

(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2019-528773

(P2019-528773A)

(43) 公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------------|-------------|
| C 1 2 N 5/078 (2010.01) | C 1 2 N 5/078 Z N A | 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| C 1 2 N 5/073 (2010.01) | C 1 2 N 5/073 | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 1 0 0 | |
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N 15/113 Z | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) | | |

(21) 出願番号 特願2019-518284 (P2019-518284)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月5日 (2017.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月4日 (2019.6.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/055353
 (87) 国際公開番号 W02018/067826
 (87) 国際公開日 平成30年4月12日 (2018.4.12)
 (31) 優先権主張番号 62/404,430
 (32) 優先日 平成28年10月5日 (2016.10.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 510003830
 フジフィルム セルラー ダイナミクス、
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 11, マディソン, サイエンス ドラ
 イブ 525, スイート 200, ユ
 ニバーシティ リサーチ パーク
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 ラジェシュ ディーピカ
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 11 マディソン サイエンス ドライブ
 525 スイート 200 セルラー
 ダイナミクス インターナショナル イン
 コーポレイテッド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MeCP2が破壊された誘導多能性幹細胞からの成熟系列の生成

(57) 【要約】

本明細書に提供されるのは、MeCP2遺伝子が破壊された多能性細胞の効率的な *in vitro* 維持、拡大、培養、および/または種々のエリスロイド系列、ミエロイド系
 列、リンフォイド系列、もしくは内胚葉系列、とくに成熟赤血球への分化の方法である。
 多能性細胞は、規定条件下で維持および分化を行う。そのため、ある特定の実施形態
 では、マウスフィーダー細胞または血清の使用は前駆細胞の分化に必要とされない。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多能性幹細胞 (PSC) に由来する造血前駆細胞 (HPC) をエリスロイド細胞、リンフォイド細胞、またはミエロイド細胞に分化させる方法であって、破壊されたメチル CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) を呈する HPC を得ること、およびエリスロイド分化、ミエロイド分化またはリンフォイド分化を促進する条件下で前記 HPC を培養することにより、エリスロイド細胞、ミエロイド細胞またはリンフォイド細胞を産生することを含む方法。

【請求項 2】

前記 HPC が、メチル化 DNA に本質的に結合しない非機能性 MeCP2 を発現する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記 HPC が、MeCP2 の DNA 結合活性を発揮するのに十分なレベルで MeCP2 を発現しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 MeCP2 が、MeCP2 遺伝子のトランケーション、エクソンスキッピング、または突然変異により非機能性である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

破壊された MeCP2 を呈する HPC を得ることが、前記 HPC と、MeCP2 に対する siRNA、shRNA または低分子阻害剤とを接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記 siRNA または shRNA が野生型 MeCP2 および変異体 MeCP2 の両方を破壊する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

破壊された MeCP2 を呈する HPC を得ることが、PSC と、MeCP2 に対する siRNA、shRNA、タンパク質阻害剤、または低分子阻害剤とを接触させること、および前記 PSC を分化させて HPC を産生することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

破壊された MeCP2 を呈する HPC を得ることが、MeCP2 の発現、活性、および / または機能を破壊するように PSC を工学操作すること、および前記 PSC を分化させて HPC を産生することを含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 9】

工学操作することが MeCP2 遺伝子の遺伝子破壊を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子破壊が、MeCP2 のメチル CpG 結合ドメインの前への停止コドンの挿入を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記停止コドンの挿入が DNA 結合ドメインの導入を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 DNA 結合ドメインがジンクフィンガー、TALE、または CRISPR の DNA 結合ドメインである、請求項 11 に記載の方法。 40

【請求項 13】

前記 PSC が誘導多能性幹細胞 (iPSCs) である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 iPSC がエピソーム的にリプログラムされた iPSC である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 iPSC がウイルス的にリプログラムされた iPSC である、請求項 13 に記載の方法。 50

【請求項 16】

前記 iPSC が 9025、SONL、TIPSE、A系、H系、またはG系 iPSC である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 PSC が哺乳動物多能性細胞である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 PSC を分化させて HPC を産生することが、

(a) 少なくとも 1 つの成長因子を含む第 1 の規定培地で前記 PSC を培養すること、

(b) 複数の細胞の分化を促進するのに十分な量の BMP4 および VEGF および bFGF を含む第 2 の規定培地で前記細胞を培養すること、および

(c) 複数の細胞の分化を促進するのに十分な量の IL-3、Flt3 リガンド、および IL-6 を含む第 3 の規定培地で前記細胞を培養することにより HPC を産生すること、の逐次工程を含む、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 19】

工程 (a) の前に、前記 PSC が 5 ~ 10 継代にわたり低酸素に適合化される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 HPC が、CD43、CD34、CD31、CD41、CD235、DLL4、および CD45 からなる群から少なくとも 2 つのマーカーを発現する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

CD34 と CD43 とを発現する HPC がリンフォイド分化を促進するように低酸素条件下で培養される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記方法が、20%未満の酸素の大気圧で前記細胞を培養することを含む、請求項 1 または 18 に記載の方法。

【請求項 23】

前記方法が、5%未満の酸素の大気圧で前記細胞を培養することを含む、請求項 1 または 18 に記載の方法。

【請求項 24】

複数の前記多能性細胞が胚様体 (EB) を形成する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

前記ミエロイド細胞が、マクロファージ、肥満細胞、赤血球、巨核球、血小板、樹状細胞、単球、好塩基球、好酸球、好中球、多形核顆粒球、マイクログリア、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ミエロイド細胞がマイクログリアである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記エリスロイド細胞が赤血球または赤芽球である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記赤血球が除核されている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記赤血球が グロビンを発現する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記赤血球が、 グロビンおよび / または グロビンの発現と比較して グロビンをより多く発現する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記リンフォイド細胞が T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、または T/NK 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

エリスロイド分化を促進するように前記細胞を培養することが、

(i) 赤芽球を生成させるように e x c y t e とホロトランスフェリンとを含む規定培地で前記 H P C を培養すること、および

(i i) エリスロイド細胞富化集団を産生するように拡大条件下で前記赤芽球を培養すること、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記規定培地が 1 種以上のサイトカインをさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 1 種以上のサイトカインが、幹細胞因子 (S C F)、F l t - 3 リガンド (F l t 3 L)、トロンボポイエチン (T P O)、インターロイキン 3 (I L - 3)、およびインターロイキン 6 (I L - 6) からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

前記拡大条件が、I L - 3、I L - 6、および T P O が本質的にフリーの規定培地で培養することを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

工程 (i) および / または工程 (i i) が、1 ~ 2 週間培養することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記エリスロイド細胞富化集団が 7 0 % 超のエリスロイド細胞を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

20

【請求項 3 8】

前記エリスロイド細胞富化集団が 8 0 % 超のエリスロイド細胞を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記エリスロイド細胞が C D 7 1、C D 2 3 5 a、および / または C D 3 6 を発現する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

ミエロイド分化を促進するように前記細胞を培養することが、

(a) マイクログリアを生成させるのに十分な時間にわたり M C S F と T G F と I L - 3 4 とを含む規定マイクログリア培地で前記 H P C を培養すること、および

30

(b) C D 2 0 0 と C X C L 1 とをさらに含む規定マイクログリア培地で前記マイクログリアを成熟させることによりマイクログリア集団を産生すること、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記マイクログリア集団が、I B A、P 2 R Y、および / または T R E M - 2 が陽性の細胞を少なくともを 2 5 % 含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記マイクログリア集団が、I B A、P 2 R Y、および / または T R E M - 2 が陽性の細胞を少なくともを 5 0 % 含む、請求項 4 0 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

リンフォイド分化を促進するように前記細胞を培養することが、

(i) N o t c h リガンドを含むマトリックス被覆プレート上の規定培地で C D 3 4 および / または C D 4 3 を発現する H P C を培養すること、および

(i i) 1 種以上のサイトカインの存在下で前記培養を維持することによりリンフォイド細胞を産生すること、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記細胞が 5 % 未満の酸素の大気圧で培養される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

50

前記規定培地がアスコルビン酸および/またはニコチンアミドを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記アスコルビン酸が50 μM ~ 1 mMの濃度で存在する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記アスコルビン酸が100 μM ~ 200 μMの濃度で存在する、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

前記ニコチンアミドが0.1 mM ~ 5 mMの濃度で存在する、請求項45に記載の方法。

【請求項49】

前記マトリックスがレトロネクチン、コラーゲン、ラミニン、またはフィブロネクチンである、請求項43に記載の方法。

【請求項50】

前記NotchリガンドがDLL4である、請求項43に記載の方法。

【請求項51】

前記DLL4がDLL4:Fcキメラタンパク質である、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

前記リンフォイド細胞がCD4を本質的に発現しない、請求項43に記載の方法。

【請求項53】

前記リンフォイド細胞が、CD8、CD7、CD45、CD5、TCR、およびCD3からなる群から選択されるマーカーを1つ以上発現する、請求項43に記載の方法。

【請求項54】

前記リンフォイド細胞の5%超が前記マーカーの少なくとも2つに関して陽性である、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記リンフォイド細胞の10%超が前記マーカーの少なくとも2つに関して陽性である、請求項53に記載の方法。

【請求項56】

PSCに由来する胚体内胚葉(DE)細胞を内胚葉細胞に分化させる方法であって、破壊されたメチルCpG結合タンパク質2(MeCP2)を呈するDE細胞を得ること、および内胚葉分化を促進する条件下でDEを培養することにより内胚葉細胞を産生することを含む方法。

【請求項57】

内胚葉分化を促進する条件下で前記DE細胞を培養することが、前記DE細胞を内胚葉前駆細胞(EPC)に分化させることを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記DE細胞および/またはEPCが、メチル化DNAに本質的に結合しない非機能性MeCP2を発現する、請求項56または57に記載の方法。

【請求項59】

前記DE細胞および/またはEPCが、MeCP2のDNA結合活性を発揮するのに十分なレベルでMeCP2を発現しない、請求項56または57に記載の方法。

【請求項60】

前記MeCP2が、MeCP2遺伝子のトランケーション、エクソンスキッピング、または突然変異により非機能性である、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

破壊されたMeCP2を呈するDE細胞またはEPCを得ることが、HPCと、MeCP2に対するsiRNA、shRNA、または低分子阻害剤とを接触させることを含む、請求項56または57に記載の方法。

【請求項62】

前記siRNAまたはshRNAが野生型MeCP2および変異体MeCP2の両方を破

10

20

30

40

50

壊する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

破壊された MeCP2 を呈する DE 細胞または EPC を得ることが、PSC と、MeCP2 に対する siRNA、shRNA、タンパク質阻害剤、または低分子阻害剤とを接触させること、および前記 PSC を分化させて DE 細胞または EPC を産生することを含む、請求項 5 6 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 4】

破壊された MeCP2 を呈する DE 細胞または EPC を得ることが、MeCP2 の発現、活性、および / または機能を破壊するように PSC を工学操作すること、および前記 PSC を分化させて DE 細胞または EPC を産生することを含む、請求項 5 6 または 5 7 に記載の方法。

10

【請求項 6 5】

工学操作することが MeCP2 遺伝子の遺伝子破壊を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

遺伝子破壊が MeCP2 のメチル CpG 結合ドメインの前への停止コドンの挿入を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記停止コドンの挿入が DNA 結合ドメインの導入を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記 DNA 結合ドメインがジンクフィンガー、TALE、または CRISPR の DNA 結合ドメインである、請求項 6 7 に記載の方法。

20

【請求項 6 9】

前記 PSC が誘導多能性幹細胞 (iPSCs) である、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記 PSC が哺乳動物多能性細胞である、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記内胚葉細胞が 細胞、 細胞、 細胞、または肝細胞である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 PSC を分化させて DE 細胞を産生することが、
 (a) MTG とアクチビン A とを含む培地で前記 PSC を培養すること、
 (b) アスコルビン酸と BMP4 と bFGF と VEGF とをさらに含む培地で前記細胞を培養すること、および
 (c) DE 細胞を産生するのに十分な時間にわたり BMP4 と bFGF とアクチビン A と VEGF とを含む培地で前記細胞をさらに培養すること、
 の逐次工程を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

30

【請求項 7 3】

前記 DE 細胞を EPC に分化させることをさらに含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記 EPC が CXCR4 / CD117 および / または CD34 を発現する、請求項 7 3 に記載の方法。

40

【請求項 7 5】

内胚葉分化を促進する条件下で前記 DE 細胞を培養することが、細胞集団を産生するのに十分な時間にわたりアクチビン A と BMP4 と TGF と EGF と VEGF と HGF とを含む培地で前記 DE 細胞を培養することを含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記 細胞集団が少なくとも 25% の PDX1 陽性細胞を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 7】

50

前記 細胞集団が少なくとも20%のNeuroD1陽性細胞を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項78】

前記 細胞集団が少なくとも5%のNKX6.1陽性細胞を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項79】

内胚葉分化を促進する条件下で前記DE細胞を培養することが、

(a) 低酸素条件下でBMP4、bFGF、EGF、VEGF、HGF、Dex、DMSO、および/またはFGF-10を含む培地で前記DE細胞を培養すること、

(b) DAPTとビタミンKとを含む培地で前記細胞をさらに培養すること、および

(c) 肝細胞集団を産生するのに十分な時間にわたりDAPTおよびビタミンKが本質的にフリーの培地で前記細胞を分化させること、

を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項80】

前記肝細胞集団が少なくとも20%のアルブミン陽性細胞を含む、請求項79に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016年10月5日出願の米国仮特許出願第62/404,430号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に基づく利益を主張する。

【0002】

本発明は、一般的には、分子生物学の分野に関する。より特定的には、MeCP2が破壊された前駆細胞から中胚葉、たとえば、エリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフォイド細胞、および内胚葉系列を産生するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

造血前駆細胞(HPC)の医学的可能性がかなりあるため、HPCからエリスロイド系列、ミエロイド系列、およびリンフォイド系列への分化方法の改善を試みた実質的研究が行われてきた。とくに、ヒト赤血球新生のin vitroモデルは、正常状態および病的状態におけるエリスロイド分化の機序を研究するのに有用である。赤血球新生は、造血幹細胞(HSC)から成熟赤血球(RBC)への分化および増殖のプロセスを規定する。成人では、エリスロイド分化により約 2×10^{11} 赤血球/日が産生される。エリスロイド系列の発生は、増殖促進因子と分化誘導因子との相反作用の微妙なバランスを必要とする。赤血球新生の通常利用可能なin vitroアッセイのほとんどは、ネズミMEL細胞系やヒトK562、HEL、UT7細胞系などの細胞系に基づく。しかしながら、不死化をもたらすトランスフォーメーションプロセス時に多くのレギュラトリー経路が改変されてしまうので、細胞系は赤血球新生の全プロセスを通常再現しない。そのほか、これらのモデルは、中程度の増殖を示すにすぎないかまたは最終分化の不在および除核を示す(Scicchitano et al., 2003)。

【0004】

成熟RBCの現在の産生方法は、エリスロイドプロジェニターとヒト胎児肝間質細胞(hFLSC)などの間質細胞との共培養を必要とする(Xiet al., 2013)。しかしながら、フィーダー細胞系と共にHPCを培養すると、共培養時の種間暴露に以前から関連付けられてきた予想外のトランスフォーメーションのリスクを生じる。ヒトHPC培養の目的の1つは、最終的に人体に移植可能な組織を形成することであるので、HPCは、他の種の細胞にも他の種の細胞培養に使用された媒体にも暴露されないことがきわめて望ましい。したがって、ヒトHPC分化技術の開発を継続する中で、いかなる種類の共培養工程も伴うことなくヒトHPC細胞からエリスロイド系列、ミエロイド系列またはリンフォイド系列の細胞への分化を可能にする方法に大きな関心が寄せられている。そ

10

20

30

40

50

のため、フィーダー細胞を用いることなくHPCをエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフォイド細胞、および内胚葉細胞、たとえば、成熟赤血球、T細胞、NK細胞、T/NK細胞、およびマイクログリアに効率的に分化させる方法についての明確な必要性が現在存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一実施形態では、メチルCpG結合タンパク質2 (MeCP2) の発現が破壊された誘導多能性幹細胞 (iPSC) などのPSCの産生方法が提供される。いくつかの態様では、PSCは、MeCP2の発現、活性、および/または機能を破壊するように工学操作される。いくつかの態様では、工学操作は、MeCP2遺伝子の遺伝子破壊を含む。特定の態様では、遺伝子破壊は、MeCP2のメチルCpG結合ドメインの前への停止コドンの挿入を含む。ある特定の態様では、停止コドンの挿入は、DNA結合ドメインの導入を含む。たとえば、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガー、TALE、またはCRISPRのDNA結合ドメインである。いくつかの態様では、iPSCなどのPSCは、哺乳動物たとえばヒトiPSCである。いくつかの態様では、MeCP2破壊は、iPSCのメチル化状態の改変をもたらし、たとえば、成熟系列への分化能が向上したiPSCを産生する。さらなる態様では、MeCP2ノックアウト (MeCP2KO) などのMeCP2破壊が行われたiPSCは、造血前駆細胞 (HPC)、胚体内胚葉 (DE) 細胞、または内胚葉前駆細胞 (EPC) などの前駆細胞に分化される。これらの前駆細胞は、成熟系列細胞、たとえば、赤血球、巨核球、マクロファージ、マイクログリア、T細胞、NK細胞、NK/T細胞、B細胞、細胞、樹状細胞たとえば形質細胞様樹状細胞、および肝細胞にさらに分化しうる。

10

20

【0006】

別の実施形態では、本開示は、HPCから成熟系列の細胞、たとえば、エリスロイド系列、ミエロイド系列、およびリンフォイド系列の細胞を生成させる方法を提供する。さらなる実施形態では、破壊されたMeCP2を呈するHPCを得ること、エリスロイド分化、ミエロイド分化、またはリンフォイド分化を促進する条件下でHPCを培養することによりエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、またはリンフォイド細胞を産生することを含む、PSC由来のHPCからエリスロイド細胞、リンフォイド細胞またはミエロイド細胞への分化方法が提供される。

30

【0007】

いくつかの態様では、HPCは、メチル化DNAに本質的に結合しない非機能性MeCP2を発現する。ある特定の態様では、HPCは、MeCP2のDNA結合活性を発揮するのに十分なレベルでMeCP2を発現しない。特定の態様では、MeCP2は、MeCP2遺伝子のトランケーションまたは突然変異により非機能性である。

【0008】

いくつかの態様では、破壊されたMeCP2を呈するHPCを得ることは、HPCとMeCP2に対するsiRNA、shRNA、または低分子阻害剤とを接触させることを含む。いくつかの態様では、タンパク質阻害剤は、MeCP2を破壊するために使用される。ある特定の態様では、siRNAまたはshRNAは、野生型MeCP2および突然変異体MeCP2の両方を破壊する。他の態様では、破壊されたMeCP2を呈するHPCを得ることは、PSCとMeCP2に対するsiRNA、shRNA、または低分子阻害剤とを接触させること、およびPSCを分化させてHPCを産生することを含む。

40

【0009】

ある特定の態様では、破壊されたMeCP2を呈するHPCを得ることは、MeCP2の発現、活性、および/または機能を破壊するようにiPSCなどのPSCを工学操作すること、およびPSCを分化させてHPCを産生することを含む。いくつかの態様では、工学操作は、MeCP2遺伝子の遺伝子破壊を含む。特定の態様では、遺伝子破壊は、MeCP2のメチルCpG結合ドメインの前への停止コドンの挿入を含む。ある特定の態様

50

では、停止コドンの挿入は、DNA結合ドメインの導入を含む。たとえば、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガー、T A L E、またはC R I S P RのDNA結合ドメインである。いくつかの態様では、P S Cは、ヒトP S Cなどの哺乳動物多能性細胞である。特定の態様では、P S Cは、ヒトi P S C、たとえば、ウイルス的リプログラムi P S Cまたはエピソーム的リプログラムi P S Cである。たとえば、i P S Cは、9 0 2 5、S O N L、T i P S 1 E、A系、H系、またはG系i P S Cでありうる。

【0010】

ある特定の態様では、P S Cを分化させてH P Cを産生することは、(a)少なくとも1つの成長因子を含む第1の規定培地でP S Cを培養すること、(b)複数の細胞の分化を促進するのに十分な量のB M P 4、V E G F、およびb F G Fを含む第2の規定培地で細胞を培養すること、および(c)複数の細胞の分化を促進するのに十分な量のI L - 3、F l t 3リガンド、およびI L - 6を含む第3の規定培地で細胞を培養することにより複数のP S CをH P Cに分化させること、の逐次工程を含む。いくつかの態様では、H P Cは、C D 4 3、C D 3 4、C D 3 1、C D 4 1、C D 2 3 5、およびC D 4 5からなる群から少なくとも2つのマーカーを発現し、たとえば、C D 4 3およびC D 3 4の両方が陽性である。いくつかの態様では、工程(a)の前に、P S Cは、たとえば5 ~ 1 0 継代にわたり低酸素に適合化される。

10

【0011】

いくつかの態様では、C D 3 4およびC D 4 3を発現するH P Cは、リンフォイド分化を促進する条件下で培養される。いくつかの態様では、リンフォイド細胞は、T細胞、B細胞、NK細胞、またはT / N K細胞である。

20

【0012】

ある特定の態様では、本方法は、20%未満の酸素の大気圧で細胞を培養することを含む。特定の態様では、本方法は、5%未満の酸素の大気圧で細胞を培養することを含む。いくつかの態様では、複数の多能性細胞は胚様体(E B)を形成する。

【0013】

ある特定の態様では、ミエロイド系列細胞は、マクロファージ、肥満細胞、赤血球、巨核球、血小板、樹状細胞、単球、好塩基球、好酸球、好中球、または多形核顆粒球である。特定の態様では、エリスロイド系列細胞は赤血球または赤芽球である。いくつかの態様では、赤血球は除核される。ある特定の態様では、赤血球は グロビンを発現する。いくつかの態様では、赤血球は、 グロビンおよび/または グロビンの発現と比較して グロビンをより多く発現する。特定の態様では、M e C P 2破壊は、野生型M e C P 2を有するi P S Cに由来する赤血球(たとえば グロビン発現がより少ないもの)よりも成熟した赤血球の産生をもたらす。

30

【0014】

いくつかの態様では、エリスロイド分化を促進するように細胞を培養することは、(i)赤芽球を生成させるようにe x c y t eとホロトランスフェリンとを含む規定培地でH P Cを培養すること、および(i i)エリスロイド細胞富化集団を産生するように拡大条件下で赤芽球を培養することを含む。ある特定の態様では、規定培地は1種以上のサイトカインをさらに含む。いくつかの態様では、1種以上のサイトカインは、幹細胞因子(S C F)、F l t - 3リガンド(F l t 3 L)、トロンボポイエチン(T P O)、インターロイキン3(I L - 3)、およびインターロイキン6(I L - 6)からなる群から選択される。ある特定の態様では、拡大条件は、I L - 3、I L - 6、およびT P Oが本質的にフリーの規定培地で培養することを含む。いくつかの態様では、工程(i)および/または工程(i i)は、1 ~ 2週間培養することを含む。ある特定の態様では、エリスロイド細胞富化集団は、70%超のエリスロイド細胞、たとえば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%のエリスロイド細胞を含む。いくつかの態様では、エリスロイド細胞富化集団は、80%超のエリスロイド細胞、たとえば、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のエリスロイド細胞を含む。いくつかの態様では、エリスロイド細胞

40

50

は、CD71、CD235a、および/またはCD36を発現する。

【0015】

いくつかの態様では、ミエロイド分化を促進するように細胞を培養することは、(a) マイクログリアを生成させるのに十分な時間にわたりMCSFとTGFとIL-34とを含む規定マイクログリア培地でHPCを培養すること、および(b) CD200とCXCL1とをさらに含む規定マイクログリア培地でマイクログリアを成熟させることによりマイクログリア集団を産生することを含む。いくつかの態様では、マイクログリア集団は、IBA、P2RY、および/またはTREM-2が陽性の細胞を少なくとも25%、たとえば、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、または70%含む。

10

【0016】

いくつかの態様では、リンフォイド分化を促進するように細胞を培養することは、(i) Notchリガンドを含むマトリックス被覆プレート上の規定培地でCD34および/またはCD43を発現するHPCを培養すること、および(ii) 1種以上のサイトカインの存在下で培養を維持することによりリンフォイド細胞を産生することを含む。いくつかの態様では、細胞は5%未満の酸素の大気圧で培養される。いくつかの態様では、規定培地はアスコルビン酸および/またはニコチンアミドを含む。アスコルビン酸の濃度は、約50 μ M~1mM、たとえば、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M、100 μ M、150 μ M、または200 μ Mでありうる。ニコチンアミドは、約0.1mM~5mM、たとえば、0.2mM、0.4mM、0.5mM、0.7mM、1mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、または4.5mMの濃度で存在しうる。ある特定の態様では、マトリックスは、レトロネクチン、コラーゲン、ラミニン、またはフィブロネクチンである。特定の態様では、NotchリガンドはDLL4である。たとえば、DLL4はDLL4:Fcキメラタンパク質である。いくつかの態様では、リンフォイド細胞はCD4を本質的に発現しない。ある特定の態様では、リンフォイド細胞は、CD8、CD7、CD45、CD5、およびCD3からなる群から選択されるマーカーの1つ以上を発現する。いくつかの態様では、リンフォイド細胞の5%超は、マーカーの少なくとも2つが陽性である。ある特定の態様では、リンフォイド細胞の10%超、たとえば、15%、20%、25%、30%、またはそれ以上は、マーカーの少なくとも2つが陽性である。

20

30

【0017】

さらなる実施形態は、破壊されたメチルCpG結合タンパク質2(MeCP2)を呈するDE細胞を得ること、および内胚葉分化を促進する条件下でDEを培養することにより内胚葉細胞を産生することを含む、PSCに由来する胚体内胚葉(DE)細胞から内胚葉細胞への分化方法を提供する。いくつかの態様では、内胚葉分化を促進する条件下でDE細胞を培養することは、DE細胞をEPCに分化させることを含む。特定の態様では、内胚葉細胞は、細胞、細胞、細胞、または肝細胞である。

【0018】

ある特定の態様では、DE細胞および/またはEPCは、メチル化DNAに本質的に結合しない非機能性MeCP2を発現する。いくつかの態様では、DE細胞および/またはEPCは、MeCP2のDNA結合活性を発揮するのに十分なレベルでMeCP2を発現しない。いくつかの態様では、MeCP2は、MeCP2遺伝子のトランケーション、エクソスキッピング、または突然変異により非機能性である。いくつかの態様では、破壊されたMeCP2を呈するDE細胞またはEPCを得ることは、HPCと、MeCP2に対するsiRNA、shRNA、または低分子阻害剤とを接触させることを含む。ある特定の態様では、siRNAまたはshRNAは、野生型MeCP2および変異体MeCP2の両方を破壊する。

40

【0019】

他の態様では、破壊されたMeCP2を呈するDE細胞またはEPCを得ることは、PSCと、MeCP2に対するsiRNA、shRNA、タンパク質阻害剤、または低分子

50

阻害剤と、を接触させること、およびPSCを分化させてDE細胞またはEPCを産生することを含む。いくつかの態様では、破壊されたMeCP2を呈するDE細胞またはEPCを得ることは、MeCP2の発現、活性、および/または機能を破壊するようにPSCを工学操作すること、およびPSCを分化させてDE細胞またはEPCを産生することを含む。特定の態様では、工学操作は、MeCP2遺伝子の遺伝子破壊を含む。いくつかの態様では、遺伝子破壊は、MeCP2のメチルCpG結合ドメインの前への停止コドンの挿入を含む。特定の態様では、停止コドンの挿入は、DNA結合ドメインの導入を含む。いくつかの態様では、DNA結合ドメインは、ジンクフィンガー、TALE、またはCRISPRのDNA結合ドメインである。

【0020】

特定の態様では、PSCはiPSCsである。特定の態様では、PSCは、ヒトiPSC、たとえば、ウイルス的にリプログラムされたiPSCまたはエピソーム的にリプログラムされたiPSCである。たとえば、iPSCは、9025、SONL、TiPS1E、A系、H系、またはG系iPSCでありうる。

【0021】

いくつかの態様では、PSCを分化させてDE細胞を産生することは、(a)MTGとアクチビンAとを含む培地でPSCを培養すること、(b)アスコルビン酸とBMP4とbFGFとVEGFとをさらに含む培地で細胞を培養すること、(c)DE細胞を産生するのに十分な時間にわたりBMP4とbFGFとアクチビンAとVEGFとを含む培地で細胞をさらに培養すること、の逐次工程を含む。追加の態様では、本方法は、DE細胞をEPCに、たとえば、CXCR4/CD117および/またはCD34を発現するEPCに分化させることをさらに含む。

【0022】

ある特定の態様では、内胚葉分化を促進する条件下でDE細胞を培養することは、細胞集団を産生するのに十分な時間にわたりアクチビンAとBMP4とTGFとEGFとVEGFとHGFとを含む培地でDE細胞を培養することを含む。いくつかの態様では、細胞集団は、少なくとも25%、たとえば、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、またはそれ以上のPDx1陽性細胞を含む。ある特定の態様では、細胞集団は、少なくとも20%、たとえば、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、またはそれ以上のNeuroD1陽性細胞を含む。いくつかの態様では、細胞集団は、少なくとも5%、たとえば、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、またはそれ以上のNKX6.1陽性細胞を含む。

【0023】

いくつかの態様では、内胚葉分化を促進する条件下でDE細胞を培養することは、(a)低酸素条件下でBMP4、bFGF、EGF、VEGF、HGF、Dex、DMSO、および/またはFGF-10を含む培地でDE細胞を培養すること、(b)DAPTとビタミンKとを含む培地で細胞をさらに培養すること、(c)肝細胞集団を産生するのに十分な時間にわたりDAPTおよびビタミンKが本質的にフリーの培地で細胞を分化させることを含む。特定の態様では、肝細胞集団は、少なくとも20%、たとえば、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、またはそれ以上のアルブミン陽性細胞を含む。

【0024】

本明細書には、MeCP2が破壊されたiPSC、MeCP2KO iPSCに由来する前駆細胞、たとえば、HPC、DE細胞、およびEPCを含む組成物がさらに提供される。また、本明細書には、MeCP2KO iPSCに由来する成熟系列の細胞、たとえば、赤血球、巨核球、マクロファージ、マイクログリア、T細胞、NK細胞、NK/T細胞、B細胞、細胞、樹状細胞たとえば形質細胞様樹状細胞、および肝細胞を含む組成物

10

20

30

40

50

も提供される。また、本明細書には、*in vitro*アッセイおよび治療たとえば*in vivo*安定移植、*in vitro*化合物スクリーニング、ならびに疾患および傷害の機序の解明のための、MeCP2KO iPSC、HPC、DE細胞、EPC、赤血球、巨核球、マクロファージ、マイクログリア、T細胞、NK細胞、NK/T細胞、B細胞、細胞、樹状細胞たとえば形質細胞様樹状細胞、および肝細胞の使用方法も提供される。

【0025】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨および範囲に含まれる各種の変更形態および修正形態は、本詳細な説明から当業者には明らかになるはずであり、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示すが単に例示を目的として与えられているにすぎないことを理解すべきである。

10

【0026】

以下の図面は、本明細書の一部を形成するものであり、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つ以上を参照すればよりよく理解される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A-1B】(1A) E8培地および低酸素条件の存在下におけるMatrigelまたはビトロネクチン上でのフィーダーフリー成長に適合化されたiPSCを用いた3D HPC分化プロセスの模式図。HPC分化の第1段階は、4日間にわたりBMP4とVEGFとFGFとにより駆動され、分化の第2段階は、ヘパリンとSCFとTPOとFlt-3リガンドとIL-3とIL-6とを含有する培地に細胞を配置することにより駆動される。(1B) 雄性iPSC細胞系01279のMeCP2KOを生成させて9006(01279.107.3902)を形成する工学操作ストラテジー。

20

【図1C】(1C) MeCP2 TALENSおよびドナープラスミドp1553でトランスフェクトされた01279 iPSCに由来するMeCP2変異体001、002、005、および008のアミノ酸アライメントの描画図。変異体(001、002、005、および008)はすべて、メチルCpG結合ドメインをコードしない。

【0028】

【図2A】(2A) HPC分化の12日目における多くのiPSC細胞系にわたる分化の概要。HPC(CD43⁺/CD34⁺)二重陽性細胞のパーセントは、フローサイトメトリーにより定量される。

30

【図2B】(2B) HPC生成効率は、生成HPC絶対数をグラフに示される投入iPSC数で除算することにより計算される。

【0029】

【図3】 iPSC由来HPCからのエリスロイド系列分化の模式的概観。12日目のHPCは、SCF、IL3、TPO、およびEPOの存在下で8日間、続いて、EPOおよびSCFのみの存在下で120日間まで分化させて赤血球の純粋培養物を生成させたものである。

40

【0030】

【図4A】(4A) 臍帯血細胞由来HPCを用いた*in vitro*エリスロイド分化時のグロビン出現の経時変化。 - グロビン発現の出現ならびに妊娠第1期の胚性グロビンから胎児グロビンへのおよび出生時近傍の胎児グロビンから成人グロビンへの生成スイッチの模式図(Orkin et al., 2012に示される)。

【図4B】(4B) エリスロイド分化の2~8週間における臍帯血(CB)由来HPC、iPSC MeCP2WTおよびMeCP2KOクローンのCD235の表面染色のFACSプロファイル。

【図4C】(4C) エリスロイド分化の2~7週間におけるCB由来HPC、iPSC MeCP2WTおよびMeCP2KOクローンのCD71の表面染色のFACSプロファ

50

イル。

【図4D】(4D) エリスロイド分化の2～8週間におけるCB由来HPC、iPSC MeCP2WTおよびMeCP2KOクローンのCD36の表面染色のFACSプロファイル。

【0031】

【図5A】(5A) CB、iPSC MeCP2WT、およびiPSC MeCP2KOクローンに由来する赤血球培養物における細胞内成人グロビン発現の比較分析。

【図5B】(5B) CB、iPSC MeCP2WT、およびiPSC MeCP2KOクローンに由来する赤血球培養物における細胞内胚性グロビン発現の比較分析。

【図5C】(5C) CB、iPSC MeCP2WT、およびiPSC MeCP2KOクローン(5C)に由来する赤血球培養物における細胞内胎児グロビン発現の比較分析。

10

【0032】

【図6】CB、iPSC 01279 (MeCP2WT)、およびiPSC 01279.107.3902 (MeCP2KO)に由来する赤血球分化の2～7週時の細胞内グロビン(、、および)の定量および比較分析。

【0033】

【図7】CB) iPSC 01279 (MeCP2WT) および iPSC 01279.107.3902 (MeCP2KO) に由来する赤血球分化の7週における組合せCD235表面染色および細胞内グロビン共染色のFACSプロファイル。

20

【0034】

【図8】CB由来HPCおよびiPSC 01279.107.3902 (MeCP2KO)に由来する最終段階の赤血球から作製されたサイトスピンは、ライト染色で染色された。除核赤血球の存在は、サイトスピんに視覚的に捉えられた。

【0035】

【図9】リンフォイド分化の模式図。5～11日目に採取されたHPCは、2～4週間にわたりSCF、TPO、IL-7、およびFlt-3リガンドの存在下で $2.5 \text{ K} / \text{ cm}^2$ の密度で非組織培養処理プレート上にプレーティングされた。T細胞、NK細胞、およびNK/T細胞の出現は、フローサイトメトリーにより定量された。

【0036】

【図10A-10C】*in vitro*で生成させたリンフォイド細胞を同定するためのゲーティングストラテジー。(10A)成人末梢血由来のリンパ球の一般的散乱プロファイル。(10B)分化18日目のリンフォイド細胞の散乱プロファイル。FSC-SSCゲートおよびリンフォイドゲートが例示される。(10C)ヨウ化プロビジウムを用いたFSC-SSC散乱内およびリンフォイド散乱内の生細胞のゲーティング。

30

【0037】

【図11A】(11A) *in vitro*で生成させたリンフォイド細胞を同定するためのゲーティングストラテジー。分化18日目のリンフォイド細胞の散乱プロファイルが示される。FSC-SSCゲートおよびリンフォイドゲートが例示される。生細胞は、フローサイトメトリーによりヨウ化プロビジウムを用いてFSC-SSC散乱内およびリンフォイド散乱内でゲートされてからCD7およびCD5が陽性の細胞に関して染色された。

40

【図11B】(11B) 生細胞は、フローサイトメトリーによりヨウ化プロビジウムを用いてFSC-SSC散乱内およびリンフォイド散乱内でゲートされてからCD3、CD8、およびCD56が陽性の細胞に関して染色された。

【0038】

【図12A-12B】低酸素条件下または正常酸素条件下に維持されて $2.5 \text{ k} / \text{ cm}^2$ の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置された7～11日目のHPCから分化された二重陽性CD7⁺/CD5⁺のプレT(12A)細胞およびプレTリンフォイド(12B)細胞のパーセント。

【0039】

50

【図13A - 13C】HPC分化7～11日目に採取されたかつ 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置されたプレT細胞およびプレNK細胞の定量。低酸素条件下(13A)または正常酸素条件下(13B)に維持された01279(MeCP2WT)細胞さらには低酸素条件下(13C)の01279・107・3902細胞(MeCP2KO)の中の $CD8^+CD3^+$ (T細胞)、 $CD56^+/CD8^+/CD3^+$ (NK細胞)、および $CD56^+/CD3^+$ (NK/T細胞)のパーセントを決定した。

【0040】

【図14A - 14B】HPC分化7～11日目に 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置されたT($CD3^+/CD8^+$)細胞の定量。MeCP2WTおよびMeCP2KOの状態を含むiPSCクローンで、すべて生存するFSC-SSCゲート下(14A)およびリンフォイドゲート下(14B)の二重陽性 $CD8^+/CD3^+$ のパーセントを決定した。

10

【0041】

【図15A - 15B】HPC分化7～11日目に 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置されたNK($CD3^-/CD56^+$)細胞の定量。MeCP2WTおよびMeCP2KOの状態を含むiPSCクローンで、すべて生存するFSC-SSCゲート下(14A)およびリンフォイドゲート下(15B)の $CD56^+/CD3^-$ のパーセントを決定した。

20

【0042】

【図16A - 16B】HPC分化7～11日目に 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置されたNK/T($CD3^+/CD56^+$)細胞の定量。MeCP2WTおよびMeCP2KOの状態を含むiPSCクローンで、すべて生存するFSC-SSCゲート下(16A)およびリンフォイドゲート下(16B)の二重陽性 $CD56^+/CD3^+$ のパーセントを決定した。

【0043】

【図17A - 17B】分化プロセスの効率の測定。MeCP2WTおよびMeCP2KOを含むiPSCをHPC分化7～11日目に採取し、 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置した。 $CD8$ および $CD3$ の表面発現を有する細胞を染色した。FSC-SSCゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。投入細胞数および16日間の分化の終了時の全生存細胞数は分かったので、T($CD3^+/CD8^+$)の絶対数を決定した。プロセスの効率は、細胞型絶対数/全投入細胞数の比(17A)または細胞型絶対数/投入($CD43^+/CD34^+$)HPC数の比(17B)により計算される。

30

【0044】

【図18A - 18B】分化プロセスの効率の測定。MeCP2WTおよびMeCP2KOを含むiPSCをHPC分化7～11日目に採取し、 25 k/cm^2 の密度でリンフォイド分化を開始するようにRet-DLL4被覆プレート上に配置した。 $CD56$ 、 $CD8$ 、および $CD3$ の表面発現を有する細胞を染色した。FSC-SSCゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより細胞のパーセントを定量した。投入細胞数および16日間の分化の終了時の全生存細胞数は分かったので、NK/T($CD3^+/CD56^+$)およびNK($CD56^+/CD3^-$)の絶対数を決定した。プロセスの効率は、細胞型(NK/TまたはNK)絶対数/全投入細胞数の比(18A)または細胞型絶対数/投入($CD43^+/CD34^+$)HPC数の比(18B)により計算される。

40

【0045】

【図19A - 19D】リンフォイドプロジェニターの表現型シグネチャーの決定。HPCは、MeCP2KOおよびMeCP2WT iPSCから生成させた。次のマーカー： $CD43FITC/CD45PE/CD34APC$ 、 $CD235FITC/CD7PE/CD34APC$ 、 $CD31FITC/DLL4PE/CD144APC$ 、 $CD34FITC/DLL4PE/APNLRAPC$ 、 $FLK-1FITC/CD34PE/APNLR$

50

A P C、C D 5 6 F I T C / C D 3 4 P E / C D 4 4 A P Cを有するH P Cを分化のさまざまな段階で染色した。i P S C 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O)におけるこれらの各種マーカーの発現プロファイルのパーセントは、1 9 A、1 9 B、1 9 C、1 9 Dに概要が示される。

【 0 0 4 6 】

【 図 2 0 】 M e C P 2 W T および M e C P 2 K O のクローンのリンフォイド分化時の集団倍加の定量。リンフォイド分化は、R e t - D L L 4 被覆プレート上に2 5 K / c m²で細胞をプレーティングすることにより開始させた。細胞は、2、4、および6週間の終了時に採取され、集団倍加は、 $e = 3.32 \times \log(\text{採取時細胞数} / \text{播種細胞数})$ であった。

10

【 0 0 4 7 】

【 図 2 1 】 内胚葉分化のさまざまな段階の一般的概観。日数および分化プロセスを駆動するために培地で使用した因子と共にi P S Cから内胚葉プロジェニター段階への変換が描かれている。

【 0 0 4 8 】

【 図 2 2 A - 2 2 B 】 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) i P S C および 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) i P S C におけるE P C純度の定量。グラフは、C X C R - 4 およびC D 1 1 7 ならびに成熟マーカーC D 3 4 の表面発現を表す。(2 2 A) 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) 細胞に由来するE P Cは1 0 ~ 1 4 継代で染色し、(2 2 B) 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) 細胞に由来するE P Cは2 ~ 1 3 継代で染色した。

20

【 0 0 4 9 】

【 図 2 3 A - 2 3 C 】 フィーダーフリーサイクル時の0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) (2 3 A) E P C および 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) (2 3 B) E P C の増殖および細胞数拡大倍率。2 Dで増殖させたE P Cから細胞を生成させるための模式図(2 3 C)。

【 0 0 5 0 】

【 図 2 4 A - 2 4 C 】 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) E P C および 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) E P C に由来する2 8日目の最終段階の細胞のフローサイトメトリー分析。細胞を採取し、4 %パラホルムアルデヒドを用いて固定し、0 . 1 % サボニンを用いて透過化し、そしてフローサイトメトリーによりP D X 1 (2 4 A)、N e u r o D 1 (2 4 B)、およびN k x 6 . 1 (2 4 C) が存在するものを染色した。

30

【 0 0 5 1 】

【 図 2 5 A - 2 5 B 】 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) E P C および 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) E P C に由来する2 8日目の最終段階の細胞のフローサイトメトリー分析。細胞を採取し、4 %パラホルムアルデヒドを用いて固定し、0 . 1 % サボニンを用いて透過化し、そしてフローサイトメトリーによりグルカゴン(2 5 A) およびC ペプチド(2 5 B) が存在するものを染色した。

【 0 0 5 2 】

【 図 2 6 】 凝集体解離後の胚分化プロセス2 2日目におけるC ペプチド、グルカゴン、およびソマトスタチンの発現の細胞内染色のF A C Sプロファイル。散布プロットは、グルカゴン、ソマトスタチン、およびC ペプチドの発現の細胞内染色を表す。左側のプロットは、細胞の前方散乱および側方散乱を示し、続いて採取後の染色が示される。プロットは、i P S C - 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) 細胞および0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) 細胞におけるC ペプチド対グルカゴン染色、C ペプチド対ソマトスタチン染色、およびC ペプチド対グルカゴン染色の二重染色プロファイルを示す。

40

【 0 0 5 3 】

【 図 2 7 】 i P S C - 0 1 2 7 9 (M e C P 2 W T) 細胞および0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2 (M e C P 2 K O) 細胞から生成させた最終段階の細胞のグルコース反応性。データは、各種濃度のグルコースに対する非規格化C ペプチド放出の放出を表す。データは

50

、細胞数アッセイに規格化されていない。

【0054】

【図28】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD43発現。

【0055】

【図29】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD34発現。

【0056】

【図30】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD34およびCD43陽性細胞のパーセント。

10

【0057】

【図31】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD45陽性細胞のパーセント。

【0058】

【図32A】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD235陽性細胞のパーセント。

【図32B】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のCD235陽性細胞のパーセント。

【0059】

【図33】指定されたMeCP2WTおよびMeCP2KOのiPSC系に由来するHPC分化9日目のDLL4陽性細胞のパーセント。

20

【0060】

【図34】指定されたMeCP2WTまたはMeCP2KOのiPSC系からのHPC生成効率。

【0061】

【図35】さまざまなiPSCクローンからマイクログリアを分化させてマーカーIBA、P2RY、およびTREM-2によりそれらの純度を評価することにより、MeCP2WT対MeCP2KOのiPSC細胞由来マイクログリアを比較した。

【0062】

【図36】最終段階のマイクログリアの純度のFACS分析。

30

【0063】

【図37】指定されたMeCP2WTまたはMeCP2KOのiPSC系に由来する1つのHPCからのマイクログリア生成効率。

【0064】

【図38A】MeCP2WTまたはMeCP2KOのiPSCからプレT細胞を分化させた。(38A)CD5およびCD7により測定されるプレT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。

【図38B】(38B)2週間の終了時に細胞を採取し、CD7/CD45(38C)またはCD7/CD5によりプレTプロジェニター細胞のパーセントを定量した。

【図38C】(38B)2週間の終了時に細胞を採取し、CD7/CD45(38C)またはCD7/CD5によりプレTプロジェニター細胞のパーセントを定量した。

40

【0065】

【図39A】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

【図39B】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了

50

時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

【図39C】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

10

【図39D】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

【図39E】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

20

【図39F】図38のプレT細胞をさらに2週間分化させた。(39A)CD3およびCD8により測定されるT細胞のFACSプロファイルのスナップショット。2週間の終了時に細胞を採取し、全CD3陽性細胞、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56⁺)、およびNK/T細胞(CD3⁺CD56⁺)を定量した。細胞は、(39B)SONL iPSC、(39C)9025 iPSC、(39D) iPSC系A、(39E) iPSC系F、または(39F) iPSC系Hから分化させた。

【0066】

【図40】MeCP2WTまたはMeCP2KOのiPSC系から肝細胞を誘導する2Dプロトコルを示す模式図。

30

【0067】

【図41】MeCP2KOを有する指定されたiPSC系からの肝細胞分化。アルブミンまたはAATが陽性の細胞のパーセントが示される。

【0068】

【図42】赤血球分化に及ぼすMeCP2KOの影響。グラフは、指定された各細胞系に対してエリスロイド分化時のCD235陽性細胞のパーセントを示す。

【0069】

【図43A】(43A)7週間までSONL iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

40

【図43B】(43B)7週間にわたりSONL iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【0070】

【図44A】(44A)7週間までのTiPS iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

【図44B】(44B)7週間にわたりTiPS iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【0071】

【図45A】(45A)7週間まで9025 iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

50

【図45B】(45B)7週間にわたり9025iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【0072】

【図46A】(46A)7週間までA系iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

【図46B】(46B)7週間にわたりA系iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【0073】

【図47A】(47A)7週間までH系iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

【図47B】(47B)7週間にわたりH系iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【0074】

【図48A】(48A)7週間までG系iPSCから分化させたMeCP2KO赤血球におけるグロビン発現。

【図48B】(48B)7週間にわたりG系iPSCから分化させたMeCP2WT赤血球におけるグロビン発現。

【発明を実施するための形態】

【0075】

MeCP2遺伝子は、メチル化DNAに結合して標的遺伝子の転写をレギュレートすることが可能なタンパク質をコードする。MeCP2遺伝子は、メチル-CpG結合ドメイン(MBD)、転写抑制ドメイン(TRD)、核移行シグナル(NLS)、およびC末端セグメントを有する(Bird et al., 2008)。本開示の研究は、成熟系列の高純度の細胞を効率的に生成させるようにiPSCの分化を方向付けるMeCP2の新しい役割を提供する。MeCP2はまた、ユビキタスで概日的にレギュレートされることも判明した。そのほか、本研究は、iPSC由来系列で成熟状態を出現させる脱メチル化の役割を支持する。

【0076】

したがって、本開示は、TALENSを用いたノックアウトなどによりMeCP2発現を破壊して中胚葉、外胚葉、および内胚葉の細胞をはじめとする特定の細胞系列への分化能が向上した強化iPSCを産生するようにiPSCを工学操作する方法を提供する。MeCP2が破壊されたiPSCは、赤血球、巨核球、マクロファージ、マイクログリア、T細胞、NK細胞、NK/T細胞、B細胞、細胞、樹状細胞たとえば形質細胞様樹状細胞、および肝細胞に効率的に分化させうる。

【0077】

とくに、MeCP2ノックアウト(MeCP2KO)を有するiPSCクローンは、造血前駆細胞(HPC)さらには胚体内胚葉(DE)細胞および内胚葉前駆細胞(EPC)をより効率的に産生することが判明した。HPCは、エリスロイド、リンフォイド、またはミエロイドの系列に高効率かつ高純度でさらに分化させうる。たとえば、HPCは、成熟した赤血球またはマイクログリアさらにはリンフォイド系列の細胞、たとえば、T細胞、B細胞、NK細胞、およびT/NK細胞を生成させるために使用しうる。DE細胞またはEPCは、細胞や肝細胞などの内胚葉系列の細胞にさらに分化させうる。

【0078】

より多くのグロビンまたはグロビンを発現する野生型(MeCP2WT)発現のiPSCとは対照的に、iPSCのMeCP2を破壊するとグロビンまたはグロビンと比べてグロビンの発現が増加することから分かるようにより高い成熟度の赤血球が得られることが、本研究により示された。

【0079】

そのほか、MeCP2破壊は、エリスロイド系列、ミエロイド系列(たとえばマイクログリア)、およびリンフォイド系列の細胞、たとえば、T細胞およびNK細胞をより効率

10

20

30

40

50

的に産生する i P S C をもたらした。Me C P 2 が破壊された i P S C の性質の向上は、ウイルス的およびエピソード的リプログラム i P S C をはじめとするいくつかの i P S C 系にわたり観測された。そのため、本開示は、リンフォイド系列細胞およびエリスロイド、ミエロイド系列細胞を含む中胚葉細胞さらには肝細胞や 細胞などの内胚葉細胞を Me C P 2 が破壊された P S C から産生するための方法および組成物を提供する。

【0080】

一方法では、Me C P 2 が破壊された i P S C は、T A L E N を用いて Me C P 2 のメチル結合ドメインの前に停止コドン挿入するように i P S C を工学操作することにより生成される。次いで、Me C P 2 ノックアウト i P S C は、規定のフィーダーフリー血清フリー条件下で H P C、D E 細胞、または E P C に分化せうる。次いで、H P C は、本明細書に開示される方法によりエリスロイド系列、ミエロイド系列、またはリンフォイド系列の他の造血細胞を作製するようにさらに分化可能であり、一方、D E 細胞または E P C は、適宜、内胚葉系列の細胞に分化せうる。たとえば、Me C P 2 K O H P C は、エリスロイド拡大培地に H P C を配置することにより成熟赤血球に分化させて C D 7 1、C D 2 3 5 a、および C D 3 6 が陽性のエリスロイド細胞富化集団を生成させることが可能である。重要なこととして、本明細書に提供される成熟赤血球は、最終的成人 - グロビンを発現するとともに除核を呈する。

10

【0081】

さらに、別の例示的な方法では、Me C P 2 破壊を含む i P S C に由来する H P C は、フィーダーフリーマトリックスとして R e t r o N e c t i n および D L L - 4 を用いて T 細胞に分化可能である。T 細胞分化は、効率および成熟を増加させるアスコルビン酸を用いることによりさらには低酸素条件下で培養することによりさらに増強しうる。興味深いことに、本発明者らは、エリスロイド、ミエロイド、およびリンフォイドの潜在能力に関して H P C 分化時に最適時間枠（たとえば 7 ~ 11 日目）を決定した。

20

【0082】

そのほか、Me C P 2 破壊を含む i P S C に由来する H P C は、最終段階のマイクログリア (m i g r o g l i a) およびマクロファージを生成させるようにミエロイド分化経路に効率的に分化可能である。

【0083】

そのため、本開示の方法は、安定な i n v i v o 移植、化合物の i n v i t r o スクリーニング、血液疾患および傷害の機序の解明などの広範にわたる用途で、無制限の数の造血系列細胞、たとえば、T 細胞、N K 細胞、T / N K 細胞、および成熟赤血球、さらには内胚葉系列細胞、たとえば、肝細胞および 細胞を提供可能である。とくに、産生されるエリスロイド細胞の数が多くかつ純度が高いので、本開示の方法は、エリスロイドの生成および輸液用 R B C の産生の基礎研究に有用である。

30

【0084】

I . 定義

本明細書で用いられる場合、特定の成分に関して「本質的にフリー」とは、特定の成分がいずれも組成物に意図的に配合されたものではないことおよび/または汚染物質としてのみもしくは痕跡量でのみ存在するにすぎないことを意味するものとして本明細書で用いられる。したがって、組成物の意図されないなんらかの汚染から生じる特定の成分の全量は、0 . 0 5 % を十分に下回り、好ましくは 0 . 0 1 % 未満である。最も好ましいのは、特定の成分の量が標準的分析方法でまったく検出できない組成物である。

40

【0085】

本明細書の中で用いられる場合、「a」または「an」は1つ以上を意味しうる。本特許請求の範囲の中で用いられる場合、「comprising (~を含む)」という語と組み合わせて用いられるとき、「a」または「an」という語は1つまたは2つ以上を意味しうる。

【0086】

本特許請求の範囲における「or (または)」という用語の使用は、選択肢のみを意味

50

するものとして明示的な指定がない限りまたは選択肢が互いに排他的でない限り「and / or (および/または)」を意味するものとして用いられるが、本開示は、選択肢のみおよび「and / or (および/または)」を意味する定義を支持する。本明細書で用いられる場合、「他の一つ」とは、少なくとも第2のものまたはそれよりも多くのものを意味しうる。

【0087】

本出願全体を通じて、「about (約)」という用語は、その値がデバイスやその値の決定に利用される方法に固有の誤差の変動または研究対象に存在する変動を含むことを意味するものとして用いられる。

【0088】

「外因性」という用語は、細胞もしくは生物のタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドとの関連で用いられるとき、人工もしくは天然の手段により細胞もしくは生物に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドを意味し、または細胞との関連では、この用語は、単離後に人工もしくは天然の手段により他の細胞もしくは生物に導入された細胞を意味する。外因性核酸は、異なる生物もしくは細胞に由来しうるか、または生物内もしくは細胞内に天然に存在する核酸の1つ以上の追加のコピーでありうる。外因性細胞は、異なる生物に由来しうるかまたは同一の生物に由来しうる。限定されるものではないが、例として、外因性核酸は、天然の細胞のときとは異なる染色体上の位置にあるものであるか、さもなければ天然に見いだされるものとは異なる核酸配列がフランキングするものである。

【0089】

「発現構築物」または「発現カセット」とは、転写の指令が可能な核酸分子を意味する。発現構築物は、1つ以上の所望の細胞型、組織、または器官で遺伝子発現を指令する少なくとも1つ以上の転写制御エレメント(たとえば、プロモーター、エンハンサー、または機能的にそれらと等価な構造)を含む。転写終止シグナルなどの追加のエレメントもまた含まれうる。

【0090】

「ベクター」または「構築物」(遺伝子送達系または遺伝子移入「媒体」ということもある)とは、in vitroまたはin vivoのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含むマクロ分子または分子複合体を意味する。

【0091】

ベクターの通常タイプである「プラスミド」は、染色体DNAとは独立して染色体DNAに依存せずに複製可能な染色体外DNA分子である。ある特定の場合には、それは環状の二本鎖である。

【0092】

「複製の起点」(「ori」)または「複製起点」とは、細胞のプラスミド中に存在するとき、結合された配列をプラスミド中におよび/またはDNA合成が開始される部位もしくはその近傍に維持可能なDNA配列たとえばリンパ球向性ヘルペスウイルスのDNA配列のことである。例として、EBV(エプスタイン・バー(Ebstein-Barr)ウイルス)のoriは、FR配列(30bpリピートの不完全な20コピー)および好ましくはDS配列を含むが、EBVの他の部位はEBNA-1に結合し、たとえば、Rep*配列は、複製の起点としてDSの代わりとなりうる(Kirshmaier and Sugden, 1998)。そのため、EBVの複製起点は、FR配列、DSもしくはRep*配列、または核酸修飾された機能的に等価な任意の配列、またはそれらに由来する合成的組合せを含む。たとえば、本開示の方法はまた、Lindner et al., 2008に具体的に記載されるように、個々のエレメントの挿入や突然変異などによりEBVの複製起点を遺伝子工学操作したものも使用しうる。

【0093】

特定のタンパク質を「コード」する「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」、または「トランスジーン」とは、適切なレギ

10

20

30

40

50

ユラトリ配列の制御下に配置されたときに転写されるとともに任意選択的に遺伝子産物たとえばポリペプチドに *in vitro* または *in vivo* で翻訳される核酸分子のことである。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAの形態のいずれかで存在しうる。DNAの形態で存在するとき、核酸分子は一本鎖（すなわちセンス鎖）または二本鎖でありうる。コード領域の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳停止コドンにより決定される。限定されるものではないが、遺伝子は、原核または真核mRNA由来のcDNA、原核または真核DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列を含みうる。転写終止配列は、通常は遺伝子配列の3'側に位置するであろう。

【0094】

「制御エレメント」という用語は、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流レギュラトリドメイン、複製の起点、内部リボソーム侵入部位（IRES）、エンハンサー、スプライス接合部などを総称して意味し、全体としてレシピエント細胞において複製、転写、転写後プロセッシング、コード配列の翻訳を提供する。これらの制御エレメントは、選択されたコード配列が適切な宿主細胞において複製、転写、および翻訳されうるのであれば、すべてが存在する必要はない。

10

【0095】

「プロモーター」という用語は、本明細書では、DNAレギュラトリ配列を含むヌクレオチド領域を意味するものとしてその通常の意味で用いられ、この場合、レギュラトリ配列は、RNAポリメラーゼに結合可能かつ下流（3'方向）のコード配列の転写を開始可能な遺伝子に由来する。それは、核酸配列の特異的転写を開始するようにRNAポリメラーゼや他の転写因子などのレギュラトリタンパク質および調節分子が結合しうる遺伝的エレメントを含有しうる。「作動的に配置」、「作動的に結合」、「制御下」、および「転写制御下」という語句は、プロモーターが核酸配列との関連で適正な機能位置および/または配向状態にありその配列の転写開始および/または発現を制御することを意味する。

20

【0096】

「エンハンサー」とは、プロモーターに近接して配置したときにエンハンサードメインの不在下でプロモーターからもたらされる転写活性と比較して増加した転写活性を付与する核酸配列を意味する。

30

【0097】

核酸分子に関して「作動可能に結合」または「共発現」とは、2つ以上の核酸分子（たとえば、転写される核酸分子、プロモーター、およびエンハンサーエレメント）が、核酸分子の転写を可能にするよう接続されることを意味する。ペプチドおよび/またはポリペプチド分子に関して「作動可能に結合」または「共発現」とは、2つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチド分子が、単一のポリペプチド鎖、すなわち、融合体の各ペプチドおよび/またはポリペプチド成分の少なくとも1つの性質を有する融合ポリペプチドを生じるように接続されることを意味する。融合ポリペプチドは、好ましくはキメラである。すなわち、異種分子で構成される。

【0098】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド間または2つのポリペプチド間の同一性パーセントを意味する。一方の配列と他方の配列との対応関係は、当技術分野で公知の技術により決定可能である。たとえば、相同性は、配列情報をアライメントして2つのポリペプチド分子間の配列情報を直接比較することによりおよび容易に入手可能なコンピュータープログラムを用いることにより決定可能である。代替的に、相同性は、相同領域間の安定な二本鎖の形成を促進する条件下でポリヌクレオチドをハイブリダイズさせた後で一本鎖特異的ヌクレアーゼで消化して消化断片のサイズを決定することにより決定可能である。2つのDNAまたは2つポリペプチドの配列は、以上の方法を用いて決定した場合、それぞれヌクレオチドまたはアミノ酸の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%が分子の規定の長さにわたりマッチしたとき、互い

40

50

に「実質的に相同」である。

【0099】

「細胞」という用語は、本明細書では、当技術分野でのその最広義で用いられ、多細胞生物の組織の構造ユニットである、外部からそれを隔離する膜構造体に取り囲まれる、自己複製能を有する、かつ遺伝情報およびそれを発現する機序を有する、生存体を意味する。本明細書で用いられる細胞は、天然に存在する細胞または人工的に改変された細胞（たとえば、融合細胞、遺伝子改変細胞など）でありうる。

【0100】

「幹細胞」という用語は、本明細書では、好適な条件下では多岐にわたる特殊化された細胞型に分化可能であるが、他の好適な条件下では自己再生および本質的に未分化の多能性状態の維持が可能である細胞を意味する。「幹細胞」という用語はまた、多能性細胞、複能性細胞、前駆細胞、およびプロジェニター細胞を包含する。例示的なヒト幹細胞は、骨髄組織から得られる造血幹細胞もしくは間葉幹細胞、胚組織から得られる胚性幹細胞、または胎児の生殖器組織から得られる胚性生殖細胞から取得可能である。例示的な多能性幹細胞はまた、多能性に関連するある特定の転写因子を発現して多能性状態にリプログラムすることにより体細胞からも産生可能である。これらの細胞は、「誘導多能性幹細胞」または「iPSCもしくはiPS細胞」と呼ばれる。

【0101】

「胚性幹（ES）細胞」とは、初期段階の胚たとえば胚盤胞段階の内部細胞塊から得られる、または人為的手段（たとえば核移行）により産生され、生殖細胞（たとえば精子および卵子）を含めて胚もしくは成人の任意の分化細胞型をもたらす、未分化多能性細胞のことである。

【0102】

「誘導多能性幹細胞（iPSCまたはiPS細胞）」とは、因子（本明細書ではリプログラミング因子という）の組合せを発現してまたは発現を誘導して体細胞をリプログラムすることにより生成される細胞のことである。iPS細胞は、胎児、出生直後の産児、新生児、若年者、または成人の体細胞を用いて生成可能である。ある特定の実施形態では、体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングに使用可能な因子としては、たとえば、Oct4（Oct3/4ということもある）、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog、およびLin28が挙げられる。いくつかの実施形態では、体細胞は、体細胞を多能性幹細胞にリプログラムするために少なくとも2つのリプログラミング因子、少なくとも3つのリプログラミング因子、少なくとも4つのリプログラミング因子、少なくとも5つのリプログラミング因子、少なくとも6つのリプログラミング因子、または少なくとも7つのリプログラミング因子を発現することによりリプログラムされる。

【0103】

「造血プロジェニター細胞」または「造血前駆細胞（HPC）」とは、造血系列にコミットするがただしさらなる造血分化が可能である細胞を意味し、たとえば、造血幹細胞、複能性造血幹細胞、共通ミエロイドプロジェニター、巨核球プロジェニター、赤血球プロジェニター、およびリンフォイドプロジェニターである。造血幹細胞（HSC）とは、ミエロイド系列（たとえば、単球およびマクロファージ、顆粒球（たとえば、好中球、好塩基球、好酸球、および肥満細胞）、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞）ならびにリンフォイド系列（たとえば、T細胞、B細胞、およびNK細胞）をはじめとするすべての血液細胞型をもたらす複能性幹細胞のことである（たとえば、Doulatov et al., 2012、Notta et al., 2015を参照されたい）。「マルチリンフォイドプロジェニター」（MLP）とは、すべてのリンフォイド系列（たとえば、B、T、およびNK細胞）をもたらすが他の（ミエロイド）潜在能力を有していても有してなくてもよいかつCD45RA⁺ / CD10⁺ / CD7⁻である、任意のプロジェニターを記述するものとして定義される（Doulatov et al., 2010）。B、T、およびNKプロジェニターは、MLPともいいうる。「共通ミエロイドプロジェニター」（CMP）とは、顆粒球、単球、巨核球、および赤血球をもたらすCD45RA⁻

10

20

30

40

50

/CD135⁺/CD10⁻/CD7細胞を意味する。

【0104】

「多能性幹細胞」(PSC)とは、1つ以上の組織もしくは器官または好ましくは3つの胚葉：内胚葉(たとえば、胃内壁、胃腸管、肺)、中胚葉(たとえば、筋肉、骨、血液、泌尿生殖器)、もしくは外胚葉(たとえば、表皮組織および神経系)のいずれかを構成するすべての細胞に分化する潜在能力を有する幹細胞を意味する。

【0105】

本明細書で用いられる場合、「体細胞」という用語は、卵子や精子などの生殖細胞以外の任意の細胞でありそのDNAを次世代に直接伝達しないものを意味する。典型的には、体細胞は、限られた多能性を有するかまたは多能性をまったく有していない。本明細書で用いられる体細胞は、天然に存在しうるかまたは遺伝子改変しうる。

10

【0106】

「プログラミング」とは、細胞により生成可能な後代の型を改変するプロセスのことである。たとえば、プログラミングを用いずに同一の条件下で生成可能な型と比較して少なくとも1つの新しい細胞型の後代を培養下または*in vivo*のいずれかで生成可能になるように改変されたとき、細胞はプログラムされている。このことは、かかる後代をプログラミング前に本質的にまったく生成できないならば、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合で観測されることを意味し、代替的には、新しい細胞型の特性を有する割合は、プログラミング前よりも多く測定されうる。このプロセスは、分化、脱分化、および分化転換を含む。

20

【0107】

「リプログラミング」とは、リプログラミングを用いずに同一の条件下で有しうるよりも少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成する測定可能に向上した能力を培養下または*in vivo*のいずれかで細胞に付与するプロセスのことである。より具体的には、リプログラミングとは、多能性の潜在能力を体細胞に付与するプロセスのことである。このことは、かかる後代をリプログラミング前に本質的にまったく生成できないならば、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合になることを意味し、さもなければ、新しい細胞型の特性を有する割合は、リプログラミング前よりも多く測定されうる。

【0108】

「分化」とは、あまり特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞型になるプロセスのことである。「脱分化」とは、部分的または最終的に分化された細胞がより初期の発生段階、たとえば、多能性または複能性の段階に戻る細胞プロセスのことである。「分化転換」とは、ある分化された細胞型を他の分化された細胞型に変換するプロセスのことである。典型的には、プログラミングによる分化転換は、細胞が中間的多能性段階を経由することなく行われる。すなわち、細胞は、ある分化された細胞型から他の分化された細胞型に直接プログラムされる。ある特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が高い順に少なくとも約1%、5%、25%、またはそれ以上でありうる。

30

【0109】

「フォワードプログラミング」という用語は、1つ以上の特定の系列決定遺伝子または遺伝子産物を複能性細胞または多能性細胞に提供することにより多能性をまったく有していない分化された体細胞とは対照的な複能性細胞または多能性細胞をプログラムすることを意味する。たとえば、フォワードプログラミングとは、造血前駆細胞もしくは他の前駆細胞または造血細胞もしくは他の分化された体細胞になるようにESCまたはiPSCをプログラムするプロセスを意味しうる。

40

【0110】

本明細書で用いられる場合、「被験体」または「必要とする被験体」という用語は、哺乳動物、好ましくは、細胞または組織の移植を必要とする任意の年齢の男性または女性のヒトを意味する。典型的には、被験体(本明細書ではレシピエントともいう)は、細胞ま

50

たは組織の移植による治療に適合しうる障害または病理学的もしくは望ましくない病態、状態、もしくは症候群または物理的、形態学的、もしくは生理学的な異常が原因で細胞または組織の移植を必要とする。

【0111】

本明細書で用いられる場合、遺伝子の「破壊」とは、破壊の不在下における遺伝子産物の発現レベルと比較して、細胞において被験体の遺伝子によりコードされる1つ以上の遺伝子産物の発現が排除または低減されることを意味する。例示的な遺伝子産物としては、遺伝子によりコードされるmRNAおよびタンパク質産物が挙げられる。破壊は、いくつかの場合には一過的また可逆的であり、他の場合には永久的である。破壊は、いくつかの場合には、機能性または全長のタンパク質またはmRNAの破壊であり、トランケート型または非機能性の産物が産生されうるという事実は関係しない。本明細書のいくつかの実施形態では、遺伝子の活性または機能は、発現とは対照的に破壊される。遺伝子破壊は、人工的方法により、すなわち、化合物、分子、複合体、もしくは組成物の添加もしくは導入により、および/またはDNAレベルなどで遺伝子の核酸の破壊もしくは遺伝子との会合により、一般に誘導される。遺伝子破壊の例示的な方法としては、遺伝子サイレンシング、ロックダウン、ロックアウト、および/または遺伝子破壊技術たとえば遺伝子編集が挙げられる。例としては、アンチセンス技術、たとえば、一般に発現の一過的低減をもたらすRNAi、siRNA、shRNA、および/またはリボザイム、さらには標的遺伝子の不活性化または破壊をもたらす遺伝子編集技術、たとえば、破壊および/または相同組換えの誘導によるものが挙げられる。例としては、挿入、突然変異、および欠失が挙げられる。破壊は、典型的には、遺伝子によりコードされる正常産物または「(野生型)産物の発現の抑制および/または完全欠如をもたらす。かかる遺伝子破壊の例としては、全遺伝子の欠失を含めて、遺伝子または遺伝子の一部の挿入、フレームシフト突然変異およびミスセンス突然変異、欠失、ノックイン、ならびにノックアウトが挙げられる。かかる破壊は、コード領域たとえば1つ以上のエクソンで行うことが可能であり、その結果、停止コドンの挿入などにより全長産物、機能性産物、またはいずれかの産物を産生できなくなる。かかる破壊はまた、遺伝子の転写を防止するようにプロモーターまたはエンハンサーまたは転写の活性化に影響を及ぼす他の領域を破壊することにより行いうる。遺伝子破壊としては、相同組換えによる標的遺伝子の不活性化をはじめとする遺伝子ターゲティングが挙げられる。

10

20

30

【0112】

「Notchリガンド」とは、造血幹細胞などのいくつかの異なる哺乳動物細胞の細胞膜に存在するNotchレセプターポリペプチドに結合可能なタンパク質のことである。ヒト細胞で同定されたNotchレセプターとしては、Notch-1、Notch-2、Notch-3、およびNotch-4が挙げられる。Notchリガンドは、典型的には、アミノ末端に20~22アミノ酸を含む特徴的DSLドメイン(D-Delta、S-Serrate、およびL-Lag2)および細胞外表面に3~8EGF様リピートを有する(Furie and Furie, 1988、Knust et al., 1987、Suzuki et al., 1987)。

40

【0113】

II. 多能性幹細胞

本開示のある特定の実施形態では、PSCから複系列HPC、DE細胞、またはEPCを提供するための方法および組成物が開示される。PSCは、限定されるものではないがiPSCおよび胚性幹細胞(ESC)をはじめとする幹細胞でありうる。

【0114】

HPCまたはEPCを産生する方法に使用されるPSCは、有糸細胞分裂により自己を複製する能力および多岐にわたる特殊化された細胞型に分化する能力により特徴付けられる。大別される哺乳動物幹細胞の2つのタイプは、胚盤胞に見いだされる胚性幹細胞および成体組織に見いだされる成体幹細胞である。発生中の胚では、幹細胞は、特殊化された胚組織のすべてに分化可能である。成体生物では、幹細胞およびプロジェニター細胞は、

50

特殊化された細胞を補充する生体修復系として作用するとともに、血液、皮膚、腸組織などの再生器官の正常代謝回転を維持する。

【0115】

特定の態様では、本明細書で用いられるPSCは、本開示のHPC、DE細胞、またはEPCをはじめとする生体のすべての細胞型に分化する潜在能力を維持しつつ*in vitro*で長期増殖可能なヒトESCまたはiPSCである。そのため、これらの細胞は、薬剤開発および治療的使用の両方のために患者特異的機能細胞の無制限供給を潜在的に提供しうる。ある特定の態様は、プログラミング遺伝子の組合せ発現を介してESCやiPSCなどのヒトPSCからフォワードプログラミングにより複系列HPC、DE細胞、またはEPCを提供する。

10

【0116】

A. 胚性幹細胞

ある特定の態様では、PSCは胚性幹細胞(ESC)である。ES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来し、高い*in vitro*分化能を有する。ES細胞は、発生中の胚の外側栄養外胚葉を除去してから成長細胞のフィーダー層上で内部塊細胞を培養することにより単離可能である。再プレーティングされた細胞は、増殖を継続してES細胞の新しいコロニーを産生可能であり、このコロニーは、取出し、解離、再プレーティング、および成長が可能である。未分化ES細胞を「継代培養」するこのプロセスは、何回か繰り返して未分化ES細胞を含有する細胞系を産生可能である(米国特許第5,843,780号明細書、同第6,200,806号明細書、同第7,029,913号明細書)。ES細胞は、その多能性を維持しつつ増殖する潜在能力を有する。たとえば、ES細胞は、細胞および細胞分化を制御する遺伝子に関する研究に有用である。ES細胞の多能性は、遺伝子操作および選択と組み合わせることでトランスジェニックマウス、キメラマウス、およびノックアウトマウスの生成を介して*in vivo*遺伝子解析研究に使用可能である。

20

【0117】

マウスES細胞の産生方法は周知である。一方法では、129系マウス由来の着床前の胚盤胞をマウス抗血清で処理して栄養外胚葉(trophoectoderm)を除去し、化学的に不活性化されたマウス胚性線維芽のフィーダー細胞層上のウシ胎仔血清を含有する培地で内部細胞塊を培養する。発生する未分化ES細胞のコロニーをウシ胎仔血清の存在下でマウス胚性線維芽フィーダー層上で継代培養してES細胞の集団を産生する。いくつかの方法では、血清含有培養培地にサイトカイン白血病抑制因子(LIF)を添加することによりフィーダー層の不在下でマウスES細胞を成長させることが可能である(Smith, 2000)。他の方法では、骨形態形成タンパク質およびLIFの存在下で無血清培地でマウスES細胞を成長させることが可能である(Ying et al., 2003)。

30

【0118】

ヒトES細胞は、以上に記載の方法により、精子および卵細胞の融合、核移行、単為発生(pathogenesis)、またはクロマチンのリプログラミングおよび形質膜へのリプログラムクロマチンの組込みによる胚細胞の産生により産生される接合体または胚盤胞の段階の哺乳動物胚から産生または誘導することが可能である(Thomson and Marshall, 1998、Reubinoff et al., 2000)。一方法では、ヒト胚盤胞を抗ヒト血清に暴露し、栄養外胚葉細胞を溶解させて内部細胞塊から除去し、この内部細胞塊をマウス胚性線維芽のフィーダー層上で培養する。さらに、内部細胞塊に由来する細胞集塊を化学的または機械的に解離し、再プレーティングし、未分化形態を有するコロニーをマイクロピペットにより選択し、解離し、そして再プレーティングする。いくつかの方法では、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で線維芽細胞のフィーダー層上でES細胞を培養することにより、血清を用いることなくヒトES細胞を成長させることが可能である(Amit et al., 2000)。他の方法では、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有する「馴化」培地の存在下でMATRIGEL(商標)やラミニンなどのタンパク質マトリックス上で細胞を培養することにより、フィーダー細胞層

40

50

を用いることなくヒトES細胞を成長させることが可能である (Xu et al., 2001)。

【0119】

また、以上に記載の方法 (Thomson and Marshall, 1998、Thomson et al., 1995、Thomson and Odorico, 2000、米国特許第5,843,780号明細書)によりアカゲザルおよびマーモセットをはじめとする他の生物から、さらには樹立されたマウスおよびヒト細胞系から、ES細胞を誘導することも可能である。たとえば、樹立されたヒトES細胞系としては、MAOI、MA09、ACT-4、HI、H7、H9、H13、H14、およびACT30が挙げられる。さらなる例として、樹立されたマウスES細胞系としては、129系マウス胚の内部細胞塊から樹立されたCGR8細胞系が挙げられる。また、CGR8細胞の培養物は、フィーダー層を用いることなくLIFの存在下で成長させることが可能である。

10

【0120】

ES幹細胞は、転写因子Oct4、アルカリホスファターゼ (AP)、段階特異的胚抗原SSEA-1、段階特異的胚抗原SSEA-3、段階特異的胚抗原SSEA-4、転写因子NANOG、腫瘍拒絶抗原1-60 (TRA-1-60)、腫瘍拒絶抗原1-81 (TRA-1-81)、SOX2、またはREX1をはじめとするタンパク質マーカーにより検出可能である。

【0121】

B. 誘導多能性幹細胞

他の態様では、本明細書で用いられるPSCは誘導多能性幹 (iPS) 細胞であり、通常、iPS細胞またはiPSCと略記される。多能性の誘導は、多能性に関連する転写因子の導入を介して体細胞をリプログラムすることにより、最初にマウス細胞を用いて2006年に (Yamanaka et al., 2006)、そしてヒト細胞を用いて2007年に (Yu et al., 2007、Takahashi et al., 2007) 達成された。iPSCの使用は、ES細胞の大規模な臨床使用に伴う倫理上および実施上の問題のほとんどを回避し、iPSC由来自己移植片を有する患者は、移植拒絶を予防するための生涯にわたる免疫抑制治療を必要としないこともある。

20

【0122】

生殖細胞を除いて、いずれの細胞もiPSCの出発点として使用可能である。たとえば、細胞型は、角化細胞、線維芽細胞、造血細胞、間葉細胞、肝細胞、または胃細胞でありうる。T細胞もまた、リプログラミング用の体細胞源として使用しうる (米国特許第8,741,648号明細書、米国特許出願公開第2015/0191697号明細書)。細胞分化の程度にも細胞が採取される動物の年齢にも制限はなく、未分化プロジェニター細胞 (体性幹細胞を含む) および最終分化成熟細胞でさえも、本明細書に開示される方法で体細胞源として使用可能である。iPS細胞は、ヒトES細胞を特定の細胞型に分化させてSSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1~60、およびTRA-1~81をはじめとするヒトES細胞マーカーを発現することが知られる条件下で成長させることが可能である。

30

【0123】

体細胞は、当業者に公知の方法を用いてiPS細胞を産生するようにリプログラムすることが可能である。当業者であればiPS細胞を容易に産生することが可能である。たとえば、米国特許出願公開第2009/0246875号明細書、米国特許出願公開第2010/0210014号明細書、米国特許出願公開第2012/0276636号明細書、米国特許第8,058,065号明細書、米国特許第8,129,187号明細書、PCT国際公開第2007/069666A1号パンフレット、米国特許第8,268,620号明細書、米国特許第8,546,140号明細書、米国特許第9,175,268号明細書、米国特許第8,741,648号明細書、米国特許出願公開第2011/0104125号明細書、および米国特許第8,691,574号明細書 (参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。一般的には、核リプログラミング因子は、体細胞か

40

50

ら多能性幹細胞を産生するために使用される。いくつかの実施形態では、Klf4、c-My c、Oct3/4、Sox2、Nanog、およびLin28の少なくとも3つまたは少なくとも4つが利用される。他の実施形態では、Oct3/4、Sox2、c-My c、およびKlf4が利用されるか、またはOct3/4、Sox2、Nanog、およびLin28が利用される。

【0124】

これらの核リプログラミング物質のマウスおよびヒトcDNA配列は、国際公開第2007/069666号パンフレットおよび米国特許第8,183,038号明細書(参照により本明細書に組み込まれる)に挙げられたNCBI受託番号に基づいて入手可能である。1つ以上のリプログラミング物質またはこれらのリプログラミング物質をコードする核酸の導入方法は、当技術分野で公知であり、たとえば、米国特許第8,268,620号明細書、同第8,691,574号明細書、同第8,741,648号明細書、同第8,546,140号明細書、米国特許第8,900,871号明細書、および米国特許第8,071,369号明細書(いずれも参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

10

【0125】

誘導されたら、多能性を維持するのに十分な培地でiPSCを培養することが可能である。米国特許第7,442,548号明細書および米国特許出願公開第2003/0211603号明細書に記載されるように、iPSCは、多能性幹細胞、より特定的には胚性幹細胞を培養するために開発された各種培地および技術で使用する。マウス細胞の場合には、培養は、分化抑制因子として白血病抑制因子(LIF)を通常の培地に添加して行われる。ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を添加することが望ましい。当業者には公知であろうが、iPSCを培養および維持するための他の方法を本明細書に開示される方法と併用しうる。

20

【0126】

ある特定の実施形態では、規定されていない条件を使用しうる。たとえば、幹細胞を未分化状態に維持するために、線維芽フィーダー細胞上または線維芽フィーダー細胞に暴露された培地上で多能性細胞を培養しうる。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞分裂を終了させるために放射線または抗生物質で処理されたマウス胚性線維芽細胞をフィーダー細胞として共存させて培養される。代替的に、TESR(商標)培地(Ludwig et al., 2006a、Ludwig et al., 2006b)やE8(商標)/Essential8(商標)培地(Chen et al., 2011)などの規定のフィーダー非依存培養系を用いて、本質的に未分化状態で多能性細胞を培養および維持しうる。

30

【0127】

プラスミドは、たとえば、レギュレートされた高コピー数の達成、および細菌におけるプラスミド不安定性の潜在的原因の回避、およびヒト細胞をはじめとする哺乳動物細胞での使用に適合可能なプラスミド選択手段の提供など、いくつかの目標を踏まえて設計されてきた。ヒト細胞で使用するためにプラスミドに課された2つの要件には、とくに注意を払われてきた。第1に、多量のDNAの産生および精製が可能になるように、大腸菌(E. coli)での維持および発酵に好適である。第2に、ヒト患者および動物で使用するうえで安全かつ好適である。第1の要件では、細菌発酵時に比較的容易に選択および安定維持を可能にする高コピー数のプラスミドが要求される。第2の要件では、選択可能マーカーや他のコード配列などのエレメントへの考慮が要求される。いくつかの実施形態では、マーカーをコードするプラスミドは、(1)高コピー数の複製起点、(2)選択可能マーカー、たとえば、限定されるものではないがカナマイシンによる抗生物質選択用のneo遺伝子、(3)チロシナーゼエンハンサーをはじめとする転写終止配列、および(4)各種核酸カセット組込み用のマルチクロニング部位、および(5)チロシナーゼプロモーターに作動可能に結合されたマーカーをコードする核酸配列で構成される。特定の態様では、プラスミドは、チロシナーゼエンハンサーもプロモーターも含まない。タンパク質

40

50

をコードする核酸を誘導するための当技術分野で公知のプラスミドベクターは多数存在する。これらとしては、限定されるものではないが、米国特許第 6, 103, 470 号明細書、米国特許第 7, 598, 364 号明細書、米国特許第 7, 989, 425 号明細書、および米国特許第 6, 416, 998 号明細書、ならびに米国特許出願第 12/478, 154 号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるベクターが挙げられる。

【0128】

エピソーム遺伝子送達系は、プラスミド、エプスタイン・バーウイルス（EBV）ベースのエピソームベクター（米国特許第 8, 546, 140 号明細書）、酵母ベースのベクター、アデノウイルスベースのベクター、シミアンウイルス 40（SV40）ベースのエピソームベクター、ウシパピローマウイルス（BPV）ベースのベクター、またはレンチウイルスベクターでありうる。ウイルス遺伝子送達系は、RNA ベースまたは DNA ベースのウイルスベクターでありうる（PCT/JP2009/062911 号パンフレット、PCT/JP2011/069588 号パンフレット）。

10

【0129】

C. 体細胞核移入により誘導された胚性幹細胞

HPC、DE細胞、またはEPCを産生するためのPSCはまた、体細胞核移入（ドナー核が紡錘体フリー卵母細胞に移入される）を利用して調製しうる。核移行により産生される幹細胞は、ドナー核と遺伝的に同一である。一方法では、アカゲザルの皮膚線維芽細胞由来のドナー線維芽細胞核は、電気融合により紡錘体フリー成熟中期IIアカゲザル卵母細胞の細胞質に導入される（Byrne et al., 2007）。融合卵母細胞は、イオノマイシンへの暴露により活性化され、次いで、胚盤胞段階までインキュベートされる。選択された胚盤胞の内部細胞塊は、次いで、胚性幹細胞系を産生するように培養される。胚性幹細胞系は、正常ES細胞形態を示し、各種ES細胞マーカーを発現し、かつ *in vitro* および *in vivo* の両方で複数の細胞型に分化する。

20

【0130】

III. メチル CpG 結合タンパク質 2 の遺伝子破壊

ある特定の態様では、MeCP2 遺伝子の発現、活性、または機能は、PSC（たとえばESCやiPSC）などの細胞において破壊される。いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、遺伝子の破壊、たとえば、ノックアウト、挿入、ミスセンス突然変異もしくはフレームシフト突然変異たとえば両対立遺伝子フレームシフト突然変異、遺伝子の全部もしくは一部たとえば1つ以上のエクソンもしくはその一部の欠失、および/またはノックインを行うことにより実施される。たとえば、破壊は、DNA結合標的化ヌクレアーゼを含めて配列特異的ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼにより、たとえば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）および転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）およびRNAガイドヌクレアーゼ、たとえば、具体的にはMeCP2 遺伝子の配列またはその一部を標的とするように設計されたCRISPR関連ヌクレアーゼ（Cas）により、行うことが可能である。

30

【0131】

いくつかの実施形態では、遺伝子の発現、活性、および/または機能の破壊は、遺伝子破壊により行われる。いくつかの態様では、遺伝子は、遺伝子破壊の不在下または破壊を行うために導入された成分の不在下での発現と比較して、少なくとも20、30、もしくは40%またはそれらの近傍の%、一般的には少なくとも50、60、70、80、90、もしくは95%またはそれらの近傍の%だけ発現が低減されるように破壊される。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、破壊は、より後の時点で遺伝子の発現が回復されるように一過的または可逆的である。他の実施形態では、破壊は、可逆的でも一過的でもなくたとえば永久的である。

【0133】

いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、遺伝子中の1つ以上の二本鎖切断および/ま

50

たは1つ以上の一本鎖切断の誘導により、典型的には、標的化法により行われる。いくつかの実施形態では、二本鎖切断または一本鎖切断は、ヌクレアーゼにより、たとえば、遺伝子標的化ヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼにより行われる。いくつかの態様では、破壊は、遺伝子のコード領域たとえばエクソンで誘導される。たとえば、いくつかの実施形態では、誘導は、コード領域のN末端部近傍、たとえば、第1のエクソン、第2のエクソン、または後続のエクソンで行われる。

【0134】

いくつかの態様では、二本鎖切断または一本鎖切断は、非相同末端結合(NHEJ)や相同指向修復(HDR)などの細胞修復プロセスを介して修復を受ける。いくつかの態様では、修復プロセスは、エラープローンであり、フレームシフト突然変異たとえば両対立遺伝子フレームシフト突然変異などの遺伝子破壊をもたらす。遺伝子の完全ノックアウトを引き起こす可能性がある。たとえば、いくつかの態様では、破壊は、欠失、突然変異、および/または挿入を誘導することを含む。いくつかの実施形態では、破壊は、早期停止コドンの存在をもたらす。いくつかの態様では、挿入、欠失、転座、フレームシフト突然変異、および/または未成熟停止コドンの存在は、遺伝子の発現、活性、および/または機能の破壊をもたらす。

10

【0135】

いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、アンチセンス技術を用いて達成され、たとえば、遺伝子の発現を選択的に抑制または阻止するために、RNA干渉(RNAi)、低分子干渉RNA(sRNA)、低分子ヘアピン(shRNA)、および/またはリボザイムが使用される。sRNA技術は、遺伝子から転写されるmRNAのヌクレオチド配列に相同な配列と、ヌクレオチド配列に相補的な配列と、を有する二本鎖RNA分子を利用するRNAiである。sRNAは、一般に、遺伝子から転写されるmRNAの一領域に相同/相補的であるか、または異なる領域に相同/相補的な複数のRNA分子を含むsRNAでありうる。いくつかの態様では、sRNAはポリシストロニック構築物に含まれる。特定の態様では、sRNAは、内因性mRNAからの野生型および変異体MeCP2翻訳の両方を抑制する。

20

【0136】

いくつかの態様では、遺伝子破壊は、MeCP2に対する薬理的薬剤または低分子阻害剤を投与することにより行われる。DNAメチル化とクロマチン脱アセチル化との間には関連性がある。MeCP2による転写抑制にはヒストンデアセチラーゼ(HDAC)依存モードおよびHDAC非依存モードの両方がある。そのため、MeCP2を破壊するためにトリコスタチンA(TSA)やバルプロ酸などのHDAC阻害剤を使用可能である。そのほか、タンパク質阻害剤、転写を阻害するDNA結合タンパク質、およびMeCP2タンパク質に結合して機能を阻害するタンパク質を使用する。さらに、分化された雌マウス胚性幹細胞では、PDK1阻害剤は、媒体と比較してXistレベルを減少させ、かつMeCP2 mRNAレベルを増加させた(Bhatnagar et al., 2014)。

30

【0137】

A. エンドヌクレアーゼ

いくつかの実施形態では、破壊は、DNA標的化分子、たとえば、DNA結合タンパク質もしくはDNA結合核酸、またはそれらを含む遺伝子に特異的に結合もしくはハイブリダイズする複合体、化合物、もしくは組成物を用いて達成される。いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、DNA結合ドメイン、たとえば、ジンクフィンガータンパク質(ZFP)DNA結合ドメイン、転写アクチベーター様タンパク質(TAL)もしくはTALエフェクター(TALE)DNA結合ドメイン、クラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)DNA結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼ由来DNA結合ドメインを含む。ジンクフィンガー系、TALE系、およびCRISPR系の結合ドメインは、たとえば、天然に存在するジンクフィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域の工学操作(1つ以上のアミノ酸の改変)により、あらかじめ決められたヌ

40

50

クレオチド配列に結合するように工学操作することが可能である。工学操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、天然に存在しないタンパク質である。設計の合理的基準には、置換規則の適用、さらには既存のZFPおよび/またはTALE設計ならびに結合データに関する情報を記憶するデータベースの情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用が含まれる。たとえば、米国特許第6,140,081号明細書、同第6,453,242号明細書、および同第6,534,261号明細書を参照されたい。また、国際公開第98/53058号パンフレット、国際公開第98/53059号パンフレット、国際公開第98/53060号パンフレット、国際公開第02/016536号パンフレット、および国際公開第03/016496号パンフレットならびに米国特許出願公開第2011/0301073号明細書も参照されたい。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、DNA標的化分子、複合体、または組合せは、DNA結合分子と、遺伝子の抑制または破壊を促進するエフェクタードメインなどの1つ以上の追加のドメインと、を含有する。たとえば、いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、DNA結合タンパク質と異種レギュラトリドメインまたはその機能性断片とを含む融合タンパク質により行われる。いくつかの態様では、ドメインは、たとえば、転写因子ドメイン、たとえば、アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー、サイレンサー、癌遺伝子、DNA修復酵素ならびにその関連因子およびモディファイヤー、DNA再構成酵素ならびにその関連因子およびモディファイヤー、クロマチン関連タンパク質およびそのモディファイヤー、たとえば、キナーゼ、アセチラーゼおよびデアセチラーゼ、およびDNA修飾酵素、たとえば、メチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、およびそれらの関連因子およびモディファイヤーを含む。DNA結合ドメインとヌクレアーゼ切断ドメインとの融合に関する詳細については、たとえば、米国特許出願公開第2005/0064474号明細書、同第2006/0188987号明細書、および同第2007/0218528号明細書（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。いくつかの態様では、追加のドメインはヌクレアーゼドメインである。そのため、いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、工学操作されたタンパク質たとえばヌクレアーゼ、およびヌクレアーゼなどの非特異的DNA切断分子に融合または複合体化された配列特異的DNA結合ドメインで構成されるヌクレアーゼ含有複合体または融合タンパク質を用いて、遺伝子編集またはゲノム編集により促進される。

20

30

【0139】

いくつかの態様では、これらの標的化キメラヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ含有複合体は、標的化された二本鎖切断または一本鎖切断を誘導して、エラープロンな非相同末端結合（NHEJ）および相同指向修復（HDR）をはじめとする細胞DNA修復機序を刺激することにより、正確な遺伝子改変を行う。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ、たとえば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEヌクレアーゼ（TALEN）、およびRNAガイドエンドヌクレアーゼ（RGEN）、たとえば、CRISPR関連（Cas）タンパク質またはメガヌクレアーゼである。

40

【0140】

いくつかの実施形態では、ドナー核酸、たとえば、遺伝子工学操作された抗原レセプターをコードするドナープラスミドまたは核酸が提供され、DSBの導入に続いてHDRにより遺伝子編集の部位に挿入される。そのため、いくつかの実施形態では、遺伝子の破壊および抗原レセプターたとえばCARの導入は同時に行われ、それにより、遺伝子は、部分的にはCARコード核酸のノックインまたは挿入により破壊される。

【0141】

いくつかの実施形態では、ドナー核酸はまったく提供されない。いくつかの態様では、DSBの導入に続くNHEJ媒介修復は、たとえば、ミスセンス突然変異またはフレームシフト突然変異を生成することにより、遺伝子破壊を引き起こしうる挿入または欠失の突然変異をもたらす。

50

【0142】

1. ZFPおよびZFN

いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、エンドヌクレアーゼなどのエフェクタータンパク質に融合されたDNA結合タンパク質、たとえば、1つ以上のジンクフィンガータンパク質(ZFP)または転写アクチベーター様タンパク質(TAL)を含む。例としては、ZFN、TALE、およびTALENが挙げられる。Lloyd et al., 2013を参照されたい。

【0143】

いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、配列特異的にDNAに結合する1つ以上のジンクフィンガータンパク質(ZFP)またはそのドメインを含む。ZFPまたはそのドメインは、亜鉛イオンの配位を介して構造が安定化された結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的にDNAに結合するタンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記されることが多い。ZFPの中には、典型的には9~18ヌクレオチド長の特定のDNA配列を標的とする人工ZFPドメインが含まれる。このドメインは、個別のフィンガーのアセンブリーにより生成される。

【0144】

ZFPとしては、単一のフィンガードメインが約30アミノ酸長であり、単一のターンの2つのシステインと共に亜鉛を介して配位された2つの不変ヒスチジン残基を含有するヘリックスを含有し、かつ2、3、4、5、または6つのフィンガーを有するものが挙げられる。一般的には、ZFPの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックス上の4つのヘリックス位置(-1、2、3、および6)でアミノ酸置換を行うことにより改変しうる。そのため、いくつかの実施形態では、ZFPまたはZFP含有分子は、天然には存在せず、たとえば、選択された標的部位に結合するように工学操作される。たとえば、Beerli et al., 2002、Pabo et al., 2001、Isalan et al., 2001、Segal et al., 2001、Choo et al., 2000、米国特許第6,453,242号明細書、同第6,534,261号明細書、同第6,599,692号明細書、同第6,503,717号明細書、同第6,689,558号明細書、同第7,030,215号明細書、同第6,794,136号明細書、同第7,067,317号明細書、同第7,262,054号明細書、同第7,070,934号明細書、同第7,361,635号明細書、同第7,253,273号明細書、および米国特許出願公開第2005/0064474号明細書、同第2007/0218528号明細書、同第2005/0267061号明細書(すべてその全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0145】

いくつかの態様では、MeCP2破壊は、遺伝子の第1の標的部位と第1のZFPとを接触させて遺伝子を破壊することにより行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子の標的部位と、6つのフィンガーおよびレギュラトリドメインを含む融合ZFPと、を接触させることにより遺伝子の発現を阻害する。

【0146】

いくつかの実施形態では、接触させる工程は、遺伝子の第2の標的部位と第2のZFPとを接触させることをさらに含む。いくつかの態様では、第1および第2の標的部位は隣接している。いくつかの実施形態では、第1および第2のZFPは共有結合されている。いくつかの態様では、第1のZFPは、1つのレギュラトリドメインまたは少なくとも2つのレギュラトリドメインを含む融合タンパク質である。

【0147】

いくつかの実施形態では、第1および第2のZFPは、それぞれ1つのレギュラトリドメインを含むまたはそれぞれ少なくとも2つのレギュラトリドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、レギュラトリドメインは、転写リプレッサー

、転写アクチベーター、エンドヌクレアーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、またはヒストンデアセチラーゼである。

【0148】

いくつかの実施形態では、ZFPは、プロモーターに作動可能に結合されたZFP核酸によりコードされる。いくつかの態様では、本方法は、最初に核酸を脂質：核酸複合体としてまたはネイキッド核酸として細胞に投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、ZFPは、プロモーターに作動可能に結合されたZFP核酸を含む発現ベクターによりコードされる。いくつかの実施形態では、ZFPは、誘導プロモーターに作動可能に結合された核酸によりコードされる。いくつかの態様では、ZFPは、弱いプロモーターに作動可能に結合された核酸によりコードされる。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、標的部位は遺伝子の転写開始部位の上流にある。いくつかの態様では、標的部位は遺伝子の転写開始部位に隣接している。いくつかの態様では、標的部位は、遺伝子の転写開始部位の下流のRNAポリメラーゼ休止部位に隣接している。

【0150】

いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を形成するようにDNA切断ドメインに融合されたジンクフィンガーDNA結合ドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素に由来する切断ドメイン(または切断ヘアドメイン)と、工学操作されていてもいなくてもよい1つ以上のジンクフィンガー結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、切断ドメインは、IIS型制限エンドヌクレアーゼFokIに由来する。FokIは、一般に、一方の鎖上のその認識部位から9ヌクレオチドの位置および他方の鎖上のその認識部位から13ヌクレオチドの位置でDNAの二本鎖切断を触媒する。たとえば、米国特許第5,356,802号明細書、同第5,436,150号明細書、および同第5,487,994号明細書、さらにはLi et al., 1992、Li et al., 1993、Kim et al., 1994a、Kim et al., 1994b. 269:31, 978-31, 982を参照されたい。]

20

【0151】

いくつかの実施形態では、ZFNは、工学操作された細胞に存在する遺伝子を標的とする。いくつかの態様では、ZFNは、たとえば遺伝子のコード領域のあらかじめ決められた部位で効率的に二本鎖切断(DSB)を生成する。標的とされる典型的な領域は、エクソン、N末端領域をコードする領域、第1のエクソン、第2のエクソン、およびプロモーターまたはエンハンサーの領域を含む。いくつかの実施形態では、ZFNの一過的発現は、工学操作された細胞の標的遺伝子の高効率な永久破壊を促進する。とくに、いくつかの実施形態では、ZFNの送達は、50%を超える効率で遺伝子の永久破壊をもたらす。

30

【0152】

工学操作された多くの遺伝子特異的ジンクフィンガーは市販されている。たとえば、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)と協同でジンクフィンガー構築用のプラットフォーム(CompoZr)を開発し、研究者によるジンクフィンガーの構築および検証を完全に回避できるようにして、何千ものジンクフィンガーを特異的に標的とするタンパク質を提供している(Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405)。いくつかの実施形態では、市販のジンクフィンガーが使用されるかまたはカスタム設計される。(たとえば、Sigma-Aldrichカタログ番号CSTZFN、CSTZFN、CTIL-1KT、およびPZD0020を参照されたい)。

40

【0153】

2. TAL、TALE、およびTALEN

いくつかの実施形態では、DNA標的化分子は、たとえば、転写アクチベーター様タンパク質エフェクター(TALE)タンパク質中に、天然に存在するまたは工学操作され

50

た（天然に存在しない）転写アクチベーター様タンパク質（TAL）DNA結合ドメインを含む。たとえば、米国特許出願公開第2011/0301073号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0154】

TALE DNA結合ドメインまたはTALEは、1つ以上のTALEリピートドメイン/単位を含むポリペプチドである。リピートドメインは、そのコグネイト標的DNA配列へのTALEの結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」ともいう）は、典型的には33～35アミノ酸長であり、天然に存在するTALEタンパク質中の他のTALEリピート配列に対して少なくともいくつかの配列相同性を呈する。各TALEリピート単位は、典型的にはリピートの位置12および/または13にリピート可変二塩基（RVD）を構成する1または2 DNA結合残基を含む。これらのTALEのDNA認識用の天然（カノニカル）コードは、位置12および13のHD配列がシトシン（C）への結合をもたらし、NGがTに結合し、NIがAに結合し、NNがGまたはAに結合し、かつNOがTに結合するように決定されており、非カノニカル（非定型）RVDもまた知られている。米国特許出願公開第2011/0301073号明細書を参照されたい。いくつかの実施形態では、TALEは、標的DNA配列に対する特異性をもたせてTALEアレイを設計することにより、任意の遺伝子を標的としうる。標的配列は一般にチミジンから始まる。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、分子は、TALEヌクレアーゼ（TALEN）などのDNA結合エンドヌクレアーゼである。いくつかの態様では、TALENは、TALEに由来するDNA結合ドメインと、核酸標的配列を切断するヌクレアーゼ触媒ドメインと、を含む融合タンパク質である。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、TALENは、遺伝子の標的配列を認識して切断する。いくつかの態様では、DNAの切断は、二本鎖切断をもたらす。いくつかの態様では、破壊は、相同組換えまたは非相同末端結合（NHEJ）の速度を向上させる。一般に、NHEJは、多くの場合、切断部位のDNA配列に変化をもたらす不完全修復プロセスである。いくつかの態様では、修復機序は、直接再ライゲーションを介してまたはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合を介して2つのDNA末端の残りの部分を再結合することを含む（Critchlow and Jackson, 1998）。いくつかの実施形態では、NHEJを介する修復は、小さな挿入または欠失をもたらす、遺伝子の破壊して抑制するために使用可能である。いくつかの実施形態では、改変は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加でありうる。いくつかの態様では、切断誘導突然変異誘発イベント、すなわち、NHEJイベントに続いて突然変異誘発イベントが起こった細胞は、当技術分野で周知の方法により同定および/または選択が可能である。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、TALEリピートは、遺伝子を特異的に標的とするようにアセンブルされる。（Gaj et al., 2013）。18,740ヒトタンパク質コード遺伝子を標的とするTALENのライブラリーが構築されている（Kim et al., 2013）。カスタム設計TALEアレイは、Collectis BioResearch（Paris, France）、Transposagen Biopharmaceuticals（Lexington, KY, USA）、およびLife Technologies（Grand Island, NY, USA）を介して市販されている。具体的には、CD38を標的とするTALENが市販されている（Gencopoeiaカタログ番号HTN222870-1、HTN222870-2、およびHTN222870-3）。例示的な分子は、たとえば、米国特許出願公開第2014/0120622号明細書および同第2013/0315884号明細書に記載されている。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、TALENは、1つ以上のプラスミドベクターによりコード

50

されるトランス遺伝子として導入される。いくつかの態様では、プラスミドベクターは、前記ベクターを受容した細胞の同定および/または選択を提供する選択マーカ含有しうる。

【0159】

3. RGEN (CRISPR/Cas系)

いくつかの実施形態では、1つ以上のDNA結合核酸を用いて破壊が行われる。たとえば、RNAガイドエンドヌクレアーゼ (RGEN) を介して破壊が行われる。たとえば、破壊は、クラスター化規則的間隔短鎖回文リピート (CRISPR) およびCRISPR関連 (Cas) タンパク質を用いて行うことが可能である。一般に、「CRISPR系」とは、Cas遺伝子をコードする配列を含めてCRISPR関連 («Cas») 遺伝子の転写物およびその活性の発現に關与するまたはそれを指令する他のエレメント、tracr (トランス活性化CRISPR) 配列 (たとえば、tracrRNAまたは活性部分tracrRNA)、tracrメイト配列 (内因性CRISPR系との関連で「ダイレクトリリピート」およびtracrRNAプロセシング部分ダイレクトリリピートを包含する)、ガイド配列 (内因性CRISPR系との関連で「スペーサー」ともいう)、ならびに/またはCRISPR遺伝子座に由来する他の配列および転写物を総称して意味する。

10

【0160】

CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼ系は、DNAに配列特異的に結合する非コードRNA分子 (ガイド) RNAと、ヌクレアーゼ機能 (たとえば2つのヌクレアーゼドメイン) を有するCasタンパク質 (たとえばCas9) と、を含みうる。CRISPR系の1つ以上のエレメントは、内因性CRISPR系を含む特定の生物たとえばストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) に由来するI型、II型、またはIII型のCRISPR系に由来しうる。

20

【0161】

いくつかの態様では、CasヌクレアーゼおよびgRNA (標的配列に特異的なcrRNAと固定tracrRNAとの融合体を含む) は、細胞に導入される。一般に、gRNAの5'末端の標的部位は、相補的塩基対合を用いてCasヌクレアーゼを標的部位たとえば遺伝子に標的化する。標的部位は、典型的にはNGGやNAGなどのプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列のすぐ5'側のその位置に基づいて選択しうる。これに關連して、gRNAは、標的DNA配列に対応するようにガイドRNAの最初の20、19、18、17、16、15、14、14、12、11、または10ヌクレオチドを改変することにより所望の配列を標的とする。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位でCRISPR複合体の形成を促進するエレメントにより特徴付けられる。典型的には、「標的配列」とは、一般に、相補性を有するようにガイド配列を設計して標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションによりCRISPR複合体の形成を促進するようにするための配列を意味する。ハイブリダイゼーションを引き起こしてCRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性がある限り、必ずしも完全な相補性は必要とされない。

30

【0162】

CRISPR系は、本明細書で考察されるように、標的部位で二本鎖切断 (DSB) を誘導してから破壊を引き起こすことが可能である。他の実施形態では、標的部位で一本鎖にニックを入れるために、「ニッカーゼ」とみなされるCas9変異体を使用される。たとえば、特異性を向上させるために、ニックの導入と同時に5'オーバーハングが導入されるように一対の異なるgRNA標的化配列によりそれぞれ指令される対をなすニッカーゼを使用可能である。他の実施形態では、遺伝子発現に影響を及ぼすように転写リプレッサーや転写アクチベーターなどの異種エフェクタードメインに触媒不活性Cas9が融合される。

40

【0163】

標的配列は、DNAポリヌクレオチドやRNAポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含みうる。標的配列は、細胞の核または細胞質に、たとえば、細胞のオルガネ

50

ラ内に位置しうる。一般に、標的配列を含む標的遺伝子座に組換えを導入するために使用しうる配列またはテンプレートは、「編集テンプレート」または「編集ポリヌクレオチド」または「編集配列」という。いくつかの態様では、外因性テンプレートポリヌクレオチドは、編集テンプレートということもある。いくつかの態様では、組換えは相同組換えである。

【0164】

典型的には、内因性CRISPR系との関連では、CRISPR複合体（標的配列にハイブリダイズされるかつ1つ以上のCasタンパク質に複合体化されるガイド配列を含む）の形成は、標的配列位置またはその近傍（たとえば、標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50塩基対内、またはそれ以上の塩基対内）で一方または両方の鎖の切断をもたらす。野生型tracr配列の全部または一部（たとえば、野生型tracr配列の約20、26、32、45、48、54、63、67、85ヌクレオチド、またはそれ以上）を含みうるまたはそれからなりうるtracr配列はまた、たとえば、tracr配列の少なくとも一部に沿って、ガイド配列に作動可能に結合されたtracrメイト配列の全部または一部にハイブリダイズすることにより、CRISPR複合体の一部を形成しうる。tracr配列は、ハイブリダイズしてCRISPR複合体の形成に關与するのに十分な程度のtracrメイト配列に対する相補性、たとえば、最適にアライメントしたときにtracrメイト配列の長さに沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の配列相補性を有する。

10

【0165】

CRISPR系の1つ以上のエレメントの発現を駆動する1つ以上のベクターは、CRISPR系のエレメントの発現が1つ以上の標的部位でCRISPR複合体の形成を指令するように細胞に導入可能である。成分はまた、タンパク質および/またはRNAとして細胞に送達可能である。たとえば、Cas酵素、tracrメイト配列に結合されたガイド配列、およびtracr配列は、それぞれ、個別のベクター上の個別のレギュラトリーエレメントに作動可能に結合しうる。代替的に、同一または異なるレギュラトリーエレメントから発現される2つ以上のエレメントは、単一のベクターで組み合わせるとともに、1つ以上の追加のベクターは、第1のベクターに含まれないCRISPR系の任意の成分を提供する。ベクターは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」ともいう）などの1つ以上の挿入部位を含みうる。いくつかの実施形態では、1つ以上の挿入部位は、1つ以上のベクターの1つ以上の配列エレメントの上流および/または下流に位置する。複数の異なるガイド配列を使用する場合、単一の発現構築物を用いて細胞内の複数の異なる対応する標的配列にCRISPR活性を標的化するようにしうる。

20

30

【0166】

ベクターは、Casタンパク質などのCRISPR酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合されたレギュラトリーエレメントを含みうる。限定されるものではないがCasタンパク質の例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（Csn1およびCsx12としても知られる）、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、それらのホモログまたはそれらの改変体が挙げられる。これらの酵素は既知であり、たとえば、S.ピオゲネス（S.pyogenes）Cas9タンパク質のアミノ酸配列は、受託番号Q99ZW2としてSwissProtデータベースに見いだしうる。

40

【0167】

CRISPR酵素は、Cas9（たとえば、S.ピオゲネス（S.pyogenes）またはS.ニューモニア（S.pneumonia）由来）でありうる。CRISPR酵素は、たとえば、標的配列内および/または標的配列の相補体内において、標的配列の位

50

置で一方または両方の鎖の切断を指令可能である。ベクターは、突然変異されたCRISPR酵素が、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠如するように、対応する野生型酵素に対して突然変異されたCRISPR酵素をコードすることが可能である。たとえば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9のRuvCII触媒ドメインでアスパラギン酸 アラニン置換(D10A)を行うと、Cas9は、両方の鎖を切断するヌクラーゼからニッカーゼ(一本鎖を切断する)に変換される。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、ガイド配列、たとえば、DNA標的のセンス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ標的とする2つのガイド配列と組み合わせて使用しうる。この組合せを用いれば、両方の鎖にニックを入れてNH EJまたはHDRを誘導できるようになる。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現に対してコドン最適化が行われる。真核細胞は、特定の生物、たとえば、限定されるものではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長動物をはじめとする哺乳動物のものまたはそれに由来するものでありうる。一般に、コドン最適化とは、天然アミノ酸配列を維持しつつ天然配列の少なくとも1つのコドンをその宿主細胞の遺伝子でより高頻度または最も高頻度に用いられるコドンに置き換えることにより対象宿主細胞における発現を向上させるように核酸配列を改変するプロセスを意味する。さまざまな種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定のバイアスを呈する。コドンバイアス(生物間のコドン使用頻度の差)は、多くの場合、伝令RNA(mRNA)の翻訳効率に相関し、ひいては、翻訳されるコドンの性質および特定の転移RNA(tRNA)分子の利用能にとくに依存すると考えられている。細胞で選択されるtRNAの優位性は、一般に、ペプチド合成で最も頻繁に使用されるコドンの現れである。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物において最適な遺伝子発現になるように調整可能である。

20

【0169】

一般に、ガイド配列は、標的ポリヌクレオチド配列に対して十分な相補性を有するとともに標的配列にハイブリダイズして標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指令する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補度、好適なアライメントアルゴリズムを用いて最適にアライメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、またはそれらを超える%である。

30

【0170】

最適アライメントは、配列をアライメントするための任意の好適なアルゴリズムを用いて決定しうる。例としては、限定されるものではないが、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transformに基づくアルゴリズム(たとえば、Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.))、SOAP(soap.genomics.org.cnで入手可能)、およびMaq(maq.sourceforge.netで入手可能)が挙げられる。

40

【0171】

CRISPR酵素は、1つ以上の異種タンパク質ドメインを含む融合タンパク質の一部でありうる。CRISPR酵素融合タンパク質は、任意の追加のタンパク質配列および任意選択的に任意の2つのドメイン間のリンカー配列を含みうる。CRISPR酵素に融合しうるタンパク質ドメインの例としては、限定されるものではないが、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、および次の活性、すなわち、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、および核酸結合活性の1つ以上を有するタンパク質ドメインが挙げられる。限定され

50

るものではないがエピトープタグの例としては、ヒスチジン (H i s) タグ、V5 タグ、F L A G タグ、インフルエンザヘマグルチニン (H A) タグ、M y c タグ、V S V - G タグ、およびチオレドキシニン (T r x) タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、限定されるものではないが、グルタチオン - 5 - トランスフェラーゼ (G S T) を含む、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、ガラクトシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、H c R e d、D s R e d、シアン蛍光タンパク質 (C F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、自己蛍光タンパク質たとえば青色蛍光タンパク質 (B F P) が挙げられる。C R I S P R 酵素は、D N A 分子に結合するまたは他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片、たとえば、限定されるものではない

10

【 0 1 7 2 】

B . 核酸の送達

いくつかの態様では、D N A 標的化分子、複合体、または組合せをコードする核酸は、細胞に投与または導入される。核酸は、典型的には、ウイルス発現ベクターなどの発現ベクターの形態で投与される。いくつかの態様では、発現ベクターは、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、D N A プラスミド発現ベクター、または A A V 発現ベクターである。いくつかの態様では、破壊分子または複合体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドたとえば D N A 標的化分子は、細胞に送達される。いくつかの態様では、送達は、1つ以上のベクター、その1つ以上の転写物、および/またはそれらから転写された1つ以上のタンパク質の送達により細胞に送達される。

20

【 0 1 7 3 】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入した結果として細胞において *i n s i t u* で合成される。いくつかの態様では、ポリペプチドは、細胞外で産生された後、それに導入しうる。ポリヌクレオチド構築物を動物細胞に導入する方法は公知であり、例としては、限定されるものではないが、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムに組み込まれる安定トランスフォーメーション法、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムに組み込まれない一過的トランスフォーメーション法、およびウイルス媒介法が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、たとえば、組換えウイルスベクター (たとえば、レトロウイルス、アデノウイルス)、リポソームなどにより細胞に導入しうる。たとえば、いくつかの態様では、一過的トランスフォーメーション法としては、マイクロインジェクション、電気穿孔、または粒子照射が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、細胞で発現されることを考慮して、ベクター、より特定的にはプラスミドまたはウイルスに含まれうる。

30

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、ウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入法は、哺乳動物細胞または標的組織の核酸に導入するために使用可能である。かかる方法は、C R I S P R 系、Z F P 系、Z F N 系、T A L E 系、および/または T A L E N 系の成分をコードする核酸を培養下または宿主生物中の細胞に投与するために使用可能である。非ウイルスベクター送達系としては、D N A プラスミド、R N A (たとえば、本明細書に記載のベクターの転写物)、ネイキッド核酸、およびリポソームなどの送達媒体に複合体化された核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞への送達後にエピソームゲノムまたは組込みゲノムのいずれかを有する D N A ウイルスおよび R N A ウイルスが挙げられる。遺伝子療法手順のレビューに関しては、A n d e r s o n , 1 9 9 2、N a b e l & F e i g n e r , 1 9 9 3、M i t a n i & C a s k e y , 1 9 9 3、D i l l o n , 1 9 9 3、M i l l e r , 1 9 9 2、V a n B r u n t , 1 9 8 8、V i

40

50

gne, 1995、Kremer & Perricaudet, 1995、Haddad et al., 1995、およびYu et al., 1994を参照されたい。

【0175】

核酸の非ウイルス送達法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティックス、ピロソーム、リボソーム、免疫リボソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ピリオン、およびDNAの作用剤強化取込みが挙げられる。リポフェクションは（たとえば、米国特許第5,049,386号明細書、同第4,946,787号明細書、および同第4,897,355号明細書）に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（たとえば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的レセプター認識リポフェクションに好適なカチオン性および中性の脂質としては、Feignerの国際公開第91117424号パンフレット、国際公開第91116024号パンフレットに記載のものが挙げられる。送達は、細胞（たとえば、*in vitro*もしくは*ex vivo*投与）または標的組織（たとえば、*in vivo*投与）に行いうる。

10

【0176】

いくつかの実施形態では、送達は、核酸の送達ではRNAまたはDNAウイルスベース系を用いて行われる。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、患者に直接投与しうるか（*in vivo*）、または*in vitro*もしくは*ex vivo*で細胞を処理した後で患者に投与するように使用可能である。いくつかの実施形態では、ウイルスベース系としては、遺伝子移入ではレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられる。

20

【0177】

いくつかの態様では、限定されるものではないが、グルタチオン-5-トランスフェラーゼ（GST）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT） - ガラクトシダーゼ、 - グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、および自己蛍光タンパク質たとえば青色蛍光タンパク質（BFP）をはじめとするレポーター遺伝子は、遺伝子産物の発現の変化または改変を測定するためのマーカーとして機能する遺伝子産物をコードするように細胞に導入しうる。さらなる実施形態では、遺伝子産物をコードするDNA分子は、ベクターを介して細胞に導入しうる。いくつかの実施形態では、遺伝子産物はルシフェラーゼである。

30

【0178】

ある特定の実施形態では、トランスジーンカセットは、トランスポザーゼ系を用いて組み込まれる。転位因子（TEまたはトランスポゾン）とは、ゲノム内でその位置を変化させることが可能であり、ときには突然変異の生成または逆転および細胞のゲノムサイズの改変をもたらすDNA配列のことである。トランスポゾンは、挿入突然変異に関する遺伝子研究および組換え遺伝子工学操作に使用可能である。挿入突然変異は、トランスポゾンがベクターとして機能するとき、遺伝子配列の除去および組込みを支援しうる。設計が比較的単純でありDNA配列を移動させる固有の能力を備えていることから、トランスポゾンは、遺伝物質のトランスダクションに対する適合性が高く、理想的な遺伝学的ツールとなる。一般に、トランスポザーゼ系としては、Sleeping Beauty、miniTo12、およびPiggyBacが挙げられる。

40

【0179】

miniTo12プラスミド系（Balciunas et al., 2006）は、トランスジーンを組み込みに使用しうる。2プラスミド系では、一方のプラスミドは、レポーター遺伝子を駆動するプロモーターにフランキングする末端To12配列を含有し、他方のプラスミド（pTrans）は、他のプロモーターの制御下にトランスポザーゼ配列を含有する。miniTo12プラスミド系に使用されるプロモーターは、pCAGGS

50

プロモーターのCMV IEプロモーターでありうる。この系では、miniToolレポーター遺伝子配列は標的ゲノムDNAに取り込まれるが、pTrans配列は取り込まれないであろう。

【0180】

「切り貼り」機序を介してベクターと染色体との間を効率的に転位する可動遺伝エレメントのPiggyBacトランスポゾンを使用可能である。転位時、SuperPBトランスポザーゼは、トランスポゾンベクターの両末端に位置するトランスポゾン特異的逆位末端リピート配列(ITR)を認識し、元の部位から内容物を移動し、それをTTAA染色体部位に効率的に組み込む。PiggyBacトランスポゾン系の強力な活性により、PBベクターの2つのITR間の対象遺伝子は標的ゲノムに容易に移動可能になる。

10

【0181】

IV. 成熟系列細胞の産生

いくつかの実施形態では、本開示は、MeCP2が破壊されたiPSC細胞、たとえば、HPC、DE細胞、またはEPCを介して成熟系列に分化しうるMeCP2KOを提供する。HPCは、エリスロイド、リンフォイド、またはミエロイドの系列に高効率かつ高純度でさらに分化させうる。たとえば、HPCは、成熟した赤血球またはマイクログリアさらにはリンフォイド系列の細胞、たとえば、T細胞、B細胞、NK細胞、およびT/NK細胞を生成させるために使用しうる。DE細胞またはEPCは、細胞や肝細胞などの内胚葉系列の細胞にさらに分化させうる。

20

【0182】

本研究はまた、iPSC由来系列で成熟状態を出現させる脱メチル化の役割を支持する。哺乳動物ゲノムでは、CpGの約60%~90%はメチル化される。残りの非メチル化CpGは、ゲノムの約1%を占めるCpGアイランドと呼ばれるものにクラスター化される。メチル-CpG結合ドメイン(MBD)ファミリーのタンパク質は、クロマチンリモデラー、ヒストンデアセチラーゼ、およびメチラーゼをリクルートしてメチル化DNAに作用することによりエピジェネティックリモデリングおよび転写抑制をもたらす。それらは、本質的に生物時計として機能してクロマチンを組織化し、ニッチ依存シグナルに反応してコヒーレント転写を調整する(Bird, 1986, Jones and Takai, 2001)。本研究では、iPSCにおいてMeCP2をノックアウトすると細胞内の生物時計を操作するメチル化状態が改変されて*in vitro*で成熟系列が生成することを示した。そのため、分化時に*in vitro*でiPSCから成熟系列を生成する一過的な段階特異的脱メチル化(低分子、RNAi、または化合物を介する)工程を含むウィンドウを提供する。この知見はiPSCに特有なものでありうる。なぜなら、プライミングされた発生段階およびユニークな*in vitro*分化環境に起因するからである。したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、成熟系列の細胞に効率的に分化可能なiPSCを提供するために、MeCP2を破壊することによりiPSCのメチル化状態を改変する方法を提供する。

30

【0183】

A. HPCの産生

MeCP2が破壊されるように工学操作されたPSC(たとえば、ES細胞またはiPSC細胞)は、米国特許第8,372,642号明細書(参照により本明細書に組み込まれる)に記載される当技術分野で公知の方法によりHPCに分化させることが可能である。たとえば、BMP4とVEGFとFlt3リガンドとIL-3とGM-CSFとの組合せを用いて、造血分化を促進しうる。ある特定の実施形態では、BMP4とVEGFと(任意選択的にFGF-2と)を含む第1の培地に細胞培養物を暴露してから逐次的にFlt3リガンドとSCFとTPOとIL-3とIL-6とを含む第2の培地で培養することにより、多能性細胞を造血前駆細胞および造血細胞に分化させることが可能である。さらに、BMP4とVEGFとを含有する培地にFGF-2(50ng/ml)を組み込むことにより、多能性細胞から造血前駆細胞を生成させる効率を向上させることが可能である。

40

【0184】

50

多能性細胞からHPCへの分化は、規定条件または未規定条件を用いて行いうる。一般的には、得られた細胞をヒト被験体に投与することが意図される実施形態では、規定条件が一般に好ましいことは分かるであろう。HPCは、規定条件下でPSCから培養しうるとともに（たとえば、TeSR培地およびMatrigel（商標）などのマトリックス成分を用いて）、造血細胞は、多能性細胞に由来する胚様体から生成させうる。他の実施形態では、多能性細胞は、OP9細胞上またはマウス胚性線維芽細胞上で共培養してから分化させうる。

【0185】

多能性細胞は、分化プロセスの一部として胚様体または凝集体を形成するようにしうる。分化を誘導するための「胚様体」（EB）または成長細胞クラスターの形成は、一般に、ヒト多能性幹細胞からEBへの*in vitro*凝集を含み、ヒト多能性幹細胞から内胚葉起源、外胚葉起源、および中胚葉起源を呈する複数の組織型への自発的ランダム分化を可能にする。そのため、三次元EBを用いて造血細胞および内皮細胞のいくつかの画分を産生することが可能である。

10

【0186】

次のプロトコルを用いてEBを形成しうる。MATRIGEL（商標）被覆プレート上またはビトロネクチン被覆プレート上でのフィーダーフリー成長に適合化された未分化のhESCまたはiPSCは、室温で約8～10分間の0.5mM EDTA処理を用いて集密状態で採取しうる。EDTAは、インキュベーション後に吸引され、EBは、rock阻害剤またはプレビスタチンを含むEB基本培地に細胞を採取することにより形成しうる。翌日、培地は、さまざまなサイトカイン配合物を含むEB分化培地に変更しうる。細胞は、凝集体形成を促進するために25万～50万細胞/mlの密度で配置される。

20

【0187】

EB形成を促進するために、すでに記載されているように、細胞を低付着プレートに移して、75%IMDM（Gibco）と、0.5%N2および1%B-27（RAサプリメントなし）、200mM l-グルタミン、0.05mg/mlアスコルビン酸-2-リン酸マグネシウム塩（Asc 2-P）（WAKO）、GlutaMAX、Pen/Strep、ならびに 4.5×10^{-4} MTGが補充された25%ハム改変F12（Cellgro）と、からなる血清フリー分化（SFD）培地で一晚インキュベーションに付しうる（Nat Biotechnol. 2006 Nov; 24(11): 1402-11）翌日、各ウェルから細胞を採取して遠心分離しうる。次いで、分化の最初の4日間で、約50ng/ml骨形態形成因子（BMP-4）、約50ng/ml血管内皮成長因子（VEGF）、および50ng/ml zeb1 FGFが補充されたSFD基本培地からなる「EB分化培地」に細胞を再懸濁させうる。細胞は、48時間ごとに半分ずつ供給する。分化5日目、培地は、50ng/ml幹細胞因子（SCF）、50ng/ml Flt-3リガンド（Flt-3L）、50ng/mlインターロイキン-6（IL-6）、IL-3、50ng/ml、および50ng/mlトロンボポイエチン（TPO）が補充されたSFD培地で構成された第2の培地と交換する。細胞は、48時間ごとに新鮮な分化培地と共に半分ずつ供給する。培地変更は、分化培養物を300gで5分間遠心沈降させること、分化培養物から体積の半分を吸引すること、およびそれを同一の体積の新鮮培地で補充することにより実施される。ある特定の実施形態では、EB分化培地は、BMP4（たとえば約50ng/ml）、VEGF（たとえば約50ng/ml）、および任意選択的にFGF-2（たとえば約25～75ng/mlまたは約50ng/ml）を含みうる。上清は、吸引して新鮮な分化培地と交換しうる。代替的に、細胞は、2日ごとに新鮮培地と共に半分ずつ供給しうる。細胞は、分化プロセス時の異なる時間点で採取しうる。

30

40

【0188】

HPCは、規定培地を用いてPSCから培養しうる。規定培地を用いて多能性細胞を造血CD34⁺幹細胞に分化させる方法は、米国特許出願第12/715,136号明細書（権利放棄することなくその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。この方

50

法は、本開示で使用しうると予想される。

【0189】

たとえば、規定培地を用いて造血CD34+分化を誘導しうる。規定培地は、成長因子BMP-4、VEGF、Flt3リガンド、IL-3、および/またはGM-CSFを含有しうる。多能性細胞は、BMP4、VEGF、および任意選択的にFGF-2を含む第1の規定培地で培養してから(Flt3リガンド、IL-3、およびGM-CSF)または(Flt3リガンド、IL-3、IL-6、およびTPO)のいずれかを含む第2の培地で培養しうる。第1および第2の培地はまた、SCF、IL-6、G-CSF、EPO、FGF-2、および/またはTPOの1つ以上を含みうる。実質的に低酸素の条件(たとえば、20%未満のO₂)は、造血分化または内皮分化をさらに促進しうる。

10

【0190】

細胞は、機械的または酵素的な手段により実質的に個別化しうる(たとえば、トリプシンまたはTrypLE(商標)を用いて)。また、ROCK阻害剤(たとえば、H1152またはY-27632)も培地に含まれうる。これらの方法は、ロボット自動化などを用いて自動化しうると予想される。iPSCは、低酸素条件下で培養することによりコンディショニングしうる。

【0191】

ある特定の実施形態では、実質的に低酸素の条件を用いて、多能性細胞から造血プロジェニター細胞への分化を促進する。当業者であれば分かるであろうが、約20.8%未満の大気酸素含有量は、低酸素であるとみなされよう。培養下のヒト細胞は、周囲空気と比較して低減された酸素含有率を有する大気条件で成長させることが可能である。この相対的な低酸素は、培養下の細胞に暴露される大気酸素を減少させることにより達成しうる。胚細胞は、in vivoでは、典型的には低酸素条件下で、一般的には周囲レベルの二酸化炭素を伴って約1%~約6%の大気酸素で発生する。理論により拘束されることを望むものではないが、低酸素条件は、ある特定の胚発生条件の態様をミミックしうると予想される。以下の例に示されるように、ある特定の実施形態では、低酸素条件は、iPSCやhESCなどの多能性細胞から造血前駆細胞などのより分化された細胞型へのさらなる分化を促進するために使用可能である。

20

【0192】

多能性細胞から造血プロジェニター細胞への分化を促進するために、次の低酸素条件を使用しうる。ある特定の実施形態では、造血前駆細胞への分化を促進するために、約20%未満、約19%未満、約18%未満、約17%未満、約16%未満、約15%未満、約14%未満、約13%未満、約12%未満、約11%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%の大気酸素含有量を使用しうる。ある特定の実施形態では、低酸素大気は約5%の酸素ガスを含む。

30

【0193】

特定の培地がいずれの所与の造血プロジェニター細胞の拡大に使用されるかにかかわらず、使用される培地は、好ましくは約0.1ng/mL~約500ng/mL、より一般的には10ng/mL~100ng/mLの濃度の少なくとも1つのサイトカインが追加される。好適なサイトカインとしては、限定されるものではないが、c-kitリガンド(KL)(steel因子(StI)、肥満細胞成長因子(MGF)、および幹細胞因子(SCF)とも呼ばれる)、IL-6、G-CSF、IL-3、GM-CSF、IL-1、IL-11、MIP-1、LIF、c-mplリガンド/TPO、およびflk2/flk3リガンド(Flt2LまたはFlt3L)が挙げられる(Nicola et al., 1979、Golde et al., 1980、Lusis, 1981、Abboud et al., 1981、Okabe, 1982、Fauser et al., 1981)。とくに、培養物は、SCF、Flt3L、およびTPOの少なくとも1つを含むであろう。より特定的には、培養物は、SCF、Flt3L、およびTPOを含むであろう。

40

50

【0194】

一実施形態では、サイトカインは、培地に含まれかつ培地灌流により補充される。代替的に、バイオリクター系を使用する場合、サイトカインは、培地灌流を行うことなく個別の入口ポートを介して濃厚溶液として個別に添加しうる。灌流を用いることなくサイトカインを添加する場合、典型的には、約2～4日ごとに新鮮なサイトカインを添加しながらバイオリクターの容積の1/10～1/100に等しい量の10×～100×溶液として添加されるであろう。さらに、灌流培地のサイトカインに加えて、新鮮な濃厚サイトカインを個別に添加することも可能である。

【0195】

A. エリスロイド分化

HPCは、エリスロイド分化培地などを用いてエリスロイド細胞に分化させうる。エリスロイド分化培地は、血清フリー培地または規定培地でありうる。また、培地は、SCF、EPO、TPO、インスリン、デキサメタゾンまたはヒドロコルチゾン、およびトランスフェリンを含有しうる(Slukvin et al., 2007)。エリスロイドプロジェクトナーは、ヒドロコルチゾン、ホロトランスフェリン、およびEXCYTE(登録商標)を含有する培地にMeCP2が破壊された造血前駆細胞を配置することにより生成させうる。

【0196】

代表的な一方法では、HPCは、低付着プレート中でSFEM(Stem Cell Technologies)、ヘパリン(たとえば1～10U/mL、たとえば5U/mL、Sigma)、TPO(たとえば50～150ng/mL、たとえば100ng/mL)、ヒト組換えSCF(たとえば50～150ng/mL、たとえば100ng/mL)、FLT3L(たとえば50～150ng/mL、たとえば100ng/mL)、IL-3(たとえば1～20ng/mL、たとえば10ng/mL)、およびIL-6(たとえば1～20ng/mL、たとえば10ng/mL)を含有する培地に移される。約4～6日後、エリスロイド細胞は、0.1%～0.5% Excyte、たとえば0.3% Excyte(Serologicals)、ホロトランスフェリン(たとえば0.5～5mg/mL、たとえば1mg/mL、Sigma)、ヒドロコルチゾン(たとえば0.5～5mM、たとえば1mM、Sigma)、インスリン(たとえば5～50ng/mL、たとえば20ng/mL、Sigma)、SCF(たとえば10～100ng/mL、たとえば50ng/mL、R&D Systems)、EPO(たとえば1～5U/mL、たとえば2U/mL、R&D Systems)、IL-3(たとえば1～10ng/mL、たとえば5ng/mL)、IL-6(たとえば1～25ng/mL、たとえば10ng/mL)、およびTPO(たとえば10～100ng/mL、たとえば50ng/mL)を含有するSFEM培地でさらに2～3週間拡大させる。続いて、培地からIL-3、IL-6、およびTPOを除去し、SCFおよびEPOの存在下で細胞を培養する。細胞内懸濁物中の赤芽球の存在は、フローサイトメトリーを用いて表面染色CD235a(グリコホリンA)、CD36、およびCD71により定量される。

【0197】

HPCから赤血球、マクロファージ、および/または顆粒球への分化を誘導するために、メチルセルロースを使用しうる。メチルセルロースは、良好な光学的透明性を備えた安定なゲルを形成する比較的イナートなポリマーである。それは、ウシ胎仔血清(FBS)、ウシ血清アルブミン(BSA)、2-メルカプトエタノール、インスリン、トランスフェリン、および組換えサイトカインをはじめとする化合物またはコロニー刺激因子源として馴化培地が補充された培養培地で0.9～1.2%の最終濃度で通常使用される。細胞のメチルセルロース分化を含む方法は、たとえば、Kaufman et al.(2001)に記載されている。

【0198】

メチルセルロースベースの培地は、他のタイプの半固体マトリックスよりもエリスロイド系列細胞の良好な成長を可能にするので、同一の培養物内でエリスロイド、顆粒球、単

10

20

30

40

50

球、および複能性CFCのアッセイを可能にする。巨核球プロジェニターは、補充コラーゲンベースの培地で好適に培養され、免疫細胞化学的染色を用いて特定の同定される。

【0199】

記載の方法により生成させたエリスロイド細胞は、CD31、CD34、CD36、CD41a、CD43、CD45、CD71、およびCD235aからなる群から選択される1つ以上の造血/エリスロイドマーカーの発現により特徴付けられうる。加えて、エリスロイド細胞は、胚()および胎児()および成人()グロビンをはじめとするグロビンの発現の評価により特徴付けられうる。特定の態様では、成熟エリスロイド細胞は、 α -グロビンおよび β -グロビンの発現と比較して δ -グロビンのより高い発現を有するであろう。赤芽球の除核形態を確認するために、細胞のサイトスピンを用いてライト染色を実施可能である。エリスロイド細胞はまた、細胞表面マーカーCD235を有する各種グロビンに対する共染色が可能である。

10

【0200】

B. ミエロイド分化

1. 巨核球分化

HPCは、巨核球にさらに分化しうる。体内では、巨核球は、血液骨髄(blood marrow)に見いだされ、細胞を形成するプロセスから血小板または前血小板を産生する。ヒト体内の巨核球細胞は、骨髄細胞の小部分を占めるにすぎないが、ある特定の疾患に反応して10倍まで数が増加する可能性がある。体内では、巨核球は、典型的には、次のように造血細胞から分化する。すなわち、血球芽細胞が巨核芽球に分化し、次いで巨核芽球が前巨核球に分化し、次いで前巨核球が巨核球に分化する。

20

【0201】

多能性細胞または造血前駆細胞を巨核球に分化させるために、各種培地および方法を使用しうる。たとえば、米国特許出願公開第2007/0077654号明細書(権利放棄することなくその全体が参照により組み込まれる)に記載の多能性細胞から巨核球に分化させるための方法および培地は、本開示で使用しうる。

【0202】

巨核球分化培地には、好ましくは成長因子が含まれる。たとえば、巨核球分化培地は、FLT-3リガンド、幹細胞因子(SCF)、トロンボポイエチン(TPO)、インターロイキン-3(IL-3)、およびインターロイキン-6(IL-6)の1つ、2つ、3つ、4つ、または全部を含有しうる。ある特定の実施形態では、巨核球分化培地にはSCFのみが含まれうる。他の実施形態では、IL-3および/またはIL-6の一方または両方と組み合わせてSCFを使用しうる。種々の実施形態では、FLT-3リガンドおよび/またはTPOは、本開示の巨核球分化培地から除外しうる。

30

【0203】

造血細胞は、100ng/ml TPO、SCF、FLT-3、20% BIT9500を含有する培地に造血前駆細胞を配置することにより、巨核球に分化させうる。巨核球の生成を誘導するために、巨核球分化培地を使用しうる。巨核球を生成させるための各種製品および方法が記載されており、国際公開第2006/050330号パンフレットに記載されるように本開示で使用しうる。加えて、Stem Cell TechnologiesからMegacult(商標)を入手可能であり、巨核球の産生/分化に使用しうる。種々の実施形態では、巨核球分化培地には、トロンボポイエチン(TPO)、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン6(IL-6)、および/または幹細胞因子が含まれうる。細胞の巨核球分化のための方法は、たとえば、Kaufman et al. (2001)に記載されている。

40

【0204】

2. 肥満細胞の生成

HPCは、肥満細胞にさらに分化させうる。幹細胞因子(SCF)、IL-6、IL-3、IL-4、IL-9、および/またはIL-10に多能性幹細胞を暴露することにより、肥満細胞分化を促進しうる。

50

【0205】

ある特定の実施形態では、次のプロトコルを用いて、肥満細胞への分化を促進しうる。造血細胞は、TPO、SCF、FLT-3、20% BIT9500をそれぞれ100 ng/ml含有する培地「MK5」に造血前駆細胞を配置することにより、巨核球に分化させうる。肥満細胞は、MK5拡大培地で、続いて50 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6を含有する培地で前駆体を拡大させることにより産生しうる。

【0206】

種々の実施形態では、巨核球分化を促進するために、臍帯血または末梢血を肥満細胞に分化させるための方法も使用しうる。たとえば、Scherntz et al. (2001)には、種々の時点でIL-6と組み合わせてまたはIL-4、IL-6、およびIL-10と組み合わせてSCFを用いることにより、臍帯血プロジェニターを肥満細胞に分化させる方法が記載されている。Lappalainen et al. (2007)には、種々の時間で添加されたSCFおよび他のサイトカイン(たとえば、IL-3、IL-6、IL-9、およびIL-4)を用いて細胞を培養することにより、末梢血を肥満細胞に分化させる方法が提供される。これらの方法はいずれも、本開示でうまく使用しうると予想される。

10

【0207】

3. マクロファージおよび樹状細胞

造血前駆細胞は、樹状細胞にさらに分化させうる。たとえば、造血前駆細胞HPCは、低付着プレート中でSFEM(Stem Cell Technologies)、ヘパリン(たとえば1~10 U/ml、たとえば5 U/ml、Sigma)、TPO(たとえば50~150 ng/ml、たとえば100 ng/ml)、ヒト組換えSCF(たとえば50~150 ng/ml、たとえば100 ng/ml)、FLT3L(たとえば50~150 ng/ml、たとえば100 ng/ml)、IL-3(たとえば1~20 ng/ml、たとえば10 ng/ml)、およびIL-6(たとえば1~20 ng/ml、たとえば10 ng/ml)を含有する培地に8日間移される。続いて、細胞は、共通ミエロイドプロジェニターを生成させるために100 ng/ml GMCSFを含有する培地に8日間配置される。次いで、これらの細胞は、M-CSF(20 ng/ml)およびIL-1(10 ng/ml)を含有する培地に細胞を約2週間配置することによりマクロファージに、または20 ng/ml GMCSF、20 ng/ml IL-4中に細胞を配置することにより樹状細胞に、さらに分化させうる。培養物中で出現しうるマクロファージの存在は、CD163、CD14、CD68、およびCD45の細胞表面発現の存在の染色により定量可能である。

20

30

【0208】

4. マイクログリアの生成

凝集体、たとえば、分化9日目のHPCまたはHPC分化13日目のCD34⁺/CD43⁺磁気選別純粋HPCは、Abud et al., 2017に記載の方法に従って10~15 k/cm²の細胞密度でMatrigel被覆プレート上にプレーティングすることによりマイクログリア分化を開始させうる。常酸素条件下でマイクログリア分化を行いうる。

40

【0209】

代表的な一方法では、分化の最初の22日間にわたり25 ng/ml MCSF、50 ng/ml TGF、および100 μg/ml IL-34を含有するマイクログリア分化培地を細胞に供給される。次いで、細胞は、25 ng/ml MCSF、50 ng/ml TGF、100 μg/ml IL-34、CD200、およびCX3CL1を含有するマイクログリア成熟培地に配置される。細胞は、27日目に採取され、最終段階の培養物でマイクログリアの出現を確認するために、細胞内フローサイトメトリーによりP2RY、TREM-2、IBA、およびCX3CR1が存在するものが染色される。

【0210】

C. リンフォイド分化

50

HPCはまた、リンフォイド系列にもさらに分化させうる。いくつかの態様では、分化プロセスの7~11日目、たとえば、7日目、8日目、9日目、10日目、または11日目に単離されたHPCは、T細胞やNK細胞などのリンフォイド細胞への分化が可能である。いくつかの態様では、リンフォイドプロジェニターの起源のタイミングは、HPC分化時の血液内皮プロジェニターの低下およびエリスロイドプロジェニターの出現に一致する。特定の態様では、9日目のHPCは、増加したT細胞生成効率を有しうる。リンフォイド分化可能なHPCは、ある特定のマーカーの発現により単離および/または同定が可能である。たとえば、CD34および/またはCD43の表面発現を有する細胞は、リンフォイド分化用として選択しうる。リンフォイドプロジェニターを検出するための追加のマーカーとしては、DLL4、CD144、CD31、CD34、CD43^{lo}、CD45^{lo/-}、CD235、CD7、Flk-1、APNLRが挙げられる。特定の態様では、CD34/CD7、CD235/CD7、DLL4/CD34、DLL4/CD31、DLL4/CD144、またはCD34/CD43^{lo}の二重陽性集団の存在は、リンフォイドプロジェニターを同定するために使用される。

10

20

30

40

50

【0211】

HPCは、リンフォイド分化のための規定フィーダーフリー条件で培養しうる。培養培地は、RetroNectin、フィブロネクチン、RGDペプチドなどの1つ以上のマトリックス成分を含有しうる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、マトリックス成分は、胚性幹細胞の成長のための固体担体を提供しうる。ある特定の実施形態では、マトリックス成分は、培養表面に適用して培地に細胞を播種する前に培養培地に接触させうる。たとえば、細胞は、細胞を集塊に機械的に分離してまたは細胞を個別化して造血前駆細胞への分化を誘導する前に、フィブロネクチンまたはMatrigel(商標)で被覆されたプレート上の規定培地(たとえばTeSR培地)で培養しうる。

【0212】

多能性細胞を培養するために、コラーゲン(たとえばコラーゲンIV)、ラミニン、ピトロネクチン、Matrigel(商標)、ゼラチン、ポリリシン、トロンボスポンジン(たとえば、TSP-1、-2、-3、および/または-4-5)、および/またはPronectin-F(商標)をはじめとする各種マトリックス成分を使用しうる。ある特定の実施形態では、細胞生存能に悪影響を及ぼす可能性があることから、事前にTeSRを用いて培養された細胞と共にMatrigel(商標)、コラーゲンIV、またはラミニンのみを使用することは回避しうるが、それにもかかわらず、これらの組成物は、他のマトリックス成分と組み合わせて有利に使用しうる。これらのマトリックス成分の組合せは、細胞成長および細胞生存能を向上させる追加の利点を提供しうる。ある特定の実施形態では、細胞を培養するために、造血分化の前などに1、2、3、4、5、6、またはそれ以上のマトリックス成分を使用しうる。

【0213】

リンフォイド分化のための例示的なフィーダーフリーマトリックスは、実施例4に開示される。特定の態様では、HPCのリンフォイド分化に使用するために、非組織培養処理プレートをDLL4:Fcキメラタンパク質およびRetroNectin(フィブロネクチン断片CH-296、日本国の宝酒造株式会社)で被覆しうる。

【0214】

いくつかの実施形態では、リンフォイド分化を向上させるためにアスコルビン酸を使用しうる。規定培地は、約10μM~約1mM、たとえば約50μM~約100μM、とくに約95μMアスコルビン酸が補充されうる。

【0215】

1. T細胞分化

ある態様では、本開示は、被験体においてNotchリガンドの産生を増加させる物質を投与し、Notchリガンドの内因性活性を改変し、造血プロジェニター細胞の分化を調整することにより、被験体においてT細胞系列の細胞のin vivo拡大を行うための方法を提供する。本方法はまた、培地で細胞を培養することを含む。この場合、培地は

、有効量の notchリガンドと、IL-7、IL-11、SCF、Flt-3、およびIL-3からなる群から選択される1種以上のサイトカインと、を含む。いくつかの特定の実施形態、培地は、IL-6をさらに含む。いくつかの実施形態では、notchリガンドは、DLL4:Fcキメラなどのdelta4 notchリガンド(DLL4)である。たとえば、培養細胞は、抗CD3抗体で細胞を染色することによりT細胞の生成に関してフローサイトメトリーによりモニターしうる。細胞は、細胞表面マーカーCD4、CD8、CD3、CD94、およびCD56を用いてT細胞およびNK細胞の存在に関して分析しうる。たとえば、CD8⁺/CD3⁺の細胞は、分化されたT細胞の指標となるであろう。一方、NK細胞はCD3⁻/CD56⁺であり、NK/T細胞はCD3⁺/CD56⁺であろう。

10

【0216】

T細胞系列の細胞の分化および増殖を促進および維持するNotchリガンドが選択される。Notchリガンドは、ヒト起源でありうるか、または他の種、たとえば、齧歯動物、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、霊長動物などの哺乳動物種に由来しうる。Notchリガンドの特定例としては、Deltaファミリーが挙げられる。Deltaファミリーとしては、Delta-1(Genbank受託番号AF003522、ホモ・サピエンス(Homo sapiens))、Delta-3(Genbank受託番号AF084576、ラタス・ノルベギカス(Rattus norvegicus))、Delta様1(Genbank受託番号NM_005618およびNP_005609(ホモ・サピエンス(Homo sapiens)、Genbank受託番号X80903、I48324、M.ムスクルス(M. musculus))、Delta様3(Genbank受託番号NM_053666、N_446118、ラタス・ノルベギカス(Rattus norvegicus))、Delta-4(Genbank受託番号AF273454、BAB18580、ムス・ムスクルス(Mus musculus)、Genbank受託番号AF279305、AAF81912、ホモ・サピエンス(Homo sapiens))、およびDelta様4(Genbank受託番号Q9NR61、AAF76427、AF253468、NM_019074、ホモ・サピエンス(Homo sapiens)、Genbank受託番号NM_019454、ムス・ムスクルス(mus musculus))が挙げられる。Notchリガンドは、市販されているか、または組換えDNA技術により産生してさまざまな度合いで精製可能である。

20

30

【0217】

2. NK細胞分化

本方法は、分化されたNK細胞を産生するのに十分な継続時間にわたり以上に記載の培養物中にHPC MeCP2-KO細胞を維持する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、分化されたNK細胞は、T細胞と共に培養物中で出現するが、NK細胞は、6週間後に増殖を停止しうる。一般に、NK細胞の数の増加および/またはその分化状態の決定は、当業者に公知の従来の方法を用いて評価される。たとえば、培養細胞は、抗CD56抗体および抗CD3抗体で細胞を染色することによりNK細胞の生成に関してフローサイトメトリーによりモニターしうる。CD56⁺/CD3⁻の細胞は、分化されたNK細胞の指標となるであろう。

40

【0218】

D. DE細胞およびEPCの産生

本開示のある特定の実施形態は、フィーダーフリー条件下に維持された誘導多能性幹細胞に由来するDE細胞またはEPCの産生方法を提供する。この方法により誘導されたDE細胞およびEPCは、モノホルモン細胞および肝細胞を生成可能である。例示的な一プロセスの模式図は図21に提供される。腭分化プロセスの段階は図23Cに提供される。特定の態様では、分化は低酸素条件下で実施される。

【0219】

胚体内胚葉(DE)は、急速に分化する過渡的状态であり、増殖可能ではなく、識別可能な形態を有しておらず、内胚葉運命に十分にコミットしない可能性がある。一方、EP

50

Cは、一過的でなく、識別可能な形態を有し、無制限に培養しうる (Cheng et al., 2012)。また、内胚葉プロジェニター細胞は、CXCR4、CD117、FOXA1、FOXA2、EOMES、CD34はおよびSOX17を発現するものとして特徴付けられる。内胚葉プロジェニター細胞は、肝臓、膵臓、腸などの内胚葉系列の細胞を生成可能であるが、*in vitro*または*in vivo*のいずれでも中胚葉も外胚葉も生成可能でない。同様に、EP細胞は、免疫欠損マウスにおいて奇形腫を形成しない。したがって、DEおよびEPの細胞は、別個の発生中間段階を示しうるとともに、さまざまな発生潜在能力を有しうる。

【0220】

本方法は、分化されたグルコース反応性細胞を産生するのに十分な継続時間にわたり以上に記載の培養物中にMeCP2WT細胞およびMeCP2KO細胞に由来するDE細胞またはEPCを維持する工程をさらに含む。懸濁培養で生成したDE細胞またはEPCは、膵細胞型の生成のための分化培地に配置される。EP細胞の膵分化では、Nostro et al. (2011)により記載され、Cheng et al. (2012)によりさらに修正されたプロトコルを利用しうる。全プロセスは、低酸素条件下で3D培養として継続しうる。

【0221】

例示的な方法では、EPC培養物は15日間拡大され、前腸/中腸内胚葉細胞を生成させるために、Wnt3A (3 ng/ml)、FGF-10 (50 ng/ml)、およびドルソモルフィン (0.75 μM) を含有するSFD培地で3日間培養される。細胞は、膵内胚葉細胞を生成させるために、GlutaMAX (1%)、B27 (レチノイン酸 (1%) を含まない)、アスコルビン酸 (50 μg/ml)、Pen/Strep (1%)、KAAD-シクロパミン (0.25 μM)、transレチノイン酸 (2 μM)、ノギン (50 ng/ml)、およびFGF-10 (50 ng/ml) を含有する高グルコースDMEM培地で3日間培養される。この工程の後、細胞は、GlutaMAX (1%)、B27 (レチノイン酸 (1%) を含まない)、アスコルビン酸 (50 g/ml)、Pen/Strep (1%)、SB431542 (6 M)、およびノギン (50 ng/ml) を含有する高グルコースDMEM培地で3日間培養される。次いで、細胞は、セクレターゼ阻害剤 (2 μMのDAPT) が補充された先の高グルコースDMEM培地で1~2日間培養される。この段階から、細胞は、グルコース (40 mM)、ニコチンアミド (10 mM)、SB431542 (6 μM)、およびノギン (50 ng/ml) を含有するSFD培地で1~2日間培養される。最後に、その次の10日間にわたり、細胞は、SB431542 (5.4 μM)、ノギン (50 ng/ml)、インスリン (800 pM)、およびニコチンアミド (10 mM) を含有するSFD培地で培養され、その際、培地は、追加された追加のグルコース (40 mM) を含むおよび追加された追加のグルコースを含まないかかる培地で交互に毎日交換される。ニコチンアミドは、約0.1 mM~約15 mM、たとえば、約10 mMの濃度で添加しうる。モノホルモン細胞の存在は、2D方式で分化の10~15日目に検出される。

【0222】

細胞培養物は、分化の21~25日目に採取され、固定され、そして細胞内フローサイトメトリーによりPDX1/NeuroD1/Cペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンの定量のために染色される。最終段階の培養物は、モノホルモン細胞の存在を示す。最終段階の培養物は、PDX1、NeuroD1、およびいくつかのレベルのNKX6.1に関して陽性である。最終段階の凝集体は、グルコースに対する反応性を示す。

【0223】

別の態様では、胚体内胚葉細胞 (DE) は、当技術分野で公知の方法により肝細胞に分化される。一方法では、図40に示されるように、肝細胞は、DE細胞から分化させうる。たとえば、全分化プロセスは、分化プロセスの25日目まで低酸素条件下で実施される。簡潔に述べると、DEは、BMP4 (50 ng/mL)、bFGF (10 ng/mL)、EGF (10 ng/mL)、VEGF (10 ng/mL)、HGF (100 ng/mL)

10

20

30

40

50

)、Dex (0.1 μM)、DMSO (1%)、およびFGF-10 (60 ng/mL)が補充されたSFD培地で2Dで約6日間培養される。次いで、細胞は、コラーゲン上においてbFGF (10 ng/mL)、EGF (20 ng/mL)、VEGF (10 ng/mL)、HGF (100 ng/mL)、OSM (20 ng/mL)、Dex (0.2 μM)、DMSO (1%)、DAPT (2 μM)、およびビタミンK (6 μg/mL)が補充されたSFD培地に約6日間再プレーティングされる。第3段階では、細胞は、肝細胞を産生するために、B27 (1x)、EGF (20 ng/mL)、OSM (20 ng/mL)、Dex (0.1 μM)、GlutaMAX (1%)、およびPen/Strep (1%)が補充されたウィリアムE培地に2Dでプレーティングされる。

【0224】

E. 細胞培養

ある特定の実施形態では、PSCからHPCへ、HPCからエリスロイド系列、ミエロイド系列、またはリンフォイド系列へ、またはDE細胞もしくはEPCから内胚葉系列への分化を促進するために、実質的に低酸素の条件を使用しうる。ある特定の実施形態では、分化を促進するために、約20%未満、約19%未満、約18%未満、約17%未満、約16%未満、約15%未満、約14%未満、約13%未満、約12%未満、約11%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%の大気酸素含有量を使用しうる。ある特定の実施形態では、低酸素大気は約5%の酸素ガスを含む。

【0225】

本明細書に記載されるように、本細胞の分化を促進するために、1つ以上の規定培養培地を有利に使用しうる。とくに、血清やマウスフィーダー層などの動物産物を排除することにより、動物産物への細胞の暴露に関連付けられるリスクを低減可能であり、より安全にヒト被験体に投与できる細胞の生成を可能にしうる。伝統的な幹細胞培養の発生は、幹細胞をさまざまな細胞型に分化させるために、血清産物およびマウスフィーダー層に依拠するので、これらの伝統的な手順では、分化を実施可能なスケール、増大する生物学的多様性および潜在的な汚染、有用性の証明を妨げるおそれのあるトランスレーショナル療法における著しく阻まれるES細胞の使用が制限されてきた。

【0226】

一般に、本開示の細胞は、細胞成長を持続可能な栄養素リッチ緩衝溶液である培養培地で培養される。本明細書に記載の方法に従って本細胞の単離、拡大、および分化を行うのに好適な培養培地としては、限定されるものではないが、高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、DMEM/F-15、RPMI 1640、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、およびOpti-MEM SFM (Invitrogen Inc.)が挙げられる。既知組成培地は最少必須培地を含み、たとえば、ヒト血清アルブミン、ヒトExCyteリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須および非必須アミノ酸、ナトリウムピルベート、グルタミン、ならびにマイトジェンが補充されたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Gibco)もまた好適である。本明細書で用いられる場合、マイトジェンとは、細胞分裂を刺激する作用剤を意味する。作用剤は、有糸分裂をトリガーする化学物質、通常は、細胞分裂を開始するように細胞に働きかけるなんらかの形態のタンパク質でありうる。一実施形態では、血清フリー培地、たとえば、米国特許出願第08/464,599号明細書および国際公開第96/39487号パンフレットに記載のもの、ならびに米国特許第5,486,359号明細書に記載の「完全培地」は、本明細書に記載の方法での使用が企図される。いくつかの実施形態では、培養培地は、10%ウシ胎仔血清(FBS)、ヒト自己血清、ヒトAB血清、またはヘパリン(2U/ml)補充血小板リッチ血漿が補充される。

【0227】

ミエロイド細胞、エリスロイド細胞、およびリンフォイド細胞は、エリスロイド系列、ミエロイド系列、またはリンフォイド系列への細胞の分化を促進するのに十分な程度に細胞内因子レベルを増加させた条件下の培地で多能性幹細胞または造血前駆細胞を培養する

10

20

30

40

50

ことにより生成可能である。培地はまた、さまざまな種類の成長因子のような1つ以上の造血細胞分化剤および成熟剤を含有しうる。これらの作用剤は、より成熟した表現型にコミットするか - または好ましくは成熟細胞の生存を促進するか - またはこれらの作用の両方を兼備するかのいずれかになるように細胞を誘導するのを支援しうる。分化剤および成熟剤は、造血細胞系列の細胞の成長を促進可能な可溶性成長因子（ペプチドホルモン、サイトカイン、リガンド-レセプター複合体、および他の化合物）を含みうる。限定されるものではないが、かかる作用剤の例としては、造血成長因子または内皮成長因子、たとえば、線維芽細胞成長因子（FGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポイエチン（TPO）、FLT-3リガンド（FLT3L）、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-9（IL-9）、もしくは果粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、またはそれらのアイソフォームもしくは変異体が挙げられる。

10

【0228】

V. 成熟系列細胞の使用

本開示の方法および組成物より提供される成熟系列細胞（たとえば、エリスロイド、ミエロイド、リンフォイド、および内胚葉）は、さまざまな用途に使用可能である。こうしたものとしては、わずかではあるが、*in vivo*での細胞の移植または植込み、細胞傷害性化合物、発癌性物質、突然変異原成長/レギュラトリー因子、医薬化合物などの*in vitro*スクリーニング、血液疾患および傷害の機序の解明、薬剤および/または成長因子が奏功する機序の研究、患者における癌の診断およびモニター、遺伝子療法、ならびに生物学的活性産物の産生が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0229】

A. 試験化合物のスクリーニング

本明細書に提供されるエリスロイド系列、ミエロイド系列、リンフォイド系列、および内胚葉系列は、本明細書に提供されるエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、およびリンフォイド細胞の特性に影響を及ぼす因子（たとえば、溶媒、低分子薬剤、ペプチド、およびポリヌクレオチド）または環境条件（たとえば、培養条件または操作）をスクリーニングするために使用可能である。

【0230】

本開示の特定のスクリーニング用途は、薬剤研究における医薬化合物の試験に関する。読者は、一般的には、標準的教科書 *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997 を参照されたい。ある特定の態様では、エリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフォイド細胞、および内胚葉細胞は、これまで短期培養で造血細胞および前駆体に対して実施されてきた標準的な薬剤スクリーニングおよび毒性アッセイに供される試験細胞の役割を果たす。候補医薬化合物の活性の評価は、一般的には、本開示のある特定の態様に提供される造血細胞または前駆体を候補化合物と組み合わせること、化合物に帰属可能な細胞の形態、マーカー表現型、または代謝活性の変化を決定すること（未処置細胞または不活性化化合物で処理された細胞と比較して）、次いで、化合物の作用を観測された変化と相関付けることを含む。スクリーニングは、化合物が造血細胞または前駆体に対して薬理学的作用を有するように設計されるので、または他の箇所でも作用を有するように設計された化合物が造血細胞または前駆体に対して予期せぬ副作用を有することもありうる。可能性のある薬剤間相互作用を検出するために、2種以上の薬剤を組み合わせ（同時にまたは逐次的に細胞と組み合わせることにより）試験することが可能である。

30

40

【0231】

B. 造血細胞療法

実施形態はまた、血液疾患もしくは障害または傷害が原因でかかる療法を必要とする被験体においてある程度の機能を回復するための、本明細書に提供されるエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフォイド細胞、および内胚葉細胞の使用を提供する。たとえば、本明細書に開示される方法により誘導されるエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフ

50

オイド細胞、および内胚葉細胞は、異常ヘモグロビン症、貧血などの血液疾患および障害を治療するために使用しうる。そのほか、エリスロイド系列およびミエロイド系列の細胞は、必要とする被験体（たとえば、輸血を必要とする被験体または血液障害を有する被験体）に血液または血液細胞（たとえば、赤血球、血小板、好中顆粒球など）を供給するのに有用でありうる。かかる細胞は、化学療法などの細胞抑制療法により引き起こされる造血細胞欠損の治療に有用でありうる。

【0232】

治療用途の本明細書に提供される細胞の好適性を決定するために、最初に好適な動物モデルで細胞を試験することが可能である。あるレベルにおいて、*in vivo*で生存するかつその表現型を維持する能力に関して細胞を評価する。本明細書に提供される細胞は、免疫不全動物（たとえば、NODマウスまたは化学的にもしくは照射により免疫不全を起こした動物）のさらなる観察に適した部位、たとえば、腎被膜下、脾臓中、肝小葉中、または骨髓中に投与される。組織は、数日後～数週間後またはそれよりも後に採取され、赤血球などの出芽細胞型が依然として存在するかを評価する。これは、検出可能な標識（たとえば、緑色蛍光タンパク質または β -ガラクトシダーゼ）を用いてまたは投与されたヒト細胞に特異的な構成マーカーを測定することにより、実施可能である。本明細書に提供される細胞を齧歯動物モデルで試験する場合、投与された細胞の存在および表現型は、ヒト特異的抗体を用いて免疫組織化学もしくはELISAにより、またはヒトポリヌクレオチド配列に特異的な増幅を引き起こすプライマーおよびハイブリダイゼーション条件を用いてRT-PCR分析により、評価可能である。mRNAレベルまたはタンパク質レベルで遺伝子発現を評価するのに好適なマーカーは、本開示の他の場所に提供される。

10

20

【0233】

本開示の方法により提供されるエリスロイド系列、ミエロイド系列、リンフォイド系列、および内胚葉系列は、血液障害および傷害を治療するそれらの能力に関して各種動物モデルで試験しうる。たとえば、鎌状赤血球貧血マウスモデルまたはT/B細胞欠損Rag-2ノックアウトマウスは、本明細書に開示されるエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、およびリンフォイドの細胞を試験するのにとくに有用な動物モデルでありうる

【0234】

動物モデルで望ましい機能特性または有効性を実証する本開示のある特定の態様に提供されるエリスロイド系列、ミエロイド系列、リンフォイド系列、および内胚葉系列は、また、それを必要とするヒト被験体への直接投与に好適でありうる。止血の目的では、細胞は、循環系を適正に利用できる任意の部位に投与可能である。造血細胞またはその前駆体はまた、傷害または疾患の部位に送達しうる。

30

【0235】

本開示のある特定の態様に提供される細胞は、それを必要とするいずれの被験体の治療にも使用可能である。かかる治療に適切でありうるヒト病態としては、各種貧血および異常ヘモグロビン症さらには造血細胞の数の減少により特徴付けられる疾患（たとえば、骨髓異形成症候群、骨髓線維症、好中球減少症、顆粒球減少症、グランツマン血小板無力症、血小板減少症、後天性免疫不全症候群など）が挙げられる。ヒト治療では、用量は、一般的には約 $10^9 \sim 10^{12}$ 細胞、典型的には約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 細胞であり、被験体の体重、罹患の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能に合わせて調整される。治療モードおよび適切な用量を決定する最終的な責任は、担当臨床医にある。

40

【0236】

いくつかの実施形態では、本開示の成熟肝細胞は、肝組織を標的とするウイルスの研究でおよび治療剤として薬剤代謝および毒性試験に使用しうる。成熟肝細胞は、好ましくは、機能的肝酵素活性を呈する。一実施形態では、本方法は、(a)上記の1つ以上の成熟肝細胞を化合物に暴露すること、および(b)毒性徴候に関して1つ以上の成熟肝細胞をモニターすることを含む。別の実施形態では、かかる方法は、(a)肝細胞により化合物が代謝される条件に1つ以上の成熟肝細胞を暴露すること、(b)化合物の得られた代謝物と1つ以上の非肝細胞とを接触させること、および(c)いずれかの代謝物誘導変化

50

に関して非肝細胞をモニターすることを含む。化合物の代謝を研究する方法は、(a) 1つ以上の成熟肝細胞を暴露すること、および(b)化合物の肝内処理によりどのような代謝物が産生されるかを決定することを含む。肝臓障害を治療する方法は、肝臓障害を有する患者に1つ以上の成熟肝細胞を投与する工程を含む。限定されるものではないが、この方法を用いて治療する肝臓障害の例としては、急性肝損傷または代謝性肝疾患、たとえば、1アンチトリプシン欠損症またはウィルソン病が挙げられる。

【0237】

本開示はまた、本明細書に開示される方法を用いて生成させた成熟細胞を細胞治療法に、たとえば、細胞数または細胞機能の低下が起因または寄与する病態の治療に使用するための方法を提供する。

10

【0238】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される成熟マイクログリアたとえばM1分極またはM2分極のものは、アルツハイマー病などの神経疾患の治療のスクリーニングさらにはそれらの治療に使用しうる。

【0239】

いくつかの実施形態では、本開示の成熟マクロファージたとえばM1分極またはM2分極のものは、スクリーニングおよび治療に使用しうる。M1およびM2は、ケモカインの識別可能な発現プロファイルを有する。「分極」という用語は、本明細書では、マクロファージの表現型特性および機能特性を表すために用いられる。表現型は、マクロファージにより発現される表面マーカーを介して規定可能である。M1マクロファージは、Th1の誘引で知られるCXCL9およびCXCL10ケモカインを発現し、一方、M2マクロファージは、CCL17、CCL22、およびCCL24を発現する。CCL2やCXCL4などのケモカインはまた、マクロファージをM2様表現型に分極させることが可能である。

20

【0240】

加えて、T細胞、NK細胞、NK/T細胞、B細胞などの成熟リンフォイド細胞は、各種スクリーニングおよび治療用途に使用しうる。いくつかの態様では、リンフォイド系列は、治療用化合物の*in vitro*スクリーニングに使用しうる。リンフォイド系列はまた、癌の治療などで養子細胞療法としても使用しうる。

30

【0241】

C. 商業、治療、および研究の目的での配布

製造、配布、および使用の目的では、本開示のエリスロイド細胞、ミエロイド細胞、リンフォイド細胞、および内胚葉細胞は、典型的には、輸送または貯蔵を容易にするために任意選択的に凍結されて等張賦形剤中または培養培地中の細胞培養物または懸濁物の形態で供給される。

【0242】

本開示はまた、製造時、配布時、または使用時の任意の時点で存在する細胞のセットまたは組合せを含めてさまざまな試薬系を含む。細胞セットは、本開示に記載の2つ以上の細胞集団の任意の組合せ、たとえば、限定されるものではないが、未分化幹細胞、体細胞誘導造血細胞、または他の分化細胞型と組み合わせられたプログラミング誘導細胞(造血系細胞、その前駆体およびサブタイプ)が挙げられる。セット中の細胞集団は、同一のゲノムまたはその遺伝子改変形態を共有することもある。セット中の各細胞型は、全部まとめてまたは個別の容器に入れて、同一の施設または異なる場所で、同一または異なる時間で、同一のエンティティーまたは取引関係を共有する異なるエンティティーの制御下でパッケージ化しうる。

40

【実施例】

【0243】

VI. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれている。以下の実施例に開示される技術は、本発明者により発見された技術が、本発明の実施で十分に機能

50

することを示しており、したがって、その好ましい実施形態を構成するとみなしうることを、当業者であれば認識すべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態に多くの変更を加えうることもかつそれにより本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同一もしくは類似の結果が得られることは分かるはずである。

【0244】

実施例1 - MeCP2 ノックアウト細胞系の生成

造血分化プロセスにおけるMeCP2の役割を決定するために、MeCP2 ノックアウトiPSC細胞系を生成させた。MeCP2をノックアウトするように雄性野生型(WT)01279 iPSC系を工学操作することにより、MyCell(登録商標)01279.107.3902細胞系を作製した。TALヌクレアーゼを用いてMeCP2 TALENおよび停止コドン挿入を含有するドナープラスミドのトランスフェクションによりMeCP2のメチルCpG結合ドメインの前に一連の停止コドン挿入し(図1B)、続いて、LoxPをフランキングさせてPGKp-ピューロマイシン-SV40pAを逆向きに挿入した。01279 iPSCは、MeCP2 TALENSおよび野生型EBNA1を発現するドナープラスミドp1553でトランスフェクトした。iPSC9025、SONL(すなわち、Sox-2、Oct-4、Nanog、およびLin28のリプログラミング因子を用いたエピソーム的リプログラムiPSC)、TIPS1e(すなわち、T細胞から分化されたiPSC)、HLA-H A系、およびHLA-Gを含む追加のiPSC系も、MeCP2 TALENSおよびドナープラスミドでトランスフェクトした。

【0245】

挿入が陽性の細胞をピューロマイシン選択により選択し、次いで、コロニーを採取し、組込みPCRによりスクリーニングした。初期スクリーニングは、採取したすべてのコロニーで右腕、左腕、および骨格に対して実施した。すべてのコロニーを約3継代で再びスクリーニングにかけて、PCRによりMeCP2 ノックアウト状態を確認した。PCR確認の後、クローンをE8培地および低酸素条件に移した。スクリーニングで選択されたコロニーのうち、約6~50%は適正に工学操作されたことが分かった。

【表1】

表1: トランスフェクション後のスクリーニングの概要

| 採取したコロニー数 | スクリーニングに合格したコロニー数 | 適正に工学操作されたパーセント |
|-----------|-------------------|-----------------|
| 37 | 4 | 10.81% |
| 7 | 2 | 28.57% |
| 5 | 1 | 20.00% |
| 4 | 2 | 50.00% |
| 20 | 4 | 20.00% |
| 33 | 2 | 6.06% |

【表 2】

表 2: 工学操作された MeCP2K0 iPSC クローンの概要

| 細胞系 | 性別 | リプログラミング方法 | リプログラミング因子 | リプログラミング細胞源 | MECP2 状態 |
|-------------------------------|----|------------|------------|-------------|----------------------|
| 9025 | 雄性 | エピソーム的 | 7 | 血液プロジェニター細胞 | 野生型 エクソン 3/エクソン 4 |
| 9025 1553-18-1 P47 (3) | 雄性 | エピソーム的 | 7 | 血液プロジェニター細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| 9025 1553-18-4 P47 (3) | 雄性 | エピソーム的 | 7 | 血液プロジェニター細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| 9025 1553-18-15 P48 (4) | 雄 | エピソーム的 | 7 | 血液プロジェニター細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| SONL | 雄 | ウイルス的 | 4 | 血液プロジェニター細胞 | 野生型 エクソン 3/エクソン 4 |
| SONL 1553-7-4 P29 (4) | 雄性 | ウイルス的 | 4 | 血液プロジェニター細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| SONL 1553-8-3 P 29 (4) | 雄性 | ウイルス的 | 4 | 血液プロジェニター細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| Tipsle | 雄性 | ウイルス的 | 4 | T 細胞 | 野生型 エクソン 3/エクソン 4 |
| Tipsle 1553-9-1 P27 (4) | 雄性 | ウイルス的 | 4 | T 細胞 | MeCP2K 0 エクソン 3 |
| HLA-H | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニター細胞 | 野生型 エクソン 3/エクソン 4 |

10

20

30

40

| | | | | | | |
|----------------------------------|----|--------|---|-----------------|-------------------------------|----|
| H系 1553-19-1 P20(4) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| H系 1553-19-2 P20(4) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| A系 | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | 野生型 エクソ ン 3/エ クソン 4 | 10 |
| A系 1553-13-2-A1 P33(11) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| A系 1553-13-2-A1B 2 P33(11) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | 20 |
| A系 1553-13-2-A1B 2 P33(11) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| A系 1553-14-10-B3 P33(11) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| G系 | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | 野生型 エクソ ン 3/ エ クソン 4 | 30 |
| G系 1553-15-17 P21(6) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | |
| G系 1553-15-20 P21(6) | 雄性 | エピソーム的 | 6 | 血液プロジェニ ター細胞 | MeCP2K 0 エク ソン 3 | 40 |

【 0 2 4 6 】

0 1 2 7 9 i P S C系でスクリーニングされたコロニーのうち、96%は2つのPCRスクリーニング反応で挿入が陽性であった。14クローンを拡大し、3継代でスクリーニングしたところ、8クローンは骨格プラスミドの取込みに関して陰性であることが分かった。そのため、残りのクローンのうち3つをインサートを介してシーケンスしたところ、2つがポリクローナルであることが分かった。1つのモノクローナル系0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 2を選択し、さらなる研究で十分に特徴付けした。追加のクローンも取得し、適正に工学操作されたものとして特徴付けた。MeCP2変異体0 0 1、0 0 2、0 0 5、および0 0 8のアミノ酸アライメントは、図1Cに描かれている。変異体0 0 8は、メ

チルCpG結合ドメインをコードしていない。

【0247】

実施例2 - HPC産生のための3Dプロトコル

HPCを産生するために、実施例の01279.107.3902 MeCP2ノックアウト(MeCP2KO)細胞およびWT01279細胞を3D分化プロトコルに付した(図1A)。最初に、Matrigel被覆(商標)上またはビトロネクチン被覆上のフィーダーフリー条件下のEssential8(E8)培地でiPSCを5~10継代にわたり低酸素条件に順化させた。凝集体は、5 μ Mプレスタチンが補充された血清フリー規定(SFD)培地の存在下で25万~50万細胞/mlの密度の半集密iPSCから作製した。プロセスは、超低付着(ULA)プレートまたはスピナーフラスコにおいて

10

【0248】

胚様体(EB)が形成されたら、最初の4日間にわたりSFD基本培地に50ng/ml BMP-4、VEGF、およびbFGFを補充することにより分化を開始した。5日目に、それぞれ50ng/mlのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、TPO、および5U/mlのヘパリンの存在下にEB培養物を配置した。EB培養物は、分化12~16日目まで低酸素条件下で分化プロセス時に2日ごとにサイトカインを含有する新鮮な分化培地を体積の半分ずつ補充した。分化プロセス後に細胞を採取し、フローサイトメトリーにより表現型を評価し、CFUアッセイを用いて機能能力を評価した。

20

【0249】

フローサイトメトリー分析では、細胞を培地に採取し、1回洗浄した。37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内でTrypLE(商標)または0.5%トリプシンを用いて細胞ペレットを5~10分間消化し、続いて、培地で洗浄し、70 μ m細胞ストレーナーに通した。FACS緩衝液を含有するPBS-FBS中に細胞を再懸濁させ、カウントして細胞生存能を推定し、そして蛍光色素コンジュゲートモノクローナル抗体:抗ヒトCD43(1G10)、抗ヒトCD31(WM-59)、抗ヒトCD41(HIP8)、抗ヒトCD45(HI30)、抗ヒトCD34(581、8G12)(BD Biosciences San Jose, CA)、および抗ヒトCD235で染色した。7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD、BD Biosciences)またはPIを用いて生存不能細胞を除外した。生細胞分析は、FACSCalibur(商標)またはAccuriフローサイトメーターを用いて実施した。

30

【0250】

クローン原性造血プロジェニターアッセイ(CFUアッセイ)では、TrypLEまたは0.5%トリプシン/EDTAを用いてEBを単一細胞懸濁物として分散した。生存細胞を定量し、プレーティングし(50,000~300,000細胞/ml)、そして幹細胞因子(SCF)50ng/ml、エリトロポイエチン(EPO)3U/ml、顆粒球マクrophageコロニー刺激因子(GM-CSF)10ng/ml、インターロイキン-3(IL-3)10ng/mlを含有するヒトメチルセルロース完全培地(R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて加湿チャンバー内で造血CFCをアッセイした。14日後、形態に従ってコロニーをスコア付けし、コロニー数/10⁵細胞を定量した。血清含有または血清フリーのMethoCult(商標)培地(Stem Cell Technologies)を用いてコロニーを生成させうる。

40

【0251】

実施例3 - エリスロイド分化に及ぼすMeCP2の影響

50

エリスロイド分化に及ぼすMeCP2ノックアウトの影響を決定するために、MeCP2ノックアウト01279.107.3902HPC、WT01279HPC、iCell1(登録商標)HPC(すなわち、フォワードプログラミングから産生された01279細胞)、CD34⁺誘導画分(すなわち、01279細胞のCD34陰性画分)、2D誘導01279HPC、および臍帯血HPC(PCT国際公開第2012/109208号パンフレット)を含めて、iPSCに由来するHPCのパネルを成熟エリスロイド細胞を生成させるそれらの能力に関して評価した。

【0252】

造血分化を誘導するために、EDTAを用いてiPSC細胞を採取し、凝集体形成を容易にするために、低付着プレート中で血清フリーEB基本培地に12時間配置した。最初の4日間にわたり骨形態形成因子(BMP-4)、血管内皮成長因子、およびゼブラフィッシュFGF-2(VEGF)でSFDMを補充し、続いて、次の8日間にわたりFlt-3リガンド(Flt3L)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-6(IL-6)、トロンボポイエチン(TPO)、ヘパリン、および幹細胞因子(SCF)が補充された培地でインキュベートした。得られたHPCを採取し、CD43/CD34細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより定量した(図2A)。プロセスの効率は、生成したHPCの絶対数を投入iPSC細胞数で除算することにより計算した(図2B)。

10

【0253】

iPSCに由来するHPCからヒト赤芽球を生成させるために、原始エリスロイド拡大培地(pEEM)で $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で細胞を1~2週間培養した(図3)。pEEM培地は、0.3%Excycyte(Serologicals)、ホロトランスフェリン(1mg/mL、Sigma)、ヒドロコルチゾン(1mM、Sigma)、SCF(50ng/mL、R&D Systems)、EPO(2U/mL、R&D Systems)、IL-3(5ng/mL)、IL-6(10ng/mL)、およびTPO(50ng/mL)が補充されたSFEM培地を含んでいた。2週間後、この段階で培養下の細胞は、CD71、CD235、およびCD36の表面発現を有することが観測された。そのため、細胞は、エリスロイド系列の方向に分化していた。MeCP2KO細胞は、MeCP2WT細胞よりも高レベルのCD235陽性細胞を呈した(表3)。

20

【0254】

【表3】

30

表3: 分化16日目におけるMeCP2KOを含有するiPS細胞クローンの向上したCD235

発現。

| IPSCクローン | MeCP2状態 | CD235発現 |
|-----------------|----------|---------|
| 01279.107.03902 | MeCP2KO | 26% |
| 01279 | MeCP2 WT | 7.5% |

40

【0255】

これとは対照的に、赤血球分化方向にHPCを分化させるために、HPCをエリスロイド拡大培地(EEM)で培養した。EEM培地は、0.3%Excycyte(Serologicals)、ホロトランスフェリン(1mg/mL、Sigma)、ヒドロコルチゾン(1mM、Sigma)、SCF(50ng/mL、R&D Systems)、およびEPO(2U/mL、R&D Systems)が補充されたSFEM培地を含んでいた。次の1~2週間にわたり細胞をこの培地に残留させ、1日おきに新鮮培地を供給した

50

。エリスロイド細胞富化集団の存在を2週間の終了時に観測したところ、80～90%がCD71、CD235a、およびCD36を発現することが分かった。

【0256】

各種HPC細胞系が呈した赤血球分化の詳しい分析は、分化の2～8週で細胞表面マーカーCD71、CD235a、CD36、CD71/235a、CD235a/36、およびCD71/36が陽性の細胞のパーセントを測定することにより実施した(図4A～4C)。01279.107.3902HPCは、赤芽球の細胞表面マーカーが陽性の細胞のパーセントが有意により高いことが分かった。そのため、iCell(登録商標)HPC以外の細胞系はすべて、分化の4週間にわたり赤血球に分化することが示されたが、MeCP2KOは、赤血球の産生を増強させた。

10

【0257】

次いで、赤血球分化プロセスの9週間にわたりHPC細胞系のそれぞれの細胞数を測定した。細胞系のほとんどは分化プロセスにわたり細胞数の低減が観測されたが、01279.107.3902細胞は、0週から4週まで細胞数の増加を示した。そのほか、他の細胞系と比較して、01279.107.3902細胞は、4週から6週まで赤血球マーカーグリコホリンA(CD235a)の発現の増加を示した。

【0258】

次いで、CD235aおよび各種グロビン、たとえば、 α グロビン、 β グロビン、および δ グロビンに関して細胞を共染色した。01279.107.3902細胞系から分化させた7および8週齢の細胞は、 α グロビンが陽性の細胞のパーセントが高く、かつ β グロビンが陽性の細胞のパーセントが低いことが観測された(図5A～5B、6)。赤血球分化プロセスにわたり、01279HPCと比較して、01279.107.3902細胞は、 α グロビン発現が高レベルであった。一方、01279.107.3902細胞は、 β グロビン発現が低発現であった。そのほか、01279.107.3902細胞系から分化させた赤血球のライト染色から除核が示された。したがって、01279.107.3902細胞系は、WT01279HPC細胞系と対比してより高レベルの α グロビンを有することから示されるように、より成熟した赤血球に分化した。そのため、MeCP2KOは、iPSCに由来する赤血球の成熟を容易にする。

20

【0259】

実施例4 - リンフォイド分化に及ぼすMeCP2ノックアウトの影響

30

リンフォイド分化に及ぼすMeCP2ノックアウトの影響を決定するために、細胞系をTおよびNK細胞分化の培養条件に付した。最初に、間質依存プロトコルでT細胞分化に関していくつかの変数を試験した。OP9骨髄間質細胞およびMS5ネズミ骨髄間質細胞をはじめとする間質系で、異なる細胞系から産生された12日目のHPCをT細胞潜在能力に関して試験した。20%FBS、10ng/mL SCF、5ng/mL Flt-3、および5ng/mL IL-7を含むMEM培地で細胞を培養した。培地の半分を週3回交換することにより細胞をリフレッシュさせた。T細胞の存在に関して細胞を分析したところ、細胞は、ミエロイド細胞を生成させる傾向を有しCD3⁺細胞の存在が検出できないことが示された。そのほか、間質共培養は、低酸素条件下で不十分な性能であった。

40

【0260】

したがって、フィーダーフリーT細胞分化プロトコルを開発した。0.5 μ g/cm²のレトロネクチンおよびNotch DLL4で被覆された未処理組織培養プレート上に約5,000～約25,000の細胞/cm²の細胞密度でHPCをプレーティングした。1%GlutaMax、1%ペニシリンストレプトマイシン、95 μ Mアスコルビン酸(WAKO Labs)、さらには50ng/mL IL-7、SCF、Flt-3、およびTPO(PeproTech)が補充されたStemSpan Serum-Free Expansion Medium(SFEM、StemCell Technologies)培地でHPCを培養した。48時間ごとに培地を補充し、2週間で細胞を非酵素的にスプリットして新しいリガンド被覆プレートに移した。そのほか、2週間と3週間

50

との間で、細胞表面マーカーCD5およびCD7によりプレT細胞の存在に関して細胞を分析した。4週間で、細胞表面マーカーCD3、CD4、およびCD8によりT細胞の存在に関して細胞を分析した。6～8週間で、細胞表面マーカーCD4、CD8、CD3、CD94、およびCD56を用いてT細胞およびNK細胞の存在に関して細胞を分析した。

【0261】

T細胞分化に及ぼす影響に関して試験したパラメーターの1つは、培養プレート上のマトリックスコーティングの選択であった。プレーティングの3週間後、Notch DLL4と臍帯血細胞との各種マトリックスの組合せを用いて血清フリー条件下でプレT細胞の出現を分析することにより、比較を行った。その結果、レトロネクチンとDLL4との組合せは、ビトロネクチンまたはテネイシンを含む組合せよりも臍帯血細胞をプレT細胞に分化させるのにより有効であることが示された(表4)。

10

【0262】

【表4】

表4: リンフォイド分化用のマトリックスの選択。レトロネクチン-DLL4上にプレーティングされた細胞はプレT細胞の(CD5⁺/CD7⁺)細胞の存在を示した。

| T細胞分化用のマトリックス | %CD5 | %CD7 | %CD5/CD7 |
|---------------|------|------|----------|
| レトロネクチン-DLL4 | 11% | 40% | 11% |
| テネイシン-DLL4 | 0.7% | 5.2% | 0.7% |
| ビトロネクチン-DLL4 | 0.6% | 6% | 0.6% |

20

30

【0263】

驚くべきことに、低酸素条件はフィーダーフリーT細胞分化を向上させることが分かった。具体的には、低酸素は、常酸素条件下で分化された細胞と比較して、CD8が陽性の細胞のパーセントの増加およびCD4が陽性の細胞のパーセントの減少をもたらすことが観測された(表5)。

【0264】

40

【表 5】

表 5: 低酸素は T 細胞分化に有利である。低酸素条件下で分化する細胞は T 細胞および NK 細胞の存在を示した。

| T細胞分化用のマトリックス | CD3 | CD4 | CD8 | CD3/CD4 | CD3/CD4 | CD4/CD8 | CD56+/CD3- (NK細胞) |
|---------------|-----|-------|------|---------|---------|---------|----------------------|
| 低酸素 | 7% | 11.4% | 49% | 2.6% | 2% | 5.6% | 28% |
| 常酸素 | 0.2 | 57% | 4.7% | 0 | 0 | 0 | 6% |

10

【 0 2 6 5 】

【表 6】

表 6: リンフォイド分化に関して試験された iPSC 細胞系の概要。

| 細胞系 | 再プログラミング方法 | 再プログラミング源材料 | MeCP2状態 | |
|----------------|------------|-------------|----------------|----|
| 01279 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雄性 |
| 01279.107.3904 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雄性 |
| 01279.107.3902 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | MeCP2KO エクソン3 | 雄性 |
| 01279.107.3905 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | MeCP2KO エクソン3 | 雄性 |
| 01279.107.3906 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | MeCP2KO エクソン3 | 雄性 |
| 01279.107.3907 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | MeCP2KO エクソン3 | 雄性 |
| 01279.107.3908 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | MeCP2KO エクソン3 | 雄性 |
| TIPS1E | ウイルス的 | T 細胞 | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雄性 |
| 1.025T | ウイルス的 | T 細胞 | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雌性 |
| 2.022B | エピソーム的 | LCL | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雄性 |
| 2.0224B | エピソーム的 | LCL | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雌性 |
| 01501.102 | エピソーム的 | 血液プロジェクター細胞 | 野生型エクソン3/エクソン4 | 雄性 |

20

30

40

【 0 2 6 6 】

実施例 2 に記載の HPC 分化の 5 日目、7 日目、9 日目、および 11 日目に 01279、01279.107.3902、01279.107.3905、01279.107.3906、01279.107.3907、および 01279.107.3908 のクローンを採取し、リンフォイド系列への分化の MeCP2 ノックアウトクローンの効率を分析した。以上に記載の時点で凍結保存されていた HPC 細胞を解凍し、レトロネクチン被覆プレート上および DLL4 被覆プレート上にプレティングした。2 日ごとに細胞に新鮮培地を供給し、HPC 細胞解凍後の 2 週間でプレ T 細胞マーカー (図 13A、13B)、4 週間で T 細胞マーカーおよび NK 細胞マーカーに関して分析した。プレ T 細胞マーカーの分析で

50

は、野生型 0 1 2 7 9 . 1 0 7 . 3 9 0 4 細胞以外の細胞はすべて、 $CD 5^+ CD 7^+$ 、 $CD 7^+ CD 4 5^+$ 、および $CD 5^+ CD 4 5^+$ として同定されるプレ T 細胞の存在を有していた。*in vitro* で生成させたリンフォイド細胞を同定するためのゲーティングストラテジーは、分化 1 8 日目について図 7 および 8 に描かれる。ヨウ化プロピジウムを用いて F S C - S S C 散乱内およびリンフォイド散乱内の生細胞のゲーティングを実施し、続いて、フローサイトメトリーにより $CD 7$ および $CD 5$ 陽性細胞を染色し、さらには $CD 3$ A P C、 $CD 8$ P E、および $CD 5 6$ F I T C で染色し、集団中の T 細胞 ($CD 3^+ / CD 8^+$) および NK / T 細胞 ($CD 3^+ / CD 5 6^+$) を同定した (図 9)。 $CD 4 5$ 、 $CD 7$ 、および $CD 5$ (図 1 0)、ならびに $CD 5 6$ 、 $CD 8$ 、および $CD 3$ (図 1 1) の表面発現を有する細胞を染色し、T 細胞、NK 細胞、および NK / T 細胞の存在を

10

【 0 2 6 7 】

投入細胞数は分かったので、T ($CD 3^+ / CD 8^+$)、NK ($CD 3^- / CD 5 6^+$)、および NK / T 細胞 ($CD 3^+ / CD 5 6^+$) の絶対数を決定した。プロセスの効率は、細胞型 (T、NK、または NK / T) 絶対数 / 全投入細胞数の比 (図 1 2 A) または細胞型絶対数 / 投入 H P C 数の比 (図 1 2 B) により計算される。T 細胞 ($CD 3^+ / CD 8^+$) のパーセント (図 1 3) および NK 細胞 ($CD 3^- / CD 5 6^+$) のパーセント (図 1 4) は、F S C - S S C ゲート下およびリンフォイド散乱ゲート下でフローサイトメトリーにより定量した。出現する NK / T ($CD 3^+ / CD 5 6^+$) (図 1 5)、($CD 3^+ / CD 8^+$) (図 1 6)、NK / T ($CD 3^+ / CD 5 6^+$)、および NK ($CD 3^- / CD 5 6^+$) (図 1 7) の細胞の量も決定した。さらなる分析を行ったところ、 $CD 2 3 5 / CD 7$ 、 $CD 1 4 4^+ / D L L 4^+$ 、および $F l k 1^+ / CD 3 4^+$ の発現は、分化 1 1 日目に低下することが示された (図 1 8)。分化 1 1 日目にリンフォイド細胞が不在であるので、このことから、これらのマーカーのある特定の発現閾値レベルは、 $D L L 4$ の存在下でリンフォイド分化に向かって細胞をプライミングするうえで本質的なものであることが示唆されうる。

20

【 0 2 6 8 】

最近の研究 (Oberlin, et al., 2010) により、全ヒト肝細胞の 0 . 6 % 未満を構成する VE - カドヘリン ($CD 1 4 4$) 発現集団の存在が実証された。この集団は $CD 3 4$ および $CD 4 5$ を共発現し、非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 (NOD / S C I D) マウスにおける *in vitro* 造血アッセイおよび長期移植実験により評価したとき、 $CD 1 4 4^- CD 3 4^+ CD 4 5^+$ カウンターパートよりも大きな自己再生能、増殖能、および分化能を呈した。

30

【 0 2 6 9 】

i P S C 由来 H P C 生成時、 $CD 1 4 4$ 発現細胞はまた $notch D L L 4$ を発現した。最終的 H S C は、成人レシピエントにおける長期複系列移植の能力により規定され、後に、大動脈・性腺・中腎 (A G M) として知られる領域の動脈血管、たとえば、背側大動脈で検出され、続いて、胎児肝臓に居を移し、骨髄への播種前に H S C はさらなる成熟および有意な増殖拡大を行う (Kieusseian et al., 2012)。Notch 経路は最終的 H S C に不可欠である。Notch $D L L 4$ は、二分化造血プロジェニターのサブ集団の造血分化時に発現される (Oberlin et al., 2010、Ayllon et al., 2015)。高レベルの $D L L 4$ を発現する細胞は、内皮運命にコミットすることが示され、一方、低レベルの $D L L 4$ を発現する細胞は、造血運命へのバイアスを有するが、高い $D L L 4$ を発現する細胞の非常に近くに存在する。*in vitro* リンフォイド分化は Notch $D L L 4$ の存在下で行われたので、リンフォイドプロジェニターは、低レベルの $D L L 4$ を発現する VE - カドヘリン陽性細胞でありうる。加えて、ヒト臍帯血中のマイナーなリンフォイドプロジェニターは、 $CD 3 4^{hi} CD 4 5 R A^{hi} CD 7^+$ として同定された (Haddad et al., 2004)。i P S C 由来 H P C 分化時に表現型によりリンフォイドプロジェニターを同定するために、VE - カドヘリン ($CD 1 4 4$)、汎白血球抗原 $CD 4 5$ 、血液内皮マーカー $CD 3$

40

50

4、およびマイナーなリンフォイドプロジェニターCD7を用いて選別実験を行った。

【0270】

リンフォイド細胞の表現型シグネチャーを同定するために、リンフォイド能力の欠如に伴って低下するマーカーのリストを用いて、T i P S C s 1 E細胞および3902細胞に由来する8日目のHPCプロジェニターを用いて磁気選別ストラテジーを実施した。8日目のHPCプロジェニターを採取し、個別化し、次いで表5に記載の磁気選別の4つの条件下に配置した。選別後に得られた陽性および陰性の画分を25k/cm²の密度でプレATINGし、Ret-DLL4被覆マトリックス12ウェルプレート上さらには24ウェルプレート上でT細胞分化を誘導した。T細胞分化は、先に記載したように低酸素条件下で実施した。

10

【0271】

T細胞マーカーの分析(図19)から、MeCP2WT細胞系ではなくMeCP2KO細胞系がリンフォイド分化の潜在能力を有することが示された。MeCP2WT細胞由来の9日目のHPCプロジェニターはCD3⁺CD8⁺T細胞を本質的に有していなかったが、試験した他のHPCプロジェニターは、CD3⁺CD8⁺T細胞集団に分化した。そのため、MeCP2のメチル結合ドメインのノックアウトは、T細胞およびNK細胞を産生するHPCプロジェニターの潜在能力を向上させた。

【0272】

実施例5 - 細胞への分化

MeCP2WTおよびMeCP2KOのiPS細胞はまた、モノホルモン細胞を生成可能なDE細胞およびEPCに分化した。プロセスの模式図は図21に提供されている。膵分化プロセスの段階は図23Cに提供される。全分化は低酸素条件下で実施される。

20

【0273】

懸濁培養で生成したEPCは、膵細胞型の生成のための分化培地に配置される。内胚葉前駆細胞の膵分化では、Nostronet al., 2011により記載され、Chenget al., 2012aによりさらに修正されたプロトコルを利用した。全プロセスは低酸素条件下で3D培養として継続させた。

【0274】

EPC培養物を15日間拡大し、前腸/中腸内胚葉細胞を生成させるために、Wnt3A(3ng/ml)、FGF-10(50ng/ml)、およびドルソモルフィン(0.75μM)を含有するSFD培地で3日間培養した。膵内胚葉細胞を生成させるために、GlutaMAX(1%)、B27(レチノイン酸(1%)を含まない)、アスコルビン酸(50μg/ml)、Pen/Strep(1%)、KAAD-シクロパミン(0.25μM)、transレチノイン酸(2μM)、ノギン(50ng/ml)、およびFGF-10(50ng/ml)を含有する高グルコースDMEM培地で細胞を3日間培養した。この工程の後、GlutaMAX(1%)、B27(レチノイン酸(1%)を含まない)、アスコルビン酸(50g/ml)、Pen/Strep(1%)、SB431542(6μM)、およびノギン(50ng/ml)を含有する高グルコースDMEM培地で細胞を3日間培養した。次いで、セクレターゼ阻害剤(2μMのDAPT)が補充された先の高グルコースDMEM培地で細胞を1~2日間培養した。この段階から、グルコース(40mM)、ニコチンアミド(10mM)、SB431542(6μM)、およびノギン(50ng/ml)を含有するSFD培地で細胞を1~2日間培養した。最後に、その次の10日間にわたり、SB431542(5.4μM)、ノギン(50ng/ml)、インスリン(800pM)、およびニコチンアミド(10mM)を含有するSFD培地で細胞を培養し、その際、添加された追加のグルコース(40mM)を含むおよび添加された追加のグルコースを含まないかかる培地で培地を交互に毎日交換した。モノホルモン細胞の存在は、2D方式で分化の10~15日目に検出された。

30

40

【0275】

分化の21~25日目に細胞培養物を採取し、固定し、そして細胞内フローサイトメトリーによりPDX1/NeuroD1/Cペプチド/グルカゴン/ソマトスタチンの定

50

量のために染色した(図24、25、26)。最終段階培養物は、モノホルモン細胞の存在を示した。最終段階の培養物は、PDX1、NeuroD1、およびいくつかのレベルのNKX6.1に関して陽性であった。最終段階の凝集体は、グルコースに対する反応性を示した(図27)。

【0276】

実施例6 - HPC分化に及ぼすMeCP2KOの影響

MeCP2WTまたはMeCP2KOを含有するiPSCクローンをE8/Matrigel上で5~10継代にわたり低酸素に適合化させ、HPCを産生するための3D分化プロトコルに付した。5 μ Mプレスタチンが補充されたSFD培地の存在下で25万~50万細胞/mlの密度の半集密iPSCから凝集体を作製した。ULAプレートまたはスピナーフラスコにおいて、75%IMDM、25%ハムF12、N2サプリメント、B27サプリメント(レチノイン酸を含まない)0.05%BSA、50 μ g/mlアスコルビン酸、GlutaMAX、Pen/Strep、および4.5 $\times 10^{-4}$ Mモノチオグリセロールを含有するSFD基本培地でプロセスを実施した。EBが形成されたら、最初の4日間にわたりSFD基本培地に50ng/ml BMP-4、VEGF、およびbFGFを補充することにより分化を開始した。EB分化の5日目に、それぞれ50ng/mlのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、ヘパリン、およびTPOの存在下に培養物を配置した。HPC分化9日目に凝集体を採取し、造血細胞の出現を定量した。

【0277】

CD43(図28)、CD34(図29)、CD34/CD43(図30)、CD45(図31)、CD235(図32A、図32B)、およびDLL-4の発現をフローサイトメトリーにより定量した。1つのiPSCを1つのHPC(34/43)細胞に変換する効率も定量した(図34)。全HPC分化を低酸素条件下で実施した。一般に、MeCP2KOは、HPC分化9日目に、CD43、CD34、CD43/CD34、CD45、CD235、およびDLL4が陽性の細胞のパーセントがより高いことが観測された。そのほか、MeCP2のノックアウトは、iPSCからHPCへの分化効率を約2~7倍に増加させた。

【0278】

実施例7 - マイクログリア生成に及ぼすMeCP2KOの影響

MeCP2WTまたはMeCP2KOを含有するiPSCクローンをE8/Matrigel上で5~10継代にわたり低酸素に適合化させ、HPCを産生するための3D分化プロトコルに付した。5 μ Mプレスタチンが補充されたSFD培地の存在下で25万~50万細胞/mlの密度の半集密iPSCから凝集体を作製した。ULAプレートまたはスピナーフラスコにおいて、75%IMDM、25%ハムF12、N2サプリメント、B27サプリメント(レチノイン酸を含まない)0.05%BSA、50 μ g/mlアスコルビン酸、GlutaMAX、Pen/Strep、および4.5 $\times 10^{-4}$ Mモノチオグリセロールを含有するSFD基本培地でプロセスを実施した。

【0279】

EBが形成されたら、最初の4日間にわたりSFD基本培地に50ng/ml BMP-4、VEGF、およびbFGFを補充することにより分化を開始した。EB分化の5日目に、それぞれ50ng/mlのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、ヘパリン、およびTPOの存在下に培養物を配置した。HPC分化9日目に凝集体を採取し、10~15k/cm²の細胞密度でMatrigel被覆プレート上にプレーティングし、Abud et al., 2017に記載の方法に従ってマイクログリア分化を開始させた。HPC分化は低酸素条件下で実施したが、マイクログリア分化は低常酸素条件下で実施した。

【0280】

分化の最初の22日間にわたり25ng/ml MCSF、50ng/ml TGF、および100 μ g/ml IL-34を含有するマイクログリア分化培地を細胞に供給した。25ng/ml MCSF、50ng/ml TGF、100 μ g/ml IL

10

20

30

40

50

- 34、CD200、およびCXCL1を含有するマイクログリア成熟培地に細胞を配置した。27日目に細胞を採取し、最終段階の培養物でマイクログリアの出現を確認するために、細胞内フローサイトメトリーによりP2RY、TREM-2、IBA、およびCXCR1が存在するものを染色した。分化プロセスの終了時の最終段階のマイクログリアの純度をフローサイトメトリーにより定量するとともに(図36)、HPCからマイクログリアを生成させる効率を定量した(図37)。IBA、P2RY、およびTREM-2が陽性の細胞のパーセントにより決定されるように、MeCP2のノックアウトは、マイクログリア細胞集団の純度の増加をもたらすことが観測された。

【0281】

実施例8 - リンフォイド細胞生成に及ぼすMeCP2KOの影響

10

MeCP2WTまたはMeCP2KOを含有するiPSCクローンをE8/Matrigel上で5~10継代にわたり低酸素に適合化させ、HPCを産生するための3D分化プロトコルに付した。5 μ Mプレスタチンが補充されたSFD培地の存在下で25万~50万細胞/mlの密度の半集密iPSCから凝集体を作製した。ULAプレートまたはスピナーフラスコにおいて、75%IMDM、25%ハムF12、N2サプリメント、B27サプリメント(レチノイン酸を含まない)0.05%BSA、50 μ g/mlアスコルビン酸、GlutaMAX、Pen/Strep、および4.5 \times 10⁻⁴Mモノチオグリセロールを含有するSFD基本培地でプロセスを実施した。

【0282】

EBが形成されたら、最初の4日間にわたりSFD基本培地に50ng/ml BMP-4、VEGF、およびbFGFを補充することにより分化を開始した。EB分化の5日目に、それぞれ50ng/mlのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、ヘパリン、およびTPOの存在下に培養物を配置した。HPC分化9日目に、凝集体を採取し、ret-DLL4被覆プレート上に25k/cm²の細胞密度でプレーティングした。分化の最初の14日間にわたり、50ng/ml SCF、TPO、IL-7、およびFlt-3リガンドを含有するT細胞分化培地を低酸素条件下で細胞に供給した。2週間の終了時に細胞を採取し、プレTプロジェニター(CD45/CD7)(図38B)および(CD7/CD5)(図38C)の細胞のパーセントをフローサイトメトリーにより定量した。プレT細胞(CD5/CD7)のFACSプロファイルのスナップショットは、(図38A)に描かれている。

20

30

【0283】

出現するプレT細胞を新鮮なret-DLL4被覆プレート上に配置し、50ng/ml SCF、TPO、IL-7、Flt-3リガンド、および10U/ml IL-2を含有する培地で分化をさらに2週間継続した。T細胞(CD3/CD8)のFACSプロファイルのスナップショットは、(図39A)に描かれている。種々のWTおよびMeCP2KOクローン、SONL(図39B)、iPSC9025(図39C)、iPSC A系(図39D)、F系(図39E)、H系(図39F)で、全CD3、細胞傷害性T細胞(CD3⁺/CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻/CD56)、およびNK/T細胞(CD3⁺/CD56⁺)の定量を行った。このように、MeCP2KO iPSCを用いてiPSCからT細胞およびNK/T細胞を効率的に生成させることが可能である。

40

【0284】

実施例9 - 肝細胞成熟に及ぼすMeCP2KOの影響

図21に記載されるように、MeCP2WTまたはMeCP2KOのiPSC系を胚体内胚葉細胞に分化させた。次いで、図40に示されるプロトコルに従って胚体内胚葉細胞を肝細胞にさらに分化させた。全分化プロセスは、分化プロセスの25日目まで低酸素条件下で実施した。簡潔に述べると、BMP4(50ng/ml)、bFGF(10ng/ml)、EGF(10ng/ml)、VEGF(10ng/ml)、HGF(100ng/ml)、Dex(0.1 μ M)、DMSO(1%)、およびFGF-10(60ng/ml)が補充されたSFD培地で2DでDE細胞を約6日間培養した。次いで、コラーゲン上においてbFGF(10ng/ml)、EGF(20ng/ml)、VEGF(10

50

ng/mL)、HGF(100 ng/mL)、OSM(20 ng/mL)、Dex(0.2 μM)、DMSO(1%)、DAPT(2 μM)、およびビタミンK(6 μg/mL)が補充されたSFD培地に細胞を約6日間再プレATINGした。第3段階では、細胞は、B27(1x)、EGF(20 ng/mL)、OSM(20 ng/mL)、Dex(0.1 μM)、GlutaMAX(1%)、およびPen/Strep(1%)が補充されたウィリアムE培地に2DでプレATINGした。

【0285】

Accumaxを用いて最終段階の肝細胞を採取し、細胞内フローサイトメトリーを実施することにより、-1-アンチトリプシン(AAT)の存在およびアルブミンの発現を有するものを染色した。AATおよびアルブミンは、成体肝細胞のマーカーとして知られ、MeCP2KO iPSCから分化させた肝細胞は、MeCP2WT iPSCから分化させた肝細胞と比較してアルブミンのより高い発現を有することが観測された。そのため、MeCP2KO iPSCを用いて、より成熟した肝細胞を効率的に生成させることが可能である。

10

【0286】

実施例10 - MeCP2KO iPSCからの赤芽球産生の特徴付け

MeCP2WTまたはMeCP2KOを含有するiPSCクローンをE8/Matrigel上で5~10継代にわたり低酸素に適合化させ、HPCを産生するための3D分化プロトコルに付した。5 μMプレスタチンが補充されたSFD培地の存在下で25万~50万細胞/mLの密度の半集密iPSCから凝集体を作製した。プロセスは、ULAプレートまたはスピナーフラスコにおいて75%IMDM(Invitrogen 12200-069)(グルタミンおよび25 mM HEPES + P/Sを含む)、25%ハムF12(Mediatech 10-080-CV)、0.5%N2サプリメント(Invitrogen 17502-048)、1%B27サプリメント(レチノイン酸を含まない)(Invitrogen 12587-010)、0.05%BSA、50 μg/mLアスコルビン酸、GlutaMAX、Pen/Strep、および 4.5×10^{-4} Mモノチオグリセロールを含有するSFD基本培地で実施された。

20

【0287】

EBが形成されたら、最初の4日間にわたりSFD基本培地に50 ng/mL BMP-4、VEGF、およびbFGFを補充することにより分化を開始した。EB分化の5日目に、それぞれ50 ng/mLのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、ヘパリン、およびTPOの存在下に培養物を配置した。HPC分化9日目に凝集体を採取し、造血細胞の出現を定量した。

30

【0288】

iPSCに由来するHPCからヒト赤芽球を生成させるために、原始エリスロイド拡大培地(pEEM)で $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で細胞を1~2週間培養した。pEEM培地は、0.3%Excycyte(Serologicals)、ホロトランスフェリン(1 mg/mL、Sigma)、ヒドロコルチゾン(1 mM、Sigma)、SCF(50 ng/mL、R&D Systems)、EPO(2 U/mL、R&D Systems)、IL-3(5 ng/mL)、IL-6(10 ng/mL)、およびTPO(50 ng/mL)が補充されたSFEM培地を含んでいた。分化の2~7週でグリコホリン(CD235)が存在する細胞を染色した。赤血球分化を行う各クローンのCD235発現の動態は、図42に描かれている。一般に、MeCP2KOを含むiPSCから分化させた赤血球は、エリスロイド分化時にCD235発現がより初期に出現し、CD235が陽性の細胞のパーセントがより高いことが観測された。

40

【0289】

赤血球分化の2~7週で、CD235aおよび各種グロビン、たとえば、グロビン、グロビン、およびグロビンに関して細胞を共染色した。iPSC SONL MeCP2KO(図43A)、SONL MeCP2WT(図43B)、iPSC TIPS MeCP2KO(図44A)、TIPS MeCP2WT(図44B)、iPSC 902

50

5 MeCP2KO (図45A)、9025MeCP2WT (図45B)、iPSC A系MeCP2KO (図46A)、A系MeCP2WT (図46B)、iPSC H系MeCP2KO (図47A)、H系MeCP2WT (図47B)、iPSC G系MeCP2KO (図48A)、およびG系MeCP2WT (図48B)。MeCP2KO細胞系から分化させた赤血球ではすべて、グロビンの発現は、胚性グロビンのレベルの低下を伴うことから、胚性グロビンから成人グロビンへのスイッチが示唆する。これには胎児グロビンのレベルの減少を伴う。そのため、MeCP2KO iPSC由来の赤血球は、MeCP2WT iPSCから分化させた赤血球よりも成熟している。

【0290】

本明細書に開示および特許請求される方法はすべて、本開示に照らして過度の実験を行うことなく実行可能である。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関連して記載されてきたが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく本方法および本明細書に記載の方法の工程または工程の順序に変更を加えることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連するある特定の作用剤は、本明細書に記載の作用剤の代わりになりうるとともに、同一または類似の結果を達成するであろうことは明らかであろう。当業者に明らかになる類似の代替物および改変物はすべて、添付の特許請求の範囲により規定される本発明の趣旨、範囲、および概念に含まれるとみなされる。

【0291】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書の記載内容を補足する例示的な手順または他の詳細事項を提供する範囲内で参照により本明細書に組み込まれる。

Aboud et al., Blood, 58: 1148 - 1154, 1981.

Abdul et al., Neuron, 2017.

Akkina et al., J. Virol., 70: 2581 - 2585, 1996.

Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5092 - 5096, 1988.

Anderson, Science 256: 808 - 813, 1992.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.

Ayllon et al., Leukemia 29(8): 1741 - 1753, 2015.

Beerli et al. Nature Biotechnol. 20: 135 - 141, 2002.

Bhatnagar, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014.

Bird A. Nature. 1986; 321: 209 - 13, 1986.

Bird, A. Biochem. Soc. Trans., 36: 575 - 583, 2008.

Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590: 582 - 583, 1990.

Biswas et al., J. Clin. Microbiol., 29: 2228 - 2233, 1991.

Blomer et al., J. Virol., 71(9): 6641 - 6649, 1997.

Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8): 2745 - 2752, 1987.

Cheng et al., Cell Stem Cell 10(4): 371 - 3

10

20

30

40

50

- 84, 2012.
- Choo et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 411 - 416, 2000.
- Critchlow and Jackson, *Trends Biochem Sci.* 23(10): 394 - 8, 1998.
- Dillon. *TIBTECH* 11: 167 - 175, 1993.
- Doulatov et al., *Cell Stem Cell.* 10: 120 - 36, 2012.
- Ercolani et al., *J. Biol. Chem.*, 263: 15335 - 15341, 1988. 10
- Evans, et al., *In: Cancer Principles and Practice of Oncology*, Devita et al. (Eds.), Lippincott-Raven, NY, 1054 - 1087, 1997.
- Fauser et al., *Stem Cells*, 1: 73 - 80, 1981
- Fechheimer et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463 - 8467, 1987.
- Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348 - 3352, 1979.
- Frisan et al., *Epstein-Barr Virus Protocols*, Part III, 125 - 127, 2001 20
- Furie and Furie, *Cell* 53: 505 - 518, 1988.
- Gaj et al., *Trends in Biotechnology* 31(7), 397 - 405, 2013.
- Golde et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 593 - 596, 1980.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52: 456 - 467, 1973.
- Haddad et al., *Blood* 104(13): 3918 - 3926, 2004.
- Haddada et al., *in Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1995. 30
- 国際公開第94/09699号パンフレット
- 国際公開第95/06128号パンフレット
- 国際公開第96/39487号パンフレット
- Isalan et al. *Nature Biotechnol.* 19: 656 - 660, 2001.
- Jaenisch, *Science* 240: 1468 - 1474, 1988.
- Jones PA and Takai D. *Science*. 293: 1068 - 70, 2001.
- Kaeppler et al., *Plant Cell Reports* 9: 415 - 418, 1990. 40
- Karin et al. *Cell*, 36: 371 - 379, 1989.
- Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266: 3361 - 3364, 1991.
- Kaufman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 19, 2001.
- Kieusseian, A., P. Brunet de la Grange, O. Burlen-Defranoux, I. Godin and A. Cumanò (2012). "Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver." *Dev* 50

- elopment 139(19):3521-3530.
- Kim et al. J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982, 1994b.
- Kim et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887, 1994a.
- Kim et al., J. Virol., 66:3879-3882, 1992.
- Kim et al., Nature Biotechnology 31,251-258, 2013.
- Knust et al, EMBO J. 761-766, 1987.
- Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44, 1995. 10
- Ladi et al., Nature Immunology, 7:338-343, 2006.
- Langle-Rouault et al., J. Virol., 72(7):6181-6185, 1998.
- Lappalainen et al. Clin. Experim. Allergy, 37:1404-1414, 2007.
- Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23):12616-12621, 1997.
- Li et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279, 1992. 20
- Lloyd et al., Frontiers in Immunology, 4(221):1-7, 2013.
- Ludwig et al. Nature Biotech., (2):185-187, 2006a.
- Ludwig et al. Nature Methods, 3(8):637-646, 2006b.
- Lusis, Blood, 57:13-21, 1981.
- Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991. 30
- Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.
- Marshall et al., Blood, 96:1591-1593, 2000.
- Miller, Nature 357:455-460, 1992.
- Minskaia and Ryan, 2013
- Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166, 1993. 40
- Nabel & Feigner, TIBTECH 11:211-217, 1993.
- Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996. Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, Ng, Nuc. Acid Res., 17:601-615, 1989.
- Nicola, et al., Blood, 54:614-627, 1979.
- Nicolas and Rubenstein, In: Vectors: A sur 50

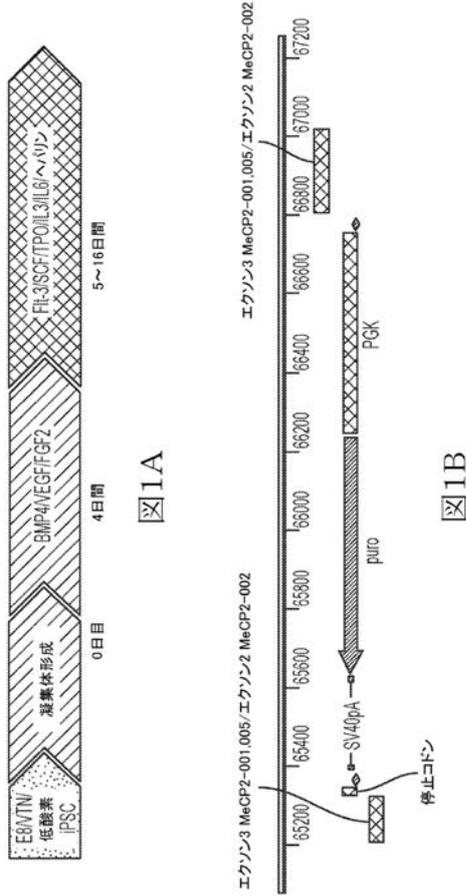
- vey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494 - 513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185 - 190, 1982.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149: 157 - 176, 1987.
- Nostro et al., *Development* 138: 861 - 871, 2011.
- Notta et al., *Science*, 218 - 221, 2011. 10
- Oberlin et al., *Blood* 116(22): 4444 - 4455, 2010.
- Okabe, *J. Cell. Phys.*, 110: 43 - 49, 1982.
- Orkin et al., *Blood* 120(15): 2945 - 2953, 2012.
- Pabo et al. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 313 - 340, 2001.
- Paskind et al., *Virology*, 67: 242 - 248, 1975.
- Patent Publication No. EP 15 07 865 20
- PCT国際公開第2006/050330号パンフレット
- PCT国際公開第2007/069666号パンフレット
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180): 320 - 325, 1988.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2): 169 - 177, 1985.
- Potter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161 - 7165, 1984.
- Quitsche et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 9539 - 9545, 1989. 30
- Richards et al., *Cell*, 37: 263 - 272, 1984.
- Rippe, et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689 - 695, 1990. Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Schernthaner et al., *Blood*, 98: 3784 - 3792, 2001.
- Scicchitano et al., *Exp Hematol.* 31: 760 - 9, 2003.
- Segal et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632 - 637, 2001. 40
- Slukvin et al. In: *Directed Production of Specific Blood Lineages from Human Embryonic Stem Cells*, #33, ASCI/AAP Joint Meet. Posters, 2007.
- Suzuki et al., *EMBO J.* 6: 1891 - 1897, 1987.
- Takahashi et al., *Cell*, 131(5): 861 - 872, 2007.
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149 - 188, 1986.
- Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 716 - 7 50

1 8 , 1 9 8 6 .

| | |
|---|----|
| 米 国 特 许 出 愿 第 0 8 / 4 6 4 , 5 9 9 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 第 1 2 / 4 7 8 , 1 5 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 第 1 2 / 7 1 5 , 1 3 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 0 7 / 0 0 7 7 6 5 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 0 9 / 0 2 4 6 8 7 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 0 / 0 2 1 0 0 1 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 1 / 0 0 5 9 5 0 2 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 1 / 0 1 0 4 1 2 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 1 / 0 3 0 1 0 7 3 号 明 细 书 | 10 |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 2 / 0 2 7 6 6 3 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 3 / 0 3 1 5 8 8 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 4 / 0 1 2 0 6 2 2 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 公 开 第 2 0 1 5 / 0 1 9 1 6 9 7 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 出 愿 第 6 1 / 0 8 8 , 0 5 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 4 , 8 9 7 , 3 5 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 4 , 9 4 6 , 7 8 7 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 0 3 0 , 0 1 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 0 4 9 , 3 8 6 号 明 细 书 | 20 |
| 米 国 特 许 第 5 , 3 0 2 , 5 2 3 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 3 2 2 , 7 8 3 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 3 8 4 , 2 5 3 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 4 6 4 , 7 6 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 4 8 6 , 3 5 9 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 3 8 , 8 7 7 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 3 8 , 8 8 0 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 5 0 , 3 1 8 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 5 6 , 9 5 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 6 3 , 0 5 5 号 明 细 书 | 30 |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 8 0 , 8 5 9 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 8 9 , 4 6 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 5 9 1 , 6 1 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 6 1 0 , 0 4 2 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 6 5 6 , 6 1 0 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 7 0 2 , 9 3 2 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 7 3 6 , 5 2 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 7 8 0 , 4 4 8 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 7 8 9 , 2 1 5 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 8 4 3 , 7 8 0 号 明 细 书 | 40 |
| 米 国 特 许 第 5 , 9 2 8 , 9 0 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 9 4 5 , 1 0 0 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 9 8 1 , 2 7 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 9 9 4 , 1 3 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 5 , 9 9 4 , 6 2 4 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 6 , 0 1 3 , 5 1 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 6 , 1 0 3 , 4 7 0 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 6 , 2 0 0 , 8 0 6 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 6 , 4 1 6 , 9 9 8 号 明 细 书 | |
| 米 国 特 许 第 7 , 0 2 9 , 9 1 3 号 明 细 书 | 50 |

- 米国特許第7,442,548号明細書
 米国特許第7,598,364号明細書
 米国特許第7,989,425号明細書
 米国特許第8,058,065号明細書
 米国特許第8,071,369号明細書
 米国特許第8,129,187号明細書
 米国特許第8,183,038号明細書
 米国特許第8,268,620号明細書
 米国特許第8,372,642号明細書
 米国特許第8,546,140号明細書 10
 米国特許第8,691,574号明細書
 米国特許第8,741,648号明細書
 米国特許第8,900,871号明細書
 米国特許第9,175,268号明細書
 米国特許出願公開第20020055144号明細書
 米国特許出願公開第20090148425号明細書
 Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154
 , 1988.
 Vigne, *Restorative Neurology and Neurosc
 ience* 8:35-36, 1995. 20
 Wilson et al., *Nature Reviews Immunology*
 , 9:91-105, 2009.
 Wilson et al., *Science*, 244:1344-1346, 198
 9.
 Wong et al., *Gene*, 10:8794, 1980. Kaneda et
 al., *Science*, 243:375-378, 1989.
 Wynn, *Nature Immunology*, 6:1069-1070, 2005
 .
 Xi et al. *Biomed Res Int*, 2013. Yamanaka e
 t al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007. 30
 Yu et al. *Gene Therapy* 1:13-26, 1994.
 Yu et al. *Science*, 318(5858):1917-1920, 20
 07.

【 図 1 A - 1 B 】



【 図 2 A 】

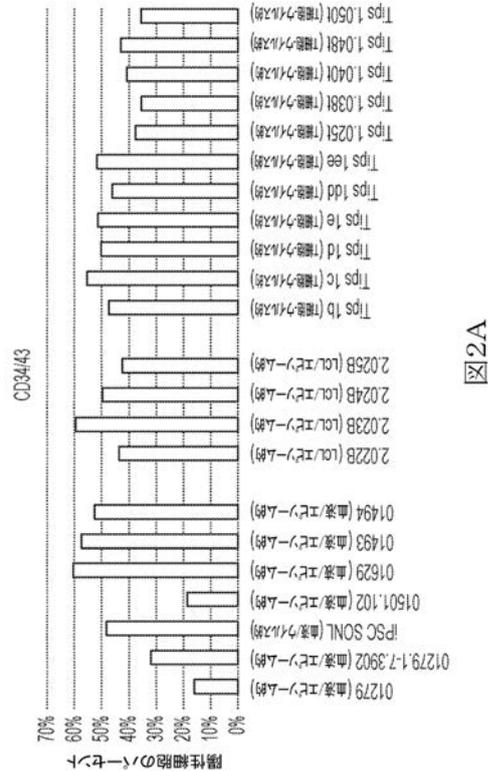


図2A

【 図 1 C 】

メチルCpG結合ドメイン

工学操作部位

| Sequence | MECP2_002 | MECP2_005 | MECP2_001 | MECP2_008 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| MAAAAAAPSGGGGGGEEERLEEKESDQLQGLKDKPLKFKVKKDKKEEGKHEPVQP | ----- | ----- | ----- | ----- |
| -----MVAGMLGLREEKESDQLQGLKDKPLKFKVKKDKKEEGKHEPVQP | ----- | ----- | ----- | ----- |
| -----MVAGMLGLREEKESDQLQGLKDKPLKFKVKKDKKEEGKHEPVQP | ----- | ----- | ----- | ----- |
| -----MVAGMLGLREEKESDQLQGLKDKPLKFKVKKDKKEEGKHEPVQP | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SXXXAHHSAPAEACKAETSESGSAPAVPEASAPKQRRSIIIRDGPMYDDPTLPEGWTRKL | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SXXXAHHSAPAEACKAETSESGSAPAVPEASAPKQRRSIIIRDGPMYDDPTLPEGWTRKL | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SXXXAHHSAPAEACKAETSESGSAPAVPEASAPKQRRSIIIRDGPMYDDPTLPEGWTRKL | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SXXXA | ----- | ----- | ----- | ----- |
| KQRKSGRSAGKYDVLINPQGFAPRSKVELIAYPEKVGDTSLDPNDFPTVIGRGSFSRR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| KQRKSGRSAGKYDVLINPQGFAPRSKVELIAYPEKVGDTSLDPNDFPTVIGRGSFSRR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| KQRKSGRSAGKYDVLINPQGFAPRSKVELIAYPEKVGDTSLDPNDFPTVIGRGSFSRR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| -----KQKSGRSAGKYDVLINPQGFAPRSKVELIAYPEKVGDTSLDPNDFPTVIGRGSFSRR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EQKPPKPKSPKAPGTRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQKRVLEKSPGKLVKMPFQT | ----- | ----- | ----- | ----- |
| -----FRDPRRPRQ-----RVCR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EQKPPKPKSPKAPGTRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQKRVLEKSPGKLVKMPFQT | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGKRRKAEADPQAIKPKRGRKPGSVAAAAAEAKKAV | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGKRRKAEADPQAIKPKRGRKPGSVAAAAAEAKKAV | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGKRRKAEADPQAIKPKRGRKPGSVAAAAAEAKKAV | ----- | ----- | ----- | ----- |
| KESSIRSVQETVLPFKKRTRETYSIEVKEVVKPLLVSFLGKESGKGLTKCSPGRKSKE | ----- | ----- | ----- | ----- |
| KESSIRSVQETVLPFKKRTRETYSIEVKEVVKPLLVSFLGKESGKGLTKCSPGRKSKE | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SSPKGRSSASSPPKKEHHHHHSESPKAPVLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPEPQDL | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SSPKGRSSASSPPKKEHHHHHSESPKAPVLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPEPQDL | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SSSVCKEEKMPRGGSLESDGCPKEPAKTQPAVATAATAAEYKHRGEGEKDKIVSSSMFR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| SSSVCKEEKMPRGGSLESDGCPKEPAKTQPAVATAATAAEYKHRGEGEKDKIVSSSMFR | ----- | ----- | ----- | ----- |
| PNREEPVDSRTFVTERVS | ----- | ----- | ----- | ----- |
| PNREEPVDSRTFVTERVS | ----- | ----- | ----- | ----- |

図1C

【 図 2 B 】

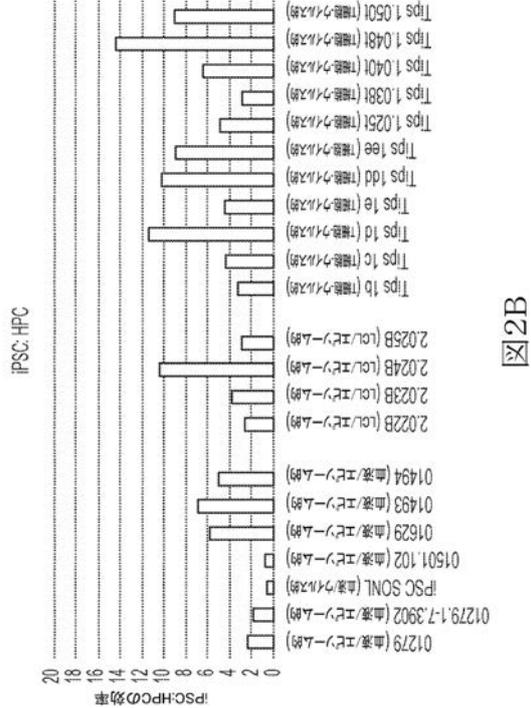


図2B

【 図 3 】

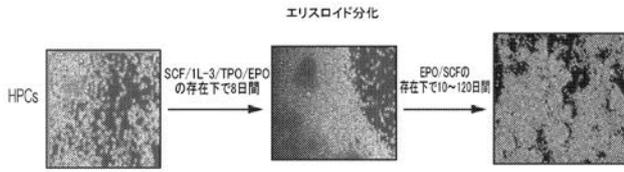


図3

【 図 4 A 】

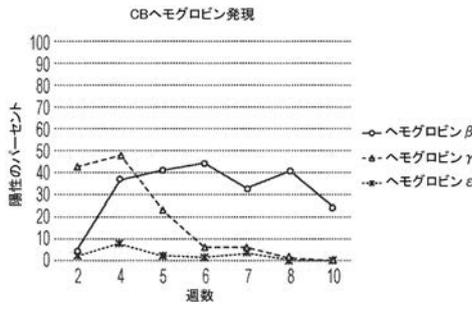


図4A

【 図 4 C 】

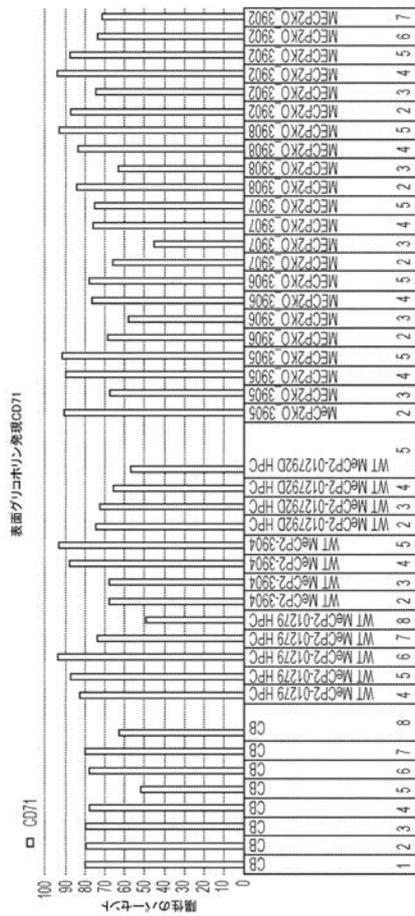


図4C

【 図 4 B 】

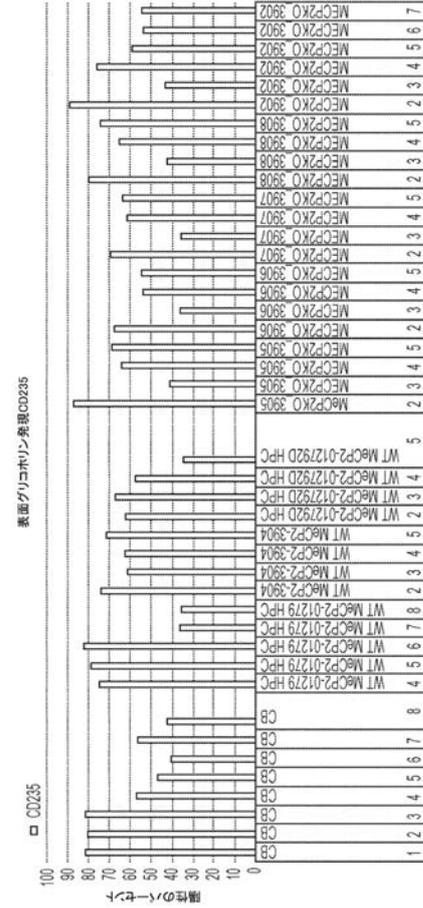


図4B

【 図 4 D 】

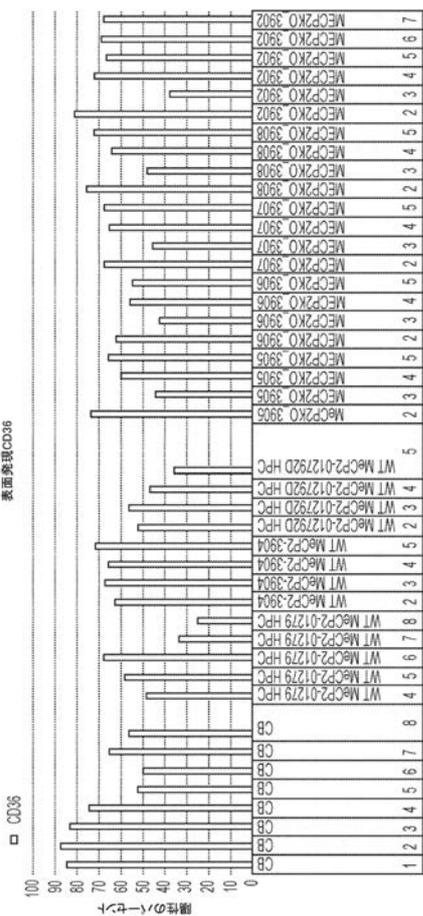


図4D

【 図 5 A 】

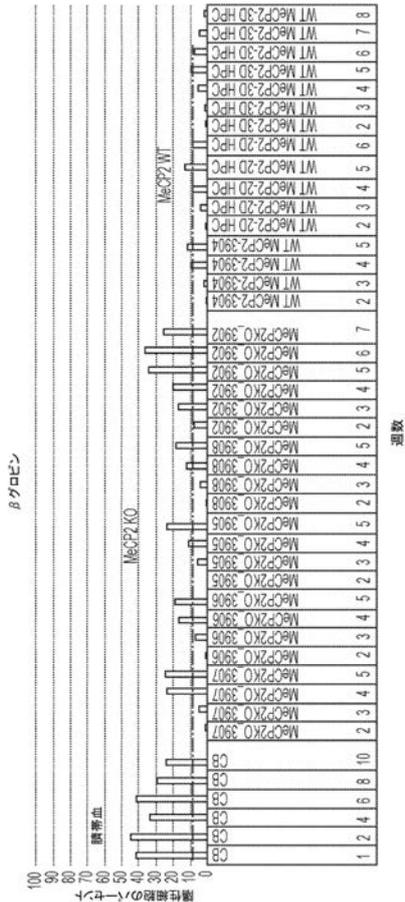


図5A

【 図 5 B 】

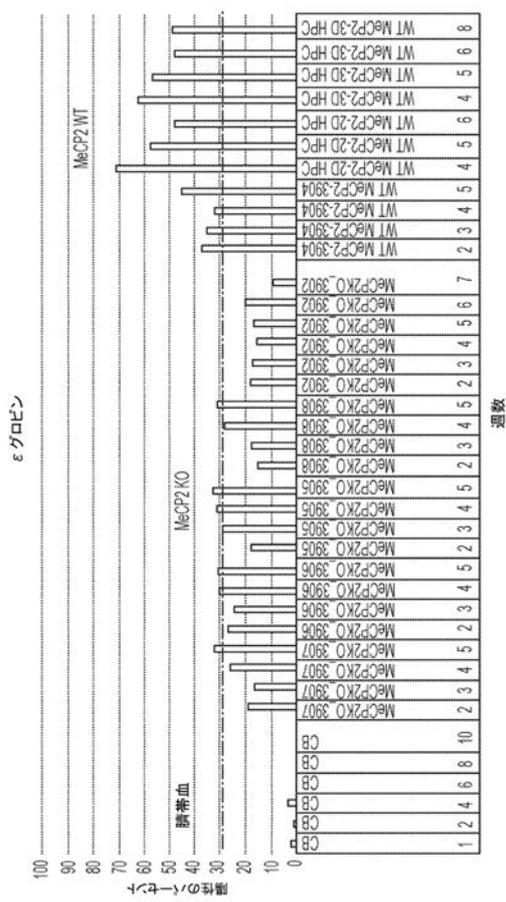


図5B

【 図 5 C 】

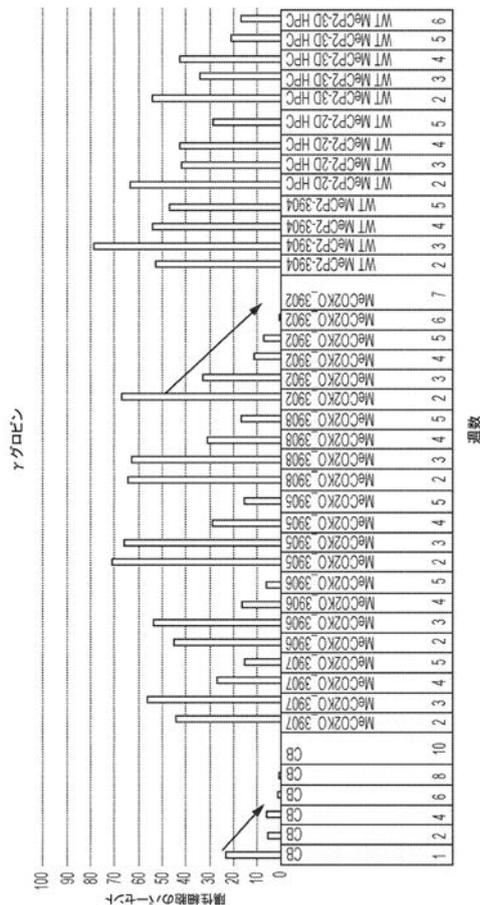


図5C

【 図 6 】

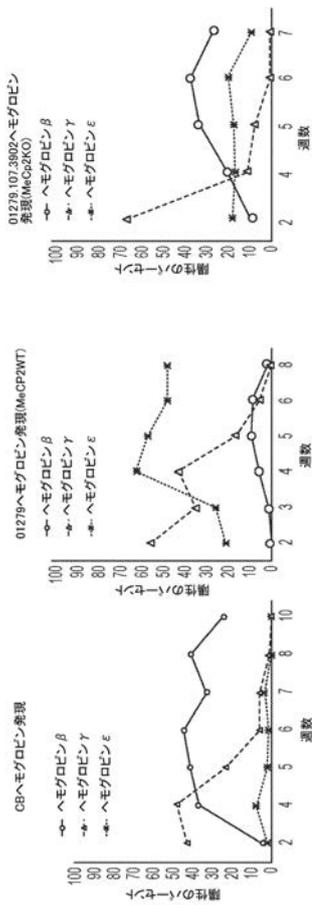


図6

【 図 7 】

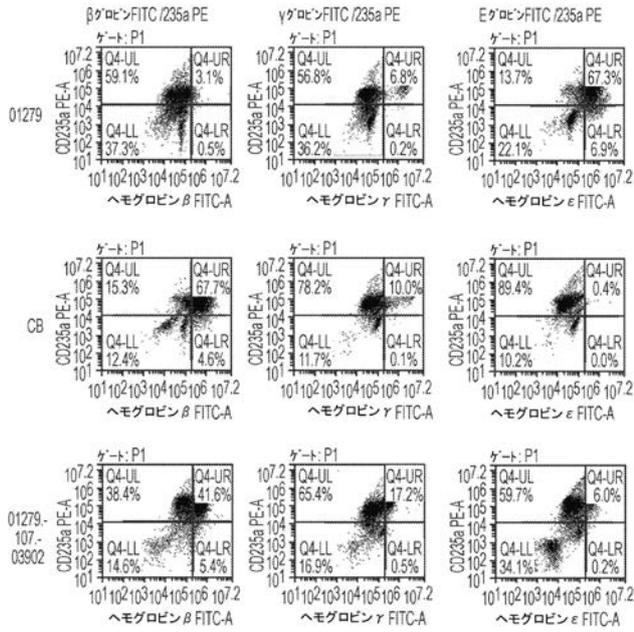


図 7

【 図 8 】

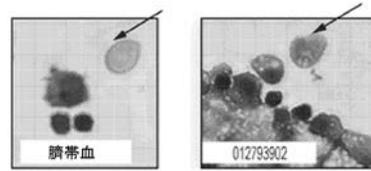


図 8

【 図 9 】

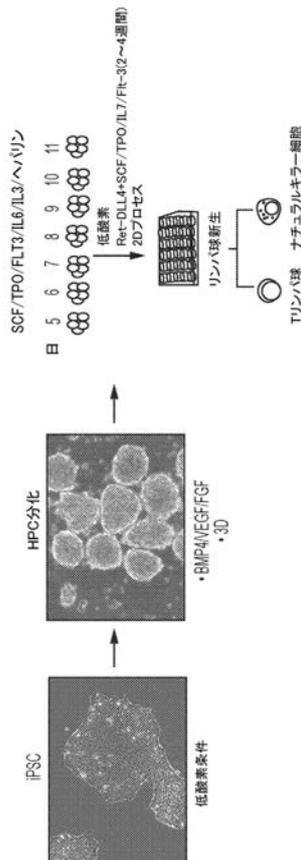


図 9

【 図 10 A - 10 C 】

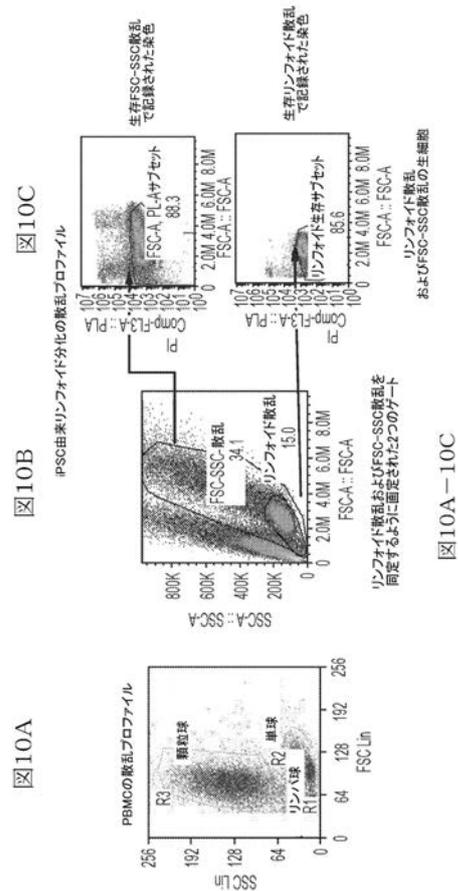


図 10A-10C

【 図 1 1 A 】

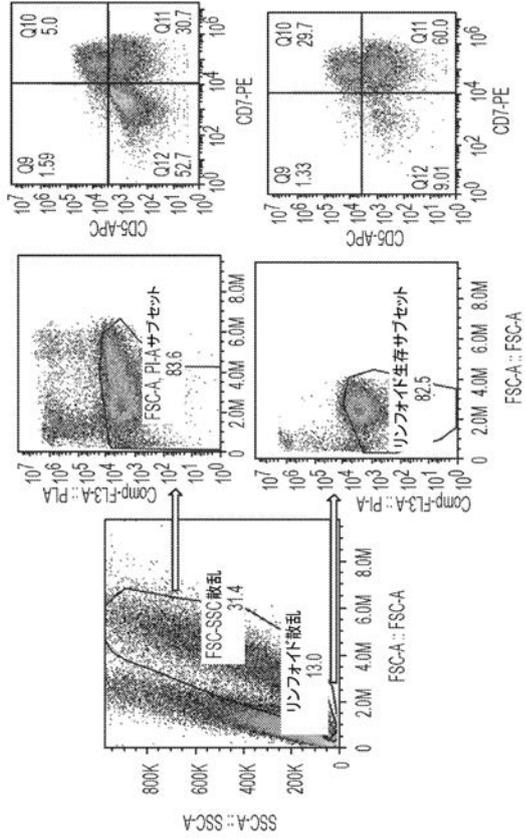


図11A

【 図 1 1 B 】

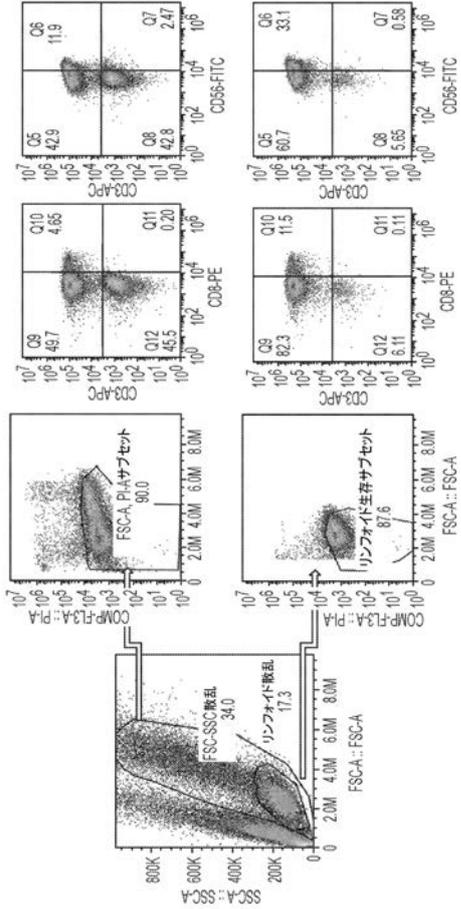


図11B

【 図 1 2 A - 1 2 B 】

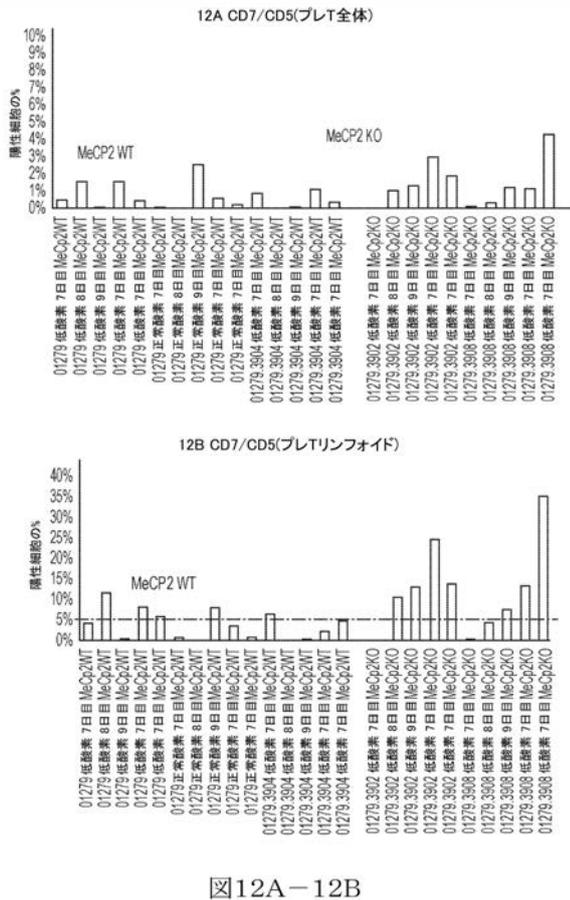


図12A-12B

【 図 1 3 A - 1 3 C 】

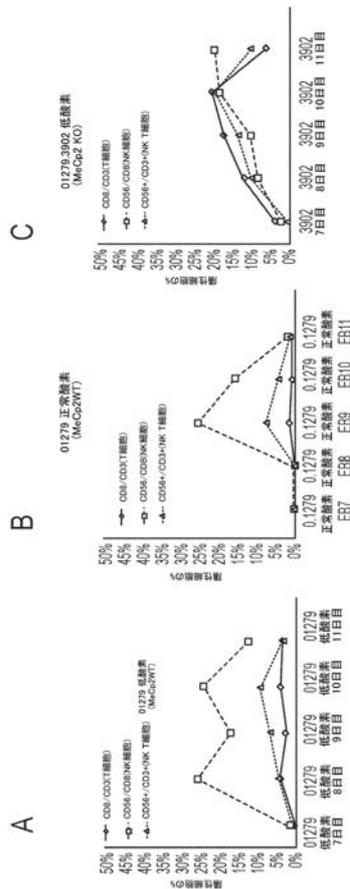


図13A-13C

【 図 1 4 A - 1 4 B 】

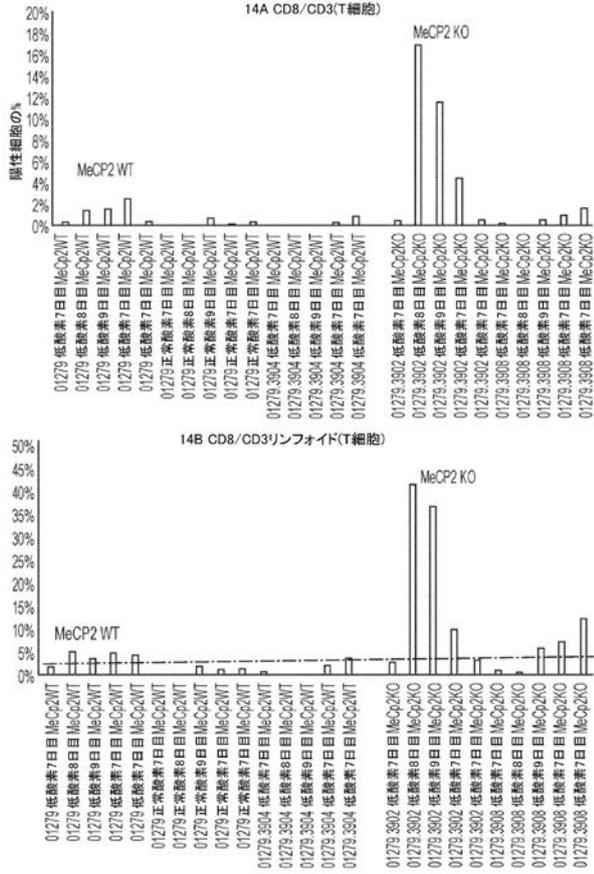


図14A-14B

【 図 1 5 A - 1 5 B 】

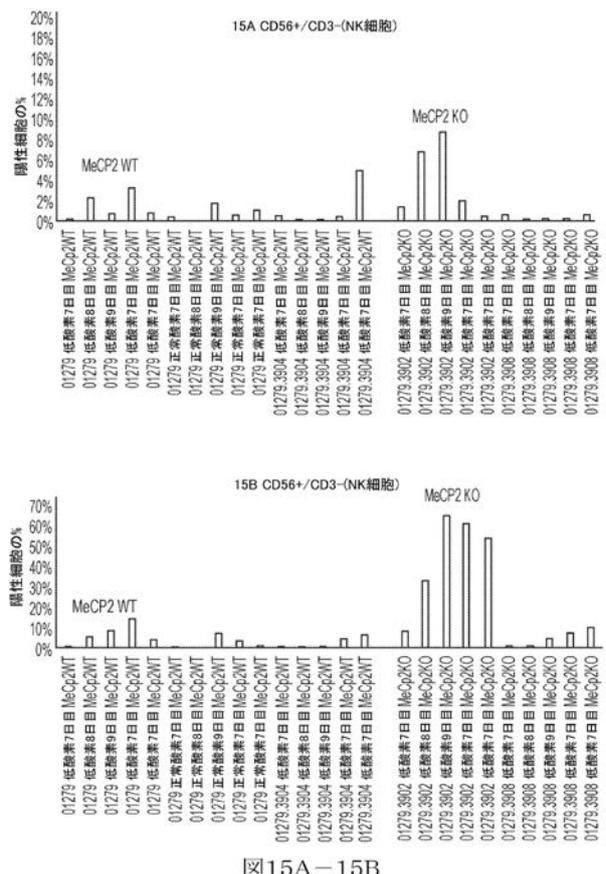


図15A-15B

【 図 1 6 A - 1 6 B 】

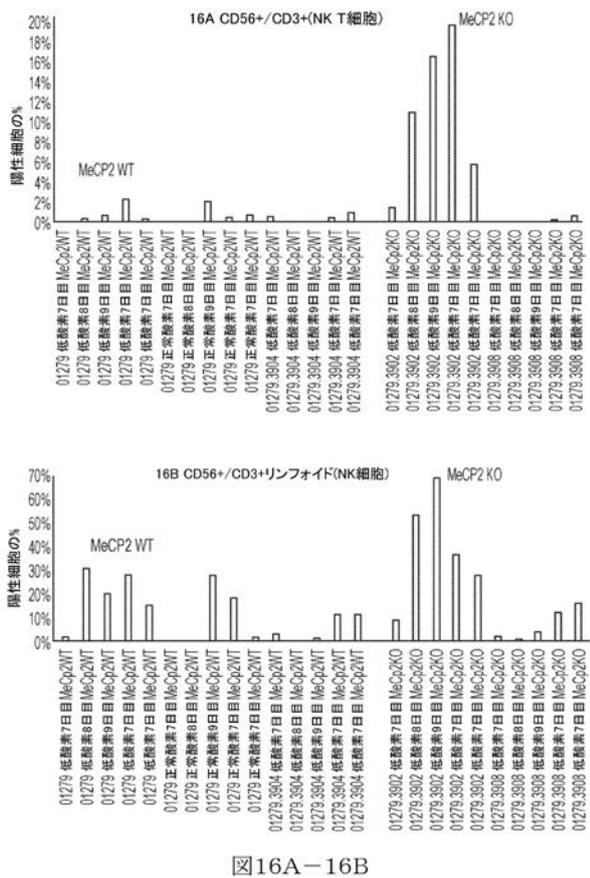


図16A-16B

【 図 1 7 A - 1 7 B 】

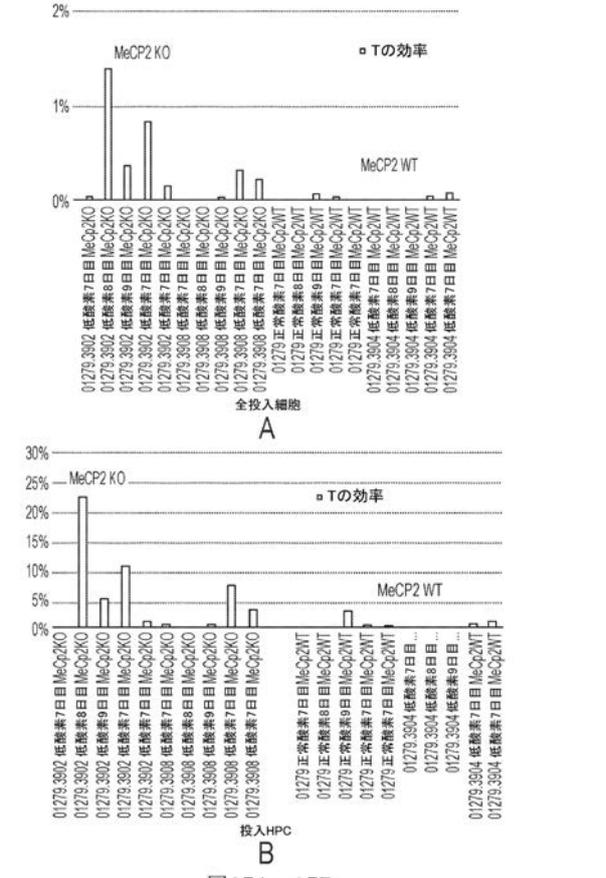


図17A-17B

【 図 18 A - 18 B 】

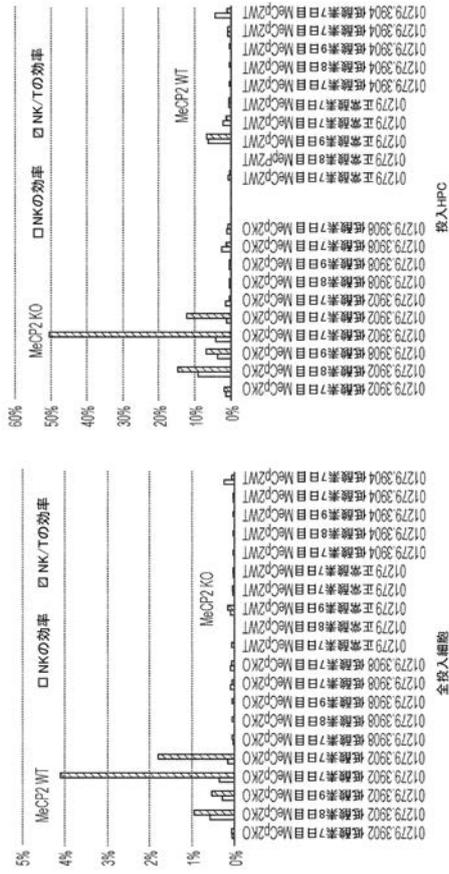


図 18A-18B

【 図 19 A - 19 D 】

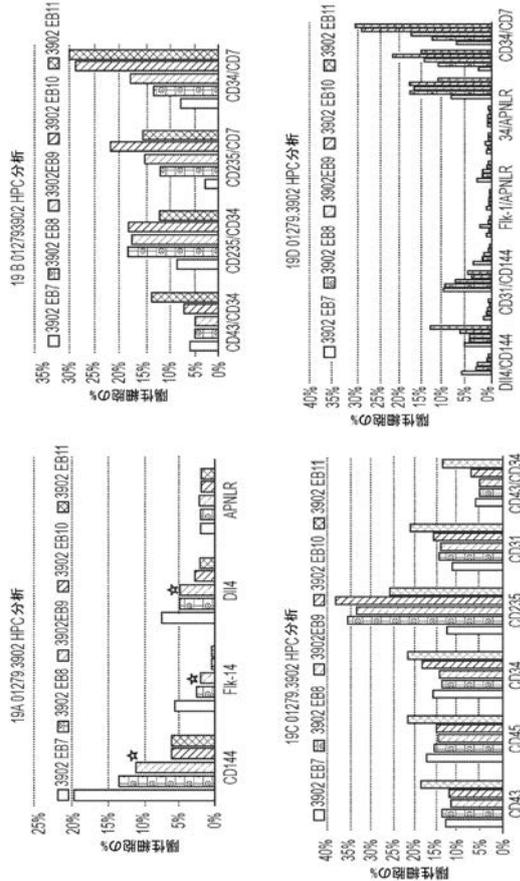


図 19A-19D

【 図 20 】

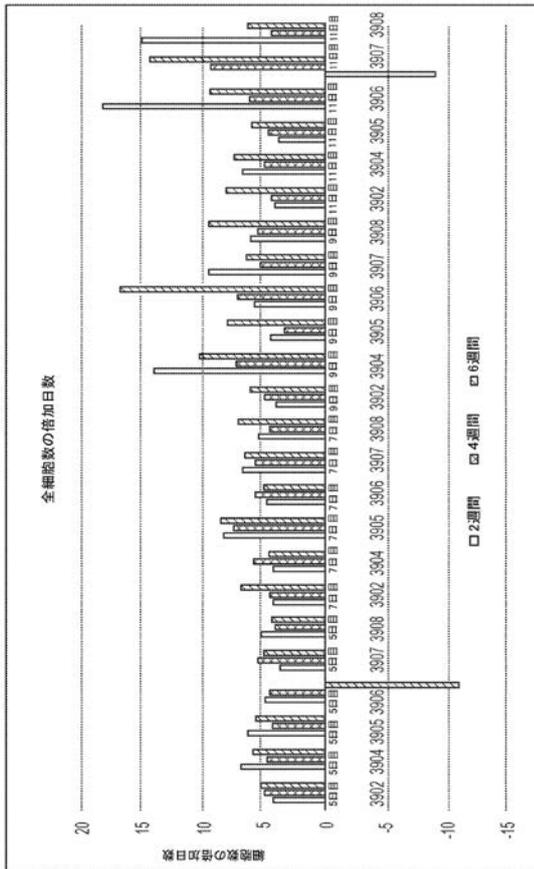


図 20

【 図 21 】

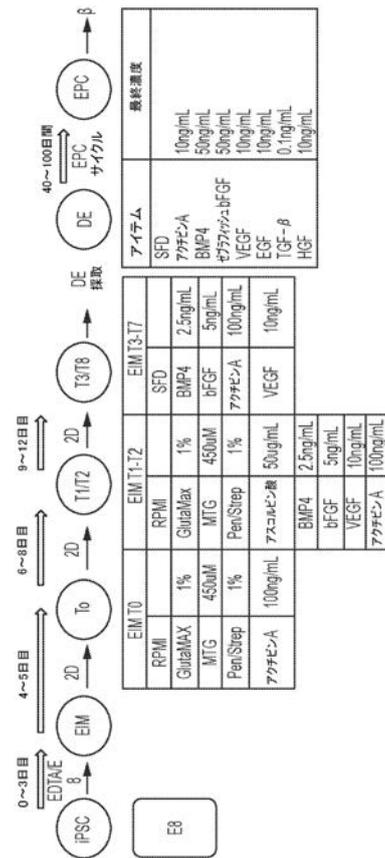


図 21

【 図 2 2 A - 2 2 B 】

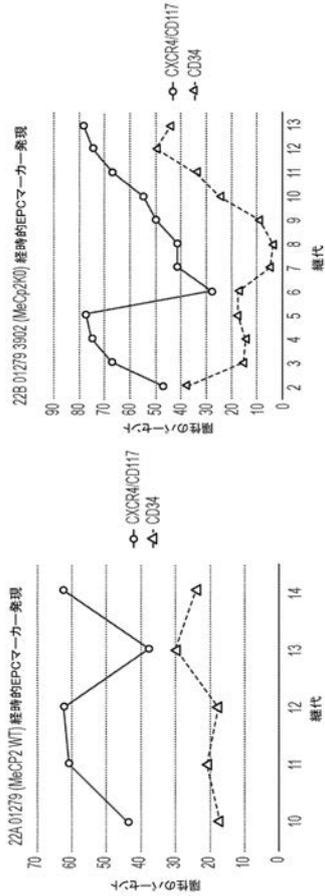


図22A-22B

【 図 2 3 A - 2 3 C 】

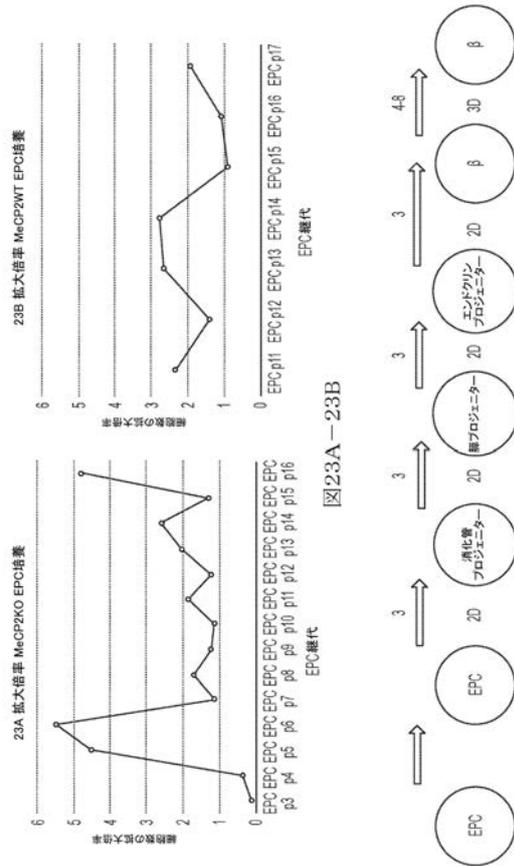


図23C

【 図 2 4 A - 2 4 C 】

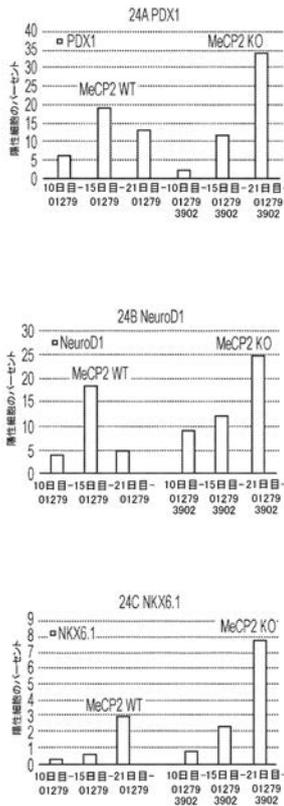


図24A-24C

【 図 2 5 A - 2 5 B 】

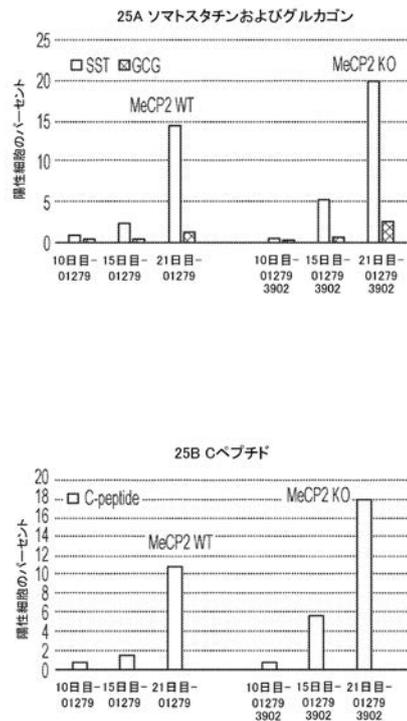


図25A-25B

【 図 2 6 】

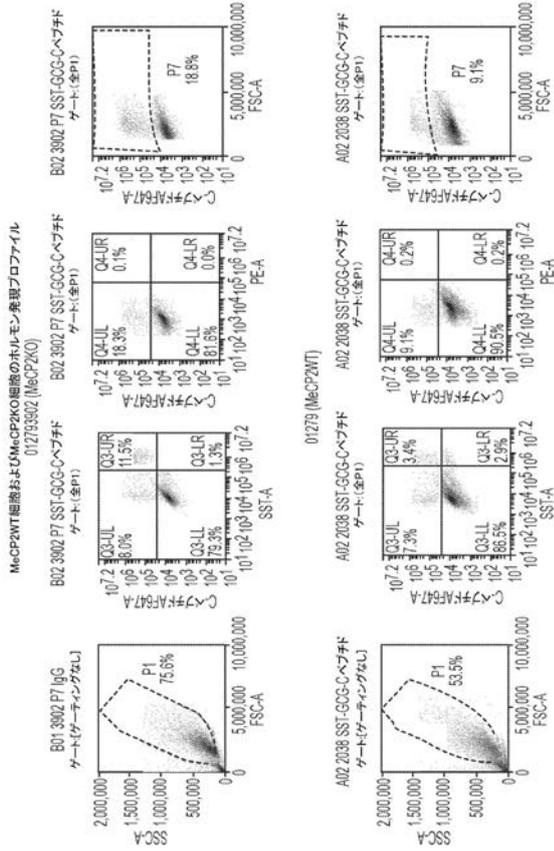


図26

【 図 2 7 】

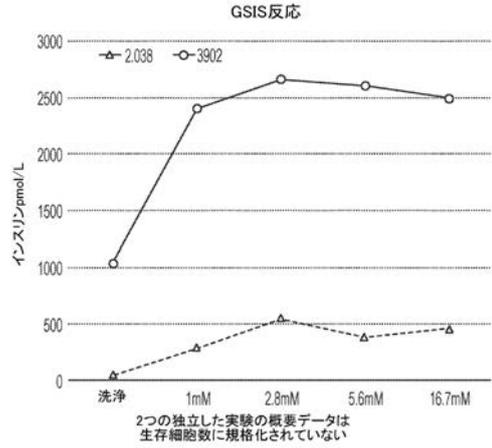


図27

【 図 2 8 】

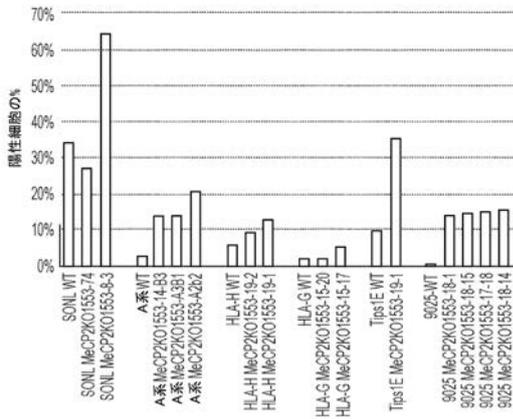


図28

【 図 2 9 】

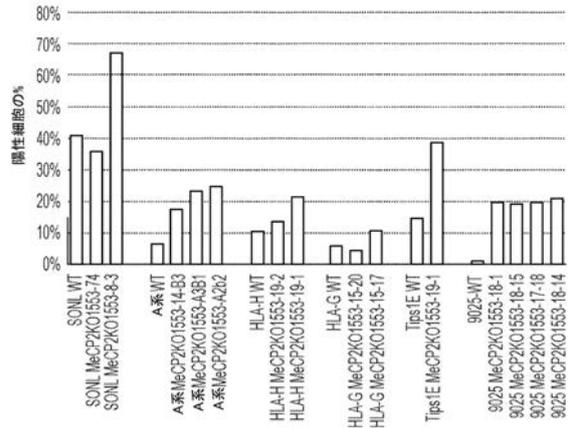


図29

【 図 3 0 】

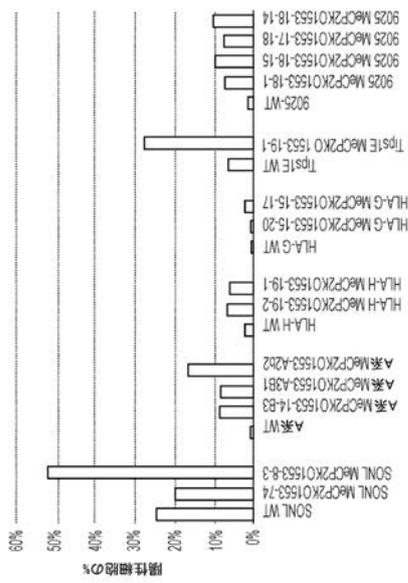


図30

【 図 3 1 】

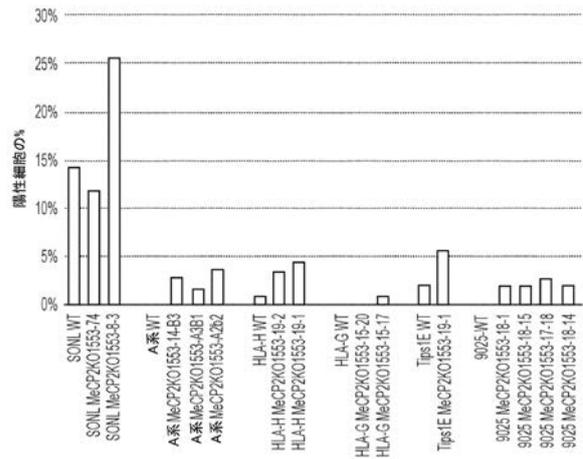


図31

【 図 3 2 A 】

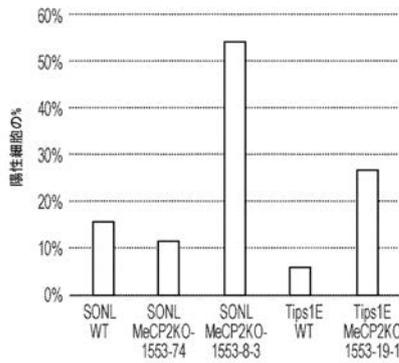


図32A

【 図 3 2 B 】

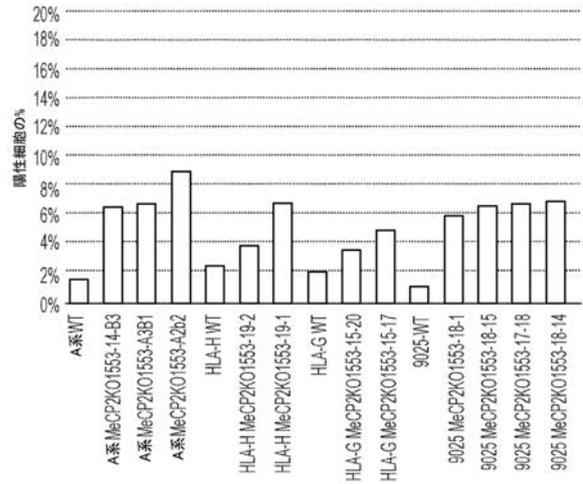


図32B

【 図 3 3 】

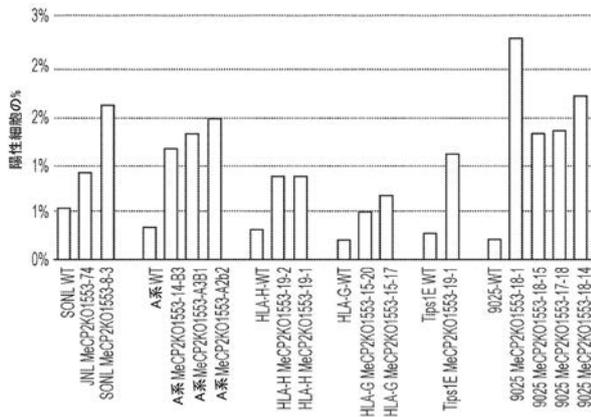


図33

【 図 3 4 】

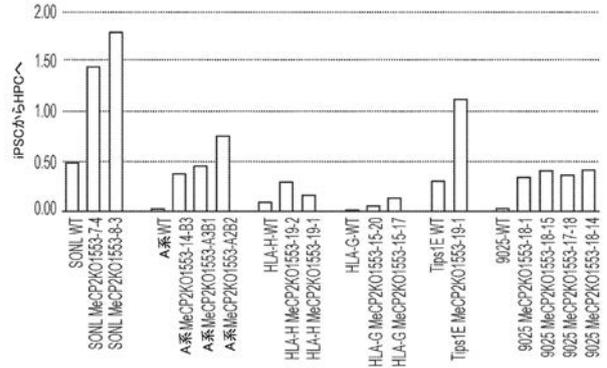


図34

【 図 3 5 】

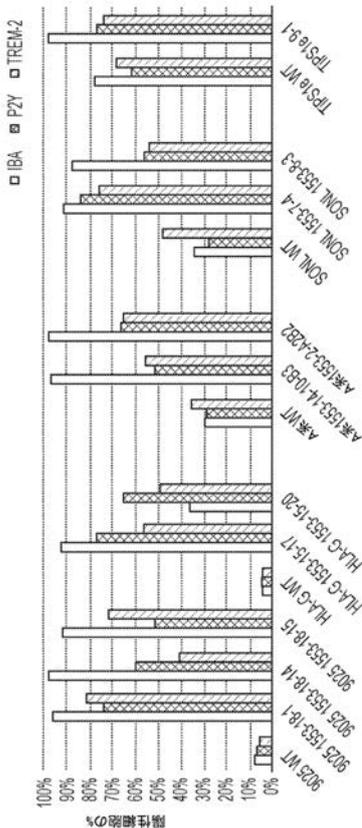


図35

【 図 3 6 】

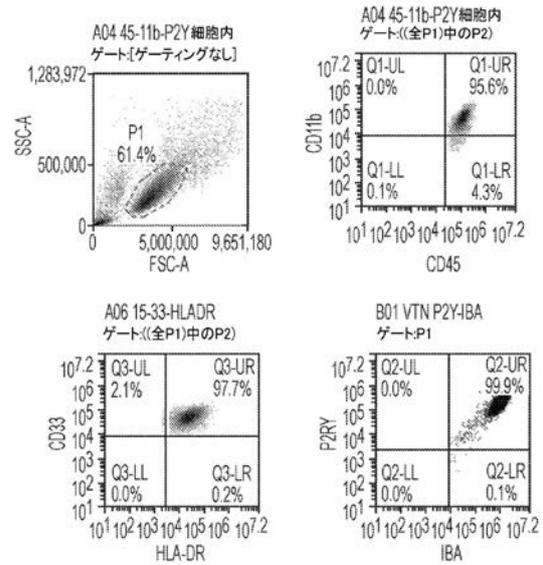


図36

【 図 3 7 】

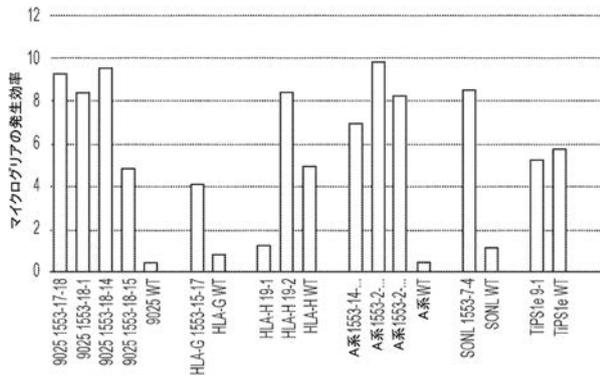


図37

【 図 3 8 A 】

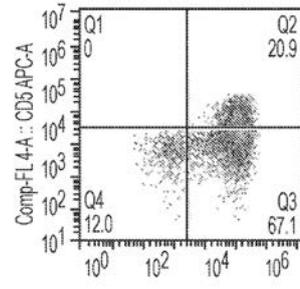


図38A

【 図 3 8 B 】

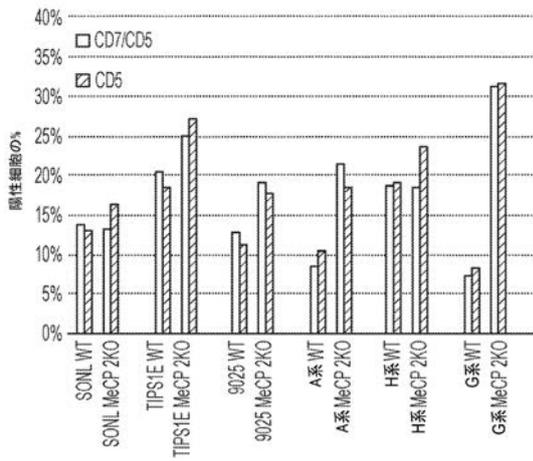


図38B

【 図 3 8 C 】

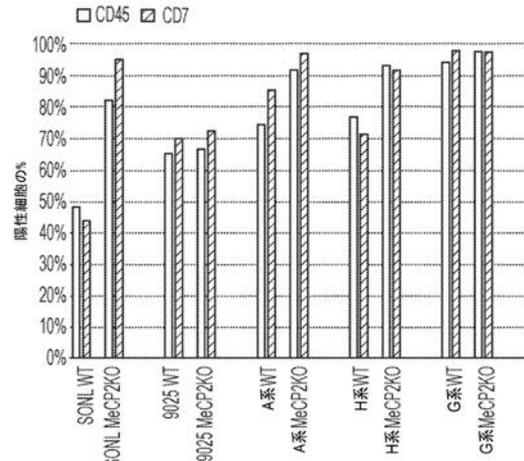


図38C

【 図 3 9 A 】

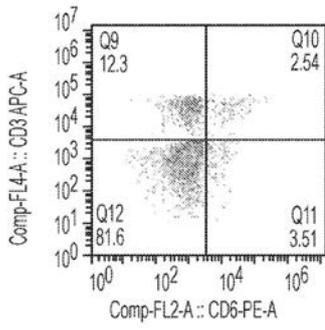


図39A

【 図 3 9 B 】

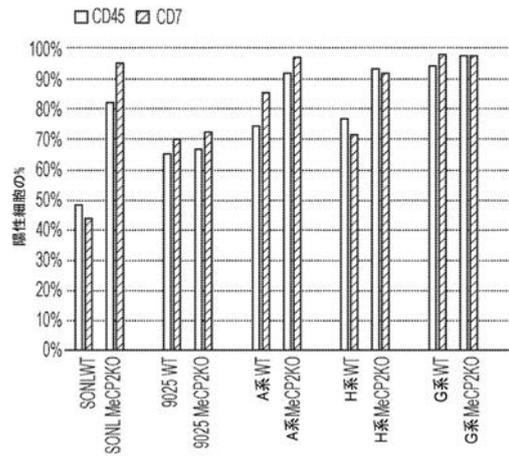


図39B

【 図 3 9 C 】

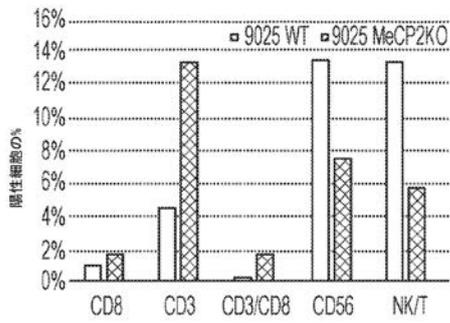


図39C

【 図 3 9 D 】

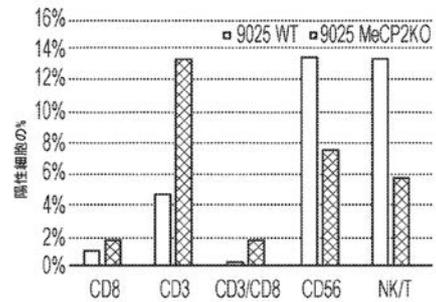


図39D

【 図 3 9 E 】

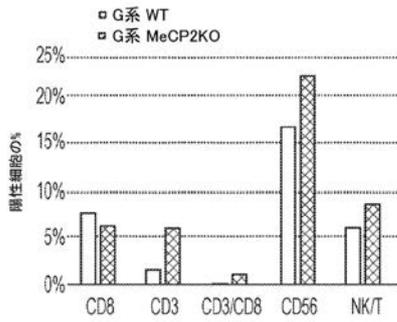


図39E

【 図 3 9 F 】

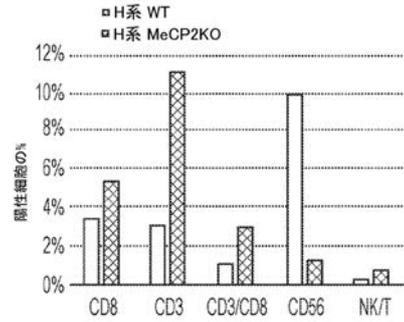


図39F

【 図 4 0 】

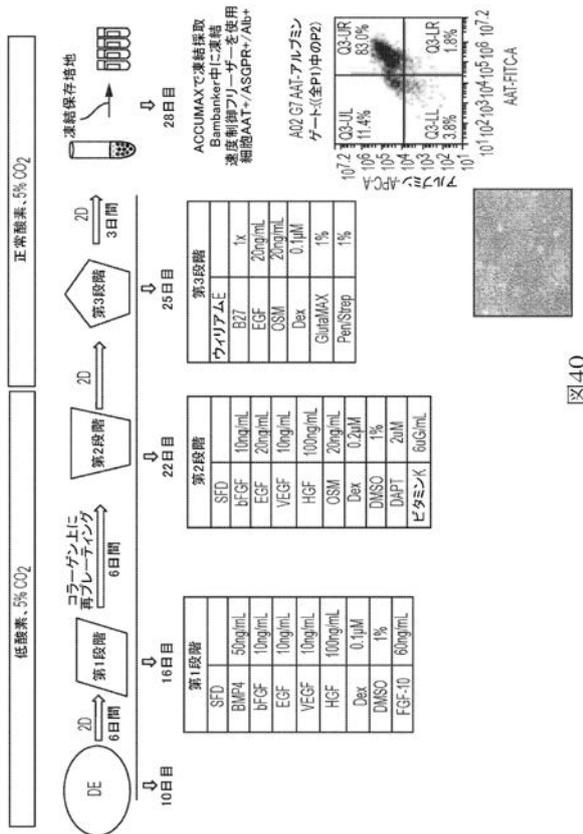


図40

【 図 4 1 】

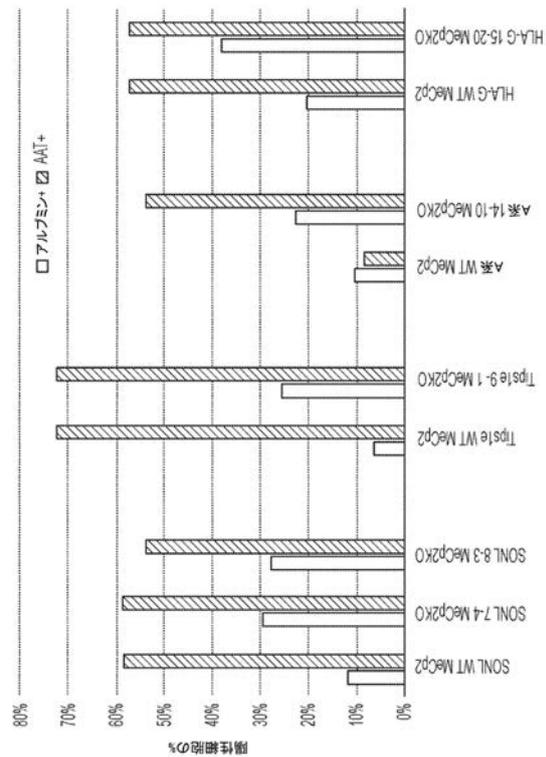


図41

【 図 4 2 】

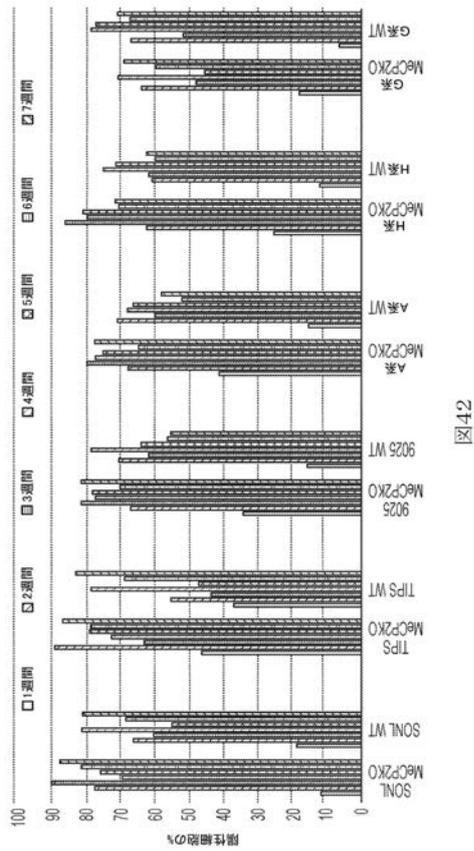


図42

【 図 4 3 A 】

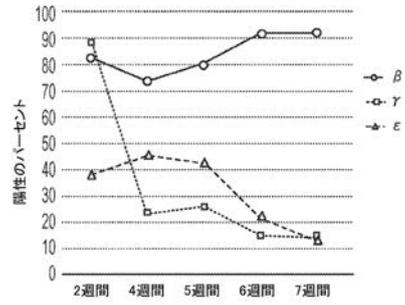


図43A

【 図 4 3 B 】

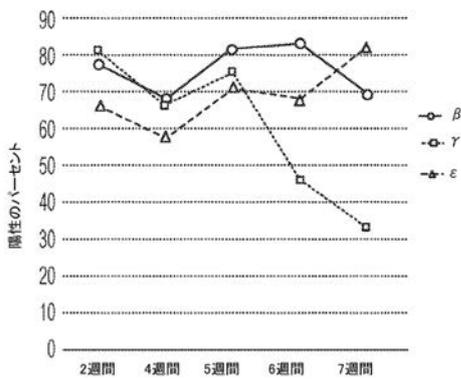


図43B

【 図 4 4 A 】

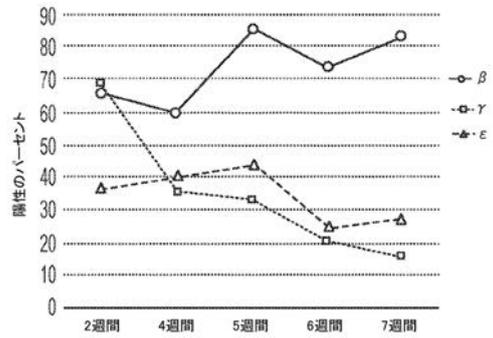


図44A

【 図 4 4 B 】

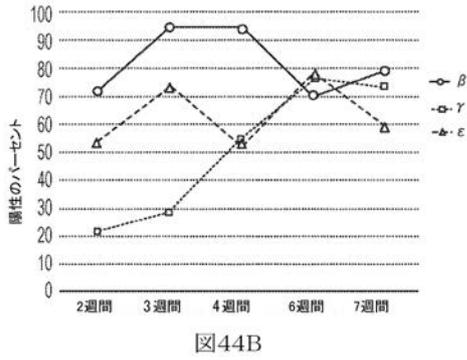


図44B

【 図 4 5 A 】

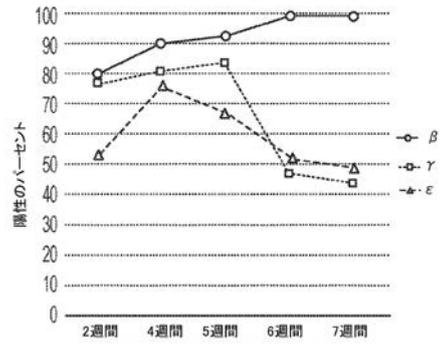


図45A

【 図 4 5 B 】

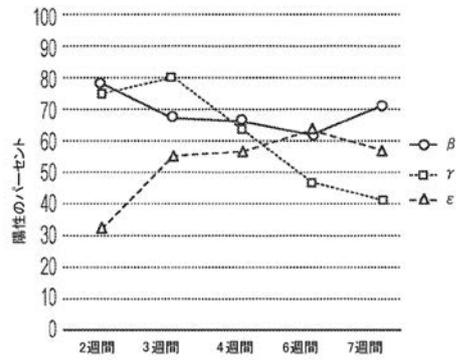


図45B

【 図 4 6 A 】

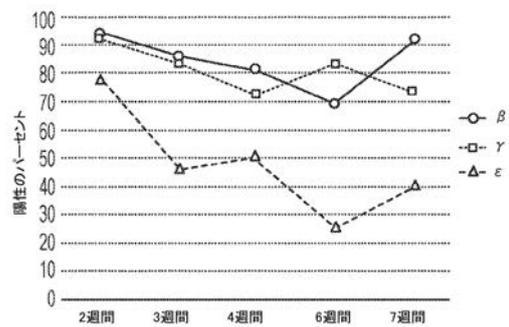


図46A

【 図 4 6 B 】

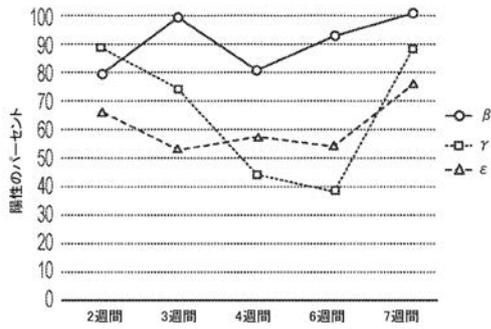


図46B

【 図 4 7 A 】

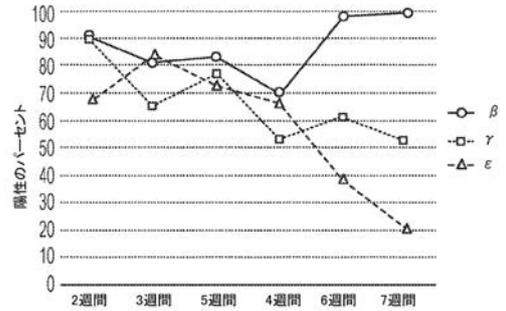


図47A

【 図 4 7 B 】

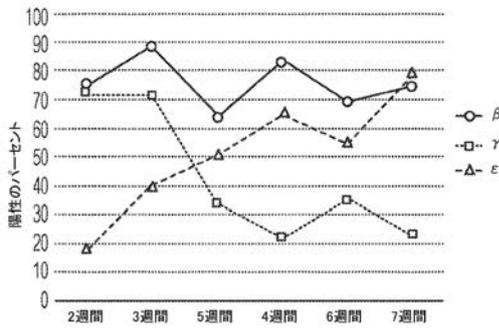


図47B

【 図 4 8 A 】

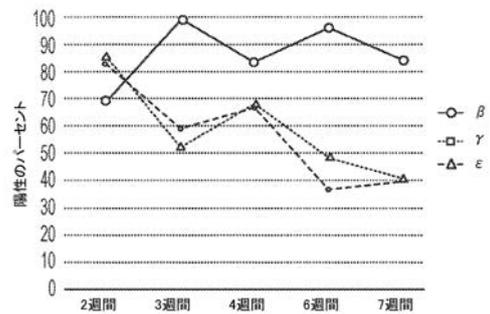


図48A

【 図 4 8 B 】

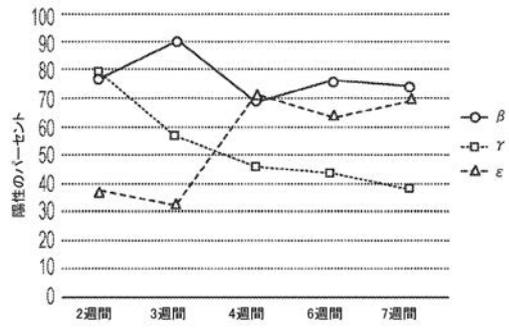


図48B

【 配 列 表 】

2019528773000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2017/055353 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0783 C12N5/0784 C12N5/0789 C12N15/85 ADD. | | |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2016/115407 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]) 21 July 2016 (2016-07-21) claims 5-11 page 45 - page 46 page 7 | 1-79 |
| Y | ----- YOSHIAKI TANAKA ET AL: "Transcriptional regulation in pluripotent stem cells by methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2)", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 23, no. 4, 15 October 2013 (2013-10-15), pages 1045-1055, XP055436641, gb ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddt500 the whole document ----- -/-- | 1-79 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 8 January 2018 | | 22/01/2018 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Bayer, Martin |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/055353

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2010/099539 A1 (CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL [US]; RAJESH DEEPIKA [US]; LEWIS RACHEL) 2 September 2010 (2010-09-02) claims 1-66 examples 1-7 ----- | 1-79 |
| Y | GIORGIA SALVAGIOTTO ET AL: "A Defined, Feeder-Free, Serum-Free System to Generate In Vitro Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Cells from hESCs and hiPSCs", PLOS ONE, vol. 6, no. 3, 1 January 2011 (2011-01-01) , page e17829, XP055040237, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0017829 the whole document ----- | 1-79 |
| X,P | WO 2017/070337 A1 (CELLULAR DYNAMICS INT INC [US]) 27 April 2017 (2017-04-27) paragraph [0147] figures 17-21 examples 7-8 ----- | 1-79 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/055353

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2016115407 A1 | 21-07-2016 | AU 2016206649 A1 | 03-08-2017 |
| | | CA 2973723 A1 | 21-07-2016 |
| | | EP 3245303 A1 | 22-11-2017 |
| | | US 2017363618 A1 | 21-12-2017 |
| | | WO 2016115407 A1 | 21-07-2016 |
| ----- | | | |
| WO 2010099539 A1 | 02-09-2010 | AU 2010217739 A1 | 08-09-2011 |
| | | CA 2753679 A1 | 02-09-2010 |
| | | CN 102388130 A | 21-03-2012 |
| | | EP 2401364 A1 | 04-01-2012 |
| | | IL 214818 A | 31-07-2014 |
| | | JP 5816100 B2 | 18-11-2015 |
| | | JP 2012519005 A | 23-08-2012 |
| | | JP 2015192681 A | 05-11-2015 |
| | | KR 20110122858 A | 11-11-2011 |
| | | US 2010279403 A1 | 04-11-2010 |
| | | US 2013210141 A1 | 15-08-2013 |
| | | WO 2010099539 A1 | 02-09-2010 |
| | | ----- | |
| WO 2017070337 A1 | 27-04-2017 | US 2017107492 A1 | 20-04-2017 |
| | | WO 2017070333 A1 | 27-04-2017 |
| | | WO 2017070337 A1 | 27-04-2017 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 ストラウス アン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 ス
イート 2 0 0 セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内

(72) 発明者 バートン サラ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 ス
イート 2 0 0 セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内

(72) 発明者 マン クリスティー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 ス
イート 2 0 0 セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内

(72) 発明者 スワンソン ブラッドリー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 ス
イート 2 0 0 セルラー ダイナミクス インターナショナル インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 4B065 BB08 BB13 BB19