

(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2008-518603

(P2008-518603A)

(43) 公表日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2007-539283 (P2007-539283)	(71) 出願人	500395761
(86) (22) 出願日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		ウイスコンシン アラムニ リサーチ フ
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月2日 (2007.7.2)		ァンダーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/039401		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
(87) 国際公開番号	W02006/050330		707-7365 マディソン ノース
(87) 国際公開日	平成18年5月11日 (2006.5.11)		ウォルナット ストリート 614 ピー
(31) 優先権主張番号	60/623, 922		オーボックス 7365
(32) 優先日	平成16年11月1日 (2004.11.1)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	60/714, 578	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成17年9月7日 (2005.9.7)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞由来の血小板

(57) 【要約】

ヒト胚性幹細胞は、最初に造血系へ、次に巨核球へ分化誘導され、これらの細胞は、血小板を生成する。巨核球の適切なin vitro培養は、血小板の生成及び流出を生じる。このことは初めて、多くの患者により必要とされるヒト血液因子のin vitro生成を可能にする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト血小板の製造法であって、

- (a) ヒト胚性幹細胞を、該細胞の造血系への分化に有利な条件下で培養する工程；
- (b) 造血系の細胞を巨核球へと培養する工程；
- (c) 巨核球を培養し、血小板を作出する工程；及び
- (d) 巨核球から血小板を回収する工程；

を含む製造法。

【請求項 2】

工程(a)が、胚様体の形成を促進し、その後胚様体から造血細胞を選択的に回収することにより実行される、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

工程(a)が、ヒト胚性幹細胞とストロマ細胞との共培養により実行される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

工程(b)が、工程(a)からの細胞を、トロンボポエチン、インターロイキン3、インターロイキン6、インターロイキン11及び幹細胞因子を含有する培地で培養することにより実行される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

巨核球が、CD41、CD42a、CD42b、CD61、CD38、CD45(弱い)及びCD62Pについては陽性であるが、CD34、CD117、及びHLA-DRについては陰性である、請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

請求項1記載の方法により作出された、ヒト血小板。

【請求項 7】

血小板が、免疫グロブリン分子を含まない、請求項8記載のヒト血小板。

【請求項 8】

in vitro培養物中で生成されたヒト血小板であって、凝固を開始するための生物学的活性があり、かつ、血液抗原、白血球及び血清構成成分を実質的に含まない、血小板。

【請求項 9】

ヒト血小板アリコートであって、機能性ヒト血小板を含有し、該機能性ヒト血小板には免疫グロブリンが付着されない、アリコート。

30

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2004年11月1日に提出された米国特許仮出願第60/623,922号及び2005年9月7日に提出された第60/714,578号の優先権を請求するものである。

【0002】

連邦政府資金による研究又は開発に関する陳述

今後決定。

40

【0003】

発明の背景

幹細胞は、多くの他の分化細胞型への分化が可能である細胞として定義される。胚性幹細胞は、成熟した体の分化細胞型の全てではない大半へ分化することが可能である胚由来の幹細胞である。幹細胞は、多能性と称され、これはこれらの細胞の多くの細胞型へ分化する能力を説明している。学会(research community)にとって関心が高い多能性幹細胞の型は、時にはhES又はヒトES細胞と略されるヒト胚性幹細胞であり、これはヒト胚給源に由来する胚性幹細胞である。ヒト胚性幹細胞は、培養物において無限の増殖が可能であり、加えて他の細胞型へ分化すること、従って少なくとも原理上は、衰えた又は欠損されたヒト組織の代替のための細胞及び組織を供給することが可能であるので、これらの細胞に

50

は、大きい科学及び研究上の関心がある。培養物中のヒト胚性幹細胞の存在は、科学的研究及びヒトの健康を補助するための様々な治療プロトコールにおける使用のために、無限の量の遺伝的に安定したヒトの細胞及び組織の可能性をもたらす。将来は、治療目的で人体へ移植又は輸注することができる分化した細胞又は組織を開発するために、ヒト胚性幹細胞は、増殖され、及び特定の系譜へ分化するように指示されることが思い描かれている。

【 0 0 0 4 】

血小板は、血液凝固のための必須の血液成分である。血小板は、核を有さないが、細胞膜、受容体、酵素、顆粒及び他の細胞突起を宿す(hosting)、細胞レベル以下の血液構成成分であり、その結果血小板は、血中のいくつかの因子に反応し、血塊形成を開始することが可能である。血小板輸注は、患者が、戦場、及び血小板減少症、特に白血病患者を治療するための骨髄アブレーション後のような様々な他の医学的状況において、大量の外傷性失血に冒された場合、化学物質又は高線量の放射線曝露に曝された場合に、適応である。貯蔵時の血小板の短い寿命(米国食品医薬品局(FDA)及び米国血液銀行協会(AABB)の規制により典型的にはわずかに5日間)は、戦場及び民間の医療システムにおいて、血小板不足を繰り返し引き起こしている。

10

【 0 0 0 5 】

医療目的で現在貯蔵されている全ての血液の細胞成分の中で、血小板は最も脆い。現在、血小板の長期貯蔵に関する臨床的に適用可能な方法は存在しない。最新の医療施設について、血小板の保管寿命5日間は、検査及び出荷に時間をかけた後、診療所での保管寿命3~4日と解釈される。多くの血液バンクは常に、血小板を新鮮に維持し貯蔵することのロジスティックな難点を抱えている。戦場の病院に血小板を確実に供給することは、より一層の困難を示している。

20

【 0 0 0 6 】

体内で、血小板は、巨核球として公知の細胞上で形成される突起、又はプロ血小板から生じる。マウス及びヒトの成体の造血幹細胞由来の巨核球の分化が研究されているが、この分化の分子機序は依然不明である。成体の造血幹細胞及び巨核球の両方の長期培養は困難であり、このことは、これらの細胞の精製及び遺伝子操作をほぼ不可能にしている。未変性のヒト巨核球cDNAライブラリーは存在せず、正常な巨核球の遺伝子プロファイルは入手できない。マウスの胚性幹細胞の*in vitro*分化は、血小板を生じることが明らかにされているが、そのような血小板の生物学的機能は依然証明されていない。ヒトとマウスの血小板は、著しく異なる。マウスの血小板は、ヒト血小板と比べ、より小さく、より顕著に不均質な顆粒を示す。ヒト及びマウスの巨核球からの血小板の放出機序は、著しく異なるように見える。

30

【 0 0 0 7 】

血小板形成のプロセス及び巨核球からの血小板の出芽(budding)の理解には、依然明確さが著しく不足している。血漿及び内皮結合した膜因子を含む因子の組合せ、巨核球細胞骨格又はオルガネラの再構成、並びに血流からの剪断力を組合せ、巨核球上で形成されたプロ血小板構造からの成熟血小板の最終的分離を引き起こすという主張が受け入れられている。しかしこの主張は、大部分は証明されておらず、並びに巨核球からの血小板の分離は、依然まだ明らかにされていない研究分野である。

40

【 0 0 0 8 】

発明の簡単な概要

本発明は、ヒト血小板の生成法としてまとめられており、これは、ヒト胚性幹細胞の造血系(hematopoietic lineage)への分化に有利な(favor)条件下での、これらの細胞を培養する工程；造血系の細胞を巨核球へ培養する工程；巨核球を培養し、血小板を生成する工程；並びに、血小板を回収する工程を含む。

【 0 0 0 9 】

本発明は、要求量及び治療的に意味のある量の*in vitro*において生成されたヒト血小板の量によってもまとめられている。

50

In vitroにおいて生成された血小板は、ヒト血流において遭遇する因子と結合しないことは、本発明の特徴である。

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の明細書から明らかになるであろう。

【0010】

発明の詳細な説明

本願明細書において企図されるものは、ヒト胚性幹細胞から始まるin vitro培養及び分化のプロセスによる血小板生成である。ヒト胚性幹細胞(hES細胞)は、in vitro培養物中に巨核球を生成するように誘導され、これらの巨核球は、生物学的に機能するヒト血小板を生成するように培養される。このプロセスは、3種の主要工程プロセスにより実行されることができ、第一の主要工程は、ヒトES細胞の造血細胞への有向の分化であり、この分化プロセスは順にいくつかの方法で行うことができる。hES細胞の造血系への分化のふたつの方法は、本願明細書において詳細に説明されている。造血分化プロセスに関するひとつの技術において、既知の技術を用い、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)は培養され、胚様体(EB)を形成する。胚様体は培養され、様々な分化細胞型の分化が始まり、その後胚様体は、巨核球前駆体の培地選択中において、細胞浮遊液へ脱凝集される。本発明者らは、経時的cDNAマイクロアレイ分析の助けにより、最高の造血能を有する最終的な造血細胞を収集するのに最も適切な時間を確定した。既に造血細胞の作出に関して十分明らかにされている別の技術は、ヒトES細胞のストロマ細胞(stromal cell)への曝露を必要とし、この曝露は、ES細胞の造血系の細胞への優先的な分化を引き起こす。これらのいずれかのプロセスの結果は、ある程度の純度で、主にES細胞由来の造血細胞である、細胞培養物である。本発明者らは、単に異なる種のフィーダー細胞の夾雑がないという理由だけでなく、限定された血清非含有培地で行うことができるという理由でも、胚様体法を特に好んでいる。このプロセスの第二の主要部分は、これらの造血細胞は次に、特に巨核球の形成を促進(encourage)しかつこれらの細胞の成熟を促進する増殖因子を含有する選択的巨核球形成培地に曝される。最後にこれらの成熟巨核球は、血小板形成培地に曝され、in vitroにおける血小板生成を促進する。これらの全てのプロセスにおいて、動物又はヒトの血清及び血漿は、回避することができる。

【0011】

血小板は、染色体性遺伝物質を有さないもので、血小板は、hES細胞由来のヒトで使用するための生物学的生成物の生成に関する目標の例である。血小板は、親巨核球の細胞質断片であると考えることができる。重要なことに、血小板は、接着、凝集及び顆粒分泌を実行することができる全ての細胞表面因子を示す。血小板成熟のプロセス及び巨核球からの血小板流出のプロセスは両方共余り理解されていないプロセスであるので、ヒトES細胞由来のin vitro細胞培養から生物学的に機能する血小板が、回収されるかどうかは不明であった。本願明細書で、血小板を、そのような細胞培養物から有用な量で回収することができることが明らかにされている。

【0012】

重要なことにここで、血小板は、in vitro細胞培養においてヒト巨核球から形成されかつ流出されることが可能であることも明らかである。このプロセスの詳細な生物学の知識を取り巻く不確実性のために、これは培養物中で生じるか又は生じ得るかどうかは、これまでは不明であった。ここでこれらの結果は、これが生じることができかつ生じていることを明らかにしている。

【0013】

本プロセスは、定義により培養物中の未分化細胞であるhES細胞で始まる。hES細胞は、造血系細胞が支配的である細胞培養物へ分化を誘導することができることは、これまでに明らかにされている。この有向の分化を実行するためのふたつの異なる技術が、これまで文献において公知であり、更に別の技術が作用するであろうと考えられる。ひとつの公知の技術は、3次元構造を獲得するhES細胞の凝集体であり、その構造は拘束された(committed)子孫系譜への幹細胞の分化を促進するように見える、胚様体の開発を必要としている。このような胚様体から、様々な系譜の分化された細胞を生成し、次に選択プロトコール

を使用し、造血系の細胞などの求められる系譜の細胞を単離することができる。本発明者らが行った詳細な経時的造血分析は、これらの造血前駆体の遺伝的プロファイルの本発明者らに提供し、同時に本発明者らは、自分たちのプロトコルを最高収量を得るように最適化した。他の文書化された技術は、hES細胞の、ヒト又は非-ヒトストロマ細胞との共培養に関連している。このようなストロマ細胞との共培養も、優先的に造血細胞を生成するためにhES細胞を誘導するように見えるが、現在の技術は、回避することが求められるいくつかの培養技術を基にしている。

【0014】

EB法の中間工程は、様々な造血系の細胞の収量を増加することがわかっているが、これはEBを断片化する。EBの特徴のひとつは、EBは、拡散により中心の細胞へ酸素及び栄養素を提供する培地の能力を超えるほど多く増殖することができることである。この結果は、EBの中心の壊死領域であり、これは失速(stall)に至るEBの増殖も引き起こす。現在、EBの断片化、すなわちEBの小片への物理的細断により、EBの増殖を再スタートすることができ、これはより分化した細胞を生じることがわかっている。本発明者らの取り組みで、この技術の使用は、プロセス全体から回収された血液細胞数の劇的増加を生じている。様々な機械的装置を使用し、このEBの断片化又は細断プロセスを行うことができる。

10

【0015】

一旦造血系細胞が生成されると、次にこれらの細胞は、巨核球を優先的に生成するように培養される。このプロセスは絶対的なものではないが、巨核球に優先的な培養条件は、培養物中の他の血液生成物の前駆細胞と比べ、巨核球の割合を増大する。未成熟及び成熟の巨核球の生成に有利な条件は、前駆細胞培養物の、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン3(IL3)、インターロイキン6(IL6)及び幹細胞因子との培養を含む。未成熟巨核球は、bFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)が存在する場合には、更に拡張される。この方法で得られる巨核球は、CD41、CD42a、CD42b、CD61、CD62P、CD38、CD45(弱い)について陽性であるが、HLA-DR、CD34、CD117について陰性である。この免疫表現型プロファイルは、正常な成熟巨核球と一致している。著しいCD45+集団は存在せず、このことは白血球夾雑が、例えば仮に存在するとしても、非常に小さいことを示唆している。

20

【0016】

巨核球による血小板の形成及び放出は次に、培養物中で生じさせることができる。血小板のin vivoにおける放出に貢献する正確な機序は完全には特徴付けられていないが、細胞培養物中の血小板を、それらの親巨核球から放出させることができる。本発明者らは、4種の因子が恐らく重要であると考えている。これらの4種の因子は、剪断力、巨核球-内皮細胞相互作用、血漿因子、及び最後に巨核球における分子機序である。血液の剪断力は、振盪、回転又は同様のプロセスによるような、培養容器の物理的操作によりシミュレーションすることができる。血漿タンパク質及び血小板受容体により作動される放出の役割は、巨核球それら自身により作動することができるか、又はこれらの因子は、必要に応じて個別に添加することができる。巨大な血小板は、ベルナルド-スーリエ病及びフォン・ヴィレブランド因子(VWF)病のような、ある種の先天的血小板異常において説明されている。本発明者らは、本発明者らの胚様体由来の血小板の一部において、同様の巨大な血小板をいくつか認めている。この現象が認められる場合、VWFのような血漿因子の欠乏により引き起こされたプロ血小板由来の血小板の不十分なピンチング(pinching)のために、この問題点は、VWF単独、又は血漿中に含まれたVWFの添加により対処することができる。cGMPは、新生物形成性の巨核球からの血小板形成を促進することができることが仮定されている。cGMPは、一酸化窒素により活性化することができる。本発明者らは、一酸化窒素を放出する化合物であるGNSOの添加は、巨核球を小さい血小板-様粒子へ2時間以内に迅速に断片化することができることを認めた。最後に、このプロセスの副産物は、比較的純粋な内皮細胞である。本発明者らは、内皮細胞も、血小板流出を補助することができるかどうかを決定するために試験を行う。これらの全ての技術により、本発明者らは、血小板形成の効率及び規則性を著しく増大することができる。血小板の生物学的機序を理解するために、本発明者らは、血漿の存在及び非存在下での血小板放出を記録するために、3D実時間

30

40

50

蛍光顕微鏡を設定した。本発明者らは、プロ血小板の3D画像を記録することもでき、並びに本発明者らは現在、このプロセスをより良くモニタリングするために微速度撮影(time-lapse)の過程にある。

【0017】

次に血小板は、収集され及びパッケージされる。12日目の巨核球分化の最終段階で、非-粘着性巨核球は、3 μ M細孔サイズのフィルターにより、マルチ-ウェルプレートの上側ウェルへ移される。インキュベーションは、恒温槽において穏やかに振盪しながら及びGNSOと共に実行される。ヒト血漿、又は生理的濃度のVWF及びフィブリノーゲンの存在が必要であるならば、血小板は、下側チャンパーに収集される。このin vitroシステムから単離された血小板は、逐次遠心及びクエン酸緩衝液中の再浮遊により、ドナー血小板として精製される。収集された血小板は更に低速で(3000gで30分間)遠心され、他のデブリを分離し、その後適当なサイズのフィルターを通り濾過され、有核細胞の調製物を取り除く。こうして生成された血小板含有生成物は、望ましい濃度に濃縮された血小板を特徴とすることができる。このin vitro生成された血小板は更に、特定の臨床上の必要性に適合するために、血清又は血漿非含有生成物として精製することができる。全ての容器は、滅菌することができ、通常の給源からのドナー血小板では共通の問題点である細菌の夾雑を低下するために、滅菌されなければならない。

10

【0018】

こうしてin vitro細胞培養物から生成された血小板は、科学又は医学にこれまで利用可能であった血小板とは、これらの血小板は血流に曝されていない点異なる。生物においてin vivoにおいて生成された血小板は、血漿から完全に分離することはできない。結果として、現在の医療用途においてパッケージされた血小板は、一部の患者において輸血反応を引き起こし得る少量の白血球及び血漿夾雑物も保持する。本in vitroシステムからヒトES細胞の分化により生成された血小板は、白血球を含まず、及び血清又は血漿へ未だ曝されたことがない。このin vitroシステムにより生成された血小板は、フィブリノーゲン及びVWFの因子が増殖又は分離のプロセスにおいて添加された場合に、フィブリノーゲン及びVWFのみを保持する。

20

【0019】

関連のある問題点は、一部の免疫グロブリンは血小板へ自発的に接着することである。従ってヒトドナーから単離された血小板は、必然的にドナー由来の免疫グロブリン分子を保持し、これは有害反応への別の原因となる可能性がある。ES細胞からin vitroにおいて生成された血小板は、IgGに曝されておらず、従ってそれらを含まないであろう。「ABO」血液型抗原も、血小板上に出現するが、これらは弱い。血小板輸血からの時折のABO-型反応が、血小板又は血清の夾雑に由来するかどうかは、不明である。Rh因子は、血小板には存在しない。従ってこの方法で生成された血小板は、医学的及び科学的により許容できるものであり、更には従来の分離技術により生成された血小板とは容易に識別可能である。

30

【0020】

実施例

胚様体由来の造血前駆体

胚様体(EB)形成は、マウス及びヒトの両方のES細胞の造血系分化を研究するために使用される方法である。しかしマウスES細胞とは異なり、単独細胞の浮遊液中においてヒトES細胞で、胚様体を効率的に形成することは失敗している。代わりに、ヒトES細胞からの胚様体を形成するために、マウス胚性線維芽細胞(MEF)上で培養されたヒトES細胞の無傷のコロニーを、0.5mg/mlジスパーゼにより5分間消化し、小型の細胞クラスターを形成した。次にこれらの細胞クラスターは、血清-含有幹細胞培養培地(20%FCS)において更に凝集させた。容易に識別可能な細胞塊である胚様体は、細胞塊への参加に失敗しアポトーシスを受けた単独細胞の50%により培養の6日後形成され始めた。培養の12日後の胚様体は、卵黄嚢の初期胚構造に類似していた。胚様体の切片を採取し、その後この切片をCD34抗体で引き続き免疫-標識すると、卵黄嚢の組織学的特徴が明らかになった。細胞がCD34陽性であることにより明らかになるように、非-接着性造血前駆細胞は、小血管(small vessel

40

50

)の管腔及び内皮層に存在することが認められた。その後胚様体を、37 °Cでのトリプシン消化(0.05%トリプシン/0.53mM EDTA)により処理した。約 10^5 個の胚様体-由来の細胞を含む初代造血前駆細胞を、メチルセルロース培養物(Stem Cells Inc. カナダ)中に播種し、10~12日間培養した。赤血球及び巨核球コロニー形成単位(CFU)がその後、それらの本来の赤色又はモノクローナル抗-CD41もしくはCD61抗体による免疫標識により検出された。マクロファージ及び顆粒球コロニーを生じることができる最終的な造血前駆細胞は、12日目に形成された。この活性は、第一次(primary)及び最終的な造血の最初の波を示している。本発明者らは現在、動物及びヒトの両血清を含まない血清非含有胚様体培養システムを確立している。

【0021】

胚様体-由来の巨核球前駆体のin vitro拡大

胚様体形成及び培養の12日後、単独細胞の浮遊培養物を、得られた細胞培養物の37 °Cでの30分間のコラーゲナーゼ(1mg/ml)及び5分間のトリプシン消化(0.05%トリプシン/0.53mM EDTA)により作出した。CD34+細胞は造血と干渉し得るので、CD34+を他のEB細胞から分離した。CD34+細胞を、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン3(IL3)、インターロイキン6(IL6)、及び幹細胞因子(SCF)の存在下、ポリ-HEME表面上で培養し、これらの全ての因子は、巨核球の分化及び増殖を特異的に促進するように選択した。 10^6 個の出発ES細胞につき 10^6 個のCD41+巨核球の収量が得られた($n=6$)。興味深いことに、コラーゲン-ベースの半固形マトリックスに播種した場合は、これらの巨核球は、ビーズ-様構造を示すプロ血小板を伴う極めて長い突起を形成した。成人造血幹細胞又はマウスES細胞を使用し巨核球の生成を試みる場合には、このような長い構造はこれまで報告されていない。小さいCD41陽性細胞断片は、放出された血小板として同定されたが、これらは、巨核球近傍に存在することが検出された。本発明者らは、フローサイトメトリーにより、これらの巨核球は、CD41、CD42a、CD42b、CD61、CD38、CD45(弱い)及びCD62Pについて陽性であるが、CD34、CD117、及びHLA-DRについて陰性であることを発見した。この表現型プロファイルは、正常なヒト成熟巨核球と一致する。

【0022】

ストロマ層上のヒトES細胞からの巨核球の分化

OP9ストロマ細胞株は、マウス造血を支援するために使用されている、新生仔頭蓋冠op/op欠損マウスから確立された細胞株である。このop/opマウスは、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)遺伝子のコード領域に変異を有する。OP9システムを使用するヒトES細胞の造血系への分化の結果は、胚様体形成によるヒトES細胞の分化法に類似しているが、このストロマ細胞法は通常より多くの成熟前駆細胞のより高収量をもたらす。簡単に述べると、ヒトES細胞を、集密なOP9ストロマ細胞上に播種し、その後20%ウシ胎仔血清(FBS)を補充した -MEM培地で培養した。分化は、6-ウェルプレート上 10^5 個ES細胞/ウェル、又は 10cm^2 培養皿中 8×10^5 個細胞で開始した。6日間培養後、細胞上のCD34+細胞表面マーカーの出現により示されたように、ES細胞は造血前駆体に分化した。巨核球への分化のために、これらの細胞を6日目にトリプシン(0.05%トリプシン/0.53mM EDTA、37 °C/5%CO₂)で5分間処理し、並びに10ng/ml TPOを含有する同じ培養培地において、新鮮な集密なOP9細胞上で継代した。更に8日間培養した後、巨核球は、目視検査により認められるようになり始めた。CD41免疫-染色により確認されるように、培養物の上清中の細胞の約30%は巨核球であった。これらの巨核球は多核であるが、胚様体-由来の巨核球において認められたような著しく長い突起を有さなかった。これらの巨核球は、成体巨核球に極めて類似している最終的な巨核球であると考えられた。興味深いことに、培養時に、血小板形成の徴候は存在せず、このことはマウスシステムとは極めて異なった。恐らく、OP9細胞は、巨核球の分化及び増殖を促進及び支援することはできるが、血小板形成を支援することはできないであろう。このことは、例え巨核球の分化及び増殖の機序の一部が類似していたとしても、マウス及びヒトの血小板形成の機序が異なることの、別の証拠である。

【0023】

巨核球の増殖、成熟及び精製

10

20

30

40

50

前述の方法のいずれかに由来した巨核球前駆体は、成体レシピエントマウスにおける増殖の、更には生着(engraft)の能力を明らかにしている。このプロセスの次工程として、本発明者らは、未熟な巨核球を更に増殖し、同時に巨核球成熟を停止するために、bFGFを使用した。各巨核球は2000個の血小板を形成できると概算すると、 10^6 個ヒトES細胞(1個の6-ウェルプレート)は、 10^6 個の巨核球を生成し、引き続き約 2×10^9 個の血小板を生成し、これは血小板の約1/20単位を示している($> 5.5 \times 10^{10}$ 個血小板/単位)。従ってこの概算された効率で、ヒト血小板1単位を生成するためには、ヒトES細胞の20 T75フラスコ(flasks)が必要であろう。これは、この収量で経済的に魅力的であることもあるが、すでに明らかに独りの技術者が支援することができる範囲である。

【0024】

分化を方向付ける代替技術

胚様体システムは、これらの細胞の大半は卵黄嚢細胞であるという事実のために、造血幹細胞を作製する望ましい効率よりも低い効率を有する。しかし胚様体システムはマウスタンパク質の夾雑を有さないため、このシステムは、OP9共培養システムよりも優れている。本発明者らのデータから、本発明者らは、造血系分化は、ストロマ細胞との共培養システムとは対称的に、EBシステムにおいてより最良に実現されると考えている。より最終的な造血細胞を入手しより効率的プロセスを作製するために、本発明者らは、EB培養を延長することを計画している。本発明者らは、微小環境が血島分化を支援し続けることを期待して、EBをより小さい断片へ機械的に解離又は断片化し、培養を継続することを試みた。本発明者らの予備的知見は、解離されたEBは、生存することができ、この解離後に成長し続けることを示唆している。このことは、EBシステムにおける更なる分化を推進する最初の試みであろう。例え最終的な血島が形成されなかったとしても、血島数の著しい増加が実現され得る。EB培養物へのVEGF及びSCFのような増殖因子の添加も試験されるであろう。

【0025】

改善された血小板放出及び成熟

本発明者らは、コラーゲンマトリックス、OP9及びポリHEMEを含む複数のシステムにおける血小板形成を既に認めているが、本発明者らは、そのプロセスを最適化することができるように、血小板放出の機序をより良く理解することを欲している。血小板形成を実現するために、本発明者らは、TPO、ヒト血漿、ヒト低温沈殿物及び一酸化窒素の存在下で、 $10^3 \sim 10^4$ 個の成熟巨核球を培養する。これらの血小板は、抗-CD41抗体で標識し、フローサイトメトリーで計数する。これらの血小板の形状は、電子顕微鏡を含む顕微鏡で観察する。真の血小板は、突起又は他の血小板との付着(attachment)を伴わない円盤状であるはずである。比較的大きいか又は連結した血小板は、プロ血小板形成のみを支援する、最適でない条件を示唆している。フィブリノーゲン及びフィブロネクチンのような細胞外マトリックスは、巨核球分化及び成熟を促進することが示されている。本発明者らは、巨核球の増殖及び分化に対するそれらの作用を決定するために、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンでコートされたプレートを使用し、巨核球を培養する。

【0026】

血小板の試験

血小板は、トロンビン、ADP、及びコラーゲンに反応して凝集する。In vitro生成された血小板の異なる刺激に反応する凝集能を、血小板凝集計(Chrono-log Corporation, www.chronolog.com)により測定する。血小板は、上清から収集し、計測する。 10^6 個/mlの血小板を、PBSで洗浄し、ヒト血漿中に再浮遊する。様々な濃度のトロンビン、ADP及びコラーゲンを添加し、凝集速度論を、未変性のヒト血小板と比較する。本発明者らは、生成された「血小板」を試験し、成熟巨核球は、顆粒放出の間接的マーカーであるCD62Pの表面発現により、0.5U/mlトロンビンにより活性化することができる。本発明者らは、以下の方法による血小板機能の試験の過程にある：

【0027】

高密度コア顆粒放出：最初に 10^6 個の培養されたヒト血小板のアリコートをし、緩衝液A(1

10

20

30

40

50

20mmol/L グルタミン酸ナトリウム、5mmol/L グルタミン酸カリウム、20mmol/L HEPES/NaOH (pH7.4)、2.5mmol/L EDTA、2.5mmol/L EGTA、3.15mmol/L MgCl_2 、及び1mmol/L DTT)中の $[\text{}^3\text{H}]\text{5-HT}$ (セロトニン)で標識する。血小板を、緩衝液Aで洗浄し、その後トロンビン1単位で活性化する。これらの反応は、この試料を氷上に4分間放置し、その後13,000gで1分間遠心することにより停止される。上清を収集し、以下のようにアッセイする。 $[\text{}^3\text{H}]\text{5-HT}$ 放出は、シンチレーションカウンターにより測定する。高密度コア顆粒放出の速度論も、凝集及び高密度コア顆粒からのATP分泌を同時に測定する光-血小板凝集計(Chronolog Corporation)により評価することができる。

【0028】

顆粒分泌：このアッセイは、フィコエリスリンと複合した抗-CD62抗体-AC 1.2(Becton Dickinson)を使用するフローサイトメトリーにより、P-セレクチン発現を測定することにより、モニタリングされる。典型的には、固定された血小板($10^9/\text{ml}$)の2.5 μl を、抗体溶液97.5 μl に添加する。15分後、これらの試料を、0.35%BSAを含有するタイロード緩衝液1mlで希釈し、分析する。P-セレクチン発現の増加の割合を計算し、ヒトの未変性の血小板と比較する。

【0029】

リゾチーム(Lysozyme)放出：ヘキソサミニダーゼは、Holmsen及びDangelmaierにより説明されたように測定する。クエン酸-リン酸緩衝液(pH4.5)5ml及び10mmol/L基質(P-ニトロフェニル-N-アセチル-D-グルコサミニド)2.5mlを混合し、96-ウェルプレートヘアリコートとし(100 μL)、反応上清5 μL を添加した。37℃で18時間インキュベーションした後、0.08N NaOHの60 μL を添加し、この反応を停止する。吸光度を、ELISAプレートリーダーにおいて、405-nmフィルターで測定する。

【0030】

これらの試験を使用し、ヒト胚性幹細胞から生成された血小板の生物学的活性を確立する。このin vitro血小板生成システムから生成された血小板は、人体の正常な血小板と機能的に類似している。しかしin vitro作出及び成熟により生成される場合、この方法で生成された血小板は、少なくとも生成の間、ヒト血液へ決して曝されないという事実のために、この生成された血小板は、血液由来のヒト血小板から容易に識別可能であろう。従ってこれらの血小板は、フィブリノーゲン、第V凝固因子及びVWFなどの通常の血清因子、in vivoにおける血流への放出後血小板が通常血液から獲得する因子へそれらを接着しない。このことは、血小板分離を補助するためにVWFが添加される場合のように、これらの因子は著しい量では培養物へ添加されないと仮定している。加えて当然血小板は、患者への送達後、直ちにこれらの因子をレシピエントの血流から獲得するであろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、ヒト胚性幹(hES)細胞からの血小板生成の流れ図を示す。

【図2】図2(A)は、巨核球コロニー形成の経時的分析を示し；及び、(B)は、増殖因子の巨核球生成に及ぼす作用を示す。

【図3】図3(A-B)は、異なる倍率のプロ血小板の画像である。

【図 1】

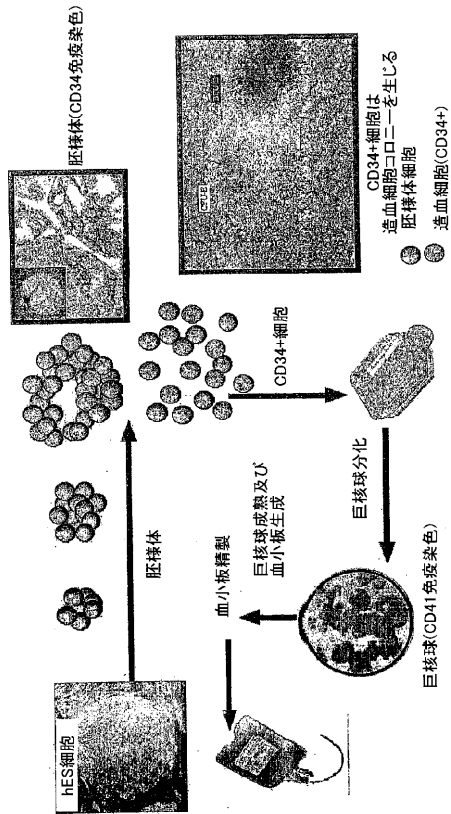


FIG 1

【図 2】

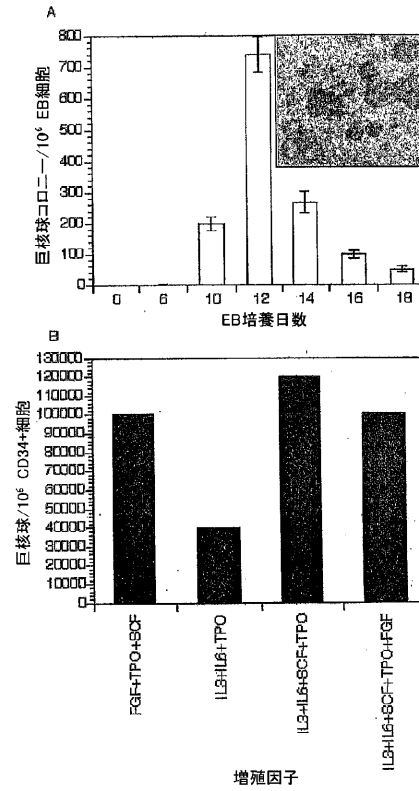


FIG 2

【図 3】

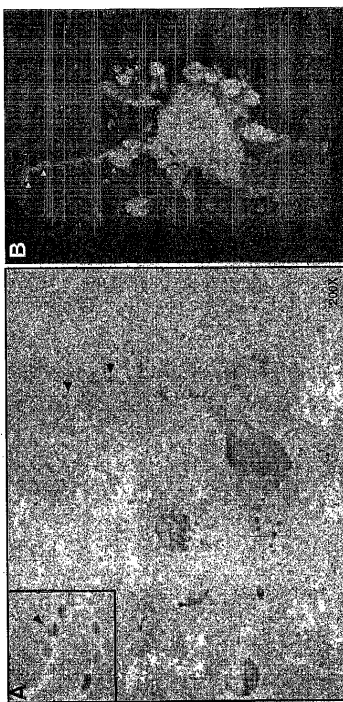


FIG 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2005/039401									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/06											
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) C12N											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PAJ, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 01/34776 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; KAUFMAN, DAN, S; THOMSON, JAMES,) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 98/07841 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS;) 26 February 1998 (1998-02-26) page 20, line 24 - page 22, line 9; claims 25,28 ----- -/-</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 01/34776 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; KAUFMAN, DAN, S; THOMSON, JAMES,) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document	1-9	Y	WO 98/07841 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS;) 26 February 1998 (1998-02-26) page 20, line 24 - page 22, line 9; claims 25,28 ----- -/-	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	WO 01/34776 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; KAUFMAN, DAN, S; THOMSON, JAMES,) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document	1-9									
Y	WO 98/07841 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS;) 26 February 1998 (1998-02-26) page 20, line 24 - page 22, line 9; claims 25,28 ----- -/-	1-9									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 19 April 2006		Date of mailing of the international search report 04/05/2006									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ntchogiannopoulou, A									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/039401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>RATHJEN P D ET AL: "PROPERTIES AND USES OF EMBRYONIC STEM CELLS: PROSPECTS FOR APPLICATION TO HUMAN BIOLOGY AND GENE THERAPY" REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT, CSIRO, EAST MELBOURNE, AU, vol. 10, no. 1, 1998, pages 31-47, XP000916997 ISSN: 1031-3613 table 1</p>	1-9
Y	<p>FUJIMOTO TETSURO-TAKAHIRO ET AL: "Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro." BLOOD, vol. 102, no. 12, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 4044-4051, XP002377397 ISSN: 0006-4971 page 4045, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2</p>	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/US2005/039401

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0134776	A	17-05-2001	AU 6940400 A	06-06-2001
			BR 0015374 A	24-12-2002
			CA 2390281 A1	17-05-2001
			CN 1387565 A	25-12-2002
			EP 1228194 A1	07-08-2002
			JP 2003513664 T	15-04-2003
			NO 20022180 A	03-06-2002
			SE 526490 C2	27-09-2005
			SE 0201328 A	05-07-2002
			US 6280718 B1	28-08-2001
			US 2002015694 A1	07-02-2002
WO 9807841	A	26-02-1998	AU 740709 B2	15-11-2001
			AU 4044397 A	06-03-1998
			BR 9711204 A	17-08-1999
			CA 2262817 A1	26-02-1998
			CN 1230989 A	06-10-1999
			EP 0934403 A1	11-08-1999
			JP 2001500725 T	23-01-2001
			NZ 334016 A	25-08-2000

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 トムソン ジェイムズ エイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 5 マディソン リージェント ストリート 1 8
0 7

(72)発明者 チェン ドン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 5 マディソン ブルー リッジ パークウェイ
6 0 5

F ターム(参考) 4B065 AA94X BB19 BB40 CA44