

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-536554

(P2020-536554A)

(43) 公表日 令和2年12月17日 (2020. 12. 17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0789 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0789	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 1
A 6 1 P 7/00 (2006. 01)	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 210 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-520317 (P2020-520317)	(71) 出願人	508297654
(86) (22) 出願日	平成30年10月9日 (2018. 10. 9)		ストワーズ インスティテュート フォー
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月8日 (2020. 6. 8)		メディカル リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/055092		アメリカ合衆国, ミズーリ 64112,
(87) 国際公開番号	W02019/074980		カンザス シティ, イースト フィフティ
(87) 国際公開日	平成31年4月18日 (2019. 4. 18)		ース ストリート 1000
(31) 優先権主張番号	62/570, 076	(71) 出願人	399019892
(32) 優先日	平成29年10月9日 (2017. 10. 9)		ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		THE UNIVERSITY OF C
			H I C A G O
(31) 優先権主張番号	62/695, 820		アメリカ合衆国60637イリノイ州シカ
(32) 優先日	平成30年7月9日 (2018. 7. 9)		ゴ、サウス・エリス・アベニュー5801
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細胞集団を増大させるための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、幹細胞集団ならびに他の細胞集団を増大させるための方法に関する。より詳細には、本発明は、とりわけ、幹細胞および／または他の細胞集団、特に、造血幹細胞集団を増大させるための方法および組成物に関する。本開示の一実施形態では、幹細胞の集団を増大させるための方法であって、幹細胞の集団を末梢血、臍帯血および骨髄からなる群より選択される組織から得る方法が提供される。当該方法は、幹細胞の数が増大するように幹細胞の集団におけるN⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

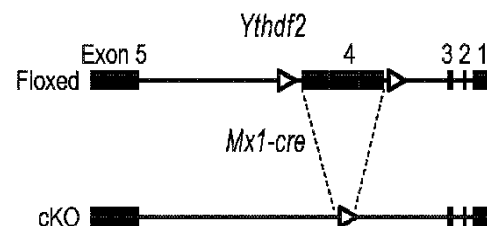


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

末梢血、臍帯血および骨髓からなる群より選択される組織から得た幹細胞の集団を増大させるための方法であって、幹細胞の数が増大するように前記幹細胞の集団における N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 2】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記幹細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA (siRNA)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に変異を導入して前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾リーダー、m⁶A mRNA 修飾ライター、および m⁶A mRNA イレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記変異が、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、および eIF3 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記変異が、Ythdf2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記変異が、FTO および ALKBH5 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記変異が、METTL3、METTL14、WTAP および KIAA1429 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞を、前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる Mx1-Cre 標的化系に曝露させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記 m^6A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞にshRNAが組み込まれる変異を導入して前記 m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項14】

前記shRNAが、前記幹細胞をレンチウイルスに曝露させて前記shRNAを送達することによって導入される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記 m^6A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーが、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、およびelF3からなる群より選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーが、Ythdf2を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することが、前記幹細胞を、以下：(HNRNPCの阻害剤)hsa-let-7e-5p(MIRT051596)、hsa-mir-455-3p(MIRT037890)、hsa-mir-30c-5p(MIRT047904)、hsa-mir-186-5p(MIRT045150)、hsa-mir-744-5p(MIRT037494)、hsa-mir-18a-3p(MIRT040851)、hsa-mir-484(MIRT042196)、hsa-mir-505-5p(MIRT037959)、hsa-mir-615-3p(MIRT039991)、hsa-mir-342-3p(MIRT043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-484、hsa-mir-320b、hsa-mir-620、hsa-mir-30b、hsa-mir-548q、hsa-mir-29b-1、hsa-mir-570、hsa-mir-183、hsa-mir-1276、hsa-mir-208a、hsa-mir-186、hsa-mir-28-5p、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-548am、hsa-mir-320d、hsa-mir-3175、hsa-mir-3155、hsa-mir-548aa、hsa-mir-519e、hsa-mir-1270、hsa-mir-513b、hsa-mir-599、hsa-mir-518f、hsa-mir-4301、hsa-mir-30c、hsa-mir-3135、hsa-mir-4286、hsa-mir-202、hsa-mir-4263、hsa-mir-4299、hsa-mir-606、hsa-mir-3133、hsa-mir-583、hsa-mir-3125、hsa-mir-501-5p、hsa-mir-7-1、hsa-mir-514b-3p、hsa-mir-3155b、hsa-mir-548d-3p、hsa-mir-224、hsa-mir-7-2、hsa-mir-708、hsa-mir-3199、hsa-

10

20

30

40

50

miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-miR-92a-3p (MIR T049721)、hsa-miR-30c-5p (MIR T048009)、hsa-miR-191-5p (MIR T045809)、hsa-let-7f-5p (MIR T051404)、hsa-miR-27b-3p (MIR T046213)、hsa-miR-877-3p (MIR T037116)、hsa-miR-615-3p (MIR T040278)、hsa-miR-1260b (MIR T052680)、hsa-miR-103a-3p (MIR T027027)、hsa-miR-16-5p (MIR T031508)、hsa-miR-1296-5p (MIR T036075)、hsa-miR-197-3p (MIR T048098)、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIR T040054)、hsa-miR-106b-5p (MI

RT044257)、hsa-mir-1 (MIRT023842)、mir-145、
 hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-200a、hsa-mir-301
 a、hsa-mir-519a、hsa-mir-141、hsa-mir-130b、
 hsa-mir-181b、hsa-mir-301b、hsa-mir-3117-3
 p、hsa-mir-1236、hsa-mir-181a、hsa-mir-519c
 -3p、hsa-mir-551b、hsa-mir-519e、hsa-mir-51
 9b-3p、hsa-mir-19b、hsa-mir-1303、hsa-mir-6
 08、hsa-mir-145、hsa-mir-130a、hsa-mir-181c
 、hsa-mir-323b-3p、hsa-mir-421、hsa-mir-515
 -5p、hsa-mir-3666、hsa-mir-181d、hsa-mir-14 10
 6a、hsa-mir-4295、hsa-mir-454、hsa-mir-3919
 、hsa-mir-19a、hsa-mir-543、hsa-mir-4262；(Y
 thdf3の阻害剤) hsa-mir-582-3p、hsa-mir-579、hsa
 -mir-520e、hsa-mir-520f、hsa-mir-3152-3p、h
 sa-mir-106a、hsa-mir-30d、hsa-mir-30a、hsa-
 mir-93、hsa-mir-508-5p、hsa-mir-29a、hsa-mi
 R-3148、hsa-mir-490-5p、hsa-mir-520b、hsa-m
 iR-20a、hsa-mir-409-3p、hsa-mir-4255、hsa-l
 et-7i、hsa-mir-373、hsa-let-7e、hsa-mir-520
 c-3p、hsa-mir-3920、hsa-mir-127-5p、hsa-mir 20
 -380、hsa-mir-616、hsa-mir-4277、hsa-mir-44
 8、hsa-mir-16-2、hsa-let-7c、hsa-mir-340、hs
 a-mir-373、hsa-mir-520a-3p、hsa-mir-144、hs
 a-mir-1265、hsa-mir-548x、hsa-mir-362-5p、h
 sa-mir-33b、hsa-mir-26b、hsa-mir-17、hsa-mi
 R-569、hsa-mir-3618、hsa-mir-576-5p、hsa-mi
 R-922、hsa-mir-302a、hsa-mir-106b、hsa-mir-
 888、hsa-mir-484、hsa-let-7b、hsa-mir-582-5
 p、hsa-let-7f、hsa-mir-30b、hsa-mir-524-5p、
 hsa-mir-302d、hsa-let-7d、hsa-mir-513a-5p、 30
 hsa-mir-500a、hsa-mir-570、hsa-mir-548l、hs
 a-mir-105、hsa-mir-374c、hsa-let-7g hsa-mi
 R-372、hsa-mir-3658、hsa-let-7a、hsa-mir-39
 08、hsa-mir-302b、hsa-mir-526b、hsa-mir-190
 、hsa-mir-181b、hsa-mir-433、hsa-mir-98、hsa
 -mir-3606、hsa-mir-595、hsa-mir-548am、hsa-
 mir-187、hsa-mir-561、hsa-mir-181a、hsa-mir
 -3155、hsa-mir-655、hsa-mir-302c、hsa-mir-1
 95、hsa-mir-26a、hsa-mir-590-3p、hsa-mir-30
 c、hsa-mir-502-5p、hsa-mir-495、hsa-mir-137 40
 、hsa-mir-181c、hsa-mir-520d-5p、hsa-mir-39
 42-5p、hsa-mir-202、hsa-mir-302e、hsa-mir-5
 13c、hsa-mir-885-5p、hsa-mir-520a-5p、hsa-m
 iR-583、hsa-mir-1297、hsa-mir-7-1、hsa-mir-
 520d-3p、hsa-mir-3155b、hsa-mir-3182、

hsa-mir-519d、hsa-mir-550a、hsa-mir-7-2、hs
 a-mir-181d、hsa-mir-190b、hsa-mir-1912、hsa
 -mir-151-3p、hsa-mir-33a、hsa-mir-525-5p、h 50

s a - m i R - 2 0 b、h s a - m i R - 5 1 4 b - 5 p、h s a - m i R - 3 0 e、h
 s a - m i R - 4 2 6 2、h s a - m i R - 6 3 6；(e l F 3の阻害剤) h s a - m i
 r - 9 2 b - 3 p (M I R T 0 4 0 7 3 4)、h s a - m i r - 1 6 - 5 p (M I R T 0
 3 1 7 0 5)、h s a - m i r - 1 8 a - 3 p (M I R T 0 4 0 9 7 4)、h s a - m i
 r - 1 5 5 - 5 p (M I R T 0 2 0 7 7 1)、h s a - m i r - 4 8 4 (M I R T 0 4 2
 3 2 4)、h s a - l e t - 7 c - 5 p (M I R T 0 5 1 7 7 6)、h s a - m i R - 3
 9 1 0、h s a - m i R - 1 4 8 b、h s a - m i R - 1 3 6、h s a - m i R - 1 5 a
 、h s a - m i R - 4 8 8、h s a - m i R - 5 0 0 a、h s a - m i R - 1 2 9 7、h
 s a - m i R - 3 1 5 9、h s a - m i R - 3 7 4 c、h s a - m i R - 4 2 4、h s a
 - m i R - 7 - 1、h s a - m i R - 1 8 6、h s a - m i R - 1 9 5、h s a - m i R
 - 1 5 b、h s a - m i R - 2 6 b、h s a - m i R - 5 0 5、h s a - m i R - 1 2 0
 6、h s a - m i R - 6 5 3、h s a - m i R - 1 2 8 3、h s a - m i R - 7 - 2、h
 s a - m i R - 1 9 6 a、h s a - m i R - 4 9 7、h s a - m i R - 3 3 a、h s a -
 m i R - 6 5 5、h s a - m i R - 2 6 a h s a - m i R - 1 6、h s a - m i r - 1
 5 1 a - 3 p (M I R T 0 4 3 6 0 0)、h s a - m i r - 9 2 a - 3 p (M I R T 0 4
 9 0 6 4)、h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0 3 9 7 7 9)、h s a - m i r
 - 8 7 7 - 3 p (M I R T 0 3 6 9 6 4)、h s a - m i r - 2 2 2 - 3 p (M I R T 0
 4 6 7 4 6)、h s a - m i r - 4 2 3 - 3 p (M I R T 0 4 2 4 6 8)、h s a - m i
 r - 3 2 4 - 3 p (M I R T 0 4 2 8 8 7)、h s a - m i r - 1 2 4 - 3 p (M I R T
 0 2 2 9 3 2)、h s a - m i R - 3 1 4 0 - 3 p、h s a - m i R - 1 2 4、h s a
 - m i R - 1 9 8、h s a - m i R - 5 2 5 - 5 p、h s a - m i R - 5 0 6、h s a - m
 i R - 5 2 0 a - 5 p、h s a - m i R - 1 9 6 a * h s a - m i R - 3 1 1 7 - 3 p
 、h s a - m i r - 3 4 2 - 5 p (M I R T 0 3 8 2 1 0)、h s a - m i r - 3 7 8 a
 - 5 p (M I R T 0 4 3 9 8 1)、h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0 4 0 0 8
 6)、h s a - l e t - 7 b - 5 p (M I R T 0 5 2 2 1 1)、h s a - m i r - 4 5 5
 - 3 p (M I R T 0 3 7 8 7 9)、h s a - m i R - 4 2 6 7、h s a - m i R - 5 9 0
 - 3 p、h s a - m i r - 1 0 6 b - 5 p (M I R T 0 4 4 3 5 5)、h s a - m i r -
 3 2 0 a (M I R T 0 4 4 4 6 6)、h s a - m i r - 1 6 - 5 p (M I R T 0 3 2 0 1
 8)、h s a - m i r - 1 5 5 - 5 p (M I R T 0 2 1 0 0 9)、h s a - m i R - 4 3
 0 2、h s a - m i r - 1 9 1 - 5 p (M I R T 0 4 5 7 9 3)、h s a - m i r - 1 3
 0 3 (M I R T 0 3 5 8 9 0)、h s a - m i r - 1 9 3 b - 3 p (M I R T 0 1 6 3 1
 6)、h s a - m i r - 2 2 2 - 3 p (M I R T 0 4 6 6 4 0)、h s a - m i r - 5 3
 2 - 3 p (M I R T 0 3 7 9 2 4)、h s a - m i r - 1 8 a - 3 p (M I R T 0 4 0 9
 2 9)、h s a - m i r - 9 2 a - 3 p (M I R T 0 4 9 0 0 1)、h s a - m i R - 5
 8 2 - 3 p、h s a - m i R - 4 2 6 5、h s a - m i R - 2 1 8 - 2、h s a - m i R
 - 1 2 7 1、h s a - m i R - 3 4 0、h s a - m i R - 2 2 1、h s a - m i R - 2 0
 b、h s a - m i R - 5 0 8 - 3 p、h s a - m i R - 1 4 1、h s a - m i R - 4 3 2
 5、h s a - m i R - 8 8 9、h s a - m i R - 2 9 a、h s a - m i R - 1 2 9 - 3 p
 、h s a - m i R - 1 2 9、h s a - m i R - 9 6、h s a - m i R - 3 1 6 3、h s a
 - m i R - 1 8 7、h s a - m i R - 1 9 6 a、h s a - m i R - 2 2 2、h s a - m i
 R - 1 1 7 9、h s a - m i R - 1 8 2、h s a - m i R - 9 * h s a - m i R - 3 2
 、h s a - m i R - 1 4 3、h s a - m i R - 4 2 9 6：(Y T H D C 1の阻害剤) h s
 a - m i r - 2 0 a - 3 p (M I R T 0 3 8 9 6 7)、h s a - m i r - 1 0 3 a - 3 p
 (M I R T 0 2 7 0 3 7)、h s a - m i r - 1 (M I R T 0 2 3 4 9 2)、h s a - m
 i r - 1 9 b - 3 p (M I R T 0 3 1 1 0 5)、h s a - m i r - 1 0 0 - 5 p (M I R
 T 0 4 8 4 0 0)、h s a - m i r - 9 3 - 5 p (M I R T 0 2 7 9 8 9)、h s a - m
 i r - 1 6 - 5 p (M I R T 0 3 1 3 7 9)、h s a - l e t - 7 b - 5 p (M I R T 0
 5 2 1 5 0)、h s a - m i R - 5 2 0 f、h s a - m i R - 3 0 0、h s a - m i R -
 1 5 a、h s a - m i R - 2 0 0 a、h s a - m i R - 6 0 5、h s a - m i R - 3 0 d
 、h s a - m i R - 3 0 a、h s a - m i R - 3 6 1 3 - 3 p、h s a - m i R - 5 0 9

- 3 - 5 p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262
 からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させることを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項19】

前記幹細胞の増大が、少なくとも2倍である、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記幹細胞の増大が、少なくとも4倍である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記幹細胞の増大が、少なくとも5倍である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記幹細胞の増大が、少なくとも8倍である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記幹細胞の増大が、少なくとも10倍である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記幹細胞が、造血幹細胞(HSC)、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)、内皮前駆細胞(EPC)、間葉系幹細胞(MSC)、心臓幹細胞(CSC)、神経幹細胞(NSC)、ならびにこれらの組合せからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記幹細胞がHSCである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

増大した前記細胞が、総コロニー形成単位(CFU)の少なくとも5倍の増加を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

増大した前記細胞が、CFU-顆粒球赤血球単球巨核球(GEMM)コロニーの少なくとも3.8倍の増加を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 28】

実質的に未分化の幹細胞集団を *ex vivo* で増大させるための方法であって、前記未分化の幹細胞集団において、前記幹細胞集団の著しい分化を伴わずに未分化の幹細胞の数が増大するように N^6 -メチルアデノシン (m^6A) *mRNA* 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 29】

末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た造血幹細胞 (HSC) 集団を *ex vivo* で増大させるための方法であって、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、前記 HSC 集団における多系列分化の潜在性を維持しながら前記 HSC 集団が十分な数量まで増大するように前記 HSC 集団における N^6 -メチルアデノシン (m^6A) *mRNA* 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

10

【請求項 30】

前記被験体が、ヒトである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 m^6A *mRNA* 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に前記 m^6A *mRNA* 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記幹細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンス *mRNA*、低分子干渉 *mRNA* (*siRNA*)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記 m^6A *mRNA* 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 28 または 29 に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記 m^6A *mRNA* 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に変異を導入して前記 m^6A *mRNA* 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記変異が、 m^6A *mRNA* 修飾リーダー、 m^6A *mRNA* 修飾ライター、および m^6A *mRNA* イレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記変異が、 m^6A *mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記変異が、*Ythdf1*、*Ythdf2*、*Ythdf3*、*Ythdc1*、*Ythdc2*、*HNRNPC*、*HNRNPAB1*、および *elf3* からなる群より選択される m^6A *mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記変異が、*Ythdf2* を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記変異が、 m^6A *mRNA* 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 33 に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記変異が、*FTO* および *ALKBH5* からなる群より選択される m^6A *mRNA* 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記変異が、 m^6A *mRNA* 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 40】

50

前記変異が、METTL3、METTL14、WTPおよびKIAA1429からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞を、前記m⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系に曝露させることを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項42】

前記m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞にshRNAが組み込まれる変異を導入して前記m⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項43】

前記shRNAが、前記幹細胞をレンチウイルスに曝露させて前記shRNAを送達することによって導入される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、m⁶A mRNA修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項45】

前記m⁶A mRNA修飾リーダーが、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNPA2B1、およびelf3からなる群より選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記m⁶A mRNA修飾リーダーが、Ythdf2を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記m⁶A mRNA修飾リーダーを下方制御することが、前記幹細胞を、以下：(HNRNPCの阻害剤)hsa-let-7e-5p(MIRT051596)、hsa-mir-455-3p(MIRT037890)、hsa-mir-30c-5p(MIRT047904)、hsa-mir-186-5p(MIRT045150)、hsa-mir-744-5p(MIRT037494)、hsa-mir-18a-3p(MIRT040851)、hsa-mir-484(MIRT042196)、hsa-mir-505-5p(MIRT037959)、hsa-mir-615-3p(MIRT039991)、hsa-mir-342-3p(MIRT043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-484、hsa-mir-320b、hsa-mir-620、hsa-mir-30b、hsa-mir-548q、hsa-mir-29b-1、hsa-mir-570、hsa-mir-183、hsa-mir-1276、hsa-mir-208a、hsa-mir-186、hsa-mir-28-5p、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-548am、hsa-mir-320d、hsa-mir-3

10

20

30

40

50

175、hsa-miR-3155、hsa-miR-548aa、hsa-miR-519e、hsa-miR-1270、hsa-miR-513b、hsa-miR-599、hsa-miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa-miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、hsa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-miR-92a-3p (MIRT049721)、hsa-miR-30c-5p (MIRT048009)、hsa-miR-191-5p (MIRT045809)、hsa-let-7f-5p (MIRT051404)、hsa-miR-27b-3p (MIRT046213)、hsa-miR-877-3p (MIRT037116)、hsa-miR-615-3p (MIRT040278)、hsa-miR-1260b (MIRT052680)、hsa-miR-103a-3p (MIRT027027)、hsa-miR-16-5p (MIRT031508)、hsa-miR-1296-5p (MIRT036075)、hsa-miR-197-3p (MIRT048098)、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1

の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRTO40054)、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44257)、hsa-miR-1 (MIRTO23842)、miR-145、
 hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-548l、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g、hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-39

42-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3182、

hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRTO40734)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31705)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40974)、hsa-miR-155-5p (MIRTO20771)、hsa-miR-484 (MIRTO42324)、hsa-let-7c-5p (MIRTO51776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a、hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRTO43600)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49064)、hsa-miR-615-3p (MIRTO39779)、hsa-miR-877-3p (MIRTO36964)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46746)、hsa-miR-423-3p (MIRTO42468)、hsa-miR-324-3p (MIRTO42887)、hsa-miR-124-3p (MIRTO22932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hsa-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-342-5p (MIRTO38210)、hsa-miR-378a-5p (MIRTO43981)、hsa-miR-615-3p (MIRTO40086)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52211)、hsa-miR-455-3p (MIRTO37879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44355)、hsa-miR-320a (MIRTO44466)、hsa-miR-16-5p (MIRTO32018)、hsa-miR-155-5p (MIRTO21009)、hsa-miR-4302、hsa-miR-191-5p (MIRTO45793)、hsa-miR-1303 (MIRTO35890)、hsa-miR-193b-3p (MIRTO16316)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46640)、hsa-miR-532-3p (MIRTO37924)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40929)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49001)、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-miR-1271、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-miR-20b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-4325、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa-miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-miR-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32

、hsa-miR-143、hsa-miR-4296：(YTHDC1の阻害剤) hsa-miR-20a-3p (MIRT038967)、hsa-miR-103a-3p (MIRT027037)、hsa-miR-1 (MIRT023492)、hsa-miR-19b-3p (MIRT031105)、hsa-miR-100-5p (MIRT048400)、hsa-miR-93-5p (MIRT027989)、hsa-miR-16-5p (MIRT031379)、hsa-let-7b-5p (MIRT052150)、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262

からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させることを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項48】

前記幹細胞が、造血幹細胞(HSC)、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)、内皮前駆細胞(EPC)、間葉系幹細胞(MSC)、心臓幹細胞(CSC)、神経幹細胞(NSC)、ならびにこれらの組合せからなる群より選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項49】

前記幹細胞が、造血幹細胞(HSC)である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記HSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織から得る、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記幹細胞の数の増大が、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍および少なくとも10倍からなる群より選択される倍数での増大である、請求項31に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

請求項 2 8 に記載のプロセスによって作製される増大した実質的に未分化の幹細胞集団。

【請求項 5 3】

請求項 2 9 に記載のプロセスによって作製される増大した H S C 集団。

【請求項 5 4】

造血幹細胞 (H S C) を *ex vivo* で少なくとも 2 倍に増大させるための方法であって、増大した前記 H S C が、それを必要とする哺乳動物に移植されたときに H S C 系列を再構成する能力を有し、前記方法が、前記幹細胞に、*m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、前記 H S C の集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法。

10

【請求項 5 5】

前記 H S C を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織から得る、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記変異が、*Y t h d f 2* を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記変異を、*m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる *M x 1 - C r e* 標的化系に前記幹細胞を曝露させることによって導入する、請求項 5 4 に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記変異が、前記幹細胞に *s h R N A* を組み込んで *m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるものである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記 H S C の数の増大が、少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 8 倍および少なくとも 1 0 倍からなる群より選択される倍数での増大である、請求項 5 4 に記載の方法。

30

【請求項 6 1】

造血幹細胞集団 (H S C) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、前記 H S C 集団に、*m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキット。

【請求項 6 2】

前記 H S C 集団に変異を導入するための系が、前記 H S C 集団に *Y t h d f 2* を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる 1 種または複数種の試薬を含む、請求項 6 1 に記載のキット。

【請求項 6 3】

前記 H S C 集団に変異を導入するための系が、*m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる *M x 1 - C r e* 標的化系を含む、請求項 6 2 に記載のキット。

40

【請求項 6 4】

前記 H S C 集団に変異を導入するための系が、前記 H S C 集団に *s h R N A* を組み込むレンチウイルスを送達して *m⁶A* m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるための試薬を含む、請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 5】

造血幹細胞集団 (H S C) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、*m⁶A* m R N A 修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関

50

する指示とを含むキット。

【請求項 66】

造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、

（a）HSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、

（b）前記試料を適切な培養培地中で前記試料中のHSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

（c）前記HSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項 67】

前記HSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項66に記載の方法。

【請求項 68】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらすものである、請求項66に記載の方法。

【請求項 69】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAの前記HSC集団への組込みをもたらすものである、請求項66に記載の方法。

【請求項 70】

造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、

（a）HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中のHSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

（b）培養物から前記 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、

（c）前記HSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項 71】

前記HSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤が、Ythdf2を阻害するものである、請求項70に記載の方法。

【請求項 73】

前記被験体が、ヒトである、請求項70に記載の方法。

【請求項 74】

骨髓の再構成を必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、

（a）HSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、

（b）前記試料を適切な培養培地中で前記試料中のHSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

（c）前記HSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項 75】

前記HSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項74に記載の方法。

【請求項 76】

骨髓の再構成を必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、

（a）HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中のHSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

10

20

30

40

50

(b) 培養物から前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、
(c) 前記 HSC を前記被験体に投与するステップと
を含む方法。

【請求項 77】

前記 HSC を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、
請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

造血細胞 (HSC) の集団を増大させるための方法であって、前記 HSC の集団を前記
HSC 集団の少なくとも 2 倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含
み、増大した前記 HSC の集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものであ
る、方法。

10

【請求項 79】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 4 倍である、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 5 倍である、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 8 倍である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 10 倍である、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

20

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

前記ヒトが、骨髓移植、末梢血移植、および臍帯血液移植からなる群より選択される移
植を必要としている、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

骨髓移植、末梢血移植および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要とする
被験体を処置するための方法であって、前記被験体に、請求項 78 に記載の方法によって
得た HSC の集団を投与するステップを含む方法。

【請求項 86】

30

造血幹細胞 (HSC) の集団を増大させるための方法であって、

(a) 哺乳動物から HSC 集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記試料由来の前記 HSC 集団を *in vitro* で増大させるステップであっ
て、

(i) 前記 HSC 集団が少なくとも 2 倍増大し、

(ii) 増大した前記 HSC 集団が、総コロニー形成単位の少なくとも 5 倍の増加を
有する、ステップと
を含む方法。

【請求項 87】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 4 倍である、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

40

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 5 倍である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 8 倍である、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記 HSC 集団の増大が、少なくとも 10 倍である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 92】

前記ヒトが、骨髓移植を必要としている、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

50

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

造血幹細胞系列の再構成を必要とする被験体において造血幹細胞系列を再構成するための方法であって、

(a) 哺乳動物から H S C 集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記試料由来の前記 H S C 集団を *i n v i t r o* で増大させるステップであって、

(i) 前記 H S C 集団が少なくとも 2 倍増大し、

(i i) 増大した前記 H S C 集団が総コロニー形成単位の少なくとも 5 倍の増加を有する、ステップと、 10

(c) 増大した前記 H S C 集団をそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む方法。

【請求項 9 5】

前記 H S C 集団の増大が、少なくとも 4 倍である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記 H S C 集団の増大が、少なくとも 5 倍である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記 H S C 集団の増大が、少なくとも 8 倍である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 H S C 集団の増大が、少なくとも 1 0 倍である、請求項 9 7 に記載の方法。 20

【請求項 9 9】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記ヒトが、骨髓移植を必要としている、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記試料が、自己供給源または同種異系供給源に由来するものである、請求項 1 0 1 に記載の方法。 30

【請求項 1 0 3】

前記試料が、自己供給源に由来するものである、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

造血幹細胞集団の増大を必要とする哺乳動物において造血幹細胞集団を増大させるための方法であって、前記哺乳動物に、N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、前記哺乳動物において造血系列を再構成する能力を有する H S C を含む前記 H S C 集団を少なくとも 2 倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法。

【請求項 1 0 5】

前記モジュレーターが、前記 H S C 集団に N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項 1 0 4 に記載の方法。 40

【請求項 1 0 6】

前記モジュレーターが、前記 H S C 集団に Y t h d f 2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記モジュレーターが、N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾リーダーの阻害剤を含む、請求項 1 0 4 に記載の方法。 50

【請求項 108】

前記モジュレーターが、Y t h d f 2 の阻害剤を含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 110】

実質的に未分化の間葉系幹細胞 (M S C) 集団を e x v i v o で増大させるための方法であって、M S C の著しい分化を伴わずに未分化の M S C の数が増大するように前記未分化の M S C 集団における N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 111】

前記 M S C 集団が、N -カドヘリン + M S C および C D 105 + M S C からなる群より選択される少なくとも 1 種の M S C を含む、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記 M S C 集団が、N -カドヘリン + M S C を含む、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た間葉系幹細胞 (M S C) 集団を e x v i v o で増大させるための方法であって、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、前記 M S C 集団における多系列分化の潜在性を維持しながら、前記 M S C 集団が十分な数量まで増大するように前記 M S C 集団における N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 114】

前記 M S C 集団が、N -カドヘリン + M S C および C D 105 + M S C からなる群より選択される少なくとも 1 種の M S C を含む、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

前記 M S C 集団が、N -カドヘリン + M S C を含む、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 116】

前記被験体が、ヒトである、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 117】

前記 m⁶ A m R N A 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 M S C に前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記幹細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンス R N A、低分子干渉 R N A (s i R N A)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 110 または 113 に記載の方法。

【請求項 118】

前記 m⁶ A m R N A 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に変異を導入して前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 117 に記載の方法。

【請求項 119】

前記変異が、m⁶ A m R N A 修飾リーダー、m⁶ A m R N A 修飾ライター、および m⁶ A m R N A イレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

前記変異が、m⁶ A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記変異が、Y t h d f 1、Y t h d f 2、Y t h d f 3、Y t h d c 1、Y t h d c 2、H N R N P C、H N R N P A 2 B 1、および e l F 3 からなる群より選択される m⁶ A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 120 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 2】

前記変異が、Y t h d f 2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記変異が、F T O および A L K B H 5 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 1 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 5】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記変異が、M E T T L 3、M E T T L 1 4、W T A P および K I A A 1 4 2 9 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 M S C を、前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる M x 1 - C r e 標的化系に曝露させることを含む、請求項 1 1 9 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 8】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 M S C に s h R N A が組み込まれる変異を導入して前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記 s h R N A が、前記幹細胞をレンチウイルスに曝露させて前記 s h R N A を送達することによって導入される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項 1 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 1 3 1】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Y t h d f 1、Y t h d f 2、Y t h d f 3、Y t h d c 1、Y t h d c 2、H N R N P C、H N R N P A 2 B 1、および e l F 3 からなる群より選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Y t h d f 2 を含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することが、前記 M S C を、以下：(H N R N P C の阻害剤) h s a - l e t - 7 e - 5 p (M I R T 0 5 1 5 9 6)、h s a - m i r - 4 5 5 - 3 p (M I R T 0 3 7 8 9 0)、h s a - m i r - 3 0 c - 5 p (M I R T 0 4 7 9 0 4)、h s a - m i r - 1 8 6 - 5 p (M I R T 0 4 5 1 5 0)、h s a - m i r - 7 4 4 - 5 p (M I R T 0 3 7 4 9 4)、h s a - m i r - 1 8 a - 3 p (M I R T 0 4 0 8 5 1)、h s a - m i r - 4 8 4 (M I R T 0 4 2 1 9 6)、h s a - m i r - 5 0 5 - 5 p (M I R T 0 3 7 9 5 9)、h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0 3 9 9 9 1)、h s a - m i r - 3 4 2 - 3 p (M I R T 0 4 3 6 9 4)、h s a - m i r - 3 6 0 7 - 3 p、h s a - m i r - 3 0 d、h s a - m i r - 3 9 1 6、h s a - m i r - 3 1 6 2 - 5 p、h s a - m i r - 1 2 7 3 d、h s a - m i r - 3 1 6 1、

40

50

hsa-miR-30a、hsa-miR-629、hsa-miR-208b、hsa-miR-489、hsa-miR-3148、hsa-miR-2113、hsa-miR-877、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-186、hsa-miR-548o、hsa-miR-3139、hsa-miR-320a、hsa-miR-4311、hsa-miR-555、hsa-miR-3605-5p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-144、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-548x、hsa-miR-299-5p、hsa-miR-653、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-548p、hsa-miR-586、hsa-miR-888、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-484、hsa-miR-320b、hsa-miR-620、hsa-miR-30b、hsa-miR-548q、hsa-miR-29b-1、hsa-miR-570、hsa-miR-183、hsa-miR-1276、hsa-miR-208a、hsa-miR-186、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-548am、hsa-miR-320d、hsa-miR-3175、hsa-miR-3155、hsa-miR-548aa、hsa-miR-519e、hsa-miR-1270、hsa-miR-513b、hsa-miR-599、hsa-miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa-miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、hsa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-miR-92a-3p (MIRT049721)、hsa-miR-30c-5p (MIRT048009)、hsa-miR-191-5p (MIRT045809)、hsa-let-7f-5p (MIRT051404)、hsa-miR-27b-3p (MIRT046213)、hsa-miR-877-3p (MIRT037116)、hsa-miR-615-3p (MIRT040278)、hsa-miR-1260b (MIRT052680)、hsa-miR-103a-3p (MIRT027027)、hsa-miR-16-5p (MIRT031508)、hsa-miR-1296-5p (MIRT036075)、hsa-miR-197-3p (MIRT048098)、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-

497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRT040054)、hsa-miR-106b-5p (MIRT044257)、hsa-miR-1 (MIRT023842)、miR-145、hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-

888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-548l、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3182、

10

20

hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRTO40734)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31705)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40974)、hsa-miR-155-5p (MIRTO20771)、hsa-miR-484 (MIRTO42324)、hsa-let-7c-5p (MIRTO51776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRTO43600)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49064)、hsa-miR-615-3p (MIRTO39779)、hsa-miR-877-3p (MIRTO36964)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46746)、hsa-miR-423-3p (MIRTO42468)、hsa-miR-324-3p (MIRTO42887)、hsa-miR-124-3p (MIRTO22932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hsa-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-342-5p (MIRTO38210)、hsa-miR-378a-5p (MIRTO43981)、hsa-miR-615-3p (MIRTO40086)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52211)、hsa-miR-455-3p (MIRTO37879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44355)、hsa-miR-

30

40

50

320a (MIR T044466)、hsa-mir-16-5p (MIR T032018)、hsa-mir-155-5p (MIR T021009)、hsa-mir-4302、hsa-mir-191-5p (MIR T045793)、hsa-mir-1303 (MIR T035890)、hsa-mir-193b-3p (MIR T016316)、hsa-mir-222-3p (MIR T046640)、hsa-mir-532-3p (MIR T037924)、hsa-mir-18a-3p (MIR T040929)、hsa-mir-92a-3p (MIR T049001)、hsa-mir-582-3p、hsa-mir-4265、hsa-mir-218-2、hsa-mir-1271、hsa-mir-340、hsa-mir-221、hsa-mir-20b、hsa-mir-508-3p、hsa-mir-141、hsa-mir-4325、hsa-mir-889、hsa-mir-29a、hsa-mir-129-3p、hsa-mir-129、hsa-mir-96、hsa-mir-3163、hsa-mir-187、hsa-mir-196a、hsa-mir-222、hsa-mir-1179、hsa-mir-182、hsa-mir-9* hsa-mir-32、hsa-mir-143、hsa-mir-4296：(YTHDC1の阻害剤) hsa-mir-20a-3p (MIR T038967)、hsa-mir-103a-3p (MIR T027037)、hsa-mir-1 (MIR T023492)、hsa-mir-19b-3p (MIR T031105)、hsa-mir-100-5p (MIR T048400)、hsa-mir-93-5p (MIR T027989)、hsa-mir-16-5p (MIR T031379)、hsa-let-7b-5p (MIR T052150)、hsa-mir-520f、hsa-mir-300、hsa-mir-15a、hsa-mir-200a、hsa-mir-605、hsa-mir-30d、hsa-mir-30a、hsa-mir-3613-3p、hsa-mir-509-3-5p、hsa-mir-34c-5p、hsa-mir-324-3p、hsa-mir-1248、hsa-mir-152、hsa-mir-548t、hsa-mir-4310、hsa-mir-145、hsa-mir-516a-3p、hsa-mir-16、hsa-mir-3668、hsa-mir-4277、hsa-mir-448、hsa-mir-16-2、hsa-mir-148b、hsa-mir-509-5p、hsa-mir-103a、hsa-mir-1265、hsa-mir-2115、hsa-mir-548c-3p、hsa-mir-148a、hsa-mir-548p、hsa-mir-513a-3p、hsa-mir-497、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-382、hsa-mir-30b、hsa-mir-543、hsa-let-7f-2、hsa-mir-1269、hsa-mir-3164、hsa-mir-503、hsa-mir-500a、hsa-mir-449a、hsa-mir-141、hsa-mir-424、hsa-mir-3908、hsa-mir-889、hsa-mir-2116、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-15b、hsa-mir-181b、hsa-mir-187、hsa-mir-1237、hsa-mir-449b、hsa-mir-101、hsa-mir-381、hsa-mir-618、hsa-mir-222、hsa-mir-181a、hsa-mir-432、hsa-mir-96、hsa-mir-19b、hsa-mir-195、hsa-mir-548n、hsa-mir-485-5p、hsa-mir-217、hsa-mir-30c、hsa-mir-495、hsa-mir-137、hsa-mir-1288、hsa-mir-181c、hsa-mir-3942-5p、hsa-mir-548v、hsa-mir-487a、hsa-mir-221、hsa-mir-891b、hsa-mir-205、hsa-mir-195、hsa-mir-4271、hsa-mir-3611、hsa-mir-516b、hsa-mir-181d、hsa-mir-154、hsa-mir-646、hsa-mir-153、hsa-mir-34a、hsa-mir-19a、hsa-mir-107、hsa-mir-30eおよびhsa-mir-4262

からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させること

を含む、請求項 130 に記載の方法。

【請求項 134】

前記 MSC を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織から得る、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 135】

前記幹細胞の数の増大が、少なくとも 2 倍、少なくとも 2.5 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 3.5 倍、少なくとも 4 倍および少なくとも 8 倍からなる群より選択される倍数での増大である、請求項 134 に記載の方法。

【請求項 136】

請求項 110 に記載のプロセスによって作製される増大した実質的に未分化の間葉細胞集団。

10

【請求項 137】

請求項 113 に記載のプロセスによって作製される増大した MSC 集団。

【請求項 138】

間葉系幹細胞 (MSC) を *ex vivo* で少なくとも 2 倍増大させるための方法であって、増大した前記 MSC が、それを必要とする哺乳動物に移植されたときに MSC 系列を再構成する能力を有し、前記方法が、前記幹細胞に、 m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、前記 HSC の集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法。

【請求項 139】

前記 MSC 集団が、N-カドヘリン+MSC および CD105+MSC からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む、請求項 138 に記載の方法。

20

【請求項 140】

前記 MSC を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織から得る、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 141】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 142】

前記変異が、Ythdf2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 138 に記載の方法。

30

【請求項 143】

前記変異を、 m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる $Mx1-Cre$ 標的化系に前記 MSC を曝露させることによって導入する、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 144】

前記変異が、前記 MSC に shRNA を組み込んで m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるものである、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 145】

前記 MSC の数の増大が、少なくとも 2 倍、少なくとも 2.5 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 3.5 倍、少なくとも 4 倍および少なくとも 8 倍からなる群より選択される倍数での増大である、請求項 138 に記載の方法。

40

【請求項 146】

間葉系幹細胞集団 (MSC) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、前記 MSC 集団に m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキット。

【請求項 147】

前記 MSC 集団が、N-カドヘリン+MSC および CD105+MSC からなる群より選択される少なくとも 1 種の MSC を含む、請求項 146 に記載のキット。

【請求項 148】

50

前記MSC集団に変異を導入するための系が、前記MSC集団にYthdf2を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる1種または複数種の試薬を含む、請求項146に記載のキット。

【請求項149】

前記MSC集団に変異を導入するための系が、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系を含む、請求項146に記載のキット。

【請求項150】

前記MSC集団に変異を導入するための系が、前記HSC集団にshRNAを組み込むレンチウイルスを送達してm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるための試薬を含む、請求項146に記載のキット。

10

【請求項151】

間葉系幹細胞集団(MSC)集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関する指示とを含むキット。

【請求項152】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項151に記載のキット。

【請求項153】

間葉系幹細胞(MSC)をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、
(a) MSC集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、
(b) 前記試料を適切な培養培地中で、前記試料中のMSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、
(c) 前記MSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

20

【請求項154】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項153に記載の方法。

【請求項155】

前記MSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項153に記載の方法。

30

【請求項156】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらすものである、請求項153に記載の方法。

【請求項157】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAの前記HSC集団への組み込みをもたらすものである、請求項153に記載の方法。

【請求項159】

間葉系幹細胞(MSC)をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、
(a) MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中のMSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、
(b) 培養物から前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、
(c) 前記MSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

40

【請求項160】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項159に記載の方法。

【請求項161】

50

前記MSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項159に記載の方法。

【請求項162】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤が、Ythfd2を阻害するものである、請求項159に記載の方法。

【請求項163】

前記被験体が、ヒトである、請求項159に記載の方法。

【請求項164】

骨髓の再構成を必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、

(a) MSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、 10

(b) 前記試料を適切な培養培地中で、前記試料中のMSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(c) 前記MSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項165】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

前記MSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項164に記載の方法。 20

【請求項167】

骨髓の再構成を必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、

(a) MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中のMSCの数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(b) 培養物から前記 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、

(c) 前記MSCを前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項168】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項167に記載の方法。 30

【請求項169】

前記MSCを、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項167に記載の方法。

【請求項170】

間葉系幹細胞(MSC)の集団を増大させるための方法であって、前記MSCの集団を、前記MSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、増大した前記MSCの集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである、方法。 40

【請求項171】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項170に記載の方法。

【請求項172】

前記MSC集団の増大が、少なくとも2.5倍である、請求項170に記載の方法。

【請求項173】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3倍である、請求項172に記載の方法。

【請求項174】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3.5倍である、請求項173に記載の方法。

【請求項175】

前記MSC集団の増大が、少なくとも4倍である、請求項174に記載の方法。

【請求項176】

前記MSC集団の増大が、少なくとも8倍である、請求項175に記載の方法。

【請求項177】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項170に記載の方法。

【請求項178】

前記ヒトが、骨髄移植、末梢血移植、および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要としている、請求項177に記載の方法。

【請求項179】

骨髄移植、末梢血移植および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要とする被験体を処置するための方法であって、前記被験体に、請求項170に記載の方法によって得たMSCの集団を投与するステップを含む方法。

10

【請求項180】

間葉系幹細胞(MSC)の集団を増大させるための方法であって、

(a) 哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記試料由来の前記MSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、

(i) 前記MSC集団が少なくとも2倍増大する、ステップとを含む方法。

【請求項181】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項180に記載の方法。

20

【請求項182】

前記MSC集団の増大が、少なくとも2.5倍である、請求項180に記載の方法。

【請求項183】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3倍である、請求項182に記載の方法。

【請求項184】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3.5倍である、請求項183に記載の方法。

【請求項185】

前記MSC集団の増大が、少なくとも4倍である、請求項184に記載の方法。

【請求項186】

30

前記MSC集団の増大が、少なくとも8倍である、請求項185に記載の方法。

【請求項187】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項180に記載の方法。

【請求項188】

前記ヒトが、骨髄移植を必要としている、請求項187に記載の方法。

【請求項189】

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織から得る、請求項180に記載の方法。

【請求項190】

間葉系幹細胞系列の再構成を必要とする被験体において間葉系幹細胞系列を再構成するための方法であって、

40

(a) 哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記試料由来の前記MSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、

(i) 前記MSC集団が少なくとも2倍増大する、ステップと、

(c) 増大した前記MSC集団をそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む方法。

【請求項191】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項190に記載の方法。

50

【請求項 192】

前記MSC集団の増大が、少なくとも2.5倍である、請求項190に記載の方法。

【請求項 193】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3倍である、請求項192に記載の方法。

【請求項 194】

前記MSC集団の増大が、少なくとも3.5倍である、請求項193に記載の方法。

【請求項 195】

前記MSC集団の増大が、少なくとも4倍である、請求項194に記載の方法。

【請求項 196】

前記MSC集団の増大が、少なくとも8倍である、請求項195に記載の方法。

10

【請求項 197】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項190に記載の方法。

【請求項 198】

前記ヒトが、骨髄移植を必要としている、請求項197に記載の方法。

【請求項 199】

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織から得る、請求項190に記載の方法。

【請求項 200】

前記試料が、自己供給源または同種異系供給源に由来するものである、請求項199に記載の方法。

20

【請求項 201】

前記試料が、自己供給源に由来するものである、請求項199に記載の方法。

【請求項 202】

間葉系幹細胞集団の増大を必要とする哺乳動物において間葉系幹細胞集団を増大させるための方法であって、前記哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、前記哺乳動物において間葉系系列を再構成する能力を有するHSCを含む、前記MSC集団を少なくとも2倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法。

【請求項 203】

前記MSC集団が、N-カドヘリン+MSCおよびCD105+MSCからなる群より選択される少なくとも1種のMSCを含む、請求項202に記載の方法。

30

【請求項 204】

前記モジュレーターが、前記MSC集団に、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項202に記載の方法。

【請求項 205】

前記モジュレーターが、前記MSC集団に、Ythdf2を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項202に記載の方法。

【請求項 206】

前記モジュレーターが、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾リーダーの阻害剤を含む、請求項202に記載の方法。

40

【請求項 207】

前記モジュレーターが、Ythdf2の阻害剤を含む、請求項202に記載の方法。

【請求項 208】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項202に記載の方法。

【請求項 209】

生体試料から間葉系幹細胞(MSC)を単離する方法であって、MSCの集団を有する前記生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させるステップを含む方法。

50

【請求項 2 1 0】

前記生体試料が、末梢血、臍帯血および骨髓からなる群より選択される組織を含む、請求項 2 0 9 に記載の方法。

【請求項 2 1 1】

間葉系幹細胞の数が増大するように前記 M S C の集団における N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) m R N A 修飾経路をモジュレートすることによって前記生体試料由来の前記 M S C の集団を増大させるステップをさらに含む、請求項 2 0 9 に記載の方法。

【請求項 2 1 2】

前記 M S C の集団を、前記生体試料から単離した後に増大させる、請求項 2 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 1 3】

前記生体試料中の前記 M S C の集団を、前記生体試料から前記 M S C を単離する前に増大させる、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

前記 M S C 集団を、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、前記 M S C 集団における多系列分化の潜在性を維持しながら十分な数量まで増大させる、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

前記被験体が、ヒトである、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

前記 m⁶ A m R N A 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記幹細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンス R N A、低分子干渉 R N A (s i R N A)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 1 7】

前記 m⁶ A m R N A 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞に変異を導入して前記 m⁶ A m R N A 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

前記変異が、m⁶ A m R N A 修飾リーダー、m⁶ A m R N A 修飾ライター、および m⁶ A m R N A イレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 2 1 9】

前記変異が、m⁶ A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 0】

前記変異が、Y t h d f 1、Y t h d f 2、Y t h d f 3、Y t h d c 1、Y t h d c 2、H N R N P C、H N R N P A 2 B 1、および e l F 3 からなる群より選択される m⁶ A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 1 9 に記載の方法。

40

【請求項 2 2 1】

前記変異が、Y t h d f 2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

前記変異が、m⁶ A m R N A 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記変異が、F T O および A L K B H 5 からなる群より選択される m⁶ A m R N A 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させる

50

ものである、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記変異が、METTL3、METTL14、WTPおよびKIAA1429からなる群より選択されるm⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞を、前記m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系に曝露させることを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

前記m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記幹細胞にshRNAが組み込まれる変異を導入して前記m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

前記shRNAが、前記幹細胞をレンチウイルスに曝露させて前記shRNAを送達することによって導入される、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

前記m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNPA2B1、およびelf3からなる群より選択される、請求項 2 2 9 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Ythdf2を含む、請求項 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

前記m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することが、前記幹細胞を、以下：(HNRNPCの阻害剤)hsa-let-7e-5p(MIRT051596)、hsa-mir-455-3p(MIRT037890)、hsa-mir-30c-5p(MIRT047904)、hsa-mir-186-5p(MIRT045150)、hsa-mir-744-5p(MIRT037494)、hsa-mir-18a-3p(MIRT040851)、hsa-mir-484(MIRT042196)、hsa-mir-505-5p(MIRT037959)、hsa-mir-615-3p(MIRT039991)、hsa-mir-342-3p(MIRT043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa

10

20

30

40

50

—miR-484、hsa-miR-320b、hsa-miR-620、hsa-miR-30b、hsa-miR-548q、hsa-miR-29b-1、hsa-miR-570、hsa-miR-183、hsa-miR-1276、hsa-miR-208a、hsa-miR-186、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-548am、hsa-miR-320d、hsa-miR-3175、hsa-miR-3155、hsa-miR-548aa、hsa-miR-519e、hsa-miR-1270、hsa-miR-513b、hsa-miR-599、hsa-miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa-miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、hsa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-miR-92a-3p (MIRT049721)、hsa-miR-30c-5p (MIRT048009)、hsa-miR-191-5p (MIRT045809)、hsa-let-7f-5p (MIRT051404)、hsa-miR-27b-3p (MIRT046213)、hsa-miR-877-3p (MIRT037116)、hsa-miR-615-3p (MIRT040278)、hsa-miR-1260b (MIRT052680)、hsa-miR-103a-3p (MIRT027027)、hsa-miR-16-5p (MIRT031508)、hsa-miR-1296-5p (MIRT036075)、hsa-miR-197-3p (MIRT048098)、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-mi

R-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRTO40054)、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44257)、hsa-miR-1 (MIRTO23842)、miR-145、hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-548l、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g、hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、hsa-

miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3182、

10

hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRT040734)、hsa-miR-16-5p (MIRT031705)、hsa-miR-18a-3p (MIRT040974)、hsa-miR-155-5p (MIRT020771)、hsa-miR-484 (MIRT042324)、hsa-let-7c-5p (MIRT051776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRT043600)、hsa-miR-92a-3p (MIRT049064)、hsa-miR-615-3p (MIRT039779)、hsa-miR-877-3p (MIRT036964)、hsa-miR-222-3p (MIRT046746)、hsa-miR-423-3p (MIRT042468)、hsa-miR-324-3p (MIRT042887)、hsa-miR-124-3p (MIRT022932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hsa-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-342-5p (MIRT038210)、hsa-miR-378a-5p (MIRT043981)、hsa-miR-615-3p (MIRT040086)、hsa-let-7b-5p (MIRT052211)、hsa-miR-455-3p (MIRT037879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-106b-5p (MIRT044355)、hsa-miR-320a (MIRT044466)、hsa-miR-16-5p (MIRT032018)、hsa-miR-155-5p (MIRT021009)、hsa-miR-4302、hsa-miR-191-5p (MIRT045793)、hsa-miR-1303 (MIRT035890)、hsa-miR-193b-3p (MIRT016316)、hsa-miR-222-3p (MIRT046640)、hsa-miR-532-3p (MIRT037924)、hsa-miR-18a-3p (MIRT040929)、hsa-miR-92a-3p (MIRT049001)、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-miR-1271、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-miR-20

20

30

40

50

b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-432
 5、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-3p
 、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa
 -miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-mi
 R-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32
 、hsa-miR-143、hsa-miR-4296：(YTHDC1の阻害剤)hs
 a-miR-20a-3p(MIRTO38967)、hsa-miR-103a-3p
 (MIRTO27037)、hsa-miR-1(MIRTO23492)、hsa-m
 iR-19b-3p(MIRTO31105)、hsa-miR-100-5p(MIR
 T048400)、hsa-miR-93-5p(MIRTO27989)、hsa-m
 iR-16-5p(MIRTO31379)、hsa-let-7b-5p(MIRTO
 52150)、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-
 15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d
 、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509
 -3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-
 miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-mi
 R-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-m
 iR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-
 448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-50
 9-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2
 115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR
 -548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-mi
 R-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-mi
 R-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-
 3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-44
 9a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、
 hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、
 hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa
 -miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-m
 iR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-1
 81a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、h
 sa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、h
 sa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-m
 iR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR
 -3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-m
 iR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-
 195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-51
 6b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、
 hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-
 miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262
 からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させること
 を含む、請求項229に記載の方法。

【請求項233】

請求項209に記載のプロセスによって作製される単離された間葉系幹細胞の集団。

【請求項234】

請求項211に記載のプロセスによって作製される増大した単離された間葉系幹細胞の
 集団。

【請求項235】

後続のそれを必要とする被験体への移植のための間葉系幹細胞(MSC)集団を単離す
 るためのキットであって、MSCを含む生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗

体と接触させるための系と、その使用に関する指示とを含むキット。

【請求項 2 3 6】

前記 M S C 集団に、m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することによって前記 M S C の集団を増大させるための系と、その使用に関する指示とをさらに含む、請求項 2 3 5 に記載のキット。

【請求項 2 3 7】

前記 M S C 集団に変異を導入するための系が、前記 M S C 集団に Y t h d f 2 を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる 1 種または複数種の試薬を含む、請求項 2 3 6 に記載のキット。

【請求項 2 3 8】

前記 M S C 集団に変異を導入するための系が、m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる M x 1 - C r e 標的化系を含む、請求項 2 3 7 に記載のキット。

【請求項 2 3 9】

前記 M S C 集団に変異を導入するための系が、前記 M S C 集団に s h R N A を組み込むレンチウイルスを送達して m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるための試薬を含む、請求項 2 3 7 に記載のキット。

【請求項 2 4 0】

間葉系幹細胞 (M S C) をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、
(a) M S C の集団を含む生体試料から M S C を、前記生体試料を 1 種または複数種の N - カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、
(b) 単離された前記 M S C を前記被験体に投与するステップと
を含む方法。

【請求項 2 4 1】

前記 M S C 集団を含有する前記生体試料に、m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、前記生体試料を適切な培養培地中で前記試料中の M S C の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップとをさらに含む、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 2】

前記 M S C を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織を含む生体試料から得る、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記変異が、Y t h d f 2 を発現する遺伝子の欠失をもたらすものである、請求項 2 4 1 に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

前記変異が、Y t h d f 2 を発現する遺伝子の発現を低減させる s h R N A の前記 H S C 集団への組み込みをもたらすものである、請求項 2 4 1 に記載の方法。

【請求項 2 4 5】

骨髓の再構成を必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、
(a) 間葉系幹細胞 (M S C) の集団を含む生体試料から M S C を、前記生体試料を 1 種または複数種の N - カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、
(b) 単離された前記 M S C を前記被験体に投与するステップと
を含む方法。

【請求項 2 4 6】

前記 M S C 集団を含有する前記生体試料に、m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、前記試料を適切な培養培地中で、前記試料中の M S C の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップとをさらに含む、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記MSCを、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織を含む生体試料から得る、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 8】

骨髄移植、末梢血移植および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要とする被験体を処置するための方法であって、前記被験体に、請求項 2 0 9 に記載の方法によって得た単離されたMSCの集団を投与するステップを含む方法。

【請求項 2 4 9】

前記試料が、自己供給源または同種異系供給源に由来するものである、請求項 2 4 8 に記載の方法。

10

【請求項 2 5 0】

前記試料が、自己供給源に由来するものである、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【請求項 2 5 1】

末梢血、臍帯血および骨髄からなる群より選択される組織から得たT細胞を改変することによって調製されたキメラ抗原受容体(CAR) T細胞の集団を増大させるための方法であって、CAR-T細胞の数が増大するように前記CAR-T細胞の集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A) mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 2 5 2】

前記m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記CAR-T細胞に前記m⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記CAR-T細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA(sRNA)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 2 5 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 5 3】

前記m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記CAR-T細胞に変異を導入して前記m⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 2 5 2 に記載の方法。

【請求項 2 5 4】

前記変異が、m⁶A mRNA修飾リーダー、m⁶A mRNA修飾ライター、およびm⁶A mRNAイレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 5 3 に記載の方法。

30

【請求項 2 5 5】

前記変異が、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 5 4 に記載の方法。

【請求項 2 5 6】

前記変異が、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、およびelf3からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 5 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 5 7】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 5 6 に記載の方法。

【請求項 2 5 8】

前記変異が、m⁶A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 2 5 4 に記載の方法。

【請求項 2 5 9】

前記変異が、FTOおよびALKBH5からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させる

50

ものである、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 260】

前記変異が、m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 254 に記載の方法。

【請求項 261】

前記変異が、METTL3、METTL14、WTP および KIAA1429 からなる群より選択される m⁶A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 260 に記載の方法。

【請求項 262】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 CAR-T 細胞を、前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる Mx1-Cre 標的化系に曝露させることを含む、請求項 253 に記載の方法。

10

【請求項 263】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 CAR-T 細胞に shRNA が組み込まれる変異を導入して前記 m⁶A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項 253 に記載の方法。

【請求項 264】

前記 shRNA が、前記 CAR-T 細胞をレンチウイルスに曝露させて前記 shRNA を送達することによって導入される、請求項 263 に記載の方法。

20

【請求項 265】

前記 m⁶A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項 251 に記載の方法。

【請求項 266】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNPA2B1、および elf3 からなる群より選択される、請求項 265 に記載の方法。

【請求項 267】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーが、Ythdf2 を含む、請求項 266 に記載の方法。

30

【請求項 268】

前記 m⁶A mRNA 修飾リーダーを下方制御することが、前記 CAR-T 細胞を、以下：(HNRNPC の阻害剤) hsa-let-7e-5p (MIRT051596)、hsa-mir-455-3p (MIRT037890)、hsa-mir-30c-5p (MIRT047904)、hsa-mir-186-5p (MIRT045150)、hsa-mir-744-5p (MIRT037494)、hsa-mir-18a-3p (MIRT040851)、hsa-mir-484 (MIRT042196)、hsa-mir-505-5p (MIRT037959)、hsa-mir-615-3p (MIRT039991)、hsa-mir-342-3p (MIRT043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p

40

50

、hsa-miR-484、hsa-miR-320b、hsa-miR-620、hsa-miR-30b、hsa-miR-548q、hsa-miR-29b-1、hsa-miR-570、hsa-miR-183、hsa-miR-1276、hsa-miR-208a、hsa-miR-186、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-548am、hsa-miR-320d、hsa-miR-3175、hsa-miR-3155、hsa-miR-548aa、hsa-miR-519e、hsa-miR-1270、hsa-miR-513b、hsa-miR-599、hsa-miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa-miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、hsa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-miR-92a-3p (MIRT049721)、hsa-miR-30c-5p (MIRT048009)、hsa-miR-191-5p (MIRT045809)、hsa-let-7f-5p (MIRT051404)、hsa-miR-27b-3p (MIRT046213)、hsa-miR-877-3p (MIRT037116)、hsa-miR-615-3p (MIRT040278)、hsa-miR-1260b (MIRT052680)、hsa-miR-103a-3p (MIRT027027)、hsa-miR-16-5p (MIRT031508)、hsa-miR-1296-5p (MIRT036075)、hsa-miR-197-3p (MIRT048098)、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hs

a-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRTO40054)、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44257)、hsa-miR-1 (MIRTO23842)、miR-145、hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-5481、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g、hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、

hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3

10

182、hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRTO40734)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31705)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40974)、hsa-miR-155-5p (MIRTO20771)、hsa-miR-484 (MIRTO42324)、hsa-let-7c-5p (MIRTO51776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRTO43600)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49064)、hsa-miR-615-3p (MIRTO39779)、hsa-miR-877-3p (MIRTO36964)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46746)、hsa-miR-423-3p (MIRTO42468)、hsa-miR-324-3p (MIRTO42887)、hsa-miR-124-3p (MIRTO22932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hsa-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-342-5p (MIRTO38210)、hsa-miR-378a-5p (MIRTO43981)、hsa-miR-615-3p (MIRTO40086)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52211)、hsa-miR-455-3p (MIRTO37879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44355)、hsa-miR-320a (MIRTO44466)、hsa-miR-16-5p (MIRTO32018)、hsa-miR-155-5p (MIRTO21009)、hsa-miR-4302、hsa-miR-191-5p (MIRTO45793)、hsa-miR-1303 (MIRTO35890)、hsa-miR-193b-3p (MIRTO16316)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46640)、hsa-miR-532-3p (MIRTO37924)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40929)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49001)、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-miR-1271、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-mi

20

30

40

50

R-20b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-4325、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa-miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-miR-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32、hsa-miR-143、hsa-miR-4296：(YTHDC1の阻害剤) hsa-miR-20a-3p (MIRTO38967)、hsa-miR-103a-3p (MIRTO27037)、hsa-miR-1 (MIRTO23492)、hsa-miR-19b-3p (MIRTO31105)、hsa-miR-100-5p (MIRTO48400)、hsa-miR-93-5p (MIRTO27989)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31379)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52150)、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させることを含む、請求項265に記載の方法。

【請求項269】

前記CAR T細胞の増大が、少なくとも2倍である、請求項251に記載の方法。

【請求項270】

前記CAR T細胞の増大が、少なくとも4倍である、請求項269に記載の方法。

【請求項271】

前記CAR T細胞の増大が、少なくとも5倍である、請求項270に記載の方法。

【請求項272】

前記CAR T細胞の増大が、少なくとも8倍である、請求項271に記載の方法。

【請求項 273】

前記 CAR T 細胞の増大が、少なくとも 10 倍である、請求項 272 に記載の方法。

【請求項 274】

キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞集団を *ex vivo* で増大させるための方法であって、CAR T 細胞の数が増大するように前記 CAR T 細胞集団における N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

【請求項 275】

末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た T 細胞を改変することによって調製されたキメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞集団を *ex vivo* で増大させるための方法であって、前記 CAR T 細胞集団が、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、十分な数量まで増大するように前記 CAR T 細胞集団における N⁶ -メチルアデノシン (m⁶ A) mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法。

10

【請求項 276】

前記被験体が、ヒトである、請求項 275 に記載の方法。

【請求項 277】

前記被験体が、がんに罹患している、請求項 275 に記載の方法。

【請求項 278】

前記被験体が、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される血液がん罹患している、請求項 275 に記載の方法。

20

【請求項 279】

前記 m⁶ A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 CAR-T 細胞に前記 m⁶ A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または、前記 CAR-T 細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA (siRNA)、およびこれらの組合せからなる群より選択される前記 m⁶ A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含む、請求項 274 または 275 に記載の方法。

【請求項 280】

前記 m⁶ A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップが、前記 CAR-T 細胞に変異を導入して前記 m⁶ A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む、請求項 279 に記載の方法。

30

【請求項 281】

前記変異が、m⁶ A mRNA 修飾リーダー、m⁶ A mRNA 修飾ライター、および m⁶ A mRNA イレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 280 に記載の方法。

【請求項 282】

前記変異が、m⁶ A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 281 に記載の方法。

【請求項 283】

前記変異が、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNPAB1、および elf3 からなる群より選択される m⁶ A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 282 に記載の方法。

40

【請求項 284】

前記変異が、Ythdf2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 285】

前記変異が、m⁶ A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 280 に記載の方法。

【請求項 286】

50

前記変異が、F T OおよびA L K B H 5からなる群より選択される m^6A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項285に記載の方法。

【請求項287】

前記変異が、 m^6A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項280に記載の方法。

【請求項288】

前記変異が、M E T T L 3、M E T T L 1 4、W T A PおよびK I A A 1 4 2 9からなる群より選択される m^6A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項280に記載の方法。

10

【請求項289】

前記 m^6A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記C A R-T細胞を、前記 m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるM x 1-C r e標的化系に曝露させることを含む、請求項279に記載の方法。

【請求項290】

前記 m^6A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、前記C A R-T細胞にs h R N Aが組み込まれる変異を導入して前記 m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む、請求項279に記載の方法。

【請求項291】

前記s h R N Aが、前記C A R-T細胞をレンチウイルスに曝露させて前記s h R N Aを送達することによって導入される、請求項290に記載の方法。

20

【請求項292】

前記 m^6A mRNA修飾経路をモジュレートするステップが、 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することを含む、請求項275に記載の方法。

【請求項293】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーが、Y t h d f 1、Y t h d f 2、Y t h d f 3、Y t h d c 1、Y t h d c 2、H N R N P C、H N R N P A 2 B 1、およびe l F 3からなる群より選択される、請求項292に記載の方法。

【請求項294】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーが、Y t h d f 2を含む、請求項293に記載の方法。

30

【請求項295】

前記 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することが、前記幹細胞を、以下：(H N R N P Cの阻害剤) h s a-l e t-7 e-5 p (M I R T 0 5 1 5 9 6)、h s a-m i r-4 5 5-3 p (M I R T 0 3 7 8 9 0)、h s a-m i r-3 0 c-5 p (M I R T 0 4 7 9 0 4)、h s a-m i r-1 8 6-5 p (M I R T 0 4 5 1 5 0)、h s a-m i r-7 4 4-5 p (M I R T 0 3 7 4 9 4)、h s a-m i r-1 8 a-3 p (M I R T 0 4 0 8 5 1)、h s a-m i r-4 8 4 (M I R T 0 4 2 1 9 6)、h s a-m i r-5 0 5-5 p (M I R T 0 3 7 9 5 9)、h s a-m i r-6 1 5-3 p (M I R T 0 3 9 9 9 1)、h s a-m i r-3 4 2-3 p (M I R T 0 4 3 6 9 4)、h s a-m i r-3 6 0 7-3 p、h s a-m i r-3 0 d、h s a-m i r-3 9 1 6、h s a-m i r-3 1 6 2-5 p、h s a-m i r-1 2 7 3 d、h s a-m i r-3 1 6 1、h s a-m i r-3 0 a、h s a-m i r-6 2 9、h s a-m i r-2 0 8 b、h s a-m i r-4 8 9、h s a-m i r-3 1 4 8、h s a-m i r-2 1 1 3、h s a-m i r-8 7 7、h s a-m i r-4 5 5-5 p、h s a-m i r-1 8 6、h s a-m i r-5 4 8 o、h s a-m i r-3 1 3 9、h s a-m i r-3 2 0 a、h s a-m i r-4 3 1 1、h s a-m i r-5 5 5、h s a-m i r-3 6 0 5-5 p、h s a-m i r-5 1 5-5 p、h s a-m i r-1 4 4、h s a-m i r-4 9 9-5 p、h s a-m i r-1 3 2 3、h s a-m i r-5 4 8 x、h s a-m i r-2 9 9-5 p、h s a

40

50

-miR-653、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-548p、hsa
 -miR-586、hsa-miR-888、hsa-miR-3647-3p、hsa
 -miR-484、hsa-miR-320b、hsa-miR-620、hsa-mi
 R-30b、hsa-miR-548q、hsa-miR-29b-1、hsa-miR
 -570、hsa-miR-183、hsa-miR-1276、hsa-miR-20
 8a、hsa-miR-186、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-330
 -3p、hsa-miR-548am、hsa-miR-320d、hsa-miR-3
 175、hsa-miR-3155、hsa-miR-548aa、hsa-miR-5
 19e、hsa-miR-1270、hsa-miR-513b、hsa-miR-59
 9、hsa-miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、
 hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa
 -miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-
 miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-mi
 R-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa
 -miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、h
 sa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-
 miR-514、hsa-miR-30e；(HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-m
 ir-92a-3p (MIRTO49721)、hsa-mir-30c-5p (MIR
 T048009)、hsa-mir-191-5p (MIRTO45809)、hsa-
 let-7f-5p (MIRTO51404)、hsa-mir-27b-3p (MIR
 T046213)、hsa-mir-877-3p (MIRTO37116)、hsa-
 mir-615-3p (MIRTO40278)、hsa-mir-1260b (MIR
 T052680)、hsa-mir-103a-3p (MIRTO27027)、hsa
 -mir-16-5p (MIRTO31508)、hsa-mir-1296-5p (M
 IRT036075)、hsa-mir-197-3p (MIRTO48098)、hsa
 -miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、h
 sa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、h
 sa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b
 -3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR
 -3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-
 miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-mi
 R-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-
 491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-m
 iR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-
 127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-m
 iR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa
 -miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa
 -miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-mi
 R-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-mi
 R-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-m
 iR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-
 548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-
 miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-
 497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-5
 24-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7
 f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-
 548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-11
 84、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、
 hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、
 hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-

miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p；(Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657；(Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRTO40054)、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44257)、hsa-miR-1 (MIRTO23842)、miR-145、hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-548l、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g、hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190

、h s a - m i R - 1 8 1 b、h s a - m i R - 4 3 3、h s a - m i R - 9 8、h s a - m i R - 3 6 0 6、h s a - m i R - 5 9 5、h s a - m i R - 5 4 8 a m、h s a - m i R - 1 8 7、h s a - m i R - 5 6 1、h s a - m i R - 1 8 1 a、h s a - m i R - 3 1 5 5、h s a - m i R - 6 5 5、h s a - m i R - 3 0 2 c、h s a - m i R - 1 9 5、h s a - m i R - 2 6 a、h s a - m i R - 5 9 0 - 3 p、h s a - m i R - 3 0 c、h s a - m i R - 5 0 2 - 5 p、h s a - m i R - 4 9 5、h s a - m i R - 1 3 7、h s a - m i R - 1 8 1 c、h s a - m i R - 5 2 0 d - 5 p、h s a - m i R - 3 9 4 2 - 5 p、h s a - m i R - 2 0 2、h s a - m i R - 3 0 2 e、h s a - m i R - 5 1 3 c、h s a - m i R - 8 8 5 - 5 p、h s a - m i R - 5 2 0 a - 5 p、h s a - m i R - 5 8 3、h s a - m i R - 1 2 9 7、h s a - m i R - 7 - 1、h s a - m i R - 5 2 0 d - 3 p、h s a - m i R - 3 1 5 5 b、h s a - m i R - 3 1 8 2、

h s a - m i R - 5 1 9 d、h s a - m i R - 5 5 0 a、h s a - m i R - 7 - 2、h s a - m i R - 1 8 1 d、h s a - m i R - 1 9 0 b、h s a - m i R - 1 9 1 2、h s a - m i R - 1 5 1 - 3 p、h s a - m i R - 3 3 a、h s a - m i R - 5 2 5 - 5 p、h s a - m i R - 2 0 b、h s a - m i R - 5 1 4 b - 5 p、h s a - m i R - 3 0 e、h s a - m i R - 4 2 6 2、h s a - m i R - 6 3 6；(e l f 3 の阻害剤) h s a - m i r - 9 2 b - 3 p (M I R T 0 4 0 7 3 4)、h s a - m i r - 1 6 - 5 p (M I R T 0 3 1 7 0 5)、h s a - m i r - 1 8 a - 3 p (M I R T 0 4 0 9 7 4)、h s a - m i r - 1 5 5 - 5 p (M I R T 0 2 0 7 7 1)、h s a - m i r - 4 8 4 (M I R T 0 4 2 3 2 4)、h s a - l e t - 7 c - 5 p (M I R T 0 5 1 7 7 6)、h s a - m i R - 3 9 1 0、h s a - m i R - 1 4 8 b、h s a - m i R - 1 3 6、h s a - m i R - 1 5 a、h s a - m i R - 4 8 8、h s a - m i R - 5 0 0 a、h s a - m i R - 1 2 9 7、h s a - m i R - 3 1 5 9、h s a - m i R - 3 7 4 c、h s a - m i R - 4 2 4、h s a - m i R - 7 - 1、h s a - m i R - 1 8 6、h s a - m i R - 1 9 5、h s a - m i R - 1 5 b、h s a - m i R - 2 6 b、h s a - m i R - 5 0 5、h s a - m i R - 1 2 0 6、h s a - m i R - 6 5 3、h s a - m i R - 1 2 8 3、h s a - m i R - 7 - 2、h s a - m i R - 1 9 6 a、h s a - m i R - 4 9 7、h s a - m i R - 3 3 a、h s a - m i R - 6 5 5、h s a - m i R - 2 6 a h s a - m i R - 1 6、h s a - m i r - 1 5 1 a - 3 p (M I R T 0 4 3 6 0 0)、h s a - m i r - 9 2 a - 3 p (M I R T 0 4 9 0 6 4)、h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0 3 9 7 7 9)、h s a - m i r - 8 7 7 - 3 p (M I R T 0 3 6 9 6 4)、h s a - m i r - 2 2 2 - 3 p (M I R T 0 4 6 7 4 6)、h s a - m i r - 4 2 3 - 3 p (M I R T 0 4 2 4 6 8)、h s a - m i r - 3 2 4 - 3 p (M I R T 0 4 2 8 8 7)、h s a - m i r - 1 2 4 - 3 p (M I R T 0 2 2 9 3 2)、h s a - m i R - 3 1 4 0 - 3 p、h s a - m i R - 1 2 4、h s a - m i R - 1 9 8、h s a - m i R - 5 2 5 - 5 p、h s a - m i R - 5 0 6、h s a - m i R - 5 2 0 a - 5 p、h s a - m i R - 1 9 6 a * h s a - m i R - 3 1 1 7 - 3 p、h s a - m i r - 3 4 2 - 5 p (M I R T 0 3 8 2 1 0)、h s a - m i r - 3 7 8 a - 5 p (M I R T 0 4 3 9 8 1)、h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0 4 0 0 8 6)、h s a - l e t - 7 b - 5 p (M I R T 0 5 2 2 1 1)、h s a - m i r - 4 5 5 - 3 p (M I R T 0 3 7 8 7 9)、h s a - m i R - 4 2 6 7、h s a - m i R - 5 9 0 - 3 p、h s a - m i r - 1 0 6 b - 5 p (M I R T 0 4 4 3 5 5)、h s a - m i r - 3 2 0 a (M I R T 0 4 4 4 6 6)、h s a - m i r - 1 6 - 5 p (M I R T 0 3 2 0 1 8)、h s a - m i r - 1 5 5 - 5 p (M I R T 0 2 1 0 0 9)、h s a - m i R - 4 3 0 2、h s a - m i r - 1 9 1 - 5 p (M I R T 0 4 5 7 9 3)、h s a - m i r - 1 3 0 3 (M I R T 0 3 5 8 9 0)、h s a - m i r - 1 9 3 b - 3 p (M I R T 0 1 6 3 1 6)、h s a - m i r - 2 2 2 - 3 p (M I R T 0 4 6 6 4 0)、h s a - m i r - 5 3 2 - 3 p (M I R T 0 3 7 9 2 4)、h s a - m i r - 1 8 a - 3 p (M I R T 0 4 0 9 2 9)、h s a - m i r - 9 2 a - 3 p (M I R T 0 4 9 0 0 1)、h s a - m i R - 5

82-3p、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-miR-1271、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-miR-20b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-4325、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa-miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-miR-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32、hsa-miR-143、hsa-miR-4296：(YTHDC1の阻害剤) hsa-miR-20a-3p (MIRTO38967)、hsa-miR-103a-3p (MIRTO27037)、hsa-miR-1 (MIRTO23492)、hsa-miR-19b-3p (MIRTO31105)、hsa-miR-100-5p (MIRTO48400)、hsa-miR-93-5p (MIRTO27989)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31379)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52150)、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262

からなる群より選択される前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させることを含む、請求項292に記載の方法。

【請求項296】

前記CAR T細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織から得たT細胞を改変することによって調製する、請求項274に記載の方法。

【請求項297】

前記CAR T細胞の数の増大が、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍および少なくとも10倍からなる群より選択される倍数での増大である

、請求項 279 に記載の方法。

【請求項 298】

請求項 274 に記載のプロセスによって作製される増大した CAR T 細胞集団。

【請求項 299】

請求項 275 に記載のプロセスによって作製される増大した CAR T 細胞集団。

【請求項 291】

キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞を *ex vivo* で増大させるための方法であって、増大した前記 CAR T 細胞が、それを必要とする哺乳動物に移植されたときにがんおよび／または血液障害を処置する能力を有し、前記方法が、前記 CAR T 細胞に、*m⁶A mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、前記 CAR T 細胞の集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法。

10

【請求項 292】

前記 CAR T 細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される哺乳動物組織由来の T 細胞を改変することによって得る、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 293】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 294】

前記哺乳動物が、がん罹患している、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 295】

前記がんが、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される血液がんを含む、請求項 294 に記載の方法。

20

【請求項 296】

前記変異が、*Ythdf2* を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させるものである、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 297】

前記変異を、前記 CAR T 細胞を *m⁶A mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる *Mx1-Cre* 標的化系に曝露させることによって導入する、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 298】

前記変異が、前記幹細胞に *shRNA* を組み込んで *m⁶A mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるものである、請求項 296 に記載の方法。

30

【請求項 299】

前記 CAR T 細胞の数の増大が、少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 8 倍および少なくとも 10 倍からなる群より選択される倍数での増大である、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 300】

キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞 (HSC) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、前記 CAR T 細胞集団に *m⁶A mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキット。

40

【請求項 301】

前記 CAR T 細胞集団に変異を導入するための系が、前記 CAR T 細胞集団に *Ythdf2* を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる 1 種または複数種の試薬を含む、請求項 300 に記載のキット。

【請求項 302】

前記 CAR T 細胞集団に変異を導入するための系が、*m⁶A mRNA* 修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる *Mx1-Cre* 標的化系を含む、請求項 301 に記載のキット。

【請求項 303】

50

前記CAR-T細胞集団に変異を導入するための系が、前記CAR-T細胞集団にshRNAを組み込むレンチウイルスを送達してm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるための試薬を含む、請求項301に記載のキット。

【請求項304】

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関する指示とを含むキット。

【請求項305】

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、

(a) CAR T細胞集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、

(b) 前記試料を適切な培養培地中で前記試料中のCAR T細胞の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(c) 前記CAR T細胞を前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項306】

前記CAR T細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得たT細胞を改変することによって得る、請求項305に記載の方法。

【請求項307】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらすものである、請求項305に記載の方法。

【請求項308】

前記変異が、Ythdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAの前記CAR T細胞集団への組込みをもたらすものである、請求項305に記載の方法。

【請求項309】

CAR T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、

(a) CAR T細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中のCAR T細胞の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(b) 培養物から前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、

(c) 前記CAR T細胞を前記被験体に投与するステップとを含む方法。

【請求項310】

前記CAR T細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項309に記載の方法。

【請求項311】

前記m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤が、Ythdf2を阻害するものである、請求項309に記載の方法。

【請求項312】

前記被験体が、ヒトである、請求項309に記載の方法。

【請求項313】

がんおよび／または血液障害の処置を必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための方法であって、

(a) CAR T細胞集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、

(b) 前記試料を適切な培養培地中で前記試料中のCAR T細胞の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(c) 前記CAR T細胞を前記被験体に投与するステップとを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1 4】

前記 C A R T 細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得た T 細胞を改変することによって得る、請求項 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1 5】

前記被験体が、がん罹患している、請求項 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1 6】

前記被験体が、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される血液がん罹患している、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 1】

がんおよび／または血液障害の処置を必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための方法であって、

(a) C A R T 細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A m R N A 修飾リーダーの阻害剤の存在下で、前記試料中の C A R T 細胞の数を前記被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、

(b) 培養物から前記 m^6A m R N A 修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、

(c) 前記 C A R T 細胞を前記被験体に投与するステップと

を含む方法。

【請求項 3 7 2】

前記 C A R T 細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得た T 細胞を改変することによって得る、請求項 3 7 1 に記載の方法。

【請求項 3 7 3】

キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞の集団を増大させるための方法であって、前記 C A R T 細胞の集団を、前記 C A R T 細胞集団の少なくとも 2 倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、増大した前記 C A R T 細胞の集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである、方法。

【請求項 3 7 4】

前記 C A R T 細胞集団の増大が、少なくとも 4 倍である、請求項 3 7 3 に記載の方法。

【請求項 3 7 5】

前記 C A R T 細胞集団の増大が、少なくとも 5 倍である、請求項 3 7 4 に記載の方法。

【請求項 3 7 6】

前記 C A R T 細胞集団の増大が、少なくとも 8 倍である、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 7】

前記 C A R T 細胞集団の増大が、少なくとも 10 倍である、請求項 3 7 6 に記載の方法。

【請求項 3 7 8】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 3 7 7 に記載の方法。

【請求項 3 7 9】

前記ヒトが、がんおよび／または血液障害に罹患している、請求項 3 7 8 に記載の方法。

【請求項 3 8 0】

がんおよび／または血液障害に罹患している被験体を処置するための方法であって、前記被験体に、請求項 3 7 3 に記載の方法によって得た C A R T 細胞の集団を投与するステップを含む方法。

【請求項 3 8 1】

キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞の集団を増大させるための方法であって、

(a) 哺乳動物から T 細胞集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記 T 細胞集団をキメラ抗原受容体を用いて改変して C A R T 細胞集団をもた

らすステップと、

(c) 前記試料由来の前記CAR T細胞集団をin vitroで増大させるステップであって、

(i) 前記CAR T細胞集団が少なくとも2倍増大する、ステップとを含む方法。

【請求項382】

前記CAR T細胞集団の増大が、少なくとも4倍である、請求項381に記載の方法。

【請求項383】

前記CAR T細胞集団の増大が、少なくとも5倍である、請求項382に記載の方法。 10

【請求項384】

前記CAR T細胞集団の増大が、少なくとも8倍である、請求項383に記載の方法。

【請求項385】

前記CAR T細胞集団の増大が、少なくとも10倍である、請求項384に記載の方法。

【請求項386】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項381に記載の方法。

【請求項387】

前記ヒトが、がんおよび／または血液障害に罹患している、請求項386に記載の方法。 20

【請求項388】

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る、請求項387に記載の方法。

【請求項389】

がんおよび／または血液障害に罹患している被験体を処置するための方法であって、

(a) 哺乳動物からT細胞集団を含む組織試料を得るステップと、

(b) 前記T細胞集団をキメラ抗原受容体(CAR)を用いて改変してCAR T細胞集団を形成するステップと、 30

(c) 前記試料由来の前記CAR T細胞集団をin vitroで増大させるステップであって、

(i) 前記CAR T細胞集団が少なくとも2倍増大する、ステップと、

(d) 増大した前記CAR T細胞集団を前記被験体に移植するステップとを含む方法。

【請求項390】

前記HSC集団の増大が、少なくとも4倍である、請求項389に記載の方法。

【請求項391】

前記HSC集団の増大が、少なくとも5倍である、請求項390に記載の方法。

【請求項392】

前記HSC集団の増大が、少なくとも8倍である、請求項391に記載の方法。 40

【請求項393】

前記HSC集団の増大が、少なくとも10倍である、請求項392に記載の方法。

【請求項394】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項389に記載の方法。

【請求項395】

前記ヒトが、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される少なくとも1種のがんに罹患している、請求項394に記載の方法。

【請求項396】

前記組織試料を、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得る 50

、請求項 394 に記載の方法。

【請求項 397】

前記試料が、自己供給源または同種異系供給源に由来するものである、請求項 396 に記載の方法。

【請求項 398】

前記試料が、自己供給源に由来するものである、請求項 397 に記載の方法。

【請求項 399】

キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞集団の増大を必要とする哺乳動物において CAR T 細胞集団を増大させるための方法であって、前記哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、前記哺乳動物におけるがんおよび／または血液障害を処置する能力を有する CAR T 細胞を含む、前記 CAR T 細胞集団を少なくとも 2 倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法。

10

【請求項 400】

前記モジュレーターが、前記 CAR T 細胞集団に N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項 399 に記載の方法。

【請求項 401】

前記モジュレーターが、前記 CAR T 細胞集団に Ythdf2 を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる変異を導入するための系を含む、請求項 400 に記載の方法。

20

【請求項 402】

前記モジュレーターが、N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA 修飾リーダーの阻害剤を含む、請求項 399 に記載の方法。

【請求項 403】

前記モジュレーターが、Ythdf2 の阻害剤を含む、請求項 402 に記載の方法。

【請求項 404】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 403 に記載の方法。

【請求項 405】

血液障害に罹患している被験体を処置する方法であって、

30

(a) 末梢血、臍帯血および骨髓からなる群より選択される組織から、幹細胞および T 細胞からなる群より選択される細胞の集団を得るステップと、

(b) 必要に応じて、前記細胞の集団が T 細胞を含む場合に前記 T 細胞をキメラ抗原受容体 (CAR) を用いて改変して CAR T 細胞をもたらすステップと、

(c) 前記細胞における N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) mRNA 修飾経路をモジュレートすることによって前記細胞の集団を増大させて、細胞の数を増大させるステップと、

(d) 増大した前記細胞を前記被験体に移植して前記血液障害を処置するステップとを含む方法。

【請求項 406】

前記血液障害が、白血病を含む、請求項 405 に記載の方法。

40

【請求項 407】

前記細胞の集団が、HSC および MSC からなる群より選択される細胞を含む、請求項 405 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、PCT 出願として出願され、どちらもこれによってそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、2017 年 10 月 9 日出願の米国特許出願第 62/570、

50

076号、ならびに2018年7月9日出願の米国特許出願第62/695,820号に対する優先権の利益を主張するものである。

【0002】

本発明は、細胞集団、特に造血幹細胞集団などの幹細胞集団を増大させるための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

造血幹細胞（HSC）は、自己複製（増大）および全ての型の成熟血液細胞を生じさせる多系列潜在性の両方の性質を有するクローン原性細胞である。HSCは、造血に関与し、増殖および分化を受けて種々の系列の成熟血液細胞を生じさせる一方で、自己複製する能力を依然として維持する。自己複製する能力により、動物の生涯にわたってHSC集団を維持することが可能になり、また、致死的に照射を受けた類遺伝子性宿主の骨髓にHSCを再配置させることも可能になる。

【0004】

初期のHSC発生は、広範囲にわたる自己複製能を有する長期（LT-）HSCから始まり、その後、短期（ST-）HSC（限定された自己複製能力を有する）および増殖性多分化能前駆細胞（MPP）（多分化能潜在性を有するが自己複製能は有さない）に対応する増大状態が続く、階層的配列を示す。MPPはまた、分化のための刺激または準備の段階でもある。MPPは、分化して、リンパ系列の全てを生じさせる共通のリンパ系前駆細胞（CLP）、または骨髓系列の全てを生じさせる共通の骨髓系前駆細胞（CMP）のいずれかになるよう拘束される。このプロセスの間、より原始的な集団からより原始的でない細胞の集団が生じ、より原始的でない細胞の集団からより原始的な細胞の集団を生じさせることはできない。HSCの多分化能、自己複製、および活性化（または一過性増幅）、ならびにMPPからCLPまたはCMPへの系列拘束（lineage commitment）を含めたこれらのプロセスを調節する内因性遺伝プログラムは依然としてほとんど分かっていない。

【0005】

個体の生存期間にわたって血液細胞の一定の生成を持続させるために、骨髓ニッチに位置するHSCは（Zhang, J. et al. Nature 425, 836-841, 2003; Calvi, L. M. et al. Nature 425, 841-846, 2003; Kiel, M. J., et al. Cell 121, 1109-1121, 2005; Arai, F. et al. Cell 118, 149-161, 2004）、造血の即時の要求が満たされる一方で、長期間にわたる幹細胞の維持も保証されるように、静止状態と活性化の平衡を達成しなければならない。成体において、幹細胞の静止した状態と活性化した状態の恒常性は、HSCが自己複製の潜在性を失うことから保護し、同時に、進行中の組織再生を支持するために重要である（Li, L. and Xie, T. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21, 605-631, 2005）。幹細胞の過剰活性化および増大には、幹細胞集団の最終的な枯渇および腫瘍形成の素因の両方のリスクがある。幹細胞活性化に重要ないくつかの因子が同定されているが（Heissig, B. et al. Cell 109, 625-637, 2002）、静止状態と活性化の間の移行を支配する分子事象は十分には理解されていない。

【0006】

HSCは、恒常性およびストレス条件下での生涯造血に関与し、これは、幹細胞の自己複製と分化の絶妙な平衡に依拠する（Li et al. Science, 327: 542-545, 2010; Weissman et al. Cell, 100:157-168, 2000）。したがって、HSC移植は、血液疾患、免疫疾患、および遺伝子疾患、ならびにがんを含めた様々な障害に対する救命治療である（Walsek et al. Annals of the New York Academy of Sciences 1266: 138-150, 2012）。しかし、HSCに基づく処置は、主にHLA適合ドナー骨髓（BM）の欠如によって限定される可能性がある。同種異系移植により、代替の手法がもたらされるが、移植片対宿主病（GVHD）が生涯の難題のままであり、これは、免疫抑制薬の服用には免疫学的回復の遅延、血栓性微小血管症などの多数の副作用があるからである（Sun et al. Stem Cells Translational Medicine, 2: 25-32 (2013); Shlomchik et al. Nature Reviews. Immunology

10

20

30

40

50

y, 7: 340-352, 2007)。h U C B由来のH S Cの移植により、G v H Dのリスクが低下するが、h U C BにおけるH S Cの数がB Mまたは動員された末梢血よりも少ないことにより、その適用が限定される (Walasek et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266: 138-150, 2012)。h U C B H S C増大のために単一分子または経路の標的化が研究されてきた (Huang et al. *Leukemia*, 30: 144-153, 2016; Boitano et al. *Science*, 329: 1345-1348, 2010; Fares et al. *Science*, 345: 1509-1512, 2014; Ansellem et al. *Nature Medicine*, 9: 1423-1427, 2003; Antonchuk et al. *Cell*, 109: 39-45, 2002; Rentas et al. *Nature*, 532: 508-511, 2016; Himburg et al. *Nature Medicine*, 16: 475-482, 2010; North et al. *Nature*, 447: 1007-1011, 2007; Guo et al. *Nature Medicine*, 2018); Varnum-Finney et al. *Nature Medicine*, 6: 1278-1281, 2000; およびChou et al. *Experimental Hematology*, 41: 479-490 e474, 2013)。しかし、幹細胞の分化よりも自己複製を比較的に有利にするために他の手法が探求されている (Zhao et al. *Molecular Cell Biology*, 18: 31-42, 2017)。

【0007】

m⁶Aは、マークの「ライター (writer)」、「イレイサー (eraser)」および「リーダー (reader)」によってモジュレートされるRNAプロセッシング、局在化、翻訳、および最終的な減衰をモジュレートすることによって遺伝子発現の転帰を制御する、広く行きわたっているmRNAの内部修飾である (Roundtree et al. *Cell*, 169: 1187-1200, 2017; Li et al. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15: 127-150, 2014)。最近の研究により、胚形成の間の幹細胞の運命決定および内皮造血転換におけるm⁶A修飾の役割 (Batista et al. *Cell Stem Cell*, 15: 707-719, 2014; Gula et al. *Science*, 347: 1002-1006, 2015; Yoon et al. *Cell*, 2017; Zhang et al. *Nature*, 549: 273-276, 2017; Zhao et al. *Nature*, 542: 475-478, 2017) ならびに白血病発症におけるm⁶A修飾の役割 (Li et al. *Cancer Cell*, 31: 127-141, 2017; Vu et al. *Nature Medicine*, 2017; Barbieri et al. *Nature*, 2017; Weng et al. *Cell Stem Cell*, 22: 191-205 e199, 2018) が解明された。興味深いことに、m⁶Aライター複合体であるMe t t l 3およびMe t t l 1 4の欠損により、異なる型の幹細胞では別個の転帰が導かれる。例えば、Me t t l 3またはMe t t l 1 4 KOにより、H S Cでは分化が促進されるが (Vu et al. *Nature Medicine*, 2017; Weng et al. *Cell Stem Cell*, 22: 191-205 e199, 2018; Barbieri et al. *Nature*, 2017)、一方、マウス胚性幹細胞 (m E S C) および胚神経幹細胞 (N S C) では幹細胞の自己複製および維持が増強される (Batista et al. *Cell Stem Cell*, 15: 707-719, 2014; Yoon et al. *Cell*, 2017)。加えて、幹細胞および白血病におけるm⁶Aの生理機能は、異なる機構を通じて媒介される。幹細胞では、m⁶A修飾により、幹細胞の運命決定因子をコードするmRNAのm⁶A媒介性減衰によって幹細胞の運命決定が制御されるが (Batista et al. *Cell Stem Cell*, 15: 707-719, 2014; Yoon et al. *Cell*, 2017)、一方、急性骨髄性白血病 (A M L) では、m⁶A修飾により癌遺伝子のmRNAが安定化され、かつ／またはそれらの翻訳が増大するので、Me t t l 3およびMe t t l 1 4により白血病誘発が促進される (Vu et al. *Nature Medicine*, 2017; Barbieri et al. *Nature*, 2017; Weng et al. *Cell Stem Cell*, 22: 191-205 e199, 2018)。さらに、以前の研究により、F T OおよびMe t t l 1 4の白血病誘発機能がY T H D Fリーダータンパク質とは無関係であることが報告された (Li et al. *Cancer Cell*, 31: 127-141, 2017; Weng et al. *Cell Stem Cell*, 22: 191-205 e199, 2018)。

【0008】

m⁶A RNA修飾は、マークの「ライター」、「イレイサー」および「リーダー」によってモジュレートされるので (Wang et al. *Nature*, 505 (7481): 117-120, 2014)、このマークおよび他のマークを組み入れる、認識する、および取り除くプロセスには、細胞、発生、および疾患の過程に関して種々の意味がありうる。例えば、研究により、m⁶Aというマークが、マイクロRNA (m i RNA) 生合成の開始を促進するための重要な転写後修飾としての機能を果たし得ることが示されている (Alarcon et al. *Nature*, 519

(7544): 482-485, 2015)。エビデンスから、 m^6A RNA修飾が幹細胞の特定の系列への分化 (Batista, Cell stem Cell, 15 (6): 707-719, 2014; Zhang et al. Nature, 549 (7671): 273-276, 2017)、および遺伝子発現の制御 (Dominissini et al., Nature 485 (7397): 201-206, 2012; Haussmann et al., Nature 540 (7632): 301-304, 2016) におそらく関与することも示される。 m^6A トランスフェラーゼであるMETTL3がマウスナীব多能性を終結させるための制御因子として同定されている (Geula et al. Science, 347 (6225): 1002-1006, 2015)。 m^6A 「ライター」タンパク質であるMETTL3は、マウスT細胞において、T細胞の恒常性および分化を妨害することも示されており (Li et al. Nature, 548 (7667): 338-342, 2017)、また、 m^6A RNAメチル化により、XIST媒介性転写抑制が促進されることが見出されている (Patilet al. Nature, 537 (7620): 369-373, 2016)。 m^6A RNA修飾はまた、紫外線により誘導されるDNA損傷応答を制御することも示されている (Xianget al. Nature, 543 (7646): 573-576, 2017)。ゼブラフィッシュにおけるものなどの母体接合体移行 (MZT) の研究によっても、トランスクリプトーム切り換えおよび動物発生における m^6A mRNAメチル化の役割が示されている (Zhao et al. Nature, 542 (7642): 475-478, 2017)。したがって、累積的なエビデンスにより m^6A の生物学的機能に関する洞察がもたらされているが (Lence et al. Nature, 540 (7632): 242-247, 2016)、成体幹細胞における m^6A の機能はほとんどわかっていない。

【0009】

骨髄 (BM) 内の造血幹細胞 (HSC) は、生涯全体を通して造血恒常性を維持し、また、骨髄破壊後の再生を支持する (Weissman, 2000)。致死的に照射を受けたマウスにおいて、静止状態のHSCは、増殖性HSCよりも優れた働きをし、これは、静止した状態ではHSCがDNA損傷から保護されることに主に起因する (Arai et al., 2004; Fleming et al., 1993; Wilson et al., 2008) (Walter et al., 2015)。しかし、最近の研究から、HSCにおけるDNA損傷蓄積が、HSC静止状態に依存するDNA修復および応答経路の広範な減弱に関連付けられることが示された (Beerman et al., 2014)。実際、大多数のHSCが、静止状態にあるにもかかわらず、5-フルオロウラシル (5FU) などの化学療法薬によるDNA損傷に感受性である (Lerner and Harrison, 1990)。造血系がどのようにして骨髄破壊の結果を克服するかが未解決の問題である。発生中および成体におけるHSCの注目すべき不均一性に関して (Benveniste et al., 2010; Benz et al., 2012; Fleming et al., 1993; Morita et al., 2010; Zhou et al., 2016)、薬物抵抗性、およびバルクのHSCを再生させてストレスによって引き起こされた骨髄破壊を克服する能力という特徴を有する予備HSC (rHSC) 亜集団の存在が提唱された (Haug et al., 2008; Li and Clevers, 2010; Wilson et al., 2008)。しかし、これまで、血液系におけるrHSCの存在を裏付ける機能的エビデンスはもたらされていない。

【0010】

HSCは、それらの維持および再生に関して複雑なBMニッチにおいて保存される (Li and Clevers, 2010; Mendelson and Frenette, 2014; Morrison and Scadden, 2014; Scadden, 2014; Schofield, 1978)。過去10年間、多数の研究により、骨内膜 (骨内部表面) 細胞 (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003)、類洞内皮細胞 (Hooper et al., 2009; Kiel et al., 2005)、Cxcl12が豊富な細網 (CAR) 細胞 (Sugiyama et al., 2006)、ネスチン⁺およびNG2⁺血管周囲細胞 (Kunisaki et al., 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010)、LepR⁺およびPrx-1⁺間葉系幹細胞および前駆細胞 (Ding and Morrison, 2013; Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013)、非髓鞘形成シュワン細胞 (Yamazaki et al., 2011)、ならびに巨核球 (Bruns et al., 2014; Zhao et al., 2014) を含めた、HSC骨髄ニッチ構成成分の複雑さが明らかにされた。しかし、BMニッチの複雑さがHSC不均一性の制御に寄与するかどうか、およびどのように寄与するかは依然としてほとんど分かっていない (Itkin et al., 2016)。さらに、第1のHSCニッチは、海綿骨領域の骨内膜内の紡錘形状N-cadherin⁺ (N-cad⁺) 前骨芽細胞として最初に同定されたが (Calvi et al., 2003; Xie et al., 2009; Zhang et al., 2009)

003)、BM内のN-cad⁺ニッチ細胞の性質および機能は不明なままである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Li, L. および Clevers, H. Science (2010) 327、542～545

【非特許文献2】Mendelson, A. および Frenette, P. S. Nat Med (2014) 20、833～846

【非特許文献3】Morrison, S. J. および Scadden, D. T. Nature (2014) 505、327～334

10

【非特許文献4】Scadden, D. T. Cell (2014) 157、41～50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、幹細胞増殖および分化の分子制御に関する洞察をもたらすためにm⁶Aおよびm⁶A mRNA経路の役割を解明し、理解することが依然として必要とされている。in vivoおよびex vivoの両方で幹細胞の集団を増大させるための方法、ならびにそのような増大した幹細胞集団を用いた処置を、例えば、適切な被験体への移植などによってもたらす方法が依然としてさらに必要とされている。

【課題を解決するための手段】

20

【0013】

本開示の一実施形態では、幹細胞の集団を増大させるための方法であって、幹細胞の集団を末梢血、臍帯血および骨髓からなる群より選択される組織から得る方法が提供される。当該方法は、幹細胞の数が増大するように幹細胞の集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0014】

さらに別の実施形態では、実質的に未分化の幹細胞集団をex vivoで増大させるための方法であって、幹細胞集団の著しい分化を伴わずに未分化の幹細胞の数が増大するように未分化の幹細胞集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む方法が提供される。

30

【0015】

さらに別の実施形態によると、造血幹細胞(HSC)集団をex vivoで増大させるための方法であって、HSC集団を末梢血、臍帯血、および骨髓からなる群より選択される組織から得、前記方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、HSC集団における多系列分化の潜在性を維持しながらHSC集団が十分な数量まで増大するように、HSC集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む、方法が提供される。

【0016】

さらに別の実施形態によると、造血幹細胞(HSC)をex vivoで少なくとも2倍に増大させるための方法であって、増大したHSCが、それを必要とする哺乳動物に移植されたときにHSC系列を再構成する能力を有し、前記方法が、幹細胞に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、HSCの集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法が提供される。

40

【0017】

さらなる実施形態によると、造血幹細胞集団(HSC)集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、HSC集団に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキットが提供される。

【0018】

50

さらに別の実施形態によると、造血幹細胞集団（HSC）集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関する指示とを含むキットが提供される。

【0019】

なおさらなる実施形態では、造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、（a）HSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

10

【0020】

なおさらなる実施形態では、造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、（a）HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

【0021】

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、（a）HSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

20

【0022】

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髓を再構成するための方法であって、（a）HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

30

【0023】

一実施形態では、造血細胞（HSC）の集団を増大させるための方法であって、HSCの集団をHSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、増大したHSCの集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである、方法が提供される。

【0024】

さらなる実施形態では、造血幹細胞（HSC）の集団を増大させるための方法であって、（a）哺乳動物からHSC集団を含む組織試料を得るステップと、（b）試料由来のHSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、（i）HSC集団が少なくとも2倍増大し、（ii）増大したHSC集団が総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有する、ステップとを含む方法が提供される。

40

【0025】

さらなる実施形態では、それを必要とする被験体において造血幹細胞系列を再構成するための方法であって、（a）哺乳動物からHSC集団を含む組織試料を得るステップと、（b）試料由来のHSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、（i）HSC集団が少なくとも2倍増大し、（ii）増大したHSC集団が総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有するステップと、（c）増大したHSC集団をそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む方法が提供される。

【0026】

50

さらに別の実施形態では、そのような増大を必要とする哺乳動物において造血幹細胞集団を増大させるための方法であって、哺乳動物に、 N^6 –メチルアデノシン (m^6A) mRNA 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物において造血系列を再構成する能力を有するHSCを含むHSC集団を少なくとも2倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法が提供される。

【0027】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞 (MSC) 集団を *ex vivo* で増大させるための方法であって、MSC 集団を末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得、前記方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、MSC 集団における多系列分化の潜在性を維持しながら、MSC 集団が十分な数量まで増大するようにMSC 集団における N^6 –メチルアデノシン (m^6A) mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む方法が提供される。

10

【0028】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞 (MSC) を少なくとも2倍、*ex vivo* で増大させるための方法であって、増大したMSCが、それを必要とする哺乳動物に移植されたときにMSC系列を再構成する能力を有し、前記方法が、幹細胞に、 m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、MSCの集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法が提供される。

20

【0029】

さらなる実施形態によると、間葉系幹細胞集団 (MSC) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、MSC 集団に m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキットが提供される。

【0030】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞集団 (MSC) 集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、 m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関する指示とを含むキットが提供される。

【0031】

なおさらなる実施形態では、間葉系幹細胞 (MSC) をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、(a) MSC 集団を含有する試料に、 m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、(b) 試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(c) MSC を被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

30

【0032】

なおさらなる実施形態では、間葉系幹細胞 (MSC) をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、(a) MSC 集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(b) 培養物から m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、(c) MSC を被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

40

【0033】

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法であって、(a) MSC 集団を含有する試料に、 m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、(b) 試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(c) MSC を被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

【0034】

50

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法であって、(a) MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(b) 培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、(c) MSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

【0035】

一実施形態では、間葉細胞(MSC)の集団を増大させるための方法であって、MSCの集団を、MSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、増大したMSCの集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである、方法が提供される。

10

【0036】

さらなる実施形態では、間葉系幹細胞(MSC)の集団を増大させるための方法であって、(a) 哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b) 試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i) MSC集団が少なくとも2倍増大し、(ii) 増大したMSC集団が総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有する、ステップとを含む方法が提供される。

【0037】

さらなる実施形態では、それを必要とする被験体において間葉系幹細胞系列を再構成するための方法であって、(a) 哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b) 試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i) MSC集団が少なくとも2倍増大し、(ii) 増大したMSC集団が総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有する、ステップと、(c) 増大したMSC集団をそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む方法が提供される。

20

【0038】

さらに別の実施形態では、そのような増大を必要とする哺乳動物において間葉系幹細胞集団を増大させるための方法であって、哺乳動物に、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A) mRNA修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物において間葉系系列を再構成する能力を有するHSCを含む、MSC集団を少なくとも2倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法が提供される。

30

【0039】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞(MSC)集団を*ex vivo*で増大させるための方法であって、MSC集団を末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得、前記方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、MSC集団における多系列分化の潜在性を維持しながら、MSC集団が十分な数量まで増大するようにMSC集団における N^6 -メチルアデノシン(m^6A) mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む、方法が提供される。

【0040】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞(MSC)を*ex vivo*で少なくとも2倍増大させるための方法であって、増大したMSCが、それを必要とする哺乳動物に移植されたときにMSC系列を再構成する能力を有し、前記方法が、幹細胞に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、MSCの集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む方法が提供される。

40

【0041】

さらなる実施形態によると、間葉系幹細胞集団(MSC)集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、MSC集団に m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含むキットが提供される。

【0042】

50

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞集団（MSC）集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットであって、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤、およびその使用に関する指示を含むキットが提供される。

【0043】

なおさらなる実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、（a）MSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

10

【0044】

なおさらなる実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法であって、（a）MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

【0045】

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法であって、（a）MSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

20

【0046】

別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法であって、（a）MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む方法が提供される。

30

【0047】

一実施形態では、間葉細胞（MSC）の集団を増大させるための方法であって、MSCの集団を、HSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、増大したMSCの集団が、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである、方法が提供される。

【0048】

さらなる実施形態では、間葉系幹細胞（MSC）の集団を増大させるための方法であって、（a）哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、（b）試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、（i）MSC集団が少なくとも2倍増大する、ステップとを含む方法が提供される。

40

【0049】

さらなる実施形態では、それを必要とする被験体において間葉系幹細胞系列を再構成するための方法であって、（a）哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、（b）試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、（i）MSC集団が少なくとも2倍増大する、ステップと、（c）増大したMSC集団をそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む方法が提供される。

【0050】

さらに別の実施形態では、そのような増大を必要とする哺乳動物において間葉系幹細胞集団を増大させるための方法であって、哺乳動物に、 N^6 -メチルアデノシン（ m^6A ）

50

mRNA修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物における間葉系系列を再構成する能力を有するMSCを含むMSC集団を少なくとも2倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む方法が提供される。

【0051】

さらなる実施形態では、生体試料から間葉系幹細胞（MSC）を単離する方法であって、MSCの集団を有する生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させるステップを含む方法が提供される。

【0052】

さらなる実施形態では、本明細書に記載のプロセスのいずれかによって作製される単離された間葉系幹細胞の集団が提供される。さらに別の実施形態によると、本明細書に記載のプロセスのいずれかによって作製される増大した単離された間葉系幹細胞の集団が提供される。

10

【0053】

さらに別の実施形態によると、後続のそれを必要とする被験体への移植のための間葉系幹細胞（MSC）集団を単離するためのキットが提供される。キットは、MSCを含む生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させるための系と、その使用に関する指示とを含む。

【0054】

さらに別の実施形態によると、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法が提供される。当該方法は、（a）MSCの集団を含む生体試料からMSCを、生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、（b）単離されたMSCを被験体に投与するステップとを含む。

20

【0055】

さらに別の実施形態によると、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法が提供される。当該方法は、（a）MSCの集団を含む生体試料から間葉系幹細胞（MSC）を、生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、（b）単離されたMSCを被験体に投与するステップとを含む。

【0056】

さらに別の実施形態によると、骨髄移植、末梢血移植および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要とする被験体を処置するための方法が提供される。当該方法は、被験体に、本明細書に記載の方法のいずれかによって得た単離されたMSCの集団を投与するステップを含む。

30

【0057】

さらに別の実施形態では、末梢血、臍帯血および骨髄からなる群より選択される組織から得たT細胞を改変することによって調製されたキメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団を増大させるための方法が提供される。当該方法は、CAR-T細胞の数が増大するようにCAR-T細胞の集団におけるN⁶-メチルアデノシン（m⁶A）mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0058】

さらなる実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞集団をex vivoで増大させるための方法が提供される。当該方法は、CAR-T細胞の数が増大するようにCAR-T細胞集団におけるN⁶-メチルアデノシン（m⁶A）mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

40

【0059】

さらに別の実施形態によると、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得たT細胞を改変することによって調製されたキメラ抗原受容体（CAR）T細胞集団をex vivoで増大させるための方法が提供される。当該方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、CAR-T細胞集団が十分な数量まで増大するように、CAR-T細胞集団におけるN⁶-メチルアデノシン（m⁶A）mRNA修

50

飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0060】

さらに別の実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞を *ex vivo* で増大させるための方法であって、増大したCAR T細胞が、それを必要とする哺乳動物に移植されたときにがんおよび／または血液障害を処置する能力を有する、方法が提供される。当該方法は、CAR T細胞に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、CAR T細胞の集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む。

【0061】

さらなる実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞（HSC）集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットが提供される。キットは、CAR T細胞集団に m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含む。

【0062】

なおさらなる実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法が提供される。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。

【0063】

別の実施形態では、CAR T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法が提供される。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。

【0064】

さらなる実施形態では、それを必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための方法が提供される。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。

【0065】

なおさらなる実施形態では、それを必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための方法が提供される。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。

【0066】

一実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団を増大させるための方法が提供される。当該方法は、CAR T細胞の集団を、CAR T細胞集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、ここで、増大したCAR T細胞の集団は、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである。

【0067】

さらに別の実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団を増大させるため

の方法が提供される。当該方法は、(a) 哺乳動物からT細胞集団を含む組織試料を得るステップと、(b) T細胞集団をキメラ抗原受容体を用いて改変してCAR T細胞集団をもたらすステップと、(c) 試料由来のCAR T細胞集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i) CAR T細胞集団が少なくとも2倍増大する、ステップとを含む。

【0068】

さらなる実施形態では、がんおよび／または血液障害に罹患している被験体を処置するための方法が提供される。当該方法は、(a) 哺乳動物からT細胞集団を含む組織試料を得るステップと、(b) T細胞集団をキメラ抗原受容体(CAR)を用いて改変してCAR T細胞集団を形成するステップと、(c) 試料由来のCAR T細胞集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i) CAR T細胞集団が少なくとも2倍増大する、ステップと、(d) 増大したCAR T細胞集団を被験体に移植するステップとを含む。

10

【0069】

なおさらなる実施形態では、そのような増大を必要とする哺乳動物においてキメラ抗原受容体(CAR) T細胞集団を増大させるための方法が提供される。当該方法は、哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A) mRNA修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物におけるがんおよび／または血液障害を処置する能力を有するCAR T細胞を含む、CAR T細胞集団を少なくとも2倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む。

20

【0070】

さらに別の実施形態では、血液障害に罹患している被験体を処置する方法が提供される。当該方法は、(a) 末梢血、臍帯血および骨髓からなる群より選択される組織から、幹細胞およびT細胞からなる群より選択される細胞の集団を得るステップと、(b) 必要に応じて、細胞の集団がT細胞を含む場合にT細胞をキメラ抗原受容体(CAR)を用いて改変してCAR T細胞をもたらすステップと、(c) 細胞におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A) mRNA修飾経路をモジュレートすることによって細胞の集団を増大させて、細胞の数を増大させるステップと、(d) 増大した細胞を被験体に移植して血液障害を処置するステップとを含む。

【0071】

本発明のこれらおよび他の態様を以下の詳細な説明および実施例においてさらに開示する。

30

【0072】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。これらの図面の1つまたは複数本明細書に提示されている具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することにより、本発明をよりよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1-1】図1A~1Hは、マウスにおいてYthdf2 KOにより表現型HSCの増加が導かれることを示す図である。図1Aは、Mx1-cre; Ythdf2^{f/f}コンディショナルKO(cKO)マウスのHSPCにおけるYthdf2の欠失を示す概略図である。図1Bは、マウスHSPCにおけるノックアウトYthdf2の細胞内フロー検証を示すウエスタンブロット(左)およびヒストグラム(右)を示す。図1Cは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)由来のBMにおけるHSPCの代表的なフローサイトメトリ分析プロットである。図1Dおよび1Eは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)由来のBMにおける総有核細胞(TNC)の頻度(1D)およびHSPCの絶対細胞数(1E)を示す棒グラフである。図1Fは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)由来のBM TNCの絶対数を示す棒グラフである。図1Gおよび1Hは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス

40

50

(各群 $n = 5$) の BM における拘束前駆細胞の絶対数 (1 G) および系列細胞の絶対数 (1 H) を示す棒グラフである。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

【図 1-2】図 1 A~1 H は、マウスにおいて *Ythdf2* KO により表現型 HSC の増加が導かれることを示す図である。図 1 A は、*Mxl-crc; Ythdf2^{f/f}* コンディショナル KO (cKO) マウスの HSPC における *Ythdf2* の欠失を示す概略図である。図 1 B は、マウス HSPC におけるノックアウト *Ythdf2* の細胞内フロー検証を示すウエスタンブロット (左) およびヒストグラム (右) を示す。図 1 C は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM における HSPC の代表的なフローサイトメトリ分析プロットである。図 1 D および 1 E は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM における総有核細胞 (TNC) の頻度 (1 D) および HSPC の絶対細胞数 (1 E) を示す棒グラフである。図 1 F は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM TNC の絶対数を示す棒グラフである。図 1 G および 1 H は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) の BM における拘束前駆細胞の絶対数 (1 G) および系列細胞の絶対数 (1 H) を示す棒グラフである。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

10

【図 1-3】図 1 A~1 H は、マウスにおいて *Ythdf2* KO により表現型 HSC の増加が導かれることを示す図である。図 1 A は、*Mxl-crc; Ythdf2^{f/f}* コンディショナル KO (cKO) マウスの HSPC における *Ythdf2* の欠失を示す概略図である。図 1 B は、マウス HSPC におけるノックアウト *Ythdf2* の細胞内フロー検証を示すウエスタンブロット (左) およびヒストグラム (右) を示す。図 1 C は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM における HSPC の代表的なフローサイトメトリ分析プロットである。図 1 D および 1 E は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM における総有核細胞 (TNC) の頻度 (1 D) および HSPC の絶対細胞数 (1 E) を示す棒グラフである。図 1 F は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) 由来の BM TNC の絶対数を示す棒グラフである。図 1 G および 1 H は、wt マウスおよび *Ythdf2* KO マウス (各群 $n = 5$) の BM における拘束前駆細胞の絶対数 (1 G) および系列細胞の絶対数 (1 H) を示す棒グラフである。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

20

30

【0074】

【図 2-1】図 2 A~2 J は、マウスにおいて、*Ythdf2* KO により機能的 HSC の増大がもたらされることを示す図である。図 2 A は、機能的 HSC の頻度を決定するための限界希釈移植アッセイ (LDA) の実験スキームを示す。図 2 B は、移植の 16 週間後に ELDA (極度限界希釈分析 (Extreme Limiting Dilution Analysis)) によって CRU 頻度を決定するための一次 LDA (群当たり $n = 10$) を示すグラフである。図 2 C は、照射を受けたレシピエント (各群 $n = 10$) に全骨髄 (WBM) 細胞 200 K 個をレスキュー細胞 200 K 個と共に移植することによる競合的再構成アッセイを示すグラフである。図 2 D および 2 E は、(2 C) と同様の移植レシピエントマウス (各群 $n = 10$) 由来の BM におけるドナー由来の HSPC の TNC の頻度 (2 D) および絶対細胞数 (2 E) を示す棒グラフである。図 2 F および 2 G は、BM 200 K 個の一次移植レシピエントマウス (各群 $n = 9 \sim 10$) 由来の BM におけるドナー由来の (CD45, 2⁺) 拘束前駆細胞 (2 F) および系列細胞 (2 G) の絶対細胞数を示す棒グラフである。図 2 H は、二次移植の 16 週間後に ELDA によって長期間 CRU 頻度を決定するための二次 LDA のプロットを示す ($n = 10$)。図 2 I および 2 J は、それぞれ、移植の 4 週間後の総生着ドナー細胞についての末梢血分析を用いた移植アッセイによる機能的マウス造血幹細胞 (HSC) の定量化を示す棒グラフ (2 I)、および移植の 4 週間後に B 系列細胞、T 系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージを用いた移植アッセイによる機能的マウス HSC の定量化を示す棒グラフ (2 J) である。

40

50

データは平均±s. e. m. として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

【図2-2】図2A~2Jは、マウスにおいて、Ythdf2 KOにより機能的HSCの増大がもたらされることを示す図である。図2Aは、機能的HSCの頻度を決定するための限界希釈移植アッセイ(LDA)の実験スキームを示す。図2Bは、移植の16週間後にELDA(極度限界希釈分析(Extreme Limiting Dilution Analysis))によってCRU頻度を決定するための一次LDA(群当たりn=10)を示すグラフである。図2Cは、照射を受けたレシピエント(各群n=10)に全骨髄(WBM)細胞200K個をレスキュー細胞200K個と共に移植することによる競合的再構成アッセイを示すグラフである。図2Dおよび2Eは、(2C)と同様の移植レシピエントマウス(各群n=10)由来のBMにおけるドナー由来のHSPCのTNCの頻度(2D)および絶対細胞数(2E)を示す棒グラフである。図2Fおよび2Gは、BM 200K個の一次移植レシピエントマウス(各群n=9~10)由来のBMにおけるドナー由来の(CD45.2⁺)拘束前駆細胞(2F)および系列細胞(2G)の絶対細胞数を示す棒グラフである。図2Hは、二次移植の16週間後にELDAによって長期間CRU頻度を決定するための二次LDAのプロットを示す(n=10)。図2Iおよび2Jは、それぞれ、移植の4週間後の総生着ドナー細胞についての末梢血分析を用いた移植アッセイによる機能的マウス造血幹細胞(HSC)の定量化を示す棒グラフ(2I)、および移植の4週間後にB系列細胞、T系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージを用いた移植アッセイによる機能的マウスHSCの定量化を示す棒グラフ(2J)である。データは平均±s. e. m. として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

10

20

【0075】

【図3-1】図3A~3Iは、Ythdf2がm⁶Aリーダーとして機能し、mRNA分解を媒介することによってHSC遺伝子発現を制御することを示す図である。図3Aは、irCLIP-seqワークフローの概略図である。図3Bは、全てのirCLIPピークが3回の反復実験全てで見いだされた、MEMEによって同定されたYthdf2結合モチーフを示す概略図である。図3Cは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおけるYthdf2結合ピークの画分を示す円グラフである。図3Dは、3回のYthdf2 irCLIP-seq反復実験の交差遺伝子(intersect gene)由来のYthdf2標的からのGO富化分析を示すチャートである。図3Eは、m⁶AピークおよびYthdf2 irCLIPピークを有するTallの代表的なトラックを示し、m⁶A免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Ythdf2 irCLIPリードが黄色で強調表示されている。図3Fは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の選別されたLSK細胞の総mRNAのqPCR分析を示すチャートである。全てのCt値をまずActb対照(m⁶Aタグを有さない)に対して正規化した。次いで、比(wtに対するYthdf2 KO)を算出した(n=3)。図3Gは、wt(n=65)およびYthdf2 KO(n=54)HSPCのTALL(緑色)についての染色強度の代表的な画像(左)および棒グラフによる定量化(右)を示す。図3Hは、wt HSPCおよびYthdf2 KO HSPCにおけるTall mRNAの蛍光in situハイブリダイゼーション(赤色)およびDcp1a(P-bodyマーカー)(赤紫色)、Ythdf2(緑色)の蛍光免疫染色を示す画像を示し、矢マークは、共局在染色を示す。スケールバー、5 μm。図3Iは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の選別されたLSK細胞におけるTall mRNAおよびDCP1a共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各LSK細胞における総Tall mRNAレベルに対するDCP1aと共局在したTall mRNAの平均頻度を示す(n=9~17)。データは平均±s. e. m. として示されている。対応のないt検定。

30

40

【図3-2】図3A~3Iは、Ythdf2がm⁶Aリーダーとして機能し、mRNA分解を媒介することによってHSC遺伝子発現を制御することを示す図である。図3Aは、irCLIP-seqワークフローの概略図である。図3Bは、全てのirCLIPピークが3回の反復実験全てで見いだされた、MEMEによって同定されたYthdf2結合モチーフを示す概略図である。図3Cは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおけるYthdf2結合ピークの画分を示す円グラフである。図3Dは、3回のYthdf2 irCLIP-seq反復実験の交差遺伝子(intersect gene)由来のYthdf2標的からのGO富化分析を示すチャートである。図3Eは、m⁶AピークおよびYthdf2 irCLIPピークを有するTallの代表的なトラックを示し、m⁶A免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Ythdf2 irCLIPリードが黄色で強調表示されている。図3Fは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の選別されたLSK細胞の総mRNAのqPCR分析を示すチャートである。全てのCt値をまずActb対照(m⁶Aタグを有さない)に対して正規化した。次いで、比(wtに対するYthdf2 KO)を算出した(n=3)。図3Gは、wt(n=65)およびYthdf2 KO(n=54)HSPCのTALL(緑色)についての染色強度の代表的な画像(左)および棒グラフによる定量化(右)を示す。図3Hは、wt HSPCおよびYthdf2 KO HSPCにおけるTall mRNAの蛍光in situハイブリダイゼーション(赤色)およびDcp1a(P-bodyマーカー)(赤紫色)、Ythdf2(緑色)の蛍光免疫染色を示す画像を示し、矢マークは、共局在染色を示す。スケールバー、5 μm。図3Iは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の選別されたLSK細胞におけるTall mRNAおよびDCP1a共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各LSK細胞における総Tall mRNAレベルに対するDCP1aと共局在したTall mRNAの平均頻度を示す(n=9~17)。データは平均±s. e. m. として示されている。対応のないt検定。

50

クが3回の反復実験全てで見いだされた、MEMEによって同定されたY t h d f 2 結合モチーフを示す概略図である。図3 Cは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおけるY t h d f 2 結合ピークの画分を示す円グラフである。図3 Dは、3回のY t h d f 2 i r C L I P - s e q 反復実験の交差遺伝子 (intersect gene) 由来のY t h d f 2 標的からのGO富化分析を示すチャートである。図3 Eは、 m^6 AピークおよびY t h d f 2 i r C L I Pピークを有するT a l 1の代表的なトラックを示し、 m^6 A免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Y t h d f 2 i r C L I Pリードが黄色で強調表示されている。図3 Fは、w t マウスおよびY t h d f 2 K O マウス由来の選別されたL S K細胞の総mRNAのq P C R分析を示すチャートである。全てのC t 値をまずA c t b 対照 (m^6 A タグを有さない) に対して正規化した。次いで、比 (w t に対するY t h d f 2 K O) を算出した ($n=3$)。図3 Gは、w t ($n=65$) およびY t h d f 2 K O ($n=54$) H S P C のT A L 1 (緑色) についての染色強度の代表的な画像 (左) および棒グラフによる定量化 (右) を示す。図3 Hは、w t H S P C およびY t h d f 2 K O H S P C におけるT a l 1 mRNAの蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (赤色) およびD c p 1 a (P - b o d y マーカー) (赤紫色)、Y t h d f 2 (緑色) の蛍光免疫染色を示す画像を示し、矢マークは、共局在染色を示す。スケールバー、 $5\mu m$ 。図3 Iは、w t マウスおよびY t h d f 2 K O マウス由来の選別されたL S K細胞におけるT a l 1 mRNAおよびD C P 1 a 共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各L S K細胞における総T a l 1 mRNAレベルに対するD C P 1 a と共局在したT a l 1 mRNAの平均頻度を示す ($n=9\sim 17$)。データは平均 $\pm$ s . e . m . として示されている。対応のないt 検定。

【図3-3】図3 A~3 Iは、Y t h d f 2 が m^6 A リーダーとして機能し、mRNA分解を媒介することによってH S C 遺伝子発現を制御することを示す図である。図3 Aは、i r C L I P - s e q ワークフローの概略図である。図3 Bは、全てのi r C L I Pピークが3回の反復実験全てで見いだされた、MEMEによって同定されたY t h d f 2 結合モチーフを示す概略図である。図3 Cは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおけるY t h d f 2 結合ピークの画分を示す円グラフである。図3 Dは、3回のY t h d f 2 i r C L I P - s e q 反復実験の交差遺伝子 (intersect gene) 由来のY t h d f 2 標的からのGO富化分析を示すチャートである。図3 Eは、 m^6 AピークおよびY t h d f 2 i r C L I Pピークを有するT a l 1の代表的なトラックを示し、 m^6 A免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Y t h d f 2 i r C L I Pリードが黄色で強調表示されている。図3 Fは、w t マウスおよびY t h d f 2 K O マウス由来の選別されたL S K細胞の総mRNAのq P C R分析を示すチャートである。全てのC t 値をまずA c t b 対照 (m^6 A タグを有さない) に対して正規化した。次いで、比 (w t に対するY t h d f 2 K O) を算出した ($n=3$)。図3 Gは、w t ($n=65$) およびY t h d f 2 K O ($n=54$) H S P C のT A L 1 (緑色) についての染色強度の代表的な画像 (左) および棒グラフによる定量化 (右) を示す。図3 Hは、w t H S P C およびY t h d f 2 K O H S P C におけるT a l 1 mRNAの蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (赤色) およびD c p 1 a (P - b o d y マーカー) (赤紫色)、Y t h d f 2 (緑色) の蛍光免疫染色を示す画像を示し、矢マークは、共局在染色を示す。スケールバー、 $5\mu m$ 。図3 Iは、w t マウスおよびY t h d f 2 K O マウス由来の選別されたL S K細胞におけるT a l 1 mRNAおよびD C P 1 a 共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各L S K細胞における総T a l 1 mRNAレベルに対するD C P 1 a と共局在したT a l 1 mRNAの平均頻度を示す ($n=9\sim 17$)。データは平均 $\pm$ s . e . m . として示されている。対応のないt 検定。

【図3-4】図3 A~3 Iは、Y t h d f 2 が m^6 A リーダーとして機能し、mRNA分解を媒介することによってH S C 遺伝子発現を制御することを示す図である。図3 Aは、i r C L I P - s e q ワークフローの概略図である。図3 Bは、全てのi r C L I Pピークが3回の反復実験全てで見いだされた、MEMEによって同定されたY t h d f 2 結合モチーフを示す概略図である。図3 Cは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおけるY

t h d f 2 結合ピークの画分を示す円グラフである。図 3 D は、3 回の Y t h d f 2 i r C L I P - s e q 反復実験の交差遺伝子 (intersect gene) 由来の Y t h d f 2 標的からの G O 富化分析を示すチャートである。図 3 E は、 $m^6 A$ ピークおよび Y t h d f 2 i r C L I P ピークを有する T a l 1 の代表的なトラックを示し、 $m^6 A$ 免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Y t h d f 2 i r C L I P リードが黄色で強調表示されている。図 3 F は、w t マウスおよび Y t h d f 2 K O マウス由来の選別された L S K 細胞の総 m R N A の q P C R 分析を示すチャートである。全ての C t 値をまず A c t b 対照 ($m^6 A$ タグを有さない) に対して正規化した。次いで、比 (w t に対する Y t h d f 2 K O) を算出した ($n = 3$)。図 3 G は、w t ($n = 65$) および Y t h d f 2 K O ($n = 54$) H S P C の T A L 1 (緑色) についての染色強度の代表的な画像 (左) および棒グラフによる定量化 (右) を示す。図 3 H は、w t H S P C および Y t h d f 2 K O H S P C における T a l 1 m R N A の蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (赤色) および D c p 1 a (P - b o d y マーカー) (赤紫色)、Y t h d f 2 (緑色) の蛍光免疫染色を示す画像を示し、矢マークは、共局在染色を示す。スケールバー、 $5 \mu m$ 。図 3 I は、w t マウスおよび Y t h d f 2 K O マウス由来の選別された L S K 細胞における T a l 1 m R N A および D C P 1 a 共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各 L S K 細胞における総 T a l 1 m R N A レベルに対する D C P 1 a と共局在した T a l 1 m R N A の平均頻度を示す ($n = 9 \sim 17$)。データは平均 $\pm s. e. m.$ として示されている。対応のない t 検定。

10

【0076】

20

【図 4 - 1】図 4 A ~ 4 I は、 $m^6 A$ - s e q および R N A - s e q 分析によるヒト臍帯血 H S C における Y T H D F 2 の役割を示す図である。図 4 A は、T S S (左) および終止コドン (右) 周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルを示し、 $m^6 A$ I P および対照 (インプット) 断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図 4 B は、5 つの重複していない転写物セグメントのそれぞれにおける $m^6 A$ ピークの画分を示す円グラフを示す。図 4 C は、マウスおよび h U C B H S P C において共有される、独特な $m^6 A$ タグを有する遺伝子を示すベン図を示す。図 4 D は、マウスおよび h U C B H S P C の両方で共有される、 $m^6 A$ タグを有する転写物の G O 富化分析のチャートを示す。図 4 E は、 $m^6 A$ ピークを有する H O X B 4 の代表的なトラックを示し、カラーコードは図 4 A と同じである。図 4 F は、R N A - s e q のための h U C B C D 3 4 ⁺ H S P C におけるレンチウイルス媒介性 Y T H D F 2 K D の概略図を示す。図 4 G は、対照および Y T H D F 2 K D h U C B C D 3 4 ⁺ 細胞を用いた、 $m^6 A$ でマークされた遺伝子 (紫色の線) および $m^6 A$ でマークされていない遺伝子 (黒色の線) についての $\log_2$ (倍率変化) での累積的分布のプロットである。図 4 H は、R N A - s e q 分析からの代表的なカバレッジプロットを示し、Y T H D F 2 K D において、対照 h U C B C D 3 4 ⁺ 細胞と比較して、 $m^6 A$ タグを有する遺伝子 H O X B 4 のリードは増加するが $m^6 A$ タグを有さない遺伝子 A C T B のリードは増加しないことが示されている。図 4 I は、対照および Y T H D F 2 K D h U C B C D 3 4 ⁺ 細胞における $m^6 A$ で標識されていない A C T B (対照として) および幹細胞の自己複製に関連する $m^6 A$ でマークされた転写因子の相対的な m R N A 発現レベルを示す棒グラフである。R N A - s e q 分析からの R P K M を対照に対して正規化した。調整した P 値を示した。n. s. 、有意でない。

30

40

【図 4 - 2】図 4 A ~ 4 I は、 $m^6 A$ - s e q および R N A - s e q 分析によるヒト臍帯血 H S C における Y T H D F 2 の役割を示す図である。図 4 A は、T S S (左) および終止コドン (右) 周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルを示し、 $m^6 A$ I P および対照 (インプット) 断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図 4 B は、5 つの重複していない転写物セグメントのそれぞれにおける $m^6 A$ ピークの画分を示す円グラフを示す。図 4 C は、マウスおよび h U C B H S P C において共有される、独特な $m^6 A$ タグを有する遺伝子を示すベン図を示す。図 4 D は、マウスおよび h U C B H S P C の両方で共有される、 $m^6 A$ タグを有する転写物の G O

50

富化分析のチャートを示す。図4 Eは、 m^6A ピークを有するHOXB4の代表的なトラックを示し、カラーコードは図4 Aと同じである。図4 Fは、RNA-seqのためのhUCB-CD34⁺HSPCにおけるレンチウイルス媒介性YTHDF2 KDの概略図を示す。図4 Gは、対照およびYTHDF2 KD hUCB-CD34⁺細胞を用いた、 m^6A でマークされた遺伝子（紫色の線）および m^6A でマークされていない遺伝子（黒色の線）についての $\log_2$ （倍率変化）での累積的分布のプロットである。図4 Hは、RNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロットを示し、YTHDF2 KDにおいて、対照hUCB-CD34⁺細胞と比較して、 m^6A タグを有する遺伝子HOXB4のリードは増加するが m^6A タグを有さない遺伝子ACTBのリードは増加しないことが示されている。図4 Iは、対照およびYTHDF2 KD hUCB-CD34⁺細胞における m^6A で標識されていないACTB（対照として）および幹細胞の自己複製に関連する m^6A でマークされた転写因子の相対的なmRNA発現レベルを示す棒グラフである。RNA-seq分析からのRPKMを対照に対して正規化した。調整したP値を示した。n.s.、有意でない。

【図4-3】図4 A~4 Iは、 m^6A -seqおよびRNA-seq分析によるヒト臍帯血HSCにおけるYTHDF2の役割を示す図である。図4 Aは、TSS（左）および終止コドン（右）周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルを示し、 m^6A IPおよび対照（インプット）断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図4 Bは、5つの重複していない転写物セグメントのそれぞれにおける m^6A ピークの画分を示す円グラフを示す。図4 Cは、マウスおよびhUCB-HSPCにおいて共有される、独特な m^6A タグを有する遺伝子を示すベン図を示す。図4 Dは、マウスおよびhUCB-HSPCの両方で共有される、 m^6A タグを有する転写物のGO富化分析のチャートを示す。図4 Eは、 m^6A ピークを有するHOXB4の代表的なトラックを示し、カラーコードは図4 Aと同じである。図4 Fは、RNA-seqのためのhUCB-CD34⁺HSPCにおけるレンチウイルス媒介性YTHDF2 KDの概略図を示す。図4 Gは、対照およびYTHDF2 KD hUCB-CD34⁺細胞を用いた、 m^6A でマークされた遺伝子（紫色の線）および m^6A でマークされていない遺伝子（黒色の線）についての $\log_2$ （倍率変化）での累積的分布のプロットである。図4 Hは、RNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロットを示し、YTHDF2 KDにおいて、対照hUCB-CD34⁺細胞と比較して、 m^6A タグを有する遺伝子HOXB4のリードは増加するが m^6A タグを有さない遺伝子ACTBのリードは増加しないことが示されている。図4 Iは、対照およびYTHDF2 KD hUCB-CD34⁺細胞における m^6A で標識されていないACTB（対照として）および幹細胞の自己複製に関連する m^6A でマークされた転写因子の相対的なmRNA発現レベルを示す棒グラフである。RNA-seq分析からのRPKMを対照に対して正規化した。調整したP値を示した。n.s.、有意でない。

【0077】

【図5-1】図5 A~5 Fは、YTHDF2 KDによりex vivoにおけるヒト臍帯血HSCの増大が容易になることを示す図である。図5 A~5 Bは、7日間培養した後の、YTHDF2 KDの示されている細胞の対照細胞に対する頻度（5 A）および絶対数（5 B）の倍率変化を示す棒グラフである。図5 Cは、形質導入されたCD34⁺CD38⁻hUCB細胞からのCFUアウトプットを示す棒グラフおよびCFU-顆粒球赤血球単球巨核球（GEMM）の画像（スケールバー、200 μ m）を示す。図5 Dは、7日間培養した対照hUCB細胞またはYTHDF2 KD hUCB細胞に由来する前期赤芽球系前駆細胞（BFU-E）（左）およびコロニー形成単位-顆粒球/マクロファージ（CFU-GM）（右）の画像を含む（スケールバー、200 μ m）。独立した臍帯血試料を使用し、パネルについて2回繰り返した。図5 Eは、形質導入されたCD34⁺hUCB細胞中のCD34⁺CD38⁻細胞の7日間培養物のアネキシンV染色によるアポトーシス分析を示す棒グラフである（n=3の独立したCB試料）。図5 Fは、示されているヒト臍帯血HSC（n=3の独立したヒト試料）におけるTthdf2ノックダウン（

KD)の対照に対する倍率変化を示す棒グラフである。レンチウイルスを使用して対照 *shRNA* またはヒト *Ythdf2 shRNA* を選別された $CD34^+CD38^-$ 臍帯血 (blood cord) HSC に送達した。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない *t* 検定。n. s.、有意でない。

【図5-2】図5A~5Fは、*YTHDF2* KDにより *ex vivo* におけるヒト臍帯血 HSC の増大が容易になることを示す図である。図5A~5Bは、7日間培養した後の、*YTHDF2* KDの示されている細胞の対照細胞に対する頻度 (5A) および絶対数 (5B) の倍率変化を示す棒グラフである。図5Cは、形質導入された $CD34^+CD38^-$ hUCB細胞からのCFUアウトプットを示す棒グラフおよびCFU-顆粒球赤血球単球巨核球 (GEMM) の画像 (スケールバー、200 μ m) を示す。図5Dは、7日間培養した対照 hUCB細胞または *YTHDF2* KD hUCB細胞に由来する前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) (左) およびコロニー形成単位-顆粒球/マクロファージ (CFU-GM) (右) の画像を含む (スケールバー、200 μ m)。独立した臍帯血試料を使用し、パネルについて2回繰り返した。図5Eは、形質導入された $CD34^+$ hUCB細胞中の $CD34^+CD38^-$ 細胞の7日間培養物のアネキシンV染色によるアポトーシス分析を示す棒グラフである (n=3の独立したCB試料)。図5Fは、示されているヒト臍帯血 HSC (n=3の独立したヒト試料) における *Tthdf2* ノックダウン (KD) の対照に対する倍率変化を示す棒グラフである。レンチウイルスを使用して対照 *shRNA* またはヒト *Ythdf2 shRNA* を選別された $CD34^+CD38^-$ 臍帯血 (blood cord) HSC に送達した。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない *t* 検定。n. s.、有意でない。

【図5-3】図5A~5Fは、*YTHDF2* KDにより *ex vivo* におけるヒト臍帯血 HSC の増大が容易になることを示す図である。図5A~5Bは、7日間培養した後の、*YTHDF2* KDの示されている細胞の対照細胞に対する頻度 (5A) および絶対数 (5B) の倍率変化を示す棒グラフである。図5Cは、形質導入された $CD34^+CD38^-$ hUCB細胞からのCFUアウトプットを示す棒グラフおよびCFU-顆粒球赤血球単球巨核球 (GEMM) の画像 (スケールバー、200 μ m) を示す。図5Dは、7日間培養した対照 hUCB細胞または *YTHDF2* KD hUCB細胞に由来する前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) (左) およびコロニー形成単位-顆粒球/マクロファージ (CFU-GM) (右) の画像を含む (スケールバー、200 μ m)。独立した臍帯血試料を使用し、パネルについて2回繰り返した。図5Eは、形質導入された $CD34^+$ hUCB細胞中の $CD34^+CD38^-$ 細胞の7日間培養物のアネキシンV染色によるアポトーシス分析を示す棒グラフである (n=3の独立したCB試料)。図5Fは、示されているヒト臍帯血 HSC (n=3の独立したヒト試料) における *Tthdf2* ノックダウン (KD) の対照に対する倍率変化を示す棒グラフである。レンチウイルスを使用して対照 *shRNA* またはヒト *Ythdf2 shRNA* を選別された $CD34^+CD38^-$ 臍帯血 (blood cord) HSC に送達した。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない *t* 検定。n. s.、有意でない。

【0078】

【図6-1】図6A~6Gは、*YTHDF2* KDにより、ヒト臍帯血機能的長期 HSC の増大が容易になることを示す図である。図6Aは、*in vivo* における増大後の HSC の頻度を測定するための実験スキームを示す画像である。図6Bは、最も高い2つの細胞用量を受けた一次レシピエントマウスからの $hCD45^+GFP^+$ 再構成の代表的なフロープロットを含む。 $hCD45$ =ヒト $CD45$ 。図6Cは、最も高い2つの用量を受けた一次レシピエントマウス (n=8) 由来のBMにおける $hCD45^+GFP^+$ 生着を示すプロットである。図6Dは、一次LDAによって決定されたHSC頻度を示すプロットである。破線は、95%信頼区間を示す。図6Eは、最も高い2つの細胞用量を受けた二次レシピエントマウスからの $hCD45^+GFP^+$ 再構成の代表的なフロープロットを含む。図6Fは、最も高い2つの用量を受けた二次レシピエントマウス (n=6) 由来のBMにおける $hCD45^+GFP^+$ 生着を示すプロットである。図6Dは、二次LDAに

よって決定されたHSC頻度を示すグラフである。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均±s. e. m.として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

【図6-2】図6A~6Gは、YTHDF2 KOにより、ヒト臍帯血機能的長期HSCの増大が容易になることを示す図である。図6Aは、*in vivo*における増大後のHSCの頻度を測定するための実験スキームを示す画像である。図6Bは、最も高い2つの細胞用量を受けた一次レシピエントマウスからのhCD45⁺GFP⁺再構成の代表的なフロープロットを含む。hCD45=ヒトCD45。図6Cは、最も高い2つの用量を受けた一次レシピエントマウス(n=8)由来のBMにおけるhCD45⁺GFP⁺生着を示すプロットである。図6Dは、一次LDAによって決定されたHSC頻度を示すプロットである。破線は、95%信頼区間を示す。図6Eは、最も高い2つの細胞用量を受けた二次レシピエントマウスからのhCD45⁺GFP⁺再構成の代表的なフロープロットを含む。図6Fは、最も高い2つの用量を受けた二次レシピエントマウス(n=6)由来のBMにおけるhCD45⁺GFP⁺生着を示すプロットである。図6Dは、二次LDAによって決定されたHSC頻度を示すグラフである。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均±s. e. m.として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

10

【図6-3】図6A~6Gは、YTHDF2 KOにより、ヒト臍帯血機能的長期HSCの増大が容易になることを示す図である。図6Aは、*in vivo*における増大後のHSCの頻度を測定するための実験スキームを示す画像である。図6Bは、最も高い2つの細胞用量を受けた一次レシピエントマウスからのhCD45⁺GFP⁺再構成の代表的なフロープロットを含む。hCD45=ヒトCD45。図6Cは、最も高い2つの用量を受けた一次レシピエントマウス(n=8)由来のBMにおけるhCD45⁺GFP⁺生着を示すプロットである。図6Dは、一次LDAによって決定されたHSC頻度を示すプロットである。破線は、95%信頼区間を示す。図6Eは、最も高い2つの細胞用量を受けた二次レシピエントマウスからのhCD45⁺GFP⁺再構成の代表的なフロープロットを含む。図6Fは、最も高い2つの用量を受けた二次レシピエントマウス(n=6)由来のBMにおけるhCD45⁺GFP⁺生着を示すプロットである。図6Dは、二次LDAによって決定されたHSC頻度を示すグラフである。破線は、95%信頼区間を示す。データは平均±s. e. m.として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

20

30

【0079】

【図7-1】図7A~7Iは、Ythdf2 KO HSCが、系列の偏りの徴候または静止状態およびホーミング能力の差異を示さないが、低アポトーシス速度を示すことを示す図である。図7Aは、pI:pC注射を伴わないMx1-cre⁻; Ythdf2^{f/f}マウスおよびMx1-cre⁺; Ythdf2^{f/f}マウス(群当たりn=3)由来のBMにおけるHSPCの絶対細胞数を示す棒グラフである。図7Bは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスにおけるHSPCの細胞周期分析を示す棒グラフである。図7Cは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)におけるBM HSPCのアポトーシス分析を示す棒グラフである。図7Dは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の脾臓の画像および重量を示す。図7E~7Hは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスの脾臓におけるTN-C(7E)、LSK-CD48⁻CD150⁺HSC(7F)、拘束前駆細胞(7G)および系列細胞(7H)の絶対数を示す棒グラフである。図7Iは、CFDA-SEで標識したBM細胞1×10⁶個を致死的に照射を受けたマウスに移植することによって決定されたwt細胞およびYthdf2 KO細胞のホーミング能力を示す棒グラフである。18時間後に、BMをホーミング事象について分析した(群当たりn=6のマウス)。データは平均±s. e. m.として示されている。対応のないt検定。n. s.、有意でない。

40

【図7-2】図7A~7Iは、Ythdf2 KO HSCが、系列の偏りの徴候または

50

静止状態およびホーミング能力の差異を示さないが、低アポトーシス速度を示すことを示す図である。図7Aは、pI:pC注射を伴わないMx1-cre⁻;Ythdf2^{f/f}マウスおよびMx1-cre⁺;Ythdf2^{f/f}マウス(群当たりn=3)由来のBMにおけるHSPCの絶対細胞数を示す棒グラフである。図7Bは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスにおけるHSPCの細胞周期分析を示す棒グラフである。図7Cは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)におけるBM HSPCのアポトーシス分析を示す棒グラフである。図7Dは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の脾臓の画像および重量を示す。図7E~7Hは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスの脾臓におけるTNC(7E)、LSK CD48⁻CD150⁺HSC(7F)、拘束前駆細胞(7G)および系列細胞(7H)の絶対数を示す棒グラフである。図7Iは、CFDA SEで標識したBM細胞1×10⁶個を致死的に照射を受けたマウスに移植することによって決定されたwt細胞およびYthdf2 KO細胞のホーミング能力を示す棒グラフである。18時間後に、BMをホーミング事象について分析した(群当たりn=6のマウス)。データは平均±s.e.m.として示されている。対応のないt検定。n.s.、有意でない。

10

【図7-3】図7A~7Iは、Ythdf2 KO HSCが、系列の偏りの徴候または静止状態およびホーミング能力の差異を示さないが、低アポトーシス速度を示すことを示す図である。図7Aは、pI:pC注射を伴わないMx1-cre⁻;Ythdf2^{f/f}マウスおよびMx1-cre⁺;Ythdf2^{f/f}マウス(群当たりn=3)由来のBMにおけるHSPCの絶対細胞数を示す棒グラフである。図7Bは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスにおけるHSPCの細胞周期分析を示す棒グラフである。図7Cは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス(各群n=5)におけるBM HSPCのアポトーシス分析を示す棒グラフである。図7Dは、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来の脾臓の画像および重量を示す。図7E~7Hは、wtマウス(n=3)およびYthdf2 KO(n=4)マウスの脾臓におけるTNC(7E)、LSK CD48⁻CD150⁺HSC(7F)、拘束前駆細胞(7G)および系列細胞(7H)の絶対数を示す棒グラフである。図7Iは、CFDA SEで標識したBM細胞1×10⁶個を致死的に照射を受けたマウスに移植することによって決定されたwt細胞およびYthdf2 KO細胞のホーミング能力を示す棒グラフである。18時間後に、BMをホーミング事象について分析した(群当たりn=6のマウス)。データは平均±s.e.m.として示されている。対応のないt検定。n.s.、有意でない。

20

30

【0080】

【図8】図8A~8Fは、Ythdf2 KO BMの移植レシピエントマウスが移植の16週間後に系列の変化または欠陥を示さないことを示す図である。図8A~8Cは、二次移植の16週間後の二次200K移植レシピエントマウス由来のBMにおけるドナー由来の(CD45.2⁺)TNC(8A)、拘束前駆細胞(8B)および系列細胞(8C)の絶対細胞数を示す棒グラフである(各群についてn=7~10)。図8D~8Fは、二次移植の16週間後の二次200K移植レシピエントマウス由来の脾臓におけるドナー由来の(CD45.2⁺)TNC(8D)、拘束前駆細胞(8E)、および系列細胞(8F)の絶対細胞数を示す棒グラフである(各群についてn=7~10)。データは平均±s.e.m.として示されている。対応のないt検定。n.s.、有意でない。

40

【0081】

【図9-1】図9A~9Kは、Ythdf2 KOが、系列の偏りを誘導することなく、in vivoにおけるマウスHSC増大に対する長期にわたる効果を有することを示す図である。図9Aは、pI:pC誘導の5~7カ月後にwtマウスおよびYthdf2 KOマウスから採取したBMおよび脾臓をフローサイトメトリーによって分析したことを示す概略図である。図9B~9Eは、誘導の5~7カ月後のwtマウスおよびYthdf2 KOマウスのBMにおけるTNC(図9B)、HSPC(図9C)、拘束前駆細胞(

50

図 9 D) および系列細胞 (図 9 E) の絶対細胞数を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 F は、誘導の 5 ～ 7 カ月後の *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウス由来の脾臓の重量を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 G ～ 9 J は、誘導の 5 ～ 7 カ月後の *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウスの脾臓における *T N C* (図 9 G)、*L S K C D 4 8 - C D 1 5 0 + H S C* (図 9 H)、拘束前駆細胞 (図 9 I) および系列細胞 (図 9 J) の絶対細胞数を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 K は、*p I : p C* 注射の 5 カ月後に、*wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウス由来の *W B M 7 5 k* 個をレスキュー細胞 *2 0 0 K* 個と共に、致死的に照射を受けたレシピエントに移植したことを示す概略図およびグラフである。移植レシピエント由来の末梢血を移植後 4 週間ごとに分析して、ドナー由来の生着を決定した (各群 $n = 10$)。データは平均 $\pm$ *s. e. m.* として示されている。対応のない *t* 検定。 *n. s.*、有意でない。

10

【図 9 - 2】図 9 A ～ 9 K は、*Y t h d f 2* KO が、系列の偏りを誘導することなく、*i n v i v o* におけるマウス *H S C* 増大に対する長期にわたる効果を有することを示す図である。図 9 A は、*p I : p C* 誘導の 5 ～ 7 カ月後に *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウスから採取した *B M* および脾臓をフローサイトメトリーによって分析したことを示す概略図である。図 9 B ～ 9 E は、誘導の 5 ～ 7 カ月後の *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウスの *B M* における *T N C* (図 9 B)、*H S P C* (図 9 C)、拘束前駆細胞 (図 9 D) および系列細胞 (図 9 E) の絶対細胞数を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 F は、誘導の 5 ～ 7 カ月後の *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウス由来の脾臓の重量を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 G ～ 9 J は、誘導の 5 ～ 7 カ月後の *wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウスの脾臓における *T N C* (図 9 G)、*L S K C D 4 8 - C D 1 5 0 + H S C* (図 9 H)、拘束前駆細胞 (図 9 I) および系列細胞 (図 9 J) の絶対細胞数を示す棒グラフである (群当たり $n = 4 \sim 7$ のマウス)。図 9 K は、*p I : p C* 注射の 5 カ月後に、*wt* マウスおよび *Y t h d f 2* KO マウス由来の *W B M 7 5 k* 個をレスキュー細胞 *2 0 0 K* 個と共に、致死的に照射を受けたレシピエントに移植したことを示す概略図およびグラフである。移植レシピエント由来の末梢血を移植後 4 週間ごとに分析して、ドナー由来の生着を決定した (各群 $n = 10$)。データは平均 $\pm$ *s. e. m.* として示されている。対応のない *t* 検定。 *n. s.*、有意でない。

20

30

【0082】

【図 10 - 1】図 10 A ～ 10 D は、マウス *H S P C* における $m^6 A$ 修飾の分子特徴付けを示す図である。図 10 A は、*T S S* (上) および終止コドン (下) 周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルのプロットを示す。 $m^6 A$ *I P* および対照 (インプット) 断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図 10 B は、5 つの転写物セグメントのそれぞれにおける $m^6 A$ ピークの画分を示す円グラフを示す。図 10 C は、発現レベルに応じたセグメントのそれぞれにおける、 $m^6 A$ ピークを有するマウス *H P S C* における遺伝子の画分のプロットを示す。図 10 D は、*H S P C* におけるアクチノマイシン D による処置の 0 時間後および 4 時間後の発現レベルの分析によって決定された $m^6 A$ タグを有するおよび $m^6 A$ タグを有さない *m R N A* の分解速度のグラフを示す。

40

【図 10 - 2】図 10 A ～ 10 D は、マウス *H S P C* における $m^6 A$ 修飾の分子特徴付けを示す図である。図 10 A は、*T S S* (上) および終止コドン (下) 周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルのプロットを示す。 $m^6 A$ *I P* および対照 (インプット) 断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図 10 B は、5 つの転写物セグメントのそれぞれにおける $m^6 A$ ピークの画分を示す円グラフを示す。図 10 C は、発現レベルに応じたセグメントのそれぞれにおける、 $m^6 A$ ピークを有するマウス *H P S C* における遺伝子の画分のプロットを示す。図 10 D は、*H S P C* におけるアクチノマイシン D による処置の 0 時間後および 4 時間後の発現レベルの分析によって決定された $m^6 A$ タグを有するおよび $m^6 A$ タグを有さない *m R N A* の分解速度のグ

50

ラフを示す。

【図10-3】図10A~10Dは、マウスHSPCにおける m^6A 修飾の分子特徴付けを示す図である。図10Aは、TSS（上）および終止コドン（下）周囲のウィンドウ内の配列カバレッジを示すメタ遺伝子プロファイルのプロットを示す。 m^6A IPおよび対照（インプット）断片のカバレッジがそれぞれ赤色および灰色で示されている。図10Bは、5つの転写物セグメントのそれぞれにおける m^6A ピークの画分を示す円グラフを示す。図10Cは、発現レベルに応じたセグメントのそれぞれにおける、 m^6A ピークを有するマウスHSPCにおける遺伝子の画分のプロットを示す。図10Dは、HSPCにおけるアクチノマイシンDによる処置の0時間後および4時間後の発現レベルの分析によって決定された m^6A タグを有するおよび m^6A タグを有さないmRNAの分解速度のグラフを示す。

10

【0083】

【図11-1】図11A~11Eは、マウスHSPCにおけるYthdf2の機能性をirCLIP-seqによって定義する図である。図11Aは、対照HPC7細胞またはFlag-Ythdf2過剰発現HPC7細胞におけるYthdf2の免疫沈降を示す画像である。図11Bは、IR800標識されたRNA-Ythdf2複合体を示すirCLIPメンブレン画像である。赤色の四角は、ライブラリー構築のために採取したRNA-Ythdf2複合体を示し、UV架橋結合を有さない試料が対照として働く。図11Cは、3回の独立したYthdf2 irCLIP-seq実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図11Dは、Ythdf2結合性標的と m^6A 標識されたmRNAの重複を示すベン図である。図11Eは、 m^6A ピークおよびYthdf2 irCLIPピークを有するGata2の代表的なトラックを示す。 m^6A 免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Ythdf2 irCLIPリードが黄色で強調表示されている。

20

【図11-2】図11A~11Eは、マウスHSPCにおけるYthdf2の機能性をirCLIP-seqによって定義する図である。図11Aは、対照HPC7細胞またはFlag-Ythdf2過剰発現HPC7細胞におけるYthdf2の免疫沈降を示す画像である。図11Bは、IR800標識されたRNA-Ythdf2複合体を示すirCLIPメンブレン画像である。赤色の四角は、ライブラリー構築のために採取したRNA-Ythdf2複合体を示し、UV架橋結合を有さない試料が対照として働く。図11Cは、3回の独立したYthdf2 irCLIP-seq実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図11Dは、Ythdf2結合性標的と m^6A 標識されたmRNAの重複を示すベン図である。図11Eは、 m^6A ピークおよびYthdf2 irCLIPピークを有するGata2の代表的なトラックを示す。 m^6A 免疫沈降のカバレッジおよびインプット断片がそれぞれ赤色および灰色で示されており、Ythdf2 irCLIPリードが黄色で強調表示されている。

30

【0084】

【図12-1】図12A~12Fは、Ythdf2 KOが、 m^6A タグを有するmRNAの発現を増大させ、それにより、HSC増大に寄与することを示す図である。図12Aは、選別されたBM LSK Flk2⁺細胞15,000個から全RNAを抽出したことを示す棒グラフである。図12Bは、wt Lin⁺細胞およびYthdf2 KO Lin⁺細胞（n=6）における m^6A RNAメチル化の定量化を示す。図12Cは、Ythdf2 KO LT-HSCにおける、wt LT-HSCと比較したTAL1、GATA2、RUNX1およびSTAT5の発現の増大を示す細胞内フロー検証を示す定量化（右）およびヒストグラム（左）を示す（群当たりn=3のマウス）。図12Dは、wt HSPCおよびYthdf2 KO HSPCにおけるGata2 mRNAの蛍光in situハイブリダイゼーション（赤色）およびDcp1a（P-bodyマーカー）（赤紫色）、Ythdf2（緑色）の蛍光免疫染色を示す。矢マークは共局在染色を示す。スケールバー、5 μ m。図12Eは、wtおよびYthdf2 KOマウス由来の選別されたLSK細胞におけるGata2 mRNAとDCP1aの共局在の定量化を

40

50

示す。パーセンテージは、各 LSK 細胞における総 *Gata2* mRNA レベルに対する *DCP1a* と共局在した *Gata2* mRNA の平均頻度を示す ($n = 12 \sim 20$)。図 12F は、移植の 4 週間後の $CD45^+$ 集団における GFP^+ 細胞のパーセンテージを示す ($n = 10$)。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

【図 12-2】図 12A~12F は、*Ythdf2* KO が、 m^6A タグを有する mRNA の発現を増大させ、それにより、HSC 増大に寄与することを示す図である。図 12A は、選別された BM LSK $F1k2^-$ 細胞 15,000 個から全 RNA を抽出したことを示す棒グラフである。図 12B は、wt Lin $^-$ 細胞および *Ythdf2* KO Lin $^-$ 細胞 ($n = 6$) における m^6A RNA メチル化の定量化を示す。図 12C は、*Ythdf2* KO LT-HSC における、wt LT-HSC と比較した *TAL1*、*GATA2*、*RUNX1* および *STAT5* の発現の増大を示す細胞内フロー検証を示す定量化 (右) およびヒストグラム (左) を示す (群当たり $n = 3$ のマウス)。図 12D は、wt HSPC および *Ythdf2* KO HSPC における *Gata2* mRNA の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (赤色) および *Dcp1a* (P-body マーカー) (赤紫色)、*Ythdf2* (緑色) の蛍光免疫染色を示す。矢マークは共局在染色を示す。スケールバー、5 μ m。図 12E は、wt および *Ythdf2* KO マウス由来の選別された LSK 細胞における *Gata2* mRNA と *DCP1a* の共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各 LSK 細胞における総 *Gata2* mRNA レベルに対する *DCP1a* と共局在した *Gata2* mRNA の平均頻度を示す ($n = 12 \sim 20$)。図 12F は、移植の 4 週間後の $CD45^+$ 集団における GFP^+ 細胞のパーセンテージを示す ($n = 10$)。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

【図 12-3】図 12A~12F は、*Ythdf2* KO が、 m^6A タグを有する mRNA の発現を増大させ、それにより、HSC 増大に寄与することを示す図である。図 12A は、選別された BM LSK $F1k2^-$ 細胞 15,000 個から全 RNA を抽出したことを示す棒グラフである。図 12B は、wt Lin $^-$ 細胞および *Ythdf2* KO Lin $^-$ 細胞 ($n = 6$) における m^6A RNA メチル化の定量化を示す。図 12C は、*Ythdf2* KO LT-HSC における、wt LT-HSC と比較した *TAL1*、*GATA2*、*RUNX1* および *STAT5* の発現の増大を示す細胞内フロー検証を示す定量化 (右) およびヒストグラム (左) を示す (群当たり $n = 3$ のマウス)。図 12D は、wt HSPC および *Ythdf2* KO HSPC における *Gata2* mRNA の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (赤色) および *Dcp1a* (P-body マーカー) (赤紫色)、*Ythdf2* (緑色) の蛍光免疫染色を示す。矢マークは共局在染色を示す。スケールバー、5 μ m。図 12E は、wt および *Ythdf2* KO マウス由来の選別された LSK 細胞における *Gata2* mRNA と *DCP1a* の共局在の定量化を示す。パーセンテージは、各 LSK 細胞における総 *Gata2* mRNA レベルに対する *DCP1a* と共局在した *Gata2* mRNA の平均頻度を示す ($n = 12 \sim 20$)。図 12F は、移植の 4 週間後の $CD45^+$ 集団における GFP^+ 細胞のパーセンテージを示す ($n = 10$)。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

【0085】

【図 13-1】図 13A~13G は、YTHDF2 により、ヒト臍帯血幹細胞における幹細胞の自己複製に関連する転写因子の発現が制御されることを示す図である。図 13A は、3 つの独立した臍帯血試料を使用した 3 回の独立した m^6A -seq 実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図 13B は、 m^6A ピークを含有する mRNA および非コード RNA のパーセンテージの円グラフを示す。図 13C は、hUCB $CD34^+$ 細胞における m^6A 修飾を有する転写因子の GO 富化分析を示す棒グラフである。図 13D は、YTHDF2 のノックダウン効率を示す、選別された GFP^+ 対照 hUCB 細胞および YTHDF2 KD hUCB 細胞における YTHDF2 (上) および β -アク

チン（下）のウェスタンブロッティングの画像を示す。図13Eは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、対照およびYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞のRNA-seq分析からのYTHDF2の発現レベル（左）および代表的なトラックプロット（右）の棒グラフを示す。図13F～13Gは、示されているm⁶Aピークを有する転写因子の代表的なトラックプロット（上）およびそれらのRNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロット（下）である。調整したP値が示されている。

【図13-2】図13A～13Gは、YTHDF2により、ヒト臍帯血幹細胞における幹細胞の自己複製に関連する転写因子の発現が制御されることを示す図である。図13Aは、3つの独立した臍帯血試料を使用した3回の独立したm⁶A-seq実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図13Bは、m⁶Aピークを含有するmRNAおよび非コードRNAのパーセンテージの円グラフを示す。図13Cは、hUCB CD34⁺細胞におけるm⁶A修飾を有する転写因子のGO富化分析を示す棒グラフである。図13Dは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、選別されたGFP⁺対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるYTHDF2（上）およびβ-アクチン（下）のウェスタンブロッティングの画像を示す。図13Eは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、対照およびYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞のRNA-seq分析からのYTHDF2の発現レベル（左）および代表的なトラックプロット（右）の棒グラフを示す。図13F～13Gは、示されているm⁶Aピークを有する転写因子の代表的なトラックプロット（上）およびそれらのRNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロット（下）である。調整したP値が示されている。

【図13-3】図13A～13Gは、YTHDF2により、ヒト臍帯血幹細胞における幹細胞の自己複製に関連する転写因子の発現が制御されることを示す図である。図13Aは、3つの独立した臍帯血試料を使用した3回の独立したm⁶A-seq実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図13Bは、m⁶Aピークを含有するmRNAおよび非コードRNAのパーセンテージの円グラフを示す。図13Cは、hUCB CD34⁺細胞におけるm⁶A修飾を有する転写因子のGO富化分析を示す棒グラフである。図13Dは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、選別されたGFP⁺対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるYTHDF2（上）およびβ-アクチン（下）のウェスタンブロッティングの画像を示す。図13Eは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、対照およびYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞のRNA-seq分析からのYTHDF2の発現レベル（左）および代表的なトラックプロット（右）の棒グラフを示す。図13F～13Gは、示されているm⁶Aピークを有する転写因子の代表的なトラックプロット（上）およびそれらのRNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロット（下）である。調整したP値が示されている。

【図13-4】図13A～13Gは、YTHDF2により、ヒト臍帯血幹細胞における幹細胞の自己複製に関連する転写因子の発現が制御されることを示す図である。図13Aは、3つの独立した臍帯血試料を使用した3回の独立したm⁶A-seq実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図13Bは、m⁶Aピークを含有するmRNAおよび非コードRNAのパーセンテージの円グラフを示す。図13Cは、hUCB CD34⁺細胞におけるm⁶A修飾を有する転写因子のGO富化分析を示す棒グラフである。図13Dは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、選別されたGFP⁺対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるYTHDF2（上）およびβ-アクチン（下）のウェスタンブロッティングの画像を示す。図13Eは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、対照およびYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞のRNA-seq分析からのYTHDF2の発現レベル（左）および代表的なトラックプロット（右）の棒グラフを示す。図13F～13Gは、示されているm⁶Aピークを有する転写因子の代表的なトラックプロット（上）およびそれらのRNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロット（下）である。調整したP値が示されている。

【図13-5】図13A～13Gは、YTHDF2により、ヒト臍帯血幹細胞における幹細胞の自己複製に関連する転写因子の発現が制御されることを示す図である。図13Aは

、3つの独立した臍帯血試料を使用した3回の独立した m^6A-seq 実験において同定された交差遺伝子を示すベン図である。図13Bは、 m^6A ピークを含有するmRNAおよび非コードRNAのパーセンテージの円グラフを示す。図13Cは、hUCB CD34⁺細胞における m^6A 修飾を有する転写因子のGO富化分析を示す棒グラフである。図13Dは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、選別されたGFP⁺対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるYTHDF2（上）および β -アクチン（下）のウェスタンブロッティングの画像を示す。図13Eは、YTHDF2のノックダウン効率を示す、対照およびYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞のRNA-seq分析からのYTHDF2の発現レベル（左）および代表的なトラックプロット（右）の棒グラフを示す。図13F～13Gは、示されている m^6A ピークを有する転写因子の代表的なトラックプロット（上）およびそれらのRNA-seq分析からの代表的なカバレッジプロット（下）である。調整したP値が示されている。

10

【0086】

【図14-1】図14A～14Cは、hUCB細胞におけるYTHDF2 KDの結果、系列アウトプットを変化させることなくHSC増大がもたされることを示す図である。図14Aは、7日間培養した後の、対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるGFP⁺CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻EPCR⁺HSCの代表的なフロープロットを示す。図14Bは、形質導入されたHeLa細胞におけるYTHDF2タンパク質ノックダウンおよび過剰発現の確認を示す。図14Cは、培養10日目のYTHDF2 OEおよび対照形質導入CD34⁺CD38⁻CBによるCFU生成を示す（ $n=3$ 回の独立したヒト試料）。データは平均 $\pm$ s.e.m.として示されている。対応のないt検定。 $n.s.$ 、有意でない。

20

【図14-2】図14A～14Cは、hUCB細胞におけるYTHDF2 KDの結果、系列アウトプットを変化させることなくHSC増大がもたされることを示す図である。図14Aは、7日間培養した後の、対照hUCB細胞およびYTHDF2 KD hUCB細胞におけるGFP⁺CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻EPCR⁺HSCの代表的なフロープロットを示す。図14Bは、形質導入されたHeLa細胞におけるYTHDF2タンパク質ノックダウンおよび過剰発現の確認を示す。図14Cは、培養10日目のYTHDF2 OEおよび対照形質導入CD34⁺CD38⁻CBによるCFU生成を示す（ $n=3$ 回の独立したヒト試料）。データは平均 $\pm$ s.e.m.として示されている。対応のないt検定。 $n.s.$ 、有意でない。

30

【0087】

【図15-1】図15A～15Dは、hUCB細胞におけるYTHDF2 KDの結果、系列アウトプットを変化させることなくHSC増大がもたらされることを示す図である。図15Aは、一次NSGレシピエントBMにおけるhCD45⁺GFP⁺単球、巨核球（MK細胞）、B細胞および赤血球の代表的なフロープロットを含む。図15Bおよび15Cは、移植の10週間後の一次NSGレシピエント由来のhCD45⁺GFP⁺BM細胞（図15B）および総CD45⁺BM細胞（図15C）における系列細胞のパーセンテージを示す棒グラフである（ $n=13\sim15$ ）。図15Dは、移植の12週間後の二次NSGレシピエント由来の総CD45⁺BM細胞におけるヒトドナー由来の系列キメラ化の要約を示す棒グラフである（ $n=6$ ）。データは平均 $\pm$ s.e.m.として示されている。対応のないt検定。 $n.s.$ 、有意でない。

40

【図15-2】図15A～15Dは、hUCB細胞におけるYTHDF2 KDの結果、系列アウトプットを変化させることなくHSC増大がもたらされることを示す図である。図15Aは、一次NSGレシピエントBMにおけるhCD45⁺GFP⁺単球、巨核球（MK細胞）、B細胞および赤血球の代表的なフロープロットを含む。図15Bおよび15Cは、移植の10週間後の一次NSGレシピエント由来のhCD45⁺GFP⁺BM細胞（図15B）および総CD45⁺BM細胞（図15C）における系列細胞のパーセンテージを示す棒グラフである（ $n=13\sim15$ ）。図15Dは、移植の12週間後の二次NSGレシピエント由来の総CD45⁺BM細胞におけるヒトドナー由来の系列キメラ化の要

50

約を示す棒グラフである ($n = 6$)。データは平均 $\pm$ s. e. m. として示されている。対応のない t 検定。n. s.、有意でない。

【0088】

【図16】図16は、*in vivo*における間葉系幹細胞の増大を示すグラフである。図16は、*wt* *Ythdf2*を有するTNCと*Ythdf2*ノックアウト(KO)を有するTNCにおけるN-Cad+CD105+の頻度の両方を示す棒グラフである。

【0089】

【図17-1】図17A~17Jは、rHSC集団の機能的同定を示す図である。図17Aは、rHSC、pHSC、ST-HSCおよびMPPについてのFACS選別の略図である。図17Bは、移植アッセイによるrHSCおよびpHSC機能の定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞についてのPB分析ならびに移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージ ($n = 1$ 群当たり10匹のマウス)。図17Cは、移植の40週間後のrHSCまたはpHSCを移植したマウスのドナー由来細胞を示す。図17Dは、追跡の130日後のrHSCおよびpHSCにおけるH2B-GFP標識を有する細胞 (群当たり $n = 4$ のマウス) を示す。図17Eは、rHSCおよびpHSCにおける細胞周期遺伝子発現を示す (マウス20匹からの $n = 3$ の反復実験)。図17Fは、rHSCおよびpHSCを移植されたレシピエントが示されている通り移植の4週間後に5FU注射を受けたことを示す。示されている移植後の週におけるドナー生着細胞についてのPB分析。移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージを示した ($n = 1$ 群当たり10匹のマウス)。図17Gは、5FU処置後3日目のrHSCおよびpHSCを示す (マウス15匹からのプール)。図17Hは、rHSCおよびpHSCにおけるDNA損傷遺伝子発現を示す (マウス20匹からの $n = 3$ の反復実験)。図17Iは、対照マウスおよび5FU後3日目のマウス由来のrHSCにおけるDNA損傷遺伝子を示す (対照マウス群は $n = 20$ 、D3 5FUマウス群は $n = 40$)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図17Jは、rHSC、pHSCおよび5FU rHSCにおけるストレス応答遺伝子のヒートマップを示す。

【図17-2】図17A~17Jは、rHSC集団の機能的同定を示す図である。図17Aは、rHSC、pHSC、ST-HSCおよびMPPについてのFACS選別の略図である。図17Bは、移植アッセイによるrHSCおよびpHSC機能の定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞についてのPB分析ならびに移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージ ($n = 1$ 群当たり10匹のマウス)。図17Cは、移植の40週間後のrHSCまたはpHSCを移植したマウスのドナー由来細胞を示す。図17Dは、追跡の130日後のrHSCおよびpHSCにおけるH2B-GFP標識を有する細胞 (群当たり $n = 4$ のマウス) を示す。図17Eは、rHSCおよびpHSCにおける細胞周期遺伝子発現を示す (マウス20匹からの $n = 3$ の反復実験)。図17Fは、rHSCおよびpHSCを移植されたレシピエントが示されている通り移植の4週間後に5FU注射を受けたことを示す。示されている移植後の週におけるドナー生着細胞についてのPB分析。移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージを示した ($n = 1$ 群当たり10匹のマウス)。図17Gは、5FU処置後3日目のrHSCおよびpHSCを示す (マウス15匹からのプール)。図17Hは、rHSCおよびpHSCにおけるDNA損傷遺伝子発現を示す (マウス20匹からの $n = 3$ の反復実験)。図17Iは、対照マウスおよび5FU後3日目のマウス由来のrHSCにおけるDNA損傷遺伝子を示す (対照マウス群は $n = 20$ 、D3 5FUマウス群は $n = 40$)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図17Jは、rHSC、pHSCおよび5FU rHSCにおけるストレス応答遺伝子のヒートマップを示す。

【図17-3】図17A~17Jは、rHSC集団の機能的同定を示す図である。図17

Aは、rHSC、pHSC、ST-HSCおよびMPPについてのFACS選別の略図である。図17Bは、移植アッセイによるrHSCおよびpHSC機能の定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞についてのPB分析ならびに移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージ（ $n=1$ 群当たり10匹のマウス）。図17Cは、移植の40週間後のrHSCまたはpHSCを移植したマウスのドナー由来細胞を示す。図17Dは、追跡の130日後のrHSCおよびpHSCにおけるH2B-GFP標識を有する細胞（群当たり $n=4$ のマウス）を示す。図17Eは、rHSCおよびpHSCにおける細胞周期遺伝子発現を示す（マウス20匹からの $n=3$ の反復実験）。図17Fは、rHSCおよびpHSCを移植されたレシピエントが示されている通り移植の4週間後に5FU注射を受けたことを示す。示されている移植後の週におけるドナー生着細胞についてのPB分析。移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージを示した（ $n=1$ 群当たり10匹のマウス）。図17Gは、5FU処置後3日目のrHSCおよびpHSCを示す（マウス15匹からのプール）。図17Hは、rHSCおよびpHSCにおけるDNA損傷遺伝子発現を示す（マウス20匹からの $n=3$ の反復実験）。図17Iは、対照マウスおよび5FU後3日目のマウス由来のrHSCにおけるDNA損傷遺伝子を示す（対照マウス群は $n=20$ 、D3 5FUマウス群は $n=40$ ）。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図17Jは、rHSC、pHSCおよび5FU rHSCにおけるストレス応答遺伝子のヒートマップを示す。

10

20

【図17-4】図17A~17Jは、rHSC集団の機能的同定を示す図である。図17Aは、rHSC、pHSC、ST-HSCおよびMPPについてのFACS選別の略図である。図17Bは、移植アッセイによるrHSCおよびpHSC機能の定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞についてのPB分析ならびに移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージ（ $n=1$ 群当たり10匹のマウス）。図17Cは、移植の40週間後のrHSCまたはpHSCを移植したマウスのドナー由来細胞を示す。図17Dは、追跡の130日後のrHSCおよびpHSCにおけるH2B-GFP標識を有する細胞（群当たり $n=4$ のマウス）を示す。図17Eは、rHSCおよびpHSCにおける細胞周期遺伝子発現を示す（マウス20匹からの $n=3$ の反復実験）。図17Fは、rHSCおよびpHSCを移植されたレシピエントが示されている通り移植の4週間後に5FU注射を受けたことを示す。示されている移植後の週におけるドナー生着細胞についてのPB分析。移植の20週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髄系列細胞のパーセンテージを示した（ $n=1$ 群当たり10匹のマウス）。図17Gは、5FU処置後3日目のrHSCおよびpHSCを示す（マウス15匹からのプール）。図17Hは、rHSCおよびpHSCにおけるDNA損傷遺伝子発現を示す（マウス20匹からの $n=3$ の反復実験）。図17Iは、対照マウスおよび5FU後3日目のマウス由来のrHSCにおけるDNA損傷遺伝子を示す（対照マウス群は $n=20$ 、D3 5FUマウス群は $n=40$ ）。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図17Jは、rHSC、pHSCおよび5FU rHSCにおけるストレス応答遺伝子のヒートマップを示す。

30

40

【0090】

【図18-1】図18A~18Iは、rHSCがBMニッチ内の骨内膜領域近くに位置することを示す図である。図18Aは、マウス胸骨骨髄（BM）の、骨（白色、第二次高調波発生、SHGによって作成）、MK（黄色、サイズ、形態およびCD41発現によって区別される）を伴う代表的なホールマウント画像を示す。緑色の矢じりは、表現型 $L i n^{-} C D 4 8^{-} C D 4 1^{-} C D 1 5 0^{+} C D 4 9 b^{-} r H S C$ を示し、白色の矢じりは、表現型 $L i n^{-} C D 4 8^{-} C D 4 1^{-} C D 1 5 0^{+} C D 4 9 b^{+} p H S C$ を示す。図18Bは、rHSC、pHSCおよび5FU rHSCの代表的な画像を示す。白色の矢マークは、表現型 $L i n^{-} C D 4 8^{-} C D 4 1^{-} C D 1 5 0^{+} C D 4 9 b^{-} r H S C$ 、表現型L

50

$lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{+}pHSC$ および表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}5FU^{-}rHSC$ を示す。図18C～Eは、 $rHSC$ 、 $pHSC$ および $5FU^{-}rHSC$ の血管、MKまたは骨への相対的な距離を示す ($n=144$ の $rHSC$ 、 $n=685$ の $pHSC$ 、 $n=707$ の $5FU^{-}rHSC$)。図18Fは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウスにおける健康な $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞、アポトーシス性 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞および死滅 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞の絶対数を示す。図18F～Gは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウス由来の中心骨髄 (CM) におけるアネキシンV⁺SytoxG⁻アポトーシス性 $Ve-Cad^{+}CD31^{+}$ 内皮細胞、またはCMおよび骨の両方における $N-cad-tomato^{+}$ 細胞の絶対数を示す。各群 $N=3$ 。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図18H～Iは、対照マウスおよび $5FU$ による処置後3日目のマウスにおける $N-cad-tomato^{+}$ および $Ve-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管の代表的な画像を示す。

【図18-2】図18A～18Iは、 $rHSC$ がBMニッチ内の骨内膜領域近くに位置することを示す図である。図18Aは、マウス胸骨骨髄 (BM) の、骨 (白色、第二次高調波発生、SHGによって作成)、MK (黄色、サイズ、形態および $CD41$ 発現によって区別される) を伴う代表的なホールマウント画像を示す。緑色の矢じりは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}rHSC$ を示し、白色の矢じりは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{+}pHSC$ を示す。図18Bは、 $rHSC$ 、 $pHSC$ および $5FU^{-}rHSC$ の代表的な画像を示す。白色の矢マークは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}rHSC$ 、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{+}pHSC$ および表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}5FU^{-}rHSC$ を示す。図18C～Eは、 $rHSC$ 、 $pHSC$ および $5FU^{-}rHSC$ の血管、MKまたは骨への相対的な距離を示す ($n=144$ の $rHSC$ 、 $n=685$ の $pHSC$ 、 $n=707$ の $5FU^{-}rHSC$)。図18Fは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウスにおける健康な $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞、アポトーシス性 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞および死滅 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞の絶対数を示す。図18F～Gは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウス由来の中心骨髄 (CM) におけるアネキシンV⁺SytoxG⁻アポトーシス性 $Ve-Cad^{+}CD31^{+}$ 内皮細胞、またはCMおよび骨の両方における $N-cad-tomato^{+}$ 細胞の絶対数を示す。各群 $N=3$ 。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図18H～Iは、対照マウスおよび $5FU$ による処置後3日目のマウスにおける $N-cad-tomato^{+}$ および $Ve-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管の代表的な画像を示す。

【図18-3】図18A～18Iは、 $rHSC$ がBMニッチ内の骨内膜領域近くに位置することを示す図である。図18Aは、マウス胸骨骨髄 (BM) の、骨 (白色、第二次高調波発生、SHGによって作成)、MK (黄色、サイズ、形態および $CD41$ 発現によって区別される) を伴う代表的なホールマウント画像を示す。緑色の矢じりは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}rHSC$ を示し、白色の矢じりは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{+}pHSC$ を示す。図18Bは、 $rHSC$ 、 $pHSC$ および $5FU^{-}rHSC$ の代表的な画像を示す。白色の矢マークは、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}rHSC$ 、表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{+}pHSC$ および表現型 $lin^{-}CD48^{-}CD41^{-}CD150^{+}CD49b^{-}5FU^{-}rHSC$ を示す。図18C～Eは、 $rHSC$ 、 $pHSC$ および $5FU^{-}rHSC$ の血管、MKまたは骨への相対的な距離を示す ($n=144$ の $rHSC$ 、 $n=685$ の $pHSC$ 、 $n=707$ の $5FU^{-}rHSC$)。図18Fは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウスにおける健康な $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞、アポトーシス性 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞および死滅 $VE-Cad^{+}CD31^{+}$ 血管細胞の絶対数を示す。図18F～Gは、対照マウスおよび $5FU$ 処置後1日目のマウス由来の中心骨髄 (CM) におけるアネキシンV⁺Sytox

G⁺アポトーシス性V e - C a d⁺ C D 3 1⁺内皮細胞、またはC Mおよび骨の両方におけるN - c a d - t o m a t o⁺細胞の絶対数を示す。各群N = 3。* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s. e. m.。図1 8 H ~ Iは、対照マウスおよび5 F Uによる処置後3日目のマウスにおけるN - c a d - t o m a t o⁺およびV e - C a d⁺ C D 3 1⁺血管の代表的な画像を示す。

【0091】

【図1 9 - 1】図1 9 A ~ 1 9 Jは、N - c a d⁺細胞により機能的H S CがB Mニッチ内に維持されることを示す図である。図1 9 Aは、B ~ Gに示されている実験に使用したN - c a d - C r e E R^T ; i D T RマウスへのD T投与のスキームを示す。Dは日を示す（例えば、D 0は0日目を示す）。図1 9 Bは、N - c a d - C r e E R^T ; i D T RマウスにおけるT o m a t o⁺細胞によって示されるN - c a d⁺細胞除去効率を示す。図1 9 C ~ Dは、T M XおよびD T注射後のN - c a d - C r e E R^T ; i D T Rマウス由来の骨髓（B M）における総有核細胞（T N C）およびH S P Cの絶対数を決定するためのフローサイトメトリー分析を示す（群当たりn = 5のマウス）。図1 9 E ~ Hは、一次1°移植および二次2°移植における移植アッセイによる機能的H S Cの定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞からの総B M細胞についてのP B分析ならびに移植の1 6週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージ（n = 1群当たり1 0匹のマウス）。図1 9 I ~ Jは、T M XおよびD T注射後のN - c a d - C r e E R^T ; S C F f / f（N - c a d - C r e E R^T __ ; S C F f / f、n = 4マウス、N - c a d - C r e E R^T + ; S C F f / f、n = 6マウス）およびN - c a d - C r e E R^T + ; C x c l 1 2 f / fマウス（N - c a d - C r e E R^T __ ; C x c l 1 2 f / f、n = 3マウス、N - c a d - C r e E R^T + ; C x c l 1 2 f / f、n = 6マウス）由来の骨髓（B M）におけるH S P Cの絶対数を決定するためのフローサイトメトリー分析を示す（* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s. e. m.）。

10

20

【図1 9 - 2】図1 9 A ~ 1 9 Jは、N - c a d⁺細胞により機能的H S CがB Mニッチ内に維持されることを示す図である。図1 9 Aは、B ~ Gに示されている実験に使用したN - c a d - C r e E R^T ; i D T RマウスへのD T投与のスキームを示す。Dは日を示す（例えば、D 0は0日目を示す）。図1 9 Bは、N - c a d - C r e E R^T ; i D T RマウスにおけるT o m a t o⁺細胞によって示されるN - c a d⁺細胞除去効率を示す。図1 9 C ~ Dは、T M XおよびD T注射後のN - c a d - C r e E R^T ; i D T Rマウス由来の骨髓（B M）における総有核細胞（T N C）およびH S P Cの絶対数を決定するためのフローサイトメトリー分析を示す（群当たりn = 5のマウス）。図1 9 E ~ Hは、一次1°移植および二次2°移植における移植アッセイによる機能的H S Cの定量化を示す。移植後の示されている週数における総生着ドナー細胞からの総B M細胞についてのP B分析ならびに移植の1 6週間後のドナー由来のB系列細胞、T系列細胞および骨髓系列細胞のパーセンテージ（n = 1群当たり1 0匹のマウス）。図1 9 I ~ Jは、T M XおよびD T注射後のN - c a d - C r e E R^T ; S C F f / f（N - c a d - C r e E R^T __ ; S C F f / f、n = 4マウス、N - c a d - C r e E R^T + ; S C F f / f、n = 6マウス）およびN - c a d - C r e E R^T + ; C x c l 1 2 f / fマウス（N - c a d - C r e E R^T __ ; C x c l 1 2 f / f、n = 3マウス、N - c a d - C r e E R^T + ; C x c l 1 2 f / f、n = 6マウス）由来の骨髓（B M）におけるH S P Cの絶対数を決定するためのフローサイトメトリー分析を示す（* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s. e. m.）。

30

40

【0092】

【図2 0 - 1】図2 0 A ~ 2 0 Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図2 0 A ~ Bは、造血幹細胞・前駆細胞（H S P C）についてのピアソン距離木およびP C A分析を示す。図2 0 C ~ Dは、B Mニッチ細胞についてのピアソン距離木およびP C A分析を示す。図2 0 Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるH S Cシグネチャー遺伝子発現を示す。図2 0 Fは、ニッチ細胞におけるB Mニッチシ

50

グネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析 (term analysis) を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdT; ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-ZsG; Cxcl12-DsRマウスについての系列追跡を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

10

【図20-2】図20A~20Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図20A~Bは、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20C~Dは、BMニッチ細胞についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるHSCシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Fは、ニッチ細胞におけるBMニッチシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析 (term analysis) を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdT; ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-ZsG; Cxcl12-DsRマウスについての系列追跡を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

20

【図20-3】図20A~20Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図20A~Bは、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20C~Dは、BMニッチ細胞についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるHSCシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Fは、ニッチ細胞におけるBMニッチシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析 (term analysis) を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdT; ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-ZsG; Cxcl12-DsRマウスについての系列追跡を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

30

【図20-4】図20A~20Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図20A~Bは、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20C~Dは、BMニッチ細胞についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるHSCシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Fは、ニッチ細胞におけるBMニッチシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析 (term analysis) を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-tdT; ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-Cre^{ERT}; R26-ZsG; Cxcl12-DsRマウスについての系列追跡

40

50

を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

【図20-5】図20A~20Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図20A~Bは、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20C~Dは、BMニッチ細胞についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるHSCシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Fは、ニッチ細胞におけるBMニッチシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析(term analysis)を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetT;ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-ZsG;Cxc112-DsRマウスについての系列追跡を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

【図20-6】図20A~20Kは、造血細胞およびニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析を示す図である。図20A~Bは、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20C~Dは、BMニッチ細胞についてのピアソン距離木およびPCA分析を示す。図20Eは、造血幹細胞・前駆細胞におけるHSCシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Fは、ニッチ細胞におけるBMニッチシグネチャー遺伝子発現を示す。図20Gは、BMニッチ細胞についての用語分析(term analysis)を示す。図20Hは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞における間質細胞発生遺伝子発現を示す。図20Iは、3回のTMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetT;ネスチン-GFPマウス、および3回のTMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-ZsG;Cxc112-DsRマウスについての系列追跡を示す。図20Jは、TMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetTマウス由来の酵素により消化された骨髓細胞を示す。抗体により染色されたLeprおよびPdfgrαが赤色のピークとして示されている。アイソタイプ対照が灰色のピークとして示されている。図20Kは、骨内膜および血管周囲の帯域由来のニッチ細胞におけるCFU-F活性を示す。

【0093】

【図21-1】図21A~21Gは、N-cad⁺由来細胞のin vitroにおける分化潜在性および局在を示す図である。図21Aは、実験設計を示す。図21Bは、酵素により消化された骨髓から培養し、Cell Trace (商標)で染色した生CFU-Fコロニーを示し、また、1つのコロニー内のTomato⁺細胞を高い倍率で示す。図21C~Eは、N-cad-CreERT⁺;R26-tetTマウス由来の間質細胞のin vitroにおける分化：骨分化の21日後の培養物(21C)の生tdTomato⁺細胞およびアルカリホスファターゼ染色；脂質分化(adipo-differentiation)の21日後(21D)の生Tomato⁺細胞およびOil Red O脂質染色；軟骨分化(chondro-differentiation)の21日後のTomato⁺細胞(21E)のアグリカン抗体染色およびトルイジンブルー染色された軟骨細胞を示す。図21F~Gは、(F~G)実験設計を示す。図21Hは、TMX注射後のN-cad-CreERT⁺;R26-tetTマウスに由来する細胞の6時間、14時間、24時間、1週間および4週間の時点での局在を示す。図21Iは、TMX注射後1週間、2週間、4週間および6週間の時点での海綿骨、皮質骨および中心骨髓におけるTomato⁺細胞のパーセンテージを示す(1週間

群および2週間群は $n = 2$ のマウス、4週間群および6週間群は $n = 3$ のマウス。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.)。

【図21-2】図21A~21Gは、 $N-cad^+$ 由来細胞の*in vitro*における分化潜在性および局在を示す図である。図21Aは、実験設計を示す。図21Bは、酵素により消化された骨髄から培養し、Cell Trace (商標)で染色した生CFU-Fコロニーを示し、また、1つのコロニー内のTomato⁺細胞を高い倍率で示す。図21C~Eは、 $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウス由来の間質細胞の*in vitro*における分化：骨分化の21日後の培養物(21C)の生tdTomato⁺細胞およびアルカリホスファターゼ染色；脂質分化(adipo-differentiation)の21日後(21D)の生Tomato⁺細胞およびOil Red O脂質染色；軟骨分化(chondro-differentiation)の21日後のTomato⁺細胞(21E)のアグリカン抗体染色およびトリジンブルー染色された軟骨細胞を示す。図21F~Gは、(F~G)実験設計を示す。図21Hは、TMX注射後の $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウスに由来する細胞の6時間、14時間、24時間、1週間および4週間の時点での局在を示す。図21Iは、TMX注射後1週間、2週間、4週間および6週間の時点での海綿骨、皮質骨および中心骨髄におけるTomato⁺細胞のパーセンテージを示す(1週間群および2週間群は $n = 2$ のマウス、4週間群および6週間群は $n = 3$ のマウス。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.)。

【図21-3】図21A~21Gは、 $N-cad^+$ 由来細胞の*in vitro*における分化潜在性および局在を示す図である。図21Aは、実験設計を示す。図21Bは、酵素により消化された骨髄から培養し、Cell Trace (商標)で染色した生CFU-Fコロニーを示し、また、1つのコロニー内のTomato⁺細胞を高い倍率で示す。図21C~Eは、 $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウス由来の間質細胞の*in vitro*における分化：骨分化の21日後の培養物(21C)の生tdTomato⁺細胞およびアルカリホスファターゼ染色；脂質分化(adipo-differentiation)の21日後(21D)の生Tomato⁺細胞およびOil Red O脂質染色；軟骨分化(chondro-differentiation)の21日後のTomato⁺細胞(21E)のアグリカン抗体染色およびトリジンブルー染色された軟骨細胞を示す。図21F~Gは、(F~G)実験設計を示す。図21Hは、TMX注射後の $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウスに由来する細胞の6時間、14時間、24時間、1週間および4週間の時点での局在を示す。図21Iは、TMX注射後1週間、2週間、4週間および6週間の時点での海綿骨、皮質骨および中心骨髄におけるTomato⁺細胞のパーセンテージを示す(1週間群および2週間群は $n = 2$ のマウス、4週間群および6週間群は $n = 3$ のマウス。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.)。

【図21-4】図21A~21Gは、 $N-cad^+$ 由来細胞の*in vitro*における分化潜在性および局在を示す図である。図21Aは、実験設計を示す。図21Bは、酵素により消化された骨髄から培養し、Cell Trace (商標)で染色した生CFU-Fコロニーを示し、また、1つのコロニー内のTomato⁺細胞を高い倍率で示す。図21C~Eは、 $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウス由来の間質細胞の*in vitro*における分化：骨分化の21日後の培養物(21C)の生tdTomato⁺細胞およびアルカリホスファターゼ染色；脂質分化(adipo-differentiation)の21日後(21D)の生Tomato⁺細胞およびOil Red O脂質染色；軟骨分化(chondro-differentiation)の21日後のTomato⁺細胞(21E)のアグリカン抗体染色およびトリジンブルー染色された軟骨細胞を示す。図21F~Gは、(F~G)実験設計を示す。図21Hは、TMX注射後の $N-cad-CreERT$; R26-tdTマウスに由来する細胞の6時間、14時間、24時間、1週間および4週間の時点での局在を示す。図21Iは、TMX注射後1週間、2週間、4週間および6週間の時点での海綿骨、皮質骨および中心骨髄におけるTomato⁺細胞のパーセンテージを示す(1週間群および2週間群は $n = 2$ のマウス、4週間群および6週間群は $n = 3$ のマウス。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。エラーバー、s. e. m.)。

【図21-5】図21A～21Gは、N-cad⁺由来細胞の*in vitro*における分化潜在性および局在を示す図である。図21Aは、実験設計を示す。図21Bは、酵素により消化された骨髄から培養し、Cell Trace（商標）で染色した生CFU-Fコロニーを示し、また、1つのコロニー内のTomato⁺細胞を高い倍率で示す。図21C～Eは、N-cad-CreERT⁺；R26-tdTマウス由来の間質細胞の*in vitro*における分化：骨分化の21日後の培養物（21C）の生tdTomato⁺細胞およびアルカリホスファターゼ染色；脂質分化(adipo-differentiation)の21日後（21D）の生Tomato⁺細胞およびOil Red O脂質染色；軟骨分化(chondro-differentiation)の21日後のTomato⁺細胞（21E）のアグリカン抗体染色およびトリジンブルー染色された軟骨細胞を示す。図21F～Gは、（F～G）実験設計を示す。図21Hは、TMX注射後のN-cad-CreERT⁺；R26-tdTマウスに由来する細胞の6時間、14時間、24時間、1週間および4週間の時点での局在を示す。図21Iは、TMX注射後1週間、2週間、4週間および6週間の時点での海綿骨、皮質骨および中心骨髄におけるTomato⁺細胞のパーセンテージを示す（1週間群および2週間群はn=2のマウス、4週間群および6週間群はn=3のマウス。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。エラーバー、s.e.m.）。

10

【0094】

【図22-1】図22A～22Kは、成体マウスにおいてN-cad⁺間質細胞から骨芽細胞および脂肪細胞が生じることを示す図である。図22Aは、解剖学的分布およびTomato⁺Col2.3-GFP⁺骨芽細胞の生成の増加を示す、TMX注射後の異なる時点のN-cad-CreERT⁺；R26-tdT；Col2.3-GFPマウスの代表的大腿骨切片を示す。スケールバー、100μm。図22B～Cは、6時間（22B）および14時間（22C）で示された領域i、ii、iii、iv、vおよびviにおける、TMX後早期の時点のN-cad-CreERT⁺；R26-tdT；Col2.3-GFPマウスの高倍率画像を示す。中空の矢じりは、TMXの6時間後および14時間後のTomato⁺Col2.3-GFP⁺骨芽細胞（黄色細胞）を示し、中実の矢じりは、海綿領域（ii、iv、v）および皮質領域（iii、vi）において組み換えられたN-cadを示す（緑色）。これらの細胞は、Col2.3-GFPが存在しないことによって示される通り、潜在的に未分化である。スケールバー、50μm。図22D～Eは、TMX注射の6時間後、14時間後、24時間後、2週間後および4週間後の海綿骨（22D）および緻密骨（22E）におけるTomato⁺Col2.3-GFP⁺およびTomato⁺Col2.3-GFP⁻細胞のパーセンテージを示す、画像定量化を示す。図22Fは、海綿骨と緻密骨の間で潜在的に未分化のTomato⁺Col2.3-GFP⁻のパーセンテージを比較した画像定量化を示す。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。エラーバー、s.e.m.。図22Gは、TMX注射の4週間後のN-cad-CreERT⁺；R26-tdT；Col2.3-GFPマウスにおける海綿骨（TB）および皮質骨（CB）の代表的な画像を示す。スケールバー、20μm。図22Hは、TMX注射の4週間後の、ベリリピン染色されたN-cad-CreERT⁺；R26-tdTマウス由来の大腿骨切片の代表的な低倍率および高倍率画像を示す。骨膜領域（i）、海綿領域付近の骨髄（ii）および中心骨髄（iii）において、中実の矢じりは、N-cad⁺MSCに由来するTomato⁺ベリリピン⁺を示す。図22Iは、BODIPY染色を示し、Tomato⁺ベリリピン⁺脂肪細胞（矢じり）の内側の脂肪滴（緑色）が示された。スケールバー、20μm。図22J～Kは、TMX注射の6時間後、14時間後、24時間後、2週間後および4週間後の海綿骨（22J）および骨膜領域（22K）におけるTomato⁺ベリリピン⁺脂肪細胞の画像定量化を示す（*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。エラーバー、s.e.m.）。

20

30

40

【図22-2】図22A～22Kは、成体マウスにおいてN-cad⁺間質細胞から骨芽細胞および脂肪細胞が生じることを示す図である。図22Aは、解剖学的分布およびTomato⁺Col2.3-GFP⁺骨芽細胞の生成の増加を示す、TMX注射後の異なる

50

時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの代表的な大腿骨切片を示す。スケールバー、 $100\mu m$ 。図 22B~C は、6 時間 (22B) および 14 時間 (22C) で示された領域 i 、 ii 、 iii 、 iv 、 v および vi における、TMX 後早期の時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの高倍率画像を示す。中空の矢じりは、TMX の 6 時間後および 14 時間後の $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞 (黄色細胞) を示し、中実の矢じりは、海綿領域 (ii 、 iv 、 v) および皮質領域 (iii 、 vi) において組み換えられた $N-cad$ を示す (緑色)。これらの細胞は、 $Col2.3-GFP$ が存在しないことによって示される通り、潜在的に未分化である。スケールバー、 $50\mu m$ 。図 22D~E は、TMX 注射の 6 時間後、14 時間後、24 時間後、2 週間後および 4 週間後の海綿骨 (22D) および緻密骨 (22E) における $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ および $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ 細胞のパーセンテージを示す、画像定量化を示す。図 22F は、海綿骨と緻密骨の間で潜在的に未分化の $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ のパーセンテージを比較した画像定量化を示す。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図 22G は、TMX 注射の 4 週間後の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスにおける海綿骨 (TB) および皮質骨 (CB) の代表的な画像を示す。スケールバー、 $20\mu m$ 。図 22H は、TMX 注射の 4 週間後の、ペリリピン染色された $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の大腿骨切片の代表的な低倍率および高倍率画像を示す。骨膜領域 (i)、海綿領域付近の骨髓 (ii) および中心骨髓 (iii) において、中実の矢じりは、 $N-cad^+$ MSC に由来する $Tomato^+$ ペリリピン⁺ を示す。図 22I は、BODIPY 染色を示し、 $Tomato^+$ ペリリピン⁺ 脂肪細胞 (矢じり) の内側の脂肪滴 (緑色) が示された。スケールバー、 $20\mu m$ 。図 22J~K は、TMX 注射の 6 時間後、14 時間後、24 時間後、2 週間後および 4 週間後の海綿骨 (22J) および骨膜領域 (22K) における $Tomato^+$ ペリリピン⁺ 脂肪細胞の画像定量化を示す ($*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.)

【図 22-3】図 22A~22K は、成体マウスにおいて $N-cad^+$ 間質細胞から骨芽細胞および脂肪細胞が生じることを示す図である。図 22A は、解剖学的分布および $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞の生成の増加を示す、TMX 注射後の異なる時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの代表的な大腿骨切片を示す。スケールバー、 $100\mu m$ 。図 22B~C は、6 時間 (22B) および 14 時間 (22C) で示された領域 i 、 ii 、 iii 、 iv 、 v および vi における、TMX 後早期の時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの高倍率画像を示す。中空の矢じりは、TMX の 6 時間後および 14 時間後の $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞 (黄色細胞) を示し、中実の矢じりは、海綿領域 (ii 、 iv 、 v) および皮質領域 (iii 、 vi) において組み換えられた $N-cad$ を示す (緑色)。これらの細胞は、 $Col2.3-GFP$ が存在しないことによって示される通り、潜在的に未分化である。スケールバー、 $50\mu m$ 。図 22D~E は、TMX 注射の 6 時間後、14 時間後、24 時間後、2 週間後および 4 週間後の海綿骨 (22D) および緻密骨 (22E) における $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ および $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ 細胞のパーセンテージを示す、画像定量化を示す。図 22F は、海綿骨と緻密骨の間で潜在的に未分化の $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ のパーセンテージを比較した画像定量化を示す。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。エラーバー、s. e. m.。図 22G は、TMX 注射の 4 週間後の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスにおける海綿骨 (TB) および皮質骨 (CB) の代表的な画像を示す。スケールバー、 $20\mu m$ 。図 22H は、TMX 注射の 4 週間後の、ペリリピン染色された $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の大腿骨切片の代表的な低倍率および高倍率画像を示す。骨膜領域 (i)、海綿領域付近の骨髓 (ii) および中心骨髓 (iii) において、中実の

矢じりは、 $N-cad^+MSC$ に由来する $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ を示す。図22Iは、BODIPY染色を示し、 $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ 脂肪細胞（矢じり）の内側の脂肪滴（緑色）が示された。スケールバー、 $20\mu m$ 。図22J～Kは、TMX注射の6時間後、14時間後、24時間後、2週間後および4週間後の海綿骨（22J）および骨膜領域（22K）における $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ 脂肪細胞の画像定量化を示す（* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s.e.m.）。

【図22-4】図22A～22Kは、成体マウスにおいて $N-cad^+$ 間質細胞から骨芽細胞および脂肪細胞が生じることを示す図である。図22Aは、解剖学的分布および $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞の生成の増加を示す、TMX注射後の異なる時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの代表的大腿骨切片を示す。スケールバー、 $100\mu m$ 。図22B～Cは、6時間（22B）および14時間（22C）で示された領域i、ii、iii、iv、vおよびviにおける、TMX後早期の時点の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスの高倍率画像を示す。中空の矢じりは、TMXの6時間後および14時間後の $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞（黄色細胞）を示し、中実の矢じりは、海綿領域（ii、iv、v）および皮質領域（iii、vi）において組み換えられた $N-cad$ を示す（緑色）。これらの細胞は、 $Col2.3-GFP$ が存在しないことによって示される通り、潜在的に未分化である。スケールバー、 $50\mu m$ 。図22D～Eは、TMX注射の6時間後、14時間後、24時間後、2週間後および4週間後の海綿骨（22D）および緻密骨（22E）における $Tomato^+Col2.3-GFP^+$ および $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ 細胞のパーセンテージを示す、画像定量化を示す。図22Fは、海綿骨と緻密骨の間で潜在的に未分化の $Tomato^+Col2.3-GFP^-$ のパーセンテージを比較した画像定量化を示す。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s.e.m.。図22Gは、TMX注射の4週間後の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$; $Col2.3-GFP$ マウスにおける海綿骨（TB）および皮質骨（CB）の代表的な画像を示す。スケールバー、 $20\mu m$ 。図22Hは、TMX注射の4週間後の、ペリリピン染色された $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の大腿骨切片の代表的な低倍率および高倍率画像を示す。骨膜領域（i）、海綿領域付近の骨髓（ii）および中心骨髓（iii）において、中実の矢じりは、 $N-cad^+MSC$ に由来する $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ を示す。図22Iは、BODIPY染色を示し、 $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ 脂肪細胞（矢じり）の内側の脂肪滴（緑色）が示された。スケールバー、 $20\mu m$ 。図22J～Kは、TMX注射の6時間後、14時間後、24時間後、2週間後および4週間後の海綿骨（22J）および骨膜領域（22K）における $Tomato^+$ ペリリピン $^+$ 脂肪細胞の画像定量化を示す（* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバー、s.e.m.）。

【0095】

【図23-1】図23A～23Jは、発生の間および傷害後に $N-cad^+MSC$ から軟骨細胞が生じることを示す図である。図23Aは、実験設計を示す。図23Bは、E14.5（TMXによる誘導の2日後）時点で肋骨においてアグリカン $^+$ 軟骨細胞と部分的に共局在した $tomato^+$ を示す。図23Cは、大腿骨における軟骨細胞発生の図を示す。図23Dは、E12.5時点でTMXによる誘導を受けた2日齢の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の代表的大腿骨切片を示す。関節面（i）および発生中の二次骨化中心（ii）において $Tomato^+$ 細胞からアグリカン $^+$ 軟骨細胞が生じたことに留意されたい。矢じりは $Tomato^+$ アグリカン $^+$ 細胞を示した。図23Eは、E12.5時点でTMXによる誘導を受けた10カ月齢の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の代表的大腿骨切片を示す。初期胚形成期の $Tomato^+$ 細胞がペリリピン $^+$ 脂肪細胞に分化した。図23Fは、E12.5時点でTMXによる誘導を受けた2カ月齢の $N-cad-CreER^T$; $R26-tdT$ マウス由来の代表的

な大腿骨切片を示す。初期胚形成期の Tomato^+ 細胞がオステオポンチン+肥大性軟骨細胞 (i および ii) ならびに骨芽細胞 (iii 、 iv 、 v および vi) に分化した。図 23G は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウスに対する大腿溝傷害についての実験設計を示す。図 23H は、対照マウスおよび膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスにおける Tomato^+ 軟骨細胞の定量化を示す。(I) 軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の 3 週間後の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成した Tomato^+ アグリカン⁺ 細胞 (i) が膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスの対応する領域で有意に増加した (ii) ことに留意されたい。図 23J は対照 (i) および軟骨傷害の場所 (ii) における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図 6H における切片の AHO 染色を示す。

【図 23-2】図 23A~23J は、発生の間および傷害後に N-cad^+ MSC から軟骨細胞が生じることを示す図である。図 23A は、実験設計を示す。図 23B は、E14.5 (TMX による誘導の 2 日後) 時点で肋骨においてアグリカン⁺ 軟骨細胞と部分的に共局在した tomato^+ を示す。図 23C は、大腿骨における軟骨細胞発生の図を示す。図 23D は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 2 日齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。関節面 (i) および発生中の二次骨化中心 (ii) において Tomato^+ 細胞からアグリカン⁺ 軟骨細胞が生じたことに留意されたい。矢じりは Tomato^+ アグリカン⁺ 細胞を示した。図 23E は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 10 カ月齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期の Tomato^+ 細胞がペリリピン⁺ 脂肪細胞に分化した。図 23F は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 2 カ月齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期の Tomato^+ 細胞がオステオポンチン+肥大性軟骨細胞 (i および ii) ならびに骨芽細胞 (iii 、 iv 、 v および vi) に分化した。図 23G は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウスに対する大腿溝傷害についての実験設計を示す。図 23H は、対照マウスおよび膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスにおける Tomato^+ 軟骨細胞の定量化を示す。(I) 軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の 3 週間後の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成した Tomato^+ アグリカン⁺ 細胞 (i) が膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスの対応する領域で有意に増加した (ii) ことに留意されたい。図 23J は対照 (i) および軟骨傷害の場所 (ii) における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図 6H における切片の AHO 染色を示す。

【図 23-3】図 23A~23J は、発生の間および傷害後に N-cad^+ MSC から軟骨細胞が生じることを示す図である。図 23A は、実験設計を示す。図 23B は、E14.5 (TMX による誘導の 2 日後) 時点で肋骨においてアグリカン⁺ 軟骨細胞と部分的に共局在した tomato^+ を示す。図 23C は、大腿骨における軟骨細胞発生の図を示す。図 23D は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 2 日齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。関節面 (i) および発生中の二次骨化中心 (ii) において Tomato^+ 細胞からアグリカン⁺ 軟骨細胞が生じたことに留意されたい。矢じりは Tomato^+ アグリカン⁺ 細胞を示した。図 23E は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 10 カ月齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期の Tomato^+ 細胞がペリリピン⁺ 脂肪細胞に分化した。図 23F は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた 2 カ月齢の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期の Tomato^+ 細胞がオステオポンチン+肥大性軟骨細胞 (i および ii) ならびに骨芽細胞 (iii 、 iv 、 v および vi) に分化した。図 23G は、E12.5 時点で TMX による誘導を受けた N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウスに対する大腿溝傷害についての実験設計を示す。図 23H は、対照マウスおよび膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスにおける Tomato^+ 軟骨細胞の定量化を示す。(I) 軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の 3 週間後の N-cad-CreER^T ; R26-tdT マウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成した Tomato^+ アグリカン⁺ 細胞 (i) が膝軟骨傷害の 3 週間後のマウスの対応する領域で有意に増加した (ii) ことに留意されたい。図 23J は対照 (i) および軟骨傷害の場所 (ii) における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図 6H における切片の AHO 染色を示す。

ウスおよび膝軟骨傷害の3週間後のマウスにおけるTomato⁺軟骨細胞の定量化を示す。(I)軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の3週間後のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成したTomato⁺アグリカン⁺細胞(i)が膝軟骨傷害の3週間後のマウスの対応する領域で有意に増加した(ii)ことに留意されたい。図23Jは対照(i)および軟骨傷害の場所(ii)における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図6Hにおける切片のAHO染色を示す。

【図23-4】図23A~23Jは、発生の間および傷害後にN-cad⁺MSCから軟骨細胞が生じることを示す図である。図23Aは、実験設計を示す。図23Bは、E14.5(TMIXによる誘導の2日後)時点で肋骨においてアグリカン⁺軟骨細胞と部分的に共局在したtomato⁺を示す。図23Cは、大腿骨における軟骨細胞発生の図を示す。図23Dは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた2日齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。関節面(i)および発生中の二次骨化中心(ii)においてTomato⁺細胞からアグリカン⁺軟骨細胞が生じたことに留意されたい。矢じりはTomato⁺アグリカン⁺細胞を示した。図23Eは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた10カ月齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期のTomato⁺細胞がペリリピン⁺脂肪細胞に分化した。図23Fは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた2カ月齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期のTomato⁺細胞がオステオポンチン⁺肥大性軟骨細胞(iおよびii)ならびに骨芽細胞(iii、iv、vおよびvi)に分化した。図23Gは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けたN-cad-CreER^T;R26-tetマウスに対する大腿溝傷害についての実験設計を示す。図23Hは、対照マウスおよび膝軟骨傷害の3週間後のマウスにおけるTomato⁺軟骨細胞の定量化を示す。(I)軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の3週間後のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成したTomato⁺アグリカン⁺細胞(i)が膝軟骨傷害の3週間後のマウスの対応する領域で有意に増加した(ii)ことに留意されたい。図23Jは対照(i)および軟骨傷害の場所(ii)における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図6Hにおける切片のAHO染色を示す。

【図23-5】図23A~23Jは、発生の間および傷害後にN-cad⁺MSCから軟骨細胞が生じることを示す図である。図23Aは、実験設計を示す。図23Bは、E14.5(TMIXによる誘導の2日後)時点で肋骨においてアグリカン⁺軟骨細胞と部分的に共局在したtomato⁺を示す。図23Cは、大腿骨における軟骨細胞発生の図を示す。図23Dは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた2日齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。関節面(i)および発生中の二次骨化中心(ii)においてTomato⁺細胞からアグリカン⁺軟骨細胞が生じたことに留意されたい。矢じりはTomato⁺アグリカン⁺細胞を示した。図23Eは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた10カ月齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期のTomato⁺細胞がペリリピン⁺脂肪細胞に分化した。図23Fは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けた2カ月齢のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。初期胚形成期のTomato⁺細胞がオステオポンチン⁺肥大性軟骨細胞(iおよびii)ならびに骨芽細胞(iii、iv、vおよびvi)に分化した。図23Gは、E12.5時点でTMIXによる誘導を受けたN-cad-CreER^T;R26-tetマウスに対する大腿溝傷害についての実験設計を示す。図23Hは、対照マウスおよび膝軟骨傷害の3週間後のマウスにおけるTomato⁺軟骨細胞の定量化を示す。(I)軟骨傷害を有さない、または軟骨傷害の3週間後のN-cad-CreER^T;R26-tetマウス由来の遠位大腿骨の代表的な切片。対照マウスの膝表面にクラスター形成したTomato⁺アグリカン⁺細胞(i)が膝軟骨傷害の3週間後のマウスの

対応する領域で有意に増加した (i i) ことに留意されたい。図 2 3 J は対照 (i) および軟骨傷害の場所 (i i) における、アルシアンブルー陽性軟骨細胞を示す図 6 H における切片の A H O 染色を示す。

【0096】

【図 2 4 - 1】図 2 4 A ~ 2 4 K は、5 F U 後の B r d U アッセイおよび N - c a d レポーターマウス系を示す図である。図 2 4 A ~ F は、5 F U 処置後 0 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 6 日目のマウス的大腿骨における B r d U ⁺ 細胞を示す代表的な画像を示す。骨 (赤色の点線) または血管 / 脂肪構造 (緑色の点線) の付近で B r d U ⁺ 細胞が 5 F U 後 2 日目に減少し、5 F U 後 3 日目から 6 日目まで再活性化したことに留意されたい。図 2 4 G は、B r d U ⁺ 細胞の動的モデルを示す。図 2 4 H は、5 F U 処置 3 日目から 6 日目までの骨髄における B r d U ⁺ 細胞の骨表面における B r d U ⁺ 細胞に対する比を示す。図 2 4 I は、5 F U 処置後 3 日目から 6 日目までの骨表面付近および血管 / 脂肪構造付近の B r d U ⁺ 細胞のパーセンテージを示す。図 2 4 J は、骨表面および中心骨髄の両方における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞を示す、代表的な全骨切片を示す。図 2 4 K は、対照群および 5 F U 処置の 3 日後のマウスの N - c a d - T d T マウスの中心骨髄 (C M) および骨における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞の絶対数を示す。各群 N = 3。* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s . e . m.

10

【図 2 4 - 2】図 2 4 A ~ 2 4 K は、5 F U 後の B r d U アッセイおよび N - c a d レポーターマウス系を示す図である。図 2 4 A ~ F は、5 F U 処置後 0 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 6 日目のマウス的大腿骨における B r d U ⁺ 細胞を示す代表的な画像を示す。骨 (赤色の点線) または血管 / 脂肪構造 (緑色の点線) の付近で B r d U ⁺ 細胞が 5 F U 後 2 日目に減少し、5 F U 後 3 日目から 6 日目まで再活性化したことに留意されたい。図 2 4 G は、B r d U ⁺ 細胞の動的モデルを示す。図 2 4 H は、5 F U 処置 3 日目から 6 日目までの骨髄における B r d U ⁺ 細胞の骨表面における B r d U ⁺ 細胞に対する比を示す。図 2 4 I は、5 F U 処置後 3 日目から 6 日目までの骨表面付近および血管 / 脂肪構造付近の B r d U ⁺ 細胞のパーセンテージを示す。図 2 4 J は、骨表面および中心骨髄の両方における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞を示す、代表的な全骨切片を示す。図 2 4 K は、対照群および 5 F U 処置の 3 日後のマウスの N - c a d - T d T マウスの中心骨髄 (C M) および骨における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞の絶対数を示す。各群 N = 3。* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s . e . m.

20

30

【図 2 4 - 3】図 2 4 A ~ 2 4 K は、5 F U 後の B r d U アッセイおよび N - c a d レポーターマウス系を示す図である。図 2 4 A ~ F は、5 F U 処置後 0 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 6 日目のマウス的大腿骨における B r d U ⁺ 細胞を示す代表的な画像を示す。骨 (赤色の点線) または血管 / 脂肪構造 (緑色の点線) の付近で B r d U ⁺ 細胞が 5 F U 後 2 日目に減少し、5 F U 後 3 日目から 6 日目まで再活性化したことに留意されたい。図 2 4 G は、B r d U ⁺ 細胞の動的モデルを示す。図 2 4 H は、5 F U 処置 3 日目から 6 日目までの骨髄における B r d U ⁺ 細胞の骨表面における B r d U ⁺ 細胞に対する比を示す。図 2 4 I は、5 F U 処置後 3 日目から 6 日目までの骨表面付近および血管 / 脂肪構造付近の B r d U ⁺ 細胞のパーセンテージを示す。図 2 4 J は、骨表面および中心骨髄の両方における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞を示す、代表的な全骨切片を示す。図 2 4 K は、対照群および 5 F U 処置の 3 日後のマウスの N - c a d - T d T マウスの中心骨髄 (C M) および骨における N - c a d 駆動性 t o m a t o ⁺ 細胞の絶対数を示す。各群 N = 3。* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** P < 0. 0 0 1。エラーバー、s . e . m.

40

【0097】

【図 2 5 - 1】図 2 5 A ~ 2 5 B は、N - c a d - C r e E R ^T マウス系統の生成を示す図である。図 2 5 A は、N - c a d - C r e E R ^T マウス系統の生成を示す。図 2 5 B は、3 回の T M X 注射後の N - c a d - C r e E R ^T、R 2 6 - t d T ; C o l 2 . 3 - G

50

F Pマウスについての系列追跡を示す。C D 3 1 および V e - カドヘリン抗体によって染色された血管。

【図 2 5 - 2】図 2 5 A ~ 2 5 B は、N - c a d - C r e E R ^T マウス系統の生成を示す図である。図 2 5 A は、N - c a d - C r e E R ^T マウス系統の生成を示す。図 2 5 B は、3 回の T M X 注射後の N - c a d - C r e E R ^T、R 2 6 - t d T ; C o l 2 . 3 - G F P マウスについての系列追跡を示す。C D 3 1 および V e - カドヘリン抗体によって染色された血管。

【0098】

【図 2 6 - 1】図 2 6 A ~ 2 6 E は、ニッチ細胞の選別戦略およびシグネチャー遺伝子発現を示す図である。図 2 6 A は、消化された骨細胞から採取された骨内膜帯域内のニッチ細胞を示す。図 2 6 B は、消化された骨髄細胞から採取された血管周囲および類洞帯域由来のニッチ細胞を示す。図 2 6 C は、骨内膜および動脈周囲領域への N G 2 - R F P ⁺ 細胞の局在を示す。図 2 6 D ~ E は、ニッチ細胞における骨軟骨形成の前駆細胞遺伝子および脂肪生成の前駆細胞遺伝子発現のヒートマップを示す。

10

【図 2 6 - 2】図 2 6 A ~ 2 6 E は、ニッチ細胞の選別戦略およびシグネチャー遺伝子発現を示す図である。図 2 6 A は、消化された骨細胞から採取された骨内膜帯域内のニッチ細胞を示す。図 2 6 B は、消化された骨髄細胞から採取された血管周囲および類洞帯域由来のニッチ細胞を示す。図 2 6 C は、骨内膜および動脈周囲領域への N G 2 - R F P ⁺ 細胞の局在を示す。図 2 6 D ~ E は、ニッチ細胞における骨軟骨形成の前駆細胞遺伝子および脂肪生成の前駆細胞遺伝子発現のヒートマップを示す。

20

【図 2 6 - 3】図 2 6 A ~ 2 6 E は、ニッチ細胞の選別戦略およびシグネチャー遺伝子発現を示す図である。図 2 6 A は、消化された骨細胞から採取された骨内膜帯域内のニッチ細胞を示す。図 2 6 B は、消化された骨髄細胞から採取された血管周囲および類洞帯域由来のニッチ細胞を示す。図 2 6 C は、骨内膜および動脈周囲領域への N G 2 - R F P ⁺ 細胞の局在を示す。図 2 6 D ~ E は、ニッチ細胞における骨軟骨形成の前駆細胞遺伝子および脂肪生成の前駆細胞遺伝子発現のヒートマップを示す。

【図 2 6 - 4】図 2 6 A ~ 2 6 E は、ニッチ細胞の選別戦略およびシグネチャー遺伝子発現を示す図である。図 2 6 A は、消化された骨細胞から採取された骨内膜帯域内のニッチ細胞を示す。図 2 6 B は、消化された骨髄細胞から採取された血管周囲および類洞帯域由来のニッチ細胞を示す。図 2 6 C は、骨内膜および動脈周囲領域への N G 2 - R F P ⁺ 細胞の局在を示す。図 2 6 D ~ E は、ニッチ細胞における骨軟骨形成の前駆細胞遺伝子および脂肪生成の前駆細胞遺伝子発現のヒートマップを示す。

30

【図 2 6 - 5】図 2 6 A ~ 2 6 E は、ニッチ細胞の選別戦略およびシグネチャー遺伝子発現を示す図である。図 2 6 A は、消化された骨細胞から採取された骨内膜帯域内のニッチ細胞を示す。図 2 6 B は、消化された骨髄細胞から採取された血管周囲および類洞帯域由来のニッチ細胞を示す。図 2 6 C は、骨内膜および動脈周囲領域への N G 2 - R F P ⁺ 細胞の局在を示す。図 2 6 D ~ E は、ニッチ細胞における骨軟骨形成の前駆細胞遺伝子および脂肪生成の前駆細胞遺伝子発現のヒートマップを示す。

【0099】

【図 2 7 - 1】図 2 7 A ~ 2 7 E は、T M X による誘導後早期の時点の N - c a d - C r e E R ^T ; R 2 6 - t d T マウスにおける系列追跡を示す図である。図 2 7 A ~ B は、T M X による誘導の 2 4 時間後および 2 週間後の N - c a d - C r e E R ^T ; R 2 6 - t d T ; C o l 2 . 3 - G F P マウスにおける海綿骨 (T B) および皮質骨 (C B) の代表的な画像を示す。スケールバー、2 0 μ m。図 2 7 C ~ E は、T M X による誘導の 6 時間後、1 4 時間後および 2 4 時間後の N - c a d - C r e E R ^T ; R 2 6 - t d T マウスの代表的な大腿骨切片を高倍率画像で示す。脂肪細胞がペリリピン抗体染色で示されている。

40

【図 2 7 - 2】図 2 7 A ~ 2 7 E は、T M X による誘導後早期の時点の N - c a d - C r e E R ^T ; R 2 6 - t d T マウスにおける系列追跡を示す図である。図 2 7 A ~ B は、T M X による誘導の 2 4 時間後および 2 週間後の N - c a d - C r e E R ^T ; R 2 6 - t d T ; C o l 2 . 3 - G F P マウスにおける海綿骨 (T B) および皮質骨 (C B) の代表的

50

な画像を示す。スケールバー、 $20\mu\text{m}$ 。図27C～Eは、TMXによる誘導の6時間後、14時間後および24時間後のN-cad-CreERT; R26-tdTマウスの代表的な大腿骨切片を高倍率画像で示す。脂肪細胞がペリリピン抗体染色で示されている。

【0100】

【図28】図28A～28Dは、初期発生からのおよび傷害修復におけるN-cad⁺MSCの特徴付けを示す図である。図28Aは、出生後2日目のTMXによる誘導の24時間後のN-cad-CreERT; R26-tdTにおけるアグリカン染色を伴うN-cad⁺MSCを示す大腿骨切片の代表的な画像を示す。図28Bは、E12.5時点でTMXによる誘導を受けた2カ月齢のN-cad-CreERT; R26-tdTマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。脂肪細胞がペリリピン抗体染色で示されている。図28Cは、E12.5時点でTMXによる誘導を受けた2日齢のN-cad-CreERT; R26-tdTマウス由来の代表的な大腿骨切片を示す。発生中の骨細胞がオステオポンチン抗体染色で示されている。図28Dは、対照群および膝軟骨傷害の2週間後の、E12.5にTMXによる誘導を受けたN-cad-CreERT; R26-tdTマウスにおける代表的な矢状膝切片を示す。スケールバー、1mm。

10

【0101】

【図29】図29は、5FU処置後3日目に生存しているrHSC（緑色、CD150⁺Lin⁻CD49b⁻）が、多くの場合に骨表面に近接した単一細胞として検出されたこと（白色、SHG）、および増殖しているHSCが、多くの場合にMK（CD150⁺Lin⁺）または血管付近に（赤色、CD31⁺）関連付けられたことを示す画像である。

20

【0102】

【図30】図30は、*in vivo*におけるncad+hMSC 10K個および総hMSC 1000k個によるヒトThpoの産生を示すプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0103】

本発明の一実施形態は、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た幹細胞の集団を増大させるための方法である。この方法は、幹細胞の数が増大するように幹細胞の集団におけるN6-メチルアデノシン（m⁶A）mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0104】

本発明の別の実施形態は、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得たT細胞を改変することによって得たキメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団を増大させるための方法である。この方法は、幹細胞の数が増大するようにCAR T細胞の集団におけるN6-メチルアデノシン（m⁶A）mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

30

【0105】

本発明では、幹細胞および／またはT細胞の集団を、任意の哺乳動物、例えばヒトなどから、ならびに、幹細胞および／または前駆細胞および／またはT細胞を含有する任意の組織から得ることができる。上記の通り、好ましい実施形態では、組織は、末梢血、臍帯血または骨髄であり得る。

40

【0106】

本明細書で使用される場合、「増大させる（expand）」、「増大させること（expanding）」および同様の用語は、集団内の幹細胞および／またはCAR-T細胞の数を、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかで、本明細書に開示される方法のいずれかを使用して元の集団内の幹細胞および／またはCAR-T細胞の数と比べて増加させることを意味する。増大は、集団内の幹細胞および／またはCAR-T細胞の元の数と比較して少なくとも40倍であり得る。より好ましくは、増大は、幹細胞の元の数と比較して少なくとも2倍、4倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍またはそれよりも大きい。

【0107】

50

本発明では、「幹細胞の集団」とは、多くの異なる型の細胞を生じさせる能力を有し、自己複製する能力を有する実質的に未分化の細胞の群を意味する。本発明による幹細胞の代表的な非限定的な例としては、気管支肺胞上皮幹細胞（BASC）、バルジ上皮幹細胞（bESC）、角膜上皮幹細胞（CESC）、心臓幹細胞（CSC）、表皮神経堤幹細胞（eNCC）、胚性幹細胞（ESC）、内皮前駆細胞（EPC）、肝臓卵形細胞（HOC）、造血幹細胞（HSC）、造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）、ケラチノサイト幹細胞（KSC）、間葉系幹細胞（MSC）、神経幹細胞（NSC）、腭幹細胞（PSC）、網膜幹細胞（RSC）、および皮膚由来前駆細胞（SKP）が挙げられる。

【0108】

造血幹細胞は、例えば、自己複製（すなわち、増大）する能力を有し、造血系における全ての型の前駆細胞（例えば、CMP、GMP、MEPおよびCLPなど）および最終的に全ての型の血液細胞（例えば、赤血球、Bリンパ球、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、および血小板など）を生じさせることができる。別の例として、間葉系幹細胞は、種々の細胞型（例えば、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞および脂肪細胞など）に分化することができる多分化能間質細胞である。

【0109】

本発明では、「キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団」とは、がん細胞の表面上の抗原などの特定の抗原に結合することができるキメラ抗原受容体を用いて改変され、そのようながん細胞を標的とし、死滅させる能力を有し得るT細胞の群を意味する。CAR T細胞は、キメラ抗原受容体を用いてT細胞を改変することによって、例えば、キメラ抗原受容体をコードするDNAをT細胞に導入して、T細胞の表面上にキメラ抗原受容体を発現させることによってなどで調製することができる（Davila et al. Sci Transl Med 6 (224), 224ra25(2014)；Tasian et al. Ther Adv Hematol 6(5), 228-241(2015)）。

【0110】

本発明では、「モジュレートすること（modulating）」、「モジュレーション（modulation）」および同様の用語は、これだけに限定されないが、タンパク質の発現レベルを低下もしくは上昇させること、そのようなタンパク質の配列を変更すること（変異、翻訳前もしくは翻訳後修飾または他のやり方によって）、またはそのようなタンパク質を阻害もしくは活性化すること（結合によるものか、リン酸化によるものか、グリコシル化によるものか、トランスロケーションによるものかまたは他のやり方によるものかにかかわらず）を含めた、シグナルトランスダクション経路、例えば、m⁶A mRNA修飾経路内のタンパク質を変更することを意味する。そのようなモジュレーションは、遺伝学的にまたは薬理的に達成することができる。

【0111】

本発明の一態様では、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップは、幹細胞および／またはCAR-T細胞の集団に変異を導入することを含み、ここで、変異は、m⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらすものである。本発明の別の態様では、m⁶A mRNA修飾経路のモジュレーションは、幹細胞および／またはCAR-T細胞をm⁶A mRNA経路内の分子のモジュレーターと接触させることも含む。そのようなモジュレーターの代表的な非限定的な例としては、小分子、生物学的物質、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、およびこれらの組合せが挙げられる。

【0112】

本発明では、「m⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーション」という句は、m⁶A mRNA修飾経路のメンバーの機能を変更することを意味し、ここで、機能の変更は、mRNAのm⁶A修飾の上流および／または下流のプロセスに関与する分子の機能を阻害するまたは低下させることと同様の効果を有し得る。そのような「モジュレーション」の非限定的な例としては、mRNAへのN⁶-メチルアデノシン修飾の組込み、mRNAへのN⁶-メチルアデノシンmRNA修飾の除去、ならびに／またはN⁶-メチルアデノシン修飾されたmRNAの認識およびプロセッシングのいずれかに関与するタンパク質

の発現または機能を増大または低減させることが挙げられる。例えば、モジュレーションは、mRNAのN⁶-メチルアデノシン修飾を増大もしくは低減させること、ならびに／または、例えば、m⁶Aライター（例えば、メチルトランスフェラーゼ）およびm⁶Aイレイサー（例えば、デメチラーゼ）の1つもしくは複数の活性をモジュレートすることによってなどでmRNAにおけるそのような修飾の型および／もしくは分布に影響を及ぼすことを含み得る。別の例として、モジュレーションは、例えば、m⁶Aリーダー（例えば、メチル化アデノシンを認識するRNA結合性タンパク質）の活性をモジュレートすることによってなどで、mRNAに対するN⁶-メチルアデノシン修飾を認識してm⁶A依存性機能を媒介するタンパク質の発現または機能を増大または低減させることであり得る。したがって、m⁶A mRNA修飾経路モジュレーター内の分子のモジュレーションにより、m⁶A mRNA修飾プロセスの上流または下流の分子の活性および／または発現のモジュレーションをもたらすことができる。

10

【0113】

一態様では、m⁶A mRNA修飾経路のモジュレーションは、m⁶A mRNA修飾リーダー、m⁶A mRNA修飾ライター、m⁶A mRNA修飾イレイサーおよびこれらの組合せからなる群より選択される分子のモジュレーションを伴う。m⁶A修飾ライターの非限定的な例としては、メッセンジャーRNAにm⁶A修飾を転写後に組み入れることができるメチルトランスフェラーゼが挙げられ、METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。m⁶A修飾イレイサーの非限定的な例としては、メチル化を逆転させることができるデメチラーゼが挙げられ、FTI、ALKBH5およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。m⁶A修飾リーダーとしては、m⁶Aメチル化mRNAに選択的に結合して、メチル化mRNAの選択的認識を通じて制御機能を発揮することができるタンパク質が挙げられる。適切なm⁶A修飾リーダーは、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、elf3およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。一態様によると、m⁶A修飾リーダーは、タンパク質のYTHドメインファミリーのタンパク質を含み、それらとして、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2およびこれらの組合せが挙げられる。（例えば、Wang et al. Nature, 505 (7481): 117-120, 2014; Frayling et al. Science, 316: 889-894, 2007; Zheng et al. Mol. Cell., 49: 18-29, 2012; Cao et al. Open Biol., 6(4): 160003, 2016; Maity et al. The FEBS Journal, 283 (9):1607-1630, 2016を参照されたい）。

20

30

【0114】

本明細書で使用される場合、「変異を導入すること」とは、幹細胞集団および／またはCAR T細胞集団の遺伝子構造に変更を生じさせるための任意の従来の方法を意味する。幹細胞集団および／またはCAR T細胞集団に変異を導入することの非限定的な例としては、幹細胞および／またはCAR T細胞の紫外線照射による変異誘発、化学的変異誘発、部位特異的変異誘発などの標的化変異誘発、ならびにトランスジェニックマウスの創出が挙げられる。一態様によると、変異を幹細胞および／またはCAR T細胞に導入して、m⁶A mRNA修飾リーダー、m⁶A mRNA修飾ライター、m⁶A mRNA修飾イレイサーおよびこれらの組合せからなる群より選択される分子などのm⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させることができる。一態様では、変異を導入して、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、elf3およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかなどのm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる。好ましい態様では、変異を導入して、Ythdf2を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる。さらに別の態様では、変異を導入して、METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429およびこれらの組合せからなる群よ

40

50

り選択されるもののいずれかなどの m^6A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる。さらに別の態様では、変異を導入して、FTI、ALKBH5およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかなどの m^6A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる。

【0115】

一態様では、幹細胞および／またはCAR T細胞を m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系（例えば、Kuhn et al. Science, 269 (5229): 1427-1429, 1995を参照されたい）に曝露させることによって変異を導入することができる。さらに別の態様では、幹細胞および／またはCAR T細胞に低分子ヘアピン型RNA（shRNA）が組み込まれる変異を導入して、 m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させる。例えば、幹細胞および／またはCAR T細胞を、shRNAを送達するためのベクターに曝露させることによってshRNAを導入することができ、当該ベクターは、レンチウイルスなどのウイルスベクターであってよい（例えば、Chiraet al. Oncotarget, 6 (31): 30675-30703, 2015を参照されたい）。shRNAは、遺伝子サイレンシングを誘発して遺伝子発現を制御することができるものであってよい（例えば、Paddison et al. Genes Dev., 16 (8): 948-958, 2002を参照されたい）。

【0116】

本明細書で使用される場合、「 N^6 -メチルアデノシンmRNA修飾経路のモジュレーター」（または「 m^6A mRNA修飾経路モジュレーター」）は、 m^6A mRNA修飾経路の任意のメンバーの活性を制御する任意の作用物質であり、例えば、 m^6A ライター（例えば、メチルトランスフェラーゼ）および m^6A イレイサー（例えば、デメチラーゼ）の1つまたは複数の活性をモジュレートすることによってなどで、例えば、mRNAの N^6 -メチルアデノシン修飾の増大もしくは低減、ならびに／またはmRNAにおけるそのような修飾の型および／もしくは分布の変化をもたらす。別の例として、作用物質は、例えば、 m^6A リーダー（例えば、メチル化アデノシンを認識するRNA結合性タンパク質）の活性をモジュレートすることによってなどで、mRNAに対する N^6 -メチルアデノシン修飾を認識して m^6A 依存性機能を媒介するタンパク質の活性を増大または低減させるものであり得る。したがって、 m^6A mRNA修飾経路モジュレーターは、mRNAに対する m^6A 修飾に影響を及ぼす作用物質に作用する、またはその上流に作用する、またはその下流に作用するものであり得る。

【0117】

一実施形態では、 m^6A mRNA修飾経路を、例えば、 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御および／または阻害することなど、 m^6A mRNA修飾経路のメンバーを下方制御および／または阻害することによってモジュレートすることができる。本明細書で使用される場合、「下方制御すること」とは、 m^6A mRNA修飾経路のメンバーの量を阻害するもしくは減少させること、またはその活性を阻害するもしくは低下させることを意味する。そのような下方制御は、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、抗体、または小分子を使用して達成することができる。別の例として、 m^6A mRNA修飾リーダーを、幹細胞および／またはCAR T細胞を m^6A mRNAリーダーの阻害剤と接触させて、 m^6A mRNAリーダーによる m^6A 修飾されたmRNAへの結合および／またはその認識を阻害することによって下方制御することができる。一態様では、下方制御される m^6A mRNA修飾リーダーは、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2 B1、elf3およびこれらの組合せからなる群より選択される。好ましい態様では、下方制御される m^6A mRNA修飾リーダーは、Ythdf2である。 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤は、以下からなる群より選択されるもののいずれかであり得る：（HNRNPCの阻害剤）hsa-let-7e-5p（MIRT051596）、hsa-mir-455-3p（MIRT037890）、hsa-mir-30c-5p（MIRT047904

)、hsa-mir-186-5p (MIRT045150)、hsa-mir-744-5p (MIRT037494)、hsa-mir-18a-3p (MIRT040851)、hsa-mir-484 (MIRT042196)、hsa-mir-505-5p (MIRT037959)、hsa-mir-615-3p (MIRT039991)、hsa-mir-342-3p (MIRT043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-484、hsa-mir-320b、hsa-mir-620、hsa-mir-30b、hsa-mir-548q、hsa-mir-29b-1、hsa-mir-570、hsa-mir-183、hsa-mir-1276、hsa-mir-208a、hsa-mir-186、hsa-mir-28-5p、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-548am、hsa-mir-320d、hsa-mir-3175、hsa-mir-3155、hsa-mir-548aa、hsa-mir-519e、hsa-mir-1270、hsa-mir-513b、hsa-mir-599、hsa-mir-518f、hsa-mir-4301、hsa-mir-30c、hsa-mir-3135、hsa-mir-4286、hsa-mir-202、hsa-mir-4263、hsa-mir-4299、hsa-mir-606、hsa-mir-3133、hsa-mir-583、hsa-mir-3125、hsa-mir-501-5p、hsa-mir-7-1、hsa-mir-514b-3p、hsa-mir-3155b、hsa-mir-548d-3p、hsa-mir-224、hsa-mir-7-2、hsa-mir-708、hsa-mir-3199、hsa-mir-514、hsa-mir-30e (例えば、Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013; Whisnant et al., MBio 4(2), 2013: e000193を参照されたい) ; (HNRNPA2B1の阻害剤) hsa-mir-92a-3p (MIRT049721)、hsa-mir-30c-5p (MIRT048009)、hsa-mir-191-5p (MIRT045809)、hsa-let-7f-5p (MIRT051404)、hsa-mir-27b-3p (MIRT046213)、hsa-mir-877-3p (MIRT037116)、hsa-mir-615-3p (MIRT040278)、hsa-mir-1260b (MIRT052680)、hsa-mir-103a-3p (MIRT027027)、hsa-mir-16-5p (MIRT031508)、hsa-mir-1296-5p (MIRT036075)、hsa-mir-197-3p (MIRT048098)、hsa-mir-548j、hsa-mir-3678-3p、hsa-mir-607、hsa-mir-188-5p、hsa-mir-15a、hsa-mir-3653、hsa-mir-371-5p、hsa-mir-550a、hsa-mir-3622b-3p、hsa-mir-548a-5p、hsa-mir-3170、hsa-mir-3148、hsa-mir-556-3p、hsa-mir-490-3p、hsa-mir-559、hsa-mir-200c、hsa-mir-130a、hsa-mir-548y、hsa-mir-548o、hsa-mir-23c、hsa-mir-491-3p、hsa-mir-335、hsa-mir-3667-3p、hsa-mir-466、hsa-mir-23b、hsa-mir-4310、hsa-mir-127-5p、hsa-mir-548b-5p、hsa-mir-6

16、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-320-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p
 (例えばHafner et al. Cell, 141 (1): 129-141, 2010; Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013を参照されたい) ; (Ythdf1の阻害剤) hsa-miR-548g、hsa-miR-204、hsa-miR-3143、hsa-miR-521、hsa-miR-195、hsa-miR-3182、hsa-miR-3941、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-563、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-1911、hsa-miR-26b、hsa-miR-190b、hsa-miR-33a、hsa-miR-329、hsa-miR-221、hsa-miR-612、hsa-miR-3185、hsa-miR-3156-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-664、hsa-miR-3657 ; (Ythdf2の阻害剤) hsa-miR-615-3p (MIRT040054)、hsa-miR-106b-5p (MIRT044257)、hsa-miR-1 (MIRT023842)、miR-145、hsa-miR-3607-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-301a、hsa-miR-519a、hsa-miR-141、hsa-miR-130b、hsa-miR-181b、hsa-miR-301b、hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262 (例えば、Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013; Selbach et al. Nature, 455 (7209): 58-63, 2008; Yang et al. J Biol Chem., 292 (9): 3614-3623, 2017を参照されたい) ; (Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR

-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、h

10

sa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-5481、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3182、hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRTO40734)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31705)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40974)、hsa-miR-155-5p (MIRTO20771)、hsa-miR-484 (MIRTO42324)、hsa-let-7c-5p (MIRTO51776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRTO43600)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO4

20

30

40

50

9064)、hsa-mir-615-3p(MIRT039779)、hsa-mir-877-3p(MIRT036964)、hsa-mir-222-3p(MIRT046746)、hsa-mir-423-3p(MIRT042468)、hsa-mir-324-3p(MIRT042887)、hsa-mir-124-3p(MIRT022932)、hsa-mir-3140-3p、hsa-mir-124、hsa-mir-198、hsa-mir-525-5p、hsa-mir-506、hsa-mir-520a-5p、hsa-mir-196a* hsa-mir-3117-3p、hsa-mir-342-5p(MIRT038210)、hsa-mir-378a-5p(MIRT043981)、hsa-mir-615-3p(MIRT040086)、hsa-let-7b-5p(MIRT052211)、hsa-mir-455-3p(MIRT037879)、hsa-mir-4267、hsa-mir-590-3p、hsa-mir-106b-5p(MIRT044355)、hsa-mir-320a(MIRT044466)、hsa-mir-16-5p(MIRT032018)、hsa-mir-155-5p(MIRT021009)、hsa-mir-4302、hsa-mir-191-5p(MIRT045793)、hsa-mir-1303(MIRT035890)、hsa-mir-193b-3p(MIRT016316)、hsa-mir-222-3p(MIRT046640)、hsa-mir-532-3p(MIRT037924)、hsa-mir-18a-3p(MIRT040929)、hsa-mir-92a-3p(MIRT049001)、hsa-mir-582-3p、hsa-mir-4265、hsa-mir-218-2、hsa-mir-1271、hsa-mir-340、hsa-mir-221、hsa-mir-20b、hsa-mir-508-3p、hsa-mir-141、hsa-mir-4325、hsa-mir-889、hsa-mir-29a、hsa-mir-129-3p、hsa-mir-129、hsa-mir-96、hsa-mir-3163、hsa-mir-187、hsa-mir-196a、hsa-mir-222、hsa-mir-1179、hsa-mir-182、hsa-mir-9* hsa-mir-32、hsa-mir-143、hsa-mir-4296(例えば、Helwak et al. Cell, 153(3): 654-656, 2013; Selbach et al. Nature, 455(7209): 58-63, 2008; Baek et al. Nature, 455(7209): 64-71, 2008; Leivonen et al. Mol Cell Proteomics, 10(7), 2011: M110.005322を参照されたい): (YTHDC1の阻害剤) hsa-mir-20a-3p(MIRT038967)、hsa-mir-103a-3p(MIRT027037)、hsa-mir-1(MIRT023492)、hsa-mir-19b-3p(MIRT031105)、hsa-mir-100-5p(MIRT048400)、hsa-mir-93-5p(MIRT027989)、hsa-mir-16-5p(MIRT031379)、hsa-let-7b-5p(MIRT052150)、hsa-mir-520f、hsa-mir-300、hsa-mir-15a、hsa-mir-200a、hsa-mir-605、hsa-mir-30d、hsa-mir-30a、hsa-mir-3613-3p、hsa-mir-509-3-5p、hsa-mir-34c-5p、hsa-mir-324-3p、hsa-mir-1248、hsa-mir-152、hsa-mir-548t、hsa-mir-4310、hsa-mir-145、hsa-mir-516a-3p、hsa-mir-16、hsa-mir-3668、hsa-mir-4277、hsa-mir-448、hsa-mir-16-2、hsa-mir-148b、hsa-mir-509-5p、hsa-mir-103a、hsa-mir-1265、hsa-mir-2115、hsa-mir-548c-3p、hsa-mir-148a、hsa-mir-548p、hsa-mir-513a-3p、hsa-mir-497、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-382、hsa-mir-30b、hsa-mir-543、hsa-let-7f-2、hsa-mir-1269、hsa-mir-3164、hsa-mir-503、hsa-mir-500a、hsa-mir-449a、hsa-mir-141、hsa-mir-424、hsa-mir-3908、hsa-mir-

889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262（例えば、Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013; Hafner et al. Cell, 141 (1): 129-141, 2010; Kishore et al, Nat Methods, 8 (7): 559-64, 2011; Memczak et al. Nature, 495 (7441): 333-8, 2013; Selbach et al. Nature, 455 (7209): 58-63, 2008; Chi et al. Nature. 460 (7254): 479-86, 2009を参照されたい）。

【0118】

本発明では、「小分子」という用語は、生物学的プロセスに影響を及ぼすように、特に、 m^6A mRNA修飾経路のメンバーをモジュレートするように作用し得る、ポリペプチドおよび核酸以外のあらゆる化学物質または他の部分を含む。小分子は、現在公知であり使用されている、または生物学的機能をスクリーニングする目的でそのような分子のライブラリーにおいて合成することができる任意の数の治療剤を含み得る。小分子は、巨大分子とはサイズによって区別される。本発明の小分子は、通常、分子量が約5,000ダルトン(Da)未満、好ましくは約2,500Da未満、より好ましくは1,000Da未満、最も好ましくは約500Da未満である。

【0119】

小分子としては、これだけに限定することなく、有機化合物、ペプチド模倣体およびそのコンジュゲートが挙げられる。本明細書で使用される場合、「有機化合物」という用語は、核酸およびポリペプチドなどの巨大分子以外のあらゆる炭素に基づく化合物を指す。炭素に加えて、有機化合物は、カルシウム、塩素、フッ素、銅、水素、鉄、カリウム、窒素、酸素、硫黄および他の元素を含み得る。有機化合物は、芳香族または脂肪族の形態であり得る。有機化合物の非限定的な例としては、アセトン、アルコール、アニリン、炭水化物、単糖、オリゴ糖、多糖、アミノ酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、レチノイド、ステロイド、プロテオグリカン、ケトン、アルデヒド、飽和、不飽和および多価不飽和脂肪、油およびワックス、アルケン、エステル、エーテル、チオール、硫化物、環式化合物、複素環化合物、イミダゾール、ならびにフェノールが挙げられる。本明細書で使用される場合、有機化合物は、ニトロ化有機化合物およびハロゲン化（例えば、塩素化）有機化合物も含む。

【0120】

好ましい小分子は、比較的容易かつ安価に製造される、製剤化されるまたは別の方法で調製される。好ましい小分子は、種々の保管条件下で安定である。好ましい小分子を巨大分子と密接に関連させて、生物活性があり、改善された薬学的性質を有する分子を形成することができる。改善された薬学的性質は、所望の生物活性に好都合である、循環時間、分布、代謝、修飾、排泄、分泌、排除、および安定性の変化を含む。改善された薬学的性質は、化学的実体の毒物学特性および有効性特性の変化を含む。

【0121】

一般に、ポリペプチド模倣体（「ペプチド模倣体」）は、ポリペプチドの生物活性を模倣するが、化学的性質においてペプチド性ではない分子である。一方、ある特定の実施形

態では、ペプチド模倣体は、ペプチド結合（すなわち、アミノ酸間のアミド結合）を含有しない分子であり、ペプチド模倣体という用語は、偽ペプチド（pseudo-peptide）、半ペプチド、およびペプトイドなどの、特性において完全にはペプチド性ではない分子を含み得る。

【0122】

本明細書で使用される場合、「生物学的物質（biologic）」という用語は、化学的プロセスとは対照的に、生きている供給源に由来する産物を意味する。「生物学的物質」の非限定的な例として、タンパク質、馴化培地、および組織から部分的に精製された産物が挙げられる。

【0123】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用される。本発明では、これらの用語は、連結したアミノ酸の配列を意味し、天然、合成、または天然および合成の修飾もしくは組合せであり得る。この用語は、抗体、抗体模倣体、ドメイン抗体、リポカリン、および標的化プロテアーゼを包含する。この用語は、ペプチドまたはペプチド断片に対する抗体を生じさせることが意図された、当該ペプチドまたはペプチド断片を含有するワクチンも含む。

【0124】

「抗体」は、本明細書で使用される場合、Fab、F(ab')₂、Fd、および単鎖抗体、ダイアボディ（diabody）、二重特異性抗体、および二機能性抗体を含めた、クラスIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEの抗体、またはその断片もしくは誘導体を含む。抗体は、所望のエピトープまたはそれに由来する配列に対する十分な結合特異性を示す、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アフィニティ精製された抗体、またはそれらの混合物であってよい。抗体は、キメラ抗体であってもよい。抗体は、当技術分野で公知の1つまたは複数の化学的部分、ペプチド部分、またはポリペプチド部分の付着によって誘導体化されていてよい。抗体は、化学的部分とコンジュゲートしていてよい。抗体は、ヒト抗体であってもヒト化抗体であってもよい。これらおよび他の抗体は、米国特許出願公開第20070065447号に開示されている。

【0125】

他の抗体様分子も本発明の範囲内に入る。そのような抗体様分子としては、例えば、受容体トラップ（例えば、エタネルセプト（etanercept）など）、抗体模倣体（例えば、例えばCompound Therapeutics, Inc.からの、フィブロネクチンに基づく「アドレス可能な」治療用結合性分子であるアドネクチンなど）、ドメイン抗体（天然に存在する単一ドメイン抗体の最小機能性断片（例えば、ナノボディなど；例えば、Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 2004 Apr 15; 64 (8): 2853-7）を参照されたい）が挙げられる。

【0126】

適切な抗体模倣体は、一般に、本明細書に記載の抗体および抗体断片の代替物として使用することができる。そのような抗体模倣体には、有利な性質が付随し得る（例えば、抗体模倣体は、水溶性、タンパク質分解に対して抵抗性、および／または非免疫原性であり得る）。例えば、モノクローナル抗体の第2の相補性決定領域（CDR）を模倣する合成ペーターループ構造を含むペプチドが提唱され、生成されている。例えば、Saragovi et al., Science. Aug. 16, 1991;253 (5021): 792-5を参照されたい。ペプチド抗体模倣体はまた、複数のCDR由来の抗原接触残基を含有するペプチド模倣体を設計するために、「活性な」抗原認識残基を決定するためのペプチドマッピング、分子モデリング、および分子動力学軌道分析(moleculardynamics trajectory analysis)を使用することによって生成されている。例えば、Cassett et al., BiochemBiophys Res Commun. Jul. 18, 2003;307 (1): 198-205を参照されたい。本発明に関して適用可能であり得る関連する原理、方法などに関する追加的な考察は、例えば、Fassina, Immunomethods. October 1994; 5 (2): 121-9に提示されている。

【0127】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」は、例えば、米国特許出願公開第20060275823号に開示されている通り、例えば、翻訳後修飾の基質標的化阻害をなすことができる標的化プロテアーゼを含む。

【0128】

「アンチセンス」分子は、本明細書で使用される場合、標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）配列に結合することができる一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含むアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを含む。所与のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを引き出す能力は、例えば、Stein and Cohen, Cancer Res. 48: 2659, (1988)およびvan der Krol et al., BioTechniques 6: 958, (1988)に記載されている。

10

【0129】

アンチセンス分子は、修飾されたまたは修飾されていないRNA、DNA、または混合ポリマーオリゴヌクレオチドであり得る。これらの分子は、対応する配列に特異的に結合し、それにより、立体的遮断またはRNase H酵素の活性化のいずれかによってペプチド合成を阻害することによって機能する（Wu-Pong, November 1994, BioPharm, 20-33）。アンチセンス分子はまた、RNAのプロセッシングまたは核から細胞質への輸送に干渉することにより、タンパク質合成を変更させることができる（Mukhopadhyay & Roth, 1996, Crit. Rev. in Oncogenesis 7, 151-190）。さらに、一本鎖DNAのRNAへの結合により、ヘテロ二重鎖のヌクレアーゼ媒介性分解がもたらされ得る（Wu-Pong、上記）。RNase Hの基質としての機能を果たすことがこれまで示されてきた骨格修飾DNA化学は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボロントリフルオリデート（boron trifluoride）、および2'-アラビノおよび2'-フルオロアラビノ含有オリゴヌクレオチドである。

20

【0130】

アンチセンス分子は、例えば、WO91/04753に記載されている通り、標的ヌクレオチド配列を含有する細胞に、リガンド結合性分子とコンジュゲートを形成することによって導入することができる。適切なリガンド結合性分子としては、これだけに限定されないが、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドが挙げられる。リガンド結合性分子のコンジュゲーションは、リガンド結合性分子のその対応する分子または受容体に結合する能力に実質的に干渉しない、または、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはそのコンジュゲートバージョンの細胞への進入を遮断しないものであることが好ましい。あるいは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、WO90/10448に記載されている通り、標的核酸配列を含有する細胞に、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成によって導入することができる。

30

【0131】

低分子干渉RNA（「siRNA」）という用語は、RNA干渉（RNAi）経路を誘導する低分子阻害性RNA二重鎖を指す（Elbashir, S. M. et al. Nature 411: 494-498 (2001); Caplen, N. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747 (2001); Harborth, J. et al. J Cell Sci. 114: 4557-4565 (2001)）。これらの分子は、長さ変動し得（一般に18〜30塩基対）、アンチセンス鎖内のそれらの標的mRNAに対して種々の程度の相補性を含有し得る。全てではないが一部、siRNAは、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の5'末端または3'末端に対になっていない突出塩基を有する。「siRNA」という用語は、2つの別々の鎖の二重鎖、ならびに二重鎖領域を含むヘアピン構造を形成し得る一本鎖を含む。本明細書で使用される場合、siRNA分子は、RNA分子に限定されず、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含する。siRNA遺伝子標的化は、細胞への一過性siRNA移入（リボソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、または微量注射のような古典的方法によって達成される）によって行うことができる。

40

【0132】

50

本発明のさらなる態様では、幹細胞および／またはCAR T細胞の数が少なくとも2倍増加する。幹細胞および／またはCAR T細胞の数が、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、またはそれよりも大きな増加を含め、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍など増加することが好ましい。驚いたことに、かつ予想外に、そのようなレベルの幹細胞および／またはCAR T細胞増大が、本発明の方法を使用して達成される。

【0133】

上記の通り、本発明の方法を使用して、任意の幹細胞の集団を増大することができる。本発明の方法に従って増大させることができる幹細胞は、造血幹細胞(HSC)、造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)、内皮前駆細胞(EPC)、間葉系幹細胞(MSC)、心臓幹細胞(CSC)、神経幹細胞(NSC)、およびこれらの組合せから選択することができることが好ましい。一態様によると、幹細胞は、HSCである。さらに別の態様によると、幹細胞は、MSCである。

【0134】

本発明の方法により、幹細胞を、増大した細胞が総コロニー形成単位(CFU)の少なくとも5倍の増加、例えば8倍、10倍、およびさらには15倍またはそれよりも大きな増大などを有するように増大させることもでき得る。さらに、当該方法により、CFU-顆粒球赤血球単球巨核球(GEMM)コロニーの少なくとも3.8倍、例えば、少なくとも4倍、5倍、およびさらには少なくとも8倍またはそれよりも大きな増大をもたらすことができ得る。

【0135】

本発明の別の実施形態は、実質的に未分化の幹細胞集団をex vivoで増大させるための方法である。この方法は、幹細胞集団の著しい分化を伴わずに未分化の幹細胞の数が増大するように、未分化の幹細胞集団におけるN⁶-メチルアデノシンmRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0136】

この実施形態では、幹細胞集団は、その集団内の十分な数の細胞が、レシピエントに移植されたときに自己複製する能力を保持し、種々の分化細胞型を生じさせること、例えば、HSC集団の場合では、移植した際にHSC系列を再配置させること(またはMSC集団の場合では、移植した際にMSC系列を再配置させること)ができれば、「実質的に未分化」である。本明細書で使用される場合、「著しい分化を伴わない」とは、増大した幹細胞集団が、多系列分化潜在性を維持する細胞を十分な数だけ有し、したがって、増大した幹細胞集団をレシピエントに移植した際に標的幹系列の全範囲を再生させることができることを意味する。したがって、例えば、HSC集団の場合では、増大したHSC集団は、レシピエントに移植されると、造血細胞系列全体を再生することができる。MSC集団の場合では、増大したMSC集団は、レシピエントに移植されると、間葉細胞系列全体を再生させることができる。

【0137】

別の実施形態は、キメラ抗原受容体(CAR) T細胞集団をex vivoで増大させるための方法である。この方法は、CAR T細胞の数が増大するようにCAR T細胞集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0138】

本発明のさらなる実施形態は、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た造血幹細胞(HSC)集団をex vivoで増大させるための方法である。この方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、HSC集団における多系列分化の潜在性を維持しながらHSC集団が十分な数量まで増大するように、HSC集団におけるN⁶-メチルアデノシンmRNA修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0139】

本発明のさらなる実施形態は、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た間葉系幹細胞（MSC）集団を *ex vivo* で増大させるための方法である。この方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、MSC 集団における多系列分化の潜在性を維持しながら、MSC 集団が十分な数量まで増大するように、MSC 集団における N⁶ -メチルアデノシン mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0140】

本発明のさらなる実施形態は、末梢血、臍帯血、および骨髄からなる群より選択される組織から得た T 細胞を改変することによって調製されたキメラ抗原受容体（CAR）T 細胞集団を *ex vivo* で増大させるための方法である。当該方法は、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、CAR T 細胞集団が十分な数量まで増大するように CAR T 細胞集団における N⁶ -メチルアデノシン（m⁶A）mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを含む。

【0141】

本明細書で使用される場合、組織から「得た」とは、ドナーから組織を採取または分割する任意の従来の方法を意味する。上記の通り、組織は、HSC および／もしくは MSC などの幹細胞、ならびに／またはキメラ抗原受容体を用いて改変することができる T 細胞を含有する任意の組織であってよい。したがって、例えば、組織は、末梢血または臍帯血試料などの血液試料から得ること、または骨髄から採取することができる。そのような試料を得るための方法は、当業者には周知である。本発明では、試料は、新鮮なもの、すなわち、凍結を伴わずにドナーから得たものであってよい。さらに、試料を、増大前にさらに操作して、外来または望ましくない構成成分を除去することができる。試料は、保存されたストックから得ることもできる。例えば、末梢血または臍帯血の場合では、試料を低温でまたは他のやり方で保存されたそのような血液のバンクから引き出すことができる。そのような試料は、任意の適切なドナーから得ることができる。ドナーは、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類であることが好ましい。さらに、試料は、自己または同種異系ドナーまたは供給源から得ることができる。試料は、自己供給源から得ることが好ましい。

【0142】

この方法では、「多系列分化の潜在性を維持すること」とは、増大した HSC および／または MSC 集団が、そのような移植を必要とする被験体に移植されたときに、造血系における全ての型の前駆細胞、例えば、CMP、GMP、MEP、および CLP、ならびに、最終的に、例えば、赤血球、Bリンパ球、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、および血小板を含めた全ての型の血液細胞を再生させる能力を有することを意味する。

【0143】

本発明では、「後続の移植のために十分な」増大した HSC および／または MSC および／または CAR T 細胞の数量は、一般に、移植後に約 1 % よりも大きな生着をもたらす HSC および／または MSC および／または CAR T 細胞の数に対応する。これは、上首尾の移植の許容される尺度の 1 つである。本発明では、実施例に記載されているものを含めた任意の従来の方法を使用して、% 生着を決定することができる。そのような測定は、競合細胞を用いてまたは用いずに、一般には、かつ好ましくは、競合細胞を用いずに行うことができる。（Zhang, C.C., et al., Nat Med, 12 (2): 240-5, 2006. Zhang, C.C. and H.F. Lodish, Blood, 105 (11): 4314-20, 2005）。

【0144】

上記の *ex vivo* 増大方法では、N⁶ -メチルアデノシン mRNA 修飾経路をモジュレートするステップを以前に記載されている通り達成することができる。N⁶ -メチルアデノシン mRNA 修飾経路をモジュレートするステップは、幹細胞および／もしくは CAR T 細胞に m⁶A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入すること、または幹細胞および／もしくは CAR T 細胞を小分子、生物学的物質、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA（siRNA）、およびこれらの組合せからなる

群より選択される m^6A mRNA 修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることを含み得る。

【0145】

ex vivo 増大方法の一態様では、 m^6A mRNA 修飾経路のモジュレーションは、 m^6A mRNA 修飾リーダー、 m^6A mRNA 修飾ライター、 m^6A mRNA 修飾イレイサー、およびこれらの組合せからなる群より選択される分子のモジュレーションを伴う。 m^6A 修飾ライターの非限定的な例としては、メッセンジャーRNAに m^6A 修飾を転写後に組み入れることができるメチルトランスフェラーゼが挙げられ、METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429 およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。 m^6A 修飾イレイサーの非限定的な例としては、メチル化を逆転させることができるデメチラーゼが挙げられ、FTI、ALKBH5 およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。 m^6A 修飾リーダーとしては、 m^6A メチル化mRNAに選択的に結合して、メチル化mRNAの選択的認識を通じて制御機能を発揮することができるタンパク質が挙げられる。適切な m^6A 修飾リーダーは、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNPA2B1、elf3 およびこれらの組合せからなる群より選択されるもののいずれかを含み得る。一態様によると、 m^6A 修飾リーダーは、タンパク質のYTHドメインファミリーのタンパク質を含み、それらとして、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2 およびこれらの組合せが挙げられる。(例えば、Wang et al. Nature, 505 (7481): 117-120, 2014; Frayling et al. Science, 316: 889-894, 2007; Zheng et al. Mol. Cell., 49: 18-29, 2012; Cao et al. Open Biol., 6(4): 160003, 2016; Maity et al. The FEBS Journal, 283 (9):1607-1630, 2016を参照されたい)。

【0146】

ex vivo 方法の一態様では、 m^6A mRNA 修飾経路をモジュレートするステップは、幹細胞および／またはCAR-T細胞に変異を導入して m^6A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む。例えば、変異は、 m^6A mRNA 修飾リーダー、 m^6A mRNA 修飾ライター、 m^6A mRNA イレイサー、およびこれらの組合せからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。一態様では、変異は、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、HNRNPC、HNRNPA2B1、elf3、およびこれらの組合せからなる群より選択される m^6A mRNA 修飾リーダーなどの m^6A mRNA 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。好ましい態様では、変異は、Ythdf2を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。さらに別の態様では、変異は、FTO、ALKBH5 およびこれらの組合せからなる群より選択される m^6A mRNA 修飾イレイサーなどの m^6A mRNA 修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。さらに別の態様では、変異は、METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429 およびこれらの組合せからなる群より選択される m^6A mRNA 修飾ライターなどの m^6A mRNA 修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。

【0147】

ex vivo 増大方法の一態様では、本明細書において以前に開示されている方法のいずれかによって変異を導入することができる。例えば、幹細胞および／またはCAR-T細胞をMx1-Cre 標的化系(例えば、Kuhn et al. Science, 269 (5229): 1427-1429, 1995を参照されたい)に曝露させることにより、 m^6A mRNA 修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させる変異を導入することができる。さらに別の態様では、幹細胞および／またはCAR-T細胞に低分子ヘアピン型RNA(shRNA)が組み込まれる変異を導入して、 m^6A mRNA 修飾経路内の

分子を発現する遺伝子の発現を低減させる。例えば、shRNAは、幹細胞および／またはCAR-T細胞をshRNAを送達するためのベクターに曝露させることによって導入することができ、当該ベクターは、レンチウイルスなどのウイルスベクターであってよい（例えば、Chiraet al. Oncotarget, 6 (31): 30675-30703, 2015を参照されたい）。shRNAは、遺伝子サイレンシングを誘発して遺伝子発現を制御することができるものであってよい（例えば、Paddison et al. Genes Dev., 16 (8): 948-958, 2002を参照されたい）。

【0148】

これらのex vivo増大方法では、一態様によると、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップは、例えば、m⁶A mRNA修飾リーダーを下方制御および／または阻害することなど、m⁶A mRNA修飾経路のメンバーを下方制御および／または阻害することを含む。本明細書で使用される場合、「下方制御すること」とは、m⁶A mRNA修飾経路のメンバーの量を阻害するもしくは減少させること、またはその活性を阻害するもしくは低下させることを意味する。そのような下方制御を、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、抗体、または小分子を使用して達成することができる。別の例として、m⁶A mRNA修飾リーダーを、幹細胞および／またはCAR-T細胞をm⁶A mRNAリーダーの阻害剤と接触させて、m⁶A mRNAリーダーによるm⁶A修飾されたmRNAへの結合および／またはその認識を阻害することによって下方制御することができる。一態様では、下方制御されるm⁶A mRNA修飾リーダーは、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2 B1、elf3およびこれらの組合せからなる群より選択される。好ましい態様では、下方制御されるm⁶A mRNA修飾リーダーは、Ythdf2である。Ythdf2のRNAを減衰させる役割は、以前に解明されている（例えば、Wang et al. Nature 505 (7481): 117-120, 2014を参照されたい）。m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤は、以下からなる群より選択されるもののいずれかであり得る：（HNRNPCの阻害剤）hsa-let-7e-5p（MIR T051596）、hsa-mir-455-3p（MIR T037890）、hsa-mir-30c-5p（MIR T047904）、hsa-mir-186-5p（MIR T045150）、hsa-mir-744-5p（MIR T037494）、hsa-mir-18a-3p（MIR T040851）、hsa-mir-484（MIR T042196）、hsa-mir-505-5p（MIR T037959）、hsa-mir-615-3p（MIR T039991）、hsa-mir-342-3p（MIR T043694）、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-484、hsa-mir-320b、hsa-mir-620、hsa-mir-30b、hsa-mir-548q、hsa-mir-29b-1、hsa-mir-570、hsa-mir-183、hsa-mir-1276、hsa-mir-208a、hsa-mir-186、hsa-mir-28-5p、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-548am、hsa-mir-320d、hsa-mir-3175、hsa-mir-3155、hsa-mir-548aa、hsa-mir-519e、hsa-mir-1270、hsa-mir-513b、hsa-mir-599、hsa-

10

20

30

40

50

miR-518f、hsa-miR-4301、hsa-miR-30c、hsa-miR-3135、hsa-miR-4286、hsa-miR-202、hsa-miR-4263、hsa-miR-4299、hsa-miR-606、hsa-miR-3133、hsa-miR-583、hsa-miR-3125、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-7-1、hsa-miR-514b-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-224、hsa-miR-7-2、hsa-miR-708、hsa-miR-3199、hsa-miR-514、hsa-miR-30e（例えば、Helwaket al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013; Whisnant et al., MBio 4 (2), 2013: e000193を参照されたい）；（HNRNPA2B1の阻害剤）hsa-miR-92a-3p（MIRTO49721）、hsa-miR-30c-5p（MIRTO48009）、hsa-miR-191-5p（MIRTO45809）、hsa-let-7f-5p（MIRTO51404）、hsa-miR-27b-3p（MIRTO46213）、hsa-miR-877-3p（MIRTO37116）、hsa-miR-615-3p（MIRTO40278）、hsa-miR-1260b（MIRTO52680）、hsa-miR-103a-3p（MIRTO27027）、hsa-miR-16-5p（MIRTO31508）、hsa-miR-1296-5p（MIRTO36075）、hsa-miR-197-3p（MIRTO48098）、hsa-miR-548j、hsa-miR-3678-3p、hsa-miR-607、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-15a、hsa-miR-3653、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-550a、hsa-miR-3622b-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-3170、hsa-miR-3148、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-559、hsa-miR-200c、hsa-miR-130a、hsa-miR-548y、hsa-miR-548o、hsa-miR-23c、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-335、hsa-miR-3667-3p、hsa-miR-466、hsa-miR-23b、hsa-miR-4310、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-16、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-3200-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-448、hsa-miR-1306、hsa-miR-944、hsa-miR-3684、hsa-miR-373、hsa-miR-103a、hsa-miR-380、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-1323、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-3674、hsa-miR-1252、hsa-miR-33b、hsa-miR-580、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-103a-2、hsa-miR-548w、hsa-miR-600、hsa-miR-634、hsa-miR-586、hsa-miR-497、hsa-miR-720、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-548q、hsa-let-7f-2、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-548l、hsa-miR-570、hsa-miR-374a、hsa-miR-1184、hsa-miR-649、hsa-miR-424、hsa-miR-3658、hsa-miR-186、hsa-miR-326、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-23a、hsa-miR-15b、hsa-miR-190、hsa-miR-203、hsa-miR-548h、hsa-miR-3136-5p、hsa-miR-618、hsa-miR-551b、hsa-miR-211、hsa-miR-1305、hsa-miR-513b、hsa-miR-96、hsa-miR-2117、hsa-miR-548n、hsa-miR-3910、hsa-miR-217、hsa-miR-892b、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-548i、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-4299、hsa-miR-1285、hsa-miR-3133、hsa-miR-483-3p（例えばHafneret al. Cell, 141 (1): 129-141, 2010; Helwak et al. Cell, 153 (

3): 654-655, 2013を参照されたい) ; (Y t h d f 1の阻害剤) h s a - m i R - 5 4
8 g、h s a - m i R - 2 0 4、h s a - m i R - 3 1 4 3、h s a - m i R - 5 2 1、
h s a - m i R - 1 9 5、h s a - m i R - 3 1 8 2、h s a - m i R - 3 9 4 1、h s
a - m i R - 3 4 c - 3 p、h s a - m i R - 7 6 7 - 3 p、h s a - m i R - 5 6 3、
h s a - m i R - 5 4 8 c - 5 p、h s a - m i R - 1 9 1 1、h s a - m i R - 2 6 b
、h s a - m i R - 1 9 0 b、h s a - m i R - 3 3 a、h s a - m i R - 3 2 9、h s
a - m i R - 2 2 1、h s a - m i R - 6 1 2、h s a - m i R - 3 1 8 5、h s a - m
i R - 3 1 5 6 - 5 p、h s a - m i R - 1 0 7、h s a - m i R - 6 6 4、h s a - m
i R - 3 6 5 7 ; (Y t h d f 2の阻害剤) h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p (M I R T 0
4 0 0 5 4)、h s a - m i r - 1 0 6 b - 5 p (M I R T 0 4 4 2 5 7)、h s a - m
i r - 1 (M I R T 0 2 3 8 4 2)、m i R - 1 4 5、h s a - m i R - 3 6 0 7 - 3 p
、h s a - m i R - 2 0 0 a、h s a - m i R - 3 0 1 a、h s a - m i R - 5 1 9 a、
h s a - m i R - 1 4 1、h s a - m i R - 1 3 0 b、h s a - m i R - 1 8 1 b、h s
a - m i R - 3 0 1 b、h s a - m i R - 3 1 1 7 - 3 p、h s a - m i R - 1 2 3 6、
h s a - m i R - 1 8 1 a、h s a - m i R - 5 1 9 c - 3 p、h s a - m i R - 5 5 1
b、h s a - m i R - 5 1 9 e、h s a - m i R - 5 1 9 b - 3 p、h s a - m i R - 1
9 b、h s a - m i R - 1 3 0 3、h s a - m i R - 6 0 8、h s a - m i R - 1 4 5、
h s a - m i R - 1 3 0 a、h s a - m i R - 1 8 1 c、h s a - m i R - 3 2 3 b - 3
p、h s a - m i R - 4 2 1、h s a - m i R - 5 1 5 - 5 p、h s a - m i R - 3 6 6
6、h s a - m i R - 1 8 1 d、h s a - m i R - 1 4 6 a、h s a - m i R - 4 2 9 5
、h s a - m i R - 4 5 4、h s a - m i R - 3 9 1 9、h s a - m i R - 1 9 a、h s
a - m i R - 5 4 3、h s a - m i R - 4 2 6 2 (例えば、Helwaket al. Cell, 153 (3)
: 654-655, 2013; Selbach et al. Nature, 455 (7209): 58-63,2008; Yang et al. J Bi
ol Chem., 292 (9): 3614-3623, 2017を参照されたい) ; (Y t h d f 3の阻害剤) h s
a - m i R - 5 8 2 - 3 p、h s a - m i R - 5 7 9、h s a - m i R - 5 2 0 e、h s
a - m i R - 5 2 0 f、h s a - m i R - 3 1 5 2 - 3 p、h s a - m i R - 1 0 6 a、
h s a - m i R - 3 0 d、h s a - m i R - 3 0 a、h s a - m i R - 9 3、h s a - m
i R - 5 0 8 - 5 p、h s a - m i R - 2 9 a、h s a - m i R - 3 1 4 8、h s a - m
i R - 4 9 0 - 5 p、h s a - m i R - 5 2 0 b、h s a - m i R - 2 0 a、h s a - m
i R - 4 0 9 - 3 p、h s a - m i R - 4 2 5 5、h s a - l e t - 7 i、h s a - m i
R - 3 7 3、h s a - l e t - 7 e、h s a - m i R - 5 2 0 c - 3 p、h s a - m i R
- 3 9 2 0、h s a - m i R - 1 2 7 - 5 p、h s a - m i R - 3 8 0、h s a - m i R
- 6 1 6、h s a - m i R - 4 2 7 7、h s a - m i R - 4 4 8、h s a - m i R - 1 6
- 2、h s a - l e t - 7 c、h s a - m i R - 3 4 0、h s a - m i R - 3 7 3、h s
a - m i R - 5 2 0 a - 3 p、h s a - m i R

- 1 4 4、h s a - m i R - 1 2 6 5、h s a - m i R - 5 4 8 x、h s a - m i R - 3
6 2 - 5 p、h s a - m i R - 3 3 b、h s a - m i R - 2 6 b、h s a - m i R - 1 7
、h s a - m i R - 5 6 9、h s a - m i R - 3 6 1 8、h s a - m i R - 5 7 6 - 5 p
、h s a - m i R - 9 2 2、h s a - m i R - 3 0 2 a、h s a - m i R - 1 0 6 b、h
s a - m i R - 8 8 8、h s a - m i R - 4 8 4、h s a - l e t - 7 b、h s a - m i
R - 5 8 2 - 5 p、h s a - l e t - 7 f、h s a - m i R - 3 0 b、h s a - m i R -
5 2 4 - 5 p、h s a - m i R - 3 0 2 d、h s a - l e t - 7 d、h s a - m i R - 5
1 3 a - 5 p、h s a - m i R - 5 0 0 a、h s a - m i R - 5 7 0、h s a - m i R -
5 4 8 1、h s a - m i R - 1 0 5、h s a - m i R - 3 7 4 c、h s a - l e t - 7 g
h s a - m i R - 3 7 2、h s a - m i R - 3 6 5 8、h s a - l e t - 7 a、h s a
- m i R - 3 9 0 8、h s a - m i R - 3 0 2 b、h s a - m i R - 5 2 6 b、h s a -
m i R - 1 9 0、h s a - m i R - 1 8 1 b、h s a - m i R - 4 3 3、h s a - m i R
- 9 8、h s a - m i R - 3 6 0 6、h s a - m i R - 5 9 5、h s a - m i R - 5 4 8

am、hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、
 hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-
 miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-
 miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-
 miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-
 miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-
 miR-513c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5-
 p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、h-
 sa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-318
 2、hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、
 hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、h-
 sa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p
 、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e
 、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elF3の阻害剤) hsa-
 miR-92b-3p (MIR T040734)、hsa-miR-16-5p (MIR
 T031705)、hsa-miR-18a-3p (MIR T040974)、hsa-
 miR-155-5p (MIR T020771)、hsa-miR-484 (MIR T0
 42324)、hsa-let-7c-5p (MIR T051776)、hsa-miR
 -3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-1
 5a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297
 、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、h-
 sa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-m
 iR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1
 206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2
 、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hs
 a-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR
 -151a-3p (MIR T043600)、hsa-miR-92a-3p (MIR T
 049064)、hsa-miR-615-3p (MIR T039779)、hsa-m
 iR-877-3p (MIR T036964)、hsa-miR-222-3p (MIR
 T046746)、hsa-miR-423-3p (MIR T042468)、hsa-
 miR-324-3p (MIR T042887)、hsa-miR-124-3p (MI
 RT022932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hs
 a-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa
 -miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-
 3p、hsa-miR-342-5p (MIR T038210)、hsa-miR-37
 8a-5p (MIR T043981)、hsa-miR-615-3p (MIR T040
 086)、hsa-let-7b-5p (MIR T052211)、hsa-miR-4
 55-3p (MIR T037879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-5
 90-3p、hsa-miR-106b-5p (MIR T044355)、hsa-mi
 r-320a (MIR T044466)、hsa-miR-16-5p (MIR T032
 018)、hsa-miR-155-5p (MIR T021009)、hsa-miR-
 4302、hsa-miR-191-5p (MIR T045793)、hsa-miR-
 1303 (MIR T035890)、hsa-miR-193b-3p (MIR T016
 316)、hsa-miR-222-3p (MIR T046640)、hsa-miR-
 532-3p (MIR T037924)、hsa-miR-18a-3p (MIR T04
 0929)、hsa-miR-92a-3p (MIR T049001)、hsa-miR
 -582-3p、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-m
 iR-1271、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-miR-
 20b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-4
 325、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-

3 p、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa-miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-miR-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32、hsa-miR-143、hsa-miR-4296（例えば、Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-656, 2013; Selbach et al. Nature, 455 (7209): 58-63, 2008; Baek et al, Nature, 455 (7209): 64-71, 2008; Leivonen et al. Mol Cell Proteomics, 10 (7), 2011: M110.005322を参照されたい）：（YTHDC1の阻害剤）hsa-miR-20a-3p（MIRT038967）、hsa-miR-103a-3p（MIRT027037）、hsa-miR-1（MIRT023492）、hsa-miR-19b-3p（MIRT031105）、hsa-miR-100-5p（MIRT048400）、hsa-miR-93-5p（MIRT027989）、hsa-miR-16-5p（MIRT031379）、hsa-let-7b-5p（MIRT052150）、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262（例えば、Helwak et al. Cell, 153 (3): 654-655, 2013; Hafner et al. Cell, 141 (1): 129-141, 2010; Kishore et al, Nat Methods, 8 (7): 559-64, 2011; Memczak et al. Nature, 495 (7441): 333-8, 2013; Selbach et al. Nature, 455 (7209): 58-63, 2008; Chi et al. Nature. 460 (7254): 479-86, 2009を参照されたい）。

【0149】

これらのex vivo増大方法では、幹細胞は、HSC、造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）、内皮前駆細胞、（EPC）、間葉系幹細胞（MSC）、心臓幹細胞（CSC）、神経幹細胞（NSC）、およびこれらの組合せから選択されることが好ましい。ある特定の態様によると、幹細胞は、HSCである。他の態様によると、幹細胞は、MSCであ

る。ex vivo増大方法では、CAR T細胞を含む細胞の集団を使用することもできる。これらの方法では、HSCおよび／またはMSCを、哺乳動物、例えば、霊長類またはヒトの臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得るが、任意のHSCおよび／またはMSCを含有する組織を使用することができる。

【0150】

造血幹細胞（HSC）集団をex vivoで増大させるための方法の別の態様では、幹細胞の数の増大は、少なくとも2倍、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍などであり、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、または少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含む。

10

【0151】

間葉系幹細胞（MSC）集団をex vivoで増大させるための方法の別の態様では、幹細胞の数の増大は、少なくとも2倍、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍などであり、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、または少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含む。

【0152】

CAR T細胞集団をex vivoで増大させるための方法の別の態様では、CAR T細胞の数の増大は、少なくとも2倍、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍などであり、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、または少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含む。

20

【0153】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明の方法、例えば、実質的に未分化の幹細胞集団をex vivoで増大させるための方法または造血幹細胞（HSC）集団をex vivoで増大させるための方法などによって作製された、増大した実質的に未分化の幹細胞集団である。

【0154】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明の方法、例えば、実質的に未分化の幹細胞集団をex vivoで増大させるための方法または間葉系幹細胞（MSC）集団をex vivoで増大させるための方法などによって作製された、増大した実質的に未分化の幹細胞集団である。

30

【0155】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明の方法、例えば、CAR T細胞集団をex vivoで増大させるための方法などによって作製された増大したCAR T細胞集団である。

【0156】

本発明の追加的な実施形態は、造血幹細胞（HSC）をex vivoで少なくとも2倍に増大させるための方法であって、増大したHSCが、それを必要とする哺乳動物の被験体に移植されたときにHSC系列を再構成する能力を有する、方法である。この方法は、幹細胞に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、HSCの集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む。

40

【0157】

本発明の追加的な実施形態は、間葉系幹細胞（MSC）をex vivoで少なくとも2倍増大させるための方法であって、増大したMSCが、それを必要とする哺乳動物の被験体に移植されたときにMSC系列を再構成する能力を有する、方法である。この方法は、幹細胞に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、HSCの集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む。

50

【0158】

本発明の追加的な実施形態は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞を *ex vivo* で少なくとも2倍増大させるための方法であって、増大したCAR T細胞が、それを必要とする哺乳動物の被験体に移植されたときにがんおよび／または血液障害を処置する能力を有する、方法である。この方法は、CAR T細胞に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、CAR T細胞の集団を適切な培養培地中で培養するステップとを含む。

【0159】

本発明のこの態様では、「HSC系列を再構成する能力を有する」とは、増大したHSCが、適切な哺乳動物の被験体に移植された時に、レシピエントにおいて1%を超える生着をもたらし、生着した細胞が、正常に機能する造血系を有するために必要な細胞系列に分化することができることを意味する。本発明のこの態様では、「MSC系列を再構成する能力を有する」とは、増大したMSCが、適切な哺乳動物の被験体に移植された時に、レシピエントにおいて1%を超える生着をもたらし、生着した細胞が、正常に機能する造血系を有するために必要な細胞系列に分化することができることを意味する。本発明のこの態様では、「がんおよび／または血液障害を処置する能力を有する」とは、増大したCAR T細胞が、適切な哺乳動物の被験体に移植された時に、哺乳動物の被験体が罹患しているがんおよび／または血液障害、例えば、白血病およびリンパ腫の少なくとも1つなどの処置をもたらすことができることを意味する。この方法では、本明細書では互換的に使用される「適切な培養培地」、「液体培地」および「培地」は、幹細胞集団および／またはCAR T細胞集団を必要な期間にわたって維持することができる生理的に平衡させた塩類溶液を意味し、当該溶液には、必要に応じて、適切な本発明の m^6A mRNA修飾経路モジュレーターを補充することができる。そのような基本的な培養培地は当技術分野で周知である。HSCのための適切な基本的な培養培地の非限定的な例は、 $10\mu g/ml$ のヘパリン、 $5\times$ ペニシリン／ストレプトマイシン、 $10ng/ml$ の組換えマウス（rm）幹細胞因子、および $20ng/ml$ のrm-トロポポエチンを補充したStem Span培地（Stem Cell Technologies；Cat. No. 09600）である。

【0160】

本発明の一態様では、HSCおよび／またはMSCおよび／またはCAR T細胞を *ex vivo* で少なくとも2倍増大させることは、本明細書に記載されている方法のいずれかによって実施することができる。例えば、方法は、Ythdf2などの m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる変異を導入することを伴い得る。さらに、変異は、例えば、幹細胞および／またはCAR T細胞を m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系に曝露させることによってなど、本明細書に記載の方法のいずれかによって導入することができる。変異は、幹細胞および／またはCAR T細胞にshRNAを組み込んで m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させることによって導入することもできる。変異を導入する他の方法、および本明細書に記載されている他の m^6A mRNA修飾リーダーを標的とする変異も提供することができる。

【0161】

この実施形態の一態様では、HSCおよび／またはMSCおよび／またはCAR T細胞を、臍帯血、末梢血、および骨髓から選択される哺乳動物組織、好ましくは霊長類またはヒト組織から得る。この実施形態では、HSCおよび／またはMSCおよび／またはCAR T細胞の数を少なくとも2倍、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍など、および少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、増大させる。

【0162】

10

20

30

40

50

本発明のさらに別の実施形態は、造血幹細胞（HSC）集団、間葉系幹細胞（MSC）集団、および／またはCAR-T細胞集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットである。キットは、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団にm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するための系と、その使用に関する指示とを含む。キットにおいて、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団に変異を導入するための系は、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団にYthdf2を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる1種または複数種の試薬を含むことが好ましい。例えば、キットは、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系を含む、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団に変異を導入するための系を含み得る。キットは、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団にshRNAを組み込んでm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるレンチウイルスを送達するための試薬を含む、HSC、MSCおよび／またはCAR-T細胞集団に変異を導入するための系も含み得る。キットは、変異を導入して、例えば、Ythdf2を含めたm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることによってなど、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするための本明細書に記載の他の系／方法をさらに含み得る。キットおよびその中の構成成分は、分配および／または保管のための任意の適切な様式で包装することができる。

【0163】

さらに別の実施形態では、造血幹細胞集団（HSC）集団および／または間葉系幹細胞（MSC）集団および／またはCAR-T細胞集団を後続のそれを必要とする被験体への移植のために増大させるためのキットが提供される。キットは、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤と、その使用に関する指示とを含み、ここで、阻害剤は、本明細書に開示される阻害剤のいずれか、例えば、Ythdf2の阻害剤などであってよい。

【0164】

この実施形態の一態様では、キットは、幹細胞および／またはCAR-T細胞の数の、少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大からなる群より選択される倍数での増大をもたらすことができるものであり得る。

【0165】

本発明のさらなる実施形態は、造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）HSC集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、およびm⁶A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのHSC集団への組み込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、HSCは、任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などから得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0166】

本発明のさらなる実施形態は、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）MSC集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験

体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、およびm⁶A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのMSC集団への組み込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、MSCは、任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などから得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0167】

本発明のさらなる実施形態は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、（b）試料を適切な培養培地中で試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、およびm⁶A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのCAR T細胞集団への組み込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、CAR T細胞は、任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などから得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0168】

本発明のさらなる実施形態は、造血幹細胞（HSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物からm⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）HSCを被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、HSCは、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0169】

本発明のさらなる実施形態は、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）MSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物からm⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）MSCを被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、MSCは、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0170】

本発明のさらなる実施形態は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞をそれを必要とする被験体に投与するための方法である。当該方法は、（a）CAR T細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、m⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、（b）培養物からm⁶A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、（c）CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、CAR T細胞は、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択さ

れる組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0171】

本発明の追加的な実施形態は、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法である。当該方法は、(a) HSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、(b) 試料を適切な培養培地中で試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(c) HSCを被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、および m^6A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのHSC集団への組込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、HSCは、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

10

【0172】

本発明の追加的な実施形態は、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法である。当該方法は、(a) MSC集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、(b) 試料を適切な培養培地中で、試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(c) MSCを被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、および m^6A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのMSC集団への組込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、MSCは、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

20

【0173】

本発明の追加的な実施形態は、それを必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための方法である。当該方法は、(a) CAR T細胞集団を含有する試料に、 m^6A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、(b) 試料を適切な培養培地中で試料中のCAR T細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(c) CAR T細胞を被験体に投与するステップとを含む。この実施形態では、変異を導入する方法、および m^6A mRNA修飾リーダーを標的とする変異は、例えば、Ythdf2を発現する遺伝子の欠失をもたらす変異、またはYthdf2を発現する遺伝子の発現を低減させるshRNAのCAR T細胞集団への組込みをもたらす変異など、以前に開示された通りである。さらに、CAR T細胞は、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

30

40

【0174】

さらに別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法が提供される。この方法は、(a) HSC集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中のHSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(b) 培養物から m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、(c) HSCを被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、HSCは、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができ、

50

被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0175】

さらに別の実施形態では、それを必要とする被験体において骨髓を再構成するための別の方法が提供される。この方法は、(a) MSC 集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中の MSC の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(b) 培養物から m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、(c) MSC を被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2 の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、MSC は、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができる、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

10

【0176】

これらの方法では、「骨髓を再構成する」とは、正常な骨髓機能が損なわれた、疾患に罹患している被験体における骨髓の全部または一部分の修復を意味する。そのような疾患の非限定的な例としては、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群 (MDS)、発作性夜間血色素尿症 (PNH) などの血液障害、および白血病などの血液がんが挙げられる。したがって、本明細書で使用される場合、「再構成された」とは、移植された HSC および／または MSC が、宿主において首尾よく生着し、骨髓において一般に見いだされるまたは骨髓に由来する全ての細胞系列に分化することができることを意味する。本発明の方法の態様は、白血病およびリンパ腫などの血液障害を処置するために、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織から得た HSC および／または MSC を被験体に移植することを伴い得る。

20

【0177】

さらに別の実施形態では、それを必要とする被験体においてがんおよび／または血液障害を処置するための別の方法が提供される。この方法は、(a) キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞集団を含有する試料を、適切な培養培地中、 m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤の存在下で、試料中の CAR T 細胞の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップと、(b) 培養物から m^6A mRNA 修飾リーダーの阻害剤を除去するステップと、(c) CAR T 細胞を被験体に投与するステップとを含む。この方法では、阻害剤は、例えば、Ythdf2 の阻害剤など、以前に開示された通りである。さらに、CAR T 細胞を調製するために改変される T 細胞は、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などの任意の適正な組織から得ることができる、被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

30

【0178】

これらの方法では、「被験体におけるがんおよび／または血液障害を処置する」とは、がんおよび／または血液障害に罹患している被験体におけるがん細胞を根絶すること、症候を緩和すること、または他のやり方で病態を軽減することを意味する。がんおよび／または血液障害の非限定的な例としては、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群 (MDS)、発作性夜間血色素尿症 (PNH) などの血液障害、ならびに白血病およびリンパ腫などの血液がんが挙げられる。

40

【0179】

これらの方法では、「HSC の数を増大させるのに十分な期間」とは、培養下の HSC を、1 回または複数回の移植のために十分な数の HSC が存在する点まで増大させるための最小の時間の量を意味し、「MSC の数を増大させるのに十分な期間」とは、培養下の MSC を、1 回または複数回の移植のために十分な数の MSC が存在する点まで増大させるための最小の時間の量を意味する。同様に、「CAR T 細胞の数が増大するのに十分な期間」とは、培養下の CAR T 細胞を、1 回または複数回の移植のために十分な数の CAR T 細胞が存在する点まで増大させるための最小の時間の量を意味する。一般には、そのような期間は、培養下で少なくとも約 10 日間であり得る。ある特定の状況下では、幹細胞および／または CAR T 細胞、例えば、HSC および／または MSC 集団を単

50

回の移植に必要なものを超えて増大させることが望ましい場合がある。例えば、幹細胞および／またはCAR T細胞、例えば、HSCおよび／またはMSC集団を、例えば、約2～約100回の移植などの複数回の移植のために十分な数まで増大させることが望ましい場合がある。これらの状況では、過剰な細胞を後で使用するために、例えば、凍結保存などの任意の従来の方法によって保存することができる。

【0180】

以前に示されている通り、「移植のために十分な数」とは、レシピエントにおける1%を超える生着を達成するために必要な幹細胞、例えば、HSCおよび／またはMSCおよび／またはCAR T細胞の最小数を意味する。「HSCを被験体に投与する」とは、これだけに限定されないが、HSCを外科的におよび／または静脈内に送達することを含めた、被験体にHSCを送達するための従来の方法を意味する。「MSCを被験体に投与する」とは、これだけに限定されないが、MSCを外科的におよび／または静脈内に送達することを含めた、被験体にMSCを送達するための従来の方法を意味する。「CAR T細胞を被験体に投与する」とは、これだけに限定されないが、MSCを外科的におよび／または静脈内に送達することを含めた、被験体にCAR T細胞を送達するための従来の方法を意味する。これらの実施形態では、HSCおよび／またはMSCおよび／またはT細胞を得る組織、ならびにm⁶A mRNA修飾リーダー阻害剤は、以前に開示されている通りである。

10

【0181】

本発明の追加的な実施形態は、造血幹細胞（HSC）の集団を増大させるための方法である。この方法は、HSCの集団をHSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、ここで、増大したHSCの集団は、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである。この実施形態では、「HSC集団の増大をもたらすのに十分な条件」は、培養下のHSCの、例えば、少なくとも2倍の増大、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大などの増大をもたらし得る条件である。「哺乳動物への移植に適した」とは、HSCの数および質が、それを必要とする哺乳動物レシピエント、例えば、ヒトレシピエントを含めた霊長類レシピエントなどにおける1%を超える生着を支持するために十分であることを意味する。

20

30

【0182】

本発明の追加的な実施形態は、間葉系幹細胞（MSC）の集団を増大させるための方法である。この方法は、MSCの集団を、MSC集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、ここで、増大したMSCの集団は、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである。この実施形態では、「MSC集団の増大をもたらすのに十分な条件」は、培養下のMSCの、例えば、少なくとも2倍の増大、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大などをもたらし得る条件である。「哺乳動物への移植に適した」とは、MSCの数および質が、それを必要とする哺乳動物レシピエント、例えば、ヒトレシピエントを含めた霊長類レシピエントなどにおける1%を超える生着を支持するために十分であることを意味する。

40

【0183】

本発明の追加的な実施形態は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の集団を増大させるための方法である。この方法は、CAR T細胞の集団を、CAR T細胞集団の少なくとも2倍の増大をもたらすのに十分な条件下で培養するステップを含み、ここで、増大したCAR T細胞の集団は、それを必要とする哺乳動物への移植に適するものである。この実施形態では、「CAR T細胞集団の増大をもたらすのに十分な条件」は、培養下のCAR T細胞の、例えば、少なくとも2倍の増大、例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも8倍、

50

少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大などをもたらす得る条件である。「哺乳動物への移植に適した」とは、CAR T細胞の数および質が、それを必要とする哺乳動物レシピエント、例えば、ヒトレシピエントを含めた霊長類レシピエントなどにおける1%を超える生着を支持するために十分であることを意味する。

【0184】

本発明のさらに別の実施形態は、骨髓移植、末梢血移植、または臍帯血移植を必要とする被験体を処置するための方法であって、被験体に、本明細書に開示される方法、特に、造血幹細胞(HSC)の集団を増大させるための方法によって得たHSCの集団を投与するステップを含む方法である。被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

10

【0185】

本発明のさらに別の実施形態は、骨髓移植、末梢血移植、または臍帯血移植を必要とする被験体を処置するための方法であって、被験体に、本明細書に開示される方法、特に、間葉系幹細胞(MSC)の集団を増大させるための方法によって得たMSCの集団を投与するステップを含む方法である。被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

【0186】

本発明のさらに別の実施形態は、がんおよび／または血液障害に罹患している被験体を処置するための方法であって、被験体に、本明細書に開示される方法、特に、CAR T細胞の集団を増大させるための方法によって得たCAR T細胞の集団を投与するステップを含む方法である。被験体は、ヒトなどの哺乳動物とすることができる。

20

【0187】

本発明のさらなる実施形態は、造血幹細胞(HSC)の集団を増大させるための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からHSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b)試料由来のHSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)HSC集団が少なくとも2倍増大し、(ii)増大したHSC集団が総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有する、ステップとを含む。この実施形態の一態様では、HSC集団は、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも4倍、例えば、少なくとも5倍増大する。この実施形態の別の態様では、哺乳動物は、ヒトを含めた霊長類である。ヒトは、末梢血移植、臍帯血移植、または骨髓移植を必要としていることが好ましい。別の態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。

30

【0188】

本発明のさらなる実施形態は、間葉系幹細胞(MSC)の集団を増大させるための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b)試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)MSC集団が少なくとも2倍増大する、ステップとを含む。この実施形態の一態様では、MSC集団は、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも2.5倍、例えば、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、例えば、少なくとも5倍増大する。この実施形態の別の態様では、哺乳動物は、ヒトを含めた霊長類である。ヒトは、末梢血移植、臍帯血移植、または骨髓移植を必要としていることが好ましい。さらなる態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。

40

【0189】

本発明のさらなる実施形態は、キメラ抗原受容体(CAR) T細胞の集団を増大させるための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からT細胞集団を含む組織試料を得るステップと、(b)T細胞集団をキメラ抗原受容体を用いて改変してCAR T細胞集団をもたらすステップと、(c)試料由来のCAR T細胞集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)CAR T細胞集団が少なくとも2倍増大する、ステップ

50

とを含む。この実施形態の一態様では、CAR T細胞集団は、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも2.5倍、例えば、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、例えば、少なくとも5倍増大する。この実施形態の別の態様では、哺乳動物は、ヒトを含めた霊長類である。ヒトは、がんおよび／または血液障害に罹患していることが好ましい。さらなる態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。

【0190】

本発明の追加的な実施形態は、それを必要とするレシピエントにおいて造血幹細胞系列を再構成するための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からHSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b)試料由来のHSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)HSC集団が少なくとも2倍、例えば、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも4倍増大し、(ii)増大したHSC集団が、総コロニー形成単位の少なくとも5倍の増加を有する、ステップと、(c)増大したHSC集団を霊長類またはヒトを含めた哺乳動物などのそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む。この実施形態では、ヒトレシピエントは、末梢血移植、臍帯血移植または骨髓移植を必要としている。したがって、さらなる態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。試料は、自己供給源または同種異系供給源から得ることができる。試料は、自己供給源から得ることが好ましい。

【0191】

本発明の追加的な実施形態は、それを必要とするレシピエントにおいて間葉系幹細胞(MSC)系列を再構成するための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からMSC集団を含む組織試料を得るステップと、(b)試料由来のMSC集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)MSC集団が少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも2倍、例えば、少なくとも4倍増大する、ステップと、(c)増大したMSC集団を霊長類またはヒトを含めた哺乳動物などのそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む。この実施形態では、ヒトレシピエントは、末梢血移植、臍帯血移植または骨髓移植を必要としている。したがって、さらなる態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。試料は、自己供給源または同種異系供給源から得ることができる。試料は、自己供給源から得ることが好ましい。

【0192】

本発明の追加的な実施形態は、がんおよび／または血液障害に罹患している被験体を処置するための方法である。当該方法は、(a)哺乳動物からT細胞集団を含む組織試料を得るステップと、(b)T細胞集団をキメラ抗原受容体(CAR)を用いて改変してCAR T細胞集団を形成するステップと、(c)試料由来のCAR T細胞集団を*in vitro*で増大させるステップであって、(i)CAR T細胞集団が少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれよりも大きな増大を含め、少なくとも2倍、例えば、少なくとも4倍増大する、ステップと、(c)増大したCAR-T細胞集団を霊長類またはヒトを含めた哺乳動物などのそれを必要とする被験体に移植するステップとを含む。この実施形態では、ヒトレシピエントは、例えば、白血病および／またはリンパ腫に罹患している。したがって、さらなる態様では、組織試料を任意の適正な組織、例えば、臍帯血、末梢血、および骨髓からなる群より選択される組織などから得る。試料は、自己供給源または同種異系供給源から得ることができる。試料は、自己供給源から得ることが好ましい。

【0193】

本発明の複数の態様では、増大したHSC集団は、最も原始的かつ長期間未分化のヒトHSCのマーカーであるCD34⁻またはCD34⁺/CD38⁻/10⁰/Thy-1

+ / CD 9 0 + / K i t - / ¹ o / L i n - / CD 1 3 3 + V E G F R 2 + ; ヒト H S C およびそれらの前駆細胞のマーカーである CD 1 5 0 + / CD 4 8 - / CD 2 4 4 - ; ならびに / または非自己複製性多分化能造血前駆細胞のマーカーである CD 1 5 0 - / CD 4 8 - / CD 2 4 4 + および CD 1 5 0 - / CD 4 8 + / CD 2 4 4 + 、ならびにこれらの組合せからなる群より選択される表現型を有する H S C を含むことが好ましい (例えば、Mimeault, M., et al., Stem Cells: A Revolution in Therapeutics -Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. Clin Pharmacol Ther., 82 (3):252-64 (2007)を参照されたい)。本発明の複数の態様では、増大した M S C 集団および / または増大に供される M S C 集団は、N-カドヘリン+および CD 1 0 5 +、ならびにこれらの組合せからなる群より選択される表現型を有する M S C を含むことが好ましい。すなわち、本明細書に記載の実施形態のいずれかの M S C 集団は、N-カドヘリン+ M S C および CD 1 0 5 + M S C からなる群より選択される少なくとも 1 種の M S C を含み得る。一実施形態では、M S C 集団は、N-カドヘリン+ M S C を含む。

10

【0194】

増大した H S C および / または M S C 集団が全体としてレシピエントにおける少なくとも 1 % の生着をもたらすために十分である限りは、集団内のこれらのマーカーを有する H S C および / または M S C の正確な割合は重要ではない。

【0195】

別の実施形態では、本発明は、そのような増大を必要とする哺乳動物において造血幹細胞集団を増大させるための方法である。この方法は、哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) m R N A 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物において造血系列を再構成する能力を有する H S C を含む、H S C 集団を少なくとも 2 倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む。

20

【0196】

別の実施形態では、本発明は、そのような増大を必要とする哺乳動物において間葉系幹細胞集団を増大させるための方法である。この方法は、哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) m R N A 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物における間葉系系列を再構成する能力を有する M S C を含む、M S C 集団を少なくとも 2 倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む。

30

【0197】

別の実施形態では、本発明は、そのような増大を必要とする哺乳動物においてキメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞集団を増大させるための方法である。この方法は、哺乳動物に、N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) m R N A 修飾経路のモジュレーターを治療有効量で、哺乳動物におけるがんおよび / または血液障害を処置する能力を有する C A R T 細胞を含む、C A R T 細胞集団を少なくとも 2 倍増大させるのに十分な期間にわたって投与するステップを含む。

【0198】

これらの方法では、モジュレーターは、本明細書で以前に開示されている通りであってよく、かつ / または、モジュレーションを本明細書に開示される任意の方法によって実施することができる。例えば、モジュレーターは、H S C および / または M S C および / または C A R T 細胞集団に、Y t h d f 2 などの N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させる変異を導入するための系を含み得る。さらに別の例として、モジュレーターは、Y t h d f 2 の阻害剤などの N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) m R N A 修飾リーダーの阻害剤を含み得る。増大を必要とする哺乳動物は、ヒトであってよい。

40

【0199】

別の実施形態では、本発明は、生体試料から間葉系幹細胞 (M S C) を単離する方法であって、M S C の集団を有する生体試料を 1 種または複数種の N-カドヘリン抗体と接触させるステップを含む方法を含む。例えば、ある特定の態様によると、生体試料は、末梢

50

血、臍帯血および骨髄からなる群より選択される組織を含む。さらに、ある特定の実施形態では、MSCを単離する方法は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによってなどで、間葉系幹細胞の数が増大するようにMSCの集団におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)mRNA修飾経路をモジュレートすることによって生体試料由来のMSCの集団を増大させる1つまたは複数のステップをさらに含み得る。一実施形態では、MSCの集団を、生体試料から単離した後に増大させる。別の実施形態では、生体試料中のMSCの集団を、生体試料からMSCを単離する前に増大させる。一実施形態では、MSC集団を、後続のそれを必要とする被験体への移植のために十分に、MSC集団における多系列分化の潜在性を維持しながら十分な数量まで増大させ、したがって、当該方法によって単離されたMSCをそのような移植のために使用することができる。例えば、単離されたMSCをヒト被験体に移植することができる。さらに別の実施形態によると、N-カドヘリン抗体に加えてまたはその代替としてのいずれかで、CD105抗体と接触させることにより、生体試料からMSCをさらに単離することができる。なおさらなる実施形態では、生体試料をN-カドヘリン抗体と接触させ、N-カドヘリン抗体に結合する細胞を検出することにより、N-カドヘリン抗体を使用して生体試料中のMSCを同定することができる。

【0200】

一実施形態では、MSCを単離する方法は、例えば、本明細書に記載のモジュレーション方法のいずれかによってなどで、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートすることによって、幹細胞にm⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーションをもたらす変異を導入することによって、または、幹細胞を、小分子、生物学的物質、アンチセンスRNA、低分子干渉RNA(sRNA)、およびこれらの組合せからなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾経路内の分子のモジュレーターと接触させることによってMSC集団を増大させることを含む。例えば、一実施形態では、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップは、幹細胞に変異を導入してm⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換える、またはその発現を低減させることを含む。一実施形態では、変異は、m⁶A mRNA修飾リーダー、m⁶A mRNA修飾ライター、およびm⁶A mRNAイレイサーからなる群より選択される分子を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。さらに別の実施形態では、変異は、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。一実施形態では、変異は、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2 B1、およびeIF3からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。別の実施形態では、変異は、Ythdf2を発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。一実施形態では、変異は、m⁶A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。一実施形態では、変異は、FTOおよびALKBH5からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾イレイサーを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。別の実施形態では、変異は、m⁶A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。一実施形態では、変異は、METTL3、METTL14、WTAPおよびKIAA1429からなる群より選択されるm⁶A mRNA修飾ライターを発現する遺伝子を欠失させる、置き換えるまたはその発現を低減させるものである。

【0201】

別の実施形態では、MSCを単離する方法は、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートすることによって、幹細胞を、m⁶A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系に曝露させることによって、MSCの集団を増大させることを含む。一実施形態では、m⁶A mRNA修飾経路をモジュレートするステップは、幹細胞にshRNAが組み込まれる変異を導入

入して m^6A mRNA修飾経路内の分子を発現する遺伝子の発現を低減させることを含む。例えば、一実施形態では、shRNAは、幹細胞をレンチウイルスに曝露させてshRNAを送達することによって導入される。さらに別の実施形態によると、 m^6A mRNA修飾経路をモデュレートするステップは、 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することを含む。一実施形態では、 m^6A mRNA修飾リーダーは、Ythdf1、Ythdf2、Ythdf3、Ythdc1、Ythdc2、HNRNPC、HNRNP A2B1、およびelF3からなる群より選択される。例えば、一実施形態では、 m^6A mRNA修飾リーダーは、Ythdf2を含む。

【0202】

一実施形態では、MSCを単離する方法は、 m^6A mRNA修飾リーダーを下方制御することによって、幹細胞を、以下からなる群より選択されるもののいずれかなどの本明細書に記載のもののいずれかである m^6A mRNA修飾リーダーの阻害剤と接触させることによって、MSCの集団を増大させることをさらに含む：(HNRNPCの阻害剤) hsa-let-7e-5p (MIR T051596)、hsa-mir-455-3p (MIR T037890)、hsa-mir-30c-5p (MIR T047904)、hsa-mir-186-5p (MIR T045150)、hsa-mir-744-5p (MIR T037494)、hsa-mir-18a-3p (MIR T040851)、hsa-mir-484 (MIR T042196)、hsa-mir-505-5p (MIR T037959)、hsa-mir-615-3p (MIR T039991)、hsa-mir-342-3p (MIR T043694)、hsa-mir-3607-3p、hsa-mir-30d、hsa-mir-3916、hsa-mir-3162-5p、hsa-mir-1273d、hsa-mir-3161、hsa-mir-30a、hsa-mir-629、hsa-mir-208b、hsa-mir-489、hsa-mir-3148、hsa-mir-2113、hsa-mir-877、hsa-mir-455-5p、hsa-mir-186、hsa-mir-548o、hsa-mir-3139、hsa-mir-320a、hsa-mir-4311、hsa-mir-555、hsa-mir-3605-5p、hsa-mir-515-5p、hsa-mir-144、hsa-mir-499-5p、hsa-mir-1323、hsa-mir-548x、hsa-mir-299-5p、hsa-mir-653、hsa-mir-576-5p、hsa-mir-548p、hsa-mir-586、hsa-mir-888、hsa-mir-3647-3p、hsa-mir-484、hsa-mir-320b、hsa-mir-620、hsa-mir-30b、hsa-mir-548q、hsa-mir-29b-1、hsa-mir-570、hsa-mir-183、hsa-mir-1276、hsa-mir-208a、hsa-mir-186、hsa-mir-28-5p、hsa-mir-330-3p、hsa-mir-548am、hsa-mir-320d、hsa-mir-3175、hsa-mir-3155、hsa-mir-548aa、hsa-mir-519e、hsa-mir-1270、hsa-mir-513b、hsa-mir-599、hsa-mir-518f、hsa-mir-4301、hsa-mir-30c、hsa-mir-3135、hsa-mir-4286、hsa-mir-202、hsa-mir-4263、hsa-mir-4299、hsa-mir-606、hsa-mir-3133、hsa-mir-583、hsa-mir-3125、hsa-mir-501-5p、hsa-mir-7-1、hsa-mir-514b-3p、hsa-mir-3155b、hsa-mir-548d-3p、hsa-mir-224、hsa-mir-7-2、hsa-mir-708、hsa-mir-3199、hsa-mir-514、hsa-mir-30e；(HNRNP A2B1の阻害剤) hsa-mir-92a-3p (MIR T049721)、hsa-mir-30c-5p (MIR T048009)、hsa-mir-191-5p (MIR T045809)、hsa-let-7f-5p (MIR T051404)、hsa-mir-27b-3p (MIR T046213)、hsa-mir-877-3p (MIR T037116)、hsa-mir-615-3p

10

20

30

40

50

(M I R T 0 4 0 2 7 8) 、 h s a - m i r - 1 2 6 0 b (M I R T 0 5 2 6 8 0) 、 h
s a - m i r - 1 0 3 a - 3 p (M I R T 0 2 7 0 2 7) 、 h s a - m i r - 1 6 - 5 p
(M I R T 0 3 1 5 0 8) 、 h s a - m i r - 1 2 9 6 - 5 p (M I R T 0 3 6 0 7 5)
、 h s a - m i r - 1 9 7 - 3 p (M I R T 0 4 8 0 9 8) 、 h s a - m i R - 5 4 8 j
、 h s a - m i R - 3 6 7 8 - 3 p 、 h s a - m i R - 6 0 7 、 h s a - m i R - 1 8 8
- 5 p 、 h s a - m i R - 1 5 a 、 h s a - m i R - 3 6 5 3 、 h s a - m i R - 3 7 1
- 5 p 、 h s a - m i R - 5 5 0 a 、 h s a - m i R - 3 6 2 2 b - 3 p 、 h s a - m i
R - 5 4 8 a - 5 p 、 h s a - m i R - 3 1 7 0 、 h s a - m i R - 3 1 4 8 、 h s a -
m i R - 5 5 6 - 3 p 、 h s a - m i R - 4 9 0 - 3 p 、 h s a - m i R - 5 5 9 、 h s
a - m i R - 2 0 0 c 、 h s a - m i R - 1 3 0 a 、 h s a - m i R - 5 4 8 y 、 h s a
- m i R - 5 4 8 o 、 h s a - m i R - 2 3 c 、 h s a - m i R - 4 9 1 - 3 p 、 h s a
- m i R - 3 3 5 、 h s a - m i R - 3 6 6 7 - 3 p 、 h s a - m i R - 4 6 6 、 h s a
- m i R - 2 3 b 、 h s a - m i R - 4 3 1 0 、 h s a - m i R - 1 2 7 - 5 p 、 h s a
- m i R - 5 4 8 b - 5 p 、 h s a - m i R - 6 1 6 、 h s a - m i R - 1 6 、 h s a -
m i R - 3 3 8 - 3 p 、 h s a - m i R - 3 2 0 0 - 5 p 、 h s a - m i R - 3 6 2 - 3
p 、 h s a - m i R - 4 4 8 、 h s a - m i R - 1 3 0 6 、 h s a - m i R - 9 4 4 、 h
s a - m i R - 3 6 8 4 、 h s a - m i R - 3 7 3 、 h s a - m i R - 1 0 3 a 、 h s a
- m i R - 3 8 0 、 h s a - m i R - 4 9 9 - 5 p 、 h s a - m i R - 1 3 2 3 、 h s a
- m i R - 3 2 3 - 5 p 、 h s a - m i R - 3 6 7 4 、 h s a - m i R - 1 2 5 2 、 h s
a - m i R - 3 3 b 、 h s a - m i R - 5 8 0 、 h s a - m i R - 5 4 8 c - 3 p 、 h s
a - m i R - 1 0 3 a - 2 、 h s a - m i R - 5 4 8 w 、 h s a - m i R - 6 0 0 、 h s
a - m i R - 6 3 4 、 h s a - m i R - 5 8 6 、 h s a - m i R - 4 9 7 、 h s a - m i
R - 7 2 0 、 h s a - m i R - 6 5 4 - 3 p 、 h s a - m i R - 5 2 4 - 5 p 、 h s a -
m i R - 5 4 3 、 h s a - m i R - 5 4 8 q 、 h s a - l e t - 7 f - 2 、 h s a - m i
R - 3 3 0 - 5 p 、 h s a - m i R - 5 0 0 a 、 h s a - m i R - 5 4 8 l 、 h s a - m
i R - 5 7 0 、 h s a - m i R - 3 7 4 a 、 h s a - m i R - 1 1 8 4 、 h s a - m i R
- 6 4 9 、 h s a - m i R - 4 2 4 、 h s a - m i R - 3 6 5 8 、 h s a - m i R - 1 8
6 、 h s a - m i R - 3 2 6 、 h s a - m i R - 5 4 8 d - 5 p 、 h s a - m i R - 2 3
a 、 h s a - m i R - 1 5 b 、 h s a - m i R - 1 9 0 、 h s a - m i R - 2 0 3 、 h s
a - m i R - 5 4 8 h 、 h s a - m i R - 3 1 3 6 - 5 p 、 h s a - m i R - 6 1 8 、 h
s a - m i R - 5 5 1 b 、 h s a - m i R - 2 1 1 、 h s a - m i R - 1 3 0 5 、 h s a
- m i R - 5 1 3 b 、 h s a - m i R - 9 6 、 h s a - m i R - 2 1 1 7 、 h s a - m i
R - 5 4 8 n 、 h s a - m i R - 3 9 1 0 、 h s a - m i R - 2 1 7 、 h s a - m i R -
8 9 2 b 、 h s a - m i R - 5 0 2 - 5 p 、 h s a - m i R - 5 4 8 i 、 h s a - m i R
- 5 2 0 d - 5 p 、 h s a - m i R - 4 2 9 9 、 h s a - m i R - 1 2 8 5 、 h s a - m
i R - 3 1 3 3 、 h s a - m i R - 4 8 3 - 3 p ; (Y t h d f 1 の阻害剤) h s a - m
i R - 5 4 8 g 、 h s a - m i R - 2 0 4 、 h s a - m i R - 3 1 4 3 、 h s a - m i R
- 5 2 1 、 h s a - m i R - 1 9 5 、 h s a - m i R - 3 1 8 2 、 h s a - m i R - 3 9
4 1 、 h s a - m i R - 3 4 c - 3 p 、 h s a - m i R - 7 6 7 - 3 p 、 h s a - m i R
- 5 6 3 、 h s a - m i R - 5 4 8 c - 5 p 、 h s a - m i R - 1 9 1 1 、 h s a - m i
R - 2 6 b 、 h s a - m i R - 1 9 0 b 、 h s a - m i R - 3 3 a 、 h s a - m i R - 3
2 9 、 h s a - m i R - 2 2 1 、 h s a - m i R - 6 1 2 、 h s a - m i R - 3 1 8 5 、
h s a - m i R - 3 1 5 6 - 5 p 、 h s a - m i R - 1 0 7 、 h s a - m i R - 6 6 4 、
h s a - m i R - 3 6 5 7 ; (Y t h d f 2 の阻害剤) h s a - m i r - 6 1 5 - 3 p ((M I R T 0 4 0 0 5 4) 、 h s a - m i r - 1 0 6 b - 5 p (M I R T 0 4 4 2 5 7) 、
h s a - m i r - 1 (M I R T 0 2 3 8 4 2) 、 m i R - 1 4 5 、 h s a - m i R - 3 6
0 7 - 3 p 、 h s a - m i R - 2 0 0 a 、 h s a - m i R - 3 0 1 a 、 h s a - m i R -
5 1 9 a 、 h s a - m i R - 1 4 1 、 h s a - m i R - 1 3 0 b 、 h s a - m i R - 1 8
1 b 、 h s a - m i R - 3 0 1 b 、 h s a - m i R - 3 1 1 7 - 3 p 、 h s a - m i R -
1 2 3 6 、 h s a - m i R - 1 8 1 a 、 h s a - m i R - 5 1 9 c - 3 p 、 h s a - m i

R-551b、hsa-miR-519e、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-19b、hsa-miR-1303、hsa-miR-608、hsa-miR-145、hsa-miR-130a、hsa-miR-181c、hsa-miR-323b-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-3666、hsa-miR-181d、hsa-miR-146a、hsa-miR-4295、hsa-miR-454、hsa-miR-3919、hsa-miR-19a、hsa-miR-543、hsa-miR-4262；(Ythdf3の阻害剤) hsa-miR-582-3p、hsa-miR-579、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-3152-3p、hsa-miR-106a、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-93、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-3148、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-20a、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-4255、hsa-let-7i、hsa-miR-373、hsa-let-7e、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-3920、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-380、hsa-miR-616、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-let-7c、hsa-miR-340、hsa-miR-373、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-1265、hsa-miR-548x、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-33b、hsa-miR-26b、hsa-miR-17、hsa-miR-569、hsa-miR-3618、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-922、hsa-miR-302a、hsa-miR-106b、hsa-miR-888、hsa-miR-484、hsa-let-7b、hsa-miR-582-5p、hsa-let-7f、hsa-miR-30b、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-302d、hsa-let-7d、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-500a、hsa-miR-570、hsa-miR-5481、hsa-miR-105、hsa-miR-374c、hsa-let-7g、hsa-miR-372、hsa-miR-3658、hsa-let-7a、hsa-miR-3908、hsa-miR-302b、hsa-miR-526b、hsa-miR-190、hsa-miR-181b、hsa-miR-433、hsa-miR-98、hsa-miR-3606、hsa-miR-595、hsa-miR-548am、hsa-miR-187、hsa-miR-561、hsa-miR-181a、hsa-miR-3155、hsa-miR-655、hsa-miR-302c、hsa-miR-195、hsa-miR-26a、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-30c、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-181c、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-202、hsa-miR-302e、hsa-miR-5

13c、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-1297、hsa-miR-7-1、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-3155b、hsa-miR-3182、hsa-miR-519d、hsa-miR-550a、hsa-miR-7-2、hsa-miR-181d、hsa-miR-190b、hsa-miR-1912、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-33a、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-20b、hsa-miR-514b-5p、hsa-miR-30e、hsa-miR-4262、hsa-miR-636；(elf3の阻害剤) hsa-miR-92b-3p (MIRTO40734)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31705)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40974)、hsa-miR-155-5p (MIRTO20771)、hsa-miR-484 (MIRTO42324)、

hsa-let-7c-5p (MIRTO51776)、hsa-miR-3910、hsa-miR-148b、hsa-miR-136、hsa-miR-15a、hsa-miR-488、hsa-miR-500a、hsa-miR-1297、hsa-miR-3159、hsa-miR-374c、hsa-miR-424、hsa-miR-7-1、hsa-miR-186、hsa-miR-195、hsa-miR-15b、hsa-miR-26b、hsa-miR-505、hsa-miR-1206、hsa-miR-653、hsa-miR-1283、hsa-miR-7-2、hsa-miR-196a、hsa-miR-497、hsa-miR-33a、hsa-miR-655、hsa-miR-26a hsa-miR-16、hsa-miR-151a-3p (MIRTO43600)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49064) 10
 、hsa-miR-615-3p (MIRTO39779)、hsa-miR-877-3p (MIRTO36964)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46746)、hsa-miR-423-3p (MIRTO42468)、hsa-miR-324-3p (MIRTO42887)、hsa-miR-124-3p (MIRTO22932)、hsa-miR-3140-3p、hsa-miR-124、hsa-miR-198、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-506、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-196a* hsa-miR-3117-3p、hsa-miR-342-5p (MIRTO38210)、hsa-miR-378a-5p (MIRTO43981)、hsa-miR-615-3p (MIRTO40086)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52211)、hsa-miR-455-3p (MIRTO37879)、hsa-miR-4267、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-106b-5p (MIRTO44355)、hsa-miR-320a (MIRTO44466)、hsa-miR-16-5p (MIRTO32018)、hsa-miR-155-5p (MIRTO21009)、hsa-miR-4302、hsa-miR-191-5p (MIRTO45793)、hsa-miR-1303 (MIRTO35890)、hsa-miR-193b-3p (MIRTO16316)、hsa-miR-222-3p (MIRTO46640)、hsa-miR-532-3p (MIRTO37924)、hsa-miR-18a-3p (MIRTO40929)、hsa-miR-92a-3p (MIRTO49001)、hsa-miR-582-3p 20
 、hsa-miR-4265、hsa-miR-218-2、hsa-miR-1271 30
 、hsa-miR-340、hsa-miR-221、hsa-miR-20b、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-4325、hsa-miR-889、hsa-miR-29a、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-129、hsa-miR-96、hsa-miR-3163、hsa-miR-187、hsa-miR-196a、hsa-miR-222、hsa-miR-1179、hsa-miR-182、hsa-miR-9* hsa-miR-32、hsa-miR-143、hsa-miR-4296：(YTHDC1の阻害剤) hsa-miR-20a-3p (MIRTO38967)、hsa-miR-103a-3p (MIRTO27037)、hsa-miR-1 (MIRTO23492)、hsa-miR-19b-3p (MIRTO31105)、hsa-miR-100-5p (MIRTO48400)、hsa-miR-93-5p (MIRTO27989)、hsa-miR-16-5p (MIRTO31379)、hsa-let-7b-5p (MIRTO52150) 40
)、hsa-miR-520f、hsa-miR-300、hsa-miR-15a、hsa-miR-200a、hsa-miR-605、hsa-miR-30d、hsa-miR-30a、hsa-miR-3613-3p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-1248、hsa-miR-152、hsa-miR-548t、hsa-miR-4310、hsa-miR-145、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-16、hsa-miR-3668、hsa-miR-4277、hsa-miR-448、hsa-miR-16-2、hsa-miR-148b、hsa-miR-509-5p、 50

hsa-miR-103a、hsa-miR-1265、hsa-miR-2115、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-148a、hsa-miR-548p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-497、hsa-miR-3647-3p、hsa-miR-382、hsa-miR-30b、hsa-miR-543、hsa-let-7f-2、hsa-miR-1269、hsa-miR-3164、hsa-miR-503、hsa-miR-500a、hsa-miR-449a、hsa-miR-141、hsa-miR-424、hsa-miR-3908、hsa-miR-889、hsa-miR-2116、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-15b、hsa-miR-181b、hsa-miR-187、hsa-miR-1237、hsa-miR-449b、hsa-miR-101、hsa-miR-381、hsa-miR-618、hsa-miR-222、hsa-miR-181a、hsa-miR-432、hsa-miR-96、hsa-miR-19b、hsa-miR-195、hsa-miR-548n、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-217、hsa-miR-30c、hsa-miR-495、hsa-miR-137、hsa-miR-1288、hsa-miR-181c、hsa-miR-3942-5p、hsa-miR-548v、hsa-miR-487a、hsa-miR-221、hsa-miR-891b、hsa-miR-205、hsa-miR-195、hsa-miR-4271、hsa-miR-3611、hsa-miR-516b、hsa-miR-181d、hsa-miR-154、hsa-miR-646、hsa-miR-153、hsa-miR-34a、hsa-miR-19a、hsa-miR-107、hsa-miR-30eおよびhsa-miR-4262。

【0203】

一実施形態によると、本発明は、本明細書に記載のプロセスのいずれかによって作製される単離された間葉系幹細胞の集団を含む。例えば、本発明は、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の増大および／または単離プロセスのいずれかによって作製される増大した単離された間葉系幹細胞の集団を含み得る。

【0204】

一実施形態では、後続のそれを必要とする被験体への移植のための間葉系幹細胞（MSC）集団を単離するためのキットが提供される。キットは、MSCを含む生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させるための系と、その使用に関する指示とを含む。一実施形態では、キットは、MSC集団に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することによってMSCの集団を増大させるための系と、その使用に関する指示とをさらに含む。さらに別の実施形態では、MSC集団に変異を導入するための系は、MSC集団にYthdf2を発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入することができる1種または複数種の試薬を含む。さらに別の実施形態では、MSC集団に変異を導入するための系は、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の少なくとも一部分を不活化するまたは欠失させるMx1-Cre標的化系を含む。一実施形態では、MSC集団に変異を導入するための系は、MSC集団にshRNAを組み込んでm⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の発現を低減させるレンチウイルスを送達するための試薬を含む。

【0205】

本発明の別の実施形態によると、間葉系幹細胞（MSC）をそれを必要とする被験体に投与するための方法が提供される。当該方法は、MSCの集団を含む生体試料からMSCを、生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、単離されたMSCを被験体に投与するステップとを含む。さらに、一実施形態では、方法は、MSC集団を含有する生体試料に、m⁶A mRNA修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、生体試料を適切な培養培地中で試料中のMSCの数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップとをさらに含む。一実施形態では

、変異は、Y t h d f 2を発現する遺伝子の欠失をもたらすものである。一実施形態では、変異は、Y t h d f 2を発現する遺伝子の発現を低減させる s h R N A の H S C 集団への組込みをもたらすものである。さらに別の態様によると、M S C を、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織を含む生体試料から得る。

【0206】

さらに別の実施形態によると、それを必要とする被験体において骨髄を再構成するための方法が提供される。当該方法は、M S C の集団を含む生体試料から間葉系幹細胞（M S C）を、生体試料を1種または複数種のN-カドヘリン抗体と接触させることによって単離するステップと、単離されたM S C を被験体に投与するステップとを含む。さらに、一態様によると、方法は、M S C 集団を含有する生体試料に、m⁶A m R N A 修飾リーダーを発現する遺伝子の欠失、置換えまたはその発現の低減をもたらす変異を導入するステップと、試料を適切な培養培地中で、試料中のM S C の数を被験体への移植に十分な数まで増大させるのに十分な期間にわたって培養するステップとをさらに含む。一実施形態では、M S C を、臍帯血、末梢血、および骨髄からなる群より選択される組織を含む生体試料から得る。

【0207】

さらに別の実施形態によると、骨髄移植、末梢血移植および臍帯血液移植からなる群より選択される移植を必要とする被験体を処置するための方法であって、被験体に、本明細書に記載の方法のいずれかによって得た単離されたM S C の集団を投与するステップを含む方法。実施形態によると、試料は、自己供給源または同種異系供給源に由来する。さらに別の実施形態によると、試料は、自己供給源に由来する。

【0208】

本発明では、「治療有効量」は、有益なまたは所望の結果をもたらすために十分な量である。哺乳動物の処置に関しては、モジュレーターおよび／または増大した細胞の「治療有効量」は、哺乳動物における骨髄疾患などの状態を処置する、管理する、和らげる、好転させる、または安定化させるために十分な量である。治療有効量は、1回または複数回用量で投与することができる。

【0209】

治療有効量は、一般に、個々の場合に依じて医師によって決定され、当業者の技術の範囲内に入る。一般には、適正な投与量を決定する際にはいくつかの要因を考慮に入れる。これらの要因としては、被験体の年齢、性別および体重、処置される状態、状態の重症度および投与される薬物の形態が挙げられる。

【0210】

有効な剤形、投与形式、および投与量は、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当技術分野の技術の範囲内である。投与量は、投与経路、排出速度、処置の持続時間、投与される任意の他の薬物の正体、動物の年齢、サイズ、および種、ならびに医薬および獣医薬の技術分野で周知の同様の要因によって変動することが当業者には理解される。一般に、本発明によるモジュレーターの適切な用量は、所望の効果を生じさせるために有効な最低用量であるモジュレーターの量になる。モジュレーターの有効用量を、1日を通して適切な間隔で別々に投与される2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれよりも多くの副用量として投与することができる。

【0211】

モジュレーターは、任意の所望の有効な様式で：経口摂取用、または非経口もしくは他の投与用の医薬組成物として、腹腔内、皮下、局所、皮内、吸入、肺内、直腸、膣、舌下、筋肉内、静脈内、動脈内、髄腔内、またはリンパ内などの任意の適正な様式で投与することができる。さらに、本発明のモジュレーターを他の処置と併せて投与することができる。所望であれば、本発明のモジュレーターをカプセル封入することまたは他のやり方で胃液分泌または他の分泌から保護することができる。

【0212】

本発明のモジュレーターを単独で投与することができるが、モジュレーターを医薬製剤

(組成物)として投与することが好ましい。そのような医薬製剤は、一般には、1種または複数種のモジュレーターを1種または複数種の薬学的に許容される担体、ならびに、必要に応じて、1つまたは複数の他の化合物、薬物、成分および／または材料と混合した活性成分として含む。選択された投与経路にかかわらず、当業者に公知の従来の方法によって本発明のモジュレーターを薬学的に許容される剤形に製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.)を参照されたい。

【0213】

薬学的に許容される担体は当技術分野で周知であり（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) および The National Formulary (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.)を参照されたい）、それらとして、糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトール）、デンプン、セルロース調製物、リン酸カルシウム（例えば、リン酸二カルシウム (dicalcium phosphate)、リン酸三カルシウムおよびリン酸水素カルシウム）、クエン酸ナトリウム、水、水溶液（例えば、生理食塩水、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸リンゲル注射液）、アルコール（例えば、エチルアルコール、プロピルアルコール、およびベンジルアルコール）、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコール）、有機エステル（例えば、オレイン酸エチルおよびトリグリセリド）、生分解性ポリマー（例えば、ポリラクチド-ポリグリコリド、ポリ（オルトエステル）、およびポリ（酸無水物））、エラストマーマトリクス、リポソーム、マイクロスフェア、油（例えば、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ、ゴマ、綿実、およびラッカセイ）、カカオバター、ワックス（例えば、坐薬ワックス）、パラフィン、シリコーン、タルク、シリシレート (silicylate) などが挙げられる。本発明のモジュレーターを含む医薬組成物に使用される薬学的に許容される担体はそれぞれ、製剤の他の成分と適合し、被験体にとって有害ではないという意味で「許容される」ものでなければならない。選択された剤形および意図された投与経路に適する担体は当技術分野で周知であり、選択された剤形および投与の方法に許容される担体は、当技術分野における通常の技術を使用して決定することができる。

【0214】

本発明のモジュレーターを含む医薬組成物は、必要に応じて、医薬組成物に一般に使用される追加的な成分および／または材料を含有してもよい。これらの成分および材料は当技術分野で周知であり、それらとして、（1）充填剤または増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸など；（2）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロースおよびアラビアゴムなど；（3）保湿剤 (humectant)、例えば、グリセロールなど；（4）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のシリケート、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋したカルボキシメチルセルロースナトリウムおよび炭酸ナトリウムなど；（5）溶解遅延剤、例えば、パラフィンなど；（6）吸収促進剤、例えば、四級アンモニウム化合物など；（7）湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびグリセロールモノステアレートなど；（8）吸収剤、カオリンおよびベントナイト粘土など；（9）滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、およびラウリル硫酸ナトリウムなど；（10）懸濁化剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガントなど；（11）緩衝化剤；（12）賦形剤、例えば、ラクトース、乳糖、ポリエチレングリコール、動物性脂肪および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、カカオバター、デンプン、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、サリチレート、酸化亜鉛、

10

20

30

40

50

水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末など；（１３）不活性な希釈剤、例えば、水または他の溶媒など；（１４）保存剤；（１５）表面活性剤（surface-active agent）；（１６）分散剤；（１７）制御放出剤（control-release agent）または吸収遅延剤、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、生分解性ポリマー、リボソーム、マイクロスフェア、アルミニウムモノステアレート、ゼラチン、およびワックスなど；（１８）乳白剤；（１９）補助剤；（２０）湿潤剤；（２１）乳化および懸濁化剤；（２２）、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステルなど；（２３）噴霧体、例えば、クロロフルオロカーボンおよび揮発性の非置換型炭化水素、ブタンおよびプロパンなど；（２４）抗酸化剤；（２５）製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする作用物質、例えば、糖および塩化ナトリウムなど；（２６）増粘剤；（２７）コーティング材料、例えば、レシチンなど；ならびに（２８）甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤、芳香剤および保存剤が挙げられる。そのような成分または材料はそれぞれ、製剤の他の成分と適合し、被験体にとって有害でないという意味で「許容される」ものでなければならない。選択された剤形および意図された投与経路に適した成分および材料は当技術分野で周知であり、選択された投与の剤形および方法のための許容される成分および材料は、当技術分野における通常の技術を使用して決定することができる。

10

20

【０２１５】

経口投与に適した医薬組成物は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、散剤、顆粒剤、水性液または非水性液中の液剤または懸濁剤、水中油または油中水エマルション、エリキシル剤またはシロップ剤、口内錠剤（pastille）、ポーラス、舐剤またはペースト剤の形態であり得る。これらの製剤は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、従来のパンコーティング（pan-coating）、混合、顆粒化または凍結乾燥プロセスによって調製することができる。

【０２１６】

経口投与用の固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖剤、散剤、顆粒剤など）は、活性成分を、１種または複数種の薬学的に許容される担体、ならびに、必要に応じて、１つまたは複数の充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、溶解遅延剤、吸収促進剤、湿潤剤、吸収剤、滑沢剤、および／または着色料と混合することによって調製することができる。同種の固体組成物を、適切な賦形剤を使用した軟充填ゼラチンカプセルおよび硬充填ゼラチンカプセル中の充填剤として使用することができる。錠剤は、必要に応じて１つまたは複数の副成分と共に、圧縮または成形によって作製することができる。圧縮錠剤は、適切な結合剤、滑沢剤、不活性な希釈剤、保存剤、崩壊剤、表面活性剤または分散剤を使用して調製することができる。成形錠剤は、適切な機械での成形によって作製することができる。錠剤、ならびに、糖剤、カプセル剤、丸剤および顆粒剤などの他の固体剤形は、必要に応じて、腸溶コーティングおよび医薬製剤化の技術分野において周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルを用いて刻み目を入れるまたは調製することができる。これらは、その中に含まれる活性成分の緩徐放出または制御放出がもたらされるように製剤化することもできる。これらは、例えば、細菌保持フィルターを通して濾過することによって滅菌することができる。これらの組成物は、必要に応じて乳白剤を含有してもよく、また、活性成分を胃腸管のある特定の部分だけにまたは当該部分に優先的に、必要に応じて遅延様式で放出する組成物であってもよい。活性成分はマイクロカプセルに封入された形態であってもよい。

30

40

【０２１７】

経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤が挙げられる。液体剤形は、当技術

50

分野で一般に使用される適切な不活性な希釈剤を含み得る。不活性な希釈剤に加えて、経口用組成物は、湿潤剤、乳化および懸濁化剤、甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤、芳香剤および保存剤などの補助剤も含み得る。懸濁剤は、懸濁化剤も含み得る。

【0218】

直腸投与または腔投与用の医薬組成物は、坐薬として提示され得、これは、1つまたは複数の活性成分を、室温では固体であるが体温では液体であり、したがって、直腸内または腔腔内で融解し、活性化合物を放出する1つまたは複数の適切な非刺激性担体と混合することによって調製することができる。腔投与に適した医薬組成物は、適正であることが当技術分野で公知の薬学的に許容される担体を含む。腔坐薬、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡沫またはスプレー製剤も含む。

10

【0219】

局所または経皮投与用の剤形としては、散剤、スプレー、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、液剤、パッチ剤、液滴および吸入剤が挙げられる。活性化合物を適切な薬学的に許容される担体と滅菌条件下で混合することができる。軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤およびゲル剤は、賦形剤を含む。散剤およびスプレーは、賦形剤および噴霧体を含む。

【0220】

非経口投与に適した医薬組成物は、1種または複数種のモジュレーターを、適切な抗酸化剤、緩衝液、製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁化剤もしくは増粘剤を含む。1つまたは複数の薬学的に許容される滅菌等張性水溶液または非水溶液、分散物、懸濁物もしくはエマルジョン、または使用する直前に滅菌の注射可能な溶液もしくは分散物に再構成することができる滅菌粉末と組み合わせる。妥当な流動性は、例えば、コーティング材料を使用することによって、分散物の場合では必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性物質を使用することによって維持することができる。これらの組成物は、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの適切な補助剤も含み得る。等張化剤を含めることが望ましい場合もある。さらに、吸収を遅延させる作用物質を含めることにより、注射可能な医薬形態の延長した吸収をもたらすことができる。

20

【0221】

一部の場合では、本発明のモジュレーターを含む薬物の効果を長引かせるために、皮下注射または筋肉内注射による吸収を減速することが望ましい。これは、難水溶性の結晶性材料または非晶質材料の液体懸濁物を使用することによって達成することができる。

30

【0222】

次に、薬物の吸収速度はその溶解速度に依存し、溶解速度が今度は結晶サイズおよび結晶形に依存し得る。あるいは、非経口投与された薬物の遅延吸収は、油性ビヒクルに薬物を溶解または懸濁させることによって達成することができる。生分解性ポリマー中活性成分のマイクロカプセルマトリクスを形成することによって注射可能なデポー形態を作製することができる。活性成分のポリマーに対する比、および使用される特定のポリマーの性質に応じて、活性成分の放出速度を調節することができる。デポー注射製剤は、薬物を体組織と適合性のリポソームまたはマイクロエマルジョン中に閉じ込めることによって調製される。注射可能な材料は、例えば、細菌保持フィルターを通して濾過することによって滅菌することができる。

40

【0223】

製剤は、単位用量または複数回用量の密閉容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提示され得、使用する直前に滅菌液体担体、例えば、注射用蒸留水を添加することだけが必要になる凍結乾燥した状態で保管することができる。上記の型の滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から即時注射液剤および懸濁剤を調製することができる。

【0224】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をさらに例示するために提供される。これらの実施例は、単に例示的なものであり、本発明の範囲を多少なりとも限定するものでは

50

ない。

【実施例】

【0225】

本明細書の実施例では、標的化mRNA分解を促進する、よく認識されたm⁶AリーダーであるYthdf2 (Wang et al. Blood, 505: 17-120, 2014) を、少なくとも部分的に、HSC維持に関連したその役割を調査する目的で試験する。いかなる特定の理論にも限定されずに、Ythdf2の操作は、m⁶Aでマークされた多数のmRNAの寿命に潜在的に影響を及ぼす可能性があり、したがって、成体HSC自己複製対分化に影響を及ぼし、HSC増大を容易にするものと考えられる。下の実施例において示されているように、Ythdf2枯渇により、マウスおよびヒトHSCが、系列運命が歪むことなく特異的に増大する。したがって、Ythdf2はHSC自己複製の制御において不可欠な役割を果たす可能性があり、臨床的適用におけるものを含め、hUCB HSCのex vivoでの増大を増強するための新規の手法をもたらすものと考えられる。

10

【0226】

実施例では、薬物抵抗性rHSC集団の機能的な定義、ならびに、rHSCが、恒常性の間および化学療法ストレス下で、大部分はN-cad⁺細胞により骨内膜ニッチ内に維持されるという所見も示される。骨内膜帯域内のN-cad⁺細胞が、間葉系幹細胞であり、rHSC維持に寄与することがさらに示される。

【0227】

(実施例A)

20

以下の実施例「A」では以下のプロトコルを使用した。

【0228】

マウス。Ythdf2コンディショナルKOマウスがChuan HeおよびBin Shenのグループにより生成された。マウスをStowers Institute for Medical Research (SIMR) の動物施設内に収容し、研究所およびNIHのガイドラインに従って取り扱った。手順は全てIACUC of SIMRによって認可されたものであった。

【0229】

フローサイトメトリーおよびHSPC選別。マウスHSPC、前駆細胞、および系列細胞をBM (大腿骨および脛骨) ならびに脾臓から採取した。0.16Mの塩化アンモニウム溶液を使用して赤血球を溶解させ、70μmストレーナーを用いて細胞を濾過して、単一細胞懸濁物を生成した。マウスHSC同定のために、細胞を、Sca-1 (D7)、c-Kit (2B8)、CD34 (RAM34)、Flk2 (A2F10)、CD48 (HM48-1)、CD150に対する抗体 (TC15-12F12.2) を、CD3 (145-2C11)、CD4 (RM4-5)、CD8 (53-6.7)、Mac-1 (M1/70)、Gr1 (RB6-8C5)、CD45R (B220、RA3-6B2)、IgM (11-41) およびTer119 (TER-119) を含む系列カクテルと共に用いて染色した。前駆細胞および系列細胞に関しては、細胞を以前に記載されている抗体で染色した (Qian, P. et al. Cell Stem Cell, 18: 214-228, 2016, doi:10.1016/j.stem.2015.11.001)。7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD) (A1310、Life technologies) を使用して死細胞を排除した。ヒト臍帯血試料をSt. Louis Cord Blood Bankから取得した。Lymphoprep (商標) (StemCell technologies) を用いて単核細胞を単離し、その後、ヒトCD34⁺臍帯血細胞をヒトCD34 MicroBead Kit UltraPure (Miltenyi Biotec) によって単離した。ヒトHSPCを定量化するために、細胞を、CD34 (581)、CD38 (HIT2)、CD45RA (HI100)、CD90 (5E10)、CD49f (GoH3)、EPCR/CD201 (RCR-401) に対する抗体で染色した。細胞選別および分析をMoFlo (Dako)、Influx Cell Sorter (BD Biosciences)、および/またはMACSQuant (Miltenyi Biotec) で実施した。FlowJoソフト

30

40

50

トウェアを使用してデータ分析を実施した。

【0230】

ホーミングアッセイ。in vivoホーミングアッセイを以前に記載されている通り実施した (He et al. *Methods in Molecular Biology*, 1185: 279-284, 2014)。基本的に、CD45⁺ 2マウス由来の全骨髄 (WBM) 細胞を5 μ Mの5- (および6-) カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFDA SE) (Molecular Probes) を用いて37°Cで10分間標識し、3回洗浄し、WBM 1×10^6 個を、致死的に照射を受けたptprcマウスに移植した。18時間後に、大腿骨および脛骨を洗い出し、CFDA SE+細胞を決定した。

【0231】

競合的再構成アッセイ。wtマウスまたはYthdf2 KOマウス (CD45⁺ 2) 由来のドナー由来WBM細胞 2×10^5 個、 7.5×10^4 個または 2.5×10^4 個を、レスキュー細胞 (CD45⁺ 1) 2×10^5 個と共に、致死的に照射を受けた (10 Gy) ptprcレシピエントマウス10匹の群に静脈内移植することにより、競合的再構成アッセイを実施した。二次移植のために、一次移植レシピエントを屠殺した。BM細胞を大腿骨および脛骨から切開し、次いで、照射を受けた二次レシピエントマウスに細胞 1×10^6 個の投与量でマウス間移植した。バイトリル水をレシピエントマウスに照射の3日前に与え、照射後さらに2週間継続した。一次および二次CRU頻度をELDAソフトウェアを使用して測定し (Hu et al. *Journal of Immunological Methods*, 347: 70-78, 2009)、上首尾の生着を、それぞれ末梢血中の総造血細胞の $\geq 5\%$ および $\geq 1\%$ の別個のCD45⁺ CD45⁺ 1⁻集団が存在することと定義した (Purton et al. *Cell Stem Cell*, 1: 263-270, 2007)。また、移植の16週間後よりも前に死亡した二次移植レシピエントマウスを生着失敗としてカウントした。

【0232】

細胞周期およびアポトーシスアッセイ。細胞周期分析を、FITCマウス抗ヒトKi67セット (BD Pharmingen) を製造者の指示に従って用いて実施した。簡単に述べると、BM細胞 5×10^6 個を単離し、上記の通りHSC抗体で染色した。細胞を4%パラホルムアルデヒドにより4°Cで終夜または室温 (RT) で1時間にわたって固定し、次いで、0.2% Triton X-100を用いて氷上で15分にわたって透過処理した。細胞を、2% FBSを含有するPBSで洗浄し、次いで、Ki-67抗体と一緒に暗闇中、RTで1時間インキュベートし、SYTOX Red (Invitrogen) と一緒にRTでさらに5分間インキュベートし、その後、Influx Cell Sorter (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー分析を行った。アポトーシス分析のために、BM細胞 5×10^6 個のアネキシンV (Invitrogen) およびSYTOX Red染色を製造者のプロトコールに従って実施した。

【0233】

m⁶A RNA-IP-seq。C57BL/6Jマウス由来のLT-HSC、ST-HSC (LSK CD34⁺ FLK2⁻) およびMPP (LSK CD34⁺ FLK2⁺) 10^5 個の2つの反復物をTRIzol (Invitrogen) 中に選別し、全RNAを製造者の指示に従って単離した。Ambion断片化試薬を用いてRNAを約100ヌクレオチドの断片に断片化した (70°Cで2分のインキュベーション)。次いで、試料をTurbo DNase処理 (Ambion) に供し、その後、フェノールクロロホルム抽出を行い、ヌクレアーゼを含まない水85 μ l中に再浮遊させ、5 μ lをインプットとして保存した。次いで、残りの80 μ lのRNA断片をIPP緩衝液 (150 mMのNaCl、0.1%のNP-40、10 mMのTris-HCl、pH 7.5) 中に希釈した。RNAを、抗m⁶Aポリクローナル抗体 (Synaptic Systems) 3 μ gを予め結合させたプロテインG磁気ビーズ25 μ lと一緒にIPP緩衝液中、4°Cで3時間インキュベートした。ビーズをIPP緩衝液200 μ lで2回洗浄し、低塩緩衝液 (50 mMのNaCl、0.1%のNP-40、10 mMのTris-HCl、pH 7.5) 200 μ lで2回洗浄し、高塩緩衝液 (500 mMのNaCl、0.1%のNP-4

10

20

30

40

50

0、10 mMのTris-HCl、pH 7.5) 200 μ lで2回洗浄した。次いで、ビーズを溶出緩衝液(5 mMのTris-HCl、pH 7.5、1 mMのEDTA、pH 8.0、0.05% SDS、プロテイナーゼK (20 mg/ml) 4.2 μ l) 300 μ lを用いて50℃で1.5時間にわたって処理し、フェノール：クロロホルム抽出、その後、エタノール沈殿を用いてRNAを回収した。3つのヒトCD34⁺臍帯血液細胞を上記の通り単離し、TRIzolを用いて全RNAを単離した。Ambion断片化試薬を用いてRNAを約100ヌクレオチドの断片に断片化した(70℃で2分50秒のインキュベーション)。次いで、試料をTurbo DNase処理(Ambion)に供し、その後、フェノール：クロロホルム抽出を行い、ヌクレアーゼを含まない水18 μ lに再浮遊させ、1 μ lをインプットとして保存した。EpiMark (登録商標) N6-Methyladenosine Enrichment Kitを製造者の指示に従って用いてm⁶A RNA IPを実施した。

【0234】

RNAのm⁶A調製後、品質をAgilent 2100 Bioanalyzerで評価し、SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit - Pico Input Mammalian (Takara Bio Inc)について製造者の指示に従い、16サイクル(マウス)または13サイクル(ヒト)のPCR2増幅を使用してRNAseqライブラリーを生成するためにRNA 1ng(マウス)または10ng(ヒト)を使用した。当該方法では、ランダムプライミングおよびテンプレートスイッチングオリゴ(template switching oligo)を使用して、相補DNAを生成し、その後、バーコードを付したアダプターのライゲーションを行う。次いで、リボソーム由来のcDNAをプローブ特異的酵素切断およびその後の切断されていない断片の富化によって除去した。

【0235】

PCR1精製に1.2×SPRIビーズ濃度を使用することにより、低分子量の試料断片が保持されるようにプロトコルを改変した。二量体を形成したアダプターを除去するために、ライブラリーを、Pippin Prep (Sage Science) 2%ゲルを用いた160~600bpのサイズ選択に供した。得られたライブラリーを、Bioanalyzer and Qubit Fluorometer (Life Technologies)を使用して品質および数量について確認した。次いで、等モル濃度のライブラリーをプールし、再び定量化した。マウスm⁶A-seqに関しては、ライブラリーを50bpの単一リードとしてIllumina HiSeq 2500機器でHiSeq Control Software 2.2.58を使用して配列決定した。配列決定後、Illumina Primary Analysis version RTA 1.18.64およびSecondary Analysis version bcl2fastq2 v2.18を実行して全てのライブラリーについてリードを逆多重化し、FASTQファイルを生成した。ヒトm⁶A-seqに関しては、ライブラリーを75bpの単一リードとしてIllumina NextSeq機器でNextSeq Control Software 2.1.2を使用して配列決定した。配列決定後、Illumina Primary Analysis version NextSeq RTA 2.4.11およびSecondary Analysis version bcl2fastq2 v2.18を実行して全てのライブラリーについてリードを逆多重化し、FASTQファイルを生成した。

【0236】

プラスミド構築および安定細胞株の生成。マウスYthdf2 (mYthdf2)を市販のcDNAクローン(ORIGENE #MC200730)からベクターp cDNA5/FRT/Flagプラスミドに、以下に列挙するプライマーを使用してクローニングした：mYthdf2 ORF Clone BamHI F: 5'-CGC GGA TCC TCG GCC AGC AGC CTC TTG GA-3'およびmYthdf2 ORF Clone NotI R: 5'-ATA AGA ATG CGG C

CG CCT ATT TCC CAC GAC CTT GAC GT-3'。次いで、Flag-mYthdf2をEF1aプロモーターの下でpSicoR-EF1a-IRES-EGFPレンチウイルス構築物にサブクローニングした(Gibson Assembly (登録商標)、フォワードプライマー: 5'-GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCA TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG-3' およびリバースプライマー: 5'-GAG GGA GAG GGG CGG ATC CCC TAT TTC CCA CGA CCT TGA CGT-3')。ヒトYthdf2 (hYthdf2)をChuan He Labにより供給されたプラスミドから以下に示すプライマーを使用してクローニングした: フォワード 5'-CGT TCG AAA TGT CGG CCA GCA GCC TCT-3'; リバース 5'-TCC CCC GGG TTA TTT CCC ACG ACC TT-3'。次いで、hYthdf2をpSicoR-EF1a-IRES-EGFP構築物にEF1aプロモーターの下でBstBIおよびXmaI制限酵素消化およびライゲーションによってクローニングした。Flag-mYthdf2 HPC7安定細胞株を生成するために、pSicoR-EF1a-Flag-mYthdf2-IRES-EGFP構築物をpsPAX2およびpMD2. Gプラスミドと共に10:7.5:2.5の比でリン酸カルシウムトランスフェクションを使用して293T細胞にトランスフェクトすることによってレンチウイルスを生成した。トランスフェクションの48時間後、72時間後、および96時間後にウイルス粒子を採取し、0.45マイクロメートルの濾過ユニット(Millipore)によって濾過し、次いで、4℃、18,000RPMで2時間遠心分離した。HPC7細胞に組換えレンチウイルス形質導入単位を4μg/mLのポリブレン(Sigma)の存在下で感染させた。感染の48時間後、GFP⁺細胞を実験のために選別し、培養した。

【0237】

irCLIP-seqおよびデータ分析。irCLIP-seqに関しては、手順を以前に報告された方法(Zarneger et al. Nature Methods, 13: 489-492, 2016); Simsek et al. Cell, 169: 1051-1065 e1018, 2017)から改変した。簡単に述べると、Flag-Ythdf2 HPC7細胞約 3×10^8 個に対して、細胞を 0.4 J/cm^2 で3回UV架橋結合させることによってirCLIPを実施した。全細胞溶解物を溶解緩衝液(150mMのKCl、10mMのHEPES、pH7.6、2mMのEDTA、0.5%のNP-40、0.5mMのDTT、1:100のプロテアーゼ阻害剤カクテル、400U/mLのRNase阻害剤; 細胞ペレット1mLおよび溶解緩衝液2mL)中に生成させた。数回ピペットで吸引排出し、次いで、mRNP溶解物を氷上で5分間インキュベートし、液体窒素を用いて-80℃でショック凍結した。mRNP溶解物を氷上で解凍し、15,000gで15分間遠心分離して溶解物を清澄化した。Flag-Ythdf2を、抗Flagモノクローナル抗体(Sigma)2μgを回転させながら4℃で2時間にわたって予め結合させたプロテインG磁気ビーズを溶解物1mL当たり30μLで用いて単離した。ビーズを採取し、氷冷NT2緩衝液(200mMのNaCl、50mMのHEPES、pH7.6、2mMのEDTA、0.05%のNP-40、0.5mMのDTT、200U/mLのRNase阻害剤)1mLで8回洗浄し、irCLIP NT2緩衝液(50mMのTris、pH7.5; 150mMのNaCl; 1mMのMgCl₂; 0.0005%のNP-40)200μLで1回洗浄した。mRNP複合体をRNase1(Thermo Fisher #AM2294)をirCLIP NT2緩衝液(水性体積30μLおよびPEG400 6μLを補充したもの(最終16.7%))中0.4U/μLで用いて消化した。ヌクレアーゼ反応物を30℃で15分間、Eppendorf Thermomixer、1,400r.p.m.で15秒、90秒静止でインキュベートした。氷冷高ストリンジェンシー緩衝液(20mMのTris、pH7.5; 120mMのNaCl; 25mMのKCl; 5mMのEDTA; 1%のTriton-X100; 1%のデオキシコール酸Na)0.5mLを添加することによってヌクレアーゼ消化を停止させた。次いで、免疫沈降物を氷冷irCLIP NT2緩衝液0.25mL、次

いで0.05mLですぐにすすいだ。i r C L I Pアダプターライゲーションおよびライブラリー構築は以前に報告されたプロトコールに従った (Zarnegeret al. Nature Methods, 13: 489-492, 2016)。

【0238】

データをFAST-iCLIPバージョン0.9.3を使用して逆多重化し、UCSCからのマウスゲノムmm10に対して、パラメーター「`--outFilterScoreMinOverLread 0 --outFilterMatchNminOverLread 0 --outFilterMatchNmin 0`」を用いて、STAR (2.4.2a)を使用してアラインメントした。RPM正規化ゲノムブラウザトラックをR (3.4.1)で創出し、Gvizパッケージ (1.20.0)を使用してプロットした。3つの反復物全てで見いだされた各結合性部位の中間点を取り、上流および下流に20塩基を付加し、MEME (4.11.1)をパラメーター「`-dna -mod zoops -revcomp -minw 5 -maxw 10 -nmotifs 10 -maxsize 1000000`」を用いて実行することにより、富化されたモチーフを同定した。モチーフの同定後、transfac (1-2017)に対してtomtom (4.11.1)を実行して既知の結合性部位を同定した。Rで超幾何分布検定 (hypergeometric test) を使用してGO富化分析を実施した。GO用語のBH調整されたp値が0.05未満であれば、GO用語が富化されたとみなした。選択された目的の用語を棒プロットで示す。棒プロットの棒は、当該用語を有する試験された一覽中の遺伝子のパーセンテージを、当該用語を有するゲノム内の遺伝子のパーセンテージで割ったものを示す。3つの反復物全てにおいてFAST-iCLIPによって見いだされたピークをゲノム内の様々な特徴に割り当てた。プロモーターをTSSの上流150塩基と定義した。「trans_stop」を転写開始部位の上流および下流200塩基と定義した。

【0239】

臍帯血形質導入。臍帯血形質導入を以前に記載されている通り行った (Rentas, S. et al. Nature, 532: 508-511, 2016, doi: 10.1038/nature17665)。簡単に述べると、新鮮なCD34⁺臍帯血細胞またはフロー選別したCD34⁺CD38⁻細胞を、増殖因子インターロイキン6 (IL-6; 20ng/ml、Pepro tech)、幹細胞因子 (SCF; 100ng/ml、Pepro tech)、FLT3リガンド (FLT3-L; 100ng/ml、Pepro tech) およびトロンボポエチン (TPO; 20ng/ml、Pepro tech) を補充したStemSpan培地 (StemCell Technologies) 中で12~18時間にわたって前刺激した。次いで、同じ培地にレンチウイルスを感染効率 (MOI) 50~200で添加して24時間置いた。次いで、細胞を形質導入後2日間置いた後、in vitroまたはin vivoアッセイを行った。ヒトYTHDF2を、以前の報告 (Wang, X. et al. Nature 505: 117-120, 2014, doi: 10.1038/nature12730) に使用されている通り、CDSのN末端付近の5'-AAGGACGTTCCCAATAGCCAA-3'を標的とするshRNAによるノックダウンのために標的化された。スクランブルshRNA (シード配列5'-GCGCGATAGCGCTAATAAT-3') を対照として使用した。

【0240】

クローン原性前駆細胞アッセイ。10日目の培養した形質導入された細胞からフロー選別したGFP⁺臍帯血細胞 (1ml当たり12,000個) を半固体メチルセルロース培地 (MethoCult H4034; StemCell Technologies) に再浮遊させた。14日間インキュベートした後にコロニーカウントを行った。

【0241】

ヒト臍帯血液HSPC培養物。形質導入の2日後、ヒト臍帯血CD34⁺またはCD34⁺CD38⁻細胞を採取し、フローサイトメトリーによってGFP⁺パーセンテージを決定した。増大前に等しい数のGFP⁺細胞が培養されることを確実にするために、対照およびhYthdf2 KD間の%GFP⁺が一致するように、等しく培養したGFP⁻細胞をGFP⁺パーセンテージがより高いものに添加した。次いで、細胞を増殖因子IL

−6 (20 ng/ml)、SCF (100 ng/ml)、FLT3-L (100 ng/ml)、TPO (20 ng/ml) およびCHIR99021 (250 nM) (Stemgent) を補充したStemSpan培地 (StemCell Technologies) に1 ml 当たり 10^5 個の密度で播種した (Perry et al. Genes and Development, 25: 1928-1942, 2011)。

【0242】

ヒトHSC異種移植。ヒト臍帯血HSCのex vivoでの増大を分析するために、選別されたCD34⁺CD38[−]細胞 10^5 個にヒトYTHDF2 shRNAまたは対照shRNAを3日間にわたって形質導入し、次いで、形質導入効率 (% GFP⁺) および幹細胞マーカーについて分析した。10日目に、培養細胞を幹細胞マーカー分析のために採取した。hUCB HSC一次LDAアッセイのために、CD34⁺細胞を上記の通り富化させ、ヒトYTHDF2 shRNAまたは対照shRNAを50 MOIで形質導入した。感染の24時間後に培地を交換した。感染の3日後に対照またはYTHDF2 KD細胞から等しい数のGFP⁺細胞を選別し、終夜培養した。3つの用量、50 K個、20 K個および10 K個の選別されたGFP⁺細胞をそれぞれ、亜致死的に照射を受けた (3.25 Gy) NSGマウスに移植した。HSC生着のカットオフは、一次移植レシピエントのBMにおける総CD45⁺細胞のうちヒトCD45⁺GFP⁺細胞が1%よりも多く示されることであった。hUCB HSC二次LDAアッセイのために、移植の10週間後に、最も高い2つの用量の一次レシピエントからBM細胞を採取し、混合した。3つの用量、 1.2×10^7 個、 8×10^6 個、 4×10^6 個のBM細胞をそれぞれ、亜致死的に照射を受けた (3.25 Gy) NSGマウスに移植した。HSC生着のカットオフは、二次移植レシピエントのBMにおける総CD45⁺細胞のうちヒトCD45⁺GFP⁺細胞が0.2%よりも多く示されることであった。ELDAソフトウェア (Hu et al. Journal of Immunological methods, 347: 70-78, 2009) を使用してHSC頻度を評価した。全てのヒト臍帯血異種移植実験について、6〜8週齢の雌NSGマウスを使用した。

【0243】

m⁶A-seqデータ分析。ヒトおよびマウスm⁶A-seqデータをhg19およびmm10のトランスクリプトームに対してアラインメントした。m⁶Aピークを同定するために、hg19およびmm10トランスクリプトームを25ヌクレオチド幅のタイルに分けた。各タイルにおいてm⁶A IPおよび非IP (対照) 試料におけるリードの数をカウントし、フィッシャーの直接検定を用いてp値を算出し、複数の試験について調整した。有意なm⁶Aシグナル富化 (調整P値 ≤ 0.05) を有するタイルをより大きな領域に合体させた。100 bpよりも小さな領域は破棄し、200 bpを超える領域を100〜200 bpの小領域に分けた。各領域において対照を超えるm⁶Aシグナルを算出した。全ての反復物において少なくとも2倍の富化を有する領域をm⁶Aピークとして同定した。全てのm⁶Aピークをhg19およびmm10 RefGeneアノテーションとオーバーラップすることにより、m⁶Aピーク分布およびm⁶Aでマークされた遺伝子を決定した。m⁶Aピークをhg19 RefGeneとオーバーラップすることにより、m⁶Aでマークされた遺伝子を同定した。転写因子をフィルタリングするために、3つの試料全てにおけるm⁶Aによりマークされた遺伝子をヒト転写因子データベースhttp://fantom.gsc.riken.jp/5/ssstar/Browse_Transcription_Factors_hg19と比較した。次いで、Rパッケージ富化GOを使用してGO用語分析を実施した。m⁶Aでマークされたヒト転写因子を検索一覧として使用し、全ての発現した遺伝子をバックグラウンドとして使用した。有意な富化を有する造血関連BP用語を使用して図3Cを作成した。

【0244】

RNA-seq。ヒト臍帯血CD34⁺細胞に対照またはヒトYTHDF2 KDレンチウイルスを形質導入し、10日後にGFP⁺CD34⁺について選別した。各群についてGFP⁺CD34⁺細胞12,000個の3つの反復物を選別し、全RNAを抽出するために使用した。高品質の全RNA 4ナノグラムをcDNA合成およびライブラリー調

製のために製造者の指示に従ってSMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara、634891) およびNextera XT (Illumina、FC-131-1096) と共に使用した。得られた短い断片ライブラリーを品質および数量についてAgilent 2100 BioanalyzerおよびInvitrogen Qubit Fluorometerを使用して確認した。等モル濃度ライブラリーをプールし、再び定量化し、Illumina NextSeq 500機器の高倍率フローセルで75塩基対の単一リードとして配列決定した。配列決定後、Illumina Primary Analysis version NextSeq RTA2.4.11およびSecondary Analysis version bcl2fastq2 2.18を実行して全てのライブラリーについてリードを逆多重化し、FASTQファイルを生

10

【0245】

RNA-seq分析のために、リードをUCSCゲノムhg38に対して、Ensembl 87遺伝子モデルを使用し、Tophat バージョン2.0.13をデフォルトパラメーターで用いてアラインメントした。-m intersection-nonemptyを用いたHTSeq-カウントを使用してリードカウントを生成した。リードをERCC対照配列に対してもアラインメントし、カウントを表にした。スケーリング因子を各試料についてのERCCカウントの中央値に基づいて算出し、正規化のために使用した。R (3.4.1) のedgeRパッケージ (3.18.1) を使用して、異なって発現した遺伝子を見いだした。異なって発現した遺伝子はBH調整されたp値<.05および発現の2倍の変化を有する必要があった。

20

【0246】

RNAの安定性アッセイ。選別されたLT-HSC、ST-HSCおよびMPP 15,000個を、10 µg/mLのヘパリン (Sigma)、0.5×ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma)、10 ng/mLの組換えマウス (rm) SCF (Biovision, Inc.)、および20 ng/mLのTpo (Cell Sciences, Inc.) (Perry et al. Genes and Development, 25: 1928-1942 (2011)) を補充したStemSpan SFEM培地 (Stem Cell Technologies) 中、37°C、5% CO₂、5% O₂ で培養した。選別された細胞を、mRNA転写の阻害のために5 µMのアクチノマイシンD (Sigma) で処理した。処理の0時間後または4時間後に細胞を採取し、全RNAを抽出し、RNA-seqのために使用した。

30

【0247】

m⁶A RNAメチル化の定量化。

【0248】

wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来のマウスBM系列陰性細胞を、マウス Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec) で富化し、その後、TRIzol (Invitrogen) を用いて全RNA抽出を行った。Lin⁻細胞におけるm⁶A RNAメチル化の定量化をm⁶A RNA Methylation Quantification Kit (Abcam ab185912) を製造者のプロトコールに従って使用して実施した。いずれの群についても反復物当たり200 ngの全RNAを使用した。

40

【0249】

qPCR分析。

【0250】

LSK細胞10⁵個をwtマウスおよびYthdf2 KOマウスから選別した。TRIzol (Invitrogen) を用いて全RNAを抽出した。High-Capacity RNA-to-cDNA (商標) Kit (Thermo) を製造者のプロトコールに従って用いてcDNA合成を行った。使用したqPCRプライマーが表S5に列挙されており、qPCRプライマーを使用してwtおよびYthdf2 KO HSPCにおける転写因子の発現レベルを検証した。

50

【0251】

ウエスタンブロットおよび細胞内染色。Ythdf2 KOマウスモデルまたはhUCBにおけるKOまたはKD効率を検証するために、cKit⁺細胞33,000個またはGFP⁺細胞120,000個をそれぞれBMまたはトランスフェクトしたhUCB試料から選別した。図14Bに示されている通りヒトYTHDF2を過剰発現するように形質導入されたHela細胞を使用して過剰発現効率を検証した。抗YTHDF2ウサギポリクローナル抗体(MBL、RN123PW)およびβ-アクチンマウスモノクローナル抗体(NOVUS、NB600-501)を用いて免疫ブロッティングを実施した。使用した二次抗体は、IRDye 800CWヤギ抗マウスIgGおよびIRDye 800CWヤギ抗ウサギIgG抗体(LI-COR)であった。細胞内染色のために、wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来のBM細胞を上記の通りHSCマーカーで染色し、次いで、Cytifix/Cytopermキット(BD Biosciences)を製造者の指示に従って用いて固定した。固定し、透過処理した細胞を抗YTHDF2抗体(MBL RN123PW)、抗TAL1抗体(Santacruz sc-393287)、抗GATA2抗体(Santacruz sc-267)、抗RUNX1抗体(Santacruz sc-365644)、抗STAT5抗体(Santacruz sc-74442)で免疫染色し、Alexa-488ロバ抗ウサギIgG抗体(Invitrogen)によって検出した。

10

【0252】

単一細胞免疫染色。wtマウスおよびYthdf2 KOマウス由来のLSK 10,000個を選別してポリ-L-リシンコーティングスライド上に置き、それをモイスターチャンバーに入れ、4℃で30分間インキュベートして細胞をスライド上に静置した。冷却したメタノールを用いてRTで10分にわたって細胞を固定し、ユニバーサルブロッキング試薬(BioGenex)を用いてRTで30分にわたってブロッキングし、マウスTAL1抗体(Santa Cruz、SC393287)またはマウスIgG対照(Abcam)を用いて4℃で終夜染色した。次いで、細胞をAlexa Fluor 488ロバ抗マウスIgG(Thermo Fisher Scientific)を用いて4℃で30分にわたって染色した。PerkinElmer UltraviewスピニングディスクシステムでYokagawa CS-X1ディスクを用いて画像を取得した。全ての放出をC9100-23 Hamamatsu EM-CCDにVelocityソフトウェア(PerkinElmer)を使用して収集した。Z-スタックについて、ステップサイズを400nmに設定した。画像当たりの染色強度をImageJプログラムによって定量化した。

20

30

【0253】

蛍光免疫染色と併せたFISH。選別されたLSKを顕微鏡ガラススライド(Fisher Scientific Cat. No. 12-544-4)上でCytospin(商標)4 Cytocentrifuge(Thermo Scientific、cat. no. A78300003)を800rpmで1分間、中程度の加速と共に使用してスピンさせ、その後、4%PFA(16%(wt/vol)水溶液から希釈したもの、Electron Microscopy Sciences、cat. no. 15710)に即時に浸漬した。細胞をRT(25±2℃)で30分にわたって固定した。RNAscopeマルチプレックス蛍光検出キットを製造者の指示に従い使用して(Advanced Cell Diagnostics)、以下の2~3の改変を伴ってRNA in situハイブリダイゼーションを実施した：抗原回復は不必要であった。また、消化を1:15に希釈したプロテイナーゼIII溶液を用いてRTで10分にわたって実施した。マウスTall1およびGata2を標的とするRNAscopeプローブはACDbioによって設計および作製された。in situハイブリダイゼーションの完了後、スライドをPBSTで2回すすぎ、バックグラウンドブロッキング(バックグラウンドバスター溶液、Innovex、cat. no. NB306)および一次抗体インキュベーションを用いて直接処理した。抗YTHDF2(MBL、1:500)および抗Dc

40

50

p1α (Santa Cruz、SC100706、1:200) 抗体を抗体希釈試薬緩衝液 (Life technologies、cat. no. 003118) で希釈し、4℃で終夜インキュベートした。ロバ抗ウサギAlexa Fluor 488 (Invitrogen、1:500) およびロバ抗マウスAlexa Fluor 633 (Invitrogen、1:500) をタンパク質標的多重化のために使用した。

【0254】

(実施例A-1)

一次マウスにおいてYthdf2 KOにより表現型HSCの増加が導かれる。

【0255】

Ythdf2の表現型HSCに対する影響を調査するために、Crispr-Cas9技術を利用してYthdf2^{f/f}コンディショナルノックアウトマウスを生成し、次いで、Mx1-Creマウスと交雑させて、造血細胞におけるYthdf2発現を特異的に低減させた(以降Ythdf2 KOマウス)(図1AおよびB)。BM HSPCは、pI:pCの不在時に識別可能な差異を示さなかった(図7A)。pI:pC注射の4週間後、同腹仔野生型(wt)マウスと比較して、長期HSC(Lin⁻Scal⁺cKit⁺(LSK)CD34⁻Flk2⁻;LT-HSC)および短期HSC(LSKCD34⁺Flk2⁻;ST-HSC)の頻度および絶対数の両方に有意な増加が観察されたが、Ythdf2 KOマウスにおける多分化能前駆細胞(LSKCD34⁺Flk2⁺;MPP)では観察されなかった(図1C~1E)。長期HSC(LT-HSC)およびST-HSCの頻度および絶対細胞数は2倍を超えて増加したが、MPPは穏やかな応答を示したことが見いだされた(図1Cおよび1E)。Ythdf2 KOによりBM細胞充実性の増大が導かれたが、共通の骨髓系前駆細胞(CMP)、顆粒球-マクロファージ前駆細胞(GMP)、巨核球-赤血球前駆細胞(MEP)および共通のリンパ系前駆細胞(CLP)を含めた拘束前駆細胞、ならびに成熟系列細胞、赤血球、骨髓性細胞、B細胞およびT細胞の絶対数には、Ythdf2 KOとwtマウスの間で有意差は示されなかった(図1F~H)。細胞周期分析から、Ythdf2 KO後のHSCまたはMPPの静止状態の識別可能な変化は明らかにならなかった(図7B)。とりわけ、Ythdf2 KO LT-、ST-HSCおよびMPPにおけるアポトーシス細胞のパーセンテージがwt対照と比較して有意に低下した(図7C)。Ythdf2 KOマウスにおけるあらゆる潜在的なHSC欠陥をさらに同定するために、脾臓におけるHSC、拘束前駆細胞、および成熟系列の数を調査し、wtマウスとYthdf2 KOマウスの間で有意差は見いだされなかった(図7D~7H)。要約すると、Ythdf2 KOにより、一次マウスにおいてHSC数が前駆細胞または系列細胞のいずれの偏りも欠陥も伴わずに特異的に増加する。

【0256】

(実施例A-2)

マウスにおいてYthdf2 KOにより機能的HSCが増大する。

【0257】

Ythdf2 KOにより機能的HSCが増大するかどうかを決定するために、KOマウスまたはそれらの対照同腹仔由来のカルボキシフルオレセインジアセテートスクシニミジルエステル(CFDA-SE)標識BM細胞1×10⁶個を、致死的に照射を受けたレシピエントマウスに移植することにより、短期ホーミングアッセイを最初の実施し、変異体とwt対照の間でホーミング能力に有意差は見いだされなかった(図7I)。次いで、ptprc変異体系統(CD45.1)に由来するレシピエントBM細胞2×10⁵個と共に、ドナーBM細胞(CD45.2)2×10⁵個、7.5×10⁴個または2.5×10⁴個を致死的に照射を受けたレシピエントマウスに移植することにより、限界希釈、競合再配置単位アッセイ(LDA)を実行した(図2A)。Ythdf2 KOマウスにおける表現型HSCの数の増加と一致して、Ythdf2 KO HSCでは対照と比較して競合再配置単位(CRU)が2.2倍に増加したことが見いだされた(図2B)。2×10⁵個群では、移植の16週間後に、Ythdf2 KOドナー細胞からの全体的

な再配置率に関して、対照と比較して、有意な増加が観察された（図 2 C）。さらに、Y t h d f 2 KO BM細胞のレシピエントでは、対照のレシピエントと比較して、ドナー由来の L T-H S C および S T-H S C の著しく高い頻度および絶対数が示されたが、BMにおける M P P に関してはそれが示されなかった（図 2 D および 2 E）。さらに、変異体および w t 細胞の移植レシピエント由来の BM におけるドナー由来の拘束前駆細胞および成熟系列が有意な変化を示さなかったことが見いだされた（図 2 F および 2 G）。Y t h d f 2 KO マウス由来の H S C の長期再配置能力を決定するために、一次レシピエントに由来する BM 細胞を用いた二次移植を行った。とりわけ、対照と比較して、Y t h d f 2 KO 細胞由来の C R U では 3.5 倍の増加が明らかになり（図 2 H）、二次移植の 16 週間後に BM および脾臓のどちらにおいても白血病の徴候は示されなかった（図 9 A ~ 9 F）ことが見いだされた。さらに、図 2 I および 2 J では、W T マウスまたは Y t h d f 2 KO マウス由来の総骨髄（BM）を 3 つの異なる投与量で移植することにより、限界希釈アッセイを行った。移植の 4 週間後、Y t h d f 2 KO BM 細胞 200, 000 個を移植したマウスにおいて、W T BM 細胞を移植したマウスと比較してドナー細胞の生着の増加が観察された。さらに、この増加により、移植レシピエントにおける系列の偏りは生じなかった。

10

【0258】

p I : p C 注射後 5 カ月を超える時点で BM および脾臓の両方における幹細胞、前駆細胞、および系列を試験することにより、恒常性条件下での造血に対する Y t h d f 2 KO の長期にわたる影響も調査した（図 9 A）。Y t h d f 2 KO マウス由来の BM において対照由来の BM と比較して L T-H S C の穏当な増加が観察されたが（図 9 C）、Y t h d f 2 KO マウスと対照マウスの間で BM または脾臓のいずれか由来の前駆細胞および系列細胞に識別可能な差異はなかった（図 9 D ~ 9 J）。これらの知見から、i n v i v o における Y t h d f 2 KO の長期にわたる影響により、系列分化が歪むこともなく、異常な増殖が促進されることもないことが示され、これは、Y t h d f 2 が白血病誘発には必要ないという以前の報告と一致する。p I : p C 誘導の 5 カ月後の BM における機能的 H S C の頻度を検証するために、w t マウスおよび Y t h d f 2 KO マウス由来の BM 細胞 7.5×10^4 個を、コンピテント細胞と共に、致死的に照射を受けたレシピエントに移植した。本発明者らは、Y t h d f 2 KO により、レシピエントにおいて w t 対照と比較して有意に高い生着が導かれることを見だし、これにより、Y t h d f 2 KO が i n v i v o におけるマウス H S C 増大に対して長期にわたる能力を有することが示唆される（図 9 K）。総合すると、これらのデータから、Y t h d f 2 KO により、系列拘束に影響を及ぼすことなく i n v i v o における特異的かつ有意なマウス H S C 増大がもたらされることが明らかになる。

20

30

【0259】

（実施例 A-3）

Y t h d f 2 は m^6 A 媒介性 m R N A 分解によって H S C 自己複製遺伝子発現を制御する。

【0260】

Y t h d f 2 KO によりどのように H S C が増大するかの基礎をなす機構を探究するために、成体 C 5 7 B L / 6 J マウスから選別された L T-H S C、S T-H S C、および M P P におけるメチル化 R N A 免疫沈降とハイスループット配列決定（M e R I P - s e q または m^6 A - s e q）を組み合わせて m^6 A メチロームのマッピングを実施した（Meyer et al. Cell, 149: 1635-1646, 2012; Schwartz et al. Cell, 155: 1409-1421, 2013; Dominissini et al. Nature, 485: 201-206, 2012）。2 つの独立した反復物から有意に富化された重複するピークを同定することによって m^6 A ピークを選択した。以前の研究（Meyer et al. Cell, 149: 1635-1646, 2012; Dominissini et al. Nature, 485: 201-206, 2012）と一致して、3 種の H S P C 集団全てにおいて、 m^6 A ピークが m R N A オープンリーディングフレーム（O R F）内、3' 非翻訳領域（U T R）内、および終止コドン周辺で豊富であることが見いだされた。中等度に発現した遺伝子の転写物がメ

40

50

チル化されている可能性がより高かった（図10A～10C）。興味深いことに、 m^6A 修飾が *Gata2*、*Etv6*、*Stat5* および *Tal1* などの転写因子の mRNA において富化されていることが見いだされ、これは、HSC 自己複製および幹細胞の状態維持に極めて重要であることが実証されており（Wanget al. *Blood*, 113: 4856-5865, 2009; Ebina et al. *The EMBO Journal*, 34: 694-709, 2015; Orkin et al. *Cell*, 132: 631-644, 2008; de Pater et al. *The Journal of Experimental Medicine*, 210: 2843-2850, 2013; Hock et al. *Genes and Development*, 18: 2336-2341, 2004; Lim et al. *The Journal of Clinical Investigation* 122:3705-3717, 2012; Reynaud et al. *Blood*, 106: 2318-2328, 2005; および Kato et al. *The Journal of Experimental Medicine*, 202: 169-179, 2005）、 m^6A 修飾が HSC の制御において重大な役割を果たす可能性があることが示唆される（表S1、HSC 自己複製および維持に重大な重要な転写因子は HSPC において m^6A により標識されている）。 m^6A mRNA メチル化により、自己複製および分化に参与する重要なシグナル伝達経路内の転写因子および遺伝子をコードする mRNA の分解が容易になることによって幹細胞の運命決定が制御されるというエビデンスが蓄積されていることを考慮して（Batista et al. *Cell Stem Cell*, 15: 707-719, 2014; Geula et al. *Science* 347: 1001-1006, 2015; Yoon et al. *Cell*, 2017; Zhang et al. *Nature*, 549: 273-276, 2017; Zhao et al. *Nature*, 542: 475-478, 2017; Li et al. *Cancer Cell*, 31: 127-141, 2017; Li et al. *Nature*, 548: 338-342, 2017）、次に、

アクチノマイシン D での転写阻害後の mRNA レベルをモニタリングすることにより、LT-HSC、ST-HSC、および MPP における mRNA 分解速度を測定した。ST-HSC、および MPP ではメチル化 mRNA の分解速度が非メチル化 mRNA よりも有意に速いことが見いだされた（図10D）。Ythdf2 は、mRNA 分解を媒介する、よく認識された m^6A 「リーダー」であるので（Wanget al. *Nature*, 505: 117-120, 2014）、マウス多分化能造血の前駆体細胞株である HPC-7 において赤外 UV 架橋結合免疫沈降配列決定（irCLIP-seq）を実施することによって Ythdf2 の標的をさらに決定した（Pintodo et al. *The EMBO Journal*, 17: 5744-5756, 1998; Zarnegar et al. *Nature Methods*, 13: 489-492, 2016）（図3A；図11A～11C）。結果から、Ythdf2 標的 mRNA の 57.8% が m^6A ピークを含有したことが示された（図11D）。Ythdf2 結合性部位では保存された m^6A モチーフが富化されており、 m^6A 分布特徴の特性が示された（図3Bおよび3C）。Ythdf2 標的転写物の遺伝子オントロジー（GO）分析により、造血またはリンパ器官発生に関連する遺伝子の富化が明らかになり、これにより、造血の制御への Ythdf2 の関与が示唆される（図3D）。とりわけ、Ythdf2 が、*Tal1* および *Gata2* の mRNA などの転写因子 mRNA に、大部分が m^6A ピークと重複する部位で結合することが見いだされた（図3E；図5Eおよび表S2、Ythdf2 は3つの irCLIP-seq 反復物からの mRNA を標的とした）。wt マウスおよび Ythdf2 KO マウス由来の LSK Flk2⁺ 細胞における全 RNA 質量に有意な変化は観察されなかった。哺乳動物細胞において m^6A 修飾はアデノシンヌクレオチドの 0.1～0.4% しか構成しないが、Ythdf2 KO により、BM Lin⁺ 細胞由来の全 RNA における m^6A 含有量のレベルの上昇が導かれることが見いだされ、これにより、Ythdf2 が m^6A でマークされた mRNA の安定性を特異的に制御することが示唆される（図12Aおよび12B）。一貫して、総 mRNA の qPCR 分析により、Ythdf2 KO LSK 細胞において、wt 対照と比較して、mRNA が m^6A によって修飾されていることが示されている *Tal1*、*Gata2*、*Runx1* および *Stat5a* のレベルの上昇が明らかになった（図3F）。単一細胞免疫蛍光染色および細胞内フローサイトメトリーにより、Ythdf2 KO HSPC では、*TAL1*、*GATA2*、*RUNX1* および *STAT5* などの、幹細胞の自己複製に参与する、 m^6A で標識された転写因子の強度の有意な増加が示されたことがさらに明らかになり、これにより、HSC 自己複製における Ythdf2 の抑制性の役割が示される（図3G；図12C）。以前の試験により、Ythdf2 が、結合した mRNA を mRNA 分解部位に局在させることによって RNA 代謝を制御することが示されている（Wa

10

20

30

40

50

nget al. Nature, 505: 117-120, 2014)。HSC自己複製の制御におけるYthdf2の機構をさらに探究するために、Tall mRNAの蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)ならびにYthdf2およびmRNA分解部位のマーカーであるDcp1aの蛍光免疫染色を実施し(Sheth et al. Science, 30: 805-808, 2003; Kedersha et al. Methods in Enzymology, 431:61-81, 2007)、選別されたwt HSPCおよびYthdf2 KO HSPCにおけるそれらの相対的な空間分布を分析した。wt細胞ではTall mRNA、Dcp1aおよびYthdf2の共局在が観察されたが、Ythdf2 KO対照では実質的に低減した(図3Hおよび3I)。さらに、wt HSPCまたはYthdf2 KO HSPCにおけるGata2 mRNA FISHとYthdf2およびDcp1aの共染色により、同様の観察が確認された(図12Dおよび12E)。Ythdf2 KOマウスにおけるTallなどの転写因子の発現の増大が、HSC増大の原因となるかどうかを決定するために、wt LSK細胞およびYthdf2 KO LSK細胞において低分子ヘアピン型(sh)RNA媒介性Tallノックダウン(KD)を使用したレスキュー実験を実施し、その後、致死的に照射を受けたレシピエントに移植した。HSPCにおけるTallの枯渇により、以前に報告された通りwt細胞の再構成能力が有意に損なわれ、また、Ythdf2 KO細胞の生着の増大のレスキューもなされた(図12F)。全体として、これらのデータから、Ythdf2が、幹細胞複製のために必須である転写因子をコードするmRNAの分解を可能することによってHSC自己複製を制御することが示される。

【0261】

(実施例A-4)

ヒトUCB HSPCにおけるYthdf2の役割のm⁶A-seqおよびRNA-seqによる詳細な分析。

【0262】

単一のヒト臍帯血液単位におけるHSCの数が限られていることが、HSC移植などの臨床的適用の障害となっている(Walasek et al. Annals of the New York Academy of Sciences, 1266:138-150, 2012)。Ythdf2 KOにより表現型および機能的マウスHSCの増加がもたらされるという観察により、YTHDF2ノックダウン(KD)によりヒトUCB HSC増大を容易にすることができるかどうかの試験が促された。最初に、3つの個々のhUCB試料から単離されたCD34⁺細胞を用いたm⁶A-seqを実施した(図13A)。m⁶A修飾は、主にmRNAに存在し(約95%)、予測通りmRNA ORF領域、3'UTR、および終止コドン付近に優先的に存在した(約90%)(図4Aおよび4B;図13B)。マウスおよびhUCB HSPCにおけるm⁶Aランドスケープを比較し、2,239種の遺伝子が一般に、m⁶Aタグを有することが見いだされた(図4C)。これらの一般にm⁶Aタグを有する転写物は、造血および幹細胞維持に関連する遺伝子に富化されていた(図4D)。マウスHSC自己複製に参与する転写因子のmRNAにm⁶A標識が富化されるので、次に、GO用語分析を実施することによってhUCB CD34⁺細胞におけるm⁶Aでマークされた転写因子転写物を特徴づけた。722種の同定されたm⁶A標識された転写因子mRNAの中で、主要なGO用語は、細胞の運命拘束および幹細胞維持に関連した(図13C)。例えば、その過剰発現によりヒトおよびマウスHSCがex vivoで増大することが報告されているHOXB4(Amsellem et al. Nature Medicine, 9: 1423-1427, 2003; Antonchuck et al. Cell, 109: 39-45, 2002)は、hUCB CD34⁺細胞においてm⁶Aによりマークされた(図4E)。HSC自己複製のために必要であり、HSCを他の細胞型から誘導するために重大である他の転写因子(Ebina et al. The EMBO Journal, 34: 694-709, 2015; Galan-Caridad et al. Cell, 129:345-357, 2007)、例えば、Zfx、RUNX1およびFOXBなども、hUCB CD34⁺細胞においてm⁶Aタグを有した(図13Fおよび13G、ならびに、論文(その補足の表も含む)がその全体がこれによって参照により本明細書に組み込まれる、論文「Suppression of m6A reader Ythdf2 Promotes Hematopoietic Stem Cell Expansion」、Li et al, Cell Research 28, 904-917(2018)の補足の表S3、Genes mar

ked by m⁶A in human UCB^{CD34+} HSPCs from individual samplesも参照されたい)。hUCB HSPCにおけるYTHDF2の役割をさらに詳細に分析するために、対照またはYTHDF2 KD hUCB CD34⁺細胞を用いてRNA-seqを実施した(図4F;図13Dおよび13E)。驚くべきことに、HOXB4および他のHSC自己複製に関連する転写因子を含めた、m⁶Aによりマークされた転写物では、YTHDF2 KD細胞において、対照と比較して、m⁶A標識されていない遺伝子に関しては注目すべき変化を伴わずに、インプットmRNAリードの有意な増加が示された(図4G~4I;図13Fおよび13G)。これらの結果により、RNA分解によるhUCB HSC自己複製の制御におけるYTHDF2の役割が裏付けられる。

【0263】

(実施例A-5)

YTHDF2 KDによるhUCB HSCの増大。

【0264】

YTHDF2の抑制によりヒトHSCを増大させることができるかどうかをさらに探究するために、hUCB HSPCにおける低分子ヘアピン型(sh)RNAにより誘導されるYTHDF2 KDを上記の通り実施した(図4F)。7日間のex vivoにおける培養後、YTHDF2のレンチウイルスによるノックダウンにより、対照細胞、特に、最も原始的なCFU-顆粒球赤血球単球巨核球(GEMM)コロニー型および前期赤芽球系前駆細胞(BFU-E)と比べて、CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻EPCR⁺表現型HSCの頻度および絶対数のそれぞれ平均14.3倍および13.6倍の増加ならびにCFUの5.1倍の増加がもたらされ、これは、YTHDF2 KD hUCB細胞においてTAL1などの造血のために重要な転写因子の発現レベルがより高いことを反映する(図5A~5D;図14A)。興味深いことに、YTHDF2 KD hUCB HSPCでは対照細胞と比較してアポトーシス率が有意に低下し、これは、Ythdf2 KOマウスにおけるHSCの傾向と同様であった(図5E)。また、図5Fは、形質導入の10日後にYthdf2ノックダウン(KD)HSCが対照HSCと比較して10倍に至るまでの増加を示したことを示す。次に、過剰発現(OE)YTHDF2のHSPC機能に対する影響を探索した。YTHDF2の過剰発現により、hUCB HSPCのクローン原性潜在性が2.2分の1に低下し、これにより、YTHDF2により、ex vivoにおけるHSC維持が負に制御されることが示唆される(図14Bおよび14C)。

【0265】

in vivoにおいてYTHDF2 KDによりヒトHSCを増大させることができるかどうかを決定するために、対照およびYTHDF2 shRNAを感染させたhUCB CD34⁺細胞から選別されたGFP⁺細胞を感染の4日後に移植することによってLDAを実施した(図6A)。移植の10週間後、レシピエントNOD/SCID Il2rg^{nu/nu}(NSG)マウス由来のBM細胞をin vivo増大後に分析し、機能的HSC頻度を測定した。とりわけ、対照群と比較して、YTHDF2 KD細胞のレシピエントでは、各系列の割合の変化は伴わずに、BMにおけるヒト造血細胞(hCD45⁺GFP⁺)生着の9倍の増加が示された(図6Bおよび6CH;図15Aおよび15B)。YTHDF2 KDにより、一次レシピエントのBMにおける骨髓系、巨核球および赤血球のパーセンテージが有意に増加した(図15C)。したがって、YTHDF2 KD細胞におけるHSC頻度が対照細胞におけるHSC頻度と比べて4.4倍増加したことが見いだされた(図6D)。YTHDF2 KD hUCB細胞の再構成され、自己複製を受ける長期にわたる能力が確認された。一次レシピエントから亜致死的に照射を受けた二次NSGレシピエントマウスへのBMの移植の12週間後、BMにおけるヒト造血細胞キメラ化は、YTHDF2 KD群において、対照群におけるものと比較して高かった(図6E、6F;図15D)。YTHDF2 KD細胞のCRUでは、対照細胞におけるものと比べて8倍の増加が明らかになった(図6G)。これらのデータから、YTHDF2 KDにより、ex vivoにおける表現型および機能的hUCB HSCの両方の増大が著しく容易になることが実証される。

【0266】

(実施例A-6)

本明細書の実施例では、m6AリーダーであるYthdf2のコンディショナル欠失により、系列の偏りを伴わずに表現型HSCおよび機能的HSCの増大が導かれることを実証する。in vivoにおいて間葉系幹細胞が同時に増加するかどうかを調査するために、Ythdf2^{f/f}マウスをMx1-Creマウスと交雑させて、間葉細胞からのYthdf2発現をコンディショナル欠失させた。pI:pc注射の9カ月後にYthdf2^{KO}およびそれらの野生型同腹仔から骨髓細胞を単離した。総骨髓細胞の単一細胞懸濁物をフロー抗体で免疫染色した。造血細胞(CD45、Ter119)および内皮細胞(CD31)を特異的なマーカーを使用して除外した。総骨髓間質細胞内に存在する間葉系幹細胞を、N-カドヘリンおよびCD105抗体を含めることによってさらに精製した。N-カドヘリン⁺およびCD105⁺の両方の特色を有する間葉系幹細胞を定量化した。Ythdf2のコンディショナル欠失により、間葉系幹細胞の頻度の3.6倍の増大が導かれた(図16)。本発明者らの試験は、Ythdf2の喪失により、in vivoにおける骨髓間葉系幹細胞を増大させることができることを明白に実証するものである。

【0267】

考察

【0268】

最近の研究では、mRNA m⁶A修飾の生物学的機能が探究されているが(Zheng et al. Molecular Cell, 49: 18-29, 2013; Zhou et al. Nature, 526: 591-594, 2015; Alarcon et al. Cell, 162: 1299-1308, 2015; Zhang et al. Cancer Cell, 31: 591-606 e596, 2017; Lence et al. Nature, 540: 242-247, 2016; Haussmann et al. Nature, 540: 301-302, 2016; Chen et al. Cell Stem Cell, 16: 289-301, 2015; Alarcon et al. Nature, 519: 482-485, 2015; Xiao et al. Molecular Cell, 61: 507-519, 2016; Wojtas et al. Molecular Cell, 68: 374-387 e312, 2017; Ivanovna et al. Molecular Cell, 67: 1059-1067 e1054, 2017; Fustin et al. Cell, 155: 793-806, 2013; Slobodin et al. Cell, 169: 326-337 e312, 2017; Schwartz et al. Cell, 159: 148-162, 2014; Pendleton et al. Cell, 169: 824-835 e814, 2017; Shi et al. Cell Research, 27: 315-328, 2017; Huang et al. Nature Cell Biology, 20: 285-295, 2018; Bertero et al. Nature, 2018; Liu et al. Nature, 518: 560-564, 2015)、本明細書の実施形態では、Ythdf2を、転写後m⁶A修飾と自己複製のために重要な転写因子をコードするmRNAの分解をカップリングすることによるヒトおよびマウスHSC自己複製の重要な制御因子として同定する。マウスHSPCおよびhUCB HSCにおけるYthdf2の抑制により、自己複製のために重大な多数の重要なTFの発現の増大を導き、それにより、注目すべき系列の偏りおよび白血病の潜在性を伴わずに、表現型HSCおよび機能的HSCの両方のex vivoにおける増大を容易にすることができる。さらに、間葉系間質細胞においてMx1-creが活性化され得るので、幹細胞ニッチがYthdf2抑制媒介性マウスHSC増大にいくらかの程度まで寄与し得る。Ythdf2の間葉系幹細胞(MSC)に対する機能、ならびに、in vivoにおいてHSCおよびMSCの両方におけるYthdf2の抑制によりどのようにHSCを相乗的に増大させることができるかを試験することが興味深いものになる。

【0269】

m⁶Aライター複合体Mettl3およびMettl14のmRNAスプライシング、翻訳、およびpri-miRNAプロセシングに対する広範かつ複雑な影響を考慮すると(Barbieri et al. Nature, 2017; Alarcon et al. Nature, 519: 482-485, 2015; Liu et al. Nature, 518: 560-564, 2015)、Mettl3またはMettl14枯渇の結果、正常な幹細胞および白血病において別個の転帰がもたらされる。最近の研究により、Mettl3およびMettl14が白血病発症および白血病幹細胞維持において重要な役割を果たすことが実証された(Vuet al. Nature Medicine, 2017; Barbieri et al. Nature, 2017; Weng et al. Cell Stem Cell, 22: 191-205 e199, 2018)。対照的に、Yth

d f 2 は m⁶ A 媒介性 m R N A 分解に主に関与すると考えられている (Batista et al. Cell Stem Cell, 15: 707-719, 2014; Yoon et al. Cell, 2017; Zhang et al. Nature, 549: 273-276, 2017; Wang et al. Nature, 505: 117-120, 2014)。本明細書のある特定の実施形態によると、Y t h d f 2 を操作することにより、m R N A プロセシングの他の側面に影響を及ぼすことなく、幹細胞の自己複製のために重大な T F をコードする特定の m⁶ A でマークされた m R N A の半減期を延長することができると考えられる。本明細書の実施例は、H S C の Y t h d f 2 枯渇は系列拘束を歪めることも血液悪性疾患を誘導することもなく、それにより、H S C の増大に伴う白血病誘発のリスクが低減することを示すものである。さらに、幹細胞の自己複製は、細胞分裂、生存、分化の防止および幹細胞性の保持で構成される複雑なプロセスである。Y t h d f 2 欠損 H S C が低いアポトーシス率を示したという知見から、本明細書の方法の実施形態は、幹細胞の自己複製の別の特徴の利益にもなることが示される。

【0270】

h U C B H S C 移植の使用に関する主要な限定は、1つの h U C B 単位中の H S C の数が不十分なことである。とはいえ、以前の研究により、D l k 1、S R 1、M u s a s h i 2 および U M 1 7 1 により、ノッチ、A H R シグナル伝達または他の未知の経路を標的とすることによって h U C B H S C を増大させることができることが明らかになっている (Boitano et al. Science, 329: 1345-1348, 2010; Fares et al. Science, 345: 1509-1512, 2014; Rentas et al. Nature, 532: 508-511, 2016; Chou et al. Experimental Hematology, 41: 479-490 e474, 2013)。したがって、本明細書の実施形態は、H S C 自己複製のために重大な多数の重要な T F を標的とするため、および H S C の増大を増強するための新規かつ強力なやり方を提供する。例えば、i n v i t r o での培養中に低分子化学物質または A A V 媒介性 K D によって Y t h d f 2 のレベルおよび機能を低下させることにより、i n v i v o での移植後に Y t h d f 2 のレベルおよび機能を回復させることを可能にし、したがって、ヒト患者における正常な H S C 維持および機能に影響を及ぼさないようにすることができる。さらに、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法を他の方法と組み合わせて、ヒト H S C だけでなく他の幹細胞の増大も容易にし、それにより、幹細胞に基づく治療のためのアプローチをもたらすことができる。

【0271】

(実施例 B)

以下の実施例「B」では以下のプロトコールを使用した。

【0272】

動物。C 5 7 B L / 6 - G t (R O S A) 2 6 S o r t m 1 (H B E G F) A w a i / J (i D T R)、B 6 . C g - G t (R O S A) 2 6 S o r t m 1 4 (C A G - t d T o m a t o) H z e / J (R 2 6 R t d T)、T g (C s p g 4 - D s R e d . T 1) 1 A k i k / J、C x c l 1 2 t m 2 . 1 S j m / J、K i t l t m 2 . 1 S j m / J (S C F^f / ^f)、C x c l 1 2 t m 1 . 1 S j m / J (C X C L 1 2^f / ^f) マウスを J a c k s o n L a b o r a t o r y から入手した。N - c a d - C r e E R^T マウス、および N - c a d - T d T マウスは A p p l i e d S t e m C e l l , I n c により生成された。N - c a d - C r e E R^T ; R 2 6 - t d T マウスを誘導するために、タモキシフェン (S i g m a) を注射 1 回当たり 2 m g で 3 日間、腹腔内に注射した。胚期の N - c a d - C r e E R^T ; R 2 6 - t d T を誘導するために、1 . 5 m g の単回用量の T M X を E 1 2 . 5 の妊娠中の雌に腹腔内に注射した (I P)。E 1 9 . 5 時点で帝王切開を実施し、新生仔マウスを里親マウスに渡した。N - c a d - C r e E R^T ; i D T R マウスにおいて N - C a d⁺ 細胞除去を誘導するために、D T (S i g m a) を 2 日に 1 回、示されている通り体重 1 g 当たり 5 0 n g の用量で腹腔内に注射した。5 F U (S i g m a - A l d r i c h) を体重 1 g 当たり 1 5 0 μ g で尾静脈に 1 回注射した。5 F U 注射後、マウスをテキストに記載されている通り分析した。本試験に使用したマウス系統は全て C 5 7 B L / 6 J 遺伝的背景を有するものであった。動物を遺伝子型決定の結果に従って実験にランダムに含めた。動物実験は研究者に対して盲検式で行った。実験ごとに使用し

た動物の数は図の説明文に示されている。本試験に使用したマウスは全て、Stowers Institute for Medical Research (SIMR) の動物施設内に収容し、SIMRおよびNational Institutes of Health (NIH) ガイドラインに従って取り扱った。手順は全てSIMRのInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって認可されたものであった。

【0273】

フローサイトメトリー。表現型分析のために、造血細胞を骨髓（大腿骨および脛骨）から採取した。0.16 Mの塩化アンモニウム溶液を使用して赤血球を溶解させた。細胞表面表現型決定のために、抗CD3 (145-2C11)、抗CD4 (RM4-5)、抗CD8 (53-6.7)、抗Mac-1 (M1/70)、抗Gr1 (RB6-8C5)、抗B220 (RA3-6B2)、抗IgM (II/41) および抗TER119 (TER-119) を含む系列カクテル (Lin、フィコエリトリン (PE) -Cy5) を使用した（骨髓細胞100万個当たり抗体カクテル100ng、eBioscience）。示されている場合には、SCA1に対するモノクローナル抗体 (D7、eBioscience)、c-KITに対するモノクローナル抗体 (2B8、eBioscience)、FLK2に対するモノクローナル抗体 (A2F10、eBioscience)、CD34に対するモノクローナル抗体 (RAM34、eBioscience)、CD48に対するモノクローナル抗体 (HM48-1、eBioscience)、CD150に対するモノクローナル抗体 (TC15-12F12.2、BioLegend) およびCD49bに対するモノクローナル抗体 (HMa2、BioLegend)（全て骨髓細胞100万個当たり50ngで使用する）も使用した。末梢血の系列分析のために、CD45.1に対するモノクローナル抗体 (A20、eBioscience)、CD45.2に対するモノクローナル抗体 (104、eBioscience)、CD3に対するモノクローナル抗体、B220に対するモノクローナル抗体、Mac-1に対するモノクローナル抗体およびGr1に対するモノクローナル抗体を使用した。7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD) (A1310、Life technologies) を使用して死細胞を排除した。間質ニッチ細胞分析のために、CD45 (30-F11、eBioscience)、CD31 (390、eBioscience)、PDGFR α -ビオチン (APB5、eBioscience)、LepR-Bio (R&D)、CD51 (クローンRM7-V、BioLegend)。ビオチンとコンジュゲートした抗体で染色した試料を染色用培地で洗浄し、次いで、ストレプトアビジンbrilliant violet 421 (商標) (BioLegend、1:500) と一緒にインキュベートした。MoFlo (Dako)、InFlux Cell Sorter (BD Biosciences)、MACSQuant (Miltenyi Biotec) またはCyAn ADP (Dako) 機器を使用して細胞選別および分析を実施した。FlowJoソフトウェアを使用してデータ分析を実施した。

【0274】

ホールマウント胸骨HSC免疫染色。胸骨を採取し、メスを用いて3~4つの断片に切断した。断片を矢状に二分して骨髓腔を露出させ、4% PFA中に固定した。20% 正常ヤギ血清および0.5% Triton X100を含有するPBS中でブロッキング/透過処理し、一次抗体を用いて3日にわたって染色した。組織を、二次抗体と一緒に2時間インキュベートした (Bruns et al., 2014; Kunisaki et al., 2013)。スピニングステージ共焦点システム (CSU-X1; Yokogawa Corporation of America) およびVelocity撮像ソフトウェア (PerkinElmer) を伴うOrca-R2カメラ (Hamamatsu) および20 $\times$ /0.8 Plan-Apochromat対物レンズ (Carl Zeiss) が取り付けられた倒立顕微鏡 (Axiovert 200M; Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany) を含むスピニングステージ共焦点顕微鏡 (UltraVIEW; PerkinElmer) で蛍光イメージングを実施した。画像をステップサイ

10

20

30

40

50

ズが $4\ \mu\text{m}$ の一連の光学切片として収集した。画像を、試料全体を網羅するために十分なタイルパターン（重複 10% ）で収集した。チャンネルを逐次的に収集した。 $405\ \text{nm}$ の光（ $50\ \text{mW}$ のダイオードレーザー、OEM）を使用して（青色色素）を励起させ、 $561\ \text{nm}$ の光（ $50\ \text{mW}$ の固体レーザー、OEM）を使用して（赤色色素）を励起させ、それぞれを、 $415\ \text{nm}\sim 775\ \text{nm}$ 、 $580\ \text{nm}\sim 650\ \text{nm}$ のバンドを有するマルチバンドパスエミッションフィルターを使用して収集した。 $488\ \text{nm}$ の光（ $50\ \text{mW}$ の固体レーザー、OEM）を使用して（緑色色素）を励起させ、 $500\ \text{nm}\sim 550\ \text{nm}$ のマルチバンドパスエミッションフィルターを使用して収集し、 $640\ \text{nm}$ の光（ $50\ \text{mW}$ の固体レーザー、OEM）を使用して（遠赤色色素）を励起させ、 $455\ \text{nm}\sim 515\ \text{nm}$ および $660\ \text{nm}\sim 750\ \text{nm}$ を有するマルチバンドパスエミッションフィルターを使用して収集した。曝露時間およびレーザーパワーを調整して、染色の変動を補正した。

10

【0275】

第二次高調波発生（SHG）イメージングを蛍光イメージングの直後に実施した。QUASAR 検出ユニット、 10×0.45 Plan-Apochromat 対物レンズ（Carl Zeiss）、および Zen 2012 撮像ソフトウェア（v8.1.3、Carl Zeiss）を備えた LSM-780 レーザー走査共焦点顕微鏡（Carl Zeiss）で SHG 画像を収集した。画像を、ステップサイズが $8\ \mu\text{m}$ であり、画素サイズが蛍光画素サイズの 4 倍である整数の倍数（ $1.32\ \mu\text{m}/\text{画素}$ ）である一連の光学切片として収集した。SHG 画像をレーザー光波長 $900\ \text{nm}$ で取得し、 $371\sim 420\ \text{nm}$ で収集した。画像アラインメントのための参照として、Cd150-PE の画像を、 $561\ \text{nm}$ ラインの DPSS レーザー（Melles Griot）を使用して取得し、 $566\sim 735\ \text{nm}$ で SHG 画像と同時に収集した。画像を、試料全体を網羅するために十分なタイルパターン（重複なし）で収集した。Zen ソフトウェアを使用してタイルを完全な 3D 画像にまとめた。

20

【0276】

画像を、Fiji ソフトウェア（1.51g National Institutes of Health）を使用して分析した。SHG と蛍光画像をアラインメントするために、まず、蛍光画像のバックグラウンドを差し引き、Grid/Collection stitching plugin（参照 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/11/1463.abstract>）を使用して画像タイルを完全な 3D 画像にまとめた。蛍光顕微鏡から SHG 顕微鏡への試料の移行には少量の試料の回転が伴うことを考慮して、SHG と蛍光画像を 3 次元で再アラインメントする必要がある。SHG と蛍光画像セットのアラインメントは、<http://research.stowers.org/imagejplugins> において入手可能な特注プラグインを使用して行った。まず、SHG および蛍光データセットの両方を目視検査することによって最低 8 つの共通のランドマークを同定した。次に、Kabsch アルゴリズムを使用して、蛍光座標を SHG 画像座標に変換するために最もよくスケールされた回転を見いだした。最後に、蛍光画像の各 3D ボクセルを対応する SHG 位置に変換し、3 つの線の内挿を使用してその位置の SHG 強度を見いだして、再アラインメントされた複合画像を創出した。

30

【0277】

試験の仮説をよく知らない研究者によって画像分析を行った。HSC を眼で同定した。細胞の形状が眼で見分けられない場合、または細胞の形状が陽性シグナルの視野内で暗い領域を形成した場合、細胞を染色に関して陰性とみなした。ニッチ構成成分までの距離測定を Fiji ソフトウェアおよび Microsoft Excel（登録商標）ソフトウェアを使用して行った。HSC の場所および 3 つのニッチ構成成分のそれぞれの最も近い点に Fiji で点 ROI を使用して印をつけ、場所をエクセルに移し、次いで、3D Pythagorean Theorem を使用して 3D での距離を算出した。ランダムに分布した HSC の距離を算出するために、観察された HSC について分析したのと同じ画像に関して FIJI で特注プラグインを使用してランダムな点 ROI を生成した。ランダムに生成した点が妥当な HSC の場所に出現した場合（周囲領域内の Lin⁺細胞の存

40

50

在によって評価して)、それらをシミュレートされたHSCとみなした。次いで、シミュレートされたHSCについてのニッチ距離測定を観察されたHSCについてと同じ様式で行った。

【0278】

距離の分布の差異の統計的有意性を、Originソフトウェアを使用してKolmogorov-Smirnov分析によって評価した。5 μ mでのHSCのパーセンテージの変化の統計的有意性を、Microsoft Excel (登録商標)でスチューデントのT検定を使用して評価した。 $P < 0.05$ の場合に変化を有意とみなした。

【0279】

図に示されている最終的な画像は、明確にするためにバックグラウンドを差し引き、コントラスト調整した最大の投影である。

10

【0280】

移植および再配置アッセイ。選別されたpHSCまたはrHSC細胞100個をCD45.1レスキュー骨髓細胞 1.0×10^5 個と共に、致死的に照射を受けた(10 Gy)CD45.1レシピエントに移植した。N-cad-CreER^T; iDTRおよび対照マウス由来のCD45.2 BM細胞 2.0×10^5 個をCD45.1レスキュー骨髓細胞 2.0×10^5 個と共に、致死的に照射を受けた(10 Gy)CD45.1レシピエントに移植した。移植後4週間ごとに、末梢血を顎下静脈から採取した。ドナー由来の血液細胞(CD45.2)からの造血再配置を測定した。

【0281】

RNA配列決定および分析。cDNAを、SMARTer Ultra Low Input RNA kit (Clontech)を使用して精製された細胞1000個から生成し、ライブラリーをNextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina)によって生成し、その後、Illumina HiSeq2500で50bpの単一のリードについて配列決定を行った。未加工のリードを、Illumina bcl2fastq2 v2.18を使用し、最大で1つのミスマッチを許容してFastqフォーマットに逆多重化した。リードを、TopHat v2.0.13でデフォルトパラメーターを用いてUCSCゲノムmm10に対してアラインメントした。Cufflinks v2.2.1を「-u -max-bundle-frags 100000000」で使用するFPKM値を生成した。HTSeq-30
カウントを「-m intersection-nonempty」で使用するリードカウントを生成した。各集団について3つまたは4つの反復物で配列決定した。データはNCBI GEO:GSE104887で入手可能である。

【0282】

CFU-Fアッセイおよびin vitroにおける分化。細胞を96ウェルプレート
の培養物中に直接選別した。培養物を37°C、加湿雰囲気中、5%O₂および10%CO₂で7~10日間インキュベートした。コロニーをCell Tracker (商標) Green CMFDA (Life technologies)によって染色し、Celi-40
go Imaging Cytometer (Nexcelom)によって画像を取得した。in vitroにおける分化のために、クローン的に増大したNcad-CreER^T駆動Tomato⁺ BM/骨間質細胞をCFU-F培養物から0.25%トリプシン/EDTAを用いた消化によって単離し、3つのアリコートに分割し、分化が許容される別々の培養物に播種した: StemPro Osteogenesis kit Gibco A10072-01、Adipogenesis kit A10070-01およびChondrogenesis differentiation kit A10071-01。骨芽細胞分化をVECTOR Red Alkaline Phosphataseによって評価し、脂肪生成分化をOil Red O (Sigma)によって検出し、軟骨形成分化をToluidine blue (Sigma、蒸留水100mL当たり0.1gのT-Blue)によって検出した。

【0283】

50

骨切片作製、免疫染色およびイメージング。

【0284】

新鮮に単離した大腿骨を4%パラホルムアルデヒド中に終夜固定し、その後、10%EDTA中で1~3日間脱灰処理した。パラフィン切片のために、骨試料をSakura Tissue Tek VIP 5 Tissue Processor (Sakura America, Torrance, CA)で処理し、パラフィン切片を5μmの厚さにカットした。切片をキシレンで脱パラフィンし、その後、アルシアンブルー／ヘマトキシリン／オレンジG染色を行った。凍結切片に対して、骨試料をCryoJane tape-transfer systemを用いて処理した。切片をPower Block (商標) Universal Blocking Reagentを用いて30分~1時間ブロッキングし、次いで、ウサギ抗アグリカン (Millipore, 1:300)、ウサギ抗ベリリピン (Cell Signaling, 1:300) およびヤギ抗オステオポンチン (R&D, 1:300) を用いて終夜染色した。ロバ抗ヤギAlexa Fluor 488およびロバ抗ヤギAlexa Fluor 647を二次抗体として使用した (全てInvitrogenから、1:300)。抗体をAntibody Diluent Solution (Invitrogen 00-3218)で希釈した。スライドにFLUORO-GEL (Electron Microscopy Science 1798510)を用いて載置し、Olympusスライドスキャナーで画像を取得した。

【0285】

大腿溝外科手術。マウスを2.5%イソフルランで麻酔し、痛覚脱失のためにブプレノルフィンを投与した。右足の皮膚を剃毛し、アルコールおよびヨウ素でこすり洗いをした。膝関節の側方に、皮膚に小さな切開を入れた。可視化のために皮膚を内側にスライドさせた後、膝蓋骨の内側に内部切開を入れ、四頭筋まで伸ばし、膝蓋腱に沿って、組織をはずした。膝蓋骨を外側に垂脱臼させ、遠位大腿骨を露出させた。マイクロソーを使用して肋軟骨下骨に穴をあけて膝関節で関節軟骨を貫通させた。伸筋機構 (四頭筋、膝蓋腱および膝蓋骨) を元の解剖学的位置に戻した。内部切開を吸収性縫合糸で縫合し、皮膚を非吸収性縫合糸で縫合した。

【0286】

統計値。

【0287】

値は平均±s.e.m.として示されている。統計分析は全て、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)を使用して行った。2群間の比較のためにスチューデントのt検定を使用した。統計的有意性を $p < 0.05$ と定義した。

【0288】

(実施例B-1)

マウス骨髄における機能的に区別される予備HSCおよび刺激されたHSC。予備HSC (以降rHSC) 亜集団を探究するために、恒久的に長期HSC (LT-HSC) と中期を区別することができる細胞表面マーカーであるCD49b (インテグリン $\alpha 2$) を適合させた (Benveniste et al., 2010; Qian et al., 2015; Wagers and Weissman, 2005; Yang et al., 2005)。興味深いことに、従来のLT-HSC (CD34⁻Flk2⁻系列-Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) 細胞) にのみ存在し、短期HSC (ST-HSC; CD34⁺FLK2⁻LSK) または多分化能前駆細胞 (MPP; CD34⁺FLK2⁺LSK) には存在しないCD48⁻CD49b⁻亜集団が見いだされた。CD48⁻CD49b⁻LT-HSC亜集団ではrHSCが富化されること、およびCD48⁻CD49b⁺LT-HSC亜集団では刺激されたHSC (以降pHSC) が富化されること (図17A) が提唱され、再配置アッセイを用いて試験した。rHSCおよびpHSCのどちらも致死的に照射を受けたマウスにおいて最大で移植後40週間にわたって造血を支持し、有意差はないことが見いだされ (図17B)、これは以前の報告 (Benveniste et al., 2010) と一致した。しかし、移植されたpHSCは、レシピエントにおけるrHSC (

95.4%の低下)ならびにST-HSCおよびMPP(どちらの集団についても約78%の低下)の生成に関して、移植されたrHSCと比較して非常に低い効率を有し、これにより、rHSCがpHSCよりも階層的に前であることが示唆される(図17C)。Sc1-tTAにより誘導されるH2B-GFP標識を保持するモデルを使用し、rHSCでは、pHSCと比較して有意により多くのH2B-GFP^{high}細胞が富化された($P=0.0039$)ことが見いだされ、これにより、rHSCがpHSCと比較して遅い細胞周期を有することが示される(図17D)。分子的に、rHSCでは、全てHSCのG₀期の維持に参与するGadd45g、Cdkn1c(p57をコードする)、およびFoxo1の発現が高く、Myc、Pcna、Ccn2、およびCdk4などの細胞周期活性化因子の発現が低いことが見いだされた。Ki67発現にはrHSCとpHSCの間で差異はなく、これにより、2つのHSC亜集団を区別するためにはKi67発現単独では不十分であることが示される(図17E)。

【0289】

rHSCの機能的な定義は薬物抵抗性であるので、rHSCまたはpHSCをレシピエントマウスに移植し、移植の4週間後にマウスを5FUで攻撃した。図17Fに示されている通り、rHSCは5FU処置に対して非感受性であったが、pHSCはそれらの再構成能力が劇的に低下した(移植の20週間後に44%の低下)。総合すると、データから、CD48⁻CD49b⁻LT-HSCでは化学療法処置に対して抵抗性のrHSCが実際に富化されるが、CD48⁻CD49b⁺LT-HSCでは化学療法に対して感受性のpHSCが富化され、さらに、移植アッセイにおいて前者からは後者が生じるが、後者から前者は生じないことが示された。

【0290】

rHSCおよびpHSCに対する急性5FU攻撃の直接の結果をさらに分析した。図17Gに示されている通り、5FUの3日後に、pHSCのおよそ92%が排除され、rHSCのみが残存し、これにより、rHSCのDNA修復系が化学療法ストレスを克服するために特異的に作動したに違いないことが示唆される。この仮説を検定するために、rHSC、pHSCおよび5FU処置後のrHSCにおけるDNA損傷応答遺伝子のトランスクリプトームプロファイリングを分析した。恒常性の間、rHSCではpHSCと比較してDNA損傷修復系に参与する遺伝子の発現が低く維持されるが(図17H)、5FU攻撃下では、rHSCにおいてDNAミスマッチ修復(MMR)、ヌクレオチド除去修復(NER)、塩基除去修復(BER)、および相同組換え(HR)などの大半のDNA修復経路が有意に活性化される(図17I)ことが観察された。さらに、並行して、主にHsp90ファミリーおよびHsp70ファミリーに属する多数のストレス応答遺伝子(Rodina et al., 2016)も上方制御され(それぞれ 1.8 ± 0.17 倍および 1.4 ± 0.1 倍)(図17J)、これにより、化学療法ストレス下でrHSCがどのように残存し、造血系を再構成させるかが部分的に説明される。

【0291】

総合すると、pHSCとrHSCの共存がBMにおいて機能的に実証された。それらの静止した状態および活性なDNA修復経路を用いた場合であっても、pHSCはなお化学療法に対して感受性であったが、rHSCではDNA損傷修復およびストレス応答遺伝子が活性化されて、化学療法ストレスを生き抜き、pHSCを生じさせた。したがって、rHSCは、重度のストレス下での造血再生の支持において重大な役割を果たす。

【0292】

(実施例B-2)

薬物抵抗性rHSCは主に骨髄の骨内膜領域に局在する

【0293】

BMニッチ由来の外因性機構が止血中および化学療法ストレス下のrHSC維持に寄与するかどうかをさらに試験した。この目的のために、ホールマウントHSC染色を実施し、これにより、rHSCおよびpHSCの骨(第二次高調波発生、SHGによって達成した)、巨核球(MK)または約75 μm以内の厚さの骨腔内の血管への相対的な分布も同

時に検出した（図18A～B）。本発明者らの定量化データから、43.4%のrHSCおよび31.0%のpHSCが血管から10 μ m以内の距離に位置すること、ならびに22.6%のrHSCおよび24.6%のpHSCがMKから10 μ m以内に位置することが示され（図18C～D）、これは、バルクのHSC集団が血管周囲および類洞帯域に存在するという以前の報告と一致する（Acar et al., 2015; Bruns et al., 2014; Chen et al., 2016; Zhao et al., 2014）。興味深いことに、16.4%のrHSCが骨表面から10 μ m以内に位置し、これと比較してpHSCは3.69%しか骨表面から10 μ m以内に位置しないことが認められた（図2E）。これらのデータから、rHSCおよびpHSCは血管およびMKにはどちらも偏りなく分布するが、rHSCはpHSCと比較して骨内膜骨表面に有意に近く位置することが示された（ $P=0.00182$ ）。

10

【0294】

化学療法ストレスの間にrHSCが骨内膜領域に保存されるかどうかを試験するために、pHSCが排除された5FU処置後3日目にrHSCの分布を試験した（図18B）。興味深いことに、本発明者らは、急性5FUストレスの際に、生存しているrHSCの約55%が骨内膜ニッチに保存されることを見だし、これは、恒常性と比較して約3.5倍の富化である（図18E）。しかし、血管またはMKの付近で観察された生存しているrHSCの頻度に有意差はなかった（図18C～D）。一貫して、図17Gに示されている通り、pHSCは4.24%しか急性5FUストレスを生き残れなかったことが観察された。次に、5FUストレス後のBM損傷およびその後の回復の動的プロセスを、BrdU標識された生存している増殖細胞を調査することによって試験した。5FU処置後2日目に、BrdU標識された細胞の大きな減少が認められ、これにより、活性なアポトーシスが5FUによって誘導されたことが示される。5FU処置後3日目に、生存しているBrdU⁺細胞（大部分が単一細胞）が主に骨内膜領域内の骨内層細胞に近接して検出されることが観察された（図24A～D）。3.5日目に、BrdU⁺細胞の対が骨内膜表面に出現したことが観察され、これにより、生存している細胞の活性化および分裂が示される。4日目および5日目に始まり、継続して、増殖している細胞の数が徐々に増加し、これらの細胞は、非常に多くの場合、血管または潜在的な脂肪細胞構造の付近のクラスターとして検出された（4日目に約55%および6日目に約65%）（図24E～I）。この観察により、骨表面が、細胞が5FU後に最初に残存するニッチであることが示唆された。次いで、これらの細胞が活性化され、娘細胞を生じ、後者が主に血管内または巨核球に近接して増大を受けた（Zhao et al., 2014）。生存している5FU-rHSCが多くの場合に骨表面に近接する単一細胞として実際に検出され、増殖しているHSCが多くの場合にMKまたは血管の近くに関連付けられることがさらに確認された。5FU処置後3日目に生存しているrHSC（緑色、CD150+Lin-CD49b-）は、多くの場合、骨表面に近接する単一細胞として検出され（白色、SHG）、増殖しているHSCは、多くの場合、MK（CD150+Lin+）または血管の近く（赤色、CD31+）に関連付けられた（図29）。

20

30

【0295】

5FU処置に対して骨表面のN-cad⁺前骨芽細胞は抵抗性であることが見いだされているが、Osx⁺骨芽細胞は、感受性であることが見いだされており、また、N-cad⁺間質細胞は、5FU処置後の回復中にOsx⁺骨芽細胞を生じさせることが見いだされている（Sugimura et al., 2012）。最近の研究により、照射1日後の細胞死に起因する、中心骨髄におけるLepR⁺間質細胞の劇的な枯渇が示された（Zhou et al., 2017）。血管および骨内膜ニッチにおける初期の変化を追跡するために、5FU処置後1日目にアポトーシスアッセイを実施した。アポトーシス性CD31⁺VE-カドヘリン⁺細胞が5FUの1日後に著しく増加することが見いだされ（図18F）、これは5FU後に血管構造が妨害されるという以前の報告と一致する（Dominici et al., 2009; Sugimura et al., 2012）。骨内膜ニッチを試験するために、Tomato⁺細胞で中心骨髄および骨表面の両方におけるN-cad発現が報告されるN-cad⁻tdTomato（N-cad⁻TdT）マウス系を樹立した（図24J）。中心骨髄ではアポトーシス性N-cad

40

50

駆動性 T o m a t o^+ 細胞の顕著な増加が認められたが、骨内膜帯域内の T o m a t o^+ 細胞は 5 F U の 1 日後に安定なままであった (図 1 8 G)。造血再生が始まった 5 F U 処置後 3 日目に、中心骨髄ならびに骨表面における N-c a d 駆動性 T o m a t o^+ 細胞がそれぞれ 2. 2 倍および 1. 7 倍増加した (図 1 8 H、図 2 4 K)。 C D 3 1^+ 血管細胞の数も増加したが、膨張し、損傷を受けたアーキテクチャを示した (図 1 8 I)。総合すると、以前の報告およびこのデータから、血管および L e p R^+ および N-c a d^+ 細胞を含めた血管周囲ニッチ内の関連する間質細胞は即時の損傷を受け、5 F U ストレスに対して感受性であるが、 N-c a d^+ 骨内膜間質細胞は安定なままであることが示された。

【0296】

このデータにより、大多数の H S C が主に血管周囲および類洞帯域に分布しているという以前の所見が部分的に説明される (Acar et al., 2015; Chen et al., 2016; Kunisaki et al., 2013)。静止状態の H S C 集団の 5 1. 3 % を占める p H S C が恒常性の中では血管周囲および類洞帯域の近くにある。しかし、ストレス下では、r H S C は骨表面のより近くに存在し化学療法ストレスから残存する。集合的に、データから、骨内膜ニッチが化学療法からの r H S C の保護において重大な役割を果たすことが示される。

【0297】

(実施例 B-3)

N-c a d^+ ニッチ細胞により骨髄における r H S C を含めた機能的 H S C が維持される

【0298】

N-c a d^+ 間質細胞は最初に同定された H S C ニッチ細胞であり、また、化学療法に対して骨内膜ニッチにおける N-c a d^+ 間質細胞は抵抗性であった一方 O s x^+ 骨芽細胞は感受性であったが、H S C を機能的に支持する N-c a d^+ に関する直接のエビデンスは妥当な遺伝学的マウス系の欠如に起因して依然として見つかっていない。本明細書の態様に従って、 $\text{N-c a d-C r e E R}^T$ 系を生成し (図 2 5 A)、 N-c a d^+ 間質細胞から $\text{C o l 2. 3-G F P}^+$ 骨芽細胞および血管周囲細胞の両方が生じることが示された (図 2 5 B)。以前の試験から、成熟 $\text{C o l 2. 3-G F P}^+$ 骨芽細胞の枯渇が B M 細胞の全体的な生着には影響を及ぼさないが (Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013)、L T-H S C のサブセットの再生能の障害のみを引き起こす (Bowers et al., 2015) ことが示された。 N-c a d^+ 間質細胞は O s x^+ 骨前駆細胞に発生的に進行し、これはさらに成熟 C o l 2. 3^+ 骨芽細胞を生じさせるが、 N-c a d^+ 間質細胞による H S C 維持に対する機能的寄与は分かっていない。 N-c a d^+ 細胞の H S C ニッチ役割を調査するために、 N-c a d^+ ニッチ細胞がジフテリア毒素 (D T) に対して感受性になっている $\text{N-c a d-C r e E R}^T$ 誘導性 D T R (ジフテリア毒素受容体をコードする) 系 ($\text{N-c a d-C r e E R}^T$; i D T R) を生成した。 $\text{N-c a d-C r e E R}^T$; i D T R マウスに 3 回のタモキシフェン (T M X) 注射を投与し、その後、D T を腹腔内注射し (1 日おきに 1 回の注射)、最後の注射後 1 日目に分析した (図 1 9 A)。 $\text{N-c a d-C r e E R}^T$; i D T R; R 2 6-t d T では、同時に D T で処置された $\text{N-c a d-C r e E R}^T$; R 2 6-t d T マウスと比較して N-c a d^+ 間質細胞の効率的な除去が観察された (図 1 9 B)。i n v i v o において N-c a d^+ 細胞除去が H S C に影響を及ぼすかどうかをさらに調査した。 N-c a d^+ 細胞の除去後、対照と比較して B M における細胞充実性の有意な変化は観察されなかった (図 1 9 C)。しかし、H S C の数が劇的に減少した: r H S C (6 5. 0 % の低下)、p H S C (6 0. 0 % の低下)、S T-H S C (5 9. 6 % の低下)、および M P P (2 9. 3 % の低下) (図 1 9 D)。これにより、 N-c a d^+ ニッチ細胞が、予備 H S C を含めた最も原始的な H S C 維持に寄与することが示された。

【0299】

N-c a d^+ 間質細胞が除去されたマウスにおける機能的 H S C 数を試験するために移植アッセイも実施した。 N-c a d^+ 間質細胞が除去されたマウス由来の骨髄細胞では有意に低いレベルのドナー細胞再構成がもたらされ (2 0 週間の時点で 2 8. 3 % の低下)

(図19E)、骨髄性細胞産生が低減する(24.5%から17.1%へ)(図19F)ことが見いだされた。N-cad⁺ニッチ細胞がHSCの長期自己複製の維持に寄与するかどうかをさらに調査するために、一次移植の20週間後に二次移植を行った。N-cad⁺間質細胞が除去されたマウス由来のBM細胞は二次移植でドナー細胞再構成能力がより大きく低下したが(16週間の時点で40.5%の低下)(図19G)、多系列再構成は可能である(図19H)ことが観察された。

【0300】

さらに、本発明者らは、N-cad⁺間質細胞からのCxcl12のコンディショナルノックアウトにより、pHSC(48%の減少)およびST-HSC(28.8%の減少)が有意に減少したが、rHSCの有意な減少は観察されなかったことを見いだした。些細ではあるがわずかにMPPが増加した(図19I)。N-cad⁺間質細胞からのSCFのコンディショナル欠失により、rHSC(60%の減少)、pHSC(38.6%の減少)、およびST-HSC(53.7%の減少)が有意に減少したが、MPPはわずかに増加した(図19J)。全体として、本発明者らは、N-cad⁺ニッチ細胞が、rHSCを含めたHSC維持に維持因子の産生によって寄与したという最初の機能的エビデンスを提供した。

【0301】

(実施例B-4)

造血細胞およびそれらのBMニッチ細胞についてのトランスクリプトーム分析

【0302】

異なるニッチ細胞がどのようにHSC垂集団制御に寄与するかを支配する分子機構を理解するために、恒常性の間の4種の型の造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)に対して、および5FU後3日目のrHSCに対して、ならびに10種の型のBMニッチ細胞に対して、トランスクリプトームプロファイリング分析を実施した。BMニッチ細胞を骨内膜(B)および中心骨髄(M)の異なるニッチ帯域から採取した(図26A~B)。ピアソン距離木および主成分分析(PCA)データから、rHSCおよびpHSCが、ST-HSCおよびMPPと比較して独特のトランスクリプトームプロファイリングを共有することが示された(図20A)。興味深いことに、5FU処置後のrHSCはpHSCに近いと思われ(図20B)、これにより、生存しているrHSCが化学療法後のその後の造血再生を支持するための活性化のために刺激されたことが示唆される。

【0303】

rHSCでは、Slamf1(CD150)、H19、Cttna11(α -Catulin)、Fgd5、vWF、Tek(Tie2)、Procr(Epcr)、Hoxb5およびMeg3(またはGtl2)などの公開されたHSC特異的マーカーの大部分が富化されることが見いだされた(Acar et al., 2015; Chen et al., 2016; Qian et al., 2015; Sanjuan-Plaet al., 2013; Venkatraman et al., 2013)。特に、rHSCにおけるvWFは、pHSCにおけるvWFの6.1倍であり、これにより、rHSCではHSC階層の頂端に存在するvWF⁺HSCの大部分が富化されることが示唆される(Sanjuan-Plaet al., 2013)。一貫して、CD34、CD48、およびFlt3(Flk2)およびItga2(CD49b)などの前駆細胞シグネチャー遺伝子はrHSCにおいて低発現である(Acaret al., 2015; Chen et al., 2016; Gazit et al., 2014)。興味深いことに、5FU後のrHSCでは、CXCR4、Cttna11(α -Catulin)(Park et al., 2002)、Esam(内皮細胞選択的接着分子)およびCD150(Slamf1、シグナル伝達リンパ球性活性化分子をコードする)の発現レベルが高く、これは、変換された刺激された状態に関連するそれらの機能と一致する(図20E)。

【0304】

ニッチ細胞分析では、ピアソン距離木(図20C)およびPCA分析(図20D)のどちらにおいても、N-cad駆動性tdTomato(N-cad-TdT)(M)が、LepR、Cxcl12-RFP、およびネスチン-GFP細胞などの間葉系幹細胞(MSC)潜在性を有する他のニッチ細胞と比較して非常に類似したトランスクリプトームプ

10

20

30

40

50

ロファイルを有することが見いだされ、これにより、 $N-cad^+$ 細胞がMSC潜在性およびHSCの制御において同様の機能を有し得ることが示唆される。興味深いことに、 $NG2-RFP$ 細胞は、 $Col2.3-GFP^+$ 骨芽細胞と非常に類似したトランスクリプトームプロファイルを有した（図20C～D）。 $NG2-RFP$ 細胞が骨端または骨幹において骨内膜に主に制限されるが、動脈周囲領域でも検出されることも見いだされた（図26C）。

【0305】

$Pecam-GFP^+$ 内皮細胞において $Pecam$ （CD31）、CDH5（VE-カドヘリン）が富化されることが見いだされた。MKおよびマクロファージ（Mac s）ではPF4およびAdgre1が富化された。 $NG2-RFP$ 細胞ではCspg4（ $NG2$ ）が富化された。ネスチン-GFP細胞は内在性ネスチン（Nes）発現を有さず、これは、以前の報告と一致する（Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013）。興味深いことに、Kitl（SCF）、Lepr、Cdh2（N-カドヘリン、N-CAD）、Cxcl12、Pdgfraなどのいくつかのマーカー遺伝子が血管周囲ニッチ細胞において広範に発現されることが見いだされた（図20F）。骨内膜帯域から単離された $N-cad-TdT$ （B）細胞も、 $Col2.3-GFP$ 細胞および $NG2-RFP$ 細胞などの骨内膜帯域由来の他の細胞と比較して高レベルのSCF、Cxcl12、LeprおよびPdgfra発現を有した（図20F）。本発明者らのGO用語分析から、 $Col2.3-GFP$ 細胞、 $Pecam-GFP$ 細胞、MK細胞およびMac細胞では、RNA代謝、タンパク質代謝、他の代謝経路および翻訳活性が高度に富化されたことが示され、これにより、これらの細胞が、比較的低い代謝状態であった $N-cad-TdT$ 細胞および他の血管周囲帯域細胞と比較して、比較的活性な機能的状態にあったことが示される。内皮細胞および血管周囲細胞は免疫系プロセスおよびストレス応答活性を有した（図20G）。 $N-cad^+$ 細胞はLepr⁺細胞、Cxcl12-RFP細胞、およびネスチン-GFP細胞などの他のMSCと同様のトランスクリプトームプロファイルを有したので、次に、異なるニッチ細胞に由来する間質発生関連遺伝子を分析し、比較した（図20H）。 $Col2.3-GFP$ 細胞では、骨芽細胞遺伝子Col1aおよび前駆細胞遺伝子Ly6a（SCA1）が富化された（Yanget al., 2014）。骨内膜領域由来の $N-Cad-TdT$ （B）細胞では、軟骨細胞遺伝子Spock1、Col2a1およびCol1a2ならびにTncなどの骨発生遺伝子が富化されたことが見いだされた。興味深いことに、 $N-Cad-TdT$ （B）および $N-Cad-TdT$ （M）の両方でPrrxl、Pdgfrβ、Pdgfra、Sp7、Sox9およびGrem1などの間葉系幹細胞および前駆細胞（MSPC）遺伝子の大部分が富化された。骨髄から採取された $NG2-RFP$ 細胞もまた、Alcam、Sp7、Mc am、Sox9およびGli1などのMSPC遺伝子発現が高レベルであったが、Col1a1、Col2a1、およびCol1a2などの骨芽細胞および軟骨細胞関連遺伝子も高レベルであった。全ての血管周囲ニッチ細胞の中で、Lepr⁺細胞ではGli1ならびにいくつかの骨芽細胞および軟骨細胞マーカー、例えば、Atf4およびTncなどが排他的に富化されたことも見いだされた。Cxcl12-RFP細胞ではMSPC遺伝子Itgavが有意に富化された。さらに、Grem1が $N-Cad-TdT$ （B）および全ての血管周囲ニッチ細胞において富化されたが、 $NG2-RFP$ 細胞では富化されなかった。

【0306】

以前のデータと一致して、 $Col2.3-GFP$ 細胞では、より成熟した骨系列遺伝子（Dmp1、Col1a1、Spp1、Bglap）が富化された。ネスチン-GFP、Cxcl12-RFPおよびLeprは、MSC遺伝子（Prrxl、Pdgfra、Itgb1、Grem1）の富化におけるそれらの公知の役割と一致した（図20H）。興味深いことに、MSC遺伝子を発現することは別として、 $N-Cad-TdT$ （M）および $N-Cad-TdT$ （B）では、軟骨形成遺伝子（Sox9、Col2a1およびTnc）、脂肪生成遺伝子（Cebpa、Pparγ、Adipoq）ならびに骨形成性遺伝子（Col1a1、Runx2）が富化され、これにより、 $N-Cad^+$ 間質細胞の三分

10

20

30

40

50

化能性が示唆される。驚いたことに、NG2-RFPでは骨発生遺伝子(Dmp1、Bglap、Sp7、Runx2、Col1a1)ならびに軟骨形成遺伝子(Sox9、Col2a1およびTnc)の両方が富化され、これにより、骨軟骨形成の役割が示唆される(図26D~E)。これらのデータから、BMにおけるMSCの不均一性が強力に示される。

【0307】

(実施例B-5)

N-cad-CreERT⁺誘導性レポーター細胞はLepr⁺およびCxcl12⁺幹/間質細胞と大きく重複する

【0308】

転写分析を確認するために、TdTomatoまたはZsGreenレポーターを使用してN-cad⁺ in vivo系列追跡を実施し、誘導後3日目に、N-cad-CreERT⁺系列がCxcl12-RFP細胞およびネスチン-GFP細胞と部分的に重複する細胞を追跡したことが見いだされた(図20I)。さらに、N-cad-CreERT⁺由来細胞の98.3%および97.9%がそれぞれLepr発現およびPdgr α 発現について陽性であった(図20J)。この結果により、トランスクリプトーム分析によって示唆される通りN-cad⁺間質細胞がMSC潜在性を有することがさらに裏付けられる。N-cad⁺間質細胞の系列潜在性を分析するために、コロニー形成単位-線維芽細胞(CFU-F)アッセイを実施して、それらの増殖能を試験した。大多数の報告されたニッチ細胞が、骨内膜帯域由来であるか血管周囲帯域由来であるかにかかわらず、CFU-F活性を有する細胞を17.6個に1つしか有さないネスチン-GFP⁺細胞は別として、CFU-F活性を有する細胞を10個未満に1つ有することが見いだされた。骨由来のN-cad⁺細胞は、CFU-F活性を有する細胞を細胞8.79個に1つ有した。N-cad-CreERT⁺由来骨細胞は、CFU-F活性を有する細胞を10.7個に1つ有し、N-cad-CreERT⁺由来骨髄細胞は7.37個に1つの細胞を有した(図20K)。大多数のCFU-Fコロニーで、tdTomatoシグナルが維持され(図21A~B)、これにより、N-cad⁺細胞がCFU-F活性を有するMSCの主要な供給源であったことが示唆される。

【0309】

(実施例B-6)

in vitroおよびin vivoにおいてN-cad⁺間質細胞から骨芽細胞、軟骨細胞、および脂肪細胞が生じる

【0310】

N-cad⁺細胞のMSC潜在性を試験するために、N-cad⁺細胞によって形成された個々のCFU-Fコロニーから得た細胞を3つのアリコートに分割し、それらを骨細胞分化、脂肪細胞分化、または軟骨細胞分化が許容される培養物にサブクロニングすることにより、in vitroにおける分化アッセイを実施した。Tomato⁺細胞は多系列分化を受け、アルカリホスフェート陽性骨芽細胞、Oil Red O陽性脂肪細胞、およびアグリカン染色およびトリジンブルー陽性軟骨細胞が生じることが見いだされた(図21C~E)。

【0311】

N-cad⁺間質細胞のin vivoにおける機能の特徴付けるために、1回用量のTMXによる処置後にN-cad由来細胞の動的な解剖学的分布を分析した(図21F、G)。興味深いことに、検出されたN-cad由来細胞は、早くもTMXの6時間後に海綿骨幹端において検出されたが、中心骨髄では非常にわずかな細胞しかみられず、これにより、N-cad⁺細胞の大部分が骨内膜領域に由来することが示唆される(図21H)。TMXによる処置後1週間から2週間まで海綿骨領域においてN-cad由来細胞の数が2.2 $\pm$ 0.2倍増加し、その後は安定なままであったことも観察された。皮質骨領域では、TMX後2週間の時点で細胞数が2.95 $\pm$ 0.2倍増加したが、その後、TMX後6週間の時点では減退し、これにより、海綿骨領域内のN-cad⁺細胞が皮質骨領域

10

20

30

40

50

と比較してより静止していたことが示唆される。さらに、N-cad由来細胞は6週間に至るまで中心骨髄において増加し続け、これにより、N-cad由来細胞がこの領域内で増殖および分化することができたことが示唆される（図21I）。

【0312】

次に、*in vivo*系列追跡アッセイを実施し、N-cad⁺細胞が時間依存的にCol2.3-GFP⁺骨芽細胞を生じさせる（Dacic et al., 2001）ことが観察された（図22A、図27A～B）。N-cad由来骨芽細胞が早くもTMXによる誘導の6時間後に海綿周囲領域において検出され（図22B）、TMXによる誘導の14時間後に緻密骨領域において検出された（図22C）。さらなる分析により、TMX後6時間の時点で、未成熟N-cad⁺Col2.3⁻細胞（1.1%±0.2%）が海綿骨領域において皮質骨領域（0.11%±0.04%）と比較して10倍多く富化されたことが示された（図22D、E）。一貫して、TMXによる誘導後24時間および2週間の時点で、海綿骨領域において緻密骨領域と比較してより多くの未成熟N-cad⁺Col2.3⁻細胞が富化された（図22F）。TMXによる誘導後4週間の時点で、Col2.3-GFP細胞の大部分（72%±6%）はN-cad⁺細胞に由来するものであった（図22G）。

10

【0313】

TMX注射の4週間後に、海綿骨領域、特に、骨内膜の細胞においてN-cad⁺間質細胞から脂肪細胞が生じることがさらに観察され（図22H）、これは、BODIPY脂質プローブ染色によってさらに確認された（図22I）。興味深いことに、N-cad⁺由来脂肪細胞の頻度は、TMXによる誘導後6時間、14時間および24時間の時点でそれぞれN-cad⁺由来細胞の39.3%±4.5%、77.1%±6.7%および17.2%±3%が観察された定量化によって証明される通り、最初に急速に増大し、後で減退し、これにより、脂肪細胞が頻繁なターンオーバー速度を有し得ることが示唆される（図22J～K、図27C～E）。集合的に、データから、成体マウスにおいて恒常性の間に*in vivo*でN-cad⁺間質細胞から骨芽細胞および脂肪細胞系列の両方が生じることが実証された。

20

【0314】

さらに、N-cad⁺MSCが他のマーカーと比較して>10倍富化されたことが見いだされた。例えば、図30に示されている通り、*in vivo*において、ほんの10K個のN-cad⁺hMSCから総hMSCよりもはるかに多くのヒトトロポエチン（THPOまたはTPO）が生じた。同様に、N-cad⁻hMSCは総hMSCと同様の機能を示した。したがって、MSCをN-cadヘリン抗体で単離することにより、MSC集団の富化をもたらすことができる。

30

【0315】

（実施例B-7）

発生の間および傷害後にN-cad⁺間質細胞から軟骨細胞が生じる

【0316】

軟骨形成は、胎仔発生において活性であり、成体期ではまれに活性である（Raghuath et al., 2005; Sophia Fox et al., 2009）。出生後2日目（P2）にTMXによる誘導を受けたマウスにおいて、Tomato⁺骨芽細胞および軟骨細胞周囲が成長板に近接しているにもかかわらず、N-cad⁻CreER^T;R26-tdTマウスの大腿骨においてアグリカン⁺軟骨細胞の間でTomato発現は検出されなかった（図28A）。N-cad⁻CreER^T;R26-tdTマウスに成長板が発生した1週間または2週間の時点でTMXを用いて誘導した後、大腿骨または脛骨の軟骨においてTomato⁺軟骨細胞は検出不可能なままであった（データは示していない）。胚期E12.5のN-cad⁻CreER^T;R26-tdTマウスに対して、胎仔骨においてMSCが圧縮（condensation）および軟骨細胞分化を受けた時にTMXによる誘導を開始した（図23A）。大多数の未分化N-cad由来tdT⁺細胞は末梢に位置し、分化したN-cad由来Tomato⁺軟骨細胞はE14.5胚の肋骨の中心領域に位置したことが見いだされた（

40

50

図 2 3 B)。重要なことに、P 2 時点での大腿骨の海綿領域において、二次骨化中心が形成される円柱帯域、および、より深層を保護するために垂直の力 (sheer force) に抵抗するために必須の表層の両方で N-cad 由来軟骨細胞が検出された (図 2 3 C、D)。一貫して、N-cad 由来脂肪細胞は生後 2 カ月の時点で検出され、生後 10 カ月の時点まで検出され (図 2 3 E、図 2 8 B)、これにより、N-cad⁺細胞が発生の間の初期および長期にわたる脂肪生成に寄与したことが示唆される。しかし、N-cad⁺細胞由来オステオポンチン⁺骨芽細胞および骨細胞は生後 2 カ月の時点では検出されたが、初期の P 2 では検出されなかった (図 2 3 F、図 2 8 C)。これらのデータから、胚 N-cad 由来の細胞から 3 種の骨-脂肪生成-軟骨形成系列全てが生じ、胚期の N-cad⁺のみが軟骨細胞を効率的に形成することができることが実証された。

10

【0317】

傷害後の成体マウスにおいて N-cad⁺細胞が軟骨細胞を生じさせることができるかどうかを次に調査した。E 12.5 時点で TMX による誘導を受けた N-cad-Cre^{ERT}; R26-tdT マウスにおいて軟骨穿孔を実施した (図 2 3 G)。軟骨損傷後 2 ~ 3 週間の時点で、本発明者らは、N-cad 由来軟骨細胞が、損傷を受けていない対照マウスと比較して 2 倍に増加し、損傷部位の仮骨においてクラスター形成したことを見いだした (図 2 3 H ~ I)。外科手術後のマウスにおいて関節軟骨損傷に起因して大腿脛骨関節が腫脹した (図 2 8 D)。傷害後領域では典型的な軟骨細胞の特徴を有するアルシアンブルー陽性細胞が劇的に増加し (図 2 3 J)、これにより、傷害に応答して N-cad⁺MSC により軟骨細胞が急速に再生したことが示される。

20

【0318】

総合すると、データから、胎仔期 (E 12.5) に誘導された N-cad 由来の細胞が、成体における軟骨細胞前駆細胞を生じさせ、傷害に応答して軟骨細胞再生を支持することができることが証明された。

【0319】

考察

【0320】

rHSC 対 pHSC

【0321】

HSC の不均一性を広範に試験した。HSC は、活性な状態、静止した状態または深く静止した状態のいずれでも維持することができる。HSC の静止状態の特徴付けがそれらの長期自己複製潜在性に機能的に関連することが周知である (Foudi et al., 2008; Wilson et al., 2008)。しかし、静止状態の HSC 集団が *in vivo* における骨髄破壊という結果をどのように克服するかは未解決の疑問である。静止状態にもかかわらず、大多数の HSC は 5FU などの化学療法ストレスを生き抜くことができない (Longley et al., 2003)。本明細書の態様に従って、HSC 亜集団のごく一部が一次マウスにおける 5FU 処置を生き抜くことができ、移植モデルにおいて 5FU 処置に対して抵抗性であることが見いだされた。したがって、この HSC 亜集団は rHSC と定義され、一方、静止しているが化学療法剤感受性である他の HSC 亜集団は pHSC と定義される (Li and Clevers, 2010)。どちらの HSC 亜集団も移植実験において長期造血を支持したが、pHSC から rHSC が生じることがめったにないが、rHSC は pHSC を生じさせることができた。機構的に、恒常性の間に rHSC では pHSC と比較して DNA 修復系が減弱しているが、rHSC は、それらの DNA 修復経路およびストレス応答プログラムを急速に活性化して、化学療法ストレスを生き抜くことができ、その後の造血を支持して骨髄破壊という結果を克服することができることが見いだされた。

30

40

【0322】

化学療法に対する抵抗性の付与に関するニッチ物質

【0323】

rHSC の化学療法抵抗性の基礎をなす外因性機構を探究するために、rHSC が BM における特異的な微小環境に保存されるという考えを検定した。ホールマウント HSC 染

50

色 (Kunisaki et al., 2013) を使用し、以前に報告された通り、バルクの H S C が血管および M K に関連することが最初に観察された。しかし、驚いたことに、恒常性の間および 5 F U 処置後に r H S C が p H S C と比較して骨内膜ニッチに主に関連することが見いだされた。これにより、骨内膜ニッチが別個の B M 微小環境を形成して r H S C を化学療法ストレスから保護することができることが示された。一貫して、化学療法ストレスを受けると、大多数の r H S C が、化学療法抵抗性 $N-cad^{+}$ 間質細胞が富化される骨内膜ニッチ内に保護されたが、血管および血管周囲細胞は 5 F U 処置に対して感受性であり、これが化学療法によって誘導される p H S C の大幅な喪失の原因である。豊富な骨分枝を有し、骨髄の内側に伸長する胸骨においてホールマウント H S C 染色を行った。この特徴により、胸骨は大腿骨における海綿骨領域と非常に類似したものになる。 $N-cad^{+}$ ニッチ細胞の枯渇が r H S C を含めた H S C 維持に影響を及ぼしたことを示す移植アッセイによりこの概念が裏付けられる。H S C 静止状態はまた、それらの低代謝状態とも相関し、これは、「睡眠」と類似するとみなすことができ、H S C 休眠または冬眠と称された (Takubo et al., 2013; Wilson et al., 2008; Yamazaki et al., 2011)。しかし、本明細書の態様に従って、静止状態が薬物抵抗性の基礎をなす唯一の機構ではなく、その代わりに、内因性ストレス応答プログラムおよび外因性ニッチ保護の両方が薬物抵抗性に寄与することがさらに示された。

【0324】

B M ニッチにおける H S C 維持に関する $N-cad$ 間質細胞の正体および機能

【0325】

$N-cad^{+}$ 間質細胞は、最初に同定された H S C ニッチ細胞であり (Zhang et al., 2003)、その後の試験によって確認された (Arai et al., 2004; Sugiyama et al., 2006)。 $N-cad^{+}$ 細胞は、それらが骨内膜に位置することに基づいて骨芽細胞の前駆細胞として最初に提唱された。本明細書の態様に従って、2つのレポーター株を使用することにより、 $N-cad^{+}$ 間質細胞が骨内膜領域および血管周囲部位のどちらにも分布していることが見いだされた。さらに興味深いことに、大多数の $N-cad^{+}$ 細胞が $Lepr^{+}$ 細胞および $Pdgfr\alpha^{+}$ 細胞と重複することが見いだされた。転写分析から、 $N-cad^{+}$ 細胞、 $Lepr^{+}$ 細胞、 $Cxcl12-RFP$ (CAR) 細胞およびネスチン-GFP 細胞が非常に類似した遺伝子発現パターンを有することが示された。データから、H S C ニッチ概念に関する長期にわたる議論が、それらの細胞の正体ではなく、使用される異なる細胞マーカーに起因する可能性が非常に高い可能性があることが強力に示される。

【0326】

$N-cad^{+}$ 間質細胞の正体を決定するために、それらの局所的分布を、異なるニッチレポーターマウスを使用して、骨髄における他の公知のニッチ細胞と比べて可視化した。 $N-cad^{+}$ 間質細胞からは $72\% \pm 6\%$ の $Col2.3-GFP^{+}$ 細胞が生じたが、 $9.3\% \pm 4.7\%$ の $N-cad^{+} Col2.3-GFP^{-}$ 細胞も骨内膜領域内で検出された。これらの未成熟の細胞は原始的な MSC の原因となり、これにより、H S C ニッチ機能試験における $Col2.3-Cre$ 遺伝学的モデルの不十分な効率を説明することができる (Ding and Morrison, 2013; Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013)。 $N-cad-TdT^{+}$ およびネスチン-GFP $^{+}$ はどちらも海綿領域において富化されたが、 $N-cad-TdT^{+}$ は、以前に報告された通り、移植された H S C の生着が検出された海綿領域に濃縮され (Nilsson et al., 2001; Xie et al., 2009)、本発明で観察された通りストレス後に残存した。これらのデータ全てから、 $N-cad^{+}$ 細胞は他の MSC と同様のトランスクリプトームプロファイルを共有するが、それらの解剖学的分布によりそれらの独特な H S C ニッチ機能が示される可能性があることが示される。実際に、r H S C の保存において $N-cad^{+}$ 骨内膜ニッチ細胞が重大な役割を果たすことが示された。

【0327】

誘導性 D T R 系を使用することによって、 $N-cad^{+}$ 細胞の除去により、B M における p H S C および r H S C がどちらも排除されることが見いだされた。これは、骨内膜および血管周囲の帯域の両方における $N-cad^{+}$ ニッチ細胞の解剖学的分布によって説明

することができる。さらに、HSCのサブセットにおいてN-cad発現を検出することができることが示された。しかし、N-cad-TdTレポーターマウス系ではこの観察は裏付けられなかった（データは示していない）。これは、別のマウス系であるN-cad-mCherry（タンパク質レベルでの融合）は実際に低レベルのN-cad発現を示すHSCの小さなサブセット（CD49b⁺CD34⁺Flt2⁺LSK）を有したので（一次観察）、それらのタンパク質レベルと転写レベルの不一致によって部分的に説明することができる。機能的移植データから、N-cad⁺ニッチ細胞の除去の結果、rHSCを含めたHSCの減少がもたらされることが示された。Cxc112およびSCFをN-cad⁺細胞から欠失させることにより、N-cad⁺間質細胞がこれらの2つの因子を産生することによってHSCの維持および制御に寄与することが見いだされた。全体として、本明細書の態様により、N-cad⁺間質細胞がMSCとして機能し、特に、ストレス下での原始的なHSC維持を支持することが実証される。

10

【0328】

ヒト臍帯血液（hUCB）由来の造血幹細胞（HSC）を移植することには、がんを含めた様々な血液学的障害の処置に関して大きな見込みがあるが、単一のhUCB単位中のHSCの数が限られることにより、その広範にわたる使用が制限される恐れがある。広範囲にわたる試みにより、単一分子または経路を標的とすることによってヒトHSCをex vivoで増大させるための多数の方法が開発されたが、幹細胞の自己複製のために必須である多数の標的を同時に操作することが達成可能であり得るかどうかは分かっていない。最近の研究により、N⁶-メチルアデノシン（m⁶A）により、幹細胞の運命決定のために重大であるmRNAの群の発現が、それらの安定性が影響を受けることによってモジュレートされることが明らかになった。いくつかのm⁶Aリーダーの中で、Ythdf2は、標的化mRNA分解を促進することがよく認識されている。しかし、成体幹細胞に対するYthdf2の生理機能は依然としてわかりにくい。本明細書の実施形態では、コンディショナルノックアウト（KO）マウスYthdf2により表現型HSCおよび機能的HSC数が増加するが、系列分化が歪むことも造血悪性疾患が導かれることもないことが実証される。さらに、ヒトYTHDF2のノックダウン（KD）により、2ラウンドの限界希釈移植アッセイにおいて、ex vivoでのhUCB HSCの増大の10倍を超える増加、コロニー形成単位（CFU）の5倍の増加、および機能的hUCB HSCの8倍を超える増加が導かれた。機構的に、マウス造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）由来のRNAならびにhUCB HSC由来のRNAのm⁶Aマッピングにより、幹細胞の自己複製のために重大である転写因子をコードするmRNAへのm⁶A富化が明らかになった。これらのm⁶AでマークされたmRNAは、Ythdf2によって認識され、mRNA分解を受けた。Ythdf2 KO HSPCおよびYTHDF2 KD hUCB HSCでは、これらのmRNAが安定化され、それにより、タンパク質レベルの上昇が導かれ、Tall mRNAなどのmRNAのノックダウンによってレスキューすることができるHSCの増大が容易になる。したがって、実施形態は、成体幹細胞維持におけるYthdf2の機能を示し、また、HSCのex vivoでの増大を、HSC自己複製のために重大である多数のmRNAの安定性を調節する機構によって制御することにおけるYthdf2の重要な役割を同定するものであり、したがって、今後の臨床的適用の強力な潜在性がある。

20

30

40

【0329】

さらに、骨髄（BM）ニッチによる造血幹細胞（HSC）の制御が実質的に試験されている。しかし、HSC亜集団が異なるBMニッチによって異なって制御されるかどうか、およびどのように制御されるかは、依然としてほとんど分かっていない。本発明では、予備HSC（rHSC）を刺激されたHSC（pHSC）と機能的に区別し、それらのそれぞれのBMニッチをさらに調査した。pHSCおよびrHSCはどちらも恒常性の下で長期造血を支持することができるが見いだされている。しかし、pHSCは化学療法に対して感受性であったが、rHSCは化学療法を生き抜き、骨髄破壊後のその後の再生を支持した。ホールマウントHSC分布試験により、rHSCが、恒常性の間および化学療

50

法後に、N-カドヘリン⁺骨内層細胞が富化される骨内膜領域内に優先的に維持されることが明らかになった。pHSCは、骨と比較して化学療法に対して脆弱な血管に主に関連付けられた。トランスクリプトームプロファイリングおよび*in vivo*系列追跡結果から、N-カドヘリン⁺間質細胞が、発生および再生の間に骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞を生じさせる機能的な間葉系幹細胞であることが示された。最後に、N-カドヘリン⁺ニッチ細胞の除去またはN-カドヘリン⁺ニッチ細胞からのScfもしくはCxc112のいずれかの欠失がHSCの数および維持に影響を及ぼすことが実証された。

【0330】

(実施例C)

shRNAを使用したCAR-T細胞の増大

10

【0331】

Ythdf2を操作することのCAR-T細胞の増大に対する効果を、レンチウイルス駆動性ヒトYthdf2 shRNAを使用して評価する。CAR-TレンチベクターへのYTHDF2 shRNAの上首尾のクローニングがなされた。レンチウイルスを使用してヒトCAR-T細胞に感染させ、ヒトCAR-T細胞の増大を進行させる。増大は、結果に関して数日間～数週間かかることが予想される。レンチウイルスに感染したCAR-T細胞集団ではCAR-T対照集団と比較して有意に増強された増大が実証されることが考えられる。

【0332】

m⁶A-seq、irCLIP-seqおよびRNA-seqデータセットを含めた全ての配列決定データがGene Expression Omnibus (GEO)を通じて受託GSE107957の下で入手可能である。

20

【0333】

元のデータリポジトリ、<http://www.stowers.org/research/publications/LIBPB-1248>

。

【0334】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手続き上のまたは他の詳細を提供する範囲内で、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

1. Li, L. & Clevers, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542-545 (2010). 30
2. Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168 (2000).
3. Walasek, M. A., van Os, R. & de Haan, G. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266, 138-150 (2012).
4. Sung, A. D. & Chao, N. J. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. *Stem cells translational medicine* 2, 25-32 (2013).
5. Shlomchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nature reviews. Immunology* 7, 340-352 (2007). 40
6. Huang, X. et al. Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. *Leukemia* 30, 144-153 (2016).
7. Boitano, A. E. et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345-1348 (2010).
8. Fares, I. et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science (New York, N.Y.)* 345, 1509-1512 (2014).
9. Amsellem, S. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by 50

- direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nature medicine* 9,1423-1427 (2003).
- 10 Antonchuk, J., Sauvageau, G. & Humphries, R. K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 109, 39-45 (2002).
- 11 Rentas, S. et al. Musashi-2 attenuates AHR signalling to expand human hematopoietic stem cells. *Nature* 532, 508-511 (2016).
- 12 Himburg, H. A. et al. Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* 16,475-482 (2010).
- 13 North, T. E. et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate hematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447, 1007-1011 (2007).
- 14 Varnum-Finney, B. et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine* 6, 1278-1281 (2000).
- 15 Chou, S., Flygare, J. & Lodish, H. F. Fetal hepatic progenitors support long-term expansion of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 41, 479-490 e474 (2013).
- 16 Guo, B., Huang, X., Lee, M. R., Lee, S. A. & Broxmeyer, H. E. Antagonism of PPAR- γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nature medicine* 24, 360-367 (2018).
- 17 Zhao, B. S., Roundtree, I. A. & He, C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18,31-42 (2017).
- 18 Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T. & He, C. Dynamic RNA Modification in Gene Expression Regulation. *Cell* 169, 1187-1200 (2017).
- 19 Li, S. & Mason, C. E. The pivotal regulatory landscape of RNA modifications. *Annual review of genomics and human genetics* 15,127-150 (2014).
- 20 Batista, P. J. et al. m(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell stem cell* 15,707-719 (2014).
- 21 Geula, S. et al. Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science* 347,1002-1006 (2015).
- 22 Yoon, K. J. et al. Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m6A Methylation. *Cell* 171, 877-889 (2017).
- 23 Zhang, C. et al. m6A modulates hematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature* 549, 273-276 (2017).
- 24 Zhao, B. S. et al. m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 542, 475-478(2017).
- 25 Li, Z. et al. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as an N6-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer cell* 31, 127-141(2017).
- 26 Vu, L. P. et al. The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. *Nature medicine* 23, 1369-1376 (2017).
- 27 Weng, H. et al. METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m(6)A Modification. *Cell stem cell* 22, 191-205 e199 (2018).
- 28 Barbieri, I. et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m(6)A-dependent translation control. *Nature* 552, 126-131 (2017).
- 29 Wang, X. et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 505, 117-120 (2014).
- 30 Meyer, K. D. et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635-1646(2012).
- 31 Schwartz, S. et al. High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell* 155,1409-1421 (2013).

- 32 Dominissini, D. et al. Topology of the human and mouse m6A RNAmethylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485, 201-206 (2012).
- 33 Wang, Z., Li, G., Tse, W. & Bunting, K. D. Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood* 113, 4856-4865 (2009).
- 34 Ebina, W. & Rossi, D. J. Transcription factor-mediated reprogramming toward hematopoietic stem cells. *The EMBO journal* 34, 694-709 (2015).
- 35 Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644 (2008).
- 36 de Pater, E. et al. Gata2 is required for HSC generation and survival. *The Journal of experimental medicine* 210, 2843-2850 (2013). 10
- 37 Hock, H. et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes & development* 18, 2336-2341 (2004).
- 38 Lim, K. C. et al. Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *The Journal of clinical investigation* 122, 3705-3717 (2012).
- 39 Reynaud, D. et al. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* 106, 2318-2328 (2005).
- 40 Kato, Y. et al. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 202, 169-179 (2005). 20
- 41 Li, H. B. et al. m6A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature* 548, 338-342 (2017).
- 42 Pinto do, O. P., Kolterud, A. & Carlsson, L. Expression of the LIM-homeobox gene LH2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. *The EMBO journal* 17, 5744-5756 (1998).
- 43 Zarnegar, B. J. et al. irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nature methods* 13, 489-492 (2016).
- 44 Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805-808 (2003). 30
- 45 Kedersha, N. & Anderson, P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* 431, 61-81 (2007).
- 46 Lacombe, J. et al. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 115, 792-803 (2010).
- 47 Galan-Caridad, J. M. et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* 129, 345-357 (2007).
- 48 Zheng, G. et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell* 49, 18-29 (2013).
- 49 Zhou, J. et al. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* 526, 591-594 (2015). 40
- 50 Alarcon, C. R. et al. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell* 162, 1299-1308 (2015).
- 51 Zhang, S. et al. m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer cell* 31, 591-606 e596 (2017).
- 52 Lence, T. et al. m6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature* 540, 242-247 (2016).
- 53 Haussmann, I. U. et al. m6A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature* 540, 301-304 (2016).
- 54 Chen, T. et al. m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes 50

es reprogramming to pluripotency. *Cell stem cell* 16,289-301 (2015).

55 Alarcon, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. & Tavazoie, S. F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519,482-485 (2015).

56 Xiao, W. et al. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular cell* 61, 507-519 (2016).

57 Wojtas, M. N. et al. Regulation of m6A Transcripts by the 3'-->5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germ Line. *Molecular cell* 68, 374-387 e312 (2017).

58 Ivanova, I. et al. The RNA m6A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence. *Molecular cell* 67, 1059-1067 e1054 (2017). 10

59 Fustin, J. M. et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell* 155, 793-806 (2013).

60 Slobodin, B. et al. Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell* 169,326-337 e312 (2017).

61 Schwartz, S. et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic -regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell* 159, 148-162 (2014).

62 Pendleton, K. E. et al. The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell* 169, 824-835 e814(2017). 20

63 Shi, H. et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell research* 27, 315-328(2017).

64 Huang, H. et al. Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature cell biology* 20,285-295 (2018).

65 Bertero, A. et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m(6)A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* (2018).

66 Liu, N. et al. N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 518, 560-564 (2015).

67 Joseph, C. et al. Deciphering hematopoietic stem cells in their niches: a critical appraisal of genetic models, lineage tracing, and imaging strategies. *Cell stem cell* 13, 520-533 (2013). 30

68 Barbieri, I. et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m(6)A-dependent translation control. *Nature* (2017).

69 He, S., Nakada, D. & Morrison, S. J. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 377-406 (2009).

70 Qian, P. et al. The Dkl1-Gtl2 Locus Preserves LT-HSC Function by Inhibiting the PI3K-mTOR Pathway to Restrict Mitochondrial Metabolism. *Cell stem cell* 18, 214-228 (2016).

71 He, X. C. et al. Homing and migration assays of hematopoietic stem/progenitor cells. *Methods in molecular biology* 1185, 279-284 (2014). 40

72 Hu, Y. & Smyth, G. K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods* 347, 70-78 (2009).

73 Purton, L. E. & Scadden, D. T. Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell stem cell* 1, 263-270 (2007).

74 Perry, J. M. et al. Cooperation between both Wnt/β-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes & development* 25, 1928-1942 (2011).

75 Simsek, D. et al. The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Function 50

- al Diversity and Heterogeneity. *Cell* 169, 1051-1065 e1018(2017).
- 76 Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526, 126-130.
- 77 Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- 78 Beerman, I., Seita, J., Inlay, M.A., Weissman, I.L., and Rossi, D.J. (2014). Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell stem cell* 15, 37-50. 10
- 79 Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell stem cell* 6, 48-58.
- 80 Benz, C., Copley, M.R., Kent, D.G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaiepour, N., Ma, E., Mader, H., Rowe, K., Day, C., et al. (2012). Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell stem cell* 10, 273-283.
- 81 Bowers, M., Zhang, B., Ho, Y., Agarwal, P., Chen, C.C., and Bhatia, R. (2015). Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* 125, 2678-2688. 20
- 82 Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M.P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., et al. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* 20, 1315-1320.
- 83 Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- 84 Chen, J.Y., Miyanishi, M., Wang, S.K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K.S., Seita, J., Sahoo, D., Nakauchi, H., and Weissman, I.L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* 530, 223-227. 30
- 85 Dacic, S., Kalajzic, I., Visnjic, D., Lichtler, A.C., and Rowe, D.W. (2001). Collagen-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res* 16, 1228-1236.
- 86 Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231-235.
- 87 Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457-462. 40
- 88 Dominici, M., Rasini, V., Bussolari, R., Chen, X., Hofmann, T.J., Spano, C., Bernabei, D., Veronesi, E., Berton, F., Paolucci, P., et al. (2009). Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood* 114, 2333-2343.
- 89 Fleming, W.H., Alpern, E.J., Uchida, N., Ikuta, K., Spangrude, G.J., and Weissman, I.L. (1993). Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology* 122, 897-902.
- 90 Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J.W., Jaenisch, R. 50

- , Carey, V., and Hock, H. (2008). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nature biotechnology*.
- 91 Gazit, R., Mandal, P.K., Ebina, W., Ben-Zvi, A., Nombela-Arrieta, C., Silberstein, L.E., and Rossi, D.J. (2014). Fgd5 identifies hematopoietic stem cells in the murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 211, 1315-1331.
- 92 Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettelpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227-230.
- 93 Haug, J.S., He, X.C., Grindley, J.C., Wunderlich, J.P., Gaudenz, K., Ross, J.T., Paulson, A., Wagner, K.P., Xie, Y., Zhu, R., et al. (2008). N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 2, 367-379. 10
- 94 Hooper, A.T., Butler, J.M., Nolan, D.J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H.G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., et al. (2009). Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell* 4, 263-274.
- 95 Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Lederger, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., et al. (2016). Corrigendum: Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 538, 274. 20
- 96 Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- 97 Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheierrmann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*.
- 98 Lerner, C., and Harrison, D.E. (1990). 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Experimental hematology* 18, 114-118. 30
- 99 Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science (New York, NY)* 327, 542-545.
- 100 Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews Cancer* 3, 330-338.
- 101 Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med* 20, 833-846.
- 102 Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834. 40
- 103 Morita, Y., Ema, H., and Nakauchi, H. (2010). Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 207, 1173-1182. Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334.
- 104 Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97, 2293-2299.
- 105 Park, B., Nguyen, N.T., Dutt, P., Merdek, K.D., Bashar, M., Sterpetti, P., Tosolini, A., Testa, J.R., and Toksoz, D. (2002). Association of Lbc Rhoguanine nucleotide exchange factor with alpha-catenin-related protein, alpha-catenin/CTN 50

- NAL1, supports serum response factor activation. The Journal of biological chemistry 277, 45361-45370.
- 106 Qian, P., He, X.C., Paulson, A., Li, Z., Tao, F., Perry, J.M., Guo, F., Zhao, M., Zhi, L., Venkatraman, A., et al. (2015). The Dlk1-Gtl2 Locus Preserves LT-HSC Function by Inhibiting the PI3K-mTOR Pathway to Restrict Mitochondrial Metabolism. Cell stem cell.
- 107 Raghunath, J., Salacinski, H.J., Sales, K.M., Butler, P.E., and Seifalian, A.M. (2005). Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. Current opinion in biotechnology 16, 503-509.
- 108 Rodina, A., Wang, T., Yan, P., Gomes, E.D., Dunphy, M.P., Pillarsetty, N., Koren, J., Gerecitano, J.F., Taldone, T., Zong, H., et al. (2016). The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. Nature 538, 397-401.
- 109 Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Jones, T.B., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. Nature.
- 110 Scadden, D.T. (2014). Nice Neighborhood: Emerging Concepts of the Stem Cell Niche. Cell 157, 41-50. Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells 4, 7-25.
- 111 Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports health 1, 461-468.
- 112 Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X.B., Suda, T., et al. (2012). Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. Cell 150, 351-365.
- 113 Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity 25, 977-988.
- 114 Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of glycolysis by pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. Cell stem cell 12, 49-61.
- 115 Venkatraman, A., He, X.C., Thorvaldsen, J.L., Sugimura, R., Perry, J.M., Tao, F., Zhao, M., Christenson, M.K., Sanchez, R., Yu, J.Y., et al. (2013). Maternal imprinting at H19-Igf2 locus maintains adult hematopoietic stem cell quiescence. Nature 500, 345-349.
- 116 Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2005). Differential expression of α 2 integrin separates long-term and short-term reconstituting Lin- / lo Thy1.1 loc- kit+ Sca-1+ hematopoietic stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F.B., Huntscha, S., Sobotta, M.C., Moehrle, B., Brooks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., et al. (2015). Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. Nature 520, 549-552.
- 117 Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 100, 157-168.
- 118 Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. Cell 135, 1118-1129.
- 119 Xie, Y., Yin, T., Wiegand, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko,

- K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., et al. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457, 97-101.
- 120 Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 147, 1146-1158.
- 121 Yang, G., Zhu, L., Hou, N., Lan, Y., Wu, X.M., Zhou, B., Teng, Y., and Yang, X. (2014). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell research* 24, 1266-1269.
- 122 Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3-short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717-2723. 10
- 123 Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- 124 Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 20, 1321-1326. 20
- 125 Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., and Morrison, S.J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature cell biology* 19, 891-903.
- 126 Zhou, F., Li, X., Wang, W., Zhu, P., Zhou, J., He, W., Ding, M., Xiong, F., Zheng, X., Li, Z., et al. (2016). Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature* 533, 487-492.

【表 1】

表 S1

表S1. HSCの自己複製および維持のために重大である重要な転写因子はHSPCにおいてm6Aによって標識されている

Gata2

Gfi1

Pbx1

Lmo2

Etv6

Erg

Runx1

Tal1

Hoxa9

Meis1

Kmt2a

Kmt2b

Kmt2c

Kmt2d

Bmi1

Sox4

Evi1

Stat3

Stat5a

Hoxb4

Zfx

Foxo3

Foxp1

10

20

TABLE 52

[illegible]

40

[illegible]

20

30

40

[illegible]

40

[illegible]

30

40

[illegible]

40

[illegible]

40

[illegible]

30

40

[illegible]

30

40

[illegible]

30

40

[illegible]

40

[illegible][illegible]

[illegible]

30

40

[illegible]

20

【表 4 - 1】

表 S4

表S4. CRUを算出するために使用したヒトドナー由来キメラ化のパーセンテージ

一次 LDA

TNCにおけるhCD45+GFP+細胞のパーセンテージ		
	1.20%	
対照	1.11%	
50K	0.85%	10
	4.29%	
	1.66%	
対照	1.51%	
20K	1.47%	
	2.10%	
	7.37%	
YTHDF2	67.90%	
KD 50K	22.80%	
	21.00%	
	12.30%	20
YTHDF2	8.23%	
KD 20K	4.57%	
	1.53%	
	0.17%	
対照	0.46%	
10K *	1.00%	
	0.65%	
	1.23%	
	2.51%	
	1.60%	30
YTHDF2	1.28%	
KD 20K	1.40%	
	1.66%	
	3.07%	
	0.95%	

* 対照10K群はマウス7匹にも移植した。しかし、2匹のマウスが分析時点前に造血回復欠損に部分的に起因して死亡した。

40

【表 4 - 2】

表 S4 (続き)

二次 LDA		
TNCにおけるhCD45+GFP+細胞のパーセンテージ		
対照	0.27%	
12E+6	0.26%	
	0.35%	
対照	0.02%	
8E+6	0.01%	10
	7.57E-05	
	0.03%	
対照	0.02%	
4E+6	0.01%	
	0.02%	
YTHDF2	0.92%	
KD 12E+6	1.13%	
	1.45%	
YTHDF2	0.38%	
KD 8E+6	0.37%	20
	0.72%	
	0.27%	
YTHDF2	0.29%	
KD 4E+6	0.19%	
	0.44%	

【表 5】

表 S5

表S5. wt HSPCおよびYthdf2 KO HSPCにおける転写因子の発現レベルを検証するために使用したqPCRプライマー		
マウス Tal1 qPCRプライマー F	CGCTGCTCTATAGCCTTAGCC	
マウス Tal1 qPCR プライマー R	CTCTTCACCCGGTTGTTGTT	
マウス Gata2 qPCRプライマー F	CAACCCCTTACTACGCCAACC	
マウス Gata2 qPCR プライマー R	GCTGTGCAACAAGTGTGGTC	
マウス Runx1 qPCRプライマー F	CCAGCCTCTCTGCAGAACTT	
マウス Runx1 qPCR プライマー R	GGAGATGGACGGCAGAGTAG	
マウス Stat5a qPCR プライマー F	AGAAGCAAGTGTCCTGGAG	
マウス Stat5a qPCR プライマー R	GTCGTCCAGGATGATGGTCT	
マウス Actb qPCR プライマー F	TGTCACCAACTGGGACGATA	
マウス Actb qPCR プライマー R	ACCCTCATAGATGGGCACAG	

【図 1 - 1】

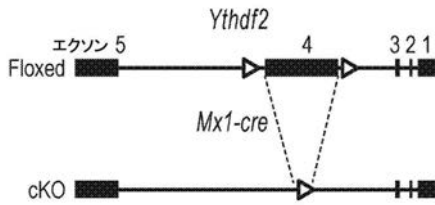


FIG. 1A

【図 1 - 2】

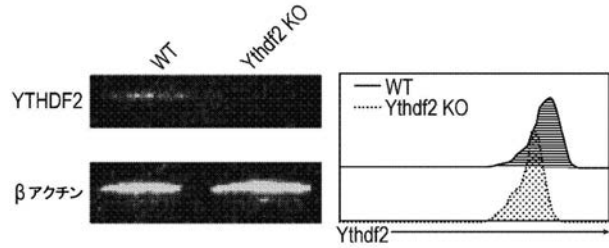


FIG. 1B

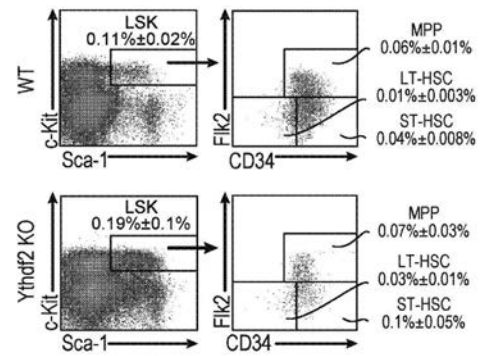


FIG. 1C

【図 1 - 3】

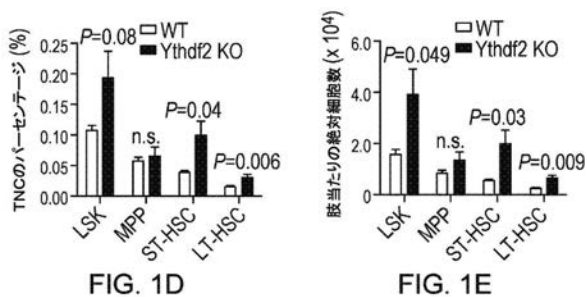


FIG. 1D

FIG. 1E

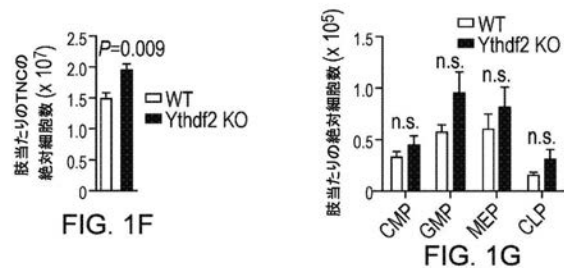


FIG. 1F

FIG. 1G

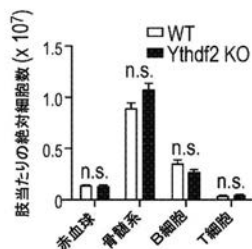


FIG. 1H

【図 2 - 1】

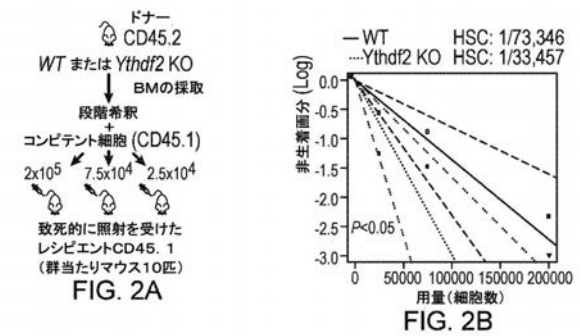


FIG. 2B

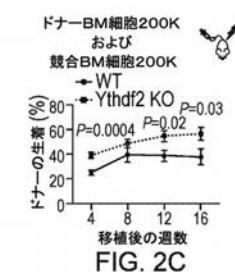


FIG. 2C

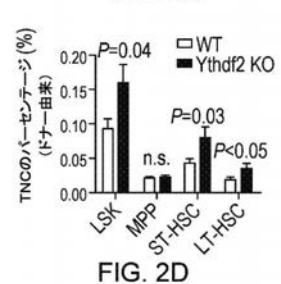


FIG. 2D

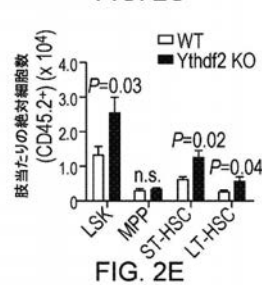


FIG. 2E

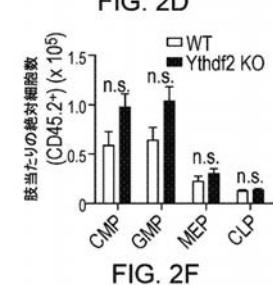
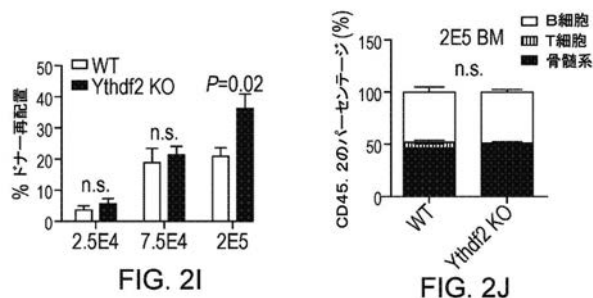
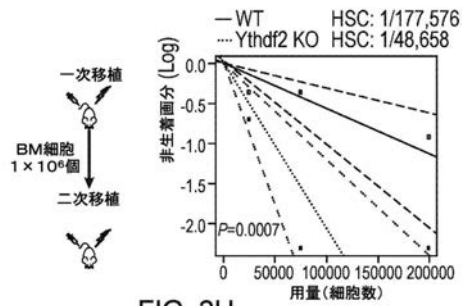
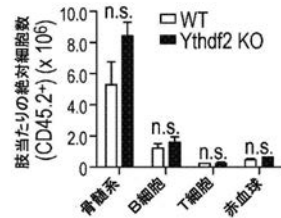
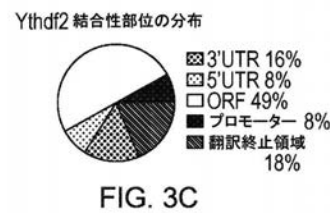
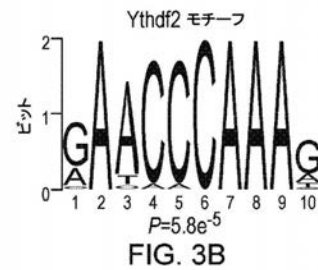
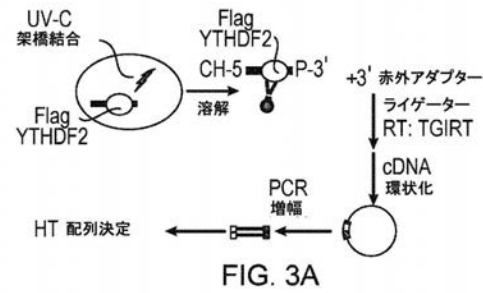


FIG. 2F

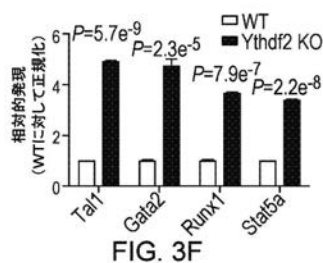
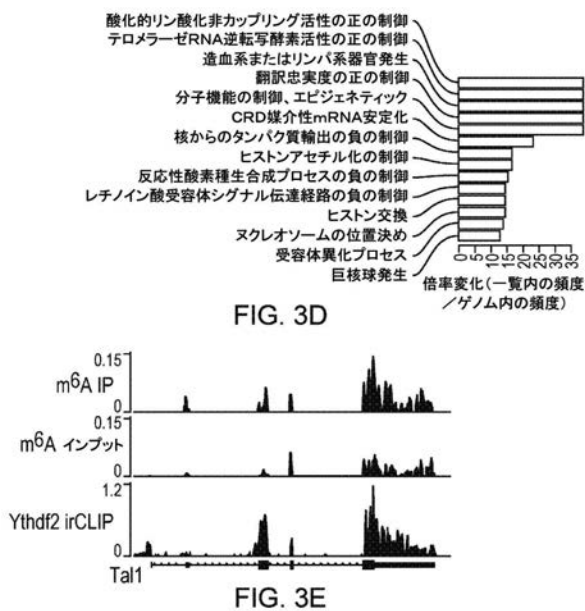
【図 2 - 2】



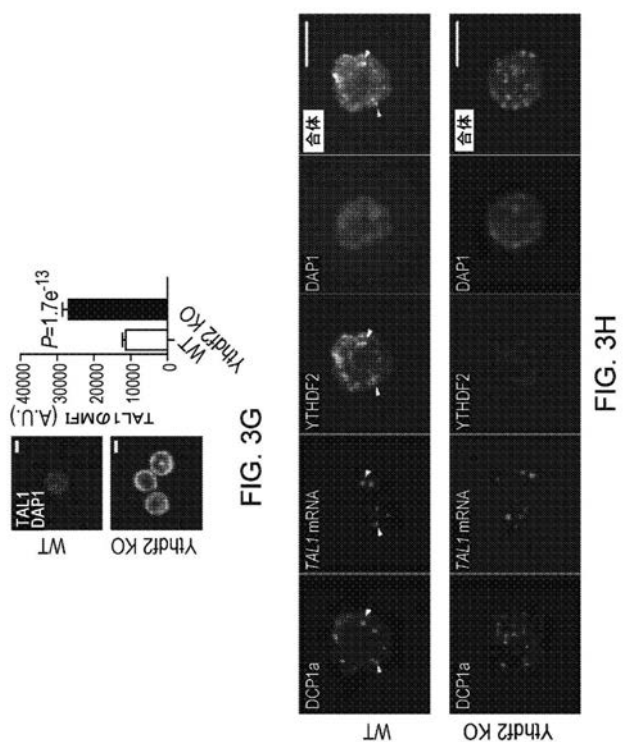
【図 3 - 1】



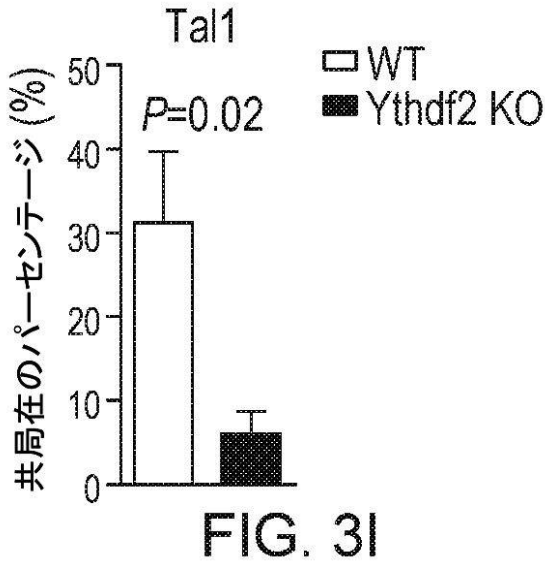
【図 3 - 2】



【図 3 - 3】



【図 3 - 4】



【図 4 - 1】

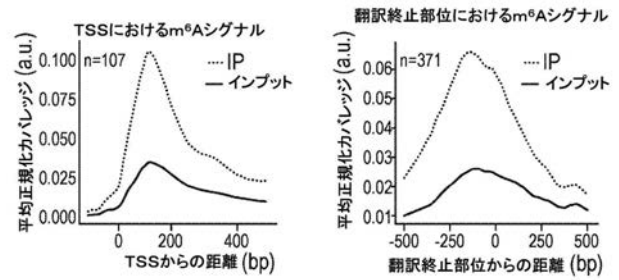


FIG. 4A

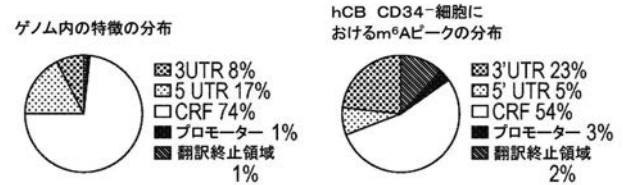
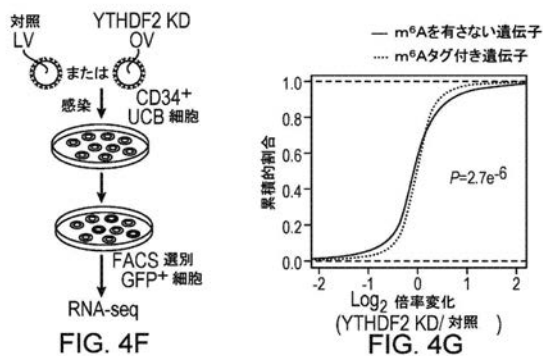
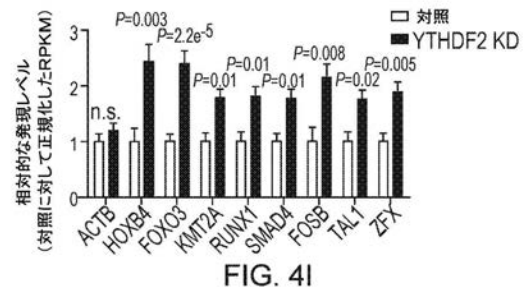
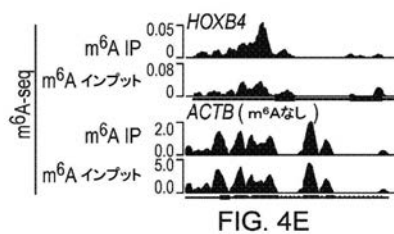
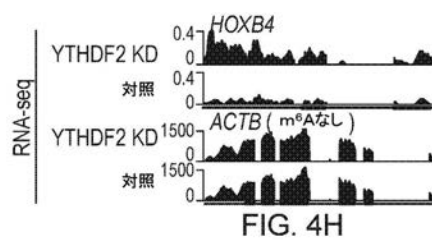


FIG. 4B

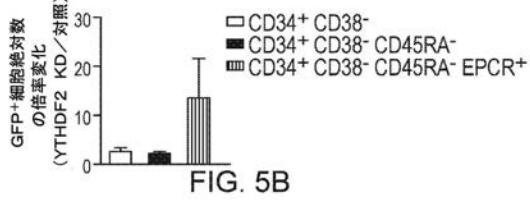
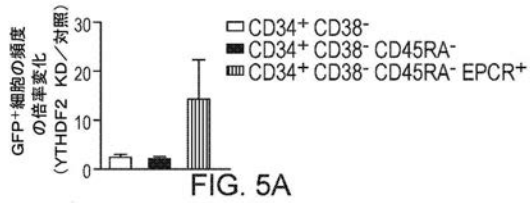
【図 4 - 2】



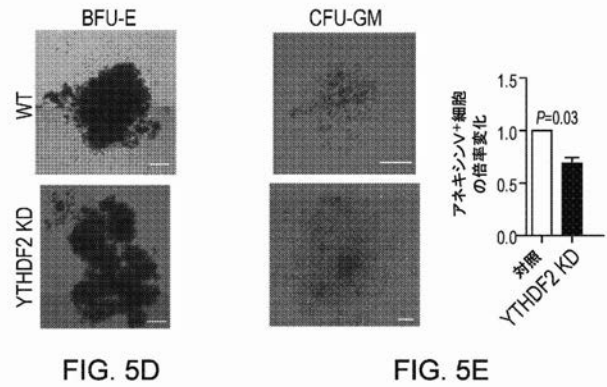
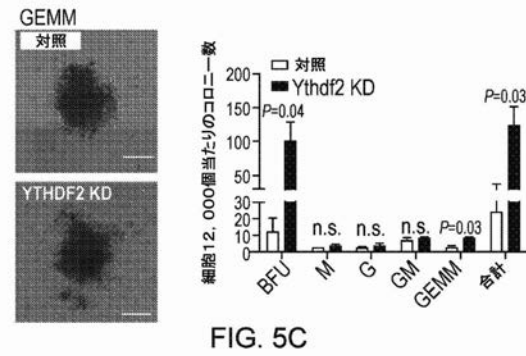
【図 4 - 3】



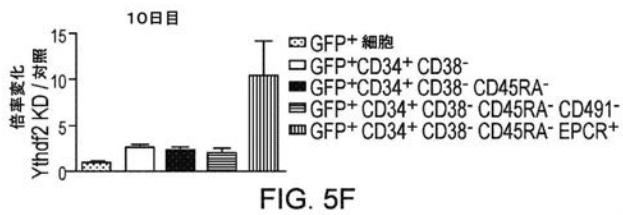
【図 5 - 1】



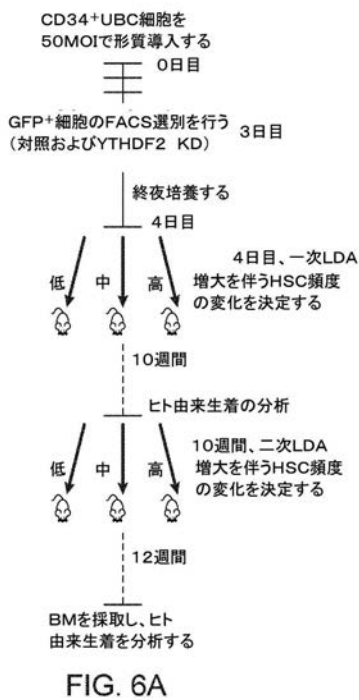
【図 5 - 2】



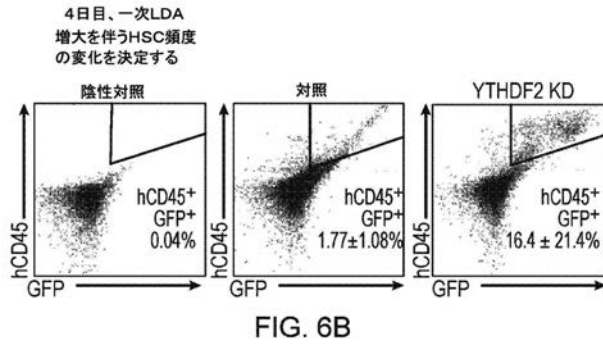
【図 5 - 3】



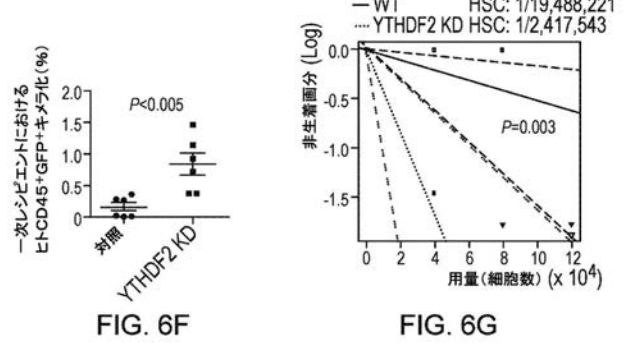
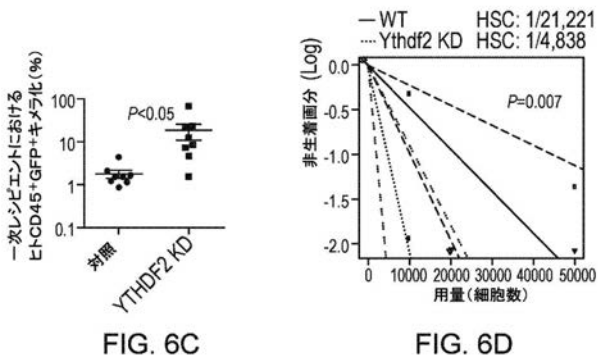
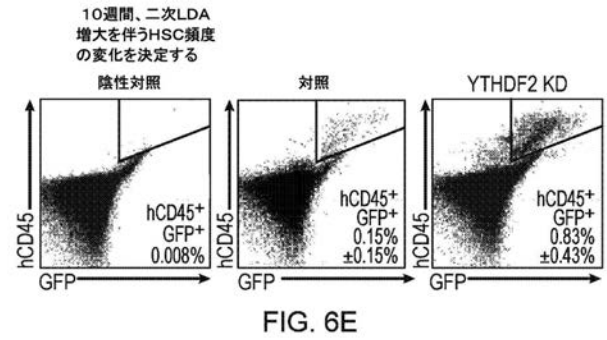
【図 6 - 1】



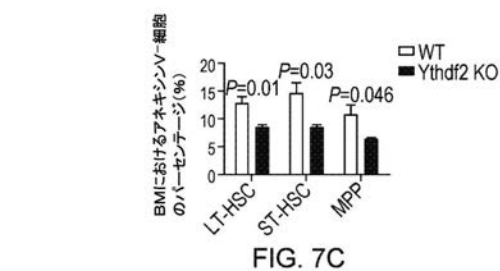
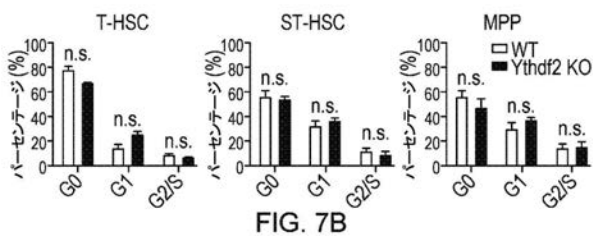
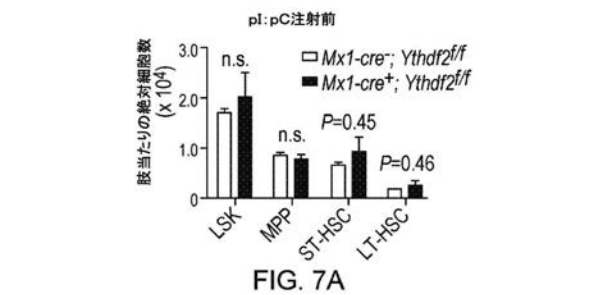
【図 6 - 2】



【図 6 - 3】



【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

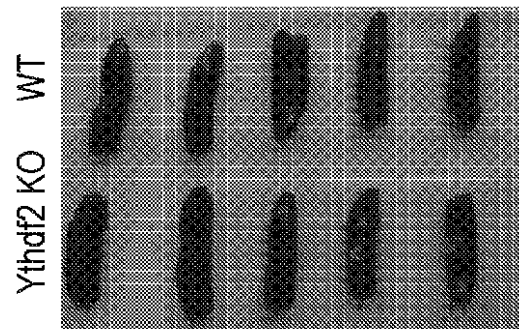


FIG. 7D

【図 7 - 3】

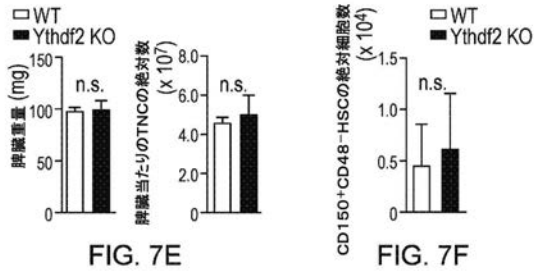


FIG. 7E

FIG. 7F

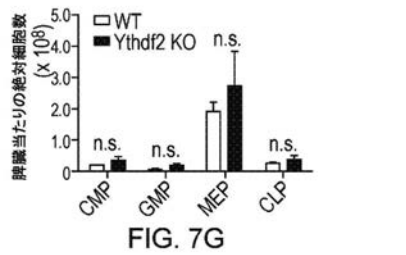


FIG. 7G

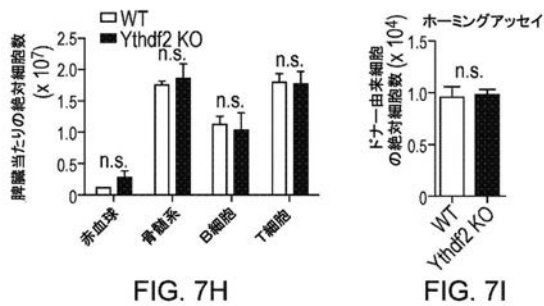


FIG. 7H

FIG. 7I

【図 8】



FIG. 8A

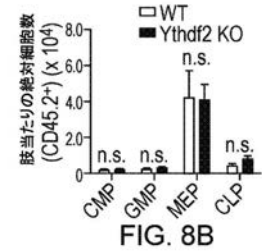


FIG. 8B

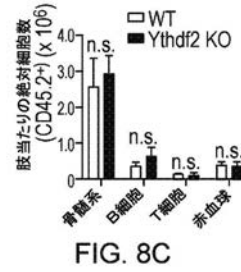


FIG. 8C

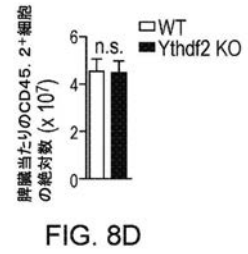


FIG. 8D

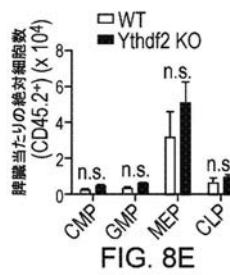


FIG. 8E

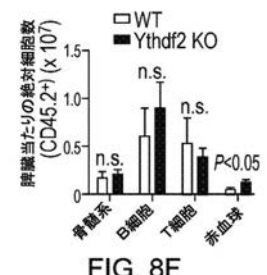


FIG. 8F

【図 9 - 1】

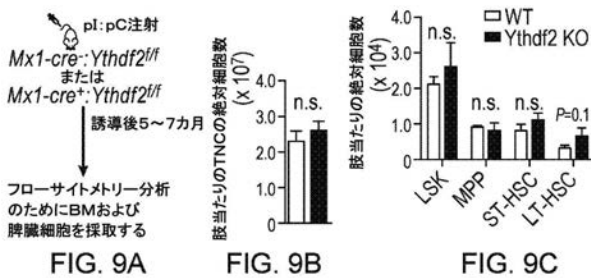


FIG. 9A

FIG. 9B

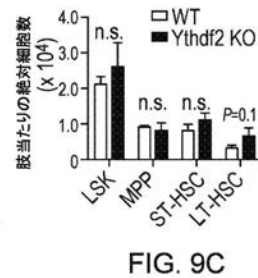


FIG. 9C

【図 9 - 2】

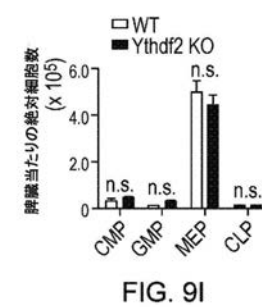


FIG. 9I

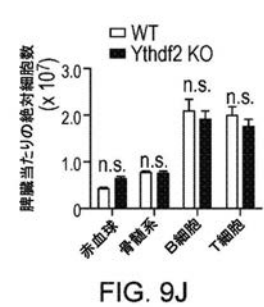


FIG. 9J

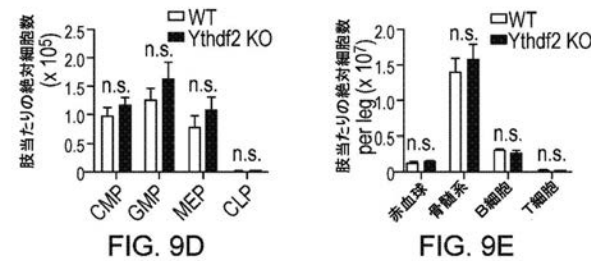


FIG. 9D

FIG. 9E

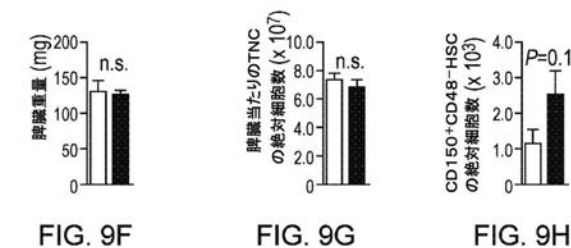


FIG. 9F

FIG. 9G

FIG. 9H

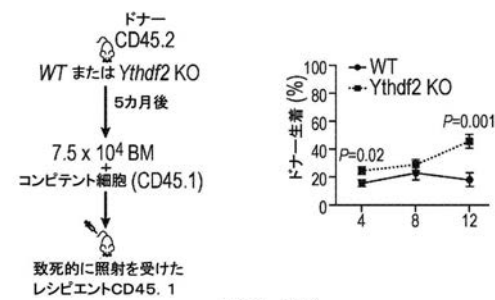


FIG. 9K

【図 10-1】

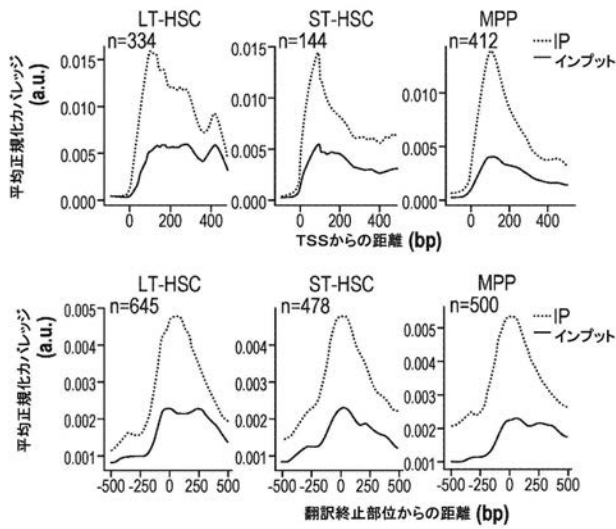


FIG. 10A

【図 10-2】

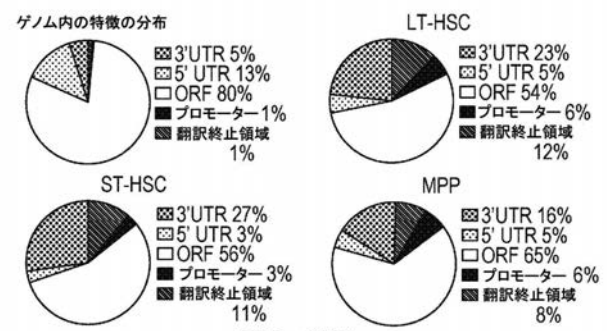


FIG. 10B

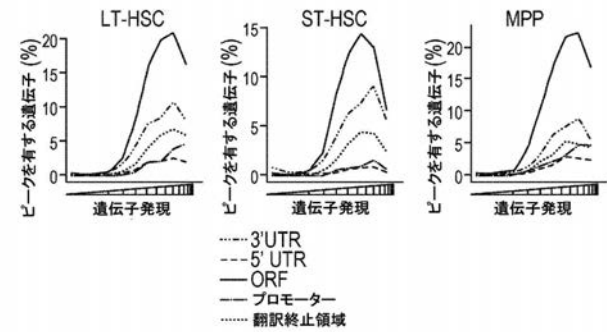


FIG. 10C

【図 10-3】

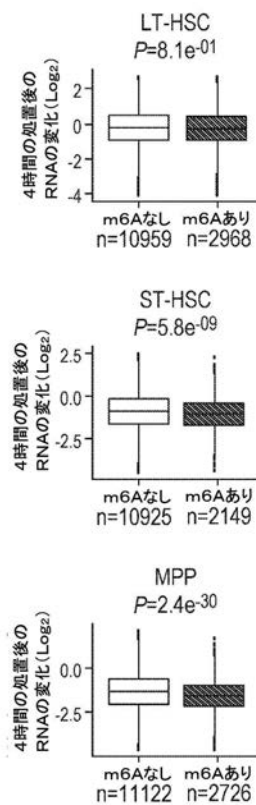


FIG. 10D

【図 11-1】

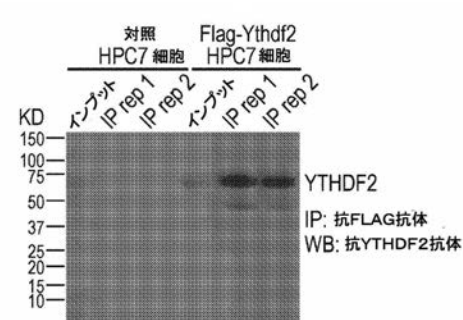


FIG. 11A

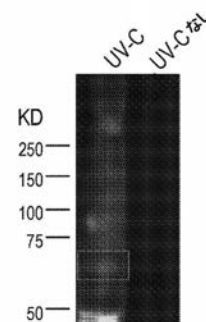
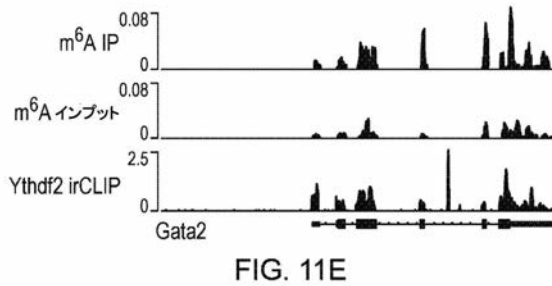
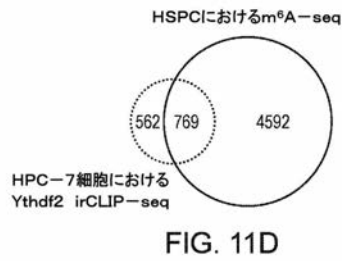
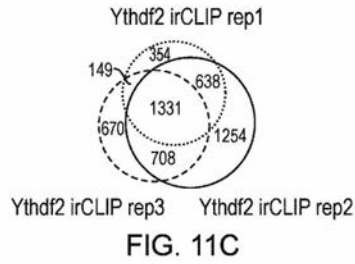
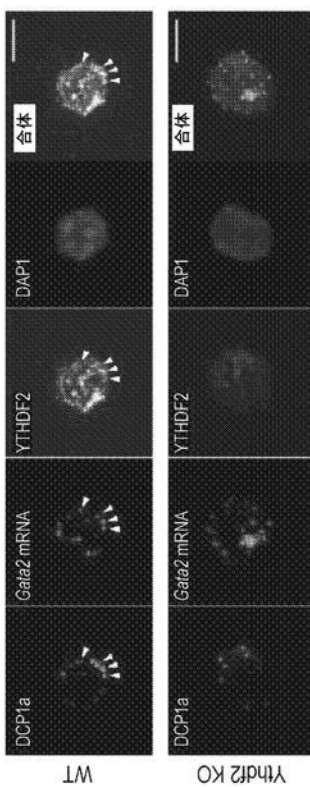


FIG. 11B

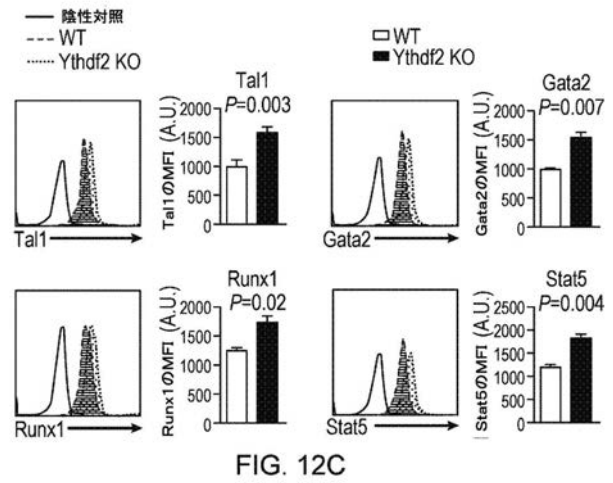
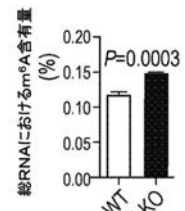
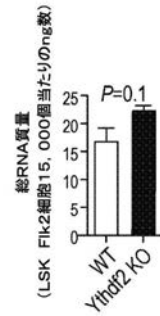
【図 1 1 - 2】



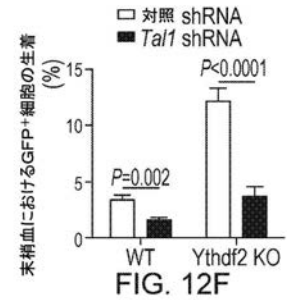
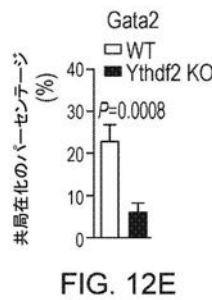
【図 1 2 - 2】



【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 3】



【図 13-1】

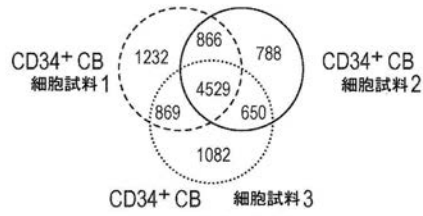


FIG. 13A

【図 13-2】

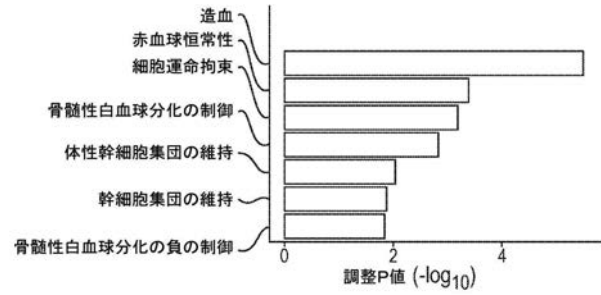


FIG. 13C

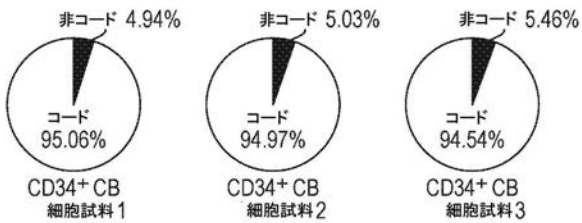


FIG. 13B

【図 13-3】

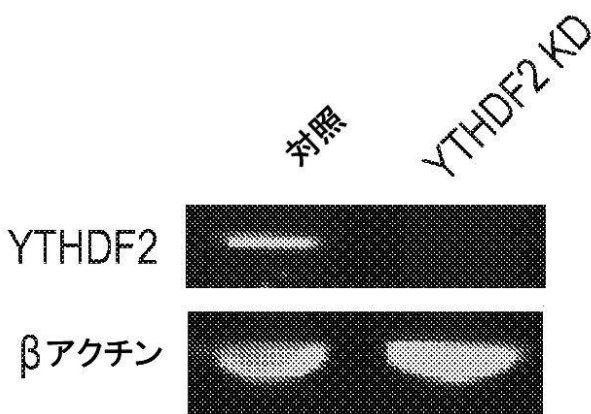


FIG. 13D

【図 13-4】

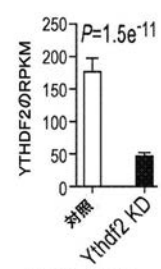


FIG. 13E

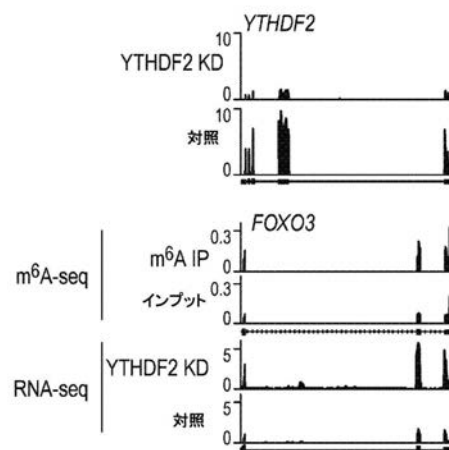
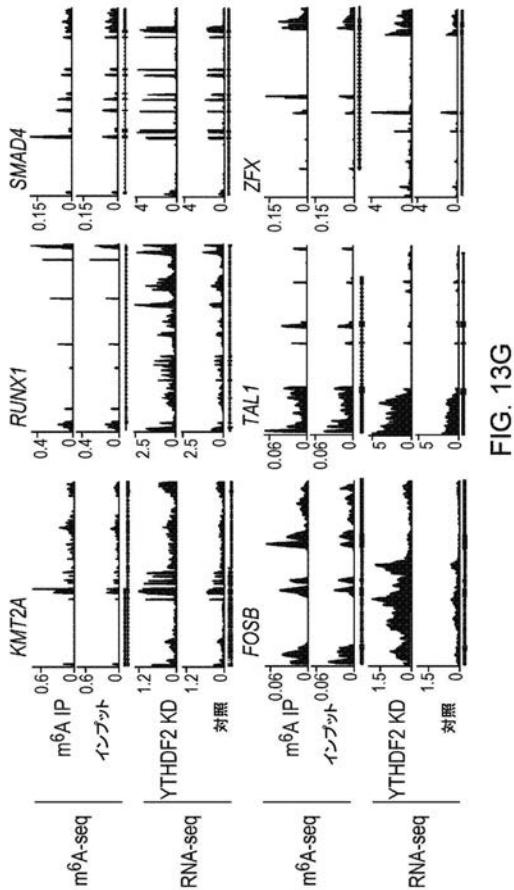


FIG. 13F

【図 13 - 5】



【図 14 - 1】

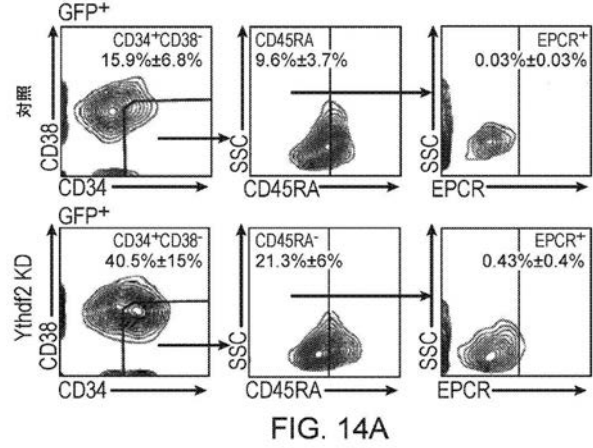


FIG. 14A

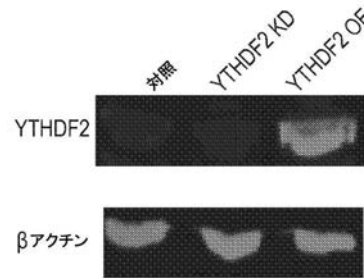


FIG. 14B

【図 14 - 2】

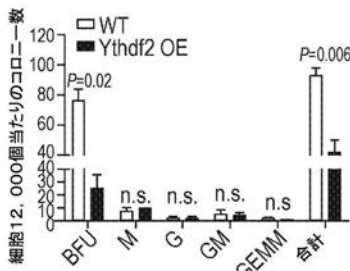


FIG. 14C

【図 15 - 2】

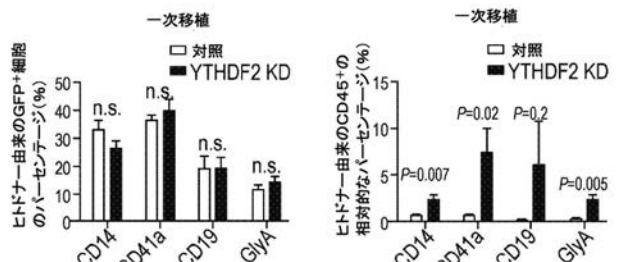


FIG. 15B

FIG. 15C

【図 15 - 1】

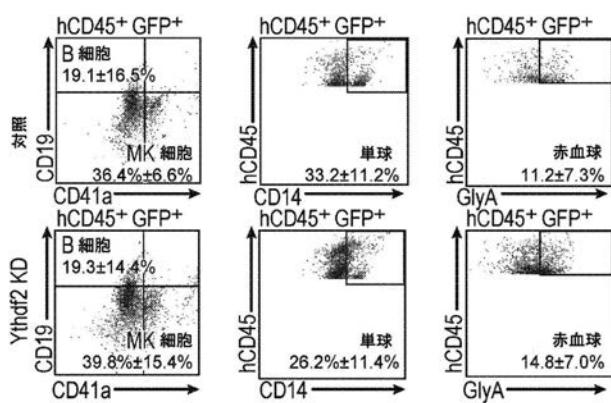


FIG. 15A

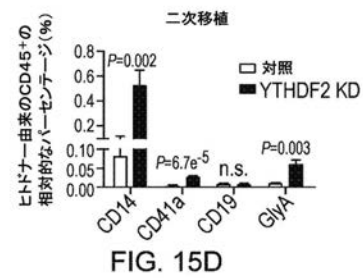
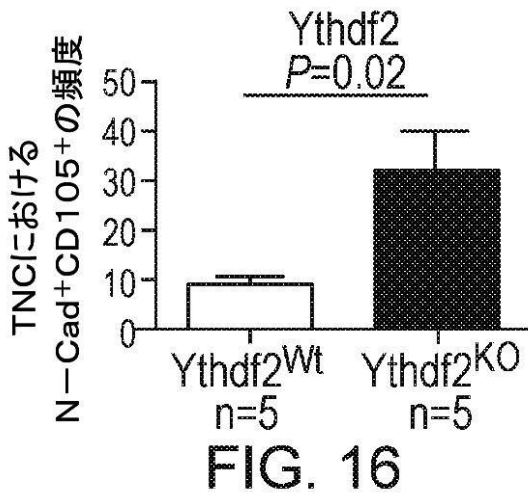
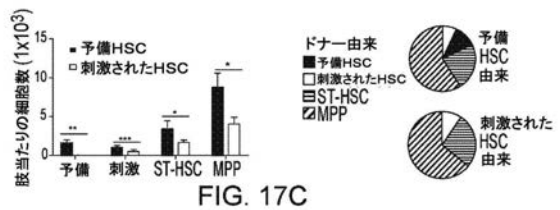
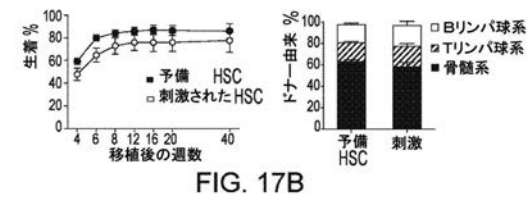
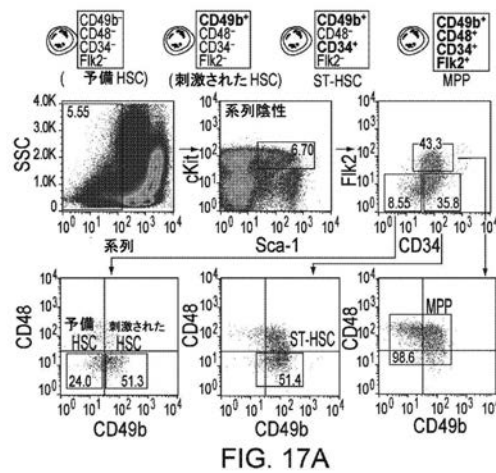


FIG. 15D

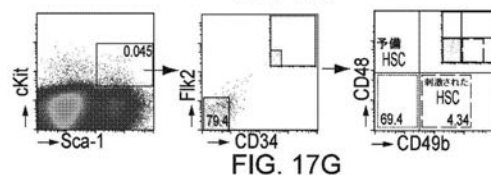
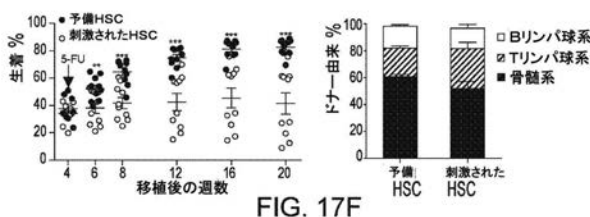
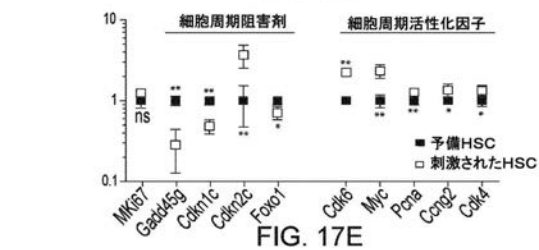
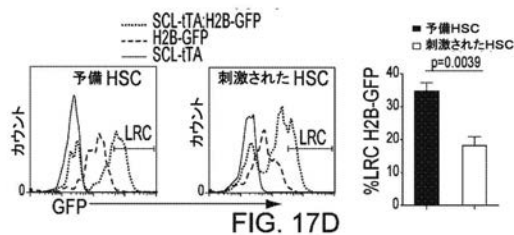
【図16】



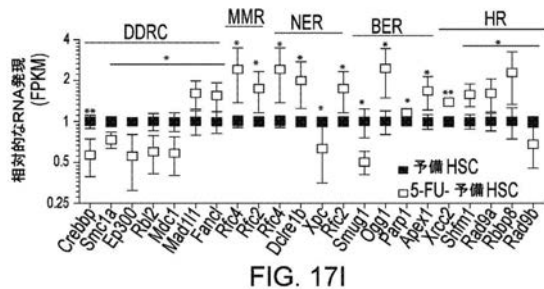
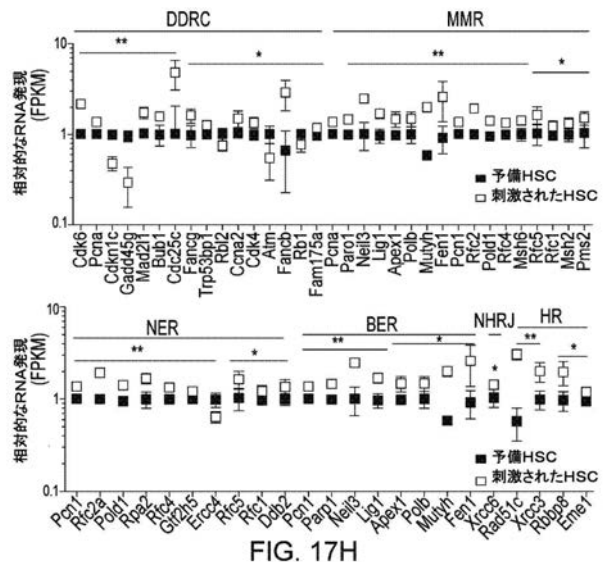
【図17-1】



【図17-2】



【図17-3】



【図 17 - 4】

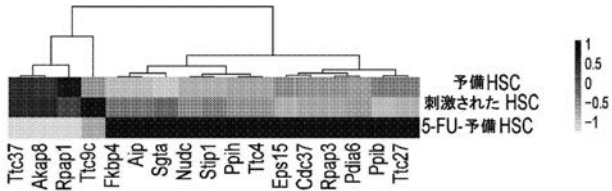


FIG. 17J

【図 18 - 1】

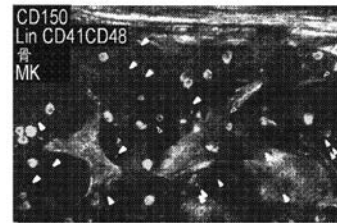


FIG. 18A

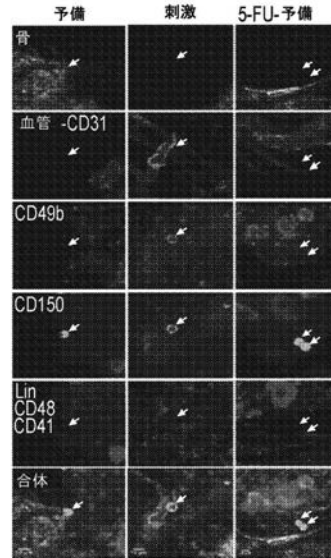


FIG. 18B

【図 18 - 2】

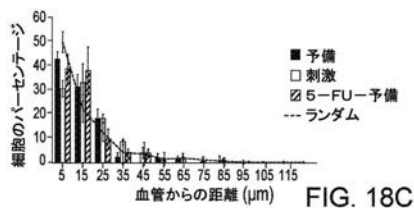


FIG. 18C

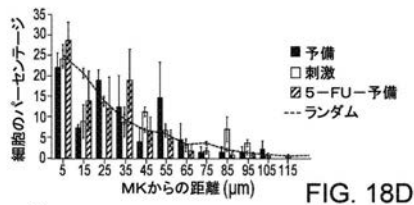


FIG. 18D

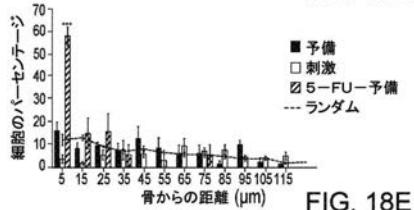


FIG. 18E

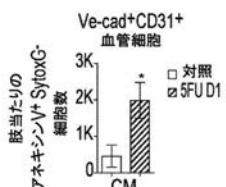


FIG. 18F

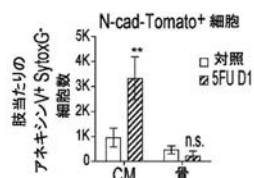


FIG. 18G

【図 18 - 3】

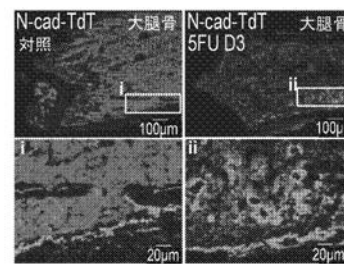


FIG. 18H

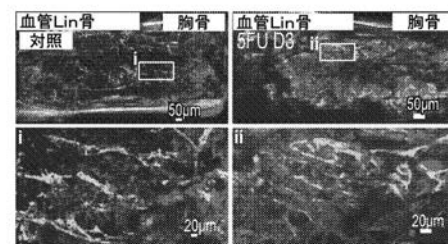
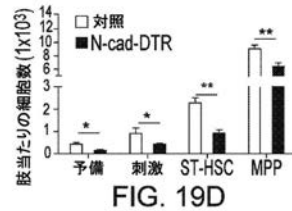
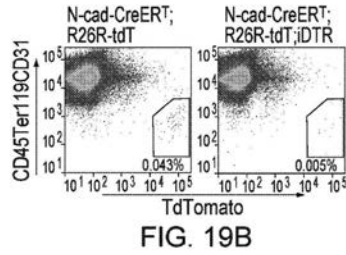
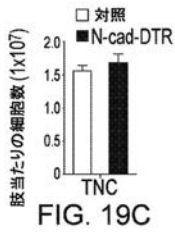
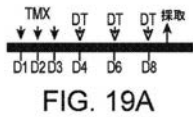
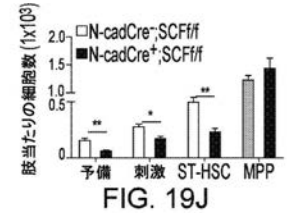
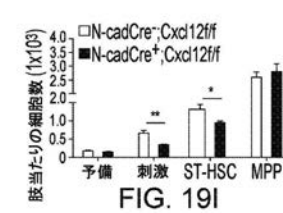
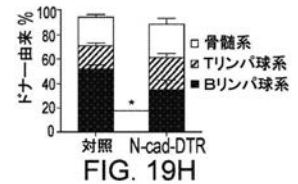
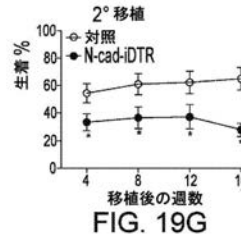
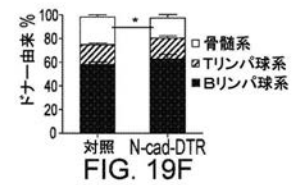
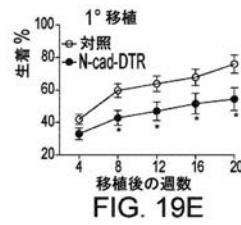


FIG. 18I

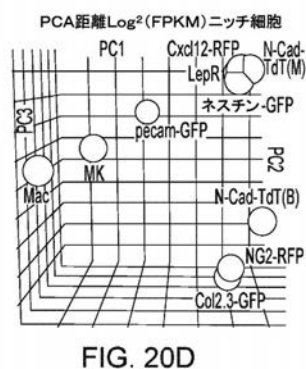
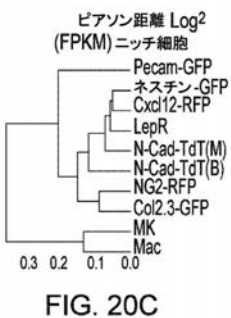
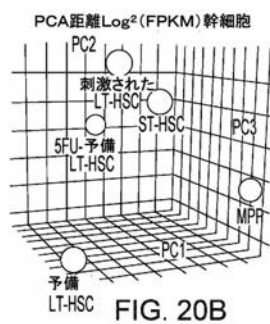
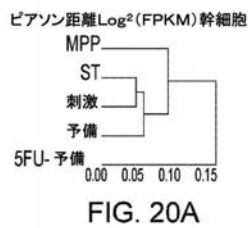
【図 19-1】



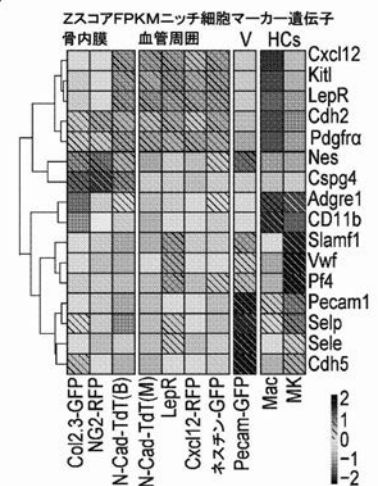
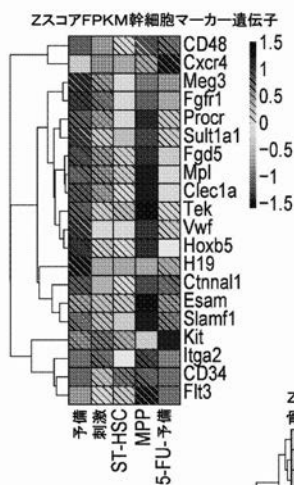
【図 19-2】



【図 20-1】



【図 20-2】



【図 20-3】

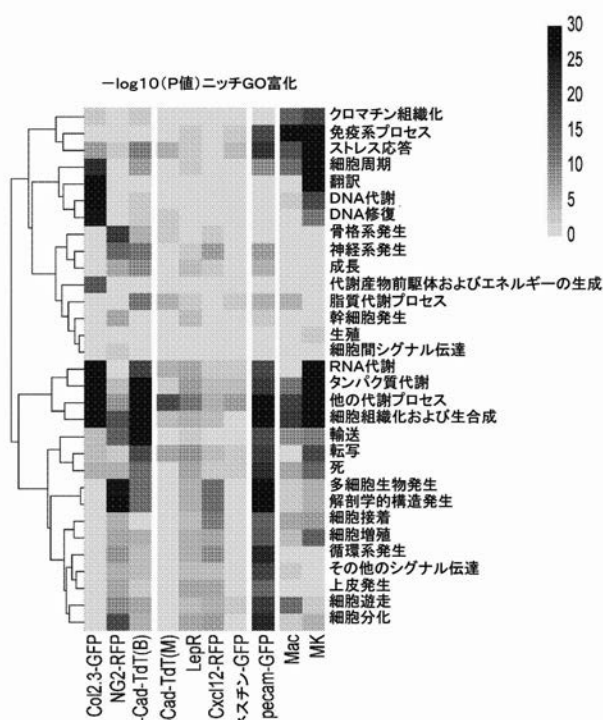


FIG. 20G

【図 20-4】

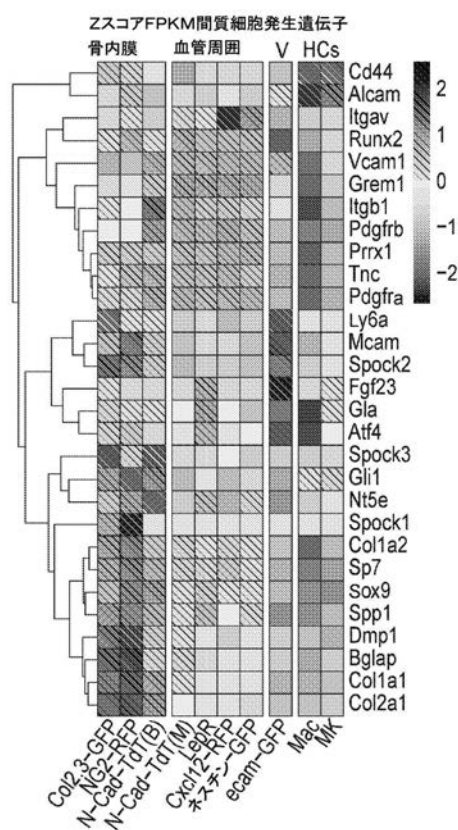


FIG. 20H

【図 20-5】

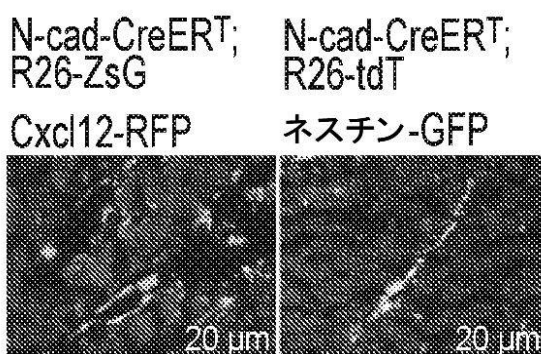


FIG. 20I

【図 20-6】

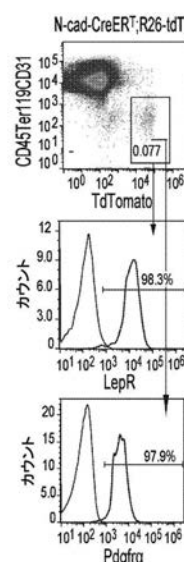


FIG. 20J

間質細胞集団	細胞 用量	ウェル当たりの CFU-Fコロニー数	CFU-F 頻度
N-cad-Td(B)	1 5 10	4/32 12/32 12/16	8.79 個に1つ
LepR	1 5 10	1/8 17/40 25/40	9.7 個に1つ
NG2-RFP	1 5 10	1/2 4/5 4/7	6.72 個に1つ
ネスチン-GFP	1 5 10	0/8 8/40 19/40	17.6 個に1つ
N-cad-creERT(B)	1 5 10	2/32 12/32 20/32	10.7 個に1つ
N-cad-creERT(M)	1 5 10	1/8 18/40 31/40	7.37 個に1つ

FIG. 20K

【図 21-1】

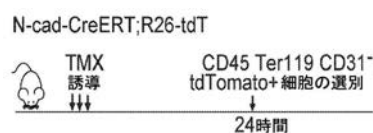


FIG. 21A

【図 2 1 - 2】

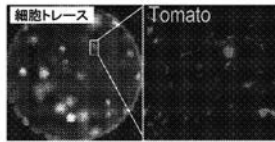


FIG. 21B

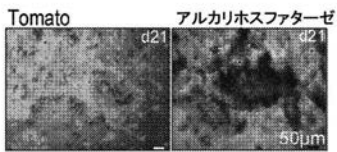


FIG. 21C

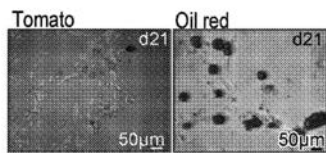


FIG. 21D

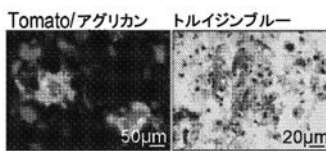


FIG. 21E

【図 2 1 - 4】

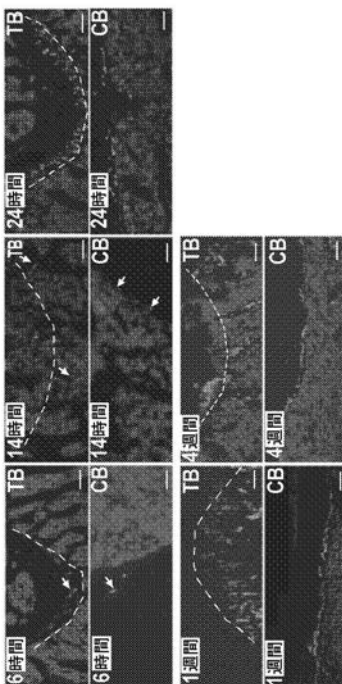


FIG. 21H

【図 2 1 - 3】

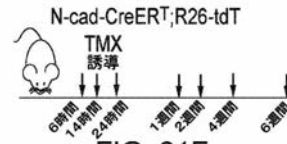


FIG. 21F

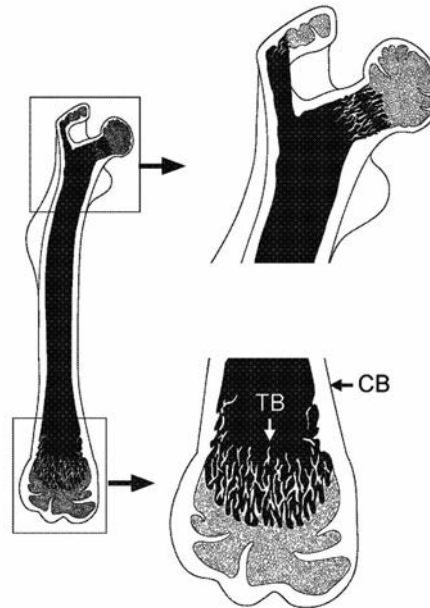


FIG. 21G

【図 2 1 - 5】

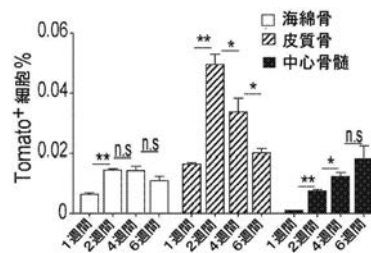
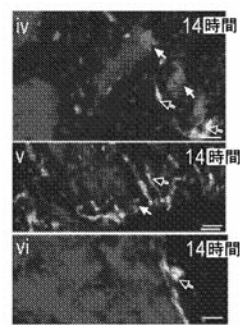
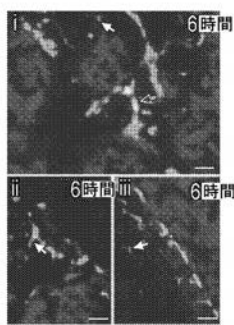
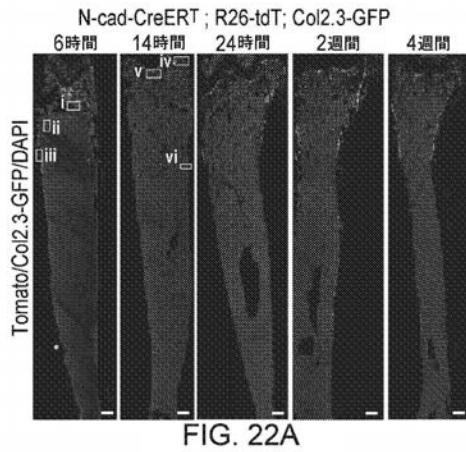
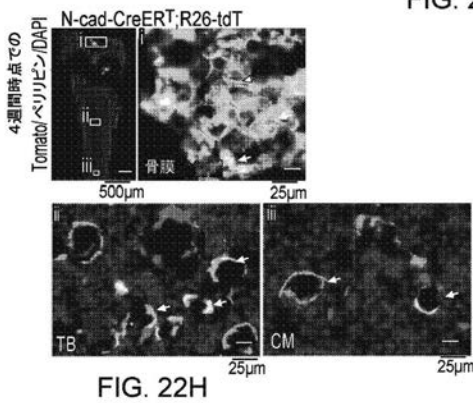
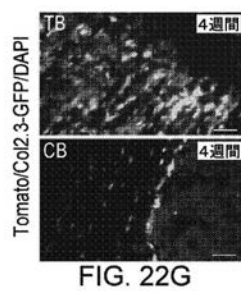


FIG. 21I

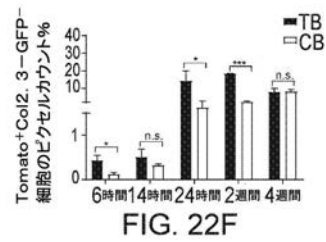
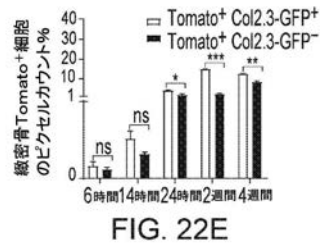
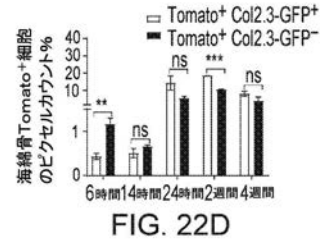
【図 2 2 - 1】



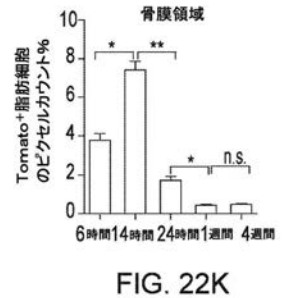
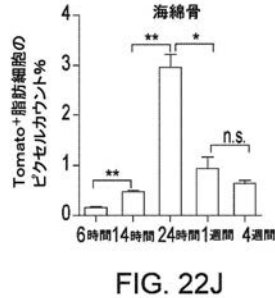
【図 2 2 - 3】



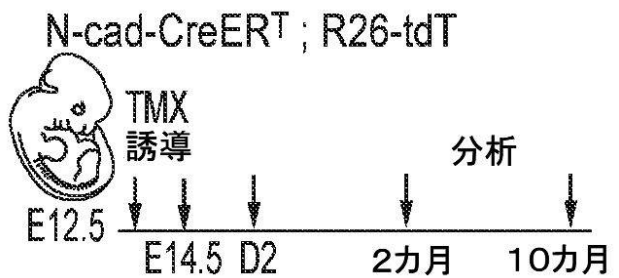
【図 2 2 - 2】



【図 2 2 - 4】



【図 2 3 - 1】



【図 2 3 - 2】

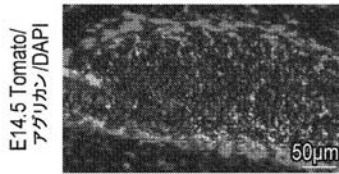


FIG. 23B

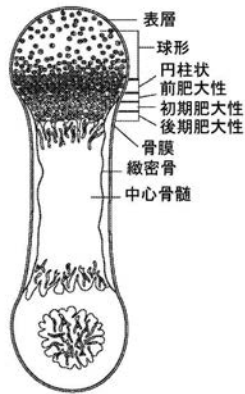


FIG. 23C

【図 2 3 - 4】



FIG. 23G

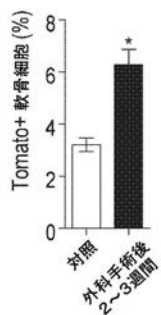


FIG. 23H

【図 2 3 - 3】

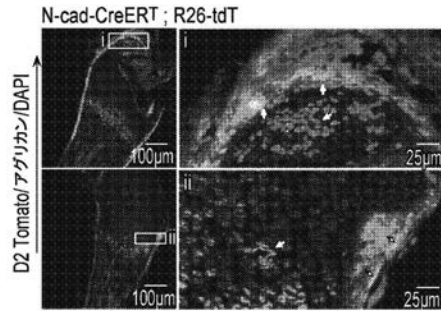


FIG. 23D

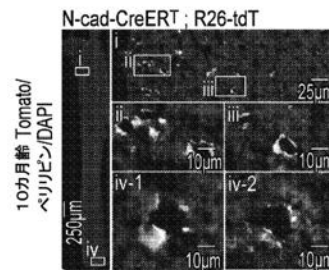


FIG. 23E

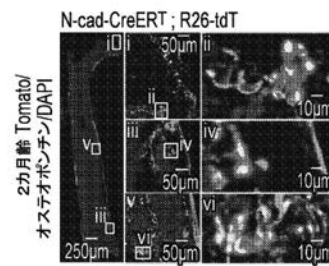


FIG. 23F

【図 2 3 - 5】

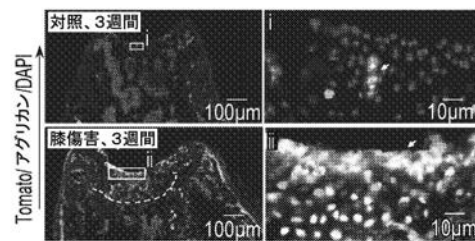


FIG. 23I

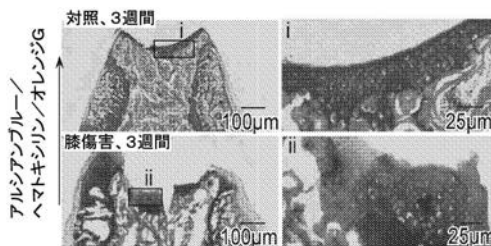
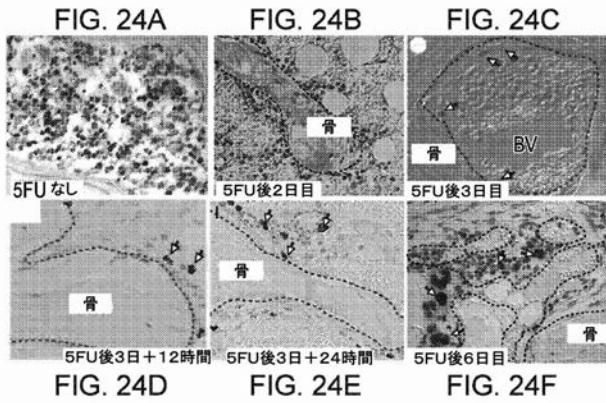


FIG. 23J

【図 2 4 - 1】



【图 2 4 - 2】

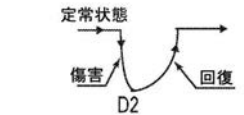


FIG. 24G

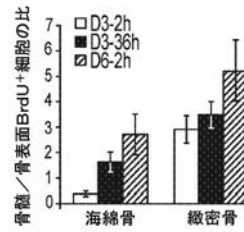


FIG. 24H

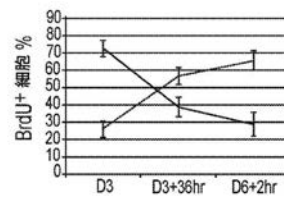


FIG. 24I

【図 24-3】

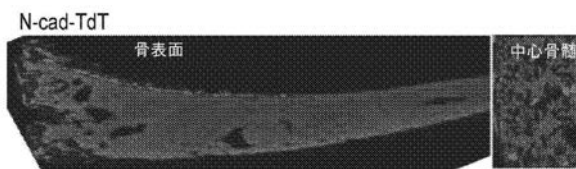


FIG. 24J

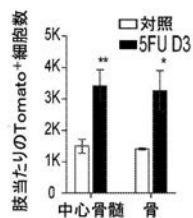


FIG. 24K

【図 2 5 - 1】

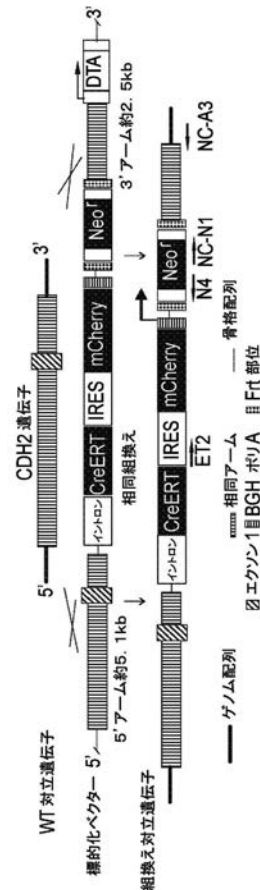


FIG. 25A

【図 25-2】

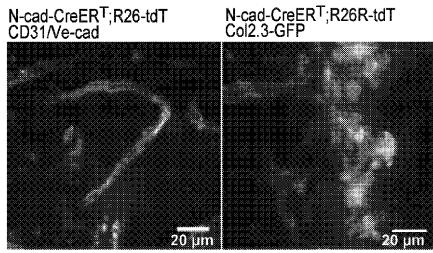


FIG. 25B

【図 26-1】

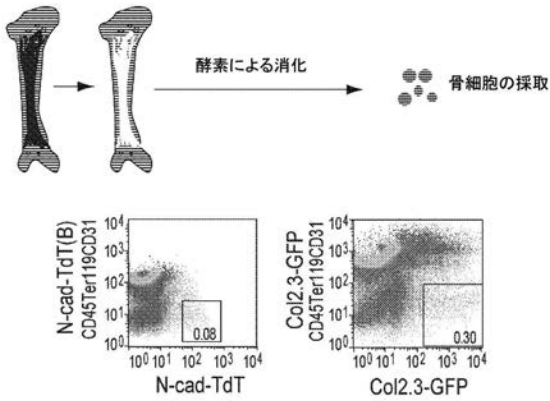


Figure 26A

【図 26-3】

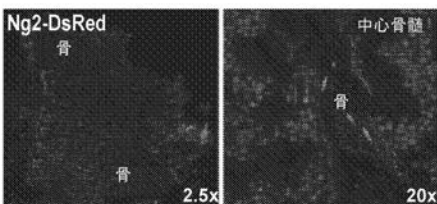


Figure 26C

【図 26-2】

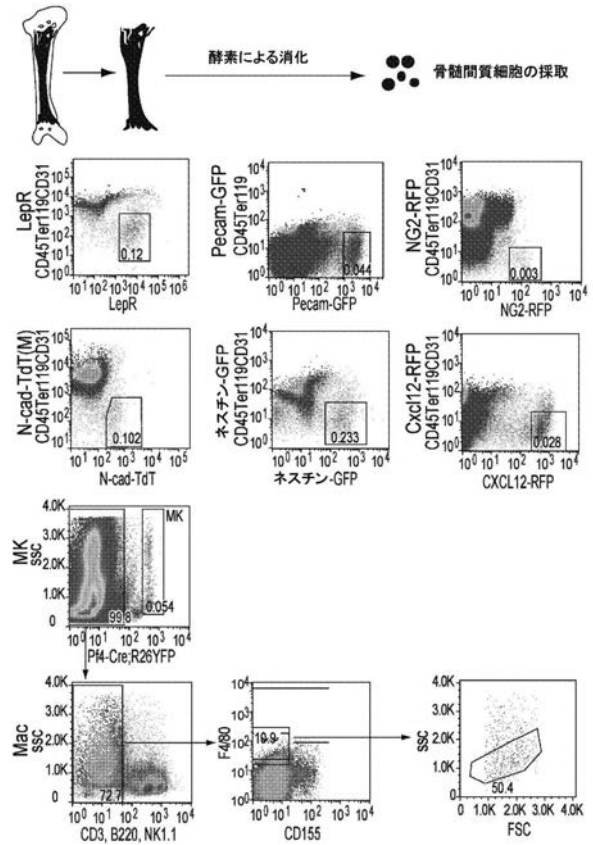


Figure 26B

【図 26-4】

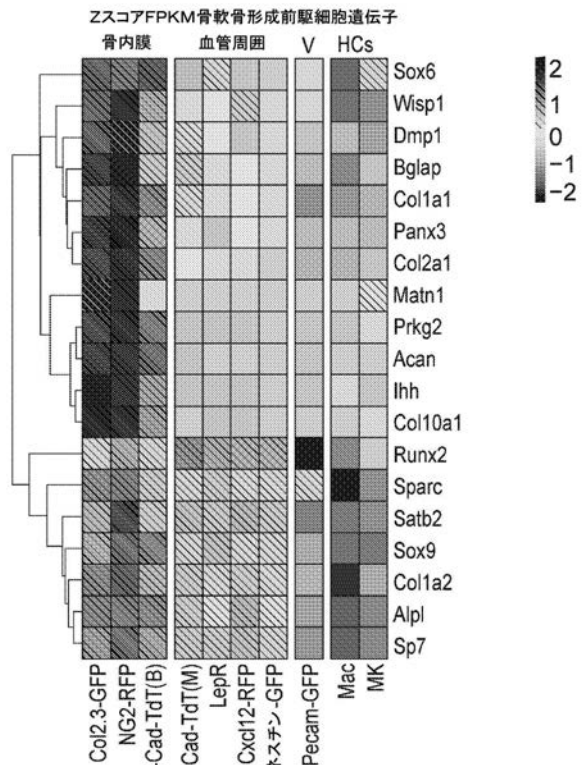


Figure 26D

【図 26-5】

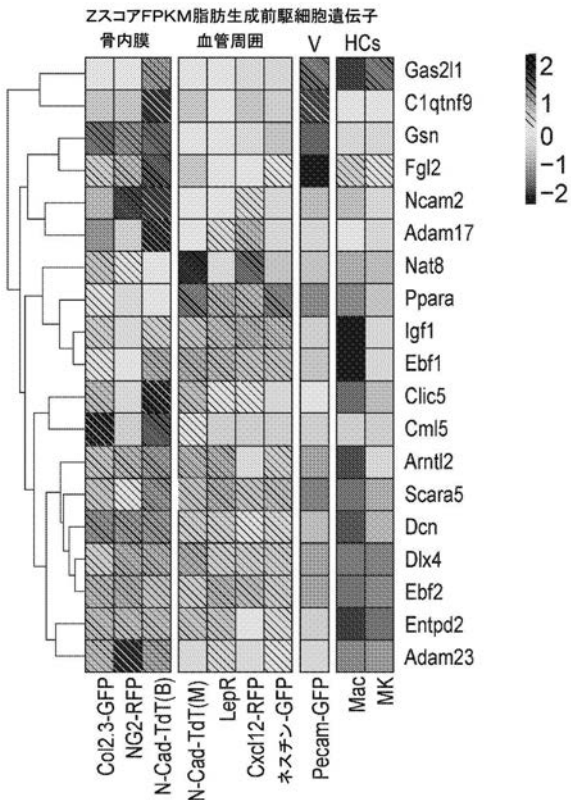
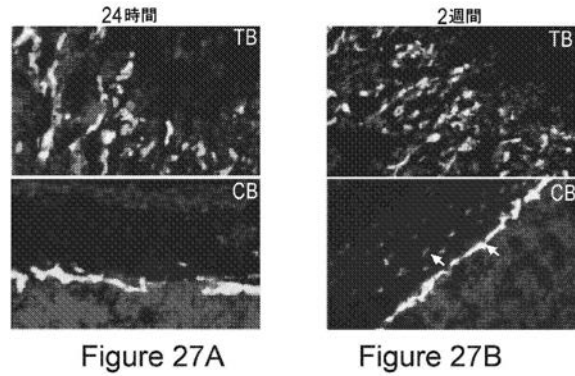
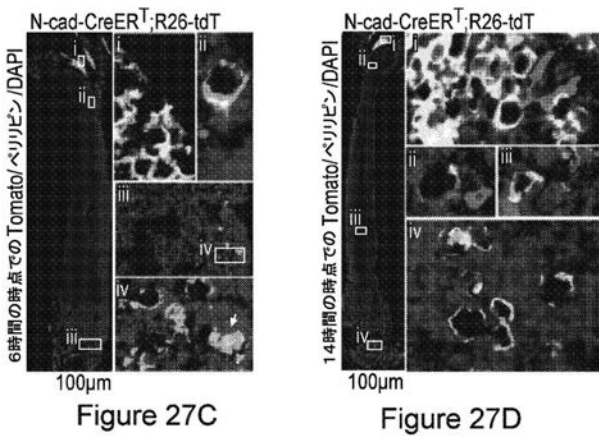


Figure 26E

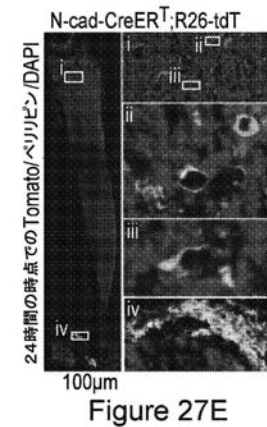
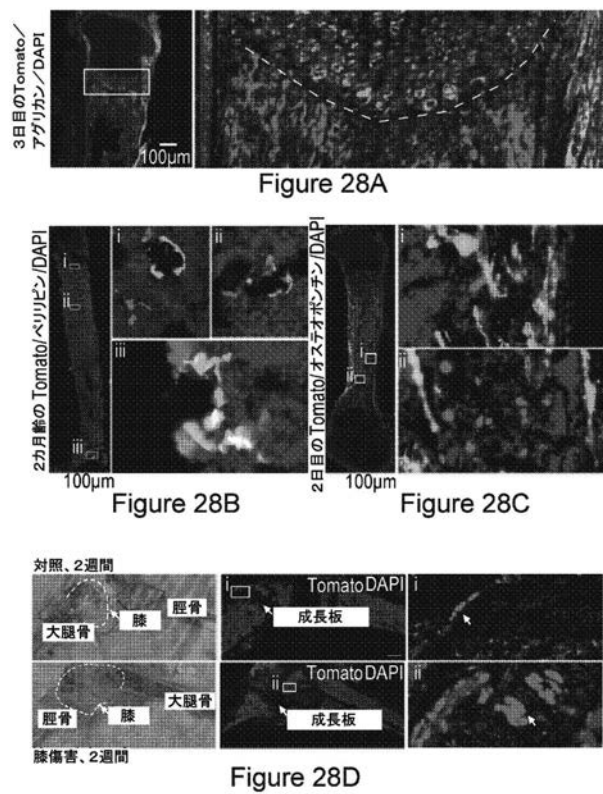
【図 27-1】



【図 27-2】



【図 28】



【図 29】

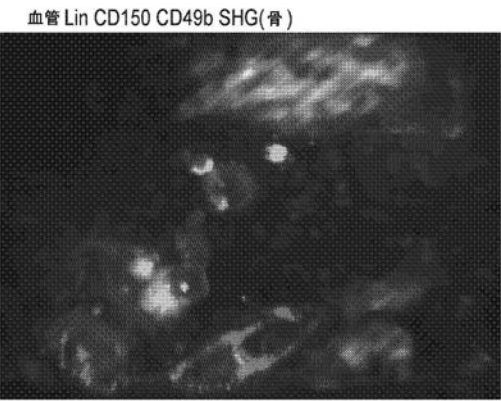


Figure 29

【図 30】

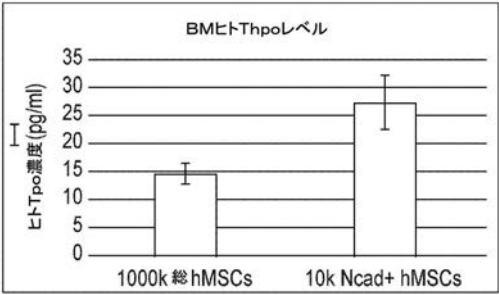


Figure 30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/55092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/28; C12N 5/071, 15/09, 15/113 (2019.01)
CPC - A61K 35/28; C12N 5/0647, 15/09, 15/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2016/264934 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, et al.) 15 September 2016; paragraphs [0007], [0014], [0023], [0033], [0037], [0044], [0095], [0121], [0136], [0158], [0194], [0201], [0271], [0277], [0288], [0306], [0433]; Figures 2F, 10H	1-3, 19-21, 24-25, 29, 30, 31/29, 32/31/29, 53 — 4-6, 12, 15-16, 33/32/31/29, 34/33/32/31/29, 35/34/33/32/31/29, 41/31/29, 44-45, 61-63, 66-67, 74-75
X	WO 2012/027376 (THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK, et al.) 1 March 2012; Figures 12, 27A; page 8, lines 21-29; page 11, lines 23-27; page 16, lines 1-4; page 23, lines 9-13; page 25, lines 4-8; page 26, lines 17-21; page 27, lines 7-11; page 28, lines 21-32; page 41, lines 3-5; page 54, line 13 – page 55, line 10; claims 1, 4-5, 10, 12	78-103
Y	(TIRUMURU, N et al.) N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. eLife – Microbiology And Infectious Disease. 2 July 2016, Vol. 5, No. e15528; page 14, 4th paragraph; Figure 3; DOI: 10.7554/eLife.15528	4-6, 15-16, 33/32/31/29, 34/33/32/31/29, 35/34/33/32/31/29, 44-45, 61-62, 66-67, 74-75
Y	(JOSEPH, C et al.) Deciphering Hematopoietic Stem Cells in Their Niches: A Critical Appraisal of Genetic Models, Lineage Tracing, and Imaging Strategies. Cell Stem Cell. 7 November 2013, Vol. 13, pages 520-533; page 520, 2nd column, 3rd paragraph – page 521, 1st column, 2nd paragraph; Table 1; DOI: 10.1016/j.stem.2013.10.010	12, 41/31/29, 63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“Z” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 February 2019 (05.02.2019)

Date of mailing of the international search report

22 MAR 2019

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/55092

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

An invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee ("ISA/225") was mailed on 24 October 2018 (24.10.2018). No approved electronic sequence listing was received in response to the ISA/225. Therefore, the international search was carried out only to the extent possible.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/55092

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-316, 371-407, a m6A modification reader YTHDF1 (m6A modification pathway molecule), MX1-Cre inactivation or deletion (modulation), and hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) are directed toward methods and kits for expansion of a population of cells, administering cells to a subject, and reconstituting bone marrow with the cells.

-Continued on Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2-8 (each in-part), 12 (in-part), 15, 16 (in-part), 19-23, 24 (in-part), 25 (in-part), 26, 27, 29, 30, 31-35 (each in-part), 41 (in-part), 44, 45 (in-part), 51 (in-part), 53, 54-56 (each in-part), 58 (in-part), 60 (in-part), 61-63, 66, 67, 74, 75, and 78-103; a m6A modification reader YTHDF1 (m6A modification pathway molecule), MX1-Cre inactivation or deletion (modulation), and hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/55092

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 9,439,928 B2 (KASAHARA, N et al.) 13 September 2016; abstract; column 2, lines 15-17; column 4, lines 14-32; column 17, lines 19-21; claim 1	74-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/55092

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

The methods and kits will be searched to the extent they encompass a m6A modification reader YTHDF1 (first exemplary m6A modification pathway molecule), MX1-Cre inactivation or deletion (first exemplary modulation method), and hematopoietic stem and progenitor cells (first exemplary cells). Applicant is invited to elect additional modification pathway molecule(s), and/or modulation method(s) (or specific inhibitor(s) used for modulation), and/or cell(s) (cell type(s)) to be searched. Additional modification pathway molecule(s), and/or modulation method(s) (or specific inhibitor(s) used for modulation), and/or cell(s) (cell type(s)) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2-6 (each in-part), 12 (in-part), 15, 16 (in-part), 19-23, 24 (in-part), 25 (in-part), 26, 27, 29, 30, 31-35 (each in-part), 41 (in-part), 44, 45 (in-part), 48-51 (each in-part), 53, 54-56 (each in-part), 58 (in-part), 60 (in-part), 61-63, 66, 67, 74, 75, and 78-103 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass YTHDF1 (m6A modification pathway molecule), MX1-Cre inactivation or deletion (modulation), and hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected modification pathway molecule(s), and/or modulation method(s) (or specific inhibitor(s) used for modulation), and/or cell(s) (cell type(s)). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a METTL3 m6A modification writer (m6A modification pathway molecule).

No technical features are shared between the modification pathway molecules and/or modulation methods or inhibitors and/or cells of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method for expanding, ex vivo, a population of cells, the method comprising modulating a N6-Methyladenosine (m6A) mRNA modification pathway in the population of cells, which is sufficient for subsequent transplantation into a subject in need thereof; an expanded cell population made by the method; a method for ex vivo expansion of cells by at least 2-fold, the expanded cells being competent to reconstitute a cell lineage upon transplantation into a mammal in need thereof, the method comprising introducing a mutation into the cells that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene expressing a m6A mRNA modification reader and culturing the population of cells in a suitable culture medium; a kit for expanding a cell population for subsequent transplantation into a subject in need thereof, the kit comprising a system for introducing a mutation into the cell population that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene expressing a m6A mRNA modification reader, and instructions for use thereof; an inhibitor of a m6A mRNA modification reader; a method for treating a subject in need of a transplant, comprising administering cells to a subject in need thereof, the method comprising: (a) introducing, into a sample containing a cell population, a mutation that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene expressing a m6A mRNA modification reader, or an inhibitor of a m6A mRNA modification reader, (b) culturing the sample in a suitable culture media for a period of time sufficient to expand the number of cells in the sample to a number sufficient to transplant into the subject; and (c), administering the cells to the subject; a method for reconstituting a cell lineage or bone marrow in a subject in need thereof, the method comprising: (a) obtaining from a mammal a tissue sample comprising a cell population; (b) expanding, in vitro, the cell population from the sample, wherein: (i) the cell population expands by at least 2-fold; and (ii) the expanded cell population has at least a 5-fold increase in total colony-forming units; and (c) transplanting the expanded cell population into a subject in need thereof; wherein the cells are stem cells; maintaining a multilineage differentiation potential in the stem cell population; stem cells obtained from a tissue selected from the group consisting of peripheral blood, cord blood and bone marrow; a method for treating cancer and/or a blood disorder in a subject in need thereof, comprising: culturing, in a suitable culture media, a sample containing a CAR T-cell population and administering to the subject a population of the CAR T-cells; these shared technical features are previously disclosed by US 2016/0264934 A1 to The General Hospital Corporation et al. (hereinafter "General") in view of US 2014/0114070 A1 to Boitano et al. (hereinafter "Boitano"), the article "MicroRNA-145 Modulates N6-methyladenosine Levels by Targeting the 3'-Untranslated mRNA Region of the N6-Methyladenosine-binding TYH Domain Family 2 Protein" by Yang et al. (hereinafter "Yang") and WO 2017/075147 A1 to Board of Regents, the University of Texas System (hereinafter "Texas").

General discloses a method for expanding (a method for expanding: paragraphs [0012], [0138]), ex vivo (ex vivo: paragraphs [0012], [0138], [0158]), a population of cells (a population of cells: paragraphs [0012], [0138], [0158]), the method comprising modulating a N6-Methyladenosine (m6A) mRNA modification pathway in the population of cells (the method comprising inhibiting METTL3 (modulating a N6-Methyladenosine (m6A) mRNA modification pathway) in the population of cells: paragraphs [0012], [0138], [0158]), which is sufficient for subsequent transplantation into a subject in need thereof (which is sufficient for subsequent transplantation into a subject in need thereof: paragraphs [0044], [0271]); an expanded cell population made by the method (an expanded cell population made by the method: paragraphs [0012], [0037], [0044]); a method for ex vivo expansion of cells by at least 2-fold (a method for ex vivo expansion of cells by at least 2-fold: paragraphs [0012], [0080], [0138], [0158]), the method comprising introducing a mutation into the cells that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene (the method comprising introducing a mutation into the cells that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene: paragraph [0189]) expressing a m6A mRNA modification enzyme (expressing METTL3 (a m6A mRNA modification enzyme): paragraphs [0012], [0138], [0158]) and culturing the population of cells in a suitable culture medium (culturing the population of cells in a suitable culture medium: paragraph [0014]); a kit (a kit: paragraph [0007]), for expanding a cell population (for expanding a cell population: paragraphs [0007], [0012]) for subsequent transplantation into a subject in need thereof (for subsequent transplantation into a subject in need thereof: paragraphs [0044], [0271]), the kit comprising a system for introducing a mutation into the cell population that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene expressing a m6A mRNA modification enzyme; paragraphs [0007], [0189]), and instructions for use thereof (instructions for use thereof: paragraphs [0007], [0189] [0274]); wherein the cells are stem cells (wherein the cells are stem cells: paragraph [0014]); maintaining a multilineage differentiation potential in the stem cell population (maintaining pluripotency (a multilineage differentiation potential) in the stem cell population: paragraph [0014]); and stem cells obtained from a tissue selected from the group consisting of cord blood and bone marrow (stem cells obtained from a tissue selected from the group consisting of cord blood and bone marrow: paragraph [0306]). General further discloses wherein inhibiting or deleting METTL3 results in a decrease in m6A levels on target genes (wherein inhibiting or deleting METTL3 results in a decrease in m6A levels on target genes: paragraph [0012]).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/55092

---Continued from Previous Supplemental Box---

General does not disclose: the expanded cells being competent to reconstitute a cell lineage upon transplantation into a mammal in need thereof; expressing an m6A mRNA modification reader; an inhibitor of a m6A mRNA modification reader; a method for treating a subject in need of a transplant, comprising administering cells to a subject in need thereof, the method comprising: (a) introducing, into a sample containing a cell population, a mutation that results in deletion, replacement or reduced expression of a gene expressing a m6A mRNA modification reader, or an inhibitor of a m6A mRNA modification reader, (b) culturing the sample in a suitable culture media for a period of time sufficient to expand the number of cells in the sample to a number sufficient to transplant into the subject; and (c), administering the cells to the subject; a method for reconstituting a cell lineage or bone marrow in a subject in need thereof, the method comprising: (a) obtaining from a mammal a tissue sample comprising a cell population; (b) expanding, in vitro, the cell population from the sample, wherein: (i) the cell population expands by at least 2-fold; and (ii) the expanded cell population has at least a 5-fold increase in total colony-forming units; and (c) transplanting the expanded cell population into a subject in need thereof; and a method for treating cancer and/or a blood disorder in a subject in need thereof, comprising: culturing, in a suitable culture media, a sample containing a CAR T-cell population and administering to the subject a population of the CAR T-cells.

Boitano discloses expanded cells being competent to reconstitute a cell lineage upon transplantation into a mammal in need thereof (expanded cells being competent to reconstitute a cell lineage upon transplantation into a mammal in need thereof; abstract); a method for treating a subject in need of a transplant, comprising administering cells to a subject in need thereof (a method for treating a subject in need of a transplant, comprising administering cells to a subject in need thereof; paragraph [0078]); culturing the sample in a suitable culture media for a period of time sufficient to expand the number of cells in the sample to a number sufficient to transplant into the subject (culturing the sample in a suitable culture media for a period of time sufficient to expand the number of cells in the sample to a number sufficient to transplant into the subject; paragraphs [0078], [0092]); and administering the cells to the subject (administering the cells to the subject; paragraph [0078]); a method for reconstituting a cell lineage or bone marrow in a subject in need thereof (a method for reconstituting a cell lineage or bone marrow in a subject in need thereof; abstract, paragraph [0122]), the method comprising: (a) obtaining from a mammal a tissue sample comprising a cell population (the method comprising: (a) obtaining from a mammal a tissue sample comprising a cell population; paragraph [0024]); (b) expanding, in vitro, the cell population from the sample (expanding, in vitro, the cell population from the sample; paragraphs [0024], [0116]), wherein: (i) the cell population expands by at least 2-fold (wherein: (i) the cell population expands by at least 2-fold; paragraph [0116]); and (ii) the expanded cell population has at least a 5-fold increase in total colony-forming units (expanded cell population has at least a 5-fold increase in total colony-forming units; paragraph [0280]); and (c) transplanting the expanded cell population into a subject in need thereof (transplanting the expanded cell population into a subject in need thereof; abstract, paragraphs [0122]).

Yang discloses expressing an m6A mRNA modification reader (expressing YTHDF2 (an m6A modification reader); abstract); and an inhibitor of an m6A mRNA modification reader (miR-145 (an inhibitor of a m6A mRNA modification reader); abstract).

Texas discloses a method for treating cancer and/or a blood disorder in a subject in need thereof (a method for treating cancer and/or a blood disorder in a subject in need thereof; paragraphs [0055], [0059]), comprising: culturing, in a suitable culture media, a sample containing a CAR T-cell population (comprising: culturing, in a suitable culture media, a sample containing a CAR T-cell population; paragraph [0059]) and administering to the subject a population of the CAR T-cells (administering to the subject a population of the CAR T-cells; paragraph [0059]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of General to have expanded cells to an appropriate extent, as disclosed by Boitano, by culturing the cells in a suitable medium, for reconstituting a cell lineage or bone marrow in a subject in need thereof, using cells expanded by modification of the m6A system in the cells, as disclosed by General. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of General to have included the deletion or suppression of additional or alternative m6A enzymes, including an m6A reader, as disclosed by Yang, using an inhibitor, as disclosed by Yang, or deletion of the gene for the enzyme, as disclosed by General, in order to modulate or affect the m6A pathway in the cells accordingly. It also would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of General to have used cells, such as CAR T-cells, as disclosed by Texas, comprising a modified m6A pathway, as disclosed by General, for the treatment of cancer, as disclosed by Texas, in order to provide an appropriate amount of expanded or proliferating CAR-T cells for effective treatment.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the General, Boitano, Yang, and Texas references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 L 27/36 3 0 0	
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/36 4 1 0	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 L 27/36 4 3 0	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	A 6 1 L 27/38 1 0 0	
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	A 6 1 L 27/38 3 0 0	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 K 35/28	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
	C 1 2 N 5/0775	
	C 1 2 N 5/10	
	C 1 2 N 15/113 Z	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

- (74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 リー, ジェンルイ
アメリカ合衆国 カンザス 6 6 1 0 3, カンザス シティ, レインボー ブールバード 3
8 3 8, アpartment 1 4 0 8
- (72)発明者 チアン, ペンシュウ
アメリカ合衆国 ミズーリ 6 4 1 1 0, カンザス シティ, キャンベル ストリート 4 6
0 2, アpartment 1
- (72)発明者 リー, リンヘン
アメリカ合衆国 ミズーリ 6 4 1 1 3, カンザス シティ, ウエスト 6 6 ティーエイチ
テラス 1 0 0 0
- (72)発明者 ヘ, チュアン
アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 3 7, シカゴ, サウス ケンウッド アベニュー 5 5 4
3

F ターム(参考) 4B065 AA90 AB01 BA02 CA44

4C081 AB11 BA12 CD34 EA02 EA13

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 CA04 NA14 ZA51 ZB26 ZB27 ZC41