

(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2005-511084

(P2005-511084A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10</b>	C 1 2 N 5/00	B 4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 35/12</b>	A 6 1 K 35/12	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 7/00</b>	A 6 1 P 7/00	
<b>A 6 1 P 29/00</b>	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-551273 (P2003-551273)	(71) 出願人	500294350 ジェロン コーポレイション アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 25, メンロ パーク, コンスティテ ューション ドライブ 230
(86) (22) 出願日	平成14年12月6日 (2002.12.6)	(71) 出願人	504218277 ロバーツ リサーチ インスティテュート カナダ国 オンタリオ州 ロンドン パー ス ドライブ 100
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月7日 (2004.6.7)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/039091	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(87) 国際公開番号	W02003/050251	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 国際公開日	平成15年6月19日 (2003.6.19)		
(31) 優先権主張番号	60/338, 979		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト胚性幹細胞に由来する造血細胞

## (57) 【要約】

本発明は、胚性幹細胞に由来する造血系統の細胞を生産するための系を提供する。分化は、本開示において挙げられる造血サイトカインおよび他の因子の存在下において行われる。得られる細胞集団は、自己再生能を有する初期造血前駆体のマーカーである、CD45+ve細胞が著しく増加している。分化工程において骨形成タンパク質を含むことによって、細胞集団の二次コロニー形成能が増強される。胚性幹細胞の非常に高い複製能のために、これによって、造血細胞の重要な、新しい、商業的な供給源が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の特性の1つまたは複数を有する、培養において増殖する分化細胞集団：

- ・細胞の少なくとも1%がCD45 +veである特性
- ・少なくとも20%がCD34 +veである特性
- ・少なくとも70%がCD13 +veである特性
- ・少なくとも10%がAC133 +veである特性。

**【請求項 2】**

霊長類多能性幹 (pPS) 細胞を分化させることによって得られる、請求項1記載の細胞集団。

10

**【請求項 3】**

請求項2の細胞集団、および、分化したもとなる未分化pPS細胞系からなる、2つの細胞集団。

**【請求項 4】**

細胞の少なくとも5%がCD34 +veおよびCD45 +veの両方であるような、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 5】**

1%未満の未分化pPS細胞を含む、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 6】**

造血コロニー形成単位 (CFU) についてのアッセイ法において、少なくとも約1,000分の1の平板効率でコロニーを形成する、請求項1記載の細胞集団。

20

**【請求項 7】**

CFUアッセイ法から採取されたコロニーが、二次CFUアッセイ法において再プレーティングされた場合に二次コロニーを形成するような、請求項6記載の細胞集団。

**【請求項 8】**

NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環赤血球系細胞、顆粒球細胞および単球を形成する、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 9】**

NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環リンパ球系細胞を形成する、請求項1記載の細胞集団。

30

**【請求項 10】**

異種遺伝子を発現するように遺伝的に改変された、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 11】**

pPS細胞がヒトの胚盤胞から単離された細胞の子孫細胞であるような、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 12】**

pPS細胞がヒト胚性幹細胞であるような、請求項1記載の細胞集団。

**【請求項 13】**

異なる遺伝子型を有するいかなる細胞をも本質的に含まないが、造血細胞増殖因子の混合物を含むような培養環境において未分化pPS細胞を培養する段階、およびその後、少なくとも1%がCD45陽性であるような、または、造血コロニー形成単位 (CFU) についてのアッセイ法において少なくとも約1,000分の1の平板効率でコロニーを形成するような細胞集団を培養環境から採取する段階を含む、pPS細胞を、造血能を有する細胞集団に分化させるための方法。

40

**【請求項 14】**

分化段階が、胚様体または細胞凝集体を形成させる段階を含むような、請求項13記載の方法。

**【請求項 15】**

分化段階が、低密度の調整培地における培養を行う段階を含むような、請求項13記載の方法。

50

- 【請求項16】  
造血細胞増殖因子の混合物が以下の少なくとも2つを含むような、請求項13記載の方法：幹細胞成長因子（SCF）、FLT-3リガンド、IL-3、IL-6、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）。
- 【請求項17】  
分化開始12日以内に、造血細胞増殖因子と共に細胞が培養されるような、請求項16記載の方法。
- 【請求項18】  
造血細胞増殖因子の混合物との培養と同時にまたは培養後に、骨形成タンパク質と共に分化細胞を培養する段階を含む、請求項13記載の方法。 10
- 【請求項19】  
造血細胞増殖因子との培養の後に、骨形成タンパク質4と共に細胞が培養されるような、請求項18記載の方法。
- 【請求項20】  
本方法に従って得られた細胞が、請求項1記載の分化細胞の特性を有するような、請求項13記載の方法。
- 【請求項21】  
造血前駆細胞、赤血球系細胞、顆粒球細胞、単球細胞、巨核球またはリンパ球系細胞を生産するための方法である、請求項13記載の方法。
- 【請求項22】 20  
pPS細胞を分化させる段階を含む、請求項1記載の分化細胞集団を得るための方法。
- 【請求項23】  
pPS細胞がヒトの胚盤胞から単離された細胞の子孫細胞であるような、請求項13記載の方法。
- 【請求項24】  
pPS細胞がヒト胚性幹細胞であるような、請求項13記載の方法。
- 【請求項25】  
請求項1の分化細胞集団をさらに分化させることによって生産される、赤血球、赤芽球、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、巨核球、血小板、またはリンパ球。 30
- 【請求項26】  
請求項1記載の分化細胞集団と化合物を組み合わせる段階、化合物と組み合わされることから生じる、細胞集団における表現型的または代謝的なあらゆる変化を決定する段階、および、その変化を、その化合物の造血細胞機能を調節する能力と相関付ける段階を含む、化合物を、造血細胞機能を調節するその能力についてスクリーニングする方法。
- 【請求項27】  
請求項1の分化細胞集団、または、請求項13記載の方法に従って得られる分化細胞集団を含む、ヒトまたは動物の身体を治療するための薬学的組成物。
- 【請求項28】 40  
ヒトにおける造血機能を再形成するための薬剤の調製における、請求項1において説明される分化細胞集団、または、請求項13記載の方法に従って得られる分化細胞集団の使用。
- 【請求項29】  
ヒトの遺伝子治療のための薬剤の調製における、請求項1において説明される分化細胞集団、または、請求項13記載の方法に従って得られる分化細胞集団の使用。
- 【請求項30】  
薬剤中の細胞とMHC適合性である細胞に対してヒトを寛容化するための薬剤の調製における、請求項13において説明される分化細胞集団、または、不活性化未分化pPS細胞集団の使用。
- 【請求項31】 50

ヒトへの投与に適するように製剤化された、請求項13記載の分化細胞集団または不活性化未分化pPS細胞を含む第一の細胞集団；および、第一の細胞集団とMHC適合性である、分化細胞を含む第二の細胞集団を共にまたは別々の容器に含む、薬学的組み合わせ。

【請求項32】

組み合わせの個体への投与の際に、第一の細胞集団によって、第二の細胞集団に対する被験者による炎症反応が阻害されるような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

【請求項33】

第一の細胞集団の個体への投与の際に、第二の細胞集団に対して個体が免疫寛容性に変えられるような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

【請求項34】

未分化pPS細胞が、照射またはマイトマイシンCを用いた処理によって不活性化されたヒト胚性幹細胞であるような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

【請求項35】

第一の細胞集団および第二の細胞集団が同じ系のヒト胚性幹細胞に由来するような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

【請求項36】

第二の細胞集団が、肝細胞、ニューロン、希突起神経膠細胞、心筋細胞、骨形成原細胞、間葉細胞、造血細胞、膵島細胞、軟骨細胞、またはこれらの細胞タイプのいずれかの系統に制限された前駆体の集団であるような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、概して、細胞生物学、胚性幹細胞、および細胞の分化の分野に関連する。より特定的には、本発明は、薬剤の開発および移植療法において使用するための、造血能を有する分化細胞を提供する。

【0002】

関連出願への言及

本願は、2001年12月7日に出願された、米国特許仮出願第60/338,979号の優先権の恩典を主張する。優先出願は、これによってその全体を参照として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

背景

白血病は、厳しい予後をもたらす造血細胞の癌である。米国白血病学会 (Leukemia Society of America) では、1998年に米国においては28,700例が白血病と診断されたと見積もっている。放射線治療または化学療法と組み合わせた、同種異系造血幹細胞または自己造血幹細胞を用いた白血病の治療には、ここ十年間の間にはかなりの進展があった。自己移植片は、後期の乳癌、卵巣癌および前立腺癌の治療においても使用されている。幹細胞移植は、現在、生命を脅かす重篤な自己免疫疾患の治療法として、臨床試験において試験されているところである。

【0004】

あいにく、これらの状態を治療するためには、しばしば、適切な造血幹細胞を入手することができない。別のドナーからの同種異系細胞は一致することが難しく、それにより、治療用の細胞が患者自身の骨髄に由来する、自己細胞移植法の発展が導かれた。自己細胞の供与は、移植するために十分な細胞を準備する時間を必要とし、投与された細胞によって患者に癌が再導入されるリスクを常に伴う。

【0005】

常に進行し続けるような仕方で造血系を補充すると考えられる、ヒトの血液および骨髄に存在する幹細胞を特徴付けるためには、多くの研究が行われてきた。Gunsiliusら (Bio

10

20

30

40

50

med. Pharmacother. 55:186、2001)では、一般的な総説が提供される。米国特許第5,750,397号では、ヒトの骨髓試料に由来する、CD34 +veであるような、ならびに増殖および分化できるような、ヒトの造血幹細胞の培養について報告されている。米国特許第5,192,553号では、胎児および新生児の血液幹細胞および血液前駆細胞の単離について報告している。米国特許第5,635,386号では、ヒトの造血細胞培養において特定の細胞系統を制御するための方法について報告されている。欧州特許第455,482 A3号は、CD38を欠失するがCD34を発現するヒトの前駆細胞サブセットについて報告している。

【0006】

Vaziriら (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 91:9857、1994)は、ヒトの造血幹細胞の寿命を示すものとしてのテロメアDNAの欠失について報告している。Chiuら (Geron Corporation ; Stem Cells 14:239、1996)は、成体ヒト骨髓からの造血前駆細胞におけるテロメラーゼ活性の示差的な発現を説明している。Gaffneyら (Blood 91:1662、1998)は、Flt-3リガンドおよび骨髓の間質由来の因子の、初期ヒトCD34 +ve骨髓前駆細胞に対する影響について報告している。Kollerら (H.Hematother. 5:449、1996)は、Flt-3リガンドおよびc-kitの、エクスピボにおける造血細胞の増殖の刺激物質としての影響を比較している。

【0007】

Bhatiaら (Proc.Natl.Acad.Sci. 94:5320、1997)は、免疫欠損マウスを再増殖できる始原ヒト造血細胞の精製について報告した。Bhatiaら (Nature Med. 4:1038、1998)は、SCIDの再増殖活性を有するヒト造血細胞のクラスについて報告した。Gallacherら (Blood 96:1、2000)は、新規の循環ヒト胚性血液幹細胞の単離について報告した。国際公開公報第99/23205号は、CD34陰性およびLin陰性であるようなヒト造血幹細胞の実質的に均一な集団について主張している。Kararuら (J.Exp.Med. 192:1365、2000)は、造血幹細胞のための増殖因子としてのNotchリガンドジャグド (Jagged) -1について報告した。Bhatiaら (J.Exp.Med. 189:1139、1999)は、骨形成タンパク質がヒト造血幹細胞の発生プログラムを制御することを報告した。Kararuら (Blood 97:1960、2001)は、デルタ (Delta) -2およびデルタ-4が始原ヒト造血細胞の分裂促進制御因子として機能することを報告した。Bhardwajら (Nature Immunol 2:172、2001)は、因子のソニック・ヘッジホッグ (sonic hedgehog) がヒト造血細胞の増殖を誘導することを報告した。

【0008】

ヒトの骨髓および臍帯血に由来する重要な造血前駆細胞が同定され、インビトロにおいてそれらを操作するために有効な方法が発見された。しかし、供与されるヒト細胞集団のパーセンテージとしてのこれらの細胞の量の少なさには、なおも問題が残されている。

【0009】

代替の供給源は、初期胚組織から単離された多能性細胞である。近年、ヒトES細胞 (Thomsonら、Science 282:114、1998; 米国特許第6,090,622号および同第6,200,806号) およびヒト胚性生殖細胞 (Shablottら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 95:13726、1998; 米国特許第6,090,622号) を単離および培養するための技術が開発された。国際公開公報第99/20741号および同第01/51616号 (Geron Corp.) では、フィーダー細胞層を含まない培養において霊長類に由来する始原幹細胞を増殖するための方法および材料が提供されており、それにより、ヒトの治療のためにこれらの細胞およびその誘導体を調製することがかなり容易になる。

【0010】

ヒトの多能性幹細胞を造血系統の細胞に分化するための予備的な努力については、Liら (Blood 15:98、2001); 米国特許第6,280,718号 (Wisconsin); およびKaufmanら (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 98:10716、2001b) によって報告されている。造血マーカーを有する細胞を生み出すためには、マウス骨髓細胞または卵黄嚢内皮細胞との共培養が必要であった。

【0011】

胚性幹細胞に由来する造血細胞が商業的に提供されることが実現可能になるためには、間質細胞と共培養する必要性を除くような、および、骨髓から入手可能な細胞と比較して

実質的に改善された収量を提供するような、新しい手法を開発する必要がある。

【発明の開示】

【0012】

概要

本発明は、多能性細胞から造血系統の細胞に分化させた霊長類細胞を効率よく生産するための系を提供する。細胞集団は、造血前駆細胞についてかなり増加させられていることが説明される。次いで、造血前駆細胞を、赤血球系細胞系、顆粒球細胞系、単球細胞系、巨核球細胞系およびリンパ球系細胞系のコロニーにさらに分化させることが可能である。本開示において説明される組成物、方法および技術は、薬剤のスクリーニングおよび様々な形態の臨床療法を含む、様々な適用についてかなり有望なものである。

10

【0013】

本発明のある態様は、培養において増殖する、および、造血細胞に特徴的なある特徴を有する細胞集団である。細胞集団は、ヒト胚性幹細胞の樹立された系が実例となるような、霊長類多能性幹(pPS)細胞を分化させることによって得られる。少なくとも細胞の1%がCD45 +veであり、下記に挙げられる造血細胞に特徴的な他のマーカーを有するような、および、未分化pPS細胞の最低限の比率を有するような集団が含まれる。細胞集団は、造血コロニー形成単位(CFU)についてのメチルセルロースアッセイ法において、高い平板効率でコロニーを形成し得、次いで二次CFUアッセイ法において再プレATINGされた場合に二次コロニーを形成し得る。NOD-SCIDマウスに注射された場合、細胞は循環赤血球系細胞、顆粒球細胞、単球、巨核球またはリンパ球系細胞を形成し得る。遺伝子治療のために異種遺伝子を発現するように、または、細胞複製能を拡大するように遺伝的に改変された細胞が含まれる。

20

【0014】

本発明のその他の態様は、例えば以下のような、本開示において説明される特徴の少なくとも1つを有するヒト造血細胞集団である：細胞の少なくとも~20%が内在性遺伝子からのCD34を発現するという特徴；細胞の少なくとも~2%が内在性遺伝子からのCD45を発現するという特徴；または、CFUアッセイ法において、細胞が高い平板効率でコロニーを形成するという特徴。これは、限定はしないが、ヒト多能性幹細胞の分化を含む任意の工程、または、(抗CD34抗体のような)特異的な抗体もしくはその同等物を用いた細胞の分離に参与しない任意の他の工程によって作製されるヒトの細胞組成物を含む。

30

【0015】

本発明のその他の態様は、pPS細胞を分化させることによって造血細胞を作製するための方法である。例えば、pPS細胞は、フィーダー細胞層を含まない培養から採集し、その後、胚様体を形成させることによって、または何か他の方法によって、分化経路に向けて分化を開始させることができる。その後、分化を開始させた細胞を造血細胞増殖因子の混合物と共に培養し、それによってCFUアッセイ法においてコロニーを形成する細胞を得ることが可能である。造血細胞増殖因子の混合物は、以下の造血分化因子の1つまたは複数を含み得る：おそらく、BMP-4のような骨形成タンパク質と組み合わせた、幹細胞成長因子(SCF)、FLT-3リガンド、IL-3、IL-6、G-CSF、ソニック・ヘッジホッグまたは本開示において挙げられる他のサイトカイン。外来の間質細胞または異なるゲノムを有する任意の他の細胞と共培養することは、通常は必要ない。本方法は、造血前駆細胞、または、赤血球系細胞、顆粒球細胞、単球細胞、巨核球またはリンパ球系細胞のような成熟造血細胞を生産するために使用することができる。

40

【0016】

本発明のさらなる態様は、造血細胞機能を調節するその能力について化合物をスクリーニングする方法である。化合物を、本発明の細胞集団と組み合わせ、その結果生じる、細胞集団におけるあらゆる表現型の変化または代謝の変化について細胞をモニタリングする。

【0017】

本発明は、免疫寛容を誘導するための系をも提供する。患者は、欠損組織機能を再生する目的で与えられる第二の細胞集団に対して患者を免疫寛容性に変えるような、霊長類多

50

能性幹 (pPS) 細胞に由来する寛容化細胞集団を投与される。典型的なhPS細胞は、ヒト胚性幹 (hES) 細胞、または、ヒトの胚盤胞から得られることが可能であるようなその同等物である。第一の細胞集団は通常、おそらく同じhPS細胞系に由来する、第二の細胞集団とMHC適合性である。本方法は、肝細胞、ニューロン、希突起神経膠細胞および他のグリア細胞、心筋細胞、骨形成原細胞、間葉細胞、造血細胞、膵島細胞のようなホルモン分泌細胞、および軟骨細胞のような組織の移植の可能性を高めるために使用することが可能である。

【0018】

本発明のこれらの態様および他の態様は、以下に続く説明から明らかとなる。

【0019】

詳細な説明

本発明は、多能性幹細胞からそれらを効率よく分化させる方法を示すことによって、ヒト造血細胞の大集団を生み出すという問題を解決するものである。

【0020】

非特異的な仕方において分化を開始させ、その後、分化を開始させた細胞を分化因子のカクテル中において培養することによって、ヒト胚性幹細胞を造血分化経路に沿って導くことが可能であることが発見された。造血細胞の分化を促進するためには、増殖因子の異なる組み合わせが有効である。特に有効な組み合わせは、幹細胞成長因子 (SCF)、Flt-3 リガンド、IL-3、IL-6およびG-CSFを含む。このカクテルにおいて適切な期間培養することによって、様々な造血細胞系列に多分化能性であるような、および、培養において活発に増殖するような、造血前駆体細胞についてかなり増加した集団が生じる。次いで、造血前駆体は、SCF、GM-CSF、IL-3、およびエリスロポエチン (EPO) と共に培養することによって、骨髓系分化経路にまでさらに至らせることが可能である。

【0021】

Kaufmanら (上記) によって報告されたこととは異なり、本開示では、間質細胞との共培養が誘導の実行に必要な部分ではないことが証明される。

【0022】

それどころか、本開示における技術を用いて、造血表現型についてかなり増加している分化細胞集団を生み出すことが可能である。分化カクテル中にサイトカインおよび骨形成タンパク質4 (BMP-4) の双方を含むことによって、8%のCD45 +ve細胞 (多能性造血細胞についてのマーカー) および22%のCD34 +ve細胞 (始原造血前駆細胞についてのマーカー) を含む細胞集団が得られた。意外なことに、5%を超える細胞がCD45およびCD34について二重に陽性である。CD45マーカーの存在は、CFUアッセイ法において測定されるような、活発にコロニー形成を行う細胞と相関する。胚性幹細胞に由来する造血細胞は、非常に高い平板効率でコロニーを生じる。

【0023】

現行のいかなる供給源 (末梢血、成体骨髓、または臍帯血さえも含む) から明らかに入手可能であるよりも多くの造血前駆細胞を含むと考えられる造血細胞集団を提供するため、本発明は重要である。サイトカインを用いて分化させた、 $1 \times 10^5$  個のhES細胞の開始集団からは、少なくとも~137個の造血前駆細胞が生じ、これはヒトの臍帯血 (182) または末梢血において動員される骨髓前駆細胞 (249) に匹敵する。ヒト胚性幹細胞は無限に増殖させることができるため、本発明は、無制限の量の造血前駆細胞、および、造血サブタイプの1つに分化方向が決定付けられた、または成熟赤血球もしくは白血球に分化した子孫細胞を生み出すために使用することが可能な系を提供する。

【0024】

以下に続く開示は、本発明の造血細胞の生産および試験についてのさらなる情報を提供する。それは、研究、薬学的な開発、および血液関連の異常の治療的な管理においてこれらの細胞をどのように使用することができるかという、広範囲に渡る実例をも提供する。

【0025】

定義

10

20

30

40

50

本開示のためには、「造血細胞」という用語は、造血経路からの任意の細胞を指す。本細胞は、造血系統に特徴的な、容認された形態学的特徴および表現型マーカー（下記にて例示される）の幾つかを発現する。造血前駆細胞、分化方向が決定付けられた自己複製能のある細胞またはコロニー形成細胞、および完全に分化した細胞が含まれる。

【0026】

「造血前駆細胞」「造血前駆体」または「造血幹細胞」は、完全に分化した造血細胞を生み出す能力を有する、および、自己再生能を有する細胞である。典型的に、それは、何らかの仕方において脱分化または再プログラムされない限り、インビトロにおいてそれだけで培養された場合には、他の胚葉の子孫細胞を生じない。

【0027】

細胞個体発生の文脈において、「分化した」という形容詞は相対的な用語である。「分化細胞」は、それが比較される細胞よりも発生経路の下方に進行した細胞である。したがって、多能性胚性幹細胞は、赤血球系、顆粒球系、単球系、巨核球系、およびリンパ球系の各々の細胞を形成する能力を有する多能性造血前駆細胞のような、系統の制限された前駆体細胞に分化することが可能である。これらの前駆細胞は、これら4つの造血系のうちただ1つの細胞を形成するように分化方向が決定付けられた自己再生細胞にさらに分化することが可能である。これらは、次いで、特徴的な役割を担う、および、さらに増殖する能力を保持できるまたは保持できない、最終的に分化した細胞にさらに分化させることが可能である。赤血球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、血小板、およびリンパ球は、最終的に分化した細胞の例である。

10

20

【0028】

本開示で用いる「分化剤」とは、造血系譜の分化細胞（前駆細胞および最終的分化細胞を含む）を産生するために、本発明の培養系に用いる一群の化合物の1つを指す。化合物の作用形態に関しては限定しない。例えば、薬剤は、表現型の変化を誘導または補助することにより、特定の表現型により細胞の増殖を促進することによりもしくは他の増殖を遅延させることにより、または、未知の機構によって他の薬剤とともに作用するとともに、分化過程を補助する可能性がある。

【0029】

原型の「霊長動物多能性幹細胞」（pPS細胞）は、受精後任意の時点の前胚組織、胚組織、または胎児組織由来の全能性細胞であり、8~12週齢のSCIDマウスで奇形腫を形成する能力等の標準技術として公認の試験によると、適切な条件下で3つの胚葉（内胚葉、中胚葉、および外胚葉）すべての派生物であるいくつかの様々な細胞種の子孫を産生し得る特徴を有する。この用語には、様々な種類の幹細胞の樹立株および記載の方法で多能性である初期組織から得られる細胞の両方を含む。

30

【0030】

pPS細胞の定義には、Thomsonら（Science 282:1145、1998）によって記載されるヒト胚幹（hES）細胞、アカゲザル幹細胞（Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844、1995）、マーモセット幹細胞（Thomsonら、Biol. Reprod. 55:254、1996）等の他の霊長動物の胚幹細胞、およびヒト胚生殖（hEG）細胞（Shamblottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726、1998）に例示される様々な種類の胚細胞が含まれる。他の種類の多能性細胞もまた、この用語に含まれる。胚組織、胎児組織、または他の供給源由来であるか否かにかかわらず、全3胚葉の派生物である子孫を産生し得る霊長動物起源の任意の細胞が含まれる。pPS細胞は、好ましくは悪性の供給源由来ではない。細胞は核型が正常であることが望ましい（必ずしも必要とは限らない）。

40

【0031】

pPS細胞培養物は、集団中の幹細胞およびその派生物の実質的な割合が、胚起源または成体起源の分化細胞と明らかに区別できる未分化細胞の形態学的特徴を示す場合に、「未分化である」と記載される。未分化pPS細胞は当業者により容易に認識され、2次元の顕微鏡視野において、典型的に、高い核/細胞質比および顕著な核小体を有する細胞のコロニーとして見える。集団内の未分化細胞のコロニーは、分化した隣接細胞に囲まれているこ

50

とが多いと理解されている。

【0032】

「フィーダー細胞」とは、他の種類の細胞と共培養され、第2の種類の細胞が増殖できる環境を提供する1つの種類の細胞を説明するために用いられる用語である。ある種類のpPS細胞は、初代マウス胚線維芽細胞、不死化マウス胚線維芽細胞、またはhES細胞から分化したヒト線維芽細胞様細胞により支持され得る。pPS細胞集団は、分割後にpPSの増殖を支持するための新鮮なフィーダー細胞を添加せずに少なくとも1回増殖した場合、フィーダー細胞を「本質的に含まない」と称される。

【0033】

「胚様体」という用語は「凝集体」と同義の専門用語であり、pPS細胞が単層培養において過剰増殖した場合または懸濁培養液中で維持される場合に現れる、様々なサイズの分化細胞および未分化細胞の凝集塊を意味する。胚様体は、形態学的基準および免疫細胞化学法により検出可能な細胞マーカーによって識別可能なくつかの胚葉に典型的に由来する、様々な細胞種の混合物である。

10

【0034】

「増殖環境」とは、目的の細胞がインビトロにおいて増殖、分化、または成熟する環境のことである。環境の特徴には、細胞を培養する培地、存在し得る増殖因子または分化誘導因子、存在する場合には支持構造（例えば、固体表面上の基層）が含まれる。

【0035】

任意の適切な人工的操作手段によりポリヌクレオチドが細胞に導入された場合、または細胞がそのポリヌクレオチドを受け継いだ最初に改変された細胞の子孫である場合、その細胞は「遺伝的に改変された」または「トランスフェクトされた」と称される。

20

【0036】

一般的技術

分子遺伝学および遺伝子工学における一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、Cold Spring Harbor); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (MillerおよびCalos編); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubelら編、Wiley & Sons) の現行版に記載されている。分子生物学、タンパク質化学、および抗体技術は、Current Protocols in Protein Science (J.E. Colliganら編、Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology (J.S. Bonifacinoら、Wiley & Sons) およびCurrent Protocols in Immunology (J.E. Colliganら編、Wiley & Sons)に見出すことができる。本開示で引用する遺伝子操作の試薬、クローニングベクター、およびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、ClonTech、およびSigma-Aldrich Co.等の市販業者から入手可能である。

30

【0037】

細胞培養法は、一般に、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R. I. Freshney編、Wiley & Sons); General Techniques of Cell Culture (M.A. HarrisonおよびI.F. Rae、Cambridge Univ. Press)、およびEmbryonic Stem Cells: Methods and Protocols (K. Turksen編、Humana Press) の現行版に記載されている。組織培養用の供給品および試薬は、Gibco/BRL、Nalgen-Nunc International、Sigma Chemical Co.、およびICN Biomedicals等の市販業者から入手可能である。

40

【0038】

本開示に関わる、特定化される参考書は、「Blood Cell Biochemistry」、Plenum Pub. Corp.およびKluwer Academic Publishers; 「Primary Hematopoietic Cells」(Human Cell Culture、第4巻)、M.R.KollerおよびB.Palsson編、Kluwer Academic Publishers、1999; 「Molecular Biology of Hematopoiesis and Treatment of Myeloproliferative Diseases: 第11回シンポジウム、Bormio、1998年6月」(Acta Haematologica、101/2)、N.G. Abrahamら編、S.Karger Publishing、1999; 「The Essential Dracula」、B.Stoker、L.WolfおよびC.Bing、Penguin Putnam、1993; および「Hematopoiesis: A Developmental Approach」、L.I.Zon編、第1版、Oxford University Press、2001を含む。

50

## 【0039】

## 幹細胞の供給源

本発明は、様々な種類の幹細胞を用いて実施され得る。幹細胞のうち本発明での使用に適した細胞は、胚盤胞または妊娠中の任意の時点で採取される胎児組織もしくは胚組織等の、妊娠後に形成される組織由来の霊長動物幹（pPS）細胞である。限定されない例は、以下に例示するような、胚幹細胞または胚生殖細胞の初代培養または樹立株である。

## 【0040】

本発明の技術は初代胚組織または胎児組織に直接実行することも可能であり、この場合、最初に未分化細胞株を樹立することなく、造血細胞を生じる可能性を有する初代細胞から直接造血細胞を導出する。ある状況下では、臍帯血、胎盤、またはある成人組織由来の多能性細胞を用いて、本発明の局面が求められる場合もある。

## 【0041】

## 胚幹細胞

胚幹細胞は、霊長動物種のメンバーの胚盤胞から単離できる（米国特許第5,843,780号、Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844、1995）。ヒト胚幹（hES）細胞は、Thomsonら（米国特許第6,200,806号；Science 282:1145、1998；Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ページ以降、1998）およびReubinoffら、Nature Biotech. 18:399、2000の記載する技術により、ヒト胚盤胞細胞から調製することが可能である。hES細胞に相当する細胞種には、国際公開公報第01/51610号（Bresagen）に概説されるような、原始外胚葉様（EPL）細胞等のその多能性派生物が含まれる。

## 【0042】

hES細胞をヒトの着床前胚から得ることができる。または、インビトロで受精した（IVF）胚を使用することもできる、または1細胞期のヒト胚を胚盤胞段階まで増殖させることもできる（Bongsoら、Hum Reprod 4: 706、1989）。G1.2培地およびG2.2培地で、胚を胚盤胞段階まで培養する（Gardnerら、Fertil. Steril. 69:84、1998）。プロナーゼ（Sigma）に短時間曝露することにより、発生した胚盤胞から透明帯を除去する。胚盤胞を1:50希釈したウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に30分間曝露し、DMEMで5分間3回洗浄し、1:5希釈したモルモット補体（Gibco）に3分間曝露する免疫手術（Solterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099、1975）により、内部細胞塊を単離する。DMEMでさらに2回洗浄した後、穏やかにピペティングして無傷の内部細胞塊（ICM）から溶解した栄養外胚葉細胞を除去し、ICMをmEFフィーダー層上にプレーティングする。

## 【0043】

9～15日後、1 mM EDTAを添加したカルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝食塩水（PBS）に曝露することにより、ディスパーゼもしくはトリプシンに曝露することにより、またはマイクロピペットで機械的に解離することにより、内部細胞塊に由来する増殖物を凝集塊に解離し、新鮮な培地中のmEF上に再度プレーティングする。未分化の形態を有して増殖するコロニーをマイクロピペットで個別に選択し、機械的に凝集塊に解離し、再度プレーティングする。ES様の形態は、細胞質に対して核の比率が明らかに高く顕著な核小体を有する小型のコロニーとして特徴づけられる。得られたES細胞は、短時間トリプシン処理してダルベッコPBS（2 mM EDTAを含む）に曝露し、IV型コラゲナーゼ（約200 U/mL；Gibco）に曝露することにより、またはマイクロピペットで個別にコロニーを選択することにより、1～2週間ごとに日常的に分割する。凝集塊の大きさは、約50～100細胞が最適である。

## 【0044】

## 胚生殖細胞

ヒト胚生殖（hEG）細胞は、最終月経期から約8～11週間後に得られるヒト胎児物質中に存在する始原生殖細胞から調製することができる。適切な調製方法は、Shamblottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726、1998および米国特許第6,090,622号に記載されている。

## 【0045】

10

20

30

40

50

簡単に説明すると、生殖隆線を処理し、非凝集細胞を形成した。EG増殖培地は、DMEM、4500 mg/L D-グルコース、2200 mg/L mM NaHCO<sub>3</sub>；15% ES認定された胎児コウシ血清（BRL）；2 mM グルタミン（BRL）；1 mMピルビン酸ナトリウム（BRL）、1000~2000 U/ml ヒト組換え白血病阻害因子（LIF、Genzyme）；1~2 ng/mL ヒト組換えbFGF（Genzyme）；および10 μmフォルスコニン（10% DMSO）である。96ウェル組織培養プレートを、LIF、bFGF、およびフォルスコニンを含まない改変EG増殖培地で3日間培養したフィーダー細胞（例えば、ST0細胞、ATCC番号CRL 1503）のサブコンフルエントな層で調製し、5000ラドの照射で不活性化する。各ウェルに、初代生殖細胞（PGC）懸濁液約0.2 mLを添加する。7~10日後に1回目の継代をEG増殖培地で行い、各ウェルを、あらかじめ照射したST0マウス線維芽細胞で調製した24ウェル培養皿の1ウェルに移す。EG細胞と一致する細胞形態が観察されるまで、毎日培地を交換してこの細胞を培養するが、典型的にこれは7~30日後または1~4継代後である。

10

## 【0046】

未分化状態におけるpPS細胞の増殖

pPS細胞は、分化を促進せずに増加を促進する培養条件を用いて培養し、連続的に増殖させることが可能である。血清を含む代表的なES培地は、80% DMEM（ノックアウトDMEM、Gibco等）、20%の既知組成ウシ胎仔血清（FBS、Hyclone）または血清代替品（国際公開公報第98/30679号）のどちらか、1%非必須アミノ酸、1 mM L-グルタミン、および0.1 mM -メルカプトエタノールから作製する。使用する直前に、ヒトbFGFを4 ng/mLになるように添加する（国際公開公報第99/20741号、Geron Corp.）。

20

## 【0047】

従来通り、ES細胞は、典型的には胚または胎児組織由来の線維芽細胞であるフィーダー細胞層上で培養する。妊娠13日目にCF1マウスから胚を採取し、2 mLのトリプシン/EDTAに移し、細かく砕き、37 °Cにて5分間インキュベートする。10%のFBSを加え、破砕物を静置させ、90%のDMEM、10%のFBS、および2 mMのグルタミンにおいて細胞を増殖させる。フィーダー細胞層を調製するために、細胞を照射し、増殖を阻害するが、ES細胞を支持する因子の合成は行わせる（~4,000 radsの照射）。0.5%のゼラチンによって培養プレートを一晩被覆し、ウェル毎に375,000個の照射mEFをプレーティングし、プレーティング5時間~4日後に使用する。培地は、pPS細胞を播種する直前に新しいhES培地と置き換える。

30

## 【0048】

Geronの研究者は、pPS細胞がフィーダー細胞なしでも未分化状態で維持され得ることを見出した。フィーダーを含まない培養環境には、適切な培養基層、特にマトリゲル（Matrigel）（登録商標）またはラミニン等の細胞外基質が含まれる。pPS細胞を $> 15,000$ 細胞 $\text{cm}^{-2}$ でプレーティングする（最適には、90,000~170,000 $\text{cm}^{-2}$ ）。典型的には、細胞が完全に分散される前に酵素消化を停止する（例えば、コラゲナーゼIVで~5~20分）。約10~2000細胞の凝集塊を、さらに分散させることなく基層上に直接プレーティングする。または、プレートが、0.5mM EDTAのPBS溶液で~5分インキュベートすることによって、コンフルエントに達する前に、酵素を含まない細胞を収集できる。培養管から洗い流した後、細胞をさらに分散することなく新しい培養に置くことができる。

40

## 【0049】

無フィーダー培養は、分化させることなく細胞の増殖を支持する因子を含む栄養培地により支持する。そのような因子は、照射した（約4,000ラド）初代マウス胚線維芽細胞、テロメア化したマウス線維芽細胞、またはpPS細胞由来の線維芽細胞様細胞等のそのような因子を分泌する細胞と共に培地を培養することにより、培地中に導入され得る。フィーダーを20% 血清代替品および4 ng/mL bFGFを添加したKO DMEM等の無血清培地で約 $5 \sim 6 \times 10^4$   $\text{cm}^{-2}$ の密度でプレーティングすることにより、培地を馴化することができる。1~2日間馴化した培地にさらにbFGFを添加し、これを用いてpPS細胞培養液を1~2日間支持する。その代わりとして、または、加えて、分化することなく増殖を支持するのを助ける、FGF-2受容体またはFGF-4受容体、c-kitのリガンド（例えば、幹細胞因子）、gp130に結合す

50

る受容体のリガンド、インシュリン、トランスフェリン、脂質、コレステロール、ヌクレオシド、ビルベート、および  $\beta$ -メルカプトエタノールのような還元剤などの他の因子を加えることができる。無フィーダー培養法の特徴は、国際公開公報第01/51616号およびXuら、Nat. Biotechnol. 19:971、2001においてさらに考察されている。

#### 【0050】

顕微鏡下で、ES細胞は、高い核/細胞質比、顕著な核小体、細胞の接合部がほとんど識別できない小型のコロニー形成を伴って見える。霊長動物ES細胞は、時期特異的胚抗原 (SSEA) 3および4、ならびにTra-1-60およびTra-1-81と称する抗体を用いて検出可能なマーカーを発現する可能性がある (Thomsonら、Science 282:1145、1998)。マウスES細胞をSSEA-1の陽性対照として、ならびにSSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81の陰性対照として使用できる。インビトロにおけるpPS細胞の分化では、SSEA-4、Tra-1-60、およびTra-1-81の発現が消失し、hES細胞でも認められるSSEA-1の発現が増加する。

#### 【0051】

##### 造血細胞およびその派生物を調製するための材料および手順

本発明の造血細胞は、所望の表現型を有する細胞を濃縮する特殊な増殖環境で幹細胞を培養、分化、または再プログラミングすることにより得られる (所望の細胞の増殖によるか、または他の細胞種の阻害もしくは死滅による)。これらの方法は、前項に記載した霊長類多能性幹 (pPS) 細胞を含む多くの種類の幹細胞に適用可能である。

#### 【0052】

pPS細胞の樹立された系に由来する場合、本発明の細胞集団および単離細胞は、それらが由来する系と同じゲノムを有する。これは、造血細胞が正常な有糸分裂の過程を通して未分化系から得られたのであれば推論できるように、pPS細胞と造血細胞の間で、あらゆる核型異常に加えて、90%を超える染色体DNAが同一となることを意味する。全ての非操作遺伝的要素は保存されているため、組換え法によって導入遺伝子を導入するように、または内在性遺伝子をノックアウトするように処理された細胞は、それらが由来する系 (またはその子孫細胞) と同じゲノムを有するとなおも考えられる。

#### 【0053】

##### 分化工程の開始

本発明に従った造血細胞の誘導に必須ということではないが、誘導を行うために効率のよい方法は、非特異的な方法で分化を開始するものがあることが見出された。1つの方法は、pPS細胞に胚様体または凝集体を形成させるものである：例えば、ドナーのpPS細胞培養を過剰増殖させることによる、または、低付着性の特性をもつ基質を有する培養器中の懸濁液においてpPS細胞を培養することによる。未分化pPS細胞を培養から採取し、クラスターに解離し、非付着性細胞培養プレートにおいてプレーティングし、分化を支持する培地において培養する (実施例1)。本方法の改変型においては、分化培地における培養の際には球形の細胞塊に凝集するような細片として、未分化細胞培養からpPS細胞を剥離する (実施例2)。

#### 【0054】

(pPS細胞を培養するために使用される調整培地に存在し得るような) 分化を阻害する因子を取り除いていく段階は、分化工程の一部である。幾つかの状況においては、例えば密度のより低いフィーダー細胞で調整された培地を使用することによって、これらの因子を徐々に取り除いていくことは有益である可能性がある (実施例3)。非特異的な方法でpPS細胞を分化させる他の方法が知られており、造血細胞を生み出す工程を開始するためにこれらも適している可能性がある。例えば、レチノイン酸 (RA) またはジメチルスルホキシド (DMSO) を培養培地に含み；細胞が培養される通常の細胞外マトリックスから取り除くことによる (国際公開公報第01/51616号)、または、始原初期外胚葉様細胞を形成することによる (Rathjenら、J. Cell Sci. 112:601、1999)。

#### 【0055】

##### 造血細胞に向かって分化を行わせる段階

培養を造血経路に向かわせるために、未分化pPS細胞または分化を開始させた細胞集団

10

20

30

40

50

を、造血分化因子のカクテルにおいて培養する。単独の、または組み合わせた因子の各々は、造血経路に向かう細胞の分化を行わせ、造血表現型を有する細胞の副産物を生じ、他の細胞タイプの成長を阻害することが可能である、または、その他の仕方において造血細胞を増加させることが可能である。本発明を実施するために作用の機構を理解することは必要ではない。

#### 【0056】

例示的には、単独での、またはBMP-2、BMP-4、もしくはBMP-7のような骨形成タンパク質と組み合わせた幹細胞成長因子（SCF）、インターロイキン3（IL-3）、インターロイキン6（IL-6）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）のような造血サイトカインの組み合わせである。SCFは、血小板由来増殖因子（PDGF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、Flt-3リガンドおよび血管内皮成長因子（VEGF）のための受容体に関連するチロシンキナーゼ受容体である、c-kitのリガンド仲介の二量体形成によって細胞内シグナルを誘導する。重要な他の因子は、ソニック・ヘッジホッグ（SHH）、デルタ-1、ジャグド-1、およびトロンボポエチン（TPO）を含む。実施例9および実施例10において示されるように、サイトカインがCD45表現型（造血前駆体細胞）の形成を促進する一方、骨形成タンパク質は自己再生能を有する前駆体細胞の増殖を促進すると考えられる。

10

#### 【0057】

典型的に、少なくとも2つ、3つ、または3つより多くのそのような因子を、分化カクテルを作製するために組み合わせる。ヒトのタンパク質が好ましいが、種相同体および種変異体を使用することもできる。これらの因子のいずれかの代わりに、受容体特異的抗体のように、同じ受容体に結合する、または同じシグナル変換経路を刺激する、他のリガンドを使用することが可能である。加えて、分化を異なる経路に向かって行わせるために存在し得る、他の因子の効果を中和するような他の成分を培地を含むことが可能である。一例は、神経形成分化の方向における細胞の喪失を最小化するのに役立つと考えられる、神経発育因子に対する抗体である。分化カクテルは、ウシアルブミン、インスリンおよびトランスフェリンを含有する、血清を含まない培地（SF）のような、望ましい細胞集団の増殖を支持する栄養培地において構成される。

20

#### 【0058】

未分化pPS細胞または分化を開始させたpPS細胞は、因子カクテルにおいて、望ましい表現型が現れるのに十分な時間培養される。幾つかの製剤は分化工程のための支持力がより強い場合、栄養培地の選択は重要である可能性がある。培地（またはその同等物）に胎児ウシ血清を含むことによって、アルブミンおよびホルモンのみを含む単純な混合物よりも、造血分化因子の活性がはるかに増強される。幾つかの状況においては、造血細胞の増殖を支持するフィブロネクチンのようなある基質上においてこの培養を行うことが有益である可能性もある。

30

#### 【0059】

以前の予想に反して、pPS細胞の造血細胞への分化は、共培養される間質細胞がなくても、非常に効率の高い仕方で行われ得ることが見出された。したがって、本発明は、pPS細胞の分化子孫細胞が、異なるゲノムを有する細胞の不在下において、少なくとも、集団の多数において造血表現型が現れるまで培養されるような、造血細胞を形成するための方法を含む。これは、フィーダー細胞、間質細胞、または分化因子もしくは支持マトリックスを提供する他の細胞のような、培養中に存在するアロタイプ細胞または異種型細胞がないことを意味する。しかし、明らかに除外される場合を除いて、工程への付加物として培養培地にそのような細胞を含むことは許容される。分化工程を増強することが可能な細胞は、ヒトの骨髄から単離された初期間質細胞、および、MS-5マウス間質細胞系の細胞を含む。

40

#### 【0060】

本発明の技術を使用して、前駆細胞の表現型を有する比率が著しく高い造血細胞集団がpPS細胞から誘導された。様々な組み合わせにおいて、SHH、BMP-4、SCF、IL-3、Flt-3LおよびIL-6は、表現型的な、および機能的な造血前駆細胞を誘導することが可能であった。

50

実施例3～5においては、pPS細胞の分化は、胚様体を10日間培養し、その後、SCFおよびFlt-3Lの双方を100～300 ng/mL、10～50 ng/mLのIL-3、IL-6、およびG-CSF、100 ng/mLのSHH、および5～100 ng/mLのBMP-4を、全て、20%の胎児ウシ血清を含有する培地中に、または、アルブミン、トランスフェリンおよびインスリンを含有する、血清を含まない培地中に含むある環境においてプレティングすることによって開始された。8～15日後、8%がCD45 +ve、22%がCD34 +ve、および5.6%が双方のマーカーについて二重に陽性であるような造血細胞が現れた。CFUアッセイ法において試験した場合、平板効率は再現可能なように約350分の1であった。実施例9および実施例10においては、胚様体が形成された翌日、培養にサイトカインおよびBMP-4を加えたところ、15～22日後にCD45 +ve細胞の比率がさらに増加した。BMP-4を加えることによって、各一次CFUから4個、10個、またはそれ以上の二次CFUが形成されるような集団を得ることが可能になることから、自己再生造血前駆細胞の存在が示される。

10

#### 【0061】

pPSに由来する造血細胞のさらなる成熟

前述の説明に従って得られたpPSに由来する造血細胞は、全身性造血不全の治療のために、および、インビトロにおける造血分化についての研究のために特に貴重であるような、高い比率の前駆細胞を含む。本発明は、特定の状態を治療するために有用な、および、インビトロにおけるある種の薬剤のスクリーニングの適用のために有用な、より成熟した細胞集団をも含む。

#### 【0062】

本発明に従った成熟造血細胞を得るためには、2つの方法がある。一方の方法においては、適切な成熟因子を含む培地において培養することによって、既に説明されたように得られた造血細胞集団をさらに分化させる。他方の方法においては、非特異的な仕方で分化を開始させた細胞集団を、成熟段階に直接至らせる。

20

#### 【0063】

使用される成熟因子は、望ましい最終細胞タイプに依存する。実施例4において例証されるように、造血細胞のコロニーは、SCF、GM-CSF、IL-3、およびエリスロポエチン(EPO)を含む環境において培養することによって、胚様体細胞から生み出すことが可能である。これによって、培養は骨髄系細胞に向かい、結果的に～66%の赤血球系コロニー、～19%の単球コロニー、および～15%の顆粒球コロニーを含む培養が生じる。使用されることが可能な他の因子は、顆粒球細胞のためのG-CSF、単球細胞のためのM-CSF、リンパ球系細胞のためのIL-2およびIL-4、巨核球のためのTPO、および赤血球系細胞のためのEPOを含む。

30

#### 【0064】

造血細胞の特徴

細胞は、多くの表現型判定基準に従って特徴付けることが可能である。判定基準は、限定はしないが、形態学的な特徴の顕微鏡による観察、発現された細胞マーカーの検出または定量化、インビトロにおいて測定可能な機能判定基準、および宿主動物個体への注入の際の挙動を含む。

#### 【0065】

表現型マーカー

本発明の細胞は、それらが様々な種類の造血細胞に特徴的な表現型マーカーを発現するかどうかに従って特徴付けられることが可能である。重要なマーカーは、以下を含む：

40

- ・未分化hES細胞：SSEA-4、Oct-4
- ・始原造血細胞：CD34、AC133、c-kit、CD38
- ・成熟多能性造血細胞：CD45
- ・赤血球系細胞：グリコホリンA
- ・初期骨髄系：CD33
- ・単球：CD14、CD64、HLAクラスII
- ・顆粒球：CD13、CD15

50

- ・リンパ球系：CD19、免疫グロブリン（B細胞）、CD3（T細胞）
- ・巨核球：CD56。

## 【0066】

組織特異的マーカーは、細胞表面マーカーについてのフロー免疫細胞化学法、または、細胞内もしくは細胞表面マーカーについての（例えば、固定化細胞または組織切片の）免疫組織化学法のような任意の適した免疫学的技術を用いて検出することが可能である。造血細胞のフローサイトメトリー解析についての詳細な方法は、Gallacherら、Blood 96:1740、2000において提供されている。細胞表面抗原の発現は、標準の免疫細胞化学的解析またはフローサイトメトリーアッセイ法において、選択的に細胞の固定後に、および選択的に、標識二次抗体または標識を増幅させるための他の連結体を用いて、有意に検出可能な量の抗体がその抗原に結合する場合に、陽性として定義付けられる。

10

## 【0067】

組織特異的な遺伝子産物の発現は、ノーザンブロット解析、ドットブロットハイブリダイゼーション解析によって、または、標準の増幅法において配列特異的プライマーを用いた、逆転写酵素によって開始されるポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって、mRNAレベルで検出することも可能である。さらなる詳細については、米国特許第5,843,780号を参照のこと。本開示において挙げられる、特定のマーカーについての配列データは、GenBankのような公共のデータベースから得られることが可能である。

## 【0068】

本発明のある態様は、少なくとも5%、10%、20%、または40%がCD34 +veであるような；1%、2%、5%、または10%がCD45 +veであるような（またはCD34と二重に陽性であるような）；50%、70%、または90%がCD14、CD14、CD19について陽性であるような；および、5%、1%、または0.2%未満がSSEA-4 +veまたはOct-4 +veであるような造血細胞に関連する。特定の細胞集団において、これらの特徴の様々な組み合わせが存在し得る。

20

## 【0069】

## 機能的な特徴

本発明の細胞は、機能判定基準に従って特徴付けられることも可能である。造血細胞および前駆細胞についてのアッセイ系の概説については、T.A.Bock (Stem Cells 15 Suppl 1:185、1997)を参照のこと。

## 【0070】

複製造血細胞について頻繁に使用される試験は、コロニー形成（CFU）アッセイ法において、そのような細胞のコロニーを形成する能力を調べるものである。古典的なアッセイ法は、TillおよびMcCulloch (Ser. Haematol. 5:15、1972)の脾臓コロニー形成アッセイ法である。今日では、コロニー形成アッセイ法は通常、増殖因子を添加したメチルセルロースマトリックスにおいて行われる。他に明らかに必要とされる場合を例外として、本開示において言及される定義的なCFUアッセイ法は、実施例2において説明されるように行われる。

30

## 【0071】

一旦コロニーが形成されれば、形態学的判定基準によってそれら进行评估し、赤芽球コロニー群形成細胞（BFU-E）、顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）、巨核球コロニー形成細胞（CFU-M）、赤芽球コロニー形成細胞（CFU-E）および4つ全ての細胞タイプを生み出す多能性コロニー（CFU-GEMM）に分類することができる。平板効率は、インプラント細胞に対する形成されたコロニーの比率である。本発明の方法に従って調製された造血細胞は、2,000分の1、500分の1より高い平板効率を有することが可能であり、ある状況下においては100分の1より高い平板効率を有することが可能である。

40

## 【0072】

最終的に分化した細胞の機能判定基準は、それらの細胞の既知の特徴に従って決定されることが可能である：例えば、マクロファージの、粒子を貪食する能力、抗原を提示する能力、または適切なサイトカインに反応する能力；顆粒球および血小板の、適切なメディエーターを放出する能力；ならびに、リンパ球の、混合リンパ球反応において照射同種異

50

系 刺激 ( 標的 ) 細胞に反応して増殖する能力。

【 0 0 7 3 】

#### 動物モデル実験

造血細胞の臨床的な適用のためにはかなり重要なものは、細胞集団の、宿主動物個体の造血系を再形成する能力である。再形成は、幾つかの十分に確立された動物モデルを用いて試験することが可能である。

【 0 0 7 4 】

造血能のある細胞の投与による再増殖は、異種移植片拒絶を先んじて制するために遺伝子操作されたマウスにおいて評価することができる。特に扱いやすいのは、重症複合型免疫不全 ( SCID ) を有するマウスを交配した、非肥満糖尿病 ( NOD ) 遺伝子型を含む NOD/SCID マウスである。このモデルの使用については、Larochelleら、*Nat.Med.* 2:1329、1996 ; Dickら、*Stem Cells* 15:199、1997 ; および Vormoorら、*J.Hematother.* 2:215、1993において説明されている。手短に言えば、マウスを致死量以下で照射し、その後、 $\sim 3 \sim 4 \times 10^6$  個の CD34 +ve 細胞を尾の静脈を通して注射する。8週間後、大腿骨、脛骨、または腸骨稜から骨髓細胞を採取し、表面表現型および CFU アッセイ法によって、投与されたヒト細胞による再増殖の証拠について解析する。再増殖によって、免疫学的キメラおよびある程度の免疫寛容が生じるため、造血細胞は、( 厳密性の増す順に ) 非照射 NOD/SCID マウス、通常の SCID マウス、ヌードマウス、および免疫応答性マウスのような、無防備状態がより軽度の免疫機構において試験されることが可能である。

10

【 0 0 7 5 】

造血能については、他の動物モデルにおいて、さらなる前臨床研究を行うことができる。適切な大動物異種移植モデルはヒツジであり、胎児の免疫学的未熟性および胎児骨髓において発達している空間を利用することにより、骨髓の調整をせずに造血幹細胞移植を行うことが可能になる。これによって、可能性のある、放射線、化学療法、または遺伝的欠損宿主に関連する間質の異常が避けられる。本モデルにおいては、ヒト幹細胞はコロニーを形成し、骨髓に何年間も存続し、多系統への分化を可能にし、ヒトのサイトカインに対して反応性を示し、二次レシピエントに移植される潜在能を保持する。Zanjaniら、*Int.J.Hematol.* 63:179、1996 ; および Zanjaniら、*J.Clin.Invest.Med.* 93:1051、1994を参照のこと。霊長類モデルは、C.E.Dunbar、*J.Intern.Med.* 249:329、2001 および Donahueら、*Hum.Gene Ther.* 12:607、2001において提供されている。本発明の細胞集団は、造血細胞に

20

30

【 0 0 7 6 】

#### 造血細胞の遺伝子改変

本発明の造血前駆細胞は、実質的な増殖能を有する。必要に応じて、内因性遺伝子からの転写を増加させること、または導入遺伝子を導入することによって、細胞中のテロメラーゼ逆転写酵素 ( TERT ) のレベルを増加させることにより複製能をさらに増強することができる。特に適切なのは、国際公開公報第 98/14592号に提供されているヒトテロメラーゼ ( hTERT ) の触媒成分である。ヒト細胞におけるテロメラーゼのトランスフェクションおよび発現は、Bodnarら、*Science* 279:349、1998 および Jiangら、*Nat. Genet.* 21:111、1999に記載されている。遺伝子改変細胞は、標準的な方法に従って、RT-PCR法、テロメラーゼ活性 ( TRAP アッセイ法 )、hTERT の免疫細胞化学染色、または複製能により、hTERT の発現について評価することができる。myc、SV40 ラージ T 抗原、または MOLT-2 をコードする DNA で細胞を形質転換する等の、細胞を不死化する他の方法もまた意図している ( 米国特許第 5,869,243号、国際公開公報第 97/32972号、および国際公開公報第 01/23555号 ) 。

40

【 0 0 7 7 】

本発明の方法により調製された細胞集団は、注目すべきことには未分化 pPS 細胞を含まない。必要に応じて、細胞を調製またはさらに処理し、インビトロで未分化細胞を除去すること、またはインビボで復帰細胞を防ぐことができる。集団から未分化幹細胞を減少さ

50

せる1つの方法は、TERTプロモーターまたはOCT-4プロモーター等の未分化細胞において優先的な発現を引き起こすプロモーターの制御下にエフェクター遺伝子があるベクターを、集団にトランスフェクションすることである。エフェクター遺伝子は、緑色蛍光タンパク質等の細胞選別に導くレポーターであってよい。エフェクターは、例えば毒素またはカスパーゼ等のアポトーシスの介在物質をコードし、細胞に対して直接溶解性であってよい(Shinouraら、Cancer Gene Ther. 7:739、2000)。エフェクター遺伝子は、抗体またはプロドラッグ等の外部薬剤の毒素効果に対して細胞を感受性にさせる効果を有してもよい。例示的には、発現する細胞をガンシクロビルに対して感受性にさせる単純ヘルペスチミジンキナーゼ(tk)遺伝子である(国際公開公報第02/42445号)。または、エフェクターは、未分化表現型に復帰する任意の細胞をインビボで天然抗体に感受性にさせる、外来決定因子の細胞表面発現を引き起こし得る(英国特許第0128409.0号)。

10

#### 【0078】

本発明の細胞は、組織再生に關与するその能力を増強するために、または、治療される被験者に治療用遺伝子を送達するために、遺伝的に改変することもできる。造血細胞において構成的であるか、または特異的に活性をもつプロモーターに機能的に連結された、望ましい遺伝子についての既知のコード配列を用いてベクターが設計される。遺伝子治療における導入遺伝子の使用は、下記において説明される。

#### 【0079】

##### 造血前駆体細胞およびその誘導体の使用

本発明は、多数の造血前駆体細胞、および、赤血球系系統、顆粒球系統、単球系統、巨核球系統、およびリンパ球系系統の造血細胞を生産する方法を提供する。これらの細胞集団は、多くの重要な研究、開発、および商業的な目的のために使用されることが可能である。

20

#### 【0080】

本発明の細胞は、他の系統からの細胞において優先的に発現されるcDNAが相対的に混在していないcDNAライブラリを調製するために使用することができる。本発明の分化細胞は、標準法に従って、造血前駆体およびその誘導体のマーカーについて特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を調製するために使用することも可能である。

#### 【0081】

特に重要なものは、薬剤の開発、造血病理学の臨床的な治療のための、および、他のタイプの移植療法の状況において選択的な免疫寛容を誘導するための、本発明の組成物の使用である。

30

#### 【0082】

##### 薬剤のスクリーニング

本発明の造血細胞は、造血前駆体細胞およびそれらの様々な子孫細胞の特徴に影響を与える(溶媒、低分子薬、ペプチド、ポリヌクレオチドのような)要素、または、(培養条件または操作のような)環境条件についてスクリーニングするために使用することができる。

#### 【0083】

幾つかの適用においては、pPS細胞(未分化または分化)は、造血細胞への成熟を促進する因子、または、長期の培養においてそのような細胞の増殖および維持を促進する因子をスクリーニングするために使用される。例えば、候補成熟因子または候補成長因子は、異なるウェルにおいて細胞にそれらを加える段階、およびその後、その細胞のさらなる培養および使用のための望ましい判定基準に従って、結果的に生じるあらゆる表現型の変化を決定する段階によって試験される。

40

#### 【0084】

本発明の他のスクリーニングの適用は、造血細胞の増殖、成長または毒性に対する潜在的な効果についての、薬学的化合物の試験に関連する。スクリーニングは、造血細胞に対して薬理学的効果を有するようにその化合物が設計されるためにか、または、どこか他の所で効果を有するように設計された化合物が、造血系に対して意図されない副作用をもた

50

らす可能性があるために、行われる可能性がある。

【0085】

当業者は一般に、標準的な教科書「In Vitro Methods in Pharmaceutical Research」、Academic Press、1997および米国特許第5,030,015号を参照する。候補薬学的化合物の活性の評価は、一般に本発明の分化細胞を、単独または他の薬剤と組み合わせた候補化合物と混合することを伴う。研究者は、化合物に起因する細胞の形態、マーカー表現型、または機能的活性における任意の変化を判断し（未処理細胞または不活性化化合物で処理した細胞と比較して）、化合物の効果を観察された変化と関連づける。

【0086】

まず細胞生存度、残存、形態、ならびに特定のマーカーおよび受容体の発現に及ぼす影響により、細胞毒性を判断することが可能である。染色体DNAに及ぼす薬剤の影響は、DNA合成または修復を測定することにより判断し得る。特に細胞周期の不定期における<sup>[3H]</sup>-チミジンまたはBrdUの取り込み、または細胞複製に必要なレベルを上回る取り込みが、薬剤の影響と一致する。望まれない効果には、中期の拡散によって判断される姉妹染色分体交換の異常な比率も含まれる。さらなる詳細については、当業者はA. Vickers（「In vitro Methods in Pharmaceutical Research」、Academic Press、1997の375～410ページ）を参照されたい。

【0087】

細胞の機能への影響は、造血細胞の表現型または活性を観察する任意の標準アッセイ法を用いて評価されることが可能である。薬剤への曝露からもたらされる、表現型マーカー、および、様々な表現型の均衡における変化の解析が含まれる。以前に説明されたような、コロニー形成アッセイ法および再形成アッセイ法も含まれる。

【0088】

造血再形成

本発明は、そのような治療の必要がある患者における造血機能を修復するための、造血前駆体細胞またはその誘導体の使用をも提供する。

【0089】

造血前駆細胞集団および誘導体集団は、急性または慢性の造血機能不全の治療のために使用することが可能である。そのような状態は、赤血球系細胞系統、顆粒球細胞系統、マクロファージ細胞系統、巨核球細胞系統、またはリンパ球系細胞系統の、遺伝したまたは獲得された、遺伝的欠損、貧血もしくは免疫不全を引き起こす不十分な造血能、または造血毒性を含む。例としては、鎌状赤血球貧血、再生不良性貧血、脊髄異形成症候群、放射線への偶発的な曝露、および狼瘡のような生命を脅かす自己免疫疾患がある。

【0090】

特に重要なものは、白血病、リンパ腫、ならびに、骨髄腫および乳癌のような、ある種の化学療法感受性および転移活性の固形腫瘍のような癌の治療である。患者は骨髄破壊的な放射線（1,200 cGy）、または、シクロホスファミド、チオテパ、もしくはエトポシドのような作用物質による化学療法を受ける、およびその後、本発明の造血細胞によって再形成を行わせる。多数のこれらの細胞を前もって成長させることができることによって、自己骨髄移植のタイミングの制限が省かれ、自己細胞調製物中に常在するいかなる腫瘍細胞にも関わる、悪性疾患を再導入するリスクが除かれる。

【0091】

可能な場合はいずれも、投与される細胞の組織適合性タイプを治療される患者の組織適合性タイプと一致させることが有益である。完全に一致する一致、またはHLA-A、HLA-B、およびHLA-DR遺伝子座において一致する細胞が最適である。pPS細胞に由来する造血前駆細胞、特にHLA対立遺伝子においてホモ接合である細胞の大きいバンクの利用可能性によって、マッチングがより容易なものになる。厳密な一致が得られない場合は、1つもしくは2つのクラスIまたはクラスII遺伝子座における一致が役立つ。そのような状況の幾つかにおいては（例えばCD2、CD3、またはCD4に対する抗体を用いて）投与される集団からT細胞を減少させるような細胞のさらなる操作により、対宿主性移植片病（GVHD）のリスクの

最小化に役立つ可能性がある。

【0092】

造血細胞は、典型的に、滅菌等張緩衝液中に懸濁した濃縮細胞懸濁液として投与するために調製される。冷凍または凍結保存された幹細胞の袋を室温にまで融解し、20~50 mLのアリコートにて、中心静脈カテーテルを通して注入する。非常に大雑把に言うと、CFUアッセイ法の平板効率に依存して、kg当たり $3.5 \times 10^6$ 個の用量のCD3 +ve細胞が適切である可能性がある。骨髓破壊的な処置後、好中球数は100細胞/ $\mu$ L未満に下がる可能性があり、 $< 10,000/\mu$ Lでは輸血に依存する程度の血小板減少を伴い、患者は血小板および一致した赤血球細胞を与えられて支持される。移植は、約7~21日目に最初に行われ、血液中の好中球および初期造血再構成の所見によって特徴付けられる。移植が一旦確立されれば、造血再形成は迅速であり、14~28日目までには十分な好中球(1,000/ $\mu$ L)および血小板(20,000/ $\mu$ L)の発生が認められる。G-CSFおよびGM-CSFのような増殖因子は、治療を増強する可能性がある。

10

【0093】

臨床医学における造血細胞およびその前駆体の使用についての一般的なアプローチは、「the Textbook of Internal Medicine」、第3版、W.N.Kelley編、Lippincott-Raven、1997のような、標準の教科書において；ならびに、「Hematopoietic Stem Cell Transplantation」、A.D.Hoら編、Marcel Dekker、2000；「Hematopoietic Cell Transplantation」、E.D.Thomasら編、Blackwell Science Inc.、1999；「Hematopoietic Stem Cell Therapy」、E.D.Ball、J.ListerおよびP.Law、Churchill Livingstone、2000のような特定化された参照において提供されている。

20

【0094】

臨床療法における造血幹細胞の使用は、進化しつつある分野であり、臨床医には他の使用が見出される。通常のように、本発明の細胞の使用および用量についての最終的な責任は、担当医にある。

【0095】

遺伝子治療

本発明の細胞は、造血機能を再形成するためのみならず、遺伝子治療を行うことのできる任意の他の欠損を修正または補足するためにも使用することができる。造血細胞には遺伝子発現のための貯蔵所(reservoir)としてのある種の利点がある。それらは、身体中を循環し、常に進行し続けるような仕方で再生する。細胞は、遺伝的に改変し、投与以前にインビトロにおいて試験することが可能であり、それにより、遺伝的ベクターを患者に投与することの不確かな状態が軽減され得る。

30

【0096】

本発明に従って遺伝子治療を行うために、安定した改変をもたらすような技術、例えば、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクター、または、相同組換えを使用して、構成的または造血細胞特異的なプロモーターの調節下にある治療用コード領域を含む導入遺伝子を用いて細胞を改変する。改変は、造血細胞の増殖培養において行われることが可能である。または、pPS細胞が未分化状態である間に改変が行われ、引き続き分化方法論が実行されることが可能である。細胞はその後、造血機能および導入遺伝子の発現の双方について評価される。

40

【0097】

十分な試験の後、遺伝子治療の必要のある患者に細胞を投与し、その後、欠損の修正について生化学的および臨床的にモニタリングすることができる。組成物が治療される被験者とHLA適合性である場合には、患者自身の細胞および遺伝的に改変された細胞の混合集団が治療用遺伝子の発現のために十分なレザバーを提供するのであれば、治療前に患者の骨髓破壊的な処置を行う必要がない可能性がある。

【0098】

胎内での遺伝子治療のための新規の標的としての造血幹細胞の説明については、Murdochら(FASEB J. 15:1628、2001)を参照のこと。一般的な参照は、「Stem Cell Biology a

50

nd Gene Therapy」、P.J.Quesenberryら編、John Wiley & Sons、1998；および「Blood Cell Biochemistrytherapy: Hematopoiesis and Gene Therapy」(Blood Cell Biochemistry、第8巻)、L.J.FairbairnおよびN.G.Testa編、Kluwer Academic Publishers、1999を含む。これらの参照は、遺伝子治療のための担体；遺伝子治療のための送達系としての、幹細胞の治療的な潜在能、および、典型的な臨床適用についての議論を提供する。

#### 【0099】

再生医療において、特定の免疫寛容を誘導するための細胞の組み合わせ

本発明の細胞は、患者に対してミスマッチの同種移植片の移植に備えて、特定の組織タイプに対する免疫寛容を誘導するために使用することも可能である。寛容化細胞は、同種移植片と組織適合性マーカーを共有するように選択され、患者に必要とされる細胞の機能を再生する細胞タイプを用いた治療の前または治療中に患者に投与される。その結果生じる免疫寛容は、後に、急性または慢性の同種移植片の拒絶のリスクを低下させる。

10

#### 【0100】

有効な細胞の組み合わせは、2つの成分を含む：免疫学的寛容を誘導する、第一の細胞タイプ；および、必要な機能を再生する、第二の細胞タイプ。再生医療のために、臨床的に有用な様々な細胞タイプを、pPS細胞および他の供給源から誘導することが可能である。

#### 【0101】

実例として、国際公開公報第01/88104号および国際特許出願番号PCT/US特許第02/19477 (Geron Corporation)において説明される方法に従って、pPS細胞から神経細胞を再生することが可能である。未分化pPS細胞または胚様体細胞は、1つまたは複数のニューロトロフィン、および1つまたは複数の分裂促進因子を含む培地において培養され、細胞の少なくとも~60%がA2B5、ポリシアリル化NCAM、またはネスチンを発現するような、および、培養において少なくとも20回は集団倍加できるような細胞集団を生じる。典型的な分裂促進因子は、EGF、塩基性FGF、PDGF、およびIGF-1である。典型的なニューロトロフィンは、NT-3およびBDNFである。増殖細胞はその後、分裂促進因子の不在下においてニューロトロフィンと培養することによって、最終的な分化を行わせることが可能である。細胞集団は、ドパミン作用性ニューロンの特徴である、高い比率のチロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞を含むように生産されることが可能である。

20

#### 【0102】

希突起神経膠細胞は、FGFのような分裂促進因子、および、トリヨードサイロニン、セレンおよびレチノイン酸のような希突起神経膠細胞分化因子を含有する培地に懸濁された細胞凝集体としてそれらを培養することによって、pPS細胞から生産することが可能である。その後、細胞を固体表面上にプレーティングし、レチノイン酸を取り除き、細胞集団を増殖させる。最終的な分化は、ポリ-L-リシン上にプレーティングし、全ての成長因子を除去することによって引き起こされることが可能である。細胞集団は、90%を超える細胞がGalC陽性であるように得られることが可能である。

30

#### 【0103】

肝細胞は、米国特許第6,458,589号および国際公開公報第01/81549号 (Geron Corporation)において説明される方法に従って、pPS細胞から生み出すことが可能である。未分化pPS細胞を、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下において培養する。典型的なある方法においては、分化は、1%のDMSO(4日間)、およびその後の、2.5 mMのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤n-ブチラートによって開始される。得られた細胞は、n-ブチラート、DMSOにEGF、肝細胞増殖因子およびTGF- $\beta$ のような成長因子を加えて含む肝細胞培養培地において4日間培養することによって、成熟させることができる。

40

#### 【0104】

心筋細胞または心筋細胞前駆体は、国際特許出願番号PCT/US02/22245号において提供される方法に従って、pPS細胞から生み出すことが可能である。5-アザシチジンが実例となるような、DNAのメチル化に影響を与える心栄養因子を含む増殖環境において細胞を培養する。その後、密度勾配遠心分離法によって、自発的に収縮する細胞を集団における他の

50

細胞から分離することができる。さらなる工程は、クレアチン、カルニチンまたはタウリンを含む培地において細胞を培養する段階を含み得る。

【0105】

骨芽細胞およびその前駆細胞は、国際特許出願番号PCT/US02/20998号において説明される方法に従って、pPS細胞から生み出すことが可能である。pPSに由来する間葉細胞を、骨形成タンパク質（特にBMP-4）のような骨形成因子、ヒトTGF- $\beta$ 受容体のためのリガンド、またはヒトビタミンD受容体のためのリガンドを含む培地において分化させる。インスリンまたは他の膵性ホルモンを分泌する細胞は、アクチビンA、ニコチンアミドのような因子、および米国特許出願第60/338,885号において挙げられる他の因子の存在下においてpPS細胞またはその誘導体を培養することによって生み出すことが可能である。軟骨細胞

10

【0106】

同種異系レシピエントに移植される、そのような分化細胞の任意のものに対する寛容を誘導するために、患者は「寛容化」細胞 - 注射部位における白血球の浸潤、抗体もしくはMLR活性の誘導、または同種移植片細胞の生存期間の延長によって決定されるような、同種移植片細胞に対する炎症反応または免疫学的反応の低下をもたらす細胞集団 - によって事前に処置される、または、同時に処置される。目的がアロタイプ特異的な寛容を促進することである場合、寛容化細胞は同種移植片細胞と「MHC適合性」であるように選択される。これは、寛容化細胞が、A遺伝子座、B遺伝子座またはC遺伝子座における少なくとも1つのMHCクラスIハプロタイプを同種移植片細胞と共有することを最低限意味する。ますます好ましいのは、寛容化細胞が、同種移植片のAハプロタイプおよび/またはBハプロタイプの片方または双方を有するような一致である。厳密な一致がない場合、寛容化集団は、異なる系に由来するMHC適合性細胞の混合物を生み出すことによって、同種移植片集団の複数のハプロタイプを含むように作製されることが可能である。同じpPS細胞系から双方の細胞集団を誘導することによって、寛容化細胞を同種移植片細胞に対して厳密に作製することも可能である。

20

【0107】

本発明のある態様においては、寛容化細胞は、上記に説明されるように得られる、および、1つまたは複数の特徴的な表現型的または機能的な特徴を有する、pPSに由来する造血細胞である。特に重要なものは、免疫制御T細胞、樹状細胞およびその前駆体、または、投与の際に免疫学的キメラを形成できるような細胞を含む、またはそれらを生み出すことが可能な造血細胞集団である。代替のある態様においては、免疫寛容（またはその比率）を誘導するために使用される細胞は、未分化pPS細胞の特徴をなおも有する。実施例6~8において例証されるように、未分化pPS細胞は、しばしば、実質的なMHCクラスII抗原を欠いていると考えられる。それらは、それら自身に対する、および、第三者の刺激細胞に対する炎症反応、ならびに同種異系免疫反応および異種免疫反応の双方を活発に抑制することが可能である。

30

【0108】

ある状況においては、未分化pPS細胞または初期前駆細胞は、投与後に制御されない仕方

方で増殖または分化し、悪性疾患または他の望ましくない過形成を生じる可能性があるという課題がある。この課題を克服するには幾つかの選択肢がある。1つのアプローチは、未分化細胞に、プロドラッグのガンシクロビルを細胞に対して毒性に変える（チミジンキナーゼのような）自殺遺伝子を備えることである（国際公開公報第02/42445号）。寛容が誘導された後、プロドラッグを投与することによって、未分化pPS細胞を被験者から淘汰することが可能である。その他のアプローチは、未分化pPS細胞を、それらがもはやインビボにおいて増殖できないが、免疫抑制のために必要な活性をなおも行い得る程度にまで不活性化するものである（実施例7および実施例8）。未分化pPS細胞は、照射（~1,000~3,000 Rads）によって、または、マイトマイシンC、もしくは他のある不活性化化学療法

40

50

薬、架橋剤、もしくはアルキル化薬を用いた処理によって、細胞分裂を阻害または予防するために事前に不活性化することが可能である。

【0109】

本節において説明される細胞の組み合わせは、再生医療の重要な新しい系を提供する。国際公開公報第02/44343号では、寛容化プロトコールおよびその後の組織再生の実行可能性を評価するための、幾つかのげっ歯目モデルおよびヒトではない霊長類モデルが提供されている。

【0110】

ヒトの被験者の治療は、第二の細胞集団に対する寛容を誘導するような仕方で第一の細胞集団を投与することによって進行する。局所的な炎症を抑える手助けとして、再生用の同種移植片を受ける同じ部位に、寛容化細胞を投与することができる。または、造血キメラを生み出す手助けとして、寛容化細胞を全身投与することができる。寛容の誘導は、同種移植片の細胞を刺激装置として用いて、一方向混合リンパ球反応において患者の血液のリンパ球を試験することによって決定されることが可能である（実施例7）。寛容の誘導の成功は、増殖反応の減少によって示される。レシピエントの造血キメラは、造血表面マーカーと同時に、HLAタイプについて循環単球を評価することによって、評価されることが可能である。

【0111】

患者は、その状態を治療するために、適合性のニューロン、希突起神経膠細胞、肝細胞、心筋細胞、間葉細胞、骨芽細胞、ホルモン分泌細胞、軟骨細胞、造血細胞、またはほか他の細胞タイプを同時にまたは後に投与される。本手法を行った後、患者は必要な量のサポートケアを受け、機能の改善について、適切な生化学的マーカーおよび臨床的判定基準によってモニタリングされる。

【0112】

本開示において説明される治療的な目的のいずれかのために、本発明の造血細胞または免疫寛容化細胞は、典型的に、ヒトへの投与のために十分な滅菌条件下において調製された等張賦形剤を含む薬学的組成物の形態において供給される。有効な細胞の組み合わせは、別々に、もしくは、キットの形態において別個の容器中に包装され、配送されることが可能である、または、（同じ部位への同時の投与のために）共に混合されることが可能である。本発明は、その製造、配送または使用のいずれかの時期に存在する細胞の組をも含む。細胞の組は、本開示において説明されるような、限定はしないが、ときには同じゲノムまたはMHCハプロタイプを共有する、未分化pPS細胞または他の分化細胞タイプと組み合わせた、pPSに由来するあるタイプの分化細胞（造血細胞、神経細胞等）が実例となるような、2つまたはそれ以上の細胞集団の任意の組み合わせを含む。組における各細胞タイプは、同じ存在物または業務上の関係を共有する異なる存在物の管理下にて、同じ施設において、または異なる場所において、一緒に、または別々の容器中に包装されることが可能である。

【0113】

細胞組成物の製剤における一般的な原則については、「Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy」、G.MorstynおよびW.Sheridan編、Cambridge University Press、1996を参照のこと。薬理学的分布および使用のために意図される組成物および組み合わせは、選択的に、造血機能の再形成、遺伝子治療、または免疫寛容の誘導のような望ましい目的についての文書の使用説明書と共に包装される。

【0114】

以下の実施例は、本発明の特定の態様の、さらに限定はしない例として提供される。

【0115】

実施例

実施例1：胚性幹細胞のフィーダー細胞層を用いない増殖

未分化ヒト胚性幹（hES）細胞の樹立された系を、本質的にフィーダー細胞を含まない

10

20

30

40

50

培養環境において維持した。

【0116】

標準の手法（国際公開公報第01/51616号）に従って単離された初期マウス胚性線維芽細胞（mEF）を用いて、調整培地を事前に調製した。

【0117】

hES培養は、マトリゲル（登録商標）によって被覆したプレートに継代した。播種の約1週間後、培養はコンフルエントになり、継代することが可能であった。これらの条件下において180日間に渡って維持された培養は、ES様の形態を示し続けた。免疫細胞化学的解析によって評価されたように、hES コロニーによってはSSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81、およびアルカリホスファターゼが発現されたが、分化細胞によってはコロニーの間で発現はなかった。多能性は、特定の細胞タイプを生み出すための確立されたプロトコールにそれらを提供することによって確認された。

10

【0118】

実施例2：未分化hES細胞培養における造血表現型の欠如

H1 hES細胞系の未分化細胞を、フローサイトメトリーおよびコロニー形成（CFU）アッセイ法によって解析し、造血細胞の特徴のいずれかが未分化状態において存在するかどうかを決定した。

【0119】

トリプシン-EDTA（1%トリプシン、2%EDTA；Gibco）によって室温にて10分間、または、細胞解離緩衝液（CDB：EDTAおよび高塩；Gibco）によって37℃にて10分間のいずれかを用いた、フィーダー細胞層を含まない培養から細胞を採取した。採取された細胞を遠心機にかけ、10%のFCSを含むIMDM（Iscove改良ダルベッコ培地）中に再懸濁し、その後、85μmのナイロンメッシュを通して過した。3%のFCSを含む200μLのPBS中にそれらを再懸濁し、2μLの抗体と共に室温にて15分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、その後、15μL/mLの7AAD（Immunotech）を用いて室温にて15分間染色した。

20

【0120】

図1は結果を示す。生細胞（7AAD<sup>-ve</sup>についてゲート制御した；パネルi）を、サイズ（ii）によってさらにゲート制御し、未分化ES細胞集団における造血細胞表面マーカー（iii-vi）の発現を解析した。培地対照に基づき、150未満の前方散乱特性についてのイベントを除いた。細胞のパーセンテージは、各図の上に示される、独立した実験の数（n）に基づき、平均±SEMとして表される。

30

【0121】

未分化H1細胞（A、B）およびH9細胞（C、D）を、個々のアイソタイプ対照（挿入図）に基づいた象限を用いて、様々なヒト造血マーカー（iii-vi）の発現について解析した。いずれの細胞も、ヒト造血マーカーCD45を発現せず、1.2%のみがCD34<sup>+</sup>（始原ヒト造血細胞のマーカー；パネルiii）であった。c-kit（iv）、CD38（v）、およびAC133（v）を含む、他の始原造血マーカーの発現について細胞を解析した。CD38はほとんどなかったが、22~33%がc-kit<sup>+</sup>であり、13~52%がAC133<sup>+</sup>であった。12~38%がMHCクラスI抗原（HLA-A、B、およびC）を発現していた（vi）。

【0122】

以下のようにCFUアッセイ法を行った。未分化hES細胞を採取し、 $2 \times 10^5$ 個のトリパンブルー陰性細胞を、50 ng/mLのSCF、10 ng/mLのGM-CSF（Novartis）、10 ng/mLのIL-3（Novartis）および3 U/mLのEPO（Amgen）を含むMethocult（商標）H4230メチルセルロース（StemCell Technologies Inc., Vancouver BC）にプレティングした。成長因子カクテルに25 ng/mLのBMP-4および300 ng/mLのFlt-3Lを加えることによって、未分化hES細胞系からの造血クローン形成性前駆細胞の検出は増強されなかった。湿度を調節した5%のCO<sub>2</sub>を含む空気中において、37℃にて培養をインキュベートし、40日目までの間、コロニーの成長についてモニタリングした。その形態学的な特徴によって、コロニーのサブタイプが識別され、（赤血球系系統の場合）赤味を帯びた色によってヘモグロビン生成が示された。結果は表1において示される。

40

50

## 【 0 1 2 3 】

(表 1) 未分化hES細胞のCFUコロニー形成能

hES 細胞系	CFUについて 陽性のウェル		CFU 数	CFU サブタイプ
H9 (n=3)	1/6	= 16.6%	3	赤血球系
H1 (n=4)	0/9	= 0%	0	(なし)

## 【 0 1 2 4 】

H1系の未分化hES細胞は、4つの別個の実験において、9つの別個のウェルにおいて造血コロニーを産生しなかった。3つの小さな赤血球系コロニーが形成された1つの実験を例外として、未分化H9細胞についても同様の結果が得られた。

## 【 0 1 2 5 】

実施例3：造血分化因子と共に培養されたhES細胞における造血表現型

本実験においては、hES細胞のH9系を造血前駆細胞に分化させ、フローサイトメトリーによって表現型を評価した。

## 【 0 1 2 6 】

パスツールピペットを用いて、細胞の蓄積物が形成されるまで、コンフルエントな6ウェルプレートの直径を横に掻き取ることによって、hES細胞の細片を形成した。各細片を非調整培地（20%のFCSを含むKO DMEM）に懸濁し、10日間培養した。この時点において、培養は、後の実施例においては胚様体と呼ばれる、細胞の丸い球を含んでいた。形態学的判定基準およびトリパンブルー染色によって評価されるように、細胞の多くは生細胞ではなかった。

## 【 0 1 2 7 】

胚様体細胞を採取し、分散させ、付着性組織培養皿またはフィブロネクチン被覆皿に播種した。培養培地は、0.1 mMのβ-メルカプトエタノール、2 mMのL-グルタミンおよび以下の組換えヒト成長因子を添加したBIT培地（BSA、インスリン、およびトランスフェリン；StemCell Technologies、Vancouver BC）であった：300 ng/mLの幹細胞成長因子（SCF、Amgen）、300 ng/mLのFlt-3リガンド（Flt-3L、R & D Systems、Minneapolis MN）、50 ng/mLのG-CSF（Amgen）、10 ng/mLのIL-3（Novartis、Dorval QC）、および10 ng/mLのIL-6（R & D Systems）。分化後、H9細胞を、フローサイトメトリーによって造血細胞表面マーカーの発現について評価した。

## 【 0 1 2 8 】

図2は、未分化hES細胞上およびその誘導体上に検出された細胞表面マーカーを比較するものである。フローサイトメトリーのデータを適切に評価するために使用されたゲート制御ストラテジーは、150未満となるような前方散乱特性によって定義付けられるような破砕物の除去（パネルAi）、その染色について陽性であることによって、それらの細胞は除去されるべきであると定義付けられるような（パネルAii）生存度染色7AADを用いた、死細胞および死にかけた細胞の除去を含み、アイソタイプ対照（挿入図）に従って象限を定義付けることによって行った。パーセンテージは、アイソタイプ対照の染色について修正された。未分化細胞はCD45を全く有さず、細胞の0.1%がCD34 +veである（パネルA iv）。未分化H9細胞の35%がAC133を発現する（パネルA v）。AC133 +veおよびCD34 -veである、骨髄から単離された始原造血細胞によっては、免疫欠損マウスを再増殖することが可能である。

## 【 0 1 2 9 】

下記には、BMP-4の不在下（パネルB）または存在下（パネルC）のいずれかにおいて、SFにHGFを加えて培養することによって分化させた細胞の解析が示される。分化後、細胞の0.9%においてCD45の発現が認められ、始原造血細胞表面マーカーCD34が0.1%から1.5%に増加した（パネルB iv）。両方のマーカーを発現する細胞は全くなかった。AC133 +ve

10

20

30

40

50

細胞は、35%から14%に減少した（パネルB v）。これらの血清を含まない培養にBMP-4を含むことによって、未分化hES細胞と同様の、CD45 +ve細胞（0.3%）およびCD34 +ve細胞（0.2%）の比率を有する細胞が生じた。しかし、BMP-4の存在下における分化では、再度、AC133の発現が減少した（10%；パネルC iv）。

【0130】

#### 実施例4：分化hES細胞による造血コロニー形成

図3は、hES細胞のH1系から分化した細胞の造血能の評価についての模式図を示す。分化は、通常の密度の半分で培養されたmEFから作製された調整培地において3回継代することによって開始された。その後、以前のように、20%のFCSを加えたKO DMEMにおいて細胞の細片を培養し、胚様体を形成させた。この時点において、ウェルの全含量（胚様体および死細胞の双方を含む）を採取するか、または、死細胞のない個々の胚様体を単離した。CFUアッセイ法（効果がほとんど認められなかったBMP-4を用いて、または用いずに、実施例2において説明されるように行われた）によって、採取された細胞を評価した。その後、フローサイトメトリーによってCFUアッセイ法からの細胞を表面表現型について評価した。

10

【0131】

図4は結果を示す。上段左端の光学顕微鏡写真は、CFUアッセイ法における典型的な培養ウェルの外観を示す（倍率100x）。この培養は、大量に増殖できるような、かつマクロファージタイプ、顆粒球タイプおよび赤血球系タイプの前駆細胞であると推測される様々な形態学的特徴を有するような細胞を含んでいた。小さな黒い斑点は、アッセイ培養における死細胞である。楕円は、赤血球系細胞を示すような、ヘモグロビン生成（赤色）を表している、細胞のクラスターを強調している。

20

【0132】

CFU培養物をプールし、グリコホリンA（赤血球前駆体を示す）；CD45（造血細胞を示す）；CD34、CD38、およびAC133（全て始原ヒト造血細胞を示す）；およびCD19（Bリンパ球を示す）に対する一次抗体を用いて染色した。CD45についての陽性染色（83~86%）によって、造血細胞の存在が確認された（パネルAiおよびii）。グリコホリンAについての陽性染色（4%）によって、赤血球系細胞の存在が確認された（パネルAi）。予測されたように、グリコホリンA陽性細胞はCD45について染色されなかった。0.7%がCD34 +veであり、0.2%がAC133 +veであったため、初期造血前駆細胞はこの培養の低いパーセンテージを占めていた。CFU培養では、CD33 +ve細胞のパーセンテージは低く（0.9%）、CD19 +ve細胞（Bリンパ球）は認められなかった。CD33は、リンパ球系系統から識別される、骨髄系経路の初期の細胞についてのマーカーである。CFUアッセイ法は骨髄系前駆細胞の形成に向けられるものであるため、リンパ球系細胞が認められなかったことは驚くべきことではない。

30

【0133】

アッセイ培養におけるCFUのサブタイプは、パネルBにおいて示される。培養への総インプット細胞数は20,000個であり、総CFU数は47個であったことは、1つのコロニーを形成するために使用された細胞の平均数（平板効率）が425分の1であったことを意味する。

【0134】

定義付けられたサブタイプの、採取された個々のコロニーについても、フローサイトメトリーを行った。パネルCに写真が示されるような（倍率50x）顆粒球の形態をいずれも有する、2つのコロニーが選択された。顆粒球コロニーについて予測されるように、コロニーは81~92%がCD45 +ve（パネルCiおよびiv）であり、73%がCD13 +ve（パネルCi）であった。CD15の低いレベルから、それは、造血階層内の骨髄球発生段階に位置付けられる。CD34およびc-kitのような始原造血細胞マーカーもこのコロニー上に各々6%および12%存在することが認められた一方、AC133は発現されていなかった。

40

【0135】

胚様体単独での前駆細胞の分化の方向付けを決定するために、分化培養から個々の胚様体を単離し、以前のようにCFUについてアッセイした。総計50,000個の分化細胞を各アッ

50

セイ法に用い、評価に先立って11日間培養した。

【0136】

図5は結果を示す。幾つかのCFUサブタイプが示された：赤血球系細胞（倍率100×）、顆粒球細胞（倍率100×）およびマクロファージ（倍率200×）。培養中の前駆細胞の総数（77個のコロニー）に基づく定量的評価から、649個のインプット細胞当たり1つの平板効率で、赤血球系系統に向かう傾向が明らかになった（パネルB）。フローサイトメトリーによって2つの赤血球系コロニーを解析したところ、93%がグリコホリンA陽性であることが認められた。

【0137】

#### 実施例5：二次コロニー形成

1つ前の実施例におけるCFUアッセイ法から個々のコロニーを採取し、それらを二次CFUアッセイ法に再プレーティングすることによって、二次前駆細胞の存在をアッセイした。全含量を分化させるプロトコールによって行われたCFUアッセイ法からの2つの一次コロニー、および、単離胚様体を分化させるプロトコールからの2つのコロニーを各々、二次CFUアッセイ法に継代した。

【0138】

図6は結果を示す。全含量プロトコールからの2つの顆粒球コロニーは、二次アッセイ法において多くのコロニーを形成した。

【0139】

パネルAは、顆粒球細胞、マクロファージ、赤血球系細胞のコロニー、およびGEMMコロニー（顆粒球細胞タイプ、赤血球系細胞タイプ、マクロファージ細胞タイプおよび巨核球細胞タイプの混合物）を示す、82,500個の細胞からなる、ある単一の一次コロニーに由来する異なる二次コロニーを示す。コロニー数は下記にて示される。二次コロニーを採取し、フローサイトメトリーのために共にプールした。高レベルのCD45発現が認められた（46%、造血非赤血球系細胞を示す）が、CD34のレベルは低かった（パネルA v）。それが由来する一次コロニーと同様に、二次アッセイ法における細胞はCD13 +ve（35%；パネルA vi）であった。CD14（単球を示す）の発現は低かった（2%；パネルA vii）。グリコホリンA +ve細胞は、プールされたアッセイ培養において低い比率を占めるにすぎなかった（1.2%；パネルA viii）が、形態学的判定基準によって評価されたように、赤血球系前駆細胞は明らかに存在していた。

【0140】

パネルBは、12,500個の細胞からなる、異なる一次顆粒球コロニーから得られた二次コロニーを示す。その全てがマクロファージ様のコロニーであるような、総計14個の二次コロニーが得られた。全CFUアッセイ集団のフローサイトメトリーによって、細胞の50%がCD45 +ve、0.7%がCD34 +ve、および57%がCD13 +veであることが示されたことから、単球細胞タイプまたは顆粒球細胞タイプのいずれかの存在が示される。

【0141】

二次コロニー形成が実証されたことによって、もとの細胞が、一次CFUアッセイ法においてコロニーを形成する骨髄細胞に特徴的なものよりも高い増殖能を有する始原前駆細胞であったことが示される。

【0142】

#### 実施例6：未分化hES細胞上におけるMHC発現の特徴付け

ヒトの組織上におけるMHC抗原の発現によって、インビトロおよびインビボにおけるアロ特異的なT細胞の反応の結果が決定される。MHCクラスIIは、主に骨髄由来の細胞および胸腺上皮において発現される。それは、特定の免疫応答を開始するために、免疫機構に対して抗原を提示する。対照的に、MHCクラスIは、事実上全ての哺乳動物細胞によって発現される。それは、免疫機構のエフェクター部分において役割を担い、宿主細胞がウイルス感染した場合、組織非適合性である場合、またはさもなければ外来抗原を含む場合に、特異的なTリンパ球によって認識される。

【0143】

10

20

30

40

50

免疫染色およびフローサイトメトリーによって、未分化hES細胞上におけるMHCの発現を解析した。これらの研究において使用されたhES細胞系は：H1（36～45継代）、H7（37～43継代）、およびH9（31～40継代）であった。以下の抗体を使用した：HLA-A、B、C；HLA-DP、DQ、DR（BD-Pharmingen）。0において抗体と細胞をインキュベートし、洗浄し、ヨウ化プロビジウムを用いて対比染色した。FACScan（商標）またはFACScalibur（商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson）において、フローサイトメトリー解析を行った。

#### 【0144】

図7は結果を示す。灰色の線は、MHC抗体染色を示す。太線はアイソタイプ対照を示す。ヒトの胎児臍帯血単核細胞（CBMC； $n = 4$ ）と同様に、H1、H7およびH9 hES細胞系は全て、MHCクラスIを発現する（ $n = 26$ ）。hES細胞は、検出可能なMHCクラスII（DP、DQ、DR八プロタイプ）を全く有さない一方、ある比率のCBMCは低レベルのクラスIIを発現する（2つめの山）。最後の図における挿入図は、50～100単位のインターフェロン（IFN）によるhES細胞の処理によって、MHCクラスIIの検出可能な発現がなおも誘導されなかったことを示す。

10

#### 【0145】

##### 実施例7：培養における未分化hES細胞による免疫抑制

hES細胞の、同種異系T細胞の増殖を誘導する能力を、混合リンパ球反応（MLR）において測定した。hES細胞系は、IFN- $\gamma$ によって刺激を与えた後でさえも、初期ヒトT細胞における同種異系反応性を誘導できないことが認められた。

20

#### 【0146】

Ficoll-Hypaque（商標）密度勾配作製用媒体（Amersham Pharmacia）を用いて、ヘパリン化した血液から末梢血単核細胞（PBMC）を単離し、10%のFBSを含むRPMI 1640培地中に再懸濁した。または、Tリンパ球について増加させるために、分離した細胞を37℃にて2時間インキュベートし、非付着細胞を収集し、後の使用のために、60%のAIM-V、30%の胎児ウシ血清（FBS）、10%のDMSO中において凍結した。10 ng/mlのヒト組換えGM-CSFおよび10 ng/mlのIL-4（R & D Systems）を含むAIM-Vにおいて残りの付着細胞を7日間培養することによって、樹状細胞（DC）を調製した。混合リンパ球反応を以下のように行った。刺激細胞を照射し（DC、3,000 Rad；BJ線維芽細胞、3,000 Rad；またはhES細胞系、1,000 Rad）、その後、AIM-V培地において、96ウェルの円形底プレートに $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^2$ 個の細胞をプレーティングした。ウェル当たり $1 \times 10^5$ 個の濃度でレスポンドーPBMC細胞またはレスポンドーT細胞を加え、AIM-Vにおいてプレートを5日間培養した。ウェルはその後、 $[^3\text{H}]$ チミジン（ウェル当たり $1 \mu\text{Ci}$ ）を用いて16～20時間パルスを与え、採取し、計数した。

30

#### 【0147】

図8は結果を示す（3例のドナーからの、マルチウェルの平均刺激指数 $\pm$ SEM）。hES細胞は、レスポンドーPBMCにおける同種異系T細胞の増殖を誘導しなかった一方、PBMCが刺激装置として使用された場合には、有意なT細胞の増殖が認められた。同様に、胎児血液単球をレスポンドーとして使用し、hES細胞を刺激装置として使用した場合に、有意な増殖は認められなかった（パネルA）。T細胞を増加させた（単球を減少させた）PBMCをレスポンドーとして使用した場合にも、hES細胞系H1、H7、およびH9の、T細胞を刺激する能力は認められなかった（パネルB）。IFN- $\gamma$ と共にインキュベートすることによって、MHCクラスIの発現の有意なアップレギュレーションが引き起こされた（挿入図：灰色の線 = 非処理のhES細胞；点線 = IFN- $\gamma$ 処理細胞；黒線 = アイソタイプ対照）。しかし、MHC発現を増加させるためにIFN- $\gamma$ と共に培養することによって調製されたhES細胞系H1およびH9によっては、T細胞の増殖はなおも刺激されなかった（パネルC）。関連実験においては、IFN- $\gamma$ と共に培養することによってヒトの包皮線維芽細胞を調製することにより、それらのT細胞を刺激する能力がより高まった。

40

#### 【0148】

未分化hES細胞が第三者の刺激細胞に対するアロMHC反応を活発に調節する能力を有する

50

かどうかを決定するために、阻害実験を行った。様々な数の、照射したヒト線維芽細胞およびhES細胞と共に、レスポナーT細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を0時間または2時間培養した。次いで、 $1 \times 10^4$ 個の照射樹状細胞をウェル毎に加えた。培養5日後、 $[^3\text{H}]$ チミジンを用いて細胞に16~20時間パルスを与え、洗浄し、計数した。

【0149】

図9は結果を示す(平均 $\pm$ SEM)。hES細胞は、同種異系樹状細胞によって刺激されたT細胞の増殖を阻害した。10:1の比率で、PBMCを同種異系プロフェッショナル抗原提示樹状細胞と共培養した場合、激しい増殖反応が検出された。しかし、未分化hES細胞系のいずれかをこれらの共培養に加えることによって、インビトロにおけるT細胞の増殖は強く阻害された(パネルA)。同等数のヒト線維芽細胞を加えることによる阻害効果は全くなかった(パネルA)。hES細胞数における連続的な減少によって、阻害効果は徐々に減少したことから、混合リンパ球反応における、hES細胞によるアロ活性化の阻害が用量依存的であることが示された(パネルB)。hES細胞:T細胞比1:1または1:3でMLRは阻害された。

10

【0150】

#### 実施例8: インビボにおける、未分化hES細胞によるアロ刺激の欠如

未分化hES細胞の免疫原性は、細胞の、インビボにおける細胞免疫反応を刺激する能力を試験することによってさらに評価された。

【0151】

免疫欠損Prk-/- SCIDマウスに $2 \sim 5 \times 10^6$ 個の未分化hES細胞、胎児性単核細胞、またはMBA-1ヒト巨核球系細胞を筋肉内注射した。48~72時間後、組織を固定し、包埋し、低温槽において切片化した。毎秒毎に、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色のために切片を維持した。倍率1,000 $\times$ において、H&E染色切片におけるその特徴的な形態によって、白血球の存在が同定された(解析は盲検的に行われた;  $R > 0.97$ )。

20

【0152】

図10は本実験の結果を示す。MBA-1細胞および臍帯血単核細胞の双方とも、Prk-/- SCIDマウスにおける顆粒球の浸潤反応を誘導することが可能であった。対照的に、未分化hES細胞を注射された動物個体の注射部位においては、顆粒球の浸潤は認められなかった。

【0153】

図11は、野生型免疫応答性CD-1マウスを用いた、後の実験の結果を示す。Prk-/- SCIDマウスとは異なり、内毒素を含有するPBS賦形剤の注射によって、注射部位におけるリンパ球および顆粒球の浸潤が誘導された(下段左パネル)。しかし、hES細胞と共に賦形剤を注射することによって、白血球の浸潤が完全に阻害された(下段右パネル)。同じ賦形剤に再懸濁されたMBA-1細胞の注射では、白血球の浸潤が阻害されなかった(挿入図)。

30

【0154】

本研究から2つの結論が引き出される。第一に、hES細胞は、免疫欠損マウスまたは免疫応答性マウスのいずれにおいても、それら自身に対する反応を引き起こさなかった。これにより、さもなくば異種反応となるべきものを阻害する能力をそれらが有することが示唆される。はるかに高いレベルでの抗原ミスマッチのため、異種宿主への細胞の投与は、原則的には、それらを同種異系のヒトに投与する場合よりも厳しい試験である。第二に、hES細胞は、さもなくば内毒素に反応して起こる、非特異的な浸潤、つまり、抗原特異的ではない炎症反応を阻害することも明らかに可能であった。

40

【0155】

本開示において先に示されたように、未分化hES細胞の、免疫反応および炎症反応の双方を活発に阻害する能力は、臨床的な治療にとって重要な意味を有する。

【0156】

#### 実施例9: BMP1は、hES細胞に由来する造血前駆細胞の自己再生を促進する

次の一連の実験においては、改変された分化時系列を用いて、hES細胞から造血細胞を得た。

【0157】

フィーダー細胞層を含まない培養における未分化hES細胞を、IV型コラゲナーゼによっ

50

て処理し、マトリゲル（登録商標）マトリックスを細片として掻き取った。その後、それらを低付着性プレートに移し、20%の非熱不活性化FBSを含む分化培地において胚様体を一晚形成させた。すぐ翌日に培地を、造血サイトカイン（300 ng/mLのSCF；300 ng/mLのFlt-3リガンド、10 ng/mLのIL-3、10 ng/mLのIL-6、および50 ng/mLのG-CSF）；もしくはBMP-4（50 ng/mL）のいずれかを含む培地、またはサイトカインとBMP-4の双方を含む培地に交換した。対照培養は、添加因子を全く含まない同じ分化培地において続けた。培地は3日毎に交換した。

#### 【0158】

図12は、総細胞数および得られたCD45 +ve造血前駆細胞の数を示す。10<sup>5</sup>個のインプット細胞当たり得られた一次CFUの数も示される。サイトカインによって、CD45 +ve細胞（ $p < 0.02$ ）およびCFU（ $p < 0.001$ ）の収量が対照と比較してかなり改善された。サイトカインを含んでもまたは含まなくても、これらの判定基準のいずれによっても、BMP-4による効果はごくわずかであった。

10

#### 【0159】

図13は二次CFUの結果を示し、BMP-4の重要性が強調される。対照条件下におけるhES細胞に由来する造血前駆細胞の自己再生は、頻度の低いイベントであり、一次CFUの6%のみで起こった（左パネル）。対照的に、分化しつつあるhES細胞をサイトカインによって処理することによって、調べられた全一次CFUの21%にまで自己再生能が増強された。サイトカインを用いて細胞を分化させた場合には前駆細胞の自己再生の頻度が増加した一方、対照造血前駆細胞およびサイトカイン誘導造血前駆細胞の双方の自己再生の程度は最低限であり、各々、一次CFU当たり平均0.5および0.3で二次CFUが検出された（右パネル）。サイトカインおよびBMP-4の双方を用いてhES細胞を分化させた場合、一次CFUの36%が二次CFUを生じた。サイトカインおよびBMP-4の存在下において分化させたhES細胞から生じる個々の一次CFUは、一次CFU当たり4個まで二次CFUを生じ、自己再生の程度は、対照またはサイトカイン単独処理の場合よりも8倍高かった。分化しつつあるhES細胞のBMP-4単独処理では、造血の特定化が基底能を超えて増強されなかったが（実施例2および実施例3）、BMP-4は、本実施例において、初期造血前駆細胞の自己再生能に影響を与えることが示された。BMP-4の存在下において生じた一次CFUの50%より多くが自己再生することができ（左パネル）、平均形成能は、一次CFU当たり10個までの二次CFUを生じるようなものであり（右パネル）、自己再生能は、対照分化細胞またはサイトカイン分化細胞よりも20倍増加した。

20

30

#### 【0160】

hES由来の造血前駆細胞と、分化が方向付けられた造血組織の既知の供給源との間において、前駆細胞の自己再生の頻度および程度を比較するために、同じようにして、ヒトの臍帯血試料から生じる一次CFUを自己再生能についてアッセイした（右パネル、挿入図）。臍帯血に由来する一次CFUは、個々にアッセイされた場合に、二次前駆細胞を生じなかった。しかし、複数の一次コロニーをプールした場合、前駆細胞の自己再生が、一次CFU当たり0.5個の二次CFUを生じるという頻度で認められた。これは、BMP-4の存在下において分化しつつあるhES細胞に由来する造血前駆細胞と比較して、分化が方向付けられた造血組織からの自己再生前駆細胞は少ないことを示す。

40

#### 【0161】

これらの結果は、BMP-4の存在下において分化しつつあるhES細胞は、優れた自己再生能を有する造血前駆細胞を生み出すことを示す。

#### 【0162】

#### 実施例10：前駆細胞誘導の動態学

本実施例においては、造血細胞分化の動態がさらに調べられた。胚様体の形成の翌日から開始して、HGFサイトカインおよびBMP-4と共に細胞を培養した。培養において、様々な時点で細胞の試料を採取し、CD45および一次CFUについて解析した。

#### 【0163】

図14は結果を示す。サイトカインおよびBMP-4を用いた培養の3日目、7日目、または10

50

日目には造血細胞は認められなかった。CD45 +ve細胞の頻度は、15日目および22日目にかなり増加した。7日目および10日目には、CFUアッセイ法におけるクローン形成効率は15,000分の1未満であったが、15日目には262分の1に増加した。15日目と22日目の間のクローン形成効率の増加は、統計学的に有意ではなかったことから、15日目と22日目の間の、分化が方向付けられた造血細胞の増加が、分化および前駆細胞機能の喪失に付随して起こることが示唆される。

【0164】

本開示は、hES細胞の意図的な造血分化に関する概念モデルを提案する。本モデルは、基本的な工程の理解を増すために単に提供されるものである。明らかに求められない場合、本発明を限定することは意図されない。

10

【0165】

hES細胞からの造血子孫細胞の生産は、2つの相において起こると考えられる - 造血サイトカインにより開始されるプログラムによって制御される誘導相、およびそれに続く、分化が方向付けられた造血細胞の増殖相。サイトカインは、CD45マーカーによって示されるような、多系統に成熟できる、分化が方向付けられた造血前駆細胞を誘導する。対照条件下におけるhES細胞の自発的な分化から生じる、分化が方向付けられた造血前駆細胞はほとんど、二次CFUアッセイ法において自己再生できなかったことから、それらはおそらく、最終的に分化されている。したがって、hES細胞の分化を制御する内在性プログラムによっては、サイトカインおよびBMP-4処理によって誘導されるような維持能力は生み出されない。

20

【0166】

結果は、BMP-4(単独またはサイトカインと組み合わせた)が、hES細胞から得られる造血前駆細胞の頻度または総数に対しては影響を全く及ぼさないことを示す。しかし、BMP-4の存在下におけるhES細胞の誘導によって、より大きな自己再生能を有する独特な造血前駆細胞が生じる。BMP-4は、発生の最初の14日間にその効果を及ぼし、前駆細胞の再生を司る長期のプログラムを刺激する可能性がある。

【0167】

当業者には、本発明の精神、または、添付の特許請求の範囲から逸脱せずに、通常最適化として本発明を改変できることが理解される。

【0168】

複数の独立の請求項に以下を含ませるような権利において行われる本発明の態様

30

1. 以下の特性の1つまたは複数をもつ、培養において増殖する分化細胞集団:

- ・細胞の少なくとも1%がCD45 +veである特性
- ・少なくとも20%がCD34 +veである特性
- ・少なくとも70%がCD13 +veである特性
- ・少なくとも10%がAC133 +veである特性。

2. 霊長類多能性幹(pPS)細胞を分化させることによって得られる、請求項1記載の細胞集団。

3. 請求項2の細胞集団、および、分化したもとなる未分化pPS細胞系からなる、2つの細胞集団。

40

4. 細胞の少なくとも5%がCD34 +veおよびCD45 +veの両方であるような、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

5. 1%未満の未分化pPS細胞を含む、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

6. 造血コロニー形成単位(CFU)についてのアッセイ法において、少なくとも約1,000分の1の平板効率でコロニーを形成する、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

7. CFUアッセイ法から採取されたコロニーが、二次CFUアッセイ法において再プレーティングされた場合に二次コロニーを形成するような、請求項6記載の細胞集団。

8. NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環赤血球系細胞、顆粒球細胞および単球を形成する、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

9. NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環リンパ球系細胞を形成する、前記請求項の

50

いずれか一項記載の細胞集団。

10. 異種遺伝子を発現するように遺伝的に改変された、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

11. pPS細胞がヒトの胚盤胞から単離された細胞の子孫細胞であるような、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

12. pPS細胞がヒト胚性幹細胞であるような、前記請求項のいずれか一項記載の細胞集団。

13. 異なる遺伝子型を有するいかなる細胞も本質的に含まないが、造血細胞増殖因子の混合物を含む培養環境において未分化pPS細胞を培養する段階、ならびにその後、少なくとも1%がCD45陽性であるような、または、造血コロニー形成単位(CFU)についてのアッセイ法において少なくとも約1,000分の1の平板効率でコロニーを形成するような細胞集団を培養環境から採取する段階を含む、pPS細胞を、造血能を有する細胞集団に分化させるための方法。

10

14. 分化段階が、胚様体または細胞凝集体を形成させる段階を含むような、請求項13記載の方法。

15. 分化段階が、低密度の調整培地における培養を行う段階を含むような、請求項13~14記載の方法。

16. 造血細胞増殖因子の混合物が以下の少なくとも2つを含むような、請求項13~15記載の方法：幹細胞成長因子(SCF)、FLT-3リガンド、IL-3、IL-6、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)。

20

17. 分化開始12日以内に、造血細胞増殖因子と共に細胞が培養されるような、請求項16記載の方法。

18. 造血細胞増殖因子の混合物との培養と同時にまたは培養後に、骨形成タンパク質と共に分化細胞を培養する段階を含む、請求項13~17記載の方法。

19. 造血細胞増殖因子との培養の後に、骨形成タンパク質4と共に細胞が培養されるような、請求項18記載の方法。

20. 本方法により得られた細胞が、請求項1~12のいずれか一項記載の分化細胞の特性を有するような、請求項13~19記載の方法。

21. 造血前駆細胞、赤血球系細胞、顆粒球細胞、単球細胞、巨核球、またはリンパ球系細胞を生産するための方法である、請求項13~20記載の方法。

30

22. pPS細胞を分化させる段階を含む、請求項1~12のいずれか一項記載の分化細胞集団を得るための方法。

23. pPS細胞がヒトの胚盤胞から単離された細胞の子孫細胞であるような、請求項13~22のいずれか一項記載の方法。

24. pPS細胞がヒト胚性幹細胞であるような、請求項13~23のいずれか一項記載の方法。

25. 請求項1~12記載の分化細胞集団をさらに分化させることによって生産される、赤血球、赤芽球、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、巨核球、血小板、またはリンパ球。

26. 請求項1~12のいずれか一項記載の分化細胞集団と化合物を組み合わせる段階、化合物と組み合わせられることから生じる、細胞集団における表現型的または代謝的なあらゆる変化を決定する段階、および、その変化を、その化合物の造血細胞機能を調節する能力と相関付ける段階を含む、化合物を、造血細胞機能を調節するその能力についてスクリーニングする方法。

40

27. 請求項1~12のいずれか一項の分化細胞集団、または、請求項13~24のいずれか一項記載の方法に従って得られる分化細胞集団を含む、ヒトまたは動物の身体を治療するための薬学的組成物。

28. ヒトにおける造血機能を再形成するための薬剤の調製における、請求項1~12において説明される分化細胞集団、または、請求項13~24のいずれか一項記載の方法に従って得られる分化細胞集団の使用。

50

29. ヒトの遺伝子治療のための薬剤の調製における、請求項1~12において説明される分化細胞集団、または、請求項13~24のいずれか一項記載の方法に従って得られる分化細胞集団の使用。

30. 薬剤中の細胞とMHC適合性である細胞に対してヒトを寛容化するための薬剤の調製における、請求項1~12において説明される分化細胞集団、または、不活性化未分化pPS細胞集団の使用。

31. ヒトへの投与に適するように製剤化された、請求項1~12のいずれか一項記載の分化細胞集団または不活性化未分化pPS細胞を含む第一の細胞集団；および、第一の細胞集団とMHC適合性である、分化細胞を含む第二の細胞集団を共にまたは別々の容器に含む、薬学的組み合わせ。

32. 組み合わせの個体への投与の際に、第一の細胞集団によって、第二の細胞集団に対する被験者による炎症反応が阻害されるような、請求項31記載の薬学的組み合わせ。

33. 第一の細胞集団の個体への投与の際に、第二の細胞集団に対して個体が免疫寛容性に変えられるような、請求項31~32記載の薬学的組み合わせ。

34. 未分化pPS細胞が、照射またはマイトマイシンCを用いた処理によって不活性化されたヒト胚性幹細胞であるような、請求項31~33記載の薬学的組み合わせ。

35. 第一の細胞集団および第二の細胞集団が同じ系のヒト胚性幹細胞に由来するような、請求項31~34記載の薬学的組み合わせ。

36. 第二の細胞集団が、肝細胞、ニューロン、希突起神経膠細胞、心筋細胞、骨形成原細胞、間葉細胞、造血細胞、臍島細胞、軟骨細胞、またはこれらの細胞タイプのいずれかの系統に制限される前駆体の集団であるような、請求項31~35記載の薬学的組み合わせ。

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】未分化ヒト胚性幹(hES)細胞のフローサイトメトリー解析を示す。細胞は、生存度(7AAD<sup>-ve</sup>; パネルi)およびサイズ(ii)についてゲート制御され、その後、未分化ES細胞集団における造血細胞表面マーカーの発現についてゲート制御された(iii-vi)。いずれの細胞も、ヒト造血前駆細胞マーカーCD45を発現せず、1.2%のみがCD34<sup>+ve</sup>(始原ヒト造血細胞マーカー)であった。

【図2】hES細胞のH系を分化させることによって得られた造血細胞のフローサイトメトリー解析を示す。分化は、20%のFBSを含む培地において凝集体としてhES細胞の細片を10日間増殖させることによって開始された。その後、骨形成タンパク質4(BMP-4)を加えた、または加えない、造血細胞増殖因子(HGF; SCF、Flt-3リガンド、IL-3、IL-6およびG-CSFであった)を含有する、血清を含まない培地(SF)において細胞を培養した。CD45マーカーによって、造血前駆細胞が同定される。

【図3】hES細胞のH1系を造血前駆細胞に分化させた図である。FCS含有培地において分化させた後、全培養(左)または個々の胚様体(右)を、幹細胞成長因子、GM-CSF、IL-3およびEPOを含むメチルセルロースにおけるコロニー形成(CFU)アッセイ法に供した。形成されたコロニーは、フローサイトメトリーにより、造血表現型について特徴付けられ、二次CFUアッセイ法に継代された。

【図4】図3の左側の図に従って全胚様体培養から形成された造血細胞を示す。全CFUアッセイ法を解析した場合(パネルA)、83~86%がCD45について染色されたことから、造血細胞の存在が確認され、4%がグリコホリンAについて染色されたことから、赤血球系細胞の存在が確認された。形態の評価は、パネルBにおいて示される。20,000個のインプット細胞から47個のコロニーが生じ、平板効率は425分の1であった。パネルCにおいて示されるコロニーをマーカー解析のために採取したところ、細胞の81~92%がCD45<sup>+ve</sup>であり、73%がCD13<sup>+ve</sup>であった。

【図5】図3の右側の図に従って単離胚様体から形成された造血細胞を示す。CFUアッセイ法においては、赤血球系細胞、顆粒球細胞およびマクロファージのコロニーが全て同定された。フローサイトメトリーによって2つの赤血球系コロニーを解析したところ、93%がグリコホリンA陽性であることが認められた。

10

20

30

40

50

【図6】図3において示されるCFUアッセイ法から採取した2つのコロニーを二次CFUアッセイ法において再プレートした場合に起こることを示す。パネルAは、82,500個の細胞を含む一次顆粒球コロニーに由来する、異なる二次コロニーを示す（各コロニータイプの数は下に示される）。二次コロニーは、顆粒球細胞コロニー、マクロファージコロニー、赤血球系細胞コロニー、およびGEMMコロニー（造血細胞タイプの混合物）の特徴を有していた。高レベルのCD45およびCD13の発現が認められたが、CD34およびCD14のレベルは低かった。その他の一次顆粒球コロニー（12,500個の細胞）を、二次CFUアッセイ法（パネルB）に継代すると、14個のコロニーが形成され、全てが単球細胞の特徴を有していた。

【図7】臍帯血単核細胞（CBMC）および未分化hES細胞系H1、H7、およびH9上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスIおよびクラスII抗原の発現を示す。灰色の線は、MHC染色についての染色を示す；太線は抗体対照を示す。未分化hES細胞は、MHCクラスIについて陽性であったが、クラスIIについては、インターフェロンで処理した後でさえも陽性ではなかった（挿入図）。

【図8】混合リンパ球反応における未分化hES細胞の影響を示す。パネルAにおいては、hES細胞によっては、同種異系末梢血単核細胞または同種異系臍帯血単核細胞の増殖は刺激されなかったことが示される。パネルBにおいては、単球を減少させることにより、反応集団をT細胞について増加させた後でさえも、3つ全てのhES細胞系によって増殖は刺激されなかったことが示される。パネルCにおいては、MHCクラスIの発現を増加させるために、IFN-と共培養することによってhES細胞を調製したが、T細胞の増殖はなおも刺激されなかったことが示される。

【図9】hES細胞が、第三者の抗原提示細胞により刺激された混合リンパ球反応を阻害することも可能であることを示す。パネルAにおいては、同種異系樹状細胞（DC）によってT細胞が刺激された場合には、激しい増殖反応が認められたことが示される。培養にヒトの線維芽細胞を加えると最低限の効果が認められたが、未分化hES細胞を加えると反応は阻害された。パネルBにおいては、阻害効果がMLR中に存在するhES細胞の数に依存することが示される。反応は、わずか $3 \times 10^4$ 個のhES細胞によって有意に阻害された。

【図10】免疫欠損Prk-/-SCIDマウスへの細胞の注射によって生じた反応を示す。MBA-1間質細胞および胎児単核細胞の双方とも、顆粒球の浸潤反応を誘導することが可能であったが、未分化hES細胞には明らかな効果はなかった。

【図11】野生型CD-1マウスへの細胞の注射によって生じた反応を示す。内毒素を含有するPBS単独の注射によって、注射部位におけるリンパ球および顆粒球の浸潤が誘導された。しかし、hES細胞と共に賦形剤を注射すると、白血球の浸潤は完全に阻害された（右）一方、MBA-1細胞は浸潤を阻害しなかった（挿入図）。未分化hES細胞は明らかに、この状況において、拒絶反応を誘導することは不可能であり、宿主細胞の注射部位における浸潤を妨げることから、炎症を阻害する能力が示される。

【図12】胚様体を形成した翌日から、サイトカインおよび/またはBMP-4の存在下においてhPS細胞を培養することによって得られた造血細胞の表現型および機能的な特徴を示す。サイトカインは総細胞収量を改善し、CD45 +veである細胞およびCFUを生じる細胞の比率をかなり増加させる。

【図13】二次CFUの結果を示し、初期の分化工程におけるBMP-4の重要性を強調するものである。（サイトカインを加えて、または加えずに）BMP-4を用いて生産された造血細胞は、高い比率で二次コロニーを生じた。これによって、BMP-4の存在下においてhES細胞を分化させることによって、かなりの自己再生能を有する造血前駆細胞が生じることが示される。

【図14】分化工程の間の、細胞の表現型および機能の動態を追ったプロトコールの結果を示す。CD45 +ve細胞は15日目までに現れ、22日目までにかかなり増加した。15日目までは、クローン形成活性は高く、22日目における増加は有意ではなかった。これらの条件下においては、最初の15日間が、造血分化を行うための、サイトカインおよびBMPについての臨界窓である可能性がある。

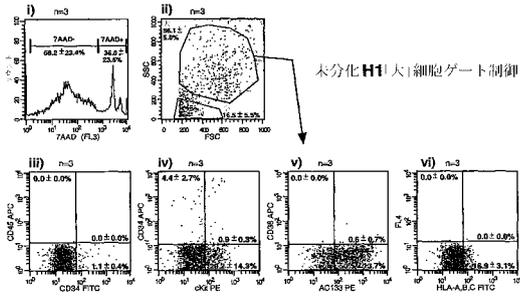
10

20

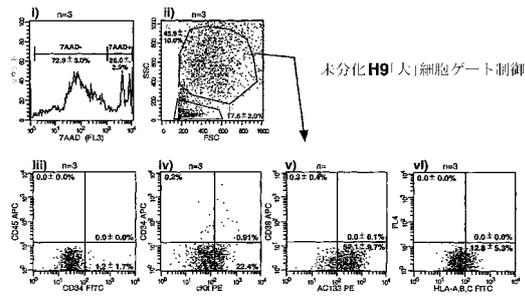
30

40

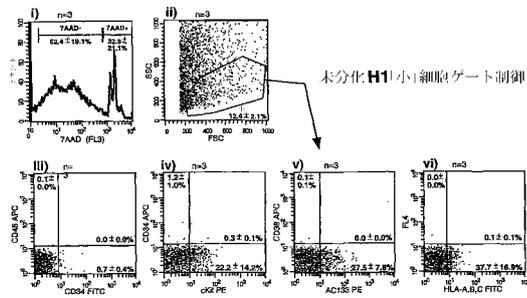
【 図 1 A 】



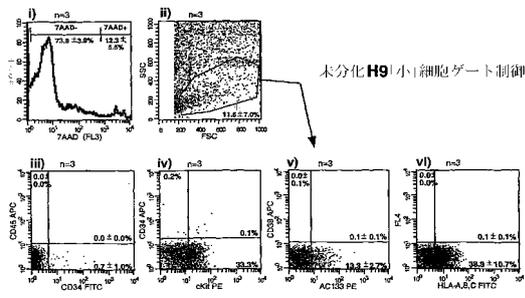
【 図 1 C 】



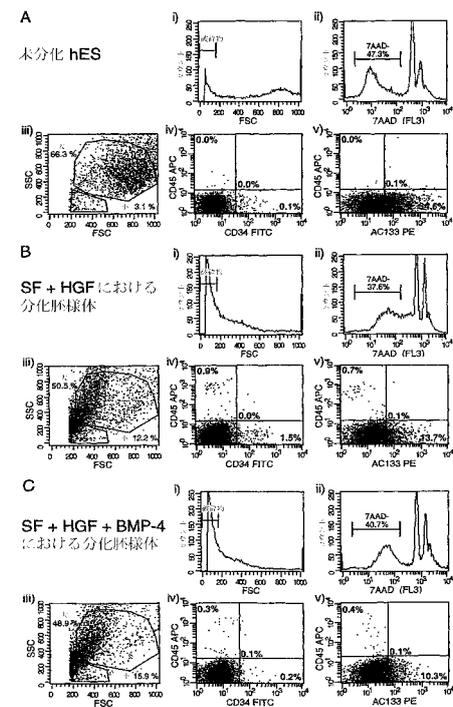
【 図 1 B 】



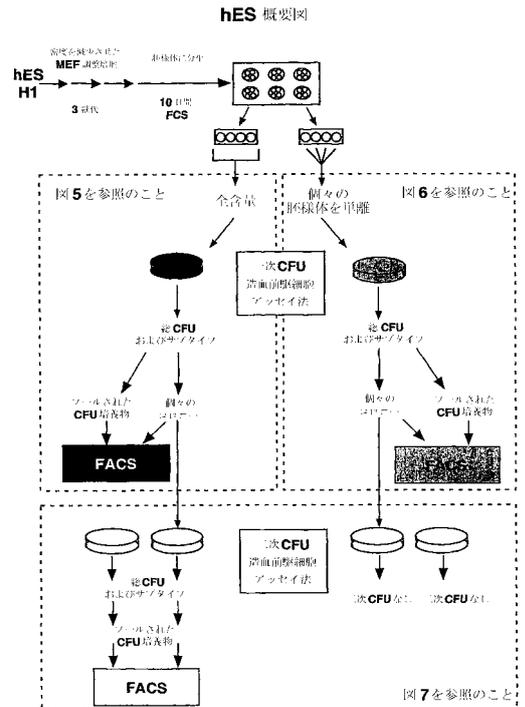
【 図 1 D 】



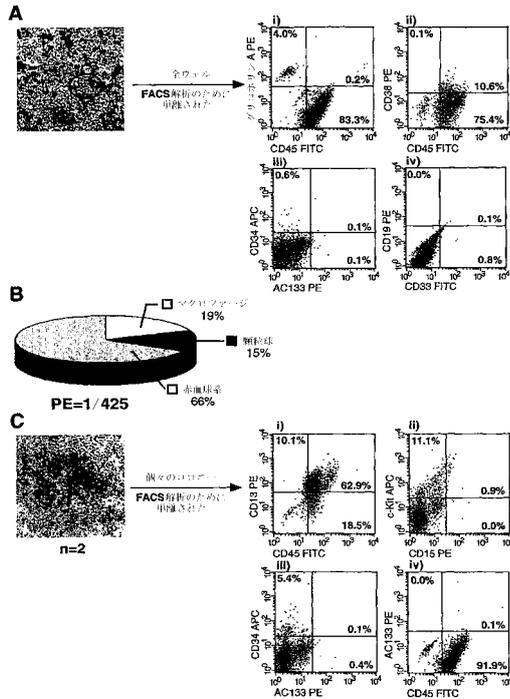
【 図 2 】



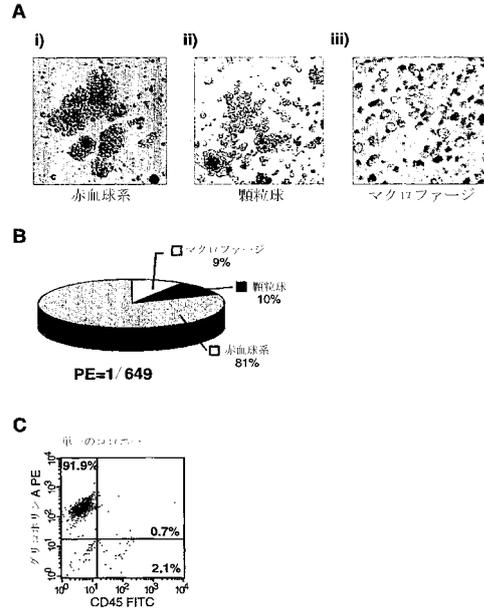
【 図 3 】



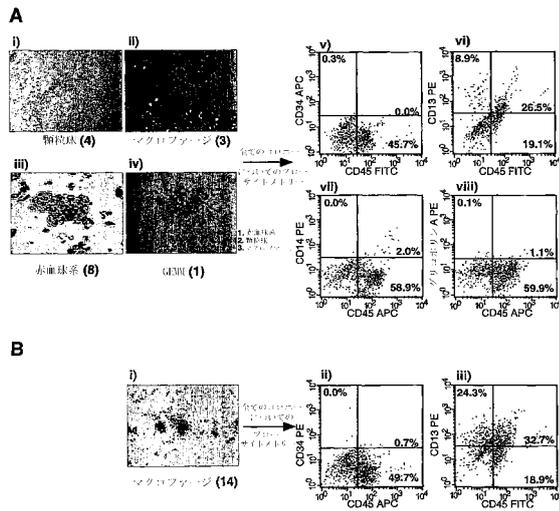
【 図 4 】



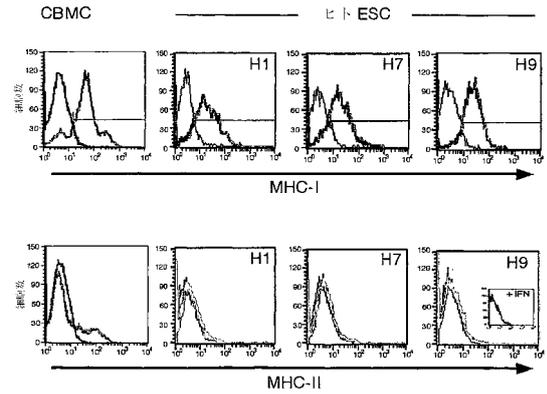
【 図 5 】



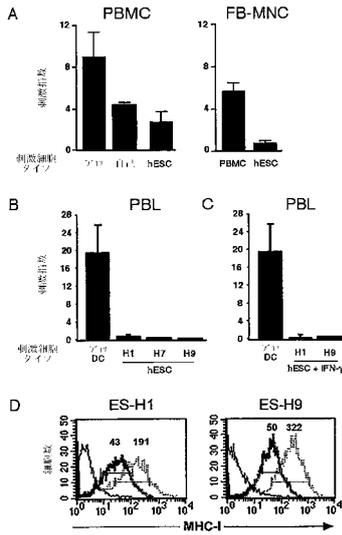
【 図 6 】



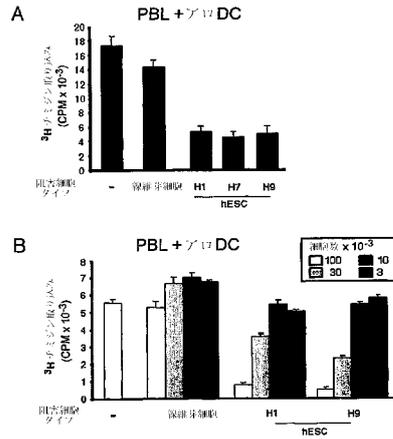
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



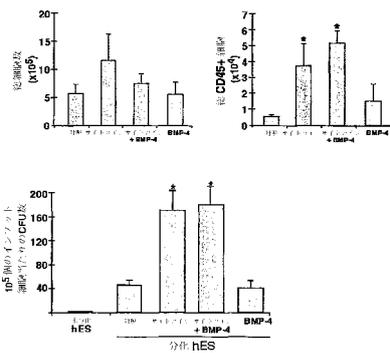
【 図 10 】



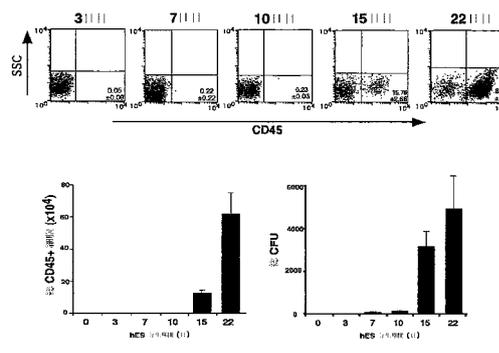
【 図 11 】



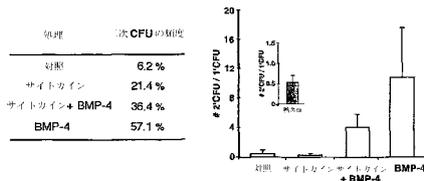
【 図 12 】



【 図 14 】



【 図 13 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年9月7日(2004.9.7)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の特性の1つまたは複数を有する、培養において増殖する分化細胞集団：

- ・細胞の少なくとも1%がCD45 +veである特性
- ・少なくとも20%がCD34 +veである特性
- ・少なくとも70%がCD13 +veである特性
- ・少なくとも10%がAC133 +veである特性。

## 【請求項2】

霊長類多能性幹(pPS)細胞を分化させることによって得られる、請求項1記載の分化細胞集団。

## 【請求項3】

請求項2の分化細胞集団、および、分化したもととなる未分化pPS細胞系からなる、2つの細胞集団。

## 【請求項4】

分化細胞の少なくとも5%がCD34 +veおよびCD45 +veの両方であるような、請求項1~3のいずれか一項記載の細胞集団。

## 【請求項5】

分化細胞集団が以下の特性の1つまたは複数を有する、請求項1~4のいずれか一項記載の細胞集団：

- ・1%未満の未分化pPS細胞を含む特性
- ・造血コロニー形成単位(CFU)についてのアッセイ法において、少なくとも約1,000分の1の平板効率でコロニーを形成する特性
- ・二次CFUアッセイ法において再プレATINGされた場合に二次コロニーを形成するCFU細胞を産生する特性
- ・NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環赤血球系細胞、顆粒球細胞および単球を形成する特性
- ・NOD-SCIDマウスに注射された場合に循環リンパ球系細胞を形成する特性。

## 【請求項6】

異なる遺伝子型を有するいかなる細胞をも本質的に含まないが、造血細胞増殖因子の混合物を含むような培養環境において未分化pPS細胞を培養する段階、およびその後、少なくとも1%がCD45陽性であるような、または、造血コロニー形成単位(CFU)についてのアッセイ法において少なくとも約2,400分の1の平板効率でコロニーを形成するような細胞集団を培養環境から採取する段階を含む、pPS細胞を、造血能を有する細胞集団に分化させるための方法。

## 【請求項7】

造血細胞増殖因子の混合物が以下の少なくとも2つを含むような、請求項6記載の方法：幹細胞成長因子(SCF)、FLT-3リガンド、IL-3、IL-6、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)。

## 【請求項8】

造血細胞増殖因子の混合物との培養と同時にまたは培養後に、BMP-4のような骨形成タンパク質と共に分化細胞を培養する段階を含む、請求項6または7記載の方法。

## 【請求項9】

請求項1~5のいずれかに記載の分化細胞集団をさらに分化させることによって生産され

る、赤血球、赤芽球、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、巨核球、血小板、またはリンパ球。

【請求項 10】

ヒトにおける造血機能を再形成するための薬剤の調製における、請求項 1~5のいずれかにおいて説明される分化細胞集団、または、請求項 6~8のいずれか一項記載の方法に従って得られる分化細胞集団の使用。

【請求項 11】

薬剤中の細胞とMHC適合性である細胞に対してヒトを寛容化するための薬剤の調製における、請求項 1~5のいずれかにおいて説明される分化細胞集団、または、不活性化未分化pPS細胞集団の使用。

【請求項 12】

ヒトへの投与に適するように製剤化された、請求項 1~5のいずれか一項記載の分化細胞集団または不活性化未分化pPS細胞を含む第一の細胞集団；および、第一の細胞集団とMHC適合性である、分化細胞を含む第二の細胞集団を共にまたは別々の容器に含む、薬学的組み合わせ。

【請求項 13】

組み合わせの個体への投与の際に、第一の細胞集団によって、第二の細胞集団に対する被験者による炎症反応が阻害されるような、または、第二の細胞集団に対して個体が免疫寛容性に変えられるような、請求項 12記載の薬学的組み合わせ。

【請求項 14】

未分化pPS細胞が、照射またはマイトマイシンCを用いた処理によって不活性化されたヒト胚性幹細胞であるような、請求項 12または13記載の薬学的組み合わせ。

【請求項 15】

pPS細胞がヒト胚性幹細胞であるような、または、pPS細胞がヒトの胚盤胞から得られた細胞の子孫細胞であるような、請求項 1~11のいずれか一項記載の産物、方法、または使用。

【請求項 16】

第一の細胞集団および第二の細胞集団が同じ系のヒト胚性幹細胞に由来するような、請求項 12~14のいずれか一項記載の薬学的組み合わせ。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/39091
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12N 5/04, 5/06, 5/08, 5/10; A01N 63/00; A61K 48/00 US CL : 435/363, 366, 372, 375, 377; 424/93.2		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/363, 366, 372, 375, 377; 424/93.2		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KEHAT, I. et al. Long Term, High Resolution Electrophysiological Assessment of Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes A Novel In Vitro Model for the Human Heart. Circulation. 13 October 2000, Volume 102, No. 18, Supplement II, page II-4, Abstract No. 6.	1-36
A	FIRPO, M. T. et al. Controlled Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. Developmental Biology. 01 June 2000, Volume 222, No. 1, page 234, Abstract No. 69.	1-36
A	THOMSON, J. A. et al. Human Embryonic Stem Cell and Embryonic Germ Cell Lines. Trends in Biotechnology. 2000, Volume 18, No. 1, pages 53-57.	1-36
A	SCHULDINER, M. et al. Effects of Eight Growth Factors on the Differentiation of Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. Proceedings of the National Academy of Science (USA). 10 October 2000, Volume 97, No. 21, pages 11307-11312.	1-36
A	LING, V. et al. In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells: Immunophenotypic Analysis of Cultured Embryoid Bodies. Journal of Cellular Physiology. 1997, Volume 171, pages 104-115.	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"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 application or patent 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	"&" 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 30 May 2003 (30.05.2003)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Deborah Croghan, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/39091

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAUFMAN, D. et al. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Hematopoietic Colony Forming Cells. Blood. 15 November 1999, Volume 94, No. 10, Supplement I, part 1, page 34a, see entire Abstract, No. 138.	1-36

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 バティア ミッキー  
カナダ国 オンタリオ州 ロンドン ペンリス クレセント 2 3
- (72) 発明者 マドレナス ジョーキン  
カナダ国 オンタリオ州 ロンドン レジェント ストリート 4 0 6
- (72) 発明者 フェルバー アイリス エイ.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティー ハドソン ストリート # 2 4  
1 5 0 0
- (72) 発明者 マジウムダール アニッシュ セン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベイル マネット ドライブ # 3 1 0 5 5

F ターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AC20 BB40 BD39 CA44  
 4C084 AA13 NA14 ZA512 ZB072 ZB112 ZB212 ZB262 ZB272  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 CA04 NA14 ZA51 ZB07 ZB11 ZB21  
 ZB26 ZB27

【要約の続き】

A

