

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6429280号
(P6429280)

(45) 発行日 平成30年11月28日 (2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日 (2018.11.9)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735

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 35/34 (2015.01)

A 6 1 K 35/34

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

請求項の数 10 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-517060 (P2015-517060)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月9日 (2014.5.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/062500
 (87) 国際公開番号 W02014/185358
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014.11.20)
 審査請求日 平成29年4月18日 (2017.4.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-102375 (P2013-102375)
 (32) 優先日 平成25年5月14日 (2013.5.14)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(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
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 山中 伸弥
 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 吉田 善紀
 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】 効率的な心筋細胞の誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法であって、次の(1)から(4)の工程を含む方法；

(1) 多能性幹細胞から胚様体を形成する工程、

(2) (1)の工程で得られた胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で1日以上5日以内の期間培養する工程、

(3) (2)の工程で得られた胚様体を解離する工程、および

(4) (3)の工程で得られた細胞をVEGFおよびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養して胚様体に再凝集させる工程。

10

【請求項2】

多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法であって、次の(1)から(4)の工程を含む方法；

(1) 多能性幹細胞から胚様体を形成する工程、

(2) (1)の工程で得られた胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で1～4日間培養する工程、

(3) (2)の工程で得られた胚様体を解離する工程、および

(4) (3)の工程で得られた細胞をVEGFおよびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養して胚様体に再凝集させる工程。

【請求項3】

20

多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法であって、次の（１）から（４）の工程を含む方法；

（１）多能性幹細胞から胚様体を形成する工程、

（２）（１）の工程で得られた胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で1. 5～5日間培養する工程、

（３）（２）の工程で得られた胚様体を解離する工程、および

（４）（３）の工程で得られた細胞をVEGF、Wnt阻害剤、並びにBMP阻害剤および/またはTGFβ阻害剤を含有する培養液中で培養して胚様体に再凝集させる工程。

【請求項４】

前記BMP阻害剤が、Dorsomorphinであり、前記TGFβ阻害剤が、SB431542である、請求項3に記載された方法。

10

【請求項５】

さらに以下の工程を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載された方法。

（５）（４）の工程で得られた胚様体をVEGFおよびbFGFを含有する培養液中で培養する工程。

【請求項６】

前記工程（５）が、前記胚様体を12日以上の間培養する工程である、請求項5に記載された方法。

【請求項７】

前記工程（２）、（４）および（５）において、培養が低酸素条件で行われる、請求項1から6のいずれか1項に記載された方法。

20

【請求項８】

前記工程（４）が、前記細胞を4日以上の間培養する工程である、請求項1から7のいずれか1項に記載された方法。

【請求項９】

前記Wnt阻害剤が、IWP-3またはIWP-4である、請求項1から8のいずれか1項に記載された方法。

【請求項10】

前記心筋細胞が、ヒト心筋細胞である、請求項1から9のいずれか1項に記載された方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心筋細胞は出生と同時にその分裂能を喪失し、再生が困難であることから、心筋梗塞、心筋炎または老化等を原因とする傷害心組織に対して、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）など多能性を有する細胞（特許文献1）を分化誘導して得られる心筋細胞を移植する補充療法が注目されている。これら多能性幹細胞からの心筋細胞への分化誘導法は多数報告されているが（特許文献2、特許文献3、非特許文献1、非特許文献2および非特許文献3）、臨床応用を目的とした場合、心筋分化効率は十分に高くない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】 W02007/069666

【特許文献2】 W02007/002136

【特許文献3】 W02009/118928

【非特許文献】

【0004】

50

【非特許文献1】Yan P, et al, Biochem Biophys Res Commun. 379:115-20 (2009)

【非特許文献2】Laflamme MA, et al, Nat Biotechnol, 25:1015-1024 (2007)

【非特許文献3】Yang L et al, Nature, 453:524-528 (2008)

【発明の概要】

【0005】

本発明の目的は、多能性幹細胞から心筋細胞を誘導する工程において、細胞の株化による感度の違いの影響を受けない、強固で高効率な心筋分化誘導方法を提供することを目的とする。

【0006】

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、心筋誘導工程において形成される胚様体を解離し再凝集させることで、同じ培養条件においても効率よく心筋細胞を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。

【0007】

すなわち、本発明は、以下を包含する。

[1]多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法であって、次の(1)から(4)の工程を含む方法；

(1)多能性幹細胞から胚様体を形成する工程、

(2)胚様体をアクチビンA、骨形成タンパク質(BMP)4および塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含有する培養液中で培養する工程、

(3)(2)の工程で得られた胚様体を解離する工程、および

(4)(3)の工程で得られた細胞を血管内皮細胞増殖因子(VEGF)およびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養して胚様体に再凝集させる工程。

[2]さらに以下の工程を含む、[1]に記載された方法。

(5)(4)の工程で得られた胚様体をVEGFおよびbFGFを含有する培養液中で培養する工程。

[3]前記工程(5)が、前記胚様体を12日以上の間培養する工程である、[2]に記載された方法。

[4]前記工程(2)、(4)および(5)において、培養が低酸素条件で行われる、[1]から[3]のいずれか1つに記載された方法。

[5]前記工程(2)が、胚様体を1日以上5日以内の間培養する工程である、[1]から[4]のいずれか1つに記載された方法。

[6]前記工程(4)が、前記細胞を4日以上の間培養する工程である、[1]から[5]のいずれか1つに記載された方法。

[7]前記Wnt阻害剤が、IWP-3またはIWP-4である、[1]から[6]のいずれか1つに記載された方法。

[8]前記工程(4)に用いられる培養液が、BMP阻害剤および/またはTGF β 阻害剤をさらに含む、[1]から[7]のいずれか1つに記載された方法。

[9]前記BMP阻害剤が、Dorsomorphinであり、前記TGF β 阻害剤が、SB431542である、[8]に記載された方法。

[10]前記心筋細胞が、ヒト心筋細胞である、[1]から[9]のいずれか1つに記載された方法。

[11][1]から[10]のいずれか1つに記載の方法で製造された心筋細胞を含む、心疾患治療剤。

【発明の効果】

【0008】

本発明に示す方法により多能性幹細胞から心筋細胞を効率的に誘導することができ、誘導された心筋細胞を用いることで、心筋梗塞および心不全などの心臓疾患患者における心機能回復が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1Aは、多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導するプロトコールを示す。図1Bは、iPS細胞(201B7)から従来法によって得られた細胞におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

【図2】図2Aは、多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導方法する改変プロトコールを示す。図2Bは、day4にて解離再凝集を行わなかった場合(左図)および行った場合(右図)での新規プロトコールを用いて得られた細胞におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

【図3】図3は、新規プロトコール中の解離再凝集をday2(d2)からday6(d6)の各日程で行った場合において、iPS細胞(201B7)から誘導された細胞(分化誘導20日後)におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

10

【図4】図4は、新規プロトコール中の解離再凝集をday2(d2)からday6(d6)の各日程で行った場合において、ES細胞(KhES1)から誘導された細胞(分化誘導20日後)におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

【図5】図5は、新規プロトコール中の解離再凝集をday2(d2)からday6(d6)の各日程で行った場合において、iPS細胞(610B1)から誘導された細胞(分化誘導20日後)におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

【図6】図6は、新規プロトコール(IW)中の解離再凝集をday2(d2)からday6(d6)の各日程で行った場合において、iPS細胞(409B2-2)から誘導された細胞におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

【図7】図7は、新規プロトコールにDorsomorphinおよびSB431542を加えた方法(IWDS)中の解離再凝集をday2(d2)からday6(d6)の各日程で行った場合において、iPS細胞(409B2-2)から誘導された細胞におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。

20

【図8】図8は、新規プロトコール(IW)および新規プロトコールにDorsomorphinおよびSB431542を加えた方法(IWDS)中の解離再凝集をday2.5(d2.5)からday6(d6)の各日程で6時間おきに行った場合において、各種iPS細胞およびES細胞から誘導された細胞におけるTNT陽性細胞の含有率をフローサイトメトリーで評価した結果を示す。各iPS細胞の由来細胞としては、MYH、409B2および427F1は線維芽細胞由来であり、606A1および610B1は臍帯血由来であり、457C1は歯髄由来であり、604A1および648A1は血液細胞由来である。

【発明を実施するための形態】

30

【0010】

本発明を以下に詳細に説明する。

【0011】

本発明は、(1)多能性幹細胞から胚様体を形成する工程、(2)胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で培養する工程、(3)(2)の工程で得られた胚様体を解離する工程、(4)(3)の工程で得られた細胞をVEGFおよびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養して胚様体に再凝集させる工程、および付加的に(5)(4)の工程で得られた胚様体をVEGFおよびbFGFを含有する培養液中で培養する工程を含む、多能性幹細胞から心筋細胞を誘導する方法を提供する。

【0012】

40

本発明において、心筋細胞とは、自己拍動の特性を有する心筋の細胞を意味する。また、特に断りがなければ、心筋細胞は心筋前駆細胞を含んでもよく、拍動筋肉と電気伝導組織を形成する心筋細胞および血管平滑筋を生じる能力を有する細胞を包含する。ここで、心筋細胞および心筋前駆細胞は互いに混在していても良く、また、単離された心筋前駆細胞でも良い。

心筋細胞および心筋前駆細胞は、心筋マーカーである心筋トロポニン(cTNTまたはtropomyosin T type 2)陽性および/またはαMHC(α myosin heavy chain)陽性であることによって特徴づけられる。また、本発明において得られる心筋細胞は、他の細胞種と比して心筋細胞の割合を多く含有した細胞集団であっても良く、好ましくは、心筋細胞を50%、60%、70%、80%または90%以上含有する細胞集団である。

50

【0013】

<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、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、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)などが含まれる。本発明では、胚の破壊を行わずに得られるという意味では、iPS細胞またはMuse細胞を用いることが好ましい。本発明の方法において好ましく使用される多能性幹細胞は、本発明の心筋分化誘導プロトコールに対して適応性が高い細胞であり得る。「本発明の心筋分化誘導プロトコールに対して適応性が高い」とは、本発明の心筋分化誘導プロトコールを用いて分化誘導を行った際に、40%以上の効率、例えば、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%の効率で心筋細胞が生成されることを意味する。本発明の方法において好ましい多能性幹細胞は、70%以上の心筋細胞生成効率を有する細胞であり、より好ましくは、80%以上の心筋細胞生成効率を有する細胞であり得る。本発明の心筋分化誘導プロトコールに対して適応性が高い細胞は、別段限定されることはないが、例えば、ES細胞について、KhES1、KhES3等、iPS細胞について、201B7、610B1、MYH、409B2、427F1、606A1、610B1、457C1、604A1、648A1等の細胞株が挙げられる。本発明における多能性幹細胞は、解離再凝集の時期に関わらず高い心筋細胞誘導効率を有する細胞であってもよく、また解離再凝集の時期に応じて心筋細胞誘導効率変動する細胞であってもよい。後者の場合、少なくとも分化誘導工程の一点において解離再凝集を行った場合に高い心筋細胞誘導効率を有する細胞であれば、本発明の方法において多能性幹細胞として使用可能である。

10

20

【0014】

(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。

【0015】

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)。

30

【0016】

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養液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。

40

【0017】

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および4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養

50

液を使用し、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(H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932)。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。

【0018】

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)。

10

【0019】

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

【0020】

(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))。

20

【0021】

(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)。

30

【0022】

(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またはGlis1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、組み合わせで用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、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、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 201

40

50

0/111422、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、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

10

【0023】

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。

20

30

【0024】

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。

【0025】

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

40

50

、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。

【0026】

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)。

【0027】

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。

【0028】

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。

【0029】

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。

【0030】

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)。

【0031】

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。

【0032】

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。

【0033】

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

10

20

30

40

50

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、およ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、およ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。

【0034】

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。

【0035】

(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。

【0036】

(F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、WO2011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

【0037】

<多能性幹細胞から胚様体を形成する工程～工程(1)>

この工程においては、コロニーを形成した多能性幹細胞を解離して単細胞にしたのちに胚様体を形成させることが好ましい。多能性幹細胞を解離させる工程においては、互いに接着して集団を形成している細胞を個々の細胞に解離(分離)させる。多能性幹細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液(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解離溶液を用いた解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解離溶液(特に好ましくは、Accumax)を用いて多能性幹細胞を解離する方法が用いられる。

【0038】

本発明の方法において、胚様体を形成する方法として、解離した多能性幹細胞を、培養皿の表面を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、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によるコーティング処理)されていないもの、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)したものを用いて浮遊培養させることが例示される。本発明の方法において、心筋細胞を誘導する目的で胚様体を形成させるために好適に使用される多能性幹細胞数は、1000個か

10

20

30

40

50

ら4000個であり、好ましくは2000個から4000個である。

【0039】

＜胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で培養する工程～工程（2）＞

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へアクチビンA、BMP4およびbFGFを添加することにより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、 α 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、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34 (invitrogen) およびこれらの混合培地などが包含される。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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

10

【0040】

本工程において用いられるアクチビンAの濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、12ng/mlである。

20

【0041】

本工程において用いられるBMP4の濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、18ng/mlである。

30

【0042】

本工程において用いられるbFGFの濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、10ng/mlである。

【0043】

培養条件について、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、低酸素条件で行われることが望ましい。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（20％）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1％から15％の間の酸素分圧が挙げられ、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％および1％が例示される。より好ましくは、5％である。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。

40

【0044】

培養期間は、1日以上7日以下が例示され、心筋細胞の樹立効率を考慮すると1日以上5日以下、1.5日以上5日以下、2日以上4日以下が例示される。本発明の培養期間は、例えば、1日、1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、4.5日、5日、5.5日、6日、6.5日、7日などであってもよく、好ましくは、2日であり得る。

【0045】

50

<製造工程中の胚様体を解離させる工程～工程（３）>

本発明において、胚様体を解離する方法は工程（１）で説明したのと同様の方法を用いることができる。

【００４６】

<VEGFおよびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養し、再凝集により胚様体を形成する工程～工程（４）>

再凝集により胚様体を形成させるにあたり、使用する細胞数は、同細胞が互いに接着し、細胞塊を作製できる細胞数であれば、特に限定されないが1000個以上、20000個以下の細胞であり、好ましくは、10000個が例示される。培養に際しては、工程（１）で説明したのと同様に、表面が細胞接着性を向上させる目的で人工的に処理されていない培養容器、もしくは、人工的に接着を抑制する処理した培養容器を用いて浮遊培養させることが好ましい。

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へVEGFおよびWnt阻害剤を添加することにより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、 α 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、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34（Invitrogen）およびこれらの混合培地などが包含される。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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

【００４７】

本発明において、Wnt阻害剤とは、Wntの受容体への結合から β カテニンの蓄積へと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるFrizzledファミリーへの結合を阻害する物質、または β カテニンの分解を促進する物質である限り特に限定されず、例えば、DKK1タンパク質（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_012242）、スクレロスチン（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_025237）、IWR-1（Merck Millipore）、IWP-2（Sigma-Aldrich）、IWP-3（Sigma-Aldrich）、IWP-4（Sigma-Aldrich）、PNU-74654（Sigma-Aldrich）、XAV939（Sigma-Aldrich）およびこれらの誘導体などが例示される。

【００４８】

本工程で使用されるTGF β 阻害剤は、好ましくは、IWP-3またはIWP-4であり得る。

【００４９】

培養液中におけるIWP-3またはIWP-4などのWnt阻害剤の濃度は、Wntを阻害する濃度であれば特に限定されないが1nM～50 μ Mが好ましく、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、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、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。より好ましくは、1 μ Mである。

【００５０】

本工程において用いられるVEGFの濃度は1～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、10ng/mlである。

【0051】

本工程では、さらに、BMP阻害剤および/またはTGF β 阻害剤を基本培地に添加しても良い。

【0052】

本発明において、BMP阻害剤とは、Chordin、Noggin、Follistatinなどのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin（すなわち、6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine）、その誘導体（P. B. Yu et al. (2007), *Circulation*, 116:II_60; P.B. Yu et al. (2008), *Nat. Chem. Biol.*, 4:33-41; J. Hao et al. (2008), *PLoS ONE*, 3(8):e2904）およびLDN-193189（すなわち、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline）が例示される。DorsomorphinおよびLDN-193189は市販されており、それぞれSigma-Aldrich社およびStemgent社から入手可能である。

10

【0053】

本工程で使用されるBMP阻害剤は、好ましくは、Dorsomorphinであり得る。

【0054】

培養液中におけるDorsomorphinなどのBMP阻害剤の濃度は、BMPを阻害する濃度であれば特に限定されないが1nM～50 μ Mが好ましく、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、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、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。より好ましくは、600nMである。

20

【0055】

本発明において、TGF β 阻害剤とは、TGF β の受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、またはALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質である限り特に限定されず、例えば、Lefty-1（NCBI Accession No.として、マウス：NM_010094、ヒト：NM_020997が例示される）、SB431542、SB202190（以上、R.K.Lindemann et al., *Mol. Cancer*, 2003, 2:20）、SB505124（GlaxoSmithKline）、NPC30345、SD093、SD908、SD208（Scios）、LY2109761、LY364947、LY580276（Lilly Research Laboratories）、A-83-01（WO 2009146408）およびこれらの誘導体などが例示される。

【0056】

本工程で使用されるTGF β 阻害剤は、好ましくは、SB431542であり得る。

30

【0057】

培養液中におけるSB431542などのTGF β 阻害剤の濃度は、ALK5を阻害する濃度であれば特に限定されないが1nM～50 μ Mが好ましく、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、50nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、5.2 μ M、5.4 μ M、5.6 μ M、5.8 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。より好ましくは、5.4 μ Mである。

【0058】

培養条件について、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、低酸素条件で行われることが望ましい。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（20%）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1%から15%の間の酸素分圧が挙げられ、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%および1%が例示される。より好ましくは、5%である。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。

40

【0059】

培養期間は、長期間培養することにより心筋細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、4日以上培養することが好ましい。例えば、4日、5日、6日、7日、8日、9日および10日が挙げられる。これにより、再凝集により形成された胚様体が心筋細胞に分化する。

【0060】

50

<VEGFおよびbFGFを含有する培養液中で培養する工程～工程（５）>

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へVEGFおよびbFGFを添加することにより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、 α 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、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34（Invitrogen）およびこれらの混合培地などが包含される。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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

10

【0061】

本工程において用いられるVEGFの濃度は1~100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、10ng/mlである。

20

【0062】

本工程において用いられるbFGFの濃度は1~100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、5ng/mlである。

【0063】

培養条件について、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、低酸素条件で行われることが望ましい。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（20%）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1%から15%の間の酸素分圧が挙げられ、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%および1%が例示される。より好ましくは、5%である。本工程では、工程の途中で酸素分圧を大気中と同等にて行われていても良い。この場合、特に低酸素条件下で行うことにより心筋細胞の誘導効率に変化がないため上限は特に設けないが、低酸素条件下は、工程の初期の4日以上行われることが好ましい。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。

30

【0064】

培養期間は、長期間培養することにより心筋細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、12日以上培養することが好ましい。例えば、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日または以上が挙げられる。工程（４）で得られた細胞をさらに工程（５）に従って培養することにより、心筋細胞への分化効率が向上する。

40

【0065】

<心疾患治療剤>

本発明で得られた心筋細胞は、動物（好ましくはヒト）の心疾患の治療剤として用いることができる。心疾患の治療方法として、例えば、得られた心筋細胞を生理食塩水等に懸濁させ、患者の心臓の心筋層へ直接投与してもよく、あるいは得られた心筋細胞をシート化して、患者の心臓に貼付することによって行われてもよい。前者の場合、細胞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

50

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。心筋シートを投与する場合、所望の部分を覆うように配置することによって達成される。ここで、所望の部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。配置に際し、所望の部分が大きい場合は、組織を取り巻くように配置してもよい。また、投与は、所望の効果をj得るため、同部分へ数回の配置を行うこともできる。数回の配置を行う場合、所望の細胞が組織へ生着し、血管新生を行うために十分な時間をおいて行うことが望ましい。このような心疾患の治療の機序は、心筋シートの生着により生じる効果であってもよく、あるいは細胞の生着によらない間接的な作用（例えば、誘引物質を分泌することによるレシピエント由来細胞の損傷部位への動員による効果）であってもよい。心疾患の治療において、心筋シートを用いる場合には、心筋細胞に加えて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞足場材料（スキャホールド）を含んでいてもよい。あるいは、心筋細胞の他に、任意の細胞種（複数も可）を含んでいることも可能である。本発明において治療され得る心疾患は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害による欠損等が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0066】

本発明において、心疾患の治療に用いられる心筋細胞の細胞数は、投与される心筋細胞もしくは心筋シートが心疾患の治療において効果を發揮するような量であれば特に限定されるものではなく、患部の大きさや体軀の大きさに合わせて適宜増減して調製されてもよい。

20

【0067】

[実施例]

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0068】

多能性幹細胞

以下の株を用いた。

(1) 201B7株

Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007に記載の方法で作製された。

30

(2) 610B1株

Okita. K, et al., Stem Cells. 2012 Nov 29.に記載の方法に基づき、ヒト臍帯血(理研BRCより入手)にエピソードベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL)を電気穿孔法で遺伝子導入し、マイトマイシン処理したマウス胎仔線維芽細胞フィーダー上で培養することにより、iPS細胞株を作製した。培養は、従来の方法で行った (Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007およびNakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26: 101-6, 2008)。

(3) MYH株

PiggyBacトランスポゾンシステム (System Biosciences, Inc.) を用いて、上記201B7株に、MYH(myosin heavy chain)6プロモーターの下流にEGFPカセットを作動可能に連結したベクターを導入して、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

40

(4) 409B2株

Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)に記載の方法に基づき、HDF1388にpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(5) 427F1株

HDF-1437にpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(6) 606A1株

Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)に記載の方法に基づき、CB CD34#1に

50

pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(7) 610B1株

Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)に記載の方法に基づき、CB CD34#2にpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(8) 457C1株

Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12. (2011)に記載の方法に基づき、DP74にpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

10

(9) 604A1株

Kajiwara et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012) に記載の方法に基づき、PBMN $\alpha \beta$ TにpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(10) 648A1株

Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)に記載の方法に基づき、PBMN #2 non-T, non-BにpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hULを導入し、作製した。培養は、上記と同様の方法で行った。

(11) KhES1株およびKhES3株

ヒトES細胞は、京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターによって樹立されたKhES1株およびKhES3株を用い、従来の方法で培養した (Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006)。

20

【0069】

心筋細胞誘導法 (比較例: 図1A)

分化誘導の3日前(day-3)に201B7細胞株をCollagenase type B溶液 (Roche) で5分処理後、溶液を除去し、続いて0.25% Trypsin-EDTA (invitrogen) で2~3分処理した。PBS溶液 (ナカライテスク) で洗浄後、得られたiPS細胞をセルスクレーパーによって剥離させて回収し、マトリゲルコート6well プレートの1wellに播種し、MEF (マウス胎仔線維芽細胞) 馴化培地 (MEF-CM) で3日間培養した。

【0070】

30

続いて (day0)、Collagenase type B溶液で10分処理後溶液を除去し、続いて0.25% Trypsin-EDTAで1~2分処理した後、セルスクレーパーを用いてiPS細胞を剥離し、1% L-Glutamine (invitrogen)、150 μ g/mL Transferrin (Roche)、50 μ g/mL Ascorbic Acid (sigma)、 3.9×10^{-3} % MTG (1-Thioglycerol) (sigma)、10 μ M Rock inhibitor (Y-27632, Wako) および2ng/mL BMP4 (R&D) を添加したSTEMPRO 34 (invitrogen) を加え、ピペettingで小塊にして低接着6well プレートの1well分に移し、37°C・5%酸素条件下で培養し胚様体 (EB) を作製した。

【0071】

翌日(day1)、EBを遠心分離により回収し、低接着24well プレートの4well分へ移し、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} % MTG、10ng/mL BMP4、5ng/mL bFGF (R&D) および6ng/mL Activin A (R&D) を添加したSTEMPRO 34中で3日間、37°C・5%酸素条件下で培養した。

40

【0072】

続いて (day4)、培地を除去し1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} % MTG、10ng/mL VEGF (R&D) および1 μ M IWP-3 (Stemolecule) を添加したSTEMPRO 34中で、4日間、37°C・5%酸素条件下で培養した。

【0073】

続いて (day8)、培地を除去し1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} % MTG、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEMPRO 34中で、4日間、37°C・5%酸素条件下で培養した。この時、2日に1度同じ条件の培地に交

50

換した。

【0074】

続いて(day12)、通常の酸素濃度のインキュベーターに移し、8日間培養した。この時、2日に1度同じ条件の培地に交換した。

【0075】

培養後(day20)、得られた細胞を評価したところ、cTNTの陽性細胞の含有率は58.6%であった(図1B)。また、day8頃から拍動が認められた。

【0076】

さらに、day4でのIWP-3をIWP-4に変更しても同様の結果が得られた。

【実施例1】

【0077】

改変心筋細胞誘導法

201B7細胞株をCTK solution (ReproCELL) で2分処理後、溶液を除去し、続いてAccumax (Innovative Cell Technologies) で5分処理後、ピペティングによりシングルセルへと解離した。遠心分離により細胞を回収し、1wellあたり2500 cells/wellを低接着96wellディッシュ (Corning) へ播種し、1% L-Glutamine、150 µg/mL Transferrin、50 µg/mL Ascorbic Acid (sigma)、 3.9×10^{-3} %MTG、10 µM Rock inhibitorおよび2ng/mL BMP4 (R&D)、0.50% Matrigel (Growth Factor Reduced) を添加したSTEMPRO 34中、37°C・5%酸素条件下にて培養して、EBを形成させた(day0)。この時、1wellあたり1000cells以下または4000cells以上によりEB細胞を形成させると心筋細胞の誘導効率が下がることが確認された。

【0078】

翌日(day1)、1% L-Glutamine、150 µg/mL Transferrin、50 µg/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、18ng/mL BMP4、10ng/mL bFGFおよび12ng/mL Activin Aを添加したSTEMPRO 34を等量、EBの培養を行っている96wellプレート中に加え、37°C・5%酸素条件下にて3日間培養した。

【0079】

続いて(day4)、得られたEBを自然落下させ培地を除去し、Accumaxを添加し5分後、ピペティングによりシングルセルへと解離し、IMDM (invitrogen) を5ml加え、遠心分離により培地を除去した。10000cells/wellを低接着96wellディッシュ (Corning) へ播種し、1% L-Glutamine、150 µg/mL Transferrin、50 µg/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGFおよび1 µM IWP-3を添加したSTEMPRO 34中で、37°C・5%酸素条件下で、4日間培養した。

【0080】

続いて(day8)、得られたEBを回収し、1wellあたりのEB数が10個を上回らないように24wellディッシュへと移した。1% L-Glutamine、150 µg/mL Transferrin、50 µg/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEMPRO 34中で、4日間、37°C・5%酸素条件下で培養した。この時、2日に1度同じ条件の培地に交換した。

【0081】

続いて(day12)、通常の酸素濃度のインキュベーターに移し、8日間培養した。この時、2日に1度同じ条件の培地に交換した。

【0082】

培養後(day20)、得られた細胞を評価したところ、cTNTの陽性細胞の含有率は82.9%であった(図2B右図)。

【0083】

さらに、day4でのIWP-3をIWP-4に変更しても同様の結果が得られた。また、day4において、5.4 µM SB431542 (sigma) および0.6 µM Dorsomorphin (sigma) をさらに培地へ添加することによっても同様の結果が得られた。

【0084】

10

20

30

40

50

ここで、day4にてシングルセルへの解離を行わず、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGFおよび1 μ M IWP-3を添加したSTEMPRO 34への培地交換のみを行い同様の培養を行ったところ、20日目でのcTNTの陽性細胞の含有率は、69.3%であった（図2B左図）。このことより、day4でのシングルセルへの解離は、心筋細胞の誘導において効率を高めることが確認された。

【実施例2】

【0085】

EBの解離・再凝集の日程の検討（1）

上述した実施例1の改変心筋細胞誘導法において、day4にて行われたシングルセルへの解離と再凝集の日程を変更してその効果を各多能性幹細胞株（201B7株、610B1株および409B2-2株、ならびにKhES1株）で確認した（図3から6）。day1にて、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、18ng/mL BMP4、10ng/mL bFGFおよび12ng/mL Activin Aを添加したSTEMPRO 34中での培養を1日間から5日間まで変更し、得られた細胞の解離・再凝集を行った。つまり、それぞれ、誘導2日目（d2）、2.25日目（d2.25）、2.5日目（d2.5）、2.75日目（d2.75）、3日目（d3）、3.25日目（d3.25）、3.5日目（d3.5）、3.75日目（d3.75）、4.25日目（d4.25）、4.5日目（d4.5）、4.75日目（d4.75）、5日目（d5）又は6日目（d6）にて解離させ、再凝集培養を行った。

【0086】

最終工程である、通常の酸素濃度下で、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEMPRO 34中で、8日間培養後、各細胞をcTNT陽性細胞の含有率で評価した。

【0087】

その結果、201B7株においては、誘導3日目（d3）から4.75日目（d4.75）において解離させ、再凝集培養を行うことで、心筋細胞の含有率が78.5%-87.6%と高効率となることが確認された（図3）。同様に、KhES1株では、2.5日目（d2.5）から4.75日目（d4.75）において解離させ、再凝集培養を行うことで、心筋細胞の含有率が81.9%-94.0%であり（図4）、610B1株では、2.5日目（d2.5）から3.25日目（d3.25）において解離させ、再凝集を行うことで、心筋細胞の含有率が75.1%-83.1%であった（図5）。また、409B2-2株では、2日目（d2）から3日目（d3）において解離させ、再凝集を行うことで、心筋細胞の含有率が80.3%-90.4%であった（図6）。

【0088】

続いて、上述の改変心筋細胞誘導法において、解離操作後の培養工程を除いては同様の方法（以下、IWDS法という）を用いて409B2-2株の分化誘導を行った。IWDS法における解離操作後の培養工程は、下記の通りである。

（day2～6）解離操作後、培地を除去し、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGF（R&D）、1 μ M IWP-3（Stemolecule）、600nM Dorsomorphin及び5.4 μ M SB431542を添加したSTEMPRO 34中で、4日間、37℃・5%酸素条件下で培養した。

【0089】

その結果、409B2-2株においては、誘導5日目（d5）から6日目（d6）において解離させ、再凝集培養を行うことで、心筋細胞の含有率が59.4%-74.7%と高効率となることが確認された（図7）。

【0090】

以上より、上記の改変心筋細胞誘導法（IW）またはIWDS法のいずれかの方法を用いて、誘導2日目（d2）から誘導6日目（d6）の間においてシングルセルへ解離させ、再凝集培養を行うことで、より効率よく心筋細胞を得ることが可能であることが示された。

【0091】

また、本方法は、事前のマトリゲルコートへの播種を行う必要がなく、シングルセルへの解離により細胞数を確定してEB細胞を形成させることで、簡易的に効率よく心筋細胞を

誘導できることが示され、大変有用な方法であることが示唆された。

【実施例 3】

【0092】

EBの解離・再凝集の日程の検討（2）

上述した改変心筋細胞誘導法（IW）およびIWDS法において、day4にて行われたシングルセルへの解離と再凝集の日程を変更して、その効果を各多能性幹細胞株（KhES1株、KhES3株、MYH株、409B2株、427F1株、606A1株、610B1株、457C1株、604A1株および648A1株）で確認した（図8）。day1にて、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、18ng/mL BMP4、10ng/mL bFGFおよび12ng/mLActivin Aを添加したSTEMPRO 34中での培養を1.5日間から5日間まで変更し、得られた細胞の解離・再凝集を行った。すなわち、各細胞株について、誘導2.5日目（d2.5）から6日目（d6）までの工程の間、6時間おきに解離させ、再凝集培養を行った。

10

【0093】

最終工程である、通常の酸素濃度下で、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 3.9×10^{-3} %MTG、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEMPRO 34中で、d15まで培養した後、各細胞をcTNT陽性細胞の含有率で評価した。

【0094】

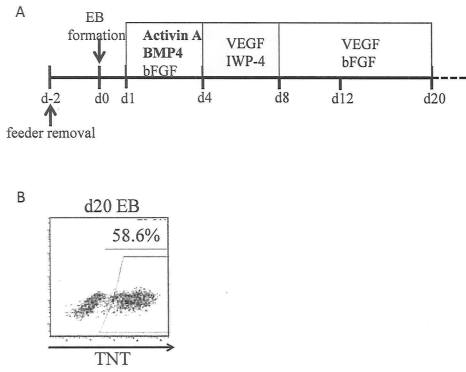
その結果、MYH株、409B2株、606A1株、457C1株およびKhES1株については、IW法ではほぼ全工程にわたって（d2.5～d5）解離させて再凝集培養を行ったときに高効率となり、IWDS法では中段階から比較的遅い段階にかけて（d3.5～d6）解離させて再凝集培養を行ったときに高効率となることが観察された（図8）。一方、427F1株、610B1株、604A1株、648A1株およびKhES3株については、IW法では比較的早い段階（d2.5～d4）で解離させて再凝集培養を行ったときに高効率となり、IWDS法では比較的早い段階から中段階にかけて（d2.5～d4.75）解離させて再凝集培養を行ったときに高効率となることが観察された（図8）。

20

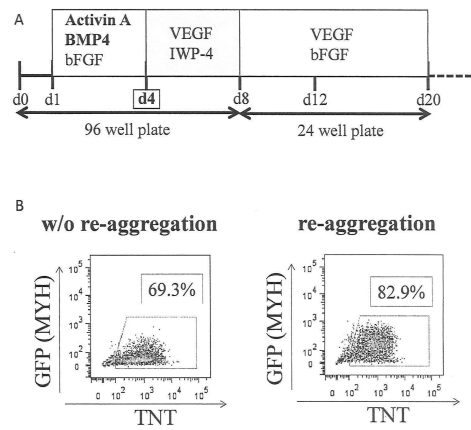
【0095】

以上より、上記の改変心筋細胞誘導法（IW）またはIWDS法のいずれかの方法を用いて、誘導2.5日目（d2.5）から誘導6日目（d6）の間においてシングルセルへ解離させて再凝集培養を行うことで、より効率よく心筋細胞を得ることが可能であることが示された。

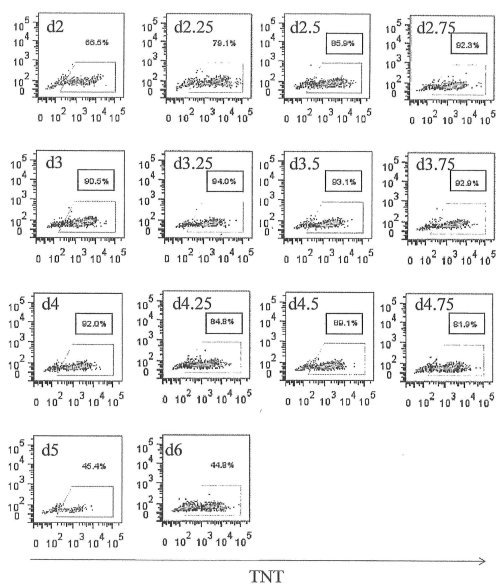
【図 1】



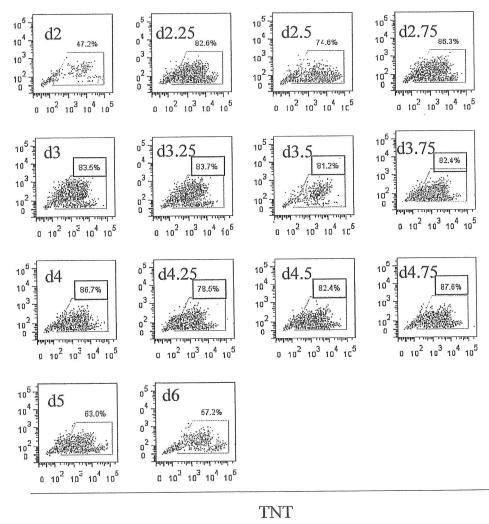
【図 2】



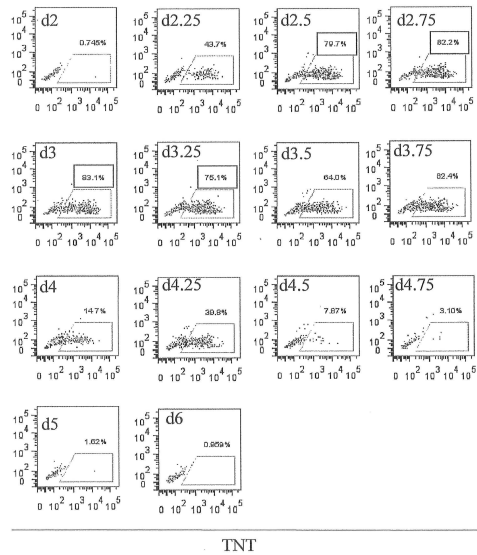
【図 4】



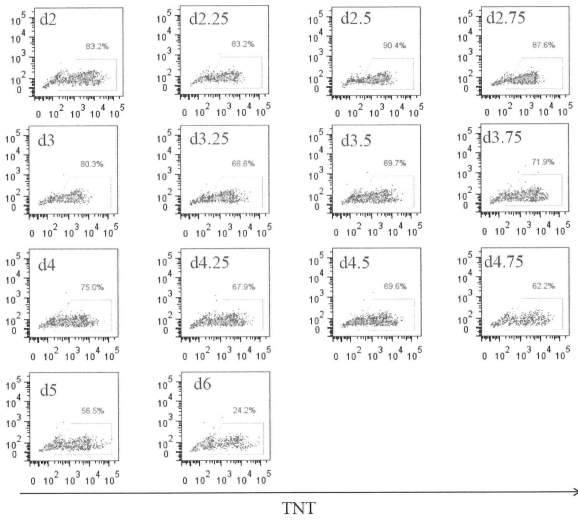
【図 3】



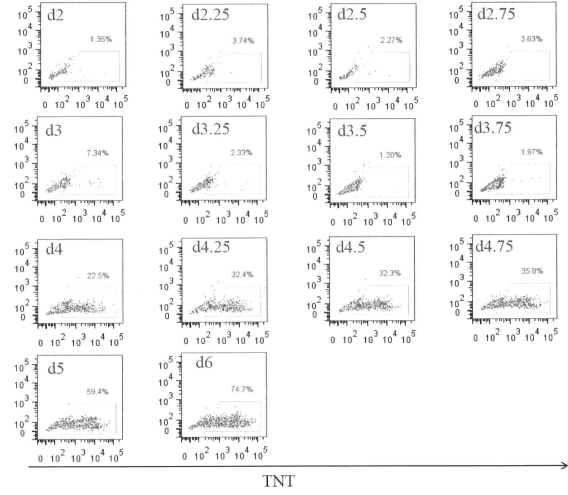
【図 5】



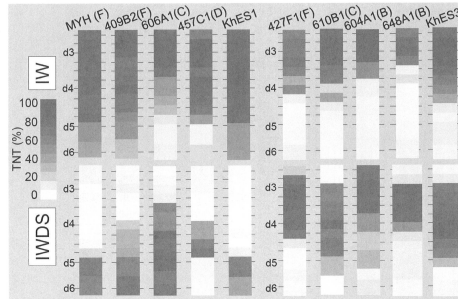
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 L 27/36 (2006.01) A 6 1 L 27/36 1 0 0
A 6 1 K 35/545 (2015.01) A 6 1 K 35/545

(72)発明者 三木 健嗣
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

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2012/024782 (WO, A1)
特表2008-546413 (JP, A)
特表2008-546414 (JP, A)
特表2012-519005 (JP, A)
特表2013-507936 (JP, A)
国際公開第2012/108444 (WO, A1)
nature biotechnology, 2011年, Vol.29, No.11, p.1011-1018
Cell Stem Cell, 2011年 2月 4日, Vol.8, No.2, pp.228-240
J. Biomol. Screen., 2012年 6月, Vol.17, No.5, p.683-691
Circ Res., 2011年, Vol.109, p.360-364
Nature, 2008年 5月22日, Vol.453, No.7194, p.524-528
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2013年 4月30日, Vol.62, p.43-50

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 1/00- 7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS (STN)