

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6383292号  
(P6383292)

(45) 発行日 平成30年8月29日(2018.8.29)

(24) 登録日 平成30年8月10日(2018.8.10)

(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

請求項の数 17 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2014-561075 (P2014-561075)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月6日 (2013.3.6)  
 (65) 公表番号 特表2015-509381 (P2015-509381A)  
 (43) 公表日 平成27年3月30日 (2015.3.30)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/029360  
 (87) 國際公開番号 WO2013/134378  
 (87) 國際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)  
 審査請求日 平成28年2月29日 (2016.2.29)  
 (31) 優先権主張番号 61/607,706  
 (32) 優先日 平成24年3月7日 (2012.3.7)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509087759  
 ヤンセンバイオテック、インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1904  
 4ホーシヤム・リツジビュードライブ 80  
 0/850  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100093676  
 弁理士 小林 純子  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多能性幹細胞の増殖及び維持のための明確な培地

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多能性幹細胞の培養、維持及び増殖のための明確な細胞培養培地であつて、前記明確な細胞培養培地は、以下：

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、及びI G F - 1 からなる、明確な細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、及びアスコルビン酸からなる、明確な細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、及び塩化リチウムからなる、明確な細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、アスコルビン酸、及び塩化リチウムからなる、明確な細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、A l C l<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、A g N O<sub>3</sub>、B a (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、K B r、C d C l<sub>2</sub>、C o C l<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、C r C l<sub>3</sub>(無水)、N a F、G e O<sub>2</sub>、K I、R b C l、及びZ r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>Oからなる、明確な

10

20

細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸D L - - トコフェロール、エチルアルコール1 0 0 %、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ブルロニックF - 6 8、ステアリン酸、及びT w e e n 8 0 (登録商標)からなる、明確な細胞培養培地；並びに

M C D B - 1 3 1、A 1 C l<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、A g N O<sub>3</sub>、B a (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、K B r、C d C l<sub>2</sub>、C o C l<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、C r C l<sub>3</sub> (無水)、N a F、G e O<sub>2</sub>、K I、R b C 1、Z r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O、アスコルビン酸、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸D L - - トコフェロール、エチルアルコール1 0 0 %、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ブルロニックF - 6 8、ステアリン酸、T w e e n 8 0 (登録商標)、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、及びL - アラニル - L - グルタミンジペプチドからなる、明確な細胞培養培地；

からなる群より選択され、前記明確な細胞培養培地中で多能性幹細胞を培養することによって、少なくとも1 0 繼代、細胞の多能性が維持される、細胞培養培地。

## 【請求項2】

前記細胞培養培地が、以下：

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、及びI G F - 1 からなる、明確な細胞培養培地；

D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、及びアスコルビン酸からなる、明確な細胞培養培地；又は

M C D B - 1 3 1、A 1 C l<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、A g N O<sub>3</sub>、B a (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、K B r、C d C l<sub>2</sub>、C o C l<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、C r C l<sub>3</sub> (無水)、N a F、G e O<sub>2</sub>、K I、R b C 1、Z r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O、アスコルビン酸、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸D L - - トコフェロール、エチルアルコール1 0 0 %、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ブルロニックF - 6 8、ステアリン酸、T w e e n 8 0 (登録商標)、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、及びL - アラニル - L - グルタミンジペプチドからなる、明確な細胞培養培地；

からなる群より選択され、前記明確な細胞培養培地中で幹細胞を培養することによって、少なくとも1 0 繼代、細胞の多能性と核型安定性が維持される、請求項1に記載の明確な細胞培養培地。

## 【請求項3】

前記細胞培養培地が、D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、及び塩化リチウムからなる、請求項1に記載の明確な細胞培養培地。

## 【請求項4】

前記細胞培養培地が、D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、I G F - 1、アスコルビン酸、及び塩化リチウムからなる、請求項1に記載の明確な細胞培養培地。

## 【請求項5】

前記細胞培養培地が、ヒト多能性幹細胞の培養、維持及び増殖のためのものである、請求項1に記載の明確な細胞培養培地。

## 【請求項6】

10

20

30

40

50

前記細胞培養培地が、ヒト胚性幹細胞の培養、維持及び増殖のためのものである、請求項5に記載の明確な細胞培養培地。

【請求項7】

前記脂肪酸を含まないアルブミンが、試薬グレードである、請求項1～6のいずれか一項に記載の明確な細胞培養培地。

【請求項8】

前記TGF-リガンドが、TGF-1である、請求項1～7のいずれか一項に記載の明確な細胞培養培地。

【請求項9】

DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びIGF-1からなる、明確な細胞培養培地。 10

【請求項10】

DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、IGF-1、及びアスコルビン酸からなる、明確な細胞培養培地。

【請求項11】

MCDB-131、AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、AgNO<sub>3</sub>、Ba(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、KBr、CdCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、CrCl<sub>3</sub>(無水)、NaF、GeO<sub>2</sub>、KI、RbCl、ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O、アスコルビン酸、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸DL-トコフェロール、エチルアルコール100%、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレン酸、ブルロニックF-68、ステアリン酸、Tween 80(登録商標)、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドからなる、明確な細胞培養培地。 20

【請求項12】

ヒト多能性幹細胞の増殖のための方法であって、以下：

DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びIGF-1からなる、明確な細胞培養培地； 30

DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、IGF-1、及びアスコルビン酸からなる、明確な細胞培養培地；並びに

MCDB-131、AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、AgNO<sub>3</sub>、Ba(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、KBr、CdCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、CrCl<sub>3</sub>(無水)、NaF、GeO<sub>2</sub>、KI、RbCl、ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O、アスコルビン酸、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸DL-トコフェロール、エチルアルコール100%、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレン酸、ブルロニックF-68、ステアリン酸、Tween 80(登録商標)、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドからなる、明確な細胞培養培地； 40

からなる群より選択される明確な細胞培養培地中、フィーダーを含まないマトリックス上で、ヒト多能性幹細胞を培養する工程を含み、前記明確な細胞培養培地中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、細胞の多能性と、核型安定性が維持される、方法。

【請求項13】

前記明確な細胞培養培地が、DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びIGF 50

- 1 からなる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記明確な細胞培養培地が、D M E M - F 1 2 基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F 、I G F - 1 、及びアスコルビン酸からなる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記明確な細胞培養培地が、M C D B - 1 3 1 、A l C l<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 、A g N O<sub>3</sub> 、B a (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 、K B r 、C d C l<sub>2</sub> 、C o C l<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 、C r C l<sub>3</sub> (無水) 、N a F 、G e O<sub>2</sub> 、K I 、R b C l 、Z r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O 、アスコルビン酸、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、エチルアルコール、アラキドン酸、コレステロール、酢酸D L - - トコフェロール、エチルアルコール 1 0 0 % 、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ブルロニックF - 6 8 、ステアリン酸、T w e e n 8 0 (登録商標) 、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F 、及びL - アラニル - L - グルタミンジペプチドからなる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記T G F - リガンドが、T G F - 1 である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ヒト多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本明細書は、全ての目的のために、その全てが参考文献によって本明細書に組み込まれている、2 0 1 2 年 3 月 7 日に出願された、米国特許仮出願明細書第 6 1 / 6 0 7 , 7 0 6 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、明確な培地条件下、多能性幹細胞の増殖及び維持の領域に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

未分化多能性幹細胞の増殖には伝統的に、多能性マーカーの接着、増殖及び維持を支持するのに十分な因子を提供する、「フィーダー」細胞が使用されてきた。ヒト胚性幹細胞の発生と培養のための初期の方法は、マウス胚性纖維芽細胞 (M E F ) フィーダー細胞の利用が必要であった。続く技術は、「条件培地」の利用と、フィーダー細胞を置換するための細胞外マトリックスコーティングの利用を包含した。条件培地は、M E F のような、フィーダー細胞によって改変された培地である。しかしながら、両方の方法は、多能性幹細胞の増殖を連続的に支持するために、条件培地又はフィーダー細胞のバッチにおいて矛盾が生じる。更に、両方のシステムは、異なる多能性幹細胞において異なって働きうる、未定義因子を提供する。したがって、多能性幹細胞の連続した増殖を支持する明確、安価、再生可能な培養培地の確立が、再生医療領域において、大きな関心が持たれている。

【0 0 0 4】

ヒト胚性幹細胞 (h E S 細胞) の明確な特徴は、細胞が、様々な系統に分化する傾向を有することである。この望まれない分化は、望む特定の細胞型を続いて産出するために要求される均一で指向された分化を妨害しうる。事実、フィーダー細胞及び条件培地培養は、典型的に、特に増殖しているE S 細胞コロニーのエッジ周辺、又はコロニーの中心にて、あるレベルの望まない分化をもたらす。

10

20

30

40

50

## 【0005】

最近の努力により、結果として、培地中のノックアウト血清交換（K S R）のような、置換培養条件のホストによる、フィーダー細胞又は条件培地の置換がもたらされている（Xu et al., 2005, *Nature Methods*, 2: 185~189）。K S Rは、ウシ血清アルブミン（B S A）の粗製の未定義画分を含む。他は、F G F 2、アクチビンA、及びインスリンを含む化学的に明確な培地中で多能性の長期間維持を示している（Valadier et al., 2005, *J Cell Sci*, 118: 4495~4509）。mTeSR（登録商標）1培地（*StemCell Technologies*, Vancouver, Canada）及びStemPro（商標）（*Invitrogen*, CA）を含む市販されている培地処方がまた、ヒト多能性幹細胞を維持及び増殖させるために既に使用されている。明確な培地の開発に焦点をあてた更なる先行技術としては、米国特許第7449334号、第7442548号、第7005252号、第2008/0268534号、第7410798号、第7297539号、及び第6800480号が挙げられる。更に、最近の発行物は、明確な培地中でさえ、E S 細胞の増殖を実際に遅くするか、それらの多能性状態を減少させうる不必要的試薬が存在することを強調して、8つの成分に対するmTeSR（登録商標）1培地を更に精製した（Chen et al., *Nature Methods*, 2011, 8: 424~429）。精製されたmTeSR（登録商標）1培地は、NaHCO<sub>3</sub>によって調整したp H を有する、インスリン、セレン、トランスフェリン、アスコルビン酸、F G F 2（b F G F）、及びT G F 又はノーダルを補ったD M E M / F 1 2基本培地からなる。

10

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

したがって、最小数の添加成分を有する一方で、多能性細胞の増殖に関して一貫性を提供する完全に明確な培地条件に対する必要性がいまだ存在することが明白である。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明は、多能性幹細胞の培養、維持、及び増殖のための明確な細胞培養処方を提供し、明確な細胞培養処方は、基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、及びアスコルビン酸を含み、明確な細胞培養処方中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、幹細胞の多能性及び核型安定性が維持される。本発明のいくつかの実施形態において、細胞培養処方は更に、インスリン増殖因子1（I G F - 1）を含む。本発明のいくつかの実施形態において、細胞培養処方は、D M E M - F 1 2を含む。

30

## 【0008】

本発明は、多能性幹細胞の培養、維持、及び増殖のための、明確な細胞培養処方を提供し、明確な細胞培養処方は、基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、T G F - リガンド、b F G F、アスコルビン酸、T r a c e E l e m e n t s C、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジン - エタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、明確な脂質、及びL - アラニル - L - グルタミンジペピチドを含み、明確な細胞培養処方中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、幹細胞の多能性及び核型安定性が維持される。本発明のいくつかの実施形態において、細胞培養処方は、M C D B - 1 3 1を含む。

40

## 【0009】

本発明のいくつかの実施形態において、I T S - Xは、本発明の明確な細胞培養処のために、インスリン、トランスフェリン、及びセレンを供給する。本発明のいくつかの実施形態において、I T S - Xは、約0.5%~約2%存在する。本発明のいくつかの実施形態において、I T S - Xは約1%存在する。本発明のいくつかの実施形態において、脂肪酸を含まないアルブミンは、試薬グレードである。本発明のいくつかの実施形態において、試薬グレード脂肪酸を含まないB S Aは、約0.2%~約2.5%存在する。本発明

50

のいくつかの実施形態において、試薬グレード脂肪酸を含まないBSAは、約2%存在する。

【0010】

いくつかの実施形態において、本発明の明確な細胞培養処方中TGF-リガンドは、TGF-1である。本発明のいくつかの実施形態において、TGF-1は、約0.5ng/mL～約10ng/mL存在する。本発明のいくつかの実施形態において、TGF-1は約1ng/mL存在する。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態において、bFGFは、細胞培養処方中、約50ng/mL～約100ng/mL存在する。本発明のいくつかの実施形態において、bFGFは、明確な細胞培養処方中、約50ng/mLにて存在する。本発明のいくつかの実施形態において、bFGFは、明確な細胞培養処方中、約100ng/mLにて存在する。

10

【0012】

本発明のいくつかの実施形態において、インスリン増殖因子1(IGF-1)は、約10ng/mL～約50ng/mL存在する。本発明のいくつかの実施形態において、IGF-1は、明確な細胞培養処方中、約20ng/mLにて存在する。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態において、アスコルビン酸は、明確な細胞培養処方中、約0.2mM～約0.3mM存在する。本発明のいくつかの実施形態において、アスコルビン酸は、明確な細胞培養処方中、約0.25mMにて存在する。

20

【0014】

1つの実施形態において、本発明は、D MEM - F 1 2 基本培地、(インスリン、トランスフェリン、及びセレンを供給するために)ITS-X、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、インスリン増殖因子(IGF-1)、及びアスコルビン酸から本質的になる明確な細胞培養処方に関する。

【0015】

1つの実施形態において、本発明は、MCD B - 1 3 1、(インスリン、トランスフェリン、及びセレンの供給源として)ITS-X、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、アスコルビン酸、Trace Elements C、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン-エタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、明確な脂質、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドから本質的になる明確な細胞培養処方に関する。

30

【0016】

1つの実施形態において、本発明は、ヒト多能性幹細胞の増殖のための方法に関し、本方法には、ヒト多能性幹細胞を、明確な細胞培養処方中、フィーダーを含まないマトリックス上で培養することを含み、明確な細胞培養処方は、基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びアスコルビン酸を含み、明確な細胞培養処方中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、細胞の多能性と核型安定性が維持される。いくつかの実施形態において、明確な細胞培養処方は更に、インスリン増殖因子1(IGF-1)を含む。いくつかの実施形態において、細胞培養処方は、D MEM - F 1 2 を含む。

40

【0017】

1つの実施形態において、本発明は、ヒト多能性幹細胞の増殖のための方法に関し、本方法は、ヒト多能性幹細胞を、明確な細胞培養処方中、フィーダーを含まないマトリックス上で培養することを含み、明確な細胞培養処方は、基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、アスコルビン酸、IGF-1、Trace Elements C、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、明確な脂質、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ヒト多能性幹細胞の増殖のための方法で使用される細胞培養処方は、MCD B - 1 3 1 を含む。

50

## 【0018】

本発明の実施形態は、50%より大きい細胞集団が、OCT4、SOX2、NANOG、FOXA2のタンパク質発現に対して陽性であり、SSEA-4及びZFP42のタンパク質発現が陰性又は低い、インビトロ細胞集団である。集団は、IGF-1、インスリン、bFGF、TGF-Bリガンド、及び脂肪酸を含まないアルブミンを補った基本培地を含む、明確な細胞培養処方中で多機能性幹細胞を培養することによって得られ、明確な細胞培養処方はアスコルビン酸を含まない。

## 【0019】

本発明のいくつかの実施形態において、明確な細胞培養処方は、DMEM/F12基本培地を含む。本発明のいくつかの実施形態において、細胞培養処方は、ITS-Xのようなインスリンを含む。本発明のいくつかの実施形態において、ITS-Xは、約0.5%～約2%存在する。本発明のいくつかの態様において、ITS-Xは、約1%にて存在する。本発明のいくつかの実施形態において、脂肪酸を含まないアルブミンは、試薬グレードである。本発明のいくつかの態様において、試薬グレード脂肪酸を含まないアルブミンは、約0.2%～約2.5%存在する。本発明のいくつかの実施形態において、試薬グレード脂肪酸を含まないアルブミンは、約2%にて存在する。本発明のいくつかの態様において、TGF-Bリガンドは、TGF-B1である。本発明のいくつかの実施形態において、TGF-B1は、約0.5ng/mL～約10ng/mL存在する。本発明のいくつかの態様において、TGF-B1は、約1ng/mLにて存在する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図1A】IH-3(図1A)、IH-1(図1B)、IH-6(図1C)、及びmTeSR(登録商標)1(図1D)における3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図1B】IH-3(図1A)、IH-1(図1B)、IH-6(図1C)、及びmTeSR(登録商標)1(図1D)における3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図1C】IH-3(図1A)、IH-1(図1B)、IH-6(図1C)、及びmTeSR(登録商標)1(図1D)における3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図1D】IH-3(図1A)、IH-1(図1B)、IH-6(図1C)、及びmTeSR(登録商標)1(図1D)における3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図2A】H-3(図2A)、IH-1(図2B)、及びmTeSR(登録商標)1(図2C)培地における10継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図2B】H-3(図2A)、IH-1(図2B)、及びmTeSR(登録商標)1(図2C)培地における10継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図2C】H-3(図2A)、IH-1(図2B)、及びmTeSR(登録商標)1(図2C)培地における10継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図3A】IH-3(図3A)、IH-1(図3B)、及びmTeSR(登録商標)1(図3C)培地における18継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図3B】IH-3(図3A)、IH-1(図3B)、及びmTeSR(登録商標)1(図3C)培地における18継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図3C】IH-3(図3A)、IH-1(図3B)、及びmTeSR(登録商標)1(図3C)培地における18継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を示す。

【図4A】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図4B】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収し

10

20

30

40

50

たヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図4C】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図4D】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図4E】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図4F】実施例1にて記述した培地中で培養し、1～5継代(P1～P5)にて回収したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図4A)、SOX2(図4B)、POU5F1(OCT4)(図4C)、Nanog(図4D)、FOXA2(図4E)、及びAFP(図4F)。

【図5A】実施例1にて記述した培地中で培養し、10継代にて回収したヒト胚性幹細胞株H1中の、Nanog、POU5F1(OCT4)、SOX2、及びZFP42(図5A)、並びにAFP及びFOXA2(図5B)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。

【図5B】実施例1にて記述した培地中で培養し、10継代にて回収したヒト胚性幹細胞株H1中の、Nanog、POU5F1(OCT4)、SOX2、及びZFP42(図5A)、並びにAFP及びFOXA2(図5B)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。

【図6A】実施例1にて記述した培地中で培養し、18継代にて回収したヒト胚幹細胞株H1中の、ZFP42、SOX2、POU5F1(OCT4)、及びNanog(図6A)、並びにAFP及びFOXA2(図6B)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。

【図6B】実施例1にて記述した培地中で培養し、18継代にて回収したヒト胚幹細胞株H1中の、ZFP42、SOX2、POU5F1(OCT4)、及びNanog(図6A)、並びにAFP及びFOXA2(図6B)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。

【図7A】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)、及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

【図7B】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)、及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

【図7C】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)、及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

10

20

30

40

50

【図7D】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

【図7E】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

10

【図7F】実施例1にて記述したIH-3培地中で、18継代培養した細胞内の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。イソタイプ対照(図7)、KI-67(図7B)、OCT4(図7C)、SOX17(図7D)、FOXA2(図7E)及びSOX2(図7F)。それぞれのマーカーに対するパーセント発現が、それぞれのヒストグラム上に示される。

【図8A】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

20

【図8B】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

【図8C】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

30

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

【図8D】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

【図8E】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

40

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

【図8F】実施例1にて記述したIH-3培地中、18継代培養し、OCT-4、FOXA2、SOX2に対して免疫染色し、DAPIを用いてDNAを蛍光標識する、細胞の画像を示す。OCT4(図8A)、FOXA2(図8B)、及びDAPI-染色DNA(図8C)に対して得た画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

同様に、SOX2(図8D)、FOXA2(図8E)、及びDAPI染色DNA(図8F)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

50

)に対する画像は、同一の光学視野からであるが、異なるフィルターにて得た。

【図9A】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図9B】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図9C】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図9D】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図9E】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図9F】mTeSR(登録商標)1培地(図9A)中、及び実施例2にて記述したIH-3(図9B)、IH-3-1(図9C)、IH-3-2(図9D)、IH-3-3(図9E)、及びIH-3-4(図9F)処方中、5継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図10A】実施例2にて記述した培地中で培養し、5継代にて回収した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図10A)、SOX2(図10B)、FOXA2(図10C)、Nanog(図10D)、及びPOU5F1(OCT4)(図10E)。

【図10B】実施例2にて記述した培地中で培養し、5継代にて回収した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図10A)、SOX2(図10B)、FOXA2(図10C)、Nanog(図10D)、及びPOU5F1(OCT4)(図10E)。

【図10C】実施例2にて記述した培地中で培養し、5継代にて回収した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図10A)、SOX2(図10B)、FOXA2(図10C)、Nanog(図10D)、及びPOU5F1(OCT4)(図10E)。

【図10D】実施例2にて記述した培地中で培養し、5継代にて回収した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図10A)、SOX2(図10B)、FOXA2(図10C)、Nanog(図10D)、及びPOU5F1(OCT4)(図10E)。

【図10E】実施例2にて記述した培地中で培養し、5継代にて回収した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。ZFP42(図10A)、SOX2(図10B)、FOXA2(図10C)、Nanog(図10D)、及びPOU5F1(OCT4)(図10E)。

【図11A】実施例3にて記述したmTeSR(登録商標)1培地(図1A)、IH-3(図11B)、IH-1(図11C)、及びIRT(図11D)培地処方中、20継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図11B】実施例3にて記述したmTeSR(登録商標)1培地(図1A)、IH-3(図11B)、IH-1(図11C)、及びIRT(図11D)培地処方中、20

10

20

30

40

50

継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図11C】実施例3にて記述したmTeSR(登録商標)1培地(図1A)、IH-3(図11B)、IH-1(図11C)、及びIH-3RT(図11D)培地処方中、20継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図11D】実施例3にて記述したmTeSR(登録商標)1培地(図1A)、IH-3(図11B)、IH-1(図11C)、及びIH-3RT(図11D)培地処方中、20継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図12A】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。  
10

【図12B】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。

【図12C】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。

【図12D】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。  
20

【図12E】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。

【図12F】実施例3にて記述した培地中、15継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図12A)、FOXA2(図12B)、SOX2(図12C)、Nanog(図12D)、POU5F1(OCT4)(図12E)、及びZFP42(図12F)。  
30

【図13A】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図13E)、及びZFP42(図13F)。

【図13B】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図13E)、及びZFP42(図13F)。  
40

【図13C】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図13E)、及びZFP42(図13F)。

【図13D】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。A FP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図50

13E)、及びZFP42(図13F)。

【図13E】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。AFP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図13E)、及びZFP42(図13F)。

【図13F】mTeSR(登録商標)1培地、及び実施例3にて記述したIH-1及びIH-3培地中、20継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。AFP(図13A)、FOXA2(図13B)、NANOG(図13C)、POU5F1(OCT4)(図13D)、SOX2(図13E)、及びZFP42(図13F)。

【図14A】Sigma BSAを含む(図14A)、又は脂肪酸を含まないBSAを含む(図14B)、実施例5にて記述した培地処方中、4日間培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図14B】Sigma BSAを含む(図14A)、又は脂肪酸を含まないBSAを含む(図14B)、実施例5にて記述した培地処方中、4日間培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図15A】Sigma BSAを含む(図15A)、又は脂肪酸を含まないBSAを含む(図15B)、実施例5にて記述した培地処方中、3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図15B】Sigma BSAを含む(図15A)、又は脂肪酸を含まないBSAを含む(図15B)、実施例5にて記述した培地処方中、3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図16A】Sigma BSA又は脂肪酸を含まないBSAを含む、実施例5にて記述した培地処方中、3継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。AFP(図16A)、MIXL1(図16B)、及びT(BRY)(図16C)。

【図16B】Sigma BSA又は脂肪酸を含まないBSAを含む、実施例5にて記述した培地処方中、3継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。AFP(図16A)、MIXL1(図16B)、及びT(BRY)(図16C)。

【図16C】Sigma BSA又は脂肪酸を含まないBSAを含む、実施例5にて記述した培地処方中、3継代培養した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。AFP(図16A)、MIXL1(図16B)、及びT(BRY)(図16C)。

【図17A】実施例6にて記述した培地処方中、10継代培養した、ヒト胚幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。SOX2(図17A)、POU5F1(図17B)、NANOG(図17C)、及びFOXA2(図17C)。

【図17B】実施例6にて記述した培地処方中、10継代培養した、ヒト胚幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。SOX2(図17A)、POU5F1(図17B)、NANOG(図17C)、及びFOXA2(図17C)。

【図17C】実施例6にて記述した培地処方中、10継代培養した、ヒト胚幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。SOX2(図17A)、POU5F1(図17B)、NANOG(図17C)、及びFOXA2(図17C)。

【図17D】実施例6にて記述した培地処方中、10継代培養した、ヒト胚幹細胞株H1の細胞中、以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。SOX2(図17A)、POU5F1(図17B)、NANOG(図17C)、及びFOXA2(図17C)。

10

20

30

40

50

図17C)。

【図18A】実施例6にて記述した、IH-3(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養した、H1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図18B】実施例6にて記述した、IH-3(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養した、H1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図18C】実施例6にて記述した、IH-3(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養した、H1細胞の位相コントラスト画像を表す。 10

【図18D】実施例6にて記述した、IH-3(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養した、H1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【図18E】実施例6にて記述した、IH-3(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養した、H1細胞の位相コントラスト画像を表す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

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。 20

【0022】

定義

幹細胞は、単独の細胞レベルで自己複製し、分化して後代細胞を生成するという、これらの両方の能力で定義される未分化細胞であり、後代細胞には、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞が含まれる。幹細胞はまた、インビトロで複数の胚葉層(内胚葉、中胚葉及び外胚葉)から様々な細胞系の機能的細胞へと分化する能力によって、また移植後に複数の胚葉層の組織を生じ、胚盤胞への注入後、すべてではないとしても殆どの組織を提供する能力によっても、特徴付けられる。 30

【0023】

幹細胞は、(1)全ての胚性及び胚外性細胞型が惹起されうることを意味する、全能性、(2)全ての胚性細胞型が惹起されうることを意味する多機能性、(3)細胞系統のサブセットが惹起されうるが、すべて特定の組織、器官又は生理学的システム内であることを意味する、多能性(例えば、造血幹細胞(HSC)は、HSC(自己再生)、血液細胞制限寡能性前駆細胞を含む前駆細胞、血液の正常の成分である、すべての細胞型及び要素(例えば血小板)を産出可能である。)、(4)多能性幹細胞よりもより制限された細胞系統サブセットを惹起可能であることを意味する、寡能性、及び(5)単一の細胞系統(例えば精子形成幹細胞)が惹起されうることを意味する、单分化能性、として、それらの発生潜在力によって分類される。 40

【0024】

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。分化細胞又は分化を誘導された細胞は、細胞系内でより専門化された(「分化決定された」)状況を呈している細胞である。分化プロセスに適用した際の用語「傾倒した」は、通常の環境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合に分化し続ける分化経路の地点に進行しており、通常の環境下で異なる細胞型に分化し、又はより分化されていない細胞型に戻ることができない細胞を指す。脱分化は、細胞が細胞系統内で比較的特殊化されて(又は傾倒して)いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用される場合、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。 50

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、分化決定されていない細胞の、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。

【0025】

本明細書で言うところの「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。この文脈において、差異的な発現は、陽性マーカーのレベルの増大及び陰性マーカーのレベルの減少を意味する。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。

10

【0026】

「基本培地」は、培養中、多能性幹細胞の増殖を支持可能である、塩、栄養素、及びビタミンの溶液を意味する。基本培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、M C D B 培地、R P M I などから選択されてよい。D M E M はまた、D M E M / F 1 2 (D M - F 1 2 とも呼ばれる)、又はD M E M - 高グルコース (D M E M - h g とも呼ばれる) であってもよい。M C D B 培地は、入手可能な任意のM C D B 培地、具体的にM C D B - 1 3 1 から選択されてよい。あるいは、基本培地は、胚性幹細胞の多能性の増殖及び維持を許容するために、適切な比にて、上記した基本培地処方を混合することによって選択されてよい。いくつかの実施形態において、本発明の明確な細胞培養処方中の基本培地は、D M E M - F 1 2 である。いくつかの実施形態において、本発明の細胞培養処方中の基本培地は、M C D B - 1 3 1 である。

20

【0027】

「フィーダー細胞」は、その上に多能性幹細胞が蒔かれる、非多能性幹細胞を意味する。フィーダー細胞は、多能性幹細胞による接着、増殖、及び多能性マーカーの維持に対して支持するための、十分に可溶性及び不溶性の因子を提供する。

【0028】

「条件培地」は、フィーダー細胞から由來した可溶性因子を更に補った培地を意味する。

【0029】

「細胞外マトリックス」又は「明確なマトリックス」又は「合成マトリックス」は、多能性幹細胞による多能性マーカーの接着、増殖、及び維持のために提供可能な、1つ以上の基質を意味する。インスリン様増殖因子1を意味する「I G F」及び「I G F - 1」は本明細書で互換的に使用される。ヒトにおいて、本タンパク質は、肝臓によって作製され、ヒト成長ホルモンに寄与するもののほとんどに関与する。

30

【0030】

本明細書で使用するところの、「F G F 2」及び「b F G F」は、ヒト塩基性纖維芽細胞増殖因子を同定するために、互換的に使用される。

【0031】

「T G F ベータ」、「T G F - B」、及び「T G F - 」は、本明細書で互換的に使用される。T G F - リガンドは、骨形態形成蛋白 (B M P s)、増殖分化因子 (G D F s)、アクチビン類 (アクチビンA、アクチビンA B、アクチビンB、アクチビンC)、ノーダル及びT G F - s から選択されてよい。T G F - は、T G F - 1、T G F - 2、アクチビンA、及びT G F - 3 から選択されてよい。

40

【0032】

多能性幹細胞の単離、増殖及び培養

多能性幹細胞の特徴付け

多能性幹細胞は、ステージ特異的胚抗原 (S S E A) 3 及び 4、並びにT r a - 1 - 6 0 及びT r a - 1 - 8 1 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つ以上を発現している (Thomsonら、Science 282: 1145, 1998)。インビトロでの多能性幹細胞の分化は、結果として、S S E A - 4、T r a - 1 - 6 0 の欠

50

損、*Tra1-81* 発現（存在するならば）、及び *SSSEA-1* の発現の増加となる。未分化多能性幹細胞は典型的に、アルカリホスファターゼ活性を有し、この活性は、製造業者（Vector Laboratories, Burlingame CA）によって記述されたように、4% パラホルムアルデヒドでの細胞の固定と、続く基質としての *Vector Red*との発現によって検出可能である。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 TETRT も発現する。

#### 【0033】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、3つの胚葉層のすべて、すなわち、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、細胞を重症複合免疫不全症（SCID）マウスに注入し、形成される奇形腫を4% パラホルムアルデヒドで固定し、次いでこれを3胚葉由来の細胞型の根拠について組織学的に調べることによって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対して評価することにより決定することができる。

#### 【0034】

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、種々のフィーダー層を用いて培養中に、又はマトリックスタンパク質コート容器を用いることによって、簡単に増殖しうる。あるいは、mTeSR（登録商標）1 培地（*StemCell Technologies, Vancouver, Canada*）のような明確な培地との組み合わせで、化学的に明確な表面を、細胞の常用増殖のために使用してよい。多能性細胞は、酵素的、機械的、又は EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）のような種々のカルシウムキレーターの利用を用いて、培養プレートから簡単に取り除くことができる。あるいは、多能性細胞を、任意のマトリックスタンパク質又はフィーダー層がない状態で、懸濁液中で増殖させてよい。

#### 【0035】

##### 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。非限定例として、例えばヒト胚幹細胞株 H1、H7、及び H9（*WiCell Research Institute, Madison, WI*）のような、ヒト胚性幹細胞又はヒト胚芽細胞の樹立株が挙げられる。更に、こうした細胞の初期の株化又は安定化の際に本開示の組成物を使用することも考えられるが、その場合は、供給源となる細胞は供給源の組織から直接採取される1次多能性細胞である。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、誘導可能多能性細胞（iPSC）、又は OCT4、*Nanog*、*Sox2*、*KLF4*、及び *ZFP42* のような多数の多能性関連転写因子の強制発現を用いて、成体細胞より誘導可能な再プログラミングされた多能性細胞も好適である（*Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2011, 12: 165～185*）。

#### 【0036】

ヒト胚性幹細胞は、*Thomson et al.*（米国特許第5,843,780号；*Science, 1998; 282: 1145～1147; Current Top Dev Biol, 1998; 38: 133～165; 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92: 7844～7848*）によって記述されたように調製してよい。

#### 【0037】

多能性幹細胞の特徴は当業者によく公知であり、多能性幹細胞の追加特徴は、継続して

10

20

30

40

50

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、すなわち、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以上の発現が挙げられる。

#### 【0038】

典型的に胚性幹細胞の培養中に存在する分化マーカーとしては、例えばA F P、F O X A 2、S O X 1 7、T (B R Y)、及びM I X L 1に対してが挙げられる。

#### 【0039】

本発明の実施形態において、ヒト多能性幹細胞を、少なくとも10継代増殖した細胞の多能性及びk a r y o t y p i c 安定性を維持する一方で、多能性幹細胞の増殖を維持するため、アスコルビン酸、I G F、インスリン、b F G F、T G F - B リガンド、及び脂肪酸を含まないアルブミンを含む明確な培地内で培養する。

10

#### 【0040】

本発明の実施形態は、50%より大きい細胞集団が、O C T 4、S O X 2、N A N O G、及びF O X A 2陽性のタンパク質発現に対して陽性であるが、S S E A - 4及びZ F P 4 2のタンパク質発現が低い、インビトロ細胞集団である。

#### 【0041】

本発明の別の態様は、結果として、50%より大きい細胞集団が、O C T 4、S O X 2、N A N O G、F O X A 2に対するタンパク質染色によって陽性であり、S S E A - 4及びZ F P 4 2のタンパク質発現が低い細胞集団となる、I G F、インスリン、b F G F、T G F - B、脂肪酸を含まないアルブミンを含み、アスコルビン酸を含まない、インビトロの明確な細胞培養処方を記述する。

20

#### 【0042】

本発明は更に、以下の実施例によって例示されるが、限定はされず、他に言及しない限り、部及びパーセンテージは、重量によってであり、度は摂氏である。これらの実施例が、本発明の好ましい実施形態を示している一方で、実例としてのみ提供されることを理解されたい。以上の議論及びこれらの実施例から、当業者は、本発明の必須の特徴が、その精神及び範囲を逸脱しないで、種々の利用及び条件に適合することが出来るこことを確認することが可能である。したがって、本明細書で示し、記述したことに加えて、本発明の種々の改変が、前述から当業者に明らかであろう。そのような改変はまた、付随する請求項の範囲内であることが意図される。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。

30

#### 【実施例】

#### 【0043】

##### (実施例1)

未分化胚性幹細胞の増殖用の最適な培地成分を同定するための、種々の培養条件の試験m T e S R (登録商標) 1培地 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s , V a n c o u v e r , C a n a d a) 中、M A T R I G E L (商標) (1:30希釈、B D B i o s c i e n c e s , F r a n k l i n L a k e s , N J) コートディッシュ上で培養し、E D T Aを用いて継代した、ヒト胚性幹細胞株H 1 (少なくとも35継代~40継代)の細胞を開始集団として使用して、種々の培地成分を試験した。細胞を、室温にて5~10分間E D T A処理を用いて、小コロニーとして継代した。培養を、それぞれの継代にて、1:6~1:10の比で常用に分割した。表Iは、それらの未分化形態及び多様性マーカーを維持する一方で、H 1細胞を増殖させるそれらの能力について試験した初期培地処方を記載している。

40

#### 【0044】

【表1】

表I 評価した培地処方

培地番号	基本培地	添加成分*	
IH-1	MCDB-131	1×Trace Elements C**、 0.25mMアスコルビン酸、 10mM HEPES、 1mM塩化リチウム、 10mMグルコース、 1:500×明確な脂質***、 1×ITS-X、 2%試葉グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 1×GlutaMAX(商標)	10
IH-2	MCDB-131	1×Trace Elements C**、 0.25mMアスコルビン酸、 10mM HEPES、 1mM塩化リチウム、 10mMグルコース、 1:500×明確な脂質***、 1×ITS-X、 2%脂質豊富なBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 1×GlutaMAX(商標)	20
IH-3	DM-F12	1×ITS-X、 2%試葉グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1	
IH-4	DM-F12	1×Trace Elements C**、 0.25mMアスコルビン酸、 10mM HEPES、 1mM塩化リチウム、 10mMグルコース、 1:500×明確な脂質***、 1×ITS-X、 2% BSA(ニュージーランド由来)、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 1×GlutaMAX(商標)	30
IH-5	DM-F12	1×Trace Elements C**、 0.25mMアスコルビン酸、 10mM HEPES、 1mM塩化リチウム、 10mMグルコース、 1:500×明確な脂質***、 1×ITS-X、 2%標準グレードBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 1×GlutaMAX(商標)	40
IH-6	DM-F12	1×非必須アミノ酸、 1×ITS-X、 20ng/mL bFGF、 0.1mM $\beta$ -メルカプトエタノール、 0.95 $\mu$ M CHIR99021、 0.4 $\mu$ M PDO325901、及び 10 $\mu$ M Y-27632	

\* : Trace Elements C\*\* (Mediatech, Manassas, VA)、HEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、Invitrogen, Carlsbad, CA)、LiCl (Sigma, Saint Louis, MO)、グルコース (Sigma)、明確な脂質\*\*\* (Invitrogen)、試薬グレード脂質を含まないBSA (Proliant, Ankeny, IA)、TGF-1 (R & D Systems, Minneapolis, MN)、bFGF (R & D Systems)、IGF-1 (R & D Systems)、GlutaMAX (商標) (0.85% NaCl中200mM L-アラニル-L-グルタミンジペプチド; Invitrogen)、脂質豊富なBSA-Albumax (Invitrogen)、ITS-X (インスリン、トランスフェリン、セレン-X-サブリメント; Invitrogen)、標準グレードニュージーランドBSA (Lampire Biological Laboratories, Coopersburg PA)、標準グレードBSA (Lampire)、NEAA (Invitrogen)、メルカプトエタノール (Invitrogen)、CHIR99021 (Stemgent, Cambridge, MA)、PD0325901 (Sigma)、Y2763 (Sigma)

## 【0046】

\*\* Mediotech Trace Elements C Catalog No. 99~176 1000×液体は、1.20mg/L  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.17mg/L  $\text{AgNO}_3$ 、2.55mg/L  $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 、0.12mg/L  $\text{KBr}$ 、2.28mg/L  $\text{CdCl}_2$ 、2.38mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.32mg/L  $\text{CrCl}_3$  (無水)、4.20mg/L  $\text{NaF}$ 、0.53mg/L  $\text{GeO}_2$ 、0.17mg/L  $\text{KI}$ 、1.21mg/L  $\text{RbCl}$ 、及び3.22mg/L  $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ を含む。

## 【0047】

\*\*\* Invitrogen Chemically Defined Lipid Concentrate Catalog No. 11905031は、100.0mL/Lエチルアルコール (200 proof) 及び2mg/Lアラキドン酸、220mg/Lコレステロール、70mg/L酢酸DL- -トコフェロール、0mg/Lエチルアルコール100%、10mg/Lリノール酸、10mg/Lリノレン酸、10mg/Lミリスチン酸、10mg/Lオレイン酸、10mg/Lパルミチン酸、10mg/Lパルミトレン酸、90000mg/LブルロニックF-68、10mg/Lステアリン酸、及び2200mg/L Tween 80 (登録商標) (ICI Americas, Inc. Bridgewater, NJ)を含む。

## 【0048】

IH-4及びIH-5を用いて培養した細胞が、2継代後増殖を失敗したので、IH-4及びIH-5の利用は、更なる評価のためには停止した。継代2にて、IH-2にて増殖した細胞が、分化した細胞とパックされたコロニーの欠損と一致した形態における有意な変化を示した。培地IH-1、IH-3、及びIH-6を更なる評価のために選択した。継代3~5にて、IH-6にて培養した細胞が、ESコロニーの周辺にて、分化した細胞の形態学的証拠を示した (図1Cを図1A、図1B、及び図1Dと比較)。

## 【0049】

5継代の後、IH-1及びIH-3のみを更に、mTeSR (登録商標) 1培地中で培養した細胞と比較した。5~18継代時に、試料をIH-1、IH-3、及びmTeSR (登録商標) 1培養から回収し、FACS、PCR、核型解析 (G-バンド又はFISH)、及び免疫蛍光染色によって評価した。FISH解析からの結果を表IIにて示す。これらの結果は、IH-1培地又はIH-3培地中で培養したH1細胞が、通常の核型を示す一方で、mTeSR (登録商標) 1培地中で培養した細胞が、10及び18継代にて、異常な12トリソミーを提示したことを示している。

## 【0050】

10

20

30

40

50

## 【表2】

表III Cell Line Genetics (Madison, WI) による  
12番染色体及び17番染色体のFISH解析の結果

培地	P5	P10	P18
IH-1	正常	正常	正常
IH-3	正常	正常	正常
mTeSR(登録商標)1	正常	14%12トリソミー、正常17	14%12トリソミー、正常17

## 【0051】

更に、mTeSR(登録商標)1培地中で増殖した細胞と同様に、IH-1培地中で連続して継代した細胞が、コロニー周辺で非常に僅かに分化した細胞を伴って、特徴的なESコロニー形態を維持した。しかしながら、IH-3培地中で増殖した細胞は、10継代を過ぎて、特徴的なESコロニー形態を失い始めた)(図1A、図2A、及び図3Aを参照のこと)。

多能性に寄与する表面及び内部マーカーの評価を使用して、多能性の維持における被検処方の影響を査定した。表IIIにて示したように、5継代にて、IH-1及びIH-3中で培養した細胞は、mTeSR(登録商標)1培地中で増殖した培養と同様の表面マーカープロファイルを示した。しかしながら、10継代まで、IH-3培地中で培養したH1細胞は、SSEA-4の発現の有意な低下と、TRA1-60及び1-81の発現の穏やかな低下を示した。10継代IH-1培地中で培養したH1細胞は、mTeSR(登録商標)1培地中で培養したものと同様の発現パターンを維持した。

## 【0052】

## 【表3】

表III 細胞の多能性状態に関する表面マーカーに関する5継代及び  
10継代におけるFACS結果

P5				
	%CD9	%SSEA-4	%TRA 1-60	%TRA 1-81
IH-1	80	98	50	54
IH-3	83	87	39	50
mTeSR(登録商標)1	60	99	56	63
P10				
	%CD9	%SSEA-4	%TRA 1-60	%TRA 1-81
IH-1	83	95	55	44
IH-3	93	15.7	42	31
mTeSR(登録商標)1	58	97	55	62

## 【0053】

驚くべきことに、mTeSR(登録商標)1及びIH-1培地中で培養したH1細胞と同様に、IH-3培地中で培養したH1細胞は、11継代にて、OCT4及びSOX2の強力な発現を維持した(表IV)。これは、IH-3培地中で培養したH1細胞に対する、SSEA-4の非常に低い発現レベルににもかかわらずであった。

## 【0054】

## 【表4】

表IV IH-1、IH-3及びmTeSR(登録商標)1培地中、  
11継代培養した細胞の内部及び表面マーカー

	%Sox2	%SSEA-4	%Oct3/4
IH-1	97	97	92
IH-3	98	4.2	96
mTeSR(登録商標)1	98	98	92

## 【0055】

10

20

30

40

50

図4に示されるように、Nanog(図4D)、OCT4(図4C)、SOX2(図4B)、及びZPF42(図4A)のようなコア多能性マーカーのmRNA発現が、mTeSR(登録商標)1中で培養されたH1細胞と同一のレベルまで、IH-1、及びIH-3培地中で培養されたH1細胞に対して、5継代を通して維持された。しかしながら、IH-1又はmTeSR(登録商標)1培地中で培養されたH1細胞と比較して、10~18継代まで、ZFP42の発現の有意な減少があり、一方でOCT4、Nanog、及びSOX2の発現は、IH-3培地中で増殖した細胞に対して、有意に変化しなかった(図5A及び図6Aを参照のこと)。更に、18継代、IH-3培地中で培養したH1細胞のFACS解析は、>97%の細胞が、OCT4+(図7C)、SOX2+(図7F)、及びK1-67+(図7B)であった。およそ1%の細胞が、SOX17+(図7D)であり、約85%の細胞がFOXA2+(図7E)であった。図8A~図8Fは、18継代、IH-3培地中で培養したH1細胞の免疫蛍光染色の画像を示す。これらの画像は、有意な数のOCT4及びSOX2陽性細胞がまたFOXA2+であったことを例示している。IH3培地中で培養したH1細胞が、少なくとも70%の細胞が、Oct4+、NANO G+、SOX2+、K1-67+、ZFP42-及びFOXA2+である表現型を獲得した。これは、本技術分野でまだ記述されていない細胞集団を表す。

## 【0056】

## (実施例2)

アスコルビン酸をスパイクしたIH-3培地中のH1細胞の培養が、未分化胚性幹細胞の主要な特徴を回復する

IH-3中で培養したH1対IH-1及びmTeSR(登録商標)1培地中で培養したものに対するSSEA-4及びZPF42における降下の理由を同定するために、ギャップ解析を実施し、mTeSR(登録商標)1及びIH-1中では存在し、IH-3培地中では存在しない主要な試薬を同定した。IH-3培地には、表Vにて示したように、Trace Elements C、アスコルビン酸、塩酸リチウム、又は明確な脂質を補った。

## 【0057】

## 【表5】

表V IH-3培地への変更

培地	IH-3培地への追加
IH-3-1	1×Trace Elements C
IH-3-2	0.25mMアスコルビン酸
IH-3-3	1mM塩酸リチウム
IH-3-4	1:500×明確な脂質

## 【0058】

IH-3中14継代培養したH1細胞を、続いて上記培地処方中で培養し、IH-3培地中で培養した細胞と比較した。種々の継代において、種々の培地処方を用いて培養したH1細胞を、多能性マーカーに対してアッセイした。表VIに示されるように、5つの続く継代後、IH-3-2(アスコルビン酸を補ったIH-3)培地中で培養したH1細胞は、他の被検培地中で培養した細胞と比較して、そのSSEA-4発現を小さい割合回復した。

## 【0059】

10

20

30

40

## 【表6】

表V I H 1 細胞の多能性状態に関連する表面マーカーに対する、

15 繼代以下5 繼代でのF A C S 結果

	CD9	SSEA-4
mTeSR(登録商標)1	26	96.9
IH-1	82.9	96.9
IH-3	89.7	0.8
IH-3-1	90.4	0.9
IH-3-2	91.6	4.2
IH-3-3	87.6	0.7
IH-3-4	88.8	0.6

10

## 【0060】

図9 D に示されるように、IH-3-2 培地中で培養したH 1 細胞は、mTeSR(登録商標)1 培地中で培養した細胞(図9 A)と同様に、典型的な胚性幹細胞形態を維持した。しかしながら、IH-3、IH-3-1、IH-3-3、及びIH-3-4 中で培養したH 1 細胞は、緩いコロニー形態を示した(図9 B、図9 C、及び図9 F を参照のこと)。以上の培地処方中で培養した細胞のPCR 解析は更に、IH-3-2 培地中で培養したH 1 細胞が、いくらかのZFP42 の発現と、FOXA2 のダウンレギュレートされた発現を再獲得したことを確認した(図10 A ~ 図10 E を参照のこと)。以上のデータは、アスコルビン酸の存在が、それらの特徴的なコロニー/細胞形態及び分化マーカーの低発現とともに、ES 細胞の多能性を維持するために必要であることを示している。このデータに基づいて、IH-3 培地中のH 1 細胞の続く培養に更に、0.25 mM アスコルビン酸を補った。

20

## 【0061】

IH-3-2 中に培養した細胞は、ES 細胞の特徴的コロニー形態のいくらかを回復し、一方で、他のIH 培地処方中で培養した細胞は、緩い形態を提示した。

## 【0062】

(実施例3)

IH-3 及びIH-1 培地中のH 1 細胞の長期培養が、多能性及び安定核型を維持する実施例1 にて記述したように、mTeSR(登録商標)1 培地中、M A T R I G E L(商標)(1:30 希釈)コートディッシュ上で培養し、EDTA を用いて継代した、ヒト胚性幹細胞株H 1 の細胞(継代35 ~ 繙代40)を開始集団として用いて、IH-1、IH-3-2、IH-3 R T 及びmTeSR(登録商標)1 培地を用いた長期培養を評価した。細胞を、室温にて5 ~ 10 分間EDTA 处理を用いて、小コロニーとして継代した。被検培地の成分を、表VII にて記載する。

30

## 【0063】

## 【表7】

表VII IH-1、IH-3-2、及びIH-3RT培地处方中で使用した成分

培地番号	基本培地	追加した成分*
IH-1	MCDB-131	1×Trace Elements C、 0.25mMアスコルビン酸、 10mM HEPES、 1mM塩化リチウム、 10mMグルコース、 1:500×明確な脂質、 1×ITS-X、 2%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 1×GlutaMAX(商標)
IH-3-2	DM-F12	1×ITS-X、 2%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸
IH-3RT	DM-F12	2%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸、 5.5μg/mL組換えヒトransフェリン(Millipore)、 10μg/mLインスリン(Invitrogen)、 0.0067μg/mLセレン酸ナトリウム(Invitrogen)

## 【0064】

図11A～図11Dにて見られるように、IH-1、IH-3-2、及びIH-3RT中、20継代培養したH1細胞は、典型的なES形態を維持した。IH-1、IH-3-2、及びIH-3RT中、15継代培養したH1細胞のPCR解析の結果を、図12A～図12Fにて示す。IH-1、IH-3-2、及びIH-3RT中、20継代培養したH1細胞のPCR解析の結果を、図13A～図13Fにて示す。これらの解析は、mTeSR(登録商標)1培地中で培養したH1細胞と同様に、IH-1、IH-3-2、及びIH-3RT(組換えヒトtransフェリン)培地中、15又は20継代培養した細胞が、全てのコア多能性マーカーを維持し、一方でFOXA2及びAFPの非常に低い発現を示すことを確認した。継代15及び継代20でのFACS解析はまた、mTeSR(登録商標)1培地中で培養したH1細胞と同一のレベルまで、多能性細胞に関する表面マーカーの発現も確認した(表VIIを参照のこと)。

## 【0065】

10

20

30

## 【表8】

表V I I I 細胞の多能性状態に関連する表面マーカーに対して継代15及び継代20にて試験した細胞に対するF A C S 結果

P15				
	%CD9	%SSEA-4	%TRA 1-60	%TRA 1-81
IH-1	93	99	59	59
IH-3-2	72	99	55	52
IH-3RT	65	99	50	48
mTeSR(登録商標)1	63	99	49	49
P20				
IH-1	91	96	52	54
IH-3-2	91	99	49	53
mTeSR(登録商標)1	66	97	57	63

## 【0066】

I H - 1、I H - 3 - 2、及びI H - 3 R T 中で連続して培養したH 1 細胞は、G - バンド及びF I S H 解析によって測定したように、通常の核型を示した。しかしながら、m T e S R ( 登録商標 ) 1 中、10 ~ 20 継代培養したH 1 細胞は、異常な染色体数を示した(表IXを参照のこと)。

## 【0067】

## 【表9】

表IX IH-1、IH-3、IH-3RT、及びm T e S R ( 登録商標 ) 1 中で培養したH 1 細胞のF I S H 及びG - バンド解析

培地	P10(G-バンド及びFISH)	P15(FISH)	P20(FISH)
IH-1	46XY、正常12番及び17番染色体	正常	正常
IH-3-2	46XY、正常12番及び17番染色体	正常	正常
IH-3RT	46XY、正常12番及び17番染色体	正常	ND
mTeSR(登録商標)1	FISHによる、48,XY,+12,L14[2],/46,XY[18]- 20% 12トリソミー	11% 12トリソミー、 正常17	20% 12トリソミー、 正常17

## 【0068】

## (実施例4)

I H - 1、I H - 3、及びm T e S R ( 登録商標 ) 1 培地中で培養したH 1 細胞に関する等価増殖率

先の被検培地中で培養した細胞の増殖率を比較するために、I H - 1、I H - 3 - 2 及びm T e S R ( 登録商標 ) 1 培地中で培養したH 1 細胞を、T r y p L E ( I n v i t r o g e n ) を用いることによって放出し、 $5 \times 10^5$ 細胞 / 10 cm MATRIGEL ( 商標 ) - コートディッシュの密度にて播いた。単一細胞のアポトーシスを減少させ、接着を増強するために、放出した細胞を、10  $\mu$ M Rock阻害剤 ( Sigma ) で前処理した。培地を、播種後3日まで、毎日交換した。3日目、細胞を単一細胞として放出し、ヘモサイトメーターを用いて計数した。表Xに示されるように、すべての3つの培地処方中で培養した細胞が、等価の倍加時間を示した。

## 【0069】

10

20

30

40

## 【表10】

表X mTeSR (登録商標) 1、IH-1、及びIH-3-2培地  
処方中で培養したH1細胞の倍加時間

	mTeSR(登録商標)1	IH-1	IH-3-2
0時間	$0.5 \times 10^6$ 細胞	$0.5 \times 10^6$ 細胞	$0.5 \times 10^6$ 細胞
72時間	$6.7 \times 10^6$ 細胞	$4.2 \times 10^6$ 細胞	$6.8 \times 10^6$ 細胞
細胞倍加時間	19.23時間	23.45時間	19.12時間

## 【0070】

10

## (実施例5)

高品質脂肪酸を含まないBSAは多能性細胞の増殖を許容する

mTeSR (登録商標) 1培地中、M A T R I G E L (商標) (1:30希釈)コートディッシュ上で培養し、EDTAを用いて継代した、ヒト胚性幹細胞株H1の細胞(継代35~継代40)を、開始集団として使用して、2% Sigma BSA (カタログ番号A2153; ロット: 061M1804V)又は脂肪酸を含まないBSA (Proline、カタログ番号7500804、ロット: 11G54001)のいずれかを補ったIH-3-2培地を用いて、短期培養を評価した。細胞を、室温にて5~10分間EDTA処理を用いて、小コロニーとして継代した。図14A及び図14Bは、Sigma BSA (図14A)又は脂肪酸を含まないBSA (図14B)を含む培地処方中、4日間培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。図15A及び図15Bは、Sigma BSA (図15A)又は脂肪酸を含まないBSA (図15B)を含む培地処方中、3継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。図14Aにて見られるように、早ければ播種後4日に、Sigma BSAを用いた培養中、分化細胞の形態学的な証拠が存在した。しかしながら、脂肪酸を含まないBSAで処理した培養中、グロス分化細胞形態学的な証拠は存在しなかった(図14Bを参照のこと)。同一の傾向が3継代にて留意され、Sigma BSAを用いた培養中、分化細胞の形態学的証拠が存在した(図15Aを参照のこと)一方で、脂肪酸を含まないBSAを含む培地中で培養した細胞中、グロス分化細胞形態学的証拠は存在しなかった(図15Bを参照のこと)。更に、試薬グレード脂肪酸BSAを含む培地中で培養した細胞と比較して、Sigma BSAを含む培地中で培養した細胞の培養密度における有意な降下が存在した(図15Aと図15Bを比較)。

20

## 【0071】

30

Sigma BSA又は脂肪酸を含まないBSAを含む培地処方中、3継代培養したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中、AFP(図16A)、MIXL1(図16B)、及びT(BRY)(図16C)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを、図16A、16B、及び16Cにて示す。3継代でのPCRデータは明確に、Sigma BSAを含む培地中で培養した細胞に対する、分化細胞と関連したマーカーの有意なアップレギュレーションを示した。このデータは明確に、脂肪酸を含まないBSAの利用が、細胞の多能性、コロニー形態、及び増殖の維持において重要であることを示している。

## 【0072】

40

## (実施例6)

多能性幹細胞は、広範囲の濃度の脂肪酸を含まないBSA及びbFGFを用いた、IH-3培地中、増殖可能であり、多能性を維持可能である。

## 【0073】

mTeSR (登録商標) 1培地中、M A T R I G E L (商標) (1:30希釈)コートディッシュ上で培養し、EDTAを用いて継代した、ヒト胚性幹細胞株H1(35継代~40継代)の細胞を、開始集団として使用して、表X Iにて示したように補ったIH-3培地を用いて、短期及び長期培養を評価した。

## 【0074】

## 【表11】

表XⅠ 種々の用量のBSA及びbFGFを補ったIH-3培地中で使用した成分

培地番号	基本培地	追加した成分*	
IH-3-2	DM-F12	1×ITS-X、 2%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸	
IH-3P-2	DM-F12	1×ITS-X、 2%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 50ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸	10
IH-3P-3	DM-F12	1×ITS-X、 1%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸	
IH-3P-4	DM-F12	1×ITS-X、 0.5%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸	20
IH-3P-5	DM-F12	1×ITS-X、 0%試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、 1ng/mL TGF-B1、 100ng/mL bFGF、 20ng/mL IGF-1、 0.25mMアスコルビン酸	30

## 【0075】

10 繼代時点で、細胞を、多能性及び分化関連遺伝子に対して、PCRによって形態学的に評価した。更に、細胞を、12番染色体及び17番染色体に対して、FISH解析を用いて、核型安定性について評価した。図17A～図17Dは、表XⅠにて記載した培地処方中、10継代培養したヒト胚性幹細胞株H1の細胞中の、SOX2(図17A)、POU5F1(図17B)、NANOG(図17C)、及びFOXA2(図17C)の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示す。これらの図にて示されるように、以上の処方の全てが、mTESR(登録商標)1培地中で増殖した細胞に関連する、多能性マーカーの強力な発現を維持した。しかしながら、0～0.5% BSA中で増殖した細胞は、他の被検処方と比較して、これらの培養中、より高いレベルの自発性分化を示している、FOXA2のより高い発現を示した。図18A～図18Eは、表XⅠにて列記したIH-3-2(図18A)、IH-3P-2(図18B)、IH-3P-3(図18C)、IH-3P-4(図18D)、及びIH-3P-5(図18E)培地処方中、10継代培養したH1細胞の位相コントラスト画像を表す。これらの図中に示されるように、本実施例にて試験した全ての処方が、グロス分化形態の最小の証拠を伴って、ESコロニーの形成を可能にした。

## 【0076】

## 【表12】

表XII Cell Line Geneticsによって解析された、

12番染色体及び17番染色体のFISH解析

培地	P10
IH-3-2	正常
IH-3P-2	正常
IH-3P-3	正常
IH-3P-4	正常
IH-3P-5	正常

10

## 【0077】

表XIIにて見られるように、表XII中で記載した培地処方中、10継代培養したH1細胞は、FISH解析によって測定されたように、12番染色体及び17番染色体に対して、正常なカウントを維持した。以上のデータは、ITS-X、試薬グレード脂肪酸を含まないBSA、TGF-B1、IGF-1、及びアスコルビン酸を補った、DMEM/F12基本培地からなる明確な培地が、広範囲の濃度の脂肪酸を含まないBSAとbFGFを使用した時に、細胞の多能性を維持する一方で、多能性細胞の増殖を許容することを示している。

20

本発明は以下の態様を包含し得る。

[1] 多能性幹細胞の培養、維持及び増殖のための明確な細胞培養処方であって、前記明確な細胞培養処方は基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びアスコルビン酸を含み、前記明確な細胞培養処方中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、細胞の多能性と、核型安定性が維持される、細胞培養処方。

[2] 前記細胞培養処方が更に、インスリン増殖因子1(IGF-1)を含む、上記[1]に記載の明確な細胞培養処方。

[3] 前記細胞培養処方が、DMEM-F12を含む、上記[1]又は[2]に記載の明確な細胞培養処方。

30

[4] 前記細胞培養処方が更に、Trace Elements C、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、明確な脂質及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドを含む、上記[1]に記載の明確な細胞培養処方。

[5] 前記細胞培養処方が、MCDB-131を含む、上記[4]に記載の明確な細胞培養処方。

[6] ITS-Xが、インスリン、トランスフェリン、及びセレンを供給する、上記[1]～[5]のいずれか一項に記載の明確な細胞培養処方。

[7] 前記脂肪酸を含まないアルブミンが、試薬グレードである、上記[1]～[6]のいずれか一項に記載の明確な細胞培養処方。

40

[8] 前記TGF-リガンドが、TGF-1である、上記[1]～[7]のいずれか一項に記載の明確な細胞培養処方。

[9] DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びIGF-1から本質的になる、明確な細胞培養処方。

[10] DMEM-F12基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、IGF-1、及びアスコルビン酸から本質的になる、明確な細胞培養処方。

[11] MCDB-131、Trace Elements C、アスコルビン酸、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコ

50

ース、明確な脂質、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドから本質的になる、明確な細胞培養処方。

[12] ヒト多能性幹細胞の増殖のための方法であって、明確な細胞培養処方中、フィーダーを含まないマトリックス上で、ヒト多能性幹細胞を培養する工程を含み、前記明確な細胞培養処方が、基本培地、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-リガンド、bFGF、及びアスコルビン酸を含み、前記明確な細胞培養処方中で幹細胞を培養することによって、少なくとも10継代、細胞の多能性と、核型安定性が維持される、方法。

[13] 前記明確な細胞培養処方が更に、インスリン増殖因子1(IGF-1)を含む、上記[12]に記載の方法。 10

[14] 前記細胞培養処方が、DMEM-F12を含む、上記[12]又は[13]に記載の方法。

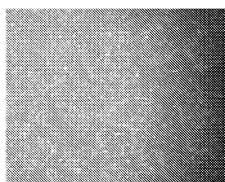
[15] 前記明確な細胞培養処方が更に、Trace Elements C、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸、塩化リチウム、グルコース、明確な脂質、及びL-アラニル-L-グルタミンジペプチドを含む、上記[12]に記載の方法。

[16] 前記明確な細胞培養処方が、MCDB-131を含む、上記[15]に記載の方法。

[17] ITS-X、脂肪酸を含まないアルブミン、TGF-B1、bFGF、及びIGF-1を含むDMEM/F12培地中で培養した多能性細胞のインビトロ集団であって、前記集団中の細胞の少なくとも70%が、Oct4+、NANOG+、SOX2+、K167+、FOXA2+及びZFP42-である、多能性細胞のインビトロ集団。 20

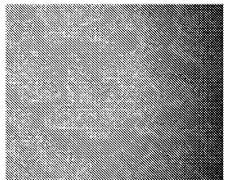
【図1A】

IH-3



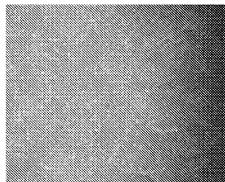
【図1B】

IH-1



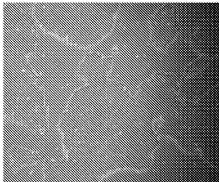
【図1C】

IH-6



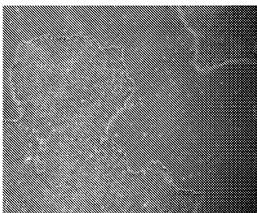
【図1D】

TeSR(登録商標)1



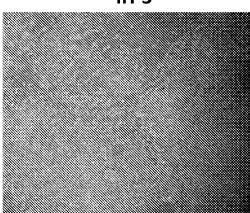
【図2A】

IH-3



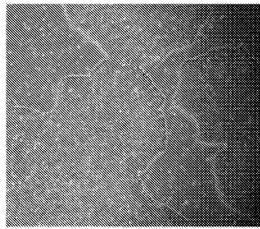
【図2B】

IH-3



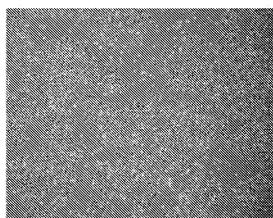
【図2C】

TeSR(登録商標)1



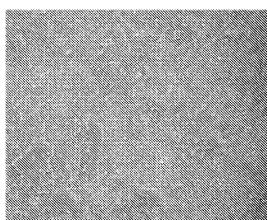
### 【図3A】

IH-3



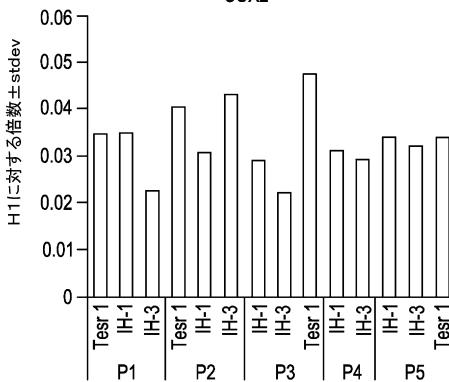
【図3B】

IH-1



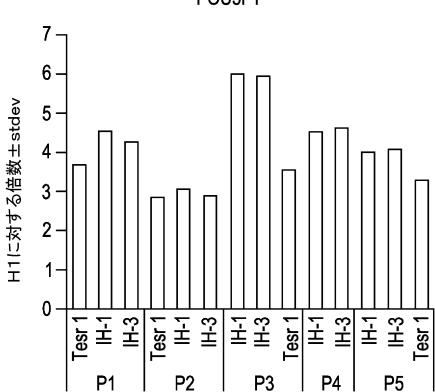
【図4B】

SOX2



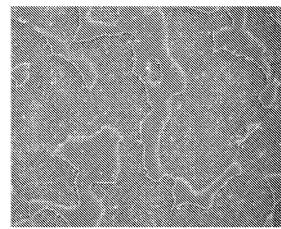
【図4C】

POU 15E1



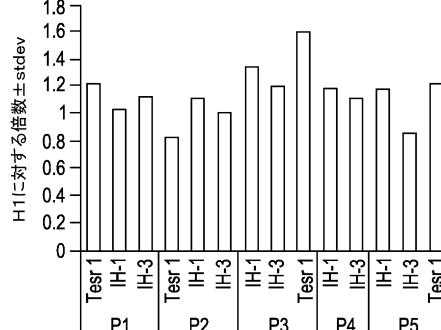
【図3C】

TeSR(登録商標)1



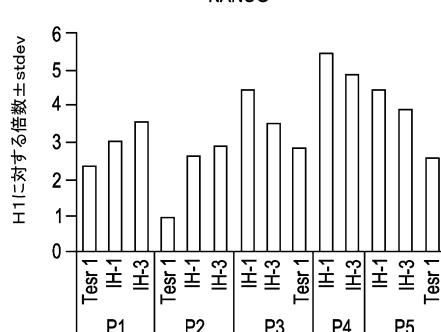
【図4A】

ZFP42



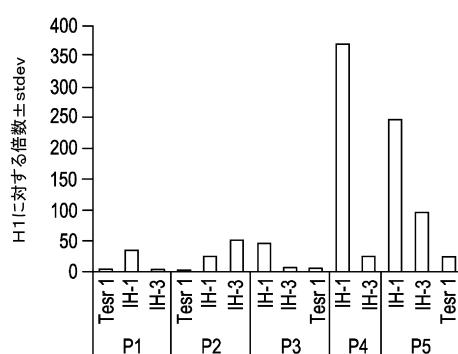
## 【図4-D】

NANOOG

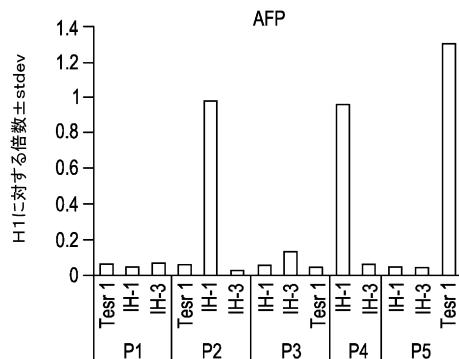


【図4E】

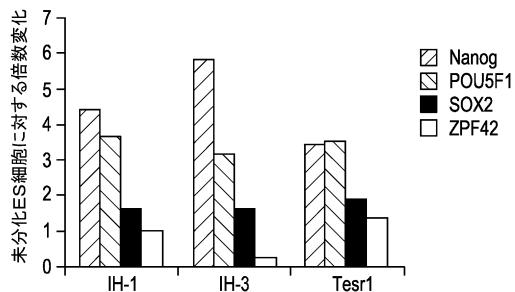
## FOXA2



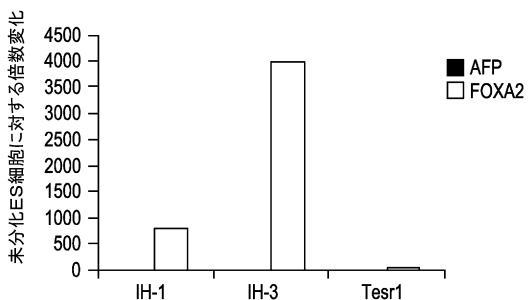
【図4 F】



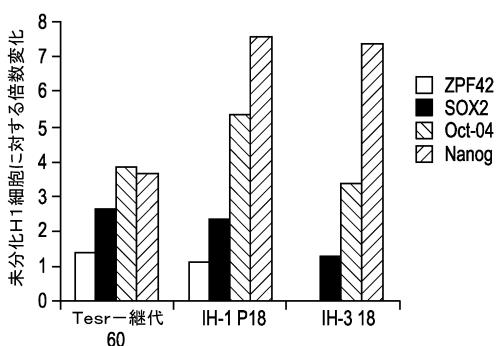
【図5 A】



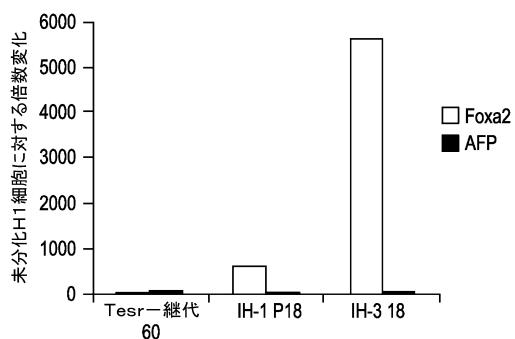
【図5 B】



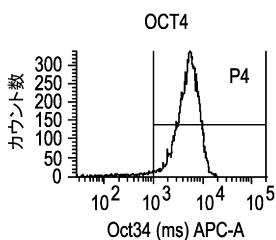
【図6 A】



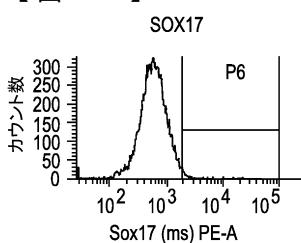
【図6 B】



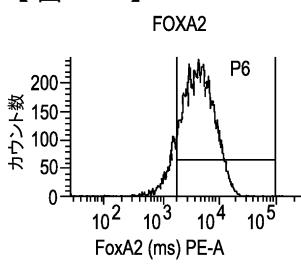
【図7 C】



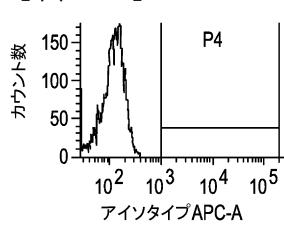
【図7 D】



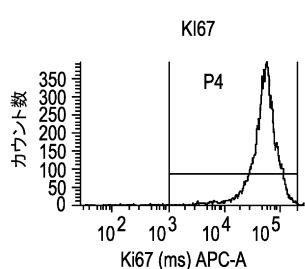
【図7 E】



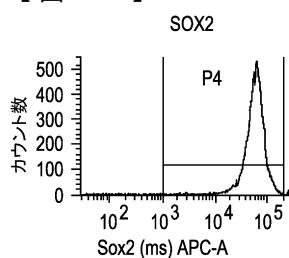
【図7 A】



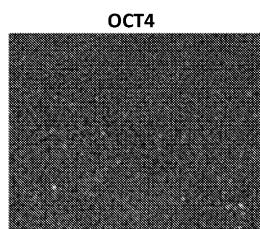
【図7 B】



【図 7 F】



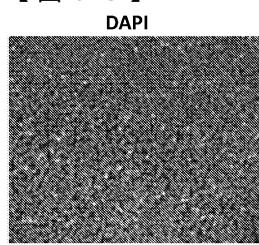
【図 8 A】



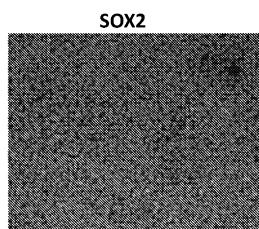
【図 8 B】



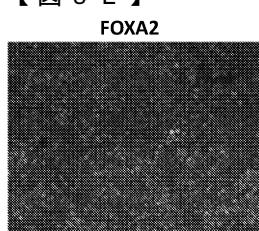
【図 8 C】



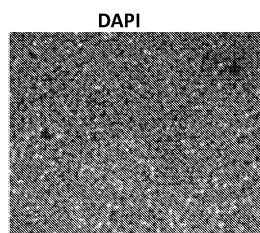
【図 8 D】



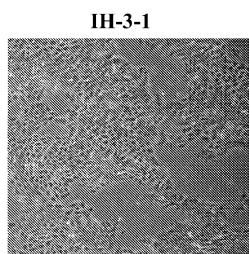
【図 8 E】



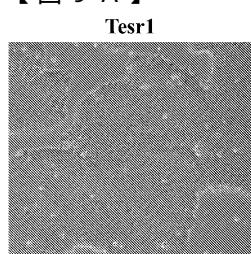
【図 8 F】



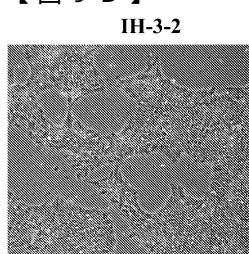
【図 9 C】



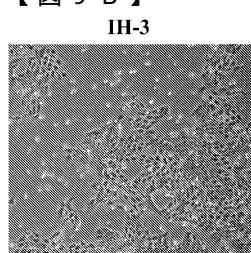
【図 9 A】



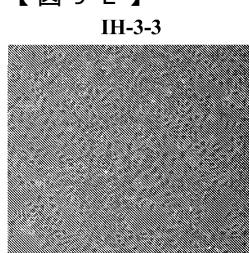
【図 9 D】



【図 9 B】

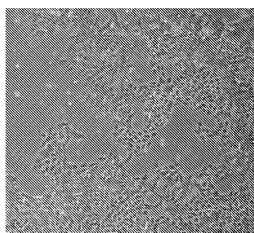


【図 9 E】



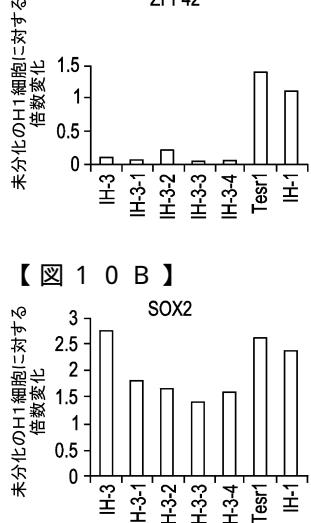
【図 9 F】

IH-3-4



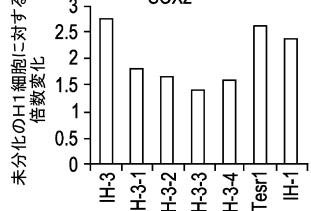
【図 10 A】

ZPF42



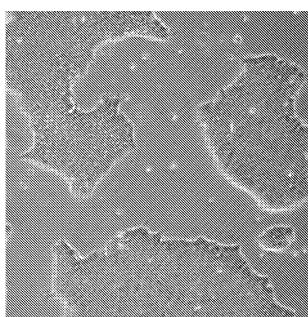
【図 10 B】

SOX2



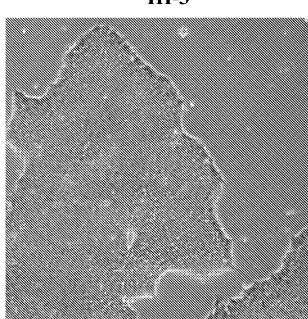
【図 11 A】

Tesr1



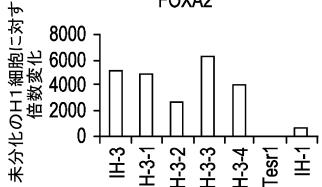
【図 11 B】

IH-3



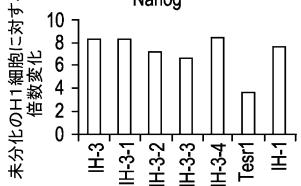
【図 10 C】

FOXA2



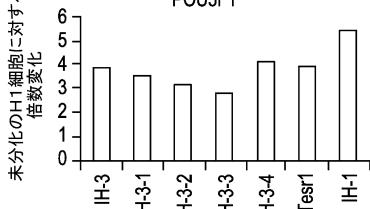
【図 10 D】

Nanog



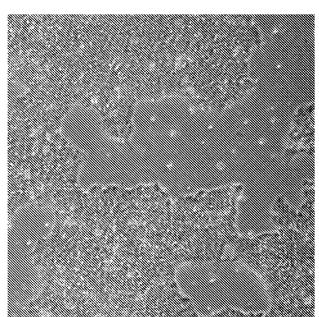
【図 10 E】

POU5F1



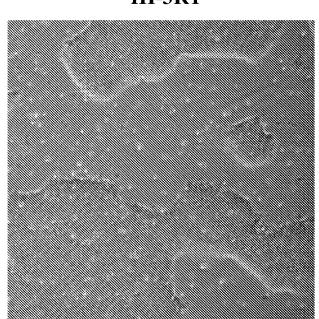
【図 11 C】

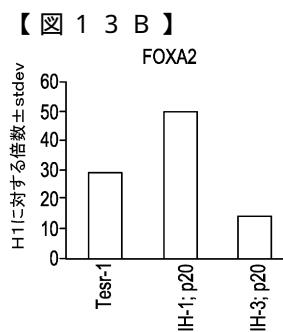
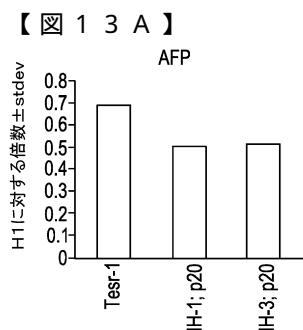
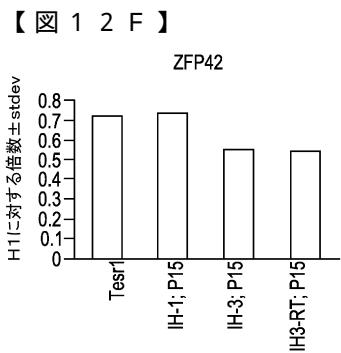
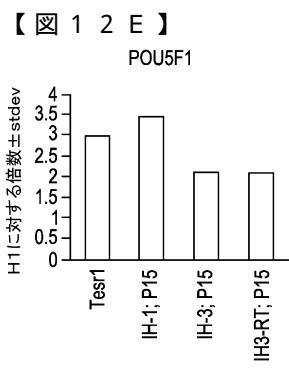
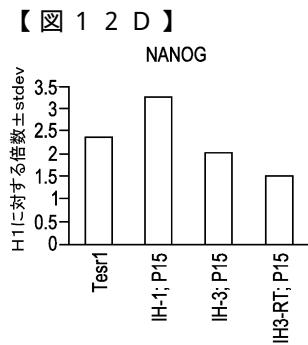
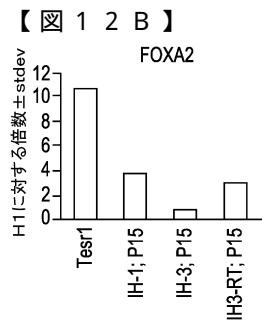
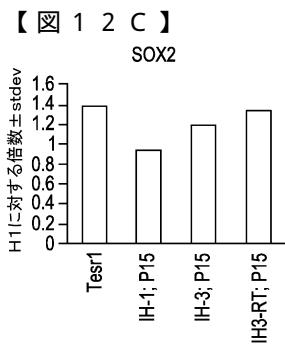
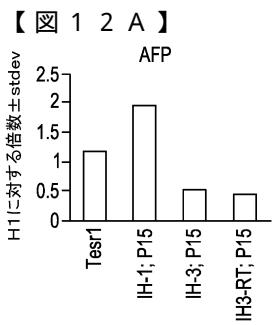
IH-1

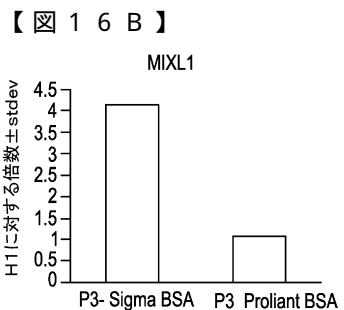
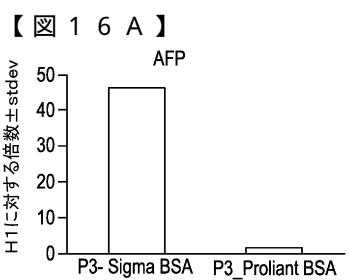
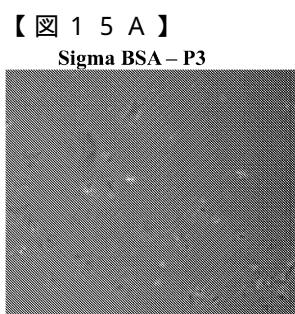
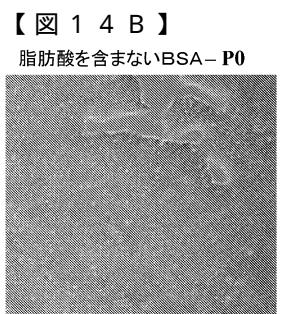
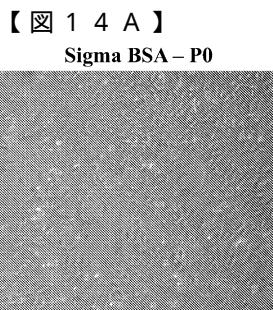
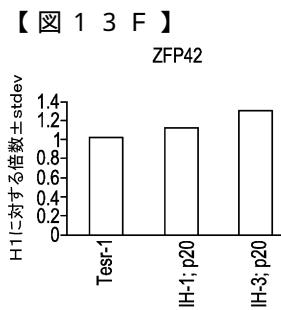
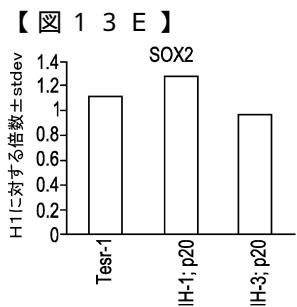
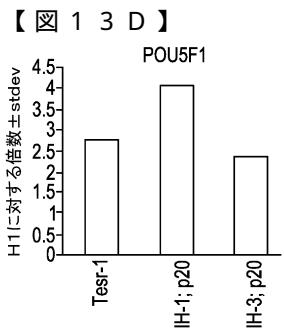
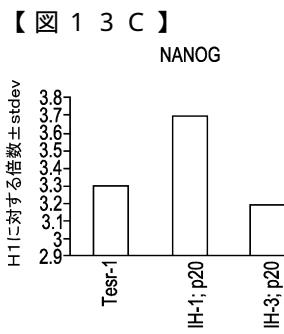


【図 11 D】

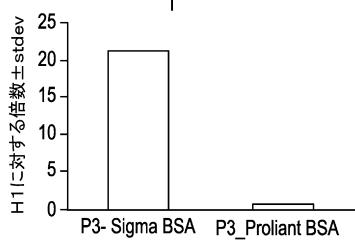
IH-3RT



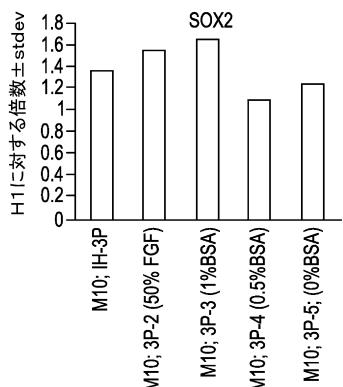




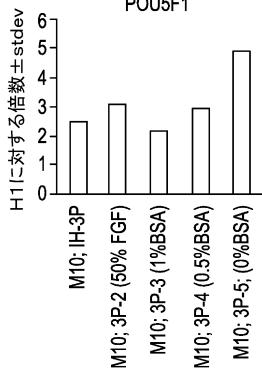
【図 1 6 C】



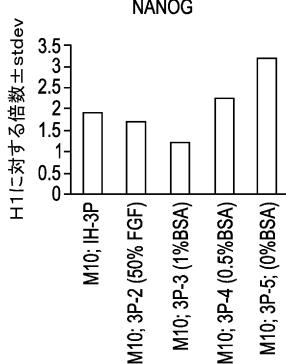
【図 1 7 A】



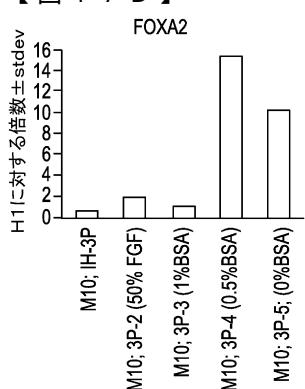
【図 1 7 B】



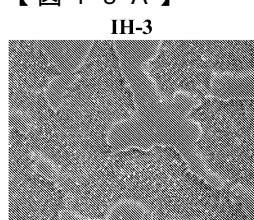
【図 1 7 C】



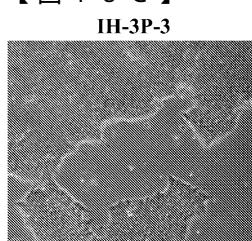
【図 1 7 D】



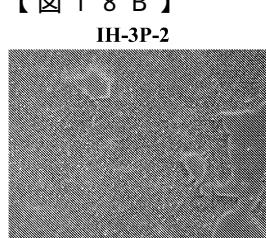
【図 1 8 A】



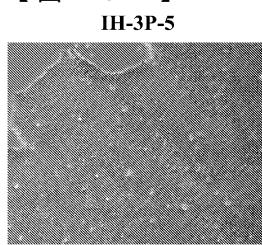
【図 1 8 C】



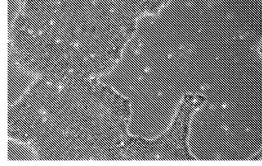
【図 1 8 B】



【図 1 8 E】



【図 1 8 D】



---

フロントページの続き

(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 08558 , スキルマン , グランドビュー ロード 19  
9

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 特表2008-512122 (JP, A)

特表2009-528034 (JP, A)

特開2011-177140 (JP, A)

米国特許出願公開第2008/0241919 (US, A1)

米国特許出願公開第2010/0261152 (US, A1)

国際公開第2011/096223 (WO, A1)

Science, 1998年, Vol.282, p.1145-1147

Reproductive BioMedicine Online, 2005年, Vol.10, No.5, p.617-627

Nature Biotechnology, 2008年, Vol.26, No.3, p.313-315

Curr. Protocols in Stem Cell Biol., 2007年, Supplement 2, p1C.2.1-1C.2.16

Stem Cells and Development, 2008年, Vol.17, p.1-11

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/00 - 7/00

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

WPI DDS / WPIX (STN)

PubMed