

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6450674号  
(P6450674)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| (51) Int.Cl.            | F 1           |
| C 12 N 5/0735 (2010.01) | C 12 N 5/0735 |
| C 12 N 5/074 (2010.01)  | C 12 N 5/074  |
| C 12 N 5/10 (2006.01)   | C 12 N 5/10   |
| C 12 N 5/071 (2010.01)  | C 12 N 5/071  |

請求項の数 24 (全 30 頁)

|               |                               |           |   |
|---------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2015-511622 (P2015-511622)  | (73) 特許権者 | 509087759<br>ヤンセン バイオテック, インコーポレーテッド<br>アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19044<br>ホーシヤム・リツジビュードライブ 80<br>O / 850 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年5月7日(2013.5.7)           | (74) 代理人  | 100092783<br>弁理士 小林 浩   |
| (65) 公表番号     | 特表2015-516161 (P2015-516161A) | (74) 代理人  | 100093676<br>弁理士 小林 純子  |
| (43) 公表日      | 平成27年6月11日(2015.6.11)         | (74) 代理人  | 100120134<br>弁理士 大森 規雄  |
| (86) 國際出願番号   | PCT/US2013/039940             | (74) 代理人  | 100190779<br>弁理士 神谷 昌男  |
| (87) 國際公開番号   | W02013/169769                 |           |   |
| (87) 國際公開日    | 平成25年11月14日(2013.11.14)       |           |   |
| 審査請求日         | 平成28年4月18日(2016.4.18)         |           |   |
| (31) 優先権主張番号  | 61/643,684                    |           |   |
| (32) 優先日      | 平成24年5月7日(2012.5.7)           |           |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                        |           |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト胚性幹細胞の肺臓の内胚葉への分化

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多能性幹細胞を胚体内胚葉細胞に分化させる方法であって、

a. 前記多能性幹細胞を、 $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、b. 前記多能性幹細胞を、Y 27632を追補した既知組成の培地またはY 27632を追補した調整培地中で48時間培養する工程と、

c. 前記多能性幹細胞を、胚体内胚葉細胞に分化させる工程とを含み、

前記工程 c が、

前記多能性幹細胞をアクチビンおよび血清を追補した培地中で培養する工程、

前記多能性幹細胞を酪酸ナトリウムおよびアクチビン A を追補した培地中で培養する工程、または

前記多能性幹細胞を GDF-8 および M CX 化合物を追補した培地中で培養する工程を含む、方法。

## 【請求項 2】

多能性幹細胞を胚体内胚葉細胞に分化させる方法であって、

a. 前記多能性幹細胞を、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、b. 前記多能性幹細胞を、Y 27632を補充した既知組成の培地またはY 27632

10

20

を補充した調整培地中で48時間培養する工程と、

c. 前記多能性幹細胞を、GDF8およびMCX化合物を追補した培地中で培養することによって胚体内胚葉細胞に分化させる工程と、  
を含む方法。

【請求項3】

胚体内胚葉細胞を得る方法であって、

多能性幹細胞を、GDF8および14-Prop-2-エン-1-イル-3,5,7,  
14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~  
8,12~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,2  
1,23-ノナエン-16-オンを追補した培地中で培養することによって胚体内胚葉細

胞に分化させる工程

を含み、

前記多能性幹細胞が、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ より高い密度で表面上に播種されており、Y27632を追補した既知組成の培地またはY27632を追補した調整培地中で分化前の48時間培養されている、方法。

【請求項4】

胚体内胚葉細胞を分化させる方法であって、

多能性幹細胞を胚体内胚葉細胞に分化させる工程と、

前記胚体内胚葉細胞を臍臍内胚葉細胞に分化させる工程と、  
を含む方法であり、

前記多能性幹細胞が、 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ~ $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種されて、Y27632を追補した既知組成の培地またはY27632を追補した調整培地中で分化前に48時間培養され、ならびに

前記多能性幹細胞を、

GDF-8およびMCX化合物；

GDF-8および14-Prop-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,2  
3,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘ  
プタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナ  
エン-16-オン；

アクチビンおよび血清；または

酪酸ナトリウムおよびアクチビンA

を追補した培地中で培養することによって、前記多能性幹細胞が胚体内胚葉細胞へと分化される、方法。

【請求項5】

胚体内胚葉細胞を分化させる方法であって、

前記胚体内胚葉細胞を $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ~ $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種する工程と、

前記胚体内胚葉細胞を臍臍内胚葉細胞に分化させる工程と、  
を含み、

前記胚体内胚葉細胞が、

GDF8およびMCX化合物；

GDF-8および14-Prop-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,2  
3,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘ  
プタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナ  
エン-16-オン；

アクチビンおよび血清；または

酪酸ナトリウムおよびアクチビンA

を追補した培地中で多能性幹細胞を培養することによって取得されたものである、方法。

【請求項6】

前記臍臍内胚葉細胞を臍臍内分泌細胞に分化させる工程をさらに含む、請求項4または

10

20

30

40

50

請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

臍臓内胚葉細胞を得る方法であって、

a. 多能性幹細胞を、 $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種する工程と、

b. 前記多能性幹細胞を、Y 2 7 6 3 2 を追補した既知組成の培地またはY 2 7 6 3 2 を追補した調整培地中で 48 時間培養する工程と、

c. 前記多能性幹細胞を、GDF8 および M CX 化合物 を追補した培地中で培養することによって胚体内胚葉細胞に分化させる工程と、

d. 前記胚体内胚葉細胞を、FGF7 を追補した培地中で培養することによって原腸管細胞に分化させる工程と、

e. 前記原腸管細胞を、SANT-1、アクチビン-A および LDN-193189 を追補した培地中で培養することによって前腸細胞に分化させる工程と、

f. 前記前腸細胞を、SANT-1、TPB、LDN-193189、SD-208 および N-{4-[2-エチル-1-(1H-1,2,4-トリアゾル-1-イル)ブチル]フェニル}-1,3-ベンゾチアゾール-2-アミン を追補した培地中で培養することによって、臍臓前腸前駆細胞に分化させる工程と、

g. 前記臍臓前腸前駆細胞を、LDN-193189、SD-208 および N-{4-[2-エチル-1-(1H-1,2,4-トリアゾル-1-イル)ブチル]フェニル}-1,3-ベンゾチアゾール-2-アミン を追補した培地中で培養することによって臍臓内胚葉細胞に分化させる工程とを含む、方法。

## 【請求項 8】

前記多能性幹細胞が、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種される、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記胚体内胚葉細胞を、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で播種する工程を更に含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記臍臓内胚葉細胞を臍臓内分泌腺細胞へと分化させる工程をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記多能性幹細胞が、Matrigel (商標) を含む表面上に播種される、請求項 1 ~ 4 および 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

胚体内胚葉細胞を分化させる方法であって、

a. 多能性幹細胞を、 $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で、第 1 の表面上に播種する工程と、

b. 前記多能性幹細胞を、Y 2 7 6 3 2 を追補した既知組成の培地またはY 2 7 6 3 2 を追補した調整培地中で 48 時間培養する工程と、

c. 前記多能性幹細胞を、GDF8 および M CX 化合物 を追補した培地中で胚体内胚葉細胞に分化させる工程と、

d. 前記胚体内胚葉細胞を、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で第 2 の表面上に播種する工程と、

e. 前記胚体内胚葉細胞を、臍臓内胚葉細胞に分化させる工程と、を含む方法。

## 【請求項 13】

前記 M CX 化合物 が、14-Prop-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナエン-16-オンである、請求項 1, 2, 4, 5, 7 または 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

前記第1の表面がMatrigel(商標)を含む、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記第2の表面がMatrigel(商標)を含む、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記第1および第2の表面が同じ表面である、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、請求項17に記載の方法。

10

## 【請求項 19】

前記胚体内胚葉細胞が、ヒトのものである、請求項1~6および12~16のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記臍臍内胚葉細胞が、ヒトのものである、請求項4~6および12~16のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記既知組成の培地がmTCSRである、請求項1~5、7および12のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記調整培地がMEF調整培地である、請求項1~5、7および12のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

前記胚体内胚葉細胞を臍臍内胚葉細胞に分化させる工程が、前記胚体内胚葉細胞をFGF-10およびレチノイン酸を用いて培養することを含む、請求項4、5または12に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記胚体内胚葉細胞を臍臍内胚葉細胞に分化させる工程が、前記胚体内胚葉細胞をノギンと共にEGF又はベータセルリンと組み合わせて培養することを含む、請求項4、5または12に記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年5月7日に出願された、米国特許仮出願シリアル番号61/643,684号の利益を主張するものであり、当該出願を参照により本明細書にその全容において、かつあらゆる目的について援用するものである。

## 【0002】

(発明の分野)

40

本発明は、細胞分化の分野にある。より具体的には、本発明は、臍臍の内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞及び臍臍の内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞のその後の有効な生成に有用な、ヒト多能性細胞及び/又は胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の播種密度の範囲を提供する。

## 【背景技術】

## 【0003】

I型糖尿病の細胞置換療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞即ち 細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、例えば、胚性幹細胞のような多能性幹細胞から機能性の 細胞を生成することがある。

50

## 【0004】

脊椎動物の胚発生において、多能性細胞は、原腸形成として公知のプロセスにて、3つの胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）を含む細胞のグループを生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓などの組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間段階は、胚体内胚葉の形成である。胚体内胚葉細胞は、H N F 3 、G A T A 4 、M I X L 1 、C X C R 4 、及びS O X 1 7などの多数のマーカーを発現する。

## 【0005】

原腸形成の終了までに、内胚葉は、内胚葉の前部、中間、及び後部の領域を特異的にマークする因子のパネルの発現によって認識することができる前部 - 後部ドメインに分割される。例えば、H h e x 及びS o x 2 は内胚葉の前領域を特定し、C d x 1 、2 及び4 は後半分を特定する。

10

## 【0006】

内胚葉組織の移行は、内胚葉を腸管の領域化に役立つ異なった中胚葉組織に近接させる。これは、例えば、F G F 、W n t 、T G F - B 、レチノイン酸（R A ）、及びB M P リガンド、並びにそれらのアンタゴニストのような多数の分泌された因子によって達成される。例えば、F G F 4 及びB M P は推定後腸内胚葉においてC d x 2 の発現を促進し、前方の遺伝子H h e x 及びS O X 2 の発現を阻害する（2 0 0 0 D e v e l o p m e n t , 1 2 7 : 1 5 6 3 ~ 1 5 6 7 ）。W N T シグナル伝達はまた、後腸の発達を促進し、前腸の運命を阻害するために、F G F シグナル伝達と平行して作用することが示されている（2 0 0 7 D e v e l o p m e n t , 1 3 4 : 2 2 0 7 ~ 2 2 1 7 ）。最後に、間葉によって分泌されるレチノイン酸は、前腸 - 後腸の境界を調節する（2 0 0 2 C u r r B i o l , 1 2 : 1 2 1 5 ~ 1 2 2 0 ）。

20

## 【0007】

特異的転写因子の発現レベルは、組織のアイデンティティを指定するために使用できる可能性がある。原腸管への胚体内胚葉の形質転換中に、腸管は、制限された遺伝子発現パターンにより分子レベルで観察することができる広いドメインに領域化される。例えば、腸管で領域化された膵臓ドメインは、P D X - 1 の非常に高い発現並びにC D X 2 及びS o x 2 の非常に低い発現を示す。同様に、F o x e 1 の高レベルの存在は、食道組織の指標である。肺組織において高度に発現されるのはN K X 2 . 1 である。S O X 2 / O d d 1 (O S R 1 ) は胃組織において高度に発現される。P R O X 1 / H h e x / A F P の発現は肝組織において高い。S O X 1 7 は胆管構造の組織で高度に発現される。P D X 1 、N K X 6 . 1 / P T f 1 a 、及びN K X 2 . 2 は膵臓組織において高度に発現される。C D X 2 の発現は、腸組織において高い。上記要約は、D e v D y n 2 0 0 9 , 2 3 8 : 2 9 ~ 4 2 及びA n n u R e v C e l l D e v B i o l 2 0 0 9 , 2 5 : 2 2 1 ~ 2 5 1 からの引用である。

30

## 【0008】

膵臓の形成は、膵臓内胚葉への胚体内胚葉の分化から生じる（2 0 0 9 A n n u R e v C e l l D e v B i o l , 2 5 : 2 2 1 ~ 2 5 1 ; 2 0 0 9 D e v D y n , 2 3 8 : 2 9 ~ 4 2 ）。背側と腹側の膵臓ドメインは、前腸上皮から生じる。また、前腸は、食道、気管、肺、甲状腺、胃、肝臓、膵臓、胆管系を生じさせる。

40

## 【0009】

膵臓内胚葉の細胞は膵臓 - 十二指腸ホメオボックス遺伝子P D X 1 を発現する。P D X 1 が存在しない場合、膵臓は、腹側芽及び背側芽の形成を越えて発達しない。したがって、P D X 1 の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を印している。成熟した膵臓は、他の細胞型の中でも、外分泌組織及び内分泌組織を含む。外分泌組織及び内分泌組織は、膵臓内胚葉の分化によって生じる。

## 【0010】

D ' A m o u u r らは、高濃度のアクチシン及び低血清の存在下でのヒト胚性幹（E S ）細胞由来の胚体内胚葉の濃縮培地の生産を記述している（N a t u r e B i o t e c

50

h n o l 2 0 0 5 , 2 3 : 1 5 3 4 ~ 1 5 4 1 ; 米国特許第 7 , 7 0 4 , 7 3 8 号)。マウスの腎臓被膜下でのこれらの細胞の移植は、内胚葉組織の特徴を有する、より成熟した細胞への分化をもたらした(米国特許第 7 , 7 0 4 , 7 3 8 号)。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、 F G F - 1 0 及びレチノイン酸の添加後、 P D X 1 陽性細胞に更に分化することができる(米国特許公開第 2 0 0 5 / 0 2 6 6 5 5 4 A 1 号)。免疫不全マウスの脂肪パッド中のこれら臍臓前駆細胞のその後の移植は、3~4ヶ月の成熟期の後に、機能的臍臓内分泌細胞の形成をもたらした(米国特許第 7 , 9 9 3 , 9 2 0 号及び米国特許第 7 , 5 3 4 , 6 0 8 号)。

【 0 0 1 1 】

F i s k らは、ヒト胚性幹細胞からの臍島細胞の產生のためのシステムを報告している(米国特許第 7 , 0 3 3 , 8 3 1 号)。この場合、分化経路は3つの段階に分割された。ヒト胚性幹細胞は、最初に、酪酸ナトリウムとアクチビン A との組み合わせを用いて内胚葉に分化された(米国特許第 7 , 3 2 6 , 5 7 2 号)。次に細胞をノギンなどの B M P アンタゴニストと共に、 E G F 又はベータセルリンと組み合わせて培養して、 P D X 1 陽性細胞を生成した。最終分化は、ニコチンアミドにより誘発された。

【 0 0 1 2 】

小分子阻害剤もまた、臍内分泌前駆細胞の誘導のために使用されている。例えば、 T G F - B 受容体及び B M P 受容体の小分子阻害剤( D e v e l o p m e n t 2 0 1 1 , 1 3 8 : 8 6 1 ~ 8 7 1 ; D i a b e t e s 2 0 1 1 , 6 0 : 2 3 9 ~ 2 4 7 )は、有意に臍内分泌細胞の数を増すために使用されている。加えて、小分子活性化剤もまた、胚体内胚葉細胞又は臍臓前駆細胞を生成するために使用されている( C u r r O p i n C e l l B i o l 2 0 0 9 , 2 1 : 7 2 7 ~ 7 3 2 ; N a t u r e C h e m B i o l 2 0 0 9 , 5 : 2 5 8 ~ 2 6 5 )。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 3 】

ヒト多能性幹細胞から臍臓細胞を生成するプロトコルの改善においては大きな発展がなされたが、 E S 細胞から臍臓細胞を生成する上でのこれらの効率においては、異なる群から報告される結果に大きなばらつきが存在する。このばらつきは、 E S 系における差、使用される試薬を含めるプロトコルの持続時間、及び懸濁培養に対しての接着性の選択などの因子に起因してきた。 E S 細胞を胚体内胚葉への分化に向かわせる上での効率は、細胞密度に対して非常に敏感ではないが、臍臓内胚葉を生成するための効率は、 E S 細胞の初期播種密度に大きく依存することを、我々はここで立証する。特に、  $0.8 \sim 2 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の範囲の初期細胞密度は、臍臓の内胚葉及び内分泌腺マーカーの最高の発現をもたらした。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

一実施形態では、本発明は、表面上に多能性幹細胞を播種する工程を含む多能性幹細胞を培養する方法に関し、この多能性幹細胞は、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で播種される。いくつかの実施形態では、培養される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、培養される多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞が播種される表面は、 M a t r i g e l (商標) を含む。

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、本発明は、多能性幹細胞を分化させる方法に関し、方法は、多能性幹細胞を、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種する工程と、多能性幹細胞を胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。いくつかの実施形態では、分化させる多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、分化させる多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞が播種される表面は、 M a t r i g e l (商標) 50

を含む。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。

#### 【0016】

一実施形態では、本発明は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関し、方法は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種された多能性幹細胞を分化させる工程を含む。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法で使用される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞を得る方法で使用される胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、Matrigel（商標）を含む表面上に播種される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。10

#### 【0017】

一実施形態では、本発明は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法を提供し、方法は、多能性幹細胞の分化効率を最大化するのに十分な播種密度で第1の表面上に播種された多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の臍臍内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化効率を最大化するのに十分な播種密度で、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を第2の表面上に播種することによって、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。本発明のいくつかの態様では、多能性幹細胞の胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞への分化効率を最大化するのに十分な播種密度は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ である。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の臍臍内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化効率を最大化するのに十分な播種密度は、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ である。20 いくつかの実施形態では、細胞を分化させる方法で使用される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの実施形態では、細胞を分化させる方法で使用される胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞が播種される第1の表面は、Matrigel（商標）を含む。本発明のいくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が播種される第2の表面は、Matrigel（商標）を含む。30 本発明のいくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。本発明のいくつかの実施形態では、臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。

#### 【0018】

一実施形態では、本発明は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臍内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる方法に関し、方法は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種された多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臍内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させるために使用される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。40 いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させるために使用される胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させるために使用される多能性幹細胞は、Matrigel（商標）を含む表面上に播種される。

#### 【0019】

一実施形態では、本発明は、臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関し、方法は、多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、この多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、この胚体内胚葉の指標50

であるマーカーを発現する細胞を表面上に播種する工程と、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を脇臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、脇臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法で使用される多能性幹細胞は、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化される工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、*Matrigel* (商標) を含む表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、*Matrigel* (商標) を含む表面上に播種される。10

#### 【0020】

一実施形態では、本発明は、脇臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関し、方法は、多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、この多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を脇臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、脇臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法で使用される多能性幹細胞は、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化される工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、*Matrigel* (商標) を含む表面上に播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、*Matrigel* (商標) を含む表面上に播種される。20

#### 【0021】

一実施形態では、本発明は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる工程に関し、方法は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、脇臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する胚芽に分化させる工程とを含む。本発明のいくつかの態様では、使用される細胞は、ヒトのものである。30

#### 【0022】

本発明は、 $0.8 \times 10^5$  多能性細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3 \times 10^5$  多能性細胞 /  $\text{cm}^2$  の段階的分化によってインピトロで得られた脇臓内胚葉系統の指標であるマーカーを発現する細胞の集団を提供する。40

#### 【0023】

本発明の一実施形態では、脇臓内分泌腺系統の指標であるマーカーを発現する細胞は、 $0.8 \times 10^5$  多能性細胞 /  $\text{cm}^2$  ~  $3 \times 10^5$  多能性細胞 /  $\text{cm}^2$  の段階的分化によって、インピトロで得られる。

#### 【0024】

本発明の一実施形態では、脇臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で表面上に播種された胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の段階的分化によって、インピトロで得られる。

#### 【0025】

50

本発明の一実施形態では、臍臓内分泌腺系統の指標であるマーカーを発現する細胞は、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ で表面上に播種された胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の段階的分化によって、インビトロで得られる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1A】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図1B】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図1C】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図1D】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図1E】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図1F】 $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1A)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4 (Y軸、DEのマーカー) 及びCD-9 (X軸、未分化ES細胞のマーカー) のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。

【図2A】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子: SOX7 (図2A)、NANOG (図2B)、OCT4 (図2C)、AFP (図2D)、SOX17 (図2E)、FOXA2 (図2F)、及びCXCR4 (図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2B】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子: SOX7 (図2A)、NANOG (図2B)、OCT4 (図2C)、AFP (図2D)、SOX17 (図2E)、FOXA2 (図2F)、及びCXCR4 (図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2C】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子: SOX7 (図2A)、NANOG (図2B)、OCT4 (図2C)、AFP (図2D)、SOX17 (図2E)、FOXA2 (図2F)、及びCXCR4 (図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2D】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子: SOX7 (図2A)、NANOG (図2B)

10

20

30

40

50

、OCT4(図2C)、AFP(図2D)、SOX17(図2E)、FOXA2(図2F)、及びCXCR4(図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2E】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子：SOX7(図2A)、NANOG(図2B)、OCT4(図2C)、AFP(図2D)、SOX17(図2E)、FOXA2(図2F)、及びCXCR4(図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2F】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子：SOX7(図2A)、NANOG(図2B)、OCT4(図2C)、AFP(図2D)、SOX17(図2E)、FOXA2(図2F)、及びCXCR4(図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図2G】実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化させるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子：SOX7(図2A)、NANOG(図2B)、OCT4(図2C)、AFP(図2D)、SOX17(図2E)、FOXA2(図2F)、及びCXCR4(図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図3A】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3B】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3C】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3D】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3E】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3F】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3G】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3H】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図3I】種々の細胞密度：0.3×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A)、0.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3B)、0.75×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3C)、0.9×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3D)、1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3E)、1.1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3F)、1.2×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3G)及び1.5×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3H)で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

10

20

30

40

50

、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3C)、 $0.9 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3D)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3E)、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3F)、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3G) 及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図3H) で播種されたDEの誘導前の培養物の位相差画像を示す。

【図4 A】ES細胞の種々の細胞密度： $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 A）、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 B）、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 C）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 D）、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 E）、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 F）及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4 G）で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4B】ES細胞の種々の細胞密度： $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4A）、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4B）、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4C）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4D）、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4E）、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4F）及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4G）で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4C】ES細胞の種々の細胞密度： $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4A）、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4B）、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4C）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4D）、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4E）、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4F）及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4G）で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4D】ES細胞の種々の細胞密度： $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4A）、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4B）、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4C）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4D）、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4E）、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4F）及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4G）で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4E】ES細胞の種々の細胞密度:  $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4A)、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4B)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4C)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4D)、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4E)、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4F) 及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4G) で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4F】ES細胞の種々の細胞密度： $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4A）、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4B）、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4C）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4D）、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4E）、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4F）及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図4G）で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図4 G】ES細胞の種々の細胞密度:  $0.3 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 A)、 $0.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 B)、 $0.75 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 C)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 D)、 $1.1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 E)、 $1.2 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 F) 及び $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図4 G)で初期に播種されたDEの4日間の培養物の位相差画像を示す。

【図5A】ES細胞の種々の細胞密度： $5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5A）、 $7.5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5B）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5C）、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5D）、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5E）及び $2.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5F）で初期に播種されたステージ5の培養物の位相差画像を示す。

【図5B】ES細胞の種々の細胞密度： $5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5A）、 $7.5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5B）、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5C）、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5D）、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5E）及び $2.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ （図5F）で初期に播種されたステージ5の培養物の位相差画像を示す。

【図5C】E S細胞の種々の細胞密度:  $5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5A)、 $7.5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5E) 及び $2.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$  (図5F)

F ) で初期に播種されたステージ 5 の培養物の位相差画像を示す。

【図 5 D】ES 細胞の種々の細胞密度 :  $5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 A)、 $7.5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 B)、 $1 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 C)、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 D)、 $1.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 E) 及び  $2.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 F) で初期に播種されたステージ 5 の培養物の位相差画像を示す。

【図 5 E】ES 細胞の種々の細胞密度 :  $5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 A)、 $7.5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 B)、 $1 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 C)、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 D)、 $1.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 E) 及び  $2.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 F) で初期に播種されたステージ 5 の培養物の位相差画像を示す。

【図 5 F】ES 細胞の種々の細胞密度 :  $5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 A)、 $7.5 \times 10^4$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 B)、 $1 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 C)、 $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 D)、 $1.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 E) 及び  $2.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  (図 5 F) で初期に播種されたステージ 5 の培養物の位相差画像を示す。

【図 6 A】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 B】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 C】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 D】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 E】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 F】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 G】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)、PDX-1 (図 6 C)、NKX6.1 (図 6 D)、NKX2.2 (図 6 E)、NGN3 (図 6 F)、NEUROD (図 6 G)、インスリン (図 6 H)、HNF4a (図 6 I)、及び PTF1a (図 6 J) の発現のリアルタイム PCR 分析から得たデータを示す。

【図 6 H】実施例 2 に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ 5 に分化させたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子 : ZIC1 (図 6 A)、CDX2 (図 6 B)

10

20

30

40

50

)、PDX-1(図6C)、NKX6.1(図6D)、NKX2.2(図6E)、NGN3(図6F)、NEUROD(図6G)、インスリン(図6H)、HNF4a(図6I)、及びPTF1a(図6J)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図6I】実施例2に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ5に分化させたヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子:ZIC1(図6A)、CDX2(図6B)、PDX-1(図6C)、NKX6.1(図6D)、NKX2.2(図6E)、NGN3(図6F)、NEUROD(図6G)、インスリン(図6H)、HNF4a(図6I)、及びPTF1a(図6J)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。

【図6J】実施例2に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ5に分化させたヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子:ZIC1(図6A)、CDX2(図6B)、PDX-1(図6C)、NKX6.1(図6D)、NKX2.2(図6E)、NGN3(図6F)、NEUROD(図6G)、インスリン(図6H)、HNF4a(図6I)、及びPTF1a(図6J)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。  
10

【発明を実施するための形態】

【0027】

開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、「発明を実施するための形態」を本発明の特定の特徴、実施形態、又は用途を、説明又は例示する下記の小項目に分割する。

【0028】

定義

20

幹細胞は、単一細胞レベルでの自己再生能及び分化能の両方によって定義される未分化細胞である。幹細胞は、自己再生前駆細胞、非再生性前駆細胞、及び最終分化細胞を含む子孫細胞を生成することができる。幹細胞はまた、複数の胚葉(内胚葉、中胚葉、及び外胚葉)から様々な細胞系統の機能性細胞へとインビトロで分化する能力を特徴とする。幹細胞は、移植後に複数の胚葉の組織を生じさせ、胚盤胞に注入後、実質的に(全てではないとしても)ほとんどの組織に寄与する。

【0029】

幹細胞は、発生能によって、(1)全胚及び胚体外細胞型を生じる能力を意味する全能性、(2)全胚細胞型を生じる能力を意味する多能性、(3)細胞系の小集合を生じるが、すべて特定の組織、器官、又は生理学的システム内で生じる能力を意味する複能性(例えば、造血幹細胞(HSC)は、HSC(自己再生)、血液細胞に限定された寡能性前駆細胞、並びに血液の通常の構成要素である全細胞型及び要素(例えば、血小板)を含む後代を産生できる)、(4)複能性幹細胞と比較して、より限定された細胞系統の小集合を生じる能力を意味する寡能性、並びに(5)1つの細胞系(例えば、精子形成幹細胞)を生じる能力を意味する単能性に分類される。  
30

【0030】

分化は、専門化されていない(「中立の」)又は比較的専門化されていない細胞が、例えば、神経細胞又は筋細胞などの専門化された細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した細胞又は分化誘導された細胞とは、細胞の系統内でより特化した(「拘束された」)位置にある細胞である。分化プロセスに適用された際の用語「拘束された」は、通常の環境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合への分化を続け、かつ通常の環境下で異なる細胞型に分化したり、又は低分化細胞型に戻ったりすることができない地点まで、分化経路において進行した細胞を指す。「脱分化」は、細胞が細胞系統内で比較的特殊化されて(又は拘束されて)いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用するとき、細胞系統は、細胞の遺伝、即ちその細胞がどの細胞から来たか、またどの細胞を生じ得るかを規定する。ある細胞の系統とは、所定の発生及び分化の遺伝体系内にその細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、未拘束の細胞の、対象とする系統への分化を評価するために使用することができる。  
40

【0031】

50

本明細書で使用するとき、「マーカー」とは、対象とする細胞で差異的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。これに関して、差異的発現とは、未分化細胞と比べて、陽性マーカーについては増大したレベルを意味し、陰性マーカーについては減少したレベルを意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出可能なレベルは、他の細胞と比較して対象とする細胞において充分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種の方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することが可能である。

【0032】

本明細書で使用するとき、細胞は、特異的マーカーが細胞内で検出されたとき、特異的マーカー「について陽性」又は「陽性」である。同様に、細胞は、特異的マーカーが細胞内で検出されないとき、特異的マーカー「について陰性」又は「陰性」である。

10

【0033】

本明細書で使用するとき、「細胞密度」及び「播種密度」は、本明細書では互換的に使用され、平面基材又は湾曲基材の単位面積あたりに播種される細胞の数を指す。

【0034】

本明細書で使用するとき、「ステージ1」及び「S1」は、胚体内胚葉（DE）に特徴的なマーカーを発現する細胞を同定するために互換的に使用される。

20

【0035】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を有する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する：HNF3、GATA4、SOX17、CXCR4、ケルベロス、OTX2、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMIXL1。

【0036】

本明細書で使用するとき、「腸管」は、以下のマーカーのうちの少なくとも一つを発現する胚体内胚葉に由来する細胞を指す：HNF3、HNF1、又はHNF4。腸管細胞は、肺、肝臓、脾臓、胃、腸などの全ての内胚葉臓器を生じさせ得る。

【0037】

本明細書で使用するとき、原腸管に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定する「ステージ2」及び「S2」は互換的に使用される。

30

【0038】

「前腸内胚葉」とは、食道、肺、胃、肝臓、脾臓、胆嚢、十二指腸の一部を生じさせる内胚葉細胞を指す。

【0039】

「後方前腸」は、後方胃、脾臓、肝臓、及び十二指腸の一部を生じさせることができる内胚葉細胞を指す。

【0040】

「中腸内胚葉」は、腸、十二指腸の一部、虫垂、及び上行結腸を生じさせることができるもの内胚葉細胞を指す。

【0041】

「後腸内胚葉」は、横行結腸の遠位3分の1、下行結腸、S状結腸、及び直腸を生じさせることができる内胚葉細胞を指す。

40

【0042】

「ステージ3」及び「S3」の双方は、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。「前腸系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX-1、FOXA2、CDX2、SOX2、及びHNF4。

【0043】

「ステージ4」及び「S4」は、脾臓前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「脾臓前腸前駆細胞系

50

統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX-1、NKX6.1、HNF6、FOXA2、PTF1a、Prox1、及びHNF4。

【0044】

本明細書で使用するとき、「ステージ5」及び「S5」は、膵臓内胚葉及び膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX1、NKX6.1、HNF1、PTF1、HNF6、HNF4、SOX9、HB9、又はPROX1。膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、CDX2又はSOX2を実質的に発現しない。

10

【0045】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌細胞」又は「膵臓ホルモン発現細胞」又は「膵内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」とは、以下のホルモンの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。

【0046】

「膵内分泌前駆細胞（precursor cell）」又は「膵内分泌前駆細胞（progenitor cell）」は、細胞を発現する膵臓ホルモンになり得る膵臓内胚葉細胞を指す。そのような細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現し得る：NGN3、NKX2.2、NeuroD、ISL-1、Pax4、Pax6、又はARX。

20

【0047】

本明細書では、「d1」、「d 1」、及び「1日目」、「d2」、「d 2」、及び「2日目」、「d3」、「d 3」及び「3日目」等は互換的に使用される。これらの数字の組み合わせは、本願の段階的分化プロトコル中の異なるステージにおけるインキュベーションの日を特定する。

【0048】

「グルコース」及び「D-グルコース」は、本明細書で互換的に使用され、天然に一般に見出される糖、デキストロースを指す。

30

【0049】

膵内分泌前駆細胞において発現されるタンパク質及びそれをコードする遺伝子を特定する「NeuroD」及び「NeuroD1」は、本明細書で互換的に使用される。

【0050】

「LDN」及び「LDN-193189」は本明細書で互換的に使用され、米国カリフオルニア州のStemgentから入手可能なBMP受容体を示す。

【0051】

多能性幹細胞の単離、増殖及び培養

多能性幹細胞は、段階特異的胚抗原（SSEA）3及び4、並びにTra-1-60及びTra-1-81と呼ばれる抗体によって検出可能なマーカーのうちの1つ以上を発現する（Thomsonら、1998, Science 282: 1145~1147）。インビトロでの多能性細胞の分化は、SSEA-4、Tra-1-60、及びTra-1-81の発現の消失をもたらす。未分化多能性幹細胞は、一般にアルカリホスファターゼ活性を有し、これは、製造業者（カリフォルニア州Vector Laboratories）により説明されているように、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、基質としてVector Redを使用して発色させることにより検出することができる。未分化の多能性幹細胞はまた、RT-PCRにより検出されるように、一般にOCT4及びTERTも発現する。

40

【0052】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、3つの胚葉のすべて、即ち、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉組織の細胞に分化する能力である。幹細胞の多能性は、例えば、細

50

胞を S C I D マウスに注入し、4 % パラホルムアルデヒドを使用して、形成された奇形腫を固定した後、それらを 3 つの胚葉からの細胞型の痕跡に関して組織学的に検査することにより確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を 3 つの胚葉に関連したマーカーの存在に関して評価することにより決定することができる。

#### 【 0 0 5 3 】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的な G バンド法を使用し、対応する靈長類種の発表されている核型と比較することで、核型を決定することができる。細胞は「正常な核型」を有することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体がすべて揃っておりかつ目立った変化のないことを意味する。多能性細胞は、様々なフィーダー層を用いて、又はマトリックスタンパク質被覆した容器を用いて、容易に培養で増殖させることができる。あるいは、m T e s r (登録商標) 1 培地 (カナダ、V a n c o u v e r の S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s ) のような既知組成の培地と組み合わせた化学的に既知組成の表面を、細胞のルーチン増殖に用いてもよい。多能性細胞は、酵素で、機械的に、又は E D T A (エチレンジアミン四酢酸) など様々なカルシウムキレート剤を用いて、培養プレートから容易に取り出すことができる。あるいは、多能性細胞は、マトリックスタンパク質又はフィーダー層の非存在下で、懸濁液中で増殖させてよい。

#### 【 0 0 5 4 】

##### 多能性幹細胞の供給源

使用が可能な多能性幹細胞の種類としては、妊娠期間中の任意の時期 (必ずしもではないが、通常は妊娠約 10 ~ 12 週よりも前) に採取した前胚性組織 (例えば、胚盤胞など)、胚性組織又は胎児組織などの、妊娠後に形成される組織に由来する多能性細胞の樹立株が含まれる。非限定的な例は、ヒト胚性幹細胞 (h E S C s) 又はヒト胚生殖細胞の樹立株であり、例えば、ヒト胚性幹細胞株 H 1、H 7、及び H 9 (米国ウィスコンシン州 M a d i s o n の W i C e l l R e s e a r c h I n s t i t u t e ) などである。フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。また、O C T 4、N A N O G、S o x 2、K L F 4、及び Z F P 4 2 など多数の多能性に関係する転写因子の強制発現を用いて、成体細胞から誘導することができる誘導性多能性細胞 (I P S) 又は再プログラム化された多能性細胞も好適である (A n n u R e v G e n o m i c s H u m G e n e t , 2 0 1 1 , 1 2 : 1 6 5 ~ 1 8 5 )。本発明の方法で使用されるヒト胚性幹細胞もまた、T hom s o n ら (米国特許第 5 , 8 4 3 , 7 8 0 号; S c i e n c e , 1 9 9 8 , 2 8 2 : 1 1 4 5 ~ 1 1 4 7 ; C u r r T o p D e v B i o l 1 9 9 8 , 3 8 : 1 3 3 ~ 1 6 5 ; P r o c N a t l A c a d S c i U . S . A . 1 9 9 5 , 9 2 : 7 8 4 4 ~ 7 8 4 8 ) によって記載されるように調製することができる。

#### 【 0 0 5 5 】

##### 多能性幹細胞からの、臍臍内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成

多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の更なる特徴は、継続して同定されている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの、即ち、A B C G 2 、c r i p t o 、F O X D 3 、C O N N E X I N 4 3 、C O N N E X I N 4 5 、O C T 4 、S O X 2 、N A N O G 、h T E R T 、U T F 1 、Z F P 4 2 、S S E A - 3 、S S E A - 4 、T r a 1 - 6 0 、T r a 1 - 8 1 の 1 つ以上の発現が挙げられる。

#### 【 0 0 5 6 】

本発明で用いるのに好適な多能性幹細胞としては、例えば、ヒト胚性幹細胞株 H 9 (N I H コード : W A 0 9 )、ヒト胚性幹細胞株 H 1 (N I H コード : W A 0 1 )、ヒト胚性幹細胞株 H 7 (N I H コード : W A 0 7 )、及びヒト胚性幹細胞株 S A 0 0 2 (C e l l a r t i s , S w e d e n ) が挙げられる。多能性細胞に特徴的な以下のマーカー、即ち、A B C G 2 、c r i p t o 、C D 9 、F O X D 3 、C O N N E X I N 4 3 、C O N N E X I N 4 5 、O C T 4 、S O X 2 、N A N O G 、h T E R T 、U T F 1 、Z F P 4 2 、S S E A - 3 、S S E A - 4 、T r a 1 - 6 0 、及び T r a 1 - 8 1 の少なくとも 1 つ

10

20

30

40

50

を発現する細胞も本発明で用いるのに好適である。

【0057】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーは、SOX17、GATA4、HNF3<sup>+</sup>、GSC、CER1、Nodal1、FGF8、短尾奇形、Mix様ホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、エオメソダーミン(EOMES)、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kitt、CD99、及びOTX2からなる群から選択される。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーの少なくとも1つを発現している細胞は本発明での使用に好適である。本発明の一態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。10

【0058】

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーは、PDX1、NKX6.1、HNF1<sup>+</sup>、PTF1<sup>+</sup>、HNF6、HNF4<sup>+</sup>、SOX9、HB9、及びPROX1からなる群から選択される。膵臓内胚葉系に特徴的なこれらのマーカーの少なくとも1つを発現する細胞が本発明における使用に適している。本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵臓内胚葉細胞であり、PDX-1及びNKX6.1の発現はCDX2及びSOX2の発現より実質的に高い。

【0059】

膵内分泌系に特徴的なマーカーは、NGN3、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、ARX、NKX2.2、及びPAX6からなる群から選択される。一実施形態では、膵内分泌細胞は、以下のホルモン、即ち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することができる。本発明で使用するに好適なものは、膵内分泌系の特徴を示すマーカーを少なくとも1つ発現する細胞である。本発明の一態様において、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であってよい。また、膵内分泌細胞は膵臓ホルモン分泌細胞であってよい。20

【0060】

本発明の一態様では、膵内分泌細胞は、細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞である。細胞系に特徴的なマーカーを発現する細胞は、PDX1と、以下の転写因子、即ち、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD、ISL1、HNF3<sup>+</sup>、MAFA、PAX4、及びPAX6のうちの少なくとも1つを発現する。本発明の一態様では、細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、細胞である。30

【0061】

本発明は、ヒト多能性幹細胞を培養する方法を詳述し、方法は、ヒト多能性幹細胞を、約0.8×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>～約3.0×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の密度で表面上に播種する工程を含む。本発明の一態様では、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明の一態様では、細胞が播種される表面は、Matrigel(商標)を含む。

【0062】

一態様では、本発明は、多能性幹細胞を分化させる方法に関する。この方法は、多能性幹細胞を、約0.8×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>～約3.0×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の密度で表面上に播種する工程と、次いでこの多能性細胞を胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程とを含む。本発明の一態様では、この多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明の一態様では、この胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明の一態様では、この細胞が播種される表面は、Matrigel(商標)を含む。40

【0063】

本発明は、約0.8×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>～約3.0×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の播種密度で表面上に播種されたヒト胚性多能性幹細胞を分化させることによって、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関する。本発明のいくつかの態様では、この細胞が播種される表面は、Matrigel(商標)を含む。50

## 【0064】

一態様では、本発明は、ヒト胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法に関し、方法は、多能性細胞の分化を最大化するのに十分な播種密度で第1の表面上に播種されたヒト胚性多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、分化効率を最大化するのに十分な播種密度で第2の表面上に播種された、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で播種される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種される。いくつかの態様では、ヒト胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法における多能性細胞の使用は、胚性幹細胞を使用する工程を含む。本発明のいくつかの態様では、胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞が播種される表面は、Matrigel（商標）を含む。10

## 【0065】

本発明は、多能性幹細胞の分化によって生成された胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる方法に関する。ここでは、多能性幹細胞は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種されている。本発明のいくつかの実施形態では、使用される多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの実施形態では、使用される胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、この細胞が播種される表面は、Matrigel（商標）を含む。20

## 【0066】

一態様では、本発明は、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関し、方法は、多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、この多能性幹細胞を胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。本発明のいくつかの態様では、この多能性幹細胞は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で播種される。本発明のいくつかの態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で播種される。本発明のいくつかの態様では、この多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、この胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、この細胞が播種される表面は、Matrigel（商標）を含む。30

## 【0067】

一態様では、本発明は、臍臓内分泌腺系統の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法に関し、方法は、多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、この多能性幹細胞を胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。本発明の一態様では、臍臓内分泌腺系統の指標であるマーカーを発現する細胞を得るために使用される多能性幹細胞は、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で播種される。本発明の一態様では、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で播種される。本発明のいくつかの態様では、この多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、この胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞である。本発明のいくつかの態様では、この細胞が播種される表面は、Matrigel（商標）を含む。40

## 【0068】

一態様では、本発明は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法に関し、方法は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約 $1.5 \times 1$ 50

$0^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、表面上に播種する工程と、次に、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現するこの細胞を、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む。本発明のいくつかの態様では、本方法で使用される胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現するこの細胞は、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現するヒトの細胞である。本発明のいくつかの態様では、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現するこの細胞は、ヒトのものである。

#### 【0069】

一態様では、本発明は、約  $1.5 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種された胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる工程と、次いでこの胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程とを含む方法に関する。いくつかの態様では、この胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。いくつかの態様では、この臍臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞は、ヒトのものである。

10

#### 【0070】

本発明は、臍臓の内胚葉及び内分泌腺系統に有効に分化し得るES細胞の範囲を記載する。

#### 【0071】

本発明の別の態様は、臍臓の内胚葉及び内分泌腺系統に有効に分化し得るDE細胞の範囲を記載する。

20

#### 【0072】

本明細書の全体を通じて引用した刊行物は、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。本発明を以下の実施例によって更に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0073】

##### (実施例1)

胚性幹細胞の播種密度は、胚体内胚葉マーカーの発現に大きく影響しない

この実施例は、ES細胞の初期播種密度が胚体内胚葉系統の細胞の生成に大きく影響を与えるかどうかを理解するために行った。

30

#### 【0074】

ヒト胚性幹細胞系H1(hESCH1)の細胞を、種々の継代(40継代~52継代)で採取し、10 μMのY27632(ROCK阻害剤、カタログ番号Y0503、米国ミズーリ州のSt. LouisのSigma Aldrich)を追補したmTeSR(登録商標)1培地(カナダのVancouverのStemCell Technologies)又は10 μMのY27632を追補したMEF-CM(調整培地)のいずれか中に、Matrigel(商標)をコーティングした皿上で、以下の密度で単一細胞として播種した:  $0.3 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $0.5 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $0.75 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $0.9 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $1 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $1.25 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $1.5 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、 $1.8 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 、及び $2 \times 10^5$ 細胞 /  $\text{cm}^2$ 。播種の48時間後に、培養物を不完全なPBS(Mg又はCaを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で約30秒間洗浄し、インキュベートした。培養物を、以下の通りに、胚体内胚葉(DE)系統に分化させた:

40

ステージ1(胚体内胚葉(DE)-4日):ステージ1の培地(2%の無脂肪酸BSA(カタログ番号68700、米国アイオワ州のAnkenyのProliant)、0.0012g / mLの重炭酸ナトリウム(カタログ番号S3187、Sigma Aldrich)、1X GlutaMax(商標)(カタログ番号35050-079、Invitrogen)、2.5mMのD-グルコース(カタログ番号G8769、Sigma Aldrich)、1:50000XITS-X(Invitrogen)、100ng / mLのGDF8(米国ミネソタ州のMinneapolisのR&D Systems)

50

及び $2.5\mu M$ のM C X化合物(G S K 3 B阻害剤、14 - Prop - 2 - エン - 1 - イル - 3 , 5 , 7 , 14 , 17 , 23 , 27 - ヘプタアザテトラシクロ[19 . 3 . 1 . 1 ~ 2 , 6 ~ . 1 ~ 8 , 12 ~ ]ヘプタコサ - 1 (25) , 2 (27) , 3 , 5 , 8 (26) , 9 , 11 , 21 , 23 - ノナエン - 16 - オン、米国特許出願公開第2010 - 0015711号、参照によりその全容が本明細書に援用される)を追捕したM C D B - 131培地(カタログ番号10372 - 019、In vitrogen(米国カリフォルニア州のCarlsbad))において、細胞を1日培養した。次いで、2%の無脂肪酸BSA、0 . 0 0 1 2 g / mLの重炭酸ナトリウム、1 X Glutamax(商標)、2 . 5 mMのD - グルコース、1 0 0 n g / mLのG D F 8、及び1 : 5 0 0 0 0 X T S - Xを追捕したM C D B - 131培地で細胞を更に3日培養した。 10

### 【0075】

D Eのステージの終わりに、試料を収集し、リアルタイムPCR及び蛍光活性化細胞選別(F A C S)により解析した。TrypLE Express(In vitrogenカタログ番号12604)内で、37にて3~5分間インキュベートすることによって、細胞h E S C誘導細胞を単一細胞懸濁液中に放出させ、その後、血球計算器を用いて、2回計測した。次いで、細胞を染色緩衝液(0 . 2 %のBSAを含有するPBS)(BD Biosciences、カタログ番号554657)中で2回洗浄した。表面マーカー染色については、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞を、100  $\mu L$ のブロッキング緩衝液(染色緩衝液中、1 : 4希釈した0 . 5 %のヒト - グロブリン)に再懸濁させた。直接抱合型一次抗体CD184APC(アロフィコシアニン、BD Biosciences、カタログ番号555976)、及びCD9PE(BD Biosciences、カタログ番号555372)を、1 : 20の最終希釈で細胞に加え、4で30分間インキュベートした。染色された細胞をBD染色緩衝液中で2回洗浄し、200  $\mu L$ の染色緩衝液に再懸濁させ、続いて、BD F A C S Cantoでの解析前の生細胞/死細胞の判別のために、15  $\mu L$ の7 A A D中でインキュベートした。 20

### 【0076】

総RNAを、R Neasy Miniキット(Qiagen カリフォルニア州、Valencia)で抽出し、High Capacity cDNA逆転写キット(Applied Biosystems、カリフォルニア州、Foster City)を使用して、製造業者の使用説明書に従って逆転写した。cDNAを、特注のTaqman Arrays(Applied Biosystems)に組み込み済みのTaqman Universal Master Mix及びTaqman Gene Expression Assaysを使用して増幅させた。Sequence Detectionソフトウェア(Applied Biosystems)を使用してデータを解析し、Ct法を用いて、未分化のヒト胚性幹(h E S)細胞に正規化した。全てのプライマーは、Applied Biosystemsから購入した。 30

### 【0077】

図1A~図1Fは、 $0 . 3 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1A)、 $0 . 75 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1B)、 $1 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1C)、 $1 . 5 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1D)、 $1 . 8 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1E)、及び $2 \times 10^5$ 細胞 /  $cm^2$ (図1F)で播種されたH1細胞についてのCXCR4(Y軸、D Eのマーカー)及びCD - 9(X軸、未分化E S細胞のマーカー)のF A C Sヒストグラム発現プロファイルを示す。CXCR4及びCD9のパーセント発現を表1に要約する。図1及び表1に示すように、CXCR4のアップレギュレーション及びCD9のダウンレギュレーションによって測定されたように、未分化のE S細胞の初期播種密度は、胚体内胚葉への後続の分化には大きく影響を与えたかった。 40

### 【0078】

## 【表1】

表I 胚体内胚葉マーカーCXCR4の発現に及ぼすES細胞の播種密度の影響

| ES細胞の播種密度<br>(細胞/cm <sup>2</sup> ) | DE 0日<br>細胞密度<br>(細胞/cm <sup>2</sup> ) | DE 4日<br>細胞密度<br>(細胞/cm <sup>2</sup> ) | % CXCR4 | % CD9 |
|------------------------------------|--|--|---------|-------|
| 0.5 × 10 <sup>4</sup>              | 1.1                                    | 2.6                                    | 93.3    | 4.9   |
| 0.75 × 10 <sup>4</sup>             | 1.25                                   | 2.8                                    | 93.1    | 5.6   |
| 1.0 × 10 <sup>5</sup>              | 2.23                                   | 3.95                                   | 93.1    | 5.3   |
| 1.5 × 10 <sup>5</sup>              | 2.87                                   | 3.75                                   | 90.9    | 6.5   |
| 1.8 × 10 <sup>5</sup>              | 2.58                                   | 4.4                                    | 93.1    | 4.7   |
| 2.0 × 10 <sup>5</sup>              | 2.8                                    | 5.2                                    | 92.2    | 6.1   |

10

## 【0079】

図2A～図2Gは、実施例1に概説される、種々の密度で播種され、その後DEに分化されるヒト胚性幹細胞系H1の細胞中の以下の遺伝子、即ち、SOX7(図2A)、NANOG(図2B)、OCT4(図2C)、AFP(図2D)、SOX17(図2E)、FOXA2(図2F)、及びCXCR4(図2G)の発現のリアルタイムPCR分析から得たデータを示す。FACSデータと一致して、Matrigel(商標)でコーティングされた表面上に種々の密度で播種されたH1細胞については、DEのステージで一般的に発現する遺伝子(CXCR4、SOX17、FOXA2)の間で有意差はなかった。更に、初期播種密度は、胚体外域内胚葉に関連する遺伝子(AFP、SOX7)及び多能性関連遺伝子(OCT4、Nanog)に大きな影響を有さなかった。

20

## 【0080】

図3及び図4は、種々の播種密度、即ち、3 × 10<sup>4</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図3A及び図4A)、5 × 10<sup>4</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図4A及び4B)、7.5 × 10<sup>4</sup>細胞/cm<sup>2</sup>(図4A及び図4C)、1 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、図4D、図4E、1.1 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、図4F、1.2 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、図4G、1.5 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で播種されたH1細胞についてのDEの誘導前(図3A～図3G)及びDEへの分化の開始後4日目(図4A～図4G)の位相差画像を示す。図4は、より高い細胞密度で播種された細胞と比べて、<1 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で播種された培養物については、有意な形態的な差があったことを明確に示している。しかしながら、この差は、DEに関連する遺伝子/タンパク質における有意差には移行しなかった。この実施例から得たデータは、初期播種密度は、DEに関連するマーカーの発現に大きく影響を及ぼすことはなかったことを強調している。0.3～2 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の範囲の密度で播種されたES細胞の培養物は、DEへの分化において同様な効率を示した。

30

## 【0081】

## (実施例2)

胚性幹細胞の播種密度は、臍臍内胚葉及び臍臍内分泌腺マーカーの発現に大きく影響を及ぼす

この実施例は、ESの初期播種密度が、臍臍の内胚葉/内分泌腺培養物の生成に大きく影響を及ぼすかどうかを理解するために行った。

40

## 【0082】

ヒト胚性幹細胞系H1(hESCH1)の細胞を、種々の継代(40継代～52継代)で採取し、10 μMのY27632が追加されたMEF-CM(調整培地)中に、Matrikel(商標)(1:30の希釈、BD Biosciences、ニュージャージー州)をコーティングした皿上で、以下の密度で単一細胞として播種した：0.5 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、0.75 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、1 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、1.5 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、1.8 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>、及び2 × 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>。播種の48時間後に、培養物を不完全なPBS(Mg又はCaを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で約30秒間洗浄し、インキュベートした。

## 【0083】

以下の通りに、培養物を、臍臍の内胚葉/内分泌腺系統に分化させた。

50

a) ステージ1(胚体内胚葉(DE)-4日):ステージ1の培地(2%の無脂肪酸BSA(Proliant、カタログ番号68700)、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム(Sigma Aldrich、カタログ番号S3187)、1X GlutaMax(商標)(Invitrogen、カタログ番号35050-079)、2.5mMのD-グルコース(Sigma Aldrich、カタログ番号G8769)、1:50000X ITS-X(Invitrogen)、100ng/mLのGDF8(R&D Systems)及び2.5μMのMCX化合物を追補したMCDB-131培地(Invitrogen、カタログ番号10372-019)において、細胞を1日培養した。次いで、2%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、2.5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、及び1:50000X ITS-Xを追補したMCDB-131培地で細胞を更に3日培養した。  
10

b) ステージ2(原腸管-2日):細胞を、1:50000X ITS-X、0.1%ALBUMAX BSA(Invitrogen)、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、2.5mMのD-グルコース、及び50ng/mLを追補したMCDB-131培地で2日間処理し、次いで

c) ステージ3(前腸-3日):細胞を、ITS-Xの1:200希釈、20mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、0.1%のALBUMAX BSA、0.25μMのSANT-1、20ng/mLのアクチビン-A、2μMのRA、50ng/mLのFGF7、及び200nMのLDN(BMP受容体阻害剤、カタログ番号04-0019、Stemgent、カリфорニア州)を追補したMCDB131培地で処理した。  
20

d) ステージ4(臍臓前腸前駆細胞-3日):細胞を、ITS-Xの1:200希釈、20mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、00015g/mLの重炭酸ナトリウム、0.1%のALBUMAX BSA、0.25μMのSANT-1、50nMのTPB(PKC活性化剤、カタログ番号565740、EMD Chemicals、ニュージャージー州のGibbstown)、200nMのLDN-193189、2μMのALK5阻害剤(SD-208、Molecular Pharmacology、2007、72:152-161に開示されている)、及び100nMのCYP26A阻害剤(N-[4-[2-エチル-1-(1H-1、2、4-トリアゾル-1-イル)ブチル]フェニル]-1、3-ベンゾチアゾール-2-アミン、ベルギー、Janssen)を追補したMCDB131培地で3日間処理した。  
30

e) ステージ5(臍臓内胚葉/内分泌腺-3日):ステージ4の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、20mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、0.1%のALBUMAX BSA、200nMのLDN-193189、100nMのCYP26A阻害剤、及び2μMのALK5阻害剤を追補したMCDB131培地で3日間処理した。

#### 【0084】

ステージ5の終わりに、関連する臍臓内胚葉遺伝子のPCR分析用のmRNAに加えて、全ての試験された細胞密度について位相差画像を取得した。図5A~図5Fは、ES細胞の種々の細胞密度、即ち、 $5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5A)、 $7.5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5B)、 $1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5C)、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5D)、 $1.8 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5E)及び $2.0 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>(図5F)で初期に播種されたステージ5の培養物の位相差画像を示す。 $1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>未満の密度で播種された培養物から分化させた培養物の劇的な異種性は、ES細胞の初期細胞密度が後のステージの培養物の形態に大きく影響を及ぼすことを示唆している。特に、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>よりも高い密度で初期播種された培養物から分化させた細胞は、培養皿の区域全体で均一の形態を示した。  
40

#### 【0085】

図6A~図6Jは、実施例2に概説した、種々の密度で播種され、その後ステージ5に  
50

分化されたヒト胚性幹細胞系 H 1 の細胞中の以下の遺伝子、即ち、Z I C 1 ( 図 6 A ) 、 C D X 2 ( 図 6 B ) 、 P D X - 1 ( 図 6 C ) 、 N K X 6 . 1 ( 図 6 D ) 、 N K X 2 . 2 ( 図 6 E ) 、 N G N 3 ( 図 6 F ) 、 N E U R O D ( 図 6 G ) 、 インスリン ( 図 6 H ) H N F 4 a ( 図 6 I ) 、 及び P T F 1 a ( 図 6 J ) の発現のリアルタイム P C R 分析からのデータを示す。実施例 1 で観察された影響とは異なり、初期播種密度は、臍臓の内胚葉 / 内分泌腺マーカーの発現に劇的に影響を与えた。特に、 $1 \sim 1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  未満の初期播種密度による培養物から分化させた細胞は、P D X - 1 、 N K X 6 . 1 、 N G N 3 、 N K X 2 . 2 、 N e u r o D 、 及びインスリンの発現における著しい下降を示したが、一方内胚葉マーカー Z I C 1 及び後方腸管マーカー、 C D X 2 のアップレギュレーションを示した。実施例 1 からのデータに加えてこのデータは、 C X C R 4 及び他の D E 関連遺伝子の高い発現が、臍臓の内胚葉 / 内分泌腺遺伝子の生成の予測ではないことを明確に強調する。初期播種密度は、臍臓の内胚葉 / 内分泌腺細胞の効率を制御する上での重要な変数であると考えられる。 10

本出願は、例えば以下の発明を提供する。

[ 1 ] 多能性幹細胞を培養する方法であって、前記多能性幹細胞を、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程を含む、方法。

[ 2 ] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[ 1 ] に記載の方法。

[ 3 ] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ] 前記多能性幹細胞が、 M a t r i g e l を含む表面上に播種される、[ 1 ] に記載の方法。

[ 5 ] 多能性幹細胞を分化させる方法であって、前記多能性幹細胞を、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、前記多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

[ 6 ] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[ 5 ] に記載の方法。

[ 7 ] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[ 6 ] に記載の方法。

[ 8 ] 前記多能性幹細胞が播種される前記表面が、 M a t r i g e l を含む、[ 5 ] に記載の方法。

[ 9 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 5 ] に記載の方法。

[ 10 ] 胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法であって、多能性幹細胞を、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程を含む方法であり、前記多能性幹細胞が、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種されている、方法。

[ 11 ] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[ 10 ] に記載の方法。

[ 12 ] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[ 11 ] に記載の方法。

[ 13 ] 前記多能性幹細胞が播種される前記表面が、 M a t r i g e l を含む、[ 10 ] に記載の方法。

[ 14 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 10 ] に記載の方法。

[ 15 ] 胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法であって、多能性幹細胞を、前記多能性幹細胞の分化効率を最大化するのに十分な播種密度で、第 1 の表面上に播種する工程と、前記多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞の分化効率を最大化するのに十分な密度で播種する工程と、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

[ 16 ] 前記多能性幹細胞が、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$

10

20

30

40

50

$\text{m}^2$ の播種密度で前記第1の表面上に播種される、[15]に記載の方法。

[17] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で第2の表面上に播種される、[15]に記載の方法。

[18] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[15]に記載の方法。

[19] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[18]に記載の方法。

[20] 前記第1の表面が、Matrigelを含む、[15]に記載の方法。

[21] 前記第2の表面が、Matrigelを含む、[15]に記載の方法。

[22] 前記第1の表面と前記第2の表面が同一表面である、[15]に記載の方法。

[23] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[15]に記載の方法。

10

[24] 前記臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[15]に記載の方法。

[25] 胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法であって、多能性幹細胞を胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法であり、前記多能性幹細胞が、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種されている、方法。

[26] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[25]に記載の方法。

20

[27] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[26]に記載の方法。

[28] 前記表面が、Matrigelを含む、[25]に記載の方法。

[29] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[25]に記載の方法。

[30] 前記臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[25]に記載の方法。

[31] 臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法であって、

a) 多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、

b) 前記多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、

30

c) 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

[32] 前記多能性幹細胞が、約 $0.8 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で表面上に播種される、[31]に記載の方法。

[33] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ ～約 $5.0 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の播種密度で播種する工程を更に含む、[31]に記載の方法。

[34] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[31]に記載の方法。

[35] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[34]に記載の方法。

[36] 前記表面が、Matrigelを含む、[31]に記載の方法。

40

[37] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[31]に記載の方法。

[38] 前記臍臍内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[31]に記載の方法。

[39] 臍臍内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞を得る方法であって、

a) 多能性幹細胞を表面上に播種する工程と、

b) 前記多能性幹細胞を、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、

c) 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、臍臍内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

50

[ 4 0 ] 前記多能性幹細胞が、約  $0.8 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で播種される、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 1 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で播種する工程を更に含む、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 2 ] 前記多能性幹細胞が胚性幹細胞である、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 3 ] 前記胚性幹細胞がヒト胚性幹細胞である、[ 4 0 ] に記載の方法。

[ 4 4 ] 前記表面が、Matrigel を含む、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 5 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 6 ] 前記脾臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 3 9 ] に記載の方法。

[ 4 7 ] 胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を分化させる方法であって、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、脾臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

[ 4 8 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 4 7 ] に記載の方法。

[ 4 9 ] 前記脾臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 4 7 ] に記載の方法。

[ 5 0 ] 胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、脾臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる方法であって、胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、約  $1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5.0 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で表面上に播種する工程と、前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞を、脾臓内分泌腺の指標であるマーカーを発現する細胞に分化させる工程と、を含む方法。

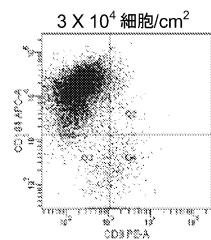
[ 5 1 ] 前記胚体内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 5 0 ] に記載の方法。

[ 5 2 ] 前記脾臓内胚葉の指標であるマーカーを発現する細胞が、ヒトのものである、[ 5 0 ] に記載の方法。

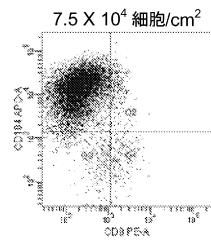
[ 5 3 ] ヒト胚性幹細胞と比べる場合、PD-X-1、NK-X6.1、NGN3、NK-X2.2、NeuroD、及びインスリンから選択される少なくとも1つのマーカーの発現において下降を示し、並びにZIC1及びCDX2のアップレギュレーションを示す、ヒト胚性幹細胞からインビトロで分化させた細胞の集団であって、前記ヒト胚性幹細胞が、 $5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  未満の播種密度で表面上に播種される、細胞の集団。

-

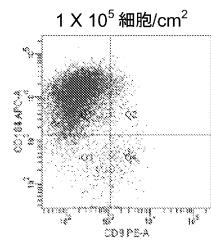
【図1A】



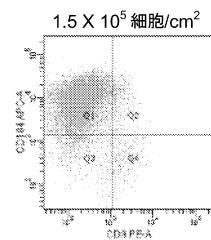
【図1B】



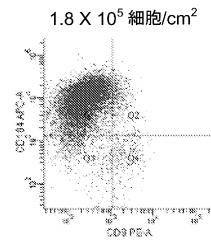
【図1C】



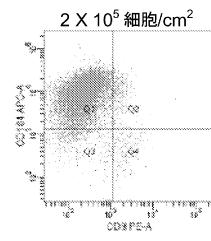
【図1D】



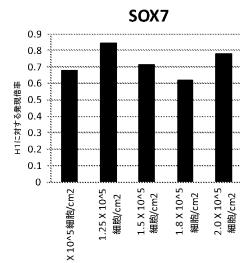
【図1E】



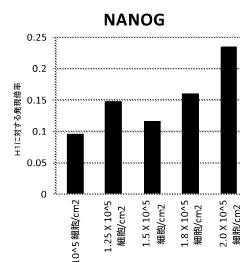
【図1F】



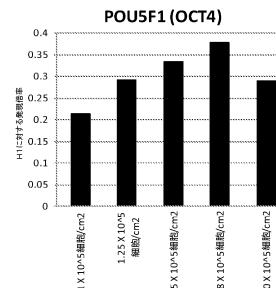
【図2A】



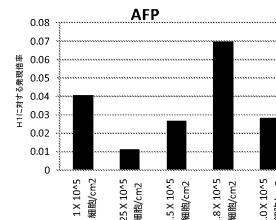
【図2B】



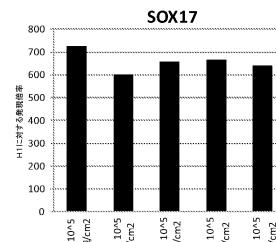
【図2C】



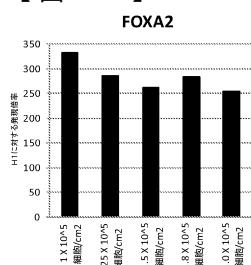
【図2D】



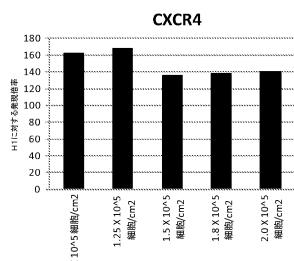
【図2E】



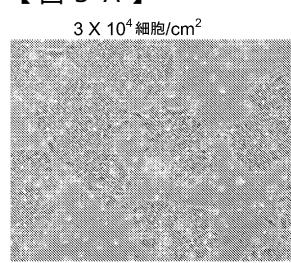
【図2 F】



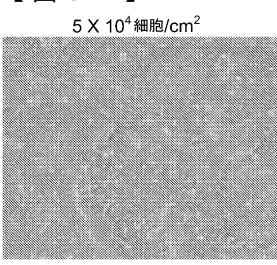
【図2 G】



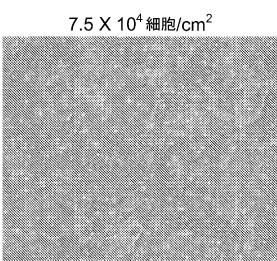
【図3 A】



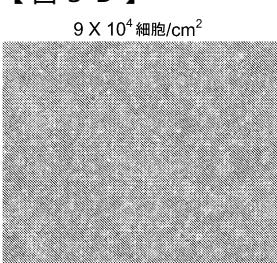
【図3 B】



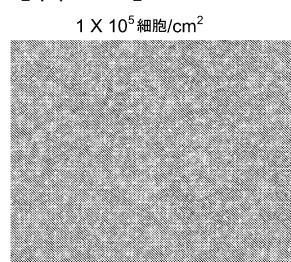
【図3 C】



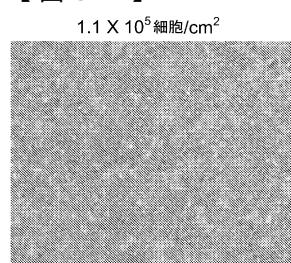
【図3 D】



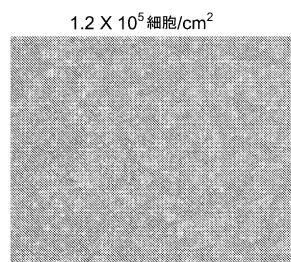
【図3 E】



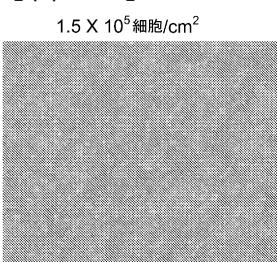
【図3 F】



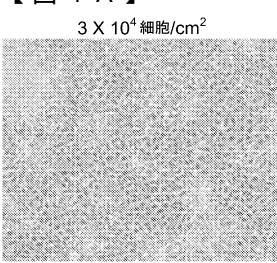
【図3 G】



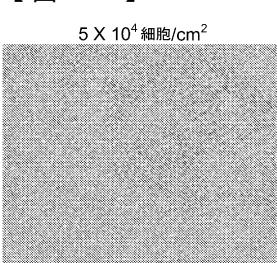
【図3 H】



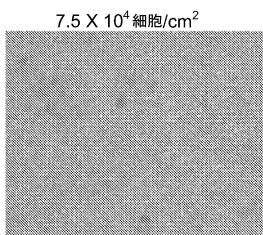
【図4 A】



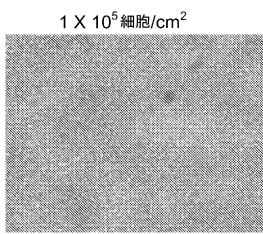
【図4 B】



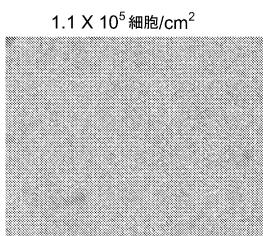
【図4 C】



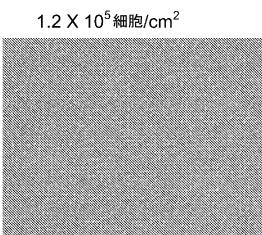
【図4 D】



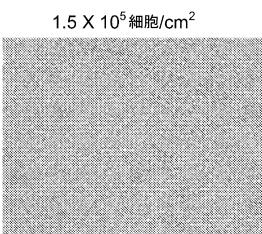
【図4 E】



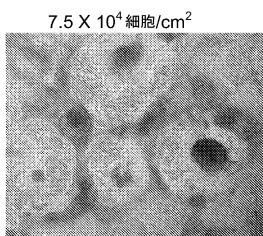
【図4 F】



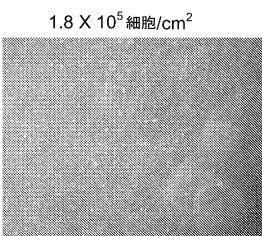
【図4 G】



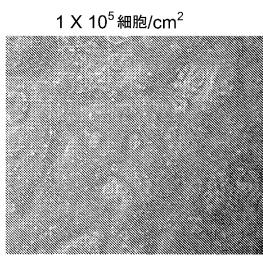
【図5 B】



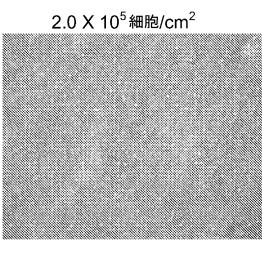
【図5 E】



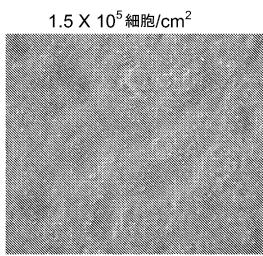
【図5 C】



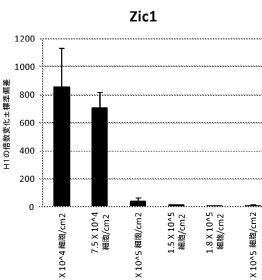
【図5 F】



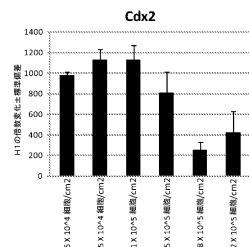
【図5 D】



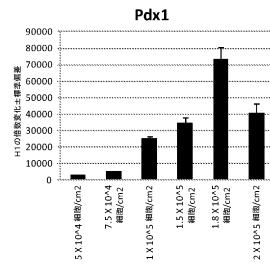
【図6 A】



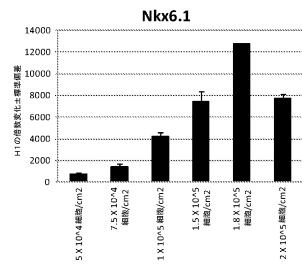
【図6B】



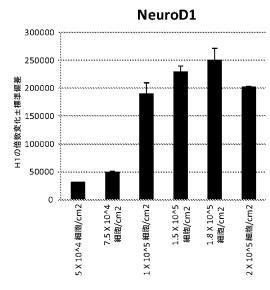
【図6C】



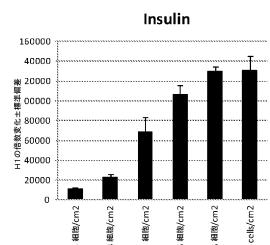
【図6D】



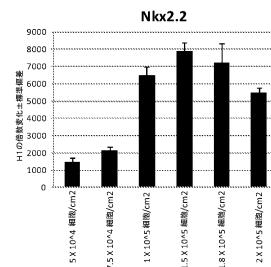
【図6G】



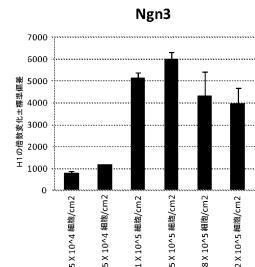
【図6H】



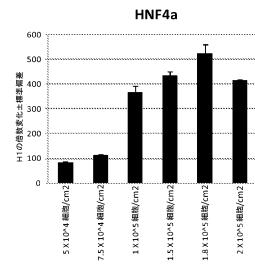
【図6E】



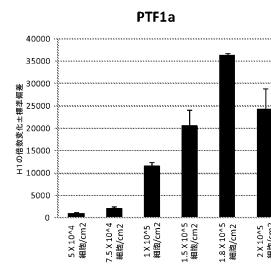
【図6F】



【図6I】



【図6J】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 レザニア, アリレザ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, 1000 ルート 202 サウス

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2011/118211 (WO, A1)

国際公開第2012/030540 (WO, A1)

特表2011-518562 (JP, A)

特表2012-507292 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

WPI DS / WPIX (STN)