(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5646990号
(P5646990)

(45)発行日　平成26年12月24日(2014.12.24)　(24)登録日　平成26年11月14日(2014.11.14)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	5/0789	(2010.01)	C12N	5/00	202Q
A61K	35/14	(2006.01)	A61K	35/14	Z
A61P	7/06	(2006.01)	A61P	7/06	
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N	9/99	(2006.01)	C12N	9/99	

請求項の数 12　(全 45 頁)

(21)出願番号　特願2010-506243 (P2010-506243)
(86)(22)出願日　平成20年4月23日 (2008.4.23)
(65)公表番号　特表2010-524499 (P2010-524499A)
(43)公表日　平成22年7月22日 (2010.7.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/005230
(87)国際公開番号　WO2008/133904
(87)国際公開日　平成20年11月6日 (2008.11.6)
審査請求日　平成23年4月25日 (2011.4.25)
(31)優先権主張番号　60/926,065
(32)優先日　平成19年4月23日 (2007.4.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/066,693
(32)優先日　平成20年2月22日 (2008.2.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

前置審査

(73)特許権者　508297654
ストワーズ　インスティテュート　フォー　メディカル　リサーチ
アメリカ合衆国, ミズーリ　６４１１２, カンザス　シティ, イースト　フィフティ　ース　ストリート　１０００
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】幹細胞自己複製のための方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られた造血幹細胞（ＨＳＣ）の集団を増大させるための方法であって、該方法は、該ＨＳＣを（ａ）可逆的ホスファターゼテンシンホモログ（ＰＴＥＮ）阻害剤、及び（ｂ）可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤と接触させることを含む方法。

【請求項２】

実質的に未分化の造血幹細胞（ＨＳＣ）集団のエキソビボでの増大のための方法であって、該ＨＳＣを（ａ）可逆的ＰＴＥＮ阻害剤、及び（ｂ）可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤と接触させて、該幹細胞集団の著しい分化を伴うことなく未分化幹細胞の数を増大させることを含む、方法。

【請求項３】

末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られた造血幹細胞（ＨＳＣ）集団をエキソビボで増大させるための方法であって、該方法が、該ＨＳＣを（ａ）可逆的ＰＴＥＮ阻害剤、及び（ｂ）可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤と接触させて、該ＨＳＣ集団の多系列分化能は維持したまま、該ＨＳＣ集団を、続いてのそれを必要としている患者への移植に足る十分な量まで増大させることを含む、方法。

【請求項４】

前記可逆的ＰＴＥＮ阻害剤が、シコニン、ビスペルオキソバナジウム化合物、ＳＦ－１７５１（Ｓｅｍａｆｏｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、これらの医薬塩、及び

これらの組み合わせから成る群より選択される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

前記ビスペルオキソバナジウム化合物が、ｂｐＶ（ｐｈｅｎ）２、ｂｐＶ（ｐｉｃ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

前記可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤が、ヒメニアルジシン、フラボピリドール、ケンパウロン、アルステルパウロン、アザケンパウロン、インディルビン－３０－オキシム、６－ブロモインディルビン－３０－オキシム（ＢＩＯ）、６－ブロモインディルビン－３０－アセトキシム、アロイシンＡ、アロイシンＢ、ＴＤＺＤ８、化合物１２、ＣＨＩＲ９８０１４、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＴ９９０２１）、ＣＴ２００２６、化合物１、ＳＵ９５１６、ＡＲＡ０１４４１８、スタウロスポリン、化合物５ａ、化合物２９、化合物４６、ＧＦ１０９２０３ｘ（ビスインドリルマレイミド　Ｉ）、Ｒｏ３１８２２０（ビスインドリルマレイミド　ＩＸ）、ＳＢ２１６７６３、ＳＢ４１５２８６、Ｉ５、ＣＧＰ６０４７４、化合物８ｂ、ＴＷＳ１１９、化合物１Ａ、化合物１７、リチウム、ベリリウム、亜鉛、低分子ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｖｅｒｔｅｘ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＮＰ－１２（Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ａｍｐｈｏｒａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（ＣｒｙｓｔａｌＧｅｎｏｍｉｃｓ）、ＳＡＲ－５０２２５０（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、３５４４（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｌｕｎｄｂｅｃｋ）、ＴＤＺＤ－８（Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ，　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ）、これらの薬理学的に許容される塩、及びこれらの組み合わせ、から成る群より選択される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

前記ＰＴＥＮ阻害剤が、ｂｐＶ（ｐｉｃ）であり、前記ＧＳＫ－３β阻害剤が、ＣＨＩＲ９９０２１である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記造血幹細胞（ＨＳＣ）集団が、臍帯血、末梢血液、及び骨髄から成る群より選択される哺乳類の組織から得られる、請求項２に記載の方法。

【請求項９】

造血幹細胞（ＨＳＣ）集団を、それを必要としている患者への続いての移植のために増大させるためのキットであって、該キットは、ＰＴＥＮ阻害剤、ＧＳＫ－３β阻害剤、及び該阻害剤の使用説明書を含む、キット。

【請求項１０】

前記ＰＴＥＮ阻害剤が、シコニン、ｂｐＶ（ｐｈｅｎ）２、ｂｐＶ（ｐｉｃ）、ＳＦ－１７５１（Ｓｅｍａｆｏｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択され、前記ＧＳＫ－３β阻害剤が、ヒメニアルジシン、フラボピリドール、ケンパウロン、アルステルパウロン、アザケンパウロン、インディルビン－３０－オキシム、６－ブロモインディルビン－３０－オキシム（ＢＩＯ）、６－ブロモインディルビン－３０－アセトキシム、アロイシンＡ、アロイシンＢ、ＴＤＺＤ８、化合物１２、ＣＨＩＲ９８０１４、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＴ９９０２１）、ＣＴ２００２６、化合物１、ＳＵ９５１６、ＡＲＡ０１４４１８、スタウロスポリン、化合物５ａ、化合物２９、化合物４６、ＧＦ１０９２０３ｘ（ビスインドリルマレイミド　Ｉ）、Ｒｏ３１８２２０（ビスインドリルマレイミド　ＩＸ）、ＳＢ２１６７６３、ＳＢ４１５２８６、Ｉ５、ＣＧＰ６０４７４、化合物８ｂ、ＴＷＳ１１９、化合物１Ａ、化合物１７、リチウム、ベリリウム、亜鉛、低分子ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｖｅｒｔｅｘ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＮＰ－１２（Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ａｍｐｈｏｒａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（ＣｒｙｓｔａｌＧｅｎｏｍｉｃｓ）、ＳＡＲ－５０２２５０（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、３５４４（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｌｕｎｄｂｅｃｋ）、ＴＤＺＤ－８（Ｃａｎ

ｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ）、これらの薬理学的に許容される塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項９に記載のキット。

【請求項１１】

前記ＰＴＥＮ阻害剤が、ｂｐＶ（ｐｉｃ）であり、前記ＧＳＫ－３β阻害剤が、ＣＨＩＲ９９２０１である、請求項１０に記載のキット。

【請求項１２】

幹細胞集団のエキソビボでの増大を実施するための培地であって、該培地中に存在する生存幹細胞、並びにＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤を、該幹細胞集団の増大を可能とするのに十分な濃度に維持する一方、該幹細胞の多系列分化能を維持するのに適する流体培地を含む培地。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本願は、２００７年４月２３日出願の米国特許出願第６０／９２６，０６５号、及び２００８年２月２２日出願の米国特許出願第６１／０６６，６９３号の利益を主張するものであり、これらの出願はその全文が参照することで本明細書に組み入れられる。

【０００２】

発明の分野

本発明は、幹細胞集団、特に造血幹細胞集団を増大させるための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

造血幹細胞（ＨＳＣ）はクローン原性細胞であり、自己複製（増大）及び、すべての種類の成熟血液細胞を生じさせる多系列分化能（ｍｕｌｔｉｌｉｎｅａｇｅ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）という両方の特性を有する。ＨＳＣは、造血の役割を担っており、増殖及び分化を起こすことによって、自己複製の能力は維持したまま種々の系列の成熟血液細胞を産生する。この自己複製の能力により、ＨＳＣの集団が動物の一生の間維持され、さらに、致死量の放射線を受けたコンジェニックホストの骨髄でのＨＳＣの再増殖を可能とする。

【０００４】

ＨＳＣ発生の初期は、階層的な配列を示し、広範囲の自己複製能力を有する長期（ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ）（ＬＴ－）ＨＳＣから始まり、短期（ｓｈｏｒｔ－ｔｅｒｍ）（ＳＴ－）ＨＳＣ（自己複製能力が限定される）及び増殖性多分化能前駆細胞（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒｓ）（ＭＰＰ）（多分化能の潜在能力は持つが自己複製能力は持たない）に対応する増大状態がこれに続く。ＭＰＰは、分化のためのプライミング又は準備の段階でもある。ＭＰＰは分化して、すべてのリンパ球系列を生じさせる共通リンパ球前駆細胞（ＣＬＰ）、又はすべての骨髄系列を産生する共通骨髄前駆細胞（ＣＭＰ）のいずれかとなることが決まっている。このプロセスの間、より原始的な集団が、より原始的でない細胞の集団を生じさせ、このより原始的でない細胞の集団は、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、及び活性化（又は、一過性の増幅）、並びにＭＰＰからＣＬＰ又はＣＭＰへという決定された系列を含むこのようなプロセスを制御する固有の遺伝的プログラムの大部分は、依然として未知である。

【０００５】

個体の一生の間の血液細胞の生成を一定に維持するために、骨髄のニッチに位置するＨＳＣ（Ｚｈａｎｇ，Ｊ．ｅｔａｌ．Ｎａｔｕｒｅ４２５，８３６－８４１，２００３；Ｃａｌｖｉ，Ｌ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ４２５，８４１－８４６，２００３；Ｋｉｅｌ，Ｍ．Ｊ．，ｅｔａｌ．Ｃｅｌｌ１２１，１１０９－１１２１，２００５；Ａｒａｉ

，Ｆ．ｅｔａｌ．Ｃｅｌｌ１１８，１４９－１６１，２００４）は、静止状態と活性化状態の間のバランスを保つ必要があり、それによって当面の造血に対する要求を満足させ、一方長期的な幹細胞の維持も確保される。成体の場合、幹細胞の静止状態と活性化状態の間の恒常性は、ＨＳＣがその自己複製の能力を喪失することを防ぎ、同時に、進行中の組織の再生を補助するために、重要である（Ｌｉ，Ｌ．ａｎｄ　Ｘｉｅ，Ｔ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｃｅｌｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２１，６０５－６３１，２００５）。幹細胞の過剰な活性化及び増大は、最終的な幹細胞集団の喪失及び腫瘍形成しやすい性質という両方のリスクを有する。幹細胞の活性化に対して重要であるいくつかの因子が明らかにされてはいるが（Ｈｅｉｓｓｉｇ，Ｂ．ｅｔａｌ．Ｃｅｌｌ　１０９，６２５－６３７，２００２）、静止状態と活性化状態の間の移行を決定する分子イベントはよく分かっていない。

【０００６】

ホスファターゼテンシンホモログ（ＰＴＥＮ）は、ＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路の負の制御因子として機能し、これは、細胞の増殖、生存、分化、及び遊走において決定的な役割を担っている（Ｓｔｉｌｅｓ，Ｂ．ｅｔａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２７３，１７５－１８４，２００４）。ＰＥＴＮ腫瘍抑制因子は一般に、調節解除された造血を特徴とする、リンパ系新生物と関連するものを含む腫瘍中で変異を起こす（Ｍｕｔｔｅｒ，Ｇ．Ｌ．Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５８，１８９５－１８９８，２００１；Ｓｕｚｕｋｉ，ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１４，５２３－５３４，２００１）。ＰＴＥＮ欠損は、神経及び胚性幹細胞集団と関連付けられている（Ｇｒｏｓｚｅｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９４，２１８６－２１８９，２００１；Ｋｉｍｕｒａ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１３０，１６９１－１７００，２００３）。しかし、幹細胞中、並びに及び腫瘍形成及び過去の腫瘍の再発におけるＰＴＥＮの役割は分かっていない。

【０００７】

ＰＴＥＮは、ホスファチジルイノシトール３キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）のアンタゴニストとして機能する（Ｍａｅｈａｍａ　Ｔ　＆　Ｄｉｘｏｎ　ＪＥ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２７３：１３３７５－１３３７８．１９９８）。セリンキナーゼＡｋｔは、ＰＩ３Ｋシグナルの下流である（Ｃｒｏｓｓ　ＤＡ，Ａｌｅｓｓｉ　ＤＲ，Ｃｏｈｅｎ　Ｐ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　３７８：７８５－７８９　１９９５）。ＰＴＥＮは、Ａｋｔを阻害し、それによって、β－カテニンの核内集積を阻害することが示されている（Ｐｅｒｓａｄ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１５３：１１６１－１１７４　２００１）。

【０００８】

Ａｋｔは、広範囲の効果を有する。その主たる機能は、生存シグナルを発生し、アポトーシスを阻止することであり、そのβ－カテニンの機能の制御と相補的である（Ｓｏｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，９（１）：５９－７１，２００５）。Ａｋｔは、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（ｍＴＯＲ）、転写因子のフォークヘッドファミリー（ＦｏｘＯ）、ＢＡＤ、カスパーゼ９、マウス微小タンパク質２（ｍｕｒｉｎｅ　ｄｏｕｂｌｅ　ｍｉｎｕｔｅ　２）（Ｍｄｍ２）を含む数多くのタンパク質を通して作用する。

【０００９】

Ａｋｔは、シグナル伝達カスケードを通してタンパク質翻訳を活性化するセリン／スレオニンキナーゼｍＴＯＲを、直接的及び間接的に活性化することができる（ＬｏＰｉｃｃｏｌｏ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇｓ，１８：８６１－８７４，２００７）。間接的な活性化は、結節性硬化症複合体２（ＴＳＣ２）を通して発生し、これは、非リン酸化状態の場合、結節性硬化症複合体１（ＴＳＣ１、ハマルチンとしても知られる）と複合体を形成する。この複合体は、脳内富化Ｒａｓホモログ（Ｒａｓ　ｈｏｍｏｌｏｇ　ｅｎｒｉｃｈｅｄ　ｉｎ　ｂｒａｉｎ）（ＲＨＥＢ）のＧＴＰアーゼ活性を促進し、次にこれが、ｍＴＯＲ活性を下方制御するように作用する。しかし、Ａｋｔによってリン酸化されると、ＴＳＣ１－ＴＳＣ２複合体がＲＨＥＢのＧＴＰアーゼ活性を促進する能力は阻害され、従って、ｍＴＯＲの活性が促進される（Ｃｕｌｌｙ，Ｍ．ｅｔ

ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，６：１８４－１９２，２００６）。ｍＴＯＲは、Ｒｉｃｔｏｒとも複合体を形成することができ、この複合体は、Ａｋｔをリン酸化して活性化することによって、Ａｋｔシグナル伝達カスケード上に正のフィードバックを提供することができる（Ｓａｒｂａｓｓｏｖ，Ｄ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３０７：１０９８－１１０１，２００５）。

【００１０】

Ａｋｔは、ＦｏｘＯを含む転写因子を通して細胞生存も制御する。ＡｋｔによるＦｏｘＯのリン酸化は、ＦｏｘＯを阻害し、結果として、Ｆａｓ－Ｌ、ＩＧＦＢＰ１、及びＢｉｍ等のいくつかのアポトーシス促進性遺伝子の転写が阻害される（Ｄａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９１：２３１－２４１，１９９７；Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ，Ｋ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌ，１４：３８１－３９５，２００２）。

【００１１】

ＦｏｘＯの下流標的の一つは、サイクリンＥ／ｃｄｋ２複合体の強力なインヒビターであるｐ２７（Ｋｉｐ１）である（Ｗｕ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２２：３１１３－３１２２，２００３）。ＦｏｘＯ因子は、ｐ２７の発現を誘発し、これがサイクリンＥ／ｃｄｋ２複合体と結合してその活性を阻害することができ、その結果として細胞の増殖が阻止される（Ｂｕｒｇｅｒｉｎｇ，Ｂ．Ｍ．Ｔ．＆　Ｍｅｄｅｍａ，Ｒ．Ｈ．，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ｂｉｏｌ．，７３：６８９－７０１，２００３）。さらに、Ａｋｔ自体もＴ１５７上のｐ２７を直接リン酸化することができ、その結果として、ｐ２７が核から細胞質へ再分布され、サイクリンＥ／ｃｄｋ２複合体から遠ざかる（同文献）。Ｔ１９８上のｐ２７のリン酸化は、１４－３－３タンパク質へのｐ２７の結合において非常に重要であり、この経路を通して、Ａｋｔはｐ２７の分解を直接促進することができる（Ｆｕｊｉｔａ，Ｎ．，ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７７（３２）：２８７０６－２８７１３，２００２）。

【００１２】

細胞生存の促進におけるＡｋｔの別の標的の一つは、タンパク質のＢｃｌ－２ファミリーのメンバーであるＢＡＤである。Ａｋｔによるリン酸化の非存在下では、ＢＡＤは、ミドコンドリア膜上でＢｃｌ－２又はＢｃｌ－Ｘと複合体を形成し、Ｂｃｌ－２及びＢｃｌ－Ｘの抗アポトーシス能を阻害する（Ｓｏｎｇ，Ｇ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，９（１）：５９－７１，２００５）。Ａｋｔは、セリン１３６上でＢＡＤをリン酸化し、それによってＢＡＤをＢｃｌ－２／Ｂｃｌ－Ｘ複合体から解離させる（Ｓｏｎｇ，Ｇ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，９（１）：５９－７１，２００５；Ｄａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．，１３：２９０５－２９２７，１９９９）。従って、Ａｋｔは、ＢＡＤが媒介するアポトーシスを抑制し、細胞生存を促進する。

【００１３】

さらに、セリン１９６におけるプロカスパーゼ９のリン酸化により、Ａｋｔは、活性形態であって、アポトーシスのイニシエーター及びエフェクターであるカスパーゼ９への、プロカスパーゼ９のタンパク質プロセシングを阻害する（Ｃａｒｄｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８２：１３１８－１３２０，Ｄｏｎｅｐｕｄｉ，Ｍ．＆　Ｇｒｕｔｔｅｒ，Ｍ．Ｇ．，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ．，１４５－１５２，２００２）。

【００１４】

さらに、Ａｋｔは、Ｍｄｍ２／ｐ５３経路を介して細胞生存を制御する。Ａｋｔは、Ｍｄｍ２を直接のリン酸化によって活性化することができ、それによって、Ｍｄｍ２の核内移行又はＭｄｍ２のユビキチンリガーゼ活性の上方制御が誘発される（ＭａｙｏＬ．Ｄ．，Ｄｏｎｎｅｒ　Ｄ．Ｂ．，２００１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９８：１１５９８－１１６０３；Ｇｏｔｔｌｉｅｂ　Ｔ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ，Ｏｃｏｇｅｎｅ，２１：１２９９－１３０３，２００２）。Ｍｄｍ２は、ストレスに反応して細胞死を誘発し得るｐ５３タンパク質を（Ｏｒｅｎ　Ｍ．，Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　Ｄｉｆｆｅ

ｒ．，１０：４３１－４４２，２００３）、ユビキチン媒介タンパク質分解においてｐ５３を標的とすることによって（Ｈａｕｐｔ，Ｙ．ｅｔａｌ．，１９９７，Ｎａｔｕｒｅ３８７：２９６－２９９）又はｐ５３のトランス活性化ドメインへ結合することによって、負に制御し、それによって、ｐ５３媒介遺伝子制御が阻害される（Ｍｏｍａｎｄ，Ｊ．ｅｔａｌ．，Ｃｅｌｌ，６９：１２３７－１２４５，１９９２）。ｐ５３の下流標的の一つは、ｐ２１（ＣＩＰ１／ＷＡＦ１）遺伝子である。ｐ５３遺伝子産物は、ｐ２１コード配列の２．４ｋｂ上流に位置する部位へ結合し、この結合部位は、ｐ５３依存的転写制御をもたらす（Ｅｌ－Ｄｅｉｒｙ，Ｗ．Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，７５：８１７－８２５，１９９３）。従って、Ｐ５３の下方制御は、ｐ２１の転写も下方制御する。

【００１５】

ＰＴＥＮは、Ａｋｔ－Ｍｄｍ２経路をアンタゴナイズすることによってｐ５３タンパク質を制御するだけでなく、ｐ５３を直接制御することもできる。第一に、ＰＴＥＮは、ホスファターゼに依存しない方法で、ｐ５３のトランス活性化を促進することができる（Ｔａｎｇ，Ｙ．＆ ＥｎｇＣ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，６６：７３６－７４２，２００６）。第二に、ＰＴＥＮは、核内でｐ３００と複合体を形成し、ｐ５３の活性化された形態であるｐ５３の高いアセチル化を維持する役割を担う（ＬｉＡ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ，２３（４）：５７５－５８７，２００６）。さらには、ｐ５３がＰＴＥＮの転写を活性化することもできる（Ｃｕｌｌｙ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，６：１８４－１９２，２００６）。

【００１６】

Ｗｎｔ経路内での標準シグナル（ｃａｎｏｎｉｃａｌ ｓｉｇｎａｌｓ）は、幹細胞増殖に関与している（Ｋｉｍ，Ｌ．＆ Ｋｉｍｍｅｌ，Ａ．Ｒ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ７：１４１１－１４１９，２００６）。グリコーゲンシンターゼキナーゼ３ベータ（ＧＳＫ－３β）は、Ｗｎｔシグナル伝達経路の一部であり、その主たる基質はβ－カテニンである（Ｈａｇｅｎ，Ｔｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７７（２６）：２３３３０－２３３３５）。標準Ｗｎｔシグナル伝達の非存在下では、ＧＳＫ－３βはβ－カテニンと結合し、β－カテニンをリン酸化し、それによって、ユビキチン化においてβ－カテニンを標的とし、続いてプロテアソームの媒介によって分解されるが、これは、大腸腺腫症（ＡＰＣ）によって媒介される（同文献、Ｍｏｏｎ，Ｒ．Ｔ．ｅｔａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６：１６４４－１６４６．２００２）。標準Ｗｎｔシグナルは、ＧＳＫ－３βからのβ－カテニンの解離を誘発し、それによって、β－カテニンを活性化する（Ｋａｔｏｈ，Ｍ ＆ Ｋａｔｏｈ，Ｍ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．５（９）：１０５９－６４，２００６）。β－カテニンは、次に、核内へ局在化し、そこで遺伝子転写を活性化する（同文献）。

【００１７】

まとめると、ＧＳＫ－３β及びＰＴＥＮの調節によって、ＨＳＣを例とする幹細胞の増殖を促進することができることが、個別に知られ又は示唆された。しかし、そのような知見及び推測は、続いての移植及び生着した細胞系列の再構成のために幹細胞集団を増大させるための臨床的に有用である手法を提供するには不十分であった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１８】

上記の観点から、Ｗｎｔ及びＰＴＥＮシグナル伝達経路間の相互作用を解明し、幹細胞の増殖及び分化の分子制御に対する新たな見識を提供することは有利であろう。そのような見識を用いて、幹細胞をインビボ及びエキソビボにて増大させるための新たな方法及び組成物を提供することも有用であり、このような幹細胞は、適切なレシピエントへ移植するのに十分な種類及び量であろう。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

発明の概要

従って、本発明の一つの態様は、末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られ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、幹細胞の集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して幹細胞の数を増大させることを含む。

【００２０】

本発明の別の態様は、実質的に未分化の幹細胞集団のエキソビボでの増大のための方法である。この方法は、未分化幹細胞集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して、幹細胞集団の著しい分化を伴うことなく未分化幹細胞の数を増大させることを含む。

【００２１】

本発明のさらに別の態様は、末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られた造血幹細胞（ＨＳＣ）集団をエキソビボで増大させるための方法である。この方法は、ＨＳＣ集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して、ＨＳＣ集団の多系列分化能は維持したまま、ＨＳＣ集団を、続いてのそれを必要としている患者への移植に足る十分な量まで増大させることを含む。

【００２２】

本発明の別の態様は、本発明の方法によって作製された、増大され実質的に未分化の幹細胞集団である。関連する態様では、本発明は、本発明の方法によって作製された、増大されたＨＳＣ集団である。

【００２３】

追加の態様は、造血幹細胞（ＨＳＣ）をエキソビボにて少なくとも４０倍に増大させるための方法であって、増大されたＨＳＣは、それを必要とする哺乳類患者へ移植した際にＨＳＣ系列を再構成する能力を有する。この方法は、ＨＳＣの集団を、ＰＴＥＮ阻害剤及びＧＳＫ－３β阻害剤を含む適切な培地で培養することを含む。

【００２４】

本発明のさらなる態様は、続いてのそれを必要としている患者への移植のために、造血幹細胞（ＨＳＣ）集団を増大させるためのキットである。キットは、ＰＴＥＮ阻害剤、ＧＳＫ－３β阻害剤、及びこれらの阻害剤の使用説明書を含む。

【００２５】

追加の態様は、幹細胞集団のエキソビボでの増大を実施するための培地である。この培地は、培地中に存在する生存幹細胞、並びにＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤を、この幹細胞集団の増大を可能とするのに十分な濃度に維持する一方、この幹細胞の多系列分化能を維持するのに適する流体培地を含む。

【００２６】

さらに別の態様は、造血幹細胞（ＨＳＣ）を、それを必要とする患者に投与するための方法である。この方法は、（ａ）適切な培地中、ＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤及びＷｎｔ経路中の分子の調節剤の存在下にて、ＨＳＣ集団を含むサンプルを、サンプル中のＨＳＣの数が患者への移植に十分な数まで増大するのに十分な時間培養すること；（ｂ）ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路調節剤を培養物から除去すること；並びに（ｃ）このＨＳＣを患者へ投与すること、を含む。

【００２７】

本発明のさらなる態様は、骨髄の再構成を、それを必要とする患者に施すための方法である。この方法は、（ａ）適切な培地中、ＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤及びＷｎｔ経路中の分子の調節剤の存在下にて、ＨＳＣ集団を含むサンプルを、サンプル中のＨＳＣの数が患者への移植に十分な数まで増大するのに十分な時間培養すること；（ｂ）ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路調節剤を培養物から除去すること；並びに（ｃ）このＨＳＣを患者へ投与すること、を含む。

【００２８】

別の態様は、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集団を少なくとも４０倍に増大させる結果を得るのに十分な条件下にてＨＳＣの集団を培養することを含み、ここで、増大されたＨＳＣの集団は、それを必要とする哺乳類への移植に適している。

【００２９】
さらに別の態様は、骨髄移植、末梢血液移植、及び臍帯血移植から成る群より選択される移植を必要とする患者を治療するための方法である。この方法は、本発明の方法によって得られたＨＳＣの集団をその患者へ投与することを含む。
【００３０】
さらなる態様は、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）ＨＳＣ集団を含有する組織サンプルを哺乳類から得ること；（ｂ）インビトロにて、サンプルからのＨＳＣ集団を増大させること、を含み、ここで：（ｉ）ＨＳＣ集団は少なくとも４０倍に増大し；及び（ｉｉ）増大したＨＳＣ集団は、レシピエントへの移植後少なくとも４週間、造血系列を再構成する能力を有する。
【００３１】
追加の態様は、造血幹細胞系列の再構成を、それを必要とするレシピエントに施すための方法である。この方法は：（ａ）ＨＳＣ集団を含有する組織サンプルを哺乳類から得る工程；（ｂ）インビトロにて、サンプルからのＨＳＣ集団を増大させる工程であって、ここで：（ｉ）ＨＳＣ集団は少なくとも４０倍に増大し；及び（ｉｉ）増大したＨＳＣ集団は、それを必要とするレシピエントへの移植後少なくとも４週間、造血系列を再構成する能力を有する、工程；並びに、（ｃ）増大したＨＳＣ集団をそれを必要とするレシピエントへ移植する工程、を含む。
【００３２】
本発明のさらなる態様は、造血幹細胞集団の増大を、そのような増大を必要とする哺乳類へ施すための方法である。この方法は、Ｗｎｔ及びＡｋｔの調節剤の治療効果量を、ＨＳＣが哺乳類中で造血系列を再構成する能力を保持した状態でＨＳＣ集団を少なくとも４０倍に増大させるのに十分な時間、哺乳類へ投与することを含む。
【００３３】
本発明のこれらの及びその他の局面を、以下の詳細な説明及び実施例にてさらに開示する。
【００３４】
以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれるものである。本発明は、これらの図面の１若しくは２つ以上を本明細書で提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせて参照することによって、より深く理解することができる。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１－１】図１Ａ乃至Ｋは、構成的活性化β－カテニンと合わせたＰＴＥＮの欠失によって、初期造血前駆細胞の喪失と共に造血幹細胞（ＨＳＣ）の増大が引き起こされていることが全体として示される、一連の棒グラフ及び蛍光活性化細胞走査（「ＦＡＣＳ」）分析である。図１Ａは、Ｓｃｌ－Ｃｒｅネガティブコントロール、及び構成的活性化β－カテニンを有するＳｃｌＣｒｅ$^{+}$ＰＴＥＮ（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）二重変異体（ｄｏｕｂｌｅ　ｍｕｔａｎｔ）、及び各一重変異体（ｓｉｎｇｌｅ　ｍｕｔａｎｔ）の骨髄（上図）並びに脾臓（下図）における系列陰性（ｌｉｎｅａｇｅ　ｎｅｇａｔｉｖｅ）、Ｓｃａ－１$^{+}$Ｋｉｔ$^{+}$（ＬＳＫ）細胞の、ＦＡＣＳ分析によって測定した絶対数（大腿骨＋脛骨あたり）を示す２つの棒グラフである（Ｈａｒａｄａ，Ｎ．，ｅｔ　ａｌ．，ＥｍｂｏＪ，１８（２１）：５９３１－４２　１９９９．Ｙｉｌｍａｚ，Ｏ．Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１：４７５－８２　２００６．Ｚｈａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１（７０９２）：５１８－２２　２００６）。マウスは、タモキシフェン誘導後の１０日目である。ＬＳＫ細胞の二重変異体骨髄中での減少とそれに伴う脾臓中での増大は、骨髄から脾臓への動員を示すものである。Ｓｃｌ－Ｃｒｅは、ＬｏｘＰが隣接（ＬｏｘＰを導入（ｆｌｏｘｅｄ））したＰｔｅｎ及びＣｔｎｎｂ１アレルのコンディショナルノックアウトを達成するために用いられるＨＳＣ特異的タモキシフェン誘導性Ｃｒｅ－リコンビナーゼである（Ｇｏｔｈｅｒｔ，Ｊ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ

，１０５（７）：２７２４－２７３２，２００５）。
【００３６】
【図１－２】図１Ｂ乃至１Ｅは、図に示すように、Ｓｃｌ－Ｃｒｅネガティブコントロール（Ｂ及びＤ）、及び構成的活性化β－カテニンを有するＳｃｌ－Ｃｒｅ$^{+}$ＰＴＥＮ（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）二重変異体（Ｃ及びＥ）の骨髄並びに脾臓における系列陰性、Ｓｃａ－１$^{+}$Ｋｉｔ$^{+}$（ＬＳＫ）細胞のＦＡＣＳ分析の代表的な結果を示す。左側のボックスは、Ｓｃａ－１$^{-}$Ｋｉｔ$^{+}$（初期造血前駆細胞）を、右側のボックスは、Ｓｃａ－１$^{+}$Ｋｉｔ$^{+}$（ＬＳＫ）細胞を示す。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。細胞は、タモキシフェンの誘導後６週間目のマウスから採取した。
【００３７】
【図１－３】図１Ｆ及び１Ｇは、誘導後６週間目での、コントロール、Ｃｔｎｎｂ１、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体の骨髄（Ｆ）及び脾臓（Ｇ）における大腿骨及び脛骨あたりのＬＳＫ細胞の絶対数を示す棒グラフである。ＬＳＫのパーセントが二重変異体で上昇する一方（図１Ｃ参照）、二重変異体由来の骨髄の低い細胞性のため、絶対数はコントロールと比較してゆるやかな上昇しか得られていない。
【００３８】
【図１－４】図１Ｈは、誘導後６週間目での、コントロール、Ｃｔｎｎｂ１、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体の骨髄における、Ｆｌｋ２$^{-}$（長期再構成（ＬＴ）－ＨＳＣを示す）であるＬＳＫ細胞のパーセントの、それぞれ棒グラフ及びＦＡＣＳ分析である。Ｃｔｎｎｂ１一重変異体は、この時点ではコントロールと大きく異なってはいない（データ示さず）。
【００３９】
【図１－５】図１Ｉは、誘導後６週間目での、コントロール、Ｃｔｎｎｂ１、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体の骨髄における、Ｆｌｋ２$^{-}$（長期再構成（ＬＴ）－ＨＳＣを示す）であるＬＳＫ細胞のパーセントの、それぞれ棒グラフ及びＦＡＣＳ分析である。Ｃｔｎｎｂ１一重変異体は、この時点ではコントロールと大きく異なってはいない（データ示さず）。図１Ｉ中のボックスは、Ｆｌｋ２$^{-}$（ＬＴ ＨＳＣ）細胞を示す。
【００４０】
【図１－６】図１Ｊは、白血病Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体骨髄中のＣＤ４５のＦＡＣＳ分析一式である。ＣＤ４５（高）急性転化細胞（ｂｌａｓｔ ｃｒｉｓｉｓ ｃｅｌｌｓ）を示す（左のパネル、青色ボックス）。コントロール及びＣｔｎｎｂ１変異体には芽細胞集団は見られず、一方、誘導後６週間目のＰｔｅｎ一重変異体マウス１体のうちの１体で小集団が見られた（データ示さず）。右のパネルは、白血病Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体マウス骨髄のＬＳＫ分析を示す。ほんの僅かのＬＳＫ集団を残しての芽細胞への転換（下部左側）に留意されたい（図１Ｃと比較して）。
【００４１】
【図１－７】図１Ｋは、コントロール、Ｃｔｎｎｂ１、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体の骨髄におけるＦＡＣＳ分析によって明らかとした初期造血前駆細胞を示す棒グラフである。共通骨髄前駆細胞（ＣＭＰ）；顆粒球－単球前駆細胞（ＧＭＰ）；巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）；及び共通リンパ球前駆細胞（ＣＬＰ）。
【００４２】
【図２－１】図２Ａ乃至Ｊは、二重変異体ＨＳＣがインビトロ及びインビボで劇的に増大するが分化はしないことを全体として示す一連の写真、棒グラフ、及びＦＡＣＳ分析である。図２Ａは、コントロール、β－カテニン（Ｃｔｎｎｂ１）、Ｐｔｅｎ変異体、及び二重変異体（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）マウスから単離した、１０日間培養の１００個のＬＳＫ細胞を示す一連の写真である（元の倍率１００×）。コントロールでは、細胞数は播種された１００個のＬＳＫから大きく増加していないが、Ｃｔｎｎｂ１一重変異体のＬＳＫは生存していない。対照的に、Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫは、より大きな増殖を見せるが、より不均一であり、このことは、分化がより著しいことを示している。最も大きく最も均一な増大は、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体のＬＳＫから発生している。

【００４３】
【図２－２】図２Ｂは、培養３４日目のＰｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体からのＬＳＫ細胞を示す一式の写真である（元の倍率２００×）（注：野生型コントロールの培養物は４週間を超えて増大することはない；Ｃｔｎｎｂ１変異体の培養物は、１０日間を超えて生存することはない）。Ｐｔｅｎ変異体のＨＳＣ培養物は、著しい細胞の凝集とより不規則な細胞形態で、より不均一に見える。さらに、分化を示す紡錘形状の（ｓｐｉｎｄｌｅ－ｓｈａｐｅｄ）接着細胞（矢印）にも留意されたい。対照的に、二重変異体のＨＳＣ培養物は、均一な形態を示している。従って、Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫは、生存し増大するが、これよりも非常に均一であるＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体のＬＳＫと比べて、より著しい分化を起こしている。
【００４４】
【図２－３】図２Ｃ及びＤは、増大実験の結果を示す棒グラフである。Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫの７週間の培養物をカウントし、ＬＳＫ表現型の保持についてＦＡＣＳによる分析を行った（野生型コントロール及びＣｔｎｎｂ１培養物は、この長さまでインビトロにて生存することはなかった）。Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫの増大が５０倍であるのに対して、二重変異体のＬＳＫは＞１２００倍の増大を起こしている。培養物のＬＳＫの純度は、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１の培養物の方が非常に高く、全生存細胞に対するＬＳＫ表現型の保持率が、Ｐｔｅｎ一重変異体の培養物で約５０％なのに対して、約８５％である。
【００４５】
【図２－４】図２Ｅは、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ細胞の７週間の培養物のＦＡＣＳ分析である（生存系列陰性細胞を予めゲーティング）。ボックス内の領域は、$Ｋｉｔ^{+}$ $Ｓｃａ－１^{+}$（ＬＳＫ）細胞を示す。
【００４６】
【図２－５】図２Ｆは、移植片生着実験（ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ ｅｎｇｒａｆｔｍｅｎｔ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ）を示すＦＡＣＳ分析である。培養５週間目にて（図２Ｂ参照）、Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を再選別し、各々からの１０００個のＬＳＫ細胞（$ＣＤ４５．２^{+}$）を、$２×１０^{5}$個のコンジェニック全骨髄競合細胞（ｃｏｎｇｅｎｉｃ ｗｈｏｌｅ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ）と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射した$ＣＤ４５．１^{+}$レシピエントマウスへ移植した。野生型細胞は５週間の培養で生存しなかったので、別のコントロール群として１０００個の新鮮な野生型ＬＳＫ細胞の移植も行った。移植後４週間目にて、Ｐｔｅｎ又はＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を移植したマウスの末梢血液分析から、いずれも生着は検出されなかった（データ示さず）。移植後５週間目にて、レシピエントマウスからの骨髄を、ドナー生着（$ＣＤ４５．２^{+}$細胞）及びドナーＬＳＫ細胞（$ＣＤ４５．２^{+}ＬＳＫ$）について分析した。図２Ｆ及びＧは、１０００個の新鮮なＬＳＫ細胞（Ｆ）を移植したマウスの骨髄からの代表的なドナー生着（左、ボックス内の領域は$ＣＤ４５．２^{+}$ドナー細胞を示す）及びドナーＬＳＫ細胞生着（右、ボックス内の領域はＬＳＫ細胞を示す）を示す。
【００４７】
【図２－６】図２Ｇは、移植片生着実験（ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ ｅｎｇｒａｆｔｍｅｎｔ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ）を示すＦＡＣＳ分析である。培養５週間目にて（図２Ｂ参照）、Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を再選別し、各々からの１０００個のＬＳＫ細胞（$ＣＤ４５．２^{+}$）を、$２×１０^{5}$個のコンジェニック全骨髄競合細胞（ｃｏｎｇｅｎｉｃ ｗｈｏｌｅ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ）と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射した$ＣＤ４５．１^{+}$レシピエントマウスへ移植した。野生型細胞は５週間の培養で生存しなかったので、別のコントロール群として１０００個の新鮮な野生型ＬＳＫ細胞の移植も行った。移植後４週間目にて、Ｐｔｅｎ又はＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を移植したマウスの末梢血液分析から、いずれも生着は検出されなかった（データ示さず）。移植後５週間目にて、レシピエント

マウスからの骨髄を、ドナー生着（ＣＤ４５．２$^{+}$細胞）及びドナーＬＳＫ細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$ＬＳＫ）について分析した。図２Ｆ及びＧは、１０００個の培養されたＰｔｅｎ：ＣｔｎｎｂｌのＬＳＫ細胞（Ｇ）を移植したマウスの骨髄からの代表的なドナー生着（左、ボックス内の領域はＣＤ４５．２$^{+}$ドナー細胞を示す）及びドナーＬＳＫ細胞生着（右、ボックス内の領域はＬＳＫ細胞を示す）を示す。

【００４８】

【図２－７】図２Ｈ乃至Ｊは、移植後５週間目にて図２Ｆ及び２Ｇで述べるレシピエントマウスの骨髄から単離した、ドナー（ＣＤ４５．２$^{+}$）細胞（Ｈ）、ドナーＬＳＫ細胞（Ｉ）、及びドナーＬＳＫの倍数の増加（Ｊ）の定量分析を示す棒グラフである。

【００４９】

【図３－１】図３Ａ乃至Ｋは、ＰＴＥＮ／Ａｋｔ及びＷｎｔ／β－カテニンシグナル伝達経路に対するエキソビボでの薬理学的な操作が協同的に機能ＨＳＣの増大を進行させることを示す、概略図、写真、棒グラフ、及びＦＡＣＳ分析である。図３Ａは、Ｗｎｔ及びＰＴＥＮ経路の代表的なメンバーの概略図である。ＧＳＫ－３βの阻害が、ＨＳＣの分化を阻止するβ－カテニンの活性化を誘発する。ＰＴＥＮの阻害が、生存を促進するＡｋｔの活性化を誘発する。両経路共に、単独でＨＳＣの増殖を促進することが示されている。

【００５０】

【図３－２】図３Ｂは、ＨＳＣの写真である。１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を野生型（Ｃ５７Ｂｌ／６）マウスから選別し、（１）培地、（２）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３β阻害剤）、（３）培地＋２００ｎＭ　ビスペルオキソ（ピコリナート）オキソバナジン酸二カリウム塩（ＢｐＶ（ｐｉｃ）、ＰＴＥＮ阻害剤）、及び（４）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）にて培養した。別の選択肢としてのＰＴＥＮ阻害剤、シコニンも、２００ｎＭを単独で（５）又は１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１と組み合わせて（６）用いた。写真は培養１７日目（Ｂ、元の倍率１００×）、及び２３日目（Ｃ、元の倍率４０×）のものである。コントロールと比較して、別々に適用された阻害剤ではいずれも、より大きなＬＳＫ細胞の増大が得られ、このことは、ＧＳＫ－３βの阻害が、Ｃｔｎｎｂ１変異体のＬＳＫで示されるβ－カテニンの構成的活性化と厳密に同等であるわけではないことを示しており、一方、Ｐｔｅｎ変異体のＬＳＫと比較して（図２参照）、ＢｐＶ（ｐｉｃ）では類似の結果が得られている。二重変異体のＬＳＫ（図２）と同様に両方の阻害剤の存在下にて最大の増大が見られる（図３Ｂ、パネル４）。

【００５１】

【図３－３】図３Ｃは、ＨＳＣの写真である。１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を野生型（Ｃ５７Ｂｌ／６）マウスから選別し、（１）培地、（２）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３β阻害剤）、（３）培地＋２００ｎＭ　ビスペルオキソ（ピコリナート）オキソバナジン酸二カリウム塩（ＢｐＶ（ｐｉｃ）、ＰＴＥＮ阻害剤）、及び（４）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）にて培養した。別の選択肢としてのＰＴＥＮ阻害剤、シコニンも、２００ｎＭを単独で（５）又は１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１と組み合わせて（６）用いた。写真は培養１７日目（Ｂ、元の倍率１００×）、及び２３日目（Ｃ、元の倍率４０×）のものである。コントロールと比較して、別々に適用された阻害剤ではいずれも、より大きなＬＳＫ細胞の増大が得られ、このことは、ＧＳＫ－３βの阻害が、Ｃｔｎｎｂ１変異体のＬＳＫで示されるβ－カテニンの構成的活性化と厳密に同等であるわけではないことを示しており、一方、Ｐｔｅｎ変異体のＬＳＫと比較して（図２参照）、ＢｐＶ（ｐｉｃ）では類似の結果が得られている。二重変異体のＬＳＫ（図２）と同様に両方の阻害剤の存在下にて最大の増大が見られる（図３Ｃ、パネル４）。

【００５２】

【図３－４】図３Ｄは、図示した培地条件における培養２８日目のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を示す一連の写真である（元の倍率２００×）。ここで、いずれの阻害剤も別々に存在する場合は、コントロールと比較して著しい増大が観察されているが；しかし、いずれの

阻害剤単一での培養においても、より不定である細胞の大きさ／形態、及び／又は紡錘形状の接着細胞への分化を含む細胞形態の著しい分化／不均一性が観察されている（中央のパネル）。対照的に、そして非常に驚くべきことに、両方の阻害剤の存在下にて、均一性を有する増大が達成されている（最後のパネル）。

【００５３】

【図３－５】図３Ｅは、両阻害剤（２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）及び１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１）を含む培地にて２８日間培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞のＦＡＣＳ分析である。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。ボックス内の領域は、Ｋｉｔ$^{+}$Ｓｃａ１$^{+}$（ＬＳＫ）細胞を示す。９０％を超えるＬＳＫがＦｌｋ２陰性を維持した（データ示さず）。ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$表現型は、両阻害剤を含む培養物中にて高純度で維持されている。

【００５４】

【図３－６】図３Ｆは、図に示した条件における２８日間の培養後の、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞の増大の倍数を示す棒グラフである。両阻害剤を別々に添加した場合は、いずれの阻害剤も含まない培地と比較して著しい増大が誘発されているが、最大の増大（約２７０倍）は、両方の阻害剤を合わせて添加した場合で観察されている。

【００５５】

【図３－７】図３Ｇは、生着したマウスからの再増殖率（％）及びＣＤ４５．２$^{+}$細胞の割合（％）を示す棒グラフである。２８日間の培養物（図３Ｄ乃至Ｆ）をＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞について再選別し、各培地条件からの１０００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$）を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。移植後４週間目にて、ドナー生着（Ｇ）について末梢血液を分析した。図３Ｇでは、各棒グラフが個々のマウスを表しており：横方向の点線は、競合細胞のみを移植されたマウスの平均の「生着」、従って、実際の生着の検出可能限界を表している。長期間（４ヶ月）の生着は２８日間の培養物からは観察されていない（データ示さず）。両阻害剤の存在下にて培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を移植した場合、＞１％の生着を示したのは、ＣＨＩＲ９９０２１のみが存在する場合の４／８、ＢｐＶ（ｐｉｃ）のみが存在する場合の０／１０、及び培地のみの２／６と比較して、８体のうちの６体のマウスである。１パーセント若しくはそれを超える生着は、実質的な生着に対する基準限界である（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）。従って、両阻害剤を合わせて用いることによってＬＳＫの最大の増大が誘発されるが（図３Ｆ）、同等数のこれらの培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞の移植によっても、両阻害剤で培養した場合は、阻害剤なし又は一方の阻害剤単独の場合と比較して、短期的な生着／機能性の上昇が見られる。

【００５６】

【図３－８】図３Ｈは、生着したマウスからの再増殖率（％）及びＣＤ４５．２$^{+}$細胞の割合（％）を示す棒グラフである。２８日間の培養物（図３Ｄ乃至Ｆ）をＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞について再選別し、各培地条件からの１０００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$）を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。移植後４週間目にて、多系列生着（Ｈ）について末梢血液を分析した。

【００５７】

【図３－９】図３Ｉは、（１）培地、（２）培地＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）、（３）培地＋１００ｎＭ　ＣＨＩＲ９９０２１、及び（４）培地＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）＋１００ｎＭ　ＣＨＩＲ９９０２１における９日間の培養後の、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞の増大の倍数を示す棒グラフである。２８日間の培養からは長期間の生着が観察されなかったことから（図３Ｄ乃至Ｈ、データは示さず）、増大及び長期間の再増殖の両方の達成が可能かどうかの試験には、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞は９日間のみの培養とした。こ

こでは２８日間の培養と類似の傾向が観察されるが（図３Ｆと比較して）、増大の度合いは、２８日間の培養と比較して、９日間のみでは著しく低下している。

【００５８】

【図３－１０】図３Ｊは、培地＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）＋１００ｎＭ　ＣＨＩＲ９９０２１で９日間培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞のＦＡＣＳ分析である。ボックス内の領域は、Ｋｉｔ$^{+}$Ｓｃａ－１$^{+}$（ＬＳＫ）細胞を示す。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。９０％を超えるＬＳＫがＦｌｋ２陰性を維持している（データ示さず）。ここで、Ｓｃａ－１及びＫｉｔのレベルは、２８日間の培養から示されるＳｃａ－１$^{(high)}$Ｋｉｔ$^{(high)}$集団と比較して（図３Ｅ）、正常であると思われる。

【００５９】

【図３－１１】図３Ｋは、マウス内での１０日間培養細胞の再増殖率（％）を示す棒グラフである。１０日間の培養物を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。１００個から開始したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を１０日間培養した後の全非接着細胞産物（ｎｏｎ－ａｄｈｅｒｅｎｔ　ｃｅｌｌ　ｐｒｏｄｕｃｔ）を各マウスに移植した。移植後８週間目にて、ドナー生着について末梢血液を分析した。図３Ｈのように、実際の生着を示したマウスすべてから多系列再構成が観察された（データ示さず）。各棒グラフが個々のマウスを表しており：横方向の点線は、競合細胞のみを移植されたマウスの平均の「生着」、従って、実際の生着の検出可能限界を表している。ここで、両阻害剤の存在下で培養されたＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を移植されたマウス７体のうち３体が、１％若しくはそれを超えるドナー生着を示し、これに対して、単一の阻害剤又は阻害剤なしのグループでは、いずれのマウスもこの限界値に達しなかった。

【発明を実施するための形態】

【００６０】

発明の詳細な説明

本発明の一つの態様は、末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られ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、幹細胞の集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して幹細胞の数を増大させることを含む。

【００６１】

本明細書で用いる「増大させる（ｅｘｐａｎｄ）」、「増大させる（ｅｘｐａｎｄｉｎｇ）」、及び類似の用語は、本明細書で開示されるいずれかの方法を用い、インビボ又はエキソビボにて、集団中の幹細胞の数を元の集団中の幹細胞の数に対して増加させることを意味する。増大は、集団中の幹細胞の元の数と比較して少なくとも４０倍であることが好ましい。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８０倍、１００倍、１５０倍、２００倍、２５０倍、又は２７０倍である。

【００６２】

本発明において、「幹細胞の集団」とは、多くの異なる種類の細胞を生じさせる能力を有し、自己複製の能力を有する、実質的に未分化の細胞の群を意味する。本発明に従う幹細胞の代表的な限定されない例としては、気管支肺胞上皮幹細胞（ＢＡＳＣ）、バルジ上皮幹細胞（ｂｕｌｇｅ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ）（ｂＥＳＣ）、角膜上皮幹細胞（ＣＥＳＣ）、心筋幹細胞（ＣＳＣ）、上皮神経冠幹細胞（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ　ｎｅｕｒａｌ　ｃｒｅｓｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ）（ｅＮＣＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、肝臓卵細胞（ｈｅｐａｔｉｃ　ｏｖａｌ　ｃｅｌｌｓ）（ＨＯＣ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、ケラチノサイト幹細胞（ＫＳＣ）、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、膵臓幹細胞（ＰＳＣ）、網膜幹細胞（ＲＳＣ）、及び皮膚由来前駆細胞（ＳＫＰ）が挙げられる。

【００６３】

例えば、造血幹細胞は、自己複製（すなわち、増大）する能力を有し、すべての種類の前駆細胞（例えば、ＣＭＰ、ＧＭＰ、ＭＥＰ、及びＣＬＰ等）、そして最終的にはすべての種類の血液細胞（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、及び血小板等）を、造血系内で生じさせることができる。

【００６４】

本発明において、「調節する」、「調節」、及び類似の用語は、例えば、ＰＴＥＮ及び／又はＷｎｔ経路のタンパク質を例とするシグナル伝達経路を変化させることを意味し、これらに限定されないが、タンパク質の発現レベルを低下若しくは上昇させること、又はそのようなタンパク質の配列を変化させること（変異、翻訳前若しくは翻訳後の修飾、又はその他による）、又はそのようなタンパク質を阻害若しくは活性化すること（結合、リン酸化、グリコシル化、トランスロケーション、若しくはその他による）を含む。そのような調節は、遺伝子的に又は薬理学的に達成することができる。

【００６５】

本明細書で用いる「ＰＴＥＮ経路の調節剤」（又は、「ＰＴＥＮ経路調節剤」）とは、ＰＴＥＮのメンバーのいずれかの活性を調節するいずれの剤をも意味し、それによって、例えば、幹細胞中のβ－カテニンの発現の上昇、及び／若しくは幹細胞中のβ－カテニンの機能の上昇、及び／若しくは幹細胞の核へのβ－カテニンの局在化の増加という結果となり、並びに／又はβ－カテニンに相補的な生存シグナルが提供される。従って、ＰＴＥＮ経路の調節剤は、ＰＴＥＮの上流で作用しても下流で作用してもよく；好ましくは、調節剤は、ＰＴＥＮにて、又はＰＴＥＮから下流にて作用する。ＰＴＥＮの阻害によって、生存を促進するＡｋｔの活性化が誘発される（図３Ａ）。ＰＴＥＮ経路のメンバーの代表的な限定されない例としては、ＰＴＥＮ、ホスファチジルイノシトール　３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）、セリン／スレオニンタンパク質キナーゼＡｋｔ、及びβ－カテニンが挙げられる。

【００６６】

ＰＩ３Ｋ調節剤、特にＰＩ３Ｋ活性化剤の代表的な限定されない例としては、過バナジン酸（Ｍａｕｄｅ　Ｔｅｓｓｉｅｒ　ａｎｄ　Ｊａｍｅｓ　Ｒ．Ｗｏｏｄｇｅｔｔ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２８１（３３）：２３９７８－２３９８９（２００６））、インスリン（Ｈｕｉ，Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０５２（１）：１－９（２００５））、インスリン様増殖因子（Ｋｅｎｎｅｙ，Ａ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，１３１：２１７－２２８（２００４）、及びＤａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９１：２３１－２４１（１９９７））、血小板由来増殖因子（Ｄａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　９１：２３１－２４１（１９９７））、カルバコール（Ｃｕｉ，ＱＬ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ　Ｉｎｔ，４８：３８３－３９３（２００６））、ニコチン（Ｗｅｓｔ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１１１：８１－９０（２００３））、４－（メチルニトロソアミノ）－１－（３－ピリジル）－１－ブタノン（ＮＮＫ）（同文献）、アドレノメデュリン（ＡＭ）（Ｎｉｋｉｔｅｎｋｏ，ＬＬ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９４：１－７（２００６））、リゾホスファチジン酸、血小板活性化因子、マクロファージ刺激因子、及びスフィンゴシン－１－リン酸が挙げられる。

【００６７】

Ａｋｔ調節剤、特にＡｋｔ活性化剤の代表的な限定されない例としては、Ｒｏ－３１－８２２０（Ｗｅｎ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，１５：３７－４５（２００３））；ニコチン（Ｗｅｓｔ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１１１：８１－９０（２００３））；カルバコール（Ｃｕｉ　ＱＬ，Ｆｏｇｌｅ　Ｅ　＆　Ａｌｍａｚａｎ　Ｇ　Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ　Ｉｎｔ，４８：３８３－３９３（２００６））；４－（メチルニトロソアミノ）－１－（３－ピリジル）－１－ブタノン（ＮＮＫ）（Ｗｅｓｔ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１１１：８１－９０（２００３））；アドレノメデュリン（ＡＭ）（Ｎｉｋｉｔｅｎｋｏ，ＬＬ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９４：１－７（２００６））；リゾホスファチジン酸；血小板活性化因子；マ

クロファージ刺激因子；スフィンゴシン－１－リン酸；フォルスコリン、クロロフェニルチオ－ｃＡＭＰ、プロスタグランジン－Ｅ１、及び８－ブロモ－ｃＡＭＰ等のｃＡＭＰ上昇剤（ｃＡＭＰ－ｅｌｅｖａｔｉｎｇ ａｇｅｎｔｓ）（Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，９（１）：５９－７１（２００５））；並びに、インスリン及びインスリン増殖因子－１（Ｄａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９１：２３１－２４１（１９９７））を含む増殖因子、並びに血小板由来増殖因子、が挙げられる。

【００６８】

本発明の追加の好ましい調節剤としては、ｍＴＯＲ、ＲＨＥＢ、ＦｏｘＯ、ｐ２７、ＢＡＤ、カスパーゼ－９、又はｐ５３を標的とするものが挙げられる。そのような調節剤の代表的な限定されない例としては、ホスファチジン酸（ＰＡ）等のｍＴＯＲ調節剤、特にｍＴＯＲ活性化剤（例えば、国際公開第２００６／０２７５４５号；Ｆｏｓｔｅｒ，Ｄ．Ａ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，６７（１）：１－４（２００７）；及び、Ｔｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：３７２８８－９６（２００３）を参照）；ＲＨＥＢ抗体等のＲＨＥＢ調節剤、特にＲＨＥＢ－ＧＴＰアーゼ阻害剤（例えば、国際公開第２００４／０４８５３６号参照）；ＦＫＨＲＬ１の切断型であるＦＫＨ（ＤＢＤ）等のＦｏｘＯ調節剤、特にＦｏｘＯ阻害剤（例えば、Ｇｉｌｌｅｙ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１６２（４）：６１３－６２２（２００３）参照）；ｐ２７アンチセンス阻害剤及び三重鎖形成オリゴヌクレオチド、タンパク質及びペプチドアンタゴニスト等のｐ２７調節剤、特にｐ２７阻害剤（例えば、米国特許第５９５８７６９号参照）；１４－３－３タンパク質等のＢＡＤ調節剤、特にＢＡＤ阻害剤（例えば、Ｓ．Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １１（１２）：１８５８－１８６７（１９９７）参照）；ＬＢ－８４４５１（ＬＧ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びＺ－ＬＥＨＤ－ＦＭＫカスパーゼ阻害剤（Ｔｈｏｒｎｂｅｒｒｙ，Ｎ．Ａ．，ａｎｄ Ｌａｚｅｂｎｉｋ，Ｙ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：１３１２－１３１６（１９９８））等のカスパーゼ－９調節剤、特にカスパーゼ－９阻害剤；並びに、ピフィスリン－α及びその誘導体等のｐ５３調節剤、特にｐ５３阻害剤（例えば、Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｋｏｍａｒｏｖ ｅｔ ａｌ．，２８５（５４３４）：１７３３－１７３７（１９９９），Ｐｉｅｔｒａｎｃｏｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ Ｒｅｓ ６５：４３－４９（２００５）参照）、が挙げられる。

【００６９】

本発明において、「Ｗｎｔ経路の調節剤」（又は、「Ｗｎｔ経路調節剤」）とは、Ｗｎｔ経路のメンバーのいずれかの活性を調節するいずれかの剤であり、それによって、例えば、幹細胞中のβ－カテニンの発現の上昇、及び／又は幹細胞中のβ－カテニンの機能の上昇、及び／又は幹細胞の核へのβ－カテニンの局在化の増加という結果となる。Ｗｎｔ経路の調節剤は、Ｗｎｔの上流で作用しても下流で作用してもよい。好ましくは、調節剤は、ＧＳＫ－３βにて、又はそこから下流にて作用する。Ｗｎｔ経路のメンバーの代表的な限定されない例としては、Ｗｎｔ、７回膜貫通型Ｆｒｉｚｚｌｅｄ（ｓｅｖｅｎ－ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ Ｆｒｉｚｚｌｅｄ）（Ｆｚ）、１回膜貫通型（ｓｉｎｇｌｅ－ｐａｓｓ）、ＬＤＬ受容体関連タンパク質（ＬＲＰ）５／６、アキシン、ディシブルド、グリコーゲンシンターゼキナーゼ３ベータ（ＧＳＫ－３β）、大腸腺腫症（ＡＰＣ）、及びβ－カテニンが挙げられる。ＧＳＫ－３βの阻害により、生存を促進するＡｋｔ活性化が誘発される（図３Ａ）。

【００７０】

本発明の一つの局面では、ＰＴＥＮ経路の調節は、幹細胞の集団に変異を導入することを含み、この変異の結果、ＰＴＥＮ経路中の分子が調節される。本発明において、ＰＴＥＮ経路の調節は、幹細胞を、β－カテニンの活性化を誘発するＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤と接触させることも含む。そのような調節剤の代表的な限定されない例としては、低分子、バイオロジック（ｂｉｏｌｏｇｉｃ）、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。本発明の本局面は、Ｗｎｔ経路を

調節することをさらに含み、これは、Ｗｎｔ経路中の分子が調節される結果となる幹細胞の集団への変異の導入を含む。本発明において、Ｗｎｔ経路の調節は、Ｗｎｔ経路中の分子の調節剤と幹細胞を接触させることも含む。そのような調節剤の代表的な限定されない例としては、低分子、バイオロジック、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【００７１】

本明細書で用いる「変異を導入する」とは、幹細胞集団の遺伝子上の構造に変化を作り出すための従来のいずれの方法をも意味する。幹細胞集団への変異の導入の限定されない例としては、紫外光の照射による変異誘発、化学的変異誘発、幹細胞の部位特異的変異誘発等の標的変異誘発（ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）、及びトランスジェニックマウスの作出が挙げられる。

【００７２】

本発明において、「ＰＴＥＮ経路中の分子の調節」という表現は、ＰＴＥＮ経路のメンバーの機能を変化させることを意味し、変化された機能は、ＰＴＥＮの機能の阻害又は低下と類似の効果を有する。このような「調節」の限定されない例としては、β－カテニンの構成的活性化、Ａｋｔの構成的活性化、又はＰＴＥＮの機能喪失型若しくはヌル対立遺伝子が挙げられる。「Ｗｎｔ経路中の分子の調節」という表現は、Ｗｎｔ経路のメンバーの機能を阻止又は低下することを意味し、これは、ＧＳＫ－３β機能の阻止又は低下と類似の効果を有する。このような調節の限定されない例としては、β－カテニンの構成的活性化、及びＧＳＫ－３βの機能喪失型若しくはヌル対立遺伝子が挙げられる。

【００７３】

「ＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤」は、β－カテニンの活性化を直接又は間接的に引き起こす分子である。このような分子の限定されない例としては、β－カテニンを活性化する、Ａｋｔを活性化する、ＰＩ３Ｋを活性化する、又はＰＴＥＮを阻害するものが挙げられる。「Ｗｎｔ経路中の分子の調節剤」は、Ｗｎｔ経路のメンバーの機能を直接若しくは間接的に阻止又は低下させる分子である。このような分子の限定されない例としては、β－カテニンを活性化するもの、又はＧＳＫ－３β、アキシン、若しくはＡＰＣを阻害するものが挙げられる。

【００７４】

本発明において、「低分子」という用語は、生物学的プロセスに影響を与えるように、特にＷｎｔ及びＰＴＥＮ経路のメンバーを調節するように作用することができる、ポリペプチド及び核酸以外のいかなる化学的又はその他の部分をも含む。低分子は、現在知られている及び用いられている、又は生物学的機能について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て合成することができる、いかなる数の治療薬も含むことができる。低分子は、その大きさによって高分子と区別される。本発明の低分子の分子量は、通常は約５０００ダルトン（Ｄａ）未満であり、好ましくは約２５００Ｄａ未満であり、より好ましくは１０００Ｄａ未満であり、最も好ましくは約５００Ｄａ未満である。

【００７５】

低分子は、限定されることなく、有機化合物、ペプチド模倣体、及びこれらの接合体を含む。本明細書で用いる「有機化合物」という用語は、核酸及びポリペプチド等の高分子以外の炭素を主体とするいかなる化合物も意味する。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、及びその他の元素を含んでいてよい。有機化合物は、芳香族又は脂肪族の形態であってもよい。有機化合物の限定されない例としては、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、及び多価不飽和脂肪、油及びワックス、アルケン、エステル、エーテル、チオール、スルフィド、環状化合物、ヘテロ環化合物、イミダゾール、並びにフェノールが挙げられる。本明細書で用いる有機化合物は、硝酸化有機化合物及びハロゲン化（例：塩素化）有機化合物も含む。

【００７６】

好ましい低分子は、比較的容易に、低いコストにて製造、製剤、又はそうでなければ作製される。好ましい低分子は、種々の保存条件下で安定である。好ましい低分子は、高分子と密接に結びついた形で配置されて、生物学的に活性であり、薬理学的特性が改良された分子を形成することができる。改良された薬理学的特性は、所望の生物学的活性にとって有利である、循環時間、分布、代謝、修飾、排泄、分泌、排出、及び安定性の改変を含む。改良された薬理学的特性は、化学的要素の毒物学的特性及び効力特性の改変を含む。

【００７７】

一般的に、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学的活性を模倣するが、化学的性質がペプチド性ではない分子である。特定の態様では、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）を含まない分子であるが、ペプチド模倣体という用語は、擬ペプチド、半ペプチド（ｓｅｍｉ－ｐｅｐｔｉｄｅｓ）、及びペプドイド等のその特性が完全にペプチド性ではない分子を含むことができる。

【００７８】

本明細書で用いる「バイオロジック」という用語は、化学的プロセスに対するものとして、生物源に由来する生成物を意味する。「バイオロジック」の限定されない例としては、タンパク質、条件培地、及び組織からの部分的に精製された生成物を含む。

【００７９】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書にて交換可能に用いられる。本発明では、これらの用語は、アミノ酸の連結された配列を意味し、天然物、合成物、又は天然物と合成物の修飾物若しくは組み合わせであってよい。この用語は、抗体、抗体模倣体、ドメイン抗体、リポカリン、及び標的プロテアーゼを含む。この用語は、ペプチド又はペプチド断片に対して抗体を産生させる意図でペプチド又はペプチド断片を含有するワクチンも含む。

【００８０】

本明細書で用いる「抗体」は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、若しくはＩｇＥの分類の抗体、又はこれらの断片若しくは誘導体を含み、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｄ、並びに単鎖抗体、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、二重特異性抗体、及び二機能性抗体を含む。抗体は、所望のエピトープ又はそれから誘導される配列との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、アフィニティ精製抗体、又はこ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、本技術分野で公知の化学的部分、ペプチド部分、又はポリペプチド部分の１若しくは２つ以上を結合することによって誘導体化されていてもよい。抗体は、化学的部分と接合していてもよい。抗体は、ヒト又はヒト化抗体であってもよい。これらの及びその他の抗体は、米国特許出願公開第２００７００６５４４７号に開示されている。

【００８１】

その他の抗体様分子も、本発明の範囲内である。そのような抗体様分子としては、例えば、受容体トラップ（ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｔｒａｐｓ）（エンタネルセプト（ｅｎｔａｎｅｒｃｅｐｔ）等）、抗体模倣体（アドネクチン、例えばＣｏｍｐｏｕｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．からのフィブロネクチンに基づく「指向可能な（ａｄｄｒｅｓｓａｂｌｅ）」治療結合分子等）、ドメイン抗体（天然の単一ドメイン抗体の最も小さい機能断片（例：ナノボディ等；例えば、Ｃｏｒｔｅｚ－Ｒｅｔａｍｏｚｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２００４　Ａｐｒ　１５；６４（８）：２８５３－７参照））が挙げられる。

【００８２】

適切な抗体模倣体は、一般に、本明細書で述べる抗体及び抗体断片に対するサロゲートとして用いることができる。そのような抗体模倣体には、有利な特性が付随し得る（例えば、それらは、水溶性、タンパク質分解に対する耐性、及び／又は非免疫原性を有し得る）。例えば、モノクローナル抗体の第二の相補性決定領域（ＣＤＲ）を模倣する合成ベータループ構造を有するペプチドが提案され、作製されている。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、「活性な」抗原認識残基を特定するためのペプチドマッピング、分子モデリング、及び分子動力学軌道分析（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｙｎａｍｉｃｓ ｔｒａｊｅｃｔｏｒｙ ａｎａｌｙｓｉｓ）を用いることによっても作製されており、それによって、複数のＣＤＲからの抗原接触残基（ａｎｔｉｇｅｎ ｃｏｎｔａｃｔ ｒｅｓｉｄｕｅｓ）を含むペプチド擬態が設計される。例えば、Ｃａｓｓｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ．Ｊｕｌ．１８，２００３；３０７（１）：１９８－２０５、を参照されたい。本発明に関連して適用可能であり得る関連する原理、方法等についてのさらなる考察は、例えば、Ｆａｓｓｉｎａ，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ．Ｏｃｔｏｂｅｒ １９９４；５（２）：１２１－９、に提供されている。

【００８３】

本明細書で用いる「ペプチド」は、標的プロテアーゼを含み、これは、例えば、米国特許出願公開第２００６０２７５８２３号等に開示のように、例えば、基質を標的とした翻訳後修飾の阻害の能力を有する。

【００８４】

本明細書で用いる「アンチセンス」分子は、標的ｍＲＮＡ（センス）又はＤＮＡ（アンチセンス）配列と結合する能力を持つ一本鎖核酸配列（ＲＮＡ又はＤＮＡ）を有するアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む。所定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又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力については、例えば、Ｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｏｈｅｎ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４８：２６５９，（１９８８）、及び、ｖａｎ ｄｅｒ Ｋｒｏｌ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：９５８，（１９８８）、に記載されている。

【００８５】

アンチセンス分子は、修飾若しくは未修飾のＲＮＡ、ＤＮＡ、又は混合されたポリマーオリゴヌクレオチドであってよい。これらの分子は、対応する配列と特異的に結合することによって機能し、その結果、立体的に阻止するか又はリボヌクレアーゼＨ酵素を活性化することによってペプチド合成を阻害する（Ｗｕ－Ｐｏｎｇ，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ １９９４，ＢｉｏＰｈａｒｍ，２０－３３）。アンチセンス分子は、ＲＮＡプロセシングの干渉、又は核から細胞質への輸送によってタンパク質合成を改変することもできる（Ｍｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙ ＆ Ｒｏｔｈ，１９９６，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．ｉｎ Ｏｎｃｏｇｅｎｅｓｉｓ ７，１５１－１９０）。さらに、一本鎖ＤＮＡのＲＮＡへの結合の結果、ヌクレアーゼの媒介によるヘテロ二重鎖の分解をもたらすことができる（Ｗｕ－Ｐｏｎｇ，上述）。これまでにリボヌクレアーゼＨに対する基質として作用することが示されているバックボーンが修飾されたＤＮＡの化学は、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（ｂｏｒｏｎｔｒｉｆｌｕｏｒｉｄａｔｅｓ）、並びに２’－アラビノ及び２’－フルオロアラビノ含有オリゴヌクレオチドである。

【００８６】

アンチセンス分子は、国際公開第９１／０４７５３号に記載のように、リガンド結合分子と接合体を形成することによって、標的ヌクレオチド配列を含む細胞へ導入することができる。適切なリガンド結合分子としては、これらに限定されないが、細胞表面受容体、増殖因子、その他のサイトカイン、又は細胞表面受容体と結合するその他のリガンドが挙げられる。リガンド結合分子の接合体形成は、実質的に、リガンド結合分子がその対応する分子若しくは受容体と結合する能力に干渉せず、センス若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその接合した形態が細胞へ侵入することも阻止しないことが好ましい。別の選択肢として、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第９０／１０４４８号に記載のように、オリゴヌクレオチド－脂質複合体を形成することによって、標的核酸配列を含む細胞へ導入することができる。

【００８７】

低分子干渉ＲＮＡ（「ｓｉＲＮＡ」）の用語は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路を誘発す

る低分子阻害ＲＮＡ二重鎖を意味する（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、長さが様々であり得（一般に、１８乃至３０塩基対）、そのアンチセンス鎖に標的ｍＲＮＡに対する種々の度合いの相補性を有し得る。すべてではないが、いくつかのｓｉＲＮＡは、センス鎖及び／若しくはアンチセンス鎖の５’又は３’末端上に、不対オーバーハング塩基を有する。「ｓｉＲＮＡ」の用語は、２本の別々の鎖の二重鎖、並びに二重鎖領域を含むヘアピン構造を形成することができる一本鎖を含む。本明細書で用いるｓｉＲＮＡ分子とは、ＲＮＡ分子に限定されず、さらに、化学的に修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドを包含する。ｓｉＲＮＡのジーンターゲティングは、ｓｉＲＮＡを細胞中へ一時的に移行させることによって実施することができる（リポソーム媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、又はマイクロインジェクション等の従来の方法によって達成される）。

【００８８】

本発明の別の局面では、ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の調節は、幹細胞集団をＰＴＥＮ経路の低分子阻害剤及びＷｎｔ経路の低分子阻害剤と接触させることを含む。ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の調節は、それぞれ、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３βの下方制御を含むことが好ましい。本明細書で用いる「下方制御」とは、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３βの量を抑制する若しくは減少させること、又はその活性を阻害する若しくは低下させることを意味する。このような下方制御は、例えば、アンチセンスＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、抗体、又は低分子を用いて達成することができる。

【００８９】

ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３βの下方制御は、幹細胞集団を：（ａ）低分子、バイオロジック、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される可逆的ＰＴＥＮ阻害剤、及び（ｂ）低分子、バイオロジック、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤、と接触させることを含むことが好ましい。本明細書で用いる「可逆的」とは、下方制御の効果が恒久的ではないことを意味する。本発明では、ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の両方の遺伝子的改変により、長期間の培養の後にインビトロ並びにインビボの両方での自己複製の能力が高められるが、分化することはできず、従って移植レシピエントの造血系を再増殖させることはできない。対照的に、例えばｂｐＶ（ｐｉｃ）及びＣＨＩＲ９９２０１等の両方の経路の可逆的下方制御剤を用いることにより、機能ＨＳＣの増大が可能となるが、（１）下方制御剤が取り除かれると、遺伝子変異体からの培養されたＨＳＣとは異なり、培養されたＨＳＣは分化することができ、及び（２）そのような培養されたＨＳＣが移植された場合、レシピエント動物は、遺伝子変異体が起こすような白血病を発症することはない。

【００９０】

可逆的ＰＴＥＮ阻害剤及び可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤は、いずれも低分子であることが好ましい。一つの局面では、可逆的ＰＴＥＮ阻害剤は、ＰＴＥＮ又はＰＴＥＮ経路の下流メンバーを阻害することができ、その阻害によってβ－カテニンの活性化を誘発する、低分子等のいずれかの分子である。ＰＴＥＮ阻害剤は、シコニン、ビスペルオキソバナジウム化合物、ＳＦ－１７５１（Ｓｅｍａｆｏｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択されることが好ましい。本局面では、ビスペルオキソバナジウム化合物は、ｂｐＶ（ｐｈｅｎ）２、ｂｐＶ（ｐｉｃ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される。

【００９１】

本発明では、可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤は、ＧＳＫ－３βを可逆的に阻害することができるいずれかの分子である。そのような阻害剤は、ヒメニアルジシン（Ｈｙｍｅｎｉａｌｄｉｓｉｎｅ）、フラボピリドール、ケンパウロン（Ｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ）、アルス

テルパウロン（Ａｌｓｔｅｒｐａｕｌｌｏｎｅ）、アザケンパウロン（Ａｚａｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ）、インディルビン－３０－オキシム、６－ブロモインディルビン－３０－オキシム（ＢＩＯ）、６－ブロモインディルビン－３０－アセトキシム、アロイシンＡ（Ａｌｏｉｓｉｎｅ Ａ）、アロイシンＢ（Ａｌｏｉｓｉｎｅ Ｂ）、ＴＤＺＤ８、化合物１２、ＣＨＩＲ９８０１４、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＴ９９０２１）、ＣＴ２００２６、化合物１、ＳＵ９５１６、ＡＲＡ０１４４１８、スタウロスポリン、化合物５ａ、化合物２９、化合物４６、ＧＦ１０９２０３ｘ（ビスインドリルマレイミド Ｉ）、Ｒｏ３１８２２０（ビスインドリルマレイミド ＩＸ）、ＳＢ２１６７６３、ＳＢ４１５２８６、Ｉ５、ＣＧＰ６０４７４、化合物８ｂ、ＴＷＳ１１９、化合物１Ａ、化合物１７、リチウム、ベリリウム、亜鉛、低分子ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｖｅｒｔｅｘ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＮＰ－１２（Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ａｍｐｈｏｒａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（ＣｒｙｓｔａｌＧｅｎｏｍｉｃｓ）、ＳＡＲ－５０２２５０（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、３５４４（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ Ｒｏｃｈｅ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｌｕｎｄｂｅｃｋ）、ＴＤＺＤ－８（Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ, Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ）、これらの薬理学的に許容される塩、及びこれらの組み合わせ、から成る群より選択されることが好ましい。

【００９２】

ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤は、所望のレベルの幹細胞の増大が達成される好都合ないかなる方法によっても幹細胞集団と接触させてよいが、阻害剤が供投与されることが好ましい。さらに、複数のＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤を幹細胞と接触させてもよい。さらに、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤は、幹細胞の自己複製を促進するのに適するその他の剤と合わせて、幹細胞との接触／幹細胞への投与を行ってもよい。好ましくは、ＰＴＥＮ阻害剤はｂｐＶ（ｐｉｃ）であり、ＧＳＫ－３β阻害剤はＣＨＩＲ９９２０１である。

【００９３】

本発明の追加の局面では、幹細胞の数は少なくとも４０倍の倍率で増加する。好ましくは、幹細胞の数は、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍を含む少なくとも１００倍等、少なくとも８０倍の倍率で増加する。驚くべきことに、そして予想外なことに、このようなレベルの幹細胞の増大は、本発明の方法を用いることによって達成される。

【００９４】

上記のように、本発明の方法を用いて、幹細胞のいかなる集団をも増大させることができる。好ましくは、本発明の方法に従って増大することができる幹細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、心筋幹細胞（ＣＳＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、及びこれらの組み合わせから選択することができる。より好ましくは、幹細胞はＨＳＣである。

【００９５】

本発明の別の態様は、実質的に未分化の幹細胞集団のエキソビボでの増大のための方法である。この方法は、未分化幹細胞集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して、幹細胞集団の著しい分化を伴うことなく未分化幹細胞の数を増大させることを含む。

【００９６】

本態様では、集団中の十分な数の細胞が、自己複製の能力を保持し、及び、例えば、ＨＳＣ集団の場合であれば、移植された際にＨＳＣ系列を再増殖させる等、レシピエントに移植された際に様々な種類の分化細胞を生じさせることができる場合、幹細胞集団は「実質的に未分化である」。本明細書で用いる「著しい分化を伴うことなく」とは、増大された幹細胞集団が、全範囲の標的幹系列（ｔａｒｇｅｔ ｓｔｅｍ ｌｉｎｅａｇｅ）を、増大された幹細胞集団をレシピエントへ移植した際に再生することができる多系列分化能を維持するのに十分な数の細胞を有することを意味する。従って、例えば、ＨＳＣ集団の場合、レシピエントに移植されると、増大されたＨＳＣ集団は、造血細胞系列全体を再生することができる。

【００９７】
本発明のさらなる態様は、末梢血液、臍帯血、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られる造血幹細胞（ＨＳＣ）集団をエキソビボで増大させるための方法である。この方法は、ＨＳＣ集団中のＰＴＥＮ経路及びＷｎｔ経路を調節して、ＨＳＣ集団の多系列分化能は維持したまま、ＨＳＣ集団を、続いてのそれを必要としている患者への移植に足る十分な量まで増大させることを含む。
【００９８】
本明細書で用いる、組織から「得られる」とは、ドナーから組織を採取又は分離する従来のいかなる方法も意味する。例えば、組織は、末梢血液若しくは臍帯血サンプル等の血液サンプルから得られてもよく、又は骨髄から採取されてもよい。そのようなサンプルを得るための方法は、当業者に公知である。本発明では、サンプルは、新鮮なもの、すなわち、凍結することなくドナーから得られたものであってよい。さらに、サンプルをさらに処理して、外来性又は望ましくない成分を増大の前に除去してもよい。サンプルは、保存ストックから得てもよい。例えば、末梢血液又は臍帯血の場合、サンプルは、低温貯蔵又はその他の方法で保存されたそのような血液のバンクから引き出してもよい。そのようなサンプルは、適切ないかなるドナーから得てもよい。ドナーは、ヒト等の霊長類を例とする哺乳類が好ましい。さらに、サンプルは、自己若しくは同種のドナー又はサンプル源から得てもよい。サンプルは、自己サンプル源から得ることが好ましい。
【００９９】
本方法において、「多系列分化能を維持する」とは、増大されたＨＳＣ集団が、そのような移植を必要とする患者へ移植された場合に、ＣＭＰ、ＧＭＰ、ＭＥＰ、及びＣＬＰを例とするすべての種類の前駆細胞を作り出し、そして最終的には、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、及び血小板を含むすべての種類の血液細胞を造血系内で作り出す能力を有していることを意味する。
【０１００】
本発明において、「続いての移植に足る」増大されたＨＳＣの量とは、一般に、移植後に約１％超の生着の結果をもたらすであろうＨＳＣの数に対応している。これは、移植の成功に対する一つの公認された尺度である。本発明では、実施例に記載のものを含めて、従来のいかなる方法を用いて生着率を決定してもよい。そのような測定は、競合細胞と共に実施しても、又は競合細胞なしで実施してもよく、通常は、及び好ましくは、競合細胞なしで実施される（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）。
【０１０１】
上述のエキソビボでの増大方法では、ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の調節は、既述のようにして達成することができる。ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の調節は、幹細胞集団をＰＴＥＮ経路の低分子阻害剤及びＷｎｔ経路の低分子阻害剤と接触させることを含むことができる。ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の調節は、それぞれ、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３βの下方制御を含むことができる。ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路の下方制御は、前述のように、幹細胞集団を可逆的ＰＴＥＮ阻害剤及び可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤と接触させることを含むことが好ましい。可逆的ＰＴＥＮ阻害剤及び可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤の両方が低分子であることが好ましい。
【０１０２】
可逆的ＰＴＥＮ阻害剤は、シコニン、ビスペルオキソバナジウム化合物、ＳＦ－１７５１（Ｓｅｍａｆｏｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択することができる。ビスペルオキソバナジウム化合物は、ｂｐＶ（ｐｈｅｎ）２、ｂｐＶ（ｐｉｃ）、これらの医薬塩、及びこれらの組み合わせから成る群より選択されることが好ましい。
【０１０３】

可逆的ＧＳＫ－３β阻害剤は、ヒメニアルジシン、フラボピリドール、ケンパウロン、アルステルパウロン、アザケンパウロン、インディルビン－３０－オキシム、６－ブロモインディルビン－３０－オキシム（ＢＩＯ）、６－ブロモインディルビン－３０－アセトキシム、アロイシンＡ、アロイシンＢ、ＴＤＺＤ８、化合物１２、ＣＨＩＲ９８０１４、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＴ９９０２１）、ＣＴ２００２６、化合物１、ＳＵ９５１６、ＡＲＡ０１４４１８、スタウロスポリン、化合物５ａ、化合物２９、化合物４６、ＧＦ１０９２０３ｘ（ビスインドリルマレイミド　Ｉ）、Ｒｏ３１８２２０（ビスインドリルマレイミド　ＩＸ）、ＳＢ２１６７６３、ＳＢ４１５２８６、Ｉ５、ＣＧＰ６０４７４、化合物８ｂ、ＴＷＳ１１９、化合物１Ａ、化合物１７、リチウム、ベリリウム、亜鉛、低分子ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｖｅｒｔｅｘ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＮＰ－１２（Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ａｍｐｈｏｒａ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（ＣｒｙｓｔａｌＧｅｎｏｍｉｃｓ）、ＳＡＲ－５０２２５０（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、３５４４（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ）、ＧＳＫ－３β阻害剤（Ｌｕｎｄｂｅｃｋ）、ＴＤＺＤ－８（Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ）、これらの薬理学的に許容される塩、及びこれらの組み合わせ、から成る群より選択することができる。

【０１０４】

これらのエキソビボでの増大方法では、ＰＴＥＮ阻害剤はｂｐＶ（ｐｉｃ）であり、ＧＳＫ－３β阻害剤はＣＨＩＲ９９２０１であることが好ましい。これらの方法では、幹細胞は、ＨＳＣ、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、心筋幹細胞（ＣＳＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、及びこれらの組み合わせから選択されることが好ましい。好ましくは、幹細胞はＨＳＣである。これらの方法では、ＨＳＣは、霊長類又はヒトを例とする哺乳類の組織から得られ、組織は、臍帯血、末梢血液、及び骨髄から成る群より選択される。

【０１０５】

造血幹細胞（ＨＳＣ）集団のエキソビボでの増大方法の別の局面では、幹細胞の数の増大は、例えば、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍を含む少なくとも８０倍等、少なくとも４０倍である。

【０１０６】

本発明のさらに別の態様は、例えば、実質的に未分化の幹細胞集団をエキソビボで増大させる方法、又は造血幹細胞（ＨＳＣ）集団をエキソビボで増大させる方法等の本発明の方法によって作製された、増大された実質的に未分化の幹細胞集団である。

【０１０７】

本発明の追加の態様は、造血幹細胞（ＨＳＣ）をエキソビボにて少なくとも４０倍に増大させるための方法であり、ここで、増大されたＨＳＣは、それを必要とする哺乳類患者へ移植した際にＨＳＣ系列を再構成する能力を有する。この方法は、ＨＳＣの集団を、ＰＴＥＮ阻害剤及びＧＳＫ－３β阻害剤を含む適切な培地で培養することを含む。

【０１０８】

本発明の本局面において、「ＨＳＣ系列を再構成する能力を有する」とは、増大されたＨＳＣが、適切な哺乳類患者へ移植された場合に、レシピエント内にて１％超の生着をもたらし、この生着した細胞が、正常に機能する造血系を持つのに必要である細胞系列へ分化することができることを意味する。本方法において、本明細書で交換可能に用いられる「適切な培地」、「流体培地」、及び「培地」とは、幹細胞集団を必要とされる期間維持することができる生理的平衡塩溶液を意味し、この溶液は、本発明のＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β調節剤／阻害剤が補足されていてもよい。このような基本培地は本技術分野で公知である。ＨＳＣのための適切な基本培地の限定されない例は、ＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｍｅｄｉａ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；カタログ番号０９６００）であり、これは、１０μｇ／ｍｌヘパリン、５×ペニシリン／ストレプトマイシン、１０ｎｇ／ｍｌ組換えマウス（ｒｍ）幹細胞因子、及び２０ｎｇ／ｍｌ　ｒｍ－トロンボポエチン

が補足されている。

【０１０９】

通常、培地は、約１００乃至約１０００ｎＭのＰＴＥＮ阻害剤も含む。培地は、約５０ｎＭ乃至約５００ｎＭのＧＳＫ－３β阻害剤をさらに含んでもよい。本発明では、範囲が示された場合、終点を含むその範囲内のいずれの数値をも意図している。培地は、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤の両方を示した濃度で含むことが好ましい。例えば、培地は、ｂｐＶ（ｐｉｃ）をＰＴＥＮ阻害剤として、ＣＨＩＲ９９２０１をＧＳＫ－３β阻害剤として含んでよい。

【０１１０】

本態様の一つの局面では、ＨＳＣは、臍帯血、末梢血液、及び骨髄から選択される、哺乳類の組織から、好ましくは霊長類又はヒトの組織から得られる。本態様では、ＨＳＣの数は、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍を含む少なくとも１００倍等、少なくとも８０倍の倍率で増大する。

【０１１１】

本発明のさらに別の態様は、それを必要としている患者への続いての移植のために、造血幹細胞（ＨＳＣ）集団を増大させるためのキットである。キットは、上述の様に、ＰＴＥＮ阻害剤及びＧＳＫ－３β阻害剤、並びにこれらの阻害剤の使用説明書を含む。好ましくは、このキットにおいて、ＰＴＥＮ阻害剤はｂｐＶ（ｐｉｃ）、ＧＳＫ－３β阻害剤はＣＨＩＲ９９２０１である。このキット及びその構成成分は、流通及び／又は保存のために適切であるいかなる手段によって梱包されていてもよい。

【０１１２】

本発明のさらなる態様は、幹細胞集団のエキソビボでの増大を実施するための培地である。この培地は、培地中に存在する生存幹細胞、並びにＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤を、この幹細胞集団の増大を可能とするのに十分な濃度に維持する一方、この幹細胞の多系列分化能を維持するのに適する流体培地を含む。

【０１１３】

本態様において、「増大を可能とするのに十分な濃度」とは、生着を成功させるのに十分な増大を例とする、所望のレベルの幹細胞の複製を達成するのに十分である、ＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤の最低濃度を意味する。

【０１１４】

本態様の一つの局面では、幹細胞の数の増大は、少なくとも４０倍、少なくとも８０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍から成る群より選択される倍率である。

【０１１５】

本発明のさらなる態様は、造血幹細胞（ＨＳＣ）を、それを必要とする患者に投与するための方法である。この方法は、（ａ）適切な培地中、ＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤及びＷｎｔ経路中の分子の調節剤の存在下にて、ＨＳＣ集団を含むサンプルを、サンプル中のＨＳＣの数が患者への移植に十分な数まで増大するのに十分な時間培養すること；（ｂ）ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路調節剤を培養物から除去すること；並びに（ｃ）このＨＳＣを患者へ投与すること、を含む。本態様において、培地、サンプル、並びにＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β調節剤は既述である。

【０１１６】

本発明の追加の態様は、骨髄の再構成を、それを必要とする患者に施すための方法である。この方法は、適切な培地中、ＰＴＥＮ経路中の分子の調節剤及びＷｎｔ経路中の分子の調節剤の存在下にて、ＨＳＣ集団を含むサンプルを、サンプル中のＨＳＣの数が患者への移植に十分な数まで増大するのに十分な時間培養することを含む。次に、ＰＴＥＮ及びＷｎｔ経路調節剤を培養物から除去する。そして、増大されたＨＳＣを、従来の方法のいずれかによって患者へ投与する。

【０１１７】

本方法において、「骨髄を再構成する」とは、正常な骨髄機能が損なわれる疾患に罹患

する患者の骨髄のすべて又は一部分を回復させることを意味する。そのような疾患の限定されない例としては、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）、及び白血病等の血液の癌が挙げられる。従って、本明細書で用いる「再構成された」とは、移植されたＨＳＣがホストに正常に生着し、通常骨髄で見られる又は骨髄から誘導される細胞系列のすべてに分化することができることを意味する。

【０１１８】

本方法において、「ＨＳＣの数が増大するのに十分な時間」とは、１若しくは２つ以上の移植のために十分な数のＨＳＣが存在する段階まで、培養中のＨＳＣを増大させるための最短の時間を意味する。通常、そのような時間は、少なくとも約１０日間の培養であってよい。特定の状況下では、ＨＳＣを例とする幹細胞集団を、単一の移植に必要とされるレベルを超えて増大させることが望ましい場合がある。例えば、ＨＳＣを例とする幹細胞集団を、例えば、約２乃至１００の移植等、複数の移植に対して十分である数まで増大させることが望ましい場合がある。このような状況では、過剰の細胞は、後の使用のめに、例えば凍結保存等の従来のいかなる方法によって保存してよい。

【０１１９】

前述の「移植に十分な数」とは、レシピエント内にて１％を超える生着を達成するのに必要である、ＨＳＣを例とする幹細胞の最小数を意味する。「患者へＨＳＣを投与する」とは、ＨＳＣを患者へ送達するための従来の方法を意味し、これらに限定されないが、外科手術によって及び／又は静脈を通してＨＳＣを送達することを含む。本態様において、ＨＳＣを得る組織、並びにＰＴＥＮ及びＧＳＫ－３β阻害剤は既述である。

【０１２０】

本発明の追加の態様は、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集団を少なくとも４０倍に増大させる結果を得るのに十分な条件下にてＨＳＣの集団を培養することを含み、ここで、増大されたＨＳＣの集団は、それを必要とする哺乳類への移植に適している。本態様において、「ＨＳＣ集団を増大させる結果を得るのに十分な条件」とは、培養中のＨＳＣが、例えば少なくとも８０倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍等、例えば少なくとも４０倍に増大する結果を得ることができる条件である。「哺乳類への移植に適している」とは、ＨＳＣの数及び性質が、１％を超える生着を、例えばヒトレシピエントを含む霊長類レシピエント等、それを必要としている哺乳類レシピエント内で補助するのに十分であることを意味する。

【０１２１】

本発明のさらに別の態様は、骨髄移植、末梢血液移植、又は臍帯血移植を必要とする患者を治療するための方法であって、この方法は、本明細書で開示される方法、特に、造血幹細胞（ＨＳＣ）の集団を増大させるための方法、によって得られたＨＳＣの集団をその患者へ投与することを含む。

【０１２２】

本発明のさらなる態様は、造血幹細胞（ＨＳＣ）の集団を増大させるための方法である。本方法は、（ａ）ＨＳＣ集団を含有する組織サンプルを哺乳類から得ること；（ｂ）インビトロにて、サンプルからのＨＳＣ集団を増大させること、を含み、ここで：（ｉ）ＨＳＣ集団は少なくとも４０倍に増大し；及び（ｉｉ）増大したＨＳＣ集団は、レシピエントへの移植後、例えば少なくとも８週間等、少なくとも４週間、造血系列を再構成する能力を有する。本態様において、「造血系列を再構成する能力」とは、増大されたＨＳＣ集団が、レシピエントへ移植された場合、レシピエント内にて１％を超えるＨＳＣの生着をもたらすことを意味する。本態様の一つの局面では、ＨＳＣ集団が、例えば、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍を含む少なくとも１００倍等、少なくとも８０倍に増大する。本態様の別の局面では、哺乳類はヒトを含む霊長類である。好ましくは、ヒトは、末梢血液移植、臍帯血移植、又は骨髄移植を必要とする。さらなる局面では、組織サンプルは、臍帯血、末梢血液、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られる。

【０１２３】
本発明の追加の態様は、造血幹細胞系列の再構成を、それを必要とするレシピエントに施すための方法である。この方法は：（ａ）ＨＳＣ集団を含有する組織サンプルを哺乳類から得る工程；（ｂ）インビトロにて、サンプルからのＨＳＣ集団を増大させる工程であって、ここで：（ｉ）ＨＳＣ集団は、例えば、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、又は少なくとも２７０倍を含む少なくとも８０倍等、少なくとも４０倍に増大し；及び（ｉｉ）増大したＨＳＣ集団は、それを必要とするレシピエントへの移植後、例えば少なくとも８週間等、少なくとも４週間、造血系列を再構成する能力を有する、工程；並びに、（ｃ）増大したＨＳＣ集団を、霊長類又はヒトを含む哺乳類等のそれを必要とするレシピエントへ移植する工程、を含む。

【０１２４】
本態様において、「造血幹細胞系列を再構成する」とは、増大したＨＳＣが、レシピエントに移植された場合、造血細胞の１％を超える生着をもたらし、これが正常な造血系列へ分化することができることを意味する。本態様において、ヒトレシピエントは、末梢血液移植、臍帯血移植、又は骨髄移植を必要とする。従って、さらなる局面では、組織サンプルは、臍帯血、末梢血液、及び骨髄から成る群より選択される組織から得られる。サンプルは、自己若しくは同種サンプル源から得てもよい。サンプルは、自己サンプル源から得ることが好ましい。

【０１２５】
本発明において、増大したＨＳＣ集団は、最も原始的な長期未分化ヒトＨＳＣに対するマーカーである、ＣＤ３４$^{-}$若しくはＣＤ３４$^{+}$／ＣＤ３８$^{-/low}$／Ｔｈｙ－１$^{+}$／ＣＤ９０$^{+}$／Ｋｉｔ$^{-/lo}$／Ｌｉｎ$^{-}$／ＣＤ１３３$^{+}$ＶＥＧＦＲ２$^{+}$；ヒトＨＳＣ及びその前駆細胞に対するマーカーである、ＣＤ１５０$^{+}$／ＣＤ４８$^{-}$／ＣＤ２４４$^{-}$；並びに／又は、非自己複製性多分化能造血前駆細胞（ｎｏｎ－ｓｅｌｆ－ｒｅｎｅｗｉｎｇ ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒｓ）に対するマーカーである、ＣＤ１５０$^{-}$／ＣＤ４８$^{-}$／ＣＤ２４４$^{+}$及びＣＤ１５０$^{-}$／ＣＤ４８$^{+}$／ＣＤ２４４$^{+}$、並びに、これらの組み合わせ、から成る群より選択される表現型を有するＨＳＣ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）参照）。

【０１２６】
集団中のこれらのマーカーを有するＨＳＣの正確な割合は、増大したＨＳＣ集団が全体としてレシピエント内で少なくとも１％の生着をもたらすのに十分である限りにおいて、それほど重要ではない。

【０１２７】
別の態様では、本発明は、造血幹細胞集団の増大を、そのような増大を必要とする哺乳類へ施すための方法である。この方法は、Ｗｎｔ及びＡｋｔの調節剤の治療効果量を、ＨＳＣが哺乳類中で造血系列を再構成する能力を保持した状態でＨＳＣ集団を少なくとも４０倍に増大させるのに十分な時間、哺乳類へ投与することを含む。

【０１２８】
本方法では、Ｗｎｔ及びＡｋｔのそれぞれの調節剤は、低分子、バイオロジック、アンチセンスＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はこれらの組み合わせ等、β－カテニンを活性化するために直接又は間接的に作用するいかなる分子であってよい。好ましくは、Ｗｎｔ調節剤は、Ｗｎｔポリペプチド、ＱＳ１１（Ｚｈａｎｇ，Ｑ．ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，１０４（１８）：７４４４－８（２００７））、２－アミノ－４－［３，４－（メチレンジオキシ）ベンジル－アミノ］－６－（３－メトキシフェニル）ピリミジン（Ｌｉｕ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．４４（１３）：１９８７－９

０（２００５））、デオキシコール酸（Ｒ．Ｐａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｅｌｌ．１５（５）：２１５６－６３（２００４））、及びこれらの組み合わせから選択される。好ましくは、Ａｋｔの調節剤は、Ｒｏ－３１－８２２０（Ｗｅｎ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，１５：３７－４５（２００３））；ニコチン（Ｗｅｓｔ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１１１：８１－９０（２００３））；カルバコール（Ｃｕｉ ＱＬ，Ｆｏｇｌｅ Ｅ ＆ Ａｌｍａｚａｎ Ｇ Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ Ｉｎｔ，４８：３８３－３９３（２００６））；４－（メチルニトロソアミノ）－１－（３－ピリジル）－１－ブタノン（ＮＮＫ）（Ｗｅｓｔ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１１１：８１－９０（２００３））；アドレノメデュリン（ＡＭ）（Ｎｉｋｉｔｅｎｋｏ，ＬＬ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９４：１－７（２００６））；リゾホスファチジン酸；血小板活性化因子；マクロファージ刺激因子；スフィンゴシン－１－リン酸；フォルスコリン、クロロフェニルチオ－ｃＡＭＰ、プロスタグランジン－Ｅ１、及び８－ブロモ－ｃＡＭＰ等のｃＡＭＰ上昇剤（Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，９（１）：５９－７１（２００５））；並びに、インスリン及びインスリン増殖因子－１を含む増殖因子（Ｄａｔｔａ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９１：２３１－２４１（１９９７））、血小板由来増殖因子、並びに、これらの組み合わせ、から成る群より選択される。

【０１２９】

本方法では、Ｗｎｔ及びＡｋｔ調節剤は、ＨＳＣが哺乳類中で造血系列を再構成する能力を保持した状態で、ＨＳＣ集団を実質的に少なくとも４０倍に増大させるいかなるレジメンを用いて投与してもよい。Ｗｎｔ及びＡｋｔ調節剤は、同時に投与されることが好ましい。

【０１３０】

本発明において、「治療効果量」とは、有益な、又は所望の結果をもたらすのに十分な量である。哺乳類の治療という点において、調節剤の「治療効果量」とは、哺乳類の骨髄疾患等の状態を、治療、処理、緩和、改善、又は安定化するのに十分な量である。治療効果量は、１若しくは２回分以上の用量で投与することができる。

【０１３１】

治療効果量は、一般に個別の状況に応じて医師が決定するものであり、当業者の技術の範囲内である。適切な用量を決定する場合に、通常いくつかの因子を考慮に入れる。これらの因子としては、患者の年齢、性別、及び体重、治療中である状態、状態の重症度、並びに投与中の薬剤の形態、が挙げられる。

【０１３２】

効果的な剤形、投与モード、及び用量は、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、本技術分野の技術の範囲内である。当業者であれば、用量は、投与経路、排泄速度、治療期間の長さ、投与中の他の薬剤の内容、動物の年齢、大きさ、及び種、並びに医学及び獣医学の分野で公知の因子、に応じて異なるであろうことは理解される。一般に、本発明による調節剤の適切な用量は、所望の効果をもたらすのに効果的である最小の用量である調節剤の量であろう。調節剤の効果用量は、２、３、４、５、６、又は７つ以上のサブ用量として、１日を通して適切な間隔で別々に投与してもよい。

【０１３３】

調節剤、特に本発明のＷｎｔ又はＡｋｔ調節剤は、経口摂取のための、又は、非経口投与、若しくは、腹腔内、皮下、局所、皮内、吸入、肺内、直腸内、膣内、舌下、筋肉内、静脈内、動脈内、くも膜下腔内、若しくはリンパ内等のその他の適切ないずれかの方法による投与のための医薬組成物として、所望の及び効果的ないかなる方法で投与してもよい。さらに、本発明の調節剤、特にＷｎｔ又はＡｋｔ調節剤は、他の治療と組み合わせて投与してもよい。本発明の調節剤、特にＷｎｔ又はＡｋｔ調節剤は、所望される場合は、カプセル化、又はそれ以外の方法により、胃若しくはその他の分泌物から保護してもよい。

【０１３４】

本発明の調節剤、特にＷｎｔ又はＡｋｔ調節剤は、単独で投与することが可能であるが、調節剤を医薬製剤（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、通常、１若しくは２種類以上の薬理学的に許容される担体との、並びに、任意に、１若しくは２種類以上のその他の化合物、薬剤、成分、及び／又は物質との混合物として、１若しくは２種類以上の調節剤を活性成分として含む。選択された投与経路に関わらず、本発明の調節剤、特にＷｎｔ又はＡｋｔ調節剤は、当業者に公知の従来の方法によって、薬理学的に許容される剤形へ製剤される。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，イーストン，ペンシルベニア州）、を参照されたい。

【０１３５】

薬理学的に許容される担体は、本技術分野で公知であり（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，イーストン，ペンシルベニア州）、及びＴｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，ワシントン，Ｄ．Ｃ．）参照）、糖類（例：ラクトース、スクロース、マンニトール、及びソルビトール）、デンプン、セルロース製剤、リン酸カルシウム（例：リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、及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：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、デキストロース及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：エチルアルコール、プロピルアルコール、及びベンジルアルコール）、ポリオール（例：グリセロール、プロピレングリコール、及びポリエチレングリコール）、有機エステル（例：オレイン酸エチル及びトリグリセリド）、生分解性ポリマー（例：ポリラクチド－ポリグリコリド、ポリ（オルソエステル）、及びポリ（無水物））、エラストマーマトリックス、リポソーム、ミクロスフェア、油類（例：トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ひまし、ゴマ、綿実、及び落花生）、ココアバター、ロウ（例：坐薬ロウ）、パラフィン、シリコーン、タルク、シリシレート（ｓｉｌｉｃｙｌａｔｅ） 等、が挙げられる。本発明の調節剤を含有する医薬組成物に用いられる薬理学的に許容される担体の各々は、その製剤の他の成分と適合し、対象に対し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。選択された剤形及び意図する投与経路に適する担体は、本技術分野で公知であり、選択された剤形及び投与方法に対して許容される担体は、本技術分野における通常の技術を用いて決定することができる。

【０１３６】

本発明の調節剤を含む医薬組成物は、任意に、医薬組成物に一般的に用いられる追加の成分及び／又は物質を含んでもよい。このような成分及び物質は、本技術分野で公知であり、（１）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、及びケイ酸等の充填剤又は増量剤（ｅｘｔｅｎｄｅｒｓ）；（２）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、及びアラビアゴム等のバインダー；（３）グリセロール等の湿潤剤（ｈｕｍｅｃｔａｎｔｓ）；（４）カンテン、炭酸カルシウム、ジャガイモ若しくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のシリケート、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び炭酸ナトリウム等の崩壊剤（ｄｉｓｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ ａｇｅｎｔｓ）；（５）パラフィン等の溶解遅延剤（ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｒｅｔａｒｄｉｎｇ ａｇｅｎｔｓ）；（６）四級アンモニウム化合物等の吸収促進剤；（７）セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロール等の湿潤剤（ｗｅｔｔｉｎｇ ａｇｅｎｔｓ）；（８）カオリン及びベントナイトクレイ等の吸収剤；（９）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、及びラウリル硫酸ナトリウム等の滑沢剤；（１０）エトキシル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及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、カンテン、並びにトラガカントゴム等の懸濁剤；（１１）緩衝剤；（１２）ラクトース、乳糖、ポリエチレングリコール、動物性及び植物性油脂

、油類、ロウ、パラフィン、ココアバター、デンプン、トラガカントゴム、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、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、及びポリアミドパウダー等の賦形剤；（１３）水又はその他の溶媒等の不活性希釈剤；（１４）保存料；（１５）界面活性剤；（１６）分散剤；（１７）ヒドロキシプロピルメチルセルロース、その他のポリマーマトリックス、生分解性ポリマー、リポソーム、ミクロスフェア、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、及びロウ等の徐放剤若しくは吸収遅延剤；（１８）不透明化剤（ｏｐａｃｉｆｙｉｎｇ　ａｇｅｎｔｓ）；（１９）アジュバント；（２０）湿潤剤；（２１）乳化及び懸濁剤；（２２）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、油類（特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油、及びゴマ油）、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、及びソルビタンの脂肪酸エステル等の可溶化剤並びに乳化剤；（２３）クロロフルオロ炭化水素、並びにブタン及びプロパン等の揮発性無置換炭化水素、等の噴射剤；（２４）抗酸化剤；（２５）糖類及び塩化ナトリウム等、製剤を意図するレシピエントの血液と等浸透圧にする剤；（２６）増粘剤；（２７）レシチン等のコーティング剤；並びに、（２８）甘味料、香味料、着色料、香料、及び保存料、が挙げられる。このような成分又は物質の各々は、その製剤の他の成分と適合し、対象に対し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。選択された剤形及び意図する投与経路に適する成分及び物質は、本技術分野で公知であり、選択された剤形及び投与方法に対して許容される成分及び物質は、本技術分野における通常の技術を用いて決定することができる。

【０１３７】

経口投与に適する医薬組成物は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤、水性若しくは非水性液体中の溶液剤又は懸濁液剤、水中油若しくは油中水型液体エマルジョン剤、エリキシール剤若しくはシロップ剤、パステル剤、巨丸剤、舐剤、又はペースト剤の形態であってよい。このような製剤は、例えば、従来のパンコーティング、混合、顆粒化、又は凍結乾燥プロセスの手段等、本技術分野で公知の方法によって作製することができる。

【０１３８】

経口投与のための固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣剤、粉末剤、顆粒剤等）は、活性成分を、１若しくは２種類以上の薬理学的に許容される担体、並びに、任意に、１若しくは２種類以上の充填剤、増量剤、バインダー、湿潤剤、崩壊剤、溶解遅延剤、吸収促進剤、湿潤剤、吸収剤、滑沢剤、及び／又は着色剤と混合することによって作製することができる。類似の種類の固体組成物を、適切な賦形剤を用いて、軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル剤の充填剤として用いることができる。錠剤は、任意に１若しくは２種類以上の補助成分（ａｃｃｅｓｓｏｒｙ　ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔｓ）と共に圧縮又は成型することによって作製することができる。圧縮錠剤は、適切なバインダー、滑沢剤、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤、界面活性若しくは分散剤を用いて作製することができる。成型錠剤は、適切な機械で成型することによって作製することができる。錠剤、並びに糖衣剤、カプセル剤、丸剤、及び顆粒剤等のその他の固体剤形は、任意に、腸溶コーティング及び医薬製剤の分野で公知のその他のコーティング等のコーティング及びシェルによって印字又は作製してもよい。これらは、その中の活性成分が緩やかな又は制御された放出となるように製剤することもできる。これらは、例えば、細菌保持フィルターを通したろ過により、滅菌することができる。これらの組成物は、任意に不透明化剤を含んでもよく、及び、胃腸管の特定の部分でのみ又は優先的に、任意に遅延放出により、活性成分を放出するような組成物であってよい。活性成分は、マイクロカプセル化された形態であってもよい。

【０１３９】

経口投与のための液体剤形としては、薬理学的に許容されるエマルジョン剤、マイクロ

エマルジョン剤、溶液剤、懸濁液剤、シロップ剤、及びエリキシール剤が挙げられる。液体剤形は、本技術分野で一般的に用いられる適切な不活性希釈剤を含んでよい。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化及び懸濁剤、甘味料、香味料、着色料、香料、並びに保存料等のアジュバントを含んでもよい。懸濁液剤は、懸濁剤を含んでよい。

【０１４０】

直腸内又は膣内投与のための医薬組成物は、坐薬として提供することができ、これは、１若しくは２種類以上の活性成分を、室温では固体であるが体温では液体であり、従って直腸腔又は膣腔内で溶融して活性化合物を放出する、１若しくは２種類以上の適切な非刺激性担体と混合することによって作製することができる。膣内投与に適する医薬組成物には、本技術分野で適切であることが公知である薬理学的に許容される担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ジェル、ペースト、フォーム、又はスプレー製剤も含まれる。

【０１４１】

局所又は経皮投与のための剤形としては、粉末剤、スプレー剤、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ジェル剤、溶液剤、パッチ剤、ドロップ剤、及び吸入剤が挙げられる。活性化合物は、滅菌条件下にて適切な薬理学的に許容される担体と混合してよい。軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、及びジェル剤は、賦形剤を含んでよい。粉末剤及びスプレー剤は、賦形剤及び噴射剤を含んでよい。

【０１４２】

非経口投与に適する医薬組成物は、適切な抗酸化剤、緩衝剤、製剤を意図するレシピエントの血液と等浸透圧にする溶質、又は懸濁剤若しくは増粘剤を含んでよい、１若しくは２種類以上の薬理学的に許容される滅菌等張水性若しくは非水性溶液、分散液、懸濁液若しくはエマルジョン、又は使用直前に滅菌注射溶液若しくは分散液へ再構成することができる滅菌粉末と組み合わせて、１若しくは２種類以上の調節剤を含む。適切な流動性は、例えば、コーティング剤の使用、分散液の場合は必要な粒子サイズの維持、及び界面活性剤の使用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、及び分散剤等の適切なアジュバントを含んでもよい。等張剤（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ａｇｅｎｔｓ）を含むことが望ましい場合もある。さらに、吸収を遅延させる剤を含有させることにより、注射用医薬剤形（ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ　ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　ｆｏｒｍ）の吸収時間を延長することができる。

【０１４３】

場合によっては、本発明の調節剤を含有する薬剤の効果を延長するために、皮下又は筋肉内注射からのその吸収を緩やかにすることが望ましい。これは、水溶性が低い結晶性又は非晶性物質の懸濁液を使用することによって達成することができる。

【０１４４】

ここで、薬剤の吸収速度は、その溶解速度に依存し、そして次に、それは結晶サイズ及び結晶形態に依存し得る。別の選択肢として、非経口投与された薬剤の吸収の遅延は、薬剤を油系媒体中に溶解又は懸濁させることによって達成することができる。注射用デポー剤形は、活性成分のマイクロカプセルマトリックスを生分解性ポリマー中に形成することによって作製することができる。ポリマーに対する活性成分の割合、及び用いた特定のポリマーの性質に応じて、活性成分の放出速度を制御することができる。デポー注射用製剤は、身体組織との適合性を有するリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬剤を包括することによっても作製される。注射用物質は、例えば、細菌保持フィルターを通したろ過によって滅菌することができる。

【０１４５】

製剤は、アンプル及びバイアルを例とする、ユニットドーズ（ｕｎｉｔ－ｄｏｓｅ）又はマルチドーズ（ｍｕｌｔｉ－ｄｏｓｅ）密封容器中に提供することができ、及び、注射の際には水を例とする滅菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥条件下で貯蔵することができる。即時注射溶液（ｅｘｔｅｍｐｏｒａｎｅｏｕｓ　ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）及び懸濁液は、上述の滅菌粉末剤、顆粒剤、及び錠剤の種類から作製す

ることができる。

【０１４６】

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物をさらに説明するために提供する。これらの実施例は、単に説明のためのものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【０１４７】

実施例１

構成的活性化β－カテニンと合わせたＰＴＥＮの欠失が初期の造血前駆細胞の喪失と共にＨＳＣの増大を引き起こす

ＰＴＥＮ／構成的活性化β－カテニン二重変異マウスの誘導

Ｐｔｅｎのホモ接合ＬｏｘＰ導入（ｆｌ）アレル（$Pten^{fl/fl}$）を有するマウスを、マウスβ－カテニン遺伝子のエクソン３（ここにリン酸化標的セリン／スレオニン残基のすべてが位置する）が２つのｌｏｘＰ配列にはさまれた$Ctnnb1^{fl/fl}$マウスと交配させた（Ｈａｒａｄａ，Ｎ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｍｂｏ　Ｊ，１８（２１）：５９３１－４２　１９９９．Ｙｉｌｍａｚ，Ｏ．Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１：４７５－８２　２００６．Ｚｈａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１（７０９２）：５１８－２２　２００６）。次に、この交配からの二重ヘテロ接合体マウス（ｄｏｕｂｌｅ　ｈｅｔｅｒｏｚｙｇｏｕｓ　ｍｉｃｅ）を交配させて、$Pten^{fl/fl}Ctnnb1^{fl/+}$マウス（Ｃｔｎｎｂ１は機能獲得型アレルであるため、Ｃｔｎｎｂ１に対するヘテロ接合体マウスのみが必要である）を作出した。同時に、$Pten^{fl/fl}$マウスをＳｃｌ－Cre^{+}トランスジェニックマウスと交配させ、Ｓｃｌ－$Cre^{+}Pten^{fl/+}$マウスを作出した。次に、これらを交配させ、Ｓｃｌ－Ｃｒｅ＋$Pten^{fl/fl}$マウス（「Ｐｔｅｎ」）を作出した。最後に、$Pten^{fl/fl}Ctnnb1^{fl/+}$マウスをＳｃｌ－$Cre^{+}Pten^{fl/fl}$マウスと交配させ、Ｓｃｌ－$Cre^{+}Pten^{fl/fl}Ctnnb1^{fl/+}$マウス（「Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１」）を作出した。Ｓｃｌ－ＣｒｅマウスをＣｔｎｎｂ１$^{fl/fl}$マウスとも交配させて、一重変異Ｓｃｌ－$Cre^{+}Ctnnb1^{fl/+}$マウス（「Ｃｔｎｎｂ１」）を作出した。Ｓｃｌ－Ｃｒｅが欠失したマウス（「Ｓｃｌ－Ｃｒｅ陰性」又は「コントロール」）をコントロールとして用いた。

【０１４８】

Ｓｃｌ－Ｃｒｅは、ＬｏｘＰが隣接（ＬｏｘＰを導入）したＰｔｅｎ及びＣｔｎｎｂ１アレルのコンディショナルノックアウトを達成するために用いられるＨＳＣ特異的タモキシフェン誘導性Ｃｒｅ－リコンビナーゼである（Ｇｏｔｈｅｒｔ，Ｊ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，“Ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｆａｔｅ－ｔｒａｃｉｎｇ　ｓｔｕｄｉｅｓ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｓｃｌ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　ｅｎｈａｎｃｅｒ：　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔｌｙ　ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｅ　ｔｏ　ａｄｕｌｔ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ．”Ｂｌｏｏｄ，２００５．１０５（７）：ｐ．２７２４－２７３２）。Ｐｔｅｎ／構成的活性化β－カテニン二重変異マウスは、トウモロコシ油（Ｓｉｇｍａ，カタログ番号Ｃ８２６７）０．１ｍｌに溶解したタモキシフェン（Ｓｉｇｍａ，カタログ番号Ｔ５６４８）（４２℃の水浴中、約５分間の超音波処理によって完全に溶解させた）を、第１日に５ｍｇ、第２日乃至第５日に２ｍｇ用いて５日間毎日腹腔内注射することによって誘導した。

【０１４９】

骨髄及び脾臓中のＨＳＣ分析

タモキシフェンによる誘導後の６週間目にて骨髄及び脾臓を採取し、単一細胞懸濁液とした。溶血緩衝剤（０．１６Ｍ塩化アンモニウム、Ｓｉｇｍａ　カタログ番号Ａ９４３４）を用いて赤血球溶解を行った。細胞は、系列マーカーに対しては、Ｋｉｔと共にＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、Ｂ２２０、ＩｇＭ、Ｍａｃ－１、Ｇｒ１、及びＴｅｒ１１９抗体を、ＬＳＫ分析に対してはＳｃａ－１を、又は前駆細胞分析に対しては、ＩＬ－７Ｒα、ＣＤ３４、及びＣＤ１６／３２と共にこれらのマーカーを用いて染色した（Ａｋａｓｈｉ，Ｋ

．，ｅｔ ａｌ．，Ａ ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃ ｃｏｍｍｏｎ ｍｙｅｌｏｉｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｔｈａｔ ｇｉｖｅｓ ｒｉｓｅ ｔｏ ａｌｌ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｉｎｅａｇｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ ２０００．４０４（６７７４）：ｐ．１９３－７）。示したように、ＬＴ－ＨＳＣ分析に対してはＦｌｋ２を加えた。

【０１５０】

特に断りのない限り、抗体はすべて以下に示すようにｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（サンディエゴ、カリフォルニア州）より入手した：フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）接合ＣＤ３抗体（カタログ番号１１－０４５２－８５）、ＦＩＴＣ接合ＣＤ４抗体（カタログ番号１１－００４２－８５）、ＦＩＴＣ接合ＣＤ８抗体（カタログ番号１１－００８１－８５）、ＦＩＴＣ接合Ｂ２２０抗体（カタログ番号１１－０４５２－８５）、ＦＩＴＣ接合Ｔｅｒ１１９抗体（カタログ番号１１－５９２１－８５）、ＦＩＴＣ接合Ｍａｃ－１抗体（カタログ番号１１－０１１２－８５）、ＦＩＴＣ接合Ｇｒ１抗体（カタログ番号１１－５９３１－８５）、ＦＩＴＣ接合ＩｇＭ抗体（カタログ番号１１－５７９０－８５）、フィコエリトリン（ＰＥ）接合Ｓｃａ－１抗体（カタログ番号１２－５９８１－８３）、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）接合Ｋｉｔ抗体（カタログ番号１７－１１７１－８３）、ビオチン接合ＣＤ１３５（Ｆｌｋ－２）抗体（カタログ番号１３－１３５１－８５）、ＰＥ－Ｃｙ５接合ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒα）抗体（カタログ番号１５－１２７１－８３）、ＰＥ－Ｃｙ７接合ＣＤ１６／３２（ＦｃｙＲＩＩ／ＩＩＩ）抗体（カタログ番号２５－０１６１－８２）、ビオチン接合ＣＤ３４抗体（カタログ番号１３－０３４１－８５）、ストレプトアビジン接合ＰＥ－Ｃｙ７抗体（カタログ番号２５－４３１７－８２）、ストレプトアビジン接合ＡＰＣ－Ｃｙ７抗体（カタログ番号１０－４３１７－８２）、ＡＰＣ接合Ｇｒ１抗体（カタログ番号１７－５９３１－８２）、ＡＰＣ接合Ｂ２２０抗体（カタログ番号１７－０４５２－８３）、ＰＥ接合Ｍａｃ－１抗体（カタログ番号１２－０１１２－８３）、及びＰＥ接合ＣＤ３抗体（カタログ番号１２－００３１－８５）。

【０１５１】

抗体染色細胞は、ＭｏＦｌｏ（Ｄａｋｏ，Ｆｔ．Ｃｏｌｌｉｎｓ，ＣＯ）フローサイトメーター及び／又はＣｙＡｎ ＡＤＰ（Ｄａｋｏ，Ｆｔ．Ｃｏｌｌｉｎｓ，ＣＯ）を用いたＦＡＣＳによって選別し、Ｓｃｌ－Ｃｒｅネガティブコントロール、及び構成的活性化β－カテニンを有するＳｃｌＣｒｅ$^{+}$ＰＴＥＮ（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）二重変異体の骨髄並びに脾臓中の系列陰性、Ｓｃａ－１$^{+}$Ｋｉｔ$^{+}$（ＬＳＫ）細胞について分析した。

【０１５２】

Ｓｃｌ－Ｃｒｅネガティブコントロール、及び構成的活性化β－カテニンを有するＳｃｌＣｒｅ$^{+}$ＰＴＥＮ（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）二重変異体、及び各々の一重変異体の骨髄（図１Ａ上）並びに脾臓（図１Ａ下）中の系列陰性、Ｓｃａ－１$^{+}$Ｋｉｔ$^{+}$（ＬＳＫ）細胞のＦＡＣＳ分析によって測定される絶対数（大腿骨＋脛骨あたり）をカウントした（Ｈａｒａｄａ，Ｎ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｂｏ Ｊ，１８（２１）：５９３１－４２ １９９９．Ｙｉｌｍａｚ，Ｏ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１：４７５－８２ ２００６．Ｚｈａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４４１（７０９２）：５１８－２２ ２００６）。マウスはタモキシフェン誘導の１０日目である。二重変異体骨髄中のＬＳＫ細胞の減少及びそれに伴う脾臓中の増大は、骨髄から脾臓への動員を示唆するものである。

【０１５３】

Ｓｃｌ－Ｃｒｅネガティブコントロール、及び構成的活性化β－カテニンを有するＳｃｌ－Ｃｒｅ$^{+}$ＰＴＥＮ（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）二重変異体、及び各々の一重変異体の骨髄並びに脾臓からのＬＳＫ細胞についてＦＡＣＳ分析を行った（ＦＡＣＳ分析の代表例については図１Ｂ乃至Ｅを参照）。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。

【０１５４】

誘導後６週間目での、コントロール、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体の骨髄（図１Ｆ）並びに脾臓（図１Ｇ）における、大腿骨及び脛骨あたりのＬＳＫ細胞

の絶対数をカウントした。ＬＳＫのパーセントが二重変異体で上昇しているが（図１Ｃ参照）、二重変異体からの骨髄の低い細胞性のため、絶対数はコントロールと比較してゆるやかな上昇しか得られていない。

【０１５５】

誘導後６週間目での、コントロール、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体の骨髄におけるＦｌｋ－２⁻（長期再構成（ＬＴ）－ＨＳＣを示す）であるＬＳＫ細胞のパーセントを算出した（図１Ｈ乃至Ｉ）。Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体マウスにおけるＬＴ－ＨＳＣ細胞のパーセントは、コントロール及びＰｔｅｎ一重変異体マウスと比較して大きく上昇した。Ｃｔｎｎｂ１一重変異体は、この時点ではコントロールと大きく異なっていなかった（データ示さず）。

【０１５６】

白血病Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体骨髄中のＣＤ４５のＦＡＣＳ分析を行った。図１Ｊに示すように、ＣＤ４５（高）急性転化細胞を左パネルの青色ボックス内に示す。これに対して、コントロール及びＣｔｎｎｂ１一重変異体には芽細胞集団は見られず、一方、誘導後６週間目のＰｔｅｎ一重変異体マウス８体のうちの１体で小集団が見られた（データ示さず）。

【０１５７】

白血病Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体マウスの骨髄のＬＳＫ分析も行った（図１Ｊ、右パネル）。ほんの僅かのＬＳＫ集団を残しての芽細胞への転換（下部左）に留意されたい（図１Ｃと比較して）。

【０１５８】

コントロール、Ｐｔｅｎ、及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体の骨髄中の初期造血前駆細胞を、ＦＡＣＳによって選別、分析した（図１Ｋ）。ＣＭＰ；ＧＭＰ；ＭＥＰ；及びＣＬＰの絶対数を測定した。

【０１５９】

まとめると、本データは、ＨＳＣにおける、β－カテニンの構成的活性化と組み合わせたＰＴＥＮの遺伝的欠失による表現型への影響を示すものである。ＰＴＥＮのみの欠失は、骨髄からの動員によって脾臓のＨＳＣの僅かではあるが有意の増大をもたらす一方、二重変異体のＨＳＣは、誘導後の１０日目に最大の動員を示している。誘導後の６週間目までには、二重変異体の脾臓ＨＳＣのみが劇的に増加する一方、一重変異体は、コントロールとの大きな違いはない。さらに、ＨＳＣの劇的な増加は、初期造血前駆細胞の増加を伴っておらず；むしろ、これらの初期前駆細胞は、コントロールとの大きな違いのないＣＬＰ以外は、すべて減少している。ＨＳＣは、分化が低減された状態での増殖により、一重変異体ではなく、二重変異体の脾臓中に劇的に集積されている。従って、驚くべきことに、そして予想外なことに、β－カテニンの構成的活性化と組み合わせられたＰＴＥＮの欠失が、幹細胞の自己複製を進行させる一方、いずれの経路もそれ単独では長期的な自己複製を進行させることができない。

【０１６０】

実施例２

コントロール及び変異体ＬＳＫ細胞のインビトロ培養

細胞培養

ＬＳＫ又はＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞を、１００細胞／ウェル、２００μｌ培地／ウェルにて９６ウェルＵ底組織培養プレートへ選別した。細胞を、３７℃、５％O_2、５％CO_2（残量N_2）にて、示した日数の間インキュベートした。１日おきに、培地の全容量の半分（基本培地については、以下の表１参照）を注意深く上部からピペットで取り、新鮮な培地で置換した。

【０１６１】

【表１】

表１－基本培地

成分	入手先
ＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｍｅｄｉａ：（１％ウシ血清アルブミン、１０μｇ ｍｌ$^{-1}$組換えヒトインスリン、２００μｇ ｍｌ$^{-1}$鉄飽和トランスフェリン、０．１ｍＭ　２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭグルタミンで補足された、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ））	Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；カタログ番号０９６００
１０μｇ／ｍｌヘパリン	Ｓｉｇｍａ，カタログ番号Ｈ－３１４９
０．５×ペニシリン／ストレプトマイシン	Ｓｉｇｍａ，カタログ番号Ｐ４３３３
１０ｎｇ／ｍｌ組換えマウス（ｒｍ）幹細胞因子	Ｂｉｏｖｉｓｉｏｎ，カタログ番号４３２８－１０
２０ｎｇ／ｍｌ　ｒｍ－トロンボポエチン	Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｉｎｃ，カタログ番号ＣＲＴ４０１Ｂ

【０１６２】

二重変異体ＨＳＣは、インビトロ及びインビボで劇的に増大するが、分化することはできない

以下の実験において、表１の基本培地を、２０ｎｇ／ｍｌ　ｒｍ－ＩＧＦ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，カタログ番号７９２－ＭＧ）及び１０ｎｇ／ｍｌ組変えヒトＦＧＦ－１（Ａｆｆｉｎｉｔｙ　ＢｉｏＲｅａｇｅｎｔｓ，カタログ番号ＯＲＰ１６０１０）によってさらに補足した。

【０１６３】

コントロール、構成的活性化β－カテニン（Ｃｔｎｎｂ１）、Ｐｔｅｎ変異体、及び二重変異体（Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１）マウスから単離した１００個のＬＳＫ細胞を、１０日間培養した（図２Ａ）。コントロールでは、細胞数は播種された１００個のＬＳＫから大きく増加しなかった一方、Ｃｔｎｎｂ１一重変異体のＬＳＫは生存しなかった。対照的に、Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫは、より大きな増殖を見せたが、より不均一であり、このことは、分化がより著しいことを示している。最も大きく最も均一な増大は、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体のＬＳＫから発生した。

【０１６４】

Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１変異体から単離されたＬＳＫ細胞を、培養３４日目に分析した（図２Ｂ）。野生型コントロールの培養物は、４週間を超えて増大することはなく；Ｃｔｎｎｂ１変異体の培養物は、１０日間を超えて生存することはなかった。Ｐｔｅｎ変異体のＨＳＣ培養物は、著しい細胞の凝集とより不規則な細胞形態を有して、より不均一に見えた。さらに、分化を示す紡錘形状の接着細胞（矢印）にも留意されたい。対照的に、二重変異体のＨＳＣ培養物は、均一な形態を示した。従って、Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫは、生存し増大したが、これよりも非常に均一であるＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１二重変異体のＬＳＫと比べて、より著しい分化を起こした。

【０１６５】

培養７週間目にて、Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物をカウントし、ＬＳＫ表現型の保持についてＦＡＣＳによる分析を行った（図２Ｅ）。ここでも、野生型コントロール及びＣｔｎｎｂ１培養物は、この長さまでインビトロにて生存することはなかった。Ｐｔｅｎ一重変異体のＬＳＫの増大が５０倍であるのに対して、二重変異体のＬＳＫは＞１２００倍の増大を起こしている。培養物のＬＳＫの純度は、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１の培養物の方が非常に高く、全生存細胞に対するＬＳＫ表現型の保持率が、Ｐｔ

ｅｎ一重変異体の培養物の約５０％と比較して、約８５％であった。
【０１６６】
これらのデータは、全体として、一重変異体又はコントロールよりも、二重変異体のＨＳＣがより長い期間、はるかに高い増大率で培養することができることを示している。
【０１６７】
実施例３
５週間の培養後におけるＰｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ細胞の移植分析
以下の実験では、細胞を実施例２で述べたものと同じ方法で培養した。実施例２のように、表１の基本培地を、２０ｎｇ／ｍｌ　ｒｍ－ＩＧＦ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，７９２－ＭＧ）及び１０ｎｇ／ｍｌ　組換えヒトＦＧＦ－１（Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｂｉｏ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ，ＯＲＰ１６０１０）で補足した。
【０１６８】
培養５週間目にて、Ｐｔｅｎ及びＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を再選別し、各々からの１０００個のＬＳＫ細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$）を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。野生型細胞は５週間の培養で生存しなかったので、別のコントロール群として１０００個の新鮮な野生型ＬＳＫ細胞の移植も行った。移植後４週間目にて、Ｐｔｅｎ又はＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ培養物を移植したマウスの末梢血液分析からはいずれも生着は検出されなかった（データ示さず）。移植後５週間目にて、レシピエントマウスからの骨髄を、ドナー生着（ＣＤ４５．２$^{+}$細胞）及びドナーＬＳＫ細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$ＬＳＫ）について分析した。
【０１６９】
図２Ｆ及び２Ｇは、１０００個の新鮮なＬＳＫ細胞（Ｆ）又は１０００個の培養されたＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１のＬＳＫ細胞（Ｇ）を移植したマウスの骨髄からの代表的なドナー生着（左）及びドナーＬＳＫ細胞生着（右）を示す。図２Ｈ、２Ｉ、及び２Ｊは、移植後５週間目にて図２Ｆ及びＧで述べるレシピエントマウスの骨髄から単離した、ドナー（ＣＤ４５．２$^{+}$）細胞（Ｈ）、ドナーＬＳＫ細胞（Ｉ）、及びドナーＬＳＫの倍数の増加（図２Ｊ）の定量を示す。大腿骨あたりのＰｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１ドナー細胞の絶対数は、コントロール又はＰｔｅｎ一重変異体ドナー細胞よりも少ないが、Ｐｔｅｎ：Ｃｔｎｎｂ１ドナーＬＳＫ細胞の数は、コントロール又はＰｔｅｎ一重変異体ドナーＬＳＫ細胞の数よりも著しく多い。
【０１７０】
これらのデータは、全体として、一重変異体又はコントロールのＨＳＣよりも、二重変異体のＨＳＣがより長い期間、はるかに高い増大率で培養することができることを示している。しかし、両経路の恒久的な遺伝的改変により、長期間の培養後、インビトロ並びにインビボの両方において自己複製の能力の上昇が引き起こされるが、分化することはできず、従って、移植レシピエントの造血系の再増殖は引き起こされない。このことはさらに、ＰＴＥＮ及びβ－カテニンシグナル伝達経路の、分化を起こさない増殖による幹細胞の増大を協同的に進行させる能力を示している。
【０１７１】
実施例４
ＰＴＥＮ／Ａｋｔ及びＷｎｔ／β－カテニンシグナル伝達経路に対するエキソビボでの薬理学的な操作が、協同的に機能ＨＳＣの増大を進行させる
１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を野生型（Ｃ５７Ｂｌ／６）マウスから選別し、（１）培地、（２）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（ＧＳＫ－３β阻害剤、Ｄｒ．　Ｓｈｅｎｇ　Ｄｉｎｇより寄贈）、（３）培地＋２００ｎＭ　ビスペルオキソ（ピコリナート）オキソバナジン酸二カリウム塩（ＢｐＶ（ｐｉｃ）、ＰＴＥＮ阻害剤、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍより入手可能、カタログ番号２０３７０５）、（４）培地＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１＋２００ｎＭ　ＢｐＶ（ｐｉｃ）、（５）培地＋２００ｎＭ　シコニン（やはりＰＴＥＮ阻害剤、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍより入手可能、カタログ番号５６５８５０）、及

び（６）培地＋２００ｎＭ　シコニン＋１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１、にて培養した（図３Ｂ乃至Ｃ）。細胞の培養は上述のようにして行った。培養の１７日目（図３Ｂ、元の倍率１００×）、及び２３日目（図３Ｃ、元の倍率４０×）に細胞を調べた。コントロールと比較して、別々に適用された阻害剤ではいずれも、より大きなＬＳＫ細胞の増大が見られ、このことは、ＧＳＫ－３βの阻害が、Ｃｔｎｎｂ１変異体のＬＳＫで示されるβ－カテニンの構成的活性化と厳密に同等であるわけではないことを示しており、一方、Ｐｔｅｎ変異体のＬＳＫと比較して（図２参照）、ＢｐＶ（ｐｉｃ）では類似の結果が見られた。二重変異体のＬＳＫ（図２）と同様に、両方の阻害剤の存在下にて最大の増大が発生した（図３Ｂ／Ｃ、パネル４）。

【０１７２】

示した培地条件における培養２８日目のＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞を調べた（図３Ｄ、元の倍率２００×）。ここで、いずれの阻害剤も別々に存在する場合は、コントロールと比較して著しい増大が観察されたが；しかし、いずれの場合も、より不定である細胞の大きさ／形態、及び／又は紡錘形状の接着細胞への分化を含む細胞形態の著しい分化／不均一性が観察された（中央のパネル）。対照的に、両方の阻害剤が存在する場合は、均一性を有する増大が達成された（最後のパネル）。

【０１７３】

培地＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）＋ＣＨＩＲ９９０２１にて２８日間培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞のＦＡＣＳ分析（図３Ｅ）を行った。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。９０％を超えるＬＳＫがＦｌｋ２陰性を維持した（データ示さず）。従って、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻表現型は、両阻害剤を含む培養物中にて高純度で維持されていた。

【０１７４】

（１）培地、（２）培地＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）、（３）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１、及び（４）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）にて２８日間培養した後のＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞の増大の倍数を分析した。各阻害剤を別々に添加することにより、いずれの阻害剤も含まない培地と比較して著しい増大が引き起こされたが、最大の増大（約２７０倍）は、両方の阻害剤が共に添加された場合に観察された。

【０１７５】

これらのデータは、全体として、ＰＴＥＮ／Ａｋｔ及びＷｎｔ／β－カテニンシグナル伝達経路を薬理学的に操作することによって、ＨＳＣの増大を進行させることが可能であることを示している。両方の経路を同時に操作することによって、最大の増大が達成される。両阻害剤の存在下にて培養した場合、機能短期ＨＳＣが最も高い再構成能を示す。非常に長期間の再構成（８週間）は、ＨＳＣを両阻害剤の存在下で培養した場合にのみ発生し、いずれかの単一の阻害剤と共に、又はいずれの阻害剤も存在しない状態で培養した場合は発生しない。従って、両経路を同時に薬理学的に操作することにより、機能ＨＳＣの最大の増大が得られる。

【０１７６】

実施例５

エキソビボでの薬理学的な操作後の培養ＬＳＫ細胞の移植分析

細胞の採取及び再増殖

細胞は、ピペットによる出し入れを数回行った後に新しいチューブへ移すことによって、移植の前にウェルから採取した。次に、さらに培地を添加してこの手順を繰り返すことで残留物を回収した。細胞をフェノールレッドを含有しないＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，カタログ番号３１０５３）で洗浄し、コンジェニックドナーからの適切な数の全骨髄レスキュー細胞（示したように、マウスあたり、２００００００個のレスキュー細胞＋１０００個の再選別ＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞（図３Ｆ乃至Ｈ）、又は１０日間培養した１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２⁻細胞の非接着性産物（ｎｏｎ－ａｄｈｅｒｅｎｔ　ｐｒｏｄｕｃｔ）（図３Ｉ乃至Ｋ）に対して）へ添加した。細胞は、致死量の放射線（１０グレイ、単一照射）を照射したＰｔｐｒｃ（ＣＤ４５．１⁺）レシピエントマウスに、尾静脈からインスリンシリンジを用いて注入した。

【０１７７】
移植後４週間目にて、末梢血液の採取、赤血球溶解、及びｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓより購入した抗体（ＦＩＴＣ接合ＣＤ４５．２（カタログ番号１１－０４５４－８５）及びＰＥ－Ｃｙ５接合ＣＤ４５．１（カタログ番号１５－０４５３－８２））を用いてのＣＤ４５．２（ドナー）生着と比較したＣＤ４５．１（レシピエント）生着の染色、によって再増殖を測定した。レスキュー／競合細胞のみを移植されたマウスをコントロールとして用い、再増殖の検出限界を測定した。多系列再構成は、上述のように、ＣＤ３、Ｂ２２０（リンパ系に対して）、及びＧｒ１、Ｍａｃ－１（骨髄系に対して）によって測定した。
【０１７８】
２８日間培養物の移植分析
（１）培地、（２）培地＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）、（３）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１、及び（４）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１（１μＭ）＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）（２００ｎＭ）にて２８日間培養した細胞を、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞について再選別した。各培地条件からの１０００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞（ＣＤ４５．２$^{+}$）を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。移植後４週間目にて、ドナー（図３Ｇ）及び多系列（図３Ｈ）生着について末梢血液を分析した。図３Ｇにおいて、各棒グラフは個々のマウスを表している。横方向の点線は、競合細胞のみを移植されたマウスの平均の「生着」、従って、実際の生着の検出可能限界を表している。２８日間の培養物からは長期間（４ヶ月）の生着が観察されなかった（データ示さず）。両阻害剤の存在下にて培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を移植した場合、＞１％の生着を示すマウスは、ＣＨＩＲ９９０２１のみが存在する場合の４／８、ＢｐＶ（ｐｉｃ）のみが存在する場合の０／１０、及び培地のみの２／６と比較して、８体のうちの６体である。１パーセント若しくはそれを超える生着は、実質的な生着に対する基準限界である（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）。従って、両阻害剤を合わせて用いることによってＬＳＫの最大の増大が誘発されるが（図２Ｆ）、同等数のこれらの培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞の移植によっても、両阻害剤で培養した場合は、阻害剤なし又は一方の阻害剤単独の場合と比較して、短期的な生着／機能性の上昇が誘発される。
【０１７９】
構成的活性化β－カテニン及びＰＴＥＮの欠失がもたらされる遺伝的改変を施したマウスはすべて白血病を発症し、変異の誘導後８乃至１０週間以内に、不良な健康状態のために屠殺せざるを得ないが（図１Ｉ、データ示さず）、一方の阻害剤単独又は両阻害剤の組み合わせで培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を移植されたマウスは、移植後１６週間まで、白血病発症の兆候は見られなかった。遺伝的二重変異マウスの誘導後８乃至１０週間とは異なり、このようなマウスはすべて健康に見え、体重の減少、貧血、食欲減退、嗜眠、背弯姿勢（ｈｕｎｃｈｅｄ　ｐｏｓｔｕｒｅ）等を示さなかった。従って、例えば、ＢｐＶ（ｐｉｃ）及びＣＨＩＲ９９０２１を用いた両経路の阻害の効果は、可逆的である。
【０１８０】
１０日間培養物の移植分析
（１）培地、（２）培地＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）（２００ｎＭ）、（３）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１（１００ｎＭ）、及び（４）培地＋ＣＨＩＲ９９０２１（１００ｎＭ）＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）（２００ｎＭ）において９日間培養した細胞を、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞について再選別し、示した条件下での９日間の培養後のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞の増大の倍数を測定した（図３Ｉ）。２８日間の培養物からは長期間の生着が観察されなかったことから（図３Ｄ乃至Ｈ、データ示さず）、増大及び長期間の再増殖の両方の達成が可能かどうかの試験には、ＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞は９日間のみの培養とした。ここでは、２８日間の培養物と比較して類似の傾向が観察されたが（図９Ｆと比較して）、増大の度合いは、２８日間の培養物に対して９日間のみでは著しく低下していた。

【０１８１】
培地＋ＢｐＶ（ｐｉｃ）（２００ｎＭ）＋ＣＨＩＲ９９０２１（１００ｎＭ）で９日間培養したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞についてＦＡＣＳ分析を行った（図３Ｊ）。細胞は、生存系列陰性細胞を予めゲーティングした。９０％を超えるＬＳＫがＦｌｋ２陰性を維持している（データ示さず）。ここで、Ｓｃａ－１及びＫｉｔのレベルは、２８日間の培養物から示されるＳｃａ－１$^{(high)}$Ｋｉｔ$^{(high)}$集団と比較して（図１Ｅ）、正常であると思われる。

【０１８２】
１０日間の培養物を、２×１０^{5}個のコンジェニック全骨髄競合細胞と共に、致死量の放射線（１０Ｇｙ）を照射したＣＤ４５．１$^{+}$レシピエントマウスへ移植した。１００個から開始したＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を１０日間培養した後の全非接着細胞産物を各マウスに移植した。移植後８週間目にて、ドナー（図３Ｇ）及び多系列（図３Ｈ）生着について末梢血液を分析した。図に示すように、実際の生着を示したマウスすべてから多系列再構成が観察された（データ示さず）。図３Ｇにおいて、各棒グラフが個々のマウスを表しており：横方向の点線は、競合細胞のみを移植されたマウスの平均の「生着」、従って、実際の生着の検出可能限界を表している。ここで、両阻害剤の存在下で培養されたＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を移植されたマウス７体のうち３体が、１％若しくはそれを超えるドナー生着を示し、これに比べて、単一の阻害剤又は阻害剤なしのグループでは、いずれのマウスもこの限界値に達しなかった。

【０１８３】
これらのデータは、全体として、ＰＴＥＮ／Ａｋｔ及びＷｎｔ／β－カテニンシグナル伝達経路を薬理学的に操作することによって、ＨＳＣの増大を進行させることが可能であることを示している。両方の経路を同時に操作することによってのみ、最大の増大が達成される。両阻害剤の存在下にて培養した場合、機能短期ＨＳＣが、最も高い再構成能を示す。非常に長期間の再構成（８週間）は、ＨＳＣを両阻害剤の存在下で培養した場合にのみ発生し、いずれかの単一の阻害剤と共に、又はいずれの阻害剤も存在しない状態で培養した場合は発生しない。従って、両経路を同時に薬理学的に操作することにより、機能ＨＳＣの最大の増大が得られる。遺伝的変異動物が白血病を発症したのに対してレシピエント動物は発症しなかったこと（図１）、及び遺伝的変異体からの培養ＨＳＣとは異なり、培養されたＨＳＣは分化することが可能であったこと（図２）から、この効果は可逆的である。

【０１８４】
実施例６
バイオロジック含有培地でのＨＳＣの培養
抗ＧＳＫ－３β及び抗ＰＴＥＮ抗体は、本技術分野で公知の手順に従って作製（又は、例えば、Ｓｉｇｍａ、ＥｘａｃｔＡｎｔｉｇｅｎｅ、及びＢｉｏｃｏｍｐａｒｅから購入）することができる。

【０１８５】
１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２$^{-}$細胞を野生型（Ｃ５７Ｂｌ／６）マウスから選別し、（１）培地、（２）培地＋ＧＳＫ－３β抗体、（３）培地＋抗ＰＴＥＮ抗体、並びに（４）培地＋抗ＧＳＫ－３β及び抗ＰＴＥＮ抗体、にて培養する。細胞は上述のようにして培養する。細胞は、培養の９日目、１７日目、及び２３日目に分析する。ＨＳＣの最大の増大は、両抗体が存在する場合に発生すると考えられる。

【０１８６】
実施例７
ｓｉＲＮＡ又はＲＮＡｉを含有する培地でのＨＳＣの培養
ＰＴＥＮ　ｓｉＲＮＡ及びＧＳＫ－３ｂ　ｓｉＲＮＡは、本技術分野で公知の手順に従って作製することができる（例えば、Ｍｉｓｅ－Ｏｍａｔａ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．３２８（４）：１０３４－４２　２００５、を参照、又はＢｉｏｃｏｍｐａｒｅから購入可能）。

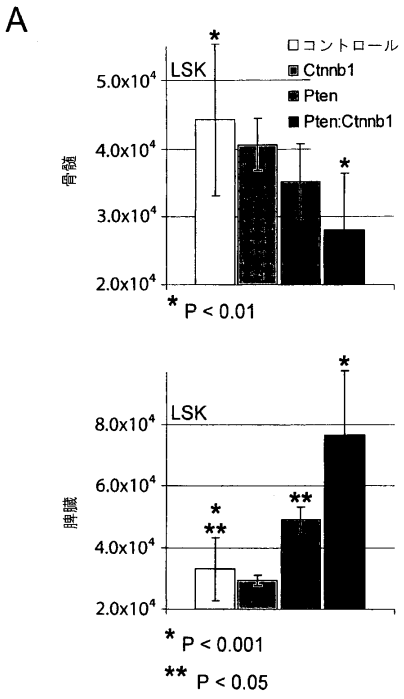
【０１８７】
１００個のＬＳＫ　Ｆｌｋ２-細胞を野生型（Ｃ５７Ｂｌ／６）マウスから選別し、（１）培地、（２）培地＋ＧＳＫ－３β　ｓｉＲＮＡ、（３）培地＋ＰＴＥＮ　ｓｉＲＮＡ、並びに（４）培地＋ＧＳＫ－３β　ｓｉＲＮＡ及びＰＴＥＮ　ｓｉＲＮＡ、にて培養する。細胞は上述のようにして培養する。細胞は、培養の９日目、１７日目、及び２３日目に分析する。ＨＳＣの最大の増大は、両ｓｉＲＮＡが存在する場合に発生すると考えられる。

【０１８８】
本願で引用したすべての文書は、その全体が本明細書に列挙されているいかのごとく、参照することで本明細書に組み入れられる。

【０１８９】
本発明の説明のための態様を本明細書にて説明したが、本発明は説明した態様に限定されるものではないこと、及び、当業者であれば、本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、種々のその他の変更又は変形を行うことができることは理解されるべきである。

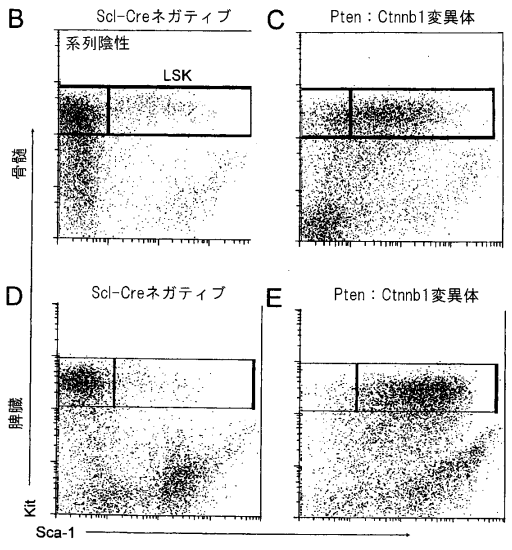
【図１－１】

Figure 1



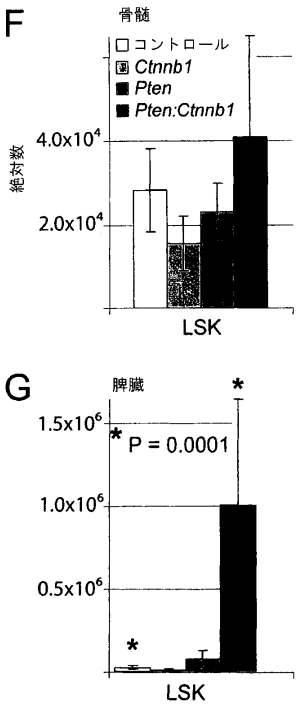
【図１－２】

Figure 1



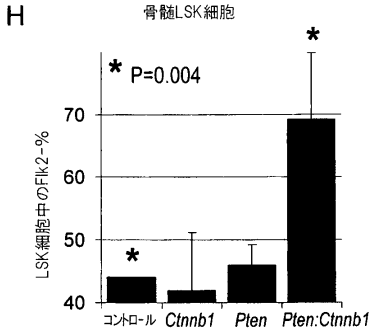
【図１－３】

Figure 1



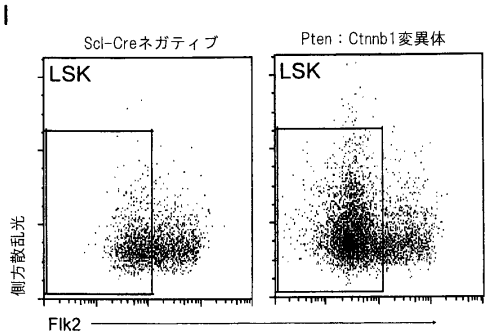
【図１－４】

Figure 1



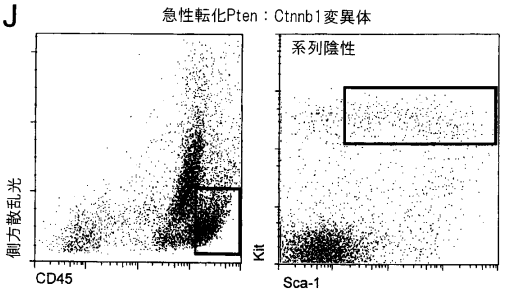
【図１－５】

Figure 1



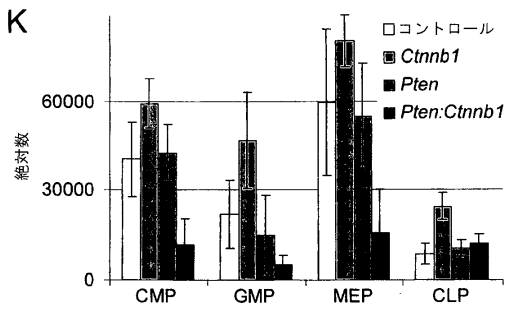
【図１－６】

Figure 1



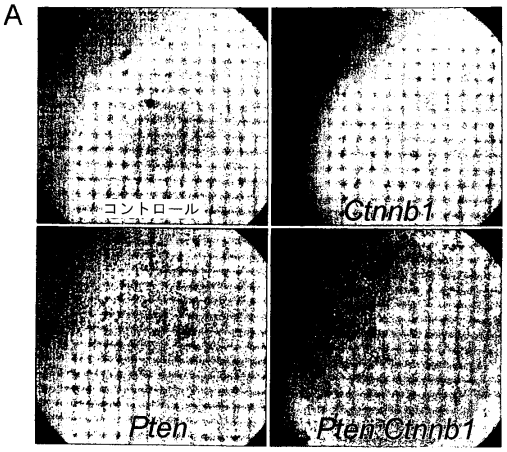
【図１－７】

Figure 1



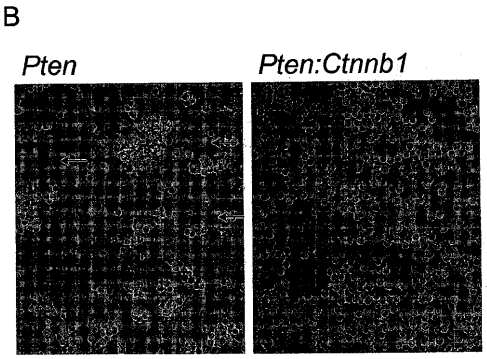
【図２－１】

Figure 2



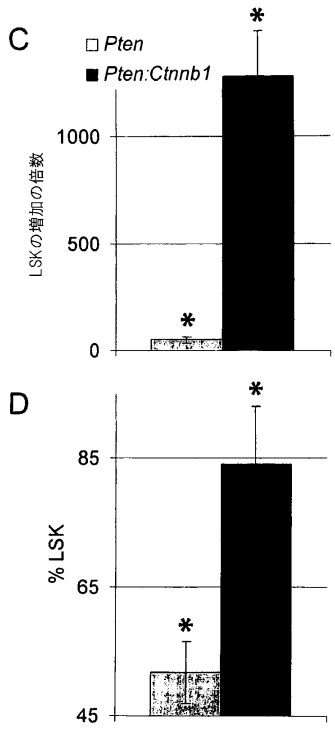
【図２－２】

Figure 2



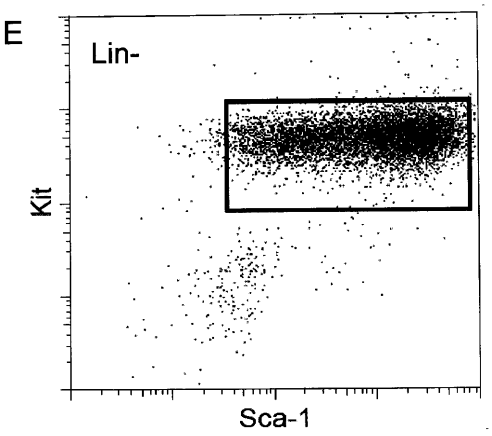
【図２－３】

Figure 2



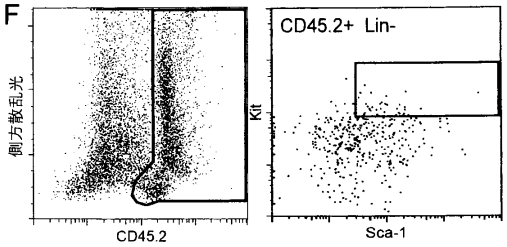
【図２－４】

Figure 2



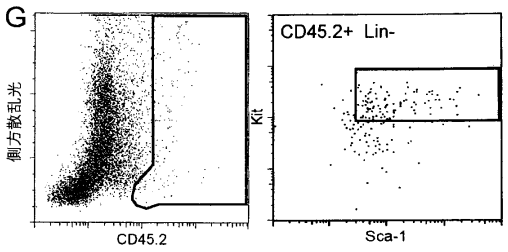
【図２－５】

Figure 2



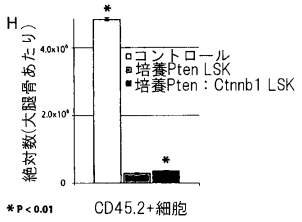
【図２－６】

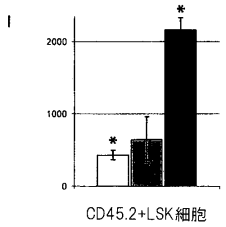
Figure 2

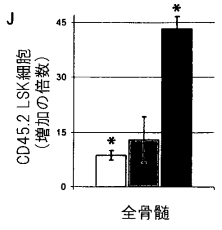


【図２－７】

Figure 2

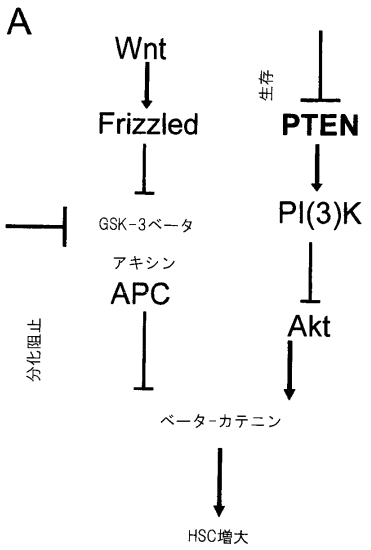






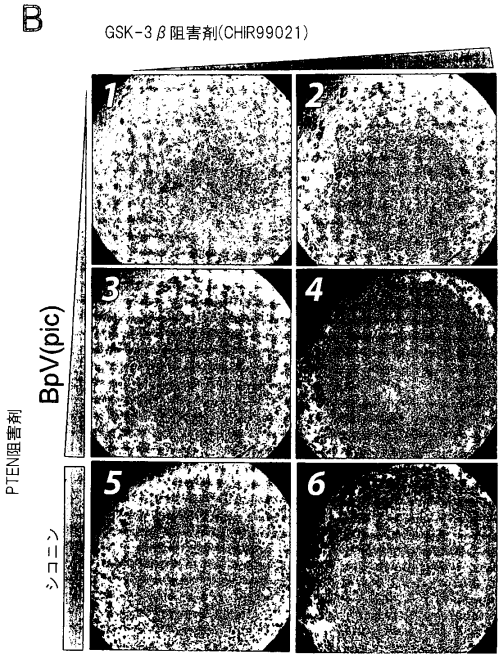
【図３－１】

Figure 3



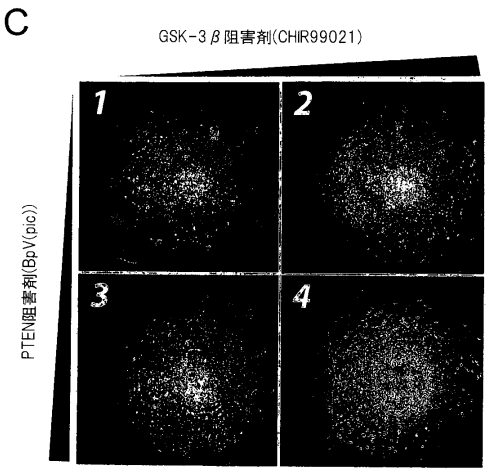
【図３－２】

Figure 3



【図３－３】

Figure 3



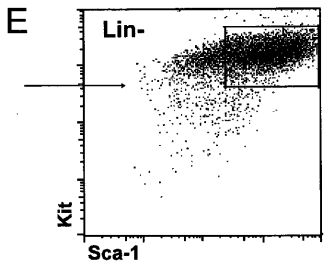
【図３－４】

Figure 3



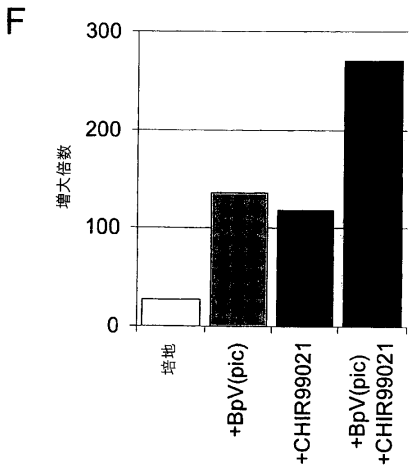
【図３－５】

Figure 3



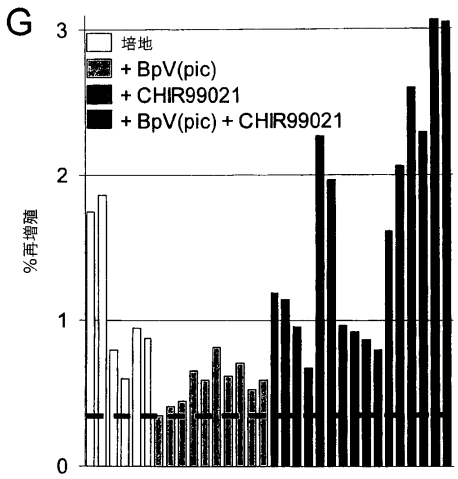
【図３－６】

Figure 3



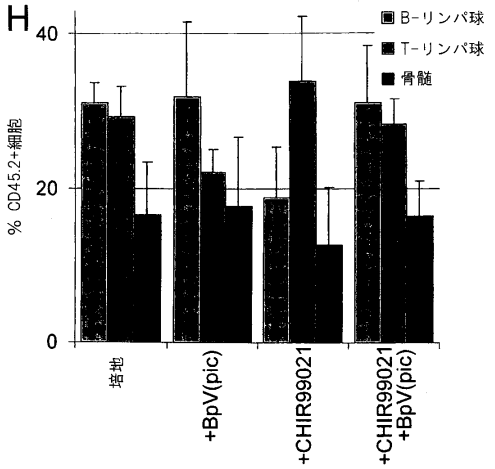
【図３－７】

Figure 3



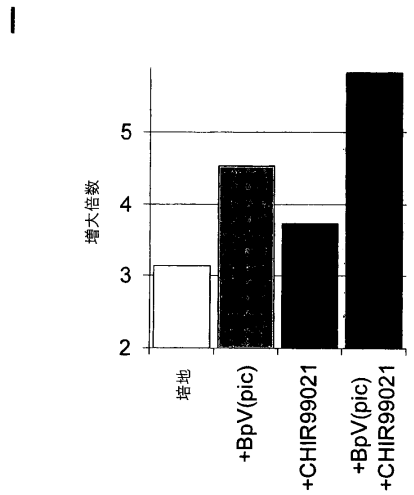
【図３－８】

Figure 3



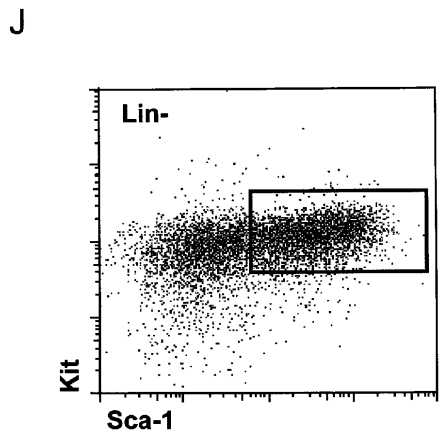
【図３－９】

Figure 3



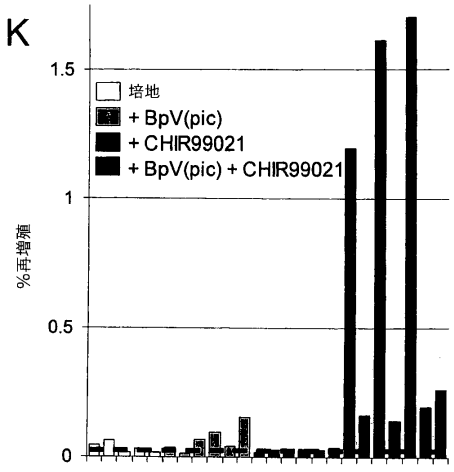
【図３－１０】

Figure 3



【図３－１１】

Figure 3



フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 ペリー, ジョン エム.
アメリカ合衆国, カンザス ６６０６１, オレイサ, ウエスト ワンハンドレッドトゥエンティフィファースト ストリート ２０７３６
(72)発明者 リ, リンヘン
アメリカ合衆国, カンザス ６６２２４, リーウッド, モホーク ロード １４５５６
(72)発明者 グリンドリー, ジャスティン シー.
アメリカ合衆国, ミズーリ ６４１０９, カンザス シティ, ハリソン ブールバード ３８３５

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表２００６－５２１８１３（ＪＰ, Ａ）
Curr.Opin.Genet.Dev., ２００６年, Vol.16, p.496-501
Nature, ２００６年, Vol.441, p.475-482
Cancer Res., ２００５年, Vol.65, No.7, p.2537-2541
日本薬学会年会要旨集, ２００４年, Vol.124th, p.119, 29[P2]III-267
FEBS Lett., ２００４年, Vol.566, p.35-38
J.Biol.Chem., ２００２年, Vol.277, No.34, p.30998-31004
実験医学, ２００６年, Vol.24, No.12, p.1744-1749
Nature, ２００６年, Vol.441, p.518-522
J.Immunol., ２００６年, Vol.177, p.2294-2303
脳２１, ２００７年 1月２０日, Vol.10, No.1, p.38-42

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １／００ － ７／０８
ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）