

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-504676

(P2015-504676A)

(43) 公表日 平成27年2月16日 (2015. 2. 16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 Z	4 C O 8 7
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	4 H O 4 5
A 6 1 K 35/42 (2015.01)	A 6 1 K 35/42	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-552322 (P2014-552322)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月11日 (2013. 1. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月4日 (2014. 9. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/021186
 (87) 国際公開番号 W02013/106677
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/586, 551
 (32) 優先日 平成24年1月13日 (2012. 1. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/619, 568
 (32) 優先日 平成24年4月3日 (2012. 4. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592017633
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
 ストン フルーツ ストリート 55
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

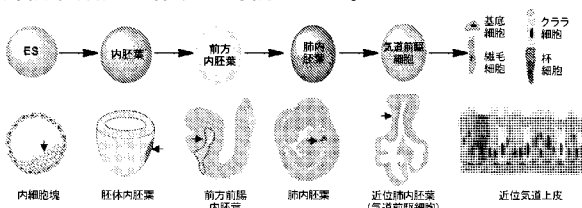
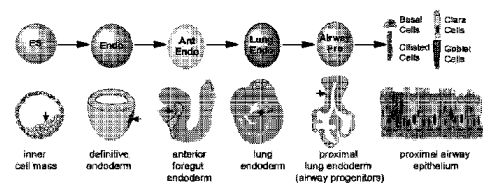
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単離ヒト肺前駆細胞およびその使用

(57) 【要約】

本明細書において、肺系列へと拘束されたヒト前駆細胞の作製、および肺疾患/障害または肺損傷を処置するためのそのような細胞の使用に部分的に関する方法および組成物を提供する。成人幹細胞をヒト成人肺から単離できるか否かは、当技術分野において依然として議論が分かれており、現在のところ、成人肺幹細胞をヒトから単離して用いる方法は再現性を欠いている。このように、本明細書において記述される方法および組成物は、当技術分野における知識の現状に対して有利であり、処置、組織工学、およびスクリーニングアッセイのためのヒト肺前駆細胞の作製を可能にする。

FIG. 1



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞。
- 【請求項 2】
Tuj1陰性およびPax8陰性である、請求項1に記載の単離細胞。
- 【請求項 3】
増殖性であり、選択された分化条件で、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞、または扁平上皮細胞へと分化する、請求項1に記載の単離細胞。
- 【請求項 4】
単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞。 10
- 【請求項 5】
FoxP2陽性および/またはID2陽性である、請求項4に記載の単離細胞。
- 【請求項 6】
増殖性であり、選択された分化条件に置かれると任意の上皮肺細胞へと分化する、請求項4に記載の単離細胞。
- 【請求項 7】
選択された分化条件に置かれると、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、I型肺胞細胞、II型肺胞細胞、扁平上皮細胞、気管支肺胞幹細胞、気管支肺胞管接合部幹細胞、遊走性CK14+細胞、または神経内分泌細胞へと分化する、請求項6に記載の単離細胞。 20
- 【請求項 8】
単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞。
- 【請求項 9】
増殖性であり、選択された分化条件に置かれると、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、または基底細胞へと分化する、請求項8に記載の単離細胞。
- 【請求項 10】
複能性気道基底幹細胞が、クララ細胞マーカー、繊毛細胞マーカー、神経内分泌細胞マーカー、または扁平細胞マーカーを発現しない、請求項8に記載の単離細胞。
- 【請求項 11】
Sox2陽性である、請求項8に記載の単離細胞。 30
- 【請求項 12】
CK5陽性および/またはNGFR陽性である、請求項8に記載の単離細胞。
- 【請求項 13】
疾患特異的細胞である、請求項1、5、または8に記載の単離細胞。
- 【請求項 14】
単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞と足場とを含む組成物。
- 【請求項 15】
足場が対象に植え込み可能である、請求項14に記載の組成物。
- 【請求項 16】
組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、請求項14に記載の組成物。 40
- 【請求項 17】
足場が生分解性である、請求項14に記載の組成物。
- 【請求項 18】
足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、請求項14に記載の組成物。
- 【請求項 19】
天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、請求項18に記載の組成物。
- 【請求項 20】 50

合成繊維が、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)（PLGA）、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシル酪酸)、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリヒドロキシヘキサ酸（PHH）、ポリブチレンコハク酸（PBS）、およびポリ(ヒドロキシル吉草酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、請求項19に記載の組成物。

【請求項 2 1】

近位気道複能性前駆細胞がTuj1陰性および/またはPax8陰性である、請求項14に記載の組成物。

【請求項 2 2】

単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞と足場とを含む組成物。

10

【請求項 2 3】

複能性肺前駆細胞がFoxP2陽性および/またはID2陽性である、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 4】

足場が対象に植え込み可能である、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 5】

組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 6】

足場が生分解性である、請求項22に記載の組成物。

20

【請求項 2 7】

足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺、またはその組み合わせを含む、請求項22に記載の組成物。

【請求項 2 8】

天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、請求項27に記載の組成物。

【請求項 2 9】

合成繊維が、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)（PLGA）、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシル酪酸)、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリヒドロキシヘキサ酸（PHH）、ポリブチレンコハク酸（PBS）、およびポリ(ヒドロキシル吉草酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、請求項28に記載の組成物。

30

【請求項 3 0】

単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞と足場とを含む組成物。

【請求項 3 1】

気道基底幹細胞がCK5陽性および/またはNGFR陽性である、請求項30に記載の組成物。

【請求項 3 2】

足場が対象に植え込み可能である、請求項30に記載の組成物。

40

【請求項 3 3】

組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、請求項32に記載の組成物。

【請求項 3 4】

足場が生分解性である、請求項30に記載の組成物。

【請求項 3 5】

足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項 3 6】

天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、請求項35に記載の組

50

成物。

【請求項 37】

合成繊維が、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA)、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシル酪酸)、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ポリヒドロキシヘキサン酸 (PHH)、ポリブチレンコハク酸 (PBS)、およびポリ(ヒドロキシル吉草酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、請求項36に記載の組成物。

【請求項 38】

細胞が疾患特異的細胞である、請求項14、22、または30に記載の組成物。

10

【請求項 39】

ヒト前腸内胚葉細胞に、FGF2、WNT、およびBMP4を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法。

【請求項 40】

接触させる段階が少なくとも2日間行われる、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、請求項39に記載の方法。

20

【請求項 42】

WntアンタゴニストがIWR-1を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項 43】

MAPKK/ERKアンタゴニストがPD98059を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項 44】

接触させる段階が少なくとも4日間行われる、請求項41に記載の方法。

【請求項 45】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、請求項41に記載の方法。

30

【請求項 46】

WntアンタゴニストがIWR-1を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

MAPKK/ERKアンタゴニストがPD98059を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項 48】

接触させる段階が少なくとも4日間行われる、請求項45に記載の方法。

【請求項 49】

前腸内胚葉細胞の培養が、胚幹 (ES) 細胞または人工多能性幹細胞 (iPSC) から誘導される、請求項39に記載の方法。

40

【請求項 50】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、請求項39に記載の方法。

【請求項 51】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養にNogginを接触させる段階をさらに含む、請求項39に記載の方法。

50

- 【請求項52】
接触させる段階が少なくとも10日間行われる、請求項50に記載の方法。
- 【請求項53】
単離ヒト肺前駆細胞と薬学的に許容される担体とを含む組成物を、肺疾患もしくは肺障害または肺損傷を有する対象に投与する段階を含む、対象における肺疾患もしくは肺障害または肺損傷を処置する方法。
- 【請求項54】
単離ヒト肺前駆細胞が、Nkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、Nkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、Nkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞、またはその分化細胞からなる群より選択される、請求項53に記載の方法。 10
- 【請求項55】
近位気道複能性前駆細胞がTuj1陰性および/またはPax8陰性である、請求項53に記載の方法。
- 【請求項56】
遠位複能性肺前駆細胞がFoxP2および/またはID2陽性である、請求項53に記載の方法。
- 【請求項57】
気道基底幹細胞がCK5陽性および/またはNGFR陽性である、請求項53に記載の方法。
- 【請求項58】
組成物が肺に投与される、請求項53に記載の方法。
- 【請求項59】 20
単離ヒト肺前駆細胞が、組成物が投与される対象に対して自家性である、請求項53に記載の方法。
- 【請求項60】
組成物が足場をさらに含む、請求項53に記載の方法。
- 【請求項61】
足場が対象に植え込み可能である、請求項60に記載の方法。
- 【請求項62】
足場が生分解性である、請求項60に記載の方法。
- 【請求項63】
足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、請求項60 30
に記載の方法。
- 【請求項64】
足場が、単離ヒト肺前駆細胞の分化を促進する物質を含む、請求項60に記載の方法。
- 【請求項65】
組成物が、エアロゾル送達のために処方される、請求項60に記載の方法。
- 【請求項66】
(a) 肺疾患または肺障害を処置するための候補物質の存在下および非存在下で、ヒト疾患特異的肺前駆細胞のインビトロ分化によって産生されたヒト疾患特異的気道細胞集団を培養する段階、
(b) 候補物質の存在下および非存在下で、疾患においてアップレギュレートされる少 40
なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階、または疾患においてダウンレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階であって、少なくとも1つのアップレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも1つのダウンレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象における肺疾患または肺障害を処置するための候補として候補物質が同定される、段階
を含む、肺疾患または肺障害を処置するための物質をスクリーニングする方法。
- 【請求項67】
段階(a)の前に、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞集団をヒト疾患特異的気道細胞の培養へと分化させる段階をさらに含む、請求項66に記載の方法。 50

【請求項68】

段階(a)の前に、肺疾患または肺障害を有する対象から誘導される人工多能性幹細胞集団を、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞集団へと分化させる段階をさらに含む、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

候補物質が、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、または核酸を含む、請求項66に記載の方法。

【請求項70】

ヒト肺前駆細胞が、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される、請求項66に記載の方法。

10

【請求項71】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞が作製される、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

接触させる段階が少なくとも4日間行われる、請求項71に記載の方法。

20

【請求項73】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞が作製される、請求項70に記載の方法。

【請求項74】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

接触させる段階が少なくとも10日間行われる、請求項73に記載の方法。

30

【請求項76】

(a) 候補分化物質の存在下および非存在下でNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒト肺前駆細胞を培養する段階、

(b) 候補物質の存在下および非存在下で、肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にアップレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階、または肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にダウンレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階であって、少なくとも1つのアップレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも1つのダウンレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象における単離ヒト肺前駆細胞の分化を誘導するために候補物質を用いることができること

40

を含む、ヒト肺前駆細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングする方法。

【請求項77】

段階(a)の前に、胚幹細胞または人工多能性幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させる段階をさらに含む、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

候補物質が、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体、または核酸を含む、請求項76に記載の方法。

【請求項79】

ヒト肺前駆細胞が、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性

50

Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される、請求項76に記載の方法。

【請求項80】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒト肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞が作製される、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

接触させる段階が少なくとも4日間行われる、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞が作製される、請求項79に記載の方法。

【請求項83】

Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

接触させる段階が少なくとも10日間行われる、請求項82に記載の方法。

【請求項85】

請求項1、5、または9に記載の細胞、薬学的に許容される担体、および肺疾患または肺障害を処置するための説明書を含む、肺疾患または肺障害を処置するためのキット。

【請求項86】

足場をさらに含む、請求項85に記載のキット。

【請求項87】

請求項1、5、または8に記載の細胞、肺特異的細胞表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質、およびその説明書を含む、候補物質をスクリーニングするためのキット。

【請求項88】

細胞培養培地、増殖因子、および/または分化物質をさらに含む、請求項87に記載のキット。

【請求項89】

(i) 任意で単位用量で提供される、BMP4、FGF2、WNT、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、PI3キナーゼ阻害剤、アクチピンA、Noggin、B27、およびレチノイン酸の2つまたはそれより多く；

(ii) 任意で、細胞培養培地；

(iii) 肺細胞特異的の表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質；および

(iii) その説明書

を含む、ヒト幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させるためのキット。

【請求項90】

B27、アクチピンA、およびZSTK474を含む、細胞または組織培地。

【請求項91】

B27の濃度が1%～5%である、請求項90に記載の培地。

【請求項92】

B27の濃度が2%である、請求項91に記載の培地。

【請求項93】

アクチピンAの濃度が10～40 ng/mLである、請求項90に記載の培地。

【請求項94】

10

20

30

40

50

アクチビンAの濃度が20 ng/mLである、請求項93に記載の培地。

【請求項 9 5】

ZSTK474の濃度が0.2~0.5 μMである、請求項90に記載の培地。

【請求項 9 6】

RPMI培地の成分を含む、請求項90に記載の培地。

【請求項 9 7】

CHIR9902、PIK-75、ドルソモルフィン、およびFGF2を含む、細胞または組織培地。

【請求項 9 9】

CHIR9902の濃度が0.1~1 μMの範囲である、請求項97に記載の培地。

【請求項 1 0 0】

PIK-75の濃度が0.01~0.1 μMを含む、請求項97に記載の培地。

【請求項 1 0 1】

ドルソモルフィンの濃度が1~5 μMを含む、請求項97に記載の培地。

【請求項 1 0 2】

FGF2の濃度が10~100 ng/mLを含む、請求項97に記載の培地。

【請求項 1 0 3】

GF-109203X、Ro31-8220、Pp242、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物をさらに含む、請求項97に記載の培地。

【請求項 1 0 4】

ヒト前腸内胚葉細胞に、Wntアゴニスト、PIK3キナーゼ阻害剤、BMPアンタゴニスト、ならびにGF-109203X、Ro31-8220、Pp242、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法。

【請求項 1 0 5】

接触させる段階が少なくとも2日間行われる、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

WntアゴニストがCHIR9902を含む、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

CHIR9902の濃度が0.1~1 μMの範囲である、請求項106に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

PI3キナーゼ阻害剤がPIK-75を含む、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

PIK-75の濃度が0.01~0.1 μMを含む、請求項108に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

BMPアンタゴニストがドルソモルフィンを含む、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

ドルソモルフィンの濃度が1~5 μMを含む、請求項110に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

増殖因子がFGF2を含む、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

FGF2の濃度が10~100 ng/mLを含む、請求項112に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

iPSCまたはESCに、B27、アクチビンA、およびZSTK474を、各々がiPSCまたはESCを胚体内胚葉細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、胚体内胚葉細胞または胚体内胚葉細胞集団を作製する方法。

【請求項 1 1 5】

10

20

30

40

50

胚体内胚葉細胞の作製が、FOXA2/SOX17共染色によってか、またはcKit/CXCR4および/もしくはcKit/EpCAMの組み合わせによるFACS分析によって決定される、請求項114に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

B27の濃度が1%～5%である、請求項114に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

B27の濃度が2%である、請求項116に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

アクチピンAの濃度が10～40 ng/mLである、請求項114に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

アクチピンAの濃度が20 ng/mLである、請求項118に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

ZSTK474の濃度が0.2～0.5 μMである、請求項114に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U.S.C. 119(e)の下で、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2012年1月13日に提出された米国特許仮出願第61/586,551号および2012年4月3日に提出された米国特許仮出願第61/619,568号の優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明の分野は、単離ヒト肺前駆細胞、そのような単離ヒト肺前駆細胞を作製する方法、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

呼吸器疾患を含む肺疾患は、全世界での死亡および有病率の主な原因である。現在の処置は、肺疾患の症状を減少させることに向けられ、疾患の治癒または完全な逆転の見込みを提供する処置はほとんどないか全くない。

【0004】

幹細胞から誘導された肺前駆細胞の移植は、損傷および疾患によって破壊された体内の肺細胞を再生させるために用いることができる1つのアプローチである。損傷および疾患によって破壊された肺上皮を修復するために幹細胞を使用する可能性に関して高い関心が集まっている。

【0005】

幹細胞は、自己再生および分化の両方を受け能力を有する独自の細胞集団を表す。操作されうる前駆細胞を対象から単離および精製した後、処置目的のために対象に再導入できることは有益である。対象自身の細胞を用いることにより、付随する免疫抑制治療を使用する必要性がなくなり、それによって対象の免疫系のコンピテンシーが維持される。たとえば、対象の体細胞試料から作製された人工多能性幹細胞の定方向分化は、自己再生細胞治療のための細胞集団を提供する上で利点を提供する。

【発明の概要】

【0006】

概要

細胞の分化は、典型的に多くの細胞分裂を通して起こる複雑なプロセスである。部分的または完全に分化した細胞は、それ自身が複能性細胞から誘導される複能性細胞から誘導されうる等々である。これらの複能性細胞の各々は、幹細胞であると見なされうるが、各々が生じることができる細胞タイプの範囲は、かなり変化しうる。いくつかの分化細胞はまた、より大きい発達能の細胞を生じる能力（たとえば、リプログラミング）を有する。

10

20

30

40

50

そのような能力は天然でありうるか、または様々な因子による処置によって人工的に誘導することができる。多くの生物学的な例において、幹細胞はまた、それらが1つより多くの別個の細胞タイプの子孫を産生しうることから「複能性」でもあるが、このことは「幹細胞であること」にとって必要ではない。

【0007】

より特異的な発達表現型への分化能に加えて、自己再生は、幹細胞定義のもう1つの古典的な部分である。理論的に、自己再生は、2つの主要な機序のいずれかによって起こりうる。幹細胞は非対称に分裂することがあり、この場合1つの娘細胞は幹細胞状態を保持して、他の娘細胞はいくつかの別個の他の特異的機能および表現型を発現する。または、集団における幹細胞のいくつかは2つの幹細胞へと対称的に分裂して、このように、全体として集団の中でいくつかの幹細胞を維持することができるが、集団の中の他の細胞は、分化した子孫のみを生じる。形式的に、幹細胞として始まる細胞は、分化した表現型に向かって進行しうるが、幹細胞表現型を「逆転させて」、再度発現させることが可能であり、これは当業者によってしばしば「脱分化」、「リプログラミング」、または「逆分化」と呼ばれる。このような分化表現型の逆転は一般的に、たとえば幹細胞特異的mRNAまたはタンパク質（たとえば、中でもc-Myc、Klf4、Oct4、Sox2）を発現させることによる、または細胞に脱分化培地を接触させることによる、細胞の人為的操作を必要とする。

10

【0008】

本明細書において提供される方法および組成物は、部分的に、肺系列へと拘束されるヒト前駆細胞の作製、および肺疾患/障害または肺に対する損傷を処置するためのそのような細胞の使用に関する。成人幹細胞をヒト成人の肺から単離できるか否かに関しては、当技術分野において依然として議論が分かれており、現在のところ、ヒトから成人肺幹細胞を単離して用いる方法は、再現性を欠いている。このように、本明細書において記述される方法および組成物は、当技術分野における知識の現状に対して有利であり、処置、組織工学、およびスクリーニングアッセイのためのヒト肺前駆細胞の作製を可能にする。

20

【0009】

本明細書において開示される1つの局面は、単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、またはヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞の濃縮集団に関する。

【0010】

この局面の1つの態様において、細胞はTuj1陰性でPax8陰性である。

30

【0011】

この局面のもう1つの態様において、細胞は、増殖性であり、選択された分化条件で、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞、または扁平上皮細胞へと分化する。

【0012】

同様に、もう1つの局面において、単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞が本明細書において提供される。

【0013】

この局面の1つの態様において、細胞は、FoxP2陽性および/またはID2陽性である。もう1つの態様において、細胞は、ETV4/5陽性である。

40

【0014】

この局面のもう1つの態様において、細胞は増殖性であり、選択された分化条件に置かれると、任意の上皮肺細胞へと分化する。

【0015】

この局面のもう1つの態様において、細胞は、選択された分化条件に置かれると、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、I型肺胞細胞、II型肺胞細胞、扁平上皮細胞、気管支肺胞幹細胞、気管支肺胞管接合部幹細胞、遊走性CK14+細胞、または神経内分泌細胞へと分化する。

【0016】

50

本明細書において記述されるもう一つの局面は、単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞、または単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞の濃縮集団に関する。

【0017】

この局面のもう一つの態様において、細胞は増殖性であり、選択された分化条件に置かれると、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、または基底細胞へと分化する。

【0018】

この局面のもう一つの態様において、複能性気道基底幹細胞は、クララ細胞マーカー、繊毛細胞マーカー、神経内分泌細胞マーカー、または扁平上皮細胞マーカーを発現しない。

10

【0019】

この局面のもう一つの態様において、細胞はSox2陽性である。

【0020】

この局面のもう一つの態様において、細胞はCK5陽性および/またはNGFR陽性である。

【0021】

この局面および本明細書において記述される他の全ての局面のもう一つの態様において、細胞は疾患特異的細胞である。

【0022】

本明細書において提供されるもう一つの局面は、単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞と足場を含む組成物に関する。

20

【0023】

この局面のもう一つの態様において、足場は対象に植え込み可能である。

【0024】

この局面のもう一つの態様において、細胞は、組成物が植え込まれる対象に対して自家性である。

【0025】

この局面のもう一つの態様において、足場は生分解性である。

【0026】

この局面のもう一つの態様において、足場は天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む。

30

【0027】

この局面のもう一つの態様において、天然繊維は、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンビン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される。

【0028】

この局面のもう一つの態様において、合成繊維は、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシ酪酸)、ポリブチレンテレフタレート(PBT)、ポリヒドロキシヘキサ酸(PHH)、ポリブチレンコハク酸(PBS)、およびポリ(ヒドロキシ吉草酸)などの代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される。

40

【0029】

この局面のもう一つの態様において、近位気道複能性前駆細胞は、Tuj1陰性および/またはPax8陰性である。

【0030】

本明細書において記述されるもう一つの局面は、単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞と足場を含む組成物に関する。

【0031】

この局面の1つの態様において、複能性肺前駆細胞は、FoxP2陽性および/またはID2陽性である。もう一つの態様において、細胞は、ETV4/5陽性である。

50

- 【0032】
この局面のもう一つの態様において、足場は、対象に植え込み可能である。
- 【0033】
この局面のもう一つの態様において、細胞は、組成物が植え込まれる対象に対して自家性である。
- 【0034】
この局面のもう一つの態様において、足場は生分解性である。
- 【0035】
この局面のもう一つの態様において、足場は天然繊維、合成繊維、脱細胞肺、またはその組み合わせを含む。 10
- 【0036】
この局面のもう一つの態様において、天然繊維は、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される。
- 【0037】
この局面のもう一つの態様において、合成繊維は、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)（PLGA）、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシ酪酸)、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリヒドロキシヘキサ酸（PHH）、ポリブチレンコハク酸（PBS）、およびポリ(ヒドロキシル吉草酸)などの代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される。 20
- 【0038】
本明細書において記述されるもう一つの局面は、単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞と足場を含む組成物に関する。
- 【0039】
この局面の1つの態様において、気道基底幹細胞はCK5陽性および/またはNGFR陽性である。
- 【0040】
この局面のもう一つの態様において、足場は対象に植え込み可能である。
- 【0041】
この局面のもう一つの態様において、細胞は、組成物が植え込まれる対象に対して自家性である。 30
- 【0042】
この局面のもう一つの態様において、足場は生分解性である。
- 【0043】
この局面のもう一つの態様において、足場は天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む。
- 【0044】
この局面のもう一つの態様において、天然繊維は、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される。 40
- 【0045】
この局面のもう一つの態様において、合成繊維は、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)（PLGA）、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシ酪酸)、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ポリヒドロキシヘキサ酸（PHH）、ポリブチレンコハク酸（PBS）、およびポリ(ヒドロキシル吉草酸)などの代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される。
- 【0046】
この局面および本明細書において記述される他の全ての局面のもう一つの態様において 50

、細胞は疾患特異的細胞である。

【 0 0 4 7 】

同様に、もう一つの局面において、ヒト前腸内胚葉細胞に、FGF2、WNT、およびBMP4を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法が本明細書において提供される。

【 0 0 4 8 】

この局面の1つの態様において、接触させる段階は、少なくとも2日間行われる。

【 0 0 4 9 】

この局面のもう一つの態様において、方法はさらに、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞を、Nkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む。

【 0 0 5 0 】

この局面のもう一つの態様において、Wntアンタゴニストは、IWR-1を含む。

【 0 0 5 1 】

この局面のもう一つの態様において、MAPKK/ERKアンタゴニストは、PD98059を含む。

【 0 0 5 2 】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも4日間行われる。

【 0 0 5 3 】

この局面のもう一つの態様において、方法はさらに、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニストおよびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞を、Nkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む。

【 0 0 5 4 】

この局面のもう一つの態様において、WntアンタゴニストはIWR-1を含む。

【 0 0 5 5 】

この局面のもう一つの態様において、MAPKK/ERKアンタゴニストは、PD98059を含む。

【 0 0 5 6 】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも4日間行われる。

【 0 0 5 7 】

この局面のもう一つの態様において、前腸内胚葉細胞の培養は、胚幹（ES）細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）から誘導される。

【 0 0 5 8 】

この局面のもう一つの態様において、方法は、さらに、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々が、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞を、Nkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む。

【 0 0 5 9 】

この局面のもう一つの態様において、方法はさらに、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養にNogginを接触させる段階を含む。

【 0 0 6 0 】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも10日間行われる。

【 0 0 6 1 】

同様に、もう一つの局面において、単離ヒト肺前駆細胞と薬学的に許容される担体を含む組成物を、肺疾患もしくは肺障害、または肺の損傷を有する対象に投与する段階を含む、対象における肺疾患もしくは肺障害、または肺損傷を処置する方法が本明細書において提供される。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

この局面の1つの態様において、単離ヒト肺前駆細胞は、Nkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、Nkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、Nkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞、またはその分化した細胞からなる群より選択される。

【0063】

この局面のもう1つの態様において、近位気道複能性前駆細胞はTuj1陰性および/またはPax8陰性である。

【0064】

この局面のもう1つの態様において、遠位複能性肺前駆細胞は、FoxP2および/またはID2陽性である。もう1つの態様において、細胞はETV4/5陽性である。

【0065】

この局面のもう1つの態様において、気道基底幹細胞はCK5陽性および/またはNGFR陽性である。

【0066】

この局面のもう1つの態様において、組成物は肺に投与される。

【0067】

この局面のもう1つの態様において、単離ヒト肺前駆細胞は、組成物が投与される対象に対して自家性である。

【0068】

この局面のもう1つの態様において、組成物はさらに足場を含む。

【0069】

この局面のもう1つの態様において、足場は対象に植え込み可能である。

【0070】

この局面のもう1つの態様において、足場は生分解性である。

【0071】

この局面のもう1つの態様において、足場は天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む。

【0072】

この局面のもう1つの態様において、足場は、単離ヒト肺前駆細胞の分化を促進する物質を含む。

【0073】

この局面のもう1つの態様において、組成物はエアロゾル送達のために処方される。

【0074】

本明細書において提供されるもう1つの局面は、(a)肺疾患または肺障害を処置するための候補物質の存在下および非存在下で、ヒト疾患特異的肺前駆細胞のインビトロ分化によって産生されたヒト疾患特異的気道細胞集団を培養する段階；(b)候補物質の存在下および非存在下で、疾患においてアップレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する、または疾患においてダウンレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階で、少なくとも1つのアップレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも1つのダウンレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象における肺疾患または肺障害を処置するための候補として候補物質が同定される段階を含む、肺疾患または肺障害を処置するための物質をスクリーニングする方法に関する。

【0075】

この局面の1つの態様において、方法はさらに、段階(a)の前に、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞の集団をヒト疾患特異的気道細胞の培養へと分化させる段階を含む。

【0076】

この局面のもう1つの態様において、方法はさらに、段階(a)の前に、肺疾患または肺障害を有する対象から誘導された人工多能性幹細胞集団を、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞集団へと分化させる段階を含む。

【0077】

10

20

30

40

50

この局面のもう一つの態様において、候補物質は、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、または核酸を含む。

【0078】

この局面のもう一つの態様において、ヒト肺前駆細胞は、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される。

【0079】

この局面のもう一つの態様において、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞は、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞を、Nkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって作製される。

10

【0080】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも4日間行われる。

【0081】

この局面のもう一つの態様において、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞は、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって作製される。

20

【0082】

この局面のもう一つの態様において、方法は、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む。

【0083】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも10日間行われる。

【0084】

本明細書において提供されるもう一つの局面は、(a)候補分化物質の存在下および非存在下でNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒト肺前駆細胞を培養する段階、(b)候補物質の存在下および非存在下で、肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にアップレギュレートされる少なくとも一つのマーカーの発現もしくは活性を比較する、または肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にダウンレギュレートされる少なくとも一つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階で、少なくとも一つのアップレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも一つのダウンレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象において単離ヒト肺前駆細胞の分化を誘導するために候補物質を用いることができることが示される段階を含む、ヒト肺前駆細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングする方法に関する。

30

【0085】

この局面の1つの態様において、方法はさらに、段階(a)の前に、胚幹細胞または人工多能性幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させる段階を含む。

40

【0086】

この局面のもう一つの態様において、候補物質は、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体、または核酸を含む。

【0087】

この局面のもう一つの態様において、ヒト肺前駆細胞は、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される。

【0088】

この局面のもう一つの態様において、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞は、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒ

50

ト肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞を、Nkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって作製される。

【0089】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも4日間行われる。

【0090】

この局面のもう一つの態様において、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞は、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって作製される。

10

【0091】

この局面のもう一つの態様において、Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む。

【0092】

この局面のもう一つの態様において、接触させる段階は、少なくとも10日間行われる。

【0093】

本明細書において提供されるもう一つの局面は、請求項1、5、または9記載の細胞、薬学的に許容される担体、および肺疾患または肺障害を処置するための説明書を含む、肺疾患または肺障害を処置するためのキットに関する。

20

【0094】

この局面の1つの態様において、キットはさらに足場を含む。

【0095】

同様に、もう一つの局面において、請求項1、5、または8記載の細胞、肺特異的細胞表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質、およびその説明書を含む、候補物質をスクリーニングするためのキットが本明細書において提供される。

【0096】

この局面の1つの態様において、キットはさらに、細胞培養培地、増殖因子、および/または分化物質を含む。

30

【0097】

本明細書において提供されるもう一つの局面は、(i)任意で単位用量で提供されるBMP4、FGF2、WNT、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、Noggin、B27、およびレチノイン酸の2つまたはそれより多く；(ii)任意で細胞培養培地；(iii)肺細胞特異的表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質；および(iii)その説明書を含む、ヒト幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させるためのキットに関する。

【0098】

同様に、本明細書において、B27、アクチピンA、およびZSTK474を含む、iPSCまたはESCから胚体内胚葉(definitive endoderm)を作製するための細胞または組織培養培地が提供される。1つの態様において、培地は、B27を1%~5%(たとえば、2%)の濃度で含む。もう一つの態様において、培地は、アクチピンAを10~40 ng/mL(たとえば、20 ng/mL)の濃度で含む。もう一つの態様において、培地は、ZSTK474を0.2~0.5 μMの濃度で含む。もう一つの態様において、基本培地は、RPMI培地の成分を含む。

40

【0099】

同様に、本明細書において、CHIR9902、PIK-75、ドルソモルフィン、およびFGF2を含む、Nkx2.1陽性肺前駆細胞を作製するための細胞または組織培養培地が提供される。いくつかの態様において、培地はCHIR9902を0.1~1 μMの濃度で含む。もう一つの態様において、培地は、PIK-75を0.01~0.1 μMの濃度で含む。もう一つの態様において、培地はドルソモルフィンを1~5 μMの濃度で含む。もう一つの態様において、培地は、FGF2を10~100 ng/mLの濃度で含む。もう一つの態様において、培地はさらに、GF-109203X、Ro31-8220、Pp242

50

、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物を含む。

【0100】

同様に、本明細書において、ヒト前腸内胚葉細胞に、Wntアゴニスト、PIK3キナーゼ阻害剤、BMPアンタゴニスト、ならびにGF-109203X、Ro31-8220、Pp242、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法が提供される。

10

【0101】

1つの態様において、接触させる段階は、少なくとも2日間行われる。

【0102】

もう1つの態様において、Wntアゴニストは、CHIR9902を含む。もう1つの態様において、CHIR9902の濃度は0.1~1 μ Mの範囲である。

【0103】

もう1つの態様において、PI3キナーゼ阻害剤は、PIK-75を含む。もう1つの態様において、PIK-75の濃度は0.01~0.1 μ Mを含む。

【0104】

もう1つの態様において、BMPアンタゴニストは、ドルソモルフィンを含む。もう1つの態様において、ドルソモルフィンの濃度は1~5 μ Mを含む。

20

【0105】

もう1つの態様において、増殖因子はFGF2を含む。もう1つの態様において、FGF2の濃度は10~100 ng/mLを含む。

【0106】

同様に、もう1つの局面において、iPSCまたはESCに、B27、アクチピンA、およびZSTK474を、各々がiPSCまたはESCを胚体内胚葉細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、胚体内胚葉細胞または胚体内胚葉細胞集団を作製する方法が提供される。

30

【0107】

1つの態様において、胚体内胚葉細胞が作製されたことは、FOXA2/SOX17共染色またはcKit/CXCR4および/またはcKit/EpCAMの組み合わせによるFACS分析によって決定される。

【0108】

もう1つの態様において、B27の濃度は1%~5%（たとえば、2%）を含む。

【0109】

もう1つの態様において、アクチピンAの濃度は10~40 ng/mL（たとえば、20 ng/mL）である。

【0110】

もう1つの態様において、ZSTK474の濃度は0.2~0.5 μ Mである。

40

【図面の簡単な説明】

【0111】

【図1】マウスESCから気道前駆細胞を段階的に分化させるための全体的戦略を示す図である。図は、マウスESCから胚気道上皮前駆細胞を産生するための効率的で再現可能なプロトコールを開発するためのアプローチを示す。シグナル伝達ネットワークは、ESCの胚体内胚葉への分化、内胚葉の前腸内胚葉への前方移動（anteriorization）、前腸内胚葉からの初期肺内胚葉の誘導、および胚気道前駆細胞の作製を促進する。

【図2】内胚葉の前腸内胚葉への前方移動がNkx2.1+細胞分化を促進することを示すデータを示す。図2Aは、胚体内胚葉への20 ng/ml BMP4、20 ng/ml FGF2、および5 nM GSK3iXVの投与によって、CDX2発現および最少のNKX2.1誘導を伴う後腸分化が起こったことを示す

50

。尺度のバーは50 μm である。図2Bは、表に記載のBMP4/TGF β アゴニストおよびアンタゴニストの異なる組み合わせによる胚体内胚葉の2日間の処置を示す。Foxa2+/Sox2+細胞を、Foxa2+細胞の総数における陽性細胞の百分率として定量した。NKX2.1発現を誘導するために、細胞をさらに、20 ng/ml BMP4、20 ng/ml FGF2、および5 nM GSK3iXVによって処置した。Nkx2.1+細胞の百分率を、存在する総細胞の百分率として定量した。データは全て、独立した3回の実験から平均した。

【図3】BMP4、FGF2、およびWNTシグナル伝達が前腸内胚葉細胞からの肺の特異化にとって必要であることを示す。図3Aは、前腸内胚葉細胞からNkx2.1+細胞を作製するための戦略および概算時間を示す図である。図3Bは、Nkx2.1+を誘導するためのBMP4、FGF2、WNTおよびそのアンタゴニストの様々な組み合わせのリストである。図3Cは、総細胞数におけるNkx2.1+細胞数によって記録したNKX2.1の百分率を、3回の独立した実験の平均で示す。

【図4】Smad依存的BMPシグナル伝達が肺の分化にとって必要であることを示す。NKX2.1発現を、20 ng/ml FGF2および5 nM GSK3iXVのみ（対照）によって、または追加のBMP4（20 ng/ml）、BMP2（20 ng/ml）、BMP7（20 ng/ml）、BMP4（20 ng/ml）+10 μM ドルソモルフィンまたはBMP4（20 ng/ml）+1 μM PD98059によって誘導した（データは示していない）。図4は、SMAD依存的経路を通してのBMPのシグナル伝達が肺Nkx2.1+の分化にとって必要であることを示す。これに対し、MAPキナーゼ経路を通してのシグナル伝達は、Nkx2.1発現にとって必要ではない。ドルソモルフィンは、SMAD経路を通してBMPシグナル伝達を阻害するが、PD98059はMAPKシグナル伝達を阻害する。

【図5】複能性肺内胚葉細胞からの胚気道前駆細胞の作製を示す。図5Aは、複能性肺内胚葉細胞からの胚気道前駆細胞を作製するための戦略および時間予定表を示す図である。図5Bは、肺発達の偽腺状期の際の近位気道および遠位肺芽先端において異なるシグナル伝達切り替えの要約である。D9でRA添加B27、20 ng/ml BMP7、20 ng/ml FGF7、100 nM IWR-1（WNTアンタゴニスト）、および100 ng/ml Nogginを含む培地によってNkx2.1+肺内胚葉細胞を2日間処置した後に、NKX2.1およびSOX2の免疫蛍光染色を行った（データは示していない）。加えて、Nkx2.1+肺内胚葉細胞を、D9でRA添加B27、20 ng/ml BMP7、20 ng/ml FGF7、100 nM IWR-1（WNTアンタゴニスト）、および1 μM PD98059を含む培地によって2日間処置した後にNKX2.1およびSOX2の免疫蛍光染色を行った。尺度のバーは50 μm である（データは示していない）。免疫蛍光染色からのデータは、p63に関して陽性であるNkx2.1+細胞の亜集団が存在することを示した（データは示していない）。

【図6】ヒトiPSCからNkx2.1+肺複能性前駆細胞を作製するための例示的な戦略および時間予定表を示す図である。実験からのデータは、ヒトiPSCからのNkx2.1+肺前駆細胞の段階的分化を示している。RPMI-1640培地において2% B27補助剤、アクチビンA（100 ng/ml）および5 μM PI3キナーゼ阻害剤LY294002の存在下で4日間処置後に、CF1 RiPS細胞から高収率で胚体内胚葉が得られ、細胞の90%より多くが転写因子SOX17およびFOXA2を同時発現した（データは示していない）。500 nM A-83-01（TGF β アンタゴニスト）および100 ng/ml Noggin（BMP4アンタゴニスト）による処置の4日後に、CF1 RiPS細胞から誘導されるFoxa2+細胞におけるSOX2発現を検出することによって、内胚葉の前腸内胚葉細胞への前方移動が観察された（データは示していない）。D8で、20 ng/ml BMP4、20 ng/ml FGF2、および5 nM GSK3iXVを含む無血清培地による4日間の前腸細胞への前方移動後にNKX2.1染色を行った（データは示していない）。免疫蛍光は、Nkx2.1陽性細胞がSOX2、SOX9、TUJ1、およびPAX8と同時に染色されることを示し、それによって甲状腺および神経分化が存在しないことおよび複能性遠位末端前駆細胞およびNkx2.1+/Sox2+気道前駆細胞が存在することを証明した（データは示していない）。加えて、免疫蛍光染色後の共焦点画像は、いくつかのNkx2.1+スフェアがp63に対して陽性の基底細胞を含むことを示している（データは示していない）。

【図7】胚体内胚葉を作製するための処置戦略および概算時間を示す図である。FOXA2およびSOX17の免疫蛍光を5日目に行ったところ、細胞の>90%がp2A mESCおよびV6.5 mESCから作製された胚体内胚葉であったことを示している（データは示していない）。

【図8】マウス胚においてNkx2.1+脳、甲状腺、および肺器官原基を分離するマーカーの

10

20

30

40

50

特異的組み合わせに関する免疫蛍光データを要約する表および図である。Nkx2.1およびSOX2の免疫蛍光イメージングを、E8.75~E9で腹側前脳、甲状腺、および肺において行った（データは示していない）。免疫蛍光イメージングはまた、E8.75~E9で、腹側前脳においてNkx2.1、Tuj1、およびSox9に関しても行うと共に甲状腺においてNkx2.1、Pax8、およびSox9に関しても行った。

【図9】ESC誘導前方内胚葉の運命の遺伝子発現分析を示すグラフである。胚体内胚葉（DE）、前方内胚葉（AE）およびNkx2.1誘導増殖因子カクテルによる処置後のAEに対応する、マウスESCまたはヒトiPSCにおけるNkx2.1、Sox2、FoxN1、Pax9、Tbx1、Pax8、Sox9、およびFoxP2 mRNAの定量的発現。n=3の生物学的反復実験、発現レベルをESCまたはiPSCのレベルに対して標準化する。

10

【図10】本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞から分化した気道細胞の表面上に機能的繊毛が存在することを示す顕微鏡写真である。繊毛は、協調して波打つことが観察され、気道の細胞が機能的であることを示している。

【図11】Nkx2.1+Tuj1-Pax8-細胞に関する分化の可能性を示す図である。理論に拘束されたくはないが、図11は、それによって下流のヒト肺前駆細胞がNkx2.1+Tuj1-Pax8-細胞から分化することができる、可能性がある2つの機序を示す。

【図12】iPSCから気道前駆細胞への例示的な段階的気道前駆細胞分化プロトコールを示す模式図である。

【図13】ヒトiPSCおよびESCから胚体内胚葉を産生するためのプロトコールの変化形を示す模式図である。プロトコールは、高い効率および一貫性で胚体内胚葉の産生を可能にする。

20

【図14】前方内胚葉からの肺の分化を増強するための不偏化学的スクリーニングを示す。図14Aは、化学スクリーニングプラットフォームを示す模式図を示す。図14Bは、Nkx2.1+肺前駆細胞の産生を促進したリード化合物を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【0112】

詳細な説明

本明細書において記述される組成物および方法は、部分的に、胚幹（ES）細胞または人工多能性細胞（iPSC）から単離ヒト肺前駆細胞を作製する方法を発見したことに関する。肺組織からの成体前駆細胞の存在および単離は、議論が分かれており、ごく限られた成功しか収めておらず、それゆえ、本明細書において記述される方法および組成物は、単離ヒト肺前駆細胞を、スクリーニングアッセイ、または肺疾患/障害または肺の損傷の処置にとって有用な量で産生することができるという利点を有する。さらに、本明細書において提供される細胞組成物は、ヒト肺組織からこれまで単離および/または培養されていない。

30

【0113】

定義

本明細書において用いられる「ヒト幹細胞」という用語は、自己再生して少なくとも1つの細胞タイプに分化することができるヒト細胞を意味する。「ヒト幹細胞」という用語は、ヒト幹細胞株、ヒト由来iPS細胞、ヒト胚幹細胞、ヒト多能性細胞、ヒト複能性幹細胞、またはヒト成人幹細胞を包含する。

40

【0114】

本明細書において用いられる「複能性」という用語は、細胞が複数の異なる表現型へと分化できることを意味する。複能性細胞は一般的に、1つの胚葉系列の細胞のみへと分化することができる。これは、定義により、3胚葉全ての細胞へと分化することができる多能性細胞とは対照的である。多能性細胞は、たとえばヌードマウステラトーマ形成アッセイを用いて、3胚葉全てへの分化能によって主に特徴付けされる。多能性はまた、胚幹（ES）細胞マーカーの発現によっても証拠が得られるが、多能性の好ましい試験は、3胚葉のそれぞれの細胞への分化能の証明である。多能性細胞は典型的に、インビトロで長期間、たとえば1年より長くまたは30回より多い継代のあいだ分裂能を有する。

50

【0115】

本明細書において用いられる「ヒト肺前駆細胞」という用語は、肺系列に拘束されるが、自己再生能も保持する任意の前駆細胞を意味する一般的な用語である。肺系列への拘束の第1段階の1つは、幹細胞マーカーNkx2.1の出現であるが、Nkx2.1マーカーはまた、甲状腺および脳の系列の細胞にも検出されうる。それゆえ、この説明の意図として、肺系列へと拘束され、「ヒト肺前駆細胞」という用語に包含される第一の前駆細胞は、Nkx2.1を発現するがTuj1およびPax8細胞表面マーカーを欠如する細胞である。Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞から分化することができ、自己再生能を保持するいかなる前駆細胞も、「ヒト肺前駆細胞」という用語に包含される。本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞の他の例には、Nkx2.1陽性Sox2陽性近位複能性気道前駆細胞、Nkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性胚前駆細胞、およびNkx2.1陽性p63陽性基底気道幹細胞が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、ヒト肺前駆細胞は、選択した分化条件に置かれると、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、I型肺胞細胞、II型肺胞細胞、または神経内分泌細胞へと分化する。ヒト肺前駆細胞は、腫瘍細胞または癌細胞ではない。1つの局面において、ヒト肺前駆細胞は、胚もしくは胚幹細胞から誘導されず、または胚の培養において誘導される他の細胞から誘導されない。いくつかの態様において、ヒト肺前駆細胞は、自己細胞または非自己細胞から分化する。1つの態様において、ヒト肺前駆細胞は遺伝子改変細胞ではなく、または遺伝子改変細胞から誘導されない。

10

【0116】

本明細書において用いられる「遠位複能性肺前駆細胞」という用語は、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞、扁平上皮細胞、I型肺胞細胞、II型肺胞細胞、気管支肺胞幹細胞(BASC)、末端細気管支内の気管支肺胞管接合部(BADJ)に存在する肺前駆細胞、I型およびII型肺胞細胞の前駆細胞、および/または肺の損傷(たとえば、インフルエンザ感染症)に应答する気道上皮細胞および肺胞細胞の両方に関する遊走性のCK14+細胞を含むがこれらに限定されるわけではない肺の全てのタイプの上皮細胞へと分化することができるNkx2.1陽性Sox9陽性細胞を意味する。

20

【0117】

本明細書において用いられる「近位気道複能性前駆細胞」という用語は、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞、扁平上皮細胞、または肺の損傷後に肺胞細胞へと分化するために気管支肺胞位置へと移動する遊走性のCK14+細胞へと分化することができるNkx2.1陽性Sox2陽性細胞を意味する。

30

【0118】

「分化した細胞」という用語は、その用語が本明細書において定義されるその本来の型において多能性ではない任意の初代培養細胞を意味する。当業者は、一方の末端の全能性または多能性細胞から、任意の他の表現型へと自然に分化する正常な能力を有しない完全分化細胞までの分化のスペクトルが存在することを認識する。このように、多能性細胞は、全能性細胞と比較すると分化しており、複能性細胞は多能性細胞と比較すると分化している。いくつかの態様において、「分化細胞」という用語はまた、細胞が細胞分化プロセスを受けている、より特異化されていない細胞タイプの細胞(たとえば、未分化細胞またはリプログラム細胞)から誘導されるより特異化された細胞タイプの細胞を意味する。

40

【0119】

マーカーに関して陽性である細胞に言及する場合の、本明細書において用いられる「陽性である」(たとえば、Nkx2.1陽性)という用語は、免疫蛍光顕微鏡または蛍光活性化セルソーティング(FACS)などのフローサイトメトリー法を用いて、細胞表面マーカーが細胞においてバックグラウンドレベルを超えて検出可能であることを意味する。または、「陽性である」もしくは「マーカーを発現する」という用語は、細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーをコードするmRNAの発現が、RT-PCRを用いてバックグラウンドレベルを超えて検出可能であることを意味する。細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーの発現レベルを、陰性対照(すなわち、マーカーを欠如することがわかっている細胞)から得たまたは

50

アイソタイプ対照（すなわち、適切な特異性を有しないが、細胞タンパク質、脂質、または炭水化物に対する非特異的結合のみを行う対照抗体）によって得られた発現レベルと比較することができる。このように、マーカーを「発現する」（または「マーカーに関して陽性である」）細胞は、そのマーカーに関する陰性対照に関して決定された発現レベルを超えて検出可能な発現レベルを有する。

【0120】

マーカーに関して陰性である細胞に言及する場合の、本明細書において用いられる「陰性である」という用語（または「発現しない」という用語）は、免疫蛍光顕微鏡または蛍光活性化セルソーティング（FACS）などのフローサイトメトリー法を用いて、細胞表面マーカーを細胞上でバックグラウンドレベルを超えて検出できないことを意味する。または、「陰性」もしくは「発現しない」という用語は、細胞内マーカーまたは細胞表面マーカーのmRNAの発現を、RT-PCRを用いてバックグラウンドレベルを超えて検出できないことを意味する。細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーの発現レベルは、陰性対照（すなわち、マーカーを欠如することがわかっている細胞）から得られたまたはアイソタイプ対照（すなわち、適切な特異性を有しない、細胞タンパク質、脂質、または炭水化物に対する非特異的結合のみを行う対照抗体）によって得られた発現レベルと比較される。このため、マーカーを「発現しない」細胞は、そのマーカーの陰性対照と類似であるように思われる。

10

【0121】

本明細書において用いられる「細胞が増殖性である」という句は、幹細胞の自己再生能を意味する。自己再生は、2つの主要な機序のいずれかによって起こりうる。幹細胞は非対称に分裂することがあり、この場合1つの娘細胞は幹細胞状態を保持し、他の娘細胞は、いくつかの別個の他の特異的な機能および表現型を発現する。または、集団の中の幹細胞のいくつかは、2つの幹細胞へと対称に分裂して、このように、全体として集団の中でいくつかの幹細胞を維持することができるが、集団の中の他の細胞は、分化した子孫のみを生じる。

20

【0122】

本明細書において用いられる「分化能」という用語は、幹細胞、前駆細胞、多能性細胞、または複能性細胞がより分化した細胞のサブセットへ分化する能力を意味する。「分化能」という用語は、親細胞より大きい分化能を含む細胞が産生されるように、分化スペクトルに沿って逆向きに移動することを包含しない。すなわち、「分化能」という用語は、細胞をより分化していない状態へとシフトさせるリプログラミング法を包含しない。

30

【0123】

細胞の個体発生の文脈において、「分化する」または「分化している」という用語は、「分化した細胞」がその前駆細胞よりさらに下流の発達経路へと進行している細胞であることを示す相対的用语である。このように、いくつかの態様において、この用語が本明細書において定義されるリプログラム細胞は、系列拘束前駆細胞（ヒト肺前駆細胞などの）へと分化することができ、次に、これはさらに下流の経路の他のタイプの前駆細胞（組織特異的前駆細胞、たとえば近位気道複能性前駆細胞など）へと分化することができ、次に、ある組織タイプにおいて特徴的役割を果たし、さらなる増殖能を保持しても保持しなくてもよい最終分化細胞へと分化することができる。

40

【0124】

本明細書において用いられる、「脱分化」または「リプログラミング」、または「逆分化」という用語は、それが由来する細胞より多くの幹細胞表現型またはより少ない分化表現型を再発現する細胞を作製するプロセスを意味する。たとえば、複能性細胞を、多能性細胞へと脱分化させることができる。すなわち、脱分化は、全能性細胞から完全分化細胞に至る分化スペクトルに沿って、細胞を逆向きにシフトさせる。典型的に、細胞の分化表現型の逆転は、たとえば、幹細胞特異的mRNAおよび/またはタンパク質を発現させることによる細胞の人為的操作を必要とする。リプログラミングは典型的に、インビボまたはインビトロで自然の条件では観察されない。

50

【0125】

本明細書において用いられる「体細胞」という用語は、胚芽細胞、着床前胚に存在するもしくはそこから得られた細胞、またはインビトロでそのような細胞の増殖に起因する細胞以外の任意の細胞を意味する。別の言い方をすれば、体細胞は、生殖系列細胞とは対照的に、生物の体を形成する任意の細胞を意味する。精子および卵子、精子および卵子が作製される元となる細胞（生殖母細胞）、および未分化幹細胞を除く哺乳動物の体に存在するあらゆる細胞タイプが体細胞であり、内部臓器、皮膚、骨、血液、および結合組織は全て、実質的に体細胞で構成される。いくつかの態様において、体細胞は、胚に存在しない、または胚から得られない、およびインビトロでそのような細胞の増殖に起因しない体細胞を意味する「非胚体細胞」である。いくつかの態様において、体細胞は、胚もしくは胎児以外の生物に存在するもしくは胚もしくは胎児以外の生物から得られた、またはそのような細胞のインビトロでの増殖に起因する細胞を意味する「成体体細胞」である。それ以外であると明記している場合を除き、分化細胞をリプログラミングする方法（たとえば、iPSCを作製する方法）は、インビボおよびインビトロの両方で行うことができる（インビボは、分化細胞が対象内に存在する場合に行われ、インビトロは、培養で維持された単離された分化細胞を用いて行われる）。

10

【0126】

本明細書において用いられる、「成体細胞」という用語は、胚の発達後の体の至る所で見いだされる細胞を意味する。

【0127】

本明細書において用いられる「単離細胞」は、そのような細胞において当初見いだされたまたはそのような細胞の子孫である生物から除去されている細胞を意味する。任意で、細胞は、インビトロで、たとえば他の細胞の存在下で培養されている。任意で、細胞は、後に第二の生物に導入されるか、または細胞（または細胞の子孫である細胞）が単離された生物に再導入される。

20

【0128】

本明細書において用いられる単離細胞集団に関して「単離集団」という用語は、混合細胞集団または不均一な細胞集団から除去および分離されている細胞集団を意味する。いくつかの態様において、単離集団は、そこから細胞が単離または濃縮される不均一な集団と比較して、実質的に純粋な細胞集団である。いくつかの態様において、単離集団は、単離ヒト肺前駆細胞集団であり、たとえばヒト肺前駆細胞とそこからヒト肺前駆細胞が誘導される細胞を含む不均一な細胞集団と比較して、実質的に純粋なヒト肺前駆細胞集団である。

30

【0129】

「実質的に純粋な」という用語は、特定の細胞集団に関して、総細胞集団を構成する細胞に関して、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%純粋である細胞集団を意味する。すなわち、肺前駆細胞集団に関して、「実質的に純粋な」または「本質的に精製された」という用語は、本明細書においてその用語によって定義される肺前駆細胞ではない細胞を、約20%より少なく、より好ましくは約15%、10%、8%、7%より少なく、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%より少なく、または1%未満含む細胞集団を意味する。

40

【0130】

「濃縮する」または「濃縮された」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、ヒト肺前駆細胞組成物および本明細書において記述される方法において用いられる細胞などの1つのタイプの細胞の収率（分画）が、開始生物学的試料、培養、または調製物におけるそのタイプの細胞の分画に対して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、または少なくとも75%増加していることを意味する。

【0131】

50

本明細書において用いられる、「増殖する」および「増殖」とは、細胞分裂による集団における細胞数の増加（成長）を意味する。細胞増殖は一般的に、増殖因子、および他のマイトゲンを含む、環境に応答した多数のシグナル伝達経路の協調的活性化に起因すると理解される。細胞増殖はまた、細胞内または細胞外シグナルの作用および細胞増殖を遮断するまたは負に影響を及ぼす機序からの解放によっても促進されうる。

【0132】

「再生」または「自己再生」、または「増殖」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、細胞自身のより多くのコピー（たとえば、複製）を作製する細胞のプロセスを意味する。いくつかの態様において、肺前駆細胞は、長期間にわたっておよび/または何ヶ月から何年ものあいだ、同じ未分化細胞へと分裂することによって（たとえば、1つまたは複数の細胞表面マーカーの有無を測定することによって決定される）自身を再生することができる。いくつかの例において、増殖は、1つの細胞が2つの同一の娘細胞へと繰り返し分裂することによる肺前駆細胞の数の増加を意味する。

10

【0133】

本明細書において用いられる「分離」または「選択」という用語は、異なる細胞タイプを1つまたは複数の集団へと単離すること、および特異的標的幹細胞集団において濃縮されている単離集団を標的細胞集団として収集することを意味する。選択は、それによって標的濃縮細胞集団が保持される陽性選択、または非標的細胞タイプが廃棄される（それによって、残りの細胞集団において所望の標的細胞タイプを濃縮する）陰性選択を用いて行うことができる。

20

【0134】

本明細書において用いられる「陽性選択」という用語は、関心対象細胞を保持することによる所望の細胞タイプの選択を意味する。いくつかの態様において、陽性選択は、関心対象細胞の保持を助けるための物質の使用、たとえば所望のまたは標的細胞上の表面抗原に対して特異的結合親和性を有する抗体などの陽性選択物質の使用を伴う。いくつかの態様において、陽性選択は、陽性選択物質の非存在下で、たとえば標的細胞タイプの陽性選択が、標的細胞タイプの細胞サイズ、密度および/または形態のいずれかに基づく、たとえば「タッチフリー」またはクローズドシステムで起こりうる。

【0135】

本明細書において用いられる「陰性選択」という用語は、枯渇させるまたは廃棄するための望ましくないまたは非標的細胞を選択して、それによって所望の標的細胞タイプを保持する（およびこのように濃縮する）ことを意味する。いくつかの態様において、陰性選択は、廃棄するための望ましくない細胞の選択を補助する物質の使用、たとえば望ましくないまたは非標的細胞上の表面抗原に対して特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体などの陰性選択物質の使用を伴う。いくつかの態様において、陰性選択は、陰性選択物質を伴わない。いくつかの態様において、陰性選択は、陰性選択物質の非存在下で、たとえば廃棄されるべき望ましくない（非標的）細胞タイプの陰性選択が、望ましくない（非標的）細胞タイプの細胞サイズ、密度、および/または形態のいずれかに基づく「タッチフリー」またはクローズドシステムで起こりうる。

30

【0136】

本明細書において用いられる「マーカー」という用語は、細胞の特徴および/または表現型を記述するために用いられる。マーカーは、関心対象の特徴を含む細胞を選択するために用いることができ、特異的細胞に応じて変化しうる。マーカーは、特定の細胞タイプの細胞または細胞タイプによって発現される分子の、形態学的、機能的、または生化学的（酵素的）特徴であるか否かによらず、特徴である。1つの局面において、そのようなマーカーは、タンパク質である。そのようなタンパク質は、当技術分野において利用可能な抗体のエピトープまたは他の結合分子を保有しうる。しかし、マーカーは、タンパク質（ペプチドおよびポリペプチド）、脂質、多糖類、核酸、およびステロイドを含むがこれらに限定されるわけではない、細胞において見いだされる任意の分子からなりうる。形態学的特徴または形質の例には、形状、サイズ、核対細胞質比が挙げられるがこれらに限定さ

40

50

れるわけではない。機能的特徴または形質の例には、特定の基質に対する接着能、特定の色素の取り込みまたは排除能、特定の条件での遊走能、および特定の系列に沿った分化能が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。マーカーは、当業者に利用可能な任意の方法によって検出されうる。マーカーはまた、形態学的特徴の非存在、またはタンパク質、脂質等の非存在でありうる。マーカーは、ポリペプチドの有無に関する独自の特徴、および他の形態学的特徴のパネルの組み合わせでありうる。1つの態様において、マーカーは、細胞表面マーカーである。肺前駆細胞上に発現される例示的な細胞表面マーカーには、Sox2、Sox9、p63、FoxP2、ETV4/5、FoxA2、Nkx2.1、Gata6、ID2、CK5、NGFR、FoxJ1、CCSP、Scgb3a2、Muc5ac、T1a、Spic、およびScgnが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、細胞表面マーカーが存在しないことを用いて、肺前駆細胞を、もう1つの系列（たとえば、甲状腺または脳系列）の細胞と区別することができる。肺前駆細胞または分化した肺細胞に存在しない例示的な細胞表面マーカーには、Tuj1およびPax8が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。当業者は、細胞表面マーカーが、発達の特定の時点で、または特定の肺前駆細胞タイプに存在しうることを認識するであろう。たとえば、Sox2は、前方内胚葉の前駆細胞において発現されるが、遠位複能性肺前駆細胞などの、より分化した肺前駆細胞では発現されず、前駆細胞の分化が進行するにつれて、気道前駆細胞などの細胞において再活性化される。このように、細胞表面マーカーを、選択される所望の肺前駆細胞の特定の分化段階に応じて、ある肺前駆細胞に関する陽性選択戦略と組み合わせる用いることができ、同様に他の肺前駆細胞の陰性選択戦略と組み合わせる用いることができる。

【0137】

本明細書において用いられる、「足場」という用語は、細胞の接着および増殖にとって適した表面を提供する生物学的適合性の材料を含む構造を意味する。足場はさらに、力学的な安定性および支持を提供することができる。足場は、増殖しつつある細胞集団がとる三次元形状または型に影響を及ぼすまたはそれらの範囲を定めるために特定の形状または型で存在しうる。そのような形状または型は、薄膜（たとえば、第三の次元より実質的に大きい二次元を有する型）、リボン、ひも、シート、平坦な円板、円柱、球体、三次元非晶質形状等を含むがこれらに限定されるわけではない。

【0138】

本明細書において用いられる、「対象に植え込み可能」という用語は、植え込み時に宿主生物において認識可能な免疫応答を生成しない任意の非生存（たとえば、無細胞）植え込み可能構造を意味する。このように、植え込み可能構造は、たとえば刺激物質であってはならず、または刺激物質を含んではならず、またはLPS等を含んではならない。

【0139】

本明細書において用いられる「生分解性」という用語は、生理的条件下で、たとえば送達された細胞またはインビボでの細胞の細胞生存率に有害な影響を及ぼさない条件下で、足場が分解する能力を意味する。そのような生分解性の足場は、好ましくは、組成物が植え込まれている対象において全身性の反応を引き起こしうる刺激物質またはアレルゲンではなく、または刺激物質またはアレルゲンを含まない。いくつかの態様において、生分解性とは、足場が代謝されうる、および代謝物が生理的排泄機序（たとえば、尿、便、肝臓の解毒等）によって対象から消失しうることを意味する。

【0140】

本明細書において用いられる「処置する」という用語は、状態、疾患、または障害の少なくとも1つの有害な効果または症状を減少または軽減することを含む。たとえば、「処置する」および「処置」という用語は、対象が疾患の少なくとも1つの症状の減少または疾患の改善を有するように、たとえば有益なまたは所望の臨床結果を有するように、組成物の有効量、たとえば肺前駆細胞集団を含む組成物の有効量を対象に投与することを意味する。本開示の目的に関して、有益なまたは所望の臨床結果は、検出可能であるか検出不能であるかによらず、1つまたは複数の症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の安定化（たとえば、悪化しない）、疾患進行の遅延または遅れ、疾患状態の改善または緩和、およ

び寛解（部分的または完全）を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、処置する段階は、処置を受けない場合に予想される生存と比較した生存の延長を意味する。このように、当業者は、処置が、疾患状態を改善することができるが、疾患に関する完全な治癒ではないことを認識する。いくつかの態様において、処置は予防を含みうる。しかし、代わりの態様において、処置は予防を含まない。

【0141】

本明細書において言及される肺障害、肺疾患、または肺損傷（たとえば、急性の肺損傷）の「処置」は、肺または気道の機能を安定化させるまたは改善する治療的介入を意味する。すなわち、「処置」は、呼吸器官の機能に向けられる。肺または気道の機能を、そのような治療前のそのような機能と比較して少なくとも10%、および好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、75%、90%、100%もしくはそれ以上、たとえば2倍、5倍、10倍またはそれ以上で完全な機能までおよび完全な機能を含む、安定化または改善する治療的アプローチは、有効な処置であると見なされる。有効な処置は、有効な処置であると見なされる肺疾患または肺障害を治癒する必要はなく、またはその基礎となる原因に直接影響を及ぼす必要はない。

10

【0142】

「薬学的に許容される」という句は、本明細書において、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を引き起こすことなく、妥当な利益/リスク比に釣り合っ、ヒトおよび動物の組織に接触して用いるために適した化合物、材料、組成物、および/または投与剤形を意味するために用いられる。

20

【0143】

本明細書において、組成物、担体、希釈剤、および試薬について言及する場合に用いられる「薬学的に許容される」、「生理的に認容される」、という用語およびその文法的変化形は、互換的に用いられ、悪心、めまい、胃のむかつき、およびその他などの望ましくない生理的効果を生じることなく、材料を哺乳動物に投与できることを表す。薬学的に許容される担体は、それが望ましい場合を除き、混合される物質に対する免疫応答の発生を促進しない。その中に溶解または分散させた活性成分を含む薬理学的組成物の調製は、当技術分野において十分に理解され、処方に基づいて制限される必要はない。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能製剤として調製されるが、使用前に液体中で溶液または懸濁液とするために適している固体剤形も同様に調製されうる。調製物はまた、乳化されうるか、またはリボソーム組成物として提示することができる。活性成分を、薬学的に許容されて、活性成分と適合性である賦形剤と、本明細書において記述される治療方法において用いるために適した量で混合することができる。適した賦形剤は、たとえば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、またはその他およびその組み合わせである。加えて、望ましければ、組成物は、活性成分の有効性を増強する湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤およびその他などの微量の補助物質を含みうる。本発明の治療組成物は、その成分の薬学的に許容される塩を含みうる。薬学的に許容される塩は、たとえば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸およびその他などの有機酸によって形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離のアミノ基によって形成される）を含む。遊離のカルボキシル基によって形成される塩もまた、たとえば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン、およびその他などの有機塩基から誘導することができる。生理的に認容される担体は、当技術分野において周知である。例示的な液体担体は、活性成分および水の他には材料を含まない、または生理的pH値のリン酸ナトリウム、生理食塩水、もしくはリン酸緩衝生理食塩液のような両方の液などの緩衝剤を含む無菌的水溶液である。なおさらに、水性担体は、1つより多くの緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどの塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、およびその他の溶質を含みうる。液体組成物はまた、水に加えておよび水を除外して液相を含みうる。そのような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油、

30

40

50

および水-油乳剤である。特定の障害または状態の処置において有効である本明細書において記述される方法と共に用いられる活性成分の量は、障害または状態の性質に依存して、標準的な臨床技術によって決定されうる。

【0144】

本明細書において用いられる、疾患、障害、またはその症状に関連して用いる場合の「予防」または「予防する」とは、個体が疾患または障害、たとえば肺の障害を発症する可能性の減少を意味する。疾患または障害を発症する可能性は、たとえば疾患または障害に関する1つまたは複数の危険因子を有する個体が、同じ危険因子を有するが、本明細書において記述される処置を受けていない集団と比較して、統計学的に言えば、障害を発症しない、またはそのような疾患もしくは障害を後になって、またはより低い重症度で発症する場合に減少する。疾患の症状を発症しない、または症状の発症が減少（たとえば、その疾患または障害に関する臨床的に許容される尺度で少なくとも10%）もしくは遅延（たとえば、数日、数週間、数ヶ月、または数年）することは、有効な予防と見なされる。

10

【0145】

本明細書において用いられる、「分化誘導する」という用語は、多能性または複能性幹細胞（たとえば、前方前腸内胚葉細胞）から、より分化した細胞（たとえば、ヒト肺前駆細胞または気道表現型を有する細胞）の形成を誘導する化学的/生物学的処置、身体的环境、または遺伝的修飾を意味する。分化は、明確な細胞タイプ特異的マーカーの出現によって、または幹細胞特異的マーカーの喪失によって、またはその両者によって評価することができる。

20

【0146】

本明細書において用いられる「含む（comprising）」または「含む（comprises）」という用語は、本質的であるか否かによらず、明記されていない要素を含むことを受け入れる、本発明にとって必須である組成物、方法、およびそのそれぞれの成分に関連して用いられる。

【0147】

本明細書において用いられる「本質的にからなる」という用語は、所定の態様にとって必要な要素を意味する。この用語は、本発明のその態様の基本および新規または機能的特徴に実質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

【0148】

「からなる」という用語は、態様のその説明において引用されていないいかなる要素も除く、本明細書において記述される組成物、方法、およびそれぞれの成分を意味する。

30

【0149】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる、単数形「1つの」、「1つの（an）」、および「その」は、本文がそれ以外であることを明らかに示している場合を除き、複数形を含む。このように、たとえば「方法」という言及は、本開示を読むことによって当業者に明らかとなる、1つまたは複数の方法、および/または本明細書において記述されるタイプの段階、およびその他を含む。

【0150】

胚幹細胞

幹細胞は、有糸分裂による細胞分裂を通して自身を再生する能力を保持し、特異化された細胞タイプの多様な範囲へと分化することができる細胞である。哺乳動物幹細胞の3つの大まかなタイプは、胚盤胞において見いだされる胚幹（ES）細胞、体細胞からリプログラミングされた人工多能性幹細胞（iPSC）、および成体組織において見いだされる成体幹細胞を含む。発達中の胚において、幹細胞は、特異化された胚組織の全てへと分化することができる。成体生物において、幹細胞および前駆細胞は、体の修復システムとして作用して、特異化された細胞を補充するが、同様に血液、皮膚、または腸組織などの再生器官の正常な代謝回転を維持する。多能性幹細胞は、3胚葉のいずれかに由来する細胞へと分化することができる。

40

【0151】

50

幹細胞は、その発達能によって、(1)全ての胚および胚外細胞タイプを生じることができる全能性、(2)全ての胚細胞タイプ、すなわち内胚葉、中胚葉、および外胚葉を生じることができる多能性、(3)細胞系列のサブセットを生じることができるが、特定の組織、器官、または生理的システム内の全てを生じることができる複能性(たとえば、複能性遠位肺前駆細胞は、複能性遠位肺前駆細胞を含む子孫(自己再生)と、気道の通常の成分である細胞タイプおよび要素(たとえば、基底細胞、繊毛細胞、クララ細胞、および杯細胞)を産生することができる)、(4)複能性幹細胞よりも拘束されたサブセットの細胞系列を生じることができる少能性;ならびに(5)1つの細胞系列(たとえば、精子発生幹細胞)を生じることができる単能性として分類される。

【0152】

10

本明細書において、胚幹細胞と人工多能性幹細胞の両方からヒト肺前駆細胞を作製する方法が提供される。1つの態様において、本明細書において提供される方法は、胚幹細胞からのヒト肺前駆細胞の作製に関する。または、いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、胚幹細胞またはヒト胚起源の任意の他の細胞からのヒト肺前駆細胞の作製を包含しない。

【0153】

胚幹細胞およびその回収方法は、当技術分野において周知であり、たとえば、Trounson A O (Reprod Fertil Dev (2001) 13: 523), Roach M L (Methods Mol Biol (2002) 185: 1), and Smith A G (Annu Rev Cell Dev Biol (2001) 17:435)に記述される。「胚幹細胞」という用語は、胚盤胞の内細胞塊の多能性幹細胞を意味するために用いられる(たとえば、米国特許第5843780号、第6200806号を参照されたい)。そのような細胞はまた、体細胞核移入から誘導される胚盤胞の内細胞塊からも得ることができる(たとえば、米国特許第5945577号、第5994619号、第6235970号を参照されたい)。胚幹細胞の識別特徴は、胚幹細胞表現型を定義する。したがって、ある細胞が、その細胞を他の細胞と区別することができるような胚幹細胞の独自の特徴の1つまたは複数を有する場合、その細胞は胚幹細胞の表現型を有する。例示的な胚幹細胞識別特徴には、遺伝子発現プロファイル、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件に対する応答性、およびその他が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

20

【0154】

胚起源から誘導される細胞は、幹細胞バンクまたは他の認識された寄託所から得られた胚幹細胞または幹細胞株を含みうる。幹細胞株を産生する他の手段は、胚盤胞を形成する前の初期胚(およそ8細胞期)からの割球の使用を含む方法を含む。そのような技術は、不妊治療クリニックで日常的に行われている着床前遺伝子診断技術に対応する。1つの割球細胞を、確立されたES細胞株と同時に培養した後、それらから分離すると、完全にコンピテントなES細胞株を形成する。

30

【0155】

胚幹細胞は、それらが特異的分化系列に拘束されていない場合、未分化であると見なされる。そのような細胞は、胚または成体起源の分化した細胞からそれらを区別する形態学的特徴を示す。未分化の胚幹(ES)細胞は、当業者によって容易に認識され、典型的に、顕微鏡の二次元視野において高い核/細胞質比と顕著な核小体を有する細胞コロニーとして出現する。いくつかの態様において、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞は、胚幹細胞または他の任意の胚起源の細胞から誘導されない。

40

【0156】

成体幹細胞は、出生後または新生児期後の生物の組織または成体生物から誘導される幹細胞であり、これらも当技術分野において公知である。成体幹細胞は、胚幹細胞と比較してそれが発現するまたは発現しないマーカーのみならず、後成的差、たとえばDNAメチル化パターンの差が存在するという点において、構造的に胚幹細胞とは異なる。

【0157】

人工多能性幹細胞(iPSC)

いくつかの態様において、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞は、単離多能性

50

幹細胞から誘導される。iPSCを用いる利点は、ヒト肺前駆細胞が投与される対象と同じ対象から細胞を誘導できる点である。すなわち、体細胞を対象から得て、人工多能性幹細胞へとリプログラムした後、ヒト肺前駆細胞（たとえば、自己細胞）へと再分化させて対象に投与することができる。肺前駆細胞が、本質的に自己起源から誘導されることから、生着の拒絶またはアレルギー反応のリスクは、別の対象または対象群からの細胞を用いる場合と比較して減少する。いくつかの態様において、肺前駆細胞は、非自己起源から誘導される。加えて、iPSCを用いることにより、胚起源から細胞を得る必要がなくなる。このように1つの態様において、開示される方法において用いられる幹細胞は、胚幹細胞ではない。

【0158】

分化は一般的に、生理的状況下で非可逆的であるが、最近、体細胞を人工多能性幹細胞へとリプログラムするためのいくつかの方法が開発されている。例示的な方法は、当技術分野において公知であり、本明細書において以下に簡単に説明する。

【0159】

本明細書において用いられる「リプログラミング」という用語は、分化した細胞（たとえば、体細胞）の分化状態を変化または逆転させるプロセスを意味する。別の言い方をすれば、リプログラミングは、細胞の分化をより未分化なまたはより原始的なタイプの細胞へと逆向きに駆動するプロセスを意味する。多くの初代培養細胞を培養すると、完全に分化した特徴の一部が失われうることには注意すべきである。このように、分化した細胞という用語に含まれるそのような細胞の単純な培養によって、これらの細胞が、非分化細胞（たとえば、未分化細胞）または多能性細胞となるわけではない。分化細胞の多能性への移行は、培養において分化特徴の部分的喪失に至る刺激を超えるリプログラミング刺激を必要とする。リプログラムされた細胞はまた、一般的に培養において有限回数の分裂能を有する初代培養の親細胞と比較して、成長能を失うことなく長期間継代できるという特徴を有する。

【0160】

リプログラムされる細胞を、リプログラミングの前に部分的に分化させるかまたは最終分化させることができる。いくつかの態様において、リプログラミングは、分化細胞（たとえば、体細胞）の分化状態の、多能性状態または複能性状態への完全な逆転を包含する。いくつかの態様において、リプログラミングは、分化細胞（たとえば、体細胞）の分化状態の、未分化細胞（たとえば、胚様細胞）への完全または部分的逆転を包含する。リプログラミングによって、細胞による特定の遺伝子の発現が起こりえて、その発現がさらなるリプログラミングに寄与する。本明細書において記述されるある態様において、分化細胞（たとえば、体細胞）のリプログラミングによって、分化細胞に、未分化状態のふりをさせることができる（たとえば、未分化細胞である）。得られた細胞は、「リプログラム細胞」または「人工多能性幹細胞（iPSCまたはiPS細胞）」と呼ばれる。

【0161】

リプログラミングは、細胞分化の際に起こる、核酸修飾（たとえば、メチル化）の遺伝的パターン、染色質凝縮、後成的変化、ゲノムインプリンティング等の少なくともいくつかの変化、たとえば逆転を伴いうる。リプログラミングは、既に多能性である細胞の既存の未分化状態を単に維持することとは異なり、または既に複能性細胞である細胞（たとえば、造血幹細胞）の既存の完全ではない分化状態を維持することとも異なる。リプログラミングはまた、既に多能性または複能性である細胞の自己再生または増殖を促進することとも異なるが、本明細書において記述される組成物および方法はまた、いくつかの態様において、そのような目的にとっても有用でありうる。

【0162】

体細胞から多能性幹細胞を作製するために用いられる特異的アプローチまたは方法（広く、「リプログラミング」と呼ばれる）は、特許請求される本発明にとって重要ではない。このように、体細胞を多能性表現型へとリプログラムするいかなる方法も、本明細書において記述される方法において用いるために適切であろう。

10

20

30

40

50

【0163】

転写因子の既定の組み合わせを用いて多能性細胞を作製するためのリプログラミング方法論は、人工多能性幹細胞において記述されている。Yamanaka and Takahashiは、Oct4、Sox2、Klf4、およびc-Mycの直接形質導入によって、マウス体細胞を発達能が増大したES細胞様細胞へと変換させた (Takahashi and Yamanaka, 2006)。iPSCは、それらが多能性関連転写回路および後成的背景の多くを回復することからES細胞と類似する。加えて、マウスiPSCは、多能性に関する全ての標準アッセイ、具体的に、3胚葉の細胞タイプへのインビトロ分化、テラトーマ形成、キメラへの関与、生殖系列伝播 (Maherali and Hochedlinger, 2008)、および四倍体胚盤胞補完 (Woltjen et al., 2009) を満たす。

【0164】

その後の実験から、類似の形質導入法 (Lowry et al., 2008; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007b) を用いてヒトiPS細胞を得ることができると示され、および転写因子トリオ、OCT4、SOX2、およびNANOGが、多能性を支配する転写因子のコアセットとして確立されている (Jaenisch and Young, 2008)。iPS細胞の産生は、歴史的にはウイルスベクターを用いて、幹細胞関連遺伝子をコードする核酸配列を成体の体細胞に導入することによって得ることができる。

【0165】

iPS細胞は、最終分化体細胞から作製または誘導することができると共に、成体体細胞または体幹細胞からも作製または誘導することができる。すなわち、非多能性の前駆細胞を、リプログラミングによって多能性または複能性にすることができる。そのような例では、最終分化細胞をリプログラムするために必要な場合ほど多くのリプログラム因子を含める必要はない。さらに、リプログラミングは、非ウイルス性のリプログラミング因子の導入によって、たとえばタンパク質そのものを導入することによって、またはリプログラミング因子をコードする核酸を導入することによって、または翻訳時にリプログラミング因子を産生するメッセンジャーRNAを導入することによって誘導することができる (たとえば、Warren et al., Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30を参照されたい)。リプログラミングは、たとえば、Oct-4 (Oct-3/4またはPou5f1としても知られる)、Sox1、Sox2、Sox3、Sox15、Sox 18、NANOG、Klf1、Klf2、Klf4、Klf5、NR5A2、c-Myc、l-Myc、n-Myc、Rem2、Tert、およびLIN28を含む、幹細胞関連遺伝子をコードする核酸の組み合わせを導入することによって行うことができる。1つの態様において、本明細書において記述される方法および組成物を用いるリプログラミングは、Oct-3/4、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、およびMycファミリーメンバーの1つまたは複数を体細胞に導入する段階をさらに含む。1つの態様において、本明細書において記述される方法および組成物は、さらに、リプログラミングのためにOct4、Sox2、Nanog、c-MYC、およびKlf4の各々の1つまたは複数を導入する段階を含む。先に注目したように、リプログラミングのために用いられる方法そのものは、必ずしも本明細書において記述される方法および組成物にとって重要ではない。しかし、リプログラムした細胞から分化した細胞を、たとえばヒトの治療に用いる場合、1つの態様において、リプログラミングは、ゲノムを変化させる方法によって行われたい。このように、そのような態様において、リプログラミングは、たとえばウイルスまたはプラスミドベクターを用いないで行われる。

【0166】

開始細胞集団から誘導されるリプログラミングの効率 (すなわち、リプログラムされた細胞の数) を、Shi, Y., et al (2008) Cell-Stem Cell 2:525-528, Huangfu, D., et al (2008) Nature Biotechnology 26(7):795-797, and Marson, A., et al (2008) Cell-Stem Cell 3: 132-135によって示されるように、様々な低分子の添加によって増強させることができる。このように、人工多能性幹細胞産生の効率または割合を増強する物質または物質の組み合わせを、患者特異的または疾患特異的iPSCの産生に用いることができる。リプログラミング効率を増強する物質のいくつかの非制限的な例には、中でも可溶性Wnt、Wnt条件培地、BIX-01294 (G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ)、PD0325901 (MEK阻害剤)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤、

10

20

30

40

50

バルプロ酸、5'-アザシチジン、デキサメタゾン、スベロイルアニリド、ヒドロキサム酸 (SAHA)、ビタミンC、およびトリコスタチン (TSA) が挙げられる。

【0167】

リプログラミング増強物質の他の非制限的な例には、スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA (たとえば、MK0683、ポリノスタット) および他のヒドロキサム酸)、BML-210、デブデシン (たとえば、(-)-デブデシン)、HC毒素、ヌルスクリプト (Nullscript、4-(1,3-ジオキソ-1H,3H-ベンゾ[デ]イソキノリン-2-イル)-N-ヒドロキシブタナミド)、フェニルブチレート (たとえば、フェニル酪酸ナトリウム) およびバルプロ酸 (VPA) および他の短鎖脂肪酸)、スクリプタイド、スラミンナトリウム、トリコスタチンA (TSA)、APHAコンパウンド8、アピシジン、酪酸ナトリウム、ピバロイルオキシメチルブチレート (ピバネクス (Pivanex)、AN-9)、トラポキシニンB、クラミドシン、デブシペプチド (FR 901228またはFK228としても知られる)、ベンズアミド (たとえば、CI-994 (たとえば、N-アセチルジナリン) およびMS-27-275)、MGCD0103、NVP-LAQ-824、CBHA (m-カルボキシ桂皮酸ビスヒドロキサム酸)、JNJ16241199、ツバシン (Tubacin)、A-161906、プロキサミド、オキサムフラチン、3-CI-UCHA (たとえば、6-(3-クロロフェニルウレイド)カブロイックヒドロキサム酸)、AOE (2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシデカン酸)、CHAP31およびCHAP 50が挙げられる。他のリプログラミング増強物質には、たとえば、HDACのドミナントネガティブ型 (たとえば、触媒的に不活性な型)、HDACのsiRNA阻害剤、およびHDACに特異的に結合する抗体が挙げられる。そのような阻害剤は、たとえば、BIOMOL International、Fukasawa、Merck Biosciences、Novartis、Gloucester Pharmaceuticals、Aton Pharma、Titan Pharmaceuticals、Schering AG、Pharmion、MethylGene、およびSigma Aldrichから入手することができる。

10

20

【0168】

本明細書において記述される方法と共に用いるための多能性幹細胞の誘導を確認するために、単離クローンを、幹細胞マーカーの発現に関して試験することができる。体細胞から誘導された細胞に幹細胞マーカーが発現されれば、細胞は、人工多能性幹細胞であると同定される。幹細胞マーカーは、SSEA3、SSEA4、CD9、Nanog、Fbx15、Ecat1、Esg1、Eras、Gdf3、Fgf4、Cripto、Dax1、Zpf296、Slc2a3、Rex1、Utf1、およびNat1を含む非制限的な群から選択されうる。1つの態様において、Oct4またはNanogを発現する細胞は、多能性であると同定される。そのようなマーカーの発現を検出する方法は、たとえばRT-PCR、およびウェスタンブロットまたはフローサイトメトリー分析などのコードされるポリペプチドの存在を検出する免疫学的方法を含みうる。いくつかの態様において、検出は、RT-PCRを伴うのみならず、タンパク質マーカーの検出を含む。細胞内マーカーは、RT-PCRによって最もよく同定されうるが、細胞表面マーカーは、たとえば免疫細胞化学によって容易に同定される。

30

【0169】

単離細胞の多能性幹細胞特徴は、3胚葉の各々の細胞へのiPSCの分化能を評価する試験によって確認することができる。一例として、ヌードマウスにおけるテラトーマ形成を用いて、単離クローンの多能性特徴を評価することができる。細胞をヌードマウスに導入して、細胞から生じた腫瘍に関して組織学および/または免疫組織化学を行う。3胚葉全ての細胞を含む腫瘍が成長すれば、たとえば細胞が多能性幹細胞であることをさらに示している。

40

【0170】

リプログラミングのための体細胞：体細胞は、この用語が本明細書において用いられる場合、生殖系列細胞を除く、生物の体を形成する任意の細胞を意味する。精子および卵子、精子および卵子が作製される元となる細胞 (生殖母細胞)、ならびに未分化幹細胞を除く、哺乳動物の体におけるあらゆる細胞タイプが、分化体細胞である。たとえば、内部臓器、皮膚、骨、血液、および結合組織は全て、分化体細胞で構成される。

【0171】

本明細書において記述される組成物および方法と共に用いられるさらなる体細胞タイプ

50

は、線維芽細胞（たとえば、初代培養線維芽細胞）、筋肉細胞（たとえば、筋細胞）、丘細胞、神経細胞、乳腺細胞、肝細胞および膵島細胞を含む。いくつかの態様において、体細胞は、初代培養細胞株または初代培養もしくは二次培養細胞株の子孫である。いくつかの態様において、体細胞は、ヒト試料から、たとえば、毛包、血液試料、生検（たとえば、皮膚生検、または脂肪組織生検）、スワブ試料（たとえば、口腔スワブ試料）から得られ、このため、ヒト体細胞である。

【0172】

分化体細胞のいくつかの非制限的な例には、上皮細胞、内皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、心細胞、骨格筋細胞、免疫細胞、肝細胞、脾細胞、肺細胞、循環中の血球、消化管細胞、腎細胞、骨髄細胞、および膵細胞が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、体細胞は、脳、肝臓、肺、消化管、胃、腸管、脂肪、筋肉、子宮、皮膚、脾臓、内分泌器官、骨等を含むがこれらに限定されない任意の体組織から単離された初代培養細胞でありうる。さらに、体細胞は、任意の哺乳動物種から得ることができ、その非制限的な例は、マウス、ウシ、サル、ブタ、ウマ、ヒツジ、またはヒト細胞を含む。いくつかの態様において、体細胞はヒト体細胞である。

10

【0173】

リプログラム細胞を、疾患の治療的処置のために用いられるヒト肺前駆細胞の作製に用いる場合、処置される患者から単離された体細胞を用いることが望ましいが、必ずしもその必要はない。たとえば、疾患に関係する体細胞、疾患の治療的処置に關与する体細胞、およびその他を用いることができる。いくつかの態様において、リプログラム細胞とそれらが誘導されるまたは作製される元となる体細胞を含む不均一な集団からリプログラム細胞を選択する方法は、任意の公知の手段によって行うことができる。たとえば、選択マーカー遺伝子などの薬物耐性遺伝子またはその他を用いて、指標として選択マーカーを用いてリプログラム細胞を単離することができる。

20

【0174】

本明細書において開示されるリプログラム体細胞は、アルカリホスファターゼ（AP）； ABCG2； ステージ特異的胚抗原-1（SSEA-1）； SSEA-3； SSEA-4； TRA-1-60； TRA-1-81； Tra-2-49/6E； ERas/ECAT5、E-カドヘリン； -III-チューブリン； -平滑筋アクチン（-SMA）； 線維芽細胞増殖因子4（Fgf4）、Cripto、Dax1； ジンクフィンガータンパク質296（Zfp296）； N-アセチルトランスフェラーゼ-1（Nat1）； ES細胞関連転写物1（ECAT1）； ES G1/DPPA5/ECAT2； ECAT3； ECAT6； ECAT7； ECAT 8； ECAT9； ECAT10； ECAT15-1； ECAT15-2； Fth17； Sal14； 未分化胚細胞転写因子（Utf1）； Rex1； p53； G3PDH； TERTを含むテロメラーゼ； サイレントX染色体遺伝子； Dnmt3a； Dnmt3b； TRIM28； F-ボックス含有タンパク質15（Fbx15）； Nanog/ECAT4； Oct3/4； Sox2； Klf4； c-Myc； Esrrb； TDGF1； GABRB3； Zfp42； FoxD3； GDF3； CYP25A1； developmental pluripotency-associated 2（DPPA2）； T-cell lymphoma break point 1（Tcl1）； DPPA3/Stella； DPPA4； 多能性に関する他の一般的マーカー等を含む、任意の数の多能性細胞マーカーを発現することができる。他のマーカーは、Dnmt3L； Sox15； Stat3； Grb2； -カテニン、およびBmi1を含みうる。そのような細胞はまた、人工多能性幹細胞が誘導される体細胞の特徴であるマーカーのダウンレギュレーションを特徴としうる。

30

40

【0175】

胚体内胚葉と前方前腸内胚葉の作製

本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞を作製する方法は、最初に、胚幹細胞または人工多能性幹細胞から胚体内胚葉を作製する段階から始まる。「胚体内胚葉」は、内胚葉系列に拘束され、腸管または腸管から誘導される器官を生じることができる複能性細胞を含む。胚体内胚葉は、消化器官（たとえば、食道、胃、肝臓、胆嚢、小腸、膵臓、結腸等）、呼吸器官（たとえば、肺胞、気管、気管支）、内分泌腺および臓器（たとえば、副甲状腺、甲状腺、胸腺）、聴覚系（たとえば、耳管および鼓室）および泌尿器系（たとえば、膀胱および尿道の一部）を生じる胚葉である。たとえば、Grapin-Botton and Melton, 2000； Kimelman and Griffin, 2000； Tremblay et al., 2000； Wells and Melton, 199

50

9; Wells and Melton, 2000を参照されたい。「胚体内胚葉」という用語は、胚外組織の形成の原因となる始原内胚葉と呼ばれる異なる系列の細胞を包含しない。

【0176】

胚体内胚葉およびそれから誘導される内胚葉細胞の形成は、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞などの胚体内胚葉系列から誘導される最終分化組織および/または器官を構成する細胞を誘導するための重要な段階である。

【0177】

胚幹細胞または人工多能性幹細胞から胚体内胚葉を誘導する方法は、当技術分野において公知である(たとえば、米国特許第7,993,916号;第7,695,963号;第7,541,185号;US2009/0298178;US2010/0272695;Sherwood et al., Mechanisms of Development (2011) 128:387-400; D'Amour K. et al., Nature Biotechnology (2005) 23:1534-1541; Turovets, N. et al., Differentiation (2011) 81(5):292-298; Kim, PT. et al., PLoS One (2010) 5(11):e14146を参照されたい)。1つの態様において、胚体内胚葉は、iPSCまたはESCに、たとえばB27、アクチビンAおよびZSTK474を含む胚体内胚葉培地を接触させることによって産生される。1つの態様において、胚体内胚葉培地は、1~5% B27(たとえば、2%)、10~40 ng/mLアクチビンA(たとえば、20 ng/mL)、および0.2~0.5 μM ZSTK474を含み、試験して、胚体内胚葉作製効率が低いまたは胚体内胚葉作製効率が低いことが疑われる細胞株において胚体内胚葉を作製するために有用である。

10

【0178】

胚幹細胞または人工多能性幹細胞の胚体内胚葉への分化は、胚体内胚葉の特徴である細胞表面マーカーの発現を決定することによってモニターすることができる。いくつかの態様において、胚体内胚葉マーカーの発現は、マーカーの有無を検出することによって決定される。または、あるマーカーの発現は、マーカーが細胞培養または細胞集団中の細胞に存在するレベルを測定することによって決定される。マーカー発現のそのような測定は、定性的または定量的のいずれかでありうる。

20

【0179】

1つの態様において、定量的PCR(Q-PCR)を用いて、胚体内胚葉におけるマーカーの発現を定量する。Q-PCRを行う方法は、当技術分野において周知である。代替の態様において、細胞マーカーに対して特異的な抗体を用いて、マーカー遺伝子産物の発現を検出する。ある態様において、胚体内胚葉の特徴であるマーカー遺伝子の発現ならびにそれらが誘導される元となる細胞(たとえば、ES細胞またはiPSC)および他の細胞タイプの特徴であるマーカー遺伝子の有意な発現の欠如を決定する。

30

【0180】

1つの態様において、胚体内胚葉のマーカーは、SOX17遺伝子である。胚体内胚葉の他のマーカーには、MIXL1、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、およびCRIP1が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、SOX17およびSOX7の両方の発現をモニターする。他の態様において、SOX17マーカー遺伝子と、ES細胞の特徴であるOCT4マーカー遺伝子の発現をモニターする。さらに、胚体内胚葉細胞は、AFP、SPARC、またはトロンプモジュリンマーカー遺伝子より高レベルでSOX17マーカー遺伝子を発現することから、これらの遺伝子の発現も同様にモニターすることができる。胚体内胚葉のもう1つのマーカーはCXCR4遺伝子であり、この遺伝子はそのリガンドが化学走化性SDF-1である細胞表面ケモカイン受容体をコードする。1つの態様において、胚体内胚葉の産生効率は、FOXA2/SOX17の共染色またはcKit/CXCR4もしくはcKit/EpCAMの組み合わせによるFACS分析によって決定することができる。

40

【0181】

胚体内胚葉が作製された後、次の段階は、胚体内胚葉細胞を、肺および甲状腺細胞になるよう運命づけられた細胞を含む領域である前方前腸内胚葉細胞へと分化させる段階である。このプロセスは本明細書において、胚体内胚葉の「前方移動」とも呼ばれる。本明細書において用いられる「前腸内胚葉」は、腸管の前方部分の細胞を意味し、前腸/中腸接合部の細胞を包含する。ESCまたはiPSCもまた、胚体内胚葉を作製する中間段階を必要と

50

することなく、前方前腸内胚葉細胞へと直接分化させることができることは当業者によって認識されるであろう。肺前駆細胞を作製するために本明細書において記述される分化方法は、前方前腸内胚葉細胞から始まり、このため、そのような前方前腸内胚葉細胞を作製する方法は重要ではなく、本明細書において記述される前方前腸内胚葉細胞を作製する方法に限定されない；前方前腸内胚葉を提供するいかなる方法も用いて、本明細書において開示される肺前駆細胞を調製するための開始材料を提供することができる。

【0182】

胚体内胚葉から前方前腸内胚葉を作製する方法は、当技術分野において公知である（たとえば、WO2010/136583、WO2011/139628；Green, MD et al., *Nature Biotechnology* (2011) 29:267-27；Morrison et al, (2008), *Cell Stem Cell*, 3: 355-356；Goss AM et al., *Developmental Cell* (2009) 17(2):290-298；Livigni A et al., *Current Protocols in Stem Cell Biology* (2009) 10: 1G.3.1-1G.3.10を参照されたい）。

10

【0183】

1つの態様において、前方前腸内胚葉の産生は、マーカーHexなどの前方前腸内胚葉特異的マーカーの活性化によって確認される。Hexは、前方前腸内胚葉の最も初期のマーカーの1つであり、後方特徴を抑制することが示されているホメオボックス含有転写リプレッサーである（たとえば、Brickman JM et al., *Development* (2000) 127:2303-2315；Thomas PQ et al., *Development* (1998) 125:85-94；Zamparini AL et al., *Development* (2006) 133:3709-3722を参照されたい）。Hexの検出は、Cxcr4 (Morrison, GM et al., *Cell Stem Cell* (2008) 3:402-412)などの他の前方前腸内胚葉マーカーと組み合わせることができる。他の例示的なマーカーには、中でもFoxA2およびSox2が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。1つの態様において、胚体内胚葉は、TGF- β アゴニスト（たとえば、アクチビン）による処置を含む前方移動段階を受ける。

20

【0184】

分化に関するシグナル伝達経路

TGF- β シグナル伝達経路の調整：いくつかの態様において、多能性細胞の特定の分化段階を促進するために（たとえば、前方前腸内胚葉の作製の際）、1つまたは複数のTGF- β アゴニストが用いられる。そのような態様において、TGF- β シグナル伝達に対して特異的な活性化物質は、TGF- β ポリペプチドまたはその活性断片、TGF- β ポリペプチドまたはその活性断片を含む融合タンパク質、TGF- β 受容体に対するアゴニスト抗体、またはTGF- β 受容体の低分子アゴニストでありうる。

30

【0185】

他の態様において、1つまたは複数のTGF- β アンタゴニストを用いて多能性細胞を分化させることができる（たとえば、Nkx2.1発現を誘導させるために、肺系列へと拘束する第一段階）。そのような態様において、TGF- β シグナル伝達のアンタゴニストは、ポリペプチド阻害剤またはその断片、ドミナントネガティブ融合タンパク質、TGF- β 受容体に対するアンタゴニスト抗体、またはTGF- β 受容体の低分子アンタゴニストでありうる。

【0186】

トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）シグナル伝達経路は、細胞の成長、細胞分化、アポトーシス、細胞恒常性、および他の細胞機能を含む、成体生物および発達中の胚の両方における多くの細胞プロセスに関係している。TGF- β スーパーファミリーリガンドは、II型受容体に結合し、これはI型受容体を動員してリン酸化する。次に、I型受容体は、受容体調節SMAD（R-SMAD）をリン酸化して、次にこれがcoSMAD SMAD4に結合する。R-SMAD/coSMAD複合体は、核に蓄積して、そこでそれらは転写因子として作用して、標的遺伝子発現の調節に関与する。

40

【0187】

TGF- β 1は、TGF- β 、アクチビン、インヒピン、骨形態形成タンパク質、およびミューラー管抑制物質を含むサイトカインファミリーの原型メンバーである。Smadタンパク質は、TGF- β 経路における例示的な下流のシグナル伝達因子であり、それゆえいくつかの態様において、直接活性化されて、ヒト肺細胞前駆体表現型への分化を行うことができる（たと

50

えば、細胞をSmadタンパク質の活性化因子によって処置することによって)。例示的なSmad活性化因子には、Smadタンパク質またはその機能的ペプチドもしくは断片(たとえば、Smad1、Smad5、Smad8)、BMP2、BMP4、およびミューラー管抑制物質(MIS)が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。アクチビンリガンドは、TGFリガンドと類似のようにシグナルを伝達する。アクチビンは、ALK受容体に結合してこれを活性化して、次に、Smad2およびSmad3などのSmadタンパク質をリン酸化する。Smad4とのヘテロSmad複合体がその後形成されると、遺伝子転写のアクチビンによる調節が起こる。

【0188】

TGF-受容体の低分子阻害剤のいくつかの非制限的な例には、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5ナフチリジン、[3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノイル)]-1H-ピラゾール、および3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾールが挙げられ、これらはCalbiochem(San Diego, CA)から購入することができる。他の低分子阻害剤には、中でもSB-431542(たとえば、Haider et al., 2005; Neoplasia 7(5):509-521を参照されたい)、SM16(たとえば、Fu, K et al., 2008; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 28(4):665を参照されたい); およびSB-505124(たとえば、Dacosta Byfield, S., et al., 2004; Molecular Pharmacology 65:744-52を参照されたい)が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。さらなるTGF-受容体アンタゴニストは当技術分野において公知である。

【0189】

いくつかの態様において、TGF-アンタゴニスト(たとえば、A8301)にとって有用な用量範囲は、0.1から10 μ M、たとえば0.1から1 μ M、0.1から0.5 μ M、0.1から2 μ M、0.1から3 μ M、0.1から4 μ M、0.1から5 μ M、0.1から6 μ M、0.1から7 μ M、0.1から8 μ M、0.1から9 μ M、0.5から2 μ M、0.5から5 μ M、1から3 μ M、2から4 μ M、2から6 μ M、2から7 μ M、5から10 μ M、6から10 μ M、7から10 μ M、8から10 μ M、9から10 μ Mである。いくつかの態様において、TGF-アンタゴニストは、たとえば少なくとも0.1 μ M、少なくとも0.2 μ M、少なくとも0.3 μ M、少なくとも0.4 μ M、少なくとも0.5 μ M、少なくとも0.6 μ M、少なくとも0.7 μ M、少なくとも0.8 μ M、少なくとも0.9 μ M、少なくとも1 μ M、少なくとも1.2 μ M、少なくとも1.3 μ M、少なくとも1.4 μ M、少なくとも1.5 μ M、少なくとも1.6 μ M、少なくとも1.7 μ M、少なくとも1.8 μ M、少なくとも1.9 μ M、少なくとも2 μ M、少なくとも2.5 μ M、少なくとも3 μ M、少なくとも3.5 μ M、少なくとも4 μ M、少なくとも4.5 μ M、少なくとも5 μ M、少なくとも5.5 μ M、少なくとも6 μ M、少なくとも6.5 μ M、少なくとも7 μ M、少なくとも7.5 μ M、少なくとも8 μ M、少なくとも8.5 μ M、少なくとも9 μ M、少なくとも9.5 μ M、少なくとも10 μ Mまたはそれより多い用量で用いられる。

【0190】

BMP受容体シグナル伝達経路の調整

BMP2およびBMP4はいずれも、I型受容体(ALK3)を通してシグナルを伝達するが、BMP7は、異なるI型受容体(ALK2)に結合する。たとえば、von Bubnoff A et al., *Developmental Biology* (2001) 239: 1-14; Chen D. et al., *Growth Factors* (2004) 22(4):233-241; Sieber C. et al., *Cytokine and Growth Factor Rev.* (2009) 20:343-355; and Miyazono K et al., *Journal of Biochemistry* (2010) 147(1):35-51を参照されたい。

【0191】

典型的に、BMP2およびBMP4は、BMP受容体I/II複合体に結合して、それによってSmads 1/5/8のリン酸化が起こり、その後Smad4とのヘテロ三量体複合体が形成される。これらの複合体は核に移動して、標的遺伝子の発現を活性化する(von Bubnoff A et al., *Developmental Biology* (2001) 239: 1-14; Chen D. et al., *Growth Factors* (2004) 22(4):233-241; Sieber C. et al., *Cytokine and Growth Factor Rev.* (2009) 20:343-355; and Miyazono K et al., *Journal of Biochemistry* (2010) 147(1):35-51)。Smad1/5/8媒介転写のほかに、BMP誘導受容体複合体は、ERK、JNK、またはp38を介してマイトゲン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路を活性化することができる(Kozawa O et al., *Journal*

of Cellular Biochemistry 84:583-589)。

【0192】

BMP受容体経路活性化：いくつかの態様において、BMPアゴニストは、ヒト肺前駆細胞を分化させるために本明細書において記述される方法と共に用いられる。1つの態様において、BMP受容体は、SMAD経路を通してシグナルを伝達する受容体（たとえば、ALK3）である。他の態様において、本明細書において記述される方法と共に用いられるBMPは、BMP2および/またはBMP4である。

【0193】

1つの態様において、多能性細胞の特定の分化段階を促進するために、1つまたは複数のBMPアゴニストが用いられる。そのような態様において、BMPシグナル伝達に対して特異的な活性化物質は、BMPポリペプチドまたはその活性断片、BMPポリペプチドまたはその活性断片を含む融合タンパク質、BMP受容体に対するアゴニスト抗体、またはBMP受容体の低分子アゴニストでありうる。

10

【0194】

いくつかの態様において、BMP4にとって有用な用量範囲は、1から500nM、たとえば1から400 nM、1から300 nM、1から200 nM、1から100 nM、1から50 nM、1から25 nM、1から10 nM、1から5 nM、1から2 nM、10から300 nM、15から250 nM、20から250 nM、20から200 nM、30から200 nM、40から200 nM、50から200 nM、60から200 nM、70から200 nM、80から200 nM、90から200 nM、100から200 nM、150から200 nM、150 nMから300 nM、175から300 nM、200 nMから300 nM、200 nMから400 nM、200 nMから500 nMである。

20

【0195】

いくつかの態様において、BMP4の用量は、たとえば少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 μM、少なくとも20 nM、少なくとも30 nM、少なくとも40 nM、少なくとも50 nM、少なくとも60 nM、少なくとも70 nM、少なくとも80 nM、少なくとも90 nM、少なくとも100 nM、少なくとも110 nM、少なくとも120 nM、少なくとも130 nM、少なくとも140 nM、少なくとも150 nM、少なくとも160 nM、少なくとも170 nM、少なくとも180 nM、少なくとも190 nM、少なくとも200 nM、少なくとも225 nM、少なくとも250 nM、少なくとも275 nM、少なくとも300 nM、少なくとも400 nM、少なくとも500 nMまたはそれより多い。

【0196】

いくつかの態様において、BMP7にとって有用な用量範囲は、1から200 ng/mL、たとえば1から100 ng/mL、1から50 ng/mL、1から25 ng/mL、1から10 ng/mL、1から5 ng/mL、1から2 ng/mL、10から200 ng/mL、15から200 ng/mL、20から200 ng/mL、30から200 ng/mL、40から200 ng/mL、50から200 ng/mL、60から200 ng/mL、70から200 ng/mL、80から200 ng/mL、90から200 ng/mL、100から200 ng/mL、または150から200 ng/mLである。

30

【0197】

いくつかの態様において、BMP7の用量は、たとえば少なくとも1 ng/mL、少なくとも2 ng/mL、少なくとも5 ng/mL、少なくとも10 ng/mL、少なくとも20 ng/mL、少なくとも30 ng/mL、少なくとも40 ng/mL、少なくとも50 ng/mL、少なくとも60 ng/mL、少なくとも70 ng/mL、少なくとも80 ng/mL、少なくとも90 ng/mL、少なくとも100 ng/mL、少なくとも110 ng/mL、少なくとも120 ng/mL、少なくとも130 ng/mL、少なくとも140 ng/mL、少なくとも150 ng/mL、少なくとも160 ng/mL、少なくとも170 ng/mL、少なくとも180 ng/mL、少なくとも190 ng/mL、少なくとも200 ng/mL、またはそれより多い。

40

【0198】

BMP受容体経路の阻害：いくつかの態様において、BMPアンタゴニストは、ヒト前腸内胚葉細胞を肺前駆細胞へと分化させるために本明細書において記述される方法と共に用いられる。1つの態様において、BMPアンタゴニストはドルソモルフィンである。

【0199】

1つの態様において、1つまたは複数のBMP受容体経路アンタゴニストは、多能性細胞の特定の分化段階を促進するために用いられる。そのような態様において、BMPシグナル伝

50

達に対して特異的な阻害剤は、ポリペプチドまたはその断片、BMP受容体に対するshRNAまたはsiRNA、BMP受容体に対するアンタゴニスト抗体、またはBMP受容体の低分子アンタゴニストでありうる。

【0200】

いくつかの態様において、BMP経路阻害剤にとって有用な用量範囲は、1から500 nM、たとえば1から400 nM、1から300 nM、1から200 nM、1から100 nM、1から50 nM、1から25 nM、1から10 nM、1から5 nM、1から2 nM、10から300 nM、15から250 nM、20から250 nM、20から200 nM、30から200 nM、40から200 nM、50から200 nM、60から200 nM、70から200 nM、80から200 nM、90から200 nM、100から200 nM、150から200 nM、150 nMから300 nM、175から300 nM、200 nMから300 nM、200 nMから400 nM、200 nMから500 nMである。

10

【0201】

いくつかの態様において、BMP経路アンタゴニストの用量は、たとえば少なくとも1 nM、少なくとも2 nM、少なくとも5 nM、少なくとも10 nM、少なくとも20 nM、少なくとも30 nM、少なくとも40 nM、少なくとも50 nM、少なくとも60 nM、少なくとも70 nM、少なくとも80 nM、少なくとも90 nM、少なくとも100 nM、少なくとも110 nM、少なくとも120 nM、少なくとも130 nM、少なくとも140 nM、少なくとも150 nM、少なくとも160 nM、少なくとも170 nM、少なくとも180 nM、少なくとも190 nM、少なくとも200 nM、少なくとも225 nM、少なくとも250 nM、少なくとも275 nM、少なくとも300 nM、少なくとも400 nM、少なくとも500 nMまたはそれより多い。

【0202】

MAPKK ERK阻害剤：本明細書において、MAPKK/ERK阻害剤による処置を含む、ヒト肺前駆細胞を、Nkx2.1+Sox2+近位複能性気道前駆細胞またはNkx2.1+Sox9+遠位複能性前駆細胞へと分化させる方法が提供される。

20

【0203】

マイトゲン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル伝達経路は、成長、分化、およびストレス応答などの細胞事象に関係している (J. Biol. Chem. (1993) 268, 14553-14556)。今日までに4つの類似のMAPK経路、すなわちERK1/ERK2、JNK、p38、およびERK5が同定されている。これらの経路は、MAPKKがMAPKKをリン酸化して活性化し、MAPKKがMAPKをリン酸化して活性化するという点において、線形のキナーゼカスケードである。今日までに、7つのMAPKK相同体 (MEK1、MEK2、MKK3、MKK4/SEK、MEK5、MKK6、およびMKK7)、および4つのMAPKファミリー (ERK1/2、JNK、p38、およびERK5) が同定されている。これらの経路の活性化は、リン酸化を通して多数の基質の活性を調節する。これらの基質は、TCF、c-myc、ATF2、およびAP-1成分、fosおよびJunなどの転写因子；細胞表面成分EGF-R；PHAS-T、p90^{ras}、cPLA₂およびc-Raf-1を含む細胞質成分；ならびにtauおよびMAP2などの細胞骨格成分を含みうる。MAPKシグナル伝達カスケードは、増殖、分化、アポトーシス、およびストレス応答を含む細胞プロセスの制御に関係している。

30

【0204】

MEKは、そのMAPK基質であるERK1およびERK2のリン酸化を触媒するMek/Erk経路において戦略的に下流の位置を占める。Anderson et al. Nature 1990, v.343, pp. 651-653。ERK経路において、MAPKKは、MEK (MAPキナーゼERKキナーゼ) に対応し、MAPKはERK (細胞外調節キナーゼ) に対応する。

40

【0205】

MAPKおよび/またはERK経路阻害剤のいくつかの非制限的な例は、SL327、U0126、SP600125、PD98059、SB203580、およびCAY10561を含む。本明細書において記述される方法と共に用いることができるさらなるMAPKおよび/またはERK経路阻害剤は、当業者に公知である。

【0206】

いくつかの態様において、MAPKK/ERKアンタゴニスト (たとえば、PD98059) にとって有用な用量範囲は、0.1から5 μM、たとえば、0.1から4 μM、0.1から3 μM、0.1から2 μM、0.1から1 μM、0.1から0.5 μM、0.5から3 μM、0.5から2 μM、0.5から1 μM、1から2 μM、1.5

50

から2 μ M、1から1.5 μ M、2から5 μ M、3から5 μ M、4から5 μ Mである。

【0207】

いくつかの態様において、MAPKK/ERKアンタゴニストの用量は、たとえば少なくとも0.1 μ M、少なくとも0.5 μ M、少なくとも1 μ M、少なくとも1.1 μ M、少なくとも1.2 μ M、少なくとも1.3 μ M、少なくとも1.4 μ M、少なくとも1.5 μ M、少なくとも1.6 μ M、少なくとも1.7 μ M、少なくとも1.8 μ M、少なくとも1.9 μ M、少なくとも2 μ M、少なくとも2.5 μ M、少なくとも3 μ M、少なくとも4 μ M、少なくとも5 μ Mまたはそれより多い。

【0208】

FGF活性化：線維芽細胞増殖因子、またはFGFは、血管新生、創傷治癒、および胚の発達において役割を果たす増殖因子ファミリーである。FGFおよびその機能的断片またはアナログは、本明細書において記述されるように、ヒト肺前駆細胞をたとえば近位複能性気道前駆細胞、遠位複能性肺前駆細胞、および複能性気道基底幹細胞へと分化させるために有用である。

10

【0209】

FGFは、細胞表面会合ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用して、FGFシグナル伝達を行うヘパリン結合タンパク質である。FGFファミリーの少なくとも22個の異なるメンバーが同定されている。FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、およびFGF10は、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) を通して結合してシグナル伝達を行う。

【0210】

FGFは、多様な細胞タイプにおいて有糸分裂を誘導して、同様に調節、形態学的、および内分泌効果を有する。FGFは、胚の発達を通して機能して、中胚葉の誘導、前方-後方パターン形成、脚発達、神経誘導、および神経発達を助ける。1つの態様において、本明細書において記述される方法と共に用いるために好ましいFGFは、FGF7であり、これはまたケラチノサイト増殖因子 (KGF) としても知られている。

20

【0211】

いくつかの態様において、FGF7またはFGF2にとって有用な用量範囲は、10から200 ng/mL、たとえば10から100 ng/mL、10から50 ng/mL、15から200 ng/mL、20から200 ng/mL、30から200 ng/mL、40から200 ng/mL、50から200 ng/mL、60から200 ng/mL、70から200 ng/mL、80から200 ng/mL、90から200 ng/mL、100から200 ng/mL、または150から200 ng/mLである。

30

【0212】

いくつかの態様において、FGF7またはFGF2の用量は、たとえば少なくとも10 ng/mL、少なくとも20 ng/mL、少なくとも30 ng/mL、少なくとも40 ng/mL、少なくとも50 ng/mL、少なくとも60 ng/mL、少なくとも70 ng/mL、少なくとも80 ng/mL、少なくとも90 ng/mL、少なくとも100 ng/mL、少なくとも110 ng/mL、少なくとも120 ng/mL、少なくとも130 ng/mL、少なくとも140 ng/mL、少なくとも150 ng/mL、少なくとも160 ng/mL、少なくとも170 ng/mL、少なくとも180 ng/mL、少なくとも190 ng/mL、少なくとも200 ng/mL、少なくとも225 ng/mL、少なくとも250 ng/mL、またはそれより多い。

【0213】

Wnt経路の調整：理論に拘束されたくはないが、Wntタンパク質およびその同源の受容体は、少なくとも2つの別個の細胞内経路を通してシグナルを伝達する。「基準の」Wntシグナル伝達経路 (本明細書においてWnt/ β -カテニン経路と呼ぶ) は、TCF関連タンパク質を通して転写を活性化するために β -カテニンを介してのWntシグナル伝達を伴う (van de Wetering et al. (2002) Cell 109 Suppl:S13-9; Moon et al. (2002) Science 296(5573): 1644-6)。Wntがタンパク質キナーゼC (PKC)、カルシウム/カルモジュリン依存的キナーゼII (CaMKII)、JNK、およびRho-GTPアーゼを活性化する基準ではない代替経路が存在し (Veeman et al. (2003) Dev Cell 5(3):367-77)、しばしば、細胞極性の制御に関係している。

40

【0214】

Wntアンタゴニスト：本明細書において、細胞にWntアンタゴニストを接触させることに

50

よって、ヒト肺前駆細胞を、より分化した幹細胞表現型、たとえばNkx2.1+Sox2+近位複能性気道前駆細胞またはNkx2.1+Sox9+遠位複能性肺前駆細胞、またはNkx2.1+p63+複能性気道基底幹細胞へと分化させるための方法が提供される。

【0215】

本明細書において用いられる「Wntアンタゴニスト」または「Wnt阻害剤」という用語は、Wnt/ β -カテニン経路を阻害する、またはWnt/ β -シグナル伝達の阻害剤の活性および/または発現を増強する任意の物質、たとえばGSK-3 活性の活性化剤または増強剤を意味する。本明細書において用いられるWnt阻害物質は、たとえばWntまたは β -カテニン、またはWnt依存的遺伝子および/またはタンパク質の発現および/または活性の減少、ならびにWntおよび/または β -カテニンの内因性の阻害剤の発現および/または活性の増加、またはWnt/ β -カテニン経路の成分の内因性の阻害剤の発現および/または活性の増加、たとえばGSK-3 の発現の増加により、しかしこれらに限定されないが、経路に沿って任意の点でWnt/ β -カテニン経路を抑制することができる。

10

【0216】

Wntアンタゴニストのいくつかの非制限的な例には、Wnt経路阻害剤V (E)-4-(2,6-ジフルオロスチリル)-N,N-ジメチルアニリンとしても知られる)、IWR-1 endo、IWP-2、CCT03 6477、および配列t-Boc-NH-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu-CO₂Hを含むペプチドが挙げられる。

【0217】

いくつかの態様において、Wntアンタゴニスト（たとえば、IWR-1）にとって有用な用量範囲は、20から200 ng/mL、30から200 ng/mL、40から200 ng/mL、50から200 ng/mL、60から200 ng/mL、70から200 ng/mL、80から200 ng/mL、90から200 ng/mL、100から200 ng/mL、または150から200 ng/mLである。

20

【0218】

いくつかの態様において、Wntアンタゴニストの用量は、たとえば少なくとも20 ng/mL、少なくとも30 ng/mL、少なくとも40 ng/mL、少なくとも50 ng/mL、少なくとも60 ng/mL、少なくとも70 ng/mL、少なくとも80 ng/mL、少なくとも90 ng/mL、少なくとも100 ng/mL、少なくとも110 ng/mL、少なくとも120 ng/mL、少なくとも130 ng/mL、少なくとも140 ng/mL、少なくとも150 ng/mL、少なくとも160 ng/mL、少なくとも170 ng/mL、少なくとも180 ng/mL、少なくとも190 ng/mL、少なくとも200 ng/mL、またはそれより多い。

30

【0219】

Wntアゴニスト：本明細書において、細胞にWntアゴニストを接触させることによって、ヒト前腸内胚葉細胞をより分化した細胞タイプ、たとえば、Nkx2.1+Tuj陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させる方法が提供される。

【0220】

本明細書において用いられる「Wntアゴニスト」という用語は、Wnt/ β -カテニン経路を活性化する、またはWnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤の活性および/または発現を阻害する任意の物質、たとえばGSK-3 活性のアンタゴニストまたは阻害剤を意味する。本明細書において用いられるWnt活性化物質は、たとえばWntまたは β -カテニン、またはWnt依存的遺伝子および/またはタンパク質の発現および/または活性の増加、ならびにWntおよび/または β -カテニンの内因性の阻害剤の発現および/または活性の減少、またはWnt/ β -カテニン経路の成分の内因性の阻害剤の発現および/または活性の減少、たとえばGSK-3 の発現の減少により、しかしこれらに限定されないが、経路に沿った任意の時点で、Wnt/ β -カテニン経路を通してシグナル伝達を増強することができる。

40

【0221】

Wnt経路アゴニストのいくつかの非制限的な例には、CHIR9902、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、BIO、(2'Z,3'E)-6-プロモインジルピン-3'-オキシム、5-(フラン-2-イル)-N-(3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル)-1,2-オキサゾール-3-カルボキサミド、およびSKL2001が挙げられる。

【0222】

50

いくつかの態様において、Wntアゴニスト（たとえば、CHIR9902）にとって有用な用量範囲は、20から200 ng/mL、30から200 ng/mL、40から200 ng/mL、50から200 ng/mL、60から200 ng/mL、70から200 ng/mL、80から200 ng/mL、90から200 ng/mL、100から200 ng/mL、または150から200 ng/mLである。

【0223】

いくつかの態様において、Wntアゴニストの用量は、たとえば少なくとも20 ng/mL、少なくとも30 ng/mL、少なくとも40 ng/mL、少なくとも50 ng/mL、少なくとも60 ng/mL、少なくとも70 ng/mL、少なくとも80 ng/mL、少なくとも90 ng/mL、少なくとも100 ng/mL、少なくとも110 ng/mL、少なくとも120 ng/mL、少なくとも130 ng/mL、少なくとも140 ng/mL、少なくとも150 ng/mL、少なくとも160 ng/mL、少なくとも170 ng/mL、少なくとも180 ng/mL、少なくとも190 ng/mL、少なくとも200 ng/mL、またはそれより多い。

10

【0224】

いくつかの態様において、Wntアゴニスト（たとえば、CHIR9902）にとって有用な用量範囲は、0.1から5 μ M、たとえば0.1から4 μ M、0.1から3 μ M、0.1から2 μ M、0.1から1 μ M、0.1から0.5 μ M、0.5から3 μ M、0.5から2 μ M、0.5から1 μ M、1から2 μ M、1.5から2 μ M、1から1.5 μ M、2から5 μ M、3から5 μ M、4から5 μ Mである。

【0225】

いくつかの態様において、Wntアゴニスト（たとえば、CHIR9902）の用量は、たとえば少なくとも0.1 μ M、少なくとも0.5 μ M、少なくとも1 μ M、少なくとも1.1 μ M、少なくとも1.2 μ M、少なくとも1.3 μ M、少なくとも1.4 μ M、少なくとも1.5 μ M、少なくとも1.6 μ M、少なくとも1.7 μ M、少なくとも1.8 μ M、少なくとも1.9 μ M、少なくとも2 μ M、少なくとも2.5 μ M、少なくとも3 μ M、少なくとも4 μ M、少なくとも5 μ M、またはそれより多い。

20

【0226】

PI3キナーゼ阻害剤：ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）は、イノシトール環の3-ヒドロキシル残基で脂質をリン酸化する脂質キナーゼである（Whitman et al (1988) *Nature*, 332:664）。PI3キナーゼによって生成された3-リン酸化リン脂質（PIP3）は、Aktおよびホスホイノシチド依存的キナーゼ1（PDK1）などの、脂質結合ドメイン（plekstrin homology (PH) 領域を含む）を有するキナーゼを動員する二次伝達物質として作用する。膜PIP3にAktが結合すると、Aktの細胞質膜への移動が起こり、AktはPDK1と接触して、これがAkt活性化の原因となる。腫瘍抑制性ホスファターゼであるPTENは、PIP3を脱リン酸化して、それゆえAkt活性化の負の調節因子として作用する。PI3キナーゼAktおよびPDK1は、細胞周期の調節、増殖、生存、アポトーシス、および移動性を含む多くの細胞プロセスの調節において重要であり、癌、糖尿病、および免疫の炎症などの疾患の分子機序の有意な成分である（Vivanco et al (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:489; Phillips et al (1998) *Cancer* 83:41）。

30

【0227】

本明細書において用いられるように、「PI3キナーゼ阻害剤」または「PI3キナーゼアンタゴニスト」という用語は、PI3キナーゼの活性を阻害する任意の物質を意味する。本明細書において記述される方法によって有用であるPI3キナーゼ阻害剤のいくつかの非制限的な例には、LY294002、ワートマニン、PIK-75、ZSTK474、およびPp242が挙げられる。

40

【0228】

いくつかの態様において、PI3キナーゼ阻害剤（たとえば、ZSTK474、またはPIK-75）にとって有用な用量範囲は、0.1から5 μ M、たとえば0.1から4 μ M、0.1から3 μ M、0.1から2 μ M、0.1から1 μ M、0.1から0.5 μ M、0.5から3 μ M、0.5から2 μ M、0.5から1 μ M、1から2 μ M、1.5から2 μ M、1から1.5 μ M、2から5 μ M、3から5 μ M、4から5 μ Mである。

【0229】

いくつかの態様において、PI3キナーゼ阻害剤（たとえば、ZSTK474、またはPIK-75）の用量は、たとえば少なくとも0.1 μ M、少なくとも0.5 μ M、少なくとも1 μ M、少なくとも1.1 μ M、少なくとも1.2 μ M、少なくとも1.3 μ M、少なくとも1.4 μ M、少なくとも1.5 μ M、少なくとも1.6 μ M、少なくとも1.7 μ M、少なくとも1.8 μ M、少なくとも1.9 μ M、少なくとも

50

2 μ M、少なくとも2.5 μ M、少なくとも3 μ M、少なくとも4 μ M、少なくとも5 μ M、またはそれより多い。

【0230】

ヒト肺前駆細胞の分化のモニタリング

本明細書において、多能性幹細胞（たとえば、前方前腸内胚葉細胞、胚体内胚葉細胞、ES細胞、またはiPSC）を、ヒト肺前駆細胞へと分化または再分化させて、任意でそのようなヒト肺前駆細胞を基底細胞、クララ細胞、繊毛細胞、および/または杯細胞などの肺気道細胞へとさらに分化させる方法が提供される。これらの局面は、多能性幹細胞を、肺および/または気道系列に拘束される幹細胞または前駆細胞へと分化させる方法を新たに発見したことに基づいている。そのような方法は、本明細書における実施例の章に例示される。同様に、本明細書において、肺細胞特異的である1つまたは複数の細胞表面マーカーまたは他のマーカーの存在などの、特定の特徴を有するヒト肺前駆細胞の組成物が提供される。またはもしくは加えて、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞組成物は、胚幹細胞または人工多能性幹細胞のマーカーを欠如する。本明細書において記述される方法の1つの態様において、胚幹細胞またはiPSCから完全分化肺細胞へのスペクトルに沿った分化の程度を決定するために、1つまたは複数の細胞表面マーカーが用いられる。

10

【0231】

細胞表面マーカー、特に幹細胞表面マーカーは、細胞の分化または脱分化状態を同定するために、本明細書において記述される方法および組成物によって有用である。たとえば、体細胞の人工多能性幹細胞へのリプログラミングの際に、幹細胞マーカーの活性化を用いて、体細胞が（部分的または完全に）脱分化していることを確認することができる。または、ES細胞またはiPSCのヒト肺前駆細胞への分化の際に、肺特異的マーカーの活性化を用いて、幹細胞が受けている分化の程度を確認することができる。加えて、特定の肺特異的マーカーの活性化または非活性化を用いて、ヒト肺前駆細胞の複能性の程度を決定することができる。これは、細胞上に存在するまたは細胞によって発現される肺特異的マーカーを、発達の際の肺細胞のマーカープロファイルと比較して、胚発達の際の対応する肺細胞の公知の程度の複能性に基づいて、分化細胞の複能性の程度を推定することによって行われうる。

20

【0232】

マーカー特異的物質、例として所望の幹細胞上の細胞表面マーカーまたは抗原を認識してこれに結合する標識抗体を用いて、幹細胞マーカーを認識することができる。所定のマーカーまたはマーカーの組に対して特異的な抗体または類似の物質を用いて、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、パニング法、磁気粒子選択、粒子ソーター選択、ならびに密度分離（Xu et al. (2002) *Circ. Res.* 91 :501; 米国特許出願第20030022367号）および他の物理的特性に基づく分離（Doevendans et al. (2000) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:839-851）を含む当業者に公知の他の方法を用いて、所望の幹細胞を分離および単離することができる。

30

【0233】

または、前駆細胞または幹細胞を、組織特異的プロモーターおよび/または特異的遺伝子プロモーターに機能的に連結されたレポータータンパク質を発現するように遺伝子操作することができる場合には、遺伝子選択法を用いることができ、それゆえ、所望の幹細胞を単離および濃縮するための陽性選択法の場合にはレポーターの発現を用いることができる。たとえば、マーカータンパク質を所望の幹細胞において活性であるプロモーターに機能的に連結させるために、遺伝子操作法によって蛍光レポータータンパク質を所望の幹細胞において発現させることができる（Klug et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98:216-224; 米国特許第6,737,054号）。いくつかの態様において、ヒト肺前駆細胞が誘導される元となる細胞は、遺伝的手段を用いて修飾されない。陽性選択のための他のアプローチは、例としてKlugら、前記によって記述される、密度勾配遠心分離による所望の細胞の濃縮を伴う薬物選択を含む。陰性選択は、望ましくないマーカーまたは特徴、たとえば線維芽細胞マーカー、上皮細胞マーカー等を有する細胞を選択して除去することによって行うことが

40

50

できる。

【0234】

未分化ES細胞は、未分化細胞の存在を検出するためのマーカーとして用いることができる遺伝子を発現する。そのような遺伝子のポリペプチド産物を、陰性選択のマーカーとして用いることができる。たとえば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2003/0224411 AI号；Bhattacharya (2004) Blood 103(8):2956-64;およびThomson (1998)、前記を参照されたい。ヒトES細胞株は、ステージ特異的胚抗原 (SSEA) -3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、およびアルカリホスファターゼを含むがこれらに限定されるわけではない、未分化非ヒト霊長類ESおよびヒトEC細胞を特徴付けする細胞表面マーカーを発現する。SSEA-4エピトープを有するグロボ系糖脂質GL7は、SSEA-3エピトープを有するグロボ系糖脂質Gb5にシアル酸を付加することによって形成される。このように、GL7は、SSEA-3とSSEA-4の両方に対する抗体に反応する。未分化ヒトES細胞株は、SSEA-1に関して染色されないが、分化細胞は、SSEA-1に対して強い染色を示す。未分化型のhES細胞を増殖させる方法は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、WO 99/20741、WO 01/51616、およびWO 03/020920に記述される。

10

【0235】

肺前駆細胞上に発現される例示的な細胞表面マーカーには、Sox2、Sox9、p63、FoxP2、ETV4/5、FoxA2、Nkx2.1、Gata6、ID2、CK5、NGFR、FoxJ1、CCSP、Scgb3a2、Muc5ac、T1a、Spc、およびScgnが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。そのような細胞表面マーカーの組み合わせを有する特定の細胞組成物を、本明細書において実施例の章に例示する。

20

【0236】

いくつかの態様において、ヒト肺前駆細胞は、濃縮細胞集団である；すなわち、細胞集団におけるヒト肺前駆細胞の百分率（たとえば、細胞の百分率）は、集団における細胞総数の少なくとも10%である。たとえば、濃縮集団は、少なくとも15%のヒト肺前駆細胞を含み、集団の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%さえもがヒト肺前駆細胞を含む。いくつかの態様において、細胞集団は、細胞少なくとも100個、少なくとも500個、少なくとも1000個、少なくとも 1×10^4 個、少なくとも 1×10^5 個、少なくとも 1×10^6 個、少なくとも 1×10^7 個、少なくとも 1×10^8 個、少なくとも 1×10^9 個、少なくとも 1×10^{10} 個、少なくとも 1×10^{11} 個、少なくとも 1×10^{12} 個、少なくとも 1×10^{13} 個、少なくとも 1×10^{14} 個、少なくとも 1×10^{15} 個、またはそれより多くの細胞を含む。

30

【0237】

1つの態様において、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞は、腫瘍細胞または癌細胞ではない。そのような態様において、ヒト肺前駆細胞は、たとえば細胞マーカープロファイルを用いて、腫瘍細胞または癌細胞とは区別される。

【0238】

足場組成物

生物学的適合性の合成、天然、ならびに半合成ポリマーを、足場材料として用いることができるポリマー粒子を合成するために用いることができる。一般的に、本明細書において記述される方法の実践に関して、足場は、肺前駆細胞を、植え込み前にポリマーから単離することができるよう、または足場が対象において経時的に分解して除去の必要がないように、生分解性である。このように1つの態様において、足場は、ヒト肺前駆細胞が成長するための、および/またはそれを必要とする対象に送達するための一時的構造を提供する。いくつかの態様において、足場によって、ヒト肺前駆細胞は、それを必要とする対象に移植または投与するために適した形状で成長することができ、それによって植え込み前に足場を除去することが可能となり、足場そのものによって開始される拒絶またはアレルギー反応のリスクを減少させることができる。

40

【0239】

50

用いることができるポリマーの例には、天然および合成ポリマーが挙げられるが、再現性および徐放性速度論の点から、合成ポリマーが好ましい。用いることができる合成ポリマーは、ポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、および他のポリヒドロキシ酸、ポリ(カプロラクトン)、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリアンヒドリド、ポリホスファゼン、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリシアノアクリレート、および生分解性のポリウレタンなどの生分解性のポリマー；ポリアクリル酸、エチレン-酢酸ビニルポリマー、および他のアシル置換酢酸セルロースおよびその誘導体などの非生分解性のポリマー；ポリウレタン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニル、ポリ(ビニルイミダゾール)、クロロスルホン化ポリオレフィン、およびポリエチレンオキサイドを含む。生分解性の天然ポリマーの例には、アルブミン、コラーゲン、フィブリン、シルク、合成ポリアミノ酸、およびプロタミンなどのタンパク質；アルジネート、ヘパリンなどの多糖類；ならびに他の天然に存在する生分解性の糖単位のポリマーが挙げられる。または、上記のポリマーの組み合わせを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0240】

PLA、PGA、およびPLA/PGAコポリマーは、生分解性の足場を形成するために特に有用である。PLAポリマーは、通常、乳酸の環状エステルから調製される。L(+)型およびD(-)型乳酸の両方、ならびにD(-)およびL(+)乳酸の光学的に不活性なDL-乳酸混合物を用いて、PLAポリマーを調製することができる。ポリ乳酸を調製する方法は、特許文献に十分に報告されている。その教示が参照により本明細書に組み入れられる以下の米国特許は、適したポリ乳酸、その特性およびその調製を詳細に記述している：Doroughに対する米国特許第1,995,970号；Schneiderに対する米国特許第2,703,316号；Salzbergに対する米国特許第2,758,987号；Zeileに対する米国特許第2,951,828号；Higginsに対する米国特許第2,676,945号；およびTrehuに対する米国特許第2,683,136号；第3,531,561号。

【0241】

PGAは、グリコール酸(ヒドロキシ酢酸)のホモポリマーである。グリコール酸のポリ(グリコール酸)への変換において、グリコール酸は、最初に自身と反応して環状エステルグリコリドを形成し、次に、熱および触媒の存在下で高分子量の直鎖ポリマーへと変換される。PGAポリマーおよびその特性は、Cyanamid Research Develops World's First Synthetic Absorbable Suture", Chemistry and Industry, 905 (1970)においてより詳細に記述されている。

【0242】

繊維は、融解紡糸、押し出し、鋳造、またはポリマー加工領域において周知の他の技術によって形成されうる。好ましい溶媒は、植え込み前に足場を除去するために用いる場合、加工によって完全に除去されるか、または加工後に残っている量で生物学的適合性である溶媒である。

【0243】

マトリクスにおいて用いられるポリマーは、細胞がその後に成長および増殖するために適切な支持体を提供するために必要な力学的および生化学的パラメータを満たすべきである。ポリマーを、Instronテスターを用いて引張力などの力学的特性に関して、ゲル透過クロマトグラフィー(GPC)によってポリマーの分子量に関して、示差走査熱量測定(DSC)によってガラス転移温度に関して、および赤外線(IR)分光法によって結合構造に関して特徴付けすることができる。

【0244】

足場は、任意の所望の形状の足場でありえて、本明細書において記述される方法にとって有用である広範囲の幾何学的構造を含みうる。形状の非制限的なリストは、たとえば、中でも中空粒子、チューブ、シート、円柱、球、および繊維を含む。足場の形状またはサイズは、細胞の成長、細胞分化、細胞増殖、または他の任意の細胞プロセスを実質的に妨害してはならず、または足場は、たとえばアポトーシスもしくは壊死によって細胞死を誘導してはならない。加えて、足場の形状は、細胞の生存率が損なわれないように、集団中

の細胞に周辺の培地からの栄養が送達されるために適切な表面積が確実に得られるように注意すべきである。足場の多孔性はまた、当業者の希望に応じて変化させることができる。

【0245】

いくつかの態様において、ポリマーに対する細胞の接着は、基底膜成分、寒天、アガロース、ゼラチン、アラビアゴム、I型、II型、III型、IV型、およびV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、ポリビニルアルコール、その混合物、ならびに細胞培養または組織工学の当業者に公知の他の親水性材料およびペプチド接着材料などの化合物によってポリマーをコーティングすることによって増強される。ポリマー足場をコーティングする材料の例には、ポリビニルアルコールおよびコラーゲンが挙げられる。

10

【0246】

いくつかの態様において、足場は、脱細胞肺組織を含みうる。脱細胞肺組織を産生する方法は、当技術分野において公知であり、たとえばWO2011/005306を参照されたい。簡単に説明すると、脱細胞プロセスは、肺組織からその細胞を化学的に剥離して、細胞の破片を除去し、細胞外マトリクス構造を残す段階を伴う。次に、細胞外マトリクスに、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞を、任意で他の生物活性物質と共に再生着させることができる。そのような脱細胞足場は、対象自身の肺の一部から調製することができ、それゆえ、再生着させて投与した足場に応答した拒絶またはアレルギー反応のリスクを最小にすることができる。

20

【0247】

いくつかの態様において、足場に生物活性分子を添加することが望ましくなりうる。多様な生物活性分子を、本明細書において記述されるマトリクスを用いて送達することができる。これらは、一般的に本明細書において「因子」または「生物活性因子」と呼ばれる。

【0248】

1つの態様において、生物活性因子は、増殖因子を含む。増殖因子の例には、血小板誘導増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 または (TGF)、骨形態形成タンパク質4 (BMP4)、線維芽細胞増殖因子7 (FGF7)、線維芽細胞増殖因子10 (FGF10)、上皮細胞増殖因子 (EGF/TGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) が挙げられるが、それらのいくつかはまた血管新生因子でもある。

30

【0249】

これらの因子は、当業者に公知であり、市販されているか、または文献に記述されている。生物活性分子を、マトリクスに組み入れて、マトリクスの拡散および/または分解によって経時的に放出することができるか、またはそれらを細胞浮遊液と共に懸濁させることができる。

【0250】

肺疾患 / 障害および肺損傷の処置

本明細書において提供される方法および組成物は、ヒト肺前駆細胞の作製および使用に関する。したがって、本明細書において、それを必要とする対象における肺損傷または肺疾患もしくは肺障害を処置および予防する方法が提供される。本明細書において記述される方法は、肺または気道の構造に対する病的損傷および/または肺胞の損傷が起こる疾患などの、多数の肺疾患またはその症状を処置、改善、予防、または遅らせるために用いることができる。「呼吸器障害」、「呼吸器疾患」、「肺疾患」、「肺障害」、「肺 (pulmonary) 疾患」および「肺 (pulmonary) 障害」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、肺、胸腔、気管支、気管、上気道、気道、または気道系の他の成分もしくは構造を含む、呼吸器および/または呼吸器系に関連する任意の状態および/または障害を意味する。

40

【0251】

そのような肺疾患は、気管支肺胞形成異常 (BPD)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、嚢胞

50

性線維症、気管支拡張、肺性心、肺炎、肺膿瘍、急性気管支炎、慢性気管支炎、気腫、肺臓炎（たとえば、過敏性肺臓炎または放射線の曝露に関連する肺臓炎）、肺胞肺疾患、および間質性肺疾患、環境性肺疾患（たとえば、アスベスト、燻煙、またはガスの曝露に関連する）、嚥下性肺炎、肺出血症候群、アミロイドーシス、結合組織病、全身性硬化症、強直性脊椎炎、肺アクチノミセス症、肺胞タンパク症、肺炭疽、肺浮腫、肺塞栓、肺の炎症、肺ヒスチオサイトーシスX、肺高血圧症、サーファクタント欠乏、肺形成不全、肺新生物、肺ノカルジア症、肺結核、肺静脈閉塞疾患、リウマチ性肺疾患、サルコイドーシス、肺切除後、ヴェーゲナー肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫症、肉芽腫性脈管炎、好酸球増加症、喘息および気道の過敏症（AHR）（たとえば、軽度間欠性喘息、軽度持続性喘息、中等度持続性喘息、重度持続性喘息、急性喘息、慢性喘息、アトピー性喘息、アレルギー性喘息、または特異体質性喘息）、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、慢性静脈洞炎、腓不全、肺または血管の炎症、細菌またはウイルス感染症、たとえば、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）感染症もしくは呼吸器多核体ウイルス（RSV）感染症、またはグレードI、II、III、もしくはIV RDSなどの急性もしくは慢性の成人もしくは小児呼吸窮迫症候群（RDS）、またはたとえば敗血症、肺炎、再灌流、無気肺、もしくは胸部外傷に関連するRDSを含むがこれらに限定されるわけではない。

10

【0252】

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、上気道、中気道、細気管支、または肺実質に気流の閉塞が存在する疾患を含み、気管狭窄、気管右室肥大性肺高血圧症、多発性軟骨炎、気管支拡張、細気管支炎、たとえば特発性細気管支炎、繊毛ジスキネジア、喘息、肺気腫、結合組織病、慢性気管支炎または肺移植の細気管支炎として出現しうる、またはそれらに関連しうる。

20

【0253】

本明細書において記述される方法はまた、気道上皮損傷、気道平滑筋痙縮、または気道過敏症、気道粘膜浮腫、粘液分泌増加、過度のT細胞活性化、または落屑、無気肺、肺性心、気胸、皮下気腫、呼吸困難、咳、喘鳴、息切れ、頻呼吸、疲労、最初の1秒間の努力呼気量（FEV₁）の減少、動脈低酸素症、呼吸性アシドーシス、IL-4、IL-5、IgE、ヒスタミン、サブスタンスP、ニューロキニンA、カルシトニン遺伝子関連ペプチドまたはトロンボキサンもしくはロイコトリエン（LTD₄またはLTC₄）などのアラキドン酸代謝物などのメディエータの望ましくない上昇レベル、およびたとえば好酸球、リンパ球、マクロファージまたは顆粒球による気道壁細胞浸潤を含む炎症を含む、急性または慢性の肺疾患/障害、またはその症状または合併症を処置または改善するために用いることができる。

30

【0254】

これらおよび他の呼吸器または肺の状態または症状のいずれも当技術分野において公知である。たとえば、The Merck Manual, 17th edition, M. H. Beers and R. Berkow editors, 1999, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N.J., ISBN 0911910-10-7、または本明細書において引用される他の参考文献を参照されたい。

【0255】

本明細書において用いられる、「投与する」、「導入する」、および「移植する」という用語は、細胞、たとえば本明細書において記述される肺前駆細胞を、所望の効果が得られるように、損傷部位または修復部位などの所望の部位で、導入した細胞の少なくとも部分的局在が得られる方法または経路によって対象に留置するという文脈において互換的に用いられる。細胞、たとえば肺前駆細胞またはその分化子孫（たとえば、気道前駆細胞、基底細胞、クララ細胞、繊毛細胞または杯細胞）は、呼吸気道に直接植え込まれるか、または植え込まれた細胞もしくは細胞成分の少なくとも一部が生存したままである対象における所望の位置への送達を得られる任意の適切な経路によって投与される。対象に投与後の細胞の生存期間は、数時間、たとえば24時間もの短時間から数日、数年もの長期間、すなわち長期間の生着でありうる。たとえば、本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、肺前駆細胞の有効量を、気管支肺形成異常を有する幼児の肺に気管

40

50

内投与によって直接投与する。他の態様において、肺前駆細胞は、腹腔内または静脈内経路などの間接的全身投与経路によって投与されうる。

【0256】

予防的に提供される場合、本明細書において記述される肺前駆細胞を、肺障害の任意の症状、たとえば喘息発作が起こる前の対象に、または未熟児に投与することができる。したがって、肺前駆細胞集団の予防的投与は、本明細書において開示される肺障害を予防するために役立つ。

【0257】

治療的に提供される場合、肺前駆細胞は、肺障害の症状または指標の発生時（または発生後）に、たとえばCOPDの発症時に提供される。

10

【0258】

本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本明細書において記述される方法に従って投与される肺前駆細胞集団は、1例または複数例のドナーから得た同種異系肺前駆細胞を含む。本明細書において用いられる「同種異系」とは、1つまたは複数の座の遺伝子が同一ではない、同じ種の1例または複数例の異なるドナーから得られた肺前駆細胞または肺前駆細胞を含む生物試料を意味する。たとえば、対象に投与される肺前駆細胞集団は、1例もしくは複数例の無関係なドナー対象から得られた、または1例もしくは複数例の非同系兄弟から得られた臍帯血から誘導することができる。いくつかの態様において、遺伝的に同一の動物から得られた細胞または遺伝的に同一の双子から得られた細胞などの、同系の肺前駆細胞集団を用いることができる。この局面の他の態様において、肺前駆細胞は自己細胞である。すなわち肺前駆細胞は対象から得られまたは単離され、同じ対象に投与され、すなわちドナーとレシピエントは同一である。

20

【0259】

処置される疾患/障害または損傷に応じて、ならびに肺損傷の位置に応じて、未分化ヒト肺前駆細胞またはその分化細胞のいずれかを対象に投与することができる。

【0260】

薬学的に許容される担体

本明細書において記述される、対象にヒト肺前駆細胞を投与する方法は、肺前駆細胞を含む治療組成物を用いることを伴う。治療組成物は、細胞組成物と共に生理的に許容される担体を含み、および任意で、活性成分としてその中に溶解または分散される、本明細書において記述される少なくとも1つの追加の生物活性物質を含む。好ましい態様において、治療組成物は、治療目的で哺乳動物またはヒト患者に投与した場合に、それが望ましい場合を除き、実質的に免疫原性ではない。本明細書において用いられる、「薬学的に許容される」、「生理的に認容される」、およびその文法的变化形は、それらが組成物、担体、希釈剤および試薬を意味する場合、互換的に用いられ、悪心、めまい、胃のむかつき、移植片拒絶、アレルギー反応およびその他などの望ましくない生理的効果を生じることなく、材料を哺乳動物に投与できることを表す。薬学的に許容される担体は、それが望ましい場合を除き、混合される物質に対する免疫応答の発生を促進しない。その中に溶解または分散される活性成分を含む組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されており、処方に基づいて制限される必要はない。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかの注射剤として調製されるが、使用前に液体中での溶液または懸濁液となるように適した固体剤形も同様に調製することができる。

30

40

【0261】

一般的に、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞は、薬学的に許容される担体と共に懸濁液として投与される。当業者は、細胞組成物において用いられる薬学的に許容される担体が、対象に送達される細胞の生存率を実質的に妨害する量の緩衝剤、化合物、凍結保護剤、保存剤、または他の物質を含まないことを認識するであろう。細胞を含む製剤は、たとえば細胞膜の完全性を維持することができる浸透圧緩衝剤、および任意で投与時の細胞の生存率を維持するまたは生着を増強するための栄養を含みうる。そのような製剤および懸濁剤は、当業者に公知であるか、および/またはルーチンの実験を用いて本明細

50

書において記述されるヒト肺前駆細胞と共に用いるために適合させることができる。

【0262】

細胞組成物はまた、乳化技法が細胞の生存率に有害に影響を及ぼさない限り、乳化されうる、またはリポソーム組成物として提示されうる。細胞および他の任意の活性成分を、薬学的に許容されて活性成分と適合性である賦形剤と、本明細書において記述される治療法において用いるために適した量で混合することができる。

【0263】

本明細書において記述される細胞組成物に含まれる追加の物質は、その中に成分の薬学的に許容される塩を含みうる。薬学的に許容される塩は、たとえば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸およびその他などの有機酸、によって形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離のアミノ基によって形成される）を含む。遊離のカルボキシル基によって形成される塩もまた、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン、およびその他などの有機塩基から誘導することができる。生理的に認容される担体は当技術分野において周知である。例示的な液体担体は、活性成分および水のほかに材料を含まない、または生理的pH値のリン酸ナトリウム、生理食塩水、もしくはリン酸緩衝生理食塩液などのその両方の液などの緩衝液を含む滅菌水溶液である。なおさらに、水性担体は、1つより多くの緩衝塩ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどの塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、およびその他の溶質を含みうる。液体組成物はまた、水に加えておよび水を除外して液相を含みうる。そのような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油、および水-油乳剤である。特定の障害または状態を処置するために有効である、本明細書において記述される細胞組成物において用いられる活性化化合物の量は、障害または状態の性質に依存して、標準的な臨床技術によって決定されうる。

【0264】

投与および効能

本明細書において、ヒト肺前駆細胞またはその分化子孫を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、肺疾患、肺障害、または肺損傷を処置する方法が提供される。

【0265】

測定されるまたは測定可能なパラメータは、疾患の臨床的に検出可能なマーカー、たとえば臨床または生物学的マーカーの上昇したまたは抑制されたレベル、ならびに疾患または障害の症状またはマーカーの臨床的に容認される尺度に関連するパラメータを含む。しかし、本明細書において開示される組成物および製剤の総1日量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されると理解される。必要な正確な量は、処置される疾患のタイプなどの要因に応じて変化する。

【0266】

本明細書において用いられる「有効量」という用語は、肺損傷または肺疾患もしくは肺障害の少なくとも1つまたは複数の症状を軽減するために必要なヒト肺前駆細胞集団またはその子孫の量を意味し、所望の効果を提供するための、たとえば喫煙によって誘発される損傷または嚢胞性線維症を有する対象を処置するための組成物の十分量に関連する。それゆえ、「治療的有效量」という用語は、肺疾患または肺障害を有する、またはそれらのリスクを有する対象などの、典型的な対象に投与した場合に、特定の効果を促進するために十分であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞を含む組成物の量を意味する。本明細書において用いられる有効量はまた、疾患の症状の発生を防止するまたは遅らせる、疾患の症状の経過を変化させる（たとえば、疾患の症状の進行を遅らせるがこれらに限定されるわけではない）、または疾患の症状を逆転させるために十分な量を含むであろう。いかなる所定の場合に関しても、当業者は、適切な「有効量」を、ルーチンの実験を用いて決定することができるという理解される。

【0267】

いくつかの態様において、対象は最初に、本明細書において記述される方法に従って細

10

20

30

40

50

胞を投与する前に、肺組織に影響を及ぼす疾患または障害を有すると診断される。いくつかの態様において、対象は最初に、細胞を投与する前に肺疾患もしくは肺障害を有する、または肺疾患もしくは肺障害を発症するリスクを有すると診断される。たとえば、未熟児は、肺疾患または肺障害を発症する有意なリスクを有しうる。

【0268】

本明細書において記述される様々な局面において用いるために、ヒト肺前駆細胞の有効量は、肺前駆細胞少なくとも 10^2 個、肺前駆細胞少なくとも 5×10^2 個、肺前駆細胞少なくとも 10^3 個、肺前駆細胞少なくとも 5×10^3 個、肺前駆細胞少なくとも 10^4 個、肺前駆細胞少なくとも 5×10^4 個、肺前駆細胞少なくとも 10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 2×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 3×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 4×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 5×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 6×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 7×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 8×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 9×10^5 個、肺前駆細胞少なくとも 1×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 2×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 3×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 4×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 5×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 6×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 7×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 8×10^6 個、肺前駆細胞少なくとも 9×10^6 個、またはその倍数を含む。肺前駆細胞は、1例もしくは複数例のドナーから誘導されうるか、または自己起源から得られうる。本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、肺前駆細胞を、それを必要とする対象に投与する前に、培養において増殖させる。

10

【0269】

本明細書において記述される方法において用いるための例示的な投与様式には、注射、肺内（鼻内および気管内を含む）注入、エアロゾルとしての吸入（鼻内を含む）、および植え込み（足場材料を有するまたは有しない）が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。「注射」は、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、腹腔内、経気管、および皮下を含むがこれらに限定されるわけではない。本明細書において用いられる「非経口投与」および「非経口投与される」という句は、腸管および表面投与以外の投与様式、通常、注射による投与様式を意味し、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、皮内、経気管、および皮下投与を含むがこれらに限定されるわけではない。

20

【0270】

いくつかの態様において、肺前駆細胞の治療的有効量は、鼻内または気管内経路などの肺内投与を用いて投与される。これらの方法のいくつかの局面において、肺前駆細胞の治療的有効量は、腹腔内または静脈内経路などの全身投与を用いて投与される。これらの方法の他の局面において、肺前駆細胞の治療的有効量は、肺内および腹腔内投与の両方を用いて投与される。これらの方法は、肺疾患もしくは肺障害を有する、または肺疾患もしくは肺障害を有するリスクを有するヒト対象の治療的または予防的処置を特に意図している。本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞は、対象において有効な処置が得られる任意の適切な経路によって、任意の肺疾患または肺障害を有する対象に投与されうる。本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、細胞の投与前に、肺障害を有する対象が最初に選択される。

30

【0271】

いくつかの態様において、肺前駆細胞の有効量は、肺内投与または送達によって対象に投与される。本明細書において定義される「肺内」投与または送達は、Nkx2.1+Sox2+肺前駆細胞などの肺前駆細胞集団が、経気管、気管内、および鼻内投与を含むがこれらに限定されるわけではない、対象の気道とこれらの細胞との直接接触が起こる方法で投与される、全ての投与経路を意味する。いくつかのそのような態様において、細胞は、鼻腔または気管に注射される。いくつかの態様において、細胞は、対象によって直接吸入される。いくつかの態様において、細胞の肺内送達は、細胞が、たとえば細胞浮遊液として、気管に留置されたチューブまたは「気管挿管」を介して、挿管された対象に投与される投与方法を含む。

40

【0272】

本明細書において用いられる「気管挿管」とは、プラスチックチューブなどの柔軟なチ

50

ューブを気管内に留置することを意味する。最も一般的な気管挿管は、本明細書において「経口気管内挿管」と呼ばれ、喉頭鏡の助けを借りて、気管内チューブを、口、咽頭、および声帯の中を、気管まで通す方法である。次に、チューブをその場に固定するのを助けるために、ならびに気道を、血液、吐物、および分泌物から保護するために、チューブの遠位末端近傍で球を膨らませる。いくつかの態様において、細胞は、チューブを鼻、咽頭、声帯、および気管の中に通す気管挿管として定義される「経鼻気管内挿管」を有する対象に投与される。

【0273】

いくつかの態様において、肺前駆細胞の有効量は、静脈内投与などの全身投与によって対象に投与される。

10

【0274】

本明細書において用いられる「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」および「末梢に投与される」という句は、細胞が対象の循環系に入り、このように、代謝および他の類似のプロセスを受けるように、肺前駆細胞集団を標的部位、組織、または肺などの器官への直接投与以外で投与することを意味する。

【0275】

本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、明確な効果を達成するために、1つまたは複数の投与経路が対象において用いられる。たとえば、肺上皮を処置または修復するために、および肺血管を修復および再生するためにそれぞれ、肺前駆細胞を気管内投与経路と腹腔内投与経路の両方によって対象に投与することができる。そのような態様において、単離または濃縮肺前駆細胞の異なる有効量を、各投与経路のために用いることができる。

20

【0276】

エアロゾル投与を用いる場合、ネブライザー装置は、特定の組成物を投薬するために適した製剤を必要とする。製剤の選択は、用いられる特異的組成物および投与される肺前駆細胞数に依存し、そのような製剤は、当業者によって調節される。しかし、例として、組成物が薬学的に許容される担体中の肺前駆細胞である場合、組成物は、溶液1 mLあたり細胞の有効濃度で、適切な緩衝液（たとえば、食塩水緩衝液）中での細胞の浮遊液でありうる。製剤はまた、細胞の生存を維持するために、細胞の栄養、単純な糖（たとえば、浸透圧を調節するため）または他の成分を含みうる。

30

【0277】

典型的に、ネブライザーによるエアロゾル送達のための各製剤は、用いられる装置のタイプに対して特異的であり、治療において有用な、通常の希釈剤、アジュバントおよび/または担体に加えて、適切な推進材料を用いることを伴いうる。

【0278】

いくつかの態様において、対象の処置において補助となる追加の物質を、本明細書において記述される肺前駆細胞による処置の前または後に投与することができる。そのような追加の物質は、前駆細胞を投与するための肺組織を準備するために用いることができる。または、投与された細胞の損傷した肺での生着および成長を支持するために、追加の物質を肺前駆細胞の後に投与することができる。そのような追加の物質は、一般的に、界面活性剤の助けを借りて推進剤に懸濁されるタンパク質または低分子を含む微粉を含む、定用量インヘラー装置と共に用いるために処方される。推進剤は、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および1,1,1,2-テトラフルオロエタン、またはその組み合わせを含む、クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、またはハイドロカーボンなどの、この目的のために使用される任意の通常の方法でありうる。適した界面活性剤は、トリオレイン酸ソルビタンおよび大豆レシチンを含む。オレイン酸もまた界面活性剤として有用でありうる。

40

【0279】

粉末インヘラー装置から投薬するための製剤は、タンパク質または低分子を含む微粉乾

50

燥粉末を含み、同様にラクトース、ソルビトール、スクロース、またはマンニトールなどの増量剤を、装置からの粉末の分散を促進する量で、たとえば製剤の50から90重量%の量で含みうる。タンパク質物質は、都合よくは、遠位肺に最も有効に送達されるためには、10 μm (またはミクロン) 未満、最も好ましくは0.5から5 μm の平均粒子径を有する微粒子型で調製すべきである。

【0280】

肺前駆細胞またはその子孫に加えてタンパク質または他の物質の鼻送達も同様に企図される。鼻送達によって、肺に産物を沈着させる必要なく、治療産物を鼻に投与した後にタンパク質または他の物質が血流に直接入る。鼻送達のための製剤は、デキストランまたはシクロデキストランを有する製剤を含む。

10

【0281】

処置の効能は、当業者の臨床医によって決定されうる。しかし、肺疾患、肺損傷、および/または肺障害の症状、または他の臨床的に認められる症状もしくはマーカーのいずれか1つもしくは全てが、本明細書において記述されるヒト肺前駆細胞を含む組成物による処置後に、たとえば少なくとも10%減少すれば、処置は、この用語が本明細書において用いられる「有効な処置」であると見なされる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であるか、および/または本明細書において記述される。

【0282】

肺疾患または肺障害または肺損傷の指標は、機能的指標、たとえば肺容量および肺機能の測定、および酸素飽和 (たとえば、組織酸素飽和または全身動脈酸素飽和) ならびに生化学的指標を含む。

20

【0283】

特発性肺線維症に関して、たとえば、症状の改善は、処置前の値と比較して予想努力肺活量 (FVC) の少なくとも10%の増加を含む。FVCは、十分に吸気した後に排出された空気の全体積である。閉塞性肺疾患を有する患者は通常、正常またはごくわずかに減少した肺活量を有する。拘束性肺疾患を有する患者は減少した肺活量を有する。

【0284】

もう1つの測定は、FEV1 (1秒間の努力肺活量) である。これは最大呼気努力の際の最初の1秒間に排出された空気の体積である。FEV1は閉塞性および拘束性肺疾患の両方において減少する。FEV1は、閉塞性肺疾患では気道抵抗が増加するために減少する。FEV1は、拘束性肺疾患では肺活量が低いために減少する。

30

【0285】

関連する測定は、FEV1/FVCである。これは、最大呼気の最初の1秒間に排出される肺活量の百分率である。健康な患者では、FEV1/FVCは、通常約70%である。閉塞性肺疾患患者では、FEV1/FVCは減少して、重度の閉塞性気道疾患では20~30%もの低い値となりうる。拘束性障害はほぼ正常なFEV1/FVCを有する。

【0286】

必要であれば、または望ましければ、肺損傷または肺疾患の動物モデルを用いて、本明細書において記述される特定の組成物の有効性を測定することができる。一例として、急性肺損傷 (ALI) のプレオマイシン誘発肺損傷モデルを用いることができる。肺機能に関する動物モデルは、他のエンドポイントの中でも、気管支収縮、アレルギー反応、吸入アレルギーに応答した遅延型気道過敏反応をモニターするために有用であり、たとえばヘッドアウトプレスチモグラフィまたはボディプレスチモグラフィモデル (たとえば, Hoymann, HG et al., J Pharmacol Toxicol Methods (2007) 55(1): 16-26を参照されたい) を含みうる。アレルギー性喘息 (たとえば、急性および慢性アレルギー性喘息) モデルを含む喘息の例示的な動物モデルが、当技術分野において公知である。たとえば Nials and Uddin. (2008) Dis Model Mech 1:213-220; Zosky and Sly (2007) Clin Exp Allergy 37(7):973-88; and Kumar and Foster. (2002) Am J Respir Cell Mol Biol 27(3):267-72を参照されたい。肺炎の動物モデルは、Mizgerd and Skerrett (2008) Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L387-L398によって論評されている。さらに、小動物イメージ

40

50

ングを肺の病理生理学に応用することができる (Brown RH, et al., Proc Am Thorac Soc (2008) 5:591-600)。

【0287】

スクリーニングアッセイ

本明細書において記述される組成物は、ヒト肺前駆細胞の分化を誘導するための、または肺疾患もしくは肺障害を処置するための物質をスクリーニングするために有用である。

【0288】

いくつかの態様において、単離ヒト肺前駆細胞またはそのようなヒト肺前駆細胞から誘導される単離ヒト疾患特異的肺細胞を、特異的インビトロアッセイを開発するための方法、アッセイ、システム、およびキットにおいて用いることができる。薬物スクリーニングおよび毒性試験に関するそのようなアッセイは、それらがヒト起源の細胞であり、細胞株の不死化を必要とせず、正常なヒト細胞の生理学をあまり反映しない死体からの組織を必要としないことから、既存のアッセイに対して利点を有する。たとえば、本明細書において記述される方法、アッセイ、システム、およびキットを用いて、肺系列に沿って分化を促進することができる物質を同定および/または試験することができる。加えてもしくはまたは、方法、アッセイ、システム、およびキットは、肺疾患もしくは肺障害を処置するため、または肺損傷を予防/処置するために有用である物質を同定および/または試験するために用いられる。

【0289】

したがって、本明細書において、(a)本明細書において記述される単離ヒト肺前駆細胞またはその子孫に、試験化合物を接触させる段階、および(b)細胞に及ぼす化合物のいかなる効果も決定する段階、を含む、生物活性に関して試験化合物をスクリーニングする方法が提供される。1つの態様において、スクリーニング法はさらに、本明細書において開示されるヒト肺前駆細胞またはヒト肺疾患特異的細胞を作製する段階を含む。1つの態様において、肺前駆細胞を最初に、所望の肺細胞表現型へと分化させる。細胞に及ぼす効果は、レポーター分子を用いることによって直接または間接的に観察可能である効果でありうる。

【0290】

本明細書において用いられる、「生物学的活性」または「生物活性」という用語は、生物試料に影響を及ぼす試験化合物の能力を意味する。生物学的活性は、生物学的アッセイにおける刺激、阻害、調節、毒性、または致死応答の誘発を含みうるがこれらに限定されるわけではない。たとえば、生物学的活性は、化合物が、酵素の効果を調整する能力、受容体を遮断する能力、受容体を刺激する能力、1つまたは複数の遺伝子の発現レベルを調整する能力、細胞増殖を調整する能力、細胞分裂を調整する能力、細胞代謝を調整する能力、分化を調整する能力、細胞形態学を調整する能力、またはその組み合わせを意味しうる。いくつかの例において、生物学的活性は、生物試料において毒性効果を生じる試験化合物の能力を意味しうる。

【0291】

先に考察したように、特異的系列は、疾患(たとえば、肺疾患)の表現型および/または遺伝子型である系列でありうる。または、特異的系列は、器官および/または組織、またはその一部(たとえば、肺)の表現型および/または遺伝子型である系列でありうる。

【0292】

本明細書において用いられる、「試験化合物」または「候補物質」という用語は、細胞に効果を及ぼすことができるか否かに関してスクリーニングされる物質または物質のコレクション(たとえば、化合物)を意味する。試験化合物は、化学化合物、化学化合物の混合物、たとえば多糖類、低分子有機または無機分子(たとえば、分子量2000ダルトン未満、1000ダルトン未満、1500ダルトン未満、1000ダルトン未満、または500ダルトン未満を有する分子)、生体高分子、たとえばペプチド、タンパク質、ペプチドアナログ、ならびにそのアナログおよび誘導體、ペプチド模倣体、核酸、核酸アナログおよび誘導體、細菌、植物、真菌、または動物の細胞または組織などの生物学的材料から作製された抽出物、

10

20

30

40

50

天然に存在するまたは合成組成物を含む、広く多様な異なる化合物を含みうる。

【0293】

実践される特定の態様に依じて、試験化合物は、溶液中で遊離で提供されうるか、または担体もしくは固相支持体、たとえばビーズに結合させることができる。多数の適した固相支持体を、試験化合物を固定するために使用することができる。適した固相支持体の例には、アガロース、セルロース、デキストラン（すなわち、Sephadex、Sepharoseとして市販される）、カルボキシメチルセルロース、ポリスチレン、ポリエチレングリコール（PEG）、濾紙、ニトロセルロース、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、ポリアミンメチルビニルエーテルマレイン酸コポリマー、ガラスビーズ、アミノ酸コポリマー、エチレン-マレイン酸コポリマー、ナイロン、シルク等が挙げられる。加えて、本明細書にお

10

【0294】

多数の低分子ライブラリが当技術分野において公知であり、市販されている。これらの低分子ライブラリを、本明細書において記述されるスクリーニング法を用いてスクリーニングすることができる。化学ライブラリまたは化合物ライブラリは、特定の効果に関して候補物質をスクリーニングするために、本明細書において記述される方法と共に用いることができる保存された化学物質のコレクションである。化学ライブラリは、各化合物の化学構造、純度、量、および物理化学特徴に関する情報を含む。化合物ライブラリは、中でも、たとえばEnzo Life Sciences（商標）、Aurora Fine Chemicals（商標）、Exclusive Chemistry Ltd.（商標）、ChemDiv、ChemBridge（商標）、TimTec Inc.（商標）、AsisChem（商標）、およびPrinceton Biomolecular Research（商標）から購入することによって得ることができる。

20

【0295】

化合物は、適切な期間のあいだ、対照と比較して細胞に対して効果を発揮することができる任意の濃度で試験されうるが、このことに限定されるわけではない。いくつかの態様において、化合物は、約0.01 nMから約100 mM、約0.1 nMから約500 μM、約0.1 μMから約20 μM、約0.1 μMから約10 μM、または約0.1 μMから約5 μMの範囲の濃度で試験される。

30

【0296】

化合物スクリーニングアッセイは、ハイスループットスクリーニングにおいて用いられうる。ハイスループットスクリーニングは、所定の活性に関して化合物のライブラリを試験するプロセスである。ハイスループットスクリーニングは、多数の化合物を迅速かつ同時にスクリーニングすることを追求する。たとえば、マイクロタイタープレートおよび自動アッセイ機器を用いて、1つの研究所が、1日に100,000個もの多くのアッセイを同時に行うことができる。

【0297】

本明細書において記述される化合物スクリーニングアッセイは、細胞またはレポーター機能の1つより多くの測定（たとえば、1つより多くのパラメータの測定および/またはアッセイの過程において多数の時点で1つまたは複数のパラメータの測定）を伴いうる。多数回測定することによって、試験化合物とのインキュベーション期間にわたって生物活性を追跡することができる。1つの態様において、レポーター機能は、異なるインキュベーション期間で試験化合物の効果をモニターできるように複数の時点で測定される。

40

【0298】

スクリーニングアッセイの後に、同定された試験化合物が意図される使用にとって望ましい特性を有するか否かをさらに同定するアッセイを引き続き行うことができる。たとえば、スクリーニングアッセイの後に、生物学的利用率、毒性、または薬物動態のいずれかの測定からなる群より選択される第二のアッセイを行うことができるが、これらの方法に

50

限定されるわけではない。

【0299】

キット

本明細書において記述される技術のもう1つの局面は、肺疾患または肺障害を処置するためのキット、候補物質をスクリーニングするためのキットおよび/またはヒト幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させるためのまたはヒト肺前駆細胞を特定のタイプまたは複数のタイプのヒト肺細胞へと分化させるためのキットに関する。本明細書において記述されるキットの1つまたは複数に含めることができるキットの成分を、本明細書において記述する。

【0300】

1つの態様において、本明細書において記述されるキットは、その用語が本明細書において用いられるヒト肺前駆細胞を含みうる。1つの態様において、幹細胞の分化を促進する1つまたは複数のシグナル伝達経路アゴニストまたはアンタゴニストがキットに含まれる。もう1つの態様において、1つまたは複数のTGF- 受容体阻害剤、1つまたは複数のBMPアゴニスト、1つまたは複数のFGFアゴニスト、およびたとえば本明細書において記述される方法を用いて、幹細胞（たとえば、胚幹細胞、単離多能性幹細胞、前方前腸内胚葉細胞、または胚体内胚葉細胞）をヒト肺前駆細胞へと変換するための説明書などの本明細書において記述される成分がキットに含まれる。

【0301】

本明細書において開示される技術のもう1つの局面は、本明細書において開示される方法に従ってヒト肺前駆細胞を産生するためのキットに関する。いくつかの態様において、本明細書において記述される成分は、1つの成分として、またはキットとして任意の組み合わせで提供されうる。キットは、本明細書において記述される成分、たとえば本明細書において記述される化合物、たとえばヒト幹細胞を肺前駆細胞へと分化させるための化合物、または化合物もしくは試薬のカクテルを含む組成物を含む。そのようなキットは任意で、肺前駆細胞マーカーまたは肺細胞マーカーまたはその組を検出することができる1つまたは複数の物質を含みうる。加えて、キットは、任意で情報材料を含む。

【0302】

いくつかの態様において、キット中の化合物は、いくつかの態様において、キットの他の成分を実質的に含まない耐水容器または気密容器で提供されうる。たとえば、シグナル伝達経路または分化経路調整化合物は、1つより多くの容器で供給され、たとえば既定数の分化反応に関して十分な試薬を有する容器たとえば1、2、3個またはそれより多くの容器で供給されうる。本明細書において記述される1つまたは複数の容器は任意の剤形で、たとえば液体、乾燥、または凍結乾燥型で提供されうる。本明細書において記述される化合物は、実質的に純粋および/または無菌的であることが好ましい。本明細書において記述される1つまたは複数のシグナル伝達経路調整化合物が液体溶液で提供される場合、液体溶液は好ましくは水溶液であり、滅菌水溶液が好ましい。本明細書において記述される化合物が乾燥型で提供される場合、一般的に適した溶媒の添加によって再構成が行われる。溶媒、たとえば滅菌水または緩衝液は任意でキットに提供されうる。

【0303】

情報材料は、本明細書において記述される方法および/または本明細書において記述される方法に関する本明細書において記述される化合物の使用に関連する説明、指示、販売、または他の材料でありうる。キットの情報材料は、その形状に限定されない。1つの態様において、情報材料は、化合物の産生、化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは製造場所の情報等々に関する情報を含みうる。1つの態様において、情報材料は、化合物を用いるまたは投与する方法に関する。

【0304】

1つの態様において、情報材料は、肺損傷または肺疾患もしくは肺障害の処置を行うために適した様式で、たとえば適した用量、投与剤形、または投与様式（たとえば、本明細書において記述される用量、投与剤形、または投与様式）で本明細書において記述される

10

20

30

40

50

ヒト肺前駆細胞を投与するための説明書を含みうる。もう1つの態様において、情報材料は、ヒト胚幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させるための説明書を含みうる。または、情報材料は、肺疾患または肺障害を処置する候補物質をスクリーニングするための説明書を含みうる。

【0305】

本明細書において記述される化合物のほかに、キットの組成物は、溶媒または緩衝液、安定化剤、保存剤、および/または、たとえば幹細胞を分化させるための（たとえばインビトロで）または本明細書において記述される状態もしくは障害を処置するための追加の物質などの他の成分を含みうる。または、本明細書において記述される細胞またはシグナル伝達経路もしくは分化経路調整化合物とは異なる他の成分をキットに含めることができるが、異なる組成物または容器に含めることができる。そのような態様において、キットは、本明細書において記述される化合物および他の成分を混合するための説明書、または本明細書において記述される化合物を他の成分と共に用いるための説明書、たとえば使用もしくは投与前に2つの物質を混合するための説明書を含みうる。

【0306】

キットは、ヒト肺前駆細胞、ES細胞、iPS細胞、甲状腺系列細胞、神経系列細胞等のマーカーを検出するための成分を含みうる。さらに、キットは、細胞マーカーに結合する1つもしくは複数の抗体、またはRT-PCRもしくはPCR反応、たとえば半定量的もしくは定量的RT-PCRもしくはPCR反応のためのプライマーを含みうる。そのような成分は、肺細胞特異的マーカーの活性化、またはES細胞、iPSC、甲状腺系列もしくは神経系列マーカーの喪失を評価するために用いることができる。検出試薬が抗体である場合、抗体は乾燥調製物で、たとえば凍結乾燥されて、または溶液中で供給されうる。抗体または他の検出試薬は、検出に用いるための標識、たとえば放射標識、蛍光標識（たとえば、GFP）または比色標識に連結させることができる。検出試薬がプライマーである場合、これは、乾燥調製物、たとえば凍結乾燥されて、または溶液中で供給されうる。

【0307】

キットはまた、HDAC阻害剤（たとえば、バルプロ酸）またはDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（たとえば5アザC）などの、人工多能性幹細胞の産生効率を増強するための1つまたは複数の試薬を含みうる。

【0308】

1つの態様において、キットは、胚体内胚葉作製のための細胞または組織培地を含む。1つの態様において、培地は、B27、アクチビンAおよびZSTK474を含む。例示的な胚体内胚葉作製培地は、2%B27、20 ng/mLアクチビンA、および0.2~0.5 μM ZSTK474を含む。

【0309】

キットは典型的に、1つのパッケージ、たとえばファイバー素材の、たとえば厚紙の、またはポリマー、たとえばスタイロフォームボックスに含まれるその様々な要素と共に提供される。封入は、内部と外部の温度差を維持するように構成され、たとえばこれは予め選択された期間、予め選択された温度で試薬を維持するための絶縁特性を提供しうる。

【0310】

本発明は、以下の番号をつけたパラグラフのいずれか1つにおいて定義されるとおりでありうる。

1. 単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞。
2. Tuj1陰性およびPax8陰性である、パラグラフ1に記載の単離細胞。
3. 増殖性であり、選択された分化条件で、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞、または扁平上皮細胞へと分化する、パラグラフ1に記載の単離細胞。
4. 単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞。
5. FoxP2陽性および/またはID2陽性である、パラグラフ4に記載の単離細胞。
6. 増殖性であり、選択された分化条件に置かれると任意の上皮肺細胞へと分化する、パラグラフ4に記載の単離細胞。
7. 選択された分化条件に置かれると、気道基底幹細胞、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン

10

20

30

40

50

分泌杯細胞、I型肺胞細胞、II型肺胞細胞、扁平上皮細胞、気管支肺胞幹細胞、気管支肺胞管接合部幹細胞、遊走性CK14+細胞、または神経内分泌細胞へと分化する、パラグラフ6に記載の単離細胞。

8. 単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞。

9. 増殖性であり、選択された分化条件に置かれると、繊毛細胞、クララ細胞、ムチン分泌杯細胞、または基底細胞へと分化する、パラグラフ8に記載の単離細胞。

10. 複能性気道基底幹細胞が、クララ細胞マーカー、繊毛細胞マーカー、神経内分泌細胞マーカー、または扁平細胞マーカーを発現しない、パラグラフ8に記載の単離細胞。

11. Sox2陽性である、パラグラフ8に記載の単離細胞。

12. CK5陽性および/またはNGFR陽性である、パラグラフ8に記載の単離細胞。

10

13. 疾患特異的細胞である、パラグラフ1、5、または8に記載の単離細胞。

14. 単離ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞と足場とを含む組成物。

15. 足場が対象に植え込み可能である、パラグラフ14に記載の組成物。

16. 組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、パラグラフ14に記載の組成物。

17. 足場が生分解性である、パラグラフ14に記載の組成物。

18. 足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、パラグラフ14に記載の組成物。

19. 天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、パラグラフ18に記載の組成物。

20

20. 合成繊維が、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ(D,L-ラクチド-コグリコリド)(PLGA)、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシシラ酸)、ポリブチレンテレフタレート(PBT)、ポリヒドロキシヘキサ酸(PHH)、ポリブチレンコハク酸(PBS)、およびポリ(ヒドロキシシラ酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、パラグラフ19に記載の組成物。

21. 近位気道複能性前駆細胞がTuj1陰性および/またはPax8陰性である、パラグラフ14に記載の組成物。

22. 単離ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞と足場とを含む組成物。

30

23. 複能性肺前駆細胞がFoxP2陽性および/またはID2陽性である、パラグラフ22に記載の組成物。

24. 足場が対象に植え込み可能である、パラグラフ22に記載の組成物。

25. 組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、パラグラフ22に記載の組成物。

26. 足場が生分解性である、パラグラフ22に記載の組成物。

27. 足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺、またはその組み合わせを含む、パラグラフ22に記載の組成物。

28. 天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、パラグラフ27に記載の組成物。

40

29. 合成繊維が、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ(D,L-ラクチド-コグリコリド)(PLGA)、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシシラ酸)、ポリブチレンテレフタレート(PBT)、ポリヒドロキシヘキサ酸(PHH)、ポリブチレンコハク酸(PBS)、およびポリ(ヒドロキシシラ酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、パラグラフ28に記載の組成物。

30. 単離ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞と足場とを含む組成物。

31. 気道基底幹細胞がCK5陽性および/またはNGFR陽性である、パラグラフ30に記載の組成物。

50

32. 足場が対象に植え込み可能である、パラグラフ30に記載の組成物。
33. 組成物が植え込まれる対象に対して細胞が自家性である、パラグラフ32に記載の組成物。
34. 足場が生分解性である、パラグラフ30に記載の組成物。
35. 足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、パラグラフ30に記載の組成物。
36. 天然繊維が、コラーゲン、フィブリン、シルク、トロンピン、キトサン、キチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、およびゼラチンからなる群より選択される、パラグラフ35に記載の組成物。
37. 合成繊維が、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA)、ポリ(カプロラクトン)、ジオール/二酸型脂肪族ポリエステル、ポリエステル-アミド/ポリエステル-ウレタン、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ヒドロキシシル酪酸)、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ポリヒドロキシヘキサ酸 (PHH)、ポリブチレンコハク酸 (PBS)、およびポリ(ヒドロキシシル吉草酸)などの、代表的な生分解性の脂肪族ポリエステルからなる群より選択される、パラグラフ36に記載の組成物。
38. 細胞が疾患特異的細胞である、パラグラフ14、22、または30に記載の組成物。
39. ヒト前腸内胚葉細胞に、FGF2、WNT、およびBMP4を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法。
40. 接触させる段階が少なくとも2日間行われる、パラグラフ39に記載の方法。
41. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、パラグラフ39に記載の方法。
42. WntアンタゴニストがIWR-1を含む、パラグラフ41に記載の方法。
43. MAPKK/ERKアンタゴニストがPD98059を含む、パラグラフ41に記載の方法。
44. 接触させる段階が少なくとも4日間行われる、パラグラフ41に記載の方法。
45. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、パラグラフ41に記載の方法。
46. WntアンタゴニストがIWR-1を含む、パラグラフ45に記載の方法。
47. MAPKK/ERKアンタゴニストがPD98059を含む、パラグラフ45に記載の方法。
48. 接触させる段階が少なくとも4日間行われる、パラグラフ45に記載の方法。
49. 前腸内胚葉細胞の培養が、胚幹 (ES) 細胞または人工多能性幹細胞 (iPSC) から誘導される、パラグラフ39に記載の方法。
50. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階をさらに含む、パラグラフ39に記載の方法。
51. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞の培養にNogginを接触させる段階をさらに含む、パラグラフ39に記載の方法。
52. 接触させる段階が少なくとも10日間行われる、パラグラフ50に記載の方法。
53. 単離ヒト肺前駆細胞と薬学的に許容される担体とを含む組成物を、肺疾患もしくは肺障害または肺損傷を有する対象に投与する段階を含む、対象における肺疾患もしくは肺障害または肺損傷を処置する方法。
54. 単離ヒト肺前駆細胞が、Nkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、Nkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、Nkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞、またはその分化細胞からなる群より選択される、パラグラフ53に記載の方法。

55. 近位気道複能性前駆細胞がTuj1陰性および/またはPax8陰性である、パラグラフ53に記載の方法。
56. 遠位複能性肺前駆細胞がFoxP2および/またはID2陽性である、パラグラフ53に記載の方法。
57. 気道基底幹細胞がCK5陽性および/またはNGFR陽性である、パラグラフ53に記載の方法。
58. 組成物が肺に投与される、パラグラフ53に記載の方法。
59. 単離ヒト肺前駆細胞が、組成物が投与される対象に対して自家性である、パラグラフ53に記載の方法。
60. 組成物が足場をさらに含む、パラグラフ53に記載の方法。 10
61. 足場が対象に植え込み可能である、パラグラフ60に記載の方法。
62. 足場が生分解性である、パラグラフ60に記載の方法。
63. 足場が、天然繊維、合成繊維、脱細胞肺組織、またはその組み合わせを含む、パラグラフ60に記載の方法。
64. 足場が、単離ヒト肺前駆細胞の分化を促進する物質を含む、パラグラフ60に記載の方法。
65. 組成物が、エアロゾル送達のために処方される、パラグラフ60に記載の方法。
66. (a) 肺疾患または肺障害を処置するための候補物質の存在下および非存在下で、ヒト疾患特異的肺前駆細胞のインビトロ分化によって産生されたヒト疾患特異的気道細胞集団を培養する段階、 20
- (b) 候補物質の存在下および非存在下で、疾患においてアップレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階、または疾患においてダウンレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階であって、少なくとも1つのアップレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも1つのダウンレギュレートされる疾患マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象における肺疾患または肺障害を処置するための候補として候補物質が同定される、段階
- を含む、肺疾患または肺障害を処置するための物質をスクリーニングする方法。
67. 段階(a)の前に、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞集団をヒト疾患特異的気道細胞の培養へと分化させる段階をさらに含む、パラグラフ66に記載の方法。 30
68. 段階(a)の前に、肺疾患または肺障害を有する対象から誘導される人工多能性幹細胞集団を、単離ヒト疾患特異的肺前駆細胞集団へと分化させる段階をさらに含む、パラグラフ66に記載の方法。
69. 候補物質が、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、または核酸を含む、パラグラフ66に記載の方法。
70. ヒト肺前駆細胞が、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される、パラグラフ66に記載の方法。
71. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞が作製される、パラグラフ70に記載の方法。 40
72. 接触させる段階が少なくとも4日間行われる、パラグラフ71に記載の方法。
73. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞が作製される、パラグラフ70に記載の方法。

74. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む、パラグラフ73に記載の方法。
75. 接触させる段階が少なくとも10日間行われる、パラグラフ73に記載の方法。
76. (a) 候補分化物質の存在下および非存在下でNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒト肺前駆細胞を培養する段階、
- (b) 候補物質の存在下および非存在下で、肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にアップレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階、または肺前駆細胞のより分化した状態への分化の際にダウンレギュレートされる少なくとも1つのマーカーの発現もしくは活性を比較する段階であって、少なくとも1つのアップレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が減少すれば、または少なくとも1つのダウンレギュレートされる分化マーカーの発現もしくは活性が増加すれば、対象における単離ヒト肺前駆細胞の分化を誘導するために候補物質を用いることができることが示される、段階
- を含む、ヒト肺前駆細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングする方法。
77. 段階(a)の前に、胚幹細胞または人工多能性幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させる段階をさらに含む、パラグラフ76に記載の方法。
78. 候補物質が、低分子、タンパク質、ポリペプチド、抗体、または核酸を含む、パラグラフ76に記載の方法。
79. ヒト肺前駆細胞が、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞、ヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞、およびヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞からなる群より選択される、パラグラフ76に記載の方法。
80. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性ヒト肺前駆細胞に、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、およびMAPKK/ERKアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性Sox9陽性近位気道複能性前駆細胞またはNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性Sox2陽性近位気道複能性前駆細胞およびヒトNkx2.1陽性Sox9陽性遠位複能性肺前駆細胞が作製される、パラグラフ79に記載の方法。
81. 接触させる段階が少なくとも4日間行われる、パラグラフ80に記載の方法。
82. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞に、B27、BMP7、FGF7、およびWNTアンタゴニストを、各々がNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞をNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む方法によって、ヒトNkx2.1陽性p63陽性複能性気道基底幹細胞が作製される、パラグラフ79に記載の方法。
83. Nkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性細胞にNogginを接触させる段階をさらに含む、パラグラフ82に記載の方法。
84. 接触させる段階が少なくとも10日間行われる、パラグラフ82に記載の方法。
85. パラグラフ1、5、または9に記載の細胞、薬学的に許容される担体、および肺疾患または肺障害を処置するための説明書を含む、肺疾患または肺障害を処置するためのキット。
86. 足場をさらに含む、パラグラフ85に記載のキット。
87. パラグラフ1、5、または8に記載の細胞、肺特異的細胞表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質、およびその説明書を含む、候補物質をスクリーニングするためのキット。
88. 細胞培養培地、増殖因子、および/または分化物質をさらに含む、パラグラフ87に記載のキット。
89. (i) 任意で単位用量で提供される、BMP4、FGF2、WNT、BMP7、FGF7、WNTアンタゴニスト、PI3キナーゼ阻害剤、アクチビンA、Noggin、B27、およびレチノイン酸の2つまたはそれより多く；
- (ii) 任意で、細胞培養培地；
- (iii) 肺細胞特異的の表面マーカーを検出するための1つまたは複数の物質；および

10

20

30

40

50

(iii) その説明書

を含む、ヒト幹細胞をヒト肺前駆細胞へと分化させるためのキット。

90. B27、アクチビンA、およびZSTK474を含む、細胞または組織培地。

91. B27の濃度が1%~5%である、パラグラフ90に記載の培地。

92. B27の濃度が2%である、パラグラフ91に記載の培地。

93. アクチビンAの濃度が10~40 ng/mLである、パラグラフ90に記載の培地。

94. アクチビンAの濃度が20 ng/mLである、パラグラフ93に記載の培地。

95. ZSTK474の濃度が0.2~0.5 μ Mである、パラグラフ90に記載の培地。

96. RPMI培地の成分を含む、パラグラフ90に記載の培地。

97. CHIR9902、PIK-75、ドルソモルフィン、およびFGF2を含む、細胞または組織培地。 10

99. CHIR9902の濃度が0.1~1 μ Mの範囲である、パラグラフ97に記載の培地。

100. PIK-75の濃度が0.01~0.1 μ Mを含む、パラグラフ97に記載の培地。

101. ドルソモルフィンの濃度が1~5 μ Mを含む、パラグラフ97に記載の培地。

102. FGF2の濃度が10~100 ng/mLを含む、パラグラフ97に記載の培地。

103. GF-109203X、Ro31-8220、Pp242、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物をさらに含む、パラグラフ97に記載の培地。

104. ヒト前腸内胚葉細胞に、Wntアゴニスト、PIK3キナーゼ阻害剤、BMPアンタゴニスト、ならびにGF-109203X、Ro31-8220、Pp242、PIK-75、ZSTK474、PMA、カルベジロール、コルチコステロン、トリクラベンダゾール、リン酸ベンプロペリン、フェノチアジン、およびメトトレキサートからなる群より選択される薬物を、各々がヒト前腸内胚葉細胞をNkx2.1陽性Tuj1陰性Pax8陰性肺前駆細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、Nkx2.1陽性、Tuj1陰性、およびPax8陰性であるヒト肺前駆細胞またはヒト肺前駆細胞集団を作製する方法。 20

105. 接触させる段階が少なくとも2日間行われる、パラグラフ104に記載の方法。

106. WntアゴニストがCHIR9902を含む、パラグラフ104に記載の方法。

107. CHIR9902の濃度が0.1~1 μ Mの範囲である、パラグラフ106に記載の方法。

108. PI3キナーゼ阻害剤がPIK-75を含む、パラグラフ104に記載の方法。

109. PIK-75の濃度が0.01~0.1 μ Mを含む、パラグラフ108に記載の方法。 30

110. BMPアンタゴニストがドルソモルフィンを含む、パラグラフ104に記載の方法。

111. ドルソモルフィンの濃度が1~5 μ Mを含む、パラグラフ110に記載の方法。

112. 増殖因子がFGF2を含む、パラグラフ104に記載の方法。

113. FGF2の濃度が10~100 ng/mLを含む、パラグラフ112に記載の方法。

114. iPSCまたはESCに、B27、アクチビンA、およびZSTK474を、各々がiPSCまたはESCを胚体内胚葉細胞へと分化させるために十分な期間および濃度で接触させる段階を含む、胚体内胚葉細胞または胚体内胚葉細胞集団を作製する方法。

115. 胚体内胚葉細胞の作製が、FOXA2/SOX17共染色によってか、またはcKit/CXCR4および/もしくはcKit/EpCAMの組み合わせによるFACS分析によって決定される、パラグラフ114に記載の方法。 40

116. B27の濃度が1%~5%である、パラグラフ114に記載の方法。

117. B27の濃度が2%である、パラグラフ116に記載の方法。

118. アクチビンAの濃度が10~40 ng/mLである、パラグラフ114に記載の方法。

119. アクチビンAの濃度が20 ng/mLである、パラグラフ118に記載の方法。

120. ZSTK474の濃度が0.2~0.5 μ Mである、パラグラフ114に記載の方法。

【実施例】

【0311】

胚幹細胞(ES)細胞および人工多能性幹細胞(iPSC)の発見によって、ヒト疾患のモデリング、薬物スクリーニング、および患者特異的治療において用いることができる組織特異的細胞タイプを産生するという前例のない機会が与えられている。肺疾患を有する患者 50

から多くのiPSCが現在産生されているが、これらの細胞を用いてヒト肺疾患モデルを実際
に開発する際の妨げとなる主要な障害は、それらを肺前駆細胞へと変換することができず
、そのためその後に治療的処置のために分化肺上皮細胞タイプへと変換できないこと、ま
たは研究室においてその特徴を調べることができないことである。マウスおよびヒトES細
胞から肺上皮細胞を産生するいくつかの試みが行われている。多くの場合、研究者らは、
II型肺胞細胞の作製に重点を置いている (Van Vranken et al., 2005; Samadikuchaksara
ei et al., 2006; Wang et al., 2007)。喘息、嚢胞性線維症、気管支炎、および気管支
原性癌などの気道疾患は、概して肺気腫などの肺胞の疾患より発生率が高いという事実
にもかかわらず、多能性幹細胞からの気道上皮細胞の分化を標的としている研究は少ない。
さらに、肺原基形成の際に、最初に認識可能な2つの前駆細胞は、複能性胚性肺前駆細胞
および気道前駆細胞である。それゆえ、これらの2つの前駆細胞を産生すれば、肺上皮細
胞の各々のタイプへの分化が可能になると予想される。

10

【0312】

マウスの大気道上皮およびヒト気道上皮の大部分は、4つの主要な細胞タイプ、すなわ
ち基底膜に隣接する基底幹細胞、主にマウスにおいてP450機構を有する分泌性解毒性クラ
ラ細胞、粘液を呼吸樹から排出する繊毛細胞、および損傷または炎症に反応して粘液を分
泌する杯細胞で構成される。ES細胞から機能的肺上皮を作製するこれまでの試み (Coraux
et al., 2005; Van Haute et al., 2009) は、限られた数の細胞が確率的に産生される
こと、および移植後にテラトーマ形成の有意なリスクを有する未分化多能性幹細胞を含む
混合細胞集団が生成されることを特徴とした。他の試みは、気道細胞の分化を誘導するた
めに定義が不完全な培地を利用しているか (ヒトES細胞の腫瘍細胞抽出物への曝露などの
; Roszell et al., 2009)、または薬物耐性遺伝子の存在に基づいて選択した遺伝子改変
多能性幹細胞を用いている (Wang et al., 2007)。残念なことに、遺伝子改変は、得ら
れた細胞において有害な遺伝子変異導入の可能性を高める。

20

【0313】

ヒト疾患のモデルとなる成人ヒト気道幹細胞を得る難しさを考慮して、本明細書におい
て記述される研究は、ヒトの正常および肺疾患特異的iPSCから正常なおよび疾患特異的肺
上皮細胞を作製することを追求する。マウスの肺疾患モデルは、しばしばヒト肺疾患の表
現型を模倣しないことから、このことは特に重要である。主な例は、ヒト患者において観
察される嚢胞性線維症関連肺病態を示さないCftrノックアウトマウス (Snouwaert et al.
, 1992; Clarke et al., 1992; Guilbault et al., 2006) である。さらに、iPSC誘導上
皮細胞は肺細胞の前病的状態を反映することから、炎症または感染症に関連する変化など
の多数の二次変化によって、疾患の発病における最初の遺伝子異常の効果が隠れることは
ない。

30

【0314】

本明細書において記述される全体的な戦略は、段階的分化アプローチを使用する。マウ
ス胚体内胚葉の領域化、肺の特異化、およびその後の前駆細胞のパターン形成および成長
を調節する機序は、十分に研究されている (Morrisey and Hogan, 2010における論評)。
内胚葉内での肺特異化の開始は、腸管の背腹軸に沿ってNkx2.1発現およびSox2のダウンレ
ギュレーションを伴う (Lazzaro et al., 1991; Minoo et al., 1999; Que et al., 2009
)。Nkx2.1は、肺内胚葉を前腸内胚葉の残りから区別する最も初期のマーカーである。次
に、Sox2発現が将来の気管、気管支、および細気管支領域で再度増加するが、は複能性胚
性肺前駆細胞集団のマーカーであるSox9、FoxP2、およびID2は、遠位肺芽先端に残る (Pe
rl et al., 2005; Shu et al., 2007; Rawlins et al., 2009)。次に、胚気管に存在す
るNkx2.1+Sox2+気道前駆細胞が、p63+気道基底幹細胞へと分化する (Que et al., 2009)
。マウスの大気道上皮は、ヒト気道上皮の大部分と非常に類似であり (Rock et al., 201
0; Rock et al., 2009; Evans et al., 2001)、それゆえヒト気道疾患を研究するための
モデルとして用いることができる。

40

【0315】

本発明者らは、Nkx2.1+甲状腺内胚葉および神経前駆細胞を欠如するNkx2.1+肺内胚葉の

50

産生に重点を置いた。ヒトES細胞を用いた最近の報告により、マウス腸器官形成の模倣に基づく分化戦略によって、30%までの効率で前方前腸細胞およびNkx2.1+細胞が産生されたことが証明された (Green et al., 2011)。しかし、これらのNkx2.1+細胞が純粋に肺前駆細胞で構成されていることは証明されなかった。TUJ1 (神経組織のマーカー) およびPAX8 (甲状腺組織のマーカー) 発現は、Nkx2.1抗体との同時抗体染色によって単細胞レベルで評価されなかった。それゆえ、肺の分化のみを反映するが、甲状腺または脳の分化を反映しないNkx2.1+前駆細胞を産生するための新規戦略の開発が必要であり、技術がヒト肺疾患の研究に広く適切となるためには、技術はヒト疾患特異的iPSCに応用可能でなければならない。

【0316】

本明細書において、マウスES細胞から始めて、次に正常および肺疾患特異的ヒトiPSCによる、胚体内胚葉 (DE)、前腸内胚葉、初期肺内胚葉、複能性Nkx2.1+胚性肺前駆細胞、および気道前駆細胞を作製する効率的で一貫した段階的分化法 (図1) が記述される。本発明者らは、高用量のアクチビン、一過性のWNT活性化、および一定期間のBMP4阻害が、ES細胞を高い効率で胚体内胚葉へと変換させることを示す。内胚葉をSox2+前腸内胚葉へと前方移動させるためには、TGF 単独のさらなる阻害で十分である。これらの研究は、内胚葉の前腸内胚葉への前方移動が、戦略の後の段階でのNkx2.1+細胞の最終分化を増強することを示している。BMP4、FGF2、およびWNTは各々、Nkx2.1+未成熟胚前駆細胞の誘導にとって必要である。これらの初期前駆細胞は、インビトロでNkx2.1+Sox2+近位前駆細胞およびNkx2.1+p63+気道基底幹細胞へと成熟することができ、成熟気道上皮へと分化することができる。

【0317】

実施例1A: 胚体内胚葉の効率を改善するための非常に効率的で普遍的に適用可能なプロトコール

内胚葉は、胚における3始原胚葉の1つである。内胚葉は、胚腸管を形成し、次にこれが肺の上皮および消化管を生じる。それゆえ、ヒトiPSCを肺系列へと向ける第一の必須段階は、好ましくは高い効率で内胚葉細胞を作製することである。多様な理由から、いくつかの細胞株は、高い効率で胚体内胚葉を作製しない。たとえば、現在公表されているプロトコール (Mou et al., 2012; RPMI + 2% B27 + 100 ng/ml TGF- β 1 アゴニストアクチビンA + 5 μ M LY-294002 PI3K阻害剤) は、いくつかのヒトiPSCおよびESC株において有効であり、胚体内胚葉の効率は90%より高い。いくつかの「難しい」または「抵抗性の」細胞株では、この同じプロトコールによって、低い (<30%) から中等度 (40~70%) まで効率が異なる胚体内胚葉が作製される。本発明者らは、LY-294002、ZSTK474 (Zenyaku Kogyo Co. (商標))、ワートマニン、PI828 (PIramed Ltd. (商標)、Roche (商標))、NVP-BKM120 (Novartis (商標))、およびPIK-75 (Drug Discovery Research, Astellas Pharma Inc. (商標)) を含む多数のPI3K阻害剤をスクリーニングして、ZSTK474が、胚体内胚葉の作製にとって最も強力であると決定した。加えて、ZSTK474を用いることによって、増殖因子アクチビンAの用量を大きく減少させることができる (たとえば、100 ng/ml から 20 ng/ml まで、およびいくつかの細胞株では10 ng/ml アクチビンAまで)。それゆえ、このプロトコールは、これまでのプロトコールよりかなり費用効果が高い。先に注目したPI3キナーゼ阻害剤はまた、Promega (商標)、Invivogen (商標)、Sigma-Aldrich (商標)、Cayman Chemicals (商標)、Tocris (商標)、およびCell Signaling Technologies (商標) を含むがこれらに限定されるわけではない販売元から得ることができる。

【0318】

このプロトコールによって、転写因子Foxa2およびSox17に関する核染色によって決定した場合に、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%を含む驚くべき90%もしくはそれ以上、およびさらに98%もしくはそれ以上ものヒトiPSC/ESC細胞を胚体内胚葉細胞へと変換することができる。重要なことに、このプロトコールは、実験毎に非常に一貫している (すなわち、再現性がある)。さらに、このプロトコールは、胚体内胚葉の作製効率が低いと決定されたいくつかの「難しい」細胞株を含む多数の細胞株に普遍的に応用すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0319】

プロトコルの概要：ヒトESCおよびiPSCを、Geltrex（商標）コーティングプレート（マウスエンゲルプレス-ホルム-スワム腫瘍から精製された低増殖因子（RGF）基底膜抽出物（BME））において完全mTeSR1培地によって成長させた。細胞に毎日栄養を与え、65～80%コンフルエンスで分化を行う。胚体内胚葉分化に関して、mTeSR1を吸引して、細胞を温RPMI 1640培地によって2回すすいで、mTeSR1中の残留増殖因子を除去した。培地を胚体内胚葉分化培地（RPMI + 2%B27 + 20 ng/ml アクチビンA + 0.2～0.5 μM ZSTK474）に交換した。4日間の総分化期間のあいだ、培地を毎日交換した。胚体内胚葉の効率を、FOXA2/SOX17共染色またはcKit/CXCR4およびcKit/EpCAMの組み合わせによるFACS分析によって調べた。

10

【0320】

高い効率で胚体内胚葉を作製するプロトコルを説明する図を、本明細書において図13に示す。

【0321】

実施例1B：段階特異的TGF 阻害により、ナイーブ内胚葉は前方前腸内胚葉に限局化して、Nkx2.1+細胞の分化を促進する

最近の報告により、マウスES細胞を高い効率で内胚葉の運命へと向けるために、Nodal およびWnt- カテニンシグナル伝達の相乗的活性化ならびに一定期間のBMP4阻害を用いる単層培養に対する戦略が記述された（Sherwood et al., 2011）。この技術を、本明細書においてマウスES細胞から胚体内胚葉（DE）を作製するように適合させた。図7は、胚体内胚葉を作製するための戦略の図解と概算時間を示す。このプロトコルによって、内胚葉転写因子Foxa2およびSox17の二重の発現に基づいて、驚くべき80%～90%もの細胞がDEに変換された（データは示していない）。次に、新たに作製されたDE細胞が、Nkx2.1+細胞を作製するコンピテンスを有するか否かを調べた。BMP4、FGF2、およびGSK3iXV（WNTアゴニスト）を含む無血清培地に2日間曝露した後（図2A）、細胞の1%未満がNkx2.1+であることが観察された（データは示していない）。しかし、細胞の60%より多くがCdx2+であり、このことは、細胞の大部分が後腸の運命へと特異化されたことを示した（データは示していない）。この段階の内胚葉細胞は、Nkx2.1+細胞へと効率よく分化しなかったことから、「前方移動」段階が肺の運命の特異化を促進するか否かを調べた。Snoeckと共同研究者は、Noggin（BMP阻害剤）がSB431542（TGF 阻害剤）と相乗的に作用して、前方内胚葉（Sox2+）運命にとって有利となるように後方内胚葉（Cdx2+）運命を抑制することを報告した（Green et al., 2011）。本発明者らは、DE作製の際に既にBMP阻害を組み入れていることから（図7）、持続的なBMP阻害が前方移動にとって必要であるか否か、または前方パターン形成にとってTGF 阻害単独で十分であるか否かという疑問を調べた。内胚葉をアクチビン（TGF アゴニスト）、A-83-01（TGF アンタゴニスト）、BMP4、およびドルソモルフィン（BMP4アンタゴニスト）の組み合わせによって2日間処置した（図2B）。FoxA2+Sox2+前方内胚葉細胞の数を、FoxA2+内胚葉細胞の総数と比較した（図2B）。処置した細胞をさらに、BMP4/FGF2/WNTアゴニストカクテルにさらに2日間曝露して、Nkx2.1+細胞を作製するそのコンピテンスを調べた（図2B）。結果は、FoxA2+Sox2+前方内胚葉を増加させるには、TGF 阻害単独で十分であったこと（培地単独で<0.1%であったことと比較して、40%～55%、図2B）、およびNkx2.1+細胞を形成する内胚葉細胞のコンピテンスをTGF 阻害が増強すること（限局化がない場合の<1%と比較しておよそ7%から13%、図2B）を示している。持続的なアクチビン処置によって、FoxA2+Sox2+細胞がほとんど得られず、Nkx2.1+細胞が少なくなることが観察され（図2B）、このことは、最適な持続でアクチビンに曝露することが、限局化の効率において役割を果たすことを示している。同様に、FoxA2+Sox2+細胞の作製にはさらなるBMP4阻害は必要ではなく、さらなるBMP4阻害によって最終的に得られるNkx2.1+細胞がわずかにより低い割合となりうることも見いだされた（図2B）。同様に、BMP4が5～7日間存在する場合には、存在する神経外胚葉マーカーTuj1がより少ないことも観察され（データは示していない）、このことは、BMP4が神

20

30

40

50

経拘束を抑制して、ESCからの非神経系列分化を促進するという知見 (Zhang et al., 2010) と一致した。FGFおよびWNTシグナル伝達は、後腸の同一性を維持して、前腸内胚葉分化を能動的に抑制することが示されている (Wells and Melton, 2000; Ameri et al., 2010)。それらの阻害がTGF 阻害剤と共に前方移動を増強するか否かを試験した。その後の実験により、FGFアンタゴニスト (PD173074) が細胞死を誘導するが、WNTアンタゴニスト (IWR-1) は、FoxA2+Sox2+集団を増加させないことが判明した (データは示していない)。

【0322】

実施例2: マウスESC誘導Nkx2.1+細胞は、神経および甲状腺マーカーを欠如して、増殖性であり、遠位複能性肺前駆細胞および近位気道前駆細胞を含む

Nkx2.1は、肺の特異的マーカーではなく、その発現はまた、甲状腺および腹側前脳においても見いだされる。それゆえ、本明細書において用いられる培養系において作製されたNkx2.1+細胞の同一性を決定することが重要であった。残念なことに、脳または甲状腺において発現されない胚形成期E9での肺系列の信頼できるマーカーはない。Sp-C (サーファクタントタンパク質C) は、肺上皮前駆細胞の最も特異的なマーカーであるが、E10~E11になるまで検出されない (Wert et al., 1993)。SOX9およびFOXP2は、実際に、遠位肺複能性上皮前駆細胞においてNKX2.1と同時発現され (データは示していない)、脳または新たに特異化された甲状腺において見いだされない (データは示していない) が、その発現はE11~E12後まで明白ではない。一方、SOX2は、E9肺内胚葉において発現され (データは示していない)、後に気道上皮前駆細胞においても発現されるが (データは示していない)、SOX2はまた、腹側前脳におけるNKX2.1発現細胞においても見いだされうる (図8およびデータは示していない)。このように、肺内胚葉特異化の最も初期の段階では (E8.75~E9)、これらのマーカー (SPC、SOX2、SOX9、およびFOXP2) はいずれも、肺細胞を信頼可能に独自に同定するために用いることができない。これに対し、腹側前脳のNkx2.1+細胞におけるTUJ1発現は、E8.0で始まり、腹側前脳においてその後も存在し続け、甲状腺または肺には存在しないことから (図8およびデータは示していない)、Tuj1発現は、NKX2.1ドメインにおける神経細胞同一性の特異的指標となる。PAX8発現は、甲状腺特異化の時点のE8.75で原基甲状腺において検出されるが (データは示していない)、肺または脳では検出されない。それゆえ、PAX8は、NKX2.1ドメインにおける甲状腺細胞同一性の特異的指標として用いられうる (図8およびデータは示していない)。要約すると、本発明者らは、初期特異化段階で、Nkx2.1+/Tuj1-/Pax8-細胞は、肺細胞系列を有すると見なされうると結論する。したがって、神経および甲状腺同一性を除外するために、ESC誘導Nkx2.1+細胞を、TUJ1およびPAX8発現に関して調べた (データは示していない)。胚 (甲状腺、肺、および腹側前脳) におけるいかなるNkx2.1+細胞に関しても予想されるように、エクスピボで分化したNkx2.1+細胞は全てFoxa2と同時染色された (データは示していない)。培養において、Tuj1+細胞の小さいサブセットが検出されたが、これらの神経細胞は、Nkx2.1+細胞と重ならなかった (データは示していない)。本発明者らは、その培養においていかなるPax8+細胞も検出しなかった (データは示していない)。それゆえ、これらのデータは、インビトロで分化させたNkx2.1+細胞が肺内胚葉細胞を表すことを示している。これらのNkx2.1+細胞は増殖性であり、その半数より多くがKi67を発現する (データは示していない)。

【0323】

免疫蛍光実験からのデータは、ESC誘導Nkx2.1+細胞が神経および甲状腺マーカーを欠如して、増殖性であり、近位および遠位肺内胚葉のマーカーを保有することを示している。FOXA2、TUJ1、およびPAX8に関する免疫蛍光染色を行ったところ、Nkx2.1+細胞は、内胚葉マーカーFOXA2に関して陽性であり、神経外胚葉マーカーTUJ1に関して陰性であり、および甲状腺マーカーPAX8に関して陰性であることが示された (データは示していない)。Nkx2.1+細胞は、Nkx2.1とKI67との同時染色によって証明されるように増殖性であった (データは示していない)。免疫蛍光染色はまた、SOX2 (気道前駆細胞マーカー) およびFOXP2/SOX9 (複能性肺前駆細胞マーカー) に関して陽性であるNkx2.1+細胞の亜集団の存在を

示した（データは示していない）。

【0324】

マウスにおいて、Sox2は、E9での肺特異化プロセスの際に、Nkx2.1発現が前肺内胚葉において始まると、この同じ前腸前肺内胚葉において急速にダウンレギュレートされる（データは示していない）。このように、最も初期の肺内胚葉細胞はNkx2.1+およびSox2-low細胞である。その後まもなく、分枝形態形成プロセスの際に、持続的に高レベルのSOX2発現が、将来の気管、気管支、および細気管支の近位気道上皮前駆細胞において検出される（データは示していない）。それゆえ、気道前駆細胞は、Nkx2.1+Sox2+である。

【0325】

これに対し、SOX9およびFOXP2は、遠位末端複能性肺前駆細胞においてのみ発現され（データは示していない）、これにより、SOX9およびFOXP2マーカーは、それらが前述のように、近位気道前駆細胞または甲状腺または脳に存在しないことから、NKX2.1ドメイン内の複能性胚性肺前駆細胞の別個の集団を独自に同定するマーカーとなる。それゆえ、本発明者らは、9日目でのそのES細胞誘導Nkx2.1+細胞が、近位気道（Nkx2.1+Sox2+）および遠位複能性（Nkx2.1+Sox9+またはNkx2.1+FoxP2+）前駆細胞の両方を含むか否かをチェックした。10回の独立した実験から作製されたNkx2.1+細胞を計数した。気道前駆細胞（Nkx2.1+Sox2+）の平均比率は、総Nkx2.1+細胞中1.8% ± 0.8%であり、遠位複能性前駆細胞Nkx2.1+Sox9+またはNkx2.1+FoxP2+の比率はそれぞれ、総Nkx2.1+細胞中4.8% ± 2.5%および6.6% ± 3.1%であった。残りのNkx2.1+細胞（甲状腺でも神経でもない）は、最少のSOX2発現を有する細胞であり、初期前肺内胚葉を反映しうる。このように、9日目でのNkx2.1+細胞の大部分はおそらく、気道前駆細胞へとまたは遠位末端複能性肺前駆細胞集団へと特異化されていない初期肺内胚葉を表す。免疫蛍光は、細胞がNkx2.1+Sox2+、Nkx2.1+Sox9+、およびNkx2.1+FoxP2+細胞に関して濃縮されていることを示している（データは示していない）。概して、これらの結果は、9日目でのESC誘導Nkx2.1+細胞が未成熟であり、ほとんどが近位および遠位前駆細胞マーカーを欠如しており、初期肺内胚葉細胞を表すことを暗示している。まれではあるが、Nkx2.1+Sox2+、Nkx2.1+Sox9+、およびNkx2.1+FoxP2+細胞の存在は、ES細胞誘導Nkx2.1+肺内胚葉細胞が、後に成熟上皮細胞へと分化しうる気道の前駆細胞および複能性肺前駆細胞へと分化しつつあることを示した。

【0326】

FoxN1（胸腺）、Pax8（甲状腺）、ならびにPax9およびTbx1（咽頭嚢内胚葉）を含む肺および他の前方細胞運命系列遺伝子の発現を、リアルタイムqPCRによって分析した（図S4A）。予想されたように、結果は、多能性細胞が胚体内胚葉（DE）へと分化すると、Sox2がダウンレギュレートされることを示した。後に、Sox2レベルは、前方内胚葉がSox2を発現するという予想に従って増加した。Nkx2.1、Sox9、およびFoxP2発現はESC、胚体内胚葉、および前方内胚葉において最少であったが、FGF2/WNT/BMP4誘導カクテルによる刺激後に大きく増加し（10~20倍）、このことは抗体の染色によりこれらの肺特異的マーカーの組み合わせを証明するこれまでの結果と一貫する（データは示していない）。同様に、FoxN1、Tbx1、Pax8、およびPax9発現は、ESC、胚体内胚葉、および前方移動内胚葉において低かった。しかし、増殖因子誘導前方前腸細胞では、Pax9およびTbx1発現の控えめな増加が観察されたが、FoxN1およびPax8発現はなおも非常に少なかった。Pax9およびTbx1遺伝子発現が増加したにもかかわらず、本発明者らは、免疫蛍光によってこれらのタンパク質に関するいかなる再現可能な染色も検出しなかった（データは示していない）。これらの結果は全て、FGF、BMP4およびWNTシグナル伝達の組み合わせが、前方内胚葉からの肺特異的Nkx2.1+前駆細胞の分化を主に駆動するという知見と一貫する。

【0327】

実施例3A：BMP4、FGF、およびWNTシグナル伝達は各々が、インビトロでNKX2.1誘導にとって必要であり、マウス肺発達を反復する

BMP4、FGF2、およびWNTシグナル伝達が各々、インビトロマウスESC分化系において前方前腸から肺内胚葉を特異化するために必要であるか否かを試験した。これを行うために、前方移動内胚葉細胞に、BMP4、FGF2、およびWNTアゴニストおよびアンタゴニストの組み

合わせを曝露した（図3AおよびB）。BMP4は単独でNKX2.1発現を誘導できることが見いだされた。これに対し、FGF2および/またはGSK3iは、BMP4がなければNKX2.1誘導にとって十分ではなく、BMP4シグナル伝達が肺の特異化にとって必要であることを示した（図3BおよびC）。興味深いことに、FGFおよびWNTアンタゴニストの存在下では、BMP4はもはやNkx2.1+細胞を誘導できなかった。この結果は、FGFおよびWNTリガンドの内因性の分泌を暗示する。同様に、FGFおよびWNT活性化は、BMP4依存的Nkx2.1特異化にとって必要であることを示唆している（図3BおよびC）。推定の内因性のFGFシグナル伝達にもかかわらず、FGF2濃度を増加させると、Nkx2.1+細胞をアップレギュレートした（図3BおよびC）。FGF2シグナル伝達と比較すると、過度のWNT活性化は有害であり、Nkx2.1+細胞は減少して（図4BおよびC）、後腸Cdx2+細胞が増加した（データは示していない）。

10

【0328】

BMP2、4、および7は、最もよく研究されたBMPファミリーメンバーである。BMP2およびBMP4はいずれも、I型受容体（ALK3）を通してシグナルを伝達するが、BMP7は異なるI型受容体（ALK2）に結合する（von Bubnoff and Cho, 2001による論評；Chen et al., 2004；Sieber et al., 2009；Miyazono et al., 2010）。BMP2およびBMP7の効果を、前方内胚葉からのNkx2.1+細胞の誘導に関してBMP4と比較した。結果から、BMP2がNkx2.1+細胞の誘導に関してBMP4より効率的ではないが、BMP7（10 ng/ml）は効果を有しない（データは示していない）ことが示された。濃度を増加させても（>100 ng/ml）、BMP7はなおもNkx2.1+細胞を作製できなかった（データは示していない）。このことは、ALK2受容体を介してのBMP7シグナル伝達がNKX2.1誘導にとって必要ではなかったことを示している。基準のBMP2/4シグナル伝達において、BMP2/4はBMP受容体I/II複合体に結合して、Smad1/5/8のリン酸化が起こり、Smad4とのヘテロ複合体が形成される。これらの複合体は、核へと移動して標的遺伝子の発現を活性化する（von Bubnoff and Cho, 2001；Chen et al., 2004；Sieber et al., 2009；Miyazono et al., 2010）。Smad1/5/8媒介転写のほかに、BMP誘導受容体複合体は、ERK、JNK、またはp38によるマイトゲン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路を活性化することができる（Kozawa et al., 2002）。ドルソモルフィン（pSmad1/5/8阻害剤）およびPD98059（MAPKK/ERK阻害剤）を用いると、ドルソモルフィンは、Nkx2.1+細胞の作製を完全に消失させるが、PD98059はごく部分的にNkx2.1+細胞比率を減少させたに過ぎなかったことが観察された（データは示していない）。PD98059の存在下で有意な細胞死が観察され、それゆえNkx2.1+細胞の減少がアポトーシスによる可能性を排除することができなかった。加えて、SmadおよびMAPK媒介経路を統合することができ（Aubin et al., 2004）、PD98059の存在下でのNkx2.1+細胞の減少もまた、Smad依存的シグナル伝達のダウンレギュレーションによる可能性がある。全体として、Smad依存的BMP2/4シグナル伝達カスケードは、前腸細胞からのNKX2.1特異化にとって必要であるという結論に達した（図4）。

20

30

【0329】

実施例3B：肺前駆細胞を作製するためのNkx2.1+分化

Nkx2.1+肺前駆細胞を促進することができる化合物を同定し、またヒト肺特異化を制御する新規シグナル伝達経路を同定するために、ハイスループット化学スクリーニングを用いた。

40

【0330】

Nkx2.1+肺前駆細胞の産生効率を増加させるために、本発明者らは、NKX2.1陽性肺前駆細胞分化を促進することができる低分子化合物およびFDA承認臨床薬を同定するために、キナーゼ経路阻害剤ライブラリおよびNIH臨床薬ライブラリに関する不偏のハイスループット化学スクリーニングを行った。化学スクリーニングのプラットフォームを図14Aに示す。Foxa2+Sox2+前方内胚葉のNkx2.1+肺内胚葉への変換段階でスクリーニングを行った。

【0331】

キナーゼ化合物セット（化合物240個）から、Nkx2.1+細胞の割合に統計学的に有意な（3倍より多い）増加を生じた少なくとも5個の分子が同定され、NIH Clinical Collection（化合物400個）から、少なくとも6個の薬物が同定された（図14B）。これらのNkx2.1+細胞

50

胞は、神経系列マーカーTuj1および甲状腺系列マーカーPax8の発現を除外するために、異なる実験においてさらに染色されている。加えて、初回スクリーニングにおいて同定された全ての陽性候補体は、肺前駆細胞の形成を増加させるために薬物の持続および用量効果に関して評価されており、それらは、細胞毒性の誘導、Ki67染色による細胞増殖を含む他の効果に関して評価されている。これらの化合物は注釈がつけられていることから、本発明者らは、PI3KおよびPKC関連シグナル伝達経路などの同じ経路を標的とする多数の陽性ヒットが存在することを見いだした。理論に拘束されたくはないが、これらのデータは、これらの生物学的経路がヒト肺器官形成に能動的に関係していることを示している。同様に、BMP4は、iPSCからのヒト肺前駆細胞分化にとって重要でないことも決定され、このことは、肺の発達がヒトとマウスで種による差があることを示している。BMP4を阻害すると、高いNKX2.1発現レベルを有する肺前駆細胞を作製するが、BMP4を添加すると、NKX2.1+肺前駆細胞の総数に影響を及ぼすことなく、NKX2.1発現を減少させることが決定された。

10

20

30

40

50

【0332】

陽性ヒットに加えて、いくつかの化合物は、NKX2.1+細胞産生を減少または遮断させることが見いだされた。これらの陰性化合物のいくつかは、MEK1/2アンタゴニストである。理論に拘束されたくはないが、これらのデータは、MEK1/2関連シグナル伝達経路が、ヒト肺器官形成およびiPSCからの肺前駆細胞分化において重要な役割を果たすことを示している。たとえば、MEK1/2の内胚葉特異的欠失によって、マウスにおいて肺無発育が起こる（非公表データ）。インビトロ分化系において、本発明者らは、MEK1/2の活性化（ホルボル-12-ミリスチン酸またはPMAおよび他のMEK1/2アゴニストなどによる）が、NKX2.1+細胞産生を刺激することを見いだした。

【0333】

陽性ヒットの相加および相乗効果を研究した後、将来の臨床応用にとって適した細胞を維持するために、異種由来成分を含まない条件で、多数のiPS細胞株からNKX2.1+肺前駆細胞の高度濃縮集団（85%~90%まで）を作製するために、強く経済的に有効な新しいプロトコルを考案した。この例示的な分化培地は、1つのWntアゴニスト（たとえば、0.5 μ M CHIR9902）、1つのPI3キナーゼ阻害剤（たとえば、0.02~0.05 μ M PIK-75）、臨床的に用いられる1つの薬物（たとえば、0.02~0.05 μ M メトトレキサート）、1つのBMPアンタゴニスト（たとえば、2~4 μ M ドルソモルフィン）および1つの増殖因子（たとえば、10~50 ng/ml FGF2）を含む。図12は、iPSCから気道前駆細胞への新たに開発した段階的気道前駆細胞分化プロトコルの要約である。当業者は、図14に記載される化合物と共にこの基本プロトコル（RPMI + 2%B27 + 10~50 ng/ml FGF2 + 0.5 μ M CHIR9902 + 2~4 μ M ドルソモルフィン）から多くの他のプロトコルを作製することができる。

【0334】

現在の培地の費用に基づいて、本発明者らは、iPSCから肺前駆細胞への分化培地の費用（段階Iから段階III）が、Mou et al., 2012によって報告された当初の費用のわずか10%であると計算するが、このプロトコルは、NKX2.1+細胞産生の効率を増加させた。

【0335】

加えて、本発明者らは、このアプローチが多数のヒトiPS細胞およびESC細胞において有効であることを証明した。段階IVは、未成熟肺前駆細胞をNKX2.1+SOX2+p63+CK5+気道幹細胞へと成熟させ、同様に、たとえば機能的アッセイ、疾患のモデリング、および薬物スクリーニングのために、そのような集団を、継代を繰り返して増殖させ、および/または細胞の量を増加させるために用いることができる。

【0336】

実施例4：BMP7およびFGF7シグナル伝達、ならびにWNTおよびMAPKK/ERK阻害の組み合わせは、近位気道前駆細胞を作製する

本明細書において先に証明したように、9日目でほとんどのESC-誘導NKX2.1+細胞は、未成熟肺内胚葉細胞であった。それゆえ、より成熟したNKX2.1+Sox2+胚気道前駆細胞を産生するために、これらの細胞を分化させた。本発明者らは、未成熟肺NKX2.1+細胞から気道stalk前駆細胞を作製するためにシグナル伝達因子を選択的に適用した（図5AおよびB）。

細胞を、9日目にRA添加B27、BMP7、FGF7、IWR-1 (WNTアンタゴニスト)、およびNogginと共に調製した「近位誘導」培地へと切り替えた(データは示していない)。2~3日後、Nkx2.1+Sox2+気道前駆細胞の増加が観察された。比率は、処置前の1%~2%と比較して、Nkx2.1+細胞総数のおよそ10%であった。個々の増殖因子を除去した異なる実験において、WNTアンタゴニズムは、Nkx2.1+Sox2+細胞の産生に対して最も顕著な効果を有することが見いだされた。この段階でNogginの代わりにドルソモルフィン(BMPアンタゴニスト)を添加しても、Nkx2.1+Sox2+細胞数に対してほとんど効果を有しなかった。興味深いことに、低分子PD98059(MAPKK/ERK阻害剤)は、Nkx2.1+細胞総数の18%までNkx2.1+Sox2+気道前駆細胞の作製を増強した(データは示していない)。これらのデータは、気道前駆細胞が、MAPKK/ERK関連経路の阻害後に形成されることを示している。最も注目すべきことに、本発明者らは、11~12日目でNkx2.1+p63+細胞の小さい分画(Nkx2.1+細胞総数の約1%~4%)を検出し始めた(図6D)。「近位誘導」培地において培養期間を2日から5日またはそれより長い期間まで増加させると、Nkx2.1+Sox2+およびNkx2.1+p63+細胞のより高い割合が得られた(データは示していない)。Nkx2.1+Sox2+およびNkx2.1+p63+細胞の産生はなおも、最適化する必要があるが、これらの結果は、ESC誘導Nkx2.1+細胞を近位気道前駆細胞および誘導気道基底細胞へと分化させることができることを証明している。これらの細胞の特異的亜集団、たとえばNkx2.1+Sox2+細胞、またはNkx2.1+Sox9+細胞およびNkx2.1+p63+細胞を単離するためのアプローチは、レポーター遺伝子構築物、たとえばSox2、Sox9、またはp63プロモーターによって駆動されるGFPレポーター構築物を細胞にトランスフェクトすることである。これらの状況でGFPが発現されれば、細胞が本発明の因子の発現を許容すると同定される。これらの試験は、限界希釈で細胞において行うことができると企図される。たとえば、前方前腸内胚葉細胞集団を、本明細書において記述されるNkx2.1+Tuj1-Pax8-複能性肺前駆細胞へと分化誘導して、その後同様に記述されるように気道前駆細胞へと分化させる処置を行うことができる。誘導条件での適切な期間の後、集団を限界希釈に供して、マイクロタイター皿において1ウェルあたり細胞1個を平板培養した。単離細胞を、培養においてクローン的に増殖させて、増殖した細胞の一部を、誘導された気道前駆細胞マーカー、たとえばNkx2.1、Sox2、Sox9、p63、またはさらにより遠位の分化マーカー、たとえばCCSP、FoxJ1等の発現または共発現に関して、たとえば免疫蛍光によって試験することができる。このようにして、様々な前駆細胞の単離集団を調製することができる。

10

20

30

40

50

【0337】

当業者は、単離細胞集団を産生する代替法もまた、本明細書において記述される方法と共に用いられうることを認識する。いくつかの態様において、化学物質または化学物質の組み合わせを用いて培養での細胞分化効率を増強して、所望の細胞タイプの数を増加させることができる。そのような細胞分化効率の増強によって、たとえば所望の細胞表現型に関する陽性選択による、または望ましくない細胞表現型の選択的殺細胞による、所望のヒト肺前駆細胞タイプの単離集団の産生が可能となる。または、所望のヒト肺前駆細胞表現型へと分化する際に細胞がGFPを発現して、それによってたとえばFACSソーティングを用いて既定の表現型の細胞を単離することができるように、細胞を遺伝子改変することができる。さらに、当業者は、特定の細胞表面マーカーまたはマーカーの組み合わせに対して抗体(たとえば、モノクローナル抗体)を作製することができる。そのような抗体または抗体の組み合わせを用いて、細胞集団から所望の細胞タイプを精製することができる。

【0338】

実施例5: ESC誘導Nkx2.1+細胞集団は、インビボで移植すると成熟気道上皮へと分化することができる

多能性幹細胞から誘導されるNkx2.1+肺前駆細胞は、有用であるためには機能的呼吸上皮の生成能を保有しなければならない。それゆえ、マウスESC誘導Nkx2.1+前駆細胞を、皮下生着によるその成熟呼吸上皮の形成能に関して試験した(データは示していない)。アッセイは、Nkx2.1+細胞が混合細胞集団内で分化する能力を評価した。細胞20,000~50,000個を50%Matrigel中に浮遊させて、免疫欠損マウスの皮下に注射した。注射後20~30日

で、生着した組織を検査のために摘出した。マウスESC誘導肺内胚葉からの気道上皮の分化が、皮下生着の際に観察された。免疫蛍光染色により、いくつかのNkx2.1+細胞がSOX2に関して陽性であることが示される（データは示していない）。免疫蛍光染色はさらに、ESC誘導Nkx2.1+細胞がp63+気道基底幹細胞、CC10+クララ細胞、FoxJ1+繊毛細胞、およびMuc5ac+杯細胞に分化したことを示した（データは示していない）。

【0339】

多くの上皮スフェアが移植片内で形成され、これらのスフェアのいくつかはNkx2.1発現細胞を含むことが観察された。いくつかのNkx2.1+スフェアにおいて、Sox2+近位気道上皮細胞（データは示していない）、p63+基底幹細胞、CC10+クララ細胞、FoxJ1+繊毛細胞、およびMuc5ac+ムチン分泌細胞（データは示していない）を含む成熟気道上皮細胞のマー

10

【0340】

共焦点イメージングを備えた三重免疫蛍光染色により、スフェアが成熟気道上皮の1つより多くのマーカーを含むことが証明された。そのような成熟気道上皮マーカーは、ESC誘導テラトーマにおいて決して検出されていない。三次元スフェア形成アッセイを用いるこれまでに公表された基底幹細胞分化により、繊毛細胞および基底細胞が産生されたが、クララ細胞は産生されなかった（Rock et al., 2009）。本発明者らは、初回細胞混合物において遠位肺複能性細胞（Nkx2.1+Sox9+およびNkx2.1+FoxP2+細胞）を有するにもかかわらず、PRO-SPC、PRP-SPA、およびAQUAPORIN5などのいかなるI型およびII型肺胞細胞マ

20

【0341】

実施例6：ヒト嚢胞性線維症iPS細胞からNKX2.1+肺細胞を作製するための効率的で再現可能な段階的アプローチ

次に、類似の段階的分化アプローチを用いて、嚢胞性線維症（CF）疾患特異的ヒトiPSCから肺気道前駆細胞を作製できるか否かを調べた（図6）。全ての分化段階を、異種由来成分を含まない条件で行った。さらに、CF iPSC株の2つは、ウイルスコードリプログラミング因子（Warren et al., 2010）ではなくて、修飾RNA（RiPS）を用いて作製され、このため遺伝子が修飾されず、このことは可能性がある将来の臨床での使用にとってもう1つの利点であった。CF iPSCを、完全mTeSR1培地中でGeltrexコーティングプレートにおいて

30

【0342】

Greenらと類似の前方移動条件を用いることによって、DE細胞におけるSOX2発現の誘導を、A-83-01（TGFアンタゴニスト；データは示していない）による4日間の処置後に50%から60%までの効率で得た。Noggin（BMP4アンタゴニスト）は、実際にこの前方移動にとって必要ではないことが見いだされた。マウスES細胞に関する試験において同定された増殖因子およびアゴニストの類似の組み合わせ（BMP4、FGF2、およびGSK3iXV）を用いると、NKX2.1+細胞を10%～30%の効率で作製することができる（データは示していない）。これらのNKX2.1+細胞は、TUJ1およびPAX8に関して陰性であり（データは示していない）、それらが神経または甲状腺同一性の細胞ではないことを証明した。加えて、これらのNKX2.1+細胞の垂集団はまた、SOX2およびSOX9に対しても陽性であった（データは示していない）。これらのマーカーは、いずれも拘束された気道前駆細胞（NKX2.1+SOX2+細胞）および複能性胚性肺前駆細胞（NKX2.1+SOX9+細胞）の存在を示唆している。

40

50

【0343】

様々な前方細胞運命遺伝子の発現を、qPCRによって定量したところ（図9）、マウスES細胞分化の際に観察された発現パターンと比較して類似の遺伝子発現パターンが観察された。SOX2は、胚体内胚葉への分化後にダウンレギュレートされた後、前方移動後に予想されたように増加した。前方移動内胚葉細胞におけるNKX2.1、SOX9、およびFOXP2発現の劇的なアップレギュレーション（20～30倍）が、FGF2/BMP4/WNT誘導後に観察された。PAX8（甲状腺内胚葉）、PAX9（咽頭内胚葉）、およびTBX1（肺/食道より前方の咽頭内胚葉）を含む他の前方細胞運命遺伝子の発現は、FOXN1（胸腺内胚葉）のいかなる発現もなく、ごく控えめにアップレギュレートされた。併せると、内胚葉の分化スペクトルは、マウスおよびヒトプラットフォームにおいて著しく類似であった。

10

【0344】

最後に、ヒトRiPS細胞誘導NKX2.1+混合細胞集団を、皮下に生着させた（データは示していない）。免疫欠損レシピエントマウスの皮下で30日後の生着した組織において、多くのスフェアが形成された。NKX2.1+スフェアにおいて、NKX2.1+細胞のいくつかは、p63を同時発現して、これらのNKX2.1+細胞が気道基底幹細胞へと成熟したことを示している（データは示していない）。

【0345】

実施例7：要約

本明細書において、多能性幹細胞を肺複能性前駆細胞（Nkx2.1+Sox9+およびNkx2.1+FoxP2+）および気道前駆細胞（Nkx2.1+Sox2+）へと分化させるための段階的戦略を報告する。本発明者らは、胚前腸の限局化を模倣することにより、Nkx2.1+肺細胞のその後の分化が増強されたことを示す。このことは、胚形成の際の各々の個別の段階の最適化によって、各々のその後の段階で分化効率の改善が起こるという考え方に信用を与える。これらのNkx2.1+肺内胚葉細胞のいくつかは、複能性胚性肺前駆細胞および気道前駆細胞へと最終分化したが、この知見は、これまでに報告されていなかった。さらに、拘束されたNkx2.1+肺前駆細胞を生着させると、気道上皮の特異的成熟細胞マーカーを産生した。次に、本発明者らは、ヒト嚢胞性線維症iPS細胞および他のヒト多能性幹細胞株から疾患特異的肺前駆細胞を産生するようにこの戦略を適合させて、このように、ヒト肺疾患を分析するための新しいプラットフォームを作製した。

20

【0346】

さらに、ESC系を、肺発達における段階を調べるための発見ツールとして用いることができる。同様に、現在の培養系において、NKX2.1を誘導するために、BMPおよびWNTシグナル伝達に加えてFGFシグナル伝達が必要であることも証明され、このことは、前腸肺原基の付近に多数のFGFの存在により、マウス遺伝子系において定義することが難しいとされていた知見である。BMP4シグナル伝達効果の作用機序の分析によってもまた、BMP4シグナル伝達がSmad依存的経路を通して起こり、薬理的にSmadを調整すると、Nkx2.1+肺細胞分化を増強するという新規知見が明らかとなった。本発明者らはまた、同じ経路の注意深く設定された一定期間のアンタゴニズムまたはアゴニズムが、最適な分化を駆動するために必須であることも示している。たとえば、内胚葉期でNkx2.1+肺細胞を誘導するために後に必要であるWNTシグナルを初期に添加すると、Nkx2.1+細胞の形成に対して不応性である後腸腸管上皮へと内胚葉を限局させる（Spence et al., 2011; Cao et al., 2011; Sherwood et al., 2011）。このように、シグナル伝達カスケードの組み合わせのみならず、その正確なタイミングが、インビボ分化を反復するために必須である。したがって、本明細書において記述されるシステムは、マウス発達遺伝学を用いてこれまでに記述されていない肺細胞分化の機序を定義するための有用な補助プラットフォームである。

30

40

【0347】

本研究は、Nkx2.1+Sox2+近位気道前駆細胞ならびにNkx2.1+p63+二重陽性気道幹細胞が、ヒトおよびマウスの両方の多能性幹細胞から誘導されることを初めて証明した。Zaretおよび共同研究者らは、正しい増殖因子が存在するにもかかわらず（Zaret et al., 2008）、腸内胚葉が特定の組織へと分化できる能力を調節する後成的パターンを前方腸が含む

50

ことを示唆している。後成的要因に基づく内胚葉のプレパターンが、肺前駆細胞特異化を増強するために調整されうるか否かを調べることは重要であろう。

【0348】

本発明者らは、免疫欠損マウスの皮下に混合細胞集団を生着させることによって、混合細胞集団を気道上皮へと分化させることに成功した。実際に、気道前駆細胞を誘導して呼吸スフェアを形成させるためには、この混合集団内の他の細胞が必要である可能性がある。

【0349】

要約すると、本明細書において、マウスESCから、DE作製、内胚葉の前腸への前方移動、および最も初期の肺Nkx2.1+内胚葉の誘導ならびに複能性Nkx2.1+Sox9+肺前駆細胞、Nkx2.1+Sox2+胚気道前駆細胞、およびNkx2.1+p63+気道幹細胞を誘導するための強く一般的に応用可能なプロトコールが提供される。この戦略を、ヒト嚢胞性線維症iPSCから疾患特異的肺前駆細胞を作製するように適合させて、このように、ヒト肺疾患を分析するための新しいプラットフォームを確立した。これによって、疾患のモデリング、薬物スクリーニング、変異体CFTR遺伝子の遺伝子レスキュー（相同的組み換え、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはTALエフェクターヌクレアーゼを用いて）および自家移植が可能となる。さらに、この戦略は基本的に、ヒトの遺伝的に影響を受けるいかなる肺障害にも応用することができる。一般的なヒト肺疾患の遺伝学において現れつつある多量のデータを考慮すると、このプラットフォームはまた、気道上皮における候補遺伝子の生物学的有意性を試験するための出発点として役立つであろう。最後に、多数の肺上皮細胞を作製できることにより、ヒト肺上皮細胞の供給が限られていたためにこれまで可能ではなかった生化学およびプロテオーム実験が可能となりうる。

10

20

【0350】

実施例8：実験技法

マウスおよびヒト細胞株：NOD-SCID IL2R^{-/-}ヌル（NOD/SCID/IL2R^{-/-}）免疫欠損マウスを、Jackson Laboratoryから購入した。動物技法は、Massachusetts General Hospital（MGH）および国のガイドラインおよび規則に従って行われ、MGHの施設内動物取扱委員会（IACUC）の承認を受けた。ヒト嚢胞性線維症誘導多能性細胞株および胚細胞株（Hues-3およびHues-9）の使用は、MGHの胚幹細胞研究監視委員会（ESCR0）およびIRBによって審査され、承認された。

30

【0351】

マウス内胚葉前方移動およびNkx2.1細胞分化：マウス胚体内胚葉を、本明細書において記述されるように作製した。内胚葉を前方移動させるために、5日目およびその後、細胞を分割して、804G-条件培地を予めコーティングしたプレートに再播種して、D0培地+0.5~1μM A8301（CalBiochem、616454）を2日間与えた。次に、培地をD0培地によって2回すすいで、50 ng/ml BMP4、100 ng/ml FGF2（GIBCO、PHG0026）および5~10 nM GSK3iXVを添加したD0培地にさらに2~3日間切り替えた。Nkx2.1+Sox2+近位前駆細胞を作製するために、細胞をD0培地によって2回すすぎ、RA添加B27、50 ng/ml BMP7、50 ng/ml FGF7、100 nM IWR-1、および1~2μM PD98059を含むD0培地に2日間またはそれより長いあいだ切り替えた。

40

【0352】

ヒトiPSC培養および分化：ヒトiPSCを、GelTrexコーティングしたプレートにおいて完全mTeSR1培地（Stemcell）中で維持した。ビタミンAを含まない2%B27補助剤（GIBCO、12587-010）、アクチピンA（Peprotech、100 ng/ml）、およびPI3キナーゼ阻害剤LY294002（5μM）の存在下でRPMI-1640培地において3~4日間処置後に、高収率の胚体内胚葉前駆細胞が得られた。前腸内胚葉細胞を作製するために、胚体内胚葉を、Noggin（BMP4アンタゴニスト、100 ng/ml）またはドルソモルフィン（2~5μM）の存在下または非存在下で、2%B27、500 nM A-83-01（TGF β アンタゴニスト）を含むRPMI-1640培地によって4日間処置した。その後、内胚葉細胞からNkx2.1を誘導するために、細胞を、2%B27、50 ng/ml BMP4、100 ng/ml FGF2、および5 nM GSK3iXVを含むRPMI-1640培地に4日間またはそれより

50

長い期間曝露した。

【 0 3 5 3 】

免疫蛍光：各分化段階において、細胞を、新しいパラホルムアルデヒド（4%）によって室温で15分間固定して、PBSによってすすぎ、PBS+0.2%Triton X-100によって洗浄して、PBS+1%BSA中で希釈した一次抗体と共に4で終夜（>16時間）インキュベートした。インキュベーション後、細胞をPBS+0.2%Triton X-100によって4回すすぎ、二次抗体と共に室温で2時間インキュベートした。画像を、Olympus IX71倒立蛍光顕微鏡またはNikon A1共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化した。用いた一次抗体を、以下の表に要約する。

【 0 3 5 4 】

（表1）一次抗体のリスト

抗体	起源
SOX2	R&D, ヤギポリクローナル, AF2018
SOX9	R&D, ヤギポリクローナル, AF3075
SOX17	R&D, ヤギポリクローナル, AF1924
FOXP2	R&D, ヤギポリクローナル, AF5647
FOXA2	Santa Cruz technology, ヤギポリクローナル, sc-655
TUJ1	Sigma, マウスモノクローナル, T8578
PAX6	Developmental Studies Hybridoma Bank, マウスモノクローナル
PAX8	Abcam, マウスモノクローナル, ab53490
NKX2.1	Abcam, ウサギポリクローナル, ab76013
P63	Santa Cruz Technology, マウスモノクローナル, sc-56188
CDX2	BioGenex, マウスモノクローナル, CDX2-88
KI67	BD pharmaceutical, マウスモノクローナル, 556003
CCSP	Dr. Barry Stripp, Duke University Medical Center から, ヤギポリクローナル
FOXJ1	eBioscience, マウスモノクローナル, 14-9965-82
MUC5AC	Thermo Scientific, マウスモノクローナル, 2013-05

【 0 3 5 5 】

二次抗体は、Invitrogen (AlexaFluor-549およびAlexaFluor-488) から購入した。少なくとも5個の無作為な視野を倍率20倍で計数する段階ならびに平均値および標準偏差を計算する段階によって定量を行った。

【 0 3 5 6 】

胚の収集、切片の作製、および染色：所望の胚形成期の胚または肺を摘出して、新しい4%PFAによって4で6時間または終夜固定した。次に、組織をPBSによって3分間（1回あたり5分）すすいで、30%スクロースのPBS溶液中で4で終夜インキュベートした。組織をOCT中に1時間浸した後、OCT中で凍結して、厚さ7μmの凍結切片を作製した。スライドガラスを、上記のように一次および二次抗体によって染色した。

【 0 3 5 7 】

皮下生着後のマウスESCおよびヒトiPS誘導Nkx2.1+肺前駆細胞の分化：細胞 $2 \sim 5 \times 10^5$ 個を、低増殖因子Matrigel (BD Biosciences, 354230) アドバンスドDMEMの1:1混合物200μl中に浮遊させて、NOD-SCID IL2R^{-/-}ヌルマウスに皮下注射した。組織を、20~30日後に採取して調べ、冷4%パラホルムアルデヒド中で終夜固定して、PBSによって2回すすぎ、3

10

20

30

40

50

0%スクロース中に2~3時間浸した後、OCTに包埋して、7 μ mの切片を作製した。スライドガラスを、NKX2.1発現に基づいて気道上皮細胞に関して調べた。ESC誘導Nkx2.1+細胞の基底幹細胞への分化は、P63およびCK5の発現に基づき、杯細胞はMUC5ACの発現に基づき、クララ細胞はCCSPの発現に基づき、および繊毛細胞はFOXJ1の発現に基づいた。

【0358】

例示的な分化培地

段階I：ヒトES細胞およびiPS細胞から胚体内胚葉

例示的なRPMI-1640培地に基づく分化培地は、2%B-27(レチノイン酸を含まない)、0.1%Albumax II、1x Glutamax、1x 非必須アミノ酸(NEAA)、5 μ M LY294002(PI3K阻害剤)、および100 ng/mlアクチピンAを含みうる。いくつかの態様において、5 μ M LY294002 および/または100 ng/mlアクチピンAを用いる。しかし、LY294002は、たとえば2~10 μ Mの範囲内で用いることができ、アクチピンAは、たとえば75~150 ng/mlの範囲内で用いることができる。いくつかの態様において、段階Iの処置期間の長さは4~5日である。

10

【0359】

段階II：胚体内胚葉から前方前腸内胚葉

段階IIのためのRPMI-1640培地に基づく分化培地は、2%B-27(レチノイン酸を含まない)、0.1%Albumax II、1x Glutamax、1x 非必須アミノ酸(NEAA)、0.5~2 μ M TGF アンタゴニストA8301、100~500 nM WNTアンタゴニストIWR-1を含みうる。いくつかの態様において、処置期間の長さは2~4日である。

【0360】

段階III：前方前腸細胞からNkx2.1+細胞

段階IIIのための例示的なRPMI-1640に基づく分化培地は、2%B-27(RA添加)、0.1%Albumax II、1x Glutamax、1x 非必須アミノ酸(NEAA)、20~200 nM BMP4、20~200 ng/ml FGF2、5~50 nM GSK3iXV(またはGSK3iXVの代わりに100~1000 nM CHIR-99021)を含みうる。いくつかの態様において、処置期間の長さは約4~6日である。

20

【0361】

段階IV：Nkx2.1初期肺内胚葉細胞からNkx2.1+Sox2+近位気道およびNkx2.1+p63+気道基底幹細胞

例示的なRPMI-1640に基づく培地は、2%B-27(RA添加)、0.1%Albumax II、1x Glutamax、1x 非必須アミノ酸(NEAA)、20~100 ng/ml BMP7、20~100 ng/ml FGF7、50~100 ng/ml IWR-1(WNTアンタゴニスト)、および1~2 μ M PD98059(MAPKK/ERKアンタゴニスト)を含みうる。いくつかの態様において、処置期間の長さは約4~6日である。

30

【0362】

第二の例示的な分化培地は、本明細書において図12に示される。

【0363】

実施例において引用された参考文献

Ameri, J., Stahlberg, A., Pedersen, J., Johansson, J.K., Johannesson, M.M., Artner, I., and Semb, H. FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 28, 45-56.

Aubin, J., Davy, A., and Soriano, P. (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes & development* 18, 1482-1494.

10

Bellusci, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., and Hogan, B.L. (1996). Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* (Cambridge, England) 122, 1693-1702.

Cao, L., Gibson, J.D., Miyamoto, S., Sail, V., Verma, R., Rosenberg, D.W., Nelson, C.E., and Giardina, C. Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 81, 1-10.

20

Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* (Chur, Switzerland) 22, 233-241.

Clarke, L.L., Grubb, B.R., Gabriel, S.E., Smithies, O., Koller, B.H., and Boucher, R.C. (1992). Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* (New York, NY) 257, 1125-1128.

Coraux, C., Nawrocki-Raby, B., Hinnrasky, J., Kileztky, C., Gaillard, D., Dani, C., and Puchelle, E. (2005). Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 87-92.

10

Domyan, E.T., Ferretti, E., Throckmorton, K., Mishina, Y., Nicolis, S.K., and Sun, X. Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Development* (Cambridge, England) 138, 971-981.

Evans, M.J., Van Winkle, L.S., Fanucchi, M.V., and Plopper, C.G. (2001). Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Experimental lung research* 27, 401-415.

20

Gontan, C., de Munck, A., Vermeij, M., Grosveld, F., Tibboel, D., and Rottier, R. (2008). Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Developmental biology* 317, 296-309.

Goss, A.M., Tian, Y., Tsukiyama, T., Cohen, E.D., Zhou, D., Lu, M.M., Yamaguchi, T.P., and Morrissey, E.E. (2009). Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Developmental cell* 17, 290-298.

30

Green, M.D., Chen, A., Nostro, M.C., d'Souza, S.L., Schaniel, C., Lemischka, I.R., Gouon-Evans, V., Keller, G., and Snoeck, H.W. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 267-272.

Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G.P., and Radzioch, D. (2007). Cystic fibrosis mouse models. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 1-7.

40

Kozawa, O., Hatakeyama, D., and Uematsu, T. (2002). Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry* 84, 583-589.

Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M., and Di Lauro, R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development (Cambridge, England)* 113, 1093-1104.

Lebeche, D., Malpel, S., and Cardoso, W.V. (1999). Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mechanisms of development* 86, 125-136.

Malpel, S., Mendelsohn, C., and Cardoso, W.V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 127, 3057-3067.

10

Minoo, P., Su, G., Drum, H., Bringas, P., and Kimura, S. (1999). Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Developmental biology* 209, 60-71.

Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of biochemistry* 147, 35-51.

20

Morrissey, E.E., and Hogan, B.L. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell* 18, 8-23.

Okubo, T., and Hogan, B.L. (2004). Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *Journal of biology* 3, 11.

30

Perl, A.K., Kist, R., Shan, Z., Scherer, G., and Whitsett, J.A. (2005). Normal lung development and function after *Sox9* inactivation in the respiratory epithelium. *Genesis* 41, 23-32.

Powell, P.P., Wang, C.C., Horinouchi, H., Shepherd, K., Jacobson, M., Lipson, M., and Jones, R. (1998). Differential expression of fibroblast growth factor receptors 1 to 4 and ligand genes in late fetal and early postnatal rat lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 19, 563-572.

40

Que, J., Choi, M., Ziel, J.W., Klingensmith, J., and Hogan, B.L. (2006). Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for *noggin* and *Bmps*. *Differentiation; research in biological diversity* 74, 422-437.

Que, J., Luo, X., Schwartz, R.J., and Hogan, B.L. (2009). Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development (Cambridge, England)* 136, 1899-1907.

Rawlins, E.L., Clark, C.P., Xue, Y., and Hogan, B.L. (2009). The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development (Cambridge, England)* 136, 3741-3745.

Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., and Hogan, B.L. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12771-12775.

10

Rock, J.R., Randell, S.H., and Hogan, B.L. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms* 3, 545-556.

20

Roszell, B., Mondrinos, M.J., Seaton, A., Simons, D.M., Koutzaki, S.H., Fong, G.H., Lelkes, P.I., and Finck, C.M. (2009). Efficient derivation of alveolar type II cells from embryonic stem cells for in vivo application. *Tissue Eng Part A* 15, 3351-3365.

Sakiyama, J., Yamagishi, A., and Kuroiwa, A. (2003). Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development (Cambridge, England)* 130, 1225-1234.

30

Samadikuchaksaraei, A., Cohen, S., Isaac, K., Rippon, H.J., Polak, J.M., Bielby, R.C., and Bishop, A.E. (2006). Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue engineering* 12, 867-875.

Serls, A.E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J.M., and Deutsch, G.H. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development (Cambridge, England)* 132, 35-47.

40

Sherwood, R., Maehr, R., Mazzoni, E.O., and Melton, D.A. (2011). Wnt Signaling Specifies and Patterns Intestinal Endoderm. *Mechanisms of development* In press.

Shu, W., Guttentag, S., Wang, Z., Andl, T., Ballard, P., Lu, M.M., Piccolo, S., Birchmeier, W., Whitsett, J.A., Millar, S.E., et al. (2005). Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung. *Developmental biology* 283, 226-239.

Shu, W., Lu, M.M., Zhang, Y., Tucker, P.W., Zhou, D., and Morrissey, E.E. (2007). Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development (Cambridge, England)* 134, 1991-2000. 10

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 20, 343-355.

Snouwaert, J.N., Brigman, K.K., Latour, A.M., Malouf, N.N., Boucher, R.C., Smithies, O., and Koller, B.H. (1992). An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science (New York, NY)* 257, 1083-1088. 20

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105-109.

Van Haute, L., De Block, G., Liebaers, I., Sermon, K., and De Rycke, M. (2009). Generation of lung epithelial-like tissue from human embryonic stem cells. *Respiratory research* 10, 105. 30

Van Vranken, B.E., Romanska, H.M., Polak, J.M., Rippon, H.J., Shannon, J.M., and Bishop, A.E. (2005). Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium. *Tissue engineering* 11, 1177-1187.

von Bubnoff, A., and Cho, K.W. (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Developmental biology* 239, 1-14. 40

Wang, D., Haviland, D.L., Burns, A.R., Zsigmond, E., and Wetsel, R.A. (2007). A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4449-4454.

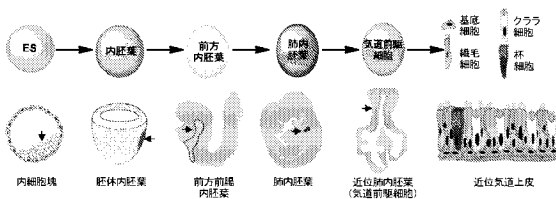
Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630.

Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature neuroscience* 8, 288-296.

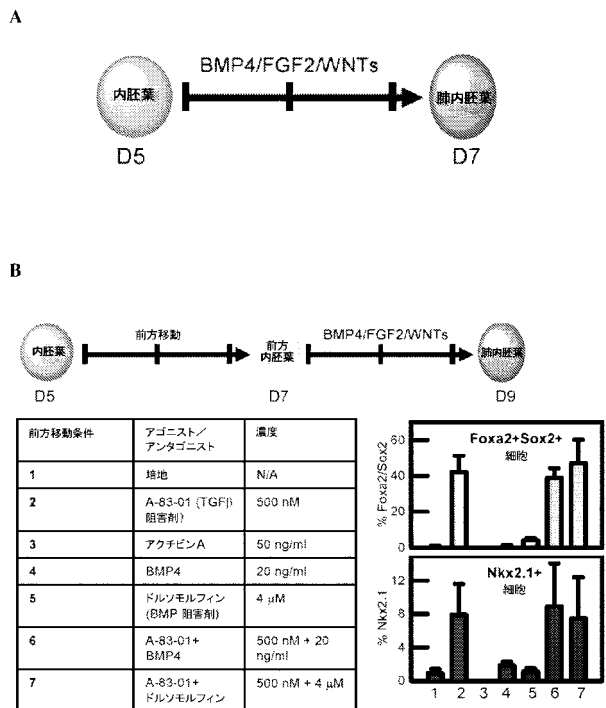
10

Weaver, M., Yingling, J.M., Dunn, N.R., Bellusci, S., and Hogan, B.L. (1999). Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* (Cambridge, England) 126, 4005-4015.

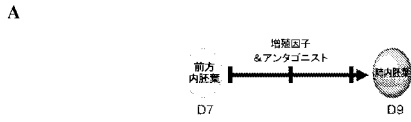
【 図 1 】



【 図 2 】



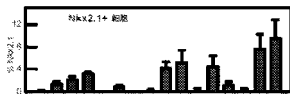
【 図 3 】



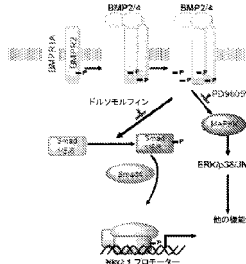
B

増殖因子 & アンタゴニスト	濃度	
1	増殖	76 nM
2	BMP4	10 ng/ml
3	BMP4	25 ng/ml
4	BMP4	100 ng/ml
5	BMP4 + フォンモルフィン	10 ng/ml + 5 μM
6	BMP4 + FGF2	10 ng/ml + 1 μM
7	FGF2	25 ng/ml
8	FGF2	100 ng/ml
9	BMP4 + FGF2	10 ng/ml + 10 ng/ml
10	BMP4 + FGF2	10 ng/ml + 100 ng/ml
11	BMP4 + FGF2 + FGF17/207A	10 ng/ml + 20 ng/ml + 1 μM
12	BMP4 + GSK3i	10 ng/ml + 10 μM
13	BMP4 + GSK3i	10 ng/ml + 500 nM
14	BMP4 + Ndf1	10 ng/ml + 1 μM
15	BMP4 + FGF2 + GSK3i	10 ng/ml + 10 ng/ml + 10 μM
16	BMP4 + FGF2 + GSK3i	20 ng/ml + 100 ng/ml + 10 μM

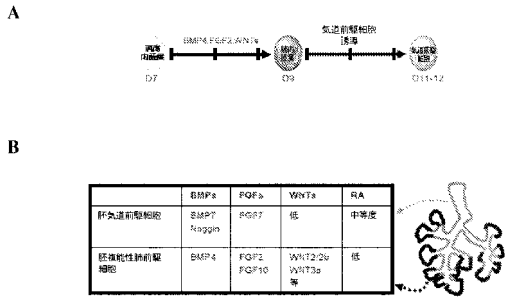
C



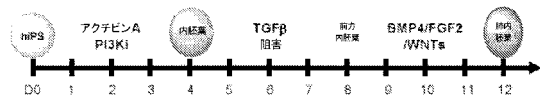
【 図 4 】



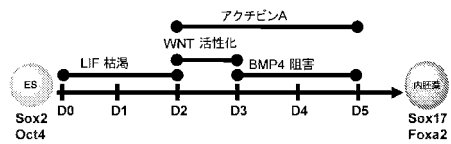
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

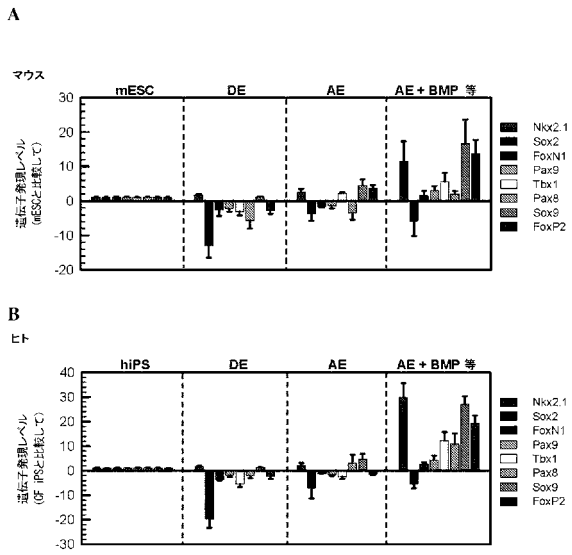


【 図 8 】

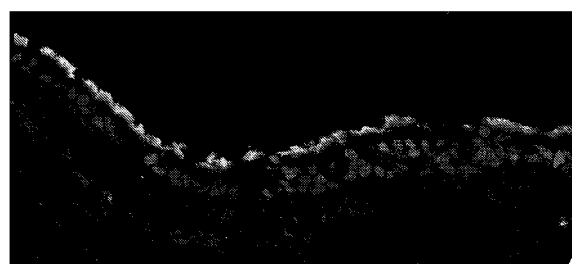
マーカー	脳	甲状腺	肺
Sox2	あり	なし	近位気道前駆細胞
Tuj1	あり	なし	なし
Pax8	なし	あり	なし

E9.5 胚 (Embryo)

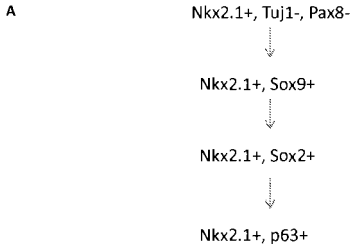
【 図 9 】



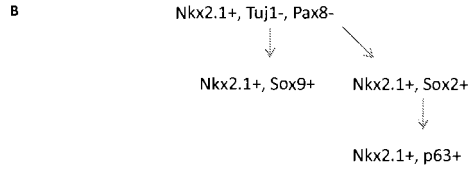
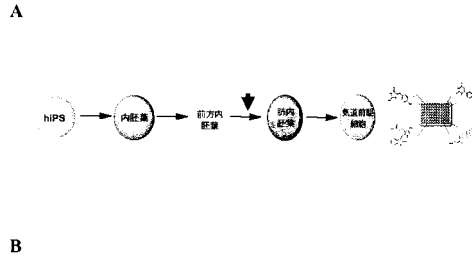
【 図 10 】



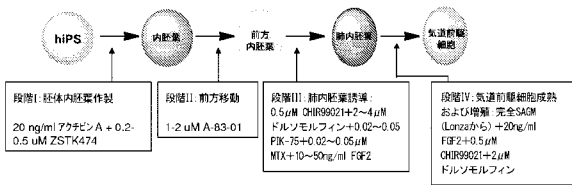
【 図 1 1 】



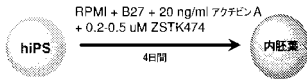
【 図 1 4 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



化合物名	総細胞数中の Nkx2.1 の割合	カテゴリ
対照	10~25%	
GF-109203X	45% まで	PKC アンタゴニスト
Ro 31-8220	70% まで	
Pp242	45% まで	PI3K アンタゴニスト
PIK 75	85% まで	
ZSTK474	55% まで	
PMA 等	80% まで	MEK1/2 アゴニスト
カルベジロール	50% まで	FDA 臨床薬
コレステロン	50% まで	
トリクラベンダゾール	80% まで	
リン酸ベンプロレリン	85% まで	
フェノチアジン	85% まで	
メトレキサート	85% まで	

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2013/021186
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		<i>C12N 5/071 (2010.01)</i> <i>C12N 5/077 (2010.01)</i> <i>A61K 35/42 (2006.01)</i> <i>A61K 48/00 (2006.01)</i> <i>A61P 11/00 (2006.01)</i> <i>C12Q 1/68 (2006.01)</i>
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N 5/071, 5/077, A61K 35/42, 48/00, A61P 11/00, C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PatSearch, EMBL, NCBI, PAJ, Esp@cenet, DWPI, PCT Online, USPTO DB, CIPO, (Canada PO), SIPO DB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	BEERS MICHAEL F. et al. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. The Journal of Clinical Investigation, 2011, Vol. 121, no. 6, pp. 2065-2073, especially, pp. 2065-2067, 2071-2072, fig. 1-4, table 1	1, 3-11, 13, 66-70 14-20, 22-30, 32-38, 54, 56, 64, 85-89 2, 12, 21, 31, 39-52, 55, 57, 71-84, 104- 113
X	QUE J. et al. "Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm". Development, 2007, Vol. 134, pp. 2521-2531, especially, abstract, pp. 2521, 2524-2529, fig. 1, 2, 8	1, 3, 8-11, 13
Y	WO 2011/003422 A1 (COLOPLAST A/S) 13.01.2011, claims, pp. 2-4, 6-8, 10-22, 25-37	14-20, 22-30, 32-38, 54, 56, 64, 85-89
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 April 2013 (10.04.2013)	25 April 2013 (25.04.2013)	
Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1	Authorized officer	
Facsimile No. +7 (499) 243-33-37	I. Goretova	
	Telephone No. (495)531-65-15	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2013/021186
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Tsentr mediko-biologicheskikh tekhnologiy. Kletchnaya terapiya bolezney legkikh, 08.02.2006, pp.1-14, [retrieved on 09.04.2013] Retrieved from the Internet:<URL:http://www.cmbt.su/eng/science/science81.html>	53, 58-63 54-57, 64, 65
Y	WO 2007/056578 A1 (ATHERSYS INC. et al) 18.05.2007, claims, paragraphs [0216] - [0217]	65
Y	WO 2011/031875 A2 (FATE THERAPEUTICS INC et al) 17.03.2011, claims	85-88
Y	WO 2010/136583 A2 (NOVO NORDISK A/S et al) 02.12.2010, claims, pp. 3-4, 6-10, example 5, fig. 3	89
Y	ODESSA YABUT et al. The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. AGING, May 2011, Vol. 3, no. 5, pp. 494-508, table 1	90-96, 114-120
Y	YAGUCHI S. et al. Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. Journal of the National Cancer Institute, 2006, Vol. 98, no. 8, pp. 545-556, fig. 6	90-103
Y	WO 2011/157029 A1 (INST BIOPHYSICS CN ACAD SCI et al) 22.12.2011, paragraphs [0036], [0039] - [0040], [0049] - [0050], [0060] - [0061]	97-103
Y	EMMAJAYNE KINGHAM et al. Distinct roles for isoforms of the catalytic subunit of class-IA PI3K in the regulation of behaviour of murine embryonic stem cells. Journal of Cell Science, 2009, Vol. 122, pp. 2311-2321, especially, fig. 5-7, pp. 2315-2317, 2319-2320	97-103
Y	SPYRIDON CHAMPERIS TSANIRAS et al. Generating pancreatic β -cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways. Journal of Endocrinology, 2010, Vol. 206, pp. 13-26, especially, table 1, p. 16	114-120
Y	US 2007/0259423 A1 (JON ODORICO et al) 08.11.2007, fig. 3, 4, 9,10, pp. 2-3, example 4	114-120

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00		
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68		A

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

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ラージャゴープル ジャヤラジ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リンカーン ディアヘブン ロード 5 0

(72) 発明者 モウ ホンメイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 メドフォード シドニー ストリート 1 0 5

F ターム (参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR48 QR55 QR62

QR69 QR72 QR77 QS25 QS33 QS36 QX02

4B065 AA90X AA93X AC20 BB05 BB18 BB19 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 AA03 CA04 MA13 NA14 ZA59

4H045 AA10 AA30 BA14 EA20