表 1 4】

表14. 実験2に対する実験パラメーター

パラメーター	方法	時間点
細胞計数	Cedexによる細胞計数	心臓プロセス終了時
心筋細胞の分化	フローサイトメトリー	心臓プロセス終了時

30

【 0 2 4 1】

【表 1 5】

表15. 実験1に対する結果の要約

密度 3.0	プラスコ1本あたりの平均細胞計数 (単位:100万)	トロポニンT +の平均%	心筋細胞の 平均収量	iPS対CM の平均比率	cTnT細胞/リッ トルの平均数(単 位:100万)
3e5_24 時間	0.25 ± 0.11	6.83 ± 0.26	17445 ± 7677	99 ± 45	2.91 ± 1.27
3e5_48 時間	1.39 ± 0.28	4.40 ± 1.00	59575 ± 1514	25 ± 1	9.92 ± 0.25
5e5_24 時間	0.46 ± 0.48	6.26 ± 3.40	18123 ± 10004	180 ± 119	3.02 ± 1.66
5e5_48 時間	3.41 ± 0.47	3.37 ± 1.12	117137 ± 48094	24 ± 11	19.52 ± 8.01
7e5_24 時間	0.77 ± 0.29	5.41 ± 1.58	39272 ± 5494	90 ± 12	6.54 ± 0.91
7e5_48 時間	3.19 ± 1.81	2.23 ± 0.28	70299 ± 40479	72 ± 58	11.71 ± 6.74
10e5_24 時間	1.95 ± 0.91	3.29 ± 2.73	51174 ± 22025	116 ± 66	8.53 ± 3.67
10e5_48 時間	4.69 ± 0.64	4.70 ± 1.08	224015 ± 71410	24 ± 9	37.33 ± 11.90
15e5_24 時間	4.01 ± 0.46	2.05 ± 0.89	80131 ± 31034	105 ± 43	13.35 ± 5.17
15e5_48 時間	6.16 ± 1.31	4.84 ± 1.61	299246 ± 127411	28 ± 10	49.87 ± 21.23

10

20

【 0 2 4 2】

【表 1 6】

表16. 実験1に対する結果の要約

密度 3.1	プラスコ1本あたりの平均細胞計数 (単位:100万)	トロポニンT +の平均%	心筋細胞の 平均収量	iPS対CM の平均比率	cTnT細胞/リッ トルの平均数 (単位:100万)
3e5_24 時間	0.57 ± 0.54	12.71 ± 1.72	66383 ± 54471	33 ± 20	11.06 ± 9.07
3e5_48 時間	2.52 ± 0.51	7.99 ± 2.24	208066 ± 94874	8 ± 4	34.67 ± 15.81
5e5_24 時間	0.52 ± 0.35	9.98 ± 2.40	53055 ± 36109	67 ± 49	8.84 ± 6.01
5e5_48 時間	4.56 ± 0.48	5.20 ± 3.33	230454 ± 138874	14 ± 7	38.40 ± 23.14
10e5_24 時間	1.54 ± 0.63	5.42 ± 1.08	85129 ± 44092	72 ± 42	14.18 ± 7.34
10e5_48 時間	7.84 ± 1.14	1.40 ± 1.45	96206 ± 81824	77 ± 44	16.03 ± 13.63
15e5_24 時間	2.63 ± 0.14	6.48 ± 2.42	171264 ± 65034	48 ± 17	28.54 ± 10.83
15e5_48 時間	6.16 ± 1.31	2.36 ± 2.03	168815 ± 181030	97 ± 85	28.13 ± 30.17

30

40

(実施例 7)

心筋細胞の生成におけるHGF添加の効果の試験

もともとHGFは、調査から開発までのオリジナルの平板法の移行の前の「誘導因子」として培地中に含まれており、平板から懸濁凝集物に発展したプロトコールとして維持された。平板法において、以前の試験はHGFが有益であったことを示していた。経費削減およびプロセスの単純化によって動機づけられて、本発明者らは現在の懸濁凝集物法におけるHGFの必要性を再考した。本実施例は、結果的に誘導培地中のHGFの任意の役割

50

となる一連の実験を要約するものである。これには、HGFは測定可能な影響なしに取り除くことができるという結果をもたらした、両方の増殖因子の滴定実験が含まれ、これは大規模な定量の測定によって確認された。

【0243】

実施例4に記載したのと本質的に同じに、様々な開始の密度のこれらiPS細胞の凝集物形成および心臓誘発手順を行ったが、異なる濃度のヒトHGF (hHGF) およびFGFを凝集形成培地、凝集物移行培地、および心臓誘導培地に適用した点が異なった。実験デザインを表17～18に要約した。

【0244】

【表17】

10

表17. HGF実験の要約

実験	実験デザイン
iPS6.1 増殖因子滴定 #1	完全マトリックス: hbFGF {0, 25 ng/mL} x HGF {0, 5, 20, 50, 150 ng/mL}
iPS6.1 増殖因子滴定 #2	完全マトリックス: hbFGF {3, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/mL} x HGF {0, 20, 50 ng/mL}
iPS6.1 「4隅」	完全マトリックス: hbFGF {0, 25 ng/mL} x HGF {0, 50 ng/mL}
H9-TGZ 増殖因子滴定 #2	完全マトリックス: hbFGF {25, 50, 100, 150 ng/mL} X HGF {0, 20, 50} 注: 凝集物形成が劣るため、2日目に3本のフラスコをまとめ、1本で行った。
H9-TGZ 増殖因子滴定 #2 (繰返し)	完全マトリックス: hbFGF {25, 50, 100, 150 ng/mL} X HGF {0, 20, 50}
iPS-MRB 1L スピナー定量 #1	HGFありおよびなしの平行の1Lスピナーフラスコ
iPS-MRB 1L スピナー定量 #2	HGFありおよびなしの平行の1Lスピナーフラスコ
iPS-MRB 1L スピナー定量 #3	HGFありおよびなしの平行の1Lスピナーフラスコ

20

30

40

【0245】

【表 18】

表18. HGF実験の実験パラメーターの要約

パラメーター	方法	時間点
心筋細胞の純度	cTNT、GFP、またはRFPのフローサイトメリー	14日目
細胞収量	CEDEX	14日目

本実験は、FGFがCMの分化プロセスに必要とされて上首尾であることを明らかに示していた。FGFなしの条件には、生存する凝集物が実質的になく、測定できる心筋細胞がなかった（図29A～B）。一方、FGFありの条件は全て、HGF濃度に無関係に心筋細胞を産生した（図29A～B）。試験したHGF濃度の範囲にわたって、心筋細胞の収量またはiPS:CM比において一貫した傾向は存在しなかった。

【0246】

第1の実験の結果に基づき（図29A～Bを参照されたい）、第2のiPS6.1の増殖因子の滴定は、FGFおよびHGF両方に対してより低い用量範囲に着目していた（図30A～B）。非常に明らかな用量反応がFGFに対して観察され、非常に少量のFGFは凝集物の低い生存をもたらし、高用量は生存を有したが心発生を欠いていた。第1の実験とは異なり、特に最善の性能のFGF濃度の条件においてHGF濃度においてここに微妙な傾向が観察され、この場合HGF濃度が高いほど生産性が増大した。しかし、どんなことがあってもHGFを省略すると条件の失敗をもたらした（条件はHGFの存在下では他の点では成功であった）ことに留意するのが重要である。

【0247】

第2のiPS増殖因子の滴定と一致して、FGF0ng/mLおよび25ng/mL、ならびにHGF0ng/mLおよび50ng/mLの2×2マトリックスを試験するために、iPS6.1細胞で簡単な実験（表19）を設定した。その時点のiPS6.1細胞に対する現在の最良の実施に基づいてFGFおよびHGFの陽性濃度が選択され、これら陽性濃度は平板および懸濁液両方のプロセスにおいてH1細胞の心臓誘導に用いられる条件と同じであった。この実験により、プロセスに対するFGFの必要性を示す先の試験が確認された。しかし、本実験において、HGFをFGFと一緒に含むことにより、FGF単独での全体の培養効率対条件は低減した。

【0248】

【表 19】

表19. 「4隅」実験の要約。各入力は1本のT25フラスコを表す。

	ラベル	入力計数	収集計数	%cTNT+	CMの数	入力したiPS:CM 100万	CMs/L
HGF+FGF	iPS +/- 5c	2420930	7.10E+04	8.3	4473	541	0.89
	iPS +/- 5b	2420930	1.97E+05	11.7	23049	105	4.6
	iPS +/- 5a	2420930	3.93E+05	12.5	49125	49	9.6
HGF のみ	iPS +/- 6a	2420930	2.40E+04	1.5	380	6725	0.072
	iPS +/- 6b	2420930	0.00E+00	7	0	N/A	0
	iPS +/- 6c	2420930	6.00E+03	0	0	N/A	0
FGF のみ	iPS +/- 7c	2420930	1.67E+06	11.2	187468	13	37
	iPS +/- 7b	2420930	1.71E+06	11.9	203371	12	41
	iPS +/- 7a	2420930	1.73E+05	13.1	22663	107	4.5
GF なし	iPS +/- 8a	2420930	1.90E+04	6.8	1224	1978	0.24
	iPS +/- 8b	2420930	0.00E+00	2.1	0	N/A	0
	iPS +/- 8c	2420930	0.00E+00	0	0	N/A	0

iPS6.1の最適化が進行している間、別々の一連の実験を行ってH9-TGZ細胞に対する増殖因子の濃度を最適化した。開始の実験は、より高レベルのFGFがH9-TGZ細胞の効果的な心臓誘導に必要とされることを示していた。したがって、試験したF

G Fの範囲は、最近の i P S 6 . 1 実験におけるよりも高かった。この実験は、最適の心筋細胞の生成は、H 9 - T G Z 細胞を有する F G F 1 0 0 ~ 1 5 0 n g / m L を必要とすることを確認するものであった（図 3 1 A ~ C）。様々な H G F 濃度にわたるプロセス効率における傾向は観察されなかった。

【0249】

上記に記載した凝集物形成での論点により、H 9 - T G Z 増殖因子滴定実験を繰り返した。この繰返しにおいて、実験上の細胞の生存および拡大は過度に密な培養物をもたらした。最終の C M 純度を低減する可能性があった。しかし、培養の性能が全体的に劣るのにもかかわらず、F G F 低レベルでの性能における、通常の、および予想される低減は依然として識別可能であることに留意するのが重要である（図 3 2 A ~ C）。試験した H G F 濃度の範囲にわたって培養性能に観察できる傾向は存在せず、繰り返すと十分な F G F を有する「H G F なし」の条件はどれも心筋細胞を生成できなかった。

【0250】

これらの実験にわたるメタ分析を行って、本発明者らは誘導培地中に H G F を含めるあらゆる測定可能な利点を検出できるか否かを評価した。この分析は、5 0 n g / m L H G F ありおよびなしの対の条件に対して利用可能な実験全てを再調査したものである。対照の脚（l e g）（H G F を有する）が 1 % を超えて心筋細胞を生成できなかった条件は除外した。これにより、1 4 対の条件（実験内では 1 1 を 3 回行った）が残った。この分析を助けるために、原料費モデルのプロセスを用いて、各条件下の心筋細胞 1 0 0 万個あたりの費用を見積もった。このモデルは、その時点（2 0 0 9 年 6 月 1 日頃）で利用できる最新の原料費用およびプロセス情報を用いた。この分析を表 2 0 および 2 1 に要約する。データは、平均して、本発明者らの心筋細胞生成プロセスにおいて測定できる H G F の正または負の効果（すなわち、実験上のノイズを超える効果）は存在しないことを示唆している。

【0251】

【表 20】

表20. HGF対HGFなしの比較の要約

実験	純度>1%の 全体の頭対頭 の対形成	より良好なCM/L を有する割合 @0を超える 50ng/mL HGF	より良好なiPS:CM比 を有する割合@ 0を超える 50ng/mL HGF	より良好な\$/CM を有する割合 @0を超える 50ng/mL HGF
第1のiPS GFマト リックス	4	3/4	3/4	3/4
第2のiPS GFマト リックス	4	2/4	2/4	0/4
第1のiPS4隅	1	0/1	0/1	0/1
H9-TGZ マトリックス #2	4	2/4	2/4	1/4
H9-TGZ マトリックス #2繰返し	1	0/1	0/1	0/1
合計	14	7/14	7/14	4/14

【0252】

【表 2 1】

表21. HGF対HGFなしの対の比較の統計分析。対応のあるt検定値を、各性能測定基準(CM/L、iPS:CM、\$/CM)に
対して示す。さらに、最良および最悪のケースのシナリオならびに平均値および標準偏差を示す。

	CM/L		iPS:CM		\$/CM	
HGF Conc (ng/mL)	0	50	0	50	0	50
対応のあるt検定に 対するp値	0.28		0.28		0.20	
最良	130	140	9	7	77	90
最悪	8	1.5	135	712	918	9000
平均	41	49	45	100	340	1186
StDev	37	50	43	189	292	2406

10

定量の測定を3回行って、HGFを除去しても測定できる効果がないことを、大規模に、かつiPS6.1-MRB細胞で確認した。これらの測定からの結果を表22に要約する。これらの測定において、測定#1だけが正常の測定とみなされ、細胞および心筋細胞全体の収率は測定2および3において変則的に低かった。測定1において、収量は、同じ独立のHGF条件と実質上同じであった。測定2および3において、依然として低いが高い収率が、HGFを有する培養物で、HGFを有さないものに比べて得られた。これより、本発明者らは、「正常の」測定において、HGF添加は効果がないが、最適以下の培養物においてHGFは培養の結果を改善することがあると結論付けた。

20

【0253】

【表 2 2】

表22. HGF除去した定量の測定

試行	純度 (% RFP+)		CM/L (100万)		iPS:CM比	
	+ HGF	- HGF	+ HGF	- HGF	+ HGF	- HGF
#1 (6/6/09)	6.6	7.3	48.9	51.5	10:1	10:1
#2 (6/10/09)	3.7	1.3	17.5	3.6	29:1	140:1
#3 (6/14/09)	2.6	2.2	10.0	5.1	50:1	98:1

30

要約すると、大規模なマトリックス実験においてiPS6.1およびH9-TGZ細胞を用いて、本発明者らは心筋細胞培養物の生産性に対するHGFの効果測定することができなかった。大規模なiPS6.1-MRB細胞での定量の測定において、本発明者らは、HGFは成果の劣る培養物を部分的に救済することがあるが、正常な、より高い収量の培養物における収量、純度、または効率に影響を及ぼさなかった証拠をいくつか認めた。これらの結果に基づくと、HGFは心臓誘導培地に対する製剤に必要なではない可能性がある。

40

【0254】

(実施例8)

多能性幹細胞の異なる系からの、および異なる幹細胞維持培地における培養後の心筋細胞の分化の最適化のための手順

異なる多能性幹細胞系を分化させる場合、高度の変動性が記録されている。これは、様々な組織（例えば、心筋細胞、血液、肝細胞、または神経細胞）を形成するPSCの「性

50

向」として、当技術分野において認められている。しかし、系間のこの性向は、各細胞系に対して同じ分化手順を用いて記録されている。PSCの異なる系統への分化は、発生段階によって、最終的に所望の表現型へ細胞を導く *in vitro* の条件を必要とする。典型的な分化の手順は、特異的な増殖因子の添加によるなど、特定の系統の発生を駆動する *in vivo* の環境を模倣しようとする培養条件を通常含んでいる。*in vitro* で分化させる場合、1) 細胞自体からの内因性の発現、2) 多能性幹細胞を培養し、および／または引き続き分化させる血清または培地、ならびに3) 外因性の増殖因子の添加、を含めた数々の源が増殖因子の環境に寄与する。増殖因子の内因性の発現に関して、これはクローン毎の変異性から、および細胞の初代培養における違いから生じることがある。所与の分化培養物中の増殖因子の環境に寄与する源は全て、最適の分化を実現するために、説明され、バランスが取れていなければならない。これは、1) ある種の経路における全体のシグナルを低減するためのアンタゴニストの添加、2) ある種の経路の全体のシグナルを増大するためのアゴニストの添加、または3) シグナルを最適化するためのアゴニストおよびまたはアンタゴニストの組合せを必要とすることがある。

10

【0255】

本実施例は、BMPおよびアクチビン／ノーダルを含めた突出したシグナル伝達経路を操作することによって、様々な初代培養条件下で増殖させた複数のPSC系またはクローンの心筋細胞系統への分化の可能性を最大にするための手順を記載するものである。この手順は、1) 数々の条件下、各細胞系の心発生の可能性をスクリーニングし、その後2) 個々のPSC系に対する分化のプロトコールをカスタマイズすることを含む。

20

【0256】

先の実施例に記載した製造手順は以下の通りであり、下記に詳述する通りに変更される。

【0257】

凝集物形成の間のあらゆる時点、好ましくは分化3日目に、典型的な分化培養培地（先の製造手順において概要した）に、a) さらなる増殖因子なし、b) 様々な濃度のBMP4単独。例えば、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、c) 様々な濃度のアクチビン単独。例えば、1 ng/ml、3 ng/ml、6 ng/ml、12 ng/ml、d) 様々な濃度のドルソモルフィン、e) 様々な濃度のSB-431542、f) 様々な組合せのBMP4およびアクチビンを含む、様々な組合せの増殖因子アゴニストおよびアンタゴニストを加えた。

30

【0258】

先の段落に略述した様々な条件を用いて、分化7日まで、培地を毎日交換した。

【0259】

分化7日後、先の実施例に記載した標準の製造手順を続けた。

【0260】

分化6、7、および8日目、各条件から少量の試料を収集して、心臓中胚葉に一致するマーカーの発現に対して、フローサイトメトリーによってモニタリングした（表23）。この情報を用いて、心臓系統に細胞を分化させる最適の培養条件を予想した。典型的に、30% KDR+/PDGFR- α 集団が、心臓中胚葉の上首尾の誘導に一致する。

40

【0261】

アッセイのエンドポイント時、典型的には分化14日に、培養物を収集し、心筋細胞のパーセント値に対して、心筋細胞の発生に一致するタンパク質の発現に基づいて分析した（表23）。さらに、細胞計数値の合計を決定した。

【0262】

例えば、図33A~Dは、様々な濃度のBMP（1 ng/mL、10 ng/mL）、ドルソモルフィン（2 μ M、0.2 μ M）、アクチビンA（1 ng/mL、10 ng/mL）、SB-431542（10 μ M、0.1 μ M）、およびアクチビンA（6 ng/mL）とBMP4（10 ng/mL）との組合せを利用した増殖因子／阻害剤のスクリーニングの結果を詳述したものである（分化3日目から7日目に様々な濃度の化合物を加えた）

50

。凝集物形成後14日目の細胞の分析（図33Cおよび33D）は、アクチビンAとBMP4との組合せを含む処理において、トロポニンT（CTNT）陽性細胞がより高濃度であったことを示している。CTNTの存在を、抗-CTNT抗体を用いてフローサイトメトリーによって決定した。このようなものとして、本実験の結果は、心筋細胞への分化のための幹細胞クローンiPS6.1MRBに最適化した培養条件は、アクチビンA（6 ng/mL）とBMP4（10 ng/mL）との組合せであることを明らかにしている。

【0263】

分化、および場合により心筋細胞の合計収量における、6、7、8、9、10日、および／またはより早い、もしくは遅い時間点からのマーカー分析（例えば、フローサイトメトリーを用いた）に基づき、最高の収量および／または純度（または所望の分化細胞型に最適の細胞培養物の増殖および／もしくは分化の別の尺度、例えば、細胞特異的な酵素もしくは受容体もしくは所望の細胞型に特異的な電気生理学的機能）を有する培養物が同定され、したがって利用される多能性幹細胞クローンの最適な分化をもたらす対応する培養条件は公知である。次いで、これらの培養条件を、製造手順の間に日常的に利用し、それによって同じ細胞系もしくはクローンからの多能性幹細胞を、同じ培養培地の組成と組み合わせることができ、または収量を増大するためのさらなる操作を調査することができる。

【0264】

【表23】

表23. 心臓中胚葉および心筋細胞の発生段階に関連する増殖因子およびマーカーの非限定的な例

心臓中胚葉を誘導する増殖因子の例	心臓中胚葉マーカーの例	増殖因子が特定する心筋細胞の例	心筋細胞マーカーの例
Wnt	KDR	BMP2	NKX2.5
アクチビンA/ノーダル	PDGFR-α	BMP4	TBX5
BMP2	CXCR4	BMP10	GATA4
BMP4	CKITneg	アクチビンA/ノーダル	Baf60c
BMP10	N-カドヘリン	bFGF	アルファ-MHC
bFGF	MESP1	EGF	CTNT
IGF		IGF	MLC2A
		(Wnt 阻害剤)	MLC2V
			MLC1V
			サルコメアのアルファ-アクチジン
			NPPA

略語および定義

PSC = 多能性幹細胞－胚性および人工多能性幹細胞。

BMP4 = 骨形成タンパク質－4；発生上のモルフォゲン。

アクチビン = アクチビンA（アクチビンおよびノーダルシグナル伝達はこの状況において交換可能に用いることができる）。発生上のモルフォゲン。

SB-431542 = TGFβ／アクチビン／ノーダルシグナル伝達経路の小分子阻害剤。

Dor = ドルソモルフィン。BMP経路の小分子阻害剤。化合物Cとしても知られている。

KDR = VEGFR－2としても知られている、キナーゼインサートドメイン受容体

PDGFR－α = 血小板由来増殖因子受容体－アルファ。

【0265】

本明細書に開示し、特許請求する方法は全て、本開示に鑑みて過度の実験なしに作製し、実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載してきたが、当業者であれば、変形が、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱せずに本明細書に記載する方法、および方法のステップまたは一続きのステップに適用することができるのは明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的両方に関連するある種の薬剤は、本明細書に記載する薬剤に置き換えることができ、同じまたは同様の結果が達成されることは明らかであろう。このような同様の置換および改変は全て、当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲によって規定される通り、本発明の精神、範囲、および概念の範囲内にあるとみなされる。

10

【0266】

参照

以下の参照は、本明細書に記載するものに対する補足の、例示の手続き上または他の詳細を提供する範囲まで、本明細書に参照によって特に組み入れられる。

【0267】

【化 1】

U.S. Appln. 61/058,858

U.S. Appln. 61/172,079

U.S. Appln. 61/184,546

U.S. Patent 5,030,015

U.S. Patent 5,478,838

U.S. Patent 5,843,780

U.S. Patent 6,099,832

10

U.S. Patent 6,200,806

U.S. Patent 6,280,718

U.S. Patent 6,602,711

U.S. Patent 6,833,269

U.S. Patent 6,833,269

U.S. Patent 7,029,913

U.S. Patent Publn. 2002/0086005

U.S. Patent Publn. 2002/0168766

20

U.S. Patent Publn. 2003/0022367

U.S. Patent Publn. 2003/0087919

U.S. Patent Publn. 2003/0125344

U.S. Patent Publn. 2003/0211603

U.S. Patent Publn. 2004/0002507

U.S. Patent Publn. 2004/0002508

U.S. Patent Publn. 2004/0014755

U.S. Patent Publn. 2005/0192304

30

U.S. Patent Publn. 2005/0209261

U.S. Patent Publn. 2007/0116680

U.S. Patent Publn. 2007/0238170

U.S. Patent Publn. 2008/0038820

U.S. Patent Publn. 2008/0171385.

【 0 2 6 8 】

【化 2】

U.S. Patent Publn. 2008/0226558

U.S. Patent Publn. 2008/0254003

U.S. Patent Publn. 2009/0047739

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. 10

Animal Cell Culture, Freshney (Ed.), 1987.

Byrne *et al.*, *Nature*, 450(7169):497-502, 2007.

Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular
Immunotherapy, Morstyn and Sheridan (Eds.), Cambridge University Press,
1996.

Chiu *et al.*, *Ann. Thorac. Surg.*, 60:12, 1995.

Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology,
1987 and 1995. 20

Doe *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 32:89-98, 2007.

Doevendans *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 32:839, 2000.

Dunn *et al.*, *Drugs*, 61:1957, 2001.

Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro*, 1993.

Evans *et al.*, *Nature*, 292:154, 1981.

Fernandes, *et al.*, *J. Biotechnology*, 132(2):227-236, 2007.

Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1993.

Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987. 30

Guide to Techniques in Mouse Development, 1993.

Harb *et al.*, *PLoS One*, 20;3(8):e3001, 2008.

Hematopoietic Stem Cell Therapy, Ball *et al.* (Eds.), Churchill Livingstone, 2000.

Igelmund *et al.*, *Pflugers Arch.*, 437:669, 1999.

In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997.

Ishizaki, *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 57:976-983, 2000.

Itskovitz-Eldor *et al.*, *Mol Med.*, 6(2):88-95, 2000.

Jainchill *et al.*, *J. Virol.*, 4:549, 1969. 40

Keller *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:862-869, 1995.

Klimanskaya *et al.*, *Lancet.*, 365:P1636-1641, 2005.

Kodama *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 112:89, 1982.

【 0 2 6 9 】

【化 3】

Li *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:1991, 1997.

Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.

Ludwig *et al.*, *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.

Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634B7638;1982.

Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634, 1981.

Marvin *et al.*, *Genes Dev.*, 15:316, 2001.

Murry *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 98:2209, 1996.

Nakajima *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52:319-324, 2003.

Nakano *et al.*, *Science*, 272, 722, 1996.

Narazaki *et al.*, *Circulation*, 118(5): 498-506, 2008.

PCT Appln. PCT/US04/42917

PCT Appln. WO 2001/088100

PCT Appln. WO 2001/51616

PCT Appln. WO 2003/004626

PCT Appln. WO 2002/076976

PCT Appln. WO 2003/059913

PCT Appln. WO 2003/062225

PCT Appln. WO 2003/062227

PCT Appln. WO 2004/039796

PCT Appln. WO 2005/080554

PCT Appln. WO 2005/123902

PCT Appln. WO 1998/30679

PCT Appln. WO 2002/44343

PCT Appln. WO 2003/050251

Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy, 1998.

Reinecke *et al.*, *Circ Res.*, 94:e56-e60, 2004.

Reinecke *et al.*, *Circulation*, 100:193, 1999.

Reubinoff *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 18:399-404, 2000.

Roach *et al.*, *Eur. Urol.*, 23(1):82-87, 1993.

Sasaki *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 93:225-232, 2002.

【 0 2 7 0 】

【化 4】

Scalia *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 82:610, 2001.

Schneider *et al.*, *Genes Dev.*, 15:304, 2001.

Smith, In: *Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000.

Takahashi and Yamanaka, *Cell*, 126(4):663-676, 2006.

Takahashi *et al.*, *Cell*, 126(4):663-76, 2007.

Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872, 2007.

10

Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. 1987.

Thomson and Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165, 1998.

Thomson and Odorico, *Trends Biotechnol.*, 18(2):53-57, 2000.

Thomson *et al.* *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*, 92:7844-7848, 1995.

Thomson *et al.*, *Science*, 282:114, 1998.

Vickers, In: *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 375-410, 1997

Watanabe *et al.*, *Nature Neurosci.*, 8:288-296, 2005.

20

Wobus *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 27:752, 1995,

Xu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001.

Ying *et al.*, *Cell*, 115:281-292, 2003.

Yu and Thompson, *Genes Dev.* 22(15):1987-97, 2008.

Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920, 2007.

Yu *et al.*, *Science*, 324(5928):797-801, 2009.

Zhang, *et al.*, *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.*, 23(1):82-86, 2009.

30

【図 1】

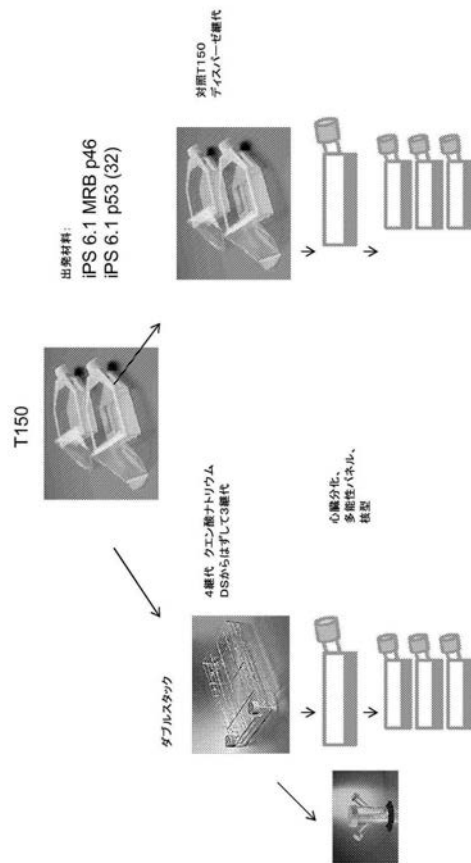


FIG. 1

【図 3】

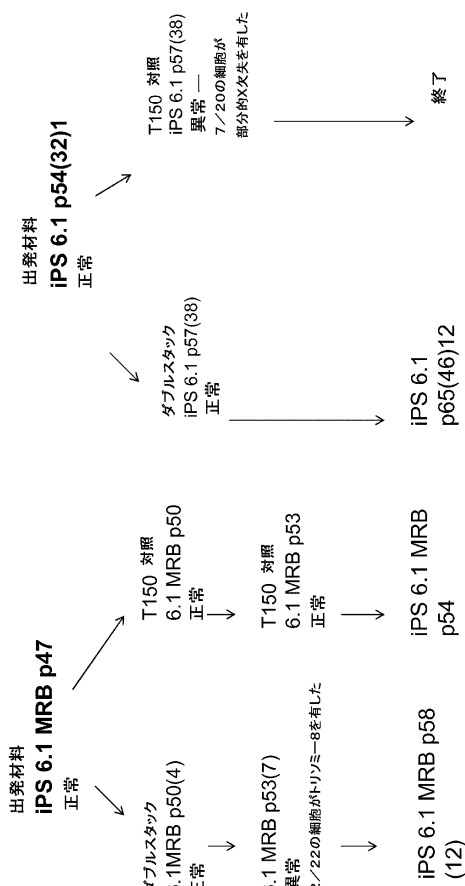
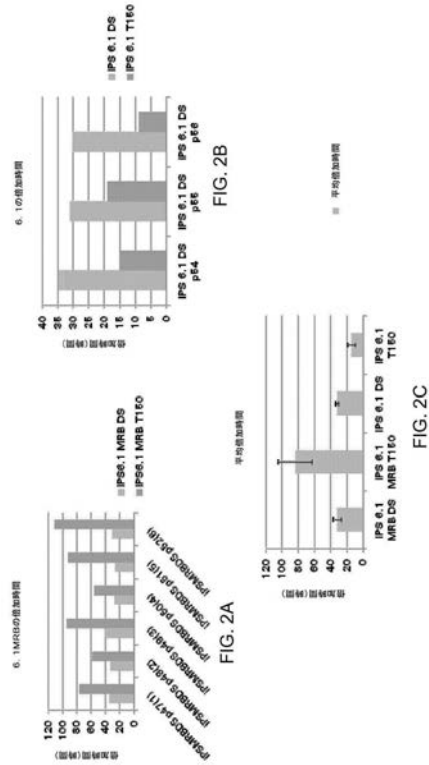
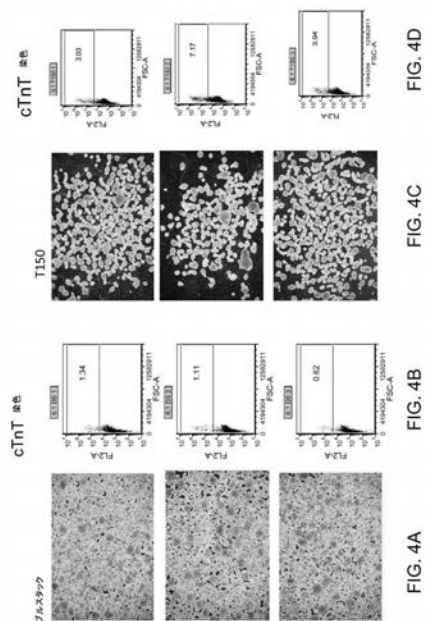


FIG. 3

【図 2】



【図 4】



【図 5】

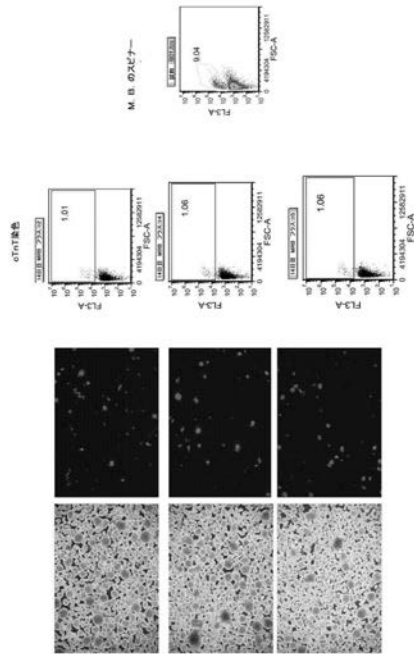


FIG. 5C

FIG. 5B

FIG. 5A

FIGs. 5A-C

【図 6】

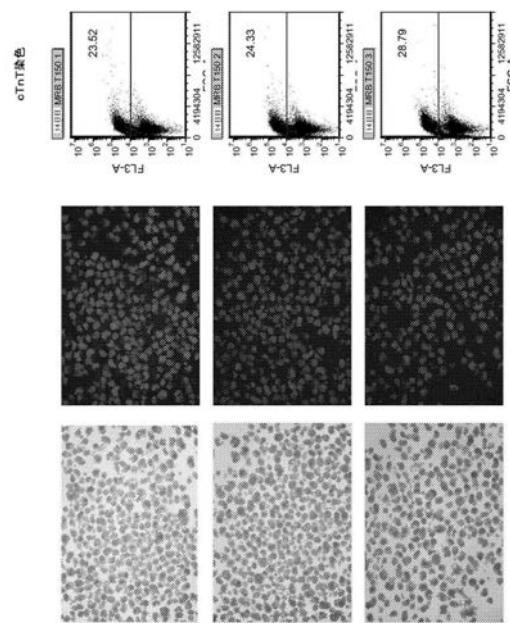


FIG. 6B

FIG. 6A

FIGs. 6A-B

【図 7】

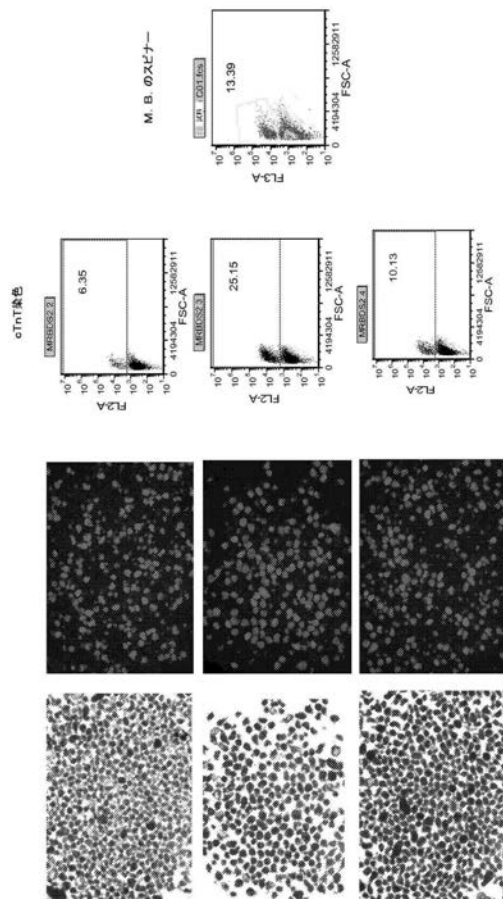


FIG. 7C

FIG. 7B

FIG. 7A

FIGs. 7A-C

【図 8】

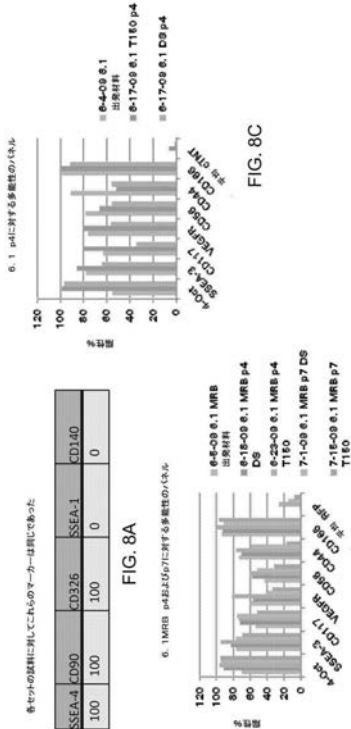


FIG. 8C

FIG. 8B

FIGs. 8A-C

【図 9】

プロトタイプ	試料id	細胞の量/ml	細胞の量/フラスコ	試験の成績	最終の細胞数(1E6)	%cTnT	収容 cTnT (1E6)	IPS:cTnT	cTnT/(1E6)	平均	標準偏差 (1E6)	CV
6.1 T150	A	1000000	5000000	5	0.41	2.7	0.011	452	2.2	5.2	2.7	0.523111
	B	1000000	5000000	5	0.62	6.1	0.037	133	7.5			
	C	1000000	5000000	5	0.86	3.4	0.029	171	5.9			
6.1 DS	A	1000000	2500000	5	2.7	1.1	0.029	85	3.3	2.2	0.667761	
	B	1000000	2500000	5	0.91	1.1	0.01	245	2			
	C	1000000	2500000	5	2.1	0.5	0.01	242	2.1			
6.1	A	1000000	2500000	5	4.4	22.1	1	3	195	177	15.9	0.08983
	B	1000000	2500000	5	3.6	22.6	0.82	3	165			
	C	1000000	2500000	5	3.1	27.3	0.85	3	171			
6/18/09 6.1 MRB DS	A	1000000	2500000	5	5.6	1.5	0.083	30	16.7	13.6	2.7	0.199071
	B	1000000	2500000	5	4.3	1.4	0.06	42	12			
	C	1000000	2500000	5	3.7	1.6	0.06	42	12			
7/1/09 6.1 MRB DS	A	1000000	2500000	5	9.7	6.7	0.65	4	139	126	20.7	0.165194
	B	1000000	2500000	5	2	25.8	0.52	5	103			
	C	1000000	2500000	5	6.8	10.6	0.72	3	144			
6.1 MRB T150 2回目	A	1000000	2500000	5	5.1	6.3	0.32	8	64	67.5	11.5	0.170117
	B	1000000	2500000	5	5.6	7.2	0.4	6	80			
	C	1000000	2500000	5	3.7	7.8	0.3	9	58			
6/18/09 MB スピナー	A	1000000	360000000	700	1200	9	108	3	154			
	B	1000000	450000000	900	730	11.8	86	5	96			
	C	1000000	500000000	1000	600	13.3	80	6	80			

FIG. 9

【図 10】

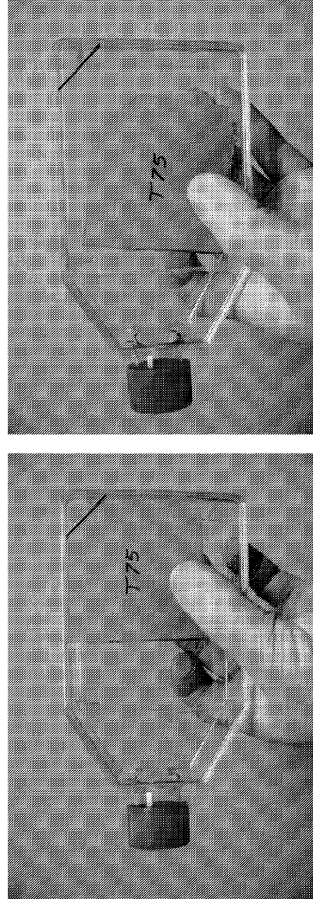


FIG. 10A

FIG. 10B

FIGs. 10A-B

【図 11】

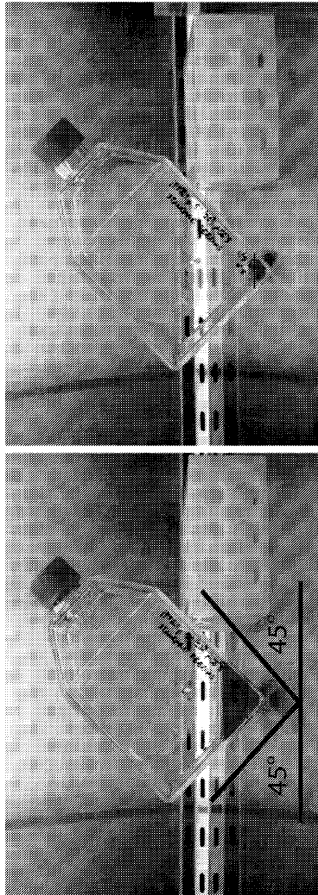


FIG. 11A

FIG. 11B

FIGs. 11A-B

【図 12】

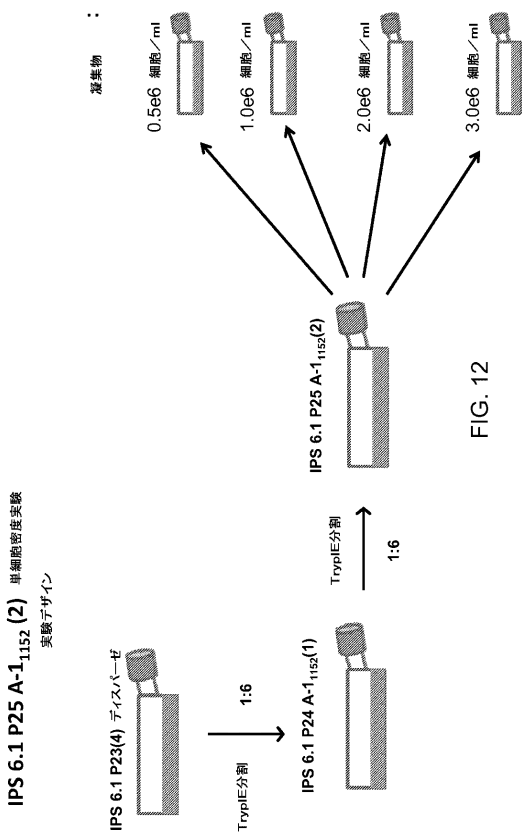
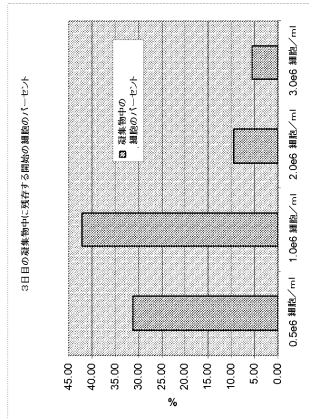


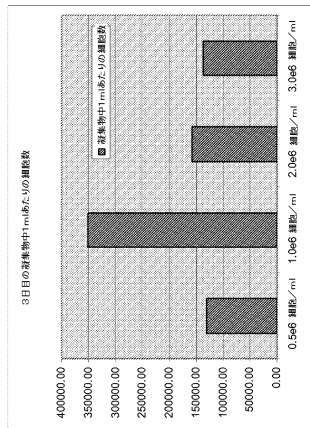
FIG. 12

【図 1 3】

FIG. 13B



FIGs. 13A



FIGs. 13A-B

【図 1 5】

FIG. 15A

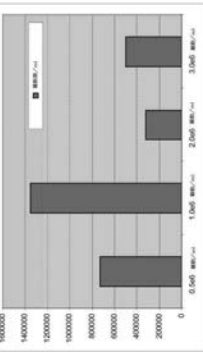


FIG. 15C

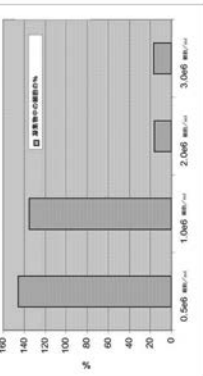
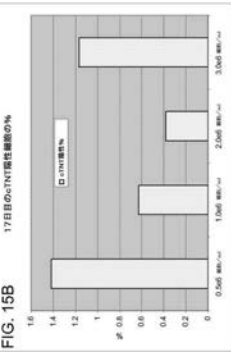


FIG. 15D

細胞濃度 (細胞/ml)	細胞の数の計算	αTNT + 細胞の収量	ES細胞TNT + 細胞の比率
0.5e6	2.5e6	62196	40:1
1.0e6	5e6	51030	98:1
2.0e6	10e6	7296	1370:1
3.0e6	15e6	35100	427:1

FIG. 15B



FIGs. 15A-D

【図 1 4】

FIG. 14C

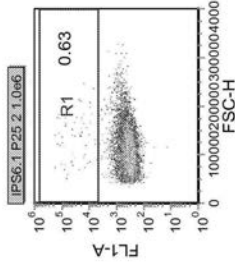


FIG. 14B

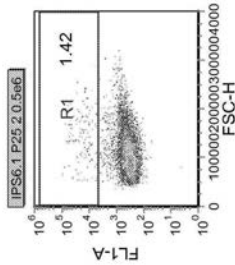


FIG. 14A

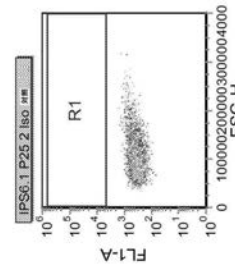


FIG. 14E

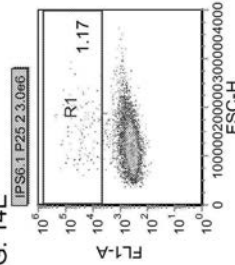
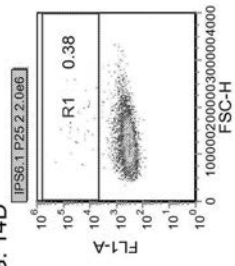


FIG. 14D



FIGs. 14A-E

【図 1 6】

FIG. 16B

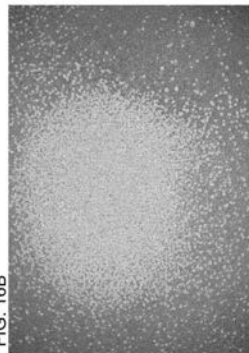


FIG. 16A

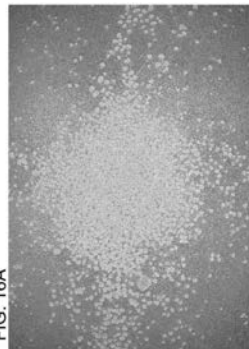
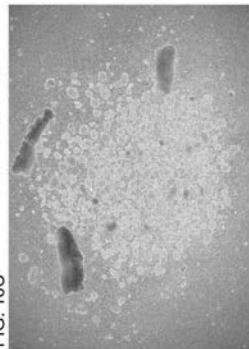
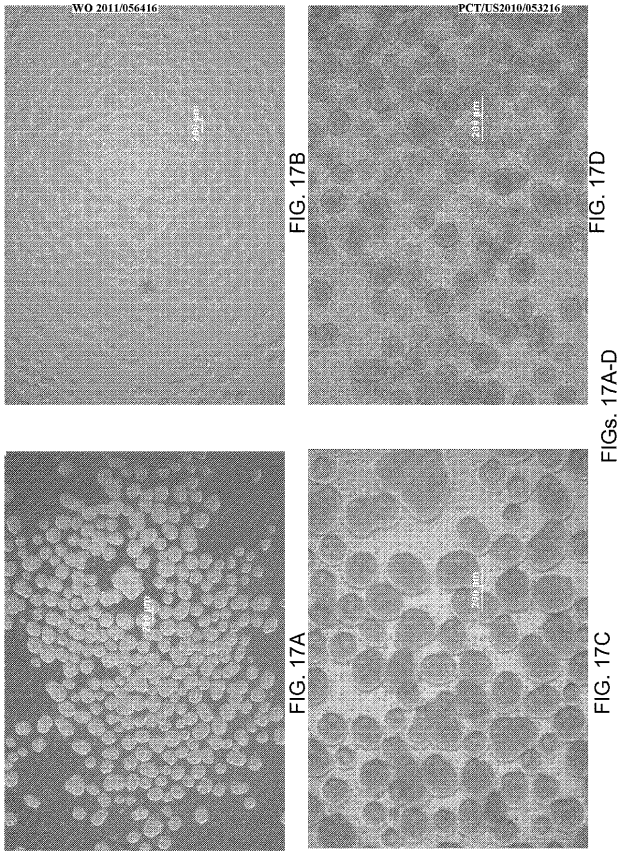


FIG. 16C



FIGs. 16A-C

【図 17】



【図 18】

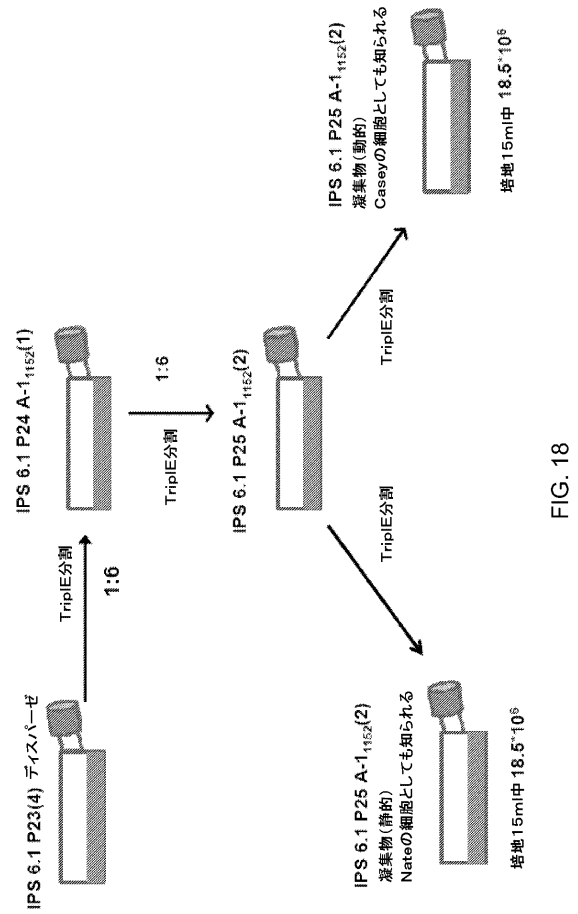


FIG. 18

【図 19】

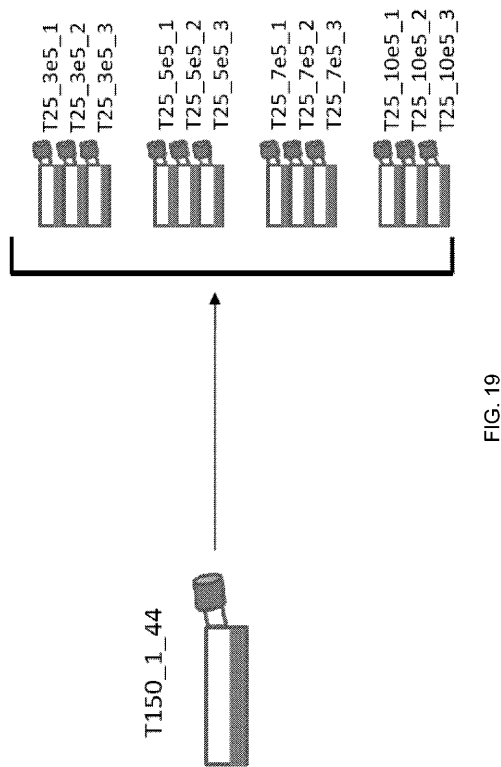


FIG. 19

【図 20】

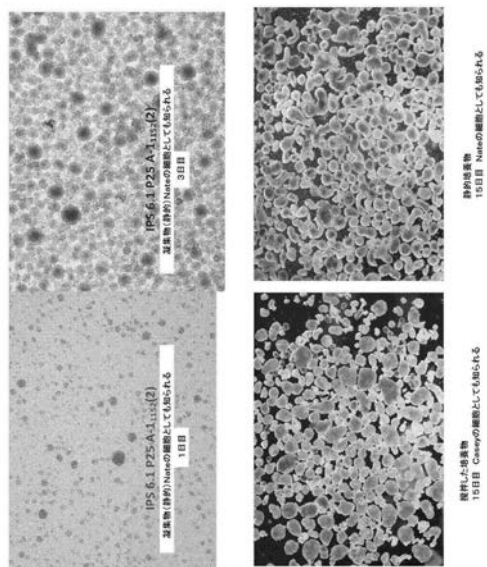


FIG. 20

【図 2 1】

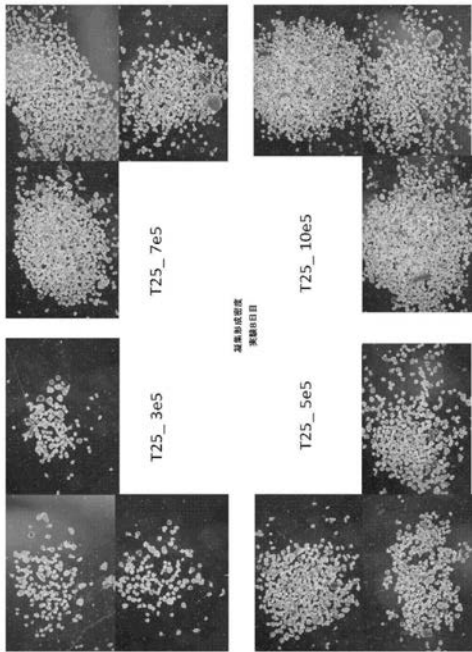


FIG. 21

【図 2 2】

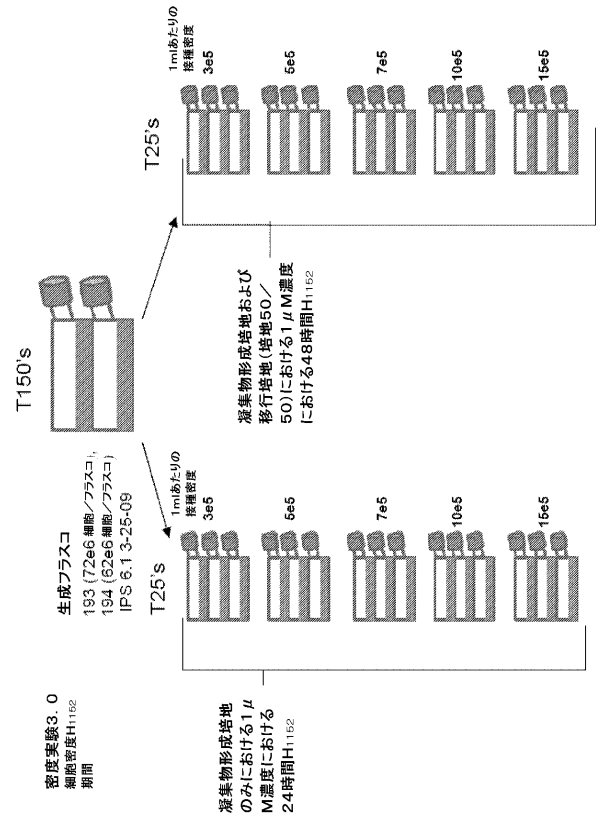


FIG. 22

【図 2 3】

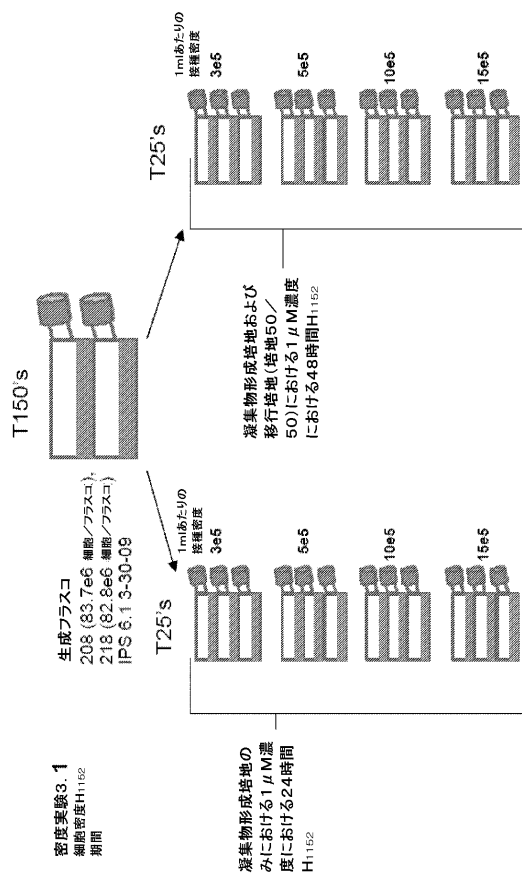
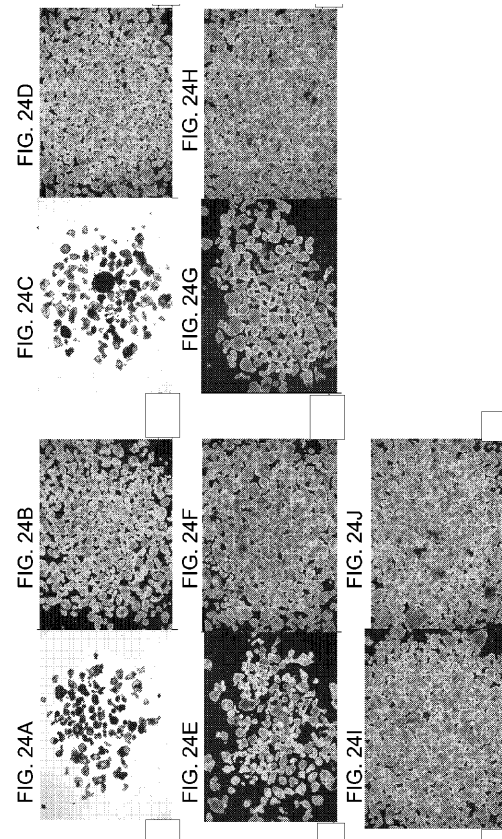


FIG. 23

【図 2 4】



FIGs. 24A-J

【図 25】

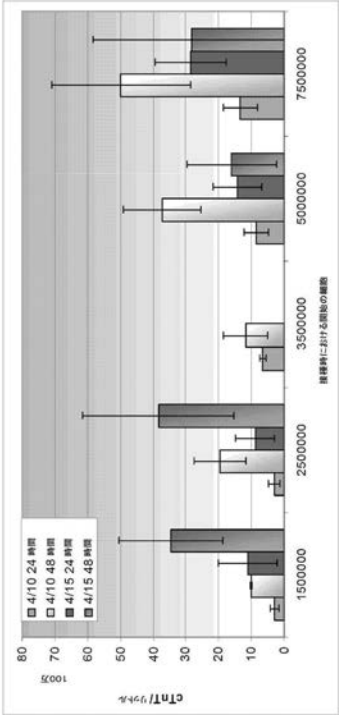


FIG. 25

【図 26】

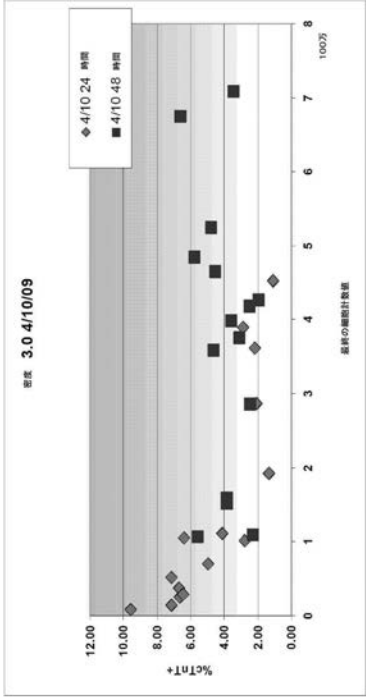


FIG. 26

【図 27】

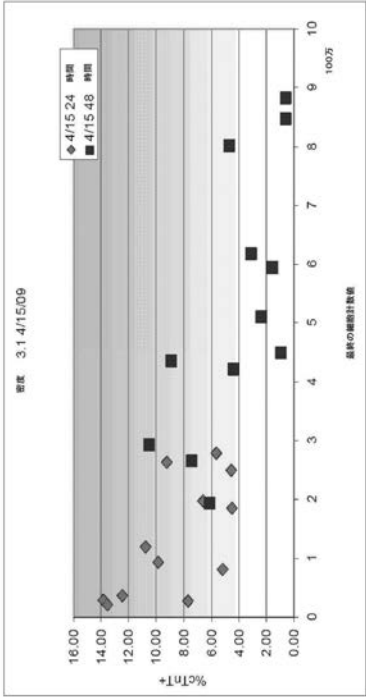


FIG. 27

【図 28】

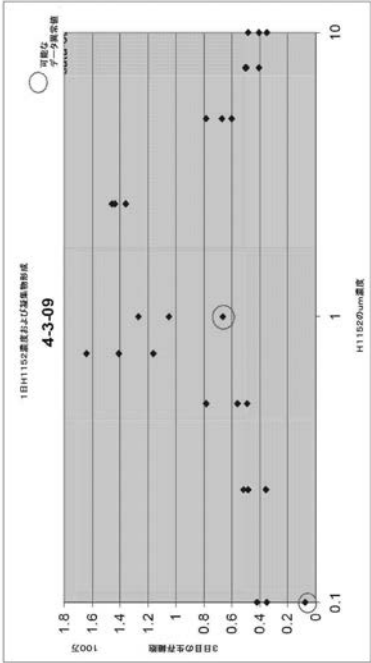
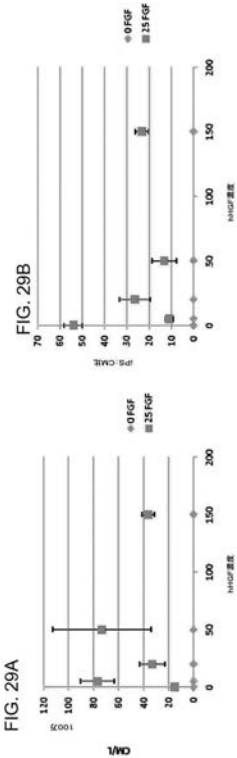


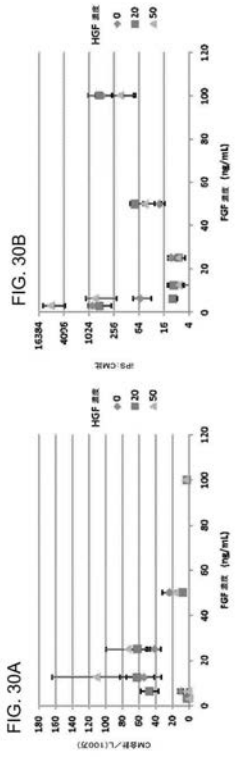
FIG. 28

【図 29】



FIGs. 29A-B

【図 30】



FIGs. 30A-B

【図 31 A】

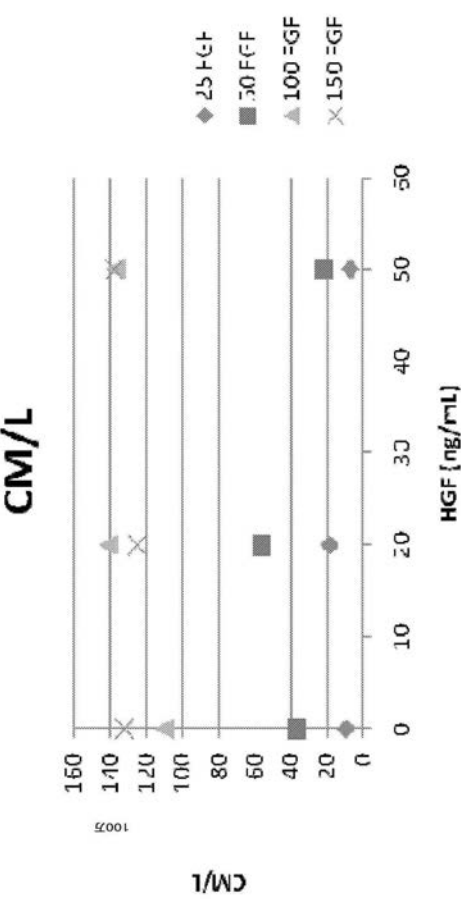


FIG. 31A

【図 31 B】

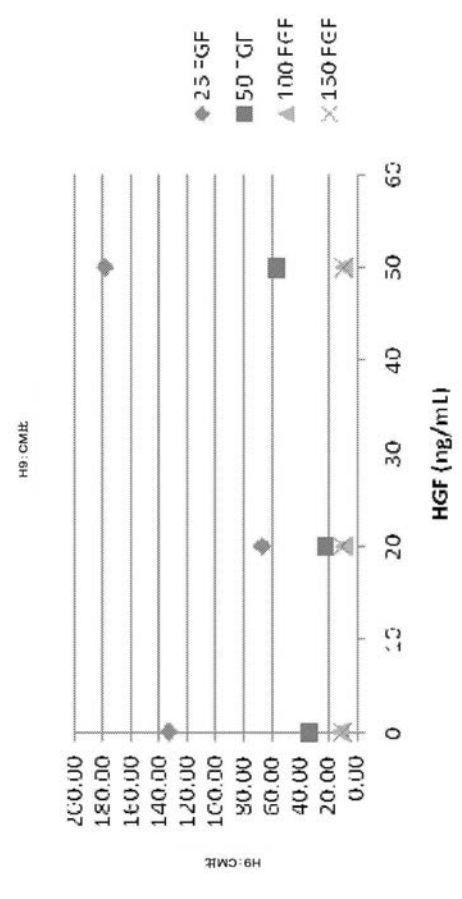


FIG. 31B

【図 3 1 C】

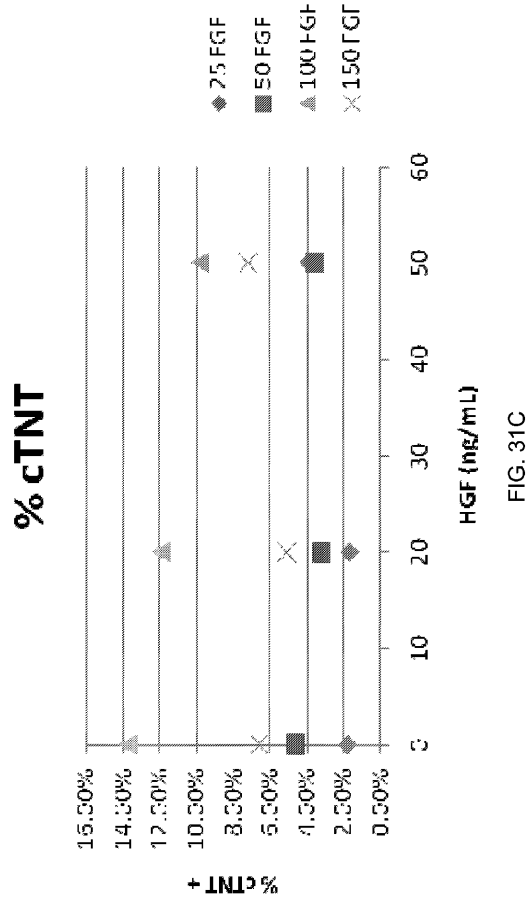


FIG. 31C

【図 3 2 A】

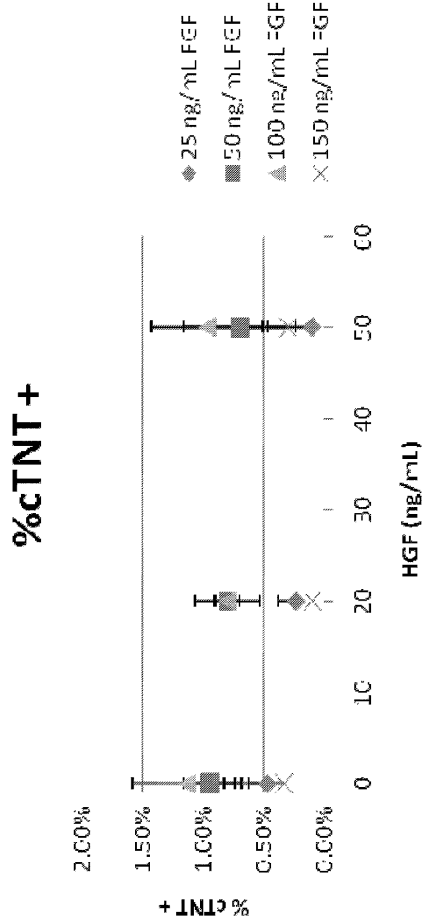


FIG. 32A

【図 3 2 B】

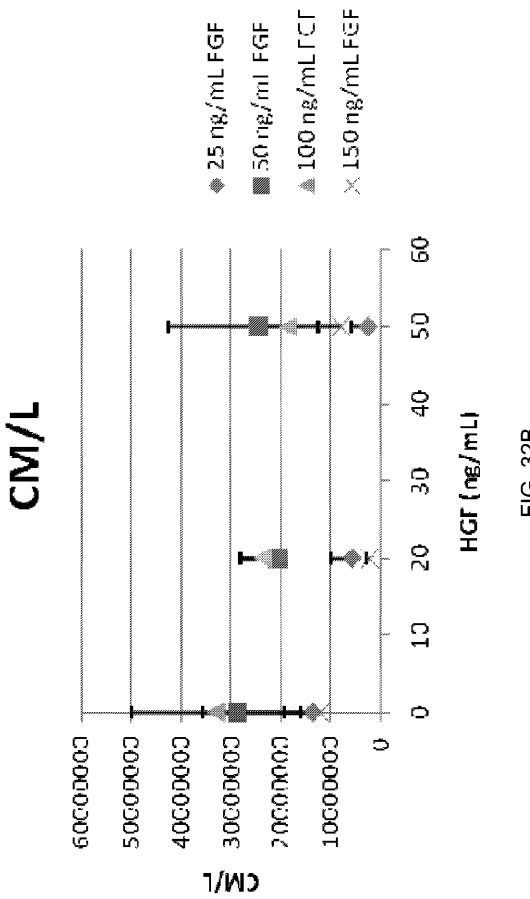


FIG. 32B

【図 3 2 C】

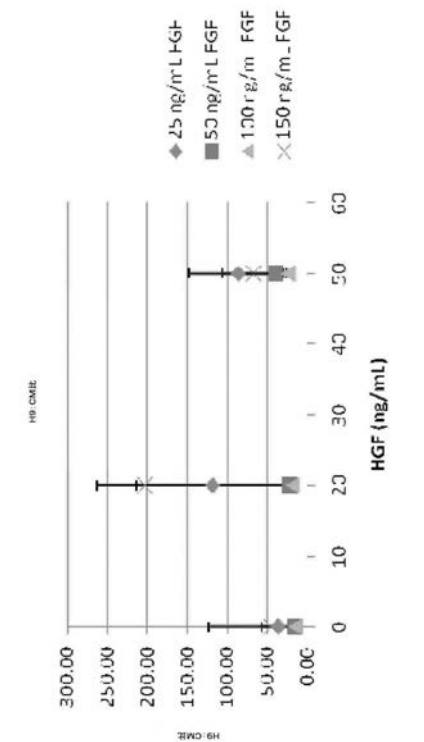
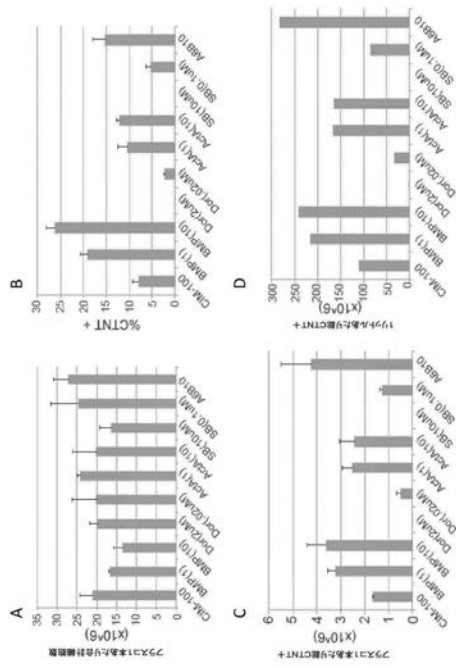


FIG. 32C

【図 3 3】



FIGS. 33A-D

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
- A 6 1 K 35/545 (2015.01)** A 6 1 K 35/545
A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00
- (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ケイシー スタンケウィクス
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドライブ 5 2 5
 , スイート 2 0 0, ユニバーシティー リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス イ
 ンターナショナル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 マット ライリー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドライブ 5 2 5
 , スイート 2 0 0, ユニバーシティー リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス イ
 ンターナショナル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ナサニール ビアーズリー
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドライブ 5 2 5
 , スイート 2 0 0, ユニバーシティー リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス イ
 ンターナショナル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ウェン ボ ワン
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドライブ 5 2 5
 , スイート 2 0 0, ユニバーシティー リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス イ
 ンターナショナル, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 スティーブン カットマン
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドライブ 5 2 5
 , スイート 2 0 0, ユニバーシティー リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス イ
 ンターナショナル, インコーポレイテッド 気付
- F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 BA30 BB19 BB40 CA44
 4C081 AB34 BA12 CD34 DA16
 4C087 AA01 AA02 BB63 NA20 ZA36

【外国語明細書】
2017104141000001.pdf