

(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2012-519005

(P2012-519005A)

(43) 公表日 平成24年8月23日(2012.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 C	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-552223 (P2011-552223)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月1日 (2010.3.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年10月12日 (2011.10.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/025776
 (87) 国際公開番号 W02010/099539
 (87) 国際公開日 平成22年9月2日 (2010.9.2)
 (31) 優先権主張番号 61/156,304
 (32) 優先日 平成21年2月27日 (2009.2.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510003830
 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
 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, ユニバーシティー リサーチ パーク
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性細胞の分化

(57) 【要約】

多能性細胞 (ヒト胚性幹細胞 (hESC) または誘導多能性細胞 (iPSC) など) の *in vitro* での維持、増殖、培養、および/または造血前駆細胞もしくは内皮細胞への分化のための方法を本明細書中に提供する。多能性細胞を、特定の条件下で維持および分化することができる。したがって、多能性細胞の造血前駆細胞または内皮細胞への分化のための一定の実施形態においてマウスフィーダー細胞や血清を使用する必要がない。得られた造血前駆細胞を、種々の骨髄細胞系列またはリンパ系細胞系列にさらに分化することができる。

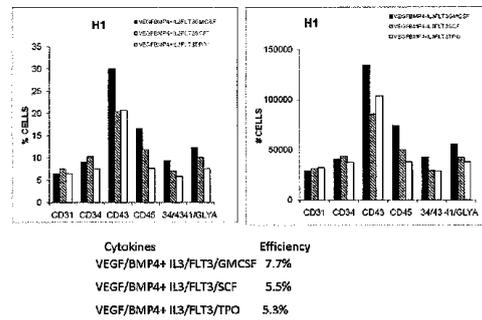


FIG. 5

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性細胞を造血前駆細胞または内皮細胞に分化させる方法であって、以下の連続工程：

a) 少なくとも 1 つの成長因子を含む第 1 の特定培地中で複数の実質的に未分化の多能性細胞を培養または維持する工程；

b) BMP 4、VEGF、IL - 3、Flt 3 リガンド、および GM-CSF を含まないか本質的に含まない第 2 の特定培地中で該細胞をインキュベートする工程、

c) 複数の該細胞を増殖するか分化を促進するのに十分な量の BMP 4 および VEGF を含む第 3 の特定培地中で該細胞を培養する工程、ならびに

d) 複数の該細胞を増殖するか分化を促進するのに十分な量の (1) IL - 3 および Flt 3 リガンド、または (2) VEGF、FGF - 2 または FGF - 2 模倣物、および IGF のいずれかを含む第 4 の特定培地中で該細胞を培養する工程

を含み、

複数の該多能性細胞が造血前駆細胞または内皮細胞に分化する、方法。

【請求項 2】

前記第 3 の特定培地が FGF - 2 または FGF - 2 模倣物をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 4 の特定培地が IL - 3、Flt 3 リガンド、および GM-CSF を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 4 の特定培地が、IL - 3、Flt 3 リガンド、および IL - 6、SCF、または TPO の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 4 の特定培地が IL - 6、SCF、および TPO をさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 4 の特定培地が血清代替物 3 をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記多能性細胞が iPSC である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (b) の前に前記細胞の少なくとも一部を少なくとも部分的に分離するか、実質的に個別化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞を、酵素を使用して実質的に個別化する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記酵素がトリプシンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記個別化後に前記細胞を ROCK インヒビターおよびトリプシンインヒビターに接触させる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 ROCK インヒビターが、HA - 100、H - 1152、および Y - 27632 からなるリストより選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記トリプシンインヒビターがダイズトリプシンインヒビターである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

複数の前記多能性細胞が胚様体 (EB) を形成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

約 200 ~ 約 1000 細胞 / 凝集体を使用して少なくとも 1 つの前記 EB を生成する、請

10

20

30

40

50

求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記方法が、20%酸素未満の気圧で前記細胞を培養する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法が、約 5%酸素の気圧で前記細胞を培養する工程を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞が、少なくとも 1 回部分的または実質的に再凝集する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞が、前記第 3 の特定培地中での培養後および前記第 4 の特定培地中での培養前または培養中に再凝集する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記再凝集が、トリプシンまたは TRYPLE への前記細胞の曝露を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記再凝集後に前記細胞を ROCK インヒビターに曝露する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞を、前記再凝集後に ROCK インヒビターを本質的に含まない培地中で培養する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記方法が、約 20%酸素未満の気圧で前記細胞を培養する工程をさらに含み、約 200 ~ 約 1000 細胞 / 凝集体を使用して複数の胚様体 (EB) を生成する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記第 3 の特定培地または前記第 4 の特定培地が血清代替物 3 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 1 の特定培地が、TeSR、mTeSR、または mTeSR 1 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

工程 (a) が、マトリックスでコーティングされた表面上で前記細胞を培養する工程を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記マトリックスが、ラミニン、ピトロネクチン、ゼラチン、ポリリジン、トロンボスポンジン、またはマトリゲル (商標) を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第 2 の特定培地が TeSR - GF または X - v i v o 1 5 培地を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第 2 の特定培地が、約 0.1 ng / ml TGF - および約 20 ng / ml FGF - 2 をさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

工程 (b) が、約 12 時間 ~ 約 3 日間、前記細胞をインキュベートする工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

工程 (c) が、約 4 ~ 約 8 日間、前記細胞を培養または分化させる工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

工程 (d) が、少なくとも 4 日間、前記細胞を培養する工程を含む、請求項 1 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 33】

複数の前記多能性細胞が骨髄性前駆細胞に分化する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記骨髄性前駆細胞が CD31、CD43、および CD45 を同時発現する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 3 の特定培地が約 10 ~ 50 ng/ml BMP4 および約 10 ~ 50 ng/ml VEGF を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 3 の特定培地が約 10 ~ 50 ng/ml FGF-2 をさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 37】

前記第 4 の特定培地が約 5 ~ 25 ng/ml IL-3 および約 10 ~ 50 ng/ml Flt3 リガンドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 4 の培地が約 5 ~ 25 ng/ml GM-CSF をさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 4 の培地が約 10 ~ 100 ng/ml TPO、10 ~ 100 ng/ml SCF、約 5 ~ 25 ng/ml IL-6、および約 5 ~ 25 ng/ml IL-3 をさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

20

【請求項 40】

複数の前記造血前駆細胞が、CD43、CD34、CD31、および CD45 を含むリストより選択される少なくとも 2 つのマーカーを発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 41】

複数の前記造血前駆細胞が CD34、CD43、CD45、および CD31 を発現する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

1 つまたは複数の前記造血前駆細胞が、赤血球系細胞、骨髄性細胞、またはリンパ球系細胞に分化する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 43】

1 つまたは複数の前記造血前駆細胞が骨髄性細胞に分化し、該骨髄性細胞が、マクロファージ、肥満細胞、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞、および多形核顆粒球からなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

1 つまたは複数の該造血前駆細胞が、好酸球、好塩基球、好中球、単球、およびマクロファージからなるリストより選択される顆粒球に分化する、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

方法が、複数の前記細胞を、複数の該細胞の赤芽球への分化を促進するのに十分な量の IL-3、IL-6、SCF、EPO、および TPO からなるリストより選択される 1 つまたは複数の成長因子を含む第 5 の特定培地中で培養する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 46】

前記方法が、第 5 の特定培地中で複数の前記細胞を培養する工程を含み、該第 5 の特定培地が、該細胞の増殖またはさらなる分化を促進するのに十分な量の SCF、IL-6、G-CSF、EPO、TPO、FGF2、IL-7、IL-11、IL-9、IL-13、IL-2、または M-CSF からなるリストより選択される 1 つまたは複数の成長因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 47】

50

複数の前記細胞を、該細胞のNK細胞への分化を促進するのに十分な量のIL-7、SCF、およびIL-2からなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項48】

前記方法が、前記細胞のT細胞への分化を促進するのに十分な量のFcキメラNotchDLL-1リガンドならびにIL-7、SCF、およびIL-2からなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で複数の該細胞を培養する工程をさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項49】

前記多能性細胞が哺乳動物多能性細胞である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項50】

前記哺乳動物多能性細胞がヒト多能性細胞である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記ヒト多能性細胞がヒト胚性幹細胞(hESC)である、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記hESCが、H1、H9、hES2、hES3、hES4、hES5、hES6、BG01、BG02、BG03、HSF1、HSF6、H1、H7、H9、H13B、およびH14からなるリストより選択される細胞を含む、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記ヒト多能性細胞が誘導多能性細胞(iPSC)である、請求項50に記載の方法。

20

【請求項54】

前記iPSCが、iPS6.1、iPS6.6、iPS、iPS5.6、iPSiPS5.12、iPS5.2.15、iPSiPS5.2.24、iPS5.2.20、iPS6.2.1、iPS-B1-SOONL、iPS-B1-SOCK、iPS-TiPS1EE、iPS-TiPSIB、iPS-KiPS-5、およびiPS5/3-4.3からなるリストより選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

請求項1に記載の方法にしたがって分化したか、請求項1に記載の方法にしたがって分化した個別の造血前駆細胞由来の造血前駆細胞。

【請求項56】

前記造血前駆細胞がCD34、CD43、CD45、およびCD31を含むリストより選択される少なくとも2つのマーカーを発現する、請求項55に記載の造血前駆細胞。

30

【請求項57】

前記造血前駆細胞がCD34、CD43、CD45、およびCD31を発現する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

請求項1に記載の方法にしたがって分化した造血前駆細胞由来の細胞であって、該細胞が骨髄性細胞または一般的な骨髄性前駆体である、細胞。

【請求項59】

前記細胞が、単球、マクロファージ、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球、血小板、および樹状細胞からなるリストより選択される、請求項58に記載の細胞。

40

【請求項60】

前記細胞が赤血球である、請求項59に記載の細胞。

【請求項61】

前記骨髄性細胞が薬学的調製物中に含まれる、請求項58に記載の細胞。

【請求項62】

請求項1に記載の方法にしたがって分化した造血前駆細胞由来のリンパ球系細胞。

【請求項63】

前記リンパ球系細胞がT細胞、B細胞、またはナチュラルキラー細胞である、請求項62

50

に記載のリンパ球系細胞。

【請求項 6 4】

前記リンパ球系細胞が薬学的調製物中に含まれる、請求項 6 2 に記載のリンパ球系細胞。

【請求項 6 5】

請求項 1 に記載の方法にしたがって分化した内皮細胞。

【請求項 6 6】

前記内皮細胞が、リンパ内皮細胞、血管内皮細胞、動脈内皮細胞 (vascular arterial endothelial cell)、静脈内皮細胞 (vascular venous endothelial cell)、または器官特異的内皮細胞である、請求項 6 5 に記載の内皮細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2009年2月27日に提出された米国出願第61/156,304号(この全体の開示は、放棄されることなく、その全体が、参考として具体的に本明細書に援用される)への優先権を主張する。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、一般に、分子生物学分野および医学分野に関する。より具体的には、本発明は、胚性幹細胞から造血前駆細胞を産生するための方法および組成物に関する。

20

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

造血幹細胞および造血前駆細胞の有意な医学的潜在能力により、多能性幹細胞から造血前駆細胞への分化方法を改良するための相当数の研究が行われている。ヒト成人では、主に骨髄中に存在する少数の造血幹細胞は、活発に分割する造血(CD34+)前駆細胞の不均一な集団を産生し、これらが血液系の全細胞に分化する。しかし、他の細胞型、特に内皮細胞(血管)もCD34を発現するので、CD34+マーカーは造血細胞の定義が不正確である。他のマーカー(CD43マーカーなど)を使用して、造血前駆細胞の同定に役立てることもできる(例えば、Kadaja-Saarepuuら、2007; 非特許文献1)。ヒト成人では、造血前駆体が増殖および分化して、数千億個の成熟血球を毎日生成する。造血前駆細胞はまた、臍帯血中に存在する。in vitroでは、ヒト胚性幹細胞は、培養において不定の増殖が可能であり、したがって、少なくとも原理的には、不全または欠損したヒト組織の代替りの細胞および組織を供給することができる。

30

【0004】

ヒト多能性細胞のフィーダー細胞株(マウス線維芽細胞など)との培養には、共培養中の種間曝露に事前に関連した予想外の形質転換のリスクがある。ヒト多能性幹細胞培養の目的の1つがヒトの身体に最終的に移植することができる組織を作製することであるので、幹細胞が別の種の細胞や別の種の培養細胞を培養するために使用した培養液に曝露されないことが非常に望ましい。したがって、いかなる種類の共培養工程も使用しないでヒト多能性幹細胞を造血系列に分化することが可能な培養条件の定義は、ヒト多能性幹細胞からのヒト造血前駆細胞の産生技術の持続的進展において非常に興味深い。

40

【0005】

分化培地中での血清の使用には、一定の欠点および制限もあり得る。例えば、非特許文献2に示すように、血清は、異なるバッチ間の血清の組成に関する(例えば、成長因子の存在および/または濃度などのばらつきに関する)不確定要素が存在する動物生成物である。これらの不確定要素はまた、実験間で生じる造血細胞産生のばらつきの増加に寄与し得る。さらに、血清の使用によって臨床開発中に実質的な規制問題が生じ、さらに、商品化が複雑になり得る。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Vodyanikら、Blood(2006)108(6):2095-105

【非特許文献2】Chadwickら、Blood(2003)102(3):906-915

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

別の動物種由来の物質に細胞が曝露されることなく多能性幹細胞を造血前駆細胞に分化させる方法は、現在必要とされていることが明確である。多能性細胞の維持および分化に関連する複雑さのために、マウスフィーダー細胞上での維持と比較して、どのようにして種々の多能性細胞が種々の特定培地(defined media)中での維持後の成長因子への曝露に応答することができるのかについて、現在のところ明らかにされていない。明らかに、多能性細胞の造血前駆細胞への改良された分化方法が必要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の要旨

特定の条件下で増殖(expand)および/または維持した多能性細胞の造血前駆細胞または内皮細胞へのin vitro分化方法を本明細書中に提供する。これらの方法は、特定の条件下で行うことができる過程の提供によって先行技術における制限を克服する。したがって、これらの方法を、有利に使用して、例えば、造血前駆細胞(HPC)またはさらに分化した骨髄細胞系列またはリンパ系細胞系列を産生することができる。これらは、マウス線維芽細胞および/または血清などの動物生成物に曝露した細胞の使用に関連するであろう臨床的懸念を軽減しながら被験体(例えば、ヒト患者)に投与することができる。

20

【0009】

本発明の1つの態様は、多能性細胞を造血前駆細胞または内皮細胞に分化させる方法であって、以下の連続工程:(a)少なくとも1つの成長因子を含む第1の特定培地中で複数の実質的に未分化の多能性細胞を培養または維持する工程、(b)BMP4、VEGF、IL-3、Flt3リガンド、およびGM-CSFを本質的に含まない第2の特定培地中で細胞をインキュベートする工程、(c)複数の細胞を増殖するか分化を促進するのに十分な量のBMP4およびVEGFを含む第3の特定培地中で細胞を培養する工程、および(d)複数の細胞を増殖するか分化を促進するのに十分な量の(1)IL-3およびFlt3リガンド、または(2)VEGF、FGF-2またはFGF-2模倣物、およびIGFのいずれかを含む第4の特定培地中で細胞を培養する工程を含み、複数の多能性細胞が造血前駆細胞または内皮細胞に分化する、方法に関する。一定の実施形態では、上記の組み合わせ(1)を使用して、造血前駆細胞への分化を促進することができる。上記の組み合わせ(2)を使用して、内皮細胞または内皮前駆細胞への分化を促進することができる。第2の特定培地は、FGF-2、IL6、SCF、および/またはTPOを含まないか本質的に含まなくてよい。第3の特定培地は、FGF-2(例えば、約5~50ng/mlまたは約10~25ng/ml)またはFGF-2模倣物も含むことができる。以下の実施例に示すように、第3の培地中にFGF-2を含めることにより、多能性細胞の造血前駆細胞への分化の効率を増大させることができる。一定の実施形態では、第4の特定培地は、GM-CSF、またはIL-6、SCF、またはTPOのうちの少なくとも1つをさらに含む。一定の実施形態では、第4の特定培地は、一定量の以下のいずれかを含む:細胞分化の促進に十分な(1)IL-3、Flt3リガンド、およびGM-CSF、または(2)IL-3、Flt3リガンド、SCF、IL-6、およびTPO。第3の特定培地および/または第4の特定培地は、BIT9500または血清代替物(serum replacement)3をさらに含むことができる。本方法は、BIT9500または血清

30

40

50

代替物 3 を含む特定培地中で細胞を培養する工程を含むことができる。少なくともいくつかの細胞を、工程 (b) の前に少なくとも部分的に分離することができるか、実質的に個別化する。酵素 (トリプシンなど) を使用して、細胞を実質的に個別化することができる。細胞を、個別化後に R O C K インヒビターおよびトリプシンインヒビター (例えば、ダイズトリプシンインヒビター) に接触させることができる。R O C K インヒビターを、H A - 1 0 0、H - 1 1 5 2、および Y - 2 7 6 3 2 からなるリストより選択することができる。複数の多能性細胞は、胚様体 (E B) を形成することができる。約 2 0 0 ~ 約 1 0 0 0 細胞 / 凝集体を使用して、少なくとも 1 つの E B を生成することができる。本方法は、2 0 % 酸素未満の気圧または約 5 % 酸素の気圧で細胞を培養する工程を含むことができる。以下の実施例に示すように、低酸素圧条件下 (約 5 % O₂ 雰囲気下など) での細胞の分化により、細胞の、例えば、造血前駆細胞および / または内皮前駆細胞への分化を増加させることができる。

10

【 0 0 1 0 】

一定の実施形態では、細胞を、少なくとも 1 回部分的または実質的に再凝集することができる。細胞を、第 3 の特定培地中での培養後および第 4 の特定培地中での培養前または培養中に再凝集することができる。再凝集は、細胞をトリプシンまたは T R Y P L E に曝露することを含むことができる。細胞を再凝集後に R O C K インヒビターに曝露することができるか、細胞を再凝集後に R O C K インヒビターを本質的に含まない培地中で培養することができる。本方法は、約 2 0 % 酸素未満の気圧で細胞を培養する工程をさらに含むことができ、約 2 0 0 ~ 約 1 0 0 0 細胞 / 凝集体を使用して複数の胚様体 (E B) を生成する。第 1 の特定培地は、T e S R、m T e S R、または m T e S R 1 を含むことができる。工程 (a) は、マトリックスでコーティングされた表面上での細胞培養を含むことができる。マトリックスは、ラミニン、ピトロネクチン、ゼラチン、ポリリジン、トロンボスポンジン、またはマトリゲル (商標) を含むことができる。第 2 の特定培地は、T e S R - G F または X - v i v o 1 5 培地を含むことができる。第 2 の特定培地は、約 0 . 1 n g / m l T G F - および約 2 0 n g / m l F G F - 2 をさらに含むことができる。工程 (b) は、約 1 2 時間 ~ 約 3 日間細胞をインキュベートすることを含むことができる。工程 (c) は、約 4 ~ 約 8 日間細胞を培養または分化することを含むことができる。工程 (d) は、少なくとも約 4 日間または約 4 ~ 約 8 日間細胞を培養することを含むことができる。複数の多能性細胞を、多分化能の造血前駆細胞または骨髄性前駆細胞に分化することができる。一定の実施形態では、骨髄性前駆細胞は、C D 3 1、C D 4 3、および C D 4 5 を同時発現する。骨髄性前駆細胞は、一般的な骨髄性前駆体であり得る。第 3 の特定培地は、約 1 0 ~ 5 0 n g / m l B M P 4 および約 1 0 ~ 5 0 n g / m l V E G F を含む。一定の実施形態では、第 3 の特定培地は、1 0 ~ 5 0 n g / m l F G F - 2 をさらに含む。第 3 の特定培地は、約 2 5 n g / m l B M P 4 および約 2 5 n g / m l V E G F を含む。第 4 の特定培地は、約 5 ~ 2 5 n g / m l I L - 3 および約 1 0 ~ 5 0 n g / m l F l t 3 リガンドを含むことができる。第 4 の特定培地は、約 5 ~ 2 5 n g / m l G M C S F または約 1 0 ~ 1 0 0 n g / m l もしくは約 1 0 ~ 5 0 n g / m l T P O、約 1 0 ~ 1 0 0 n g / m l S C F、約 5 ~ 2 5 n g / m l I L - 6、および約 5 ~ 2 5 n g / m l I L - 3 をさらに含むことができる。第 4 の特定培地は、約 1 0 n g / m l I L - 3、約 2 5 n g / m l F l t 3 リガンド、および約 1 0 n g / m l G M C S F を含むことができる。複数の造血前駆細胞は、C D 4 3、C D 3 4、C D 3 1、および C D 4 5 を含むリストより選択される少なくとも 2 つの細胞マーカーを発現することができる。複数の造血前駆細胞は、C D 3 4、C D 4 3、C D 4 5、および C D 3 1 を発現することができる。一定の実施形態では、造血前駆細胞は、C D 3 4、C D 4 3、C D 4 5、および C D 3 1 を同時発現する多分化能造血前駆細胞である。

20

30

40

【 0 0 1 1 】

1 つまたは複数の造血前駆細胞を、骨髄性細胞またはリンパ球系細胞に分化することができる。骨髄性細胞は、マクロファージ、肥満細胞、赤血球、巨核球 / 血小板、樹状細胞、または多形核顆粒球 (例えば、好酸球、好塩基球、好中球、単球、またはマクロファ-

50

ジ)であり得る。

【0012】

一定の実施形態では、第5の特定培地を使用して、細胞の特定の細胞型への分化をさらに促進することができる。例えば、種々の培養液を使用して、造血前駆細胞のさらに分化した細胞型(例えば、赤芽球、NK細胞、またはT細胞など)への分化を促進することができる。本方法は、複数の細胞の赤芽球への分化の促進に十分な量のIL-3、IL-6、SCF、EPO、およびTPOからなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で複数の細胞を培養する工程をさらに含むことができる。複数の細胞を、細胞のNK細胞への分化の促進に十分な量のIL-7、SCF、およびIL-2からなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で培養する。本方法は、細胞のT細胞への分化の促進に十分な量のNotchリガンドならびにIL-7、SCF、およびIL-2からなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で複数の細胞を培養する工程をさらに含むことができる。Notchリガンドは、FcキメラNotch DLL-1リガンドまたはNotchリガンドを過剰発現する間質細胞株によって産生されるNotchリガンドであり得る。一定の実施形態では、胸腺ペプチド(サイモシン、チモペンチン(thymopenin))、またはサイモシンB4など)を使用して、細胞のT細胞への分化をさらに促進することができる(例えば、Pengら、2008に記載)。一定の実施形態では、複数の細胞は造血前駆細胞を含む。第3の特定培地は、細胞の増殖またはさらなる分化の促進に十分な量のSCF、IL-6、G-CSF、EPO、TPO、FGF2、IL-7、IL-11、IL-9、IL-13、IL-2、またはM-CSFからなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含むことができる。第4の特定培地は、細胞の増殖またはさらなる分化の促進に十分な量のSCF、IL-6、G-CSF、EPO、TPO、FGF2、BMP4、VEGF、IL-7、IL-11、IL-9、IL-13、IL-2、またはM-CSFからなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含むことができる。一定の実施形態では、本方法は、細胞の増殖またはさらなる分化の促進に十分な量のSCF、IL-6、G-CSF、EPO、TPO、FGF2、IL-7、IL-11、IL-9、IL-13、IL-2、またはM-CSFからなるリストより選択される1つまたは複数の成長因子を含む第5の特定培地中で細胞をインキュベートする工程を含むことができる。

10

20

30

【0013】

多能性細胞は、好ましくは、哺乳動物多能性細胞である。一定の実施形態では、多能性細胞は、ヒト多能性細胞(ヒト胚性幹細胞(hESC)または誘導多能性細胞(iPSC)など)である。hESCは、H1、H9、hES2、hES3、hES4、hES5、hES6、BG01、BG02、BG03、HSF1、HSF6、H1、H7、H9、H13B、およびH14からなるリストより選択され得る細胞を含む。iPSCを、iPS6.1、iPS6.6、iPS、iPS5.6、iPSiPS5.12、iPS5.2.15、iPSiPS5.2.24、iPS5.2.20、iPS6.2.1、iPS-B1-SOONL、iPS-B1-SOCK、iPS-TiPS1EE、iPS-TiPSIB、iPS-KiPS-5、およびiPS5/3-4.3からなるリストより選択することができる。

40

【0014】

本発明の別の態様は、本明細書中に記載の方法にしたがって分化したか、本明細書中に記載の方法にしたがって分化した個別の造血前駆細胞に由来する造血前駆細胞に関する。造血前駆細胞は、CD34、CD43、CD45、およびCD31のうち2つ、3つ、または全てを発現することができる。本発明の別の態様は、本明細書中に記載の方法にしたがって分化した造血前駆細胞に由来する骨髄性細胞、骨髄性前駆体、または一般的な骨髄性前駆体に関する。骨髄性細胞を、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、および樹状細胞からなるリストより選択することができる。一定の実施形態では、骨髄性細胞は赤血球である。骨髄性細胞、骨髄性前駆体、または一

50

般的な骨髓性前駆体を、薬学的調製物中に含めることができる。

【0015】

本発明の別の態様は、本明細書中に記載の方法にしたがって分化した造血前駆細胞由来のリンパ球系細胞に関する。リンパ球系細胞は、T細胞、B細胞、またはナチュラルキラー細胞であり得る。リンパ球系細胞を、薬学的調製物中に含めることができる。

【0016】

本発明のさらに別の態様は、本明細書中に記載の方法にしたがって分化した内皮細胞、内皮前駆細胞、または間葉細胞に関する。本明細書中に記載の方法によって種々の内皮細胞群を産生することができると予測される。内皮細胞は、特定の内皮細胞型（リンパまたは血管（例えば、LYVE1またはポドプラナムを発現する）、動脈（例えば、Notch1およびNotch、Jagged1およびJagged2を発現する）、静脈（例えば、EphB4、Lefty1、およびLefty2を発現する）、または器官特異的内皮細胞（例えば、心内膜細胞、腎臓細胞、肺または血液内の細胞、および血液脳関門細胞）など）に由来し得る。形態学的には、内皮細胞は、連続性、有窓性、または不連続性を示し得る。

10

【0017】

「個別化細胞」は、本明細書中で使用する場合、例えば、機械的分離またはタンパク質分解酵素（トリプシンまたはTrypLE（商標）など）への曝露の結果として、細胞がより小さな細胞群または個別の細胞に解離または分離することをいう。一定の実施形態では、個別化された培養物は、細胞の小クランプ（例えば、約2～10個の細胞を含む細胞のクランプ）を依然として含むことができる。

20

【0018】

培地が成長因子を欠いているか、培地中での細胞のいかなる実質的な増殖および/または分化の促進にも不十分な量で培地中に成長因子が存在するか、検出可能限度未満の濃度で存在する場合、培地は、成長因子を「本質的に含まない」という。成長因子を本質的に含まない培地がそれでもなお培地中に微量の成長因子を含み得ると認識されるであろう。

【0019】

用語「阻害」、「減少」、または「防止」、またはこれらの用語の任意のバリエーションには、特許請求の範囲および/または本明細書中で使用する場合、所望の結果を達成するための任意の測定可能に減少した阻害または完全な阻害が含まれる。

30

【0020】

用語「有効な」は、この用語を明細書中および/または特許請求の範囲で使用する場合、所望されるか、期待されるか、意図される結果を達成するのに適切であることを意味する。

【0021】

用語「a」または「an」の使用は、特許請求の範囲および/または明細書中で用語「含む」と併せて使用する場合、「1つ」を意味し得るが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つ以上」の意味とも一致する。

【0022】

本明細書中で考察した任意の実施形態を本発明の任意の方法または組成物に関して実施することができる（その逆も真なり）ことを意図する。さらに、本発明の組成物を使用して、本発明の方法を達成することができる。

40

【0023】

本出願を通して、用語「約」を使用して、値がデバイス（値を決定するために使用した方法）固有のエラーのばらつきまたは研究用被験体の間に存在するばらつきを含むことを示す。

【0024】

特許請求の範囲中の用語「または」は、開示が代替物のみおよび「および/または」をいう定義を支持するにもかかわらず、代替物のみをいうことを明確に示すか、代替物が互いに矛盾しない限り、「および/または」を意味するために使用する。

50

【0025】

明細書および特許請求の範囲で使用する場合、用語「含む (comprising)」(および含む (comprising) の任意の形態 (「含む (comprise)」および「含む (comprises)」など))、「有する (having)」(および有する (having) の任意の形態 (「有する (have)」および「有する (has)」など))、「含む (including)」(および含む (including) の任意の形態 (「含む (includes)」および「含む (include)」など))または「含む (containing)」(および含む (containing) の任意の形態 (「含む (contains)」および「含む (contain)」など))は、包括的または無制限であり、さらなる引用されていない要素または方法の工程を排除しない。

10

【0026】

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となるであろう。しかし、本発明の精神内および範囲内の種々の変更形態および修正形態がこの詳細な説明から当業者に明らかとなるであろうという理由で、詳細な説明および具体例が、本発明の特定の実施形態を示す一方で、例示のみを目的として示されると理解すべきである。

【0027】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の一定の態様をさらに証明するために含まれる。本発明を、本明細書中に示した特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて1つまたは複数のこれらの図面を参照することによってより深く理解することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】継代数50(A)および40(B)でのH1 hESCの造血分化(8、12、および16日目についてのn=3実験)。

【図2】前条件付け特定培地への曝露によって造血分化が改善する。特定条件で維持し、mTESRを使用したマトリゲルコーティングプレート上での無フィーダー細胞成長に適合させたhESCおよびiPSCを使用した。

【図3】胚様体(EB)サイズはCD43発現と相関する。

【図4】低酸素圧は造血分化を促進する。

【図5】多能性細胞の単一細胞懸濁液からの造血前駆細胞の生成効率。

30

【図6】EB分化の概観ならびにスピナーフラスコを使用したHPCおよび種々の系列特異的細胞型の生成。

【図7】96ウェル形式でのhESCのEB分化。

【図8】iPSC由来の内皮細胞の磁性選別前および後の代表的なフローサイトメトリー分析。

【図9】EB分化培地中のFGF-2補足により、hESC(H1)および種々のiPSC細胞株における造血前駆細胞(HPC)の生成が増加した。

【図10】(50ng/ml BMP4、50ng/ml VEGF、および25ng/mlのFGF-2)を含むEB分化培地の存在下での種々のiPSC細胞株の分化。

【図11】成長因子を補足したEB基本培地を使用したhESC(H1)およびiPSC(SONL)細胞株の造血前駆細胞(HPC)への分化を示す。IL-3およびFlt-3を含む培地にSCF、IL-6、およびTPOを補足した場合、分化の増加が認められた。

40

【図12】(H1)およびiPSC(SONL)細胞株において改変EB2組み合わせ(D)を使用して、多能性細胞のHPCへの分化効率の増加が認められた。培地中に補足した成長因子を示す。血清代替物3(Sigma-Aldrich)は、分化過程における血清代替物としてBIT-9500(Stem Cell Technologies)より優れていることが認められた。

【図13】酸素正常状態(「N」)および低酸素圧(「H」)条件下でのiPSC細胞からのHPCの生成。未分化細胞株を酸素正常状態条件下または低酸素圧条件下で維持し、酸

50

素正常状態条件下または低酸素圧条件下で分化させた。例えば、「H - N」は、細胞を低酸素圧条件下で維持し、酸素正常状態条件下で分化させたことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

例示的实施形態の説明

多能性細胞（ヒト胚性幹細胞（hESC）または誘導多能性細胞（iPSC）など）の造血前駆細胞および/または内皮細胞への *in vitro* 分化方法を本明細書中に提供する。多能性細胞を、特定条件下で維持し、増殖し、分化することができる。したがって、多能性細胞の造血前駆細胞および/または内皮細胞への分化にはマウスフィーダー細胞または血清を使用する必要がない。得られた造血前駆細胞を、種々の骨髄細胞系列（例えば、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、または樹状細胞）またはリンパ系細胞系列（例えば、T細胞、B細胞、またはナチュラルキラー細胞）にさらに分化することができる。多能性細胞を、多能性細胞の分化前に特定条件下（例えば、TeSR培地を使用）で本質的に未分化状態にて増殖および維持することができる。

10

【0030】

特に、本発明者は、一定の成長因子が特定条件下で維持した多能性細胞の分化に特に重要であることを発見した。一定の実施形態では、多能性細胞をいくつかの特定培地に連続的に曝露して、造血前駆細胞への分化を促進することができる。第1の特定培地中（例えば、TeSR培地中）での本質的に未分化状態での多能性細胞の培養および維持後、細胞を、BMP4、VEGF、IL-3、Flt3リガンド、またはGM-CSFを含まないか本質的に含まない第2の特定培地に曝露することができる。次いで、細胞をBMP4、VEGF、IL-3、Flt3リガンド、およびGM-CSFを含む第3の特定培地に曝露して、造血分化を促進することができる。あるいは、細胞を、BMP4およびVEGF、および任意選択的にFGF-2を含む第3の特定培地に曝露し、その後、IL-3、Flt3リガンド、およびGM-CSFを含む第4の培地に曝露することができる。本発明者は、BMP4およびVEGFを含む第3の特定培地への連続的曝露およびその後のIL-3、Flt3リガンド、およびGM-CSFを含む第4の培地への曝露によって、驚くべきことに造血前駆細胞の生成を実質的に増加させることができることを発見した。以下の実施例に示すように、第3の特定培地中にFGF-2を含めることにより、多能性細胞の造血前駆細胞への分化が驚異的に増加した。また、低酸素圧条件（例えば、気圧5%O₂への曝露）、少なくとも部分的な細胞の再凝集（例えば、トリプシンまたはTrypLE（商標）の使用）、および/または胚様体（例えば、約200~1000細胞/凝集体）の形成における特定範囲の細胞を使用した凝集体の形成を使用して、造血前駆細胞への分化をさらに促進することもできることが発見されている。

20

30

【0031】

I. 胚性幹細胞の調製および維持

多能性細胞を、造血分化前に種々の方法を使用して未分化状態で培養および維持することができる。一定の実施形態では、多能性細胞を、特定のフィーダー非依存性培養系（TeSR培地など）を使用して、本質的に未分化の状態での培養および維持することができる。あるいは、非特定条件を使用することができる。例えば、多能性細胞を、未分化状態の幹細胞を維持するために線維芽細胞のフィーダー細胞または線維芽細胞のフィーダー細胞に曝露した培地上で培養することができる。

40

【0032】

フィーダー非依存性の培養系および培地を使用して、多能性細胞（hESCまたはiPSCなど）を培養および維持することができる。これらのアプローチにより、ヒト胚性幹細胞をマウス線維芽細胞の「フィーダー層」を必要とせずに本質的に未分化の状態で保持することが可能である。本明細書中に記載するように、必要に応じて、費用などを軽減するために、これらの方法を様々に修正することができる。

【0033】

50

実質的に任意の多能性幹細胞株またはヒト胚性幹細胞株を、本明細書中に記載の特定条件下で造血前駆細胞に分化することができると予測される。例えば、ヒト胚性幹細胞株 H 1、H 9、h E S 2、h E S 3、h E S 4、h E S 5、h E S 6、B G 0 1、B G 0 2、B G 0 3、H S F 1、H S F 6、H 1、H 7、H 9、H 1 3 B、および / または H 1 4 などを、本明細書中に記載の方法によって造血前駆細胞に分化することができる。その後利用可能になる幹細胞株も本明細書中に記載の方法によって造血前駆細胞に分化することができると予測される。一定の実施形態でヒト多能性細胞を好んで使用することができるが、ある場合には、他の多能性細胞（哺乳動物、マウス、霊長類など）を造血分化のために使用することも可能である。

【 0 0 3 4 】

ヒト胚性幹細胞に加えて、i P S 細胞を、本明細書中に記載の方法によって培養し、そして / または造血前駆細胞に分化することができる。i P S 細胞は、幹細胞のように作用する再プログラミングされた体細胞である（T a k a h a s h i ら、2 0 0 7 ; T a k a h a s h i ら、2 0 0 7 ; N a k a g a w a ら、2 0 0 7）。当業者に認識されるように、用語「多能性細胞」には、天然に存在するか胚盤胞に由来する細胞および幹細胞に脱分化するか幹細胞様状態に戻るよう誘導された細胞の両方が含まれる（例えば、N a k a g a w a ら、2 0 0 7 ; Y u ら、2 0 0 7 を参照のこと）。

【 0 0 3 5 】

A . T e S R 培地

T e S R 培地は、未分化ヒト胚性幹細胞を培養するために使用することができる特定培地である。T e S R 培地には、T e S R 1 培地および m T e S R 培地の両方が含まれる。T e S R には、b F G F、L i C l、 γ -アミノ酪酸（G A B A）、ピペコリン酸、および T G F β が含まれ、T e S R を使用した種々の方法が以前に記載されている（例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 8 4 1 6 8 号および L u d w i g ら（2 0 0 6 a ; 2 0 0 6 b）（その全体が参考として援用される））。

【 0 0 3 6 】

T e S R 培地は、典型的には、無機塩、微量ミネラル、エネルギー基質、脂質、アミノ酸、ビタミン、成長因子、およびタンパク質、ならびに他の成分を含む。T e S R 1 培地のための完全処方物を、以下の表 1 に示す。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

【表 1】

表1. TeSR1培地のための完全処方物

無機塩	mM	アミノ酸	mM
塩化カルシウム(無水)	8.24E-01	L-アラニン	1.37E-01
HEPES	1.18E+01	L-アルギニン塩酸塩	5.48E-01
塩化リチウム(LiCl)	9.80E-01	L-アスパラギンH2O	1.37E-01
塩化マグネシウム(無水)	2.37E-01	L-アスパラギン酸	1.37E-01
硫酸マグネシウム(MgSO4)	3.19E-01	L-システイン-HCl-H2O	7.83E-02
塩化カリウム(KCl)	3.26E+00	L-シスチン 2HCl	7.83E-02
重炭酸ナトリウム(NaHCO3)	1.80E+01	L-グルタミン酸	1.37E-01
塩化ナトリウム(NaCl)	9.46E+01	L-グルタミン	2.94E+00
リン酸ナトリウム、二塩基性(無水)	3.92E-01	グリシン	2.94E-01
リン酸ナトリウム、一塩基性 (NaH2PO4-H2O)	3.55E-01	L-ヒスチジン-HCl-H2O	1.18E-01
		L-イソロイシン	3.26E-01
		L-ロイシン	3.54E-01
		L-リジン塩酸塩	3.91E-01
微量ミネラル		L-メチオニン	9.06E-02
硝酸鉄(III) (Fe(NO3)3-9H2O)	9.71E-05	L-フェニルアラニン	1.69E-01
硫酸鉄(III) (FeSO4-7H2O)	1.18E-03	L-プロリン	2.16E-01
硫酸銅 (CuSO4-5H2O)	4.08E-06	L-セリン	2.94E-01
硫酸亜鉛 (ZnSO4-7H2O)	1.18E-03	L-トレオニン	3.52E-01
メタバナジン酸アンモニウム NH4VO3	1.09E-05	L-トリプトファン	3.46E-02
硫酸マンガン Mn SO4 H2O	1.97E-06	L-チロシン 2Na 2H2O	1.88E-01
NiSO4 6H2O	9.70E-07	L-バリン	3.55E-01
セレン	1.77E-04		
メタケイ酸ナトリウム Na2SiO3 9H2O	9.66E-04	ビタミン	
SnCl2	1.24E-06	アスコルビン酸	2.53E-01
モリブデン酸アンモニウム塩	1.97E-06	ビオチン	1.12E-05
CdCl2	1.22E-05	B12	3.94E-04
CrCl3	1.98E-06	塩化コリン	5.03E-02
AgNO3	9.81E-07	D-パントテン酸カルシウム	3.69E-03
AlCl3 6H2O	4.87E-06	葉酸	4.71E-03
Ba (C2H3O2)2	9.79E-06	D-イノシトール	5.49E-02
CoCl2 6H2O	9.81E-06	ナイアシンアミド	1.30E-02
GeO2	4.97E-06	塩酸ピリドキシン	7.62E-03
KBr	9.89E-07	リボフラビン	4.56E-04
KI	1.00E-06	塩酸チアミン	2.42E-02
NaF	9.83E-05		
RbCl	9.81E-06	成長因子/タンパク質	
ZrOCl2 8H2O	9.80E-06	GABA	9.79E-01
		ピペコリン酸	9.84E-04
エネルギー基質		bFGF	5.77E-06
D-グルコース	1.37E+01	TGF β 1	2.35E-06
ビルビン酸ナトリウム	3.92E-01	ヒトインスリン	3.92E-03
		ヒトホロトランスフェリン	1.37E-04
脂質		ヒト血清アルブミン	1.95E-01
リノール酸	1.88E-04	グルタチオン(還元型)	6.38E-03
リボ酸	4.00E-04		
アラキドン酸	1.29E-05	他の成分	
コレステロール	1.12E-03	ヒポキサンチン Na	1.18E-02
DL-αトコフェロール-アセタート	2.90E-04	フェノールレッド	1.69E-02
リノレン酸	6.99E-05	ブトキシ -2HCl	3.95E-04
ミスチン酸	8.59E-05	チミジン	1.18E-03
オレイン酸	6.94E-05	2-メルカプトエタノール	9.80E-02
パルミチン酸	7.65E-05	Puronic F-68	2.33E-02
パルミトレイン酸	7.71E-05	Tween 80	3.29E-04
ステアリン酸	6.89E-05		

上記処方物中の一定の成分を、例えば、研究または節約のためのTeSRの使用を容易にするために置換することもできる。例えば、培地mTeSR1をTeSR1の代わりに使用することができ、この培地は、TeSR1と以下の点で異なる：ウシ血清アルブミン(BSA)をヒト血清アルブミンの代わりに使用することができ、クローン化したゼブラフィッシュ塩基性線維芽細胞成長因子(zbFGF)をbFGFの代わりに使用することができる。TeSR1は、例えば、Ludwigら(2006)(その全体が本明細書中で参考として援用される)に記載されている。

【0038】

「TeSR-GF」または「mTeSR-GF」は、bFGFおよびTGF-βを欠くTeSR培地をいう。「EB基本培地」は、約20%BIT9500(Stem Cell

10

20

30

40

50

l Technologies)または血清代替物3 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO)、約1%NEAA、約1mM L-グルタミン、約0.1mMメルカプトエタノール、約0.75%BSA、および約50 ug/mlアスコルビン酸を補足したIMDMを含む培地をいう。用語「TeSR培地」は、本明細書中で使用する場合、TeSR1培地、TeSR2培地、またはmTeSR培地を含む。TeSR2培地は、TeSR2培地がヒト化されていることを除いてTeSR1培地と本質的に同一である。TeSR1培地、TeSR2培地、またはmTeSR培地を、本明細書中に開示の方法で使用することができる。

【0039】

1. 成長因子含有量を減少させた特定培地における前条件付け

(例えば、TeSR培地およびマトリックス成分(マトリゲル(商標)またはフィブロネクチンなど)を含む二次元培養系における)多能性細胞培養物の培養および/または維持後且つ造血分化前に、多能性細胞を、成長因子が減少しているか、本質的に排除されているか、欠いている特定培地に有利に曝露するか、この特定培地中で培養することができる。一定の実施形態では、培地に、TGF- α および/またはFGF-2を補足することができる。例えば、成長因子レベルが実質的に減少した(例えば、約0.1ng/mL TGF- α および約20ng/mL FGF-2が補足されているが、全ての他の非インスリン成長因子を欠く)TeSR培地を使用して、さらなる成長因子への曝露前に細胞を培養または「前条件付け」して、例えば、造血細胞への分化を促進することができる。

10

【0040】

この「前条件付け」培養工程は、多能性細胞を約12時間~約7日間以上培養する工程を含み得る。一定の実施形態では、前条件付け工程は、約1~約7日間、約1~約3日間、または約1、2、3、4、5、6、または7日間、またはこれらから導き出される任意の範囲の期間細胞を培養することを含み得る。以下の実施例に示すように、約1~約3日目の前条件付け培養物は、その後の多能性細胞の造血分化を有意に改善するのに十分であり得る。

20

【0041】

前条件付け培養物で使用される特定培地は、FGF-2および/またはTGF- α を含むことができる。典型的には、前条件付け培養物中へのFGF-2および/またはTGF- α の補足量を、本質的に未分化の状態を維持するために使用される特定培地と比較して減少させることができる。一定の実施形態では、約10pg/mL~約5ng/mL、約0.05ng/mL~約0.5ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲のTGF- α を、前条件付け培養時に特定培地中に含めることができる。種々の実施形態では、約1ng/mL~約100ng/mL、約5ng/mL~約50ng/mL、または約10ng/mL~約25ng/mL、または約20ng/mLのFGF-2を、前条件付け培養時に特定培地中に含めることができる。FGF-2は、組換え的に産生されたヒトまたはゼブラフィッシュFGF-2であり得る。

30

【0042】

B. マトリックス成分

マトリックス成分を、実質的または本質的に未分化の状態の多能性細胞の培養および維持のために特定培地中に有利に含めることができる。適切な半固体マトリックス中で培養する場合、コロニー形成細胞(CFC)と呼ばれる個別の前駆体が増殖して個別の細胞クラスターまたはコロニーを形成することができる。CFCアッセイを、栄養素およびサイトカインを補足した半固体培地(メチルセルロースまたはコラーゲンなど)に細胞懸濁液を入れ、その後例えば、約37°Cでインキュベートすることによって行うことができる。

40

【0043】

種々のマトリックス成分を使用して、多能性細胞(hESCまたはiPSCなど)を培養および維持することができる。例えば、Ludwigら(2006)(その全体が参考として援用される)に記載のように、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、

50

およびビトロネクチンの組み合わせを使用して、胚細胞の培養および維持のための固体支持体を得ることができる。

【0044】

マトリゲル(商標)を使用して、多能性細胞の細胞培養および維持のための基質を得ることもできる。マトリゲル(商標)は、マウス腫瘍細胞によって分泌されるゼラチン様タンパク質混合物であり、BD Biosciences (New Jersey, USA) から市販されている。この混合物は、多数の組織で認められる複雑な細胞外環境に類似し、細胞培養用基質として細胞生物学者によって使用されている。マトリゲル(商標)を使用した特定培地中でのヒト胚性幹細胞の培養および維持方法は、例えば、Ludwigら(2006)に記載されており、この方法を使用して造血分化前の多能性細胞を培養することができる。当業者に公知のように、ヒト胚性幹細胞のさらなる培養および維持方法を本発明と共に使用することができることが認識される。

10

【0045】

II. ES細胞の播種および分化

多能性細胞を、造血分化前に部分的、本質的、または完全に解離または個別化することができる。多能性細胞を、単一のコロニーまたはクローン群としてか、培養組織から解離した細胞のクランプとしてか、個別化した細胞として播種して造血分化を促進することができる。多能性細胞を、機械的方法または酵素的方法(多能性細胞を含む組織のトリプシンまたはTrypLE(商標)への曝露など)を使用して、本質的に個別の細胞に個別化または分離することができる。タンパク質分解酵素を使用して、培養表面から細胞を解離し、細胞自体を分離することができる。分化のためにES細胞を個別化するために使用することができる酵素には、セリンプロテアーゼ(トリプシンなど)および酵素の混合物(アクターゼ(商標)に見出される酵素など)が含まれる。

20

【0046】

多能性細胞を、本質的に個別の(または分散した)細胞として播種培地に添加または播種することができる。一定の実施形態では、分散したES細胞を、約50万~300万細胞/mlの密度にて表面(低付着表面など)上の播種培地中に播種する。一定の実施形態では、播種培地は特定培地である。一定の実施形態では、低付着表面を有利に使用することができるが、標準的な無菌細胞培養物に適合する本質的に任意の材料を培養表面に使用することができるかと予測される。播種培地は、TESR培地またはmTESR培地、マトリック成分、およびROCKインヒビターを含むことができる。

30

【0047】

多能性細胞を、ROCKインヒビター、プロテアーゼインヒビター(例えば、トリプシンインヒビター)、および/またはPKCインヒビターを含むか含まない播種培地中で培養するかこの播種培地に曝露することができ、細胞を、1つまたは複数の成長因子を含む特定培養培地中にて低酸素雰囲気下で培養することができる。一定の実施形態では、ダイズトリプシンインヒビター(例えば、約0.25mg/ml~0.5mg/ml)を播種培地中に含めることができる。播種培地および特定培養培地は、それぞれ、フィーダー細胞を含まないか、本質的に含まないかもしれない。さらなる分化細胞をその後回収することができる。例えば、造血前駆細胞またはCD34+細胞を、播種後に約8日間~約12日間以上または約6日間~約9日間培養することができる。

40

【0048】

任意選択的に、ポリビニルアルコール(PVA)を、胚様体(EB)の形成時にROCKインヒビターを含む培地中に含めることができる。本発明者らは、ROCKインヒビターを含む培地中でのEB形成のためにPVAが必要でなく、それにもかかわらず、EB形成時の培地(例えば、低レベルのTGF- α およびFGF-2以外の成長因子(growth))を欠くTESR培地中にPVAを含めることができることを認めた。TrypLE(商標)または他の酵素消化物を使用して、ROCKインヒビターおよび/またはトリプシンインヒビター(および/または、任意選択的に、PVA)の曝露およびEB形成前に多能性細胞を実質的に個別化するかバラバラにすることができる。

50

【 0 0 4 9 】

I I I . 多能性細胞の造血前駆細胞への分化

部分的、本質的、または完全な多能性細胞の解離または個別化後、細胞を特定培地中でさらに培養して造血分化を促進することができる。成長因子の特定の組み合わせが多能性細胞の造血前駆体および造血細胞系列への分化を実質的に促進することができることが発見された。成長因子の特定の組み合わせの連続的適用を使用して多能性細胞の分化をさらに促進することができることがさらに発見された。一定の実施形態では、成長因子の特定の組み合わせは多能性細胞の造血分化に極めて重要である。例えば、BMP4、VEGF、Flt3リガンド、IL-3、およびGM-CSFの組み合わせを使用して造血分化を促進することができることを本明細書中に示す。一定の実施形態では、本発明者は、BMP4およびVEGF（および任意選択的にFGF-2）を含む第1の培地への細胞培養物の連続的曝露およびその後のFlt3リガンド、IL-3、およびGM-CSFを含む第2の培地中での培養によって多能性細胞の造血前駆細胞および造血細胞への分化を驚異的に増大させることができることを発見した。例えば、以下の実施例に示すように、この連続的曝露により、特定条件下で同一時間にわたって産生される造血前駆細胞数がほぼ倍増した。さらに、BMP4およびVEGFを含む培地中にFGF-2（50 ng/ml）を含めることにより、多能性細胞からの造血前駆細胞生成の効率が少なくとも倍増した。

10

【 0 0 5 0 】

多能性細胞の造血前駆細胞への分化を、特定条件または非特定条件を使用して行うことができる。一般に、特定条件は、一般に、得られた細胞がヒト被験体への投与を意図する実施形態で好ましいと認識されるであろう。造血幹細胞を、特定条件下（例えば、TESR培地およびマトリックス成分（マトリゲル（商標）など）を使用）にて多能性幹細胞から培養することができ、造血細胞を、多能性細胞由来の胚様体から生成することができる。他の実施形態では、多能性細胞を、OP9細胞またはマウス胚線維芽細胞上で共培養し、その後分化させることができる。

20

【 0 0 5 1 】

多能性細胞は、分化過程の一部として胚様体を形成することが可能である。分化を誘導するための「胚様体」（EB）（すなわち、成長中の細胞のクラスター）の形成は、一般に、ヒト多能性幹細胞のEBへの*in vitro*凝集を含み、ヒト多能性幹細胞の内胚葉、外胚葉、および中胚葉起源の複数の組織型への自発的および無作為な分化が可能である。したがって、三次元EBを使用して、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できる。

30

【 0 0 5 2 】

以下のプロトコールを使用してEBを形成することができる。マトリゲル（商標）コーティングプレート上でのフィーダーフリー成長に適合させた未分化のhESCまたはiPSCを、37°Cで約10分間のコラゲナーゼIV（1 mg/ml）処理を使用して、コンフルエンスで回収することができる。インキュベーション後にウェルのコラゲナーゼを洗い流し、EB基本培地中へのウェルの搔爬によってEBを形成させることができる。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB分化培地に交換することができる。

40

【 0 0 5 3 】

EB形成を促進するために、細胞を、約20%BIT9500（Stem Cell Technologies）または血清代替物3、約1%NEAA、約1mM L-グルタミン、および約0.1mMメルカプトエタノール、約0.75%BSA、および約50 μg/mlアスコルビン酸を補足したIMDMを含む「EB基本培地」中での一晩のインキュベーションのための低付着プレートに移すことができる。翌日、細胞を各ウェルから回収し、遠心分離することができる。次いで、細胞を、約50 ng/ml骨形成因子（BMP-4）、約50 ng/ml血管内皮成長因子（VEGF）、約25 ng/ml幹細胞因子（SCF）、約25 ng/ml Flt-3リガンド（Flt-3L）、約10 ng/mlインターロイキン-3（IL-3）、約10 ng/mlインターロイキン-6（IL-6）、約20 ng/ml顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、約20 ng/ml

50

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、約0.2 U/ml エリスロポエチン (EPO)、約25 ng/ml トロンボポエチン (thrombopoietin) (TPO)、および約25 ng/ml FGF-2を補足したEB基本培地からなる「EB分化培地」に再懸濁することができる。15 mL管にEBを移し、凝集体を約5分間静置することによって、4日毎に培地を交換することができる。一定の実施形態では、EB分化培地は、およそBMP4 (例えば、約50 ng/ml)、VEGF (例えば、約50 ng/ml)、および任意選択的にFGF-2 (例えば、約25~75 ng/ml または約50 ng/ml) を含むことができる。上清を吸引し、新鮮な分化培地と交換することができる。あるいは、細胞に、2日毎に新鮮な培地の半量を補給することができる。細胞を、分化過程の異なる時点で回収することができる。

10

【0054】

造血前駆細胞を、特定培地を使用して多能性幹細胞から培養することができる。特定培地を使用した多能性細胞の造血CD34+幹細胞への分化方法は、例えば、米国特許出願第61/015,813号 (放棄することなくその全体が参考として援用される) 中に記載されている。これらの方法を本発明と共に使用できると予測される。

【0055】

例えば、特定培地を使用して、造血CD34+分化を誘導することができる。特定培地は、成長因子BMP-4、VEGF、Flt3リガンド、IL-3、および/またはGM-CSFを含むことができる。多能性細胞を、BMP4、VEGF、および任意選択的にFGF-2を含む第1の特定培地中で培養し、その後 (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の培地中で培養することができる。第1および第2の培地はまた、1つまたは複数のSCF、IL-6、G-CSF、EPO、FGF-2、および/またはTPOを含むことができる。実質的な低酸素圧条件 (例えば、20% O₂ 未満) は、造血分化または内皮分化をさらに促進することができる。

20

【0056】

細胞を、機械的手段または酵素的手段 (例えば、トリプシンまたはTrypLE (商標) を使用) によって実質的に個別化することができる。ROCKインヒビター (例えば、H1152またはY-27632) を、培地に含めることもできる。これらのアプローチを、例えば、ロボットによる自動化を使用して自動化できると予測される。

30

【0057】

多能性細胞の造血前駆細胞への分化のための特定の使用方法の場合によっては好ましいかもしれないが、特定しないアプローチを種々の実施形態で使用することができる。ヒトESCから造血幹細胞を分化するための1つの特定しない方法は、CD34+への頑強な分化を誘導するフィーダー細胞 (マウス胚線維芽細胞 (MEF) フィーダー層またはマウス間質細胞株OP9など) 上でESCを培養する工程を含む。簡潔に述べれば、ESCを成長因子の存在下でMEF上で成長させることができ、MEFは、細胞のための基質およびおそらくいくつかの栄養物を提供する。特定条件と対照的に、OP9細胞の使用は、一般に、CD34+分化を誘導するための追加の成長因子を必要としない。これらの過程が生じる機構は完全に理解されていない。このアプローチを、一定の成長因子および血清と組み合わせて使用することもできる (Wang, 2007)。MEFも、ヒトESCの培養および維持のためにしばしば使用する。マウス胚線維芽細胞上での培養を使用する方法 (以下のプロトコールなど) を、FBSの代わりにノックアウト (商標) 血清代替物を含むように修正することができる。

40

【0058】

以下の特定しないプロトコールを、多能性細胞の造血細胞への分化のために使用することができる。H1細胞を、MEF上で日常的に維持し、次いで、ほとんどコンフルエントなOP9間質細胞を含むMEM+20%の特定のFBS+100 ng/ml TPOに1×10⁵細胞/ウェル (1ウェルは9.6 cm²である) で継代することができる。2日目および4日目に、細胞に新鮮な培地を補給することができる。7日目に、細胞を、コ

50

ラゲナーゼ I V を使用して新鮮な O P 9 細胞上に 1 : 3 に分割することができる。8 日目および 1 0 日目に、細胞に新鮮な培地を補給することができる。1 1 日目に、細胞を、コラゲナーゼ I V を使用して新鮮な O P 9 細胞上に 1 : 1 に分割し、その後にトリプシン / E D T A を使用して単一の細胞を得て、培地を MEM + 1 0 % 特定 F B S + 1 0 0 n g / m l T P O に交換した。1 4 ~ 1 6 日目に毎日さらなる 1 m l のこの培地を添加することによって細胞に補給することができる。一定の実施形態では、O P 9 細胞に関する分化方法を、G a u r ら、2 0 0 6 (その全体が参考として具体的に援用される) に記載のように行うことができる。

【 0 0 5 9 】

I V . 造血前駆細胞の骨髄細胞系列またはリンパ系細胞系列への分化

種々のアプローチを本発明と共に使用して、造血前駆幹細胞を細胞 (赤血球、顆粒球、マクロファージ、および巨核球が含まれる) にさらに分化することができる。これらのアプローチは、赤血球分化培地、メチルセルロース、および巨核球分化培地の使用を含むことができる。一定の実施形態では、造血前駆細胞を、内皮細胞に分化するか、血管産生のために使用することもできる。

10

【 0 0 6 0 】

これらの細胞系列を、種々の医学的処置および適用で使うことができる。例えば、赤血球系列を、血液移植のための血液の産生で使うことができる。他の実施形態では、内皮細胞を使用して、局所虚血を処置するために使うことができる新規の血管を産生することができる。あるいは、一定の実施形態では、本発明にしたがって分化した造血細胞を、鎌状赤血球貧血などの疾患を処置するために投与することができる (H a n n a ら、2 0 0 7) 。

20

【 0 0 6 1 】

赤血球、顆粒球、単球 - マクロファージ、および巨核球骨髄細胞系列の多分化能前駆体および系列制限前駆体を定量するための *i n v i t r o* アッセイ系が開発されている。コロニー内の造血系列細胞の 1 つまたは複数の型の形態学的認識に基づいて、コロニー形成細胞 (C F C) を分類および列挙することができる。コロニーの評価および列挙を、光学顕微鏡法または各コロニーの引き抜きおよびその後の細胞化学的方法および免疫細胞化学的方法を使用した細胞の染色によって *i n s i t u* で行うことができる。種々のゲル化剤 (寒天、アガロース、メチルセルロース、コラーゲン、およびフィブリン塊が含まれる) が、C F C アッセイのために使用されている。

30

【 0 0 6 2 】

A . 赤血球分化

造血前駆細胞を、例えば、赤血球分化培地を使用して赤血球系細胞に分化することができる。赤血球分化培地は無血清培地または特定培地であり得る。この培地は、S C F、E P O、T P O、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むことができる (S l u k v i n ら、2 0 0 7) 。

【 0 0 6 3 】

以下のプロトコールを使用して、造血前駆細胞を赤血球系細胞に分化することができる。赤血球前駆体を、I L - 3、F L T - 3、S C F、および T P O から導いた造血前駆細胞をヒドロコルチゾン (1 0 - 6 M)、ホロトランスフェリン、およびエキサイトを含む培地中に入れることによって生成することができる。以下の実施例に示すように、1 0 0 万個の h E S C は、2 0 0 万個の赤血球前駆体を生成することができた。

40

【 0 0 6 4 】

B . メチルセルロース

メチルセルロースを使用して、造血前駆細胞からの赤血球、マクロファージおよび / または顆粒球の分化を誘導することができる。メチルセルロースは、比較的不活性なポリマーであり、良好な光学的透明度を有する安定なゲルを形成する。これは、一般に、化合物 (ウシ胎児血清 (F B S)、ウシ血清アルブミン (B S A)、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が含まれる) を補足した培

50

養培地またはコロニー刺激因子の供給源としての馴化培地中にて最終濃度0.9~1.2%で使用される。細胞のメチルセルロース分化を含む方法は、例えば、Kaufmanら(2001)に記載されている。

【0065】

メチルセルロースベースの培地は、他の半固体マトリックス型よりも赤血球系細胞のより良好な成長が可能であり、したがって、同一培養物内での赤血球、顆粒球、単球、および多分化能CFCのアッセイが可能である。巨核球前駆体を、補足コラーゲンベース培地中で適切に培養し、免疫細胞化学染色を使用して具体的に同定する。

【0066】

C. 巨核球への分化

造血前駆細胞を、巨核球にさらに分化することができる。体内では、巨核球は、骨髄中に見出され、細胞上で形成される突起(すなわち、血小板前駆体)から血小板を産生する。ヒトの体内の巨核球は、骨髄細胞の小画分のみが存在するが、一定の疾患に応答してその数が10倍まで増加し得る。体内では、巨核球は、典型的には、以下のように造血細胞から分化する:血球芽細胞(hemacytoblast)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。

10

【0067】

種々の培地および方法を使用して、多能性細胞または造血前駆細胞を巨核球に分化することができる。例えば、米国特許出願公開第2007/0077654(放棄することなくその全体が参考として援用される)に記載の多能性細胞の巨核球への分化のための方法および培地を、本発明と共に使用することができる。

20

【0068】

成長因子を、巨核球分化培地中に優先的に含める。例えば、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)のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、または全てを含むことができる。一定の実施形態では、SCFのみを巨核球分化培地中に含めることができる。他の実施形態では、SCFを、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使用することができる。種々の実施形態では、FLT-3リガンドおよび/またはTPOを、本発明の巨核球分化培地から排除することができる。

30

【0069】

造血細胞を、以下のプロトコールによって巨核球に分化することができる。巨核球を、(100ng/ml TPO、SCF、FLT-3、20%BIT9500)を含む培地中に造血前駆細胞を入れることによって産生することができる。以下の実施例に示すように、100万個のhESCは、6万個の巨核球を生成することができた。

【0070】

巨核細胞分化培地を使用して、巨核細胞の生成を誘導することができる。巨核細胞生成のための種々の生成物およびアプローチは記載されてきており、本発明と共に使用することができる(WO2006/050330号などに記載)。さらに、メガカルト(商標)はStem Cell Technologiesから利用可能であり、巨核球の産生/分化のために使用することができる。種々の実施形態では、トロンボポエチン(thrombopoietin)(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/または幹細胞因子を、巨核細胞分化培地中に含めることができる。細胞からの巨核細胞の分化方法は、例えば、Kaufmanら(2001)に記載されている。

40

【0071】

D. 内皮細胞への分化

造血細胞を、内皮細胞に分化させることもできる。内皮細胞を、例えば、動物被験体またはヒト被験体への移植のための以下のプロトコールを使用して生成することができる。ヒトES細胞由来CD31+細胞を、50ng/mL rhVEGFおよび5ng/mL

50

r h F G F - 2 を含む E G M (商 標) - 2 培 地 (L o n z a , S w i t z e r l a n d) または分化培地中で7~10日間で培養することができる。

【0072】

内皮細胞のさらなる増殖および分化のために、単離したCD31+細胞を、VEGF、FGF、EGF、IGF、アスコルビン酸、およびFBSを含む内皮分化培地(Lonzaカタログ番号CC3202)または50ng/mlの血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、およびFGF-2(例えば、50ng/mlゼブラフィッシュFGF-2)を含む分化培地中で培養することができる。細胞を2~3週間培養することができる。

【0073】

以下のプロトコールを使用して、内皮分化を誘導することができる。内皮細胞の増殖および分化のために、単離したCD34+細胞を、ゼラチンコーティングしたウェル(1.5~2x10⁴細胞/cm²)上のEGM-2MV培地(Cambrex)中に播種することができる。ゼラチンは、典型的には、I型コラーゲンコーティングウェルよりも増殖性が低いにもかかわらず、I型コラーゲンコーティングウェル(BD Labware)も使用することができる。CD34+細胞を、内皮成長因子、hVEGF₁₆₅(50ng/ml)、およびFGF-2(5ng/ml)を含むhESC分化培地中で培養することができる。約7~10日間のインキュベーション後、付着細胞をトリプシン処理によって回収し、分析のための使用することができる。

【0074】

内皮細胞を、マトリゲルプラグの画像化によって評価することができる。例えば、以下のプロトコールを使用して、細胞を画像化することができる: hESCまたはiPSC由来の内皮細胞(EC)を、マトリゲル中に懸濁し(例えば、約100万個/ml)、SCIDベージュマウスに皮下注射することができる。次いで、FITCデキストランを、マトリゲルプラグ除去の約14日前に静脈内注射することができる。プラグを採取し、蛍光画像化技術を使用した画像化に供し、血管新生の有無についてプラグを分析することができる。

【0075】

E. 肥満細胞生成

造血前駆細胞を、肥満細胞にさらに分化することができる。幹細胞因子(SCF)、IL-6、IL-3、IL-4、IL-9、および/またはIL-10への多能性細胞の曝露により、肥満細胞分化を促進することができる。

【0076】

一定の実施形態では、以下のプロトコールを使用して、肥満細胞への分化を促進することができる。造血細胞を、(100ng/ml TPO、SCF、FLT-3、20%BIT9500)を含む培地「MK3」中に造血前駆細胞を入れることによって最初に巨核球に分化することができる。肥満細胞を、その後、MK3増殖およびその後の50ng/ml SCF、50ng/ml IL-6含有培地中での前駆体の増殖によって産生することができる。

【0077】

種々の実施形態では、臍帯血または末梢血の肥満細胞への分化方法を使用して、巨核球分化を促進することもできる。例えば、Schernthanerら(2001)は、種々の時点でIL-6または(IL-4、IL-6、およびIL-10)と組み合わせたSCFを使用した臍帯血前駆体の肥満細胞への分化方法を記載している。Lappalainenら(2007)は、種々の期間添加したSCFおよび他のサイトカイン(IL-3、IL-6、IL-9、およびIL-4)を使用した細胞の培養による末梢血の肥満細胞への分化方法を提供する。これらの方法のいずれかを本発明と共に首尾よく使用することができる。と予測される。

【0078】

F. マクロファージおよび樹状細胞

10

20

30

40

50

造血前駆細胞を、樹状細胞にさらに分化することができる。例えば、造血前駆細胞を、 200 ng/ml GMCSFを含む培地中に8日間入れることができる。次いで、これらの細胞を、 10 ng/ml M-CSFおよび 20 ng/ml IL-1を含む培地中に細胞を2週間入れることによってマクロファージにさらに分化するか、(20 ng/ml GMCSF、 20 ng/ml IL-4)中に細胞を入れることによって樹状細胞にさらに分化することができる。以下の実施例に示すように、100万個のhESCは、約20万個~250万個の樹状細胞および約50万個~250万個のマクロファージを生成することができた。

【0079】

V. 多能性細胞の内皮細胞への分化

多能性細胞(iPSCまたはhESCなど)を、本発明の種々の実施形態で内皮細胞に分化することができる。内皮細胞が血管の一部を構成するので、これらの細胞は、例えば、血管または内皮細胞に及ぼす化合物の影響、薬理学、または毒性学を決定するための化合物のスクリーニングまたは試験に特に有用であり得る。内皮細胞を、1つまたは複数の以下の性質を使用した評価または同定のために使用することもできる：血管収縮または血管拡張、血圧の調節、血液凝固(例えば、血栓症または繊維素溶解)、アテローム性動脈硬化症の促進または軽減、血管形成、炎症、および/または化合物のバリア機能(例えば、血液脳関門機能)または輸送に及ぼす影響。内皮細胞はまた、冠状動脈疾患、真性糖尿病、高血圧症、または高コレステロール血症を促進または軽減することができる化合物のスクリーニングまたは同定に有用であり得る。

10

20

【0080】

一定の実施形態では、多能性細胞を、TGF(例えば、 0.1 ng/ml)およびFGF(例えば、 20 ng/ml)を補足した特定培地(例えば、TeSR培地)中で約12~36時間または約24時間前条件付けすることができる。次いで、細胞を、例えば、約37°Cで約5分間のTrypLE処理を使用して、コンフルエンスで採取することができる。細胞を、EB基本培地(例えば、約20%BIT9500(Stem Cell Technologies)または血清代替物-3(商標)、約1%NEAA、約1mM L-グルタミン、約0.1mMメルカプトエタノール、約0.75%BSA、約50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸、およびROCKインヒビター($1\text{ }\mu\text{M}$ のH-1152など)を補足したIMDMを含む)中で回収することができる。次いで、細胞を、低付着培養表面またはプレート、バイオリアクター、またはスピナーフラスコなどにて培養することができる。

30

40

【0081】

培養約12~24時間後、細胞を回収し、BMP-4(例えば、 50 ng/ml)、VEGF(例えば、 50 ng/ml)、およびFGF-2(例えば、 50 ng/ml)を補足したEB基本培地中に再懸濁することができる。培地を、約4日目で新鮮な培地と少なくとも部分的に置換することができる。EB分化の約7日目に、細胞を内皮分化培地(EGM-2MV、Lonzaカタログ番号CC3202など)中に入れることができる。一定の実施形態では、内皮分化培地は、VEGF、FGF、EGF、IGF、アスコルビン酸、および/またはFBSのうちの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または全てを含む。内皮細胞を、その後(例えば、培養10日目に)回収することができる。1つまたは複数の細胞マーカー(CD31および/またはCD105など)を使用して、例えば、FACSのMACSを使用して、細胞集団から内皮細胞集団を実質的に精製することができる。以下の実施例に示すように、内皮細胞を、本発明の一定の実施形態で、iPSCまたはhESCから首尾よく生成することができる。内皮細胞を同定するか実質的に精製するために使用することができる細胞マーカーには、CD31、CD105、CD144(VE-カドヘリン)、CD106、CD146、およびZ01(密着結合タンパク質)が含まれる。

【0082】

VI. 低酸素圧および分化

50

一定の実施形態では、実質的に低酸素の条件を使用して、多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進することができる。当業者に認識されるように、約20.8%未満の大気中酸素含有量が低酸素と見なされるであろう。ヒト培養細胞は、周囲の空気と比較して低い酸素含有量の大気条件で成長することができる。この相対的低酸素圧を、培養培地に曝露した大気中酸素の減少によって達成することができる。胚細胞は、典型的には、一般に約1%と約6%との間の大気中酸素の低酸素圧条件および環境レベルの二酸化炭素にて*in vivo*で発生する。理論に拘束されることを望まないが、低酸素圧条件は一定の胚発生条件の態様を模倣し得ると予測される。以下の実施例に示すように、低酸素圧条件を一定の実施形態で使用して、多能性細胞(iPSCまたはhESCなど)のより分化された細胞型(造血前駆細胞など)へのさらなる分化を促進することができる。

10

【0083】

以下の低酸素圧条件を使用して、多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進することができる。一定の実施形態では、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%の大気中酸素含有量を使用して、造血前駆細胞への分化を促進することができる。一定の実施形態では、低酸素雰囲気は約5%酸素ガスを含む。

【0084】

VII. 特定培養培地

本明細書中に記載のように、1つまたは複数の特定培養培地を有利に使用して、多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進することができる。特に、動物生成物(血清およびマウスフィーダー層など)の排除により、動物生成物への細胞の曝露に関連するリスクを軽減することができる。ヒト被験体により安全に投与することができる細胞の生成が可能である。幹細胞の種々の細胞型への分化のための伝統的な幹細胞培養の開発は血清生成物およびマウスフィーダー層に依存していたので、これらの伝統的な手順は、分化することができる規模を制限し、生物学的ばらつきおよび潜在的汚染を増加させ、そうでなければ有用であると証明され得る探索的治療におけるES細胞の使用が阻止されてきた。

20

【0085】

特に、本発明者は、培地中に同時または連続的に含まれる非常に制限された数のサイトカイン(例えば、任意選択的にGM-CSF、IL-3、IL-6、TPO、および/またはFGF-2を組み合わせたBMP4、VEGF、FLT-3、およびIL-3)を含む特定培養培地への多能性細胞の曝露を使用して造血前駆細胞への分化を促進することができることが同定された。驚くべきことに、細胞培養培地中のBMP-4のみおよびVEGFのみでは造血分化を促進しなかった一方で、細胞培養培地中にBMP4およびVEGFの両方を含めた場合に協力作用を示し、一定の実施形態では、前駆細胞の造血細胞への分化を促進するために必要であったことが認められた。BMP4およびVEGFを有する特定培地中にFGF-2を含めることによって多能性細胞の分化を促進することができ、例えば、以下の実施形態に例示するように、この培地中にFGF-2を含めることによって多能性細胞からの造血前駆細胞(HPCs)の生成効率が少なくとも倍増した。

30

40

【0086】

本発明者らは、一定の実施形態では、(BMP4、VEGF、および任意選択的にFGF-2)の第1の組み合わせへの前駆細胞の連続的曝露およびその後の(FLT-3、IL-3、およびGM-CSF)または(FLT-3、IL-3、TPO、IL-3、およびIL-6)のいずれかへの曝露により、これらの全てのサイトカインを同一期間中に一度に細胞に同時曝露した場合と比較して、分化(例えば、造血前駆細胞への分化)を驚異的にさらに促進することができることをさらに同定した。(BMP4およびVEGF)への曝露後且つ(FLT-3およびIL-3)への曝露前に細胞を再凝集させて、その後の成長因子への細胞の曝露を促進または改善することができる。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、この再凝集工程によって細胞の造血前駆細胞への分化をさらに促進す

50

ることができる予測される。

【0087】

培養培地は、典型的には、さらなる栄養素、アミノ酸、抗生物質、および緩衝剤などを含む。一定の実施形態では、特定培養培地は、以下の表1に列挙した1つまたは複数の成分を含む。以下の培養培地は、約25 ng/mlのFlt-3、約10 ng/ml IL-3、および約10 ng/ml GM-CSFを含むことができる。抗生物質の非存在下で細胞に対して分化方法を実施することができるにもかかわらず、培地は1つまたは複数の抗生物質を含むことができる。以下の実施例に例示するように、IMDM培養培地中に血清代替物3を含めることにより、多能性細胞の分化および増加をさらに促進することができる。

10

【0088】

【表2】

表2. IMDM特定培養培地

20% BIT 9500または血清代替物3
25~50 ng/mL BMP4
25~50 ng/mL VEGF
5~25 ng/ml FGF2
2 mM L-グルタミン
0.1 mM 非必須アミノ酸
450 μM モノチオグリセロール
50 μg/ml アスコルビン酸
0.75% BSA

20

A. 成長因子

種々の成長因子を使用して、多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進することができる。一定の実施形態では、本発明の特定培養培地は、1つ、2つ、またはそれを超える成長因子（例えば、(BMP-4およびVEGF)または(BMP-4、VEGF、FLT-3、IL-3、およびGM-CSF)など)を含むことができる。

30

【0089】

本発明の特定培養培地中に含むことができる成長因子には、BMP-4、VEGF、bFGF、幹細胞因子(SCF)、Flt3リガンド、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)、インターロイキン11(IL-11)、インスリン関連成長因子1(IGF1)、インスリン関連成長因子2(IGF2)、エリスロポエチン(EPO)、トロポポエチン(TPO)、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSFまたはGM-CSF)、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSFまたはG-CSF)が含まれるが、これらに限定されない。本発明の特定培養培地は、1つ、2つ、3つ、またはそれを超えるこれらの因子を含むことができる。例えば、細胞の増殖を増加させるか分化状態を調整するために、他の成長因子を特定培地中に含めることができる。一定の実施形態では、特定培地は、少なくとも(BMP-4およびVEGF、および任意選択的にFGF-2)または(FLT-3、IL-3、およびGM-CSF)を含むことができる。これらの実施形態では、必ずではないが、1つまたは複数のさらなる成長因子を特定培地中に含めることができる。例えば、分化過程の第2の工程で約25 ng/mlのTPOまたはSCFを使用してGM-CSFを置換することができる。種々の量のこれらの因子を使用して、細胞応答を刺激することができる(例えば、Yamamuraら、2008; Fadilahら、2007; Bashayら、2007に記載の量)。例えば、細胞の増殖または細胞分化を促進するために、約1

40

50

～50 ng/mL、約5～25 ng/mL、または約10 ng/mLの濃度のTPOを含めることができる。種々の実施形態では、約5～100 ng/mL、約10～50 ng/mL、または約25 ng/mLの濃度のSCFを特定培地中に含めることができる。種々の実施形態では、約5～50 ng/mL、約5～25 ng/mL、または約10 ng/mLの濃度のIL-6を特定培地中に含めることができる。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を、造血前駆細胞からの顆粒球の生成のために使用することができる。

【0090】

1. BMP-4

骨形成タンパク質-4(BMP-4)は、骨形態形成タンパク質および腹側中胚葉誘導因子群のメンバーである。BMPは成人ヒト骨髄(BM)中に発現し、骨のリモデリングおよび成長に重要である。一定の実施形態では、BMP4の含有は培養の最初の2～3日間のみ必要であり、その後分化に有害な影響を及ぼすことなく系から除去することができる。

10

【0091】

BMP-4は、造血前駆細胞の増殖および分化の潜在能力の調整に重要である(Bhardwajら、2001; Bhatiaら、1999; Chadwick 2003)。さらに、BMP-4は、ヒト胎児、新生児、および成人の造血前駆細胞における初期造血細胞発生を調整することができる(Davidson and Zon, 2000; Huberら、1998; Marshallら、2000)。例えば、BMP-4は成人および新生児起源の高度に精製された原始ヒト造血細胞の増殖および分化を調節することができる(Bhatiaら、1999)、BMP-4はヒト胚性幹細胞の造血分化を促進することができる(Chadwick, 2003)。

20

【0092】

約5～100 ng/mL、約20～100 ng/mL、約20～50 ng/mL、約10～30 ng/mL、約15～30 ng/mL、約20～30 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のBMP-4を特定培養培地中に含めることができる。一定の実施形態では、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度のBMP-4を特定培養培地中に含める。

【0093】

2. VEGF

血管内皮成長因子(VEGF)は、胚循環器系の形成および血管形成に關与する重要なシグナル伝達タンパク質である。VEGFは、種々の細胞型(血管内皮および他の細胞型(例えば、ニューロン、癌細胞、腎臓上皮細胞)が含まれる)に影響を及ぼし得る。in vitroでは、VEGFは、内皮細胞有糸分裂誘発および細胞遊走を刺激することができる。VEGF機能はまた、種々の病状(癌、糖尿病、自己免疫疾患、および眼血管疾患が含まれる)で重要であることが示されている。

30

【0094】

約10～100 ng/mL、約20～100 ng/mL、約10～50 ng/mL、約15～30 ng/mL、約20～30 ng/mL、約20～50 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のVEGFを、特定培養培地中に含めることができる。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度のVEGFを特定培養培地中に含める。

40

【0095】

3. FGF-2

塩基性線維芽細胞成長因子(bFGFまたはFGF-2ともいわれる)は、様々な生物学的過程(肢および神経系の発生、創傷治癒、および腫瘍成長が含まれる)に關与している成長因子である。bFGFはヒト胚性幹細胞のフィーダー非依存性成長を支持するために使用されていたが(Ludwigら、(2006)、以前の研究ではbFGFは造血細胞の発生または生存に影響を及ぼす可能性は低いと示されていた(Ratajczakら、1996)。一定の実施形態では、bFGFは分化を誘導するために必要ではない。

50

したがって、種々の実施形態では、bFGFは、本発明の培地中に含めても排除してもよい。

【0096】

約5～約100 ng/mL、5～約50 ng/mL、約5～約25 ng/mL、約25～約50 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のbFGFを特定培養培地中に含めることができる。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または約75 ng/mLの濃度のbFGFを特定培養培地中に含める。これらの濃度は、未分化状態または実質的に未分化状態の多能性細胞の維持のために使用される培地に特に有用であり得る。種々の実施形態では、FG2（例えば、約100 ng/mL）を、細胞の多能性の維持のために使用することができる。造血分化を促進するために、細胞を約5～50 ng/mLの濃度のFG2に曝露することができる。

10

【0097】

種々の実施形態では、より低い濃度のbFGFを造血分化前の「前条件付け」培養段階で特定培地中に含めることができることが本発明者によって発見された。例えば、約5 ng/mL～約50 ng/mL、約10 ng/mL～約30 ng/mL、約15 ng/mL～約25 ng/mL、約50 ng/mL未満、約40 ng/mL未満、約30 ng/mL未満、または約10、15、20、25、もしくは30 ng/mLのbFGFを、細胞の造血前駆細胞への分化前に多能性細胞の前条件付け培養中の特定培地中に含めることができる。一定の実施形態では、bFGF（例えば、約25～75 ng/mLまたは約50 ng/mL）またはFGF-2および0.1 ng/mL TGF- β を補足した成長因子を含まないTeSR培地を、造血分化前の多能性細胞の前条件付け培養中で使用することができる。一定の実施形態では、この前条件付け工程は、その後の造血分化を促進するために不可欠であり得る。

20

【0098】

多能性細胞を前条件付けした後（例えば、TGF- β およびFGF-2を補足した成長因子を含まないTeSR培地中で約1日間）、細胞を、BMP4、VEGF、およびFGF-2（例えば、約25～50 ng/mL）を含むEB分化培地中に入れることができる。以下の実施例に示すように、FGF-2を含めることにより、多能性細胞（hESCまたはiPSCなど）の造血前駆細胞への分化効率が少なくとも倍増し得る。

30

【0099】

一定の実施形態では、他の線維芽細胞成長因子（酸性FGF（aFGF）、FGF4、FGF9、FGF17、またはFGF18など）を、例えば、上記の濃度でbFGFの代わりに使用することができるか、bFGFと共に含めることができると想定される。あるいは、FGF-2模倣化合物を、FGF-2の代わりに使用して実質的または本質的に同一の効果を得ることができる。FGF-2模倣物には、FGF-2を模倣するペプチド、抗体、および小分子が含まれる。例えば、合成ペプチドF2A4-K-NSは*in vitro*および*in vivo*でFGF-2の影響を模倣し（Linら、2006）、本発明の種々の実施形態においてFGF-2の代わりに使用することができる。

40

【0100】

FGルーブ（FGL）ペプチドは、本発明の一定の実施形態で使用することができるFGF-2模倣物の別の例である。FGLは、NCAM部位のFGFR1への結合の一部を示すNCAMの第2のF3モジュール中の15アミノ酸配列である。FGLは、FGFR1に結合して活性化し、神経突起の伸長を刺激することが示されている（Kiselyovaら、2003）。

【0101】

BioSET F2Aペプチドを、FGF-2の代わりに使用することもできる。BioSET F2Aペプチドは、天然ヒトFGF-2成長因子の合成模倣物である。BioSET F2AペプチドおよびF2A4-KNSペプチドは、FYI Tournier, Inc. またはBioSurface Engineering Technology

50

es, Inc. (「BioSET」) から利用可能である。FGF-2 模倣化合物の組み合わせを本発明の種々の実施形態で FGF-2 の代わりに使用することもできることが想定される。

【0102】

4. IL-3

インターロイキン-3 (IL-3) は、多分化能造血細胞の生存、増殖、および分化に關与する造血成長因子である。5つの哺乳動物種 (ヒトが含まれる) では、IL-3 をコードする遺伝子を単離し、成熟組換えタンパク質が得られるように発現している。ヒト IL-3 遺伝子は、2つの保存システイン残基および2つの潜在的なN結合グリコシル化部位を有する133アミノ酸のタンパク質をコードする (Wagemakerら、1990)。

10

【0103】

一定の実施形態では、2.5 ~ 約50 ng/mL、2.5 ~ 約50 ng/mL、約5 ~ 約50 ng/mL、約5 ~ 約25 ng/mL、約5 ~ 約15 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のIL-3を、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、約30 ng/mLの濃度のIL-3を特定培養培地中に含める。以下の実施例に示すように、Flt3リガンドおよびIL-3は、多能性細胞の造血前駆細胞への分化に対して相乗作用を発揮し得る。一定の実施形態では、IL-3を、多能性細胞培養において培地中に最初のおよそ1~3週間含めるか、多能性細胞の分化を促進するために培地に約5日目から約7日目まで含め、その後

20

【0104】

5. FLT3リガンド

Flt3リガンド (FLT3リガンドとも呼ばれる) は、FLT3の内因性リガンドである。FLT3は、未熟造血前駆細胞によって発現される受容体チロシンキナーゼである。FLT3のリガンドは、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質であり、種々の細胞 (造血細胞および骨髄間質細胞が含まれる) によって発現される。他の成長因子と組み合わせ、Flt3リガンドは幹細胞、骨髄前駆細胞およびリンパ前駆細胞、樹状細胞、およびナチュラルキラー細胞の増殖および発生を刺激することができる。受容体の活性化により、造血細胞の増殖、生存、および他の過程を調節する異なるシグナル伝達経路に關与することが公知の種々の重要なアダプタータンパク質がチロシンリン酸化される。FLT3およびFLT3に影響を及ぼす変異はまた、病理学的疾患 (白血病の予後および治療など) で重要である (Drexlerら、2004)。

30

【0105】

一定の実施形態では、5 ~ 約100 ng/mL、5 ~ 約50 ng/mL、約10 ~ 約30 ng/mL、約15 ~ 約30 ng/mL、約20 ~ 約30 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のFlt3リガンドを、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50 ng/mLの濃度のFlt3リガンドを特定培養培地中に含める。一定の実施形態では、Flt3リガンドを、多能性細胞培養において培地中に最初のおよそ1~3週間含めるか、多能性細胞の分化を促進するために培地中に培養約5日目から約7日目まで含め、その後

40

【0106】

6. 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSFまたはGMCSFとも省略される) は、マクロファージ、T細胞、肥満細胞、内皮細胞、および線維芽細胞によって分泌されるタンパク質である。GMCSFは白血球成長因子として機能することができるサイトカインであり、GMCSFは、幹細胞を刺激して顆粒球 (好中球、好酸球、および好

50

塩基球)および単球を産生することができる。単球は循環血中に存在し、マクロファージに成熟することができる。したがって、GMCSFは、少数のマクロファージの活性化によってその数を迅速に増加させることができる免疫/炎症カスケード(感染との戦いに不可欠な過程)で役割を果たし得る。GMCSFの活性形態は、典型的には、ホモ二量体として*in vivo*で細胞外に見出される。GMCSFはまた、酵母細胞中で発現する場合、モルグラモスチムまたはサルグラモスチム(ロイカイン)と呼ばれる。一定の実施形態では、組換え産生した成長因子を使用して多能性細胞の造血分化を促進することができる。

【0107】

一定の実施形態では、約2.5~約100ng/mL、2.5~約50ng/mL、約5~約50ng/mL、約5~約25ng/mL、約5~約15ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のGMCSFを、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、または約30ng/mLの濃度のGMCSFを特定培養培地中に含める。一定の実施形態では、GMCSFリガンドを、多能性細胞培養において培地中に最初のおよそ1~3週間含めるか、多能性細胞の分化を促進するために培地中に培養約5日目から約7日目まで含め、その後には分化にほとんどまたは本質的に全く有害作用を及ぼすことなく系から除去することができる。

10

【0108】

7. 幹細胞因子

幹細胞因子(SCF)は、CD117(c-Kit)に結合するサイトカインである。SCFは、「KITリガンド」、「c-kitリガンド」、または「スティール因子」としても公知である。SCFは以下の2つの形態で存在する:細胞表面結合SCFおよび可溶性(または遊離)SCF。可溶性SCFは、典型的には、メタロプロテアーゼによる表面結合SCFの切断によって*in vivo*で産生される。SCFは、造血幹細胞および他の造血前駆細胞の生存、増殖、および分化に重要であり得る。*in vivo*では、SCFは、BFU-E(赤芽球バースト形成単位)細胞(赤血球系における最初期の赤血球前駆体である)をCFU-E(赤芽球コロニー形成単位)に変化させることができる。

20

【0109】

一定の実施形態では、約5~約100ng/mL、5~約50ng/mL、約10~約30ng/mL、約15~約30ng/mL、約20~約30ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のSCFを、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約50ng/mLの濃度のSCFを特定培養培地中に含める。

30

【0110】

8. IL-6

インターロイキン-6(IL-6)は炎症促進性サイトカインである。*in vivo*では、IL-6はT細胞およびマクロファージによって分泌され、外傷または他の組織損傷に対する免疫応答を刺激して、炎症を引き起こす。IL-6は一定の細菌に対する応答でも役割を果たすことができ、骨芽細胞は*in vivo*でIL-6を分泌して破骨細胞形成を刺激する。ヒトでは、多数の血管の中膜中の平滑筋細胞は、炎症促進性サイトカインとしてIL-6を産生することができ、IL-6は発熱の重要な*in vivo*メディエーターである。

40

【0111】

一定の実施形態では、約2.5~約100ng/mL、2.5~約50ng/mL、約5~約50ng/mL、約5~約25ng/mL、約5~約15ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度のIL-6を、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約2.5、5、10、15、20、25、または約30ng/mLの濃度のIL-6を特定培養培地中に含める。

【0112】

9. TPO

50

トロンボポエチン（すなわち、TPO）は、肝臓および腎臓によって *in vivo* で主に産生され、骨髄中での血小板の *in vivo* 生成に関する糖タンパク質ホルモンである。一定の実施形態では、約 2.5 ~ 約 100 ng/mL、5 ~ 約 75 ng/mL、約 10 ~ 約 50 ng/mL、約 15 ~ 約 35 ng/mL、約 25 ng/mL、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度の TPO を、本発明の培養培地中に含める。一定の実施形態では、約 2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または約 50 ng/mL の濃度の TPO を特定培養培地中に含める。

【0113】

B. マトリックス成分

培養培地は、1つまたは複数のマトリックス成分（フィブロネクチンまたは RGD ペプチドなど）を含むことができる。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、マトリックス成分により、胚性幹細胞の成長のための固体支持体を得ることができる。一定の実施形態では、マトリックス成分を、培養表面に適用し、細胞の培地への播種前に培養培地と接触させることができる。例えば、細胞を、フィブロネクチンまたはマトリゲル（商標）でコーティングしたプレート上の特定培地（例えば、TeSR 培地）中で培養し、その後細胞を凝集塊または個別化細胞に機械的に分離し、造血前駆細胞への分化を誘導することができる。

10

【0114】

種々のマトリックス成分（コラーゲン（例えば、IV 型コラーゲン）、ラミニン、ビトロネクチン、マトリゲル（商標）、ゼラチン、ポリリジン、トロンボスポンジン（例えば、TSP-1、-2、-3、-4、および/または -5）、および/またはプロネクチン-F（商標）が含まれる）を使用して、多能性細胞を培養することができる。一定の実施形態では、TeSR を使用した予め培養した細胞と共にマトリゲル（商標）、IV 型コラーゲン、またはラミニンを使用して、細胞生存度に及ぼす可能性のある有害作用を回避することができる。それにもかかわらず、これらの組成物を他のマトリックス成分と組み合わせることで有利に使用することができる。これらのマトリックス成分の組み合わせは、細胞成長および細胞生存度の促進のためのさらなる利点を得ることができる。一定の実施形態では、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える上記マトリックス成分を使用して、例えば、造血分化前に細胞を培養することができる。

20

【0115】

1. RGD ペプチド

RGD ペプチドを、特定細胞培養培地中でマトリックス成分として使用することができる。RGD ペプチドは、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を含む接着タンパク質であり、一定の RGD ペプチドは細胞の接着、移動、および成長で重要な役割を果たし得る。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、RGD ペプチドにより、胚性幹細胞の分化および成長を可能にするためのフィブロネクチンに類似の胚性幹細胞の物理的基質を得ることができる。一定の実施形態では、合成 RGD ペプチドを本発明と共に使用することができる。

30

【0116】

例えば、約 0.05 ~ 0.2 mg/mL または約 0.1 mg/mL の濃度の RGD ペプチドを特定培養培地中に含めることができる。一定の実施形態では、プロネクチン F を使用して、細胞培養物の表面をコーティングすることができる。プロネクチン F (PnF) は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) の 13 部位を典型的に含む市販の RGD ペプチドである。

40

【0117】

C. ROCK インヒビターおよび PKC インヒビター

本発明のなおさらなる態様では、さらなる培地成分（細胞の解離後（例えば、細胞集団の分割中または EB 形成前）の ES 細胞のアポトーシスを軽減するか、生存を促進する分子など）を ES 細胞成長培地中に含めることができる。特定培養培地を使用して ES 細胞を播種、培養、維持、または分化することができ、この培地は、Rho 非依存性キナーゼ

50

(ROCK)のインヒビターおよび/またはプロテインキナーゼC(PKC)のインヒビターを含むことができる。一定の実施形態では、ROCKインヒビターおよび/またはPKCインヒビターを使用して、個別化後の多能性細胞の生存および分化有効性を強化することができる。一定の実施形態では、ROCKインヒビターおよび/またはPKCインヒビターを、TeSRまたはmTeSR培地およびマトリックス成分を含む播種培地中に含めることができる。

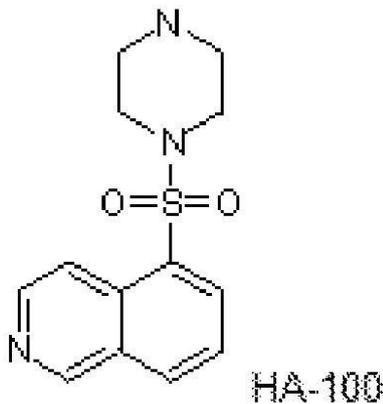
【0118】

一定の実施形態では、特定培養培地は、1つまたは複数のRho関連キナーゼ(ROCK)インヒビター(Y-27632またはその誘導体など)を含むことができる。さらに、いくつかの態様では、特定培地は、HA-100:

10

【0119】

【化1】



20

またはその誘導体を含むことができる。

【0120】

HA-100またはY-27632は、ES細胞成長培地中に、例えば、約1~15 μM、5~15 μM、1~30 μM、5~30 μM、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 μM、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度で存在し得る。一定の実施形態では、HA-100またはY-27632は、約10~20 μMでES細胞成長培地中に存在する。

30

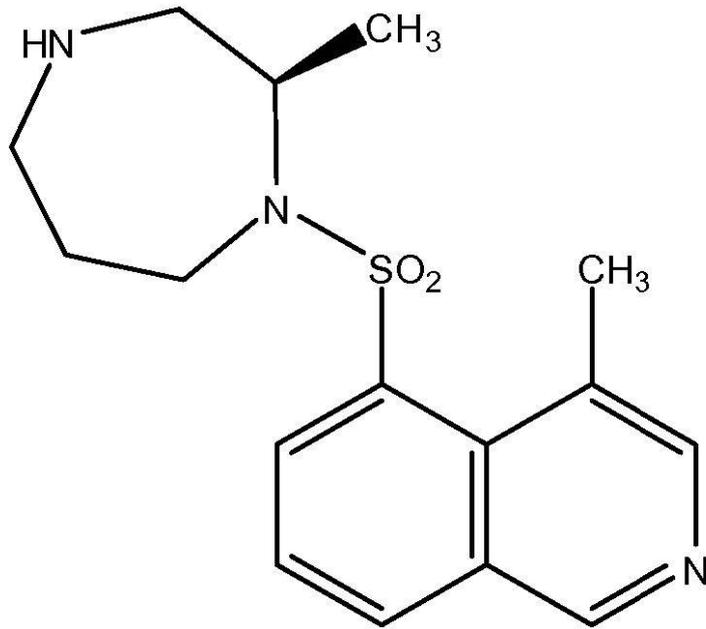
【0121】

本発明のES細胞成長培地中に含めることができる他のROCKインヒビターには、H-1152((S)-(+) - 2 - メチル - 1 - [(4 - メチル - 5 - イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン)が含まれる。H-1152は、HA-100のおよそ10倍の効力を示す。したがって、H-1152は、ES細胞成長培地中に、例えば、約0.1~10 μM、約0.5~5 μM、約1~3 μM、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5 μM、またはこれらから導き出される任意の範囲の濃度で存在し得る。一定の実施形態では、HA-100は、約1 μMでES細胞成長培地中に存在する。96ウェルプレート中で個別化ヒトES細胞の非常に効率的な播種が可能なH-1152(HA-100に類似するが、濃度が1/10)。細胞凝集塊中で別の方法で継代される個別化HES細胞によってウェルあたりより均一な細胞密度を得ることができ、このことは、細胞ベースの小分子スクリーニングの厳格な必須条件である。したがって、H-1152を、本発明の自動化細胞培養を含むES細胞ベースの小分子スクリーニングのためのプロトコルで使用することができる。H-1152は、例えば、Ikemuraら(2002)およびSasakiら(2002)(本明細書中で参考として援用される)に以前に記載されている。

40

【0122】

【化 2】



H-1152

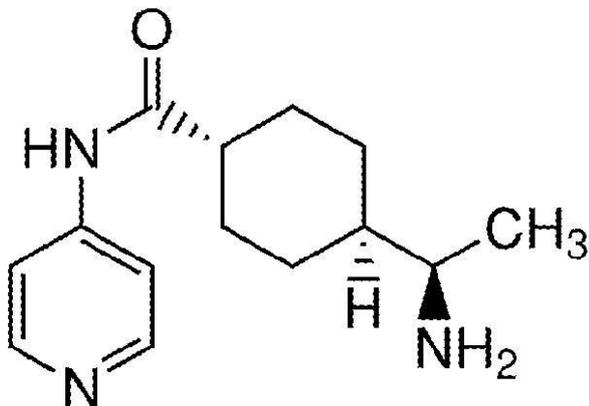
10

E S 細胞成長培地中に含めることができる他の ROCK インヒビターには、Y - 276 32、N - (4 - ピリジル) - N - (2, 4, 6 - トリクロロフェニル) 尿素、3 - (4 - ピリジル) - 1H - インドール、グリシル - H1152 ((S) - (+) - 2 - メチル - 4 - グリシル - 1 - (4 - メチルイソキノリニル - 5 - スルホニル) ホモピペラジン)、および/または HA1100 (ヒドロキシファルスジル) が含まれる。Y - 27632 ((R) - (+) - トランス - 4 - (1 - アミノエチル) - N - (4 - ピリジル) シクロヘキサンカルボキサミド) は、Sigma - Aldrich から市販されており、以前に記載されている (例えば、Maekawara、1999; Daviesら、2000 を参照のこと)。

20

【0123】

【化 3】



Y-27632

30

40

細胞生存を促進するために使用することができる例示的な ROCK インヒビターには、HA100、H1152、(+)-トランス - 4 - (1 - アミノエチル) - 1 - (ピリジン - 4 - イルアミノカルボニル) シクロヘキサンジヒドロクロリド水和物 (例えば、WO00078351、WO00057913)、イミダゾピリジン誘導体 (例えば、US7348339)、置換ピリミジンおよびピリジン誘導体 (例えば、US6943172)、および置換イソキノリン - スルホニル化合物 (例えば、EP00187371) が含まれるが、これらに限定されない。

【0124】

50

P K CインヒビターをR O C Kインヒビターと組み合わせるかその代替物として使用することができることが予測される。例えば、多能性細胞の解離または個別化後且つ造血前駆細胞への分化前に、例えば、P K Cインヒビターを使用して、細胞生存を促進することができる。使用することができるP K Cインヒビターには、例えば、V 5ペプチド（例えば、U S 7 4 5 9 4 2 4）、ポリミキシンB、カルホスチンC、バルミトイル-D L -カルニチン、ステアロイルカルニチン、ヘキサデシルホスホコリン、スタウロスポリンおよびその誘導体、サンギバマイシン；サフィンゴール、D -エリスロ - スフィンゴシン；塩化ケレトリン、メリチン；塩化デカリニウム；エラグ酸、H B D D E、1 - O - ヘキサデシル - 2 - O - メチル - ラック - グリセロール、ヘペリシン、K - 2 5 2、N G I C - J、フロレチン、ピセアタンノール、クエン酸タモキシフェン、置換ピペラジンおよびチアジン（例えば、U S 6 8 1 5 4 5 0）が含まれる。

10

【0125】

D . 他の成分

特定培養培地はまた、さらなる成分（栄養素、アミノ酸、抗生物質、緩衝剤など）を含むことができる。一定の実施形態では、本発明の特定培養培地は、非必須アミノ酸、L - グルタミン、P e n - s t r e p、およびモノチオグリセロールを含むことができる。

【0126】

例えば、約10% ~ 約30%の量または約20%の量のB I T 9 5 0 0 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s I n c . , V a n c o u v e r , C a n a d a) を本発明の特定培養培地中に含めることもできる。B I T 9 5 0 0は、I s c o v e のM D M中にウシ血清アルブミン、インスリン、およびトランスフェリン（B I T）の予め試験したバッチを含む。B I T 9 5 0 0は、50mg / mLウシ血清アルブミン（N a H C O ₃で緩衝化）、50μg / mL r hインスリン、1mg / mLヒトトランスフェリン（鉄飽和）を含む。一定の実施形態では、特定培地を必要としない実施形態においてK O S RをB I T 9 5 0 0の代わりに使用することができる。K O S Rは市販の非特定培地であり（例えば、G i b c o / I n v i t r o g e n , カタログ番号10828）、以前にW O 9 8 / 3 0 6 7 9に記載されている。

20

【0127】

上記のように、B I Tの使用をH I Tに置換することができる。H I Tは、成分（血清アルブミンなど）がヒト成分（例えば、ヒト血清アルブミン）であることを除いて、B I Tについて記載の組成物を含む。例えば、H I Tの使用は、感染リスクなどが特に懸念される実施形態で好ましいかもしれない。

30

【0128】

血清代替物3（S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O）を、B I T 9 5 0 0の代わりに使用することもできる。血清代替物3は、ヒトタンパク質（すなわち、ヒト血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、ヒト組換えインスリン）のみを含む。血清代替物3は、成長因子、ステロイドホルモン、糖質コルチコイド、細胞接着因子、検出可能なI g、または分裂促進因子を含まない。以下の実施例に示すように、血清代替物3を含めることにより、一定の実施形態では、分化をさらに促進することができる。

【0129】

種々の実施形態では、特定培養培地は、1つまたは複数のビタミン、ミネラル、塩、脂質、アミノ酸、または他の成分を含むことができる。例えば、本発明の特定培地は、T e S R培地中に存在する1つまたは複数の成分（例えば、T e S R中に含まれる濃度に同一または匹敵する濃度）を含むことができる。

40

【0130】

V I I I . 細胞の分離

胚性幹細胞からの造血（例えば、C D 3 4 +、C D 4 3 +）前駆細胞または内皮細胞（例えば、C D 3 1 +）の調製後、細胞集団からさらにまたは実質的に分化された細胞（例えば、造血前駆細胞、内皮細胞など）の1つまたは複数の亜集団を実質的に精製または分離することが望ましいかもしれない。フローサイトメトリー（F A C Sなど）または磁性

50

活性化細胞分取を使用した細胞の分離方法を使用して、異種細胞集団から造血細胞を分離することができる。

【0131】

A. 磁性活性化細胞分取 (MACS)

CD34⁺、CD43⁺、CD31⁺、および/またはCD45⁺細胞を、磁性活性化細胞分取器 (MACS) を使用して分化したhESCから単離することができる。MACSは、典型的には、カラムから細胞を分離するための磁性ビーズと組み合わせて抗体 (抗CD34抗体など) を使用する。MACSは、一定の実施形態では、FACSと比較して細胞に対して穏やかであり、細胞生存度および完全性に好ましい影響を及ぼし得る。これはおそらくFACSに関連する細胞のレーザー照射に起因する。

10

【0132】

種々のMACS製品は市販されている (MACS MicroBeads (商標) カラムまたはAutoMACS (商標) (Miltenyi Biotec, CA, USA) (製造者の説明書にしたがって使用することができる) が含まれる)。PBS/0.5% BSA (EDTAなし) を、細胞単離のための緩衝液として使用することができる。いくつかの実験では、死細胞除去キット (Miltenyi Biotec) を使用して、CD34⁺細胞の単離前に死細胞を除去することができる。必要に応じて、MACSカラムを繰り返し使用することができる。

【0133】

B. FACS

蛍光標示式細胞分取 (FACS) を使用して、CD34⁺細胞を分離することもできる。FACSは、例えば、細胞を分離するための蛍光タグを含む抗CD34抗体への結合に起因する細胞によって示される蛍光の程度を使用する。このような方法で、FACSを使用して不均一な細胞集団から造血CD34⁺細胞を分離することができる。

20

【0134】

例えば、以下のプロトコールを使用してFACSを実施し、造血細胞を定量することができる。1% FBSまたは0.5% BSAを含むPBS中で細胞を調製し、モノクローナル抗体 (mAb) の組み合わせ (CD31-PE (クローンWM-59)、CD34-APC (クローン581、8G12)、CD45-FITC (クローンHI30) (全てBD Pharmingen製)、およびKDR-PE (クローン89106) (R&D system) など) にて4で15~30分間標識することができる。50倍希釈の特異的抗体および200倍希釈のIgGコントロールを使用することができる。サンプルをFACS Calibur (商標) (Becton-Dickson, New Jersey, U.S.A.) によって分析することができる。

30

【0135】

IX. バイオリアクターおよびロボット自動化

幹細胞の培養および/または胚性幹細胞からの造血前駆細胞の分化のための1つまたは複数の工程を自動化することができる。ロボット自動化または他の自動化を使用した過程の自動化により、細胞をより有効且つ経済的に産生、培養、および分化する方法を得ることが可能である。例えば、ロボット自動化を、1つまたは複数のヒト胚性幹細胞の培養、継代、培地の添加、分化培地の添加、分化培地での培養、および細胞型の分離 (例えば、磁性分離またはFACSの使用) と併せて使用することができる。

40

【0136】

バイオリアクターを本発明と併せて使用して、本発明にしたがって細胞 (例えば、ヒト胚性幹細胞、CD34⁺細胞、造血細胞など) を培養、維持、および/または分化することもできる。バイオリアクターにより、大量の細胞を産生するための過程の「スケールアップ」が可能という利点を得られる。種々のバイオリアクター (回分バイオリアクター、流加回分バイオリアクター、連続バイオリアクター (例えば、連続攪拌タンクリアクターモデル)、および/またはケモスタットが含まれる) を本発明と共に使用することができる。

50

【0137】

例えば、スピナーフラスコを使用して、多能性細胞を維持および/または分化するための方法をスケールアップして、多数の細胞を生成することができる。一定の実施形態では、以下のプロトコルを使用してスピナーフラスコ中でのEB形成を促進することができる：未分化のhESCおよびiPSCを、マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させ、例えば、約37℃で約5分間のTrypLE処理を使用してコンフルエンスで採取することができる。細胞を、約20%BIT9500 (Stem Cell Technologies) または血清代替物-3 (Sigma Aldrich)、約1%NEAA、約1mM L-グルタミン、および約0.1mMメルカプトエタノール、約0.75%BSA、約50ug/mlアスコルビン酸、および約1μM ROCKインヒビター (例えば、H-1152) を補足したIMDMを含むEB基本培地中で採取することができる。次いで、細胞を、約50~200万個/mlの密度でスピナーフラスコ (例えば、125mlコーニング) 中に入れることができる。スピナーを30~40rpmで一晩に設定してEB形成を促進することができる。あるいは、細胞を、低付着プレート中に静止条件下で24時間置くことができる。一般に、使用した特定のスピナーフラスコまたはバイオリアクターに応じて細胞密度および/またはスピナーフラスコの移動速度を変化させることができると認識される。培養約12~24時間後、細胞を、例えば、約60RPMの速度で回転したスピナーフラスコ中の磁性攪拌プラットフォーム上のサイトカインを含むがROCKインヒビターを含まないEB分化培地中に入れることができる。スピナーフラスコのサイドキャップを緩めて気体を移動させることができる。細胞を、約50ng/ml骨形成因子 (BMP-4)、約50ng/ml血管 (vascular) 内皮成長因子 (VEGF)、および約25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を補足したEB基本培地中に入れることができる。分化約4日目に、懸濁したEB凝集体がフラスコの底部に15~20分間沈殿できるようにスピナーフラスコを静止させたままにすることによって細胞に補給することができる。次いで、消費した培地を吸引することができる (例えば、125mlスピナー中に約20mLが残存する)。次いで、細胞を穏やかに巡回させ、約50ng/ml骨形成因子 (BMP-4)、約50ng/ml血管 (vascular) 内皮成長因子 (VEGF)、および約25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を含む新鮮な培地を細胞に添加することができる。実質的により高いか低い回転速度を使用することができると予測されるにもかかわらず、スピナーフラスコを、全造血分化過程を通して約40~60rpmの速度に設定することができる。分化約5~6日目に、消費した培地を上記のように吸引し、細胞を、例えば、(1)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約10mg/mlのIL-3、および約10ng/ml GM-CSF、または(2)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約25ng/mlのSCF、約25ng/mlのTPO、約10ng/ml IL-3、および約10ng/ml IL-6のいずれかを補足したEB基本培地中に入れることができる。消費した培地を、約8日目および10日目に上記のように吸引することができる。EB培養物を、分化約12日目に採取することができる。細胞を、表面マーカー (例えば、CD34+、CD45+、CD43+、CD41+、CD235a+、CD31+) の表現型発現について染色して、集団の造血前駆体含有量を定量することができる。以下の実施例に示すように、これらのアプローチを首尾よく使用して種々の細胞系列 (例えば、赤血球、巨核球、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、顆粒球) を生成することができ、iPS細胞またはhESCを使用して類似の結果を得ることができる。

【0138】

本発明との使用を特に想定したロボット自動化は、例えば、Tecan (CA, USA) から得ることができる。ロボットは、液体操作ツール (サンプル間の繰越し汚染を最小にするためのキャップ貫通プローブおよび使い捨てチップなど) を含むことができる。種々の実施形態では、ロボティクスを、1つまたは複数の細胞培養用のバイオリアクターと併せて (例えば、hESCの維持または成長、hESCの造血細胞への分化、または造血細胞の次の系列 (赤血球など) への分化の間に) 使用することができる。以下の実施例に

10

20

30

40

50

示すように、造血前駆細胞の維持および生成のための条件を、Tecan Cellerity (商標) システム (産業的に関連するロボットプラットフォーム) を使用して少なくとも部分的または完全に自動化することができる。Tecan Cellerity (商標) は、Tecan 液体操作ロボット (Freedom EVO 200)、自動化インキュベーター (Storax 500) (容量は500 Roboflasks (商標))、培地保存用冷却装置、Cedex 細胞カウンター、懸濁細胞の増殖および播種用のスピナーフラスコ、ならびにプレートおよび8チャンネル固定チップピペットを操作するためのROMAロボットアームを備えている。EB分化プロトコールの一部、本質的に全て、または全てを自動化することができる。例えば、分化12日目に、細胞をTecan Cellerity システムによって採取し、マーカーの細胞表面染色のために手作業で洗浄することができる。染色後、細胞を、Accuriフローサイトメーターに接続したHypercytを使用して分析することができる。この過程を、造血前駆体集団の高処理スクリーニングのために使用することができる。一定の実施形態では、未分化のhESCまたはiPSCを、上記の方法によって、例えば、マトリゲル(商標)コーティングしたロボフラスコ(Corning)を使用してロボット上で培養することができる。EBの維持、播種、補給、および/または採取を、例えば、Tecan Cellerity (商標) システムを使用して、部分的または完全に自動化することができる。このロボットはスピナーフラスコを含める収容力を有し、またはバイオリクターを使用して多数の細胞を生成することができる。

【0139】

一定の実施形態では、本発明の方法を小型化または「スケールダウン」するのに有用であり得る。これらのアプローチは、例えば、方法が、例えば、細胞の特定の系列への脱分化または分化を促進することができる化合物の高処理スクリーニングを含む場合、特に有用であり得る。高処理スクリーニングを使用して、候補物質の1つまたは複数の性質(例えば、毒性、分化を促進または軽減する能力など)を評価することもできる。方法の小型化は、低付着プレート(例えば、96ウェルプレート)および/または低酸素(例えば、約25%O₂または約5%O₂未満)条件下での細胞培養の使用を含むことができる。一定の実施形態では、以下の方法を使用することができる:マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESC'またはiPSC'に、約0.1ng/ml TGFおよび約20ng/mlゼブラフィッシュFGFを補足した成長因子を含まないTeSRを使用して24時間前条件付けすることができる。細胞を、例えば、約37°Cで約5分間のTrypLE処理を使用してコンフルエンスで採取することができる。細胞を、約20%BIT9500または血清代替物-3、約1%NEAA、約1mM L-グルタミン、および約0.1mMメルカプトエタノール、約0.75%BSA、約50μg/mlアスコルビン酸、および約1μM ROCKインヒビター(例えば、H-1152)を補足したIMDMを含むEB基本培地中で採取することができる。EB形成を開始させるために、細胞を、ROCKインヒビターを含むEB基本培地中に約10万個/ウェルの密度で低付着96ウェルプレート中に入れることができる。正確な細胞の使用濃度を類似の結果を達成するために変化させることができると予測される。EB形成を、低O₂条件でプレートをインキュベートすることによって容易にすることもできる。約12~24時間後、細胞を、約50ng/ml骨形成因子(BMP-4)、約50ng/ml血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、および約25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を含むEB分化培地中に入れることができる。例えば、96ウェルプレート中のウェルあたり約300μlの培地を使用することができる。分化約3~4日目に、消費培地体積の半分(例えば、100~150μl)を穏やかに除去し、且つ同体積の新鮮な培地を添加することによって、細胞に培地の半分を補給することができる。分化約5~6日目に、消費した培地を上記のように吸引することができ、細胞を、例えば、(1)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約10mg/mlのIL-3、および約10ng/ml GMCSF、または(2)約25ng/mlのFlt-3リガンド、約25ng/mlのSCF、約25ng/mlのTPO、約10ng/ml IL-3、

および約 10 ng/ml IL-6 を含む培地のいずれかを補足した EB 基本培地中に入れることができる。上記のように、分化約 8 日目および 10 日目に、分化 EB 培養物に新鮮な培地を半分補給することができる。分化約 12 日目に、EB 培養物を採取することができる。以下の実施例に示すように、これらのアプローチを首尾よく使用して種々の細胞系列（例えば、赤血球、巨核球、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、顆粒球）を生成することができ、iPS 細胞または hESC を使用して類似の結果を得ることができる。

【0140】

本発明の方法を、ロボット自動化を使用して、プレートに単一の細胞を付着させるように細胞を誘導するために培地中に ROCK インヒビター HA100 および / または H1152 を含めることによって単一細胞アッセイで使用することができる。ロボットでの培養系への小分子 HA100 または H1152 または Y-27632 の添加により、多能性細胞 (ES、hESC、および iPS 細胞が含まれる) の生存度を非常に改善することができる。一定の実施形態では、TESR 培地中での多能性細胞の生存を、特に細胞をタンパク質分解的または機械的に凝集塊に分離するか個別化した後に ROCK インヒビターまたは PKC インヒビターを含めることによって改善することができる。ROCK インヒビターは、個別化した hES 細胞の表面への付着および成長を促進することができる。多能性細胞の維持または増殖および造血前駆細胞または特異的造血系列への分化の過程のいくつかがまたは全てを自動化することができる。自動化方法の一部または全部は、特定条件を使用することができる。

10

【0141】

X. キット

本発明はまた、本発明で用いるキットを意図する。例えば、キットは、1 つまたは複数の密封バイアル中に本明細書中に記載の分化培地を含むことができる。キットは、細胞 (多能性幹細胞、前駆細胞、造血前駆細胞、または内皮前駆細胞など) を含むことができる。

20

【0142】

キットはまた、前駆細胞 (造血前駆細胞または内皮前駆細胞など) の産生のための説明書を含むことができる。あるいは、説明書は、造血細胞、内皮細胞、肥満細胞、樹状細胞、巨核球、顆粒球、マクロファージ、または赤血球の産生を指示することができる。

30

【0143】

適切なキットは、適切な容器および包装材料 (管、バイアル、ならびに収縮包装および中空成形包装が含まれる) 中に本発明で用いる種々の試薬を含む。本発明のキット中に含めるのに適切な材料には、1 つまたは複数の本明細書中に記載の特定培地および 1 つまたは複数の細胞が含まれるが、これらに限定されない。ここで、細胞は、本明細書中に示す方法にしたがって少なくとも部分的に分化した多能性細胞または多能性細胞である。一定の好ましい実施形態では、複数の多能性細胞または少なくとも部分的に分化した細胞を、本発明のキット中に含む。

【0144】

XI. スクリーニングアッセイ

本発明は、スクリーニングアッセイ (多能性幹細胞の前駆細胞への分化を促進する能力についての候補物質の同定に有用なスクリーニングアッセイなど) を意図する。例えば、造血細胞、造血前駆細胞、および / または内皮細胞を使用して、候補物質の薬理学および / または毒性学を評価することができる。したがって、本明細書中に記載の方法によって分化した細胞を使用したスクリーニング方法を使用して、細胞に影響を及ぼし得る疾患に関連する 1 つまたは複数の症状を緩和することができる治療化合物を同定することができる。他の実施形態では、分化細胞を利用して、細胞に有毒な化合物を同定することができる。あるいは、スクリーニング法は、細胞の分化または脱分化を促進することができる候補物質に細胞を曝露する工程を含むことができる。

40

【0145】

本明細書中で使用する場合、用語「候補物質」は、多能性幹細胞の前駆細胞への分化を

50

促進する任意の物質をいう。候補物質には、天然に存在する化合物のフラグメントまたは一部が含まれ得るか、そうでなければ不活性な公知の化合物の活性な組み合わせとしてみ見出され得る。1つの実施形態では、候補物質は小分子である。さらに他の実施形態では、候補物質には、有機小分子、そのペプチドまたはフラグメント、ペプチド様分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、タンパク質、酵素、塩、アミノ酸、ビタミン、マトリックス成分、インヒビター、抗生物質、抗体、抗体フラグメント、ミネラル、脂質、または他の有機（炭素含有）分子または無機分子が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0146】

XII. 薬学的調製物

本明細書中に記載の方法にしたがって分化したか、本明細書中に記載の方法にしたがって分化した細胞に由来する細胞を薬学的調製物中に含め、被験体（ヒト患者など）に投与することができる。薬学的調製物を、一定の実施形態では、非経口または静脈内に投与することができる。

【0147】

本発明の薬学的組成物は、有効量の1つまたは複数の造血細胞、骨髄性細胞、もしくは赤血球系細胞、または薬学的に許容可能なキャリア中に溶解または懸濁したさらなる薬剤を含む。句「薬学的または薬理的に許容可能な」は、必要に応じて動物（例えば、ヒトなど）に投与した場合に有害反応、アレルギー反応、または他の副作用を生じない分子の実体および組成物をいう。少なくとも1つの造血細胞、骨髄性細胞、もしくは赤血球系細胞またはさらなる有効成分を含む薬学的組成物の調製は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., by University of the Sciences in Philadelphia（本明細書中で参考として援用される）に例示のように、本開示を考慮して当業者に公知であろう。さらに、動物（例えば、ヒト）投与のために、調製物はFDA Office of Biological Standardsが定める無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の標準を満たさなければならないと理解されるであろう。一般に、薬学的調製物を、典型的には、処方物中に存在する種々の造血細胞、骨髄性細胞、もしくは赤血球系細胞の生存性が促進されるように処方すると認識されるであろう。例えば、一定の実施形態では、組成物は、ヒト患者への静脈内投与のために溶液中に赤血球を含むことができる。

【0148】

本発明は、さらに、本明細書中に開示の方法によって得た薬学的有効量の前駆細胞、造血細胞、または内皮細胞を被験体に投与することにより、疾患、障害、または損傷を処置する方法を意図する。本発明のこれらの組成物の投与は、標的組織がその経路を介して利用可能である限り、任意の一般的経路による投与であろう。これには、全身的または非経口方法（静脈内注射、脊髄内注射、または脳内、皮内、皮下、筋肉内、もしくは腹腔内方法が含まれる）による投与が含まれる。治療の性質に応じて、投与はまた、経口、鼻、口内、直腸、膺、または局所手段による投与であり得る。

【0149】

本明細書中に開示の方法によって処置することができる疾患または障害には、脈管の疾患または障害、免疫学的疾患または障害、神経の疾患または障害、血液の疾患または障害、または損傷が含まれるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0150】

XIII. 実施例

以下の実施例を、本発明の好ましい実施形態を証明するために含める。以下の実施例中に開示の技術が本発明者によって本発明の実施で十分に機能することが発見された技術を示し、したがって、その実施に好ましい様式を構成すると見なすことができると当業者は認識すべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、開示の特定の実施形態で多数

10

20

30

40

50

の変更形態を得ることができ、本発明の精神および範囲を逸脱することなく同様または類似の結果を依然として得ることができると認識すべきである。

【0151】

実施例 1

EBの作製：マトリゲル（商標）コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、37℃で10分間のコラゲナーゼIV（1mg/ml）処理を使用してコンフルエンスで採取した。インキュベーション後にウェルを洗浄してコラゲナーゼを洗い流し、EB基本培地中へのウェルの搔爬によってEBを形成させた。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB分化培地と交換した。

【0152】

マトリゲル（商標）コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、37℃で6分間のTrypLE（商標）処理を使用してコンフルエンスで採取した。ウェル中のTrypLE（商標）を、1μM ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター（0.25mg/ml）を含む「EB基本培地」を使用して中和した。細胞を回収し、1μM ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター（0.25mg/ml）を含むEB基本培地で洗浄した。細胞を計数して生存度をチェックし、1μM ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター（0.25mg/ml）を含むEB基本培地中の低付着プレート中にプレートした。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB分化培地と交換した。

【0153】

EB形成および分化プロトコール：上記酵素を使用してEB形成を促進するために、細胞を、20%BIT9500（Stem Cell Technologies）、1%NEAA、1mM L-グルタミン、および0.1mMメルカプトエタノール（全てInvitrogen, Carlsbad, CA）、0.75%BSA、50ug/mlアスコルビン酸を補足したIMDMを含む「EB基本培地」中での一晚のインキュベーションのために6ウェル低付着プレートに移した。翌日、細胞を各ウェルから回収し、遠心分離した。細胞を、以下の成長因子およびサイトカインを補足したEB基本培地からなる「EB-分化培地」に懸濁した：50ng/ml骨形成因子（BMP-4）、50ng/ml血管内皮成長因子（VEGF）、25ng/ml幹細胞因子（SCF）；25ng/ml Flt-3リガンド（Flt-3L）、10ng/mlインターロイキン-3（IL-3）、10ng/mlインターロイキン-6（IL-6）、20ng/ml顆粒球コロニー刺激因子（G-CSFまたはGCSF）；20ng/ml顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSFまたはGMCSF）、0.2U/mlエリスロポエチン（EPO）、25ng/mlトロンボポエチン（Thrombopoietin）（TPO）（全てR&D Systems, Minneapolis, MN）、および25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2。EBを15mL管に移し、凝集体を5分間沈殿させることによって4日毎に培地を交換した。上清を吸引し、新鮮な分化培地と交換した。あるいは、細胞に、半量の新鮮な培地を2日毎に補給した。異なる過程の間の異なる時点で細胞を採取し、フローサイトメトリーによって表現型を評価し、CFUアッセイを使用して機能的能力を評価した。

【0154】

フローサイトメトリー：細胞を各ウェル/条件から回収し、培地で1回洗浄した。細胞ペレットを、TrypLE（商標）または0.5%トリプシンを使用して37℃のインキュベーター中で5~10分間消化し、その後培地で洗浄し、70μm細胞ストレーナーに通した。細胞をPBS-FBS含有FACS緩衝液に懸濁し、計数して細胞生存度を評価し、以下の蛍光色素抱合モノクローナル抗体で染色した：抗ヒトCD43（1G10）、抗ヒトCD31（WM-59）、抗ヒトCD41（HIP8）；抗ヒトCD45（HI30）、および抗ヒトCD34（581、8G12）（BD Biosciences San Jose, CA）；抗ヒトflk-1（89106）、（R&D Systems, Minneapolis, MN製）。非生存細胞を、7-アミノアクチノマイシンD

10

20

30

40

50

(7 - A A D、B D B i o s c i e n c e s) を使用して排除した。生細胞分析を、F A C S C a l i b u r (商 標) または A c c u r i フローサイトメーターおよび C e l l Q u e s t ソフトウェアによって行った。

【0155】

クローン原性造血前駆体アッセイ (C F U アッセイ) : E B を、T r y p l e または 0 . 5 % トリプシン / E D T A を使用して単一細胞懸濁液に分散させた。生細胞を定量し、プレートし (5 0 , 0 0 0 ~ 3 0 0 , 0 0 0 細胞 / m L)、幹細胞因子 (S C F) 5 0 n g / m L、エリスロポエチン (E P O) 3 U / m L、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 1 0 n g / m L、インターロイキン - 3 (I L - 3) 1 0 n g / m L を含むヒトメチルセルロース完全培地 (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を使用して、湿室中で造血 C F C についてアッセイした。14日後、コロニーをその形態学にしたがってスコアリングし、プレートした 10^5 個の細胞あたりのコロニー数を定量した。血清含有または無血清の M e t h o C u l t (商 標) 培地 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) を使用して、コロニーを生成することができる。

10

【0156】

サイトスピン : 製造者の説明書にしたがって、細胞を固定し、ライト・ギムザ試薬 (H e m a 3 色素 ; F i s h e r S c i e n t i f i c , H a m p t o n , N H) で染色した。

【0157】

実施例 2

胚様体 (E B) と呼ばれるクラスターに誘導されたヒト胚性幹細胞 (h E S C) または i P S C の i n v i t r o 凝集により、内胚葉系列、中胚葉系列、および外胚葉系列を示す細胞に分化することが可能である。この確立論的 E B 形成過程を導くことにより、外因性成長因子の添加によって造血前駆細胞型を生成することができる。

20

【0158】

本発明者は、分化の 9 ~ 13 日目に細胞表面上に C D 4 3 +、C D 3 4 +、C D 3 1 +、および C D 4 5 + を発現する造血前駆細胞を生成するための 5 つの不可欠なサイトカイン組を使用した新規の無フィーダー且つ無血清の特定の E B ベースの造血分化プロトコルを確立した。前駆細胞型の生成効率は、2 つのヒト h E S C および 4 つの i P S C にわたって 5 ~ 8 % であった。分化過程に 200 ~ 1000 細胞 / 凝集体、低酸素圧、および再凝集工程を使用して形成された E B は、造血前駆細胞型の生成を好む。

30

【0159】

本方法は、5 つのサイトカインの存在下での培養 16 ~ 24 日後に細胞表面上に C D 3 1、C D 4 3、および C D 4 5 を同時発現する骨髓性前駆細胞を効率よく生成することができる。あるいは、造血前駆細胞を単離することができ、各特異的細胞系列のための特殊化サイトカイン富化培地処方物に入れた場合に巨核球系列、赤血球系列、および骨髓細胞系列にさらに分化することができる (例えば、未熟から成熟の多形核顆粒球、マクロファージ、樹状細胞)。

40

【0160】

胚性幹細胞

未分化ヒト胚性幹細胞株 (h E S C) および誘導多能性幹細胞株 i P S C を、15% K O - 血清サプリメント (I n v i t r o g e n)、1% 非必須アミノ酸 (N E A A)、1 m M L - グルタミン (全て I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A 製)、0 . 1 m M - メルカプトエタノール (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s) を補足したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) / ハム F - 12 培地 (F 12) 中での照射マウス胚線維芽細胞 (M E F) との共培養によって維持した。培地に、h E S C については 4 n g / m l ゼブラフィッシュ塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F) を補足し、i P S C については 100 n g / m l ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F) を補足した。

50

【0161】

照射マウス胚線維芽細胞上で成長させるか、MEF馴化培地(MEF-CM)またはmTeSR培地を使用して維持したマトリゲル(商標)コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、EB分化プロトコールのための出発物質として使用した。

【0162】

分化前の細胞の前条件付け

mTeSR培地を使用してマトリゲルコーティングしたプレート上で維持したhESCおよびiPSCを、分化開始前に前条件付け工程に供した。前条件付け工程は1~3日の間で変動した。

10

【0163】

0.1 ng/ml TGF- α および20 ng/ml FGF-2を補足したX-vivo 15(Cambrex)または0.1 ng/ml TGF- α および20 ng/ml FGF-2を補足した成長因子を欠くmTeSR(「mTeSR-GF」)を、EB分化開始前の前条件付け工程のために使用した。

【0164】

EB形成のための細胞の採取

方法1:MEF上で成長させるか、マトリゲルコーティングしたプレート上で無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、37°Cで10分間のコラゲナーゼIV(1 mg/ml)処理を使用してコンフルエンスで採取した。インキュベーション後にウェルのコラゲナーゼを洗い流し、EB基本培地中でのウェルの搔爬によってEBを形成させた。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB分化培地と交換した。

20

【0165】

方法2:マトリゲル(商標)コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、37°Cで6分間のTrypLE(商標)処理を使用してコンフルエンスで採取した。ウェル中のTrypLE(商標)を、1 μ M ROCKインヒビター(H-1152)または10 μ M ROCKインヒビター(Y-27632)、ダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地を使用して中和した。細胞を回収し、1 μ M~10 μ M ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25~0.5 mg/ml)を含むEB基本培地で洗浄した。細胞個別化のためにトリプシンを使用した場合にダイズトリプシンインヒビターを含めた。TrypLEを使用して細胞を個別化した場合、ダイズトリプシンインヒビターを排除することができる。細胞を計数して生存度をチェックし、1 μ M~10 μ M ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25~0.5 mg/ml)を含むEB基本培地中の低付着プレート中にプレートした。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB分化培地と交換した。

30

【0166】

EB形成および分化プロトコール

上記酵素を使用してEB形成を促進するために、細胞を、20%BIT9500(Stem Cell Technologies)、1%NEAA、1 mM L-グルタミン、および0.1 mMメルカプトエタノール(全てInvitrogen, Carlsbad, CA製)、0.75%BSA、50 μ g/mlアスコルビン酸を補足したIMDMを含むmTeSR培地またはEB基本培地中で一晚のインキュベーションのために6ウェル低付着プレートに移した。翌日、細胞を各ウェルから回収し、遠心分離した。細胞をEB-分化培地に再懸濁した。EB-分化培地は、以下の成長因子およびサイトカインを補足したEB基本培地からなる:50 ng/ml骨形成因子(BMP-4)、50 ng/ml血管内皮成長因子(VEGF)、25 ng/ml幹細胞因子(SCF);25 ng/ml Flt-3リガンド(Flt-3L)、10 ng/mlインターロイキン-3(IL-3)、10 ng/mlインターロイキン-6(IL-6)、20 ng/ml顆粒球コロニ

40

50

ー刺激因子 (G-CSF) ; 20 ng/ml 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、0.2 U/ml エリスロポエチン (EPO)、25 ng/ml トロンボポエチン (TPO) (全て R&D Systems, Minneapolis, MN 製)、および 25 ng/ml ゼブラフィッシュ FGF-2。EB を 15 mL 管に移し、凝集体を 5 分間沈殿させることによって 4 日毎に培地を交換した。上清を吸引し、新鮮な分化培地と交換した。あるいは、細胞に、半量の新鮮な培地を 2 日毎に補給した。異なる過程の間の異なる時点で細胞を採取し、フローサイトメトリーによって表現型を評価し、CFUアッセイを使用して機能的な能力を評価した。

【0167】

EB を 15 mL 管に移し、凝集体を 5 分間沈殿させることによって 4 日毎に培地を交換したか、48 時間毎に培地を半分ずつ交換した。上清を吸引し、新鮮な分化培地と交換した。

10

【0168】

結果

mTESR に適合させた hESC 由来の mTESR 培地中で作製した EB は、照射マウス胚線維芽細胞上で維持したか、mTESR の代わりに MEF 馴化培地を使用して維持したマトリゲル (商標) コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた hESC および iPSC から作製した EB と比較して、分化 16 日後により低い頻度 (4% 未満) の造血前駆体が明らかとなった。後者の条件により、10~15% の造血前駆細胞が生成された。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、mTESR 培地中のより高いレベルの TGF- β は、最も原始的な幹細胞 / 前駆細胞に対して優先的な成長阻害効果を発揮することができる。

20

【0169】

サイトカインの存在は、hESC および iPSC の両方の無血清造血分化過程を誘導するのに不可欠であることが認められた。最初のサイトカイン処方物は、EB 分化培地中に列挙した 11 種のサイトカインを含んでいた。造血前駆細胞の頻度は、血清およびサイトカインの非存在下で 0.5~2% であり、サイトカインを含まない血清の存在下で 2~10% であった。造血前駆細胞の頻度は、血清の非存在下且つサイトカインの存在下で 16 日間の分化を超えて 10~40% であった。サイトカインを含む培地への血清の添加により、前駆細胞の増加はわずかであった。したがって、無血清でサイトカイン豊富な EB 分化培地は、mTESR 培地を使用したマトリゲルコーティングしたプレート上で維持し、MEF-CM を使用して前条件付けした hESC および iPSC ならびに照射マウス胚線維芽細胞上で維持した hESC および iPSC から造血前駆細胞を生成することができた。

30

【0170】

EB 分化の 16~18 日間の終了時の細胞の主な表現型は、CD45⁺、CD43⁺、および CD31⁺ 細胞であった。CFUアッセイにより、顆粒球 (例えば、好酸球、好塩基球、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞) を生成することができる骨髓前駆体の存在が明らかとなった。

【0171】

図 1 は、継代数 50 (A) および 40 (B) での H1 ESC の造血分化を示す。両 hESC を、mTESR を使用してマトリゲル (商標) 上で 10 継代維持した。hESC を、造血分化開始前に MEF-CM を使用して 3 日間前条件付けした。コラゲナーゼを使用して細胞を採取し、無血清サイトカイン富化培地を使用して EB 分化させた。EB 細胞を、造血前駆細胞型 (CD43、CD34、CD45、CD31、および CD41) の存在について異なる時点でのフローサイトメトリーによって分析した。値は、3 つの個別の実験の平均 SEM を示す。

40

【0172】

FGF-2 および TGF- β 量を減少させた特定培地中での細胞の前条件付けによって造血分化が改善された。図 2 は、mTESR を使用して維持したマトリゲル (商標) 上で

50

の無フィーダー成長に適合させたhESCおよびiPSCのための前条件付け特定培地への曝露によってその後の造血分化が増大することを示す。より具体的には、マトリゲル(商標)コーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させたH1 hESCを、MEFCM、または0.1ng/ml TGF- および20ng/ml FGF-2を補足したX-vivo 15、または0.1ng/ml TGF- および20ng/ml FGF-2を補足したmTESR(成長因子を欠く)のいずれかを使用して3日間前条件付けした。前条件付け培地を、3日間にわたって毎日交換した。コラゲナーゼを使用して細胞を採取し、EB基本培地中への搔爬によってEBを形成させた。EB基本培地へのプレティングの24時間後に11種のサイトカインを含むEB分化培地に細胞を移した。分化12日目に細胞を採取し、細胞の表現型をフローサイトメトリーによって定量した。

10

【0173】

前条件付け時間枠を1日間もの短さにし、依然として造血分化を改善することができることがさらに認められた。低レベルのTGF- (0.1ng/ml)およびFGF-2(20ng/ml)を補足した成長因子を欠くmTESR(mTESR-GF)は好ましい前条件付け培地である。トリプシン(例えば、TrypLE(商標))を使用して小さな凝集塊に個別化または分離されたEBに前条件付けの有利な影響も認められると予測される。

【0174】

実施例3

20

造血前駆体を、hESCおよびiPSCの単一細胞懸濁液から産生した。単一細胞懸濁液(すなわち、個別化細胞)を、トリプシン消化によって産生した。

単一細胞からEBを作製するために使用した方法

mTESRを使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させたhESCおよびiPSCを、0.1ng/ml TGF- および20ng/ml FGF-2を含むmTESR-GFの存在下で3日間前条件付けした。単一細胞からの分化を開始させるために、培養物をTrypLE(商標)Select(Invitrogen)で6分間処理し、細胞懸濁液を、(1)単純なEB基本培地、(2)PVAを含むEB基本培地、(3)0.5%PVAおよび1μM H1152、または10μM Y27632 ROCKインヒビターを含むEB基本培地、または(4)1uM H1152 ROCKインヒビターのみを含むEB基本培地中に回収した。細胞を回収し、1回洗浄し、37で低付着プレート上の各培地処方物中にプレートした。EB形成状態を、18~24時間後に位相差顕微鏡下でチェックした。

30

【0175】

【表3-1】

表3. ROCKインヒビター/PVAを使用したEB形成

Rho関連コイルキナーゼ(ROCK)インヒビター	ポリビニルアルコール	EB 状態
Y-27632 または H1152	PVA	
存在しない	存在しない	形成されず
存在しない	存在する	わずかなEB形成
存在する	存在する	形成
存在する	存在しない	形成

40

造血分化に必要なサイトカイン

サイトカインマトリックス実験プロトコール:mTESRを使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させたhESCを、0.1ng/ml TGF- および20ng/ml FGF-2を含むX-vivo-15の存在下で3日間前条件付けした。細胞を、37で6分間のTrypLEを使用して採取した。TrypLE(商標)

50

を、 $1\ \mu\text{M}$ ROCKインヒビター (H-1152)、ダイズトリプシンインヒビター ($0.25\ \text{mg}/\text{ml}$) を含むEB基本培地を使用して中和した。細胞を、 $1\ \mu\text{M}$ ROCKインヒビターおよびダイズトリプシンインヒビター ($0.25\ \text{mg}/\text{ml}$) を含むEB基本培地で1回洗浄した。細胞を、 $1\ \mu\text{M}$ ROCKインヒビターおよびダイズトリプシンインヒビター ($0.25\ \text{mg}/\text{ml}$) を含むEB基本培地中の低付着プレート中にプレートした。翌日、培地を、異なるサイトカイン処方物を含むEB基本培地と交換した。

【0176】

サイトカインの使用濃度は以下である： $25\ \text{ng}/\text{ml}$ BMP-4、 $25\ \text{ng}/\text{ml}$ VEGF、 $25\ \text{ng}/\text{ml}$ SCF、 $25\ \text{ng}/\text{ml}$ Flt-3L、 $10\ \text{ng}/\text{ml}$ IL-3、 $10\ \text{ng}/\text{ml}$ IL-6、 $20\ \text{ng}/\text{ml}$ G-CSF； $20\ \text{ng}/\text{ml}$ GM-CSF、 $0.2\ \text{U}/\text{ml}$ EPO、 $10\ \text{ng}/\text{ml}$ TPO、および $10\ \text{ng}/\text{ml}$ ゼブラフィッシュFGF-2。

10

【0177】

使用したサイトカイン組み合わせを、以下の表3に列挙する。EB培養物に、2日毎に半量の新鮮な分化培地を補給した。EB培養物を、分化8、12、および17日目に採取した。EB培養物を、全細胞を遠心沈殿し、TrypLE (商標) または0.5%トリプシンを使用してEBを消化することによって採取した。前駆細胞型の表現型をフローサイトメトリーによって分析し、細胞をCFUアッセイのためにメチルセルロース培地中にプレートした。「FLT3」は、以下のFlt3リガンドをいう。

20

【0178】

【表3-2】

表 3.

組番号	サイトカイン組み合わせ
1.	SCF/FLT-3/BMP-4/VEGF/FGF/EPO/TPO/IL3/IL6/GCSF/GMCSF
2.	FLT3/VEGF/FGF/EPO/GCSF
3.	BMP4/FGF/EPO/TPO/GMCSF
4.	SCF/VEGF/EPO/TPO/IL3
5.	FLT3/FGF/TPO/IL3/IL6
6.	BMP4/EPO/IL3/IL6/GCSF
7.	VEGF/TPO/IL6/GCSF/GMCSF
8.	SCF/FGF/IL3/GCSF/GMCSF
9.	SCF/FLT-3/EPO/IL6/GMCSF
10.	SCF/FLT-3/BMP4/TPO/GCSF
11.	FLT-3/BMP-4/VEGF/IL3/GMCSF
12.	SCF/BMP4/VEGF/FGF/IL6/

30

これらの異なる組み合わせに基づいたこれらの結果を、以下の表4に示す。以下に列挙するように、成長因子のこれらの異なる組み合わせにおける培養に起因する細胞を評価して、種々の細胞表面マーカーの発現を決定した。

【0179】

40

【表 4】

表4. 結果

8日目												
存在	SCF	FLT-3	BMP4	VEGF	FGF	EPO	TPO	IL3	IL6	GCSF	GMCSF	
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	1.0%	1.4%	1.6%	1.6%	1.0%	0.8%	0.8%	1.4%	1.0%	0.8%	1.4%	
CD31	0.9%	1.0%	1.3%	1.1%	0.9%	0.7%	0.8%	1.0%	0.8%	0.7%	1.1%	
CD45	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	
CD34	1.5%	1.4%	1.7%	1.5%	1.5%	1.1%	1.3%	1.3%	1.4%	1.1%	1.3%	
FLK-1	2.0%	2.2%	2.4%	1.8%	2.4%	1.7%	1.9%	2.3%	2.6%	1.7%	1.7%	
非存在												
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	0.8%	0.3%	0.1%	0.1%	0.8%	1.0%	1.0%	0.3%	0.8%	1.0%	0.3%	
CD31	0.7%	0.5%	0.2%	0.4%	0.7%	0.8%	0.8%	0.5%	0.8%	0.8%	0.4%	
CD45	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	
CD34	0.8%	0.9%	0.5%	0.7%	0.8%	1.2%	1.0%	1.0%	0.9%	1.2%	1.0%	
FLK-1	1.9%	1.6%	1.4%	2.0%	1.4%	2.2%	1.9%	1.5%	1.2%	2.2%	2.2%	
12日目												
存在	SCF	FLT-3	BMP4	VEGF	FGF	EPO	TPO	IL3	IL6	GCSF	GMCSF	
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	3.2%	3.0%	4.0%	4.0%	3.2%	2.4%	2.3%	3.0%	3.2%	2.3%	3.0%	
CD31	2.6%	2.4%	3.2%	3.2%	2.6%	1.8%	1.7%	2.4%	2.5%	1.8%	2.4%	
CD45	2.1%	2.7%	3.7%	3.6%	2.1%	1.5%	1.5%	2.7%	2.1%	1.5%	2.6%	
CD34	2.6%	2.6%	2.9%	2.6%	2.7%	2.0%	2.2%	2.3%	2.6%	2.0%	2.1%	
FLK-1	0.6%	0.5%	0.7%	0.6%	0.6%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.4%	0.4%	
非存在												
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	1.2%	1.4%	0.3%	0.2%	1.2%	2.1%	2.2%	1.4%	1.2%	2.3%	1.4%	
CD31	1.3%	1.5%	0.6%	0.6%	1.3%	2.2%	2.3%	1.6%	1.4%	2.2%	1.5%	
CD45	1.5%	1.2%	0.1%	0.2%	1.5%	2.6%	2.6%	1.3%	1.5%	2.6%	1.3%	
CD34	1.7%	1.7%	1.3%	1.3%	1.6%	2.4%	2.2%	2.0%	1.7%	2.4%	1.9%	
FLK-1	0.3%	0.5%	0.2%	0.3%	0.4%	0.8%	0.7%	0.6%	0.5%	0.7%	0.6%	
17日目												
存在	SCF	FLT-3	BMP4	VEGF	FGF	EPO	TPO	IL3	IL6	GCSF	GMCSF	
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	9.8%	12.4%	12.8%	12.6%	9.7%	9.1%	9.2%	12.1%	9.9%	9.1%	12.1%	
CD31	9.3%	11.5%	11.9%	11.6%	9.4%	8.8%	8.6%	11.2%	9.4%	8.6%	11.3%	
CD45	9.6%	12.3%	12.8%	12.7%	9.4%	8.9%	8.8%	12.2%	9.6%	8.8%	12.3%	
CD34	2.6%	2.6%	2.9%	2.6%	2.7%	2.4%	2.4%	2.4%	3.0%	2.2%	2.8%	
FLK-1	2.2%	2.4%	2.7%	2.2%	2.1%	2.1%	2.0%	2.4%	2.5%	2.1%	2.3%	
非存在												
因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
CD43	4.1%	1.1%	0.7%	0.6%	4.2%	5.0%	4.8%	1.4%	4.1%	4.9%	1.4%	
CD31	3.9%	1.4%	1.0%	1.0%	3.9%	4.6%	4.8%	1.6%	3.8%	4.8%	1.6%	
CD45	4.0%	0.9%	0.3%	0.4%	4.2%	4.8%	4.9%	1.0%	4.1%	4.9%	0.9%	
CD34	2.3%	2.2%	2.0%	2.0%	2.1%	2.5%	2.5%	2.5%	1.8%	2.7%	2.1%	
FLK-1	1.4%	1.3%	0.8%	1.4%	1.5%	1.6%	1.7%	1.2%	1.1%	1.6%	1.4%	

10

20

30

E B サイトカイン混合物中の 11 種のサイトカインのうち、5 種のサイトカイン組 (BMP4、VEGF、IL-3、Flt-3、GMCSF) が、無血清造血分化プロトコルの実施に特に有効であるか不可欠であることが同定された。5 種のサイトカインのうち、BMP-4 および VEGF は E B 分化の間の全ての時点で有意な役割を果たすようであった一方で、GMCSF および IL-3 は E B 分化の後期段階で役割を果たすようであった。

40

【0180】

造血分化の各時点の終了時にコロニー形成アッセイを行った。CFUアッセイにより、5 種のサイトカイン組み合わせによって全ての時点で 11 種のサイトカインカクテルに類似する総コロニー数が得られることが明らかとなった。GEMMコロニーの頻度 (3 ~ 5 / 10⁵ 細胞) は、E B 分化 12 日目で 11 種のサイトカイン組み合わせと 5 種のサイトカイン組み合わせとの間で類似していた。5 種のサイトカインを含む E B 分化培地を使用

50

して、hESCおよびiPSCから造血前駆細胞を首尾よく生成した。

【0181】

5種のサイトカインを含むEB分化培地は、hESCおよびiPSCから造血前駆細胞を生成するのに十分であった。mTESRを使用して維持したマトリゲル(商標)上での無フィーダー成長に適合させたhESCおよびiPSCを、 0.1 ng/ml TGF-
および 20 ng/ml FGF-2を含むmTeSR-GFまたはX-vivo 15の存在下で3日目前条件付けした。

【0182】

造血分化のためのサイトカインの使用濃度の決定

実験プロトコール：mTESRを使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させたhESCを、 0.1 ng/ml TGF- および 20 ng/ml FGF-2を含むmTeSR-GFの存在下で3日間前条件付けした。細胞を、 37°C で6分間のTrypLE(商標)を使用して採取した。TrypLE(商標)を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビターおよびダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地を使用して中和した。細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビター(H-1152)、ダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地で1回洗浄した。細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地中の低付着プレート中に 100 万個/ml の細胞密度でプレートした。翌日、培地を、異なる濃度の5種のサイトカインを含むEB基本培地に交換した。サイトカインの使用濃度は以下である：BMP-4、VEGF、SCF、FLT-3リガンド($50\sim 25\text{ ng/ml}$ の範囲)；IL-3、GM-CSF($10\sim 20\text{ ng/ml}$ の範囲)。

10

20

【0183】

EB培養物に2日毎に半量の新鮮な分化培地を補給した。EB培養物を、分化9日および12日目に採取した。EB培養物を、全細胞を遠心沈殿し、TrypLE(商標)または0.5%トリプシンを使用してEBを消化することによって採取した。前駆細胞型の表現型をフローサイトメトリーによって分析し、細胞をCFUアッセイのためにメチルセルロース培地中にプレートした。

【0184】

結果(5種サイトカインの用量組み合わせ)

結果は、造血前駆細胞を生成させるおよそ5種の必須サイトカインの最適用量がBMP4、VEGF、およびFLT-3リガンドについては 25 ng/ml 、IL-3およびGM-CSFについては 10 ng/ml であることを示す。サイトカインのこの組み合わせにより、EB分化12日目に、造血前駆体を生成する多分化能GEMMコロニー($3\sim 5/10^5$ 細胞)を生成することができる。

30

EB培養物の再凝集によって造血が増大する

無血清で12日間のEB分化プロトコールを、分化プロトコール中に再凝集工程を含めることによってさらに最適化した。

【0185】

実験プロトコール：mTESRを使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させたhESCを、 0.1 ng/ml TGFおよび 20 ng/ml FGF-2を含むmTeSR-GFの存在下で2日間前条件付けした。細胞を、 37°C で6分間のTrypLEを使用して採取した。TrypLE(商標)を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビターを含むEB基本培地を使用して中和した。細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地で1回洗浄した。細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ROCKインヒビター(H-1152)およびダイズトリプシンインヒビター(0.25 mg/ml)を含むEB基本培地中の低付着プレート中に12~24時間プレートした。

40

【0186】

翌日、培地を、BMP-4およびVEGFを共に 25 ng/ml 含むEB基本培地に交

50

換した。細胞を、最初のサイトカイン組中で4、5、または6日間分化した。EB培養物を、その後に2種のサイトカインの最初のパルス後さらに4、5、または6日間IL-3/GM-CSF/FLT-3リガンドに曝露した。最初のサイトカイン組から他の組への移行中に、1組のEBをTrypLE(商標)を使用して消化し、第2の培地中で再凝集させた一方で、脱凝集工程を行わずに他の組を第2の培地中に入れた。分化過程を通して、EB培養物に、2日毎に半量の新鮮な分化培地を補給した。EB培養物を、EB分化9、10、11、および14日目に採取した。実験終了時に、EB培養物を、全細胞の遠心沈殿およびTrypLE(商標)または0.5%トリプシンでのEBの消化によって採取した。前駆細胞型の表現型をフローサイトメトリーによって分析し、細胞をCFUアッセイのためにメチルセルロース中に入れた。

10

【0187】

結果

EB培養物の部分的再凝集によって造血分化が増加した。最初の4~5日間のBMP4およびVEGFの存在およびその後の次の7~8日間のIL-3/Flt3リガンド/GM-CSFの添加により、CD43+、CD34+、CD45+、およびCD31+を発現する最も多数の造血前駆体(10%超)が得られた。

【0188】

コロニー形成アッセイの結果は、フローサイトメトリー分析によって得られたデータによく似ていた。最初の4~5日間BMP4およびVEGFをパルスし、その後に次の7~8日間IL-3/FLT3リガンド/GM-CSFを添加したEB培養物により、最高のコロニー形成単位が明らかとなった。総CFU値は、再凝集工程後、100超から250まで上昇した。GEMM保有コロニーの頻度は、3~5/10⁵から15~20/10⁵細胞に急上昇した。

20

【0189】

実施例4

EBサイズは造血分化に影響を及ぼし得る。

【0190】

mTESRを使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させたhESCを、0.1ng/ml TGF- α および20ng/ml FGF-2を含むmTESR-GFの存在下で2日間前条件付けした。細胞を、37°Cで6分間のTrypLEを使用して採取した。TrypLE(商標)を、10 μ M Y-27632 ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25mg/ml)を含むEB基本培地を使用して中和した。細胞を、1 μ M ROCKインヒビター、ダイズトリプシンインヒビター(0.25mg/ml)を含むEB基本培地で1回洗浄した。

30

【0191】

生細胞数を決定し、所望の細胞数を、製造者の説明書にしたがってAggreWell(商標)プレートの各ウェルに入れた: 1.2 \times 10⁵細胞をプレートして100細胞凝集体EBを得た。2.4 \times 10⁵細胞をプレートして200細胞凝集体EBを得た。6 \times 10⁵細胞をプレートして500細胞凝集体EBを得た。1.2 \times 10⁶細胞をプレートして1000細胞凝集体EBを得た。2.4 \times 10⁶細胞をプレートして2000細胞凝集体EBを得た。3.6 \times 10⁶細胞をプレートして2000細胞凝集体EBを得た。4.8 \times 10⁶細胞をプレートして2000細胞凝集体EBを得た。

40

【0192】

細胞を、1 μ M ROCKインヒビター(H-1152)、ダイズトリプシンインヒビター(0.25mg/ml)を含むEB基本培地中のAggreWell(商標)(製造者の説明書を使用)中で18~24時間プレートしてEBを形成させた。細胞を低付着プレートに移し、写真撮影して種々の細胞数を使用して形成させたEBのサイズを測定した。

【0193】

EB培養物を、5種サイトカイン(BMP4/VEGF/IL-3/FLT-3リガ

50

ド / G M C S F) を含む培地中で分化させた。E B 培養物に、2 日毎に 5 種全てのサイトカインを含む半量の新鮮な分化培地を補給した。分化 1 1 日目に、E B 培養物を採取した。実験終了時に、E B 培養物を、全細胞の遠心沈殿および T r y p L E (商標) または 0 . 5 % トリプシンでの E B の消化によって採取し、C D 4 3 値をフローサイトメトリーによって定量した。図 3 に示すように、E B サイズと C D 4 3 発現との間の相関関係が認められた。

【 0 1 9 4 】

限定数の細胞を含む H 1 h E S C 凝集体を、E B 基本培地中の A g g r e W e l l (商標) プレート (S t e m c e l l t e c h n o l o g i e s 、製造者の説明書を使用) 中で 1 8 ~ 2 4 時間形成させた。細胞を後に低付着プレートに移し、 μ M 単位の異なる細胞数によって生成された E B サイズを、顕微鏡上のスケールバーを使用して記録した。E B を含む細胞数および E B の凝集体サイズを、分化開始前に定量した。E B 培養物を、B M P 4 / V E G F / I L - 3 / F L T - 3 リガンド / G M C S F の存在下で 1 1 日間分化した。実験終了時に、E B 培養物を、T r y p L E (商標) を使用した E B の個別化によって採取し、C D 4 3 値をフローサイトメトリーによって定量した。

10

【 0 1 9 5 】

結果

造血分化のための至適細胞数は、1 0 0 ~ 2 5 0 μ M の規模で 2 0 0 ~ 1 0 0 0 細胞 / 凝集体である。1 0 0 0 μ M 超の規模のより多数の細胞凝集体 (2 0 0 0 個超) は、造血前駆細胞の生成を容易にしなかった。

20

【 0 1 9 6 】

実施例 5

低酸素圧条件によって造血分化が増大する

m T e S R を使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させた H 1 h E S C を、0 . 1 n g / m l T G F - および 2 0 n g / m l F G F - 2 を含む m T e S R - G F の存在下で 2 日間前条件付けした。細胞を、T r y p L E (商標) を使用して採取し、1 μ M R O C K インヒビター (H - 1 1 5 2) およびダイズトリプシンインヒビター (0 . 2 5 m g / m l) を含む E B 基本培地中の低付着プレート中に 1 0 0 万細胞 / m l の細胞密度で 1 2 ~ 2 4 時間プレートした。

【 0 1 9 7 】

E B 培養物を、5 種のサイトカイン (B M P 4 / V E G F / I L - 3 / F L T - 3 リガンド / G M C S F) を含む培地中で分化させた。E B 培養物に、2 日毎に 5 種全てのサイトカインを含む半量の新鮮な分化培地を補給した。E B 培養物を、再凝集工程を行わずに分化 8、1 2、および 1 6 日目に採取した。実験終了時に、E B 培養物を、全細胞の遠心沈殿および T r y p L E (商標) または 0 . 5 % トリプシンでの E B の消化によって採取し、造血に関連する種々の表面マーカーの表現型発現を、フローサイトメトリーによって定量した。

30

【 0 1 9 8 】

結果

E B 培養物により、高酸素条件下と比較した場合、低酸素圧条件下での C D 4 3、C D 3 1、C D 4 5、C D 3 4 の細胞発現率がより高かった。この影響は、E B 分化 8 日後でより明白であった。総細胞数は、両条件下で類似していた。

40

【 0 1 9 9 】

マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた H 1 h E S C を、0 . 1 n g / m l T G F - および 2 0 n g / m l F G F - 2 を補足した m T e S R - G F を使用して 2 日間前条件付けした。細胞を、R O C K インヒビターの存在下で T r y p L E (商標) を使用して採取した。E B を、低 (5 % O₂) および高 (2 0 % O₂) 酸素条件下で V E G F、B M P 4、I L - 3、G M C S F、および F l t - 3 リガンドを含む E B 分化培地に移した。細胞を分化の 8、1 1、および 1 6 日目に採取し、細胞の表現型をフローサイトメトリーによって定量した。

50

【0200】

造血前駆体の生成効率

mTeSR (商標) を使用して維持したマトリゲル (商標) 上での無フィーダー成長に適合させた H1 hESC および iPSC を、 0.1 ng/ml TGF および 20 ng/ml FGF-2 を含む mTeSR-GF の存在下で 2 日間前条件付けした。細胞を TrypLE (商標) を使用して採取した。生細胞数を評価し、細胞を、 100 万細胞/ml の密度でプレートした。

【0201】

細胞を、 $1 \mu\text{M}$ ROCK インヒビター (H-1152) およびダイズトリプシンインヒビター (0.25 mg/ml) を含む EB 基本培地中の低付着プレート中に 24 時間プレートした。EB 培養物を、2 工程の分化過程で分化するように誘導した。培養物を、BMP4 および VEGF を含む培地中に低酸素圧条件下で 4 日間入れた。EB 培養物を、分化 5 日目に TrypLE を使用して再凝集し、(1) IL-3、FLT-3 リガンド、GM-CSF; (2) IL-3、FLT-3 リガンド、SCF; または (3) IL-3、FLT-3 リガンド、TPO のいずれかを有する第 2 の分化培地中に低酸素圧条件下でさらに 7 日間入れた。EB 培養物に、2 日毎に半量の新鮮な分化培地を補給した。EB 培養物を、分化 12 日目に採取した。実験終了時に、EB 培養物を、全細胞を遠心沈殿し、TrypLE (商標) または 0.5% トリプシンを使用して EB を消化することによって採取した。実験終了時の総生細胞数を評価した。造血に関連する種々の表面マーカーの表現型発現を、フローサイトメトリーによって定量した。造血前駆細胞 ($\text{CD}43^+ / \text{CD}34^+$) の比率および絶対数を定量した。したがって、造血前駆細胞の生成効率を、初期細胞数を分化実験終了時の造血前駆体の生成数で割ることによって決定した。

【0202】

結果：2 工程 EB 分化プロトコールを使用した hESC および iPSC からの造血前駆体集団の生成効率は、 $5 \sim 8\%$ であることが認められた。結果を図 5 に示す。

【0203】

実施例 6

上記 EB 分化プロトコールを使用して生成した造血前駆細胞は、赤血球前駆体、巨核球、マクロファージ、単球、および樹状細胞を生成することができることを見出された。具体的には、mTeSR を使用して維持したマトリゲル上での無フィーダー成長に適合させた H1 hESC および iPSC を、 0.1 ng/ml TGF および 20 ng/ml FGF-2 を含む mTeSR-GF の存在下で 2 日間前条件付けした。TrypLE を使用して細胞を採取した。全細胞株についての生細胞数を評価した。

【0204】

細胞を、 $1 \mu\text{M}$ ROCK インヒビター (H-1152) およびダイズトリプシンインヒビター (0.25 mg/ml) を含む EB 基本培地中の低付着プレート中に 100 万細胞/ml の細胞密度で 24 時間プレートした。EB 培養物を、2 工程の分化過程で分化するように誘導した。培養物を、BMP4 および VEGF を含む培地中に 4 日間入れた。EB 培養物を、5 日目に TrypLE を使用して再凝集し、(1) IL-3、FLT-3 リガンド、GM-CSF; (2) IL-3、FLT-3 リガンド、SCF、または (3) IL-3、FLT-3、TPO のいずれかを含有する第 2 の分化培地中にさらに 7 日間入れた。EB 培養物に、2 日毎に半量の新鮮な分化培地を補給した。低酸素圧条件下で全 12 日間の分化を行った。EB 培養物を、分化 12 日目に採取した。実験終了時に、EB 培養物を、全細胞を遠心沈殿し、TrypLE (商標) または 0.5% トリプシンを使用して EB を消化することによって採取した。実験終了時の総細胞数を評価した。 100 万個 の hESC は、 $80,000$ 個の造血前駆細胞を生成することができた。

【0205】

IL-3、FLT-3、GM-CSF 組 (1) 由来の前駆体を、 200 ng/ml GM-CSF を含む培地中に 8 日間入れた。これらの細胞を、以下にさらに分化させた：(1) M-CSF (10 ng/ml) および IL-1 (20 ng/ml) を含む培地中に細胞

を2週間入れることによってマクロファージに分化させるか、(2) 20 ng/ml GM-CSFおよび20 ng/ml IL-4を含む培地中に細胞を入れることによって樹状細胞に分化させた。100万個のhESCは、20万個の樹状細胞を生成することができた。全系列の分化実験を、非低酸素濃度(約20%)で行った。

【0206】

巨核球を、IL-3、FLT-3リガンド、SCF組(2)由来の前駆細胞を(100 ng/ml、TPO、SCF、FLT-3、20%BIT9500)を含むMK3培地に入れることによって産生した。肥満細胞を、MK3増殖培地およびその後の5 ng/ml SCF、5 ng/ml IL-6を含む培地中での前駆体の増殖によって産生した。100万個のhESCは、6万~120万個の巨核球を生成することができる。系列分化実験を、非低酸素(約20%)条件で行った。

10

【0207】

赤血球前駆体を、IL-3、FLT-3、SCF、TPO由来の前駆体をヒドロコルチゾン(10⁻⁶M)ホロトランスフェリン、エキサイトを含む培地中に入れることによって生成した。系列分化実験を、酸素正常状態(約20%酸素)条件下で行った。ヒトAB血清および低酸素圧条件の補足により、赤血球前駆体の収量が増大した。これらの方法を使用して、培養で100万個のhESCをおよそ100万個の赤芽球に増殖した。

スピナーフラスコを使用したEB分化プロトコールのスケールアップ

細胞を、分化前に最初に前条件付けした。マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、0.1 ng/ml TGFおよび20 ng/mlゼブラフィッシュFGFを補足した成長因子を含まないTeSRを使用して24時間個別に前条件付けした。

20

【0208】

細胞を、37℃で5分間のTrypLE(商標)処理を使用してコンフルエンスで採取した。細胞を、20%BIT9500(Stem Cell Technologies)、または血清代替物3(Sigma Aldrich)、1%NEAA、1mM L-グルタミン、および0.1mMメルカプトエタノール(全てInvitrogen, Carlsbad, CA製)、0.75%BSA、50 μg/mlアスコルビン酸、および1 μM ROCKインヒビター(H-1152)を補足したIMDMを含むEB基本培地中に回収した。

30

【0209】

次いで、細胞を、50万個~200万細胞/mlの密度で125mlのコーニングスピナーフラスコ中に入れた。スピナーを、EB形成を促進するために、30~40rpmで一晩に設定した。あるいは、細胞を、低付着プレート中の低付着コーニングフラスコ中に静止条件下で24時間置くことができる。細胞を最初に12~24時間培養した場合、細胞生存が改善された。12~24時間後、細胞を、速度60RPMの電磁式攪拌プラットフォーム上のスピナーフラスコ中のROCKインヒビターを用いずにサイトカインを含むEB分化培地中に入れた。スピナーフラスコを25~30RPMで最初の12~24時間維持した場合にEBが生成し、次いで、その後の分化のために40~60に増加させた。スピナーフラスコのサイドキャップを緩めてガスを移動させた。細胞を、50 ng/ml 骨形成因子(BMP-4)、50 ng/ml、血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、および25 ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を補足したEB基本培地中に入れた。

40

【0210】

分化4日目に、細胞に、懸濁したEB凝集体がフラスコの底部に15~20分間沈殿することができるように細胞培養フード中にスピナーフラスコを設置することによって補給した。消費した培地を吸引した(125mlスピナーについて約20ml残存した)。細胞を穏やかに旋回させ、50 ng/ml骨形成因子(BMP-4)、50 ng/ml、血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、および25 ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を含む新鮮な培地を細胞に添加した。スピナーフラスコを、全造血分化過程

50

を通して、60rpmの速度に設定した。

【0211】

分化5~6日目に、消費した培地を上記のように吸引し、細胞を、(1)25ng/mlのFlt-3リガンド、10mg/mlのIL-3、および10ng/ml GMCSF、または(2)25ng/mlのFlt-3リガンド、25ng/mlのSCF、25ng/mlのTPO、10ng/ml IL-3、および10ng/ml IL-6のいずれかを補足したEB基本培地中に入れた。消費した培地を、8日目および10日目に上記のように吸引した。

【0212】

EB培養物を、分化約12日目に採取した。分析終了時に、総細胞数を定量した。細胞を、表面マーカー(CD34+、CD45+、CD43+、CD41+、CD235a+、CD31+)の表現型発現について染色して、集団の造血前駆体数を定量した。表5は、H1ES細胞を使用して種々の細胞密度で生成したスピナーデータをまとめている。類似の結果を、iPS細胞を使用して得た。スピナーフラスコにおけるEB分化過程の概要および得られた結果を図6に示す。造血前駆体は、異なる系列に属する種々の細胞型(赤芽球、巨核球、樹状細胞、肥満細胞、顆粒球、およびマクロファージが含まれる)を生成することができた。

10

【0213】

【表5】

表5 :

20

細胞密度	開始細胞数	EB 12収量	反復	HPC (CD34+CD43)+	CD45	Glya/CD41	CD43	CD34	絶対 HPC収量	効率
0.5 百万細胞/ml	30 百万個	52 百万個	n=1	8%	7%	6.50%	18%	15%	4.16 百万細胞	17.33333
1 百万細胞/ml	60 百万個	140 百万個	n=2	15%	13%	10%	30%	25%	21 百万細胞	35
2 百万細胞/ml	120 百万個	160 百万個	n=2	9%	8%	6%	20%	15%	16 百万細胞	13.33333
3 百万細胞/ml	180 百万個	80 百万個	n=1	5%	2.50%	3.50%	10%	8%	4 百万細胞	2.22222
5 百万細胞/ml	300 百万個	50 百万個	n=1	2%	1%	2%	7%	5%	1 百万細胞	2

30

実施例 7

96ウェルプレートを使用したEB分化の小型化:

マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、0.1ng/ml TGFおよび20ng/mlゼブラフィッシュFGFを補足した成長因子を含まないTeSRを使用して24時間個別に前条件付けた。細胞を、37で5分間のTrypLE処理を使用してコンフルエンスで採取した。細胞を、20%BIT9500(Stem Cell Technologies)または血清代替物-3(Sigma Aldrich)、1%NEAA、1mM L-グルタミン、および0.1mMメルカプトエタノール(全てInvitrogen, Carlsbad, CA製)、0.75%BSA、50µg/mlアスコルビン酸、および1µMROCKインヒビター(H-1152)を補足したIMDMを含むEB基本培地中に回収した。

40

【0214】

細胞を、ROCKインヒビターを含むEB基本培地中の低付着96ウェルプレート中に

50

10万細胞/ウェルの密度で入れた。EB形成を、低酸素(5%O₂)条件下でプレートした細胞をインキュベートすることによって容易にした。12~24時間後、細胞を、50ng/ml骨形成因子(BMP-4)、50ng/ml血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、および25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を含むEB分化培地中に入れた。96ウェルプレートのウェルあたりおよそ300μlの培地を使用した。

【0215】

分化3~4日目に、消費した培地の半分の体積(100~150μl)を穏やかに除去し、50ng/ml骨形成因子(BMP-4)、50ng/ml血管(vascular)内皮成長因子(VEGF)、および25ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を含む同体積の新鮮な培地を細胞に添加することによって、細胞に半分の培地を補給した。

10

【0216】

分化5~6日目に、消費した培地を上記のように吸引し、細胞を、(1)25ng/mlのFlt-3リガンド、10mg/mlのIL-3、および10ng/ml GMCSF、または(2)25ng/mlのFlt-3リガンド、25ng/mlのSCF、25ng/mlのTPO、10ng/ml IL-3、および10ng/ml IL-6を含む培地のいずれかを補足したEB基本培地中に入れた。分化EB培養物に、上記のように分化8日目および10日目に半量の新鮮な培地を補給した。

【0217】

EB培養物を、分化12日目に採取した。分析終了時に、総細胞数を定量した。細胞を、表面マーカー(CD34+、CD45+、CD43+、CD41+、CD235a+、CD31+)の表現型発現について染色して、集団の造血前駆体数を定量した。H1ES細胞を使用して作成したデータを図7にまとめている。iPS細胞を使用して類似の結果を得た。

20

【0218】

図7に示すように、100000個の細胞を、低付着96ウェルプレート上にプレートした。細胞を、サイトカイン(BMP4/VEGF/FGF)の存在下にて低酸素(5%O₂)条件下で最初の4~5日間分化させ、サイトカイン(SCF/Flt-3/TPO/IL-3/IL-6)の存在下にて低酸素(5%O₂)条件下で次の分化7~8日間分化させた。分化12日目に細胞を採取し、HPCをフローサイトメトリーによって定量した。

30

【0219】

実施例8

ロボット自動化

Tecan Cellerityシステム(産業的に関連するロボットプラットフォーム)を使用した造血前駆細胞の維持および生成のための条件。実施例8で使用したプロトコルに基づいて、分化12日目に、Tecan Cellerityシステムによって細胞を採取し、マーカーの細胞表面染色を手作業で洗浄した。染色後、細胞を、Accuriフローサイトメーターに接続したHypercytを使用して分析した。

40

【0220】

実施例9

多能性細胞からの内皮細胞の生成

マトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化のhESCおよびiPSCを、0.1ng/ml TGF- および20ng/mlゼブラフィッシュFGF-2を補足した成長因子を含まないTeSRを使用して24時間個別に前条件付けした。細胞を、37で5分間のTrypLE処理を使用してコンフルエンスで採取した。細胞を、20%BIT9500(Stem Cell Technologies)または血清代替物-3(Sigma Aldrich)、1%NEAA、1mM L-グルタミン、および0.1mMメルカプトエタノール(全てInvitrogen, Carlsbad, CA製)、0.75%BSA、50μg/mlアスコルビン酸、およ

50

び $1 \mu\text{M}$ ROCKインヒビター (H-1152) を補足したIMDMを含むEB基本培地中に回収した。細胞を、EB形成を容易にするために $100 \sim 200$ 万細胞/mlの密度で低付着プレート中に入れた。

【0221】

EB分化を誘導するために、以下のプロトコールを使用した。12~24時間後、細胞をプレートから回収し、 1000 rpm で5分間遠心沈殿した。細胞を、 50 ng/ml 骨形成因子 (BMP-4)、 50 ng/ml 血管 (vascular) 内皮成長因子 (VEGF)、および 50 ng/ml ゼブラフィッシュFGF-2を補足したEB基本培地に再懸濁した。

【0222】

EB分化4日目に、細胞を、プレートを傾斜させることによって沈殿させた。上清培地の半分を吸引し、 50 ng/ml 血管 (vascular) 内皮成長因子 (VEGF) および 50 ng/ml ゼブラフィッシュFGF-2をそれぞれ含む新鮮な分化培地と置換した。

【0223】

EB分化7日目に、EB培養物を、VEGF、FGF、EGF、IGF、アスコルビン酸、およびFBSを含む内皮分化培地 (Lonzaカタログ番号CC3202, Basel, Switzerland) または 50 ng/ml 血管 (vascular) 内皮成長因子 (VEGF) および 50 ng/ml ゼブラフィッシュFGF-2を含む新鮮な分化培地中に入れた。

【0224】

細胞を、分化10日目に内皮細胞の存在について分析した。細胞を回収し、コニカルチューブ中に遠心沈殿させた。細胞ペレットを、TrypLE (商標) セレクトまたは0.5%トリプシンを使用して37℃で5分間消化した。細胞を、FACS緩衝液を含むPBS-FBSに再懸濁し、細胞数および生存状態を決定した。細胞を、蛍光色素抱合モノクローナル抗体である抗ヒトCD31 (WM-59) および抗ヒトCD105で染色した。非生存細胞を、ヨウ化プロピジウム ($50 \mu\text{g/ml}$) を使用して排除した。生細胞分析を、FACS Calibur (商標) またはAccuri (商標) フローサイトメーターで行った。図8は、EB分化10日目のCD31+細胞の生成を示す。

【0225】

内皮細胞の精製: EBを単一細胞懸濁液に分散させ、製造者の説明書にしたがって抗CD31マイクロビーズ (Milenyiカタログ番号130-091-935) を使用して精製した。得られた集団の磁性後分取により、(CD31+CD105+) 内皮細胞集団が精製された。内皮細胞を、アセチル化LDLの取り込み、フォンウィルブランド因子染色の発現、およびマトリゲルチューブ形成アッセイについて試験した。マトリゲルチューブ形成アッセイは、iPSC由来の内皮細胞の首尾のよい生成を示した。

【0226】

実施例10

EB分化培地中にFGF-2を含めることによって造血前駆細胞の分化効率を増加させることができる

hESCおよびiPSCの分化を、以下の条件下で個別に評価した。細胞を、 0.1 ng/ml TGF- α および 20 ng/ml FGF-2を補足した成長因子を含まないTeSR中で1日間前条件付けした。 100 万細胞/mlの細胞密度のEBを、 $1 \mu\text{M}$ ROCKインヒビターを補足したEB基本培地 (20%BIT-9500、0.75%BSA、 $50 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸 (ascorbic acid)、グルタミン (glutamine)、NEAA、および 0.1 mM モノチオグリセロールを補足したIMDM) 中で作製した。

【0227】

12~24時間後、細胞を、以下の改変EB分化培地のうちの1つに入れた: (A) 25 ng/ml BMP4、 25 ng/ml VEGF、 0 ng/ml FGF-2; (

10

20

30

40

50

B) 25 ng/ml BMP4、25 ng/ml VEGF、10 ng/ml FGF-2; (C) 50 ng/ml BMP4、50 ng/ml VEGF、25 ng/ml FGF-2。EB培養物に、分化過程を通して4日毎に半量を補給した。EB培養物は、分化4~5日目に部分的に再凝集した。次いで、EB培養物を、25 ng/ml Flt-3リガンド、10 ng/ml IL-3、および10 ng/mlのGM-CSFを含む培地に入れた。EB培養物に、分化過程を通して4日毎に半量を補給した。

【0228】

EB培養物を分化12日目に採取し、CD34、CD43、CD45、CD31、CD41、およびCD235a (Gly-a)の発現率を定量した。HPCの生成効率を、EB分化12日目のCD34+/CD43+二重陽性細胞の絶対数を開始時のES/iPS細胞数で割ることによって決定した。

10

【0229】

結果: EB1分化におけるFGF-2の補足により、過程の効率がiPSC (iPS-SONL) について6~12%およびhESC (H1 ES細胞) について8~21%増加した。図9は、hESC (H1) およびiPSC (SONL) 細胞株におけるFGF補足を使用した効率の増加をまとめている。図10は、(50 ng/ml BMP4、50 ng/ml VEGF、および25 ng/mlのFGF-2) を含む改変EB1培地の存在下での種々のiPS細胞株の全分化を示す。

【0230】

実施例11

20

EB分化培地へのTPO、IL-6、およびIL-3の含有

hESCおよびiPSCを、0.1 ng/ml TGF- β および20 ng/ml FGF-2を補足した成長因子を含まないTeSR中で1日間個別に前条件付けした。100万~200万細胞/mlの細胞密度のEBを、1 μ M ROCKインヒビター (H-1152) を補足したEB基本培地 (20% BIT-9500、0.75% BSA、50 μ g/mlのアスコルビン酸 (ascorbic acid)、グルタミン (glutamine)、NEAA、および0.1 mMモノチオグリセロールを補足したIMDM) 中での細胞の次の培養によって生成した。12~24時間後、細胞を、50 ng/ml BMP4、50 ng/ml VEGF、25 ng/ml FGF-2を補足したEB基本培地中に入れた。EB培養物に、分化過程を通して4日毎に半量を補給した。EB培養物は、分化4~5日目に部分的に再凝集した。

30

【0231】

次いで、EB培養物を、(A) 25 ng/ml Flt-3リガンド、10 ng/ml GM-CSF、10 ng/ml IL-3; (B) 100 ng/ml Flt-3リガンド、100 ng/ml SCF、100 ng/ml TPO、10 ng/ml IL-3、10 ng/ml IL-6; (C) 50 ng/ml Flt-3リガンド、50 ng/ml SCF、50 ng/ml TPO、10 ng/ml IL-3、10 ng/ml IL-6; または (D) 25 ng/ml Flt-3リガンド、25 ng/ml SCF、25 ng/ml TPO、10 ng/ml IL-3、10 ng/ml IL-6のいずれかを補足したEB基本培地であった第2のEB培地 (「EB2」) 中で培養した。

40

【0232】

EB培養物に、分化過程を通して4日毎に半量を補給し、EB培養物を、分化12日目に採取した。CD34、CD43、CD45、CD31、CD41、およびCD235a (Gly-a)のそれぞれの細胞発現率を定量した。造血前駆細胞 (HPC) の生成効率を、EB分化12日目のCD34+/CD43+二重陽性細胞の絶対数を開始時のES/iPS細胞数で割ることによって決定した。

【0233】

結果: EB2培地へのTPO、IL-6、およびSCFの補足により、HPCの生成率がiPS-SONLについて15~55%さらに増加した。H1 ES細胞は、21~28%の増加が明らかとなった。図11に示すように、上記の改変EB2培地を使用して

50

hESC (H1) および iPSC (SONL) 細胞株において HPC への分化の増加が認められた。図 12 は、(H1) および iPSC (SONL) 細胞株における改変 EB2 組み合わせ (D) を使用した効率の増加を示す。血清代替物 3 (Sigma) は、分化過程の血清代替物として BIT-9500 より優れていることが認められた。

【0234】

実施例 12

分化培養条件における低酸素圧および酸素正常状態の評価

mTESR を使用したマトリゲルコーティングしたプレート上での無フィーダー成長に適合させた未分化の hESC および iPSC を、5% O₂ (低酸素圧) および 20% O₂ (酸素正常状態) 条件の存在下で少なくとも 5 世代維持した。

10

【0235】

EB 分化を、以下の条件下で評価した：

(A) 酸素正常状態条件下での未分化細胞の維持および酸素正常状態条件下での 12 日間の EB 分化 (「N-N」)；

(B) 酸素正常状態条件下での未分化細胞の維持および低酸素圧条件下での 12 日間の EB 分化 (「N-H」)；

(C) 低酸素圧条件下での未分化細胞の維持および酸素正常状態条件下での 12 日間の EB 分化 (「H-N」)；

(D) 低酸素圧条件下での未分化細胞の維持および低酸素圧条件下での 12 日間の EB 分化 (「H-H」)。

20

【0236】

細胞を、0.1 ng/ml TGF- α および 20 ng/ml FGF-2 を補足した成長因子を含まない TESR 中で 1 日間前条件付けした。12 ~ 24 時間後、100 万細胞/ml の細胞密度の細胞を、上記の実施例に記載のように 50 ng/ml BMP4、50 ng/ml VEGF、25 ng/ml FGF-2 を含む改変された EB 基本培地中に入れた。EB 培養物に、分化過程を通して 4 日毎に半量を補給した。EB 培養物は、分化 4 ~ 5 日目に部分的に再凝集した。次いで、EB 培養物を、25 ng/ml Flt-3 リガンド、25 ng/ml SCF、25 ng/ml TPO、10 ng/ml IL-3、10 ng/ml IL-6 を補足した EB 基本培地中でさらに培養した。EB 培養物に、分化過程を通して 4 日毎に半量を補給した。

30

【0237】

EB 培養物を分化 12 日目に採取し、CD34、CD43、CD45、CD31、CD41、および CD235a (Gly-a) をそれぞれ発現した細胞の比率を定量した。HPC の生成効率を、EB 分化 12 日目の CD34+ / CD43+ 二重陽性細胞の絶対数を開始時の ES / iPSC 細胞数で割ることによって決定した。

【0238】

結果：図 13 は、酸素正常状態条件および低酸素圧条件での iPSC 細胞からの HPC の生成を示す。EB 分化は、低酸素圧条件および酸素正常状態条件下で操作された。EB 分化を低酸素圧条件で行った場合、より高い HPC レベルが認められた。低酸素圧条件下での未分化の ES / iPSC 細胞の維持は、分化過程にいかなる有意な利点も付加しなかった。グルコホリン A 発現細胞は、酸素正常状態条件下で減少した。

40

【0239】

本明細書中に開示され、且つ特許請求の範囲に記載の全ての方法および組成物を、本開示を考慮して過度の実験を行うことなく作製および実施することができる。本発明の組成物および方法が好ましい実施形態の立場から記載されているが、本発明の概念、精神、および範囲を逸脱することなく、変更形態を、本明細書中に記載の方法および組成物に、ならびに方法の工程または一連の工程で適用することができることが当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的且つ生理学的に関連する一定の薬剤を本明細書中に記載の薬剤の代わりに使用することができる一方で、同一または類似の結果が達成されるであろうということが明らかであろう。当業者に明らかな全てのかかる類似の代替形態および修正

50

形態は、添付の特許請求の範囲に定義の本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であると考えられる。

【 0 2 4 0 】

参考文献

以下の参考文献は、これらが本明細書中に記載の例示の手順または他の補足的な詳説を提供する範囲で、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【 0 2 4 1 】

【 化 4 】

U.S. Patent 6,815,450	10
U.S. Patent 6,943,172	
U.S. Patent 7,348,339	
U.S. Patent 7,459,424	
U.S. Application 61/015,813	
U.S. Patent Appln. 2006/0084168	
U.S. Patent Appln. 2007/0077654	
Bashey <i>et al.</i> , <i>Transfusion</i> , 47(11):2153-2160, 2007.	20
Bhardwaj <i>et al.</i> , <i>Nat. Immunol.</i> , 2:172-180, 2001.	
Bhatia <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> , 189:1139-1148, 1999.	
Chadwick <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , 102(3):906-915, 2003.	
Davidson and Zon, <i>Curr. Top Dev. Biol.</i> , 50:45-60, 2000.	
Davies <i>et al.</i> , <i>Structure</i> , 8(2):185-195, 2000.	
Drexler <i>et al.</i> , <i>Growth Factors</i> , 22(2):71-3, 2004.	
EP 00187371	30
Fadilah <i>et al.</i> , <i>Stem Cells Dev.</i> , 16(5):849-856, 2007.	
Gaur <i>et al.</i> , <i>J. Thromb. Haemost.</i> , 4(2):436-42, 2006.	
Hanna <i>et al</i> <i>Science</i> 318(5858):1920-1923, 2007.	
Huber <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , 92:4128-4137, 1998.	
Ikenoya, <i>et al.</i> , <i>J. Neurochem.</i> , 81:9, 2002.	
Kadaja-Saarepuu <i>et al.</i> , 2007	
Kaufman <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 98:19, 2001.	40
Kiselyov <i>et al.</i> , <i>Structure</i> , 11(6):691-701, 2003.	
Lappalainen <i>et al.</i> , <i>Clin. Experim. Allergy</i> , 37:1404-1414, 2007.	
Lin <i>et al.</i> , <i>Int. J. Mol. Med.</i> 17:833-839, 2006	
Ludwig <i>et al.</i> , <i>Nature Biotech.</i> , (2):185-187, 2006a.	
Ludwig <i>et al.</i> , <i>Nature Methods</i> , 3(8):637-646, 2006b.	

【 0 2 4 2 】

【化5】

- Maekawa *et al.*, *Science*, 285(5429):895-8,1999.
- Marshall *et al.*, *Blood*, 96:1591-1593, 2000.
- Nakagawa *et al.* *Nat. Biotechnol.*, 26(1):101-106, 2007.
- PCT Appln. WO 0005/7913
- PCT Appln. WO 0007/8351
- PCT Appln. WO 0098/30679
- PCT Appln. WO 2006/050330 10
- Peng *et al.*, *Cell Biology International*, 32(10): 1265-1271, 2008.
- Ratajczak *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 93(4):772-782, 1996.
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia
- Sasaki *et al.*; *Pharmacol. Ther.*, 93:225, 2002.
- Schernthaner *et al.*, *Blood*, 98:3784-3792, 2001.
- Slukvin *et al.* In: *Directed Production of Specific Blood Lineages from Human Embryonic Stem Cells*, #33, ASCI/AAP Joint Meet. Posters, 2007. 20
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 131(5):861-872, 2007.
- Takahashi *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2(12):3081-3089, 2007.
- Vodyanik *et al.*, *Blood*, 108(6):2095-105, 2006.
- Wagemaker *et al.*, *Biotherapy*, 2(4):337-345, 1990.
- Wang *et al.*, *Nature Biotech.*, 25(3):317-318, 2007.
- Yamamura *et al.*, *Stem Cells*, 26(2):543-9, 2008. 30
- Yu *et al.* *Science*, 318(5858):1917-1920, 2007.

【 図 1 】

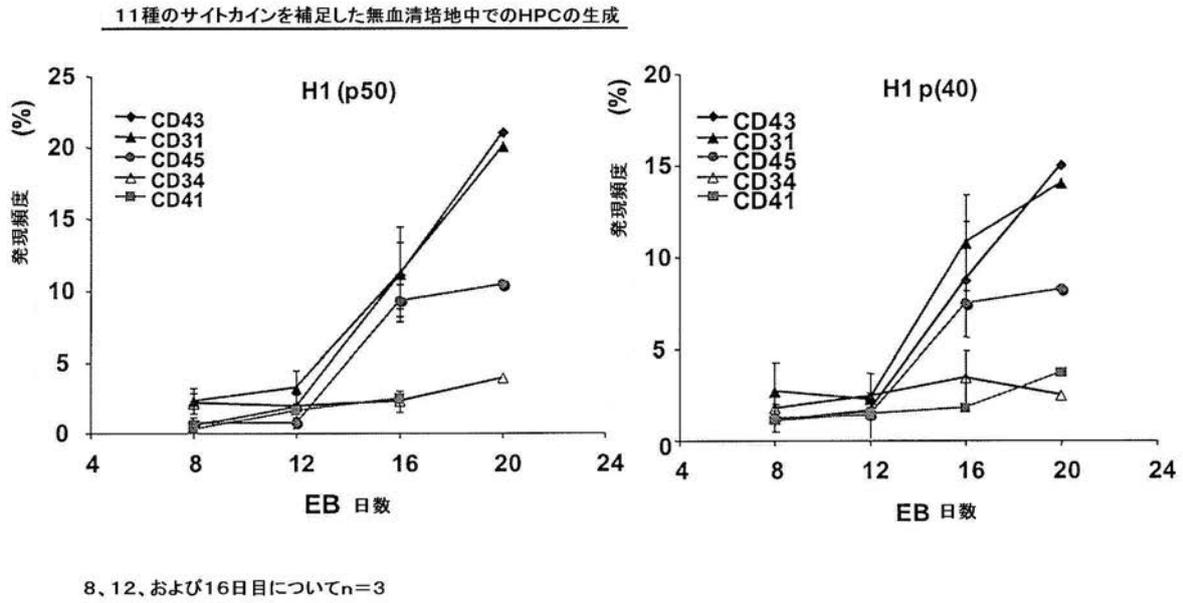


FIG. 1

【 図 2 】

分化開始前の前条件付けによってHPC生成が増加する

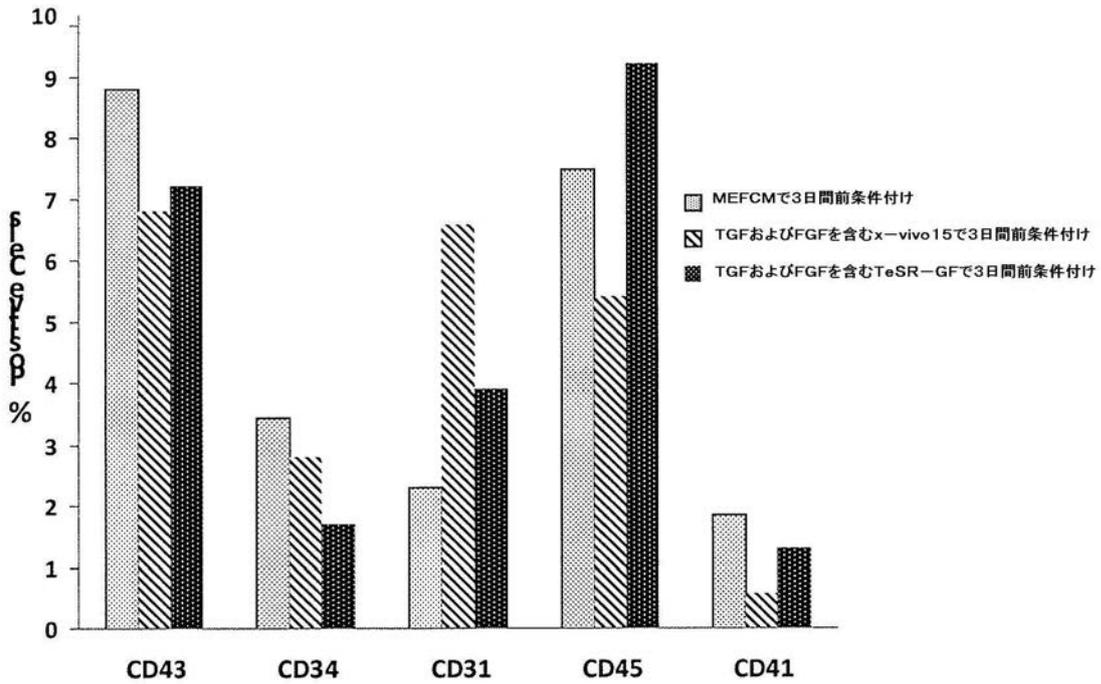


FIG. 2

【 図 3 】

EBサイズとCD43発現との間の相関関係

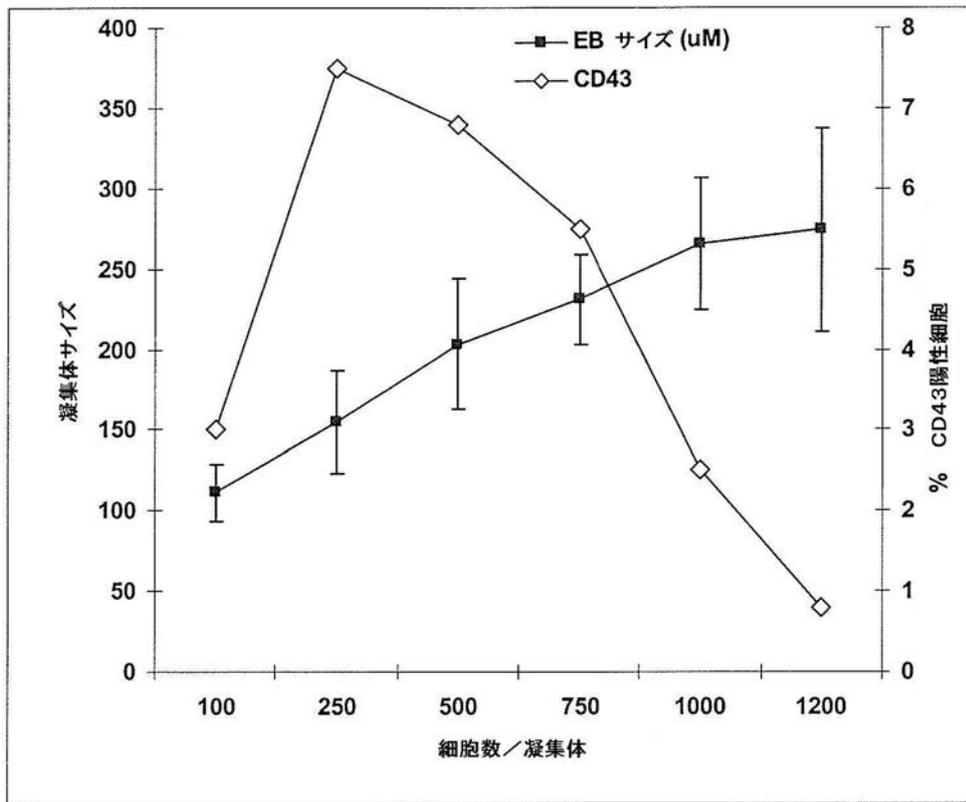


FIG. 3

【 図 4 】

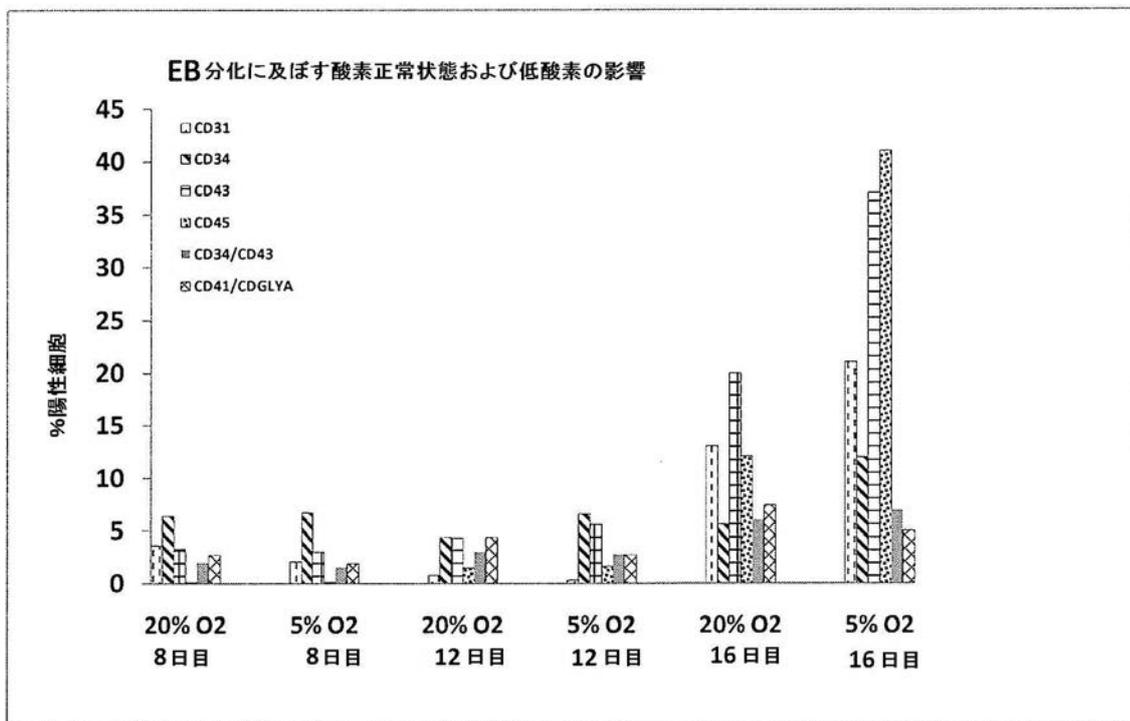


FIG. 4

【 図 5 】

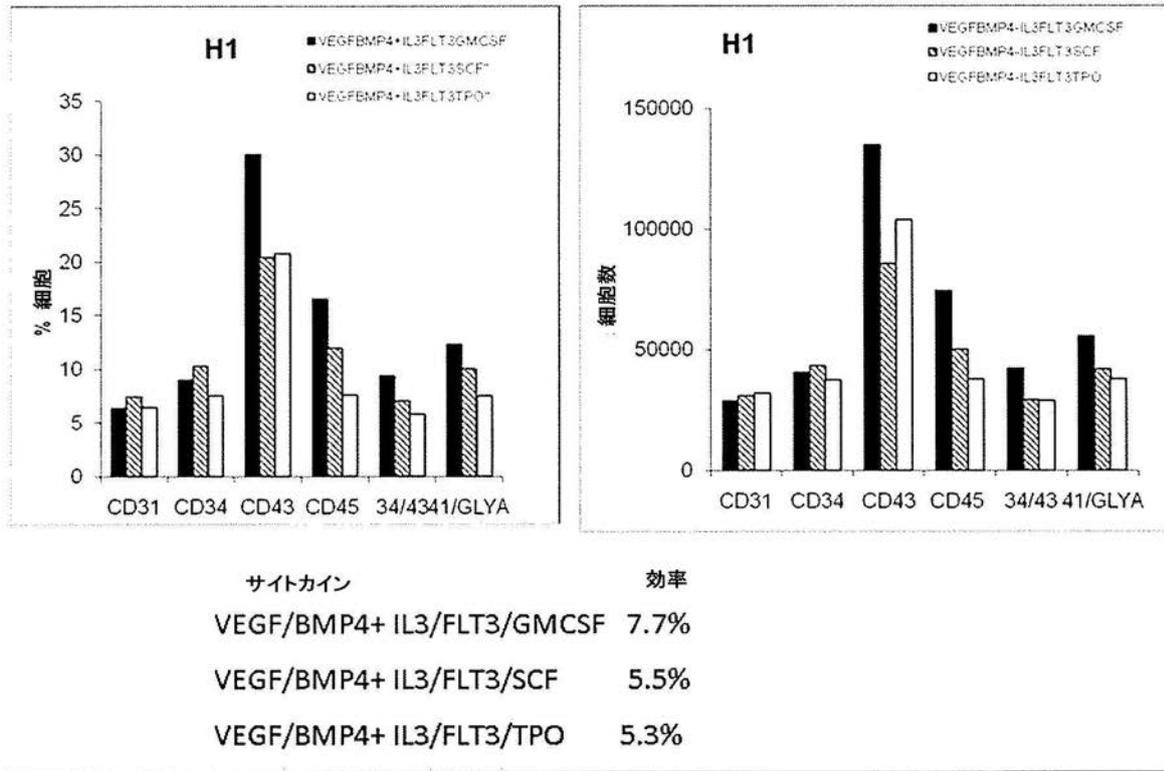


FIG. 5

【 図 6 】

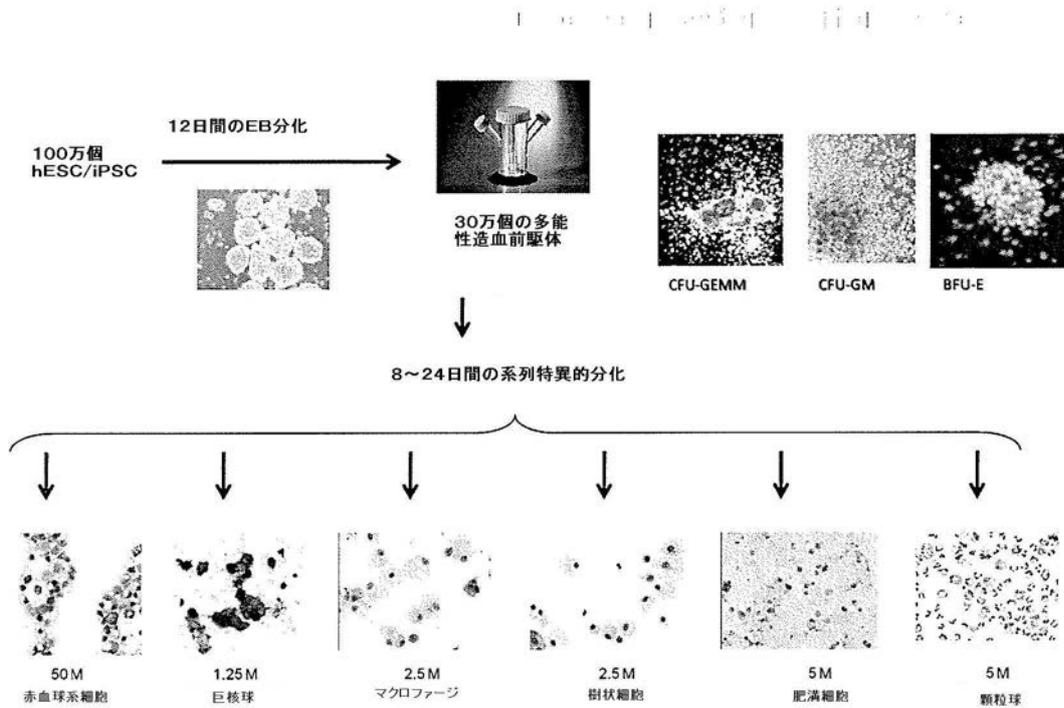


FIG. 6

【 図 7 】

96ウェルプレート形式でのHPC生成

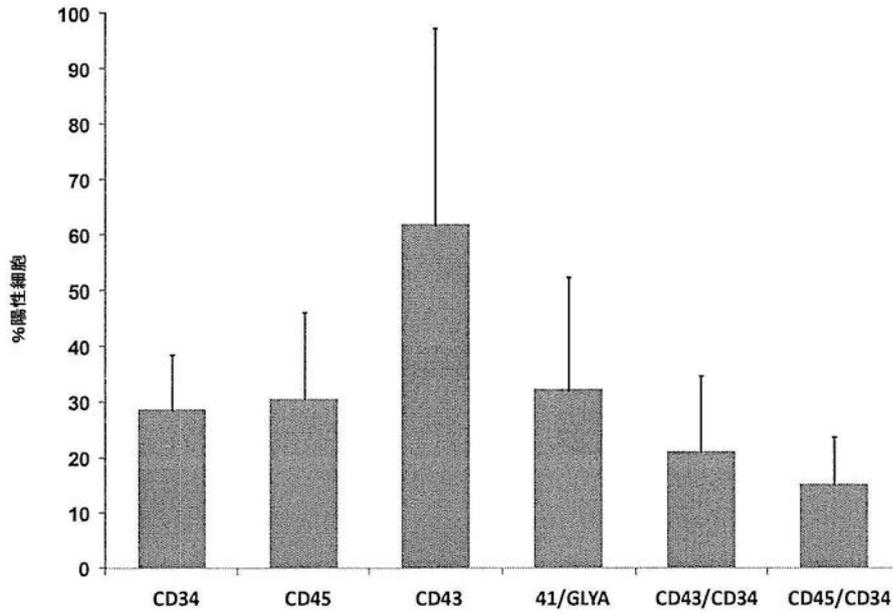


FIG. 7

【 図 8 】

内皮細胞の生成および精製

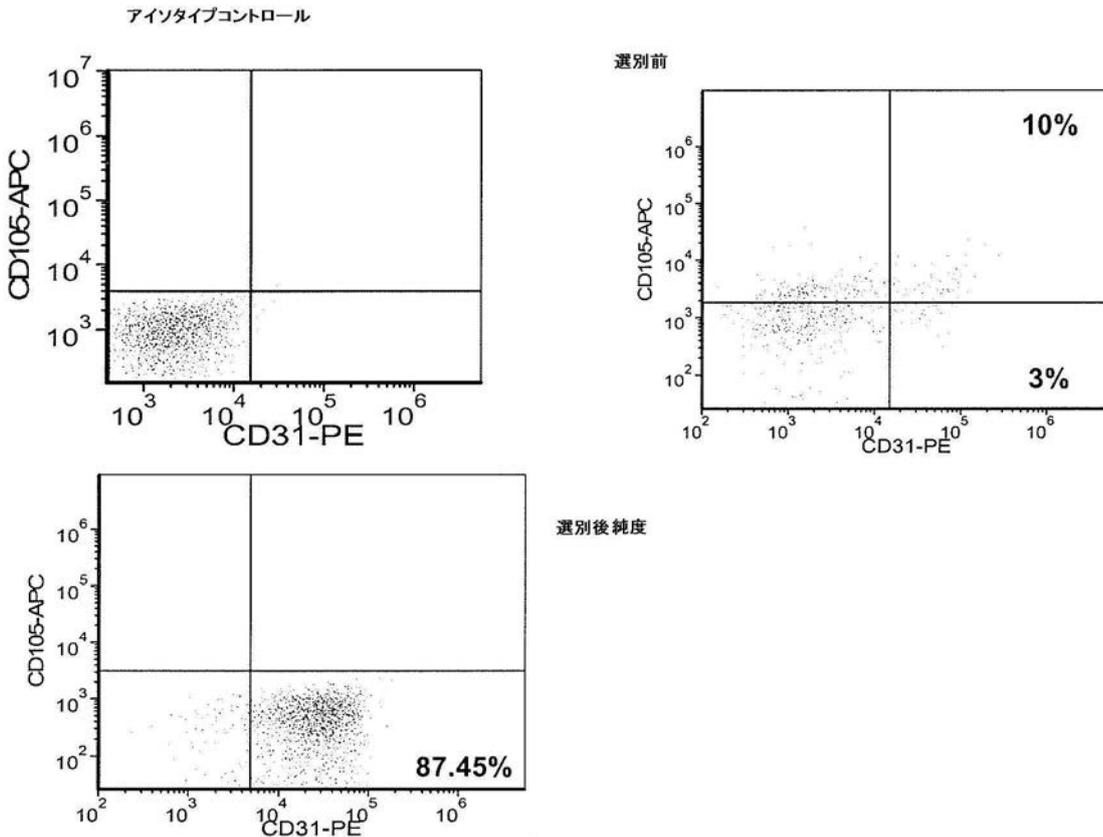


FIG. 8

【 図 9 】

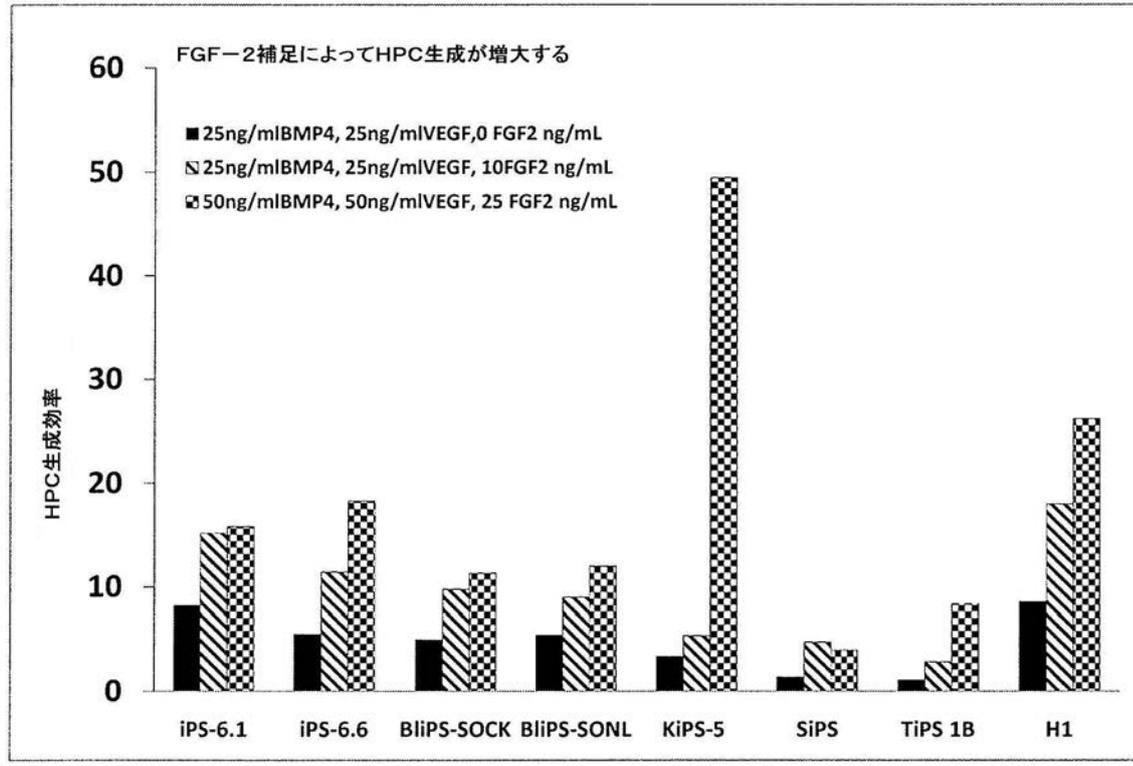


FIG. 9

【 図 10 】

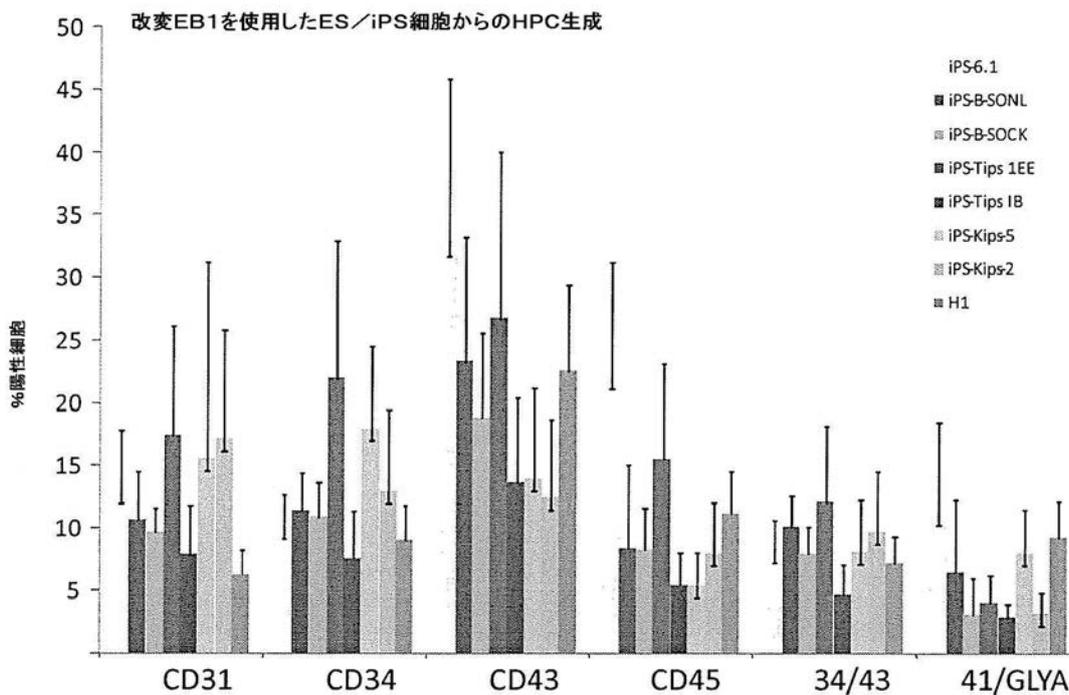


FIG. 10

【 図 1 1 】

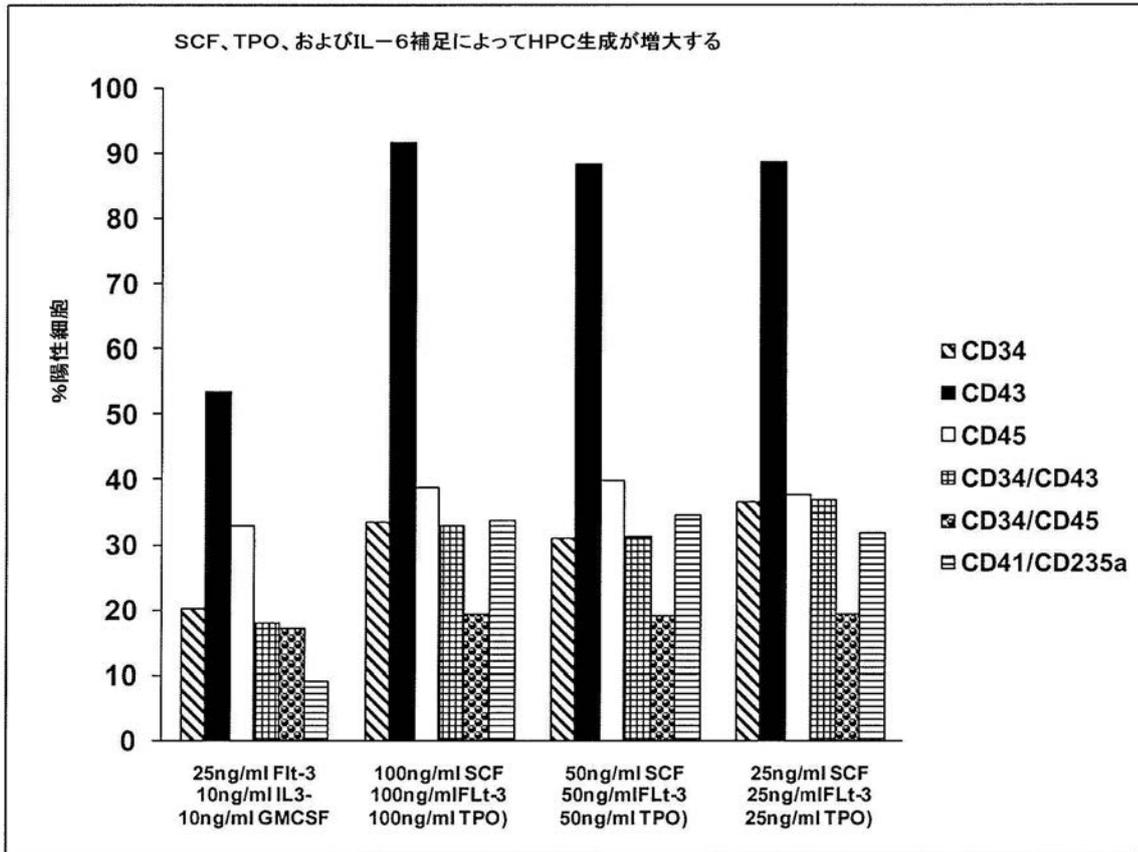


FIG. 11

【 図 1 2 】

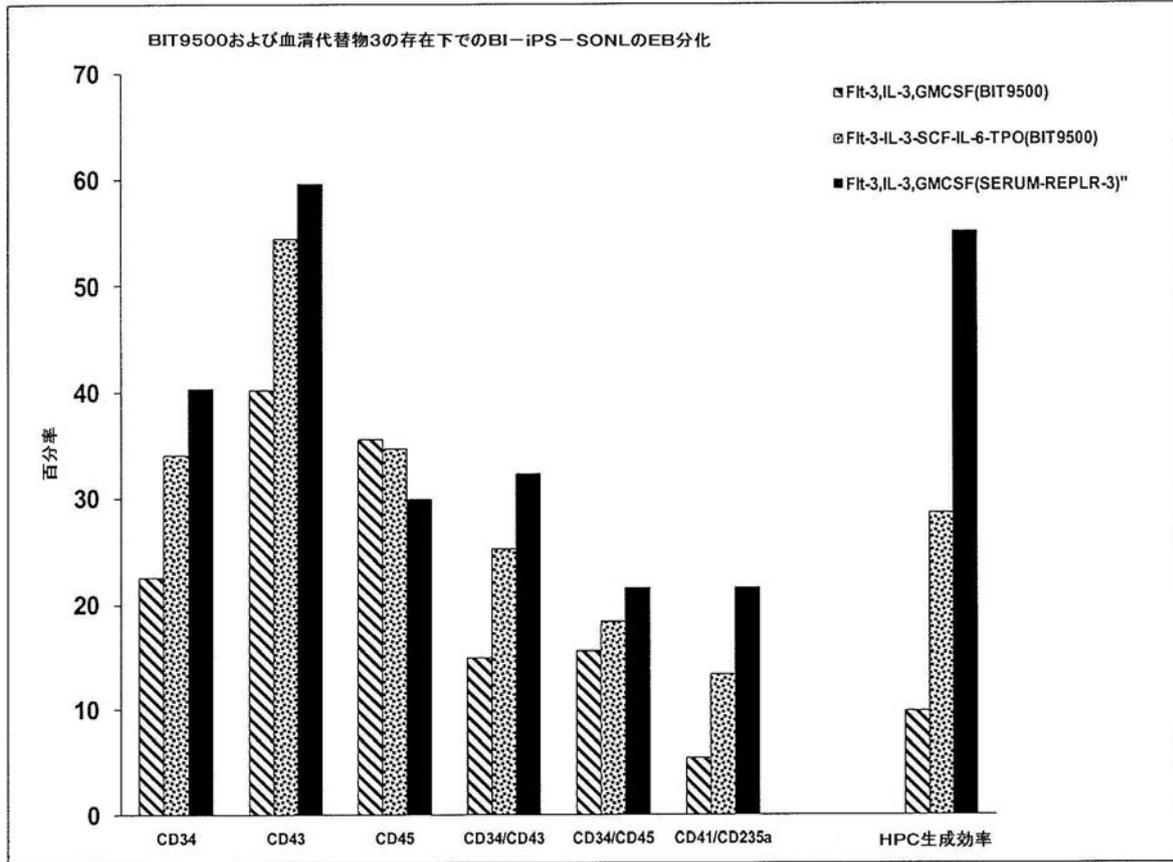


FIG. 12

【 図 1 3 】

低酸素および酸素正常状態条件下でのHPCの生成

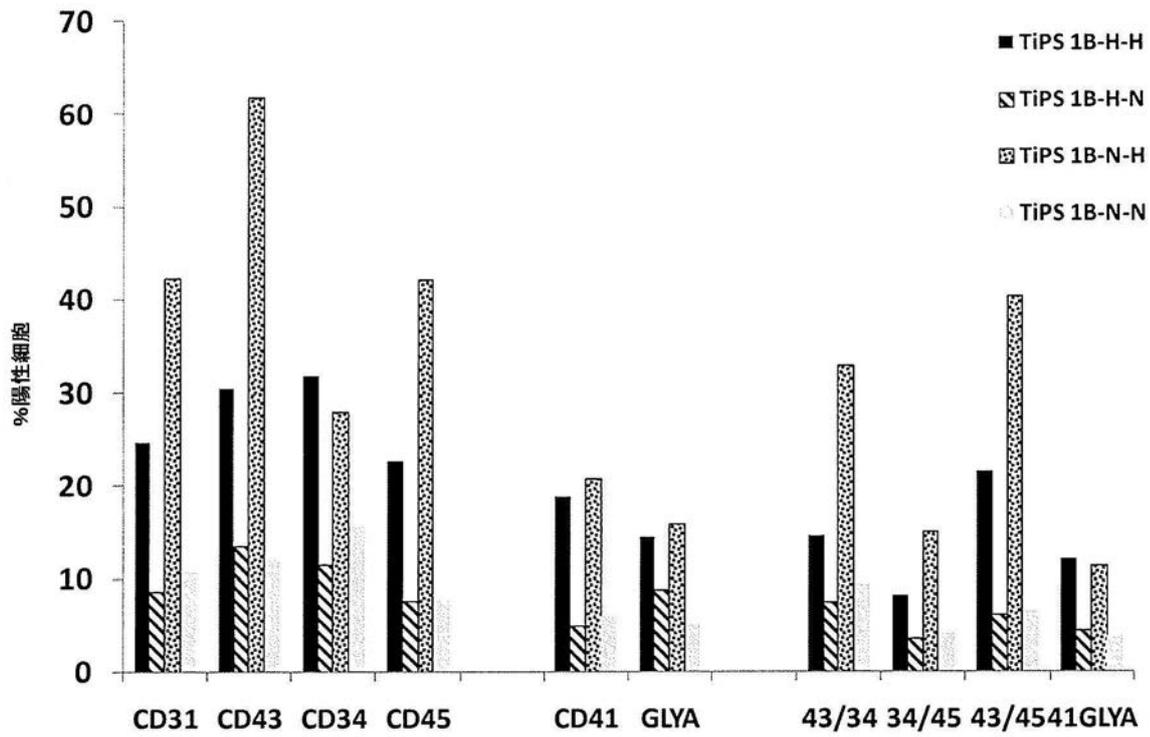


FIG. 13

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/025776

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0781 C12N5/071 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2009/135206 A1 (STEM CELL PRODUCTS INC [US]; DAIGH CHRISTINE [US]; RAJESH DEEPIKA [US]) 5 November 2009 (2009-11-05) page 1 - page 30; claims 8-15	1-4,7-54
Y	PARK CHANGWON ET AL: "A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells" DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 131, no. 11, June 2004 (2004-06), pages 2749-2762, XP002511712 ISSN: 0950-1991 the whole document	1-54
		-/--
<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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
1 July 2010	14/07/2010	
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 Friedrich, Christof	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/025776

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WANG LISHENG ET AL: "Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties" IMMUNITY, CELL PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.IMMUNI.2004.06.006, vol. 21, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 31-41, XP002484358 ISSN: 1074-7613 the whole document</p>	1-54
Y	<p>BHATIA MICKIE: "Hematopoiesis from human embryonic stem cells." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES JUN 2007 LNKD- PUBMED:17332088, vol. 1106, June 2007 (2007-06), pages 219-222, XP007912752 ISSN: 0077-8923 figure 1</p>	1-54
Y	<p>KENNEDY MARION ET AL: "Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 109, no. 7, 1 April 2007 (2007-04-01) , pages 2679-2687, XP002483687 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-54
Y	<p>PEARSON STELLA ET AL: "The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF" DEVELOPMENT, COMPANY OF BIOLOGISTS, CAMBRIDGE, GB LNKD- DOI:10.1242/DEV.011767, vol. 135, no. 8, 1 April 2008 (2008-04-01) , pages 1525-1535, XP008092701 ISSN: 0950-1991 the whole document</p>	1-54

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/025776

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PICK MARJORIE ET AL: "Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis"</p> <p>STEM CELLS, ALPHAMED PRESS LNKD-DOI:10.1634/STEMCELLS.2006-0713, vol. 25, no. 9, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 2206-2214, XP008092704 ISSN: 1549-4918 [retrieved on 2007-06-07] the whole document</p>	1-54
Y	<p>NAKAYAMA NAOKI ET AL: "Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro"</p> <p>BLOOD, vol. 95, no. 7, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 2275-2283, XP002221609 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-54
Y	<p>WANG ZACK Z ET AL: "BMP4 and TGFbeta Differentially Regulate CD34+Progenitor Development in Human Embryonic Stem Cells through SMAD-Dependent Pathway"</p> <p>BLOOD, vol. 112, no. 11, November 2008 (2008-11), page 328, XP007912753 & 50TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06 -09, 2008 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-54
Y	<p>TIAN XINGHUI ET AL: "Differentiation of embryonic stem cells towards hematopoietic cells: progress and pitfalls"</p> <p>CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 15, no. 4, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 312-318, XP009132345 ISSN: 1065-6251 the whole document</p>	1-54

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/025776

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOROL F ET AL: "Ex vivo expanded mobilized peripheral blood CD34+ cells accelerate haematological recovery in a baboon model of autologous transplantation" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB LNKD- DOI:10.1046/J.1365-2141.2000.01995.X, vol. 109, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 162-172, XP003013492 ISSN: 0007-1048 the whole document	1,4-54
Y	YANG SHI ET AL: "[Hematopoietic reconstitution of fresh and cultured cord blood CD34+ cells in NOD/SCID mice]" XI BAO YU FEN ZI MIAN YI XUE ZA ZHI = CHINESE JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY OCT 2008 LNKD- PUBMED:18845075, vol. 24, no. 10, October 2008 (2008-10), pages 947-949, XP007912757 ISSN: 1007-8738 the whole document	1,4-54
Y	FADILAH S A W ET AL: "Cord blood CD34+ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c+CD1a-/c- myeloid dendritic cells." STEM CELLS AND DEVELOPMENT OCT 2007 LNKD- PUBMED:17999605, vol. 16, no. 5, October 2007 (2007-10), pages 849-855, XP007912758 ISSN: 1547-3287 the whole document	1,4-54
Y	SHIOZAWA YUSUKE ET AL: "Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro" ACTA HAEMATOLOGICA, S. KARGER, BASEL, CH, vol. 120, no. 3, 28 November 2008 (2008-11-28), pages 134-145, XP009132445 ISSN: 0001-5792 the whole document	1,4-54
Y	EP 1 860 180 A1 (FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RES [JP]; UNIV TOKAI EDUCATIONAL SYSTEM [JP]) 28 November 2007 (2007-11-28) the whole document	1,4-54
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2010/025776

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU M H ET AL: "Optimization of culture conditions to enhance transfection of human CD34+ cells by electroporation" BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 27, no. 11, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 1201-1209, XP007913656 ISSN: 0268-3369 the whole document	1,3-54
Y	CHUTE J P ET AL: "A comparative study of the cell cycle status and primitive cell adhesion molecule profile of human CD34+ cells cultured in stroma-free versus porcine microvascular endothelial cell cultures." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY FEB 1999 LNKD- PUBMED:10029177, vol. 27, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 370-379, XP000929912 ISSN: 0301-472X the whole document	1-54
Y	HUBER TARA L ET AL: "Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm" BLOOD, vol. 92, no. 11, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 4128-4137, XP007913633 ISSN: 0006-4971 the whole document	2,7-54
Y	SLACK J M W ET AL: "MESODERM INDUCTION BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN EARLY XENOPUS DEVELOPMENT" PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B BIOLOGICAL SCIENCES, vol. 327, no. 1239, 1990, pages 75-84, XP007913634 ISSN: 0962-8436 the whole document	2,7-54
Y	ZHANG PENGBO ET AL: "Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells" BLOOD, vol. 111, no. 4, February 2008 (2008-02), pages 1933-1941, XP007913635 ISSN: 0006-4971 Mesoderm induction in human ES cells by BMP-4 and FGF results in cells capable of hematopoietic differentiation.; page 1935, column 1, paragraph 3 page 1937, column 1, paragraph 4 - page 1938, column 1, paragraph 2	2,7-54

2

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 5 of 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/025776

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PURPURA K A ET AL: "Analysis of the temporal and concentration-dependent effects of BMP-4, VEGF, and TPO on development of embryonic stem cell-derived mesoderm and blood progenitors in a defined, serum-free media" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US LNKD- DOI:10.1016/J.EXPHEM.2008.04.003, vol. 36, no. 9, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1186-1198, XP023976901 ISSN: 0301-472X [retrieved on 2008-06-11] Effect of TPO on BMP-4/VEGF mouse ES cell cultures.; page 1195; figures 5, 6 page 1938, column 1, paragraph 2</p>	1,4-54
X	<p>YAMASHITA ET AL: "Differentiation of Arterial, Venous, and Lymphatic Endothelial Cells From Vascular Progenitors" TRENDS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US LNKD- DOI:10.1016/J.TCM.2007.01.001, vol. 17, no. 2, 7 February 2007 (2007-02-07), pages 59-63, XP005878224 ISSN: 1050-1738 the whole document</p>	65,66
Y	<p>MOHAMED AZZA A ET AL: "Ex vivo expansion of stem cells: defining optimum conditions using various cytokines." LABORATORY HEMATOLOGY : OFFICIAL PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR LABORATORY HEMATOLOGY 2006 LNKD- PUBMED:16751136, vol. 12, no. 2, 2006, pages 86-93, XP009135584 ISSN: 1080-2924 the whole document</p>	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/025776**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-6, 65, 66(completely); 7-54(partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2010 /025776

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 7-54(all partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into haematopoietic precursor cells with BMP4 and VEGF first and then IL-3 and Flt3 ligand

2. claims: 1, 7-54(all partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into endothelial cells with BMP4 and VEGF first and then VEGF, FGF-2 or an FGF-2 mimic and IGF

3. claims: 2, 7-54(all partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into haematopoietic precursor cells with BMP4, VEGF, and FGF-2 or an FGF-2 mimic first and then IL-3 and Flt3 ligand

4. claims: 2, 7-54(all partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into endothelial cells with BMP4, VEGF, and FGF-2 or an FGF-2 mimic first and then VEGF, FGF-2 or an FGF-2 mimic and IGF

5. claims: 3(completely); 7-54(partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into haematopoietic precursor cells with BMP4 and VEGF first and then IL-3, Flt3 ligand, and GM-CSF

6. claims: 4(completely); 7-54(partially)

Methods for differentiation of pluripotent cells into haematopoietic precursor cells with BMP4 and VEGF first and then IL-3, Flt3 ligand, and at least one of IL-6, SCF, or TPO

7. claims: 55-57

Haematopoietic precursor cells

8. claims: 58-61

Myeloid progenitor cells

International Application No. PCT/US2010/025776

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. claims: 62-64

Lymphoid cells

10. claims: 65, 66

Endothelial cells

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/025776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009135206 A1	05-11-2009	US 2009275131 A1	05-11-2009
EP 1860180 A1	28-11-2007	WO 2006090882 A1	31-08-2006
		US 2008166327 A1	10-07-2008

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 K 35/44 (2006.01)	A 6 1 K 35/44	

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

(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 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 , ユニバーシティー リサーチ パーク , 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 気付

(72) 発明者 ルイス , レイチェル
 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 , ユニバーシティー リサーチ パーク , 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 気付

F ターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC12 BB19 BB27 BB34 BC14 BC46 CA44 CA46
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 NA14 ZA36 ZA51