

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6112733号
(P6112733)

(45) 発行日 平成29年4月12日(2017.4.12)

(24) 登録日 平成29年3月24日(2017.3.24)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/07 (2010.01) C 1 2 N 5/07

請求項の数 21 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2014-509231 (P2014-509231)	(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(86) (22) 出願日	平成25年4月4日(2013.4.4)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/060878	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02013/151186	(74) 代理人	100120905 弁理士 深見 伸子
(87) 国際公開日	平成25年10月10日(2013.10.10)	(72) 発明者	長船 健二 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
審査請求日	平成28年4月1日(2016.4.1)	(72) 発明者	人見 浩史 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
(31) 優先権主張番号	61/621, 256		最終頁に続く
(32) 優先日	平成24年4月6日(2012.4.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 エリスロポエチン産生細胞の誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、ヒト多能性幹細胞からのエリスロポエチン産生細胞の製造方法：
 (i) ヒト多能性幹細胞を、ActivinとGSK-3阻害剤とを含む培地で培養する工程；および
 (ii) 工程(i)の後、ヒト多能性幹細胞を、IGFファミリー遺伝子産物を含む培地で培養する工程。

【請求項2】

前記GSK-3阻害剤が6-[2-[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)ピリミジン-2-イルアミノ]エチルアミノ]ピリジン-3-カルボニトリル(CHIR99021)である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記IGFファミリー遺伝子産物がIGF-1である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記ヒト多能性幹細胞がヒトiPS細胞またはヒトES細胞である、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(i)において、培地がHDAC阻害剤をさらに含む、請求項1～4のいずれ

か 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 H D A C 阻害剤が N a B である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記工程 (i i) において、培地がジメチルスルホキシドをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記工程 (i) において、前記ヒト多能性幹細胞を単一細胞へ分散させることを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記工程 (i i) が 8 ~ 1 2 日間の培養期間である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記工程 (i) が 6 日間の培養期間であり、および、前記工程 (i i) が 1 0 日間の培養期間である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記工程 (i i) が低酸素条件下で行われる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記低酸素条件下における酸素濃度が 5 % である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ヒト多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を製造するためのキットであって、A c t i v i n、G S K - 3 阻害剤および I G F ファミリー遺伝子産物を含む、前記キット。

【請求項 1 4】

前記 G S K - 3 阻害剤が 6 - [2 - [4 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (4 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) ピリミジン - 2 - イルアミノ] エチルアミノ] ピリジン - 3 - カルボニトリル (C H I R 9 9 0 2 1) である、請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

前記 I G F ファミリー遺伝子産物が I G F - 1 である、請求項 1 3 または 1 4 に記載のキット。

【請求項 1 6】

H D A C 阻害剤をさらに含む、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 1 7】

前記 H D A C 阻害剤が N a B である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

ジメチルスルホキシドをさらに含む、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 1 9】

ヒト多能性幹細胞を単一分散させる試薬をさらに含む、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 0】

R O C K 阻害剤をさらに含む、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記 R O C K 阻害剤が、(R) - (+) - t r a n s - 4 - (1 - アミノエチル) - N - (4 - ピリジル) シクロヘキサンカルボキサミド (Y - 2 7 6 3 2) である、請求項 2 0 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導する方法に関する。本発明はまた、多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を効率的に分化誘導する方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

赤血球造血は、赤血球数の恒常性維持のために必須のプロセスである。赤血球の平均寿命はヒトでは約120日であり、老化赤血球は循環系から継続的に除かれるため、毎日、約千億個の赤血球が成人体内で新たに産生されている。赤血球造血は、主に造血因子のエリスロポエチン（Erythropoietin；EPO）によって恒常性が維持されている。EPOは主に腎臓で産生され、血液中を循環し、骨髄中の後期赤芽球系前駆細胞（CFU-E）に作用して増殖、分化を刺激することで赤血球造血を促進する。EPOが正常レベルに産生されず不足すると、CFU-Eが減少し、赤血球造血が低下した結果、貧血になる。貧血はヘモグロビン濃度が不十分で身体の酸素輸送要求を満足できない病的状態であり、労作意欲の低下、易疲労感、息切れ、立ちくらみ、動悸等の臨床症状を呈するため、症状を改善することが望まれる。各種の疾患がEPO不足による貧血をもたらすことが知られるが、最も一般的な例は、腎臓病である。慢性腎不全患者は、腎臓が損傷することによりEPO産生が低下するために腎性貧血を呈する。慢性腎不全患者のうちの多くは、腎機能代替のため頻繁な透析を必要とする透析患者であり、透析患者の約9割は貧血を患う。現在、腎性貧血の治療法として、組換えヒトEPO（rHuEPO）の投与が広く用いられている。透析患者の多くはrHuEPOを投与されており、それらのうち多くは貧血改善効果が認められている。しかしながら、rHuEPOの投与は、長期間にわたる治療となるためにコストの増大などが問題となっている。

一方、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（特許文献1および2）。そこで、腎性貧血の治療方法として、これらの多能性幹細胞から分化誘導されたEPO産生細胞を移植する治療法が検討されている。しかしながら、ヒト多能性幹細胞からEPO産生細胞を分化誘導する技術については、現在のところ十分に確立されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 3 】

【特許文献1】USP 5,843,780

【特許文献2】WO 2007/069666

【発明の概要】

【 0 0 0 4 】

上述した実情に鑑み、本発明は、ヒト多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導する新規な方法を提供することを目的とする。本発明はまた、多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を効率的に分化誘導する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、特定の因子を含む培地で培養を行うことにより、ヒト多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を分化誘導できることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下を包含する：

[1] 以下の工程を含む、ヒト多能性幹細胞からのエリスロポエチン産生細胞の製造方法：

(i) ヒト多能性幹細胞を、ActivinとGSK-3 阻害剤とを含む培地で培養する工程；および

(ii) 工程(i)の後、ヒト多能性幹細胞を、IGFファミリー遺伝子産物を含む培地で培養する工程、

[2] 前記GSK-3 阻害剤がCHIR99021である、[1]に記載の方法、

[3] 前記 I G F ファミリー遺伝子産物が I G F - 1 である、[1] または [2] に記載の方法、

[4] 前記ヒト多能性幹細胞がヒト i P S 細胞またはヒト E S 細胞である、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法、

[5] 前記工程 (i) において、培地が H D A C 阻害剤をさらに含む、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法、

[6] 前記 H D A C 阻害剤が N a B である、[5] に記載の方法、

[7] 前記工程 (i i) において、培地がジメチルスルホキシドをさらに含む、[1] ~ [6] のいずれかに記載の方法、

[8] 前記工程 (i) において、前記ヒト多能性幹細胞を単一細胞へ分散させることを含む、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法、

10

[9] 前記工程 (i i) が 8 ~ 1 2 日間の培養期間である、[1] ~ [8] のいずれかに記載の方法、

[1 0] 前記工程 (i) が 6 日間の培養期間であり、および、前記工程 (i i) が 1 0 日間の培養期間である、[9] に記載の方法、

[1 1] 前記工程 (i i) が低酸素条件下で行われる、[1] ~ [1 0] のいずれかに記載の方法、

[1 2] 前記低酸素条件下における酸素濃度が 5 % である、[1 1] に記載の方法、

[1 3] ヒト多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を製造するためのキットであって、A c t i v i n、G S K - 3 阻害剤および I G F ファミリー遺伝子産物を含む、前記キット、

20

[1 4] 前記 G S K - 3 阻害剤が C H I R 9 9 0 2 1 である、[1 3] に記載のキット、

[1 5] 前記 I G F ファミリー遺伝子産物が I G F - 1 である、[1 3] または [1 4] に記載のキット、

[1 6] H D A C 阻害剤をさらに含む、[1 3] ~ [1 5] のいずれかに記載のキット、

[1 7] 前記 H D A C 阻害剤が N a B である、[1 6] に記載のキット、

[1 8] ジメチルスルホキシドをさらに含む、[1 3] ~ [1 7] のいずれかに記載のキット、

30

[1 9] ヒト多能性幹細胞を単一分散させる試薬をさらに含む、[1 3] ~ [1 8] のいずれかに記載のキット、

[2 0] R O C K 阻害剤をさらに含む、[1 3] ~ [1 9] のいずれかに記載のキット、

[2 1] 前記 R O C K 阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2 である、[2 0] に記載のキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である米国仮出願 No. 6 1 / 6 2 1 , 2 5 6 の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

本発明に示す方法により、ヒト多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞を製造することが可能となる。また、得られたエリスロポエチン産生細胞から産生される E P O は市販の E P O と同等もしくはそれ以上の機能を有するため、当該エリスロポエチン産生細胞を用いて腎性貧血などの疾患の効果的な治療が可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 5 】

図 1 は、ヒト i P S 細胞から分化誘導された E P O 産生細胞における E P O の産生を示す。データは、工程 2 (S t a g e 2) の 1 8 日目における細胞を抗体染色することにより得られた。

図 2 は、ヒト i P S 細胞から分化誘導された E P O 産生細胞における E P O m R N A 発現および E P O タンパク質産生を示す。m R N A およびタンパク質レベルの両方において、E P O 産生が確認された。

図 3 は、ヒト i P S 細胞から分化誘導された E P O 産生細胞における E P O m R N A 発

50

現の経時的変化を示す。工程2の6日目よりEPO mRNAの転写量が多くなることが確認された。

図4は、工程2におけるIGF-1のEPO産生亢進作用を示す。IGF-1は、IGF-2と比較して、より強力にEPO産生を亢進させることが確認された。

図5は、ヒトiPS細胞から分化誘導されたEPO産生細胞における種々のIGF-1濃度でのEPO分泌を示す。データは、工程2の8日目における細胞のEPO分泌を示す。

図6は、ヒトiPS細胞から分化誘導されたEPO産生細胞における種々のIGF-1濃度でのEPO分泌の経時的変化を示す。IGF-1 50 ng/mLでは工程2の10日目において最大のEPO分泌が確認された。IGF-1 100 ng/mLでは工程2の12日目までその分泌の増加傾向が確認された。

図7は、低酸素条件下でヒトiPS細胞から分化誘導されたEPO産生細胞におけるEPO産生の経時的変化を示す。Stage 2の第1日目より低酸素培養を施行した。

図8は、EPO産生細胞の培養上清による造血幹細胞の赤芽球への分化誘導効率を示す。コントロールとして、市販のリコンビナントEPOを用いた。

図9は、EPO産生細胞の培養上清によるマウスの腎性貧血の改善効果を示す。コントロールとして、市販のリコンビナントEPOを用いた。

【発明を実施するための形態】

【0006】

本発明を以下に詳細に説明する。

<多能性幹細胞>

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在する全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(ntES)細胞、精子幹細胞(「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。

(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。

ES細胞は、受精卵の8細胞期、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. (1998), 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、およびJ. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), Cur

r. Top. Dev. Biol., 38: 133-165)。

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。ヒトおよびサルの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. Suem

10

20

30

40

50

ori et al. (2001), Dev. Dyn., 222: 273 - 279、および H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1580 - 1585 などに記載されている。

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および4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、5%CO₂ 湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる。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 および20%KSRを含有するPBS中の0.25%トリプシンおよび0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

10

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にして行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOGなどの遺伝子マーカーの発現をReal-Time PCR法で検出したり、細胞表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81を免疫染色法にて検出することで行うことができる (Klimanskaya I, et al. (2006), Nature, 444: 481 - 485)。

ヒトES細胞株である例えばKhES-1、KhES-2および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。

(B) 精子幹細胞

20

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)。精子幹細胞は、神経膠細胞系由来神経栄養因子 (glial 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))。

30

(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得る (Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70: 841 - 847; J. L. Resnick et al. (1992), Nature, 359: 550 - 551)。

(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か、または薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させ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および国際公開WO 2010/068955)。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す遺伝子若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, So

40

50

x17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, Esrrb, EsrrgまたはGlis1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つ若しくは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。

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当該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、またL-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびGlis1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
Glis1	NM_147221	NM_147193

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し、あるいは、DNA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得る（Science, 322: 949-953, 2008）。ベクターは、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、リボソーム結合配列、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、上記ベクターは、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子若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

10

20

30

40

50

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若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., (2009), Nature, 458: 771 - 775, Wolftjen et al., (2009), Nature, 458: 766 - 770, WO 2010/012077)。さらに、ベクターは、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソームに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotropic herpes virus)、BKウイルスおよび牛乳頭腫 (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に係る配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1 および ori P 若しくは Large T および SV40 ori 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、遺伝子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 並びに WO 2009/092042 および WO 2009/152529)。

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、MC1293、M344 等の低分子阻害剤、HDAC に対する siRNA および shRNA (例えば、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 (例えば、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, 568 - 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 などの増殖因子、ALK5 阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat. Methods, 6: 805 - 8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signalling 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。

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現を上昇させる方法における薬剤としては、6-bromoindirubin-3'-oxime、indirubin-5-nitro-3'-oxime、valproic acid、2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine、1-(4-methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone HBr (pifithrin-alpha)、prost

10

20

30

40

50

aglandin J2およびprostaglandin E2等が例示される(WO 2010/068955)。

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、penicillin/streptomycin、puromycin、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)、mTESR-1)などが含まれる。

10

培養法の例としては、例えば、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質(DNA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(例えば、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後にES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。

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞(例えば、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、ピューロマイシン、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、約25~約30日またはそれ以上の後にES様コロニーを生じさせることができる。

20

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 \times 10³~約5 \times 10⁶細胞の範囲である。

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。

30

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(例えば、角質化表皮細胞)、粘膜上皮細胞(例えば、舌表層の上皮細胞)、外分泌腺上皮細胞(例えば、乳腺細胞)、ホルモン分泌細胞(例えば、副腎髄質細胞)、代謝・貯蔵用の細胞(例えば、肝細胞)、境界面を構成する内腔上皮細胞(例えば、I型肺胞細胞)、内鎖管の内腔上皮細胞(例えば、血管内皮細胞)、運搬能をもつ繊毛のある細胞(例えば、気道上皮細胞)、細胞外マトリックス分泌用細胞(例えば、線維芽細胞)、収縮性細胞(例えば、平滑筋細胞)、血液と免疫系の細胞(例えば、Tリンパ球)、感覚に関する細胞(例えば、桿細胞)、自律神経系ニューロン(例えば、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(例えば、随伴細胞)、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞(例えば、星状グリア細胞)、色素細胞(例えば、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、例えば神経幹細胞、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。

40

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。

50

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt 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(nuclear transfer 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), Nat. 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。

10

(F) 融合幹細胞

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

20

<多能性幹細胞からのエリスロポエチン産生細胞の分化誘導法>

本発明によれば、ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞からエリスロポエチン産生細胞への分化誘導に際して、以下の工程を含む方法を用いることができる：

(i) ヒト多能性幹細胞等の多能性幹細胞を、ActivinとGSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) 阻害剤とを含む培地で培養する工程(第1工程)；および、

(ii) 工程(i)の後、多能性幹細胞を、IGFファミリー遺伝子産物を含む培地で培養する工程(第2工程)。

本発明において、エリスロポエチン産生細胞とは、エリスロポエチンを産生可能な任意の細胞を意味し、尿細管間質細胞など特定の組織細胞であることを限定しない。好ましくは、当該細胞がおかれた環境が低酸素状況の場合、エリスロポエチンの産生を増幅させるなど、酸素分圧に対して応答性を有している細胞であるが、特にこれに限定されない。また、本発明におけるエリスロポエチンとは、NCBIのAccession番号NM_000799において示される核酸配列から翻訳されるタンパク質であり、好ましくは、シグナルペプチドが切断などの修飾を受けた165個のアミノ酸からなるタンパク質である。

30

本発明において、分化誘導されたエリスロポエチン産生細胞は、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、あるいは純化された集団であってもよい。

(A) ヒト多能性幹細胞を、ActivinとGSK-3 阻害剤とを含む培地で培養する工程(第1工程)

40

本工程では、前述のように得られたヒト多能性幹細胞を、任意の方法で分離し、浮遊培養により培養してもよく、あるいはコーティング処理された培養皿を用いて接着培養してもよい。本発明における培養方法として、好ましくは接着培養が採用される。ここで、ヒト多能性幹細胞の分離方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液(例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)など)またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液(特に好ましくは、Accutase(TM))を用いてヒト多能性幹細胞を解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法が用いられる。ここで、使用されるヒト多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーであ

50

ることが好ましい。

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であり、特に限定はされないが、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、若しくは、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。

また、接着培養においては、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、マトリゲル（BD）、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、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

本工程における培地は、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TMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco'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、RPMI 1640培地である。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、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などの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、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得る。

本工程においては、増殖因子としてActivinを含む培地を用いる。本工程の培地はその他の増殖因子を含んでもよい。その他の増殖因子は、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF-、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、IGFファミリー遺伝子産物（例えば、IGF-1、IGF-2）およびGDFなどを含むがこれらに限定されない。

培地におけるActivinの濃度は、通常1 ng/ml ~ 200 ng/ml、好ましくは50 ng/ml ~ 150 ng/ml、例えば、1 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、95 ng/ml、100 ng/ml、110 ng/ml、120 ng/ml、130 ng/ml、140 ng/ml、150 ng/ml、160 ng/ml、170 ng/ml、180 ng/ml、190 ng/ml、200 ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、100 ng/mlである。

本工程においては、低分子化合物としてGSK-3 阻害剤を含む培地を用いる。本工程の培地はその他の低分子化合物を含んでもよい。その他の低分子化合物は、例えば、HDAC (Histone deacetylase) 阻害剤またはROCK (Rho dependent protein kinase) 阻害剤などを含むがこれらに限定されない。

GSK-3 阻害剤は、GSK-3 タンパク質のキナーゼ活性（例えば、カテニンに対するリン酸化能）を阻害する物質として定義され、既に多数のものが知られているが、例えば、インジルピン誘導体であるBIO (別名、GSK-3 阻害剤IX; 6-プロモインジルピン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、フェニルプロモメチルケトン化合物であるGSK-3 阻害剤VII (4-ジプロモアセトフェノン)、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts (別名、GSK-3 ペプチド阻害剤; Myr-N-GKEAPPAP

10

20

30

40

50

P Q S p P - N H ₂) および高い選択性を有する C H I R 9 9 0 2 1 (6 - [2 - [4 - (2 , 4 - D i c h l o r o p h e n y l) - 5 - (4 - m e t h y l - 1 H - i m i d a z o l - 2 - y l) p y r i m i d i n - 2 - y l a m i n o] e t h y l a m i n o] p y r i d i n e - 3 - c a r b o n i t r i l e) が挙げられる。これらの化合物は、例えば Calbiochem 社や Biomol 社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、他の入手先から入手してもよく、あるいはまた自ら作製してもよい。

本発明で使用される G S K - 3 阻害剤は、好ましくは、C H I R 9 9 0 2 1 であり得る。

培地における C H I R 9 9 0 2 1 の濃度は、通常 1 n M ~ 5 0 μ M、好ましくは 5 0 n M ~ 5 μ M、例えば、1 n M、1 0 n M、5 0 n M、1 0 0 n M、5 0 0 n M、7 5 0 n M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、1 0 μ M、1 5 μ M、2 0 μ M、2 5 μ M、3 0 μ M、4 0 μ M、5 0 μ M であるがこれらに限定されない。特に好ましくは、1 μ M である。

本工程における培地はさらに、H D A C 阻害剤を含んでいてもよい。

H D A C 阻害剤は、H D A C の脱アセチル化活性を阻害する物質として定義され、例えば、ヒドロキサム酸誘導体、環状テトラペプチド、短鎖脂肪酸 (S C F A) 誘導体、ベンズアミド誘導体、求電子ケトン誘導体およびその他の H D A C 阻害剤を含むがこれらに限定されない。

ヒドロキサム酸誘導体としては、例えば、スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (S A H A) (R i c h o n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 , 3 0 0 3 - 3 0 0 7 (1 9 9 8)) ; m - カルボキシケイ皮酸ビスヒドロキサミド (C B H A) (R i c h o n e t a l . , s u p r a) ; ピロキサミド; トリコスタチン A (T S A) およびトリコスタチン C などのトリコスタチン類縁体 (K o g h e e t a l . 1 9 9 8 . B i o c h e m . P h a r m a c o l . 5 6 : 1 3 5 9 - 1 3 6 4) ; サリチルヒドロキサム酸 (A n d r e w s e t a l . , I n t e r n a t i o n a l J . P a r a s i t o l o g y 3 0 , 7 6 1 - 7 6 8 (2 0 0 0)) ; スベロイルビスヒドロキサム酸 (S B H A) (米国特許第 5 , 6 0 8 , 1 0 8 号) ; アゼライン酸ビスヒドロキサム酸 (A B H A) (A n d r e w s e t a l . , s u p r a) ; アゼライン酸 - 1 - ヒドロキサメート - 9 - アニリド (A A H A) (Q i u e t a l . , M o l . B i o l . C e l l 1 1 , 2 0 6 9 - 2 0 8 3 (2 0 0 0)) ; 6 - (3 - クロロフェニルウレイド) c a r p o i c ヒドロキサム酸 (3 C l - U C H A) ; オキサムフラチン [(2 E) - 5 - [3 - [(フェニルスルホニル) アミノフェニル] - ペンタ - 2 - エン - 4 - イノヒドロキサム酸] (K i m e t a l . O n c o g e n e , 1 8 : 2 4 6 1 2 4 7 0 (1 9 9 9)) ; A - 1 6 1 9 0 6、スクリプタイド (S u e t a l . 2 0 0 0 C a n c e r R e s e a r c h , 6 0 : 3 1 3 7 - 3 1 4 2) ; P X D - 1 0 1 (P r o l i f i x) ; L A Q - 8 2 4 ; C H A P ; M W 2 7 9 6 (A n d r e w s e t a l . , s u p r a) ; M W 2 9 9 6 (A n d r e w s e t a l . , s u p r a) ; または米国特許第 5 , 3 6 9 , 1 0 8 号、第 5 , 9 3 2 , 6 1 6 号、第 5 , 7 0 0 , 8 1 1 号、第 6 , 0 8 7 , 3 6 7 号および第 6 , 5 1 1 , 9 9 0 号に開示されているヒドロキサム酸のいずれかなどが挙げられるがこれらに限定されない。

環状テトラペプチドとしては、例えば、トラポキシニン A (T P X) - 環状テトラペプチド (シクロ - (L - フェニルアラニル - L - フェニルアラニル - D - ピペコリニル - L - 2 - アミノ - 8 - オキソ - 9 , 1 0 - エポキシデカノイル)) (K i j i m a e t a l . , J B i o l . C h e m . 2 6 8 , 2 2 4 2 9 - 2 2 4 3 5 (1 9 9 3)) ; F R 9 0 1 2 2 8 (F K 2 2 8、デブシペプチド) (N a k a j i m a e t a l . , E x . C e l l R e s . 2 4 1 , 1 2 6 - 1 3 3 (1 9 9 8)) ; F R 2 2 5 4 9 7 環状テトラペプチド (H . M o r i e t a l . , P C T 出願 W O 0 0 / 0 8 0 4 8 (1 7 F e b r u a r y 2 0 0 0)) ; アピシジン環状テトラペプチド [シクロ (N - O - メチル - L - トリプトファン - L - イソロイシニル - D - ピペコリニル - L - 2 - アミ

10

20

30

40

50

ノ - 8 - オキソデカノイル)] (Darkin - Rattray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13143-13147 (1996)); アピシジン Ia、アピシジン Ib、アピシジン Ic、アピシジン I Ia、およびアピシジン I Ib (P. Dulski et al., PCT 出願 WO 97/11366); CHAP、HC - トキシン環状テトラペプチド (Bosch et al., Plant Cell 7, 1941-1950 (1995)); WF 27082 環状テトラペプチド (PCT 出願 WO 98/48825); ならびにクラミドシン (Bosch et al., supra) などが挙げられるがこれらに限定されない。

短鎖脂肪酸 (SCFA) 誘導体としては、例えば、酪酸ナトリウム (NaB) (Couzens et al., J. Biol. Chem. 254, 1716-1723 (1979)); イソ吉草酸塩 (McBain et al., Biochem. Pharm. 53:1357-1368 (1997)); 吉草酸塩 (McBain et al., supra); 4 - フェニル酪酸塩 (4 - PBA) (Lea and Tulsyan, Anticancer Research, 15, 879-873 (1995)); フェニル酪酸塩 (PB) (Wang et al., Cancer Research, 59, 2766-2799 (1999)); プロピオン酸塩 (McBain et al., supra); ブチルアミド (Lea and Tulsyan, supra); イソブチルアミド (Lea and Tulsyan, supra); フェニル酢酸塩 (Lea and Tulsyan, supra); 3 - プロモプロピオン酸塩 (Lea and Tulsyan, supra); トリブチリン (Guan et al., Cancer Research, 60, 749-755 (2000)); パルプロ酸、パルプロ酸塩および Pivanex (商標) などが挙げられるがこれらに限定されない。

ベンズアミド誘導体としては、例えば、CI - 994; MS - 275 [N - (2 - アミノフェニル) - 4 - [N - (ピリジン - 3 - イルメトキシカルボニル) アミノメチル] ベンズアミド] (Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597 (1999)); および MS - 275 の 3' - アミノ誘導体 (Saito et al., supra) などが挙げられるがこれらに限定されない。

求電子ケトン誘導体としては、例えば、トリフルオロメチルケトン (Frey et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. (2002), 12, 3443-3447; U.S. 6,511,990) および N - メチル - - ケトアミドなどの - ケトアミドなどが挙げられるがこれらに限定されない。

その他の HDAC 阻害剤としては、例えば、天然物、サマプリン、およびデプデシン (Kwon et al. 1998. PNAS 95:3356-3361) などが挙げられるがこれらに限定されない。

本発明で使用される HDAC 阻害剤は、好ましくは、酪酸ナトリウム (NaB) であり得る。

培地における NaB の濃度は、通常 0.01 mM ~ 10 mM、好ましくは 0.1 mM ~ 1 mM、例えば、0.01 mM、0.05 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1 mM、2 mM、5 mM または 10 mM であるがこれらに限定されない。特に好ましくは、0.5 mM である。

本工程における NaB は、任意の時期に任意の期間において培地に添加することができる。本工程における NaB の添加期間は、例えば、1 日間、2 日間、3 日間、4 日間または 5 日間であり、好ましくは 3 日間である。添加時期は、培養の 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、6 日目、7 日目、8 日目、9 日目または 10 日目である。好ましくは、培養の 2 日目に NaB を添加し、3 日間添加培地で培養することである。

本工程における培地はさらに、ROCK 阻害剤を含んでいてもよい。特に、本工程が多能性幹細胞を単一細胞へ分散させる工程を含む場合には、培地に ROCK 阻害剤が含まれていることが好ましい。

10

20

30

40

50

ROCK阻害剤は、Rhoキナーゼ(ROCK)の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632(例えば、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983(2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284(2000)参照)、Fasudil/HA1077(例えば、Uenata et al., Nature 389:990-994(1997)参照)、H-1152(例えば、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93:225-232(2002)参照)、Wf-536(例えば、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4):319-324(2003)参照)およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸(例えば、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の低分子化合物も知られているので、本発明においてはこのような化合物またはそれらの誘導体も使用できる(例えば、米国特許出願公開第20050209261号、同第20050192304号、同第20040014755号、同第20040002508号、同第20040002507号、同第20030125344号、同第20030087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照)。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。

10

本発明で使用されるROCK阻害剤は、好ましくは、Y-27632((R)-(+) -trans-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド)であり得る。

20

Y-27632の濃度は、通常100nM~50μM、好ましくは例えば、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μMであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、10μMである。

低分子化合物の置換基は、当分野における技術常識に基づいて当業者により容易に置換され得るものであり、例えば上記した化合物(GSK-3阻害剤、HDAC阻害剤、ROCK阻害剤など)の性質を保持し得る限りにおいて任意に変更することができる。

本工程において好ましい培地として、B27およびPenicillin/Streptomycin、ならびにActivinおよびCHIR99021を含有するRPMI培地であり、適宜、HDAC阻害剤又はROCK阻害剤を添加された培地が例示される。

30

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、約2~5%、好ましくは5%である。培養期間は、例えば12日以下の培養であり、好ましくは6日である。

(B)ヒト多能性幹細胞を、IGFファミリー遺伝子産物を含む培地で培養する工程(第2工程)

本工程では、前述の第1工程が接着培養であった場合、本工程では得られた細胞を、培地の交換により継続培養してもよい。あるいは、前述の第1工程が浮遊培養であった場合、得られた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してもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、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、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

40

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、Medium199培地、Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI1640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培地である。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、培地は、例えば、アルブミン、

50

トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Invitrogen) (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、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などの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、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得る。

本工程においては、増殖因子としてIGFファミリー遺伝子産物(例えば、IGF-1、IGF-2)を含む培地を用いる。本工程の培地はその他の増殖因子を含んでよい。その他の増殖因子としては、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- β 、Activin、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、およびGDFが挙げられる。本工程においては、IGF-1を増殖因子として用いることが望ましい。

培地におけるIGF-1の濃度は、例えば、1 ng/ml ~ 300 ng/ml、1 ng/ml ~ 200 ng/ml、10 ng/ml ~ 200 ng/ml、50 ng/ml ~ 200 ng/ml、50 ng/ml ~ 100 ng/mlの範囲内であるがこれらに限定されず、好ましくは、50 ng/ml ~ 200 ng/mlの範囲内である。培地におけるIGF-1の濃度は、例えば、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、125 ng/ml、150 ng/ml、175 ng/ml、200 ng/ml、225 ng/ml、250 ng/mlであり、好ましくは、50 ng/mlである。

本工程において培地は、低分子化合物として、ジメチルスルホキシド(DMSO)を含むことが好ましい。

本工程において好ましい培地として、KSR、L-glutamine、NEAA(非必須アミノ酸)、2-メルカプトエタノールおよびPenicillin/Streptomycin、ならびにDMSOおよびIGF-1を含有するDMEM培地が例示される。

培養温度は、以下に限定されないが、約30 ~ 40 °C、好ましくは約37 °C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、約2 ~ 5%、好ましくは5%である。培養期間は、例えば3日以上、好ましくは8 ~ 12日間の培養である。特に好ましい培養期間は、10日間である。

本工程は、任意の酸素濃度条件下で行われ得るが、低酸素条件下で行われることが好ましい。

本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。例えば、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が20%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は、15%以下(例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など)、10%以下(例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など)、または5%以下(例、4%以下、3%以下、2%以下など)である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上(例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など)、0.5%以上(例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.9%以上など)、または1%以上(例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上、1.5%以上、1.6%以上、1.7%以上、1.8%以上、1.9%以上など)である。好ましい雰囲気中の酸素濃度は、1 ~ 5%であり、特に好ましくは、5%である。

細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーターは、種々の機器メーカーか

10

20

30

40

50

ら販売されている（例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社などのメーカー製の低酸素培養用CO₂インキュベーターを用いることができる）。

<エリスロポエチン産生細胞>

本発明は、上述した分化誘導法によって作製されたエリスロポエチン産生細胞（別名、EPO産生細胞）を指標に用いて純化してもよい。エリスロポエチン産生細胞は、例えば、EPO mRNAもしくはEPOタンパク質、またはエリスロポエチン産生細胞の任意のマーカによって染色することで同定し、当業者に周知の方法で純化され得る。

このように得られたエリスロポエチン産生細胞は、エリスロポエチンの産生低下により引き起こされる疾患、例えば、腎性貧血患者へ投与することで、当該疾患の治療薬として用いる事ができる。エリスロポエチン産生細胞は、単体で投与してもよく、好ましくは、生着を促すような足場材と共に投与され得る。ここで足場材とは、コラーゲンなどの生体由来の成分やこれに代替するポリ乳酸などの合成ポリマーが例示されるが、これらに限定されない。投与部位は、血管に隣接する組織であれば、特に限定されないが、腎臓、肝臓、脾臓、小腸、皮下組織等への投与が例示される。特に好ましくは、皮下組織である。また、投与する細胞数は、投与対象において適正な赤血球量またはエリスロポエチン濃度（3～30mlU/ml）が得られるような細胞数であり、対象内の赤血球量またはエリスロポエチン濃度を観察しながら投与細胞数を適宜決定する事によって行われ得る。

<多能性幹細胞からのエリスロポエチン産生細胞の分化誘導用キット>

本発明は、多能性幹細胞からエリスロポエチン産生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増殖因子、化合物、培養液、解離溶液（ヒト多能性幹細胞を単一分散させる試薬を含む）、および培養皿のコーティング剤を含んでもよい。本キットには、さらに分化誘導の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

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。

【実施例1】

【0007】

エリスロポエチン産生細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞（201B6、201B7および253G4）は、京都大学の山中教授より受領し、従来の方法で培養した（Takahashi K, et al. Cell. 131:861-72）。SNL細胞（McMahon, A. P. and Bradley, A. (1990) Cell 62; 1073-1085）をフィーダー細胞として用いて、6cmディッシュ上で80-90%コンフルエントになるまでiPS細胞を培養した。該細胞をCTK溶液の添加により解離させ、フィーダー細胞を除去し、1mLのAccutase(TM)を加えてiPS細胞を単一細胞へ分散させた。

次いで、10μM Y-27632、2%B27およびPenicillin/Streptomycinを含有するRPMI培地にiPS細胞を懸濁し、マトリゲルでコートした24ウェルプレートに細胞数250,000/ウェルとなるように播種した。100ng/mL Activinおよび1μM CHIR99021を加えて、培地量が0.5mL/ウェルとなるように調整し、6日間培養した（Stage1）。この時、2日目に、0.5mM NaBを培地中に添加し（培地交換なし）、3日目に、100ng/mL Activin、1μM CHIR99021および0.5mM NaBを含む培地へ交換し、5日目に、100ng/mL Activin、1μM CHIR99021を含む培地へ交換した。

6日間の培養後、培地を、1%DMSO、50ng/mL IGF-1、20%KSR、2mM L-glutamine、NEAA（非必須アミノ酸）、100μMβ-ME（2-mercaptoethanol）、50mU/L Penicillinおよび50μg/L Streptomycinを含有するDMEMに培地を置換し、所定の日数iPS細胞を培養した（Stage2）。この間、隔日で培地交換を行った。

【実施例 2】

【0008】

エリスロポエチン産生細胞の評価と培養条件検討

Stage 2において18日間の培養後、当該細胞を解析した結果、エリスロポエチン (EPO) のmRNAおよびタンパク質での発現が確認された(図1および2)。また、Stage 2の培養日数とEPOのmRNAの転写量を比較したところ、6日目よりその転写量が多くなることが確認された(図3)。さらに、Stage 2において、IGF-1とIGF-2のEPO産生亢進能を比較したところ、IGF-1は、IGF-2と比較して、より強力にEPO産生を亢進させることが確認された(図4)。

続いて、発現したEPOタンパク質が、細胞外へ分泌されるかについてELISA法を用いて検討したところ、細胞外において確認された。また、Stage 2においてIGF-1の添加濃度とEPOの細胞外分泌濃度について比較したところ、1ng/mL以上の添加量でEPOの細胞外分泌量を増加できることが確認された(図5)。さらに、IGF-1の添加量と培養日数について検討したところ、50ng/mLで10日間培養したときのEPO分泌量が最も高かった(図6)。この時、24wellプレートを用いて得られる量のEPO産生細胞が、0.5mL/wellの培地へ、ヒト血清中の正常範囲より高い濃度のEPOを分泌できる能力を有していることが確認された。

【実施例 3】

【0009】

低酸素条件下でのエリスロポエチン産生細胞への分化誘導

実施例1と同様の方法で、エリスロポエチン産生細胞への分化誘導工程をStage 1まで行い、培地を、1% DMSO、50ng/mL IGF-1、20% KSR、2mM L-glutamine、NEAA(非必須アミノ酸)、100μM -ME(2-mercaptoethanol)、50mU/L Penicillinおよび50μg/L Streptomycinを含有するDMEMに置換した。次いで、本培地中で、14日間iPS細胞を培養した(Stage 2)。この間、隔日で培地交換を行った。Stage 2の第1日目より低酸素培養を施行した。低酸素培養は、マルチガスインキュベーターを用いて行った(O₂濃度5%、CO₂濃度5%)。低酸素培養後2日目、4日目、6日目、8日目、10日目、12日目および14日目に培地と細胞懸濁液を回収し、ELISAでEPOタンパク質量を、PCRでEPO mRNA発現量を確認した。その結果、低酸素条件下での培養により、EPO産生細胞によるEPO産生量が増加した(図7)。

【実施例 4】

【0010】

EPO産生細胞より産生されたエリスロポエチンのin vitro機能評価

得られたEPOの造血幹細胞から赤芽球への分化誘導能について検討するため、CD34陽性細胞を用いて評価した。詳細には、免疫磁気ビーズ法(Miltenyi Biotech; Auburn, CA)により、臍帯血または動員末梢血から0.5-1×10⁵のCD34陽性細胞を単離した。単離したCD34陽性細胞は、95%以上の純度であることをフローサイトメーターにより確認した。得られた10⁵個のCD34陽性細胞は、50ng/mL SCF(Stem cell factor)および、0.05unitまたは0.5unitの市販リコンビナントEPOもしくは0.05unitまたは0.5unitの限外濾過膜(アミコンウルトラ: Millipore)で濃縮したEPO産生細胞の培養上清を添加したMethoCult GF+semisolid medium(#4435; STEMCELL Technologies)中へ懸濁させ、1×10⁴個分の細胞を35mmディッシュへ播種した。14日間の培養後、コロニーの形態および色を倒立顕微鏡を用いて観察し、赤芽球系(BFU-E)への分化について評価した。その結果、EPO産生細胞の培養上清は、市販のEPOと同等に、ヒト臍帯血由来のCD34陽性細胞を赤芽球系へ分化誘導することが確認された(図8)。

【実施例 5】

10

20

30

40

50

【0011】

EPO産生細胞より産生されたエリスロポエチンの *in vivo* 機能評価

6週齢の雄C57BL/6マウス(CLEA Japan, Tokyo, Japan, <http://www.clea-japan.com>)へアデニン(0.5% methylcellulose中、50mg/kg)を4週間経口投与することにより、腎性貧血を誘導させ、アデニン誘導腎性貧血モデルとして用いた。腎性貧血の確認は、マウス尾静脈から採血し、ヘマトクリット(Hct)を測定することで行った。限外濾過膜(アミコンウルトラ: Millipore)で濃縮したEPO産生細胞の培養上清または市販リコンビナントEPO製剤(コントロール)を、各々、0 unit/日、0.1 units/日または5 units/日で、腎性貧血モデルマウスに皮下投与した。投与は、1週間に3回を4週間行った。投与後4週間ですべてのマウスを屠殺し、貧血の改善効果をヘマトクリットで評価した。その結果、EPO産生細胞の培養上清は、市販のEPOよりも高効率にマウスの腎性貧血を改善することが確認された(図9)。尚、実験は全て動物実験等の実施に関する指針に則して行われた。

10

【産業上の利用可能性】

【0012】

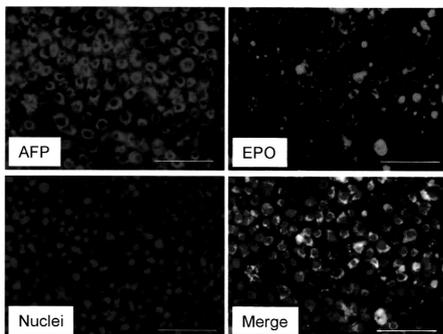
本発明により、ES細胞やiPS細胞などのヒト多能性幹細胞から、エリスロポエチン産生細胞を作製することが可能となる。エリスロポエチン産生細胞は、腎性貧血などの治療を目的とした再生医療の分野で使用することができるために大変有用である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参照により本明細書にとり入れるものとする。

20

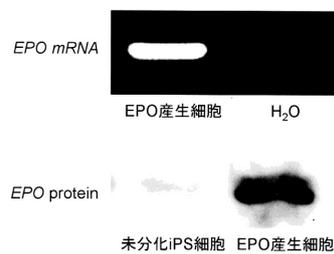
【図1】

図1



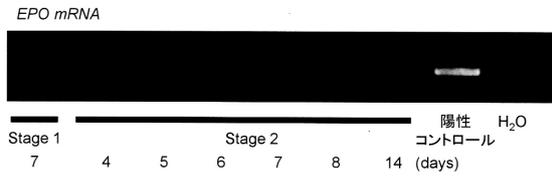
【図2】

図2



【 図 3 】

図 3



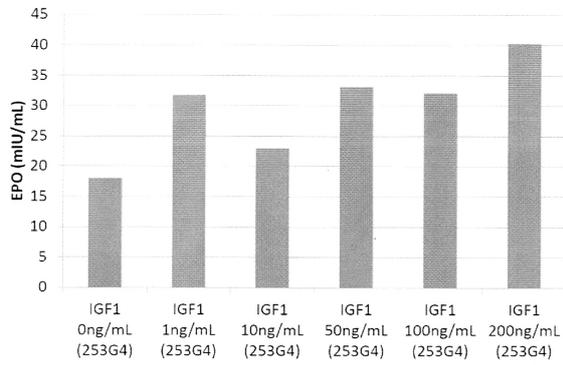
【 図 4 】

図 4

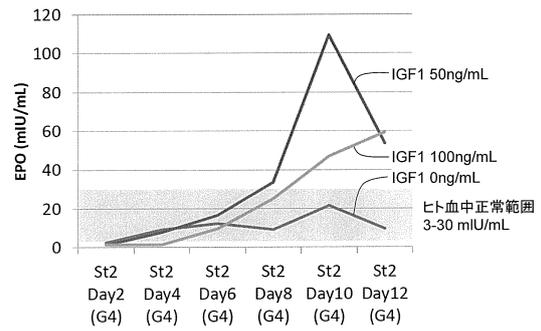


【 図 5 】

図 5

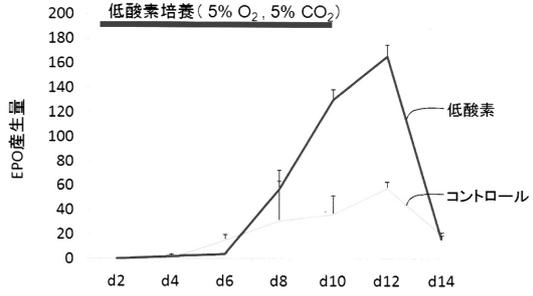


【 図 6 】



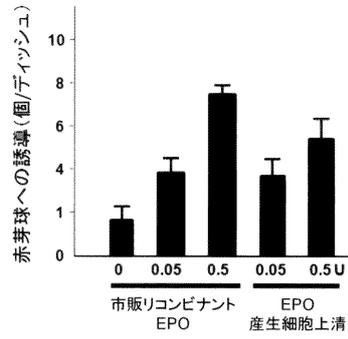
【 図 7 】

図 7



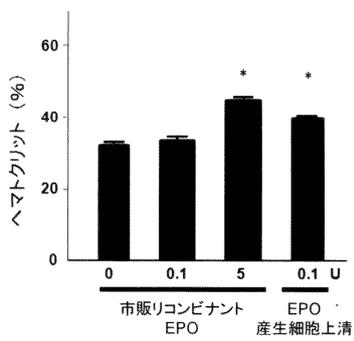
【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

図 9



フロントページの続き

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2011/155641(WO, A1)
特開2012-19690(JP, A)
特表2011-518562(JP, A)
国際公開第2010/129294(WO, A1)
GASSMANN, M., et al., Differentiating Embryonic Stem Cells as an In Vitro Model of Early Erythropoiesis, 1995年, 9(4), pp.429-438
栗崎 晃ら, 動物における器官再生, 化学と教育, 2009年, 57(10), pp.450-453
POWELL-BRAXTON, L., et al., IGF-I is required for normal embryonic growth in mice, Genes & Development, 1993年, 7, pp.2609-2617

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)