

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5995247号

(P5995247)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2013-539023 (P2013-539023)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成24年2月23日 (2012.2.23)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2014-506447 (P2014-506447A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成26年3月17日 (2014.3.17)	(74) 代理人	100100549
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/055152		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開番号	W02012/115276	(74) 代理人	100126505
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012.8.30)		弁理士 佐貫 伸一
審査請求日	平成27年2月23日 (2015.2.23)	(74) 代理人	100131392
(31) 優先権主張番号	61/445,856		弁理士 丹羽 武司
(32) 優先日	平成23年2月23日 (2011.2.23)	(72) 発明者	中畑 龍俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		日本国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
		(72) 発明者	斎藤 潤
			日本国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
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞から樹状細胞を製造する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程により多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞より樹状細胞を製造する方法；

(1) BMP4を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

(2) VEGF並びにbFGFおよび／またはSCFを含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

(3-1) SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligandを含み、血清を含まない培養液で接着培養した後、GM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandを含み、血清を含まない培養液に交換して接着培養する工程、または

(3-2) SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligandを含み、血清を含まない培養液で接着培養した後、SCF、Flt3-ligand、GM-CSFおよびM-CSFを含み、血清を含まない培養液に交換して接着培養する工程、および

(4) GM-CSFおよびIL-4を含み、血清を含まない培養液を用いて浮遊培養する工程。

【請求項2】

前記工程(1)から工程(3-1)または工程(3-2)における接着培養が、細胞外基質をコーティングしたディッシュで行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞外基質がマトリゲルである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記工程（４）の浮遊培養において、さらにLPSおよびTNF- α を含む培養液で培養する工程を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５】

前記樹状細胞が、HLA-DR陽性ならびにCD14陰性の樹状細胞である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

前記樹状細胞が、さらにCD83陽性である、請求項５に記載の方法。

【請求項７】

前記工程（１）が、４日間である、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

前記工程（２）が、２日間である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

前記多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法

。

【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効率よく樹状細胞を製造する方法およびそれによって得られた樹状細胞に関する。

【背景技術】

【０００２】

樹状細胞は、ナイーブT細胞の予備刺激等において重要な役割を果たす抗原提示細胞の中で最も強力な細胞の一つである。そこで、抗原をパルスした樹状細胞を用いたガン免疫療法等への応用が提案されている（特許文献１）。

【０００３】

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２または特許文献３）。そこで、これらの多能性幹細胞から分化誘導された樹状細胞を移植する再生医療やこの樹状細胞を用いたin vitroでの病態モデルを作製することに注目が置かれている。

【０００４】

これまでES細胞またはiPS細胞から樹状細胞を作製する方法として、サイトカインを添加した培養液で胚様体を形成させ誘導する方法（非特許文献１）または異種由来のストローマ細胞上で培養する方法（非特許文献２）が用いられている。しかし、胚様体を経る方法では、一部の細胞のみが目的の細胞となり、その他の多くは別の細胞種へと分化誘導されてしまい、誘導効率が悪くなってしまう。また、異種細胞を用いた場合、誘導された細胞を移植用に用いることは困難である。さらに、病態モデルを作製する場合において、常に同等の樹状細胞を用意するために、ロット差等の不確定要素を含む培養条件をできる限り用いないことが好ましい。

【０００５】

しかし、これまで、胚様体の形成や異種細胞との共培養法を用いず、尚且つ限定された成分の培養液を用いる方法での多能性幹細胞から樹状細胞の作製は報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】 W01995/034638

【特許文献２】 USP 5,843,780

【特許文献３】 WO 2007/069666

【非特許文献】

【０００７】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Zhan X, et al, Lancet. 2004, 364, 163-71

【非特許文献2】Senju S, et al, Stem Cells. 2007, 25, 2720-9

【発明の概要】

【0008】

本発明の目的は、多能性幹細胞から限定された成分を用いて効率よく樹状細胞を製造することである。したがって、本発明の課題は、ヒト多能性幹細胞、特にヒト人工多能性幹細胞を樹状細胞へ分化誘導する培養条件を提供することである。

【0009】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、多能性幹細胞をフィーダー細胞のない条件下で、BMP4、VEGFおよび種々の造血因子を含み血清を含まない培養液を適宜交換し、接着培養と浮遊培養を行ったところ、目的の樹状細胞が得られることを見出した。

10

【0010】

以上の結果から、本発明者らは、多能性幹細胞を適切な培養条件で培養し、限定的な条件下で樹状細胞を製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は以下の通りである。

本発明の一つの態様は、以下の工程により多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞より樹状細胞を製造する方法を提供することである。

(1) BMPファミリータンパク質を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

20

(2) VEGFを含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

(3) 造血因子を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、および

(4) 血清を含まない培養液を用いて浮遊培養する工程。

本発明の他の態様は、前記工程(1)から工程(3)における接着培養が、細胞外基質をコーティングしたディッシュで行われる、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記細胞外基質がマトリゲルである、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、BMPファミリータンパク質がBMP4である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記工程(2)において、培養が、さらにbFGFおよび／またはSCFを含む培地において行われる、前記方法を提供することである。

30

本発明の他の態様は、前記造血因子が、SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligand、GM-CSFおよびM-CSFから成る群より選択される少なくとも一つの造血因子である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記工程(3)において、SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligandを含む培養液で培養した後、さらにGM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandを含む培養液で培養する、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記工程(3)において、SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligandを含む培養液で培養した後、さらにSCF、Flt3-ligand、GM-CSFおよびM-CSFを含む培養液で培養する、前記方法を提供することである。

40

本発明の他の態様は、前記工程(4)の浮遊培養において、GM-CSFおよびIL-4を含有する培養液を用いる、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記工程(4)の浮遊培養において、さらにLPSおよびTNF- α を含む培養液で培養する工程を含む、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記樹状細胞が、HLA-DR陽性ならびにCD14陰性の樹状細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記樹状細胞が、CD83陽性である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記工程(1)が、4日間である、前記方法を提供することである。

50

本発明の他の態様は、前記工程（２）が、２日間である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記いずれかに記載の方法で製造された樹状細胞を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】図１は、CD14陽性細胞を浮遊培養して６日後に得られた細胞のフローサイトメトリの結果を示す。

10

【図２】図２は、浮遊培養後のiPS細胞由来樹状細胞のメイ・ギムザ染色像を示す写真。

【図３】図３は、CD14陽性細胞の、浮遊培養前（左）または浮遊培養７日後（右）に得られた細胞のフローサイトメトリの結果を示す。

【図４】図４は、未成熟樹状細胞を非処理、またはTNF- α とLPSで処理して得られた未成熟および成熟樹状細胞それぞれのフローサイトメトリの結果を示す。

【図５】図５は、ナイーブT細胞を、iPS細胞由来の単球、未成熟樹状細胞または成熟樹状細胞と接触させた後の、細胞増殖アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

本発明を以下に詳細に説明する。

20

【００１４】

本発明は、上記のとおり、（１）BMPファミリータンパク質を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、（２）VEGFを含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、（３）造血因子を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、および（４）血清を含まない培養液を用いて浮遊培養し、それにより樹状細胞を得る工程を含む、多能性幹細胞から樹状細胞を含む細胞を製造する方法に関する。

【００１５】

<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(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。

30

【００１６】

(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。

【００１７】

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; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

40

【００１８】

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

50

成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液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US P5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147; 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; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。

【0019】

ES細胞作製のための培養液として、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 β -FGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、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る、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。

【0020】

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Real-Time PCR法で行うことができる。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)。

【0021】

ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Research Instituteから、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。

【0022】

(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(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液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))。

【0023】

(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)。

【0024】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA又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; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA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、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低

10

20

30

40

50

分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/07852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/09015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720に記載の組み合わせが例示される。

【0025】

上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、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]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

【0026】

初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド (例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン) との融合、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。

【0027】

一方、DNAの形態の場合、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 (WO 2010/008054

）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、リボゾーム結合配列、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し、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)、 β グロクロニダーゼ(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、初期化因子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初期化因子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。

10

【0028】

また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、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良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよび pseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い(Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

【0029】

iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液(これらの培養液にはさらに、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。)または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液(霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが含まれる。

20

【0030】

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又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約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、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30~約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

30

【0031】

あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、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培養液(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日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる(Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質(例えば、Laminin-5(W02009/123349)およびマトリゲル(BD社))を用いる方法が例示される。

【0032】

この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される(Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件(0.1%以上、15%以下の酸素濃度)によりiPS細胞を樹立しても良い(Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845)。

40

【0033】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。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5×10³~約5×10⁶細胞の範囲である。

【0034】

iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞

50

が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS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、iPS細胞を選択することができる。

【0035】

本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、及び成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、及び株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（１）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）、（２）組織前駆細胞、（３）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

【0036】

また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

【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), 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初期化することができる。

【0038】

＜多能性幹細胞から樹状細胞を製造する方法＞

本発明において、樹状細胞とは、細胞突起を有し樹状あるいは樹枝状の形態を呈する細胞であって、T細胞への抗原提示能を有する免疫細胞であって、骨髄系樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、ランゲルハンス細胞、指状嵌入細胞、ヴェール細胞および真皮内樹状細胞等を含む。好ましくは、骨髄系樹状細胞であって、CD11a、MHC-classII（例えば、ヒトの場合、HLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQ）、CD40、CD80およびCD86からなる表面抗原の少なくともいずれか一つのマーカーを発現する細胞である。より好ましくは、HLA-DRおよびCD83陽性ならびにCD14陰性の細胞である。

【0039】

本発明の多能性幹細胞から樹状細胞を製造する方法は、以下の工程により多能性幹細胞を培養することを含む方法である；

（１）BMPファミリータンパク質を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

（２）VEGFを含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、

- (3) 造血因子を含有し、血清を含まない培養液を用いて接着培養する工程、および
(4) 血清を含まない培養液を用いて浮遊培養する工程。

【0040】

本明細書において「血清」とは、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などを指し、血清を含まない培養液とは、成分が規定された培養液であることが好ましく、アルブミンまたはアルブミン代替物、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、インシュリンまたはインシュリン代替物、および亜セレン酸の少なくとも一つを含有した培養液であってもよく、より好ましくは、Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement (ITS) (インビトロジェン社) を含有した培養液である。本発明において、好ましい血清を含まない培養液として、最小必須培養液 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培養液 (DMEM)、イスコフ改変ダルベッコ培養液 (IMDM)、StemPro-34SFM (インビトロジェン社)、Stemline II (Sigma-Aldrich社) 等へITSを添加した培養液もしくは血清代替物を予め含有した霊長類ES細胞培養用培養液 (霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地 (mTeSR, Stemcell Technology社) が例示される。より好ましい血清を含まない培養液は、ITSを含有したStemline IIである。

10

【0041】

「BMPファミリータンパク質」とは、TGF- β スーパーファミリーに属するタンパク質であり、骨形成、細胞増殖、細胞分化、器官発生、器官形成などに関与する約20種類のサブタイプを有するサイトカインであり、本発明において好ましいBMPファミリータンパク質は、BMP2および／またはBMP4であり、さらに好ましいBMPファミリータンパク質はBMP4である。

20

【0042】

「VEGF」とは、脈管形成および血管新生に関与する一群の糖タンパクであり、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF (placental growth factor) -1、PlGF-2およびこれらの選択的スプライシングバリエーション (例えば、VEGF-Aでは、121個、165個、189個および206個のアミノ酸から成るバリエーションである。) を含む。本発明において、好ましいVEGFは、VEGF-Aである。

上記工程 (2) の好ましい態様において、培地はさらに、bFGFおよび／またはSCFを含んでもよい。

30

【0043】

「造血因子」とは、血球の分化・増殖を促進する因子であり、ステムセルファクター (Stem Cell Factor (SCF))、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、エリスロポエチン (Erythropoietin (EPO))、 trombopoietin (TPO))、インターロイキン類およびFlt3-ligandなどがある。ここで、インターロイキン類は、白血球から分泌されるタンパク質で、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、およびIL-9などを含む30種以上がある。本発明において、造血因子は、好ましくは、SCF、TPO、IL-3、Flt3-ligand、GM-CSFおよびM-CSFから成る群から選択される造血因子である。本発明において、造血因子は、単独で用いても良いが (例えば、GM-CSFのみ)、好ましくは、組み合わせで用いる。組み合わせで用いる場合、上記工程 (3) において、SCF、TPO、IL-3およびFlt3-ligandから成る群より選択される組み合わせの後、SCF、GM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandから成る群より選択される組み合わせを造血因子として用いる工程が例示される。より好ましくは、SCF、TPO、IL-3およびFlt3-ligandから成る組み合わせの後、GM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandから成る組み合わせを用いる工程、もしくは、SCF、TPO、IL-3およびFlt3-ligandから成る組み合わせの後、SCF、GM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandから成る組み合わせを用いる方法である。

40

【0044】

また、上記工程 (4) においても、造血因子を含有させてもよく、工程 (4) で用いる好

50

ましい造血因子は、GM-CSFおよびIL-4から成る群から選択される組み合わせが例示される。さらに、樹状細胞を成熟させるために、さらにリポ多糖（LPS）および腫瘍壊死因子を用いても良い。ここで、リポ多糖とは、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり脂質及び多糖から構成される物質である。また、腫瘍壊死因子とは、TNF- α 、TNF- β （リンホトキシン（LT）- α ）およびLT- β から成る群より選ばれるサイトカインであり、本発明において、好ましくは、TNF- α である。

【0045】

本発明において、中間体である骨髓単球系細胞（CD14陽性細胞）に対して工程（4）を実施することで所望する樹状細胞が得られることを考慮し、樹状細胞への誘導効率を高める観点から、上記工程（3）後に産生された浮遊細胞のうち、CD14陽性細胞を精製して上記工程（4）に用いることが望ましい。CD14陽性細胞の精製は、当業者に周知の方法で行うことができ、特に限定されないが、CD14 MicroBeads（#130-050-201, Miltenyi Biotec）を用いてautoMACS pro（Miltenyi Biotec）またはフローサイトメーターにより精製することができる。また、工程（4）に用いる浮遊細胞は、フローサイトメーターまたはLymphoprep（AXIS-SHIELD PoC AS）等を用いた密度勾配遠心法により死細胞を除去して用いることが望ましい。

【0046】

各工程で用いる造血因子を含むサイトカイン等の濃度は、目的の細胞が得られる濃度であれば特に問わないが、BMP4の場合は、5 ng/mlから150 ng/mlでもよく、好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlであり、より好ましくは、20 ng/mlから80 ng/mlである。VEGFの場合は、20 ng/mlから100 ng/mlでもよく、好ましくは、30 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、50 ng/mlである。bFGFの場合は、10 ng/mlから100 ng/mlでもよく、好ましくは、20 ng/mlから50 ng/mlであり、より好ましくは、25 ng/mlである。SCFの場合は、20 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、30 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、50 ng/mlである。IL-3の場合は、5 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、30 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、50 ng/mlである。TPOの場合は、1 ng/mlから25 ng/mlであり、好ましくは、1 ng/mlから10 ng/mlであり、より好ましくは、5 ng/mlである。Flt3-ligandの場合は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、30 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、50 ng/mlである。GM-CSFの場合は、5 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlから50 ng/mlであり、より好ましくは、25 ng/mlである。M-CSFの場合は、5 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、30 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、50 ng/mlである。IL-4の場合は、5 ng/mlから100 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlから70 ng/mlであり、より好ましくは、40 ng/mlである。TNF- α の場合は、0.05 ng/mlから1 ng/mlであり、好ましくは、0.1 ng/mlから0.5 ng/mlであり、より好ましくは、0.2 ng/mlである。LPSの場合は、0.01 μ g/mlから10 μ g/mlであり、好ましくは、0.1 μ g/mlから1 μ g/mlであり、より好ましくは、0.2 μ g/mlである。

【0047】

各工程の期間として、前記工程（1）では、2日以上であり、好ましくは、2日以上6日以下であり、より好ましくは、4日である。前記工程（2）では、1日以上であり、好ましくは、1日以上5日以下であり、より好ましくは、2日である。前記工程（3）では、10日以上であり、好ましくは、10日以上30日以下であり、より好ましくは、24日である。前記工程（3）にて、造血因子の組み合わせを変える場合、SCF、TPO、IL-3およびFlt3-ligandから成る群より選択される造血因子の組み合わせを用いる期間は、7日以上、好ましくは、7日以上14日以内、より好ましくは、9日、さらに、SCF、GM-CSF、M-CSFおよびFlt3-ligandから成る群より選択される造血因子の組み合わせを用いる期間は、3日以上、好ましくは、3日以上20日以内であり、より好ましくは15日である。前記工程（4）では、3日以上であり、好ましくは、3日以上14日以下であり、より好ましくは、7日である。前記工程（4）にて、造血因子を用いる場合、GM-CSFおよびIL-4から成る群より選択される造血因子を用いた培養期間は、3日以上、好ましくは、3日以上10日以内、より好ましくは、5日であり、さらに、TNF- α およびLPSから成る群より選択される組み合わせを添加する場合、そ

の培養期間は、1日以上、好ましくは、1日以上7日以内であり、より好ましくは2日である。

【実施例】

【0048】

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。

【0049】

なお、ヒトES細胞 (KhES-1) は、京都大学再生医科学研究所より受領し、ヒトiPS細胞 (201B7および253G4) は、京都大学の山中教授より受領した。ヒトES細胞およびヒトiPS細胞は、growth factor-reduced Matrigel (#354230; Becton-Dickinson) でコートしたディッシュ上でmTeSR1 (#05850; STEMCELL Technologies) を用いて培養した。

【0050】

[実施例1]

下記の方法により、ヒトiPS細胞 (253G4) をCD14陽性の単球を経て樹状細胞へと分化誘導した後、フローサイトメトリーを用いて分析したところ、CD14陰性HLA-DR陽性細胞が含有されていることが確認された (図1)。

1. iPS細胞コロニーを1ウェルあたり5個以下のコロニー数になるようにgrowth factor-reduced Matrigelでコートした6ウェルプレート上へ播種し、mTeSR1を用いて各コロニーの直径が約1mmになるまで培養した。

2. 培養液をInsulin-Transferrin-Selenium-X Supplement (ITS) (#51500-056; Invitrogen) および20 ng/mLのBMP4 (#314-BP-010; R&D Systems) を含有するStemline II serum-free hematopoietic stem cell expansion medium (Stemline II) (#S0192; Sigma-Aldrich) へ交換し、4日間培養した。

3. 培養液をITS、50 ng/mLのVEGF (#293-VE-050; R&D Systems) および50 ng/mLのSCF (#255-SC-050; R&D Systems) を含有するStemline IIへ交換し、2日間培養した。

4. 培養液をITS、50 ng/mLのSCF、50ng/mLのIL-3 (#203-IL-050; R&D Systems)、5 ng/mLのTPO (#288-TPN-025; R&D Systems) および50 ng/mLのFlt-3 ligand (#308-FK-025; R&D Systems) を含有するStemline IIへ交換し、7~9日間培養した。

5. 培養液をITS、50 ng/mLのFlt-3 ligand、25 ng/mLのGM-CSF、50 ng/mLのM-CSFを含有するStemline IIへ交換し、15日間培養した。この時、5日おきに新しい培養液へ交換した。

6. 培養上清中の浮遊細胞を回収し、Lymphoprep (#1114740; AXIS-SHIELD PoC AS) を用いて密度勾配遠心法により死細胞を除去した後、CD14 MicroBeads (#130-050-201, Miltenyi Biotec) を用いてautoMACS pro (Miltenyi Biotec) によりCD14陽性細胞を分離した。3×10⁴個の分離したCD14陽性細胞をUltra-Low Attachment Surface (#3471; CORNING) でコートした6ウェルディッシュを用いて、GM-CSF(50 ng/mL) +IL-4(40 ng/mL) とITSを含有するStemline II中で6日間浮遊培養を行った。

【0051】

[実施例2]

下記の方法により、ヒトiPS細胞 (253G4) を樹状細胞へ分化誘導を行い、メイ・ギムザ染色を行ったところ、得られた細胞は末梢血由来の樹状細胞と類似した形状であることが確認された (図2)。

1. iPS細胞コロニーを1ウェルあたり5個以下のコロニー数になるようにgrowth factor-reduced Matrigelでコートした6ウェルディッシュ上へ播種し、mTeSR1を用いて各コロニーの直径が約1mmになるまで培養した。

2. 培養液をITSおよび20 ng/mLのBMP4を含有するStemline IIへ交換し、4日間培養した。

。

3. 培養液をITS、50 ng/mLのVEGFおよび50 ng/mLのSCFを含有するStemline IIへ交換し、2日間培養した。

4. 培養液をITS、50 ng/mLのSCF、50ng/mLのIL-3、5 ng/mLのTPOおよび50 ng/mLのFlt-

10

20

30

40

50

3 ligandを含有するStemline IIへ交換し、7～9日間培養した。

5. 培養液をITS、50 ng/mLのFlt-3 ligand、25 ng/mLのGM-CSFおよび50 ng/mLのM-CSFを含有するStemline IIへ交換し、15日間培養した。

6. 培養上清中の浮遊細胞を回収し、Lymphoprepを用いて密度勾配遠心法により死細胞を除去した後、CD14 MicroBeadsを用いてautoMACS proによりCD14陽性細胞を分離した。 3×10^4 個の分離したCD14陽性細胞をUltra-Low Attachment Surfaceでコートした6ウェルディッシュを用いて、ITS、25 ng/mLのGM-CSFおよび40 ng/mLのIL-4を含有するStemline II中で5日間浮遊培養を行った。さらに、培養液へ0.2ng/mLのTNF- α と1.0 μ g/mlのLPSを添加し、2日間培養を続けた。

【0052】

10

[実施例3]

下記の方法により、ヒトiPS細胞(253G4)をCD14陽性の単球を経て樹状細胞へと分化誘導した後、フローサイトメトリーを用いて分析した(図3および4)。その結果、工程6にてTNF- α およびLPSを添加した方が、HLA-DRおよびCD83陽性細胞がより多く含まれていた。つまり、TNF- α およびLPSを含む培養液で培養する工程により樹状細胞が成熟することが示唆された。

さらに、ナイーブT細胞を、iPS細胞から分化させた単球、未成熟樹状細胞または成熟樹状細胞と接触させた後の、増殖活性を ^3H チミジン取り込みアッセイで調べた(図5)。その結果、iPS細胞から分化させた成熟樹状細胞はナイーブT細胞に対して増殖刺激能を有することがわかった。

20

1. iPS細胞コロニーを1ウェルあたり5個以下のコロニー数になるようにgrowth factor-reduced Matrigelでコートした6ウェルディッシュ上へ播種し、mTeSR1を用いて各コロニーの直径が約1mmになるまで培養した。

2. 培養液をITSおよび20 ng/mLのBMP4を含有するStemline IIへ交換し、4日間培養した。

3. 培養液をITS、50 ng/mLのVEGF 25ng/ml bFGF (#133-FB-025; R&D Systems)および50 ng/mLのSCFを含有するStemline IIへ交換し、2日間培養した。

4. 培養液をITS、50 ng/mLのSCF、50ng/mLのIL-3、5 ng/mLのTPOおよび50 ng/mLのFlt-3 ligandを含有するStemline IIへ交換し、7～9日間培養した。

5. 培養液をITS、50 ng/mLのFlt-3 ligand、25 ng/mLのGM-CSFおよび50 ng/mLのM-CSFを含有するStemline IIへ交換し、15日間培養した。

30

6. 培養上清中の浮遊細胞を回収し、Lymphoprepを用いて密度勾配遠心法により死細胞を除去した後、CD14 MicroBeadsを用いてautoMACS proによりCD14陽性細胞を分離した。 1.5×10^6 個の分離したCD14陽性細胞(単球として使用)を、Ultra-Low Attachment Surfaceでコートした6ウェルディッシュを用いて、(i) ITS、25 ng/mLのGM-CSFおよび40 ng/mLのIL-4を含有するStemline IIで7日間浮遊培養(未成熟樹状細胞として使用)、または(ii) ITS、25 ng/mLのGM-CSF、40 ng/mLのIL-4を含有するStemline II中で5日間浮遊培養し、続いて0.2ng/mLのTNF- α および1 μ g/mLのLPSを加えてさらに2日間浮遊培養した(成熟樹状細胞として使用)。

【0053】

40

[実施例4]

分化効率が変化するかどうかについて他の基礎培地を評価した。その結果、次の方法でもiPS細胞から樹状細胞を得ることができた。

1. ES細胞またはiPS細胞コロニーを1ウェルあたり5個以下のコロニー数になるようにgrowth factor-reduced Matrigelでコートした6ウェルディッシュ上へ播種し、mTeSR1を用いて各コロニーの直径が約1mmになるまで培養した。

2. 培養液を80 ng/mLのBMP4を含有するStemPro-34SFM (#10639-011; Invitrogen)へ交換し、4日間培養した。

3. 培養液を100ng/mLのVEGF、25ng/mlのbFGFおよび10 ng/mLのSCFを含有するStemPro-34SFMへ交換し、2日間培養した。

50

4. 培養液を50 ng/mLのSCF、50ng/mLのIL-3、5 ng/mLのTPOおよび50 ng/mLのFlt-3 ligandを含有するStemPro-34SFMへ交換し、7～9日間培養した。
5. 培養液を50 ng/mLのFlt-3 ligand、25 ng/mL のGM-CSF、50 ng/mLのM-CSFを含有するStemPro-34SFMへ交換し、3日から15日間培養した。この時、5日おきに新しい培養液へ交換した。
6. 培養上清中の浮遊細胞を回収し、Lymphoprepを用いて密度勾配遠心法により死細胞を除去した後、CD14 MicroBeadsを用いてautoMACS proによりCD14陽性細胞を分離した。1.5 × 10⁶個の分離したCD14陽性細胞をUltra-Low Attachment Surfaceでコートした6ウェルディッシュを用いて、25 ng/mL のGM-CSFおよび40 ng/mL のIL-4を含有するStemPro-34SFM中で浮遊培養を行った。浮遊培養開始から5日目に、培養液へ1 μg/mL のLPSおよび0.2ng/mL のTNF-α を添加し、さらに2日間培養を続けた。

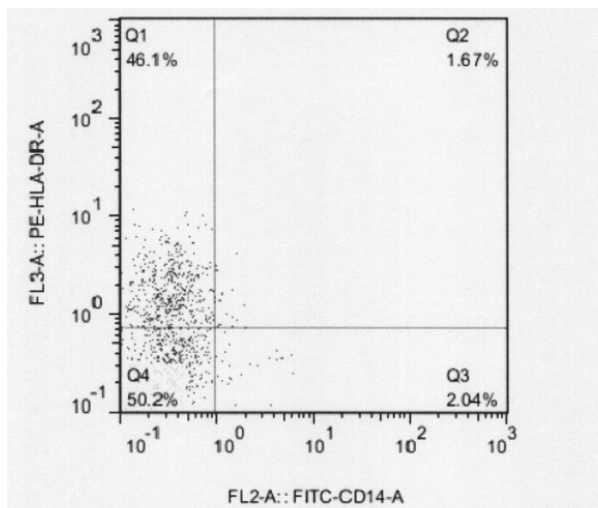
10

【産業上の利用可能性】

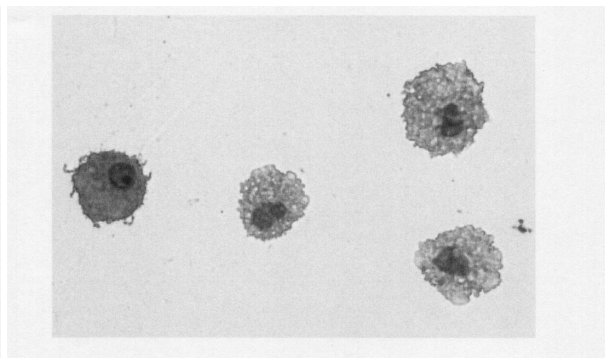
【0054】

本発明により、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から、樹状細胞を作製することが可能になる。製造された樹状細胞は、ガン免疫療法などの治療、または樹状細胞が関連する自己免疫疾患等の治療方法の開発に有用である。

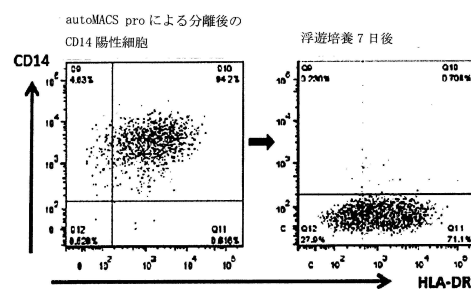
【図 1】



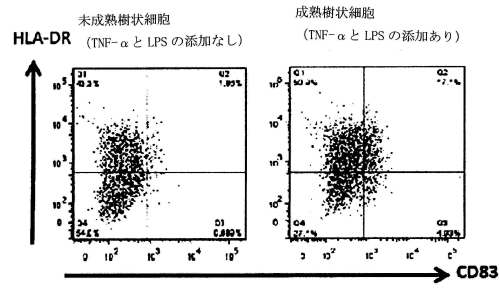
【図 2】



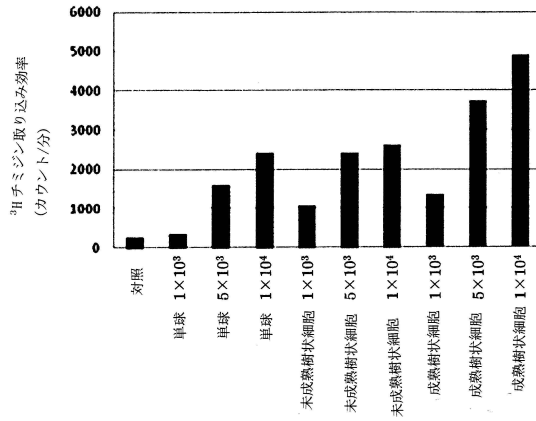
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(72)発明者 丹羽 明

日本国京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 柳町 昌克

日本国京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 国際公開第2009/120891 (WO, A1)

国際公開第2010/099539 (WO, A1)

国際公開第2010/096746 (WO, A1)

Plos one, 2013年 4月, 8, 4, e59243

Regenerative Medicine, 2009年, 4, 4, 513-526

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

C12N 15/00

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)