

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5479661号
(P5479661)

(45) 発行日 平成26年4月23日(2014.4.23)

(24) 登録日 平成26年2月21日(2014.2.21)

(51) Int.Cl.

F I

AO 1 K 67/027 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 5/071 (2010.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

AO 1 K 67/027
 C 1 2 N 5/00 1 O 2
 C 1 2 N 5/00 2 O 2 A
 C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2003-515654 (P2003-515654)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月23日(2002.7.23)
 (65) 公表番号 特表2004-535820 (P2004-535820A)
 (43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2002/000978
 (87) 国際公開番号 W02003/010303
 (87) 国際公開日 平成15年2月6日(2003.2.6)
 審査請求日 平成17年6月21日(2005.6.21)
 審判番号 不服2011-3389 (P2011-3389/J1)
 審判請求日 平成23年2月15日(2011.2.15)
 (31) 優先権主張番号 PR 6560
 (32) 優先日 平成13年7月24日(2001.7.24)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)
 (31) 優先権主張番号 PS 1180
 (32) 優先日 平成14年3月18日(2002.3.18)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

(73) 特許権者 511037034
 イーエス・セル・インターナショナル・ビ
 ーティーイー・リミテッド
 シンガポール国 1 3 8 6 7 2 シンガポ
 ール、ナンバー 0 1 - 0 3 ゲノム、バ
 イオポリス ストリート 6 0
 (73) 特許権者 504031539
 ネザーランズ・インスティテュート・フォ
 ール・オントヴィックリングスビオロヒー
 オランダ国, エヌエル-3 5 8 4 セーテ
 ー ユトレヒト, ユブサララーン 8
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞の分化を誘導する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未分化の h E S 細胞を心筋細胞へと分化させる方法であって、

h E S 細胞の未成熟心筋細胞への分化を誘導するために、マウス胚に由来する内胚葉細胞又は内胚葉様 E N D - 2 細胞の存在下に、h E S 細胞を培養することを含む方法。

【請求項 2】

未成熟心筋細胞を含む細胞集団を得る方法であって、前記未成熟心筋細胞は細胞集団における未分化の h E S 細胞に由来するものであり、前記方法は、請求項 1 の未分化 h E S 細胞の分化を誘導することを含む、方法。

【請求項 3】

前記内胚葉細胞が、マウス原腸形成胚に由来する請求項 1 の方法。

【請求項 4】

前記内胚葉細胞が、マウス 7 . 5 日胚に由来する請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 5】

マウス胚に由来する内胚葉細胞又は内胚葉様 E N D - 2 細胞を実質的に集密な単層にまで予備培養することと、

前記マウス胚に由来する内胚葉細胞の単層又は前記内胚葉様 E N D - 2 細胞の単層の存在下で、h E S 細胞を共培養することと
 をさらに含む請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 6】

細胞集団が未成熟筋細胞からなる請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、幹細胞の分化を誘導する方法に関する。特に、本発明は、胚性幹細胞の筋細胞または血管内皮細胞への分化を誘導する方法に関する。本発明は、また、本発明の方法で用いられる細胞、細胞株、試験モデルおよび培養システム、およびそこから生成された分化した細胞にも関する。本発明は、また、治療の目的で、本発明の分化細胞を用いる方法も提供する。

10

【背景技術】

【0002】

幹細胞は、一連の成熟機能細胞を発生させることができる未分化細胞である。胚幹（ES）細胞は、胚に由来し、多能性である、すなわち、任意の器官、細胞型または組織型に発生する能力を有する。幹細胞における分化のプロセスは、未成熟細胞の、運命決定され、十分に成熟した種々の系列の細胞への選択的発生を含む。そのような系列の派生物は、筋細胞、神経細胞、骨格細胞、血液（造血）細胞、内皮細胞および外皮細胞を含む。幹細胞の分化は、種々の成長因子および調節分子により誘発されることが知られている。

【0003】

分化している間、幹細胞特異的遺伝子およびマーカーの発現が失われ、細胞は、体細胞またはそれらの前駆体の遺伝子発現プロファイルを獲得する。場合によっては、分化と自己再生との相関を制御する「マスター」遺伝子が記載される。

20

【0004】

一部の系列特異的幹細胞の分化をある程度の確実性で誘導することができるが、多能性幹細胞の集合の分化の結果はあまり予想できない。特異的細胞型を誘導する条件下に細胞を置くことが、分化の結果を調節する試みの一つであった。これらの条件は、細胞を高密度または低密度に増殖させる、培地を変える、サイトカイン、ホルモンおよび成長因子を導入または除去する、および、適当な基質を提供することのような特定の細胞型への分化に適した環境を作ることを含む。

【0005】

30

通常、幹細胞培地の分化を誘導する場合、分化した集合を、遺伝子の発現、マーカーまたは表現型により特別の細胞型について分析する。いずれの場合にも、それぞれの細胞型を選択的に培養して、それらの集合の割合を高め、その結果、単一の細胞型および培養物を得ることができる。

【0006】

特定の分化した細胞型の誘導は、移植またはインビトロでの薬剤スクリーニングおよび薬剤発見に有用となり得る。幹細胞およびそれから生成された筋細胞中で分化を誘導する方法を用いて、組織発生の細胞的および分子的生物学を研究し、組織発生および再生において役割を果たす分化因子のような遺伝子およびタンパク質を発見することができる。

【0007】

40

特に、幹細胞の筋細胞への分化の誘導は、筋肉の移植および治療の目的に有用であり、培養中での潜在的ヒト疾患モデルを提供する（例えば、薬剤試験）のに有用である。幹細胞において心筋細胞分化を誘導することは、心臓疾患および異常心臓症状のための治療法および治療製品を開発するのに特に有用である。しかしながら、発生中に胚性幹細胞から筋細胞のような特定の細胞型を特定化し最終的に分化させる分子経路は、完全には明らかでない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、筋細胞または内皮細胞のような特定の細胞型への幹細胞の分化を誘導する効果

50

的方法を提供する必要性が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一つの態様において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、幹細胞の分化を誘導する条件下、胚細胞および／または胚細胞の細胞外培地の存在下に、幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0010】

好ましくは、幹細胞は、胚性ヒト幹細胞である。より好ましくは、幹細胞が、筋細胞、血管内皮細胞または造血細胞に分化するよう誘導される。前述したような本発明の方法において、胚細胞は、好ましくは、胚性内胚葉または外胚葉に由来する。より好ましくは、胚細胞は、胚体外組織に由来する。

10

【0011】

本発明の方法において、幹細胞は、好ましくは、胚性内胚葉細胞および／または胚性内胚葉細胞の細胞外調整培地の存在下に増殖させて、幹細胞の、心筋細胞または造血細胞への分化を誘導する。より好ましくは、幹細胞は、胚細胞の存在下に共培養される。本発明の方法において、幹細胞は、好ましくは、胚細胞の集密性単層上に培養され、培地中で増殖され、幹細胞の分化を誘導する。

【0012】

また、幹細胞が、胚性外胚葉細胞および／または胚性外胚葉細胞の細胞外培地の存在下に増殖され、幹細胞の骨格筋細胞への分化を誘導する。

20

【0013】

さらにもう一つの好ましい実施形態において、幹細胞が、胚性外胚葉および／または内胚葉細胞、および／または、胚性外胚葉および／または内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に増殖され、幹細胞の血管内皮細胞への分化を誘導する。

【0014】

本発明の好ましい態様において、幹細胞の筋細胞分化を誘導する方法であって、幹細胞の筋細胞への分化を誘導する条件下、胚細胞および／または胚細胞の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0015】

好ましくは、幹細胞が、胚性内胚葉細胞および／または胚性内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に増殖され、幹細胞の心筋細胞への分化を誘導する。より好ましくは、胚細胞は胚体外由来である。胚細胞は、好ましくは、内臓内胚葉に由来し、内臓内胚葉様特性を有する細胞であるまたは内臓内胚葉の特性を有する胚細胞株に由来する。より好ましくは、幹細胞は、胚細胞の存在下に共培養される。

30

【0016】

また、幹細胞が、胚性外胚葉細胞および／または胚性外胚葉細胞の細胞外培地の存在下に増殖され、幹細胞の骨格筋細胞への分化を誘導する。より好ましくは、胚細胞は、胚体外組織に由来する。

【0017】

本発明のもう一つの態様は、本発明の方法で用いるための胚細胞である。好ましくは、胚細胞は、胚性または胚体外の内胚葉または外胚葉に由来する。好ましくは、胚細胞は、内臓内胚葉に由来するかまたは、内臓内胚葉様特性を有する細胞である。より好ましくは、胚細胞は、END-2細胞株(Mummaryら著、1985年、Dev Biol. 第109巻：402～410頁)のような内臓内胚葉の特性を有する細胞株に由来する。

40

【0018】

本発明のさらに好ましい態様において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、幹細胞の分化する条件下、胚細胞または胚細胞の細胞外培地に由来する因子の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0019】

本発明は、さらに、幹細胞の分化を誘導する方法において用いるための、本発明により

50

細胞外培地から単離されたまたは胚細胞から分泌された、単離された因子を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらにもう一つの態様において、前述のように本方法により生成された分化された細胞が提供される。好ましくは、分化細胞は、心筋細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞または造血細胞である。本発明は、また、移植、細胞治療または遺伝子治療に用いることができる、本発明の方法により生成された、分化された細胞も提供する。好ましくは、本発明は、心臓疾患または症状を患っている被験者において心臓機能を回復する方法におけるように、治療目的で用いることができる、本発明の方法により生成された、分化された細胞を提供する。

【 0 0 2 1 】

10

本発明のもう一つの態様は、心臓疾患または症状を治療または予防する方法であって、前記方法は、単離された心筋細胞および/または心筋細胞に分化することができる細胞を、被験者の心臓組織中に導入することを含む方法である。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、前述のような方法により幹細胞を分化させることにより心筋細胞が生成される。被験者は、心臓疾患または症状を患っていることが好ましい。本発明の方法において、単離された心筋細胞が、好ましくは、被験者の損傷した心筋組織中に移植される。より好ましくは、この方法により、被験者において心臓機能が回復される。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらにもう一つの好ましい態様において、心臓組織を修復する方法であって、前記方法は、単離された心筋細胞および/または心筋細胞に分化することができる細胞を、被験者の損傷した心筋細胞中に導入することを含む方法が提供される。

20

【 0 0 2 4 】

好ましくは、心筋細胞は、前述の方法により幹細胞を分化することにより生成される。被験者が心臓疾患または症状を患っていることが好ましい。本発明の方法において、単離された心筋細胞は、好ましくは、被験者の損傷した心臓組織中に移植される。より好ましくは、この方法により、被験者の心臓機能が回復される。

【 0 0 2 5 】

本発明は、また、血管内皮細胞にまたは骨格筋細胞またはこれらの細胞の祖先に分化細胞を移植することにより、血管疾患および筋肉疾患を治療する方法も提供する。

30

【 0 0 2 6 】

本発明は、好ましくは、心筋細胞に分化した幹細胞が心臓機能を回復する性能を試験するための心筋モデルも提供する。

【 0 0 2 7 】

本発明は、さらに、本発明の方法により生成された分化細胞、およびキャリアを含む細胞組成物を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 8 】

本発明の一つの態様において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、前記方法は、幹細胞の分化を誘導する条件下、胚細胞および/または胚細胞の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

40

【 0 0 2 9 】

幹細胞は、通常、その未分化状態を維持するために、線維芽細胞供給層と共培養することが必要である。この状態を適切に維持しない供給層は、未分化特性により表現型を不明瞭にする幹細胞を提供する。出願人は、胚細胞と共に幹細胞を培養すると、培地中の分化細胞の分化方向の決定因子が提供され得ることを見つけた。この制御は、線維芽細胞を用いて見られることは無かった。

【 0 0 3 0 】

本明細書で用いられる「幹細胞の分化を誘導する」という用語は、幹細胞への直接的または意図的な影響の結果として、幹細胞を特定の分化細胞型に発生させることと理解され

50

る。幹細胞における分化を誘導し得る影響因子は、細胞性パラメーター、例えばイオン流入、pH変化および/または細胞外因子、例えば、分泌されたタンパク質、例えば限定はされないが分化を調節および引き起こすサイトカインおよび成長因子を含み得る。これは、細胞を集密性まで培養することを含み、細胞密度により影響され得る。

【0031】

本発明の方法において、幹細胞は、培養前は未分化であるが、分化することができる任意の細胞である。幹細胞は、限定はされないが、胚性幹細胞、多能性幹細胞、造血幹細胞、全能幹細胞、間葉幹細胞、神経幹細胞および成人幹細胞を含む群より選択することができる。

【0032】

幹細胞は、好ましくは、胚に由来するまたは、胚性幹細胞の培養から直接に由来するヒト胚性幹細胞である。例えば、幹細胞は、ヒト胚性幹細胞(hES)細胞(Reubinoffら著、Nature Biotech. 第16巻:399~404頁、2000年)のような細胞培養から得ることができる。幹細胞は他の動物に由来することができるが、これらは、最も好ましくはヒト胚性幹細胞である。幹細胞は、胚細胞株または胚組織に由来することができる。胚性幹細胞は、培養され未分化状態に維持されている細胞であり得る。そのような細胞が、PCT/AU99/00990、PCT/AU00/01510、PCT/AU01/00735およびPCT/AU01/00278に開示されており、その内容を参照することにより本明細書に取り込む。

【0033】

本方法で用いるのに適した幹細胞は、患者自身の組織に由来することができる。これは、幹細胞に由来する分化組織グラフトと、患者との適合性を高めるであろう。幹細胞は、胚細胞または胚細胞からの細胞外培地にさらす前、さらしている間またはその後に、分化の状態を制御し得る遺伝子の導入により、使用前に遺伝子的に改変することができる。これらは、Oct-4のような幹細胞特異的プロモーターの制御下に選択可能なマーカーを発現するベクターを導入することにより遺伝子的に改変することができる。幹細胞は、マーカーが任意の培養段階において保持されるように、任意の段階でマーカーを用いて遺伝子的に改変することができる。マーカーは、任意の培養段階において分化または未分化幹細胞集合を精製するために用いることができる。

【0034】

幹細胞を、筋細胞、血管内皮細胞のような内皮細胞、上皮細胞、血液細胞(造血細胞)または神経細胞を含む群から選択される細胞型に分化するように誘導することができる。好ましくは、幹細胞を、筋細胞または血管内皮細胞に分化するように誘導する。より好ましくは、幹細胞を、心筋細胞または骨格筋細胞に分化するように誘導する。

【0035】

本発明の好ましい実施形態において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、幹細胞の分化を誘導する条件下、胚細胞の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0036】

本方法で用いられる胚細胞は、胚に由来する胚細胞または胚体外組織に由来する細胞を含む。「胚」という用語は、哺乳動物における受胎後2週間までの任意の受精後段階と定義される。これは、細胞の繰り返し分裂から起こり、外部栄養外胚葉および内部細胞塊(ICM)を含む胚盤胞段階の段階を含む。胚はインビトロで受精胚であってもよく、または胚は、好ましくはヒトまたは非ヒト起源の摘出された卵母細胞中に体細胞または細胞核を移して得られる胚であってもよい。胚体外組織は、胎盤を作る胚により生成される細胞を含む。

【0037】

本発明の好ましい実施形態において、胚細胞は、胚性、好ましくは胚体外性の内胚葉または外胚葉に由来する。より好ましくは、胚細胞は、胚から単離された内臓内胚葉様組織または内臓内胚葉組織に由来する。好ましくは、内臓内胚葉は、マウス胚(E7.5)の

10

20

30

40

50

ような初期の原腸形成後胚から単離することができる。内臓内胚葉または内臓内胚葉様組織は、Roelenら著、1994年、Dev. Biol. 第166巻：716～728頁に記載のように単離することができる。特徴的なことに、内臓内胚葉は、 α フェトリニンおよびサイトケラチンENDO-Aの発現により確認することができる。胚細胞は、胎児性癌細胞、好ましくは内臓内胚葉特性を有する細胞であってよい。

【0038】

胚細胞は、培養中の細胞株または細胞に由来することができる。胚細胞は、胚細胞株、好ましくは、END-2細胞株(Mummaryら著、1985年、Dev Biol. 第109巻：402～410頁)のような内臓内胚葉の特性を有する細胞株に由来することができる。END-2細胞株は、懸濁液中においてレチン酸で凝集体(胚様体)として処理されたP19EC細胞の培養からクローニングすることにより得られ、次に、再び平板培養した(Mummaryら著、1985年、Dev Biol. 第109巻：402～410頁)。END-2細胞株は、 α フェトリニン(AFP)および細胞骨格タンパク質ENDO-Aを発現している内臓内胚葉(VE)の特徴を有する。従って、胚細胞がEND-2細胞株に由来することが最も好ましい。これらの細胞は、ヒト幹細胞の心筋細胞への分化を誘導するのに特に有用であると分かった。

【0039】

胚細胞は、Roelenら著、1994年、Dev. Biol. 第166巻：716～728頁に記載の方法に従って単離することができる外胚葉細胞であってよい。外胚葉細胞は、oct-4を発現することが知られており、アルカリホスファターゼ活性を有し、それらの細胞表面上にSSEA-1も有する。従って、外胚葉細胞は、前記特性に基づいて同定し単離することができる。外胚葉細胞は、骨格筋または内臓内皮細胞への分化を誘導する(成長)因子を分泌することができる。外胚葉細胞が、E7.5胚性マウス組織に由来することが好ましい。

【0040】

従って、本発明のもう一つの態様において、本発明の方法で用いるために胚細胞が提供される。好ましくは、胚細胞は、前述のように胚性内胚葉または外胚葉に由来する。

【0041】

本発明および先に記載の方法において、幹細胞および胚細胞が培養されて、特定の細胞型への分化が誘導される。好ましくは、幹細胞および胚細胞が、インビトロで共培養される。これは、典型的には、培養中において胚細胞を増幅することにより生成される胚細胞単層に幹細胞を導入することを含む。好ましくは、胚細胞単層は増殖して実質的集密性になり、幹細胞は、胚細胞の細胞外培地の存在下に、幹細胞から特定の細胞型への分化を誘導するのに十分な時間培養される。また、胚細胞の細胞外培地を含むが胚細胞は存在しない培地において幹細胞を増殖させることができる。胚細胞と幹細胞とは、フィルターまたは、寒天のような非細胞質マトリクスにより互いに分離することができる。

【0042】

本発明の方法において、幹細胞が、好ましくは、胚細胞の単層上に培養され、幹細胞の分化を誘導するように培地中で増殖される。より好ましくは、単層は集密性であり、有糸分裂誘導不活性である。

【0043】

分化胚細胞を得るための条件は、幹細胞の再生には許容できない条件であるが、幹細胞を殺さないまたは、幹細胞を排他的に胚体外系列に分化させる。幹細胞成長用の最適条件を徐々に外すことは、幹細胞から特定細胞型への分化に好ましい。好適な培養条件は、分化速度および/または効率を増加させ得る共培地中にDMSO、レチン酸、FGFまたはBMPを添加することを含む。

【0044】

胚細胞層の細胞密度は、その安定性および性能に影響を与える。胚細胞は、好ましくは、集密性となるべきである。より好ましくは、胚細胞が成長して集密性となり、次に、マイトマイシンCのような細胞のさらなる細胞分裂を防止する試薬に曝される。胚単層は、

10

20

30

40

50

幹細胞の添加の2日前に達成されるのが好ましい。幹細胞は、好ましくは、解離され、次に、胚細胞の単層に導入される。より好ましくは、幹細胞および胚細胞が、幹細胞の実質的部分が分化するまで、2～3週間共培養される。好ましくは、幹細胞は、心筋細胞および骨格筋細胞、血管内胚葉細胞または造血細胞を含む筋細胞（筋肉細胞）に分化するように誘導される。胚細胞が胚体外組織に由来することが好ましく、より好ましくは、胚性内胚葉または外胚葉に由来する。

【0045】

本発明のもう一つの好ましい実施形態において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、前記方法は、幹細胞の分化を誘導する条件下、胚細胞の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

10

【0046】

本明細書で用いられる「胚細胞の細胞外培地」という用語は、本明細書に記載のような胚細胞を、所定の時間、培地中において増殖させることにより生成される調整（コンディショニング）培地であって、それにより、胚細胞により生成された分泌タンパク質のような細胞外因子が調整培地中に存在するような調整培地を意味すると解される。この培地は、細胞の成長を促進する成分、例えば、ダルベッコ最少必須培地、ハムF12または胎児ウシ血清のような基本培地を含むことができる。

【0047】

本発明のさらに好ましい態様において、幹細胞の分化を誘導する方法であって、前記方法は、幹細胞の分化を誘導する条件下、胚細胞または胚細胞の細胞外培地に由来する因子の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

20

【0048】

細胞外培地は、好ましくは、細胞因子、例えば、幹細胞の分化を誘導することができる分泌タンパク質を含む。そのような分泌タンパク質は、典型的には、細胞表面上に受容体を結合させて、細胞の分化を始めることができる細胞内経路を促す。適当な細胞外因子の例は、Dyerら著、2001年、Dev. 第128巻：1717～1730頁に記載のようなlhhおよびBMP2を含む。

【0049】

本発明のもう一つの態様において、幹細胞の分化を誘導する方法において用いるための、本発明により細胞外培地から単離されたまたは胚細胞から分泌された単離された因子が提供される。適当な単離された因子は、幹細胞の分化を誘導するその性能により選択することができる。例えば、幹細胞の分化を誘導することができる特定因子およびタンパク質フラクションを確認するために培養細胞アッセイ系を用いることができる。この因子は、胚細胞の細胞外培地中に存在する分泌されたタンパク質を含み得る。適当なタンパク質は、当業者に知られている従来法により抽出および精製することができる。

30

【0050】

本発明のもう一つの好ましい態様において、幹細胞の筋細胞分化を誘導する方法であって、幹細胞の筋細胞への分化を誘導する条件下、胚細胞および/または胚細胞の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0051】

40

好ましい実施形態において、幹細胞の心筋細胞への分化が誘導される。出願人は、幹細胞を胚性、好ましくは胚体外性内胚葉細胞と一緒に培養すると、特定の細胞型への、特に筋細胞への分化が選択的に誘導されることを発見した。幹細胞と胚性内胚葉細胞とのこの組み合わせが、心筋細胞への分化を誘導することが最も好ましい。幹細胞がヒト由来、好ましくはヒト胚性幹細胞（hES）であることが好ましい。より好ましくは、幹細胞は、胚細胞と共培養される。これは、典型的には、解離した幹細胞を、適当な胚細胞の単層を有する培養培地に導入することにより達成される。より好ましくは、単層は、集密性胚細胞からなる。

【0052】

本発明のさらに好ましい実施形態において、胚細胞は、内臓内胚葉に由来する内胚葉細胞

50

胞であるまたは、内臓内胚葉特性を有する胚細胞である。より好ましくは、内臓内胚葉細胞は、E7.5マウス胚に由来する。胚細胞は、胎児性癌細胞、好ましくは、内臓内胚葉特性を有する細胞であってよい。より好ましくは、胚細胞は、培養中の細胞株または細胞に由来する。胚細胞は、胚細胞株、好ましくは、END-2細胞株(Mummeryら著、1985年、Dev Biol. 第109巻: 402~410頁)のような内臓内胚葉の特性を有する細胞株に由来することができる。より好ましくは、胚細胞は胚体外組織に由来し、より好ましくは、内臓内胚葉に由来する。内胚葉細胞は、典型的には、脊椎動物の心臓形成部位に隣接する。内胚葉分化が欠損または存在していない個体において、心臓は異常に発生する。

【0053】

10

幹細胞の心筋細胞への分化を誘導するために、培地中の胚体外内胚葉細胞単層に幹細胞を導入することが好ましい。単層は、胚性内胚葉、より好ましくは胚体外性内胚葉に由来する胚細胞の増殖により生成される。胚性内胚葉は、好ましくは、胚体外内臓内胚葉である。より好ましくは、細胞単層は、END-2細胞により生成される。胚細胞を培養し継代させてから、成長させて単層を形成することが好ましい。単層は、好ましくは、DMEMまたはM16培地のような適当な培地中で集密性まで成長する。次に、単層を特定の試薬で処理して、細胞のさらなる細胞分裂を防止することができる。例えば、単層をマイトマイシンで処理することができ、次に、幹細胞を、有糸分裂誘導不活性の単層上に培養することができる。

【0054】

20

幹細胞を、内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に、幹細胞の心筋細胞への、最も好ましくは収縮細胞への分化を、誘導するのに十分な時間、増殖させる。最も好ましくは、共培養は約2~3週間行われ、培地は、好ましくは、5~6日毎のように定期的に新しい培地と取り替えられる。

【0055】

また、幹細胞を、内胚葉細胞の細胞外培地を含むが内胚葉細胞が存在しない培養中で成長させることができる。従って、幹細胞を、胚性内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に成長させて、幹細胞の、心筋細胞のような筋細胞への分化を誘導させることができる。

【0056】

本発明の方法において、生成される心筋細胞は好ましくは収縮細胞である。心筋細胞は、幹細胞に由来する分化した細胞型である。心筋細胞を含む筋細胞を固定して、 α アクチニン抗体で染色して、筋肉表現型を確認することができる。 α -トロポニン、 α -トロポマイシンおよび α -MHC抗体も、特徴的な筋肉染色を与える。好ましくは、心筋細胞は、当業者に知られている方法に従って固定される。より好ましくは、心筋細胞は、パラホルムアルデヒドで、好ましくは約2%~約4%のパラホルムアルデヒドで固定される。筋細胞のイオンチャンネル特性および活動電位は、パッチクランプ、電気生理学およびRT-PCRにより決めることができる。

【0057】

30

心筋細胞の由来となる幹細胞は、例えばイオンチャンネルにおける突然変異(これは、ヒトの突然死を引き起こす)を有するように遺伝子的に改変することができる。すなわち、これらの修飾幹細胞に由来する心筋細胞は、異常であり、欠損イオンチャンネルに関わる心臓疾患用の培養モデルを提供する。これは、基礎研究および試験医薬に有用である。同様に、他の遺伝子に基づく心臓疾患のための培地におけるモデルを作ることができる。本方法において生成された心筋細胞も、移植および心臓機能の回復に用いることができる。

【0058】

40

例えば、虚血性心臓疾患は、西洋世界における罹患率および死亡率の主要な原因である。酸素剥奪およびその後の酸素再灌流により引き起こされる心臓虚血は、不可逆的細胞損傷を引き起こし、結局、広範囲の細胞死および機能損失につながる。心筋細胞移植により損傷心臓組織を再生する方法は、梗塞後心不全を予防または制限する。幹細胞の心筋細胞

50

への分化を誘導する方法は、前述したように、そのような心臓疾患の治療に有用である。本方法により生成された心筋細胞は、心臓機能の回復の性能を試験するための心筋梗塞モデルにおいても有用でありえる。

【0059】

本発明は、好ましくは、心筋細胞に分化した幹細胞が心臓機能を回復する性能を試験するための心筋モデルを提供する。インビボでの心筋細胞移植の有効性を試験するために、心臓機能の測定可能なパラメーターを有する再生可能な動物モデルを有することが重要である。用いられるパラメーターは、対照動物と実験動物とを明らかに識別して（例えば、Palmenら著、（2001年）、Cardiovasc. Res. 第50巻、516～524頁）、移植の効果を適切に決めることができるべきである。PV関係は、心臓のポンプ性能の尺度であり、移植後の変化した心臓機能を読み出すために用いることができる。

10

【0060】

限定はされないが免疫不全マウスのような宿主動物を、種々の供給源からの心筋細胞の「普遍的アクセプター(universal acceptor)」として用いることができる。好ましくは、心筋細胞は本発明の方法により生成される。

【0061】

本発明の心筋モデルは、好ましくは、適当な宿主動物に心筋細胞またはその適当な祖先細胞を移植した後の心臓修復の程度を評価するように設計される。より好ましくは、宿主動物は、分化した心筋細胞の普遍的アクセプターとして用いられる、梗塞後の心筋変性のモデルとして作られる免疫不全動物である。この動物は、ネズミ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ブタおよび非ヒト霊長類を含む任意の種であり得るが、これらに限定されない。これらの動物における心臓修復を測定するために用いられるパラメーターには、心臓組織または種々の心臓機能の電気生理学的特性があるが、これらに限定されない。例えば、収縮機能を、心臓における体積および圧力変化として評価することができる。好ましくは、心室収縮機能が査定される。心臓機能および心臓組織特性を査定する方法は、当業者にも知られている技術を含む。

20

【0062】

本発明のもう一つの態様において、患者における心臓疾患または症状を治療または予防する方法であって、心筋細胞および/または心筋細胞祖先細胞あるいは心筋細胞に分化することができる細胞を、患者の心筋組織に導入することを含む方法を提供する。

30

【0063】

本明細書で用いられる「治療または予防」という用語は、治療または予防すべき症状の兆候を緩和または低減することを意味する。

【0064】

好ましくは、心筋細胞は、前述のような方法に従って幹細胞を分化することにより生成される。被験者が心臓疾患または症状を患っていることが好ましい。本発明の方法において、単離された心筋細胞は、好ましくは、被験者の損傷した心臓組織中に移植される。より好ましくは、この方法により、被験者の心臓機能が回復される。

【0065】

「心筋細胞に分化することができる細胞」または心筋細胞祖先細胞は、内臓内胚葉および/または内臓内胚葉の細胞外培地と共培養されたが、心筋細胞に完全には分化していない幹細胞を含み得る。

40

【0066】

適当な心臓疾患は、限定はされないが心筋梗塞または心臓肥大を含み得る。

【0067】

本発明のさらにもう一つの態様において、損傷した心臓組織を修復する方法であって、心筋細胞および/または心筋細胞祖先細胞あるいは心筋細胞に分化することができる細胞を、被験者の損傷した心臓組織に導入することを含む方法を提供する。

【0068】

50

好ましくは、前述のような方法に従って幹細胞を分化することにより心筋細胞を生成する。被験者が心臓疾患または症状を患っていることが好ましい。本発明の方法において、単離された心筋細胞は、好ましくは、被験者の損傷した心臓組織中に移植される。より好ましくは、この方法により、被験者の心臓機能が回復される。

【0069】

損傷された骨格筋組織は、筋ジストロフィーから生じる。

【0070】

さらにもう一つの好ましい態様において、幹細胞の骨格筋細胞への分化を誘導する方法であって、前記方法は、幹細胞の骨格筋細胞への分化を誘導する条件下、胚性外胚葉組織および/または胚性外胚葉組織の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

10

【0071】

外胚葉細胞は、Roelenら著、1994年、Dev. Biol. 第166巻：716～728頁に記載の方法に従って単離することができる。外胚葉細胞はoct-4を発現しアルカリホスファターゼ活性を有することが知られており、これらは、その細胞表面上にSSEA-1も有する。従って、外胚葉細胞は、前記特性に基づいて同定および単離することができる。外胚葉細胞は、骨格筋への分化を誘導する分泌（成長）因子を分泌することができる。外胚葉細胞は、E7.5胚性マウス組織に由来することが好ましい。より好ましくは、外胚葉細胞は、先に記載したものと類似の方法を用いて幹細胞と共培養される。外胚葉単層は、好ましくは、培養中で形成され、好ましくは、解離した幹細胞が、幹細胞の骨格筋細胞への分化を誘導するのに十分な時間、培養に導入される。

20

【0072】

骨格筋細胞は、典型的には、「攣縮」とすると共にMF20を発現する長い多核細胞である。骨格筋細胞をαアクチニンで染色すると、これらは、通常、縞状染色パターンを作る。本発明の方法により生成された骨格筋細胞は、筋肉疾患の治療における移植のために用いることができる。

【0073】

本発明のもう一つの態様において、患者における筋肉疾患を治療または予防する方法であって、前記方法は、胚性外胚葉細胞および/または胚性外胚葉細胞の細胞外培地の存在下に共培養された骨格筋細胞および/または骨格筋細胞祖先を患者の筋肉に導入することを含む方法が提供される。

30

【0074】

好ましくは、骨格筋細胞は、前述の条件下に共培養した幹細胞から分化されたものである。

【0075】

筋肉疾患は、筋ジストロフィーに起因し得る。しかしながら、この治療法は、筋細胞の再生および回復を必要とするいかなる症状にも適用することができる。

【0076】

さらにもう一つの好ましい態様において、幹細胞の血管内皮細胞への分化を誘導する方法であって、前記方法は、胚性外胚葉および/または内胚葉細胞、および/または、胚性外胚葉および/または内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に幹細胞を培養して、幹細胞から血管内皮細胞への分化を誘導させることを含む方法が提供される。

40

【0077】

より好ましくは、胚細胞は、胚体外外胚葉および/または内胚葉組織に由来する。好ましくは、胚細胞は、胚性E7.5マウスに由来する。胚性外胚葉または内胚葉細胞を、前述のようにして得ることができる。卵黄嚢の中の内臓胚体外内胚葉に隣接して、胚内第1血管ネットワークが形成され、これが、内皮細胞様TGFβおよびVEGFに影響を与える因子を生成する。従って、より好ましくは、前述の方法で用いられる胚細胞は、内臓胚体外内胚葉に由来するまたは、内臓細胞様特性を有する細胞である。胚性内胚葉および/または外胚葉細胞は、好ましくは、前述の方法を用いて、幹細胞と共培養される。しかし

50

ながら、VEGFを培養培地に添加して、培地中での血管内皮細胞成長を促進することができる。

【0078】

本発明の方法により生成される血管内皮細胞は、血液を含んでいることがある血管ネットワークを形成することができることにより確認することができる。血管内皮細胞は、典型的に、PE-CAM、VE-CAMおよびフォン・ウィルブラント因子用の染剤であるVEGF用の受容体を発現する。本発明の方法により生成される血管内皮細胞は、遺伝子に基づく血管疾患のモデルとして有用であろう。例は、患者がTGF- β 受容体において突然変異を有し慢性出血症候群を有する、ヒト遺伝的毛細血管拡張症であり得る。病因を理解するために、この疾患を有する患者から長寿命細胞を単離し維持することは困難である。従って、血管内皮細胞への分化が誘導された遺伝子的に改変された幹細胞は、有用な培養モデルを提供することができる。さらに、本方法により生成された血管内皮細胞を、移植のためおよび/または遺伝子治療の配達のための経路として用いることができる。

10

【0079】

本発明のもう一つの態様において、血管組織における血管疾患を治療または予防する方法であって、前記方法は、胚性外胚葉および/または内胚葉細胞、および/または、胚性外胚葉および/または内胚葉細胞の細胞外培地の存在下に共培養した血管内皮細胞および/または血管内皮祖先細胞を血管組織に導入することを含む方法が提供される。

【0080】

好ましくは、血管内皮細胞は、前述の条件下に共培養された幹細胞から分化されたものである。

20

【0081】

好ましくは、血管疾患は、遺伝性出血性毛細血管拡張症および、糖尿病または喫煙の結果としての血管劣化のいずれか一つにより引き起こされる。

【0082】

本発明のさらにもう一つの態様において、前述のような方法に従って生成された分化細胞が提供される。好ましくは、分化細胞は、心筋細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞または造血細胞である。本発明は、移植、細胞治療または遺伝子治療のために用いることができる、本発明の方法により生成された分化細胞も提供する。好ましくは、本発明は、心臓疾患または症状を患っている被験者における心臓機能を回復する方法におけるような治療目的で用いることができる本発明の方法により生成された分化細胞を提供する。

30

【0083】

分化細胞は、限定はされないが成長因子、分化因子または組織再生を制御する因子を含む新規遺伝子産物の単離または同定のための供給源として用いることができるまたは、これらを、新規エピトープに対する抗体の発生のために用いることができる。

【0084】

本発明の方法により生成された分化細胞は、クローン的に増幅することができる。特定の分化細胞型を、他の細胞型の混合物から選択的に培養し、続いて増殖させることができる。クローン的に増幅した特定の分化細胞型は、移植治療用の十分な細胞の生成、遺伝子発見研究用の十分なRNAの生成、等のような種々の用途に有用であり得る。分化細胞は、従来法に従って細胞株を作るのに用いることができる。

40

【0085】

本発明の方法により生成された分化細胞を、遺伝子的に改変することができる。例えば、遺伝子構築物を、培養の任意の段階において、分化細胞に挿入することができる。移植後、遺伝子的に改変した細胞を用いて、遺伝子治療中の標的器官に遺伝子を運び発現させることができる。

【0086】

本発明の方法により生成された分化細胞は、生物学的材料の貯蔵に適した任意の方法により保蔵または維持することができる。分化細胞の効果的保存は、将来の種々の用途のために細胞を連続的に貯蔵させることができるので高度に重要である。細胞株の凍結保存に

50

一般的に用いられている伝統的緩慢凍結法を用いて分化細胞を凍結保存することができる。

【 0 0 8 7 】

本発明は、本発明の方法により生成された分化細胞およびキャリアを含む細胞組成物をさらに提供する。キャリアは、細胞を維持する任意の生理学的に許容できるキャリアであってよい。これは、PBSまたは、当業者に知られている他の最少必須培地であってよい。本発明の細胞組成物は、移植のような医療的目的または生物学的分析のために用いることができる。

【 0 0 8 8 】

本発明の細胞組成物は、心臓疾患または組織損傷が起こっているような疾患または症状を修復または治療する方法において用いることができる。治療には、患者に細胞または細胞組成物（部分的または完全に分化したもの）を投与することがあるが、これに限定されない。これらの細胞または細胞組成物は、動物モデルの使用を通して先に開示したような機能を回復することにより症状を元に戻す。

【 0 0 8 9 】

本明細書の記載および請求の範囲を通して、「含む (comprise)」、および「含んでいる (comprising)」、および「含む (comprises)」という用語は、他の添加物、成分、完全体 (integer) またはステップを排除することを意図していない。

【 0 0 9 0 】

文献、事実、材料、装置、物品等の記載は、本発明の内容を説明する目的のみで、本明細書中に含まれる。これらの事項のいずれもまたは全てが、従来技術の基礎の一部を形成し、本出願の各請求項の優先日以前にオーストラリアに存在する本出願に関する分野の一般的知識であると言っているのではない。

【 0 0 9 1 】

本発明を、添付の実施例および図面を参照して、より詳細に説明する。しかしながら、以下の記載は説明をするのみであり、決して前記本発明の普遍性を制限するものと解すべきでない。

【 実施例 1 】

【 0 0 9 2 】

[ヒト胚幹 (hES) 細胞の心筋細胞への分化]

(a) hES細胞とEND-2細胞との共培養

ヒト胚性幹細胞 (hES細胞) (Reubinoффら著、Nature Biotech. 第16巻: 399~404頁) を、END-2細胞 (Mummaryら著、1985年、Dev Biol. 第109巻: 402~410頁) と共培養した。1:1比のダルベッコ最少必須培地 (DMEM) とハムF12培地 (DF) (FCS 7.5%含む) とにおいてEND-2細胞を増殖させた。次に、細胞を、1:5のトリプシン/EDTA (0.125% w/v; 50 mM resp) 中で1週間に2回、継代培養した。hES細胞を、DMEMにおいて、20%のFCS、0.1 mMのβ-メルカプトエタノール、1%の非必須アミノ酸、2 mMのグルタミン+抗生物質 (pen/strep) と共に、マイトマイシン (10 μg/ml) 処理胚のフィーダー細胞上で培養した。HESを、ジスパーゼ (dispase) で処理し、個々のコロニーを6~10枚の断片に機械的にスライスし、続いて断片を新しいフィーダー細胞に移すことにより二次培養した。

【 0 0 9 3 】

共培養を始めるために、END-2細胞の集密性培地を、まず、7.5% FCSを含むDMEMにおけるゼラチン被覆ガラスオーバースリップまたは組織培養プラスチックウェル上で1:10に継代培養し、集密性になるまで3日間成長させた。次に、単層を、10 μg/mlのマイトマイシンCで3時間処理し、Ca²⁺およびMg²⁺を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で3回洗い、hES培地を添加した。次に、hES細胞を10 mg/mlジスパーゼを用いて3~5分間解離させ、続いてピペット中で穏やかに攪拌し

て、約10～50細胞の小さな細胞塊を含む懸濁液を得た。これらの懸濁液を、次に、hES完全培地において有糸分裂不活性END-2単層上で2～3週間培養した。培地を、5～6日毎に新鮮なhES培地に置換した。

【0094】

(b) hES細胞と内臓内胚葉細胞との共培養

内臓内胚葉細胞を、ジスパーゼを用いて前述のようにE7.5(E0.5は、膈栓の日正午である)にて、原腸形成しているマウス胚の3つの胚葉から単離した(Roelenら著、1994年、Dev. Biol. 第166巻: 716～728頁)。分離した胚葉を、M16培地におけるポリ-L-リシン被覆培養皿上に乗せ、一晚付着させた。翌日、M16をhES完全培地に置換し、胚細胞単離後3日目に、未分化細胞塊「移植片」を、マウス胚からの付着した内胚葉および外胚葉細胞上で培養した。次に、培地を2～3週間増殖させ、培地を5～6日毎に新しくした。

10

【0095】

(c) 共培養実験(a)および(b)の分析

前記(a)および(b)に記載した培養を、10日後の収縮筋の領域の存在について評価した。

【0096】

(i) 免疫蛍光

次に、収縮筋の領域が明らかになった後、培養を、2%パラホルムアルデヒド中で30分間固定し、3回洗い、使用するまでPBS中に貯蔵した。次に、培地を、 α -アクチニン抗体(モノクローナル抗体- α -アクチニン(筋節)クローンEA-53、1:1000希釈、Sigma製; 二次抗体: ヤギ抗マウス-IgG-Cy3)を用いて、筋肉表現型を確認するために染色した。

20

【0097】

(d) 共培養実験(a)および(b)の結果

(i) hES-END-2共培養

共培養の最初の週の間、細胞の塊を徐々に広げ分化させて、混合形状を有するが上皮様細胞の割合が比較的高い細胞を得る。第2週までに、これらは膨張して流体を満たした嚢胞になる(図1A参照)。これらの間に、細胞の異なるパッチが明らかになり、数日後に収縮するようになる。12～21日の間に、これらの収縮しているパッチが次第に多く現れる。ガラス基質と組織培養基質との間に明らかな相違はなく、いずれも収縮している筋肉を産生し、これは、3つの独立した実験において示され、収縮筋肉の1または2以上の領域を含むウェルが15～20%あることが示される。収縮速度は1分当たり約60回であり、高度に温度感受性である。これらの細胞は、 α -アクチニンで陽性に染まり、実際に筋細胞であることが確認される(図2)。

30

【0098】

(ii) hES-E7.5内胚葉共培養

培養の第1週中、hES断片を内胚葉の上で培養し、これは徐々に広がり平らになり、12日目に、収縮している筋細胞の第1の領域が明らかになる。これは、END-2共培養において観察される強度の嚢胞形成を伴わないが、血管内皮細胞ネットワークに似ている領域は、培養の端部に現れない。

40

【実施例2】

【0099】

[ヒト胚幹(hES)細胞の骨格筋細胞への分化]

実施例1で用いたヒト幹細胞(hES)を、E7.5日胚(E0.5は栓の日)から単離された外胚葉上に乗せた。鋭いピンセットとタングステン針を用いて、脱落膜から胚を取り出し、10%FCSを含むHEPES緩衝DMEM中で氷上に維持した。ライヘルト膜を除去した後、受胎産物の胚と胚体外部分を、タングステン針で分離した。結節と原始線条を取り出し、胚部分を、氷上のPBS中の2.5%パンクレアチンおよび0.5%トリプシン中で8分間インキュベートした。インキュベーション後、胚を、氷上の10%F

50

C Sを含むH E P E S緩衝D M E Mに移した。次に、外胚葉、内胚葉および中胚葉を、タングステン針を用いてきれいに単離することができた。

【 0 1 0 0 】

h E S細胞は、最初は、内胚葉上のものに似ているが、18日目までに、骨格筋細胞に似ているかなり長い攣縮している細胞の領域ができる。血管ネットワーク（血管内皮細胞）は明らかであるが、収縮筋筋を暗示する領域は無い。

【実施例3】

【 0 1 0 1 】

[ヒト胚幹（h E S）細胞の血管内皮細胞への分化]

実施例1で用いたヒト幹細胞（h E S）を、外胚葉および／または内胚葉細胞上に乗せた。外胚葉または内胚葉とのh E Sの共培養条件は前述と同じであった。ネットワークにおける血管内皮細胞は、他の体細胞型への分化を伴った。

【実施例4】

【 0 1 0 2 】

[内臓内胚葉細胞およびh E Sおよび分化心筋細胞の共培養]

a) 共培養

E N D - 2細胞、P 1 9 E C、h E Cおよびh E S細胞を、前述のように培養した（Mummaryら著、1985年、1991年；vanden Eijnden-van Raaijら著、1991年；Slagerら著、1993年；Reubinoofら著、2000年）。全ての実験において、E S I（Reubinoofら著、2000年）からのh E S 2細胞株を用いた。共培養を開始するために、実施例1に記載のようにマイトマイシンC（10 μ g / ml）で1時間処理した有糸分裂不活性のE N D - 2細胞培養で、h E C、m E Sおよびh E S用のフィーダーであるマウス胚性線維芽細胞（M E F）を置き換えた。フィーダーに依存しないP 1 9 E Cとの共培養を、先に記載（Mummaryら著、1991年）のように開始し維持した。次に、培地を2～3週間成長させ、5日目からの収縮筋肉の領域の存在について評価した。

【 0 1 0 3 】

（b）一次ヒト成人心臓細胞の単離

手術生検からのヒト心房細胞が、抗体染色、電気生理学およびR T - P C Rによるイオンチャンネルの特徴付け用の対照として使用された。心臓手術を受ける患者からの同意を得た心臓組織を得た。手術中に定法で除去された心房付属器を、直ちに、氷冷クレブス - リンガー（K R）食塩水に移した。過剰結合組織および脂肪組織を切り取り、滅菌K R溶液で2回洗った。心筋組織を、滅菌鋏で切り刻み、次に、公開された方法（Peetersら著、（1995年）、Am. J. Physiol. 第268巻、H1757～H1764）を用いて3段階酵素的単離手順により分離して個々の細胞を放出した。第1の段階は、37 $^{\circ}$ Cで4.0 U / mLプロテアーゼ型X X I V（Sigma製、St Louis、MO、USA）を用いて15分間インキュベートすることを含む。次に、組織を、1.0 mg / mLコラーゲナーゼおよび0.5 mg / mLヒアルロニダーゼを含む溶液に移し、続いて、コラーゲナーゼ（1.0 mg / mL）を用いてさらに3回、各々37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした。組織抽出物を一緒にし、カルシウム濃度を1.79 mmol / Lに回復させた。心筋細胞を、10%のF B S、ペニシリン（100 U / mL）ストレプトマイシン（100 μ g / mL）、2.0 mmol / LのL - カルニチン、5.0 mmol / Lのクレアチン、5.0 mmol / Lのタウリンを加えた組織培養培地M 1 9 9に移し、50 μ g / mLのポリL - リシンを被覆したガラスカバースリップ上に直接接種し、一晚培養した。

【 0 1 0 4 】

（c）免疫細胞化学

付着した一次心筋細胞、m E S（E 1 4およびR 1）およびh E S誘導心筋細胞を、C a ²⁺およびM g ²⁺を含むP B S中の3.0%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定し、次に、P B S中の0.1%トライトンX 100で4分間透過性にした。α - アクチ

10

20

30

40

50

ニンおよびトロポミオシン (Sigma 製) を含む筋節タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて標準的方法により免疫細胞化学を実施した。ミオシン軽鎖 (MLC2a/2v) のアイソフォームに特異的な抗体を用いて、心房細胞と心室細胞 (Dr Ken Chien から戴いた) とを区別した (表 1)。二次抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratories から得た。培養した心臓線維芽細胞は、筋節タンパク質用のネガティブコントロールとして役立ち、Zeiss Axiovert 135M エピ蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 製、Jena GmbH、Germany) を用いて細胞を可視化した。画像処理ソフトウェアを用いて画像を擬似着色した。

【0105】

【表 1】

10

心房心筋細胞を染色するために用いられる抗体

一次抗体	希釈率	二次抗体	希釈率
マウス抗 α -アクチン IgG	1:800	ヤギ抗マウス IgG-cy3/FITC コンジュゲート	1:250
マウス抗トロポミオシン IgG	1:50	ヤギ抗マウス IgG-cy3 コンジュゲート	1:250
ポリクローナルウサギ抗マウス mIc-2a (心房)	1:500	ヤギ抗ウサギ IgG-cy3 コンジュゲート	1:250
ヘキスト (核酸)	1:500		

20

【0106】

(d) イオンチャンネル発現のための半定量的 RT-PCR

1% ジメチルスルホキシド (Rudnicki および McBurney 著、1987 年) の存在下、凝集プロトコールにより P19EC 細胞を収縮筋に分化させた。これらの培養条件で 16 日後、収縮心房を切除し、RNA を、Trizol (Gibco 製) を用いて単離し、M-MLV-RT (Gibco 製) を用いて逆転写した。心臓アクチン (Lanson ら著、(1992 年) Circulation、第 85 巻、1835~1841 頁)、MLC2v (Meyer ら著、(2000 年) FEBS Lett、第 478 巻、151~158 頁)、ERG (Lees-Miller ら著、(1997 年)、Circ. Res. 第 81 巻、719~726 頁) および Kir2.1 (Vandorpe ら著、(1998 年)、J. Biol. Chem. 第 273 巻、21542~21533 頁) 用のプライマーを、前述のように用いた。マウス L 型カルシウムチャンネルサブユニット $\alpha 1c$ (センス 5'-CCAGATGAGACCCGCGAGCGTAA (配列番号 1); アンチセンス 5'-GTCTGCGGCGTTCTCCATCTC (配列番号 2); GenBank 登録番号 L01776; 生成物寸法 745 bp)、Scn5a (センス 5'-CTTGCCCAAGATCAACCTGCTCT (配列番号 3); アンチセンス 5'-CGGACAGGGCCAAATACTCAATG (配列番号 4); AJ271477、770 bp) および β -チューブリン (センス 5'-TCACTGTGCTGAACCTTACC (配列番号 5); アンチセンス 5'-GAACATAGCCGTAACCTGC (配列番号 6); X04663、319 bp) 用のプライマーを、Vector NTI ソフトウェア (Informax 製、North Bethesda、MD、USA) を用いて設計した。

30

40

【0107】

(e) パッチクランプ電気生理学

パッチ-クランプ技術の全細胞電圧クランプ構造を用いて 33 で実験を行った。封鎖達成後、電流固定式に活動電位を測定した。Axopatch 200B 増幅器 (Axon Instruments Inc. 製、Foster City、CA、USA) を用いて、自発収縮領域における細胞からのデータを記録した。出力信号を、AD/DAC

50

LAB PC + 収集ボード (acquisition board) (National Instruments 製、Austin, TX, USA) を備えたペンティアム (登録商標) III を用いて 2 kHz でデジタル化した。抵抗 2 ~ 4 MΩ のパッチピペットを用いた。浴槽培地の組成は、140 mM の NaCl、5 mM の KCl、2 mM の CaCl₂、10 mM の HEPES であり、NaOH で pH 7.45 に調節されている。ピペット組成：145 mM の KCl、5 mM の NaCl、2 mM の CaCl₂、10 mM の EGTA、2 mM の MgCl₂、10 mM の HEPES であり、KOH により pH 7.30 に調節されている。

【0108】

(f) 共培養の結果

10

(i) mEC - END - 2 共培養

END - 2 細胞との共培養の開始から 2 日後に、P19 EC 細胞は自然に凝集し、7 ~ 10 日後、凝集塊の多くが、先に記載 (Mummary 著、1991 年) のように収縮細胞の領域を含んでいた (図 3a)。電気生理学および RT - PCR は、胚心筋細胞の機能的イオンチャンネル特性がこれらの細胞において発現されたことを示した (図 4、表 2)。

【0109】

[表 2]

半定量的 RT - PCR により決められる心臓マーカーとイオンチャンネル mRNA 発現との相対水準。示された遺伝子産物について、未分化 P19 (EC)、分化 P19 心筋細胞 (CMC) および成体マウス心臓 (心臓) の同一量の cDNA を PCR 増幅した。各産物についての相対水準を示す。

20

【0110】

[表 2]

	EC	CMC	心臓	イオンチャンネルおよび電流
心臓アクチン	+	++	+++++	
MLC2v+	+++	+++++		
α1c	+	+++	++++	L 型カルシウムチャンネル、I _{Ca}
Scn5a	+	+	+++++	心臓特異的ナトリウムチャンネル、I _{Na}
ERG	++	++	++++	遅延整流カリウムチャンネル、I _{Kr}
Kir2.1	-	+	++++	電圧ゲートカリウムチャンネル、I _{K1}
チューブリン+++	+++	+++		

30

【0111】

(ii) mES - END - 2 共培養

2 つの独立したマウス ES 細胞株 (E14 および R1) を、それらの共培養条件への反応について試験した。培養は単一細胞懸濁液として開始されなかったが、3 日以内に、最初に接種したよりも大きな凝集塊が、両方の細胞株について明らかとなった (図 3b、c)。殆ど同時に、自発的収縮心筋細胞の著しい領域が R1 ES 細胞培地において明らかとなったが、僅か 7 日後には、収縮筋肉の (より小さな) 領域が E14 ES 細胞中において見つかった。収縮領域中の細胞は、α - アクチニンで染色した場合に、筋細胞の特徴的筋節バンドパターンを示した (図 6d 参照)。

40

【0112】

(iii) hEC - および END - 2 共培養

ヒト EC 細胞株 GCT27X は、フィーダーに依存する全能 EC 細胞株であり、ヒト ES 細胞 (Pera 著、(1989 年)、Differentiation、第 42 巻、10 ~ 23 頁) に類似の特徴を有する。END - 2 細胞との共培養において、大きな凝集塊の形成が観察された (図 3d)。しかしながら、3 週間後でも、収縮筋肉の証拠は無かった。

50

【 0 1 1 3 】

(i v) h E S - E N D - 2 共培養

共培養の第 1 週中に、細胞の小さな塊が徐々に広がり分化して、混合形状を有するが上皮様細胞の割合が比較的高い細胞を得る。第 2 週までに、これらは膨張して流体を満たした嚢胞になる（図示せず）。これらの間に、細胞の異なる区画が明らかになり、数日後に収縮するようになる。12～21日の間に、これらの収縮している区画が次第に多く現れる（例えば、図3e）。全体では、15～20%のウェルが収縮筋肉の1または2以上の領域を含む。収縮速度は1分当たり約60回であり、マウスES誘導心筋細胞と比べて高度に温度感受性である。これらの細胞は、 α -アクチニンで陽性に染まり、その筋肉表現型が確認される（図6e）。しかしながら、mESおよびP19EC誘導心筋細胞と対照的に、筋節バンドパターンはあまり定まらないが、培養中で2日しか増殖していない一次ヒト心筋細胞と十分に匹敵している（図5および6a～c）。一次ヒト心筋細胞は初期に筋節構造を維持するが、標準的培養条件により、劣化が迅速になることが明らかである（図5）。hES培養条件は、心筋細胞に最適ではなく、そのために、hES誘導心筋細胞はその特徴的表現型において同様に劣化を示すことが推定される。培地中の幹細胞から十分に機能的な心筋細胞を得るために、これらの条件を最適化することが必要である。筋節構造における劣化にも拘わらず、hES誘導心筋細胞は数週間にわたって周期的に収縮を続け、活動電位は、図4（c）に示すように電極を凝集塊に導入することにより行われる電流固定電気生理学により検出することができる（図4b）。しかしながら、このように電気生理学を行う、すなわち、単一細胞よりも凝集塊において電気生理学を行うことにより、細胞の群の蓄積された結果である活動電位が得られる。従って、これらは理解が困難であり、心室細胞、心房細胞またはペースメーカー細胞のいずれに帰することが困難である。単一細胞について決めるために凝集塊を分離し再培養する作業が現在進行中である。

【 0 1 1 4 】

(v) 幹細胞分化中の心臓イオンチャンネル発現

心臓発育中に、成体活動電位のその後の相の原因となるイオン電流が生じる順番が、電気生理学的研究において確立された（Daviesら著、（1996年）、Circ. Res. 第78巻、15～25頁）。内向きL型 Ca^{2+} 電流は、初期心臓胚形成において重要な役割を果たすが、内向き Na^{2+} 電流は、出産直前にしか上昇しない（Daviesら著、1996年）。マウスESおよびP19EC細胞は、イオン電流発現において同様のタイミングを示す（Wobusら著、（1994年）、In Vitro Cell. De. Biol. 第30A巻、425～434頁）。P19EC細胞の分化中の分子水準でのイオンチャンネル発現の順序を解明するために、我々は、未分化かつ16日齢の、-40～-60mVの比較的陽性の膜電位（IK1が無いまたは少し）であるP19誘導心筋細胞の収縮塊から単離されたRNAについてRT-PCRを行った。これらの結果は、mES誘導心筋細胞について先に記載（Doevendansら著、（1998年）、cardiovasc. Res. 第39巻、34～39頁）したように、16日齢のP19心筋細胞がイオンチャンネル発現に関して胎児心筋細胞に似ていることを示している。

【 0 1 1 5 】

本明細書に記載の作業の結果は、VE様細胞が、多能性細胞の心筋細胞への分化を誘導／促進することを示している。これらの細胞は、胚における心臓発育の領域に通常隣接するものに類似の細胞に由来する誘導因子に反応することが始めて示された多能性マウスEC細胞、マウスESおよびヒトES細胞を含む。

【実施例5】

【 0 1 1 6 】

[内臓内胚葉様細胞との共培養により誘導されるヒト胚性幹細胞の心筋細胞分化]

(a) 方法

i) 細胞培養

END-2細胞およびhESを、実施例1に記載のように培養した。全ての実験において、ES Cell International Pte LtdからのhES2細胞株を用

いた。共培養を開始するために、マイトマイシンC (10 µg/ml) で1時間処理した有糸分裂不活性のEND-2細胞培養で、hEC細胞用のフィーダーとして、マウス胚性線維芽細胞(MEF)を置き換えた。次に、共培地を6週間まで成長させ、5日目からの収縮筋肉の領域の存在について評価した。肝臓実質細胞に似ている癌細胞株であるHep G2細胞(Knowlesら著、(1980年) Science 第29巻: 497~9頁)を、10% FCSを含むDMEM中で培養し、1週間に2回継代培養した。END-2細胞のように共培養を開始したが、Hep G2は集密性単層として成長せず、hES細胞がHep G2に選択的に付着した。P19 EC細胞の懸滴培養を開始し、先に記載(Mummaryら著、1991年)のように通常のFCSを用いて、DMEM/ハムF12 (1:1)中に維持し、一方、ノーザンブロット用のRNAを単離するためのEND-2調整培地の存在または不存在下におけるP19胚体のバルク生成を、前述(Mummaryら著、1991年)のように活性炭処理したFCSの存在下に行って、FCS中にレチノイド様活性を有する可能性のある親油性物質により引き起こされる心筋細胞分化の背景水準を低下させた。電気生理学のために、コラーゲナーゼを用いて収縮性凝集塊を分解し、ゼラチン被覆オーバースリップ上に乗せた。

10

【0117】

i i) 免疫組織化学

付着した一次心筋細胞hES誘導心筋細胞を、Ca²⁺およびMg²⁺を含むPBS中の3.0%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定し、次に、PBS中の0.1%トライトンX100で4分間透過性にした。α-アクチニンおよびトロポミオシン(Sigma製)を含む筋節タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて標準的方法により免疫細胞化学を実施した。ミオシン軽鎖(MLC2a/2v)のアイソフォームに特異的な抗体を用いて、心房細胞と心室細胞(Dr Ken Chienから戴いた)とを区別した。Oct-4およびα1c抗体はSigma製である。二次抗体は、Jackson ImmunoResearch Labs. 製である。

20

【0118】

i i i) 一次成体および胎児心筋細胞の培養

一次組織は、標準的インフォームドコンセント手順に従いUniversity Medical Centre, Utrechtの倫理委員会の承認を受けた患者から得た。成体心筋細胞を前述(Mummaryら著、(2002年)、J. Anat. 第200巻: 233~242頁)のように単離し、培養した。胎児心筋細胞を、Langendorffにより灌流された胎児心臓から単離し、穏やかに遠心分離した後に残っている上澄みが、ラミニン被覆オーバースリップに付着した生活力のある心筋細胞を主要量で含んでいたことを除いて同様の方法で培養した。電気生理学のために、細胞を、低カルシウム含量のタイロード緩衝液(Sipidoら著、1998年、Cardiovasc. Res. 第37巻: 478~88頁)中に集め、ガラスウェル中で直接パッチクランプを置換した。

30

【0119】

i v) (半定量的) RT-PCR

RNAを、Trizol(Gibco製)を用いて単離し、M-MLV-RT(Gibco製)を用いて逆転写した。α1c(Van Gelderら著、1999年)、Kv4.3(Calmelsら著、2001年、Ref)およびANF(Kehatら著、2001年、J. Clin. Invest. 第108巻、407~414頁)様のプライマーは前述の如くである。ヒトKvLQT1(センス5'-TTCTTGGCTCGGGGTTTGCC(配列番号7); アンチセンス5'-TGTTGCTGCCGCGATCC TTG(配列番号8); GenBank登録番号AF000571; 生成物寸法723bp)およびβ-チューブリン(センス5'-TGGCTTTTGCCCCCTCTCACCA(配列番号9); アンチセンス5'-CGGCGGAACATGGCAGTGAA(配列番号10); AF141349、369bp)用のプライマーを、Vector NTIソフトウェア(Informax製、North Bethesda、MD、USA)を

40

50

用いて設計した。アニーリング温度および増幅サイクル数：ANF、58、35サイクル； $\alpha 1c$ 、56、38サイクル；Kv4.3、55、35サイクル；KvLQT1、58、32サイクル； β -チューブリン、61、30サイクル。エチジウムブロミド1.5%染色アガロースゲル上で生成物を分析した。

【0120】

v) ノーザンブロット

RNAは、先に記載(Mummaryら著、1990年、Dev. Biol. 第142巻：406～413頁)のようにP19凝集塊から単離され、ポリA+RNAが選択された。

【0121】

vi) 電気生理学

パッチ-クランプ技術の全細胞電圧クランプ構造を用いて33で実験を行った。封鎖達成後、電流固定式に活動電位を測定した。Axopatch 200B増幅器(Axon Instruments Inc. 製、Foster City, CA, USA)を用いて、自発収縮領域における細胞からのデータを記録した。出力信号を、AD/DAC LAB PC+収集ボード(acquisition board)(National Instruments 製、Austin, TX, USA)を備えたペンティアム(登録商標)IIIを用いて2kHzでデジタル化した。抵抗2～4M Ω のパッチピペットを用いた。浴槽培地の組成は、140mMのNaCl、5mMのKCl、2mMのCaCl₂、10mMのHEPESであり、NaOHでpH7.45に調節されている。ピペット組成：145mMのKCl、5mMのNaCl、2mMのCaCl₂、10mMのEGTA、2mMのMgCl₂、10mMのHEPESであり、KOHによりpH7.30に調節されている。

【0122】

(b) ヒトES細胞の心筋細胞分化

本明細書で記載の実験の大部分は、hES2細胞株(Reubinfoffら著、2000年)を用いて行った。細胞を、前述(Mummaryら著、2002年)のように血清含有培地においてマイトマイシンC処理MEF「フィーダー細胞」と共培養することにより未分化状態に維持した。これらの条件下において、培養の塊中の全ての細胞が、oct-4について核染色を示すが、培養の端部における平坦細胞は陰性であった。Oct-4発現は、未分化細胞の表現型特性に関連する。未分化細胞の小さい塊を、新しいマイトマイシンC処理MEFに、またはマイトマイシンC処理END-2細胞の集密性培養に移すことによりhESを二次培養した。これらの条件下で約5日後、上皮細胞が明白になり、次の数日で、流体で満たされた嚢胞になった(図1A)。これらは α フェトリプロテインを染色し、胚体外内臓内胚葉であることが分かる。さらに、10日までに、より固体の凝集塊中で周期的に収縮している種々の全体形状(図1B、3e)の細胞の領域が明らかになった(図1A、3e)。12ウェルプレートのウェルの16～35%が収縮領域を含み、各々を分解し置き換えることにより、3次元構造よりも2次元構造を有する収縮細胞の12個までの新しいコロニーが産生され；これにより、パッチ-クランプ電気生理学によるさらなる特徴付けのために細胞に接触することが容易になる(図4、図9；以下参照)。分解の前後において、hES誘導心筋細胞は1分当たり45～60回収縮し、時には不規則に収縮し；収縮は、カルバコール、イソプレナリンおよびフェニレフリンのような薬理的作動薬に反応してアップレギュレーションされる。

【0123】

心筋細胞をさらに特徴付けるために、多くの筋節タンパク質について免疫蛍光染色を行い、筋節についての生体染色のためにBIDOPY-リオナジンを使用し、イオンチャネルの発現をRT-PCRにより分析した(図8)。各々の場合、一次ヒト胎児(17週)および成体心房および/または心室組織を、制御された参照として用いた。データは、hES誘導心筋細胞が、 α -アクチニンで染色し、別々の束に構成した場合、筋節線条を呈することを示した(図2)。これらは、胎児心筋細胞で観察された束を暗示するが、個

10

20

30

40

50

々の筋節はあまり良好に構成されておらず、成体ヒト心臓の生検からの心室細胞において観察される高度に構成された平行束と全く異なる。

【0124】

(c) h E S / E N D - 2 共培養における心臓イオンチャンネルおよび幹細胞 / 筋節マーカーの発現

心臓特異的イオンチャンネルの発現を、未分化 h E S 細胞および、E N D - 2 細胞との共培養の 9 日および 14 日後の分化細胞において判定した (図 8)。先に他で示されている (K e h a t ら著、2001 年) ように、収縮している h E S に由来する心筋細胞の領域は A N F を発現する。心臓特異的 L 型カルシウムチャンネル ($\alpha 1 c$) および一時的外向きカルシウムチャンネル (K v 4 . 3) の α - サブユニットの発現も検出され、K v 4 . 3 の発現は、収縮の開始より数日間早い。遅延整流カリウムチャンネル K v L Q T 1 用の R N A は、未分化細胞において見られ、これは、初期分解中に消滅し、やや後の段階において再び現れる。

【0125】

(d) 電気生理学

h E S 心筋細胞の解離し再培養した凝集塊のパッチクランプ電気生理学は、胎児起源の一次ヒト心筋細胞 (図 9 B) に匹敵する範囲の (電氣的) 表現型が培養中に存在する (図 9 A) ことを示した。心室様活動電位が主要であった (31 決定のうち 28) が、心房細胞とペースメーカー様細胞の両方共が存在した (それぞれ、31 決定のうち 2 および 1)。注目すべきは、比較的遅い上昇速度 ($7.0 \pm 0.8 \text{ V/s}$) および低い膜電位 (図 9 A) であり、これは、細胞が、妊娠 17 週の胎児ヒト心筋細胞と比較しても比較的未熟であったことを示している。細胞が収縮していないが収縮領域から区別できない形状を有する共培養の領域において、電流注入は、繰り返し活動電位および持続する規則的収縮を誘導するのに充分であった。さらに、h E S 細胞と H e p G 2 細胞との共培養により、h E S - E N D - 2 共培養におけるものと類似の活動電位を有する心筋細胞が得られた。

【0126】

収縮している h E S 心筋細胞の群におけるカルシウム過渡電流も、F u r a - 2 を用いて実時間で決めることができ、蛍光放射スペクトルは、細胞内カルシウム濃度に依存する。図 9 B は、繰り返し Ca^{2+} 過渡電流が h E S 心筋細胞において発生し、明らかな電気伝導度測定セルの不存在下に収縮する性能を反映していることを示している。

【0127】

(e) E N D - 2 調整培地の、P 19 E C 細胞の凝集塊への効果

我々は、先に (M u m m e r y ら著、1991 年)、E N D - 2 細胞により 24 時間調節した培地が、その分化を誘導することができ、それにより、懸滴が収縮筋を含むので、3 日間成長後の殆ど全ての凝集塊が 10 日以内に再び培養されることを示した。正規 F C S の存在下に、分化が、背景水準を越えて著しく高められる。背景分化水準は、F C S が活性炭カラム (D C C - F C S) 上を通過して残留レチノイドが除去される場合、実質的に 0 に低下し; さらに、アクチビンにより分化が阻害される (v a n d e n E i j n d e n - v a n R a a i j ら著、1991 年、M e c h . D e v . 第 33 巻: 157 ~ 166 頁)。E N D - 2 C M を、M E F 上で培養した h E S 細胞と m E S 細胞の両方について試験した (M E F がないと、細胞は間接的に死ぬ / 分化する) が、M E F により分泌された分化阻害活性を超えることはできなかった。P 19 E C はアッセイ系が好ましい、それは、これらの細胞が、未分化成長についてフィーダーに依存しないからである。これらの実験は、P 19 E C 細胞の 2 つの独立したクローンにおいて、再培養した凝集塊における心筋細胞の外観の促進において投与量依存的効果を有することを示している (図 10 A)。より重要なことは、効果が、発生期の中胚葉の分化への初期の効果に関連すると思われる; ノーザンブロット分析は、最初の 3 日間の凝集相における初期中胚葉マーカー B r a c h y u r y T (H e r m a n n 著、1991 年) を E N D - 2 C M がアップレギュレーションし (図 10 B)、その水準が培養直後は維持されるが、9 日後には、B r a c h y u r y T がもはや検出不可能であることを示している。さらに、B r a c h y u

ry Tの誘導が、アクチビンのさらなる存在により阻害(図10B)、これは、凝集塊中の収縮筋肉の形成を阻害する性能に一致している。Brachyury Tの一時的発現が、マウス胚の原腸形成中の初期の中胚葉分化中に発見される発現に類似している。

【0128】

ヒト胚幹(hES)細胞が細胞移植治療による病気の治療における性能を得るべき場合、維持成長の制御および特定の分化経路を誘導する性能が必須である。

【0129】

従って、マウスからの内臓内胚葉様細胞と共にhES細胞を共培養すると、分化プログラムが始まり、収縮筋細胞が形成されることが示されている。筋節マーカータンパク質およびイオンチャンネルの発現は、これらの細胞が心筋細胞であることを示しており、単一細胞についてのパッチ-クランプ電気生理学は、大部分が心室の表現型であることを示している。この系は、通常達成が困難である、培地におけるヒト心筋細胞の研究のためのモデルを提供し、虚血性心臓疾患において失われた心室細胞の置換が心臓機能の回復を補助すると想像される場合の心筋細胞移植治療の可能性を提供する。これは、体細胞系への自発的分化を起こさないhES細胞株における心筋細胞分化の誘導を始めて示すものである。

【実施例6】

【0130】

[マウスにおける心筋梗塞モデル]

幹細胞誘導心筋細胞が心臓機能を回復する性能を試験するために、マウスにおいてMIモデルを開発した。ペントバルビタール麻酔した成体マウスにおいて、胸部を胸骨中央から開く。前下降枝を確認し結さつする。首尾良い手順により、遠位心筋の変色を誘導する。胸部を、3回の縫合により閉じ、動物を回復させる。合計で、17匹の動物を手術した。7匹は、縫合の位置決めを含む偽手順を行い、10匹は結さつした。MIの4週間後、同じ薬剤を用いて腹腔内注射によりマウスを再び麻酔した。血行力学的研究のために、動物をインキュベートし、げっ歯類の人工呼吸器に接続した(Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten Germany)。機器を使用して胸部を閉じてカテーテルを頸静脈に導入した。

【0131】

1.4フレンチコンダクタンス-マイクロマノメーター(Millar Instruments製、Houston, TX, USA)を、頸動脈を通して左心室に入れた。Sigma SA電子装置(CD Leycom, Zoetermeer, the Netherlands)を用いて圧力およびコンダクタンスを測定し、オフライン分析のために貯蔵した。正常心臓において記録された典型的圧力体積(PV)ループを図7(a)に示す。PV-ループから、収縮末期PV関係(ESPVR)および前負荷漸増拍出仕事量(PRSW)を含む多くの血行力学的パラメーターを推測することができる。

【0132】

最後に、前述の発明は、特定した以外の変化、修飾および/または付加を設けることができ、本発明は全てのそのような変化、修飾および/または付加を含むと解され、種々の他の修飾および/または付加が前述の説明の範囲に入ると解される。

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】図1Aは、13日後のEND-2細胞と共培養したヒト胚性幹細胞(hES)の位相差顕微鏡写真を示す図である。分化した幹細胞は、混合形状を有するが、上皮様細胞の割合が比較的高い。上皮細胞は膨張して流体充填嚢胞になり、これらの細胞の間に心筋細胞のパッチがある。示されるコロニーの断面は約2mm(対物レンズ40×)である。目盛り棒=100μm。図1Bは、2~3週間後のEND-2細胞と共培養したヒト胚性幹細胞(hES)の位相差顕微鏡写真を示す図である。収縮心筋細胞(心筋細胞;bm)のパッチの増加がある。観察された収縮速度は、1分当たり約60回収縮である(対物レンズ20×)である。目盛り棒=100μm。

【図2】 α -アクチニンで陽性染色された細胞を示し、本当の筋細胞であることを確認する図である。目盛り棒 = 100 μ m。

【図3】マウス内臓内胚葉様細胞系 END-2 と幹細胞との共培養を示す図である。(a) 正常単層培地における P19EC、END-2 細胞との共培養の開始から3日後および、収縮筋肉(B.M.)が明らかな場合には10日後。(b) 正常「フィーダー」細胞上の単層における mES 細胞株 R1 (SNL)、共培養の開始から3日後および、収縮筋肉が明らかな場合には2日後。(c) は凝集から7日後に B.M. が明らかであることを除いて(b)と同様。(d) マウス胚性線維芽細胞(MEF)供給細胞上の GCT27X ヒト EC 細胞株、共培養の開始から3日後および、16日後。収縮筋肉が存在しない。(e) MEF フィーダー上の hES 細胞、END-2 共培養の開始から3日後および、11日後に収縮筋肉が形成。

10

【図4】幹細胞からの心筋細胞の電気生理学的特性を示す図である。自発的に収縮している領域から記録された繰り返し活動電位。(a) マウス P19EC 細胞誘導心筋細胞。(b) hES 誘導心筋細胞の凝集塊。(c) (b) に示す記録が由来する hES 培地の収縮領域の位相差像。(収縮領域が配される突起構造の高さに注目、対物レンズ 20 $\times$)。

【図5】単離心筋細胞を示す図である。(a) 2日間培養した細胞と比較して鋭い端部および良好に形成された筋節を示す。(b) 筋節パターンを崩した。(a) は単離および固定後の複数細胞の位相差像。(b) は、(a) と比べて2倍にデジタル的に拡大した単一細胞。

【図6】成人ヒト一次心房心筋細胞および幹細胞誘導心筋細胞についての免疫細胞化学を示す図である。一次心房心筋細胞は、(緑色) α アクチン、(赤色)m1c-2a(a) およびトロポミオシン(b)を含む筋節タンパク質について陽性に染色された。細胞DNAを、Hoechstで(青色に)染色して、正常細胞とアポトーシス細胞とを区別した。2日間培養した細胞は、崩れたトロポミオシン筋節パターンおよび散漫な抗体染色を示した(c)。mES 誘導心筋細胞も、 α アクチンで染色した場合に鋭いバンドを示す(d)が、hES 誘導心筋細胞では、 α -アクチニンが散漫で、あまりバンド形成していない(図示せず)。(e) は、低倍率で、hES 誘導心筋細胞における全体としての強度の α -アクチニン染色を示す。

20

【図7】マウスにおける左心室機能の血行力学的査定を示す図である。(a) 正常ループは、マウス心臓における体積変化と圧力変化との間の関係を表し、収縮および弛緩の1サイクル中の弁に関する事項および段階が示される。(b) 心筋梗塞の4週間後の圧力体積関係：ループの形状の相違、および収縮と弛緩とにおける変化に注目。

30

【図8】RT-PCRによるhESとEND-2細胞の共培養における心筋細胞マーカー mRNA の発現を示す図である。

【図9】A. パッチクランプ電気生理学による活動電位およびイオンチャンネルおよび Ca^{2+} の実時間分析の分析を示す図である。

【図10】P19胎児性癌細胞へのEND-2調整培地の効果を示す図である。A. P19EC凝集塊における収縮筋肉の誘導。7日目および8日目における2つの独立クローン(P19ECおよびP19クローン6EC)からの結果を示す。全ての凝集塊は、10日目にDMSOの存在下に収縮する。B. P19EC凝集塊におけるEND-2調節培地によるBrachyury Tの誘導を示すノーザンブロット。DMSOは心筋細胞分化も誘導し、対照として示される。END-2CMとDMSOの両方が誘導したBrachyury T発現はアクチビンにより阻害される。

40

【図 1】

Figure 1A

hES細胞は、END-2細胞との共培養で分化する
hESは原形筋肉の領域を表し、cyは多くの細胞性胚性内胚構造上のものを表す

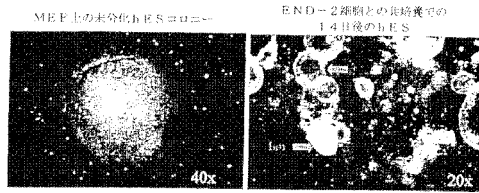
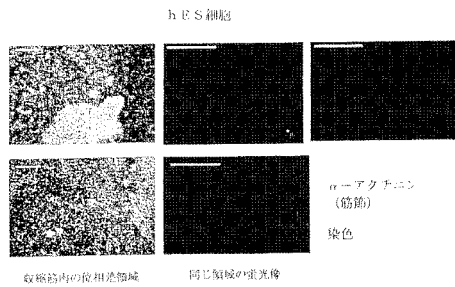


Figure 1B

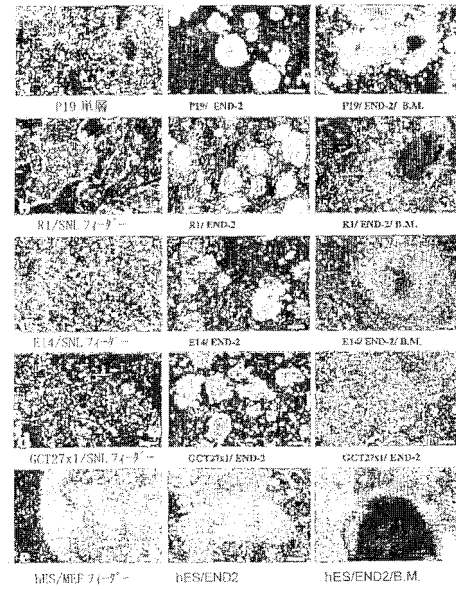
【図 2】

Figure 2



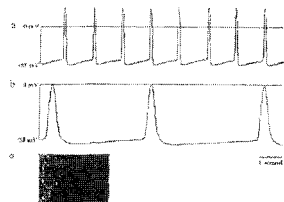
【図 3】

Fig.3.



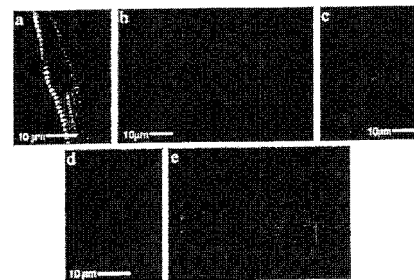
【図 4】

Fig. 4 非分解 hES 心筋細胞からの活動電位



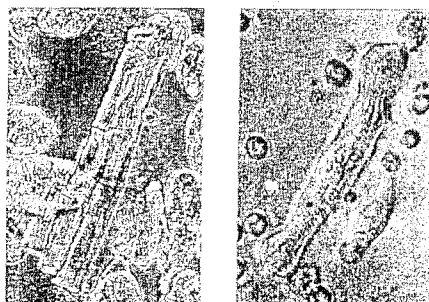
【図 6】

Fig. 6.



【図 5】

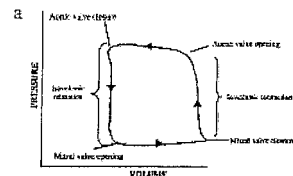
Fig. 5 成人ヒト心筋細胞



【図 7】

Fig. 7

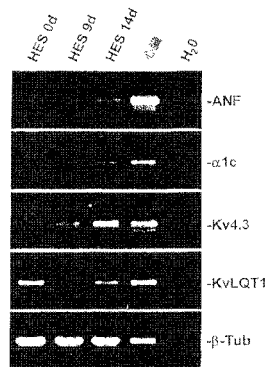
対照



梗塞後

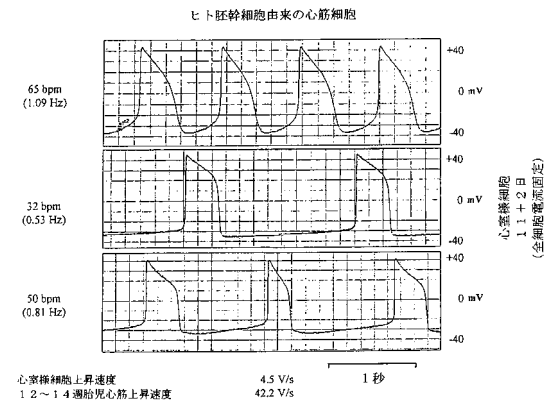
【図 8】

Figure 8



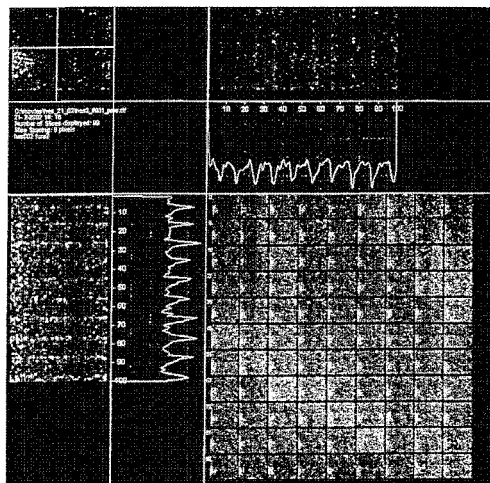
【図 9 A】

Figure 9A



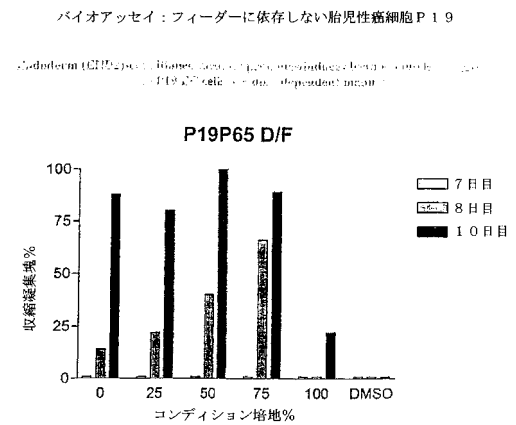
【図 9 B】

Figure 9B



【図 10 A】

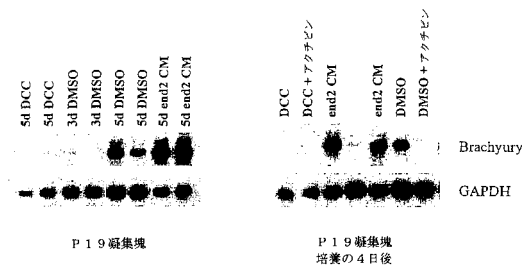
Figure 10A



DCC-FCSを有する非コンディショニング培地における非収縮バックグラウンド0~5%
P19クローンの5つのうち2つが、ここでEND2-CMに反応する：フィーダー依存
hESおよびmESは反応しない

【図 10B】

Figure 10B



フロントページの続き

- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (74)代理人 100114591
弁理士 河村 英文
- (74)代理人 100118407
弁理士 吉田 尚美
- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (72)発明者 ママリー, クリスティン・リンゼイ
オランダ国, エヌエル - 3 7 2 3 デーイェー ビルトホーフェン, ハーセブルークラーン 4 3

合議体

審判長 鈴木 恵理子
審判官 植原 克典
審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第00/70021(WO, A1)
国際公開第98/43679(WO, A1)
Differentiation, Vol. 46, pp. 51 - 60 (1991)
Develop. Dynamics, Vol. 210, pp. 344 - 353 (1997)
Molecular Medicine, Vol. 6, No. 2, pp. 88 - 95 (2000)
)
FASEB J., Vol. 14, pp. 2540 - 2548 (2000)
Cytotechnology, Vol. 30, pp. 211 - 226 (1999)
Dev. Dynamics, Vol. 217, pp. 327 - 342 (2000)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed