

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5896421号
(P5896421)

(45) 発行日 平成28年3月30日 (2016. 3. 30)

(24) 登録日 平成28年3月11日 (2016. 3. 11)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-548262 (P2012-548262)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成23年4月21日 (2011. 4. 21)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2013-527746 (P2013-527746A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成25年7月4日 (2013. 7. 4)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/060340		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02011/132799	(74) 代理人	100118773
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成26年4月17日 (2014. 4. 17)	(74) 代理人	100169579
(31) 優先権主張番号	61/326, 929		弁理士 村林 望
(32) 優先日	平成22年4月22日 (2010. 4. 22)	(72) 発明者	平家 俊男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内
前置審査		(72) 発明者	中畑 龍俊
			京都府京都市左京区聖護院川原町53 国 立大学法人京都大学 i P S細胞研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞への分化誘導法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程：

- (1) ヒト多能性幹細胞を浮遊培養する工程、
 - (2) 浮遊培養後の細胞集団を接着培養する工程、
 - (3) 接着培養後の細胞を解離する工程、および
 - (4) 解離させた細胞を1,000~3,000 cells/cm²の初期密度でウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地において接着培養し、前記ウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地での培養後、該培地を、インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地に交換してさらに細胞を培養する工程、
- を含む、ヒト多能性幹細胞から人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を製造する方法。

【請求項2】

前記工程(1)において、ヒト多能性幹細胞が、接着培養により形成された該細胞のコロニーであり、および該コロニーをそのまま浮遊培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記工程(2)において、細胞を、インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地で培養する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記工程(1)において、培養期間が7日間である、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記工程(2)において、培養期間が14日間である、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記工程(4)において、培養期間が少なくとも21日間である、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

ヒト多能性幹細胞が、ヒト胚性幹(ES)細胞またはヒト人工多能性幹(iPS)細胞である、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

以下の物質：

(1) インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地、

(2) ウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地、および

(3) 細胞解離溶液、

を使用説明書とともに含む、ヒト多能性幹細胞から人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を製造するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞を分化誘導する方法に関する

。

【0002】

本発明はまた、上記方法によって作製された人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞にも関する。

【背景技術】

【0003】

胚性幹細胞(ES細胞)や、体細胞へ未分化細胞特異的遺伝子を導入することで得られる人工多能性幹細胞(iPS細胞)など多能性を有する細胞がこれまでに報告されている(USP 5,843,780またはWO 2007/069666)。そこで、筋原性疾患の治療方法、特に筋ジストロフィーの治療方法として、これらの多能性幹細胞から分化誘導された骨格筋前駆細胞を移植する治療法が注目されている。同様に、均一な骨格筋を用いて治療薬の開発を行うことも視野に入れられている。

【0004】

ここでES細胞から骨格筋前駆細胞または骨格筋を分化誘導する方法として、(1)単一のヒトES細胞を浮遊培養により増殖させた細胞を無血清培養液中で接着培養した後、CD73陽性細胞を単離しさらに培養した後、NCAM陽性細胞を単離し増殖する方法(Barberi T, et al. Nat Med. 13:642-8, 2007)、(2)5-Azacytidine(脱メチル化剤)で処理したヒトES細胞を浮遊培養し胚様体を形成した後、さらに接着培養する方法(Zheng JK, et al. Cell Res. 16:713-22, 2006)などが開発されている。

【0005】

しかし、これらの方法では、細胞の単離を数回行う必要があることや、モデルマウスへ移植することで誘導骨格筋の生着が確認されているが骨格筋が極わずかであるなどの問題を抱えている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】USP 5,843,780

【特許文献2】WO 2007/069666

【非特許文献】

【0007】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Barberi T, et al. Nat Med. 13:642-8, 2007

【非特許文献2】Zheng JK, et al. Cell Res. 16:713-22, 2006

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、多能性幹細胞から浮遊培養、接着培養および解離・接着培養の工程により骨格筋または骨格筋前駆細胞を分化誘導する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は以下の特徴を有する。

10

[1]以下の工程：

- (1) ヒト多能性幹細胞を浮遊培養する工程、
- (2) 浮遊培養後の細胞集団を接着培養する工程、
- (3) 接着培養後の細胞を解離する工程、および
- (4) 解離させた細胞を接着培養する工程、

を含む、ヒト多能性幹細胞から人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を製造する方法。

[2]前記工程(1)において、ヒト多能性幹細胞が、接着培養により形成された該細胞のコロニーであり、および該コロニーをそのまま浮遊培養する、[1]に記載の方法。

[3]前記工程(2)において、細胞をインシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地で培養する、[1]または[2]に記載の方法。

20

【0010】

[4]前記工程(4)において、解離された細胞を1,000~3,000 cells/cm²の初期密度で培養する、[1]~[3]のいずれか1つに記載の方法。

[5]前記工程(4)において、細胞をウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地で培養する、[1]~[4]のいずれか1つに記載の方法。

[6]前記工程(1)において、培養期間が7日間である、[1]~[5]のいずれか1つに記載の方法。

【0011】

[7]前記工程(2)において、培養期間が14日間である、[1]~[6]のいずれか1つに記載の方法。

30

[8]前記工程(4)において、培養期間が少なくとも21日間である、[1]~[7]のいずれか1つに記載の方法。

[9]前記工程(4)において、前記ウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地での培養後、該培地を、インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地に交換してさらに細胞を培養する、[5]に記載の方法。

[10]ヒト多能性幹細胞が、ヒト胚性幹(ES)細胞またはヒト人工多能性幹(iPS)細胞である、[1]~[9]のいずれか1つに記載の方法。

【0012】

[11]以下の物質：

- (1) インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含む無血清培地、
- (2) ウシ胎児血清およびウマ血清を含む培地、および
- (3) 細胞解離溶液、

40

を使用説明書とともに含む、ヒト多能性幹細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞を製造するためのキット。

[12][1]~[10]のいずれか1つに記載の方法によってヒト多能性幹細胞から作製されたことを特徴とする、人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞。

[13]ヒト正常ジストロフィンをコードするDNAを発現可能に含む、[12]に記載の人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞。

[14]筋原性疾患の治療用医薬の製造における、[1]~[10]のいずれか1つに記載の方法によりヒト多能性幹細胞から製造された人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞の使用。

50

[15][1]~[10]のいずれか1つに記載の方法によりヒト多能性幹細胞から製造された人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を含む組成物。

【0013】

本願が優先権を請求する米国特許仮出願第61/326,929号の明細書及び/又は図面に開示される内容が本明細書に取り込まれる。

【発明の効果】

【0014】

本発明に示す方法により人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】この図は、ヒト多能性幹細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞を作製する培養スキームを示す。

【図2】この図は、分化誘導70日後の細胞の(a) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、(b) Myogenin (Clone: F5D)、(c) Myosin(骨格筋)および(d) これらを重ねた像、の各免疫染色像を示す。図2中、黒抜き矢頭は、Myogenin陽性の細胞核を示し、また、白色矢頭は、Myosin陽性細胞を示す。

【図3】この図は、分化誘導70日後の細胞の、(a) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、(b) Myogenin、(c) Myosin(骨格筋)の免疫染色像(A)と位相差像(B)を示す。

【図4】この図は、分化した細胞の移植4週間後の筋組織の免疫染色像を示す：(a) ヒトラミニン(merosin); (b) マウス/ヒトラミニン; (c) (a)および(b)の重ねた像; (d) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); (e) ヒトラミニンA/C; (f) マウス/ヒトラミニン; (g) (d)および(e)の重ねた像; (h) (e)および(f)の重ねた像;並びに(i) (d)、(e)および(f)の重ねた像。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明は、ヒト多能性幹細胞を浮遊培養、接着培養および解離後の再接着培養することを含む、骨格筋または骨格筋前駆細胞を分化誘導する方法に関する。

【0017】

<多能性幹細胞>

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、以下のものに限定されないが、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(核移植ES: ntES)細胞、精子幹細胞(「生殖幹細胞: GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

【0018】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

【0019】

ES細胞は、受精卵の桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M.J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J.A. Thomson et al. (1999), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

【0020】

10

20

30

40

50

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培地を用いて行うことができる。ヒトおよびサルES細胞の樹立と維持の方法については、例えばH. Suemori et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585などに記載されている。

【 0 0 2 1 】

ES細胞作製のための培地として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSR及び4ng/ml FGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、2% CO₂/98% 空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(O. Fumitaka et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:215-224)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂及び20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

【 0 0 2 2 】

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標として用いて行うことができる。当該マーカーは、Real-time PCR、ウエスタンブロッティング、免疫染色等により検出することができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:443-452)。

【 0 0 2 3 】

ヒトES細胞株である例えばKhES-1、KhES-2及びKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

【 0 0 2 4 】

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培地で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), *実験医学*, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

【 0 0 2 5 】

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), *Cell*, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359:550-551)。

【 0 0 2 6 】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126: 663-676; K. Takahashi et al. (2007) *Cell*, 131: 861-872; J. Yu et al. (2007) *Science*, 318: 1917-1920; M. Nakagawa et al. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106; 国際公開WO 2007/069666)。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果た

10

20

30

40

50

す遺伝子もしくはその遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, EsrrbまたはEsrrgが例示される。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わせられて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

【0027】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することによって取得できる。また、L-Myc、Lin28、Lin28b、EsrrbおよびEsrrgのマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列情報については、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438

【0028】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。あるいは、DNAまたはRNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 プロモーター、CAGプロモーター、SR プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR プロモーターなどが挙げられる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。別の好ましい実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポ

ゾンであるpiggyBac等が挙げられる (Kaji, K. et al., Nature, 458: 771-775 (2009)、Woltjen et al., Nature, 458: 766-770 (2009)、WO 2010/012077)。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソーマルに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BKウイルスおよび牛乳頭腫 (Bovine papillomavirus) の複製起点の配列とその複製因子の配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1およびoriPもしくはLarge TおよびSV40ori配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201およびWO 2009/149233)。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、核初期化物質をコードする配列の間は、IRESまたは口蹄病ウイルス (FMDV) 2Aコード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008、WO 2009/092042およびWO 2009/152529)。

10

【 0 0 2 9 】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等)等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 68-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIFまたはbFGFなどのサイトカイン、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signaling阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

20

【 0 0 3 0 】

iPS細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地 (これらの培地にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(2) bFGFまたはSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地 (例えばTX-WES培地、トロンボX社)または霊長類ES細胞培養用培地 (例えば霊長類 (ヒト&サル) ES細胞用培地、リプロセル、京都、日本)、などが含まれる。

30

【 0 0 3 1 】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDME M/F12培地上で体細胞と核初期化物質 (DNA、RNAまたはタンパク質) を接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等) 上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で培養し、該接触から約30~約45日またはそれ以上ののちにiPS細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5-10%と低い酸素濃度の条件下で細胞を培養してもよい。

40

【 0 0 3 2 】

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等) 上で10%FBS含有DMEM培地 (これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。) で培養してもよい。約25~約30日またはそれ以上の培養ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。

50

【0033】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ~ 約 5×10^6 細胞の範囲である。

【0034】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で細胞の培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

10

【0035】

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

20

【0036】

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

30

【0037】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES(核移植ES)細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している(T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術(J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646)とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで再プログラム化することができる。

40

【0038】

(F) 融合幹細胞

融合幹細胞は、融合させたES細胞と同様な多能性を有するように、体細胞と卵子もしくはES細胞とを融合させることにより作製される。さらに融合幹細胞は、体細胞に特有の遺伝子も有する(Tada M et al. Curr Biol. 11:1553-8, 2001; Cowan CA et al. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73)。

【0039】

<骨格筋または骨格筋前駆細胞分化誘導法>

50

本発明によれば、ES細胞、iPS細胞などの多能性細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞への人工的分化誘導に際して、以下の工程を含む方法を用いることができる；

- (1) ヒト多能性幹細胞を浮遊培養する工程、
- (2) 浮遊培養後の細胞集団を接着培養する工程、
- (3) 接着培養後の細胞を解離する工程、および
- (4) 解離させた細胞を接着培養する工程。

【0040】

本明細書において、「骨格筋」とは成熟筋を意味し、筋繊維つまり多核細胞である筋細胞を含む。また、「骨格筋前駆細胞」とは、筋細胞へ選択的に分化し得る細胞を意味するが、骨芽細胞や脂肪細胞などの他の中胚葉細胞への分化能を全く有しないことを意味するものではない。本発明において、骨格筋前駆細胞は、骨格筋幹細胞（および、場合により、サテライト細胞を含む。）を含むものとする。

10

【0041】

本発明において、分化誘導された人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された細胞集団であってもよい。人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、例えばMyoD、Myf5、Pax7、Myogenin、ミオシン重鎖、NCAM、Desmin、SkMAct、MF20、M-Cadherin、Fgfr4およびVCAME1などの骨格筋前駆細胞および骨格筋のマーカー遺伝子の発現を検出することによって同定可能であるし、これに加えて、収縮能をもつ筋管細胞の形成（例えばMRF4遺伝子の発現）などを指標として同定することもできる。ここで「人工の」という用語は、*in vitro*でヒト多能性細胞から分化誘導された骨格筋または骨格筋前駆細胞に対して使用する。人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、ヒトにおいて天然に生じる骨格筋または骨格筋前駆細胞と同一でなくともそれになり類似した特性をもっていればよく、生体に移植したときに生体適合性であって、かつ、損傷部位を補填し代替する能力のあるような特性を有するものが特に望ましい。

20

【0042】

(A) ヒト多能性幹細胞を浮遊培養する工程

本工程では、前述のように得られたヒト多能性細胞を、任意の方法でそれぞれの細胞から解離させるか、またはコロニー形態で取得し、浮遊培養を行う。好ましい本発明においては、多能性幹細胞のコロニー形態をそのまま浮遊培養に使用する。解離の方法としては、細胞を力学的に解離するか、もしくはプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)が挙げられる）を用いて解離してもよい。好ましくは、多能性を維持するように培養された状態で形成されたコロニーを力学的に剥離し、そのまま、剥離した細胞を浮遊培養に用いる方法である。ここで、剥離前に3日間以上、好ましくは5日間、培養されたコロニーを用いることが好ましい。

30

【0043】

ここで浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態に培養することを意味する。浮遊培養は、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養皿、もしくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）した培養皿を使用して行うことができる。

40

【0044】

浮遊培養の培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEMとF12の1：1の混合培地である。培地には、血清が含まれていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (*invitrogen*)、B27サプリメント (*invitrogen*)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール

50

などの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、ならびに、脂質、アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。

【0045】

20% Knockout serum replacement (KSR)、2mM L-グルタミン、及び非必須アミノ酸類を含有するDMEM/Ham's F12混合培地が例示される。

【0046】

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、例えば5日から9日間の培養であり、より好ましくは7日である。培地は、2日から5日ごとに交換することが望ましい。

10

【0047】

(B) 細胞集団を接着培養する工程

本工程では、前述の工程で得られた浮遊培養後の細胞集団をそのままコーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養する。コーティング剤としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、ゼラチンである。

【0048】

本工程の培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEMである。培地には、血清が含まれていないことが望ましい。必要に応じて、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Gibco) (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム含有)、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (invitrogen)、B27サプリメント (invitrogen)、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、ならびに、脂質、アミノ酸、Glutamax (Gibco)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。

20

30

【0049】

好ましくはインシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウムを含み、さらに、グルタミンおよび2-メルカプトエタノールを含有する培地が例示される。

【0050】

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、例えば7日から21日間の培養であり、より好ましくは14日である。培地は、2日から5日ごとに交換することが望ましい。

【0051】

40

(C) 細胞を解離し再接着培養する工程

本工程では、前述の工程で得られた接着培養後の細胞集団を解離し、初期低細胞密度でコーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養する。コーティング剤としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンまたはエンタクチン、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。本工程において、好ましくは、タイプIコラーゲンである。

【0052】

細胞集団の解離の方法としては、力学的に解離、トリプシン/EDTAもしくはプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液 (例えば、Accutase (商標) および Accumax (商標) が挙げられる) を用いてもよい。

50

【 0 0 5 3 】

本工程の培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEMである。培地には、血清が含まれていてもよく、血清としては、特に限定されないが、ヒト血清、サル血清、ウシ胎児血清、ウシ血清、ブタ血清、ウマ血清、ロバ血清、ニワトリ血清、ウズラ血清、羊血清、ヤギ血清、イヌ血清、ネコ血清、ウサギ血清、ラット血清、モルモット血清及びマウス血清が例示される。必要に応じて、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Gibco)、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (invitrogen)、B27サプリメント (invitrogen)、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、ならびに、脂質、アミノ酸、Glutamax (Gibco)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有する。

10

【 0 0 5 4 】

好ましくはウシ胎児血清およびウマ血清を含み、さらに、非必須アミノ酸、グルタミン、および2-メルカプトエタノールを含有する培地が例示される。

【 0 0 5 5 】

また、低細胞密度とは、約1,000~3,000 cells/cm²が例示される。

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、例えば21日から35日間の培養であり、より好ましくは28日である。培地は、2日から5日ごとに交換することが望ましい。

20

【 0 0 5 6 】

本工程において、培地を無血清培地に交換して、さらに、14日から21日間接着培養してもよい。この時の培地は、好ましくはインシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウムを含み、さらに、グルタミンおよび2-メルカプトエタノールを含有する培地が例示される。

30

【 0 0 5 7 】

< 骨格筋または骨格筋前駆細胞の分化誘導用キット >

本発明は、多能性幹細胞から骨格筋または骨格筋前駆細胞を分化誘導するためのキットを提供する。本キットには、上述した分化誘導に用いる培地、解離溶液（例えば、トリプシン/EDTAもしくはプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有するバッファー）、培養ディッシュをコートするためのコーティング剤（例えば、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、あるいはこれらの組み合わせ、など）、などを含んでもよい。本キットには、さらに分化誘導の手順を記載した書面または使用説明書を含んでもよい。

【 0 0 5 8 】

< 骨格筋または骨格筋前駆細胞 >

本発明は、上で説明した分化誘導法によって作製された人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞を提供する。

40

【 0 0 5 9 】

人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、MyoD、Myf5、Pax7、Myogenin、ミオシン重鎖、NCAM、Desmin、SkMAct、MF20、M-カドヘリン (M-Cadherin)、Fgfr4およびVCAME1などの骨格筋前駆細胞および骨格筋のマーカーによって同定される。

【 0 0 6 0 】

骨格筋または骨格筋前駆細胞は、作製後、そのまま生体へ移植されてもよく、好ましくは、骨格筋前駆細胞を生体に移植されてもよい。このとき、骨格筋細胞や骨格筋前駆細胞

50

は、下で説明するように、蛍光標識化特異抗体を利用するフローサイトメトリー法などの慣用の手法で精製・分離することができる。

【0061】

<筋原性疾患治療剤のスクリーニングへの利用>

本発明の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、筋原性疾患（例えば、筋ジストロフィー、ミオパチーなどが挙げられる）の治療用化合物（例えば医薬化合物、溶媒、小分子、ペプチド、またはポリヌクレオチド）のスクリーニングに用いることもできる。例えば、単独でまたは他の薬剤と組み合わせて、候補医薬化合物を、上述のように誘導した骨格筋または骨格筋前駆細胞に加えることにより、当該細胞の数の変化により、評価を行うことができる。ここで、骨格筋または骨格筋前駆細胞は、治療対象となる筋原性疾患と同様の表現型を呈する細胞が好ましく、特に好ましくは、疾患の罹患患者由来の体細胞から作製されたiPS細胞もしくは疾患を有する患者由来の体細胞の核を移植されたntES細胞を分化誘導した骨格筋または骨格筋前駆細胞である。

10

【0062】

<再生医療への使用>

本発明の人工の骨格筋または骨格筋前駆細胞は、損傷した骨格筋組織の正常化のために再生医療の分野で有効に使用し得る。それゆえ、この細胞は、筋原性疾患の治療に使用することができる。

【0063】

筋原性疾患の例としては、筋ジストロフィー（デュシェンヌ型、ベッカー型、先天性および肢帯型など）、先天性ミオパチー、ミトコンドリア病、糖原病、重症筋無力症、および筋無力症候群などが挙げられる。

20

【0064】

また、細胞を治療用医薬または組成物として用いる場合、細胞の純度を高めることが望ましい。このための方法には、目的の細胞を選別する方法、例えばフローサイトメトリー法が挙げられる。フローサイトメトリー法は、非常に細い流液中に細胞粒子を高速度で流し、レーザー光を照射して、粒子が発生する蛍光（細胞が予め蛍光標識された場合）、散乱光などの光を測定するものであり、セルソーターを備えると、目的の細胞を選別・分離することができる。細胞の蛍光標識は、骨格筋または骨格筋前駆細胞に特異的な抗体（蛍光標識化）、例えばSM/C-2.6抗体（Fukada S, et al, Exp Cell Res. 296:245-55, 2004.）、抗M-Cadherin抗体、抗FGFR4抗体、抗NCAM抗体および抗VCAM1抗体によって行うことができる。

30

【0065】

再生医療への使用において、患者由来のES細胞、患者由来のiPS細胞、あるいは、患者由来の核を用いたntES細胞もしくはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人からの多能性幹細胞であってもよい。筋ジストロフィーのような筋原性疾患の治療に患者由来の多能性幹細胞を用いる場合、樹立したES細胞、ntES細胞またはiPS細胞へ正常なヒトジストロフィンをコードするDNA（遺伝子、ゲノムDNA、cDNA等を含む。）（GenBank Accession No. NG_012232.1、BC150141等）等の正常な疾患関連遺伝子を直接的または間接的に導入したのち、本発明の方法を用いて目的の骨格筋または骨格筋前駆細胞に分化誘導することができる。ジストロフィン遺伝子は全長14kbであるため、人工染色体（好ましくは、ヒト染色体（再表2008/013067））等のベクターを用いて導入することが例示される。この他にも短縮化した機能的なジストロフィン遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターで導入する方法、ミニジストロフィン遺伝子をレトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、もしくはレンチウイルスベクターを用いて導入する方法、等も例示される。

40

【0066】

ここに例示的に記載した手法は、公知の方法で実施可能である。ES細胞やntES細胞の場合には、正常なヒトジストロフィンをコードするDNAを含むベクターで細胞を直接的に形質転換もしくはトランスフェクションすることができる。一方、iPS細胞の場合には、該ベクターで細胞を直接的に形質転換もしくはトランスフェクションすることも可能である

50

し、あるいはiPS細胞を誘導するための体細胞を予め該ベクターで形質転換もしくはトランスフェクションしたのちiPS細胞を誘導してもよい。形質転換もしくはトランスフェクションおよびその他の一般的な手法(例えば遺伝子組換え技術、PCR増幅法など)は、学術文献、特許文献、学術書(Sambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Manual、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology)などに記載されており、その開示を参照することができる。

【実施例】

【0067】

本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

10

ES細胞

ヒトES細胞(KhES-1)は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)より受領し、従来の方法で培養した(Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006)。ヒトiPS細胞(253G4)は、山中教授より受領し、従来の方法で培養した(Nakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26: 101-6, 2008)。

【0068】

骨格筋または骨格筋前駆細胞への分化誘導(フィーダー細胞あり)

ヒトES細胞は、フィーダー細胞としてSTO細胞を用いて5日間培養し、ヒトES細胞用解離液[トリプシン、10mg/ml コラゲナーゼIV、KSR(invitrogen)、1M CaCl₂/PBSおよびPBSを含む。]を用いてコロニーのまま剥離し、ペトリ皿にてヒト胚性幹細胞維持培地[DMEM/F12 (Sigma) + 20% KSR + 1% NEAA + 2mM L-グルタミン]で7日間浮遊培養(胚様体形成)した。続いて、0.1%ゼラチンコートした細胞培養ディッシュ上で無血清培地(DMEM + 1×ITS-X (Gibco) + 1×Glutamax(Gibco) + 100 μM 2-メルカプトエタノール)で接着培養を14日間行った。さらに、トリプシン/EDTAを用いて胚様体を解離した後、タイプIコラーゲンコートディッシュ(BD Bioscience)上にて低密度(約1,000~3,000 cells/cm²)で播種し、血清培地[DMEM + 10% FCS(ウシ胎児血清; Sigma) + 5% HS(ウマ血清; Sigma) + 1% NEAA + 1×Glutamax + 100 μM 2-メルカプトエタノール]を用いて3~4週間培養した。ここで、細胞移植用に分化誘導を止めてもよいが、さらに、無血清培地(DMEM + 1×ITS-X + 1×Glutamax + 100 μM 2-メルカプトエタノール)に培地交換してさらに細胞を2~3週間培養した。以上の概要は、図1に示す。全ての条件において、培地交換は5日おきに行なった。

20

30

【0069】

このようにして分化誘導した細胞に対して、成熟骨格筋マーカーであるミオシン重鎖II型抗体(Sigma, Myosin Skeletal M7523)、および骨格筋細胞の融合に関わるとされる骨格筋転写因子myogenin抗体(Dako, M3559 (F5D))を用いて免疫染色を行ったところ、それらの発現を確認することができた(図2および図3)。さらに、自発的な収縮活動も観察された。以上より、本方法を用いることで、in vitroでヒト多能性細胞から成熟骨格筋を作製することに成功したことが示された。同時に、骨格筋前駆細胞も作製されていたことが示唆された。

【0070】

上記の方法で49日間ヒトES細胞から分化させ、且つトリプシン/EDTAで解離した細胞溶液(5.0 × 10⁵/20 μL)を、そのまま移植前にカルジオトキシンで24時間処理され、且つ1.2 Gyの全身照射された骨格筋損傷モデルNOGマウスの前脛骨筋に移植した。移植から4週間後に、移植片を、ヒト特異的ラミニン(merosin)抗体(Novocastra Laboratories)およびラミニンA/C抗体(Dako)を用いた免疫染色により同定した(図4)。同じ結果を、iPS細胞(253G4)から分化させた細胞からも得ることができた。

40

【産業上の利用可能性】

【0071】

本発明により、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から、煩雑な単離作業の回数を減らし、骨格筋または骨格筋前駆細胞を作製することが可能になる。このように作製した骨

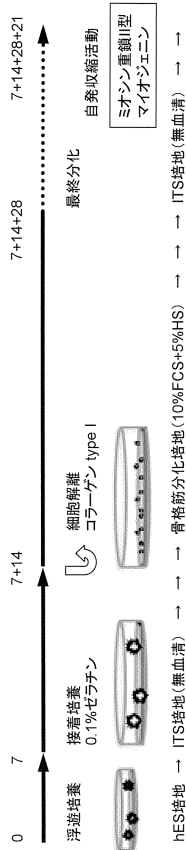
50

格筋または骨格筋前駆細胞は、筋原性疾患の治療を目的とした再生医療の分野で使用することができる。

【 0 0 7 2 】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

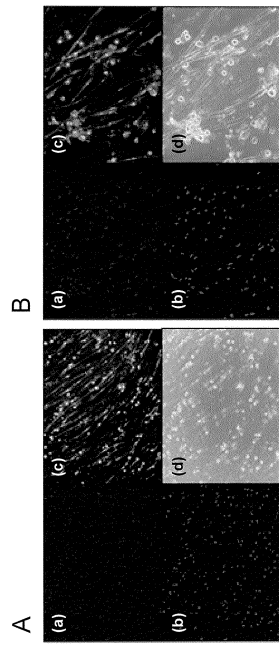
【 図 1 】



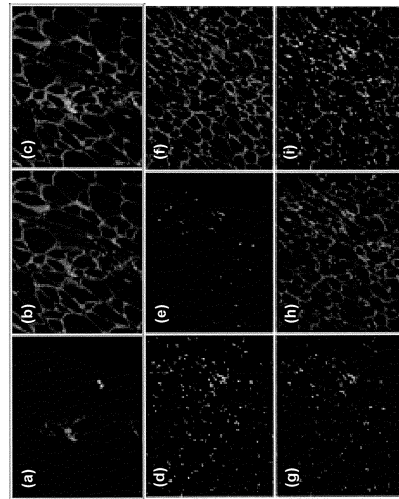
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 栗屋 智就

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 ZHENG JK, et al., Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. , Cell Res. , 2006年 8月, Vol.16, No.8, p.713-22
Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. , BARBERI T, et al., Nat Med. , 2007年 5月, Vol.13, No.5, p.642-8.
CHANG,H. et al, Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. , The FASEB journal , 2009年, Vol.23, No.6, p.1907-19
MIZUNO Y. et al, Production of transplantable skeletal muscle progenitor cells from mouse iPS cells. , Regenerative Medicine, , 2009年, Vol.8, Suppl., , Page.179,0-23-6
MIZUNO, Y.et al. , , The differentiation tendency from embryonic stem cells to skeletal myocytes is different depending on the passage number. , Journal of Japanese Physical Therapy Association;Physical Therapy Japan, , 2008年, Vol.35, No.Suppl.2, p.44

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 5/00 - 28

A61K 35/28

A61P 21/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

Science Direct

Wiley Online Library

CiNii