

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5560393号
(P5560393)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月20日(2014.6.20)

(51) Int.Cl. F1
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 202A

請求項の数 15 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2008-518339 (P2008-518339)	(73) 特許権者	514000015
(86) (22) 出願日	平成18年6月20日 (2006.6.20)		アステリアス バイオセラピューティクス
(65) 公表番号	特表2008-543338 (P2008-543338A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成20年12月4日 (2008.12.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア メンロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/024060		パーク コンスティテューション ドラ
(87) 国際公開番号	W02007/002136		イブ 230
(87) 国際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)	(74) 代理人	100149294
審査請求日	平成21年2月27日 (2009.2.27)		弁理士 内田 直人
(31) 優先権主張番号	60/693, 141	(72) 発明者	ゴールド, ジョゼフ ディー.
(32) 優先日	平成17年6月22日 (2005.6.22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
(33) 優先権主張国	米国 (US)		10, サンフランシスコ, ランディズ
			レーン 100

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋細胞系列細胞への霊長類多能性幹細胞の分化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト胚性幹 (hES) 細胞から心筋細胞系列細胞を得るための方法であって、

a) アクチビンAの存在下であるがBMPの非存在下で該hES細胞を培養する工程；および

b) その後、該細胞をBMPの存在下であるがアクチビンAの非存在下で培養する工程を包含する、方法。

【請求項2】

前記BMPがBMP-2またはBMP-4である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記BMPがBMP-2である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記BMPがBMP-4である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記hES細胞が、アクチビンAの存在下で約1日間培養された後、前記BMPの存在下で約4日間培養される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記BMP培養工程に続いて、培地がアクチビンAもBMPも含まない追加の培養工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記追加の培養工程が少なくとも1週間にわたり行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記追加の培養工程が少なくとも2週間にわたり行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

前記追加の培養工程がIGF-IまたはIGF-IIを含有する培地中で行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項10】

前記追加の培養工程がIGF-Iを含有する培地中で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

胚様体を形成させる工程を含まない、請求項1に記載の方法。

10

【請求項12】

前記BMP培養工程に続いて、前記培養物から細胞を回収する工程、および該回収した細胞集団を心筋細胞系列細胞について富化させる工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記回収した細胞集団がパーコール勾配によって富化される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記富化が心臓体の形成を伴う、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

hES細胞から心筋細胞系列細胞の富化集団を得る方法であって、

20

a) アクチピンAの存在下であるがBMPの非存在下で、無血清培地中で約1日間該hES細胞を培養する工程；

b) その後、BMPの存在下であるがアクチピンの非存在下で、無血清培地中で約4日間培養する工程；

c) 該培養物から細胞を回収する工程；および

d) 該回収した細胞集団を心筋細胞系列細胞について富化させる工程

をこの順序で包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

(関連出願の引用)

本出願は、2005年6月22日出願の米国特許出願第60/693,141号の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、インピトロにおいて霊長類多能性幹細胞を心筋細胞系列細胞へと分化させる分野に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

40

再生医学研究の主な課題は、心機能の再構築を助けることができる細胞組成物を開発することである。男女約5人に1人が何らかの形態の心血管疾患を有すると推定される(非特許文献1)。広範に及ぶ病態には、冠動脈性心疾患(人口の5%)、先天性心血管障害(0.5%)および先天性心不全(3%)が含まれる。これまで医薬品の技術分野では、心疾患により生じる損傷を抑える助けとなる低分子薬および生物学的化合物が製造されてきたが、損傷した組織の再生を助ける薬剤は市販されていない。

【0004】

心臓再生を可能にする細胞集団を開発することを目的に、これまで幾つかの角度から研究が行われてきた。幾つかの施設では、心筋梗塞後の治療における自己骨髄由来細胞の利用を検討する臨床試験が行われている(非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非

50

特許文献5；非特許文献6)。これらの細胞は、心臓組織の血液灌流を向上させる洗浄機能を有すると考えられてきた。また、心臓の治療における自己骨格筋芽細胞の利用を検討する臨床試験も行われている(非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9)。しかし、横紋筋細胞の収縮が心拍動と十分に協調できるかについては不明である。

【0005】

より直接的な手法としては、既に心筋細胞の機能を持つ細胞を使用する手法があると考えられる。これまで動物試験においては、恒久的な冠閉塞により生じる損傷の修復に同系の新生児および乳児の心細胞を使用してきた(非特許文献10；非特許文献11)。そのため、このような細胞がヒトの治療に利用可能であれば、虚血性心疾患の処置に非常に効果的である可能性がある。さらに、心筋細胞を製剤等の化合物のスクリーニングに使用することもできる。

【非特許文献1】National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-94, Center of Disease Control and the American Heart Association

【非特許文献2】Perin, et al., Circulation 107:2294, 2003

【非特許文献3】Strauer, et al., Circulation 106:1913, 2002

【非特許文献4】Zeiber, et al., Circulation 106:3009, 2002

【非特許文献5】Tse, et al., Lancet 361:47, 2003

【非特許文献6】Stamm, et al., Lancet 366:45, 2003

【非特許文献7】Menasche, et al., J. Am. Coll. Cardiol. 41:1078, 2003

【非特許文献8】Pagani, et al., J. Am. Coll. Cardiol. 41:879, 2003

【非特許文献9】Hagege, et al., Lancet 361:491, 2003

【非特許文献10】Reffelmann, et al., J. Mol. Cell Cardiol. 35:607, 2003

【非特許文献11】Yao, et al., J. Molec. Cell. Cardiol. 35:607, 2003

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の簡単な要旨)

本発明は、霊長類多能性幹細胞から心筋細胞系細胞を得る方法を提供する。心筋細胞系細胞は、多くの可能性ある利用法を有しており、これには、潜在的な製剤のスクリーニング、細胞毒性化学物質のスクリーニング、および損傷または疾患のある心臓の *in vivo* 修復等の治療的用途が含まれるが、これらに限定されない。

【0007】

本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞から心筋細胞系細胞を得る方法は、アクチピンの存在下であるがBMPの非存在下で、霊長類多能性幹細胞を培養する工程；その後BMPの存在下でこれらの細胞を培養する工程；および得られた回収細胞を培養液から回収する工程をこの順序で含む。

【0008】

本発明はまた、心筋細胞系細胞の富化集団を得る方法も提供する。特定の実施形態において、これらの方法は、アクチピン存在下であるがBMPの非存在下で霊長類多能性幹

10

20

30

40

50

細胞を培養する工程；その後BMPの存在下でこれらの細胞を培養する工程；これらの細胞を培養液から回収する工程；および回収した細胞集団を心筋細胞系列細胞に富化する工程をこの順序で含む。特定の実施形態において、これらの方法は、アクチビンAの存在下であるがBMPの非存在下で、無血清培地中で霊長類多能性幹細胞を約1日間培養する工程；その後、BMP-4またはBMP-2の存在下であるがアクチビンの非存在下で、無血清培地中でこれらの細胞を約4日間培養する工程；これらの細胞を培養液から回収する工程；および回収した細胞集団を心筋細胞系列細胞に富化する工程をこの順序で含む。

【0009】

本発明の特定の実施形態において、これらの細胞は、培養工程時に固体表面に付着させる。特定の実施形態において、これらの細胞は、BMPによる培養工程時に、胚様体を形成することができる。特定の実施形態において、これらの細胞は、アクチビンおよび/またはBMPによる培養工程時に単一細胞の懸濁液において培養される。

10

【0010】

特定の実施形態において、これらの細胞は、アクチビンの存在下で、1日以上培養される。特定の実施形態において、これらの細胞は、BMPの存在下で、4日間以上培養される。特定の実施形態において、アクチビンはアクチビンAである。特定の実施形態において、BMPはBMP-4またはBMP-2である。

【0011】

特定の実施形態において、これらの細胞は、アクチビンまたはBMPの非存在下で、BMPによる培養工程後の追加期間にわたり培養される。これらの特定の実施形態において、追加の培養工程は2週間以上である。これらの特定の実施形態において、IGFは培養工程に含まれる。これらの特定の実施形態において、IGFはIGF-1である。

20

【0012】

本発明の特定の実施形態において、分化プロトコルから得られた細胞集団は、心筋細胞系列細胞に富化される。これらの特定の実施形態においては、心筋細胞系列細胞の集団の富化にパーコール勾配が使用される。

【0013】

本発明の特定の実施形態において、回収した細胞は、ミオシン重鎖(MHC)が少なくとも10%陽性である。本発明の特定の実施形態において、回収した細胞は、心臓トロポニンI(cTnI)が少なくとも10%陽性である。本発明の特定の実施形態において、回収した細胞は、心臓トロポニンI(cTnI)が少なくとも25%陽性である。

30

【0014】

本発明の特定の実施形態においては、心筋細胞系列細胞を富化および/または拡大するために、心臓体が形成される。これらの特定の実施形態において、本方法は、単一細胞として存在する富化細胞集団内の細胞を細胞群として存在する細胞から分離する工程；栄養培地中に細胞群として存在する細胞を再懸濁する工程；栄養培地中の再懸濁した細胞を再培養する工程；および再培養した細胞を採取し、洗浄する工程をさらに含む。

【0015】

本発明はまた、本発明の方法に従って霊長類多能性幹細胞から分化した心筋細胞系列細胞の集団も提供する。本発明はまた、ヒト胚芽細胞から心筋細胞系列細胞を生成する際に培養した複数の細胞集団も提供し、ヒト胚芽細胞から得られた霊長類多能性幹細胞株由来の未分化細胞；および本発明の方法に従って前記霊長類多能性幹細胞から分化した心筋細胞系列細胞の集団も含む。

40

【0016】

本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化は、無血清培地中で行われる。本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化は、0.5%未満の血清を含む培地中で行われる。本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化は、1%未満の血清を含む培地中で行われる。本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化は、5%未満の血清を含む培地中で行われる。

50

【0017】

本発明の特定の実施形態において、これらの細胞は、霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化時に、1つ以上のゼラチン、マトリゲル、ラミニン、フィブロネクチンおよび/またはビトロネクチンを含む基質に付着させる。

【0018】

本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞は、アクチビンによる培養工程の1~7日前に、MEM-CM+bFGF中で培養される。特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞は、アクチビンによる培養工程の約6日前に、MEM-CM+bFGF中で培養される。

【0019】

特定の実施形態において、RPMI+1X B27培地は、アクチビンの存在下で細胞を培養する場合に使用される。特定の実施形態において、RPMI+1X B27培地は、BMPの存在下で細胞を培養する場合に使用される。特定の実施形態において、RPMI+N2培地は、アクチビンの存在下で細胞を培養する場合に使用される。特定の実施形態において、RPMI+N2培地は、BMPの存在下で細胞を培養する場合に使用される。

【0020】

(定義)

「心筋細胞系列細胞」とは一般的に、心筋細胞の前駆体細胞および成熟心筋細胞双方を指す。特に指示がない限り、本開示内容における心筋細胞系列細胞、前駆体または心筋細胞の言及は、上に定義した通り、心筋細胞の個体発生の制限のない何れかの段階の細胞にも一様に適用することができる。以下に記載の通り、心筋細胞系列細胞は、以下の一覧の1つ以上のマーカー(時には少なくとも3個または5個のマーカー)を有する場合がある:心臓トロポニンI(cTnI)、心臓トロポニンT(cTnT)、サルコメアミオシン重鎖(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-カドヘリン、 β -1-アドレナリン受容体(β -1-AR)、ANF、転写因子のMEF-2ファミリー、クレアチンキナーゼMB(CK-MB)、ミオグロビン、または心房性ナトリウム利尿因子(ANF)。

【0021】

「胚様体」という用語は、霊長類多能性幹細胞が懸濁培養液または凝集物中に非特異的に分化することができる場合に生じる分化および部分分化細胞を含む不均質細胞群を指す。

【0022】

本明細書で使用される「霊長類多能性幹細胞」とは、何れかの種類の胚組織(胎児または胎児前組織)に由来し、3胚葉(内胚葉、中胚葉、外胚葉)全ての誘導体である種々の細胞型の後代を、当技術分野で認められる標準的な試験(例えば8~12週齢のSCIDマウスにおける奇形腫の形成能、または組織培養中における3胚葉全ての識別可能な細胞の形成能)に従い、適切な条件下で生成できる特性を有する細胞を指す。霊長類多能性幹細胞の定義には、種々の胚細胞型、例えば、ヒト胚性幹(hES)細胞(例えば、Thomson, et al. (Science 282:1145, 1998)を参照)およびヒト胚性生殖(hEG)細胞(例えば、Shambloott, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998を参照);その他の霊長類の胚幹細胞、例えばアカゲザル幹細胞(例えば、Thomson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995を参照)、マーモセット幹細胞(例えば、Thomson, et al., Biol. Reprod. 55:254, 1996を参照)が含まれる。

【0023】

本明細書で使用される「未分化霊長類多能性幹細胞」とは、集団における霊長類多能性幹細胞およびその誘導体の実質的な割合が未分化細胞の形態的特性を示す細胞培養を指す。集団内の未分化細胞のコロニーは、部分的に分化した隣接細胞により囲まれること多い

10

20

30

40

50

ことが理解される。

【0024】

本明細書で使用される「胚幹細胞」とは、胚芽細胞段階の、または細胞が3胚葉に実質的に分化する前のヒト胚に由来する多能性幹細胞を指す。但し、特に明示的に要求されない限り、この用語は、hES細胞の表現型特性を担持する一次組織および樹立した株、並びに3胚葉の各後代を精製する能力を常に有するような株の後代が含まれる。「ヒト胚性幹細胞」(hES細胞)のプロトタイプについては、Thomson, et al. (Science 282:1145, 1988; 米国特許第6200806号)に記載されている。

【0025】

本明細書で使用される「アクチビン」とは、トランスフォーミング増殖因子(TGF-)スーパーファミリーのメンバーであるポリペプチド増殖因子を指す。現在のところ、4つのアクチビン(A、AB、BおよびC)が知られている。

【0026】

本明細書で使用される「骨形態形成タンパク質(BMP)」とは、TGF-スーパーファミリーのポリペプチド増殖因子を指す。現在のところ、BMPファミリー内では約20のメンバーが知られている。本出願において、「BMP」という用語にBMP-1は含まれない。本明細書で使用される「富化する」とは、混合物中の成分濃度を増加させることを指す。例えば、本発明の特定の実施形態において、所与の細胞集団は、その集団における心筋細胞系列細胞の割合を増加させることによって富化される場合がある。

【0027】

本明細書で使用される「心臓体」とは、ヒト心筋細胞系列細胞の複数の特性を担持する、懸濁液中の霊長類多能性幹細胞由来細胞の群を指す。

【0028】

本明細書で使用される「直接分化」とは、霊長類多能性幹細胞を中間体である胚様体を形成することなく、特定の組織型の細胞に富化させた後代に分化するプロセスを指す。即ち、直接分化という用語は、少量の細胞凝集物を無意識に形成するプロセスを包含する。

【0029】

本明細書で使用される「遺伝子的に変化した」、「トランスフェクトした」または「遺伝的に形質転換した」とは、ポリヌクレオチドを何れかの好適な人工操作の手段により細胞に転移させているか、または細胞が最初に変化した細胞の後代であり、ポリヌクレオチドを遺伝して受け継いでいるプロセスを指す。ポリヌクレオチドは、細胞に高濃度のタンパク質を発現させる、対象のタンパク質をコードする転写可能な配列を含むか、あるいはそれ自体タンパク質をコードすることなくタンパク質の発現に影響する(未分類の細胞または別のポリヌクレオチド配列の導入の何れかにより発現する)siRNAまたはアンチセンスRNA等の分子をコードする配列を含む場合がある。遺伝的変化は、変化した細胞の後代が同じ変化を有する場合に「遺伝的に受け継ぐことができる」とされる。

【0030】

本明細書で使用される「無血清」とは、基準組成物に血清が添加されていない状態を指す。

【0031】

本明細書で使用される「フィーダー細胞」とは、異なる組織型および一般的には異なるゲノムの細胞であり、これは、共培養した細胞の増殖を促進および/または分化を制御する働きを果たす場合がある。例えば、未分化の霊長類多能性幹細胞は、未分化状態の維持を助けるフィーダー細胞で共培養することができるが、霊長類多能性幹細胞は、特定の組織型に分化を導くフィーダー(例えば、心筋細胞系列細胞)で培養することができる。

【0032】

本明細書で使用される「無フィーダー」とは、基準組成物にフィーダー細胞が添加されていない状態を指す。即ち、無フィーダーという用語は、とりわけ、一次培養物由来のフィーダーの一部が二次培養物中に存在する場合であっても、霊長類多能性幹細胞を、フィ

10

20

30

40

50

ーダーを有する培養物からフィーダーを添加していない培養物に継代培養する状態を包含する。

【0033】

本明細書で使用される「培養する」とは、細胞をインビトロで維持および/または拡大するプロセスを指す。

【0034】

本明細書で使用される「同じゲノム」とは、霊長類多能性幹細胞、および霊長類多能性幹細胞由来の分化細胞のゲノムを指し、制限酵素断片長多型(「RFLP」)またはSNP分析により測定した場合に、染色体DNAが霊長類多能性幹細胞およびその由来細胞の間で90%以上同一であることを意味する。霊長類多能性幹細胞またはその由来細胞が遺伝的に変化している場合でも、これらの細胞は、非操作遺伝的要素を保持することから、これが由来する細胞またはこれに由来する細胞として同じゲノムを有すると考えられる。

10

【0035】

本明細書で使用される「マトリゲル」とは、BD MatrigelTM Basement Membrane Matrixを指し、これは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍細胞により生成された市販の基底膜調製物であり、ラミニン等の細胞外マトリックス成分を含む。マトリゲルは、Becton, Dickinson and Company(米国ニュージャージー州フランクリンレイクス)から市販されている。

【0036】

本明細書で使用される「RPMI」とは、RPMI培地1640(invitrogen[米国カリフォルニア州カールスバッド])を指す。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

(発明の詳細な説明)

一般的技法：本発明の実施に有用な一般的技法の詳細については、細胞生物学、組織培養、胎生学および心臓生理学の標準的な文献およびレビューを参照されたい。

【0038】

組織および細胞培養並びに胚幹細胞に関しては、以下を参照されたい：Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); Guide to Techniques in Mouse Development (P. M. Wasserman, et al., eds., Academic Press 1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (P. D. Rathjen, et al., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998; および R. I. Freshney, Culture of Animal Cells, Wiley-Liss, New York, 2000)。心細胞の培養に関する一般的な参考文献には、以下が含まれる：The Heart Cell in Culture (A. Pinson ed., CRC Press 1987), Isolated Adult Cardiomyocytes (Vols. I & II, Piper & Isenberg eds., CRC Press 1989); および Heart Development (Harvey & Rosenthal, Academic Press 1998)。分子および細胞生化学の一般的な方法には、以下のような標準的な文献を参照されたい：Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed.; Immunolo

30

40

50

gy Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); および Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)。

【0039】

(霊長類多機能性幹細胞)

本発明は、霊長類多機能性幹細胞を心筋細胞系列細胞に分化させる方法を提供する。本発明の方法に使用される場合がある霊長類多機能性幹細胞には、胚幹細胞が含まれるが、これに限定されない。胚幹細胞は、霊長類種の胚芽細胞から単離することができる(米国特許第5843780号; Thomson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995)。ヒト胚性幹(hES)細胞は、例えば Thomson, et al. (米国特許第6200806号; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) および Reubinoff, et al., Nature Biotech. 18:399, 2000 に記載の技法を使用して、ヒト胚芽細胞から調製することができる。その他の霊長類多機能性幹細胞型には、国際公開第WO 01/51610号(Bresagen)に概説される原始外胚葉様(EPL)細胞、およびヒト胚性生殖(hEG)細胞(Shambloott, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

本発明に使用する胚幹細胞は胚幹細胞株から選択される場合もあれば、一次胚組織から直接得る場合もある。胚幹細胞株は既に数多く樹立されており、これらには以下が含まれるが、これらに限定されない: H1、H7、H9、H13 または H14 (参照: Thompson); hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03 (Bresagen, Inc. [米国ジョージア州アテネ]); HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6 (ES Cell International, Inc. [シンガポール]); HSF-1、HSF-6 (カリフォルニア大学[サンフランシスコ]); I3、I3.2、I3.3、I4、I6、I6.2、J3、J3.2 (Technion-Israel Institute of Technology, [イスラエル ハイファ]); UCSF-1 および UCSF-2 (Genbacev, et al., Fertil. Steril. 83(5):1517-29, 2005); HUES1-17 株 (Cowan, et al., NEJM 350(13):1353-56, 2004); および ACT-14 株 (Klimanskaya, et al., Lancet, 365(9471):1636-41, 2005)。

【0041】

特定の実施形態において、本発明において使用する霊長類多機能性幹細胞は、無フィーダーの形態で得られる場合がある(例えば、Klimanskaya, et al., Lancet, 365(9471):1636-41, 2005 を参照)。

【0042】

(霊長類多機能性幹細胞培養)

霊長類多機能性幹細胞は、種々の基質、培地および他の補給剤並びに当技術分野で既知の因子を使用して培養される場合がある。霊長類多機能性幹細胞は、増殖を促進するものの、分化を抑制する培養条件を使用して、継続的に培養物中で繁殖させることができる。例示的な培地を 80% DMEM (例えば、Knock-Out DMEM、Gibco)、既に明らかなウシ胎仔血清(FBS、Hyclone)若しくは血清代替品(米国特許公開第2002/0076747 A1号, Life Technologies Inc.)の何れか 20%、非必須アミノ酸 1%、L グルタミン 1 mM 並びにメルカプト

10

20

30

40

50

エタノール 0.1 mM から精製する。

【0043】

特定の実施形態において、霊長類多機能性幹細胞は、フィーダー細胞、一般的には胚または胎児組織由来の繊維芽細胞層上で培養される (Thomson, et al., Science 282:1145, 1998)。特定の実施形態において、これらのフィーダー細胞は、ヒトまたはマウス由来である。ヒトフィーダー細胞は、種々のヒト組織から単離し、ヒト幹性細胞を繊維芽細胞へ分化することにより得ることができる (例えば、国際公開第 WO 01/51616 号を参照)。特定の実施形態において、使用される場合があるヒトフィーダー細胞には、以下が含まれるが、これらに限定されない：胎盤繊維芽細胞 (例えば、Genbacev, et al., Fertil. Steril. 83(5):1517-29, 2005 を参照)、卵管上皮細胞 (例えば、Richards, et al., Nat. Biotechnol., 20:933-36, 2002 を参照) 包皮繊維芽細胞 (例えば、Amit, et al., Biol. Reprod, 68:2150-56, 2003 を参照)、子宮内膜細胞 (例えば、Lee, et al., Biol. Reprod. 72(1):42-49, 2005 を参照)。

10

【0044】

特定の実施形態において、胚幹細胞は、フィーダー細胞を添加していない未分化の状態 で維持される場合がある (例えば、Rosler, et al., Dev. Dynam. 229:259-274, 2004 を参照)。無フィーダー培養は、分化しない細胞の増殖を促進する因子を含む栄養培地により一般的に支持される (米国特許第 6,800,480 号)。特定の実施形態において、このような因子は、このような因子を隠す細胞、例えば、照射された (約 4,000 rad) 初代マウス繊維芽細胞、テロマー化したマウス繊維芽細胞、または霊長類多能性幹細胞由来の繊維芽細胞様細胞 (米国特許第 6,642,048 号) で培地を培養することにより培地に導入される場合がある。培地は、無血清培地、例えば、20% 血清代替品および bFGF 4 ng/mL を補充した KO DMEM 中にフィーダーを入れることによって馴化することができる。1~2 日間馴化した培地は、追加の bFGF と共に補充され、1~2 日間霊長類多機能性幹細胞培養を支持するために使用される (例えば、国際公開第 WO 01/51616 号; Xu, et al., Nat. Biotechnol. 19:971, 2001 を参照)。

20

30

【0045】

あるいは、新鮮なまたは非馴化培地を使用することができ、これは、未分化形態の細胞の増殖を促進する添加因子 (繊維芽細胞増殖因子またはホルスコリン等) を補充している。例としては、X-VIVOTM 10 (Biowhitaker) または QBSFTM 60 (Quality Biological Inc.) のような基本培地があり、これは、bFGF 40~80 ng/mL を補充し、場合により幹細胞因子 (15 ng/mL) または Flt3 リガンド (75 ng/mL) を含む (例えば、Xu, et al., Stem Cells 23(3):315-23, 2005 を参照)。これらの培地配合は、その他の系の 2~3 倍の細胞成速度を支持する利点がある (例えば、国際公開第 WO 03/020920 号を参照)。

40

【0046】

例えば、霊長類多能性幹細胞は、15,000 細胞/cm² 超 (場合により 90,000 個/cm² ~ 170,000 個/cm²) にて培地に入れる。一般的に、酵素消化は細胞が完全に分散する (即ち、コラゲナーゼ IV にて約 5 分) 前に停止する。次いで、約 10~2,000 個の細胞のクランプを、さらに分散させずに、基質に直接入れる。あるいは、細胞を酵素なしで回収後、プレートは、0.5 mM EDTA の PBS 溶液で約 5 分間インキュベートすることにより、またはプレートから所望の細胞を機械的に簡単に分離させることにより、例えば、微細ピペットでこするまたは分離することによりコンフルエンスに達する。培養管から洗浄後、細胞をさらに分散しないで新しい培養に入れる。さらに説明すると、フィーダーの非存在下で培養した密集したヒト胚性幹細胞を 0.05% (w

50

t / vol) のトリプシン (Gibco) および 0.053 mM の EDTA 溶液にて、37 にて 5 ~ 15 分間インキュベートすることにより、プレートから取り除くことができる。プレート内の残りの細胞を取り出し、この細胞をすり潰して、単一細胞および小細胞群を含む懸濁液とし、次いで、生存を促進し分化を制限するために、細胞 50,000 ~ 200,000 個 / cm² の密度でプレートに入れた。

【0047】

顕微鏡下において、霊長類多能性幹細胞は、核/細胞質比が高く、核小体が顕著に出現し、細胞間結合があまり認識できないコロニー形成を集約する。霊長類多能性幹細胞は、一般的に段階特異胚抗原 (SSEA) 3 および 4 および Tra-1-60 および Tra-1-81 を示す抗体を使用して検出可能なマーカーを発現する。また、未分化ヒト胚性幹細胞もまた、一般的には、RT-PCR 法により検出されるように、転写因子 Oct-3/4、Cripto、ガストリン放出ペプチド (GRP) 受容体、ポドカリキシン様タンパク質 (PODXL) およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) (米国特許公開第 2003/0224411 A1 号) を発現する。

10

【0048】

(霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化)

本発明は、とりわけ、初めにアクチビンの存在下で、霊長類多能性幹細胞を逐次培養し、BMP の存在下でその後に培養することにより、霊長類多能性幹細胞を心筋細胞系列細胞に分化させる方法を提供する。BMP は、アクチビンによる培養工程時に除外されるが、アクチビンは、場合によりその後の BMP 培養工程の間も含む場合がある。

20

【0049】

特定の実施形態において、アクチビンは、10 ng/mL ~ 200 ng/mL または 25 ng/mL ~ 100 ng/mL、あるいは 50 ng/mL ~ 100 ng/mL の濃度にて培養培地に含まれる。特定の実施形態において、アクチビンは、10 ng/mL 未満または 200 ng/mL 以上の濃度にて培養培地に含まれる。

【0050】

特定の実施形態において、BMP は、10 ng/mL ~ 200 ng/mL または 25 ng/mL ~ 100 ng/mL、あるいは 50 ng/mL ~ 100 ng/mL の濃度にて培養培地に含まれる。特定の実施形態において、BMP は、10 ng/mL 未満または 200 ng/mL 以上の濃度にて培養培地に含まれる。

30

【0051】

特定の実施形態において、分化に使用するアクチビンは、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン AB またはアクチビン C である。特定の実施形態において、複数のアクチビンを使用される場合がある。特定の実施形態において、他の TGF スーパーファミリーのメンバー、例えば、TGF、nodal または lefty を、本発明の方法のアクチビンの代わりに置換する、またはアクチビンに添加することができる。

【0052】

特定の実施形態において、分化に使用する BMP は、BMP-2、BMP-4 または BMP-7 である。特定の実施形態において、BMP は、BMP-2、BMP-4 または BMP-7 以外の BMP である (BMP-1 を除く)。特定の実施形態において、複数の BMP を使用される場合がある。

40

【0053】

特定の実施形態において、分化細胞は、BMP 工程後にアクチビンおよび BMP が共に非存在下で培養される。これらの特定の実施形態において、IGF は、この培養工程に含まれる。これらの特定の実施形態において、IGF は、10 ng/mL ~ 500 ng/mL、または 25 ng/mL ~ 100 ng/mL、あるいは 50 ng/mL ~ 100 ng/mL の濃度にて含まれる。特定の実施形態において、IGF は、10 ng/mL 以下または 500 ng/mL 以上の濃度にて含まれる。IGF は、IGF-1 または IGF-2 であってよい。特定の実施形態において、インスリンを本発明の方法の IGF と置換される場合がある。

50

【0054】

霊長類多能性幹細胞の心筋細胞系列細胞への分化時に、細胞は、種々の指定された時間でアクチビン、BMPまたはIGFの存在下で培養される。特定の実施形態において、アクチビンを有する培養工程は、12時間～36時間の期間または12時間～2日間の期間または6時間～4日間の期間、あるいは4時間～5日間の期間である。特定の実施形態において、アクチビンを有する培養工程は、5日間以上である。

【0055】

特定の実施形態において、BMPを有する培養工程は、3日～5日間の期間、または2日～8日間の期間、または1日～14日間の期間である。特定の実施形態において、BMPを有する培養工程は、14日間以上である。

10

【0056】

特定の実施形態において、IGFを有する培養工程は、3日～5日間の期間、または2日～8日間の期間、または1日～4週間の期間である。特定の実施形態において、IGFを有する培養工程は、4週間以上である。

【0057】

例えば、特定の実施形態において、マトリゲル上のにせたヒト胚性幹細胞は、初めにBMPの非存在下でアクチビンA 50 ng/mLにて約1日間培養された後、アクチビンの非存在下でBMP-4 50 ng/mLにて約4日間培養される場合がある。次いで、アクチビンおよびBMP共に非存在下でIGF-1 50 ng/mLの存在下で2週間培養される場合がある。特定の実施形態において、得られた心筋細胞系列細胞は、回収され、実施例3に記載の通りパーコール勾配により富化される。

20

【0058】

特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞は、直接分化により心筋細胞系列細胞に分化させる場合がある。霊長類多能性幹細胞の分化は元来、胚様体を意図的に形成することを伴い、これは異なる細胞型間でのクロストークを可能にし、胚を暗示させる方法で組織形成を促進すると考えられた。しかし、多くの場合、分化プロセスをより制御して胚様体の形成の必要性がなくなることは有利であり、得られた細胞集団は、より均質になる傾向がある(例えば、WO 01/51616、米国特許公開第2002/0151053 A1号を参照)。

【0059】

直接分化技法の有利なことの1つに、他の方法では一般的であるような、血清または血清代替品を、心筋細胞分化プロセスを開始または支持するために必要としないことがある。代わりに、培地を心筋細胞またはニューロン等の分化細胞を支持する人工栄養補給剤を含むように配合することができる。例として、B27補給剤、N2補給剤およびG5補給剤(Life Technologies/Gibco)がある。特定の実施形態において、補給剤には、栄養素およびヒトインスリン(500 µg/L)、ヒトトランスフェリン(5～10 mg/L)およびセレニウム(0.5 µg/mL)のような共同因子を含み、ブトレッシン(1.5 mg/L)、ピオチン(1 µg/L)、ヒドロコルチゾン(0.4 µg/L)またはプロゲステロン(0.6 µg/L)および/またはEGFまたはFGF等の低濃度のマイトゲン類(1 µg/L)も含む場合がある。販売規模の製造およびヒト治療において、非ヒト動物由来の成分を排除することが有利な場合がある。

30

40

【0060】

特定の実施形態において、分化工程中に使用する培養培地は、無血清である。特定の実施形態において、分化工程中に使用する培養培地は、血清0.25%以下若しくは血清0.5%以下、または血清1.0%以下、または血清2.0%以下、または血清5.0%以下あるいは血清10%以下を含む。

【0061】

このような直接分化法の利点に関係なく、本発明の特定の実施形態において、霊長類多能性幹細胞は、本発明の方法により、アクチビンによる培養工程を除いた分化プロトコルのある時点で、胚様体の形成を通して心筋細胞系列細胞に分化される場合がある。胚様体

50

を当技術分野で既知の種々の方法により形成することができる。

【0062】

特定の実施形態において、分化細胞は、本発明の方法において基質上で培養される。本発明に使用することができる基質には、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ポリ-L-リシン-ヒアルロン酸被覆組織培養プラスチックまたはマトリゲルが含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

本発明の実施において、細胞の培養に使用される場合がある固体表面には種々のものがある。これらの固体表面には、6-ウェル、24-ウェル、96-ウェル、または144-ウェルプレート等の標準細胞培養プレートが含まれるが、これらに限定されない。その他の固体表面には、微粒子担体およびディスクが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、微粒子担体はビーズである。これらのビーズは、種々の形態、例えば細胞付着性を補強するため陽性電荷基を有するCytodex Dextran微粒子担体ビーズ、細胞付着のためのゼラチン/コラーゲン被覆ビーズおよび細胞の付着のための様々な多孔を有するマクロ多孔性微粒子担体ビーズとなる。Cytodex dextran、ゼラチン被覆および多孔性微粒子担体ビーズは、市販されている(Sigma-Aldrich [米国ミズーリ州セントルイス]またはSolohill Engineering Inc. [米国ミシガン州アンアーバー])。特定の実施形態において、ビーズは、面積350~500cm²、粒径90~200μmである。ビーズは、ガラスまたはプラスチックを含むがこれらに限定されない種々の材料で構成される場合がある。特定の実施形態において、ディスクは、細胞を付着させるために攪拌タンクバイオリアクターにおいて使用される場合がある。ディスクは、New Brunswick Scientific Co., Inc. (米国ニュージャージー州エジソン)等より販売されている。特定の実施形態において、ディスクは、Fibra-cel Disksであり、これはポリエステル/ポリプロピレンディスクである。これらのディスク1gは、表面面積1,200cm²となる。

【0064】

固体表面は、種々の物質から製造することができ、ガラス若しくはプラスチック、例えばポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、メリネックスまたはサーマノックスが含まれるが、これらに限定されない。本発明の特定の実施形態において、固体表面は、3次元の形状であってよい。3次元固体表面の例は、例えば米国特許公開第20050031598号に記載されている。

【0065】

特定の実施形態において、細胞は、本発明の方法の中で単一細胞懸濁液中にある。単一細胞の懸濁は、スピナーフラスコ、振盪フラスコまたは発酵装置の培養を含むがこれらに限定されない種々の方法で実施される場合がある。使用される場合がある発酵装置には、Celligen Plud (New Brunswick Scientific Co., Inc. [米国ニュージャージー州エジソン])およびSTRまたは攪拌タンクリアクター (Applikon Inc. [米国カリフォルニア州フォスターシティ])が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、バイオリアクターは、培地で継続的に灌流される場合もあれば、流加状態で使用される場合もある。バイオリアクターは、2.2L、5L、7.5L、14Lまたは20Lのような様々な大きさとなる。

【0066】

(心筋細胞系列細胞の富化および拡大)

本発明は、富化工程なしに高純度心筋細胞系列細胞集団を得る方法を提供する。しかし、1回以上の富化工程を加えることで、さらに高純度心筋細胞系列細胞集団を生成することができる。それゆえ、本発明の方法には、本発明の分化工程により得られた心筋細胞系列細胞を富化および/または拡大する工程が含まれる場合がある。特有の細胞型を富化する種々の方法は、当業者に既知であり、これには、機械的分離法、密度分離法、細胞分別、磁気分別および遺伝選択法が含まれるがこれらに限定されない(細胞分離の概説につい

10

20

30

40

50

ては、Freshney, Culture of Animal Cells, Wiley-Liss, New York, 2000 - Chapter 14を参照)。これらの方法論の一部の例を以下に説明する。

【0067】

(密度勾配)

特定の実施形態において、心筋細胞系細胞は、例えばパーコール(例えば、本明細書の実施例3およびXu, et al., Circ. Res. 91(6):501-08, 2002)、Ficoll(Pharmacia)、メトリザミド(Nygard)、RediGrad(GE Healthcare)およびデキストランを含むがこれらに限定されない密度勾配培地を使用する密度勾配分離法により富化される。

10

【0068】

(細胞分別法)

多くの細胞分別法が、非心筋細胞系細胞から心筋細胞系細胞を分別するために利用可能である。これらの細胞分別法には、陰性免疫選択および陽性免疫選択が含まれるが、これらに限定されない。

【0069】

免疫選択とは、選択系の特異性が抗体または抗体様分子、例えばレクチンまたはハプテンにより付与される種々の技法を含む一般的な用語である。このような特異性の例としては、特異的細胞表面抗原の抗体親和性がある。2つ一般的な型の免疫選択技法が実施されている。陰性免疫選択は、不均質な集団から特異的亜集団の成分を排除、例えば本明細書の方法において霊長類多能性幹細胞の分化から生じる細胞集団から非心筋細胞系細胞の排除に関する。それに対し、陽性免疫選択は、特異的成分の直接選択および回収、例えば、本明細書の方法において霊長類多能性幹細胞の分化から心筋細胞系細胞の直接選択および回収を示す。種々の免疫選択型を本発明の実施に使用される場合があり、これには、フローサイトメトリー(FACS)、免疫磁気法、抗体カラム、免疫沈降および免疫パンニング法が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0070】

心臓体：特定の実施形態において、心筋細胞系細胞は、心臓体と呼ばれる細胞群に成長させることにより、さらに拡大または富化される場合がある。

【0071】

初めに、心筋細胞系細胞の表現型特徴を有する細胞を含み、場合により密度分離または他の技法により富化させた細胞集団を発生する。次いで、細胞に群を形成させ、懸濁液中の単一細胞を除去する。これは細胞群を安定させ、単一細胞含有上清をピペットで除去することよりなされる。次に進む前に、時には(例えば、簡潔なトリプシン処理および/または機械的分散により)細胞群を分解することが有利である。次いで、細胞を新鮮な培養培地(例えば、ウシ胎仔血清、血清代替品またはCCTを含む培地)において付着性の低いプレートの懸濁液にて培養することができ、「第2の」心臓体に再凝集することができる。次いで、必要な場合、培養を細胞10~5,000個(一般的には細胞50~1,000個)の細胞群として残る心筋細胞系細胞を周期的に再追加し続ける。

30

【0072】

適切な期間(一般的には1~7日)が経過後、培養した細胞を特徴付けのために回収し、または薬剤スクリーニングまたは製剤製造に使用することができる。精製効果は、細胞に単一細胞の除去および細胞群の再培養の追加のサイクルを8日間以上行う場合、向上する。各サイクルは場合により、細胞群が単一細胞またはより小さな細胞群に分散する工程を組み込むことができ、さらに拡大することができる。より大きな細胞群は、懸濁細胞の凝集または細胞群内の増殖の何れか、あるいはその両方により形成される場合がある。本発明の仮説において、心筋細胞系細胞は、適切な条件下でこのような細胞群を形成する傾向にあり、単一細胞の除去が他の細胞型を排除し、均質性の増加を助ける。

40

【0073】

心臓体技法を使用して、分化プロセスのどの段階の細胞集団の心筋細胞を拡大および/

50

または富化することができる。以下に挙げる通り、この技法は、前記の密度分離法による富化工程の後に使用することができる。本技法の実施は、本発明を実施後に行うことが有利である。特に、実時間PCR法により検出されたミオシン重鎖の発現は、細胞を7日間培養した場合、10～100倍増加する。組成物中の大きな割合の細胞群は、以下の自然な収縮活動を呈する：一般的に50%以上および既述の様態で加工する場合、潜在的に約80～100%。

【0074】

(ES分化心筋細胞系列細胞の特徴付け)

本発明の技法に従って得られた心筋細胞系列細胞を、多くの表現型の基準に従って特徴付けすることができる。

10

【0075】

霊長類多能性幹細胞株由来の心筋細胞および前駆体は、多くの場合、他の源からの心筋細胞の形態的特徴を有する。これらは、錐、円、三角または多角の形状を有し、免疫染色により検出可能なサルコメア構造が特徴である横紋を示す(図1)。これらは、平面状の細胞を形成し、または懸濁液中の基質または浮遊物に付着した状態で凝集することができ、電子顕微鏡にて調べた場合、一般的なサルコメアおよび心房性顆粒を示す。

【0076】

適当な環境下において、霊長類多能性幹細胞由来の心筋細胞は、多くの場合、自然な周期的収縮活動を示す。これは、適切なCa⁺⁺濃度および電解質バランスを有する適切な組織培養環境において培養する場合、培養培地に追加の成分を添加する必要なく、細胞が細胞の1軸に沿って収縮した後弛緩することを意味する。この収縮は、周期的であり、これは規則的または不規則に正常な緩衝液中1分当たり約6～200回、および多くの場合1分当たり約20～90回の収縮頻度で繰り返すことを意味する(図2)。各細胞は、それ自体の自然な周期的な収縮活動を示し、または組織中の近接する細胞、細胞凝集物または培養細胞質量に合わせて自然な周期的収縮活動を示す。

20

【0077】

細胞の収縮活動は、収縮の性質および頻度による培養条件の影響において特徴付けすることができる。利用可能なCa⁺⁺濃度を減少させるまたはさもなければCa⁺⁺の膜透過輸送体を干渉する化合物は、多くの場合、収縮活動に影響を及ぼす。例えば、L型カルシウムチャンネルブロッカージルチアゼムは、用量依存的に収縮活動を抑制する。一方、イソプレナリンおよびフェニレフリンのようなアドレナリン受容体作用薬は、陽性変時効果を有する。さらに細胞の機能的特性の追加の特徴として、Na⁺、K⁺およびCa⁺⁺のチャンネルの特徴付けを含むことができる。電気生理学について、心筋細胞様活動電位のパッチクランプ分析を研究することができる。Igelmund, et al., Pflugers Arch. 437:669, 1999; Wobus, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 27:752, 1995; および Doevendans, et al., J. Mol. Cell Cardiol. 32:839, 2000を参照されたい。

30

【0078】

心筋細胞系列細胞は、一般的に少なくとも1つの以下の心筋細胞特異的マーカーを有する：

40

- ・心臓トロポニンI(cTnI)、横紋筋収縮の制御のためのカルシウム感受性分子スイッチを提供するトロポニン複合体のサブユニット
- ・心臓トロポニンT(cTnT)
- ・Nkx2.5、マウス初期胚発生中の心臓中胚葉に発現する心臓転写因子であり、これは発達中の心臓内で持続する。

【0079】

また、細胞は、一般的に少なくとも1つ(および多くの場合、少なくとも3つ、5つまたはそれ以上)の以下のマーカーを発現する：

- ・心房性ナトリウム利尿因子(ANF)、発達中の心臓および胎児心筋細胞に発現するが

50

、成人では下方制御されるホルモン。心臓細胞中に高度な特異様式で発現するが、骨格筋細胞には発現しないため心筋細胞に適したマーカーであると考えられている。

- ・ミオシン重鎖 (MHC)、特に心臓特異的である鎖。
- ・チニン、トロポミオシン、サルコメアアクチニンおよびデスミン
- ・GATA-4、心臓中胚葉に高度に発現し、発達中の心臓内に持続する転写因子。多くの心臓遺伝子を調節し、心臓発生の役割を果たす。
- ・MEF-2A、MEF-2B、MEF-2CおよびMEF-2D；心臓中胚葉に発現し、発達中の心臓内に持続する転写因子。
- ・N-カドヘリン、心臓細胞間の付着を媒介する。
- ・コネキシン43、心筋細胞間のギャップ結合を形成する。
- ・ β 1アドレナリン受容体 (β 1-AR)
- ・クレアチンキナーゼMB (CK-MB) およびミオグロビン、これは、心筋梗塞後の血清において上昇する。
- ・ β -心臓アクチン、初期成長応答 (遺伝子) - I およびサイクリンD2。

10

【0080】

組織特異的マーカーを、適切な免疫学的技法、例えば細胞表面マーカーに対してフローサイトメトリーまたは親和性吸着、細胞内または細胞表面マーカーに対して免疫細胞化学 (例えば、細胞または組織切片の固定)、細胞抽出物に対するウェスタンブロット分析および細胞抽出物または培地に隠れた産物に対する酵素結合免疫分析を使用して検出することができる。cTnIおよびcTnT等の心臓マーカーと他のアイソフォームを区別する抗体は、SigmaおよびSpectral Diagnosticsのような供給業者から市販されている。細胞による抗原発現により、標準的な免疫細胞化学またはフローサイトメトリー分析において、かなりの検出可能な量の抗体が抗原と結合する場合、場合によって細胞を固定後、および場合によって標識した二次抗体を使用して抗体の検出が可能であるとされている。

20

【0081】

また、組織特異的遺伝子産物の発現は、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析または公式に利用可能な配列データ (GenBank) を使用して標準的な増幅方法で配列特異的プライマーを使用する逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) によりmRNA濃度で検出することができる。タンパク質またはmRNA濃度で検出する場合の組織特異的マーカーの発現は、濃度が未分化の霊長類多能性幹細胞のものより少なくとも2倍および好ましくは10~50倍以上である場合、陽性と考えられる。

30

【0082】

また、組織特異的遺伝子産物の発現を、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析または標準的な増幅方法における配列特異的プライマーを使用する逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) によりmRNA濃度にて検出することができる。詳細については、米国特許第5843780号を参照されたい。本開示内容に記載した特定のマーカーの配列データは、GenBank等の公式データベースから得ることができる (URL www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)。mRNA濃度での発現は、一般的な対照実験の標準的工工程における細胞試料の試験の結果が明らかに識別可能なハイブリッド形成または増幅産物を生じる場合、本開示内容に記載した試験の1つにおいて「検出可能」と言える。タンパク質またはmRNA濃度で検出する場合の組織特異的マーカーの発現は、濃度が未分化の霊長類多能性幹細胞の濃度より少なくとも2倍および好ましくは10以上または50倍である場合、陽性であると考えられる。

40

【0083】

マーカーを所望の表現型の細胞表面上で同定した場合、これらのマーカーを免疫選択に使用して、免疫パンニング法および抗体媒介フルオロセンス活性細胞分別等の技法により集団をさらに富化することができる。

50

【0084】

霊長類多能性幹細胞の樹立した株由来である場合、本発明の細胞集団および分離細胞をこれらが由来する株と同じゲノムを有するように特徴付けすることができる。これは、染色体DNAが霊長類多能性幹細胞と心臓細胞間でRFLPおよびSNP分析により90%以上同一であり、またこれは、心臓細胞が正常な有糸分裂の過程を介して未分化株から得られた場合、干渉することができることを意味する。心筋細胞系列細胞が親細胞集団由来であるという特徴は、幾つかの点で重要である。特に、未分化細胞集団を、共有したゲノム - かなりの群の心臓細胞または治療に有用な場合がある別の細胞型 - 例えば患者を心臓同種移植の組織適合性に予め耐性化させることができる集団の何れかで追加の細胞を生成するために使用することができる(米国特許公開第2002/0086005 A1号; 国際公開第WO 03/050251号)。

10

【0085】

(分化細胞の遺伝的变化)

本発明の細胞は、分化の前後の何れかに細胞を遺伝的に操作することにより1つ以上の遺伝的变化を含むように生成することができる(米国特許公開第2002/0168766 A1号)。例えば、細胞を、発達制限系列細胞または最終分化細胞になる前後の何れかに、細胞がテロメラーゼ逆転写酵素を発現するように遺伝的に変化させることにより複製能を増加するように加工することができる(米国特許公開第2003/0022367 A1号)。

【0086】

20

また、本発明の細胞は、組織再生に関与し、または投与部位に治療的遺伝子を送達する能力を高めるために遺伝的に変化させることができる。ベクターを所望の遺伝子をコードする既知の配列を使用し、また、分化細胞型においてPan特異的または特異的活性の何れかであるプロモーターと操作可能に結合させるように設計する。特に関心の高いものは、FGF等の種々の型の1つ以上の増殖因子、心房性ナトリウム利尿因子等の心臓栄養因子、cripto並びにGATA-4、Nkx2.5およびMEF2-C等の心臓転写制御因子を発現するよう遺伝的に変化させる細胞である。投与部位にてこれらの因子を生成することは、機能的表現型の導入、投与された細胞の有利な効果を向上させるまたは治療部位に近接する宿主細胞の増殖または活性を増加させることを容易にすることができる。

【0087】

30

特定の実施形態においては、1つ以上の抗原の発現を減少させるまたは排除し、その結果これらの細胞の免疫原性が低下するように、非ヒト心筋細胞系列細胞遺伝的に変化させることが望ましい。これは、例えば、非ヒト心筋細胞系列細胞をヒトに異種移植する場合に有用な可能性がある。

【0088】

(ES分化心筋細胞系列細胞の使用)

本発明は、多数の心筋細胞系列の細胞を生成する方法を提供する。これらの細胞集団は、多くの重要な研究、開発および商業化目的に使用することができる。

【0089】

(スクリーニング)

40

本発明の心筋細胞は、このような細胞およびこれらの種々の後代の特徴に影響する因子(例えば、溶剤、低分子薬、ペプチド類、オリゴヌクレオチド類)または環境条件(例えば、培養条件または操作)をスクリーニングするために商業的に使用することができる。

【0090】

幾つかの用途において、霊長類多能性幹細胞(未分化または分化)は、成熟因子を後の段階の心筋細胞前駆体または最終分化細胞に促進させる因子をスクリーニングする、または長期間培養のこのような細胞の増殖および維持を促進するために使用される。例えば、候補成熟因子または増殖因子を、細胞の追加培養および使用に関する所望の基準により、様々なウェルの細胞に添加した後、得られた幾つかの表現型の変化を決定することにより分析する。

50

【 0 0 9 1 】

本発明のその他のスクリーニング用途には、心筋組織の維持または修復の効果に対して薬学的化合物を試験することが含まれる。スクリーニングは、化合物がこの細胞において医薬的效果を有するよう設計されている、または別の場所で効果を有するよう設計された化合物がこの組織型の細胞において意図しない副作用を有する恐れがあるかの何れかのために行われる。スクリーニングは、本発明のいつかの前駆体細胞または最終分化細胞を使用して行うことができる。

【 0 0 9 2 】

一般的に、標準的な文献である *In vitro Methods in pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997 および米国特許第 5030015 号を参照されたい。候補となる薬学的化合物の活性の評価には一般的に、本発明の分化細胞と候補化合物を単一または他の薬剤と併用の何れかで組み合わせることが含まれる。本研究者は、形態学、マーカー表現型または化合物に帰因する細胞の機能的活性（未処理の細胞または不活性化化合物で処理した細胞を比較）の変化を測定し、次いで化合物の効果と認められた変化を関連付ける。

10

【 0 0 9 3 】

細胞毒性は、第一に、細胞生存能に対する影響、生存、形態および特定のマーカーおよび受容体の発現により測定することができる。染色体 DNA に対する薬物の効果を DNA 合成または修復を測定することに決定することができる。特に細胞サイクル中の不定期な回数または細胞複製に必要な濃度以上の [³H]-チミジンまたは BrdU 取り込みと、薬物効果は一致する。また、望ましくない影響として、中期分裂の広がりにより決定される、異常な割合の姉妹染色分体交換がある。詳細については、A. Vickers (pp 375-410 in *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997) を参照されたい。

20

【 0 0 9 4 】

細胞機能の影響は、表現型または心筋細胞の活性、例えば、マーカー発現、受容体結合、収縮性活動または電気生理学を細胞培養または *in vivo* の何れかにて観察する幾つかの標準的な試験を使用して評価することができる。また、医薬的候補物質を収縮活動の影響、例えば、収縮の範囲または頻度の増減を見るために分析することができる。影響が認められた場合、有効量中央値 (ED_{50}) を決定するために化合物の濃度を漸増することができる。

30

【 0 0 9 5 】

(動物試験)

本発明はまた、心筋細胞およびその前駆体を利用して、代謝機能の先天異常、疾患状態の影響または有意な外傷性障害の結果等、必要と感じる心筋組織の維持または修復を高める方法も提供する。

【 0 0 9 6 】

治療投与に対する細胞組成物の適切性を決定するために、初めに細胞を適切な動物モデルにおいて分析することができる。1濃度にて、細胞を *in vivo* の表現型の生存能および維持能を評価する。細胞組成物を免疫不全動物（例えば、ヌードマウスまたは化学的または放射により免疫不全となった動物）に投与する。組織を再生期間後に採取し、多能性幹由来細胞が依然として存在しているかについて評価する。

40

【 0 0 9 7 】

これは、検出可能な標識（例えば、緑色蛍光タンパク質またはガラクトシダーゼ）を発現する細胞、前標識されていた細胞（例えば、BrdUまたは [³H]チミジン）を投与することにより、またはその後の構造的細胞マーカーの検出（例えば、ヒト特異的抗体を使用）により実施することができる。投与細胞の存在および表現型を、ヒト特異的抗体を使用した免疫組織化学若しくは ELISA 法または公式の配列データによりヒトポリヌクレオチドに特異的に増幅するプライマーおよびハイブリッド形成条件を使用する RT-

50

PCRにより評価することができる。

【0098】

また、適切性は、心筋細胞系列細胞集団の処理の結果におこる心臓の回復の程度を評価することにより決定することができる。多くの動物モデルがこのような試験に利用可能である。例えば、心臓を、予備冷却したアルミニウム棒を左心室前壁の表面に接触して置くことにより凍結損傷させることができる(Murry, et al., J. Clin. Invest. 98:2209, 1996; Reinecke, et al., Circulation 100:193, 1999; 米国特許第6099832号; Reinecke, et al., Circ Res., Epub Mar 2004)。より大型の動物において、凍結損傷は、左心室前壁上に液体窒素で冷却した銅ディスクプローブ30~50mmを~20分間置くことによりなされる(Chiu, et al., Ann. Thorac. Surg. 60:12, 1995)。梗塞は、左冠動脈主幹部を結紮し(Li, et al., J. Clin. Invest. 100:1991, 1997)、または徐々に膨張して動脈を塞ぐAmeroid社のコンストラクションデバイスを使用することにより誘発することがきできる。損傷部位は、本発明の細胞製剤で処置し、損傷領域の細胞の存在について心臓組織を組織学検査により調べる。心機能は、左心室拡張終期圧、心室圧、圧上昇率および減圧率等のパラメータを測定することによりモニターすることができる。

10

【0099】

(ヒトにおける治療的使用)

十分に試験した後、本発明の分化細胞をヒト患者またはこのような治療が必要な他の試料の組織再構築または再生に使用することができる。細胞を目的の組織部位にグラフトまたは移動させ、機能的に不完全な領域を再生する様式で投与する。特別なデバイスを、直接心機能を再構築することが可能な細胞を所望の部位にて心臓腔、心膜または心筋内部に投与するために使用することが可能である。

20

【0100】

所望する場合、心筋細胞系列細胞の同種移植を受ける患者は、移植細胞の免疫拒絶を減少させるよう治療することができる。検討した方法には、シクロスポリンA等の従来の免疫抑制薬の投与(Dunn, et al., Drugs 61:1957, 2001)または多能性幹由来細胞の適合集団を使用することによる免疫耐性の誘発(WO 02/44343; 米国特許第6280718号; WO 03/050251)がある。他の手法は、心筋細胞系列細胞集団を使用して、試料に移植した細胞により生成される尿酸量を例えばアロプリノールで処置することにより減少させることがある。別法または併用して、予め患者にアロプリノールまたは尿酸を代謝する酵素、例えば尿酸酸化酵素を投与する(PCT/US04/42917)。

30

【0101】

本発明における再生薬の投与に適した患者は、種々の急性および慢性心疾患、例えば冠状心疾患、心筋症、心内膜炎、先天性心血管障害および先天性心不全を有する患者である。治療の効能は、臨床的に認められた基準、例えば、瘢痕組織の占める面積の減少若しくは瘢痕組織の再血管新成並びに狭心症の頻度および重度、または心室圧、収縮期圧、拡張終期圧、圧/時間、患者の運動性および生活の質の改善によりモニターすることができる。

40

【0102】

本発明の心筋細胞系列細胞は、ヒト投与のために十分に滅菌した状態下において調製された等張性賦形剤を含む、薬学的組成物の形態で供給することができる。分化工程は、心臓体である細胞を培養することを含む場合、プロテアーゼを使用してまたはゆっくりとした機械的操作により細胞を単一細胞または小細胞群の懸濁液に分散させることが望ましい。移植下で細胞の死滅の恐れを減少させるため、細胞を熱衝撃により処置し、または投与の約24時間前に約0.5U/mLのエリスロポイエチンにて培養することができる。

【0103】

50

医薬品配合の一般的な原則において、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; および Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000を参照する。投与に使用する経路およびデバイスにより、細胞賦形剤および幾つかの組成物の付随要素を選択する。また、この組成物は、心筋細胞系列細胞を移植し、または機能的に運動させることが容易な1つ以上の他の成分を含むまたはこれを伴うことができる。適切な成分には、心筋細胞系列細胞の付着を支持または促進するマトリックスタンパク質類または相補的細胞型、特に内皮細胞類がある。

10

【0104】

また、本発明は、製造、販売または使用中の如何なる時点において存在する1組の細胞または細胞の組み合わせからなる試薬系を含む。細胞組は、本開示内容に記載の複数の細胞集団の組み合わせを含み、例として、未分化の霊長類多能性幹細胞または他の分化細胞型を組み合わせ、多くの場合、同じゲノムを共有する分化多能性幹由来細胞型（心筋細胞類、心筋細胞前駆体、心臓体等）であるが、これらに限定されない。この組の各細胞型は、一緒にまたは別の容器に、同じ施設内または別の場所において、同時間または異なる時間に仕事上の関係を共有する同じ事業体または異なる事業体の管理下において包装することができる。

20

【0105】

本発明の薬学的組成物は、場合により所望の目的、例えば、心筋細胞の疾患状態または心筋異常を改善するために心筋細胞系列細胞の機能の再構築を記載した使用説明書を適切な容器に包装することができる。

【0106】

本発明の細胞を、cDNAライブラリの生成するために使用することができ、このcDNAライブラリは他の系列の細胞内に発現したcDNAに比較的汚染されていないことが好ましい。例えば、心筋細胞系列細胞を1,000rpmにて5分間の遠心分離により収集後、mRNAを調製し逆転写する。心筋細胞系列細胞の発現パターンを、マイクロアレイ分析により他の細胞型と比較することができる。一般的に、Fritz, et al., Science 288:316, 2000; "Microarray Biotechnology", L Shi, www.Gene-Chips.comに総説されている。

30

【0107】

また、本発明の分化細胞を使用して、心筋細胞系列細胞のマーカーに特異的な抗体を生成することができる。ポリクローナル抗体を、免疫原性の形態において、本発明の細胞を脊椎動物に注入することにより生成することができる。モノクローナル抗体の生成は、Harrow & Lane (1988)、米国特許第4491632号、第4472500号および第4444887号およびMethods in Enzymology 73B:3 (1981)のような標準的な参考文献に記載されている。

40

【0108】

本出願に記載の全ての刊行物および特許は、如何なる目的においても参考として本明細書に組み入れられている。

【実施例】

【0109】

(実施例1)

ゼラチン/FBSにおける3因子分化

ゼラチン/FBS被覆表面の調製：ゼラチン0.5%溶液1mL/ウェルを6-ウェルプレートのウェルに添加し、37にて一晩インキュベートした。ゼラチン溶液を除去し、十分な20%FBS含有培地（例えば、20%FBS(Sigma)含有knock

50

ut DMEM)をウェルの表面を被覆するよう添加した。プレートを37℃にてさらに5～6時間インキュベートした。ヒト胚性幹細胞を添加する前に培地をウェルから除去した。

【0110】

その後の分化のための未分化ヒト胚性幹細胞のプレーティング：未分化ヒト胚性幹細胞6ウェル中1ウェルをa)培地を除去し、b)ウェルをPBSにて1回洗浄し、c)0.25%トリプシン/500mM EDTA溶液1mLを添加することにより分離した。ウェルを37℃にて10分間インキュベートした後、1mLピペットで10回粉碎した。細胞が完全に分離していることを確かめるため、ウェルを顕微鏡下で調べた。20%FBS含有培地2mL(例えば、20%FBS含有knockout DMEM)を添加し、トリプシンを不活性化した。分離した細胞を計数し、この細胞数を使用して、所望の密度にて残りのウェルから得られた細胞をプレートに入れた。

10

【0111】

培地を残りのウェルから除去した。コラゲナーゼ20単位/mL溶液をウェル(1mL/ウェル)に添加した。ウェルを37℃にて10分間インキュベートし、コラゲナーゼ溶液を除去した。MEF馴化培地1mL+bFGF8ng/mLをウェルに添加した。ウェルを細胞が(小細胞群に)分離するまで5mLピペットでこすり、さらに粉碎しなかった。細胞を所望の密度に希釈し、上記のように調製した6ウェルプレートに入れた(この場合、1ウェル当たり5mL中の細胞は670,000個であり、3ウェルを入れた)。ES細胞を、消耗した培地を除去し、新しいMEF-CM+bFGF8ng/mLに入れ換えることにより毎日再追加した(細胞を木曜日に入れるため、土曜日の追加は、一般的に省略した)。

20

【0112】

増殖因子処理：上記のように成長6日後に、細胞の培地を除去し、RPMI+1X B27補給剤(Invitrogen)+アクチビンA50ng/mL(R&D systems)に入れ換えた。18～24時間後、培地を除去し、RPMI+1X B27補給剤+BMP-4 50ng/mL(R&D systems)に入れ換えた。BMP-4含有培地を加えて合計4日後、培地を除去し、アクチビンまたはBMPを含まないRPMI+1X B27補給剤+IGF-1 50ng/mL(R&D systems)に入れ換えた。培養を、消耗した培地を除去し、アクチビンおよびBMPを含まない新鮮なRPMI+1X B27補給剤+IGF-1 50ng/mLに入れ替えることにより、2～3日毎に再追加した。

30

【0113】

多くの細胞の拍動群がアクチビンAを添加後約12日目から認められた。アクチビンAを添加24日後に細胞を計数し(6ウェルプレート中合計3ウェルからの細胞910万個)、以下の工程において、心臓トロポニンI発現に対してFACS分析を行った：

FACS分析：培地を吸着により培養物から除去した。ウェルをカルシウム/マグネシウム非含有PBS5mLで1回洗浄した。1ウェル当たり0.25%トリプシン/500mM EDTA溶液0.5mLを添加し、細胞を37℃にて20分間インキュベートした。細胞を単一細胞懸濁液が得られるまでピペットで粉碎した。トリプシン消化は、20%FBS含有培地1mL(20%FBS含有knockout DMEM)を添加することにより停止した。細胞濃度を計数により評価し、約500,000個の細胞を染色毎に分類した(EMA、アイソタイプ、cTnI、cTnI+EMA；各々15mLコニカルチューブ)。

40

【0114】

細胞を入れたチューブを400×g、5分間の遠心分離にかけた。培地を吸引し、細胞ペレットを染色緩衝液(PBS+1%熱不活性化ヤギ血清および0.1%アジ化ナトリウム)1mLに再懸濁した。EMA染色において、細胞にEMAを加えて最終濃度5μg/mLにした。これらのサンプルを氷上、暗室にて15分間インキュベートした後、上記のようにペレット化した。EMA処理したサンプルをPBS500μLに再懸濁し、10分

50

間光に暴露した。E M A 処理したサンプルに 4 % パラホルムアルデヒド 5 0 0 μ L を加え、暗室、室温にて 1 5 分間インキュベートした。E M A を加えなかったが、その後に抗体染色したサンプルを上記のようにペレット化し、P B S 5 0 0 μ L に再懸濁した後、4 % パラホルムアルデヒド 5 0 0 μ L を加え、暗室、室温にて 1 5 分間インキュベートした。

【 0 1 1 5 】

全てのサンプルを上記のようにペレット化し、P B S 1 0 0 μ L に再懸濁した。次に全てのサンプルに氷冷 1 0 0 % メタノール 9 0 0 μ L を加え、氷上にて 3 0 分間インキュベートした。全てのサンプルに染色緩衝液 1 m L (P B S + 1 % 熱不活性化ヤギ血清および 0 . 1 % アジ化ナトリウム) を加え、上記のようにペレット化した。上清を吸引し、細胞を約 5 0 0 , 0 0 0 個 / 5 0 μ L の密度でブロッキング用緩衝液 (P B S + 2 0 % 正常ヤギ血清および 0 . 1 % アジ化ナトリウム) に再懸濁した。サンプルを 4 μ m にて 1 0 ~ 1 5 分間インキュベートした。各染色サンプルにおいて、少量の細胞 5 0 μ L を 1 2 \times 7 5 m m ポリスチレンチューブそれぞれに分注した。染色した各サンプルに心臓トロポニン I 抗体 (S p e c t r a l D i a g n o s t i c s) またはアイソタイプ対照 (チューブ当たりの最終の抗体量は、1 . 2 μ g) のどちら 5 0 μ L を加えた。サンプルを 4 μ m にて 3 0 分間インキュベートした。

10

【 0 1 1 6 】

染色緩衝液 2 m L を添加後、サンプルを上記のようにペレット化した。この洗浄工程を繰り返した。2 回目の洗浄上清を除去した後、サンプルを二次抗体 (アレクサ 4 8 8 で標識したヤギ抗マウス I g G の分子プローブ) 0 . 2 5 μ g 含有 P B S 中 5 % 正常ヤギ血清 5 0 μ L に再懸濁した。サンプルを 4 μ m の暗室にて 3 0 分間インキュベートし、染色緩衝液 2 m L を添加して洗浄し、上記のようにペレット化した。上清をデカントし、F A C S c a l i b u r m a c h i n e のフローを得るため、サンプルを染色緩衝液 3 0 0 μ L 中に再懸濁した。

20

【 0 1 1 7 】

本実験において、総細胞数の 5 4 . 4 9 % がトリプシン処理後、生存可能であった。これらの生存可能な細胞のうち、細胞の 2 4 . 6 7 ~ 2 7 . 3 6 % を心筋細胞サルコメアタンパク質心臓トロポニン I に対する抗体で染色した。これらの結果を図 1 に示す。

【 0 1 1 8 】

(実施例 2)

マトリゲル被覆表面における 3 因子直接分化

増殖因子減少型マトリゲルのアリコート (予め、冷 K n o c k o u t D M E M で 1 : 2 に希釈し、- 2 0 $^{\circ}$ C で保存) 。マトリゲル溶液をさらに冷 K n o c k o u t D M E M で 1 : 1 5 に希釈した。6 ウェルプレート中の空のウェルに希釈マトリゲル溶液 1 m L / ウェルを被覆し、プレートを室温で 4 ~ 5 時間インキュベートした。マトリゲル溶液を除去した後、ヒト E S 細胞を、ウェルを前洗浄することなく以下のようにプレートに入れた。

30

【 0 1 1 9 】

その後の分化のための未分化 h E S 細胞のプレーティング : 1) 未分化 h E S 細胞 6 ウェル中 1 ウェルの細胞を a) 培地を除去し、b) ウェルを P B S にて 1 回洗浄し、c) 0 . 0 5 % トリプシン / 5 0 0 m M E D T A 溶液 1 m L を添加して分離した。ウェルを 3 7 $^{\circ}$ C にて 1 0 分間インキュベートした。細胞が完全に分離するまで細胞をピペットで粉砕した。2 0 % F B S 含有培地 2 m L (例えば、2 0 % F B S 含有 k n o c k o u t D M E M) を添加してトリプシンを不活性化した。分離した細胞を計数し、この細胞数を使用して、所望に密度にて残りのウェルから得られた細胞をプレートに入れた。

40

【 0 1 2 0 】

培地を残りのウェルから除去した。コラゲナーゼ (2 0 0 単位 / m L) 溶液を 1 m L / ウェル添加し、ウェルを 3 7 $^{\circ}$ C にて 1 0 分間インキュベートした。コラゲナーゼ溶液を除去し、M E F 馴化培地 + b F G F 8 n g / m L を添加した。ウェルを細胞が (小細胞群に) 分離するまでピペットでこすり、さらに粉砕しなかった。細胞を所望の密度に希釈し、

50

上記のように調製した6ウェルプレートに入れた(1ウェル当たり5mL中の細胞185万個)。プレートに入れたhES細胞を、消耗した培地を除去し、新しいMEF-CM+bFGF8ng/mLに入れ換えることにより毎日(但し、2日目はない)追加した。

【0121】

増殖因子処理：上記のように成長6日後に、細胞の培地を除去し、RPMI+1X B27補給剤+アクチビンA50ng/mLに入れ換えた。18~24時間後、培地を除去し、アクチビンAを含まないRPMI+1X B27補給剤+BMP-4 50ng/mLに入れ換えた。BMP-4含有培地を加えて合計4日後、培地を除去し、アクチビンまたはBMPを含まないRPMI+1X B27補給剤+IGF-1 50ng/mLに入れ換えた。培養を、消耗した培地を除去し、アクチビンまたはBMPを含まない新鮮なRPMI+1X B27補給剤+IGF-1 50ng/mLに入れ替えることにより、2~3日毎に再追加した。

10

【0122】

拍動細胞は、アクチビンAを添加後10~12日目に認められた。21日目に、細胞を計数し、以下に記載の通り、心臓トロポニンI発現をFACSにより分析した。

【0123】

FACS分析：培地を吸着により培養物から除去した。ウェルをカルシウム/マグネシウム非含有PBS5mLにて1回洗浄した。1ウェル当たり0.25%トリプシン/500mMEDTA溶液1mLを添加し、細胞を37にて5分間インキュベートした。トリプシン中の分離細胞を15mLコニカルチューブに移し、37にて15~20分間さらにインキュベートした。細胞を単一細胞懸濁液が得られるまでピペットで粉碎した。トリプシン消化は、20%FBS含有培地(20%FBS含有knockoutDMEM)2mLを添加することにより停止した。細胞濃度を計数により評価し、約500,000個の細胞を染色毎に分類した(EMA、アイソタイプ、cTnI、cTnI+EMA;各々15mLコニカルチューブ)。細胞を入れたチューブを400xg、5分間の遠心分離にかけた。培地を吸引し、細胞ペレットを染色緩衝液1mLに再懸濁させた(PBS+2%熱不活性化ウシ胎仔血清および0.1%アジ化ナトリウム)。EMA染色において、細胞にEMAを加えて最終濃度5μg/mLにした。これらのサンプルを氷上、暗室にて15分間インキュベートした後、上記のようにペレット化した。EMA処理したサンプルをPBS1mLに再懸濁させ、10分間光に暴露した。EMA処理したサンプルに4%パラホルムアルデヒド1mLを加え、暗室、室温にて15分間インキュベートした。EMAを加えなかったが、その後に抗体染色したサンプルを上記のようにペレット化し、PBS500μLに再懸濁した後、4%パラホルムアルデヒド500μLを加え、暗室、室温にて15分間インキュベートした。全てのサンプルを上記のようにペレット化し、PBS100μLに再懸濁した。

20

30

【0124】

次に全てのサンプルに氷冷100%メタノール900μLを加え、氷上にて30分間インキュベートした。全てのサンプルに染色緩衝液1mL(PBS+2%熱不活性化ウシ胎仔血清およびラット抗マウスFcブロック(BD)0.2μg/0.5x10⁶個)を加え、上記のようにペレット化した。上清液を吸引し、細胞を約500,000個/100μLの密度にてブロッキング用緩衝液(PBS+20%正常ヤギ血清および0.1%アジ化ナトリウム)に再懸濁した。サンプルを4にて10~15分間インキュベートした。各染色サンプルにおいて、100μLの少量の細胞を12x75mmポリスチレンチューブそれぞれに分注した。染色した各サンプルに心臓トロポニンI抗体(Spectral Diagnostics)またはアイソタイプ対照(チューブ当たりの最終の抗体量は、1.2μg)の何れか20μLを加えた。サンプルを4にて30分間インキュベートした。染色緩衝液4mLを添加後、サンプルを上記のようにペレット化した。

40

【0125】

2回目の洗浄上清液を除去した後、サンプルを二次抗体(アレクサ647で標識したヤギ抗マウスIgGの分子プローブ)0.25μg含有PBS中5%正常ヤギ血清50μL

50

に再懸濁した。サンプルを暗室、4℃にて30分間インキュベートし、染色緩衝液4mLを添加して洗浄し、上記のようにペレット化した。上清液をデカントし、FACS caliber machineのフローを得るため、サンプルを染色緩衝液300 μ L+0.5%パラホルムアルデヒド中に再懸濁した。結果を、Flojoソフトウェアを使用して分析した。この実験において、総細胞数の69%がトリプシン分離後に生存可能であった。これらの生存可能な細胞のうち、8.9%が心筋細胞特異的タンパク質心臓トロポニンIに対する抗体に染色した(図2を参照)。

【0126】

(実施例3)

4相遠心分離法の富化の実施例

心筋細胞は、4日間の胚様体形成により、H7株のhES細胞から発生し、次いで、17日間ゼラチン被覆プレートにおいて増幅させた(5-アザ-デオキシ-シチジンおよび増殖因子を使用しなかった)。次いで、細胞を、コラゲナーゼBを使用して分離し、分化培地に再懸濁した。次いで細胞懸濁液をパーコール不連続勾配に層状に重ね、1,500g、30分間遠心分離した。以下の4つの画分を収集した：I、上部の界面；II、40.5%層；III、下部の界面；IV、58.5%層。細胞を洗浄し、分化培地に再懸濁した。免疫染色のための細胞を1ウェル当たり細胞 10^4 個にてチャンバースライドに播種し、2または7日間培養し、その後固定し染色した。

【0127】

結果を図3に示す。MHC陽性細胞の割合を、各画分用に3回のウェルからの30画像の細胞を計数することにより決定し、3つのウェルの細胞の平均 \pm 標準偏差で表した。

【0128】

【表3】

表3: パーコール分離

画分	細胞カウント数	拍動細胞	MHC 染色%	
			2日目	7日目
分離前		+	17 \pm 4.4%	15 \pm 4%
I	9.0 $\times 10^6$	\pm	2.6 \pm 0.5%	2.5 \pm 3.0%
II	1.6 $\times 10^6$	+	4.5 \pm 1.5%	2.4 \pm 0.9%
III	4.0 $\times 10^6$	++	35.7 \pm 2.7%	28.3 \pm 9.4%
IV	1.3 $\times 10^6$	+++	69.1 \pm 5.0%	52.2 \pm 14.5%

拍動細胞は全画分中に認められたが、画分IIIおよびIVが最も高い割合を含んだ。

【0129】

間接免疫細胞化学により決定した場合の細胞の表現型を表4に示す。

【0130】

【表4】

表4: 分離された細胞集団の特徴

エピトープ	心筋細胞系列	非心臓細胞
cTnI	++	-
心臓特異的 α/β MHC	++	-
心臓 c β MHC	++	-
サルコメア MHC	++	-
N-カドヘリン	++	±
平滑筋アクチン	++	サブセット
ミオゲニン	-	-
α -フェトプロテイン	-	-
β -チューブリン III	-	-
Ki67	サブセット	サブセット
BrdU	サブセット	サブセット
SSEA-4	-	-
Tra-1-81	-	-

10

密度勾配遠心分離により分離した心筋細胞集団を c T n I および M H C 染色により分類することができた。ミオゲニン、フェトプロテインまたはチューブリン III が染色しなかったことは、骨格筋、内胚細胞型およびニューロンが存在しなかったことを示す。S S E A - 4 および T r a - 1 - 8 1 染色が少なかったことにより、未分化 h E S 細胞が存在しなかったことを確認した。

20

【0131】

平滑筋アクチン (S M A) は、胚および胎児心筋細胞に存在するが、成人心筋細胞に存在しないことが報告されている (L e o r , a l . , C i r c u l a t i o n 9 7 : I 1 3 3 2 , 1 9 9 6 ; E t z i o n , e t a l . , M o l . C e l l C a r d i o l . 3 3 : 1 3 2 1 , 2 0 0 1) 。事実上、心筋細胞分化プロトコルにおいて得られた c T n I 陽性細胞全ておよび c T n I 陰性細胞のサブセットは、S M A に陽性であり、これらは、初期段階であり、増殖の可能性があることを示唆する。

30

【0132】

画分 I I I および I V の細胞を再度プレートに入れてさらに2日間培養した。M H C 陽性細胞の $43 \pm 4\%$ が B r d U を発現し、これらは、細胞サイクルの S 期にあることを示した。他の実験において、c T n I 陽性細胞のサブセットは、K i - 6 7 を発現することが認められた。これらの結果は、集団中の心筋細胞の約 20% または 40% が活動性増殖を行っていることを示す。

【0133】

(実施例4)

心臓体生成による収縮細胞の富化の実施例

この実施例は、心臓体である心筋細胞群のその後の培養により治療による使用および他の目的に望ましい特徴を有する細胞に富化することについて説明する。

40

【0134】

H 7 株の未分化 h E S 細胞を入れた 225 cm^2 フラスコ3つを使用して既述のように胚様体を発生させた。各フラスコの E B を培地 75 mL に再懸濁し、付着の弱い6ウェルプレート3つ(1ウェル当たり細胞懸濁液 4 mL)に移し、懸濁液中の E B を入れたプレートを合計9つ精製した。E B は、懸濁1日後に、新たに形成した E B を 50 mL コニカルチューブに移し(1チューブ当たり1プレート)、E B を攪拌することなく室温にて10~20分間静置した後、培地を除去し、新鮮な培地(チューブ当たり 25 mL)に入れ換えることにより再追加した。

【0135】

50

E Bをもとの接着の弱いプレートに戻し、さらに3日間20% FBS含有培地の懸濁液に維持した後、ゼラチン被覆した225 cm²組織培養フラスコの合計3つに移した。ゼラチン被覆したフラスコに移した2日後、培地を除去し、各フラスコに20% FBS含有培地75 mLを再追加した。同様の再追加を8日目、11日目、13日目、15日目および18日目に行った。分化培養をブレンザイム (Roche Applied Sciences [ドイツ ペンツベルグ]) で分離し、既述のようにパーコール不連続勾配において分画した。画分I V (高密度画分) を回収し、計数し、約 3.7×10^6 個の単一細胞および小細胞群を生成した。

【0136】

画分I V細胞を約6.5 mLの20% FBS含有培地に再懸濁し、15 mLコニカルチューブに移し、攪拌せずに室温にて10分間静置した。培地 (細胞 2.8×10^6 個含有、これは大部分の単一細胞) を除去し、新鮮な培地を入れ換えた。細胞懸濁液を単一の接着の低い6ウェルプレート (1ウェル当たり細胞懸濁液 ~ 4 mL) に移した。C Bを同様な様式 (50 mLチューブに移し、10分間静置し、培地を除去し、入れ換える) にて48時間毎に再追加した。

10

【0137】

図3は、実時間PCRにより測定したサルコメア遺伝子 MHCおよび心臓トロポニンIの発現を示す。ゼラチン培養20日後の発現に対して、パーコールによる細胞の分離により、画分I V細胞の発現が2~5倍に増加した。単一細胞を除去し、細胞群を回収することにより、発現が5~20倍に増加した。心臓体である細胞を培養して8日後、発現は、分離していない細胞に比べて100~500倍であった。

20

【0138】

C Bをゼラチンまたはマトリゲルに再び入れる場合、細胞群は付着、平面化し、広い範囲の自然な収縮細胞を生成する。動物試験に使用において、心臓体を直接埋め込み、または単一細胞の懸濁液に分散することができる。

【0139】

(実施例5)

H7hES細胞の分化を実施例1のように行った。但し、分化は6ウェルプレートの代わりに24ウェルプレートにて行い、因子量はウェル当たり1 mLであった。さらに、BMP-2およびBMP-4を25 ng/mL、50 ng/mLおよび100 ng/mLの濃度で使用した。各濃度で3回行った。図4は、対照の相対的倍率として表し、これはアクチビン、BMPまたはIGF-Iを添加しないプロトコルを実施した。また、BMP-2は分化プロトコルにおいて効果があったことが認められた。

30

【0140】

(実施例6)

H7hES細胞が密集する6ウェルプレートをPBS 2 mLで洗浄した。次いで、PBS中0.5 mM EDTA溶液2 mLを各ウェルに添加し、プレートを10分間、37でインキュベートした。EDTA溶液をマウス胚繊維芽細胞馴化培地 (MEF-CM) 1 mL + bFGF 8 ng/mL (「培地A」) に入れ換えた。未分化ES細胞を2~3回ピペットで分離した後、培地A中の細胞400,000個/ウェルにて24ウェルプレートに播種した。細胞を2日間37でインキュベートした。

40

【0141】

hES細胞の分化を誘発するため、培地Aを24ウェルプレートの1ウェル当たりB27:RPMI (1:50) (共にInvitrogenの試薬) 0.5 mL + アクチビンA 100 ng/mL (R&D Systems) (「培地B」) に入れ換えた。細胞を24時間インキュベートした。次いで、培地Bを24ウェルプレートの1ウェル当たりBMP-4 (R&D Systems) 10 ng/mL + 1:50のB27:RPMI 1 mL (培地C) に入れ換えた。細胞を4日間インキュベートした。

【0142】

培地Cを24ウェルプレートの1ウェル当たり1:50のB27:RPMI 1 mLに入

50

れ換え、プレートを15日間インキュベートした。得られた細胞を実施例2のようにFACS分析した。但し、細胞を0.25%トリプシン/500mM EDTA溶液に実施例2で使用した20分のかわりに5分間インキュベートした。細胞の約36%がcTnIを発現した。

【図面の簡単な説明】

【0143】

【図1A】実施例1に記載の方法に従って、H7細胞をゼラチンおよびFBSで被覆したウェルに入れた後、分化した。最初にアクチピンを添加してから24日後に、培養液をトリプシン-EDTAにより分離し、固定・透過した後、心臓トロポニンIに対する抗体で染色した。固定前に細胞をEMAでインキュベートし、死亡細胞(EMAを取り込んだ細胞)から生存細胞(EMAを排除した細胞)を分類した。試料をFACS caliberで分析し、死亡細胞を分析から除外した。この実験では、約54%の細胞がトリプシン分離から生き残り、これらの生存細胞の24~27%が、心臓トロポニンI特異的抗体で標識することにより測定した場合に心筋細胞であった。2枚の画像では、2つの異なるゲート法を使用した(図1A:棒グラフおよび図1B:散布図)。心筋細胞の割合は、何れの方法でも類似していた。

10

【図1B】実施例1に記載の方法に従って、H7細胞をゼラチンおよびFBSで被覆したウェルに入れた後、分化した。最初にアクチピンを添加してから24日後に、培養液をトリプシン-EDTAにより分離し、固定・透過した後、心臓トロポニンIに対する抗体で染色した。固定前に細胞をEMAでインキュベートし、死亡細胞(EMAを取り込んだ細胞)から生存細胞(EMAを排除した細胞)を分類した。試料をFACS caliberで分析し、死亡細胞を分析から除外した。この実験では、約54%の細胞がトリプシン分離から生き残り、これらの生存細胞の24~27%が、心臓トロポニンI特異的抗体で標識することにより測定した場合に心筋細胞であった。2枚の画像では、2つの異なるゲート法を使用した(図1A:棒グラフおよび図1B:散布図)。心筋細胞の割合は、何れの方法でも類似していた。

20

【図2】実施例2に記載の方法に従って、H7細胞をマトリゲルで被覆したウェルに入れた後、分化した。最初にアクチピンを添加してから21日後に、培養液をトリプシン-EDTAにより分離し、固定・透過した後、心臓トロポニンIに対する抗体で染色した。固定前に細胞をEMAでインキュベートし、死亡細胞(EMAを取り込んだ細胞)から生存細胞(EMAを排除した細胞)を分類した。試料をFACS caliberで分析し、死亡細胞を分析から除外した。この実験では、約69%の細胞がトリプシン分離から生き残り、これらの生存細胞の8.9%が、心臓トロポニンI特異的抗体で標識することにより測定した場合に心筋細胞であった。

30

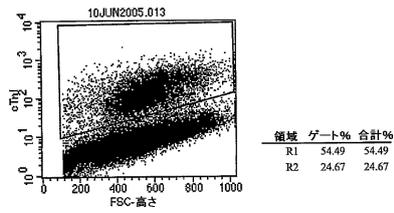
【図3】図3は、4つの各パーコール画分から形成される心臓体において測定したcTnIの発現量を示す。未分化hES細胞を陰性対照として使用する。心臓体として画分IVの細胞を培養することにより、MHCまたはcTnIの発現量を100~500倍に富化した。

【図4】図4は、異なる濃度のBMP-2およびBMP-4を使用してhES細胞の分化から得られた細胞集団におけるMHCの発現量を示す。

40

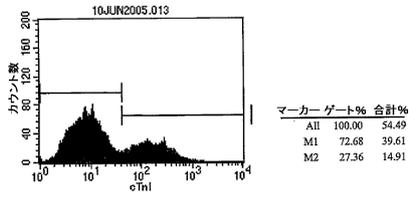
【 図 1 A 】

Figure 1A



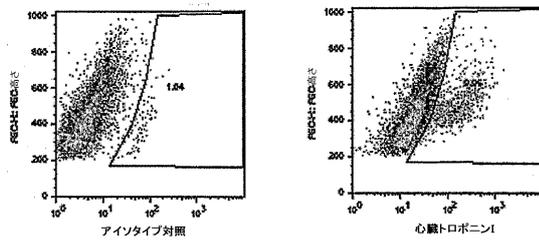
【 図 1 B 】

Figure 1B



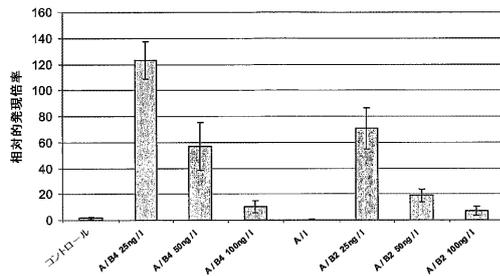
【 図 2 】

Figure 2



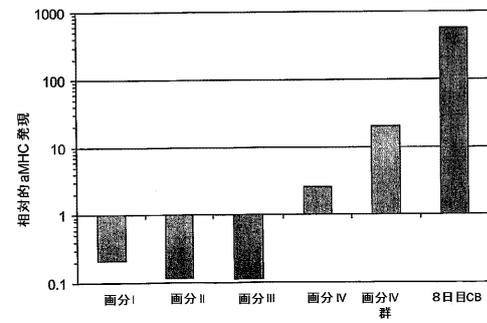
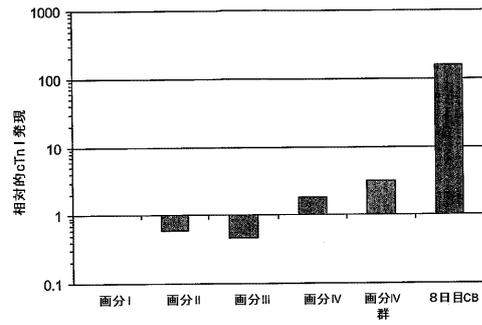
【 図 4 】

Figure 4



【 図 3 】

Figure 3



フロントページの続き

(72)発明者 ハッサニポーア, モハマッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94506, ダンビル, ダブ クリーク レーン 206

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0054092(US, A1)
特表2003-530828(JP, A)
特開2003-111588(JP, A)
歯科学報, (2002), Vol. 102, No. 10, p. 764-771

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00
MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
WPIDS(STN)