

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6444307号
(P6444307)

(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/071 (2010.01)
 C 1 2 N 5/0735 (2010.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 35/42 (2015.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/071
 C 1 2 N 5/0735
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 35/42
 A 6 1 P 11/00

請求項の数 14 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-533300 (P2015-533300)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月25日 (2013.9.25)
 (65) 公表番号 特表2015-530097 (P2015-530097A)
 (43) 公表日 平成27年10月15日 (2015.10.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/061687
 (87) 国際公開番号 W02014/052458
 (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014.4.3)
 審査請求日 平成28年7月29日 (2016.7.29)
 (31) 優先権主張番号 61/705,427
 (32) 優先日 平成24年9月25日 (2012.9.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503469393
 イエール ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー
 ヘブレン トウ ホイットニー アベニュー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胚体内胚葉を介したヒト肺胞 I I 型へのヒト I P S 細胞の分化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる方法であって、

a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；

b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程であって、前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導するために、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるヒト細胞外マトリックス (ECM) タンパク質と、骨形態形成タンパク質 (BMP) の阻害剤および形質転換成長因子ベータ (TGF- β) シグナル伝達の阻害剤を補った培地との存在下において、胚体内胚葉細胞が培養される、工程；

c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導するためにウシ胎仔血清および追加の成長因子を含む分化培地中で前部前腸内胚葉細胞を培養することによって、肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導する工程であって、分化培地中の唯一の追加の成長因子が、線維芽細胞成長因子 10 (FGF-10)、上皮成長因子 (EGF)、Wnt3a、ケラチノサイト成長因子 (KGF)、レチノイン酸 (RA)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される成長因子であり、該肺細胞が肺胞上皮 II 型細胞であり、該肺胞上皮 II 型細胞が選択可能マーカーによって選択されない、工程；ならびに

d) 肺胞上皮 II 型細胞を肺胞上皮 II 型細胞の集団へと拡大させる工程を含み、それによって肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる、方法。

【請求項 2】

10

20

幹細胞が、胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導するためにアクチビンAの存在下において血清なしで培養される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

BMPの阻害剤がノギン(NOGGIN)であり、かつTGF- β シグナル伝達の阻害剤がSB-431542である、請求項1記載の方法。

【請求項4】

肺胞上皮II型細胞が肺胞上皮II型前駆細胞である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

少なくとも95%の肺細胞が肺胞II型表現型を示す、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項6】

肺胞II型表現型が、サーファクタントタンパク質C (SPC)、ムチン-1、サーファクタントタンパク質B (SPB)、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である、請求項5記載の方法。

【請求項7】

肺細胞が脱細胞化された肺マトリックス上で培養される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；

b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程であって、前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導するために、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるヒト細胞外マトリックス(ECM)タンパク質と、骨形態形成タンパク質(BMP)の阻害剤および形質転換成長因子ベータ(TGF- β)シグナル伝達の阻害剤を補った培地との存在下において、胚体内胚葉細胞が培養される、工程；

20

c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導するためにウシ胎仔血清および追加の成長因子を含む分化培地中で前部前腸内胚葉細胞を培養することによって、肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導する工程であって、分化培地中の唯一の追加の成長因子が、線維芽細胞成長因子10 (FGF-10)、上皮成長因子(EGF)、Wnt3a、ケラチノサイト成長因子(KGF)、レチノイン酸(RA)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される成長因子であり、該肺細胞が肺胞上皮II型細胞であり、該肺胞上皮II型細胞が選択可能マーカーによって選択されない、工程；ならびに

30

d) 肺胞上皮II型細胞を肺胞上皮II型細胞の集団へと拡大させる工程を含み、それによって肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる、肺細胞へ幹細胞を分化させる方法

により産生された、肺細胞の集団。

【請求項9】

少なくとも95%の肺細胞が肺胞II型表現型を示す、請求項8記載の肺細胞の集団。

【請求項10】

肺胞II型表現型が、サーファクタントタンパク質C (SPC)、ムチン-1、サーファクタントタンパク質B (SPB)、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である、請求項9記載の肺細胞の集団。

40

【請求項11】

遺伝子改変細胞を含む、請求項8記載の肺細胞の集団。

【請求項12】

細胞が、治療用遺伝子を発現するように遺伝子改変される、請求項8記載の肺細胞の集団。

【請求項13】

細胞が、新鮮単離されたヒト初代肺胞II型細胞に類似する、請求項8記載の肺細胞の集団。

50

【請求項14】

哺乳動物において肺欠損を軽減または処置するための医薬を製造するための、組成物の使用であって、該組成物が、肺細胞へ幹細胞を分化させる方法により産生された肺細胞の集団を含み、ここで分化の方法が、

a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；

b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程であって、前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導するために、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるヒト細胞外マトリックス(ECM)タンパク質と、骨形態形成タンパク質(BMP)の阻害剤および形質転換成長因子ベータ(TGF-β)シグナル伝達の阻害剤を補った培地との存在下において、胚体内胚葉細胞が培養される、工程；

10

c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導するためにウシ胎仔血清および追加の成長因子を含む分化培地中で前部前腸内胚葉細胞を培養することによって、肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導する工程であって、分化培地中の唯一の追加の成長因子が、線維芽細胞成長因子10(FGF-10)、上皮成長因子(EGF)、Wnt3a、ケラチノサイト成長因子(KGF)、レチノイン酸(RA)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される成長因子であり、該肺細胞が肺胞上皮II型細胞であり、該肺胞上皮II型細胞が選択可能マーカーによって選択されない、工程；ならびに

d) 肺胞上皮II型細胞を肺胞上皮II型細胞の集団へと拡大させる工程を含み、それによって肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる方法である、使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2012年9月25日付で出願された米国特許仮出願第61/705,427号の優先権を主張するものであり、その内容は全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

肺疾患は米国において死亡原因の第3位であり、毎年400,000人超の死亡を伴う(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Petersen TH, et al. 2011. Material today 14(5): 196-201)。肺移植は、終末期肺疾患を有する人に可能な処置である。ドナー肺の低い可用性により肺移植は制限される。さらに、この集団においては外科的、内科的および免疫学的合併症がかなりの死亡率および罹患率を引き起こす。結果として、多くの患者が順番待ちの間にまたは移植合併症のために毎年死亡している(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Nichols JE, et al. 2012. J Cell Biochem 113(7):2185-2192, McCurry KR, et al. 2009. Am J Transplant 9(Part 2):942-958)。

30

【0003】

ヒト肺から単離された成人肺幹細胞および前駆細胞または肺胞細胞の移植は、全器官移植の代用として浮上している(Wang D, et al. 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104(11):4449-4454)。しかしながら、このアプローチはまた、ヒト上皮細胞の不足、およびインビトロでこれらの細胞を拡大させることの難しさによって制限される。さらに、損傷した肺におけるインビボでのそのような細胞の生着の成功は、未だ実証されていない(Wang D, et al. 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104(11):4449-4454, Tesei A, et al. 2009. Cell Prolif 42(3):298-308, Fujino N, et al. 2012. Am J Respir Cell Mol Biol 46(4):422-430)。

40

【0004】

重篤な肺疾患に対する今後の潜在的処置の1つは、ガス交換ができる人工肺による移植である。免疫学的拒絶を回避するため、そのような人工肺は、個体特異的な(自家の)肺お

50

よび気道細胞を用いて作出されるべきである(Nichols JE, et al. 2012. J Cell Biochem 113(7):2185-2192, Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541, Badylak SF, et al. 2012. Lancet 379(9819):943-952)。それゆえ、肺関連の治療法において使われる機能的な肺上皮細胞の信頼性のある供給源を特定することがかなり重視されている(Petersen TH, et al. 2011. Material today 14(5): 196-201, Kotton DN, et al. 2012. Am J Respir Crit Care Med 185(12): 1255-1260)。

【0005】

誘導多能性幹(iPS)細胞は、特異的な多能性遺伝子の「強制」発現を誘導することにより胚様状態に再プログラム化している成人幹細胞の産物である(Takahashi K, et al. 2007. Cell 131(5):861-872, Yu J, et al. 2007. Science 318(5858): 1917-1920)。ヒトiPS細胞を用いることが、肺関連の細胞療法および組織工学において有益でありうる呼吸上皮細胞を発生させるのに最も効果的な戦略でありうるものと推論される(Nishikawa S, et al. 2008. Nat Rev Mol Cell Biol 9(9):725-729, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397)。iPS細胞は、処置される患者に由来しうることを考えれば、それらは、患者と遺伝的に同一である細胞源となり、これらの細胞から作出された組織が免疫拒絶を回避することを可能にしうる(Badylak SF, et al. 2012. Lancet 379(9819):943-952, Yu J, et al. 2007. Science 318(5858): 1917-1920)。

【0006】

肺上皮へのヒト胚性幹細胞およびiPS細胞(それぞれhESCおよびiPSC)の分化は、困難だがやりがいがある。いくつかの研究グループが種々のプロトコルを用いて、肺胞II型細胞(AETII細胞)と他の気道上皮の両方を含む、ある範囲の肺上皮細胞型の方角への分化の成功について報告している(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Wang D, et al. 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104(11):4449-4454, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397, Van Haute L, et al. 2009. Respir Res 10: 105, Ali NN, et al. 2002. Tissue Eng 8(4):541-550, Rippon HJ, et al. 2006. Stem Cells 24(5): 1389-1398, Samadikuchaksaraei A, et al. 2006. Tissue Eng 12(4):867-875)。しかしながら、高い均一性を有して肺胞上皮系統に沿ってhESCまたはiPSCを分化させる条件は未だに報告されておらず、ほとんどのプロトコルがhESCまたはiPSCから上皮細胞の混合集団を生ずる。

【0007】

最近では、器官工学における焦点は、心臓、肝臓、および腎臓などの複雑な器官を脱細胞化すること、ならびに器官に特異的な細胞での再生のための足場として無細胞マトリックスを用いることに集中している。脱細胞化された器官は、細胞外マトリックスの鋳型を有するので、それは、適切な3次元(3D)構造および領域に特異的な細胞接着部位を含む(Nichols JE, et al. 2012. J Cell Biochem 113(7):2185-2192, Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541)。ドナー肺に由来する細胞外マトリックスを用い、自家細胞から肺組織(例えば、自家iPS由来の上皮)を再生できることが、それゆえ、主要な医学的進歩となるであろう。肺工学においてこれを達成する1つの方法は、ヒトiPSCを呼吸上皮細胞へおよび/または推定される呼吸器系の生後幹細胞へ分化させることであり、これらの細胞を肺無細胞マトリックスに再播種することである(Badylak SF, et al. 2012. Lancet 379(9819):943-952)。

【0008】

自家細胞からの肺組織の再生が当技術分野において必要とされている。本発明は、当技術分野におけるこの満たされていない必要に応える。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる方法であって、a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程; b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程; c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程

を含む、方法を提供する。

【0010】

1つの態様において、幹細胞は、胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導するためにアクチビンAの存在下において血清なしで培養される。

【0011】

1つの態様において、胚体内胚葉細胞は、前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導するために、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質ならびに骨形態形成タンパク質(BMP)の阻害剤およびTGF- β シグナル伝達の阻害剤を補った培地の存在下において培養される。

【0012】

1つの態様において、BMPの阻害剤はノギン(NOGGIN)であり、TGF- β シグナル伝達の阻害剤はSB-431542である。

10

【0013】

1つの態様において、ECMタンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるヒトECMである。

【0014】

1つの態様において、前部前腸内胚葉細胞は、肺胞上皮II型細胞である肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導するために、FGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む分化培地の存在下において培養される。

20

【0015】

1つの態様において、分化培地はBMP4を含まない。

【0016】

1つの態様において、肺胞上皮II型細胞は肺胞上皮II型前駆細胞である。

【0017】

1つの態様において、肺細胞の集団は、肺胞II型表現型を示す細胞が少なくとも95%である。

【0018】

1つの態様において、肺胞II型表現型は、SPC、ムチン-1、SPB、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である。

30

【0019】

1つの態様において、肺細胞は脱細胞化された肺マトリックス上で培養される。

【0020】

本発明は、a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程； b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程； c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、肺細胞へ幹細胞を分化させる方法により産生された肺細胞の集団を提供する。

【0021】

1つの態様において、集団は、肺胞II型表現型を示す細胞が少なくとも95%である。

【0022】

1つの態様において、肺胞II型表現型は、SPC、ムチン-1、SPB、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である。

40

【0023】

1つの態様において、細胞の集団は遺伝子改変細胞を含む。

【0024】

1つの態様において、細胞は、治療用遺伝子を発現するように遺伝子改変される。

【0025】

1つの態様において、細胞は、新鮮単離されたヒト初代肺胞II型細胞に類似する。

【0026】

本発明は同様に、肺細胞へ幹細胞を分化させる方法により産生された肺細胞の集団を含む組成物の治療的有効量を哺乳動物に投与し、それによって該哺乳動物における肺欠損を

50

軽減または処置する工程を含み、ここで分化の方法が、a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程；c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、哺乳動物において肺欠損を軽減または処置する方法を提供する。

[本発明1001]

肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる方法であって、a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程；c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、前記方法。

[本発明1002]

幹細胞が、胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導するためにアクチビンAの存在下において血清なしで培養される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

胚体内胚葉細胞が、前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導するために、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質ならびに骨形態形成タンパク質(BMP)の阻害剤およびTGF- β シグナル伝達の阻害剤を補った培地の存在下において培養される、本発明1001の方法。

[本発明1004]

BMPの阻害剤がノギン(NOGGIN)であり、かつTGF- β シグナル伝達の阻害剤がSB-431542である、本発明1003の方法。

[本発明1005]

ECMタンパク質が、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるヒトECMである、本発明1003の方法。

[本発明1006]

前部前腸内胚葉細胞が、肺胞上皮II型細胞である肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導するために、FGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む分化培地の存在下において培養される、本発明1001の方法。

[本発明1007]

分化培地がBMP4を含まない、本発明1006の方法。

[本発明1008]

肺胞上皮II型細胞が肺胞上皮II型前駆細胞である、本発明1006の方法。

[本発明1009]

肺細胞の集団は、少なくとも95%の細胞が肺胞II型表現型を示す、本発明1001の方法。

[本発明1010]

肺胞II型表現型が、SPC、ムチン-1、SPB、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である、本発明1009の方法。

[本発明1011]

肺細胞が脱細胞化された肺マトリックス上で培養される、本発明1001の方法。

[本発明1012]

a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程；b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程；c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、肺細胞へ幹細胞を分化させる方法により産生された肺細胞の集団。

[本発明1013]

少なくとも95%の細胞が肺胞II型表現型を示す、本発明1012の肺細胞の集団。

[本発明1014]

肺胞II型表現型が、SPC、ムチン-1、SPB、CD54、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される肺胞II型細胞マーカーの発現である、本発明1013の肺細胞の集団。

[本発明1015]

遺伝子改変細胞を含む、本発明1012の肺細胞の集団。

10

20

30

40

50

[本発明1016]

細胞が、治療用遺伝子を発現するように遺伝子改変される、本発明1012の肺細胞の集団。

[本発明1017]

細胞が、新鮮単離されたヒト初代肺胞II型細胞に類似する、本発明1012の肺細胞の集団。

[本発明1018]

肺細胞へ幹細胞を分化させる方法により産生された肺細胞の集団を含む組成物の治療的有効量を哺乳動物に投与し、それによって該哺乳動物における肺欠損を軽減または処置する工程を含み、ここで分化の方法が、a) 胚体内胚葉細胞へ幹細胞を誘導する工程； b) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉細胞を誘導する工程； c) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、哺乳動物において肺欠損を軽減または処置する方法。

【図面の簡単な説明】**【0027】**

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付図面と併せて読むことによってより良く理解されよう。本発明を説明するために、図中、好ましい態様を示されている。しかしながら、本発明は、図示する態様の正確な構成および手段に限定されないことが理解されるべきである。

【0028】

【図1】 図1A～1Dを含む図1は、実験を要約した図表を描く一連の画像である。図1A: 22日間のインビトロでのAETIIへのiPSCの有向分化の模式的プロトコルを描く画像である。パネルの上部に示した異なる段階でサイトカインを加えた。図1B: 肺発生段階および各段階での対応マーカーを描く画像である。図1C: iPSC分化ならびにiPSC由来AETII細胞によるラットおよびヒトの両方の肺の脱細胞化-再細胞化を要約した略図を描く画像である。図1D: 0日目のiPSC、6日目のDE細胞、ならびにAETII細胞と名付けた、15日目および22日目の分化細胞の一連の位相差画像である。スケールバー, 63 μm 。

【図2】 図2A～2Oを含む図2は、前部前腸内胚葉(AFE)を産生するための分化8日目の細胞の特徴付けを描く一連の画像である。(図2A～2I) AFEマーカーの免疫蛍光分析；(図2A、2D、2G)は核のDAPI染色を示す；(図2B、2E、2H)はPAX9、TBX1およびSOX2陽性細胞を示す；(図2C、2F、2I)は8日目時点の重ね合わせを示す。(図2J) AFE細胞がSOX2およびFOXA2の両方について陽性であることを示す免疫蛍光染色。(図2K) アクチピンAおよびRPMI培地のみにおいて培養された細胞と比べて8日目時点のAFE細胞におけるSOX2およびFOXA2についての二重陽性細胞のフローサイトメトリー分析(Y軸: FOXA2/SOX2についての%陽性細胞)。(図2L) 8日目時点のインビトロでDE細胞から作出されたAFEにおけるSOX2、TBX1およびPAX9のmRNA発現(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびiPS細胞と比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ。Y軸: iPSCと比べた遺伝子発現の倍変化)。(図2M) 核のDAPI染色、NKX2.1陽性細胞、および重ね合わせによって定量化された前部前腸内胚葉の誘導後13日目のNKX2.1の発現。(図2N) FOXA2について陽性染色されたAFEにおけるNKX2.1細胞を示す免疫蛍光染色であり、これらの細胞は甲状腺前駆細胞ではなく、より多くが肺前駆細胞であることを示す。(図2O) NKX2.1陽性細胞のフローサイトメトリー分析。最大4%までのAFE細胞が13日目時点でNKX2.1陽性であった。(Y軸: NKX2.1陽性細胞の割合)。バーは、qRT-PCRおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3の平均±SEMを示す。*は、統計的に有意な差p-値 < 0.05を示す。スケールバー, 31 μm 。

【図3】 図3A～3Kを含む図3は、分化22日目の、iPSC (C1クローン)に由来するAETII細胞の機能的特徴付けを描く一連の画像である。(図3A～3D) 肺胞II型マーカー(図3A) ProSPC、(図3B) ムチン-1、(図3C) proSPA、(図3D) ProSPBの免疫染色。(スケールバー, 63 μm) (図3E～3F) 透過電子顕微鏡検査は、特徴的な細胞質の層状体を含んだ(図3E) ヒトAETIIおよび(図3F) iPSC由来AETIIを示す(スケールバー, 0.5 μm)。(図3G) 3回の独立した実験からの、ヒトAETIIと比べた未分化iPSC、DE、AFEおよび分化AETII細胞におけるqRT-PCR分

10

20

30

40

50

析。関心対象の遺伝子(SPA、SPB、SPC、およびムチン-1)に対する三つ組のPCR反応からの値は、同じcDNAサンプルからの平均GAPDH Ct値に対して正規化された。iPS由来AETII細胞とヒトII型細胞との間のGOI転写産物レベルの倍変化は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ に等しく、ここで $\Delta Ct = Ct_{(GOI)} - Ct_{(GAPDH)}$ 、および $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(AETII)} - \Delta Ct_{(ATII)}$ 。(図3H) 22日目時点の肺胞II型およびI型マーカーについての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。細胞はp63およびSOX2について陰性であった。(図3I) iPSC-AETIIにおけるアルブミン、CD31、TSHR、およびCC10 (CCSP)の発現。細胞は22日目時点で他の系統を示す遺伝子について陰性であった。(図3J) ELISAによって判定された、ヒトII型細胞と比べて分化の経過中に回収されたiPSC由来AETII上清中の分泌SPCの量。(図3K) 22日目時点のiPSC-AETII中のproSPCおよび内部対照としての β -アクチンに対するウェスタンブロット。バーは、qRT-PCR、ELISAおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および±SEMを示す。^{*}は、統計的に有意な差p-値 < 0.05を示す。

【図4】図4A～図4Dを含む図4は、分化29日目の、iPSC (C1クローン)に由来するAETI細胞の機能的特徴付けを描く一連の画像である。(図4A～4B)肺胞I型マーカー(図4A) T1 α (図4B)カベオリン-1の免疫蛍光染色(スケールバー, 63 μ m)。(図4C) IWR-1の存在下および非存在下における29日目時点の肺胞I型マーカーについての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析(Y軸: %陽性細胞)。(図4D) 3回の独立した実験からの、天然ヒトI型(AETI)細胞と比べたAETI細胞におけるqRT-PCR分析。関心対象の遺伝子(AQ5、T1 α 、カベオリン-1)に対する三つ組のPCR反応からの値は、同じcDNAサンプルからの平均GAPDH Ct値に対して正規化された。iPS由来AETI細胞とヒトI型細胞との間のGOI転写産物レベルの倍変化は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ に等しく、ここで $\Delta Ct = Ct_{(GOI)} - Ct_{(GAPDH)}$ 、および $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(AETI)} - \Delta Ct_{(hAETI)}$ (Y軸: ヒトI型細胞と比べた相対的遺伝子発現)。バーは、qRT-PCR、ELISAおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および±SEMを示す。

【図5】図5A～図5Pを含む図5は、バイオリアクタ中のiPSC由来AETII再細胞化3Dラット肺組織足場を描く一連の画像である。(図5A)脱細胞化ラット肺のH&E染色；(図5B～5C)バイオリアクタ中で培養されたiPSC由来AETII細胞を3日間および7日間播種したラット肺のH&E染色(スケールバー 25 μ m)。(図5D～5F) 3日目時点のAETII播種細胞におけるpro-SPCの免疫蛍光染色。(図5D) DAPI染色；(図5E) Pro-SPC；(図5F)重ね合わせ(図5F中の矢印は、pro-SPCについての陽性細胞を示す)。(図5G～I) 7日目時点のNKX2.1についての免疫染色。(図5G) DAPI、(図5H) NKX2.1、(図5I)重ね合わせ(図5I中の矢印は、NKX2.1についての陽性細胞を示す)。(図5J～5M) 7日目時点のカスパーゼおよびPCNA免疫染色(矢印は、図5L中ではPCNAおよび図5M中ではカスパーゼについての陽性細胞を示す) (スケールバー, 25 μ m)。(図5N) 3日目と比べて7日目時点の増殖。iPSC-AETIIは、それらがPCNAについて染色された時点から7日後に有意に高い分別増殖(fractional proliferation)を呈した(P<0.05) (Y軸: PCNAについて染色された陽性核の数に基づいた%増殖)。(図5O) 7日目時点でT1 α 陽性およびNKX2.1陰性の、扁平な形態を獲得した少数の生着上皮細胞の免疫染色(スケールバー, 63 μ m、図5O中の矢印は、T1 α についての陽性細胞を示す)。(図5P)バイオリアクタ中のラット肺足場への播種前後のSPC、T1 α 、CCSP、p63およびSOX2についてのフローサイトメトリー。SPC陽性細胞の数は7日間の培養中に減少したが、T1 α 陽性細胞の数は9%から31.2%まで増加した。iPS細胞から分化した細胞は全て、細胞播種の前後にCCSP、p63およびSOX2について陰性であった。

【図6】図6A～図6Vを含む図6は、iPSC由来AETII (C1クローン)が無細胞ラットおよびヒト肺マトリックスの切片に接着することを実証する一連の画像である。(図6A～G) 7日目時点のヒト肺切片上のiPSC-AETII。(図6A) H&E, スケールバー 200 μ m (図6B) SPCおよびCCSPについての免疫染色。(図6C) NKX2.1およびT1 α についての免疫染色(矢印は、図6BではSPCおよび図6CではT1 α についての陽性細胞を示す、スケールバー, 63 μ m)。(図6D～6F) NKX2.1についての免疫染色。(図6D) DAPI、(図6E) NKX2.1、(図6F)重ね合わせ、スケールバー 50 μ m (図6G)カスパーゼおよびPCNA免疫染色、スケールバー 49 μ m。(図6H～6O) 7日間ラット肺切片上で培養されたiPSC由来AETII。(図6H) H&E, スケールバー 200 μ m (図6I) SPCおよびCCSPについての免疫染色。(図6J～6K) NKX2.1およびT1 α について

の免疫染色(矢印は、図6IではSPC、図6JではT1 α および図6KではNKX2.1についての陽性細胞を示す)、スケールバー 63 μm 。(図6L) DAPI染色 (図6M) PCNAおよび(図6N)カスパーゼ、(図6O)重ね合わせについての免疫染色(スケールバー 50 μm)。(図6P~6V) 7日間ヒト肺切片上で培養された、新鮮成人ヒト肺から単離された、天然ヒトAETII細胞。(図6P) H&E, スケールバー 200 μm 。(図6Q) SPCおよびCCSPについての免疫染色、スケールバー 63 μm (図6R) NKX2.1およびT1 α についての免疫染色、スケールバー 63 μm (矢印は、図6QではSPCおよび図6RではT1 α についての陽性細胞を示す)。(図6S~6U) NKX2.1についての免疫染色。(図6S) DAPI、(図6T) NKX2.1、(図6U)重ね合わせ、スケールバー 50 μm 。(図6V)カスパーゼおよびPCNA免疫染色、スケールバー 49 μm 。

【図7】図7A~図7Mを含む図7は、6日目時点の、iPSC (C1クローン)に由来する胚体内胚葉(DE)細胞の機能的特徴付けを描く一連の画像である。(図7A~7F) 6日目時点のDEマーカータンパク質SOX17およびFOXA2の免疫蛍光分析。(図7Aおよび図7D)核をDAPIで染色した、(図7Bおよび図7E)はDE細胞におけるSOX17、FOXA2染色を示す、(図7Cおよび図7E)重ね合わせ。(図7G~7J) DE細胞が6日目時点でSOX17およびFOXA2の両方について陽性であることを示す免疫蛍光染色、(図7K)アクチビンAなしの培地中で培養されたiPSと比べて、6日目時点の、アクチビンAに曝露されたDE細胞におけるSOX17/FOXA2二重陽性細胞のフローサイトメトリー分析、(図7L) qRT-PCRによる3回の独立した実験からのSOX17、FOXA2およびCXCR4のmRNA発現。(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびiPSCと比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ)、(図7M) 6日目時点のiPSC細胞でのアクチビンAを介した胚体内胚葉誘導中のSOX17、FOXA2およびCXCR4のフローサイトメトリー分析(対応するアイソタイプで染色されたDE細胞と比較)。バーは、qRT-PCRおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および $\pm$ SEMを示す。グラフ上の*は、統計的に有意な差p-値 < 0.005を示す、スケールバー, 31 μm 。

【図8】図8A~図8Mを含む図8は、6日目時点の、iPSC C2クローンに由来する胚体内胚葉細胞の特徴付けを描く一連の画像である：(図8A~8F)アクチビンA誘導6日目時点の胚体内胚葉マーカーSOX17およびFOXA2の免疫蛍光染色(スケールバー, 31 μm)、(図8G~8J) DE細胞がSOX17およびFOXA2の両方について陽性であることを示す免疫蛍光染色、(図8K)アクチビンAなしの培地中で培養されたiPSと比べて、6日目時点の、アクチビンAに曝露されたDE細胞におけるSOX17/FOXA2二重陽性細胞のフローサイトメトリー分析、(図8L) 6日目時点の、qRT-PCRによって定量化されたC2 iPSCにおけるSOX17、CXCR4およびFOXA2 mRNAの発現。(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびiPS細胞と比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ)、(図8M) 6日目時点のC2 iPSC由来DEにおけるSOX17、CXCR4およびFOXA2の代表的なフローサイトメトリー分析。バーは、qRT-PCRおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および $\pm$ SEMを示す。グラフ上の*は、統計的に有意な差p-値 < 0.005を示す、スケールバー, 31 μm 。

【図9】図9A~図9Oを含む図9は、C2 iPSC細胞におけるノギン/SB-431542処理胚体内胚葉でのAFEマーカーの分析を描く一連の画像である。(図9A~9I) AFEマーカーの免疫蛍光染色；C2 iPSC細胞におけるノギン/SB431542誘導2日後(8日目時点)の、SOX2、TBX1、PAX9。スケールバー, 31 μm 、(図9J) AFE細胞が8日目時点でSOX2およびFOXA2の両方について陽性であることを示す免疫蛍光染色、(図9K) 8日目時点のAFE細胞におけるSOX2/FOXA2二重陽性細胞のフローサイトメトリー分析。85%超の細胞がSOX2およびFOXA2の両方について二重陽性であった。(図9L) 8日目時点のC2 iPSC細胞におけるqRT-PCRによって定量化されたTBX1、SOX2、およびPAX9 mRNAの発現(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびiPSC細胞と比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ)。(図9M) 13日目時点のクローンC2に由来するAFEにおけるNKX2.1の免疫蛍光染色(スケールバー, 31 μm)。(図9N) AFE細胞が13日目時点でNKX2.1およびFOXA2の両方について陽性であることを示す免疫蛍光染色；ほとんどのNKX2.1陽性細胞がFOXA2について陽性染色された(スケールバー, 31 μm)。(図9O) 13日目時点のAFE細胞におけるNKX2.1陽性細胞のフローサイトメトリー分析。DEをノギン/SB431542に曝露することで、26%のNKX2陽性細胞が得られる。バーは、qRT-PCRおよびフローサイトメトリーに対する生物学関連の三つ組の繰り返しn=3および $\pm$ SEMを示

10

20

30

40

50

し、* は、統計的に有意な差 p -値 < 0.05 を示す。

【図 1 0】図10A～図10Cを含む図10は、さまざまな細胞外マトリックスタンパク質上でのAETII (22日目)へのDE細胞(6日目)の分化を実証する一連のグラフである。qRT-PCRによって定量化された、コラーゲンI型、コラーゲンIV型、フィブロネクチン(fibronectin)、ならびにヒトECMタンパク質およびマトリゲル上で分化されたAETIIにおける(図10A) SPC、(図10B) SPBおよび(図10C) NKX2.1発現。iPSC由来DEは、さまざまなECMタンパク質上でAETIIに分化した。さまざまなECMタンパク質上でのiPS由来AETII細胞における遺伝子発現を、マトリゲル上のiPS由来hAETII細胞において認められたレベルと比較した。関心対象の遺伝子(SPB、SPC、およびNKX2.1)に対する三つ組のPCR反応からの3回の独立した実験のCt値を、同じcDNAサンプルからの平均GAPDH Ct値に対して正規化した。各ECMタンパク質上のiPS由来AETIIとマトリゲル上のiPS由来AETII細胞との間のGOI転写産物レベルの倍変化は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ に等しく、ここで $\Delta Ct = Ct_{(GOI)} - Ct_{(GAPDH)}$ 、および $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(関心対象のECM上のiPSC-AETII)} - \Delta Ct_{(マトリゲル上のiPSC-AETII)}$ である。ヒトECMは各個々のECMタンパク質と比べて有意に高いレベルのSPC、SPBおよびNKX2.1の発現を誘導した。(バーは、 $\pm$ SEMおよび独立した実験 $n=3$ を示す)。

【図 1 1】図11A～図11Jを含む図11は、C2 iPSC系から分化したAETIIの機能的特徴付けを描く一連の画像である。(図11A) AETII細胞の位相差画像。(図11B～11Cおよび図11E～11F)肺胞II型マーカーの免疫蛍光染色；(図11B)プロサーファクタントタンパク質B (ProSPB)、(図11C)ムチン-1、(図11E)サーファクタントタンパク質A (SPA)、(図11F)プロサーファクタントタンパク質C (ProSPC) スケールバー、63 μm 、(図11D) 透過電子顕微鏡検査は、特徴的な細胞質の層状体を含んだAETIIを示す(スケールバー、1 μm) (図11G) 3回の独立した実験からの、新鮮ヒト肺に由来するhAETII細胞と比べたC2クローンに由来する未分化iPSC、DE、AFEおよびAETII細胞におけるqRT-PCR分析、関心対象の遺伝子(SPA、SPB、SPC、ムチン-1)に対する三つ組のPCR反応からの値は、同じcDNAサンプルからの平均GAPDH Ct値に対して正規化された。iPS由来AETIIとヒトII型細胞との間のGOI転写産物レベルの倍変化は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ に等しく、ここで $\Delta Ct = Ct_{(GOI)} - Ct_{(GAPDH)}$ 、および $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(AETII)} - \Delta Ct_{(ATII)}$ である、(図11H) 22日目時点の肺胞II型マーカーについての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。集団の95%超は、CCSP (クララ細胞マーカー)、p63 (基底幹細胞マーカー)について陰性であり、II型細胞マーカー(CD54, SPB, SPC, Mucin-1)について陽性であった、(図11I) iPSC由来AETIIにおけるアルブミン、CD31、TSHR、CC10 (CCSP)の発現；それらは22日目時点で他の系統を示す遺伝子について陰性であった。(図11J) 酵素結合免疫吸着測定分析によって判定された、ヒト肺から単離されたAETII由来のSPC分泌と比べて分化の経過中のiPSC由来AETIIにおける分泌SPCの量。バーは、qRT-PCR、ELISAおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験 $n=3$ および $\pm$ SEMを示す。
* は、統計的に有意な差 p -値 < 0.05 を示す。

【図 1 2】図12A～図12Dを含む図12は、実験の結果を描く一連のグラフである。(図12A～12B) qRT-PCRによって定量化されたAETII細胞への分化中のDE特異的およびAFE特異的遺伝子の逐次的な上方および下方制御。(図12A～12B) DE細胞における遺伝子発現の比率は、(図12A) C1クローンおよび(図12B) C2クローンにおいてqRT-PCRにより定量化された分化中のiPSCに匹敵する(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびDE細胞と比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ)(図12C～12D) (図12C) C1クローンおよび(図12D) C2クローンにおいてqRT-PCRにより定量化されたAETIIへのiPSCの分化中のAFE特異的タンパク質の逐次的な上方および下方制御。GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化およびAFE細胞と比べた遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ；バーは、 $\pm$ SEMおよび独立した実験 $n=3$ を示す。

【図 1 3】図13A～図13Dを含む図13は、肺胞上皮へのiPSC細胞(C1クローン)の分化中のNKX2.1およびSPC発現の動態を描く一連の画像である。(図13A～13B)リアルタイムqRT-PCRによって定量化された、さまざまな日のNKX2.1およびSPC mRNA発現の動態。(図13A) AETIIへのiPS細胞の分化中のSPC発現。SPCのCt値は、GAPDHに対して正規化されており、ヒト肺から単離されたATII細胞(hAETII)において認められたレベルに対して表されている。(図13

B) AETIIへのiPS細胞の分化中のNKX2.1。GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化として表され、単離されたヒト初代II型において認められたレベルに対して表されたデータ。(図13C~13D) 13日目から22日目までの(図13C) NKX2.1および10日目から22日目までの(図13D) SPCについての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。バーは、PCRおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および±SEMを示す。

【図14】図14A~図14Dを含む図14は、肺胞上皮へのiPSC細胞(C2クローン)の分化中のNKX2.1およびSPC発現の動態を描く一連の画像である。(図14A~14B) iPSC由来AETII (C2クローン)においてリアルタイムRT-PCRによって定量化された、さまざまな日のNKX2.1およびSPC mRNA発現。(図14A) 0日目から32日目までの分化中のSPC発現。SPCのCt値は、GAPDHに対して正規化されており、ヒト肺から単離されたAETII細胞(hATII)において認められたレベルに対して表されている(図14B) 分化中のNKX2.1発現。GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化として表され、単離されたヒトII型において認められたレベルに対して表されたデータ(図14C~14D) 13日目から22日目までの(図14C) NKX2.1および10日目から22日目までのSPC(図14D)についての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。バーは、PCRおよびフローサイトメトリーに対する独立した実験n=3および±SEMを示す。

【図15】図15A~図15Dを含む図15は、肺胞上皮へのiPSC細胞の分化中の $\alpha 6 \beta 4$ およびCD166発現の動態を描く一連の画像である。(図15および図15C) (図15A) C1クローンおよび(図15C) C2クローンに由来するAETIIにおける10日目から28日目までのCD166についての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。(図15Bおよび図15D) (図15B) C1クローンおよび(図15D) C2クローンに由来するAETIIにおける8日目から22日目までの $\alpha 6 \beta 4$ についての陽性細胞の割合に関するフローサイトメトリー分析。

【図16】図16A~図16Eを含む図16は、0日目およびAETIIへの分化中のC2クローンにおける多能性マーカー分析を描く一連の画像である。(図16A) iPSCクローンC1およびC2の両方におけるiPSCマーカー; OCT4、Nanog、SSEA4、Tra1-81の免疫蛍光染色(スケールバー、100 μm)。両クローンは0日目時点で多能性遺伝子について陽性であった。(図16B~C) AETIIへの分化中のiPSC特異的遺伝子OCT4、SOX2、およびNanogの下方制御。OCT4、SOX2、およびNanogの発現は、長期的におよび32日目まで下方制御され、これらのマーカーは、(図16B)クローンC1および(図16C)クローンC2の両方に由来するiPSC由来AETIIにおいて検出不能であった(GAPDHに対して正規化されたmRNAの定量化および0日目時点のiPS細胞と比した遺伝子発現の平均の倍変化として表したデータ、バーは、SEMおよび独立した実験n=3を示す)、(図16D~16E) 0日目の分化AETII細胞におけるOCT4およびSPCの発現を、(図16D) C1クローンおよび(図16E) C2クローンについてフローサイトメトリーにより分析された22日目のものと比した。分化22日目の時点で、SPC陽性iPSC由来AETII細胞は、OCT4について陰性であった。

【図17】図17A~図17Mを含む図17は、iPSC C2クローンに由来するAETIIがバイオリアクタ中の3D肺組織足場を再細胞化するように応答することを実証する一連の画像である(図17A~17C)バイオリアクタ中(図17A) 3日目および(図17B~17C) 7日目時点のiPSC由来AETII細胞を播種した肺足場のH&E染色。スケールバー、200 μm 。(図17D~17F) 7日目時点の、バイオリアクタ中で培養されたiPSC由来AETII細胞を播種したラット肺足場上のSPCについての免疫染色(図17D)核をDAPIで染色した;(図17E) Pro-SPC染色を示す(図17F)重ね合わせ、スケールバー、50 μm (図17G~17I) 7日目時点の、バイオリアクタ中で培養されたiPSC由来AETII細胞を播種したラット肺足場上のNKX2.1についての免疫染色(図17G)核をDAPIで染色した;(図17H) NKX2.1染色を示す(図17I)重ね合わせ、スケールバー、50 μm (図17J~17M) 7日目時点の、バイオリアクタ中で培養されたiPSC由来AETII細胞のPCNAおよびカスパーゼについての免疫染色。スケールバー、49 μm 。

【発明を実施するための形態】

【0029】

詳細な説明

本発明は、幹細胞を肺細胞、好ましくは肺胞上皮II型細胞へ分化させる方法を提供する。1つの態様において、幹細胞はヒト誘導多能性幹(iPS)細胞である。

【0030】

1つの態様において、肺細胞を作出する方法は、胚体内胚葉(DE)集団を作出するためにアクチビンAの存在下において血清なしで幹細胞を培養する工程を含む。DE集団を次いで、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質ならびにBMPの阻害剤およびTGF-βシグナル伝達の阻害剤を補った培地の組み合わせの存在下においてDE細胞を培養することにより前部前腸内胚葉(AFE)へ分化させることができる。好ましくは、BMPの阻害剤はノギンであり、TGF-βシグナル伝達の阻害剤はSB-431542である。

【0031】

AFE細胞を分化培地の存在下において培養し、所望の細胞型への分化を誘導することができる。例えば、肺胞上皮II型細胞へ分化させるための誘導には、FGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む分化培地の存在下においてAFE細胞を培養する工程が含まれる。好ましくは、肺胞上皮II型細胞分化培養は、BMP4を含まない。

10

【0032】

本発明の組成物および方法は、とりわけ、創薬、毒性試験、疾患病理学、肺発生生物学の調査などに有用である。

【0033】

本発明は、肺胞上皮II型細胞をインビトロで作出できるという発見に関する。したがって、本発明は、再生医療の形態としての肺胞上皮II型細胞の作出のための方法および組成物を提供する。1つの態様において、本方法は、SPC、SPB、ムチン-1、およびCD54を含むが、これらに限定されない、高い割合の肺胞II型マーカーを発現する肺胞II型前駆細胞の純粋な集団の作出を可能にする。

20

【0034】

本発明は同様に、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて肺欠損を軽減または処置する方法を提供する。本方法は、それを必要としている哺乳動物に、肺胞上皮II型細胞または肺胞上皮II型細胞の少なくとも1つの特徴を示すそれ以外の細胞を含む組成物の治療的有効量を投与し、それにより哺乳動物において肺欠損を軽減または処置する工程を含む。

【0035】

1つの態様において、本発明は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは98%、さらにより好ましくは少なくとも99%が肺胞II型の表現型を示す分化した幹細胞、またはその子孫の集団を肺へ、損傷または罹患した肺胞上皮組織を含む部位に移植する工程を含む、哺乳動物の肺内の損傷または罹患した肺胞上皮組織を修復する方法を提供する。肺胞II型の表現型を有する細胞の集団は、本発明の方法を用いて調製され、かつ、移植後、その部位で損傷または罹患した肺胞上皮組織の少なくとも一部分を修復するのに有効である。

30

【0036】

定義

別段の定義がない限り、本明細書において用いられる技術用語および科学用語は全て、一般に、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。一般に、本明細書において用いられる用語体系や、細胞培養、分子遺伝学、有機化学、ならびに核酸化学およびハイブリダイゼーションにおける実験手順は、当技術分野において周知であり、通常利用されているものである。

40

【0037】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、1つのまたは2つ以上の(すなわち、少なくとも1つの)、その冠詞の文法上の対象をいうように本明細書において用いられる。例として、「ある要素」とは、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0038】

「約」という用語は、当業者には理解され、それが用いられる文脈に基づいて、ある程度まで変動するであろう。

【0039】

「成体幹細胞」または「ASC」という用語は、胎児、若年、および成体組織を含む、非

50

胚組織から誘導された任意の複能性(multipotent)幹細胞をいうように用いられる。幹細胞は、血液、骨髄、脳、嗅上皮、皮膚、脾臓、骨格筋、および心筋を含む、多種多様の成体組織から単離されている。これらの幹細胞の各々は、遺伝子発現、因子応答性、および培養における形態に基づいて特徴付けることができる。例示的な成体幹細胞としては、神経幹細胞、神経堤幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、および脾幹細胞が挙げられる。上述したように、幹細胞は、事実上あらゆる組織中に存在することが分かった。したがって、本発明は、幹細胞集団を事実上あらゆる動物組織から単離できることを理解している。

【0040】

本明細書において用いられる場合、「前部前腸内胚葉」は、肝臓を生じる内胚葉よりも前部である内胚葉をいう。したがって、当業者は、「前部前腸内胚葉」が、例えば、咽頭内胚葉および内胚葉細胞のより高度に分化した他の集団を含むこと、および「前部前腸内胚葉」という用語によって包含されるさまざまな細胞型が、分子マーカーの異なる発現パターンを示しうることを容易に理解するであろう。当業者は、「前部前腸内胚葉」がさまざまな組織、例えば、扁桃、鼓膜、甲状腺、副甲状腺、胸腺、気管、食道、胃、肺および喉頭/咽頭を生じることを理解するであろう。

10

【0041】

本明細書において用いられる場合、「自家」は生物学的材料であって、後にその材料が再導入されることになる個体と同じ個体に由来するものをいう。

【0042】

本明細書において用いられる場合、「同種異系」は生物学的材料であって、その材料が導入されることになる個体と同じ種の遺伝学的に異なる個体に由来するものをいう。

20

【0043】

本明細書で用いられる場合、「生体適合性」は、哺乳動物に埋植された時に、その哺乳動物において有害な応答を惹起しない、任意の材料をいう。生体適合性材料は、個体へ導入された場合に、その個体にとって毒性または有害でなく、その哺乳動物におけるその材料の免疫学的拒絶を誘導することもない。

【0044】

本明細書において用いられる場合、「前部前腸内胚葉」は、内胚葉よりも前部である内胚葉をいう。したがって、当業者は、「前部前腸内胚葉」が、例えば、咽頭内胚葉および内胚葉細胞のより高度に分化した他の集団を含むこと、および「前部前腸内胚葉」という用語によって包含されるさまざまな細胞型が、分子マーカーの異なる発現パターンを示しうることを容易に理解するであろう。当業者は、「前部前腸内胚葉」がさまざまな組織、例えば、扁桃、鼓膜、甲状腺、副甲状腺、胸腺、気管、食道、胃、肺および喉頭/咽頭を生じることを理解するであろう。

30

【0045】

本明細書において用いられる場合、疾患、欠損、障害または状態を「軽減する」ことは、その疾患、欠損、障害または状態の1つまたは複数の症状の重症度を低減することを意味する。

【0046】

本明細書において用いられる場合、「基礎培地」という用語は、アミノ酸、ビタミン類、塩類、および栄養物の溶液であって、培養細胞の増殖を支持するのに有効な該溶液をいうが、これらの化合物は通常、追加の化合物を補わない限り細胞増殖を支持しないであろう。栄養物は、細胞が代謝できる炭素源(例えば、グルコースなどの糖)、ならびに細胞の生存に必要な他の化合物を含む。これらは、その化合物(例えば、必須アミノ酸)を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子のうちの1つまたは複数が存在しないために、細胞が自ら合成できない化合物であるか、あるいは、細胞が合成できる化合物に関しては、細胞の特定の発生段階が原因で、必要な生合成タンパク質をコードする遺伝子が十分なレベルでは発現されていない化合物である。ダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Media) (DMEM)、ロックアウト-DMEM (KO-DMEM)、およびDMEM/F12のような、いくつかの基礎培地が哺乳動物細胞培養の分野において知られているものの、実質

40

50

的に未分化の状態で霊長類胚性幹細胞の増殖を支持する任意の基礎培地を利用することができる。

【0047】

本明細書で用いられる場合、「生体適合性」は、哺乳動物に埋植された時に、その哺乳動物において有害な応答を惹起しない、任意の材料をいう。生体適合性材料は、個体へ導入された場合に、その個体にとって毒性または有害でなく、その哺乳動物におけるその材料の免疫学的拒絶を誘導することもない。

【0048】

本明細書において用いられる場合、「生体適合性格子」という用語は、組織発達を促す三次元構造の形成を促進できる基材をいうように意図される。したがって、例えば、細胞は、細胞外マトリックス物質、合成重合体、サイトカイン、成長因子などを含むものなどの、このような生体適合性格子上に培養または播種することができる。格子は、組織型の発達を促進するために望ましい形状へ成形することができる。また、少なくとも細胞培養中の初期段階で、培地および/または基材に、適切な組織型および構造の発達を促進する因子(例えば、成長因子、サイトカイン、細胞外マトリックス物質など)を補う。

【0049】

本明細書において用いられる「生物活性剤」は、以下の1つまたは複数を含むことができる: 走化性物質; 治療剤(例えば、抗生物質、ステロイド系および非ステロイド系の鎮痛薬および抗炎症薬(グリシンのようなある種のアミノ酸を含む)、免疫抑制薬および抗がん薬のような抗拒絶剤); さまざまなタンパク質(例えば、短期間ペプチド、骨形態形成タンパク質、コラーゲン、ヒアルロン酸、糖タンパク質、およびリポタンパク質); 細胞接着メディエータ; 生物学的に活性なリガンド; インテグリン結合性配列; リガンド; さまざまな増殖剤および/または分化剤ならびにその断片(例えば、表皮成長因子(EGF)、肝細胞成長因子(HGF)、脈管内皮成長因子(VEGF)、線維芽細胞成長因子(例えば、bFGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン由来成長因子(例えば、IGF-1、IGF-II)および形質転換成長因子(例えば、TGF β I~III)、副甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、骨形態形成タンパク質(例えば、BMP-2、BMP-4; BMP-6; BMP-7; BMP-12; BMP-13; BMP-14)、ソニック・ヘッジホッグ(sonic hedgehog)、増殖分化因子(例えば、GDF5、GDF6、GDF8)、組み換えヒト成長因子(例えば、MP52、およびMP-52変種rhGDF-5)、軟骨由来形態形成タンパク質(CDMP-1; CDMP-2、CDMP-3)); 特異的な成長因子の上方制御に影響を与える小分子; テネイシン-C; ヒアルロン酸; 硫酸コンドロイチン; フィブロネクチン; デコリン; トロンボエラスチン; トロンビン由来ペプチド; ヘパリン結合性ドメイン; ヘパリン; 硫酸ヘパラン。適当なエフェクタは同様に、上記の薬剤のアゴニストおよびアンタゴニストを含む。成長因子は、上記の成長因子の組み合わせを含むこともできる。加えて、成長因子は、血液中の血小板によって供給される自家の成長因子とすることができる。この場合、血小板由来の成長因子は、さまざまな成長因子の不確定なカクテルであろう。他のそのような物質が整形外科の分野において治療的価値を有するなら、これらの物質の少なくとも一部が本発明において用途を有するものと予想され、そのような物質は、他に明示的に限定されていない限り「生物活性剤(bioactive agent)」および「生物活性剤(bioactive agents)」の意味のなかに含まれるべきである。生物活性剤の好ましい例としては、培地、骨形態形成タンパク質、成長因子、増殖分化因子、組み換えヒト成長因子、軟骨由来形態形成タンパク質、ヒドロゲル、重合体、抗生物質、抗炎症薬、免疫抑制薬、自家細胞、同種異系細胞または異種相同(xenologous)細胞、例えば幹細胞、軟骨細胞、線維芽細胞ならびにタンパク質、例えばコラーゲンおよびヒアルロン酸が挙げられる。生物活性剤は、自家、同種異系、異種間(xenogenic)または組み換え型であってよい。

【0050】

「生物学的に適合した担体」または「生物学的に適合した培地」という用語は、妥当な損益比に相応して過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触させて用いるのに適した試薬、細胞、化合物、材料、組成物、および/または投与製剤をいう。

10

20

30

40

50

【0051】

「細胞」および「細胞の集団」という用語は、互換的に用いられ、複数の細胞、すなわち、2つ以上の細胞をいう。この集団は、1種の細胞型を含む純粋な集団でありうる。あるいは、この集団は、2種以上の細胞型を含みうる。本発明において、細胞集団が含みうる細胞型の数に制限はない。

【0052】

本明細書において用いられる「細胞培地」という用語は、細胞を培養するのに有用な培地をいう。細胞培地の例は、DMEM/F 12 Ham's、10%ウシ胎仔血清、100 Uペニシリン/ストレプトマイシン100 μg /フンギゾン(Fungizone) 0.25 μg を含む培地である。典型的には、細胞培地は基礎培地、血清および抗生物質/抗真菌薬を含む。しかしながら、細胞を抗生物質/抗真菌薬のない間質細胞培地により培養し、これに少なくとも1つの成長因子を補ってもよい。好ましくは、成長因子はヒト上皮成長因子(hEGF)である。hEGFの好ましい濃度は、約1~50 ng/mlであり、より好ましくはその濃度は約5 ng/mlである。好ましい基礎培地は、DMEM/F12 (1:1)である。好ましい血清はウシ胎仔血清(FBS)であるが、しかしウマ血清またはヒト血清を含めて他の血清が使われてもよい。好ましくは最大20%までのFBSが、間質細胞の増殖を支持するために、上記培地に加えられよう。しかしながら、細胞増殖のためにFBS中の必要な成長因子、サイトカイン、およびホルモンが特定され、増殖培地中に適切な濃度で提供されるなら、規定培地を用いることができる。さらなる構成要素が培地に加えられてもよいものとさらに認識される。そのような構成要素は、抗生物質、抗真菌薬、アルブミン、成長因子、アミノ酸、および細胞の培養のために当技術分野にとって公知の他の構成要素を含むが、これらに限定されることはない。培地へ添加できる抗生物質は、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むが、これらに限定されることはない。培地中のペニシリンの濃度は、1 mlあたり約10~約200単位である。培地中のストレプトマイシンの濃度は、約10~約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。しかしながら、本発明は、細胞を培養するためのいずれか1つの培地に限定されるものと決して解釈されるべきではない。むしろ、組織培養において細胞を支持できる任意の培地が用いられうる。

【0053】

本明細書において用いられる「脱細胞化された」または「脱細胞化」という用語は、細胞および組織の内容物が取り除かれて、インタクトな無細胞基礎構造を残した生物学的構造(例えば、器官、または器官の一部)をいう。腎臓のような器官は、さまざまな専門化した組織から構成される。専門化した器官組織構造、または実質は、器官に関連した特殊な機能を提供する。器官の支持線維網が間質である。大部分の器官は、専門化した組織を支持する専門化していない結合組織から構成される間質フレームワークを有する。脱細胞化のプロセスは、専門化した組織を除去し、結合組織の複雑な三次元ネットワークを残す。結合組織の基礎構造は主に、コラーゲンから構成される。脱細胞化された構造は、異なる細胞集団が注入されうる生体適合性基材となる。脱細胞化された生物学的構造は、硬質または半硬質であって、その形状を変化させる能力を持ちうる。本発明において有用な脱細胞化器官の例としては、心臓、肺、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、膀胱、尿管および尿道、軟骨、骨、脳、脊髄(spine cord)、末梢神経が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0054】

本明細書において用いられる場合、「胚体内胚葉(DE)」および胚体内胚葉細胞(DE細胞)は、限定されるものではないが、胚体内胚葉の細胞に典型的なタンパク質もしくは遺伝子発現およびまたは/または形態などを示す細胞あるいは胚体内胚葉の細胞に似ているかなりの数の細胞を含む組成物をいう。胚体内胚葉細胞はマーカーSox17を発現しうる。胚体内胚葉細胞の他のマーカーは、MIXL2、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1およびCRIP1を含むが、これらに限定されることはない。胚体内胚葉細胞は、肝臓、肺、膵臓、胸腺、腸、胃および甲状腺の細胞を含む細胞へ分化する能力がある。

【0055】

本明細書において用いられる「脱分化」という用語は、細胞が、専門性の低い状態に戻

10

20

30

40

50

ることをいう。脱分化後、そのような細胞は、再プログラミング前に可能であったものに比べて、より多くの、または異なる細胞型へと、分化する能力を有するであろう。逆分化(すなわち、脱分化)のプロセスは分化よりも複雑である可能性が高く、より始原的になるように細胞を「再プログラムする」ことが必要である。

【0056】

「分化した細胞」という用語は、その天然の形態では、その用語が本明細書において定義されるように多能性ではない任意の一次細胞を意味する。別の言い方をすれば、「分化した細胞」という用語は、細胞の分化プロセスにおいてあまり専門化していない細胞型の細胞(例えば、誘導多能性幹細胞のような幹細胞)に由来する、より専門化した細胞型の細胞をいう。理論に制限されることを望むわけではないが、通常の個体発生中の多能性幹細胞は、肺細胞を形成できる内胚葉細胞および他の内胚葉細胞型に最初に分化しうる。内胚葉細胞は、例えば肺、肝臓、腸、胸腺などの、内胚葉由来の他の細胞へ分化することもできる。

10

【0057】

「分化培地」は、完全には分化していない幹細胞、胎児肺細胞または他のそのような前駆細胞が、その培地中でインキュベートされた時に、分化細胞の特徴の一部または全部を有する細胞へと発生するように添加物を含むまたは添加物を欠く、細胞成長培地をいうように本明細書において用いられる。

【0058】

「胚性幹細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊の多能性幹細胞をいうように用いられる(米国特許第5,843,780号、同第6,200,806号を参照のこと)。そのような細胞は、体細胞核移植由来の胚盤胞の内部細胞塊から同様に得ることができる(例えば、米国特許第5,945,577号、同第5,994,619号、同第6,235,970号を参照のこと)。胚性幹細胞の際立った特徴は、胚性幹細胞表現型を規定する。したがって、細胞は、その細胞が他の細胞と区別されうる胚性幹細胞に特有の特徴の1つまたは複数を保有する場合、胚性幹細胞の表現型を有する。例示となる際立った胚性幹細胞の特徴としては、遺伝子発現プロファイル、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件に対する応答性などが挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0059】

本明細書において用いられる場合、「上皮細胞」は、身体の外面を形成し、器官、腔および粘膜表面を裏打ちする細胞を意味する。

30

【0060】

本明細書において用いられる場合、「内皮細胞」は、血管およびリンパ管ならびに他のさまざまな体腔を裏打ちする細胞を意味する。

【0061】

本明細書において用いられる場合、「内因性」は、ある生物、細胞または系に由来する、またはそれらの内部で産生された、任意の材料をいう。

【0062】

「外因性」は、ある生物、細胞、または系に導入された、またはそれらの外で産生された、任意の材料をいう。

40

【0063】

「コードする」とは、所定の配列のヌクレオチド(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)または所定の配列のアミノ酸とその結果生じる生物学的性質とを有する他の重合体および高分子を生物学的プロセスにおいて合成するための鋳型として役立つという、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特異的配列が持つ固有の性質をいう。したがって、ある遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞内または他の生物学的系内で、あるタンパク質を産生するのであれば、その遺伝子はそのタンパク質をコードしている。コード鎖、つまりmRNA配列と同一のヌクレオチド配列を持ち、配列表に通常記載されるものと、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖はどちらも、タンパク質、またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードしてい

50

ることができる。

【0064】

本明細書において用いられる「内胚葉細胞」という用語は、ごく初期の胚における3つの一次胚葉層(primary germ cell layer)のうちの1つに由来する細胞をいう(その他の2つの胚葉層は中胚葉および外胚葉である)。外胚葉は3つの層の最内部である。内胚葉細胞は分化して、最初に胚性胃腸を生じ、次に呼吸器管および消化管(例えば腸)の内面、肝臓ならびに膵臓を生じる。

【0065】

「拡大性(expandability)」は、増殖して、例えば数を拡大するか、細胞の集団の場合であれば、集団倍加を起こすという、細胞の能力をいうように本明細書において用いられる。

10

【0066】

本明細書において用いられる場合、「細胞外マトリックス組成物」は、可溶性画分および不溶性画分の両方またはそれらの任意の部分を含む。不溶性画分は、支持体または足場上に沈積される分泌ECMタンパク質および生物学的構成要素を含む。可溶性画分は、細胞が培養されたかつ細胞が活性作用物質を分泌した培地を含み/いい、かつ足場上に沈積されていないそれらのタンパク質および生物学的構成要素を含む。両方の画分が回収されてもよく、任意でさらに加工処理されてもよく、本明細書に記述の種々の用途において別々にまたは一緒に用いられてもよい。

【0067】

20

本明細書において用いられる場合、「胎児肺細胞」(FPC)は、胚の肺組織から単離された細胞をいう。FPCの混合集団は、上皮、間葉および内皮の細胞を含みうるが、これらに限定されることはない。

【0068】

本明細書において用いられる場合、「グラフト(graft)」は、典型的には欠損を置き換え、矯正し、または他の方法で克服するために個体に埋植される、細胞、組織または器官をいう。グラフトはさらに足場を含んでもよい。組織または器官は、同じ個体から導出される細胞からなることができ、このグラフトを、本明細書においては、以下の交換可能な用語でいう:「オートグラフト autograft)」、「自家トランスプラント autologous transplant)」、「自家インプラント autologous implant)」および「自家グラフト」。同じ種の遺伝学的に異なる個体に由来する細胞を含むグラフトを、本明細書においては、以下の交換可能な用語でいう:「アログラフト(allograft)」、「同種異系トランスプラント」、「同種異系インプラント」および「同種異系グラフト」。ある個体の一卵性双生児である兄妹から得られるグラフトを、本明細書においては、「アイソグラフト(isograft)」、「同種同系トランスプラント」、「同種同系インプラント」または「同種同系グラフト」という。「キセノグラフト(xenograft)」、「異種トランスプラント」または「異種インプラント」とは、ある個体から、種が異なる別の個体へのグラフトをいう。

30

【0069】

本明細書において用いられる場合、「成長因子産物」という用語は、細胞に対して成長効果、増殖効果、分化効果、または栄養効果を有する、タンパク質、ペプチド、マイトジェン、または他の分子をいう。成長因子には、線維芽細胞成長因子(FGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、上皮成長因子(EGF)、インスリン様成長因子I (IGF-T)、インスリン様成長因子II (IGF-II)、血小板由来成長因子(PDGF)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、アクチビンA、骨形態形成タンパク質(BMP)、インスリン、成長ホルモン、エリスロポエチン、トロンプオエチン、インターロイキン3 (IL-3)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン7 (IL-7)、マクロファージコロニー刺激因子、c-kitリガンド/幹細胞因子、オステオプロテゲリンリガンド、インスリン、神経成長因子、毛様体神経栄養因子、サイトカイン、ケモカイン、モルフォゲン、中和抗体、他のタンパク質、および小分子などが含まれるが、これらに限定されることはない。好ましくは、FGFは、FGF2、FGF7、FGF10、およびその任意の組み合わせから選択される群から選択され

40

50

る。

【0070】

本明細書において用いられる場合、「成長培地」という用語は、細胞の成長を促進する培養培地をいうように意図される。成長培地は一般に、動物血清を含有するであろう。場合によって、成長培地は動物血清を含有しえない。

【0071】

本明細書において用いられる場合、「ヒト多能性幹細胞」(hPS)は、任意の供給源に由来しうる細胞であって、適切な条件の下で、3つの胚層(内胚葉、中胚葉、および外胚葉)の全ての誘導体である種々の細胞型のヒト子孫を産生できる細胞をいう。hPS細胞は、8~12週齢のSCIDマウスで奇形腫を形成する能力、および/または組織培養において全3胚層の特定可能な細胞を形成する能力を有しうる。ヒト多能性幹細胞の定義には、文献中でヒト胚性幹(hES)細胞(例えば、Thomson et al. (1998), Heins et al. (2004)を参照のこと)と表されることが多いヒト胚盤胞由来幹(hBS)細胞を含むさまざまなタイプの胚細胞、および誘導多能性幹細胞(例えばYu et al., (2007) Science 318:5858); Takahashi et al., (2007) Cell 131(5):861を参照のこと)が含まれる。本明細書において記述されるさまざまな方法および他の態様は、種々の供給源からのhPS細胞を必要としたまたは利用しうる。例えば、用いるのに適したhPS細胞は、発生中の胚から得られうる。さらにまたはあるいは、適当なhPS細胞は、樹立された細胞系および/またはヒト誘導多能性幹(hiPS)細胞から得られうる。

【0072】

本明細書において用いられる場合、「hiPS細胞」は、ヒト誘導多能性幹細胞をいう。

【0073】

「単離された細胞」は、組織または哺乳動物においてその単離された細胞に天然に付随している他の構成要素および/または細胞から分離された細胞をいう。

【0074】

「単離された核酸」は、天然の状態でそれに隣接している配列から分離されている核酸セグメントまたは核酸断片、すなわち通常はその断片に近接している配列(すなわち、それが天然に存在するゲノム中でその断片に近接している配列)から取り出されたDNA断片をいう。この用語は、その核酸に天然に付随する他の構成要素、すなわち、細胞内でそれに天然に付随しているRNAもしくはDNAまたはタンパク質から実質的に精製された核酸にも適用される。したがってこの用語には、例えば、ベクターに組み込まれているか、自律的に複製するプラスミドもしくはウイルスに組み込まれているか、または原生生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれている組み換えDNA、または他の配列から独立して別個の分子(すなわちcDNAまたはPCRもしくは制限酵素消化によって作り出されるゲノム断片もしくはcDNA断片)として存在する組み換えDNAが含まれる。また、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組み換えDNAも含まれる。

【0075】

「肺特異的」という用語は、身体の他の組織と比べて肺において優勢に発現される核酸分子またはポリペプチドをいう。好ましい態様において、「肺特異的」核酸分子またはポリペプチドが、身体の他のどの組織よりも5倍高いレベルで発現される。より好ましい態様において、「肺特異的」核酸分子またはポリペプチドが、身体の他のどの組織よりも10倍高いレベルで発現され、より好ましくは、身体の他のどの組織よりも少なくとも15倍、20倍、25倍、50倍または100倍高いレベルで発現される。核酸分子レベルは、ノザンブロットハイブリダイゼーションなどの核酸ハイブリダイゼーションまたは定量PCRによって測定されうる。ポリペプチドレベルは、ウェスタンブロット分析のような、タンパク質レベルを正確に測定することが知られている任意の方法によって測定されうる。

【0076】

「肺組織」は、静脈、動脈、血管、毛細血管、およびそのような構造体の一部であるかもしくはそれと関連するタイプの細胞を含むが、これらに限定されない、全ての肺組織構造体および関連組織; 肺および胸膜組織; および血管平滑筋、周皮細胞、ならびに血管内

皮系列および/または表現型を含みうるが、これらに限定されることはない。

【0077】

「前駆体細胞」、「前駆細胞」、および「幹細胞」という用語は、当技術分野において互換的に用いられ、本明細書において用いられる場合、無限回にわたり有糸分裂して自分自身を再生するか、所望の細胞型へと分化するであろう子孫細胞を生み出す能力を、潜在的に有する、多能性の、または分化拘束されていない(lineage-uncommitted)前駆細胞をいう。多能性幹細胞とは対照的に、分化拘束された(lineage-committed)前駆細胞は一般に、表現型が互いに異なる多数の細胞型を生じる能力は持たないと考えられる。その代わりに、前駆細胞は、1つか、場合によっては2つの、分化拘束された細胞型を生じる。

【0078】

「増殖」は、類似する形態の、特に細胞の、複製または増倍をいうように本明細書において用いられる。すなわち、増殖は、より多数の細胞の産生を包含し、例えば、細胞の数を単純に数え上げること、³H-チミジンの細胞への取り込みを測定することなどによって測定することができる。

【0079】

「細胞周期の進行または細胞周期を経る進行」は、細胞が有糸分裂および/または減数分裂に備えるプロセスおよび/または入るプロセスをいうように本明細書において用いられる。細胞周期を経る進行には、G1期、S期、G2期、およびM期を経る進行が含まれる。

【0080】

本明細書において用いられる場合、「足場」は、細胞の接着と増殖に適した表面を提供する生体適合性材料を含む構造をいう。足場はさらに、機械的安定性および機械的支持も提供しうる。足場は、三次元形状に影響を及ぼすようにまたは三次元形状の境界を定めるように特定の形状または形態をとるか、増殖細胞の集団が呈する形態をとりうる。そのような形状または形態には、薄膜(例えば第3の次元よりも実質的に大きな2つの次元を持つ形態)、リボン、ひも、シート、平らな円板、円柱、球、三次元無定形の形状などが含まれるが、これらに限定されることはない。

【0081】

本明細書において用いられる場合、「幹細胞」という語句は、細胞塊を組織または身体において生じさせることに関わる最も初期の再生可能な細胞集団、および、いくぶんかより分化し、それにもかかわらず、分化拘束されておらず、最も初期の再生可能な細胞集団の一部となるために容易に逆戻りできるとく初期の前駆細胞の両方をいう。

【0082】

本明細書において用いられる場合、「実質的に精製された」細胞は、本質的に他の細胞型を含まない細胞である。したがって、実質的に精製された細胞とは、その天然状態ではそれに通常付随している他の細胞型から精製された細胞をいう。

【0083】

本明細書において用いられる場合、「対象」および「患者」という用語は、互換的に用いられる。本明細書において用いられる場合、対象は、好ましくは哺乳動物、例えば非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(例えば、サルおよびヒト)、最も好ましくはヒトである。

【0084】

本明細書において用いられる場合、「処置する」ことは、ある疾患、欠損、障害、または有害な状態などの症状を患者が経験する頻度を低減することを意味する。

【0085】

本明細書において用いられる場合、「治療的有效量」は、組成物が投与される個体に有益な効果を与えるのに十分な本発明の組成物の量である。

【0086】

本明細書において用いられる場合、「組織工学」とは、組織置換(tissue replacement)または組織再建に用いるためにエキスピボで組織を生成させるプロセスをいう。組織工学は「再生医学」の一例であり、これは、細胞、遺伝子または他の生物学的構成単位の組み

10

20

30

40

50

込みと、生物工学的材料および技術とによる、組織および器官の修復または代用への取り組みを包含する。

【0087】

本明細書において用いられる場合、「組織グラフティング(tissue grafting)」および「組織再建(tissue reconstructing)」という用語はどちらも、肺欠損または軟部組織欠損などの組織欠損を処置または軽減するために、グラフトを個体へ埋植することをいう。

【0088】

「移植片」は、移植しようとする生体適合性格子またはドナーの組織、器官もしくは細胞をいう。移植片の一例としては、皮膚の細胞または組織、骨髄、ならびに実質器官、例えば心臓、膵臓、腎臓、肺および肝臓を挙げることができるが、これらに限定されることは

10

【0089】

一般に、「栄養因子」は、細胞の生存、成長、増殖および/もしくは成熟を促進する、かつ細胞の活性の増大を刺激する物質と定義される。

【0090】

範囲：本開示全体を通じて、本発明のさまざまな局面を範囲の形で提示することができる。範囲の形での記述は単なる便宜および簡略のためのものであり、本発明の範囲に対する融通の利かない限定と解釈されるべきではないことが理解されるはずである。したがって、範囲の記述は、可能性のある全ての部分範囲(subrange)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。例えば、1~6などの範囲の記述は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内にある個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示したとみなされるはずである。これは範囲の幅に関係なく適用される。

20

【0091】

記述

本発明は、幹細胞からの純粋な肺胞上皮II型細胞集団の成功裏の作出に関する。幹細胞から分化した肺胞上皮II型細胞は、末梢肺疾患、肺損傷、および肺に影響を与える遺伝的疾患を処置するために治療的に用いるための細胞の有望な供給源となる。

【0092】

本発明は、肺胞上皮II型細胞の少なくとも1つの特徴を示す細胞へ幹細胞を分化させる方法を提供する。1つの態様において、本方法は、第1段階が幹細胞集団から胚体内胚葉(DE)集団を作出する工程を含み、かつ第2段階がDE集団を前部前腸内胚葉(AFE)の細胞へ分化させる工程を含む、2つの段階を含む。第1段階に関し、1つの態様において、幹細胞は、最初は、DE集団を作出するためにアクチビンAの存在下において血清なしで培養される。第2段階に関し、1つの態様において、DE集団は、AFEへの分化を誘導するために、BMPの阻害剤およびTGF- β シグナル伝達の阻害剤を補った培地と組み合わせてヒト細胞外マトリックス(ECM)タンパク質の存在下において、かつ、アクチビンAの非存在下において培養される。好ましくは、BMPの阻害剤はノギンであり、TGF- β シグナル伝達の阻害剤はSB-431542である。

30

【0093】

AFE細胞が作出されたら、それらを分化培地の存在下において培養し、所望の細胞型への分化を誘導することができる。例えば、AFE細胞は、肺胞上皮II型細胞の少なくとも1つの特徴を示す細胞へ分化誘導することができ、ここで分化培地はFGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む。好ましくは、肺胞上皮II型細胞分化培地は、BMP4を含まない。

40

【0094】

したがって、本発明は、肺胞II型細胞を含むがこれに限定されない、AFEに由来する細胞型および組織への幹細胞の有向分化のための方法を提供する。

【0095】

本発明は、本明細書の他の項に開示されている独特のプロトコルが肺胞II型前駆細胞へのAFE細胞の高効率の変換を可能にするという発見に部分的に基づく。例えば、特異的な

50

成長因子と組み合わせてECMタンパク質でコーティングされた表面を用いることで、高い割合の肺胞II型細胞マーカーを発現する細胞集団が作出された。1つの例において、本発明の方法は、ヒト幹細胞、好ましくはヒト誘導多能性幹(iPS)細胞に由来する肺胞II型細胞の純粋な集団の作出を可能にする。

【0096】

1つの態様において、肺胞II型細胞表現型に向けて幹細胞を分化させる方法は、肺胞II型細胞表現型にAFEを分化させる工程が、成長因子およびECMタンパク質の組み合わせの使用を要するという点で先行技術と異なる。1つの態様において、成長因子の組み合わせはFGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む。別の態様において、成長因子の組み合わせはBMP4を除く。ECMタンパク質に関して、細胞は1つの態様において、肺発生のための胚形成中に存在するECMタンパク質(例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、ならびにいくつかのプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン)を模倣するECMタンパク質の存在下において培養することができる。

10

【0097】

胚体内胚葉

胚発生中に、身体組織は3つの主要な細胞集団：外胚葉、中胚葉および胚体内胚葉から形成される。一次胚葉層としても知られる、これらの細胞集団は、原腸形成として知られるプロセスを通じて形成される。原腸形成の後に、各一次胚葉層は、特異的なセットの細胞集団および組織を作出する。中胚葉は、例えば、血液細胞、内皮細胞、心筋および骨格筋、ならびに脂肪細胞を生ずる。胚体内胚葉は、例えば、肝臓、膵臓および肺を作出する。外胚葉は、例えば、神経系、皮膚および副腎組織を生ずる。

20

【0098】

胚体内胚葉が幹細胞から産生され、精製されかつ拡大されうることの実証が、本明細書において記述される。このようにして精製または継代培養された幹細胞由来の胚体内胚葉を、肺前駆体(例えば、肺胞II型前駆細胞)に向けた分化のためのプラットフォームとして用いることができる。1つの態様において、本発明は、実質的に当初は幹細胞、好ましくはヒト誘導多能性幹(iPS)細胞から本質的になる細胞集団から胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を作出する方法を提供する。

【0099】

1つの態様において、本発明は、胚性幹細胞(ES)またはiPS細胞のような幹細胞を、本明細書において記述される少なくとも1つの化合物の有効量に曝露して、胚体内胚葉細胞のような内胚葉細胞へ幹細胞を分化させることにより、胚体内胚葉細胞のような、内胚葉細胞を産生する方法を提供する。本明細書において開示される方法により産生された分化内胚葉細胞は、膵臓、胸腺、肝臓、胃、腸および肺のような内胚葉導出物へ分化することができる。本発明の別の局面は、胚体内胚葉細胞のような内胚葉細胞を、本明細書において記述される少なくとも1つの化合物の有効量に曝露して、肺胞II型前駆細胞へ胚体内胚葉細胞を分化させることにより、肺胞II型前駆細胞を産生する方法に関する。

30

【0100】

本発明の方法は、血清を含まないかつ血清抽出物を含まない培地中で、DE細胞への幹細胞の分化を刺激するために用いることができる。好ましくは、そのような方法はまた、フィーダー細胞および/またはフィーダー細胞抽出物の非存在下において行われる。

40

【0101】

例えば、DE細胞への幹細胞の分化は、1) 幹細胞を第1の培地中で一定の時間、任意によりフィーダー上で、血清もしくは血清の抽出物の存在下においてまたは無血清/無血清抽出物の培地中で維持する工程; 2) 第1の培地を、アクチビンを含む第2の無血清培地と交換する工程または第1の培地がフィーダー、血清および血清抽出物を含まないように、第1の培地から血清もしくは血清抽出物を除去する工程かつフィーダー(存在するなら)を取り除く工程かつアクチビンを添加する工程; ならびに3) その後に、DE細胞を含む細胞を得るためにアクチビンを含む培地中で幹細胞を増殖させる工程を含めて、行うことができる。

50

【0102】

1つの態様において、胚体内胚葉への多能性細胞、例えば、幹細胞の有向分化は、高濃度のアクチビンAの適用によって得ることができる。任意の特定の理論によって束縛されることを望むわけではないが、この戦略の科学的根拠は、内胚葉形成にはモルフォゲン nodal によるシグナル伝達が必要とされるといえるものであると考えられる。アクチビンAは、nodalと同じ受容体を活性化するが、可溶性サイトカインとして利用可能である。

【0103】

1つの態様において、胚体内胚葉幹細胞の作出は、マウスES細胞から胚体内胚葉を発生させるために用いられるプロトコルを適応することによって達成されうる (Kubo et al, 2004 Development 131: 1651-1662)。好ましくは、幹細胞は最初に、高濃度のアクチビンA (約50~500 ng/ml、約75~150 ng/ml、約100 ng/ml)の存在下において無血清で培養される。

【0104】

内胚葉細胞、例えば本発明の方法によって産生された胚体内胚葉細胞の存在を確認するために、当業者によく知られている任意の手段を用いることができる。いくつかの態様において、内胚葉細胞の存在は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,326,572号に記載されているものなどの適当なマーカーを用いて検出することができる。

【0105】

いくつかの態様において、胚体内胚葉マーカー、例えば化学的に誘導された胚体内胚葉細胞の存在は、胚体内胚葉細胞を示す1つまたは複数のマーカーの存在または非存在を検出することによって評価することができる。いくつかの態様において、本方法は、胚体内胚葉細胞のマーカーの陽性発現(例えば、存在)を検出する工程を含むことができる。いくつかの態様において、マーカーは、試薬、例えば、SOX17、HNF3 β (Fox2A)、MIXL2、GATA4、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1などの1つまたは複数の検出のための試薬を用いて検出することができる。具体的には、胚体内胚葉細胞は、Sox17および/またはHNF3Bを発現し、有意なレベルの胚体外内胚葉細胞マーカー、例えばGATA4、SPARC、APF、およびDABを発現しない。胚体内胚葉細胞の他の陽性マーカーはまた、Nodal、Tmprss2、Tmem30b、St14、Spink3、Sh3gl2、Ripk4、Rab15、Npnt、Clic6、Cldn8、Cacnalb、Bnip1、Anxa4、Emb、FoxA1、およびRbm35aを含むが、これらに限定されることはない。

【0106】

胚体内胚葉細胞の陰性マーカー(例えば、有意なレベルの発現のないこと)は、Gata4、SPARC、APFおよびDABのような胚体外(EE)内胚葉細胞マーカー、ならびに陰性マーカーZic、Pax6、Flk1またはCD31を含む。胚体内胚葉細胞の陰性マーカーは、非胚体内胚葉細胞の陰性選択(例えば、Gata4、SPARC、APF、DAB、Zic、Pax6、Flk1もしくはCD31を発現する細胞の選択および廃棄)のために有用であり、またはこれらの陰性マーカーを発現しない細胞(例えば胚体内胚葉細胞)の特定のために有用である。

【0107】

マーカーのための試薬は、例えば、マーカーに対する抗体またはRT-PCRもしくはPCR反応、例えば、半定量もしくは定量RT-PCRもしくはPCR反応のためのプライマーであることができる。そのようなマーカーは、胚体内胚葉細胞が産生されたかどうかを評価するために用いることができる。抗体または他の検出試薬を標識、例えば、検出用の放射性標識、蛍光(例えば、GFP)標識または比色標識に連結させることができる。検出試薬がプライマーであれば、それは乾燥調製物として、例えば、凍結乾燥されて、または溶液中で供給されることができる。

【0108】

胚体内胚葉への多能性幹細胞の進行は、胚体内胚葉細胞に特有のマーカーの発現を判定することによって監視することができる。いくつかのプロセスにおいては、ある種のマーカーの発現は、マーカーの存在または非存在を検出することによって判定される。あるいは、ある種のマーカーの発現は、マーカーが細胞培養物または細胞集団の細胞に存在するレベルを測定することによって判定することができる。ある種のプロセスにおいては、胚

体内胚葉細胞に特有のマーカーの発現、および胚体内胚葉細胞を導出させた多能性幹細胞に特有のマーカーの有意な発現の欠如が判定される。

【0109】

前部前腸内胚葉(AFE)

肺、食道および気管は、嚢より遠位の前部前腸内胚葉に由来する。多能性細胞から前部前腸/咽頭内胚葉細胞の集団を作出する能力は、これらの組織の細胞置換療法において、細胞成長および分化に影響を与える作用物質のアッセイ法において、ならびに組織発生および分化に関する研究において有用であろう。

【0110】

本発明の胚体内胚葉細胞は、前部前腸内胚葉の細胞へ分化することを可能とされうる。アクチビンAが内胚葉を誘導するが、アクチビンAはこの組織を後方化することが発見されている。したがって、前部前腸内胚葉の調製は、アクチビンAを低減または除去し、その後、胚体内胚葉を形成することが必要である。ある種の局面において、本発明はしたがって、前部前腸内胚葉に関して濃縮された細胞の集団の形成、ならびに中部および後部内胚葉シグナルの枯渇のための方法を提供する。

【0111】

1つの態様において、胚体内胚葉細胞集団は次いで、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質ならびにBMPの阻害剤およびTGF- β シグナル伝達の阻害剤を補った培地の組み合わせの存在下において胚体内胚葉細胞を培養することにより前部前腸内胚葉へ分化されうる。好ましくは、BMPの阻害剤はノギンであり、TGF- β シグナル伝達の阻害剤はSB-431542である。

【0112】

ある種の態様において、本発明はしたがって、前部前腸内胚葉細胞に関して濃縮された細胞集団を提供する。前部前腸内胚葉の濃縮された集団は、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または少なくとも99.9%の前部前腸内胚葉細胞を含む。

【0113】

内胚葉細胞集団は、当技術分野において公知のマーカーにより特徴付けられ、かつ識別される。胚体内胚葉内で、胚性幹細胞マーカーSOX2は、前部前腸内胚葉のマーカーとして再出現し、その一方でCDX2は後部内胚葉(後腸)のマーカーである。アクチビンAによって内胚葉を形成するように4~5日間誘導された細胞を長期培養すると、CDX2を増加させ、SOX2を喪失させ、これらの条件で後方化することが示唆される。胚体内胚葉の前方化は、アクチビンAを取り除くかまたは遮断することにより、および前方化するモルフォゲンを加えることにより達成されうる。好ましい前方化するモルフォゲンは、BMPおよびTGF- β シグナル伝達の阻害剤である。BMPおよびTGF- β シグナル伝達の阻害剤は、単独でまたは組み合わせて用いられうる。好ましくは、BMPおよびTGF- β シグナル伝達の阻害剤は、組み合わせて用いられる。BMP阻害剤の例は、ノギン、コーディン(Chordin)、およびフォリスタチンである。好ましいBMP阻害剤は、ノギンである。TGF- β シグナル伝達の阻害剤の例は、Ly364947 (SD208)、SM16、SB-505124、SB-431542、および抗TGF- β 抗体である。好ましいTGF- β シグナル伝達の阻害剤は、SB-431542である。好ましい態様において、ノギンおよびSB-431542の組み合わせは、胚体内胚葉の前方化を誘導するために用いられる。ある種の態様において、ノギンおよびSB-431542の組み合わせは、培養およそ2日間で加えられて、胚体内胚葉の前方化を誘導する。ノギンおよびSB-431542による胚体内胚葉の前方化は、例えば、SOX2、TBX1 (咽頭)、PAX9 (咽頭、胸腺)、FOXP2 (肺、気道上皮)、DLX3 (食道)、FOXA2 (胚体内胚葉)、および/またはSOX7 (早期内胚葉マーカー)の1つまたは複数の発現を、例えば、検出することにより; 任意でPAX6 (外胚葉)および/またはBRACHYURY (中胚葉)の発現の欠如を検出することにより確認されうる。

【0114】

ある種の態様において、本発明は、BMPの阻害剤またはTGF- β シグナル伝達の阻害剤を用いて、かつアクチビンAの非存在下において胚体内胚葉を培養する工程を含む、前部前

10

20

30

40

50

腸内胚葉を導出する方法を提供する。好ましい態様において、胚体内胚葉は、BMPの阻害剤およびTGF- β シグナル伝達の阻害剤の両方を用いて、かつアクチビンAの非存在下において培養される。

【0115】

いくつかの態様において、BMPの阻害剤はノギンである。いくつかの態様において、ノギンは、約1 ng/ml~10 μ g/ml、10 ng/ml~1 μ g/ml、10 ng/ml~500 ng/ml、10 ng/ml~250 ng/ml、または10 ng/ml~100 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。好ましい態様において、ノギンは、約25 ng/ml~150 ng/ml、50 ng/ml~150 ng/mlまたは75 ng/ml~150 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。最も好ましい態様において、ノギンは、約100 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。

10

【0116】

いくつかの態様において、TGF- β の阻害剤はSB-431542である。本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、SB-431542は、約0.1 μ M~100 mM、1 μ M~10 mM、1 μ M~500 μ M、1 μ M~250 μ M、または1 μ M~100 μ Mの濃度で培養物中に存在する。最も好ましい態様において、SB-431542は、約10 mMの濃度で培養物中に存在する。

【0117】

本発明の方法において用いられる培養物が、約75 ng/ml~150 ng/mlの濃度のノギンおよび約500 μ M~10 mMの濃度のSB-431542を含む態様も好ましい。好ましくは、ノギンは約200 ng/mlの濃度であり、かつSB-431542は約10 mMの濃度である。

【0118】

20

ECMタンパク質に関して、胚体内胚葉細胞集団は、ECMタンパク質の存在下において培養することができる。すなわち、本発明は、ECMタンパク質、ならびにノギンおよびSB-431542を補った培地の組み合わせの存在下において胚体内胚葉細胞を培養することで、高効率の前部前腸内胚葉分化が得られたという発見に基づく。1つの態様において、前部前腸内胚葉分化に有用なECMタンパク質は、肺発生のための胚形成中に存在するECMタンパク質(例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、ならびにいくつかのプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン)を模倣する。

【0119】

別の態様において、本発明は、適当な成長培地中で表面(例えば、二次元または三次元表面)のECMタンパク質の存在下において細胞を培養する方法を提供する。1つの態様において、ECMは培養装置の表面にコーティングされる。

30

【0120】

別の態様において、本発明は組織培養系を含む。さまざまな局面において、培養系は、二次元または三次元の支持体材料に含まれるような、本明細書において記述されるECM組成物から構成される。別の局面において、本明細書において記述されるECM組成物は、さまざまな細胞型の成長のための支持体または二次元もしくは三次元の支持体となる。例えば、培養系を用いて、幹細胞の成長を支持することができる。1つの局面において、培養系を用いて、幹細胞の分化を支持することができる。さらに別の態様において、培養系を用いて、前部前腸内胚葉の細胞への胚体内胚葉細胞の分化を支持することができる。

【0121】

40

ECMは、ある種の細胞により分泌されることが知られており、線維性タンパク質、多糖類、および他の微量成分から主に構成される。その構成要素には、構造要素、例えばコラーゲンおよびエラスチン、接着タンパク質、例えば糖タンパク質 フィブロネクチン、ラミニン、ピトロネクチン、トロネンボスポンジンIおよびテネイシンも、プロテオグリカン、例えばデコリン、ビグリカン、コンドロイチン硫酸およびヘパリン硫酸ならびにグリコサミノグリカン(GAG)、例えばヒアルロン酸(HA)も含まれる。

【0122】

1つの態様において、ECM組成物は、以下のいずれかまたは全てを含むことができる: フィブロネクチン、フィブリリン、ラミニン、エラスチン、コラーゲンファミリーのメンバー(例えば、コラーゲンI型、III型、およびIV型)、グリコサミノグリカン、細胞質基質、

50

細網繊維ならびにトロンボスポンジン。好ましくは、ヒトECMは胚体内胚葉を培養するために用いられる。1つの態様において、ヒトECMは、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、ならびにいくつかのプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカンを含む。

【0123】

別の態様において、再構成された基底膜を含む固体支持体上で細胞を培養することが望ましく、ここで該膜は、インビボで細胞層の下に存在する薄い、膜形成性の細胞外マトリックスに含まれ、かつタンパク質および糖タンパク質、例えばラミニン、コラーゲンIV型およびヘパリン硫酸プロテオグリカンならびにさまざまな細胞成長因子および活性化因子などを含む適当な細胞組織から抽出かつ調製されることによって得ることができる。

10

【0124】

1つの態様において、重要な主たる細胞外マトリックス構成要素は、線維状コラーゲン、特にコラーゲンI型である。しかしながら、他の線維状および非線維状コラーゲンは、コラーゲンII型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型などを含む。

【0125】

本発明のECM組成物は、種々の方法で加工処理されうる。したがって、1つの態様において、本発明は組織培養系を含む。さまざまな局面において、培養系は、本明細書において記述されるECM組成物から構成される。本発明のECM組成物は、種々の方法で組織培養系へ組み入れられうる。例えば、組成物は、コーティングとして、本明細書において記述される三次元の足場材料を含浸させることにより、または細胞を培養するための培地への添加物として組み入れられうる。したがって、1つの局面において、培養系は、成長因子または胎児性タンパク質のような、本明細書において記述されるECM組成物のいずれかを含浸させた三次元の支持体材料を含むことができる。

20

【0126】

肺胞II型前駆細胞

肺胞上皮系へ分化できる細胞は、肺損傷後の組織修復に関与する細胞であるので、再生医療などの臨床上也非常に重要な細胞である。さらに、このような細胞はヒト肺組織幹細胞を特定する新たなマーカーを発見するための材料としても有用であり、これらの細胞の分化シグナルなどを分析することによって、新薬の発見につながりうるものと考えられる。

30

【0127】

1つの態様において、本発明の前部前腸内胚葉細胞は、この細胞を適切な分化培地中で培養することにより所望の細胞型へ分化するように誘導することができる。

【0128】

分化は、非限定的に Ca^{2+} 、上皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、形質転換成長因子(TGF)、サイトカイン、例えばインターロイキン、インターフェロン、または腫瘍壊死因子、レチノイン酸、トランスフェリン、ホルモン(例えば、アンドロゲン、エストロゲン、インスリン、プロラクチン、トリヨードサイロニン、ヒドロコルチゾン、もしくはデキサメタゾン)、酪酸ナトリウム、TPA、DMSO、NMF (N-メチルホルムアミド)、DMF (ジメチルホルムアミド)、あるいはマトリックス要素、例えばコラーゲン、ラミニン、ヘパリン硫酸)を含む、1種または複数種の分化剤を用いて誘導することができる。

40

【0129】

1つの態様において、本発明の前部前腸内胚葉細胞は、肺表現型を有する細胞へ分化するように誘導することができる。例えば、前部前腸内胚葉細胞は、同様にII型肺細胞として公知であるII型肺胞細胞へ分化するように誘導することができる。下垂体抽出物(例えばウシ下垂体抽出物)、ステロイドホルモン(例えばヒドロコルチゾン、もしくは酢酸塩のようなその塩)、成長因子(例えば、上皮成長因子、好ましくはヒト上皮成長因子)、カテコールアミン(例えば、ラセミ体もしくは鏡像異性体のいずれかの、エピネフリン)、鉄結

50

合タンパク質(例えば、トランスフェリン)、インスリン、ビタミン(例えば、レチノイン酸)、甲状腺ホルモン(例えば、トリヨードサイロニン)、血清アルブミン(例えば、組み換え調製物を含めて、ウシもしくはヒト血清アルブミン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシンのような、アミノグリコシド系抗生物質)、および/または抗真菌薬(例えば、アンフォテリシン-B)の1つまたは複数を含む培地を用いることができる。例えば、培地は、ヒドロコルチゾン、上皮成長因子、インスリン、トリヨードサイロニン、トランスフェリン、およびウシ血清アルブミンを含むことができ、いくつかの態様において、レチノイン酸、下垂体抽出物、およびエピネフリンをさらに含むことができる。CambrexのSAGM(商標)培地(カタログCC-3118)は、II型肺胞細胞へ前部前腸内胚葉細胞を分化させるのに特に有用である。

10

【0130】

本発明者らは、適切な分化因子の使用を通じて、肺細胞の純粋な集団を得ることができた。好ましくは、肺細胞は末梢の肺細胞型、好ましくは肺胞型細胞、より好ましくはI型またはII型の肺胞型細胞である。

【0131】

いくつかの態様において、本発明の方法は、肺胞II型細胞への幹細胞の直接分化を効率的に誘導する。いくつかの態様において、本方法は、肺胞II型細胞の実質的に純粋な集団(例えば、少なくとも95%の肺胞II型の表現型)をもたらす。

【0132】

1つの態様において、本発明の前部前腸内胚葉細胞は、肺胞II型細胞の少なくとも1つの特徴を示す細胞へ分化するように誘導することができる。例えば、前部前腸内胚葉細胞は、肺胞II型細胞表現型の方向への分化に十分な時間、FGF-10、EGF、Wnt3a、およびKGFを含む分化培地の存在下において培養することができる。

20

【0133】

いくつかの態様において、Wntシグナル伝達のアゴニストはWnt3aであり; その他のものを、本明細書において記述されるように、用いることもできる。本明細書において記述される方法で用いるために、Wnt3aは約1 ng/ml~10 μ g/ml、10 ng/ml~1 μ g/ml、10 ng/ml~500 ng/ml、10 ng/ml~250 ng/ml、または10 ng/ml~100 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。好ましい態様において、Wnt3aは約25 ng/ml~150 ng/ml、50 ng/ml~150 ng/mlまたは75 ng/ml~150 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。さらに好ましい態様において、Wnt3aは約100 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。

30

【0134】

いくつかの態様において、FGFシグナル伝達のアゴニストはFGF7またはFGF10であり; その他のものを、本明細書において記述されるように、用いることもできる。本明細書において記述される方法で用いるために、FGF7またはFGF10は、約1 ng/ml~10 μ g/ml、10 ng/ml~1 μ g/ml、10 ng/ml~500 ng/ml、10 ng/ml~250 ng/ml、または10 ng/ml~100 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。好ましい態様において、FGF7またはFGF10は、約25 ng/ml~150 ng/ml、50 ng/ml~150 ng/mlまたは75 ng/ml~150 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。最も好ましい態様において、FGF7およびFGF10の両方が約10 ng/mlの濃度で培養物中に存在する。

40

【0135】

例示的な幹細胞が分化した肺胞II型細胞は、形態学的に正常と思われ、特徴的なサーファクタントタンパク質A、BおよびC、CFTRならびに α -1AT RNAを発現するだけでなく、補体タンパク質C3およびC5を合成かつ分泌もする。したがって、損傷した肺胞および、限定されるものではないが、肺に影響を与える遺伝的疾患のような他の肺疾患または障害を再構成するために治療的に使用できる、かなりの量の実質的に純粋な幹細胞由来の肺胞II型細胞を確実に作出するために独特のアプローチが提供される。

【0136】

好ましくは、細胞は、導管構造を形成する分化遠位上皮細胞(proSpC発現性)から構成される組織型(histiotypic)肺胞様構造を形成する。このように、埋植された細胞は、それ

50

を周囲の組織に似せる特徴を発達させるであろう。これらの方法を用いて、生物学的足場は組織を増強することができ、本発明の生物学的足場は、組織工学に用いることができ、従来のいかなる組織工学的背景でも用いることができる。

【0137】

1つの態様において、本方法は、胚体形成を通じて幹細胞から肺胞II型細胞を導出するために多工程が使われた、幹細胞から肺胞II型細胞の分化への以前の試みと対照をなす、肺胞II型細胞への幹細胞の直接分化をもたらす。以前のアプローチでは、肺胞II型細胞が導出される内胚葉を発生させるのに長い時間を要するが、結局のところ、混合された細胞集団中に検出できる数の肺胞II型細胞はほとんど産生されない。それゆえ、実質的に純粋なかつ多数の肺胞II型細胞を提供することに加えて、本方法の態様は、幹細胞由来の肺胞II型細胞を作出するうえでの時間および労力を減らし、その治療的および臨床的使用を促す。

10

【0138】

肺細胞(例えば、肺胞II型細胞)への分化は、例えば、光学顕微鏡検査によって評価される肺形態により、ならびに透過電子顕微鏡検査によって評価される層状体および微小空胞体の存在により確認することができる。層状体は、肺胞II型細胞においてのみ発現される内在性膜タンパク質である貯蔵型の肺サーファクタント、つまりサーファクタントタンパク質C (SPC)として働く分泌リソソームである。SPC mRNAの存在は逆転写酵素PCRによって検出することができ、SPCタンパク質の存在は免疫蛍光染色によって検出することができる。

20

【0139】

方法

本発明は、幹細胞(例えば、iPS細胞)が胚体内胚葉を経由して肺胞II型細胞へ分化されるという発見に関する。例えば1つの態様において、本発明は、1) 胚体内胚葉の細胞へ幹細胞を誘導する工程; 2) 前部前腸内胚葉細胞へ胚体内胚葉の細胞を誘導する工程; 3) 肺細胞へ前部前腸内胚葉細胞を誘導し、それによって肺細胞へ幹細胞を分化させる工程を含む、肺細胞の集団へ幹細胞の集団を分化させる方法を提供する。本発明の細胞は、肺発生生物学を調べるのに有用である。さらに、本発明の細胞は、とりわけ、創薬、毒性試験、疾患病理学などに有用である。したがって、本発明は、再生医療の形態としての血管新生された肺組織の作出のための方法および組成物を提供する。

30

【0140】

少なくとも1つの幹細胞に由来する肺胞上皮II型細胞系統の、インビトロで培養された細胞の集団の作出は、好ましくは胚体の形成なくして、分化した細胞を産生するために本発明の方法にしたがってインビトロで少なくとも幹細胞を培養する工程を含む。1つの態様において、産生の方法は、肺胞上皮II型細胞の少なくとも1つのバイオマーカーの発現を検出することにより肺胞上皮II型細胞の表現型の、分化した細胞を特定する工程、および肺胞上皮II型細胞の表現型を有する分化した細胞を単離する工程をさらに含む。場合によっては、これは、少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%の細胞が肺胞上皮II型細胞の表現型を有する、分化した細胞の精製された集団を選択する工程を含みうる。

40

【0141】

本発明の細胞およびそれに由来する細胞は、とりわけ、ヒト、霊長類、げっ歯類および鳥類に由来することができる。好ましくは、本発明の細胞は哺乳動物、とりわけマウス、ラットおよびヒトに由来する。肺胞上皮II型細胞が由来する幹細胞は、野生型または遺伝子改変型のいずれかの幹細胞でありうる。

【0142】

本発明の細胞は、浮遊状態で成長されるか接着細胞培養物として成長されるかを問わず、培地と接触して成長される。

【0143】

本発明において用いられる培地は好ましくは、さらなる構成要素を任意で補ってもよい

50

、基礎培地を含む。

【0144】

基礎培地は、細胞に不可欠な炭素源および/またはビタミンおよび/またはミネラルを供給する培地である。基礎培地は一般に、タンパク質を含んでおらず、それだけでは、細胞の自己再生/対称性分裂を支持することができない。

【0145】

好ましくは、適当な細胞は哺乳動物、より好ましくは霊長類、およびより好ましくはさらに、ヒトから単離される。本発明の方法において有用な細胞は、本明細書において、例えば実施例の項において論じられている方法を用いて、または当技術分野において公知の任意の方法によって単離される。単離の後、適当な細胞は培地中で培養される。細胞の成長を支持する培地配合物は、イーグル最小必須培地、ADC-1、LPM (ウシ血清アルブミン不含)、F10 (HAM)、F12 (HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI 1640、BGJ培地(フィットン-ジャクソンの改変を含むものおよび含まないもの)、イーグル基礎培地(BME-アールの塩類ベース(salt base)の添加あり)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM-血清不含)、ヤマネ(Yamane)、IMEM-20、グラスゴー改変イーグル培地(GMEM)、リーボビッツL-15培地、マッコイの5A培地、M199培地(M199E-アールの塩類ベースを含む)、M199培地(M199H-ハンクスの塩類ベースを含む)、イーグル最小必須培地(MEM-E-アールの塩類ベースを含む)、イーグル最小必須培地(MEM-H-ハンクスの塩類ベースを含む)およびイーグル最小必須培地(非必須アミノ酸を含むMEM-NAA)などを含むが、これらに限定されることはない。

【0146】

さらなる構成要素が培地に添加されうるものとさらに認識される。そのような構成要素は、抗生物質、抗真菌薬、アルブミン、成長因子、アミノ酸、および細胞の培養のために当技術分野にとって公知の他の構成要素を含むが、これらに限定されることはない。培地へ添加されうる抗生物質は、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むが、これらに限定されることはない。培地中のペニシリンの濃度は、1 mlあたり約10~約200単位である。培地中のストレプトマイシンの濃度は、約10~約200 $\mu\text{g/ml}$ である。しかしながら、本発明は、本発明の細胞を培養するためのいずれか1つの培地に限定されるものと決して解釈されるべきではない。むしろ、組織培養において本発明の細胞を支持できる任意の培地が用いられうる。

【0147】

ある種の態様において、本発明において用いられる培地は、定義されていない任意の構成要素(例えば、血清および/もしくはフィーダー細胞)、すなわち、その含量が不明である構成要素、または定義されていない因子もしくは特定されていないさまざまな因子を含有しうる構成要素を含有しない。血清不含かつ血清抽出物不含の、十分に定義された培地を用いることの利点は、本発明の細胞およびそれに由来する細胞の培養とそれに続く操作のための効率的かつ一貫性のあるプロトコルを得ることができるというものである。

【0148】

本発明の全ての局面における細胞の培養のための典型的な基材は、細胞培養に有用であると当分野において認識されている培養表面であり、これらには、プラスチック製表面、金属製表面、複合材製表面が含まれるが、通常は、広く市販されているプラスチック製組織培養プレートのような表面が用いられる。そのようなプレートは、多くの場合、直径が数センチメートルである。スケールアップのために、この種のプレートは、さらにもっと大きな直径で用いることができ、多くの繰り返しプレートユニットを用いることができる。

【0149】

培養表面は、通常は表面上にコーティングされた、細胞接着タンパク質をさらに含むうる。細胞上に存在する受容体または他の分子が、該タンパク質または他の細胞培養基材に結合し、これが表面への接着を促進し、成長を促進する。

【0150】

ある種の態様において、本発明の培養は、好ましくは接着培養であり、すなわち、細胞

は基材に接着される。

【0151】

場合によっては、本発明の細胞は、脱細胞化された組織、好ましくは脱細胞化された肺組織上で培養することができる。場合によっては、本発明の細胞は、肺組織の再生のために脱細胞化された組織上で培養される。脱細胞化された肺組織の例は、PCT/US2010/023213に開示されており、その内容は全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0152】

1つの態様において、本発明は、脱細胞化された肺組織に「播種する」細胞を提供する。細胞は、適切な分化培地の存在下において足場上で細胞を培養することにより、インビトロで分化することができる。分化した細胞は、その全体の形態により、およびそれらが他の細胞と形成する結び付きにより特定することができる。例えば、肺細胞へ分化する細胞は、細気管支に似ている複雑な形態を発生させる。

10

【0153】

本発明は同様に、いくつかの態様にしたがって提供される、哺乳動物の肺における損傷または罹患した肺胞上皮組織を修復するインビボの方法を提供する。そのような方法は、少なくとも95%が肺胞上皮II型の表現型を有する、分化した幹細胞、またはその子孫の集団を、損傷または罹患した肺胞上皮組織を含む肺へ移植する工程を含む。細胞の集団は、本明細書において記述される方法にしたがって調製され、損傷または罹患した肺胞上皮組織の少なくとも一部分を修復するのに有効である。いくつかの態様において、哺乳動物は、肺における肺胞上皮組織に影響を与える遺伝的疾患に苦しんでおり、その治療的導入遺伝子は、該肺胞上皮組織での該遺伝的疾患の有害作用を改善するための遺伝子産物をコードする。いくつかの態様において、少なくとも1つの分化した幹細胞、またはその子孫は、細胞特異的プロモーターに機能的に連結された治療的導入遺伝子を含み、ここでこの導入遺伝子が治療用遺伝子産物をコードする。いくつかの態様において、上記の細胞集団は、肺内の損傷または罹患した肺胞上皮組織へ直接移植される。いくつかの態様において、細胞の集団を移植する工程は、それらを肺へ、中咽頭挿管により気管内投与する工程を含む。

20

【0154】

1つの態様において、本発明の方法は、幹細胞の分化培養物からの肺前駆細胞の作出を提供する。さらに、iPS細胞が真皮の皮膚線維芽細胞から作出されうるという最近の発見により、体細胞から肺前駆上皮細胞を作出することの可能性について調べるために調査を始めた。これらの努力が成功に繋がれば、患者特異的なiPS細胞を得ることができ、それによって異種の胚性幹細胞源が利用された場合に起こりうる免疫拒絶の問題を回避することができる。さらに、iPS細胞は、嚢胞性線維症、 α -1-抗トリプシン欠乏症、およびサーファクタントタンパク質欠乏症を含む、肺に影響を与える遺伝的疾患を有する個体から、遺伝子修正された、患者特異的な肺前駆細胞を作出することの可能性を与える。

30

【0155】

本組成物および方法の多くの態様では、EBの形成なしに肺胞上皮II型細胞へのヒト幹細胞の直接的な分化を効率的に誘導し、また、ヒト肺胞上皮II型細胞の高度に純粋な集団を産生する。いくつかの態様において、本方法は、奇形腫を産生する重大なリスクなしに哺乳動物宿主の肺組織への埋植に適した実質的に純粋な肺胞上皮II型表現型(例えば、少なくとも95%および多くの場合には少なくとも99%の肺胞上皮II型表現型)の細胞のクローン集団をもたらす。

40

【0156】

記述される方法の態様を用いて産生された、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞の移植は、体重および動脈血酸素飽和度の回復、コラーゲン沈着の減少、ならびに生存の増大によって実証されたように、損傷から1日または2日後に移植された場合に急性肺損傷を反転または抑止した。興味深いことに、損傷した肺胞上皮領域のなかには、観察可能な、移植された幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞を持っていないにもかかわらず、記述される方法の態様を用いて産生された、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞の移植後に健常と思われるものもあ

50

った。これは、記述される方法の態様を用いて産生された、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞が、限定されるものではないが、IL-10、アンジオポエチン-1、およびケラチノサイト成長因子のような抗炎症性メディエータの放出などの、傍分泌修復/損傷した肺上皮に対する防御を与えうることを示唆している。

【0157】

いくつかの態様において、幹細胞に由来する肺胞II型上皮細胞(限定されるものではないが、実施例において用いられているように、ヒトiPS細胞のような)は、肺損傷の処置において治療的に用いられる。急性肺損傷の動物モデルにおいて幹細胞に由来する肺胞II型上皮細胞を用い本明細書において治療活性が実証される。プレオマイシン誘導性の急性肺損傷に供されたマウスの肺へ移植された場合に、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞は正常な初代肺胞上皮II型細胞として振る舞い、肺胞I型上皮細胞の表現型マーカーを発現する細胞へ分化した。腫瘍形成性の副作用を経験することなく、肺損傷は、体重および動脈血酸素飽和度の回復、コラーゲン沈着の減少、ならびに生存の増大によって実証されたように、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞を移植されたマウスにおいて抑止された。それゆえ、幹細胞由来の肺胞上皮II型細胞の移植は、急性肺損傷および関連した障害を処置するために有効な治療法としての将来性を発揮する。

【0158】

1つの態様において、本発明は、本発明の分化した幹細胞、またはその子孫の集団を哺乳動物へ移植する工程を含む、哺乳動物の肺内の損傷または罹患した肺胞上皮組織を修復する方法を提供する。好ましくは、本発明の細胞は、損傷または罹患した肺胞上皮組織を含む部位に移植される。別の態様において、本発明の細胞は哺乳動物の肺へ直接移植される。1つの態様において、本発明の分化した幹細胞、またはその子孫の集団は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%が肺胞上皮II型の表現型を示すものであり、ここで細胞の集団が本発明の方法により調製され、かつ損傷または罹患した肺胞上皮組織の少なくとも一部分をその部位で修復するのに有効である。分化した幹細胞、またはその子孫は、細胞特異的プロモーターに機能的に連結された、所望の遺伝子産物(例えば、治療用タンパク質またはペプチド)をコードする、導入遺伝子を含みうる。

【0159】

1つの態様において、本発明は、本発明の分化した幹細胞、またはその子孫の集団を哺乳動物へ移植する工程を含む、哺乳動物の肺内の肺胞上皮組織に影響を与える遺伝的疾患を処置する方法を提供する。好ましくは、本発明の細胞は肺へ、遺伝的疾患によって悪影響を受けている肺胞上皮組織を含む部位に移植される。本発明の分化した幹細胞、またはその子孫は、遺伝的疾患または肺胞上皮組織におけるその有害作用を少なくとも埋植の部位でインビボでの発現時に改善する遺伝子産物をコードする導入遺伝子を含むことができる。本発明の細胞は、細胞特異的プロモーターに機能的に連結された導入遺伝子を含んでよく、ここでこの導入遺伝子が治療用遺伝子産物をコードする。

【0160】

本発明によって包含される疾患の処置の方法は、本発明の単一細胞、細胞系、組成物、または細胞集団の、それを必要としている哺乳動物への移植を含むことができる。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0161】

1つの態様において、本発明の細胞は、本発明の細胞の分化に及ぼす誘導因子または遮断因子の有効性をアッセイするために用いることができる。そのようなアッセイ法は、試験したい因子と本発明の細胞(すなわち組成物、細胞系、および集団中に存在するような、または単一細胞)を接触させる工程を含みうる。細胞の分化に及ぼす因子の効果は、結果として得られた細胞のマーカープロファイルを判定することにより、すなわち細胞が本発明の細胞に似たマーカープロファイルを有するかどうか、またはこれらのマーカーが失われているかどうかを示すことにより、適当に評価することができる。本発明の細胞はまた、医薬、例えば、肺疾患の処置をアッセイするのに適している。

【0162】

遺伝子改変

本発明の細胞は、気腫、閉塞性細気管支炎、および嚢胞性線維症を含むが、これらに限定されない、肺疾患を処置するために用いることができる。例えば、細胞を、例えば気管点滴注入、吸入または注入などによって、レシピエントに送達することができる。培養下に拡大されるそのような細胞は、レシピエントにおける治療を達成するために用いることができる。

【0163】

遺伝子治療との関連では、レシピエントの肺への細胞の送達に先だって、本発明の細胞を、関心対象の遺伝子で処理することができる。いくつかの例では、そのような細胞ベースの遺伝子送達が、アデノウイルス遺伝子送達ベクターの吸入などといった肺への他の遺伝子送達手段に対して、著しい利点を示すことができる。宿主への細胞ベースの遺伝子送達が持つこの優位性は、吸入された遺伝子ベクターが典型的には、粘液層および宿主免疫系によって課される障壁により、低い細胞形質導入効率をもたらすという知見に由来する。細胞中に前もって挿入された治療遺伝子の送達では、レシピエント肺細胞への遺伝子治療ベクターの貫入に付随する問題が回避される。

【0164】

したがって、本発明は、本発明の方法によって培養された遺伝子改変細胞の使用を提供する。遺伝子改変は、例えば外因性遺伝子(「導入遺伝子」)の発現をもたらすか、内因性遺伝子の発現の変化をもたらす。そのような遺伝子改変は治療上の利益を持ちうる。あるいは、遺伝子改変は、例えば本発明の組成物を個体に埋植した後に、そのように修飾された細胞を追跡しまたは同定するための手段にもなりうる。細胞の追跡には、移植された遺伝子改変細胞の移動、同化および生存を追跡することが含まれる。遺伝子改変は少なくとも第2の遺伝子を含むこともできる。第2の遺伝子は、例えば、選択可能な抗生物質耐性遺伝子または他の選択可能マーカーをコードする。

【0165】

細胞を追跡するのに有用なタンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP)、他の蛍光タンパク質のいずれか(例えば、強化緑色、シアン、黄色、青色および赤色蛍光タンパク質; Clontech, Palo Alto, CA)、または他のタグタンパク質(例えば、LacZ、FLAG-tag、Myc、His₆など)が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0166】

細胞の遺伝子改変の目的が生物学的活性物質の産生にある場合、その物質は一般に、所与の障害の処置にとって有用なものであるだろう。例えば、細胞が骨または軟部組織形成に関連する一定の成長因子産物を分泌するように、細胞を遺伝子改変することが望ましい場合があるだろう。組織修復に関係する他の内因性細胞タイプの成長を誘導するための成長因子産物も有用である。例えば、内因性毛細管および/または微小血管内皮細胞を刺激するための成長因子は、軟部組織欠損の修復において、特に大体積の欠損に、役立ちうる。

【0167】

本発明の細胞は、細胞の培養にとって有益な分子、例えば栄養因子、成長因子、サイトカインなどを産生するように外因性遺伝物質を細胞中に導入することにより、遺伝子改変することができる。また、そのような分子を産生するように細胞を遺伝子改変することにより、細胞は、それを必要とする哺乳動物中に移植された時に、哺乳動物に対して追加の治療効果を与えることができる。例えば、遺伝子改変細胞は、哺乳動物中の移植部位に近接する細胞にとって有益な分子を分泌することができる。

【0168】

本発明の細胞は、当業者に知られる任意の方法を用いて遺伝子改変されうる。例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)、および Ausubel et al., Eds, (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY) 中

10

20

30

40

50

を参照されたい。例えば、細胞を、導入遺伝子を含む核酸が含まれている発現ベクターに曝露して、導入遺伝子が細胞内で発現されるのに適当な条件下で核酸が細胞内に導入されるようにする。導入遺伝子は一般に、適切なプロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチドを含む発現カセットである。ポリヌクレオチドはタンパク質をコードするか、生物学的に活性なRNA（例えば、アンチセンスRNAまたはリボザイム）をコードすることができる。したがって、例えば、ポリヌクレオチドは、毒素に対する耐性を付与する遺伝子、ホルモン（例えば、ペプチド成長ホルモン、ホルモン放出因子、性ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、サイトカイン（例えば、インターフェロン、インターロイキン、リンホカインなど）、細胞表面結合型細胞内シグナル伝達部分（例えば、細胞接着分子、ホルモン受容体など）、所与の系譜の分化を促進する因子（例えば、骨形態形成タンパク質(BMP)）などをコードすることができる。

10

【0169】

発現カセット内では、コードポリヌクレオチドが適切なプロモーターに機能的に連結される。適切なプロモーターの例には、原核生物プロモーターおよびウイルスプロモーター（例えば、レトロウイルスITR、LTR、前初期ウイルスプロモーター(IEp)、例えばヘルペスウイルスIEp（例えば、ICP4-IEpおよびICP0-IEEp）、サイトメガロウイルス(CMV) IEp、および他のウイルスプロモーター、例えばラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、およびマウス白血病ウイルス(MLV)プロモーター)が含まれる。他の適切なプロモーターは、真核生物プロモーター、例えばエンハンサー（例えば、ウサギ β -グロビン調節要素）、構成的に活性なプロモーター（例えば、 β -アクチンプロモーターなど）、シグナル特異的プロモーター（例えば、RU486に応答するプロモーターなどの誘導性プロモーター）、組織特異的プロモーターである。事前に定められた細胞との関連で遺伝子発現を駆動するのに適したプロモーターを選択することは、当技術分野の技能で十分に可能である。発現カセットは、2つ以上のコードポリヌクレオチドを含むことができ、所望どおりに他の要素（例えば、ポリアデニル化配列、膜挿入シグナルまたは分泌リーダーをコードする配列、リボソーム侵入配列、転写調節要素（例えば、エンハンサー、サイレンサーなど）など）を含むことができる。

20

【0170】

導入遺伝子を含有する発現カセットは、細胞に導入遺伝子を送達するのに適した遺伝子ベクター中に組み込まれるべきである。所望する最終用途に応じて、任意のそれらベクターを、細胞を遺伝子改変するために、そのように利用することができる（例えば、プラスミド、裸のDNA、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、パピローマウイルス、レトロウイルスのようなウイルスなど）。そのようなベクター内に所望の発現カセットを構築する任意の方法を利用することができ、それらの多くは当技術分野において周知である（例えば、直接クローニング、相同組み換えなど）。ベクターの選択が、細胞中にベクターを導入するために用いられる一般に当技術分野において公知である方法（例えば、プロトプラスト融合による方法、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃、エレクトロポレーション、DEAEデキストランまたは脂質担体によるトランスフェクション、ウイルスベクターによる感染など）を、おおむね決めることになる。

30

【0171】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、および他のDNAまたはRNAポリメラーゼ媒介技法を含むインビトロ増幅法を当業者に実行させるのに足る技法の例が、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-3 (3rd ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001)に見出される。

40

【0172】

いったんあるタンパク質に関して核酸をクローニングしたら、当業者は、種々の肺細胞中で組み換え遺伝子を発現させることができる。当業者は、所望の導入遺伝子を発現させるために利用することができる数多くの発現系を知っていると予期される。

【0173】

バイオリアクタ

50

本発明は、脱細胞化された肺に導入された本発明の細胞を培養するためのシステム(例えば、バイオリアクタ)を提供する。バイオリアクタは、細胞生存性、細胞の分化状態、および肺形態の維持を可能にする。本発明のバイオリアクタには、ビボ(vivo)環境の重要な特質が組み込まれている。本バイオリアクタは、脱細胞化および/または再細胞化プロセスを最適化するための変更が可能なように設計することができる。

【0174】

ある態様では、バイオリアクタが、使用者の指定した流量かつ哺乳動物の生理的流量レベルおよび生理的圧力レベル内で、脈管構造を通して培地を灌流させる能力を有する。別の態様では、バイオリアクタが、気管を通して空気または培地で組織(例えば、肺)を換気する能力を有する。好ましくは、正常な生理学的条件と合致するように陰圧換気法が使用されるが、陽圧を使った換気を行うこともできる。さらに別の態様において、バイオリアクタは、組織の血管コンパートメントと気道コンパートメントを異なる培地タイプで浸すことを可能にする能力を有する。別の態様において、バイオリアクタは、培養培地へのガス交換を可能にすると同時に、換気に関する所望の要件を満たす。別の態様では、バイオリアクタが、圧力測定、例えば肺動脈圧および気管圧の測定を可能にするためのポート(port)を持つ。好ましくは、圧力は正常な生理学的値の範囲内にある。別の態様では、バイオリアクタが、定期的な培地交換を可能にする手段を持つ。

【0175】

本発明のバイオリアクタは、一般に、組織にカニューレを挿入するための少なくとも1つのカニューレ挿入装置、カニューレを通して培地を灌流させるための灌流器具、および器官または組織の滅菌環境を維持するための手段(例えば、封じ込めシステム)を含む。カニューレ挿入装置は、一般に、組織の血管、導管、および/または腔中に導入するための適当なサイズの中空チューブを含む。典型的には、組織中の1つまたは複数の血管、導管、および/または腔にカニューレが挿入される。灌流器具は、液体(例えば、細胞破壊培地)のための保持容器および1つまたは複数のカニューレを通して器官越しに液体を移動させるための機構(例えば、ポンプ、空気圧、重力)を含むことができる。脱細胞化および/または再細胞化中の組織の滅菌性は、本明細書の他の項で論じる方法を用いて維持することができる。

【0176】

バイオリアクタは、本明細書において記述されるように、組織を再細胞化するために用いることができる。本プロセスは、一定の灌流特徴(例えば、圧力、体積、フローパターン、温度、ガス、pH)、機械的力(例えば、心室壁運動および心室壁応力)、および電気刺激(例えば、ペーシング)について監視することができる。灌流の有効性は流出液および組織切片において評価することができる。灌流体積、フローパターン、温度、O₂およびCO₂分圧、ならびにpHは、標準的な方法を用いて監視することができる。

【0177】

バイオリアクタおよび/または組織を監視するために、センサを用いることができる。ソノミクロメトリー、微小検圧法、および/またはコンダクタンス測定を用いて、圧力-体積を取得することができる。例えば、センサを用いて、カニューレが挿入された器官または組織を通して移動する液体の圧力; 系内の周囲温度および/または器官もしくは組織の温度; カニューレが挿入された器官または組織を通して移動する液体のpHおよび/または流量; および/または再細胞化組織の生物学的活性を監視することができる。そのような特質を監視するためのセンサを持つことに加えて、組織を再細胞化するためのシステムは、そのような特質を維持または調節するための手段も含むことができる。そのような特質を維持または調節するための手段は、温度計、サーモスタット、電極、圧力センサ、オーバーフロー弁、液体の流量を変化させるための弁、溶液のpHを変化させるために用いられる溶液への流体接続を開け閉めするための弁、風船、外部ペースメーカー、および/またはコンプライアンスチャンバなどの構成要素を含むことができる。安定した状態(例えば、温度)の確保に役立つように、チャンバ、リザーバ、およびチューブには水ジャケットを装着することができる。

【0178】

バイオリアクタは、細胞の生存および分化を支持するために、肺組織に十分な栄養素供給および機械的刺激を与える能力を有する。バイオリアクタは、インビトロ肺組織培養および人工肺組織培養に用いることができる。好ましくは、本発明の細胞と組み合わせて脱細胞化された肺足場を用いて人工肺組織を培養するために、バイオリアクタを用いることができる。

【0179】

肺組織の真の3次元セグメントをインビトロ培養する能力を有するバイオリアクタの開発は、臨床的に有用な人工肺組織の開発における重要な一工程である。例えば、人工肺をレシピエントに埋植する前に、人工肺組織の成長および成熟をバイオリアクタ中で行うことにより、最終的な埋植肺組織のインビボでの機能性を強化することができる。また、肺の生物学、生理学および発生の研究を支援するために、インビトロ肺培養のためのバイオリアクタを用いることもできる。すなわち、肺内皮および上皮細胞の相互作用による肺動脈-毛細管障壁の形成を、本発明の人工肺組織およびバイオリアクタを用いて研究することができる。当業者は、現在使用されているさまざまな動物モデルよりもよく制御された環境で、肺の挙動を研究することが可能になるであろう。人工肺組織およびバイオリアクタは、時間も費用もかかるヒト試験または動物試験に進む前に、ヒト組織および動物組織における薬理学的な試験および調査を行うために用いることもできる。

【0180】

投与

本発明では、インビトロ環境とインビボ環境の両方での本発明の細胞の使用が考えられる。したがって、本発明は、研究目的および治療目的もしくは医学的/獣医学的目的での本発明の細胞の使用を提供する。研究環境では、この技術に関して、数多くの実用的応用が存在する。そのような応用の一例は、エクスピボがんモデル、例えばさまざまなアブレーション技法(例えば、放射線処置、化学療法処置、またはそれらの組み合わせを含む)の有効性を実験室で調べ、そうすることによって処置方法を最適化するために病気の患者を使用することを避けるためのものなどにおける本発明の細胞の使用である。例えば、新しく摘出した肺をバイオリアクタに取り付け、その肺を処理して組織をアプレートすることができる。インビボ使用の別の例は、組織工学のための使用である。

【0181】

本発明は同様に、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて肺欠損を軽減または処置する方法を提供する。本方法は、それを必要としている哺乳動物に、本発明の細胞を含む組成物の治療的有効量を投与し、それにより哺乳動物において肺欠損を軽減または処置する工程を含む。

【0182】

本発明の細胞はインビボでも役立つ。数ある用途のなかでも、対象(本明細書においては「患者」と互換的に用いられ、ヒトと動物の両方を包含するように意図される)のインビボ処置法を挙げることができる。一般に、ある種の態様に関して、対象の処置方法は、対象中または対象の表面に本発明の細胞を埋植する工程を含み、細胞の埋植は対象における検出可能な変化をもたらす。検出可能な変化は、自然の知覚を使ってまたは人造の装置を使って検出することができる任意の変化であることができる。本発明では任意のタイプの処置(例えば、疾患または障害の治療的処置、皮膚の斑点の美容的処置など)が想定されるが、多くの態様では、処置が、対象の疾患、障害、または他の苦痛の原因の治療的処置である。したがって、検出可能な変化は、対象を冒す疾患または障害の少なくとも1つの臨床症状における変化、好ましくは改善の検出であることができる。例示的なインビボ治療法には、腫瘍処置後の器官の再生、医学的装置を埋植するための手術部位の調製、皮膚グラフトリング、および疾患または障害によって損傷を受けたか破壊されたものなどの、組織または器官の一部または全部の代用が含まれる。対象はヒトまたは動物であることができるという事実を考慮すると、本発明は医学的応用と獣医学的応用の両方を持つ。

【0183】

本発明は、本発明の細胞を、それを必要とする哺乳動物中に埋植することによって、患者を処置する方法も提供する。いくつかの例では、本発明の細胞が、適当な細胞、例えば肺胞上皮II型細胞を含む。しかし本発明は、いかなる特定の細胞型にも限定されるべきではない。埋植後、グラフトされた細胞は、それに内因性組織の特徴を発生させる環境キューに応答することができる。好ましくは、細胞は、導管構造を形成する分化遠位上皮細胞(proSpC発現性)から構成される組織型(histiotypic)肺胞様構造を形成する。このように、埋植された細胞は、それを周囲の組織に似せる特徴を発生させるであろう。これらの方法を用いて、生物学的足場は組織を増強することができ、本発明の生物学的足場は、組織工学に用いることができ、従来のいかなる組織工学的背景でも用いることができる。

【0184】

10

したがって、本発明は組織再生への応用を包含する。組織再生治療アプローチの目的は、高密度の修復コンピテント細胞(または局所環境による影響を受けたときにコンピテントになることができる細胞)を、初期の創傷力学と最終的な新組織生成の両方を最適化するような形で、欠損部位に送達することである。本発明の組成物は、個体における肺組織欠損を軽減または処置するのにとりわけ有用である。有利なことに、本発明の組成物は、改善された肺組織再生をもたらす。具体的には、本発明の組成物の結果として、組織再生が、より迅速に達成される。

【0185】

有利なことに、本発明の組成物および方法は、先行技術の方法に対する改善を表す。好ましくは、肺組織欠損を処置するために用いられる組成物は、本明細書の他の項で記述されるように、肺胞上皮II型細胞を含む。

20

【0186】**実験例**

以下に実験例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。これらの実施例は、例示のために記載するに過ぎず、別段の指定がない限り、限定を意図するものではない。したがって、本発明は、決して、以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、本発明は、本明細書が提供する教示の結果として明白になる、ありとあらゆる変形を包含すると解釈すべきである。

【0187】

さらなる説明なしに、当業者は、前述の説明および以下の例示的な実施例を使って、本発明の化合物を作出および利用し、主張される方法を実践しうるものと考えられる。以下の実施例はそれゆえ、本発明の好ましい態様を具体的に指摘するものであり、決して開示の残りの部分を限定するものと解釈されてはならない。

30

【実施例】**【0188】****実施例1: ヒト誘導多能性幹細胞由来の肺胞II型細胞の分化および特徴付け**

本明細書において提示される実験は、肺組織をインビトロで再生できるかどうか探索するように設計された。成熟ヒト肺胞II型およびI型細胞に類似した表現型特性を有していたヒトiPS細胞から、肺胞上皮II型(AETII)およびI型(AETI)細胞の相対的に均質な集団を作出した。最大97%までの細胞がサーファクタントタンパク質C陽性、95%がムチン-1陽性、93%がサーファクタントタンパク質B陽性、および89%が上皮マーカーCD54陽性であった。さらに、AETIIをWnt/ β -カテニン阻害剤(例えば、IWR-1)に曝露することによって、iPSC-AETII様の表現型が主にAETI様の表現型に変えられた。AETI細胞であった細胞のうち、90%超のものがI型マーカーT1 α およびカベオリン-1陽性であった。ラットまたはヒト成体肺全体を脱細胞化試薬で処理し、引き続いてこれらのマトリックスにヒトiPS細胞由来の肺胞細胞を播種することにより、無細胞肺マトリックスを調製した。適切な培養条件の下で、これらの前駆細胞は3D肺組織の足場に接着し、その内部で増殖し、分化した肺上皮のマーカーを呈した。

40

【0189】

これらの実験において利用された材料および方法をこれから記述する。

50

【0190】

化学物質および試薬

マウス胚線維芽細胞(MEF) (GSC-6201)はGlobal stemから購入し、マトリゲル(Matrigel) (354277)はBDから購入し、組み換えヒトWNT3a (5036WN)はR&Dから購入した。ディスペーゼ(07923)はStem Cell Technologyから入手した。ケラチノサイト成長因子(KGF) (PHG0094)、線維芽細胞成長因子10 (FGF-10) (PHG0204)、上皮成長因子(EGF) (PHG0311)、ヒト塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF) (13256-029)、NOGGIN (PHC1506)、アクチビンA (PHG9014)、ノックアウト血清代替物(108280280)、RT-PCR用Superscript第1鎖合成システム(18080-051)はInvitrogenから購入した。ダルベッコ改変イーグル培地: 栄養混合物F-12 (DME M/F-12) (11330-032)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) (11905-092)、RPMI 1640 (11875-093)、IMDM (12440-053)、非必須アミノ酸(1140-050)、L-グルタミン(25030164)、ピルビン酸ナトリウム(11360-070)、2-メルカプトエタノール(21985-023)、B27サプリメント(17504-044)、トリプシン(25200-056)、ペニシリン-ストレプトマイシン(15140-122) ウシ胎仔血清(FBS)はlife technologyによるGIBCOから購入した。レチノイン酸(R2625)ゼラチン(G1393)、SB431542(S4317)、ヒトECMタンパク質(E0282)、IWR-1(I0161)、ヒトコラーゲンI型(C7624)およびIV型(C7521)、ヒトフィブロネクチン(F0895)、ヒトECMタンパク質(E0282)、CHAPs C3023)、ベンゾナーゼ(E1014)、デオキシコール酸ナトリウム(D6750)、エラストーゼ(E8140) Triton X-100 (T9284)はSigma-Aldrichから購入した。ニトロプルシッドナトリウム二水和物(71778)はFlukaから入手した。DNase I (LS006333)はWorthington Biochemical Corporationから購入した。末梢気道成長培地(Small Airway Growth Medium) (SAGM) (CC-3119)、アンフォテリシンB (17836R)はLonzaから購入した。ヒトSPC ELISAキット(E01S0168)はLife Science Advanced Technologies Incから入手した。過酢酸またはPAA (P05020)はPfalz & Bauerから入手した。ウシ胎仔血清(FBS) (SH30071.03)はHycloneから入手した。iQ(商標) SYBR Green Supermix (170-8882)はBio-Radから入手した。本研究において用いられた全ての抗体は、表1に記載されている。

【0191】

(表1) さまざまな実験の染色、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットで用いられた抗体のリスト

一次抗体			
抗原	タイプ	供給業者 (Cat #) (lot #)	適用
β -アクチン	モノクローナル	Abcam (Cat# ab8226, Lot# GR88207-1)	WB
カスパーゼ3	ウサギ ポリクローナル	Abcam (Cat# ab13847, Lot# GR62173-2)	IHC

10

20

30

CCSP	ウサギ ポリクローナル	Millipore (Cat# 07-623, Lot# 1972321)	IHC
CCSP	ヤギ ポリクローナル	Biovender (Cat# RD81022220, Lot# RD2412)	IHC
CD54-PE	マウス モノクローナル	BD Pharmingen (Cat# 560971, Lot# 10609)	FC
CXCR4-APC	モノクローナル	BD Pharmingen (Cat# 560936, Lot# 41560)	FC
サイトケラチン-5	ウサギ ポリクローナル	Abbiotec (Cat# 251431, Lot# 11092101)	IHC
FoxA2	ヤギ ポリクローナル	R&D Systems (Cat# AF2400, Lot# ULB0311101)	ICC, FC
Muc-1	モノクローナル	R&D Systems (Cat# MAB6298, Lot# CDYA0111031)	ICC, FC
Nanog	ウサギ モノクローナル	Abcam (Cat# ab80892, Lot# GR40243-14)	ICC
Nkx2.1	ウサギ ポリクローナル	Abcam (Cat# ab76013, Lot# GR76790-2)	ICC, IHC, FC
Oct4	ヤギ ポリクローナル	Abcam (Cat# ab27985, Lot# GR56247-1)	ICC, FC
p63	モノクローナル	Santa Cruz (Cat# sc-71825, Lot# H2510)	IHC
Pax9	ラット モノクローナル	Abcam (Cat# ab28538, Lot# GR53993-1)	ICC
Pax9	ヤギ ポリクローナル	Santa Cruz (Cat# sc-7746, Lot# K121)	ICC
PCNA	モノクローナル	Abcam (Cat# ab29, Lot# GR70504-2)	IHC
proSPB	ウサギ ポリクローナル	Millipore (Cat# ab3430, Lot# NG1820771)	ICC, FC
proSPC	ウサギ モノクローナル	Millipore (Cat# ab3786, Lot# 2117989)	ICC, IHC, FC
proSPC	ウサギ ポリクローナル	Abcam (Cat# ab40879, Lot# GR86765-1)	WB
Sox2	ウサギ ポリクローナル	Abcam (Cat# ab97959, Lot# Unknown)	ICC
Sox2-AF647	モノクローナル	BD Pharmingen (Cat# 562139, Lot# 18245)	ICC, FC
Sox17	ヤギ ポリクローナル	R&D Systems (Cat# AF1924, Lot# KGA0411031)	ICC, FC
Sox17	マウス モノクローナル	Abcam (Cat# ab84990)	ICC
SPA	ウサギ ポリクローナル	Millipore (Cat# ab3420, Lot# NG1888873)	ICC
SPA	ウサギ ポリクローナル	Santa Cruz (Cat# sc-13977, Lot# K0807)	WB
SPC	ウサギ ポリクローナル	Santa Cruz (Cat# sc-13979, Lot# L1710)	ICC, IHC, FC
SPC	モノクローナル	Life Sciences Advanced Tech.(Cat #E01S0168)	ELISA
SSEA4	モノクローナル	Millipore(Cat# MAB4304, Lot #	ICC

10

20

30

40

		LV1488380	
T1α	モノクローナル	Abcam (Cat# ab10288, Lot# GR47830-3)	IHC
Tbx1	ウサギ ポリクローナル	Abcam(Cat # ab18530)	ICC
TRA-1-81	モノクローナル	Millipore(Cat#MAB4381, Lot # LV1512392)	ICC
CD166-PE	マウス モノクローナル	(Cat# 559263, Lot# 3018832)	FC
CD104-FITC	マウス モノクローナル	(Cat# 64233, Lot # 3039557	FC
検出抗体(Detection Antibodies)			
タイプ		Provider(Cat #) (lot #)	適用
Alexa Fluor(登録商標) 555ロバ抗ヤギIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A21432, Lot# 439379)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 568ロバ抗マウスIg		Invitrogen (Cat# A10037, Lot# 1110068)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 488ロバ抗ラットIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A21208, Lot# 1017330)	ICC
Alexa Fluor(登録商標) 488ウサギ抗ヤギIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A11078, Lot# 1069847)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 555ヤギ抗ウサギIgG (H+L)、高度の交差吸収処理済み		Invitrogen (Cat# A21429, Lot# 1010124)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 488ヤギ抗ウサギIgG (H+L)、高度の交差吸収処理済み		Invitrogen (Cat# A11034, Lot# 1008720)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 555ヤギ抗マウスIgG (H+L)、高度の交差吸収処理済み		Invitrogen (Cat# A21424, Lot# 1214852)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 555ヤギ抗ラットIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A21434, Lot# 1008806)	ICC
Alexa Fluor(登録商標) 488ニワトリ抗ウサギIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A21441, Lot# 1003212)	ICC, IHC
Alexa Fluor(登録商標) 488ニワトリ抗ヤギIgG (H+L)		Invitrogen (Cat# A21467, Lot# 474697)	ICC, IHC
ヤギ抗マウスIgG - HおよびL (FITC)		Abcam (Cat# ab6785, Lot# GR6891-4)	ICC, IHC
ヤギ抗ウサギIgG-HRP		Santa Cruz (Cat# sc-2004, Lot#	WB

10

20

30

40

	H2806)	
HRP-結合	Life Sciences Advanced Tech.(Cat #E01S0168	ELISA
APCマウスIgG2a, κ アイソタイプ対照	BD Pharmingen (Cat# 555576, Lot# 33828)	アイソタイプ対照
PEマウスIgG1, κ アイソタイプ対照	eBiosciences (Cat# 12-4714-82, Lot# E01672-1630)	アイソタイプ対照
Alexa Fluor(登録商標) 647マウスIgG1, κ アイソタイプ対照	BD Pharmingen (Cat# 557714, Lot# 34876)	アイソタイプ対照
マウスIgG2a κ アイソタイプ対照 FITC-	eBiosciences (Cat# 11-4724-81, Lot# E00590-1630)	アイソタイプ対照
アイソタイプFITCヤギ抗マウスIg	(Cat# 611233, Lot# 039557)	
PEマウスIgG κ アイソタイプ対照	(Cat# 555749, Lot# 38193)	

10

略語：IHC，免疫組織化学；ICC，免疫細胞化学；FC，フローサイトメトリー；WB，ウェスタンブロット；ELISA，酵素結合免疫吸着測定法；PE，フィコエリトリン、APC，アロフィコシアニン；FITC，フルオレセインイソチオシアネート；HRP，西洋ワサビペルオキシダーゼ；CCSP，クララ細胞分泌タンパク質；PCNA，増殖性細胞核抗原；SSEA4，発生段階特異的胎児性抗原-4；Oct4，オクタマー結合性転写因子4；Muc-1，ムチン1；SPA，サーファクタントタンパク質A；SPB，サーファクタントタンパク質B；SPC，サーファクタントタンパク質C；Nkx2.1，NK2ホメオボックス1；Sox2，SRY（性決定領域Y）-ボックス2；Sox17，SRY-ボックス17；Tbx1，T-ボックス1；Pax 9，ペアードボックス遺伝子9；CXCR4，C-X-Cケモカイン受容体4型；FoxA2，フォークヘッドボックスタンパク質A2；AF647，Alexa Fluor（登録商標）647。

20

【0192】

30

ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞系iPSC（IMR90，C1）およびiPSC（新生児包皮，C2）を得た（Takahashi K, et al. 2007. Cell 131(5):861-872）。両ヒトiPS細胞系は、OCT-4、SOX2、Nanogおよびlin28遺伝子で単離ヒト皮膚線維芽細胞（IMR90，C1クローン）および新生児包皮線維芽細胞（C2クローン）をレンチウイルスにより形質導入することで作出された。これらの誘導多能性ヒト幹細胞を広範に特徴付けた；それらは正常な核型およびテロメラーゼ活性を有し、ヒトES細胞を特徴付ける細胞表面マーカーおよび遺伝子を発現し、全3つの一次胚葉層の高度導出物(advanced derivative)へ分化する発生能を維持している（Takahashi K, et al. 2007. Cell 131(5):861-872）。どちらの系も、既述のように培養および維持された（Takahashi K, et al. 2007. Cell 131(5):861-872）。手短に言えば、20%ノックアウト血清代替物、4 ng/ml bFGF、1 mMグルタミン、1 mM非必須アミノ酸および0.1 mM β -メルカプトエタノールを補ったDMEM-F12培地中で放射線照射マウス胚線維芽細胞(MEF)フィーダー層にて37°C、5% CO2および90～95%の湿度で、培地を毎日交換しながらiPS細胞を増殖させた。Stem Cell Cutting Tool（VWR）を用いて機械的解離により、新鮮なフィーダーへ4～5日ごとに未分化iPS細胞を継代した。

40

【0193】

AETII細胞へのiPS細胞のインビトロでの分化

ヒトiPSCは、胚体内胚葉(DE)および前部前腸内胚葉(AFE)を経由して、有向分化プロトコルで肺胞上皮に分化された。iPS細胞は、既述の条件の下で胚体内胚葉の方向へ分化された（Duan Y, et al. 2010. Stem Cells 28(4):674-686, Kubo A, et al. 2004. Develop

50

ment.131(7):1651-1662)。手短に言えば、100 ng/mlのアクチビンA、2 mM L-グルタミンおよび1%抗生物質-抗真菌薬を補ったRPMI 1640培地中で48時間h-iPSCを培養した；1xB27サプリメント、0.5 mM酪酸ナトリウムおよび0.1% FBSを同じ培地へ添加し、培地を毎日交換しながら、さらに4日間、細胞を培養した(D'Amour KA, et al. 2005. Nat Biotechnol 23(12): 1534-1541)。

【0194】

アクチビンAへの曝露によって作出されたDEを、トリプシン処理し、ヒトECMタンパク質をコーティングしたプレート上に1:1~2の比率で再播種し、2日間、200 ng/ml NOGGINおよび10 mM SB-431542を補ったIMDM+5% FBS、2 mM L-グルタミン、1 mM非必須アミノ酸、1%抗生物質-抗真菌薬で前部前腸内胚葉に分化させた(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272)。

10

【0195】

10~14日間、10% FBS、2 mM L-グルタミン、1 mM非必須アミノ酸、1%抗生物質-抗真菌薬、レチノイン酸(0.5 μ M)、FGF-10 (10 ng/ml)、EGF (10 ng/ml)、Wnt3a (100 ng/ml)、およびKGF (各10 ng/ml)を有するIMDM分化培地中でAFE細胞を維持した。細胞を、肺マトリックスへ播種するまで、SAGM培地(Lonza)に加えて1%ウシ胎仔血清(FBS)中で維持した(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272)。

【0196】

22日目の分化細胞を次に、10% FBS、2 mM L-グルタミン、1 mM非必須アミノ酸、1%抗生物質-抗真菌薬および100 mM IWR-1を有するDMEM培地中で7日間維持した。

20

【0197】

ヒトII型細胞の単離

既述のように移植拒絶されたヒト肺から肺胞II型(AETII)細胞を単離した(Bove PF et al. 2010. J Biol Chem 285(45):34939-34949)。手短に言えば、主気管支を通して右中葉にカニューレを挿入し、肺の残りの部分から取り除いた。末梢気腔をCa²⁺-およびMg²⁺-不含溶液(0.5 mM EGTA、140 mM NaCl、5 mM KCl、2.5 mM Na₂HPO₄、10 mM HEPES、および6 mMグルコース)によって6~10回洗浄し、この修正型の溶液(グルコースなし、2.0 mM CaCl₂および1.3 mM MgSO₄)で3回洗浄した。エラスターゼ(13単位/ml)を末梢気腔へ注入し、37℃で30分間インキュベートした。単離された細胞をDMEMに再懸濁し、ヒトIgG抗体でコーティングされ、PBSおよびDMEMですすいだペトリ皿へデカントした。37℃で60分後、非接着AETII細胞を、線維芽細胞に対するモノクローナル抗体(AS02)および磁石による除去のためにパン-マウスIgG Dynabeadsとともにインキュベートした。AETII細胞を、10% FBS、アンフォテリシンB、セフトジジム、トブラマイシン、およびバンコマイシンを含有するDMEMに再懸濁した。

30

【0198】

フローサイトメトリーおよび免疫化学

DE、AFEおよびiPSC-AETII細胞集団を、分化の前に、DEおよびAFEおよびiPSC-AETIIの誘導の間に、ならびに脱細胞化された肺マトリックス中での培養の後に、免疫蛍光または/およびフローサイトメトリーによって評価した。

40

【0199】

免疫染色の場合、細胞をPBSで洗浄し、室温(RT)で20分間4%パラホルムアルデヒド中で固定し、RTにて15分間PBS中0.1%のTriton X-100で透過処理した。細胞をRTで60分間PBS中3%のBSA中でブロッキングし、4℃で終夜、一次抗体とともにインキュベートした。翌日、細胞をPBSで洗浄し、RTで2時間、二次抗体とともにインキュベートした。洗浄後、細胞を4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI) (1:1000)核染色剤とともにインキュベートした。

【0200】

細胞を播種した肺足場のパラフィン切片を、H&Eで染色した。さらなる切片を熱媒介によるクエン酸抗原回復の後に15分間0.2% Triton Xで透過処理し、RTで1時間5% BSAでブロ

50

ッキングした。一次抗体を4℃で終夜適用した。切片をRTで1時間、二次抗体とともにインキュベートし、すすぎ、1分間DAPIで処理し、PVA-DABCOカバースリップ用溶液で封入した。染色された細胞およびスライドをZeiss Axiovert 200M倒立顕微鏡およびHamamatsuカメラで撮像した。

【0201】

フローサイトメトリーの場合、細胞を2分間0.25%トリプシンとのインキュベーションにより単個細胞浮遊液へ分離し、固定した(Fixation/Permeabilizationキット, BD Biosciences)。氷上で30分間ブロッキングした後に、細胞を氷上で30分間、ブロッキング溶液中の一次抗体とともにインキュベートした。細胞を氷上で30分間の結合二次抗体とのインキュベーション後にPerm/Wash緩衝液350 μ lに再懸濁し、2回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。抗体情報については表1を参照されたい。

10

【0202】

リアルタイム定量RT-PCR

QiagenのRNeasy Mini Kitを用い、製造元の使用説明書にしたがって総RNAを抽出した。第1鎖相補DNA (cDNA)は、製造元のプロトコル(Invitrogen)にしたがってSuperScript First-Strand Synthesis Systemを使い、ランダムヘキサマーをプライマーとして用いて合成した。各サンプルをiQ(商標) SYBR Green Supermix (Bio-Rad)により三つ組で操作した。PCR条件には、95℃で4分の初期変性工程、その後に95℃で15秒、60℃で30秒および72℃で30秒からなるPCR 40サイクルを含めた。関心対象の遺伝子(GOI)に対する三つ組のPCR反応からの平均の閾値サイクル(Ct)値を、同じcDNAサンプルからの平均GAPDH Ct値に対して正規化した。サンプルAとサンプルBとの間のGOI転写産物レベルの倍変化は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ に等しく、ここで $\Delta Ct = Ct_{(GOI)} - Ct_{(GAPDH)}$ 、および $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(A)} - \Delta Ct_{(B)}$ である。プライマーについては表2を参照されたい。

20

【0203】

(表2) さまざまな実験のqRT-PCRで用いられたプライマーの配列

遺伝子	長さ (bp)	プライマー配列
hSPA	180	フォワード: TCCAAGCCACACTCCACGA; (Seq id no:1) リバーズ: TTCCTCTGGATTCCCTTGGG; (Seq id no:2)
hSPB	69	フォワード: TGGGAGCCGATGACCTATG; (Seq id no:3) リバーズ: GCCTCCTTGGCCATCTTGT; (Seq id no:4)
hNKX2.1	93	フォワード: GGACGTGAGCAAGAACATG; (Seq id no:5) リバーズ: TCGCTCCAGCTCGTACACC; (Seq id no:6)
hSPC	94	フォワード: CCTTCTTATCGTGGTGGTGGT; (Seq id no:7) リバーズ: TCTCCGTGTGTTTCTGGCTCAT; (Seq id no:8)
hMucin-1	88	フォワード: AGCTTCTACTCTGGTGCACAA; (Seq id no:9) リバーズ: GGTGGCTGGGAATTGAGA; (Seq id no:10)
hOCT4 内因性	164	フォワード: CCTCACTTCACTGCACTGTA; (Seq id no:11) リバーズ: CAGGTTTTCTTTCCCTAGCT; (Seq id no:12)
hSOX2 内因性	151	フォワード: CCCAGCAGACTTCACATGT; (Seq id no:13) リバーズ: CCTCCATTTCCTCGTTTT; (Seq id no:14)
hNANOG 内因性	239	フォワード: CCAAATTCTCCTGCCAGTGAC; (Seq id no:15) リバーズ: CACGTGGTTTTCCAAACAAGAAA; (Seq id no:16)
hCC10	105	フォワード: CCCTGGTCACACTGGCTCTC; (Seq id no:17) リバーズ: TCATAACTGGAGGGTGTGTC; (Seq id no:18)
hCXCR4	79	フォワード: CACCGCATCTGGAGAACCA; (Seq id no:19) リバーズ: GCCCATTTCCCTCGGTGTAGTT; (Seq id no:20)
hFOXA2	89	フォワード: GGGAGCGGTGAAGATGGA; (Seq id no:21) リバーズ: TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA; (Seq id no:22)
hSOX17	61	フォワード: GGCGCAGCAGAATCCAGA; (Seq id no:23) リバーズ: CCACGACTTGCCCAGCAT; (Seq id no:24)
hPAX9	132	フォワード: GTTATGTTGCTGGACATGGGT; (Seq id no:25) リバーズ: GAAGCCGTGACAGAATGACTAC; (Seq id no:26)
hTBX1	117	フォワード: GCTCCTACGACTATTGCCC; (Seq id no:27) リバーズ: CGTATTCCTTGCTTGCCCT; (Seq id no:28)
hCD31	140	フォワード: ATTGACAGTGGTTATCATCGGAGTG; (Seq id no:29) リバーズ: CTCGTTGTTGGAGTTCAGAAGTGG; (Seq id no:30)
hTSHR	156	フォワード: TTTCTTACCCAAGCCACTGC; (Seq id no:31) リバーズ: TTCTCTTCATATTCCTGGTGG; (Seq id no:32)
hALB	149	フォワード: AAACGCCAGTAAGTGACAGAG; (Seq id no:33) リバーズ: ATATCTGCATGGAAGGTGAAT; (Seq id no:34)
hGAPDH	122	フォワード: GACAACAGCCTCAAGATCATCAG; (Seq id no:35) リバーズ: ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG; (Seq id no:36)

10

20

30

【0204】

透過電子顕微鏡像

細胞サンプルをSchmiedlら(Schmiedl, et al. Histochem Cell Biol 1-12)から修正されたプロトコルにしたがって調製した。手短に言えば、天然ヒトAETIIおよびiPSC-AETII細胞を30分間、0.2 Mカコジル酸ナトリウム中2.5%のグルタルアルデヒド/2.0%のパラホルムアルデヒド混合物で37℃にて固定し、その後4℃で2時間のインキュベーションを行った。標準的なエタノール系列にしたがってサンプルを脱水した。サンプルをOsO₄固定および酢酸ウラニルでのブロック染色(en block uranyl acetate staining)によって後処理した。切片(70~80 nm)を採取し、対比増大のために酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛中でインキュベートした。Philips Tecnai透過電子顕微鏡を用いて撮像した。

40

【0205】

脱細胞化された細胞外マトリックスの足場の調製

3ヶ月齢のFischerまたはSprague Dawleyラットを、米国獣医師会(American Veterinary Medical Association)によって記載されているガイドラインにしたがって、ペントバルビタールナトリウムで麻酔した(60 mg/kg IP)。肺細胞外マトリックスの足場を、既述のように調製した(Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541, Calle EA, et al. 2011. J Vis Exp (49). pii: 2651)。肺にPBS中のヘパリン(50 U/ml, Sigma)を灌流

50

させ、それを心臓および気管とともに取り除いた。肺動脈および気管にカニューレを挿入し、肺動脈を通じて肺にニトロプルシッドナトリウム(1 ml/ml, Fluka)を灌流させた後に37°Cで2~3時間、脱細胞化溶液(PBS中8 mMのCHAPS、1 MのNaCl、5 mMのEDTA)で処理した。足場を37°Cで1時間、ベンゾナーゼエンドヌクレアーゼ(90 U/ml, Sigma)で処理し、その後にはPBS、抗生物質および抗真菌薬で徹底的にすすいだ。

【0206】

Gift of Life Michiganによる手はず通りに心停止前のドナー(beating-heart donor)または迅速剖検(warm autopsy)からヒト肺を得て、最近記述されているように脱細胞化した(Booth AJ. 2012. Am J Resp Crit Care Med. 186(9): 866-76)。肺サンプルを無菌脱イオン蒸留水中で攪拌し、細胞溶解のために0.1% Triton X-100中でインキュベートした。サンプルを無菌PBSで洗浄し、2%デオキシコール酸ナトリウムとともにインキュベートし、再び洗浄した。肺を1 M NaCl中でインキュベートして、残留核を溶解させた。NaClをデカントした後に、組織をすすぎ、1.3 mM MgSO₄および2 mM CaCl₂中30 µg/mLのDNaseとともにインキュベートした。DNase溶液をデカントし、組織を無菌PBSで洗浄した(Booth AJ, et al. 2012. Am J Resp Crit Care Med. 186(9): 866-76)。

【0207】

ラット肺細胞外マトリックスの足場上での細胞の培養

ラット足場を既述のようにバイオリアクタにマウントした(Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541)。カニューレをループ状配管につなげて、足場への細胞の灌流および導入をもたらした。iPSC-AETII細胞4000万個を培地(SAGM-1% FBS) 3~5 mlに懸濁し、気道コンパートメントへ導入した；灌流を細胞播種の直後に1 ml/分で開始した。さらなる実験においては、ヒト肺から単離された天然ヒトAETII細胞 6×10^6 個を、脱細胞化されたラット肺の右上葉へ導入した。培地の全量を3日目または4日目に一度交換し、サンプルを1日目、3日目および7日目に収集し、組織像用に確保しておいた。並列実験においては、iPSC-AETII細胞を7日間、SAGM-1% FBS培地中に細胞 1.5×10^5 個/スライスの濃度で脱細胞化ラット肺の切片上へ播種しておいた。最後に、AETII細胞または天然ヒトAETII細胞のいずれか 3×10^5 個を、SAGM-1% FBS中の脱細胞化ヒト肺スライス上へ移入し、1週間培養した；培地を1日おきに交換した。

【0208】

SPCのための酵素結合免疫吸着測定分析(ELISA)

製造元の使用説明書にしたがい分泌SPC (Life Science Advanced Technology)を定量化するために、iPSC-AETII分化の間に回収された細胞培地に対してELISAを行った。SPC値を細胞総数に対して正規化した。

【0209】

ウェスタンブロッティング

30分間氷上で、プロテアーゼ阻害剤(Complete Mini, Roche,)を補ったRIPA緩衝液中において細胞をインキュベートした。ビシンコニン酸プロテインアッセイ法(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞溶解物からタンパク質濃度を決定した。細胞溶解物を変性させ、等量のタンパク質/サンプルを既述のようにSDS-PAGEおよび免疫ブロッティングに供した。HRP結合ヤギ抗マウスおよびヤギ抗ウサギ二次抗体を、増強化学発光によって検出した。

【0210】

増殖アッセイ法

肺足場内での細胞増殖を評価するために、AETIIを播種し、AETIIとともに3日間および7日間培養した肺を、4% PBS緩衝化パラホルムアルデヒド(pH 7.4)中で固定し、70% EtOHで後固定した。ヒトカスパーゼおよびPCNAに対する免疫細胞化学染色を、本明細書の他の項で記述されているように行った。画像をZeiss Axiovert 200M倒立顕微鏡で可視化し、Hamamatsuカメラで撮像した。3つの高倍率視野の中の総細胞数に基づいて、陽性核染色の割合を計算した。

【0211】

統計分析

統計をOrigin (OriginLab, Northampton, MA)で行った。平均±SEMとしてデータを表した。(測定 of 標準誤差、全てのエラーバーは±SEMを表す)。対応のない両側スチューデントt検定を行って、2つの群は相互に有意差があるかどうか評価した。0.05未満のp値(両側)を統計的に有意とみなした。全てのエラーバーは±SEMを表す。

【0212】

実験の結果をこれから記述する。

【0213】

本明細書において提示される実験は、ヒトiPSC (iPSC)から胚体内胚葉(DE)、前部前腸内胚葉(AFE)、その後、ヒトAETIIおよびAETI細胞の相対的に均質な集団を作出するための効率的かつ一貫性のある、段階的分化法を実証する(図1A)。これらの細胞は、成熟ヒト肺胞I型およびII型細胞の表現型を示すだけでなく、新鮮単離されたヒト初代肺胞I型およびII型細胞と比べて高い割合のI型およびII型細胞マーカーをも発現する。さらに、これらのiPSC由来AETII細胞は、無細胞肺マトリックスに再生息することができ、末梢肺に存在する細胞型を生ずる(図1B)。

【0214】

胚体内胚葉細胞の効率的な誘導

胎児肺は胚体内胚葉(DE)から生じる(Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165, Kadzik RS, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):355-361)。それゆえ、第1の工程においては、iPSCを最初の分化6日間、飽和濃度のアクチビンAに曝露することによって、DEに分化させた。iPSCは、最初に100 ng/mlのアクチビンAとともに48時間、無血清で培養し、その後、1xB27培地を与えて低い血清濃度に変えた。iPSCをアクチビンAに曝露していた時に、コロニー中の細胞の大部分はDE細胞に転換したが、そうでない細胞は目視観測を通じて監視したところ徐々に死滅した。分化6日後、どちらのiPSCクローン(C1およびC2と表示した)も、SOX17およびFOXA2について陽性に染まり、細胞の大部分がSOX17およびFOXA2について陽性であった(図1D、C1細胞の場合は図7A~7J、C2細胞の場合は図8A~8J)。SOX17、CXCR4およびFOXA2についてqRT-PCRを使い内胚葉マーカーの発現を監視したところ、これらのマーカーの発現は0日目の時点で認められなかった；発現はその後、アクチビンAに曝露されたiPS細胞において0日目から6日目まで増加した(C1細胞の場合には図7Lおよび図12A、C2細胞の場合には図8Lおよび図12B)。フローサイトメトリー分析から、6日目時点のiPS細胞に由来する細胞集団がC1ではCXCR4について92.71±4.0%、SOX17について83.76±2.0%およびFOXA2について87.66±1.2%、ならびにC2ではCXCR4について87.23±2.0%、SOX17について91.42±3.0%、およびFOXA2 83.54±1.8%を含めて、胚体内胚葉に関連したマーカーを高い割合で発現することが実証された(C1細胞の場合は図7M、C2の場合は図8M)。本明細書において用いられるプロトコルは、iPSCクローンにおけるSOX17およびFOXA2の二重発現に基づき、iPSCから相対的に均質なDE集団を作出するのに極めて効率的であることが分かった。85%超のC1および89%のC2は、内胚葉細胞から構成されていることが認められた(C1細胞の場合には図7K、C2の場合には図8K)。C1クローン(これは胎児肺由来である)もC2クローン(これは新生児線維芽細胞に由来する)もともに、類似の結果をもたらす。このことから、このプロトコルは、他の細胞起源由来の、または他の技法を用いて再プログラム化される他のiPSC系に一般化されることが示唆される。

【0215】

胚体内胚葉細胞からの前部前腸内胚葉の作出

発生上の理論的枠組みに従えば、肺胞上皮へのiPS細胞の有向分化は、胚体内胚葉の作出と、それに続く前部前腸内胚葉(AFE)へのパターン形成によって進行するはずである。DEからのAFE細胞の分化は、Greenとその同僚により既述された条件を通じて、2日間、細胞をノギン(200 ng/ml)およびSB-431524 (10 mM)に曝露することによって誘導された(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397)。胚体

内胚葉にノギン/SB-431542を適用することで、両クローンにおいてSOX2、PAX9およびTBX1を含む、AFE表現型に関連したマーカーの強力な発現を有する高度に濃縮された細胞集団が得られた。8日目時点の免疫染色によって実証されるように、細胞の大部分はSOX2およびFOXA2を共発現した(C1細胞の場合には図2A～図2J、C2の場合には図9A～図9J)。胚体内胚葉マーカーについて陰性であった細胞は、本発明者らが顕微鏡検査によって可視化したところ、AFE分化培地への交換後に徐々に死滅した。さらに、本結果から、ノギン/SB-431542によるTGF- β シグナル伝達およびアクチビンA/nodalシグナル伝達の阻害が、ノギン/SB-431542なしでの0.1%未満と比べて、最大92～95%まで前部内胚葉細胞集団(FOXA2⁺/SOX2⁺によって定義された)を増加させるため、試験された2つのiPSCクローンにおいて十分であったことが明らかである(C1細胞の場合には図2K、C2の場合には図9K)。定量的RT-PCRから、8日目時点で両方のiPSCコロニーに由来するAFE細胞において高度に発現された、SOX2発現と比べて、PAX9およびTBX1の両方での比較的軽度の増加が明らかにされた(C1細胞の場合には図2L、C2の場合には図9L)。6日目時点でのアクチビンA除去およびノギン/SB-431542への交換の後、CXCR4もSOX17もともに6日目から12日目まで減少することが認められた。FOXA2の場合、8日目時点の発現の増加が認められ、その後、培養の時間とともに減少した(C1細胞の場合には図12A、C2の場合には図12B)。内胚葉が肺発生における過渡段階であり、幹細胞がもっと後の表現型の方向へ分化するとともにピークに達し、その後、消えていくと予想されることを考えれば、これらの結果は予想されるものである(Yasunaga M, et al. 2005. Nat Biotechnol 23(12): 1542-1550)。

【0216】

肺分化の前に、肺系統に属する全細胞が、最初は、腹部マーカーNKX2.1の上方制御によって定義される原初の前駆段階を通じて進行せねばならない(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Van Haute L, et al. 2009. Respir Res 10:105)。NKX2.1 (ホメオドメイン含有転写因子)は、甲状腺および肺への拘束に関連した最も古くから知られているマーカーであるが、いくつかの研究によれば、NKX2.1の誘導は甲状腺運命ではなく、肺への拘束を示すことが示唆されている(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Van Haute L, et al. 2009. Respir Res 10:105)。6日目から8日目までアクチビンAをノギン/SB-431542と交換し、その後にBMP4/Wnt3a/bFGF/KGFを含有するカクテルを加えることにより、13日目の時点でAFE細胞集団においてNKX2.1の発現が誘導された。両方のiPSCクローンにおけるNKX2.1陽性細胞のほとんどが、内胚葉マーカーFOXA2で同時染色された(C1細胞の場合には図2Mおよび図2N、C2の場合には図9Mおよび図9N)。さらに、フローサイトメトリ分析から、C1に由来するAFE細胞集団の24±2%およびC2由来の26±3%が、アクチビンA誘導細胞でのおよびノギン/SB-431542不含培地で培養された細胞での13日目時点の1%未満と比べて、NKX2.1について陽性であることが明らかにされた。ノギン/SB-431542を加えずに6日目から8日目まで継続的にアクチビンA処理をすることにより、稀有なFOXA2⁺/SOX2⁺細胞および少数のNKX2.1⁺細胞が得られた(C1細胞の場合には図20、C2の場合には図90)。まとめて、これらの発現データから、アクチビンAで誘導された胚体内胚葉において、ノギン/SB-431542への曝露が、AFE表現型を有する細胞の高濃縮集団をもたらすことが明らかである。

【0217】

分化に及ぼす細胞外マトリックスタンパク質の効果

従来の幹細胞培養/分化実験においては、組織特異的な分化のシグナルを与えるために成長因子(GF)が可溶型で加えられる(Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397, Ali NN, et al. 2002. Tissue Eng 8(4):541-550, Rippon HJ, et al. 2006. Stem Cells 24(5): 1389-1398, Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165)。しかしながら、分化は最近になって、細胞と細胞外マトリックス(ECM)との間の相互作用などの機械生物学的な概念とますます結び付けられるようになっている(Reilly GC, et al. 2010. J Biomech 43(1):55-62, Lin YM, et al. 2010. Tissue Eng Part A 16(5): 1515-1526, Gutierrez JA, et al. 1998.

Am J Physiol 274(2 Pt 1):L196-202)。さらに、発生中、ECMタンパク質の発現は、器官運命で最も重要な誘導因子の一部にあたる。したがって、培地をノギン/SB-431542に交換して、AFEをヒト多能性細胞から作出する前に、DE細胞をトリプシンでバラバラにし、48時間、ノギン/SB-431542を含有する培地中でECMコーティングされたプレート上に1:1~2の比率で再播種した。フィブロネクチン、コラーゲンI型、コラーゲンIV型、マトリゲル、ならびにヒトECMタンパク質の混合物(コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、テネイシン、エラスチン、ならびにいくつかのプロテオグリカンおよびグリコサミノグリカン; Sigma)へのDE細胞の接着について調べた。フィブロネクチン、コラーゲンI型、コラーゲンIV型およびラミニンは、肺マトリックスの主成分であり、DE細胞はこれらのタンパク質の全てによく付着する。しかしながら、ヒトECMタンパク質の混合によって、いっそう速いDE細胞付着や、15日目と30日目の両方でSPC、SPB、およびNKX2.1遺伝子の有意に高い発現が生じた(図10A~図10C)。

10

【0218】

AFEからの精製肺胞II型の効率的な誘導

8日目のAFEへの分化の後、培地を、ヒトECMタンパク質上で14日間、FGF-10、EGF、WNT3a、KGF、およびRAを含有する肺胞分化培地に交換した。これらの因子または試薬は、実証的研究を通じて選択したが、肺胞肺細胞分化および肺発生において重要な役割を果たすものと考えられている(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397, Ali NN, et al. 2002. Tissue Eng 8(4):541-550, Rippon HJ, et al. 2006. Stem Cells 24(5):1389-1398, Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165)。他の報告と比べて、最終段階においてBMP4を欠いた分化カクテルが遠位マーカー、とりわけII型肺細胞に関連したものをもたらしことが分かった。22日目の後、細胞、ここからはAETII細胞(図1Aおよび図1C)と呼ぶ細胞を、1% FBSを含有するSAGM培地中で維持した。C1およびC2クローンの両方に由来するAETII細胞は、pro-SPC、プロサーファクタントタンパク質B (SPB)、ムチン-1およびサーファクタントタンパク質A (SPA)を含む、II型マーカーについて強陽性であった。II型細胞に関連した陽性マーカー発現に加えて、ヒトII型細胞に典型的な、層状体の存在も、iPSC由来AETII細胞における電子顕微鏡検査によって調べられた。TEMによる層状体の特定は、2型肺細胞を確実に特定するための方法として用いられる。TEMデータから、iPSC由来AETII細胞における層状体の存在が明示される(C1細胞の場合には図3A~図3F、図11A~図11F)。定量的RT-PCRから、iPSC-AETII細胞における高い割合のII型細胞マーカー発現が実証され、これは新鮮単離されたヒト初代肺胞II型細胞(hATII細胞)の発現レベルに匹敵していた(C1細胞の場合には図3G、C2の場合には図11G)。クローンC1においては最大97%までの細胞がSPCについて陽性、 $92 \pm 0.9\%$ がムチン-1について陽性、 $89 \pm 0.9\%$ がSPBについて陽性であり、細胞の大部分 $94 \pm 0.9\%$ が上皮表面マーカーCD54を発現し、クローンC2においては $96.27 \pm 0.5\%$ がSPCについて、 $94.42 \pm 0.3\%$ がSPBについて、 $91.54 \pm 1.8\%$ がムチン-1について、 $89.83 \pm 0.5\%$ がCD54について陽性となった。さらに、AETII細胞はFACS分析により、CCSP (クララ細胞マーカー)、p63 (基底幹細胞マーカー)およびSOX2 (近位気道上皮細胞マーカー)について陰性となり、これらの細胞がII型細胞の相対的に均質な集団であることを示唆するものであった(C1細胞の場合には図3Hおよび図3I、C2の場合には図11Hおよび図11I)。細胞培養上清中のSPCタンパク質のELISA測定から、13日目の細胞が24時間につき、それぞれ、C1およびC2クローンにおいて16.78 ng/mlおよび15.78 ng/mlの速度でSPCを合成かつ分泌することが示唆された。分泌の速度は、13日目時点の分泌と比べて分泌22日目に有意に増した($P < 0.05$)。22日目の時点で、C1およびC2由来のiPSC-AETII細胞は、24時間につき68.5 ng/mlおよび71.5 ng/mlのSPCを産生し、これは新鮮単離したヒトAETII細胞によって産生されたもの(82.95 ng/ml)に匹敵していた(C1細胞の場合には図3J、C2の場合には図11J)。

20

30

40

【0219】

過去の研究から、気管、気管支および細気管支を最終的に生じる気道前駆細胞は、NKX2.1⁺/SOX2⁺であり、高いレベルのSOX2発現を維持することが分かっている(Mou H, et al.

50

2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397)。しかしながら、22日目までに、分化したiPSC-AETII細胞の集団においてNKX2.1⁺/SOX2⁺細胞または単陽性SOX2⁺細胞は検出されなかった。フローサイトメトリーによって判定されたように、全てのAETII細胞がまた、CCSPおよびp63について陰性であった(C1細胞の場合には図3H、C2細胞の場合には図11H)。これは、これらの細胞が気道前駆細胞ではないことを示唆しうる。前部前腸内胚葉は、甲状腺、副甲状腺および肺のマーカーを発現する細胞へ理論的には分化されうるので(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411)、CD31 (内皮マーカー)、アルブミン(成熟肝細胞マーカー)およびTSGHR (甲状腺細胞マーカー)の発現を定量的RT-PCRにより調べて、iPSC-AETII細胞にこれらの他の系統由来の細胞が混入しているかどうか判定した。甲状腺、内皮細胞または肝細胞系統の特異的マーカーは22日目時点のiPSC-AETII細胞において検出されず、その結果、分化した肺前駆集団の中にこれらの系統由来の細胞が存在しないことを確認するものであった(C1細胞の場合には図3I、C2細胞の場合には図11I)。

10

【0220】

AFEマーカー(SOX2、PAX9およびTBX1)ならびにDEマーカー(SOX17、CXCR4およびFOXA2)の発現は、8日目から22日目まで減少した。32日目まで、これらのマーカーのどれもiPSC-AETII細胞において検出できなかった。FOXA2およびSOX2の場合、6日目時点のアクチビンA除去およびノギン/SB-431542への交換の後、FOXA2およびSOX2発現の増加が8日目時点で認められ、引き続いて培養時間とともにこれらの遺伝子の発現の減少が認められた(C1細胞の場合には図12A、図12C、および図16B、C2細胞の場合には図12B、図12D、および図16CC)。

【0221】

20

培養9日目時点の、Wnt3a、EGF、KGFおよびFGFを含有する肺胞肺細胞誘導培地への曝露後、AFE遺伝子、とりわけSOX2の、もっと低い発現が認められ、NKX2.1の同時の上方制御が認められた。8日目後、SOX2は急速に下方制御された一方で、NKX2.1は上方制御された。NKX2.1の発現は、C1において13日目時点の24±2%から20~22日目時点の94±0.4%まで徐々に増加した。定量的RT-PCRおよびフローサイトメトリーにより、SPC陽性細胞の割合がC1クローンにおける分化の間に13日目時点の58±1.6%から20~22日目時点の90±0.4%まで徐々に増加することが明らかにされた。NKX2.1およびSPC発現の同じパターンが8日目から22日目までの分化の間にC2クローンにおいて認められた(C1細胞の場合には図13A~図13D、C2細胞の場合には図14A~図14D)。8日目~22日目の間に、NKX2.1⁺細胞はゆっくり増殖し、NKX2.1およびSPC陽性細胞数の増加を最終的にもたらした。肺胞上皮分化培地への培地の交換後の、細胞死の量は、0日目から8日目までのDEからAFE分化培地への初期の培地交換と比べて無視できるほどであった。さまざまな日(13日目、18日目および21日目)の時点のNKX2.1⁺細胞の免疫染色から、NKX2.1を発現しているコロニーが徐々に拡大され、NKX2.1陰性細胞を過成長させることが実証された。これは、13日目時点の24%から20~22日目時点の94%までの緩徐進行によって示されるように、NKX2.1陽性細胞数の増加を最終的にもたらした。

30

【0222】

いくつかの最近の研究によって、CD166およびα6β4が肺上皮前駆細胞のマーカーであることが報告されている(Chapman HA, et al. 2011. J Clin Invest 121(7):2855-2862, Whitsett JA, et al. 2011. J Clin Invest 121(7):2543-2545, Soh BS, et al. 2012. Mol Ther 20(12):2335-2346, Asselin-Labat ML, et al. 2012. Open Biol 2:120094)ので、これらのマーカーの発現をいくつかの時点での上皮細胞へのiPSCの分化の間に特徴付けた。フローサイトメトリーによって、CD166陽性細胞の割合がC1クローンにおける分化の間に13日目時点の15±0.8%から20~22日目時点の35±1.4%まで徐々に増加することが明らかにされた。CD166の発現はその後、28日目時点でiPSC由来の上皮細胞の成熟培養物において減少した。α6β4の場合、発現はC1において13日目時点の10±0.7%から18日目時点の25±1.2%まで徐々に増加した。22日目まで、細胞の7~8%しかα6β4について陽性ではなかった。CD166およびα6β4発現の同じパターンが8日目から22日目までの分化の間にC2クローンにおいて認められた。(C1細胞の場合には図15Aおよび図15B、C2細胞の場合には図15Cおよび図15D)。

40

50

【0223】

培養9日目の時点でノギン/SB-431542培地を分化培地と交換することによって、時間とともにOCT4およびNanogのような多能性遺伝子の発現の減少が引き起こされた。予想通り、13日目から22日目まで、多能性遺伝子の発現は、ほとんど検出不能であった。両クローン由来のiPSC由来AETII細胞に関するフローサイトメトリーから、22日目時点のSPC陽性細胞がOCT4について陰性であることが示された(C1およびC2細胞の場合には図16A～図16E)。

【0224】

II型細胞は、I型細胞のマーカーを発現している細胞へ自発的に分化しうる(Fehrenbach H, et al. 2001. Respir Res 2(1):33-46, Bove PF et al. 2010. J Biol Chem 285(45):34939-34949, Fujino N, et al. 2011. Lab Invest 91(3):363-37833)ので、I型マーカーT1 α 、AQ5、およびカベオリン-1の発現をフローサイトメトリーおよびqPCRによって評価した。フローサイトメトリーから、8～11%の細胞が分化プロトコルを受けてI型マーカーを発現したことが明らかにされた。クローンC1において最大9%までの細胞がAQ5について陽性であり、9.6%がカベオリン-1について陽性であり、8.1%がI型表面マーカーT1 α を発現した(図4C)。

【0225】

I型細胞へのiPSC由来AETIIの分化

iPSC-AETIIをAETIへさらに分化させるため、本発明者らは次に、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達を調節することがAETII細胞におけるI型マーカーの発現に及ぼす効果について調べた。本発明者らは、選択的 β -カテニン/CBP阻害剤IWR-1(Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165, Fehrenbach H, et al. 2001. Respir Res 2(1):33-46)がAETI細胞へのiPSC-AETII細胞の分化を調節するかどうか調べた。22日目時点の分化AETII細胞を7日間、100 mM IWR-1を補ったDMEM-10% FBS中にて、ヒトECMタンパク質でコーティングされたプレート上で培養した。独立した実験からのデータによって示されたように、IWR-1とのiPSC-AETII細胞のインキュベーションによってAETI細胞表現型へのAETII細胞の分化が誘導された(図4A～図4D)。IWR-1による処理の後、免疫染色によって判定されたように未処理AETIIと比べてiPSC由来AETIIにおいてAETIマーカーAQ5、T1 α およびカベオリン-1の有意な増加が認められた(図4Aおよび4B)。フローサイトメトリーによって、最大92%の細胞がアクアポリン-5 (AQ5)について陽性であり、98%がカベオリン-1について陽性であり、細胞の88%が上皮マーカーT1 α を発現したことが明らかにされた(図4C)。対照的に、AETII細胞マーカーSPCは、フローサイトメトリーによって判定されたように有意に減少した(図4C)。定量的RT-PCRから、IWR-1に曝露されたiPSC-AETII細胞における高い割合のI型細胞マーカー発現が実証され、これは新鮮単離されたヒト初代肺胞I型細胞(hAETI細胞)の発現レベルに匹敵していた(図4D)。

【0226】

iPSC由来AETIIによるラットおよびヒト無細胞マトリックスの再増殖

インビトロにおいて肺組織を作出するiPS由来AETII細胞の再生能を探索するため、細胞構成要素を除去するが、しかし気道および脈管構造の階層的分枝構造を保持している細胞外マトリックスの足場を残すプロセスによって、成体ヒトおよびラット由来の肺を脱細胞化した(Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541, Booth AJ, et al. 2012. Am J Resp Crit Care Med.186(9): 866-76)。これは、初代肺上皮細胞または幹細胞由来の肺上皮細胞の再生能を試験するために最近になって開発されたアッセイ法である(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541, Daly AB, et al. 2012. Tissue Eng Part A 18(1-2): 1-16, Ott HC, et al. 2010. Nat Med 16(8):927-933)。ATI肺細胞もATII肺細胞もともに、分化した細胞型であるが、しかしいくつかの報告から、ATII細胞が可塑性のレベルを維持していることが実証されている。ATI肺細胞に損傷が起きると、ATII細胞が増殖し、今度は、ATI細胞へ分化しうる(Asselin-Labat ML, et al. 2012. Open Biol 2: 120094, Fehrenbach H, et al. 2001. Respir Res 2(1):33-46, Fujino N, et al. 2011. Lab Invest 91(3):363-37833)。それゆえ、本明細書において提示される研究において、iPSC由来のII型

細胞が、脱細胞化された肺細胞外マトリックスの気道コンパートメントに再配置する能力について調べた。28日目時点のiPSC-AETII細胞を利用して、無細胞マトリックスに再配置させた。この段階は、肺細胞II型の表現型および機能へのその拘束のため、最も適しているように思われた。播種されたマトリックスは、これまでに設計および記述されたバイオリアクタ中で培養された(Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991): 538-541, Petersen TH, et al. 2011. Cell Transplant 20(7): 1117-1126)。このバイオリアクタは、血管灌流および液体換気を含めて、インビボの胎児肺環境の重要な局面を再現することができる。本発明者らはまた、脱細胞化された全ラット肺組織へiPSC-AETII細胞を播種することに加えて、6ウェルプレート中で培養されたラットまたはヒト無細胞肺マトリックスのいずれかのスライス上へiPSC-AETII細胞を播種した(図1C)。

10

【0227】

ラット肺バイオリアクタ実験の場合、およそ 40×10^6 個の細胞を、気管を通じて気道へ注入し、無細胞化されたラット肺マトリックスに再配置させた(図1C)。播種されたマトリックスを次いで、SAGM (1% FBS)中にてバイオリアクタ内で最大7日までの間、培養および維持した。H&E染色により、iPSC-AETII細胞が末梢肺内の肺胞肺構造に拡散的に再配置できることが示された。播種されたAETII細胞の大部分は依然として、おおよそそのAETII形態、つまり立方体状の形状および丸い単核を示した(C1細胞の場合には図5A～図5C、C2細胞の場合には図17A～図17C)。肺マトリックス内の多くのAETII細胞は、II型細胞マーカーpro-SPCおよびNKX2.1を発現した。生来の肺においては、このマーカーは、通常、AETII細胞上に見出される。再播種されたラット肺においては、pro-SPCの細胞発現は3日目まで肺胞において強固であって、7日目の時点で存在したままであった(C1細胞の場合には図5D～5I、C2細胞の場合には図17D～17I)。

20

【0228】

iPSC由来のAETIIは無細胞マトリックス中で増殖することができるか調べた。バイオリアクタ中でiPSC-AETII細胞を培養した後に、3日目および7日目時点の再播種された肺由来切片をPCNA (増殖性細胞核抗原)の発現を目的に染色した。ラット足場上の細胞の大部分は、3日目および7日目の両時点でPCNAを発現したが、その一方でそれらは、カスパーゼ-3の免疫染色によって判定されたように、アポトーシス細胞死の数種のマーカーを呈した。しかしながら、7日間ラット肺足場中で培養されたiPSC-AETIIは、3日目の培養物と比べて陽性PCNA染色率の増大を有した。このデータから、iPSC-AETIIは、ラット足場内に播種された場合に増殖できることが示唆される(C1細胞の場合には図5J～5N、C2細胞の場合には図17～17M)。

30

【0229】

II型細胞からの、インビボでのI型細胞の形成には、NKX2.1タンパク質の消失が伴う(Lo ngmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411)。このパターンと一致して、生着したAETII細胞のなかには、扁平な形態を獲得し、同時染色によってI型肺細胞マーカーT1 α を発現していたが、しかしNKX2.1タンパク質の発現を欠いたものもあった(図50)。さらに、T1 α 陽性細胞の数は、細胞播種前の9.7%からラット肺バイオリアクタ中で細胞を培養した後には31.2%まで有意に増加した。逆に、SPC陽性細胞の数は、細胞播種前の98%からバイオリアクタ中のラット肺足場における培養7日後には72.3%まで減少した。I型細胞は最終分化した細胞であり、II型細胞のように増殖することができないので、これらの所見は、細胞外マトリックスキューが上皮集団を支持すること、およびiPSC-AETIIは肺足場内でI型細胞に分化できることを示唆しうる。(図5P)。iPSC-AETII細胞の全てが、ラット肺足場における培養7日後にはFACS分析によりCCSPおよびp63について陰性であった(図5P)。

40

【0230】

並列実験においては、iPSC由来AETIIをラットおよびヒト肺マトリックスの切片上で培養した。無細胞肺マトリックスの切片を調製するため、既述されているものに似た手順を用いて成体ドナー由来の肺を処理した(Petersen TH, et al. 2010. Science 329(5991):538-541, Booth AJ, et al. 2012. Am J Resp Crit Care Med. 186(9): 866-76)。その後

50

、マトリックスの切片(厚さ: 600 μm)上へ直接ピペティングし、1% FBSを有するSAGM中、6ウェルプレート内での培養下で維持することにより、iPSC-AETII細胞を無細胞マトリックスに播種した。iPSC-AETII細胞は、マトリックス表面によく接着し、当初は、ラットおよびヒトの両方の脱細胞化された肺切片において、マトリックス中の肺胞全体に広く分布していた。細胞の多くは依然として、AETII形態を示し、SPCおよびNKX2.1の強固な発現を認めた(ヒト肺切片に関しては図6A～図6Fおよびラット肺切片に関しては図6H～6K)一方で、生着したAETII細胞のなかには、扁平な形態を獲得し、肺胞I型マーカーT1 α を発現していた(ヒト肺切片に関しては図6Cおよびラット肺切片に関しては図6J)。iPSC由来AETIIは、PCNAおよびカスパーゼ-3についての免疫染色によって判定されたように、ラットおよびヒトの両方の肺切片上で増殖することができる(ヒト肺切片に関しては図6Gおよびラット肺切片に関しては図6L～図6O)。

10

【0231】

これらの実験の対照として、成人ヒト肺由来の単離されたヒトII型細胞(hAETII細胞)をまた、脱細胞化されたヒト肺切片上へ播種した。iPSC-AETII細胞と同様に、hAETII細胞を有する細胞の多くがSPCおよびNKX2.1を発現し、hAETII細胞の一部がT1 α 陽性細胞を生じた(図6P～図6U)。さらに、それらはヒト足場切片上で複製することができ、細胞の大部分がPCNAを発現していた一方で、カスパーゼ-3についての免疫染色によって判定されたように、アポトーシス細胞死の数種のマーカーを呈した(図6V)。

【0232】

DE、AFE、AETIIおよびAETI細胞の方向へのiPSCの分化

20

肺上皮は、最も研究されていない系統にあって、これまでにインビトロにおいてESCおよびiPSCからまだ得られておらず、肺上皮の方向への分化に関して報告している研究グループは数少ない(Wang D, et al. 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104(11):4449-4454, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397, Van Haute L, et al. 2009. Respir Res 10:105)。hESCまたはiPSCが均質に肺胞上皮系統に沿って分化するように方向付けるための条件は、まだ十分には定義されておらず、ほとんどのプロトコルによっては、hESCまたはiPSCから肺胞上皮の混合集団が生じる。マウスにおいては、NKX2.1:GFPレポーターを用いて、肺運命に拘束された細胞が単離されており、それらはその後、さらなる分化に従順であった(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411)。さらに、分化中のESCの不均質培養物において、サーファクタントタンパク質C (SPC)のような発生の後期マーカーの誘導が報告されているが、しかしその発現は確率論的であるように思われ、これらのマーカーを発現している細胞は、拡大することが困難であった(Longmire TA, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):398-411, Green MD, et al. 2011. Nat Biotechnol 29(3):267-272, Mou H, et al. 2012. Cell Stem Cell 10(4):385-397, Ali, et al. 2002. Tissue Eng 8(4):541-550, Rippon HJ, et al. 2006. Stem Cells 24(5): 1389-1398, Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165)。本明細書において提示される研究は、2つの異なるヒトiPSCクローン(胎児肺線維芽細胞から再プログラム化されたC1および新生児線維芽細胞から再プログラム化されたC2)から胚体内胚葉(DE)、前部前腸内胚葉(AFE)、その後、ヒト肺胞II型細胞の相対的に均質な集団を作出するための効率的かつ一貫性のある、段階的分化法を実証する。興味深いことに、両方のiPSCクローンは類似の結果をもたらし、DE、AFE、AETIIおよびAETI細胞の方向へ分化する類似の効率を有していたことから、このプロトコルが他の供給源由来の他のiPSC系に一般化されうることが示唆される。しかしながら、単離したヒトII型細胞とは異なり、これらのiPSC-AETII細胞は、SPC、SPAおよびムチン-1のような、AETII細胞に関連したマーカーを失わずに数回の継代の間、増殖することが可能であり、無細胞マトリックスの足場に播種するための何千万個の細胞を作出するために用いることができる。前駆体集団を「スケールアップ」できることは、ヒト組織の産生で用いるためにこれらの技術を転換する場合にとりわけ有益であり、今後に向けた肺の生物工学的な研究において自家iPSC由来細胞を用いることの可能性を許容する。

30

40

【0233】

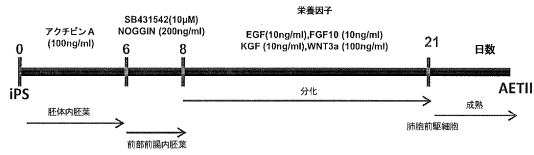
50

適切な培養条件の下で、ラットの脱細胞化された肺バイオリアクタ中へ、または脱細胞化されたラットもしくはヒト肺切片上へ播種されたiPSC由来AETIIは、単離したヒトII型細胞と同様に振る舞う。これらの研究において、iPSC-AETII細胞は肺胞の肺構造に拡散的に再配置することができた。播種されたiPSC-AETII細胞の大部分は依然として、およそのAETII形態を示したが、T1 α 陽性細胞の割合は7日の培養期間にわたりラット肺マトリックス内でおおよそ30%まで増加した。任意の特定の理論によって束縛されることを望むわけではないが、この発現の変化は、正しい細胞マトリックス相互作用の分化効果である可能性がある。II型細胞は分化した細胞であるが、これらの細胞はそれでもなお、可塑性のレベルを保持している。末梢肺損傷の後、II型細胞は増殖およびI型表現型の方角への分化を起こす。実際に、II型細胞は推定上の肺幹細胞であるものと考えられ、肺胞の自然再生プロセスに極めて重要である(Banerjee ER, et al. 2012. PLoS One 7(3):e33165, Asselin-Labat ML, et al. 2012. Open Biol 2: 120094)。AETII細胞と肺マトリックスとの間の相互作用は、とりわけ影響力が強い可能性があった。というのは、AETII細胞は、生来の肺がI型細胞を含有する領域中で接着している場合にはT1 α 細胞を生じうる前駆状態に依然としてあり、II型細胞が典型的に見出される領域中ではII型細胞表現型を維持している可能性が高いからである。任意の特定の理論によって束縛されることを望むわけではないが、バイオリアクタ中の肺足場内で培養された細胞の大部分においてはI型細胞マーカーが検出されなかったため、周期的伸張または気液界面への曝露のような、さらなる刺激が、より多くのI型肺胞マーカーの発現を促進するには必要でありうる可能性がある(Gutierrez JA, et al. 1998. Am J Physiol 274(2 Pt 1):L196-202, Ostrowski LE, et al. 2000. Expt Lung Res 21 (6) 957-970, Alcorn D, et al. J Anat 123(Pt 3):649-660)。まとめて、本明細書において提示されるデータにより、自家細胞からのインビトロでの肺再生は、組織修復および細胞療法の用途に向けて実行可能な戦略でありうる実証される。

【0234】

本明細書において引用されるありとあらゆる特許、特許出願、および刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明を具体的態様について開示したが、当業者が本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、本発明の他の態様および変形を考案しうることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのような態様および等価な変形の全てを含むと解釈されるよう意図される。

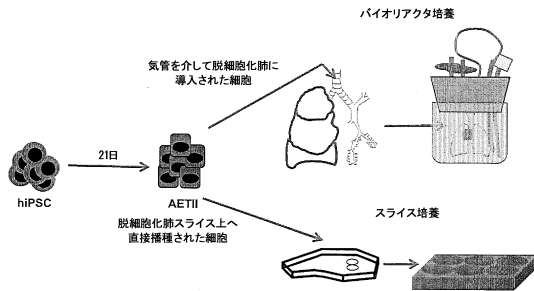
【図 1 A】



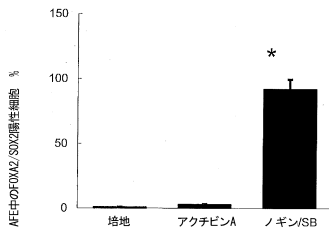
【図 1 B】

肺分化段階	マーカー
誘導多能性幹細胞 (iPSC)	OCT4, SOX2, SSEA4, TRA1-60
胚体内胚葉 (DE)	CXCR4, SOX17, FOXA2
前部前腸内胚葉 (AFE)	NKX2.1, PAX9, TBX1, SOX2
肺細胞II型 (AETII)	SPC, SPB, SPA, ICAM-1, NKX2.1
肺細胞I型 (AETI)	T1α, カベオリン-1, AQP5

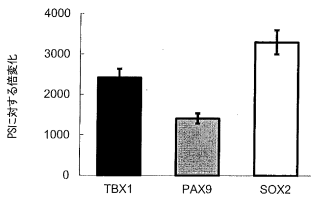
【図 1 C】



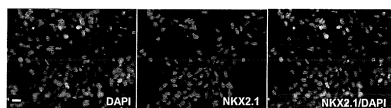
【図 2 K】



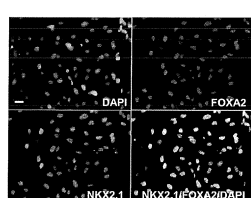
【図 2 L】



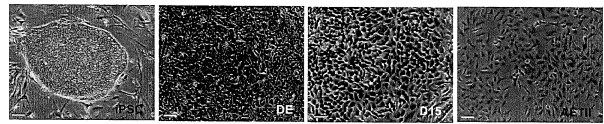
【図 2 M】



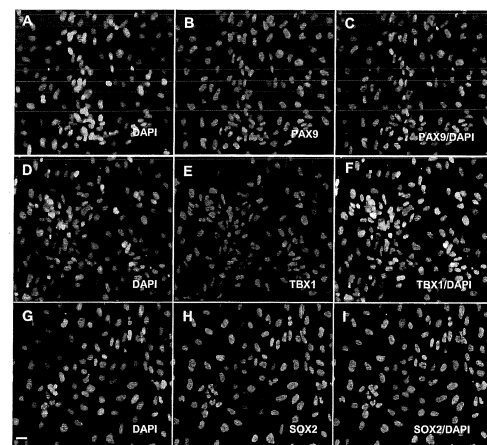
【図 2 N】



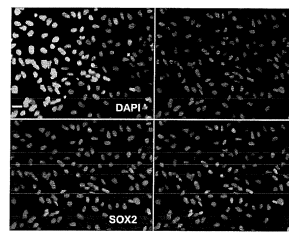
【図 1 D】



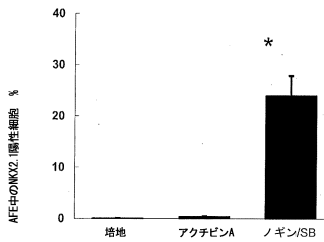
【図 2 - 1】



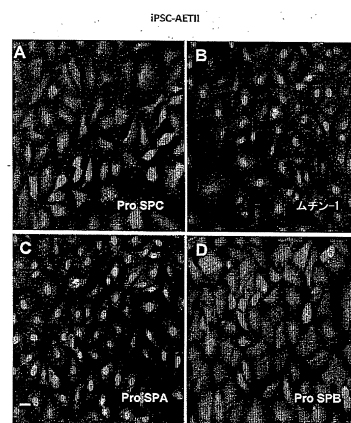
【図 2 J】



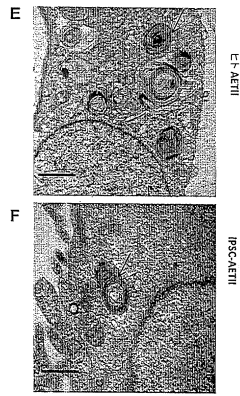
【図 2 O】



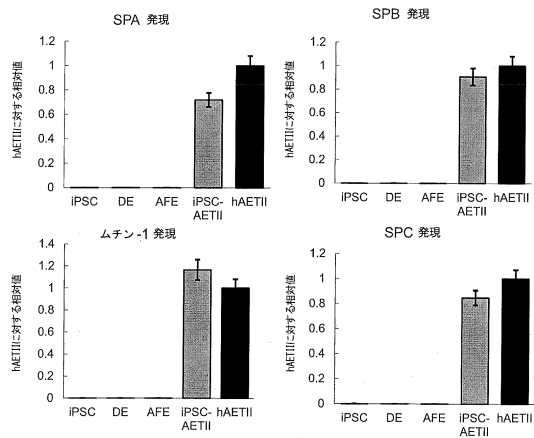
【図 3 - 1】



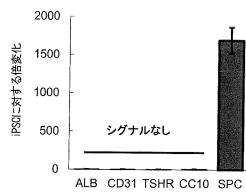
【図 3 - 2】



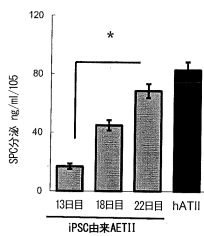
【図 3 G】



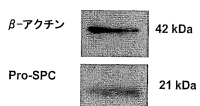
【図 3 I】



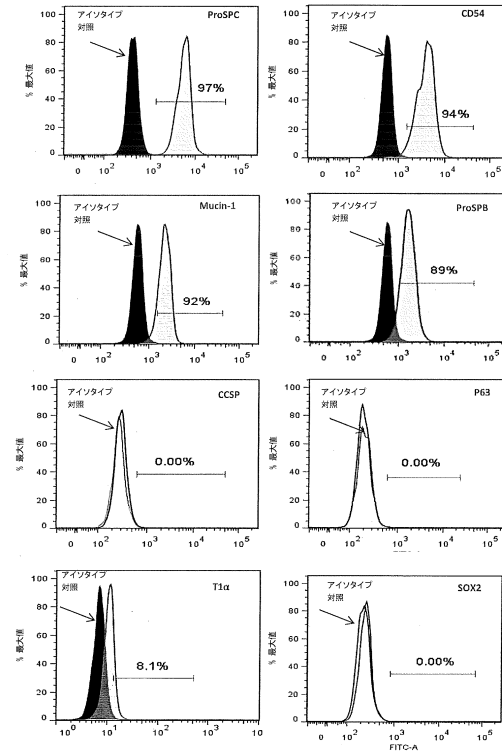
【図 3 J】



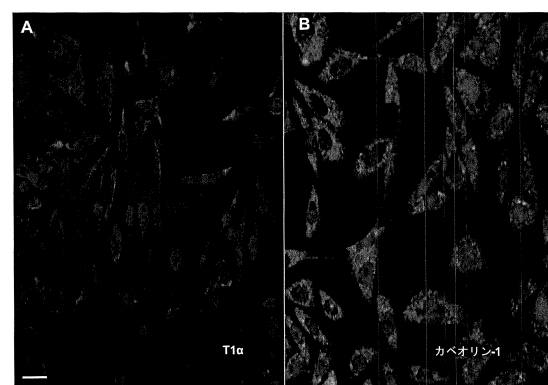
【図 3 K】



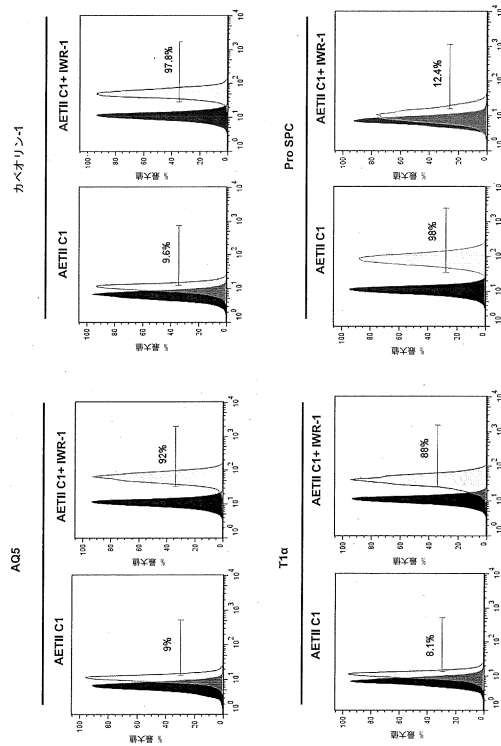
【図 3 H】



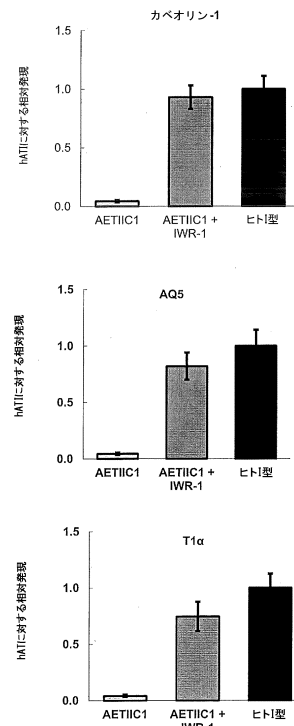
【図 4 - 1】



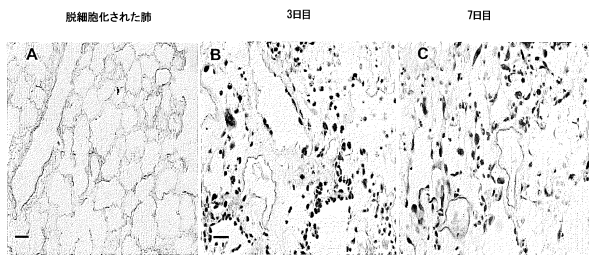
【図 4 C】



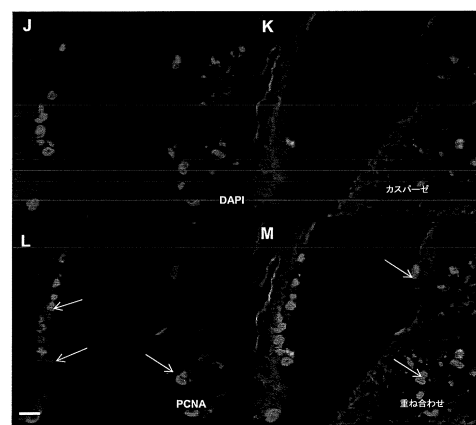
【図 4 D】



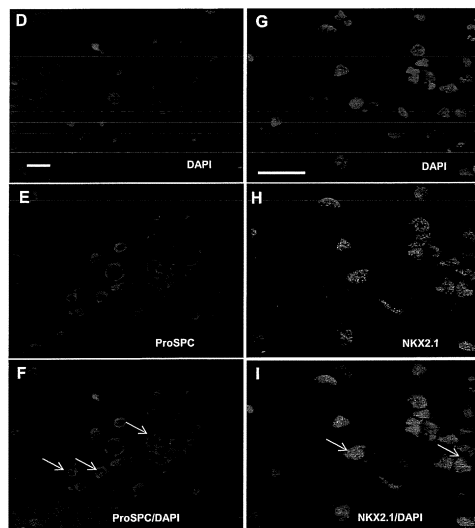
【図 5 - 1】



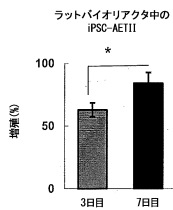
【図 5 - 3】



【図 5 - 2】



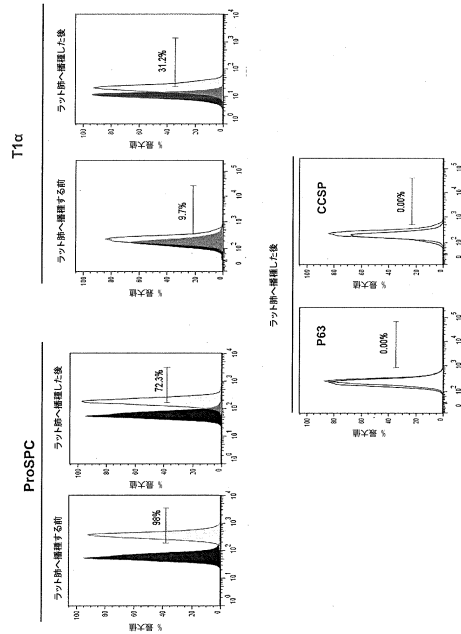
【図 5 N】



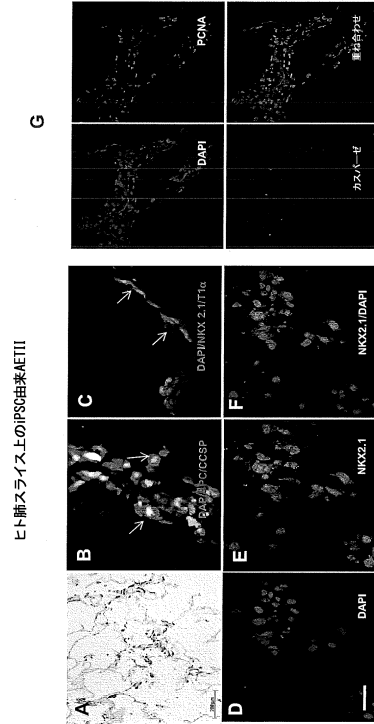
【図 5 O】



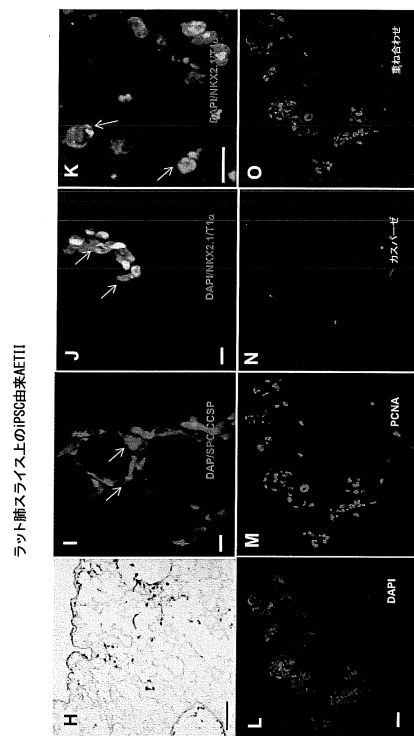
【図 5 P】



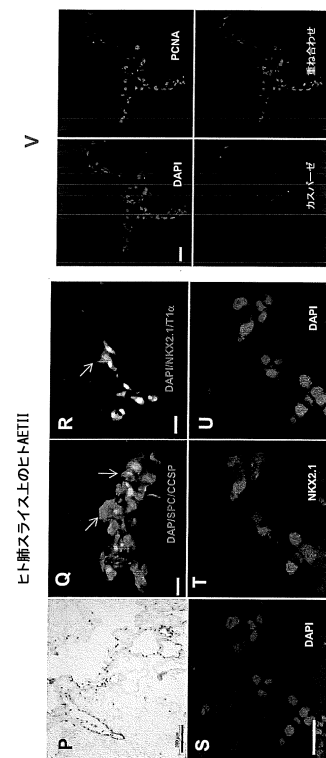
【図 6 - 1】



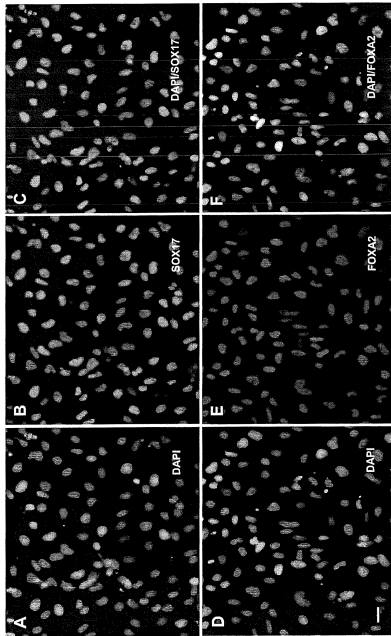
【図 6 - 2】



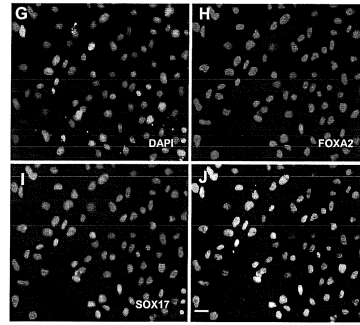
【図 6 - 3】



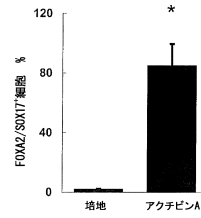
【図 7 - 1】



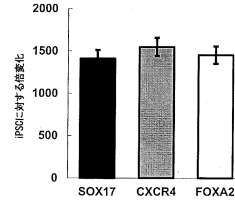
【図 7 - 2】



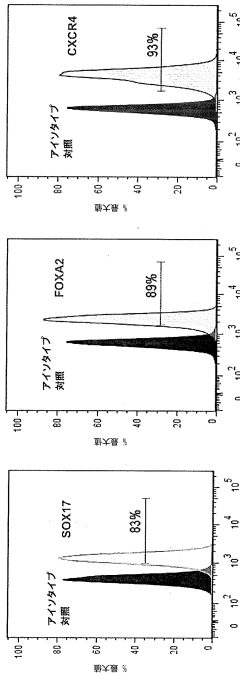
【図 7 K】



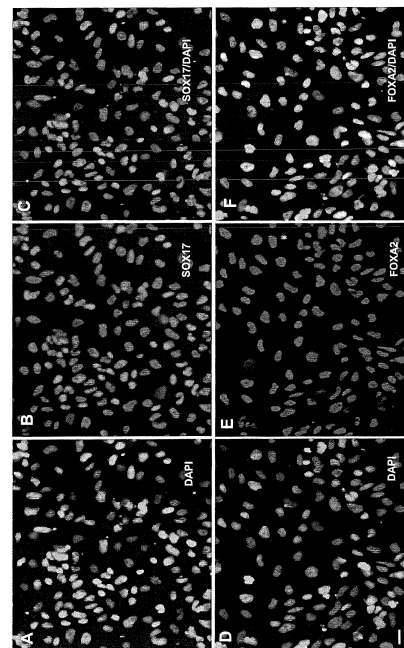
【図 7 L】



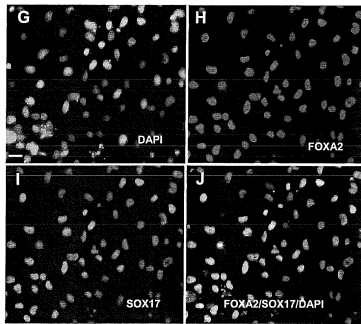
【図 7 M】



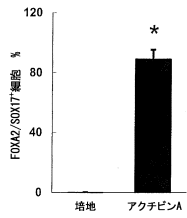
【図 8 - 1】



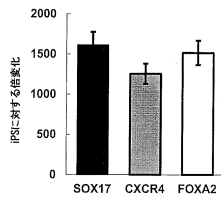
【図 8 - 2】



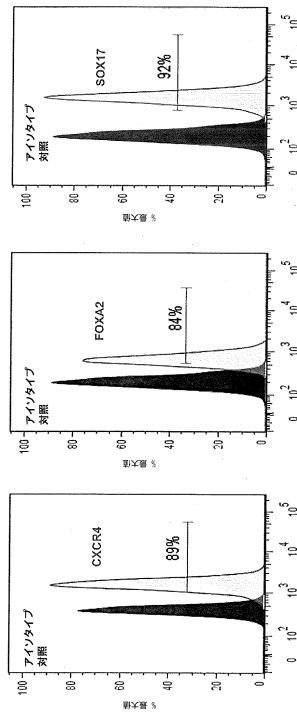
【図 8 K】



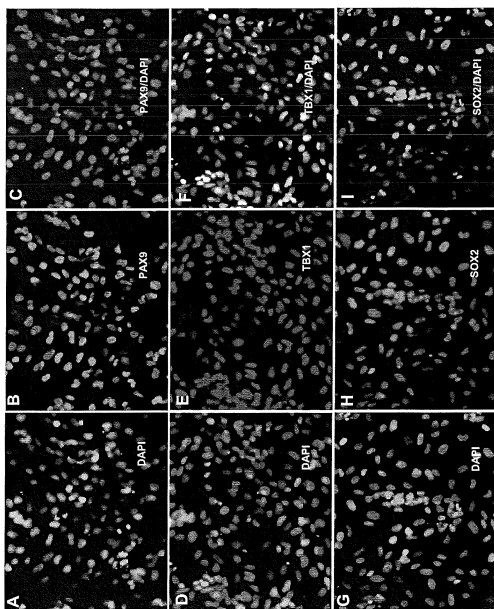
【図 8 L】



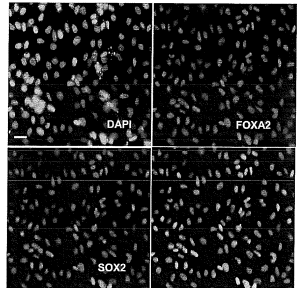
【図 8 M】



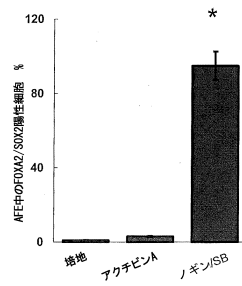
【図 9 - 1】



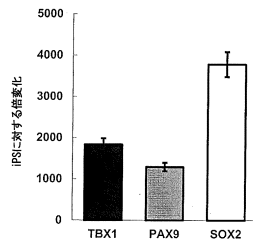
【図 9 J】



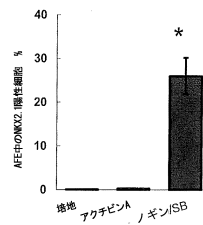
【図 9 K】



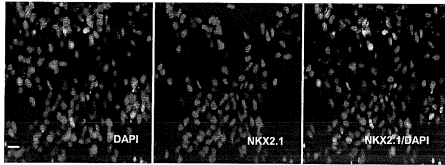
【図 9 L】



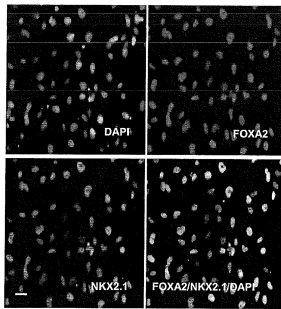
【図 9 O】



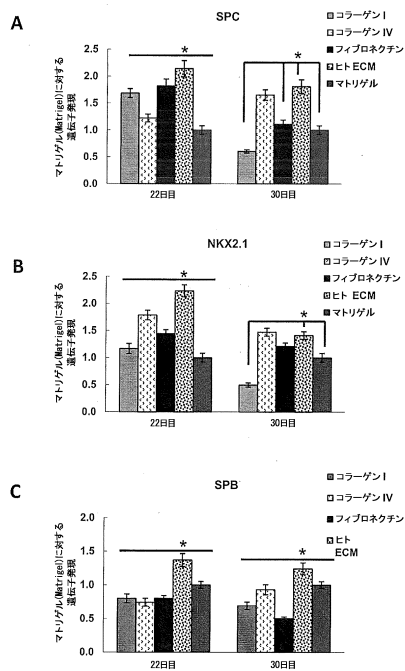
【図 9 M】



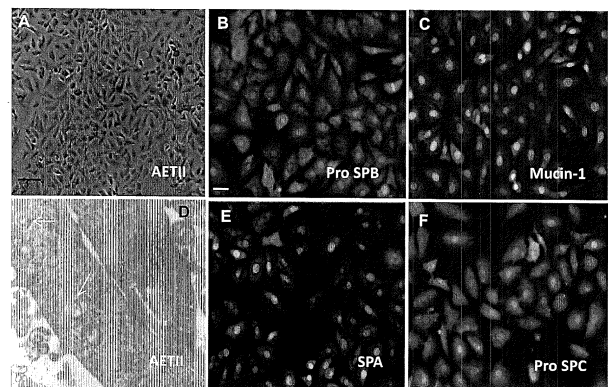
【図 9 N】



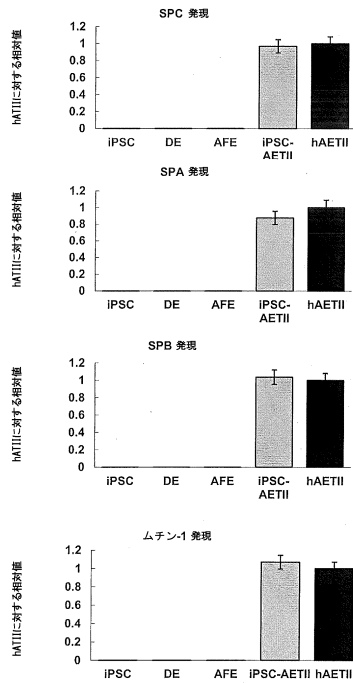
【図 10】



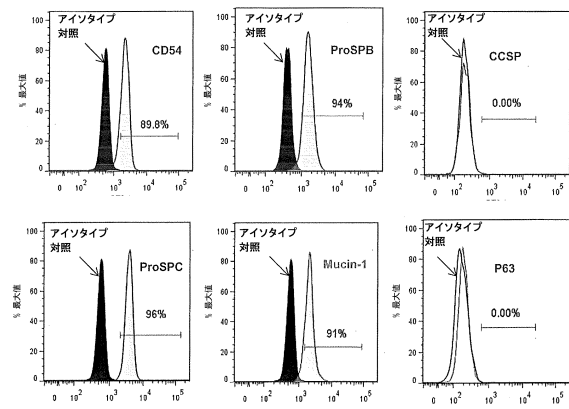
【図 11-1】



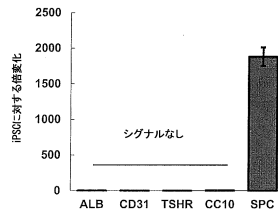
【図 1 1 G】



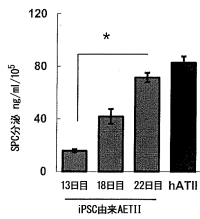
【図 1 1 H】



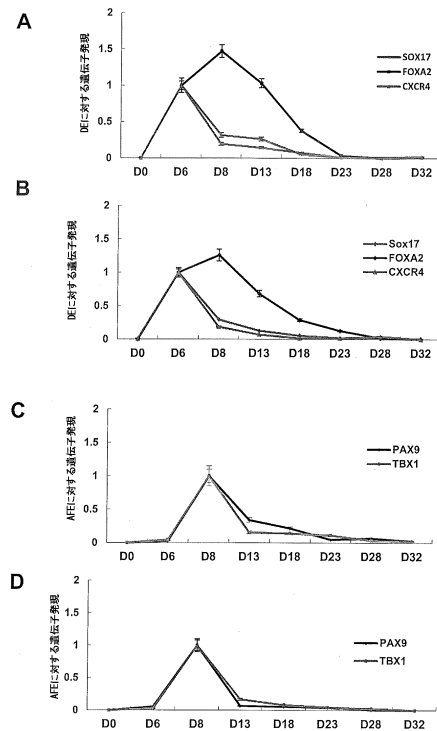
【図 1 1 I】



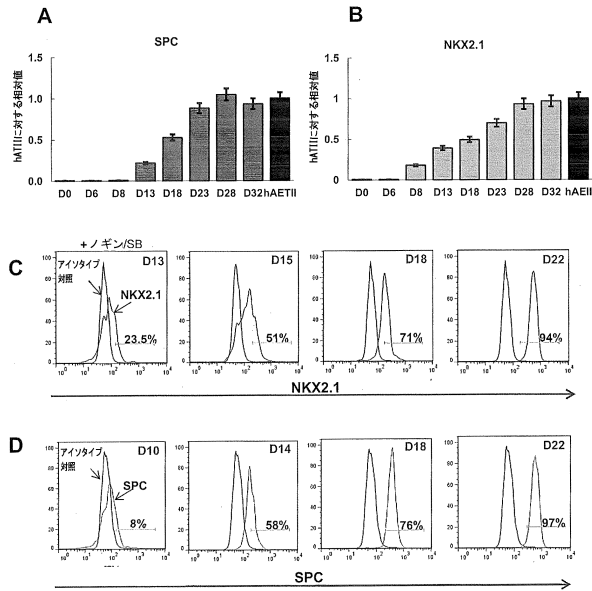
【図 1 1 J】



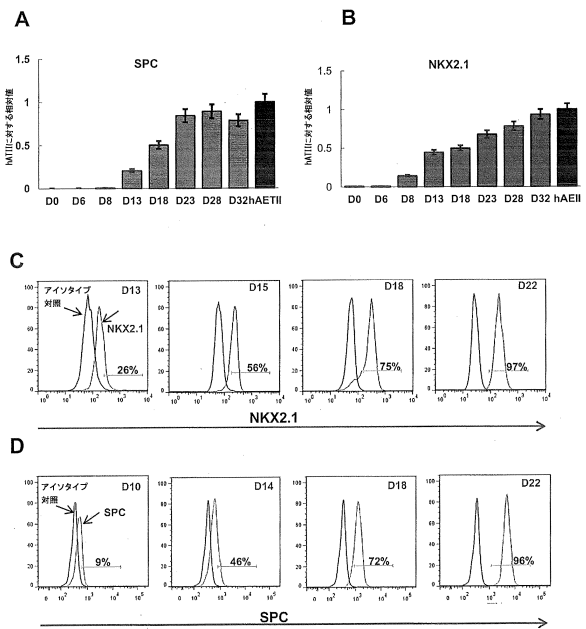
【図 1 2】



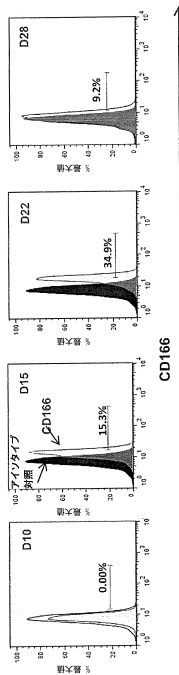
【図 13】



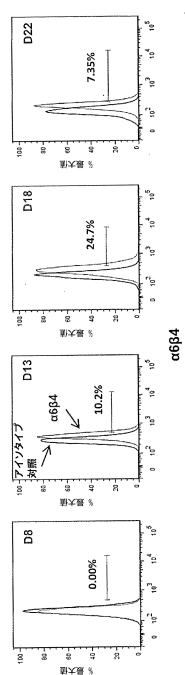
【図 14】



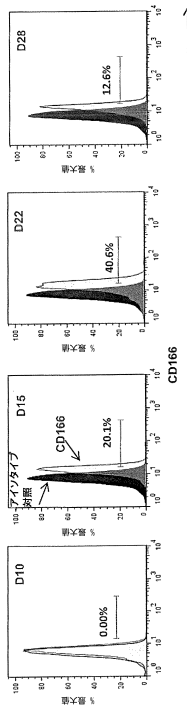
【図 15 A】



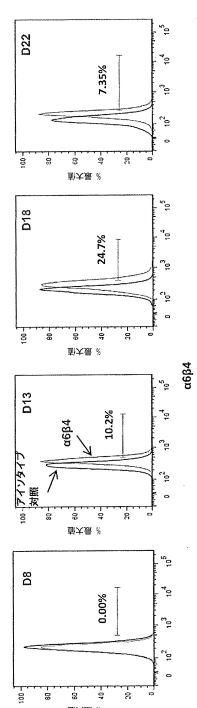
【図 15 B】



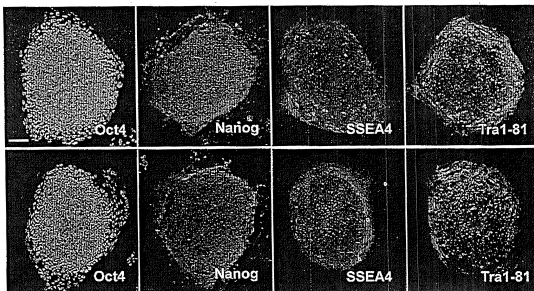
【図 15 C】



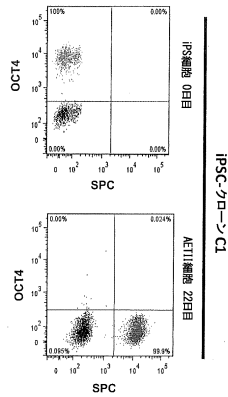
【図 15 D】



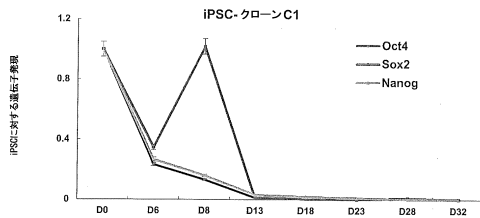
【図 16 A】



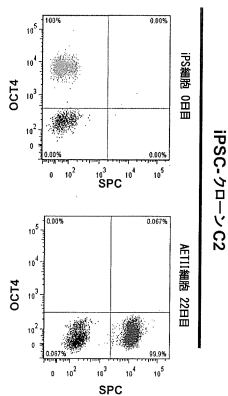
【図 16 D】



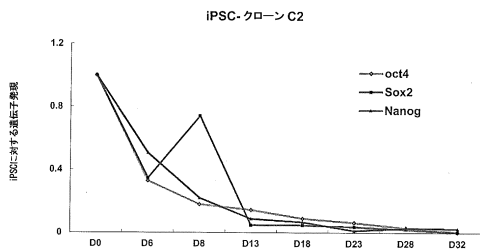
【図 16 B】



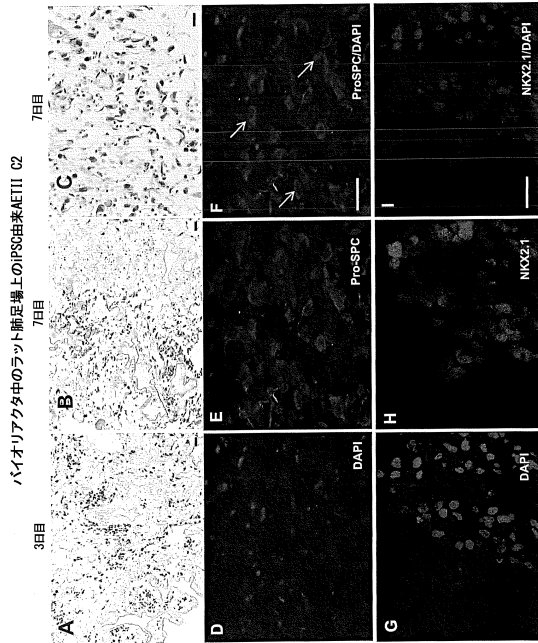
【図 16 E】



【図 16 C】

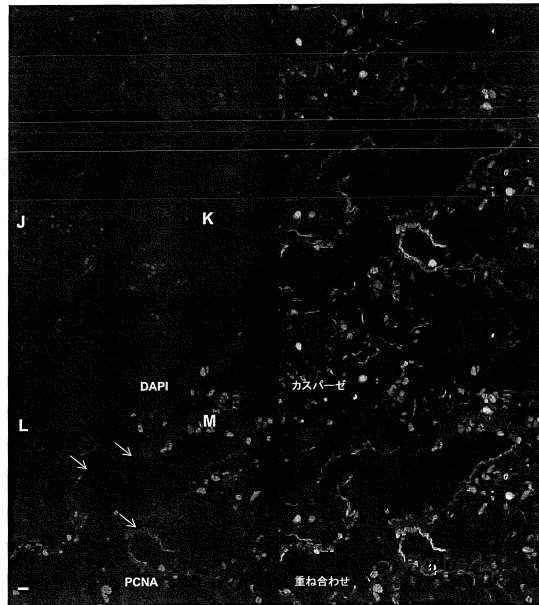


【図 17-1】



【図 17-2】

バイオリアクタ中のラット肺足場上のiPSC由来AETII C2



【配列表】

[0006444307000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/09 Z N A Z

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ニクラソン ローラ イー.

アメリカ合衆国 コネティカット州 グリニッチ ウィルシャー ロード 35

(72)発明者 ガエディ マブーブ

アメリカ合衆国 コネティカット州 ニューヘーブン ホイットニー アベニュー 725 アパ
ートメント ディー.

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第2011/139628 (WO, A1)

国際公開第2008/103810 (WO, A1)

特表2012-516699 (JP, A)

Journal of Biomechanics, 2010, Vol.43, p.55-62

Tissue Eng Part A., 2010, Vol.16, p.1515-1526

Cell Stem Cell, April 6, 2012, Vol.10, p.385-397

nature biotechnology, 2011, Vol.29, p.267-272, ONLINE METHODS

Chin Crit Care Med, July 2012, Vol.24, p.388-392

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 15/00

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)