

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4613069号
(P4613069)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/0735 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 0 2 C
C 1 2 R 1/91 (2006.01) C 1 2 N 5/00 2 0 2 C
 C 1 2 R 1:91

請求項の数 28 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2004-560155 (P2004-560155)	(73) 特許権者	504127647
(86) (22) 出願日	平成15年12月7日(2003.12.7)		テクニオン リサーチ アンド ディベロ ップメント ファウンデーション リミテ ッド
(65) 公表番号	特表2006-515173 (P2006-515173A)		イスラエル国、ハイファ 32000、テ クニオン シティ、 セネート ハウス
(43) 公表日	平成18年5月25日(2006.5.25)	(74) 代理人	100103816
(86) 国際出願番号	PCT/IL2003/001030		弁理士 風早 信昭
(87) 国際公開番号	W02004/055155	(74) 代理人	100120927
(87) 国際公開日	平成16年7月1日(2004.7.1)		弁理士 浅野 典子
審査請求日	平成18年9月5日(2006.9.5)	(72) 発明者	アマット, ミカル
(31) 優先権主張番号	60/433, 619		イスラエル, 20 142 ミスガヴ, ユヴァリム 261
(32) 優先日	平成14年12月16日(2002.12.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 支持細胞非含有、異種非含有のヒト胚性幹細胞の調製方法およびこれらを使用して調製された幹細胞培養物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を確立する方法であって、

支持細胞を含まず、マトリックスと、トランスフォーミング増殖因子₁ (TGF₁) および塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) が補充された組織培養培地とを含む培養条件のもとでヒト胚性幹細胞を培養し、それにより、支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を得る工程；

を含む方法。

【請求項2】

前記培養条件のもとでヒト胚性幹細胞株から細胞をクローン化する工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

支持細胞を含まない培養条件のもとで、多能性かつ増殖性の未分化状態でヒト胚性幹細胞株を拡大する方法であって、ヒト胚性幹細胞株の細胞を、マトリックスと、TGF₁ およびbFGFが補充された組織培養培地とに基づいて培養し、それにより、ヒト胚性幹細胞株の細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持する工程を含む方法。

【請求項4】

多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる特定の種の異種非含有かつ支持細胞非含有の胚性幹細胞株を確立する方法であって、

支持細胞および異種混入物を含まず、特定の種由来のマトリックスと、 TGF_{α} および $bFGF$ を含む組織培養培地とを含む培養条件のもとで胚性幹細胞を培養し、それにより、異種非含有かつ支持細胞非含有の、特定の種の胚性幹細胞株を得る工程；を含む方法。

【請求項 5】

支持細胞および異種混入物を含まない培養条件のもとで、多能性かつ増殖性の未分化状態で特定の種の胚性幹細胞株を拡大する方法であって、特定の種の胚性幹細胞株の細胞を、特定の種由来のマトリックスと、 TGF_{α} および $bFGF$ を含む組織培養培地とに基づいて培養し、それにより、特定の種の胚性幹細胞株の細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持する工程を含む方法。

10

【請求項 6】

支持細胞を含まない培養条件のもとで、ヒト胚性幹細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持する方法であって、マトリックスと、少なくとも 25 時間の倍加時間を伴って少なくとも 56 回の継代培養にわたって前記幹細胞を維持することができる選択された濃度範囲で提供される TGF_{α} および $bFGF$ を含む組織培養培地とを含む培養条件のもとでヒト胚性幹細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 7】

前記マトリックスが、ヒト由来フィブロネクチン、ヒト由来ラミニン、包皮繊維芽細胞マトリックス、および MEF マトリックスからなる群から選択される請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記マトリックスがフィブロネクチンマトリックスである請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記フィブロネクチンが、ウシフィブロネクチン、組換えウシフィブロネクチン、ヒトフィブロネクチン、組換えヒトフィブロネクチン、マウスフィブロネクチン、組換えマウスフィブロネクチン、および合成フィブロネクチンからなる群から選択される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記培養条件が異種混入物を含まず、前記マトリックスが、ヒト血漿フィブロネクチンマトリックス、組換えヒト血漿フィブロネクチンマトリックス、ヒト細胞フィブロネクチンマトリックス、組換えヒト細胞フィブロネクチンマトリックス、および合成フィブロネクチンからなる群から選択される請求項 1, 2, 3 または 6 に記載の方法。

30

【請求項 11】

ヒト胚性幹細胞株が少なくとも 85% の未分化ヒト胚性幹細胞を含む請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ヒト胚性幹細胞株の細胞が少なくとも 25 時間の倍加時間を維持する請求項 1, 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記組織培養培地が血清および / または血清代替物をさらに含む請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記血清および / または前記血清代替物が少なくとも 10% の濃度で提供される請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 TGF_{α} が少なくとも 0.06 ng/ml の濃度で提供される請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 $bFGF$ が少なくとも 2 ng/ml の濃度で提供される請求項 1 ~ 6 のいずれか一

50

項に記載の方法。

【請求項 17】

前記培地が白血病阻害剤因子 (LIF) をさらに補充されている請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 LIF が少なくとも 500 u / ml の濃度で提供される請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記組織培養培地が特定の種由来の血清および / または血清代替物を含む請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 20】

未分化で、多能性かつ増殖性のヒト胚性幹細胞を培養培地に含む細胞培養物であって、前記培養培地が TGF₁ および bFGF を含み、前記細胞培養物が異種混入物および / または支持細胞の混入物を含まない細胞培養物。

【請求項 21】

培養培地が血清代替物を含む請求項 20 に記載の細胞培養物。

【請求項 22】

前記培養培地が LIF をさらに含む請求項 20 または 21 に記載の細胞培養物。

【請求項 23】

マトリックスおよび組織培養培地を含む異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムであって、前記組織培養培地が TGF₁ および bFGF を含み、前記培養システムが、この培養システムで培養されたヒト胚性幹細胞を増殖性かつ多能性の未分化状態で維持することができるように選択される異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システム。

【請求項 24】

前記マトリックスがヒト由来のフィブロネクチンである請求項 23 に記載の培養システム。

【請求項 25】

前記組織培養培地が血清代替物を含む請求項 23 または 24 に記載の培養システム。

【請求項 26】

前記培養培地が LIF をさらに含む請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載の培養システム。

【請求項 27】

細胞置換および / または組織再生用医薬品の製造のための、異種混入物および支持細胞を含まないヒト胚性幹細胞調製物の使用であって、前記ヒト胚性幹細胞調製物が、支持細胞および異種混入物を含まず、ヒト由来のフィブロネクチンマトリックスと、TGF₁ および bFGF が補充された組織培養培地とを含む培養条件のもとでヒト胚性幹細胞を培養することによって調製される使用。

【請求項 28】

前記培養条件が、15% の濃度の血清代替物、0.12 ng / ml の濃度の TGF₁、1000 u / ml の濃度の LIF、および 4 ng / ml の濃度の bFGF を含む請求項 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、支持細胞 (例えば、支持細胞層 (feeder cell layer)、支持細胞層 (feeder layer) としても知られている) を含まず、異種を含まない培養システムを使用するヒト胚性幹細胞株を調製する方法、および、異種混入物および支持細胞を含まない培養において多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる幹細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

胚性幹細胞（ESC）は全能性であるので、任意のタイプの細胞に発達し、また、完全な生物体を含めて任意のタイプの組織または器官または身体部分を生じさせる潜在的能力を有している。そのため、正常なクローン性ヒトESCを要求に応じて提供することができ、かつ、その分化を操作することができることは、生物医学分野、産業分野および科学分野における根本的な進歩の原動力となり得る強力なツールを提供することが予想される。ESCの潜在的な用途は広範囲にわたっており、それらには、薬物の発見および試験、移植において使用される細胞、組織および器官の作製、生体分子の製造、化合物の毒性および/または催奇性の試験、ならびに、発達プロセスおよび他の生物学的プロセスの研究の促進が含まれる。例えば、ESCまたはESC由来細胞の治療的移植によって処置可能であることが現在期待される疾患には、パーキンソン病、心筋梗塞、若年性糖尿病および白血病が含まれる（Gearhart, J., Science, 1998, 282: 1061; RossantおよびNagy, Nature Biotech., 1999, 17: 23）。

10

【0003】

しかしながら、ヒトESCの実用的な利用に重大な障害がある。

【0004】

ヒトESCを未分化状態で維持するためには、ES培養物は、細胞増殖を維持し、ES細胞の分化を阻害し、多能性を持続させる因子が補充されなければならない。

【0005】

また、細胞置換治療および組織再生治療の場合、ヒトESCは、完全な動物非存在の環境で、かつ、ES培養物の完全な再生産を可能にする十分に規定された培養条件の存在下で培養されなければならない。

20

【0006】

現在実用化されているES培養方法は、主に、幹細胞の増殖のために必要とされる因子を分泌し、一方で同時に、その分化を阻害する支持細胞層の使用に基づいている。支持細胞非含有システムもまた、ES細胞の培養において使用されており、そのようなシステムでは、支持細胞層の代替物として、血清、サイトカインおよび増殖因子が補充されたマトリックスが利用されている。

【0007】

支持細胞層に基づく培養

30

マウス支持細胞層 - ES細胞を培養するための最も一般的な方法は、ES細胞の増殖および多能性を助ける、血清または白血病阻害因子（LIF）を含有する組織培養培地が補充された支持細胞層としてのマウス胚性繊維芽細胞（MEF）に基づいている [Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998)、ヒト胚盤胞に由来する胚性幹細胞株、Science, 282: 1145~7; Reubinoff BE, Pera MF, Fong C, Trounson A, Bongso A (2000)、ヒト胚盤胞由来の胚性幹細胞株：インビトロでの体細胞分化、Nat. Biotechnol., 18: 399~404]。MEF細胞は、ウシ胎児血清が補充された培地における12日齢~13日齢のマウス胚から得られる。これらの条件のもとで、マウスES細胞は、その表現型および機能的特徴を維持させながら、多能性幹細胞として培養状態で維持することができる。しかしながら、マウスES細胞とは異なり、外部から添加されたLIFの存在下では、ヒトES細胞の分化は妨げられない（Thomson他、1998、Science、282：1145~7；Reubinoff他、2000、Nat. Biotechnol.、18：399~404）。さらに、支持細胞の使用は製造費用を実質的に増大させ、ヒトES細胞培養の規模拡大を実施不可能にする。また、支持細胞は、支持細胞が幹細胞を成長させないために代謝的に不活性化されており、従って、ヒトES培養のそれぞれの分割のために新鮮な支持細胞を有することが必要である。現在、大量培養で調製された胚細胞からの支持細胞成分の分離は効率的に達成することができないので、支持細胞層で調製されたES培養物はヒト治療に

40

50

は適していない。

【0008】

ES細胞はまた、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)が補充された血清代替物を使用する血清非含有状態のもとで、MEF上で培養することができる[Amit M、Carpenter MK、Inokuma MS、Chiu CP、Harris CP、Waknitz MA、Itskovitz-Eldor J、Thomson JA(2000)、クローン的に得られたヒト胚性幹細胞株は多能性および増殖能を長期間の培養にわたって維持する、Dev. Biol.、227:271~8]。これらの条件のもとでは、ES細胞のクローン化効率は、ウシ胎児血清の場合よりも4倍多い。また、血清代替物のもとでの6ヶ月の培養の後、ES細胞は、胚の3つの胚葉のすべてを含有する奇形腫を形成するその能力によって示されるように、その多能性を依然として維持している。このシステムでは、より良好に規定された培養条件が使用されるが、培養におけるマウス細胞の存在により、ヒト培養物は、細胞に基づく治療におけるその使用を制限する病原体にさらされる。

10

【0009】

支持細胞層としてのヒト胚性繊維芽細胞または成人ファロピウス管上皮細胞 - ヒトES細胞は、ヒト胚性繊維芽細胞または成人ファロピウス管上皮細胞を使用して成長させ、かつ維持することができる。これらのヒト支持細胞上で成長したとき、ヒトES細胞は正常な核型を示し、アルカリホスファターゼ活性を与え、Oct-4および他の胎児性細胞表面マーカー(これには、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60およびGCTM-2が含まれる)を発現し、奇形腫をインビボで形成し、かつ、すべての重要な形態学的特徴を保持する[Richards M、Fong CY、Chan WK、Wong PC、Bongsso A(2002)、ヒト支持細胞はヒトの内部細胞塊および胚性幹細胞の長期にわたる未分化成長を助ける、Nat. Biotechnol.、20:933~6]。しかしながら、ヒト胚性繊維芽細胞または成人ファロピウス管上皮細胞を支持細胞として使用することの大きな欠点は、これらの細胞株はともに8回~10回にすぎない限定された継代培養能力を有し、それにより、長期にわたるES成長期間の能力を制限しているということである。長期にわたる培養期間の場合、ES細胞は、数人に由来するヒト支持細胞において成長させなければならない、このことは、培養条件における変動性の増大をもたらす。

20

30

【0010】

包皮支持細胞層 - ヒトES細胞は、米国特許出願第10/368045号に開示されるようにヒト包皮支持細胞層上で培養することができる。包皮由来の支持細胞層は、ヒトES細胞を培養するために好適な完全な動物非存在の環境からなる。また、包皮細胞は、その誘導以降、42回の継代培養の長きにわたって培養状態で維持することができ、これにより、ES細胞には比較的一定の環境が提供される。これらの条件のもとでは、ヒトES細胞は、代替りのプロトコル(例えば、MEF)を用いて成長させた細胞と機能的に異なっていることが見出された。分化後、ES細胞は、インビトロでは、胚の3つの胚葉のすべてに関連する遺伝子を発現し、インビボでは、3つの胚葉のすべてから生じる組織からなる奇形腫を形成した。また、ヒトファロピウス管上皮細胞またはヒト胚性繊維芽細胞とは異なり、包皮支持細胞層において培養されたヒトES細胞は、少なくとも87回の継代培養にわたって多能性の未分化状態で培養において維持された。しかしながら、包皮細胞は長期間(すなわち、42回の継代培養)にわたって培養状態で維持することができるが、包皮培養システムは、異なるバッチ間での違いのために十分に規定されていない。また、ヒト支持細胞層に基づく培養システムでは、支持細胞層およびhES細胞の両方の同時成長が依然として要求される。従って、様々な支持細胞非含有培養システムが開発されている。

40

【0011】

支持細胞非含有培養

幹細胞は、培養培地の存在下、細胞外マトリックス(例えば、Matrigel^{RTM})

50

またはラミニン)などの固体表面において成長させることができる。支持細胞および幹細胞の同時成長が要求され、また、混合された細胞集団をもたらす得る支持細胞型培養とは異なり、支持細胞非含有システムで成長した幹細胞は表面から容易に分離される。幹細胞を成長させるために使用される培養培地は、分化を効果的に阻害し、その成長を促進させる因子(例えば、MEF馴化培地およびbFGFなど)を含有する。しかしながら、一般に使用されている支持細胞非含有培養システムでは、マウス血清もしくはウシ血清またはMEF馴化培地が補充された動物系マトリックス(例えば、Matrigel^{RTM})が利用されており[Xu C他(2001)、未分化ヒト胚性幹細胞の支持細胞非含有成長、Nat Biotechnol、19:971~4]、これらは、ヒトES細胞に対する動物病原体の交差転移の危険性をもたらす、従って、将来の臨床的適用を危うくする。

10

【0012】

米国特許出願第10/368045号にさらに開示されるように、幹細胞は、包皮由来の馴化培地が補充されたマトリックス表面において培養することができる。しかしながら、この培地は、動物非存在システムを提供しているが、培養組成の点では未だに十分に規定されていない。

【0013】

より規定された培養組成においてヒト胚性幹細胞を培養する最近の試みでは、Matrigelまたはラミニンの表面および増殖因子の混合物が利用された。しかしながら、米国特許出願第20030017589号に開示されるように、これらの条件のもとでは、細胞の50%~70%のみが未分化細胞の形態学を示しただけであった。また、幹細胞はさらに、19時間の比較的短い倍加時間を示した。このことは、幹細胞が腫瘍形成性になったことを示唆している(Amit他、2000、Dev. Biol.、227:271~8を参照のこと)。

20

【0014】

従って、ヒトES細胞を増殖性かつ多能性の未分化状態で維持することができる、上記の制限を有しない支持細胞非含有かつ異種非含有の培養システムが必要であることが広く認識されており、従って、そのような培養システムを有することは非常に好都合である。

【発明の開示】

【0015】

本発明の1つの態様によれば、多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を確立する方法であって、(a)ヒト胚性幹細胞を得ること、および(b)支持細胞を含まず、マトリックスと、TGF₁、bFGFおよび/またはLIFが補充された組織培養培地とを含む培養条件のもとで前記ヒト胚性幹細胞を培養し、それにより、支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を得ることを含む方法が提供される。

30

【0016】

記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、この方法は、前記培養条件のもとでの工程(b)から得られるヒト胚性幹細胞株から細胞をクローン化することをさらに含む。

【0017】

本発明の別の態様によれば、支持細胞を含まない培養条件のもとで、多能性かつ増殖性の未分化状態でヒト胚性幹細胞株を拡大する方法であって、ヒト胚性幹細胞株の細胞を、マトリックスと、TGF₁、bFGFおよび/またはLIFが補充された組織培養培地とに基づいて培養し、それにより、ヒト胚性幹細胞株の細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することを含む方法が提供される。

40

【0018】

本発明のさらに別の態様によれば、多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を確立する方法であって、(a)ヒト胚性幹細胞を得ること、および(b)支持細胞を含まず、フィブロネクチンマトリックスと、TGF₁、bFGFおよび/またはLIFが補充された組織培養培地とを含む培養条件のもと

50

で前記ヒト胚性幹細胞を培養し、それにより、支持細胞非含有のヒト胚性幹細胞株を得ることを含む方法が提供される。

【0019】

本発明のなお別の態様によれば、支持細胞を含まない培養条件のもとで、多能性かつ増殖性の未分化状態でヒト胚性幹細胞株を拡大する方法であって、ヒト胚性幹細胞株の細胞を、フィブロネクチンマトリックスと、TGF β ₁、bFGFおよび/またはLIFが補充された組織培養培地とに基づいて培養し、それにより、ヒト胚性幹細胞株の細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することを含む方法が提供される。

【0020】

本発明のさらなる態様によれば、多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる特定の種の異種非含有かつ支持細胞非含有の胚性幹細胞株を確立する方法であって、(a)胚性幹細胞を得ること、および(b)支持細胞および異種混入物を含まず、種由来のマトリックスと、組織培養培地とを含む培養条件のもとで前記胚性幹細胞を培養し、それにより、異種非含有かつ支持細胞非含有の、特定の種の胚性幹細胞株を得ることを含む方法が提供される。

10

【0021】

本発明のさらにさらなる態様によれば、支持細胞および異種混入物を含まない培養条件のもとで、多能性かつ増殖性の未分化状態で特定の種の胚性幹細胞株を拡大する方法であって、特定の種の胚性幹細胞株の細胞を、種由来のマトリックスと、組織培養培地とに基づいて培養し、それにより、特定の種の胚性幹細胞株の細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することを含む方法が提供される。

20

【0022】

本発明のさらなる態様によれば、未分化で、多能性かつ増殖性のヒト胚性幹細胞を培養培地を含む細胞培養物が提供され、この場合、細胞培養物は異種および/または支持細胞の混入物を実質的に含まない。

【0023】

本発明のさらなる態様によれば、マトリックスおよび組織培養培地を含む異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムが提供され、この場合、この異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムは、この培養システムで培養されたヒト胚性幹細胞を増殖性かつ多能性の未分化状態で維持することができるように選択される。

30

【0024】

本発明のさらにさらなる態様によれば、細胞置換および/または組織再生を必要としている個体を処置する方法であって、異種および支持細胞の混入物を含まないヒト胚性幹細胞調製物を個体に投与することを含む方法が提供される。

【0025】

記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、この方法は、ヒト胚性幹細胞調製物を投与前に調製することを含み、この場合、調製は、(a)ヒト胚性幹細胞を得ること、および(b)支持細胞および異種混入物を含まず、ヒト由来のフィブロネクチンマトリックスと、TGF β ₁、bFGFおよび/またはLIFが補充された組織培養培地とを含む培養条件のもとで前記ヒト胚性幹細胞を培養し、それによりヒト胚性幹細胞調製物を調製することによって達成される。

40

【0026】

本発明のなおさらなる態様によれば、支持細胞を含まない培養条件のもとで、ヒト胚性幹細胞を多能性かつ増殖性の未分化状態で維持する方法であって、マトリックスと、少なくとも25時間の倍加時間を伴って少なくとも56回の継代培養にわたって幹細胞を維持することができる選択された濃度範囲で提供される少なくとも1つの増殖因子が補充された組織培養培地とを含む培養条件のもとでヒト胚性幹細胞を培養することを含む方法が提供される。

【0027】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、マトリックスはフィ

50

プロネクチンマトリックスである。

【0028】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、フィブロネクチンは、ウシフィブロネクチン、組換えウシフィブロネクチン、ヒトフィブロネクチン、組換えヒトフィブロネクチン、マウスフィブロネクチン、組換えマウスフィブロネクチン、および合成フィブロネクチンからなる群から選択される。

【0029】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、培養条件は異種混入物を実質的に含まず、一方、マトリックスは、ヒト血漿フィブロネクチンマトリックス、組換えヒト血漿フィブロネクチンマトリックス、ヒト細胞フィブロネクチンマトリックス、組換えヒト細胞フィブロネクチンマトリックス、および合成フィブロネクチンからなる群から選択される。

10

【0030】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ヒト胚性幹細胞株は少なくとも85%の未分化ヒト胚性幹細胞を含む。

【0031】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ヒト胚性幹細胞株の細胞は少なくとも25時間の倍加時間を維持する。

【0032】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、組織培養培地はさらに血清および/または血清代替物を含む。

20

【0033】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、血清および/または血清代替物は少なくとも10%の濃度で提供される。

【0034】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、血清および/または血清代替物は15%の濃度で提供される。

【0035】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、TGF β_1 は少なくとも0.06 ng/mlの濃度で提供される。

30

【0036】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、TGF β_1 は0.12 ng/mlの濃度で提供される。

【0037】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、bFGFは少なくとも2 ng/mlの濃度で提供される。

【0038】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、bFGFは4 ng/mlの濃度で提供される。

【0039】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、LIFは少なくとも500 u/mlの濃度で提供される。

40

【0040】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、LIFは1000 u/mlの濃度で提供される。

【0041】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、マトリックスは種由来のフィブロネクチンマトリックスである。

【0042】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、支持細胞非含有の培

50

養条件は異種混入物を実質的に含まない。

【0043】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、特定の種の胚性幹細胞株の細胞は少なくとも20時間の倍加時間を維持する。

【0044】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、組織培養培地は種由来の血清および/または血清代替物を含む。

【0045】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、種由来の血清は少なくとも5%の濃度で提供される。

10

【0046】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、組織培養培地は少なくとも1つの増殖因子をさらに含む。

【0047】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、少なくとも1つの増殖因子は、TGF₁、bFGF、LIFからなる群から選択される。

【0048】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、組織培養培地は種由来の馴化培地である。

【0049】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ヒト胚性幹細胞株は、少なくとも38回目の継代培養について多能性かつ増殖性の未分化状態で維持可能である。

20

【0050】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、TGF₁は0.06 ng/ml ~ 0.24 ng/mlの濃度範囲で提供される。

【0051】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、bFGFは2 ng/ml ~ 8 ng/mlの濃度範囲で提供される。

【0052】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、LIFは500 u/ml ~ 2000 u/mlの濃度範囲で提供される。

30

【0053】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、培養条件は、15%の濃度での血清代替物、0.12 ng/mlの濃度でのTGF₁、1000 u/mlの濃度でのLIF、および4 ng/mlの濃度でのbFGFを含む。

【0054】

本発明は、支持細胞非含有かつ異種非含有の培養システムを使用してヒト胚性幹細胞株を確立および拡大する方法、異種混入物および支持細胞を含まない培養において多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができる幹細胞を提供することによって、現在知られている形態の欠点に対処することに成功している。

40

【0055】

別途定義されない場合、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と同様または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。また、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定することは意図されない。

【0056】

図面の簡単な記述

50

本発明は、例としてだけであるが、添付されている図面を参照して、本明細書中に記載される。次に図面を詳しく具体的に参照して、示されている細目は、例としてであり、また、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論のためのものであり、従って、本発明の原理および概念的態様の最も有用かつ容易に理解された記述であると考えられるものを提供するために示されていることが強調される。これに関して、記述を図面と一緒に理解することにより、本発明のいくつかの形態が実際にどのように具体化され得るかが当業者には明らかになるので、発明の構造的詳細を、発明の基本的な理解のために必要であるよりも詳細に示すことは試みられていない。

図1 a ~ 図1 d は、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したES細胞コロニーおよび単一ES細胞を例示する顕微鏡写真である。血清代替物および様々な組合せの増殖因子の存在下でフィブロネクチン上で成長した様々なES細胞株の明視野像が示される。図1 a - 31回の継代培養にわたってTGF β ₁、LIFおよびbFGF (TLF)の存在下で成長したI-6 ES細胞株 (サイズバーは100 μ Mを表す) ; 図1 b - 21回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3 ES細胞株 (サイズバーは50 μ Mを表す) ; 図1 c - 31回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-6 ES細胞株 (サイズバーは50 μ Mを表す) ; 図1 d - 20回の継代培養にわたってTGF β ₁およびbFGF (TF)において成長したI-3 ES細胞株 (サイズバーは38 μ Mを表す)。細胞間の間隔 (図1 a ~ 図1 c) およびヒトES細胞に典型的な大きい核対細胞質比率 (図1 d) に留意すること。図1 e ~ 図1 h は、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したヒトI-3 ES細胞株およびI-6 ES細胞株における未分化細胞に典型的な表面マーカーの発現を例示する免疫組織化学顕微鏡写真である。17回の継代培養にわたってTFの存在下で成長し、抗SSEA4抗体で標識されたヒトES細胞 (系統I-3) の蛍光像 (図1 e、サイズバーは50 μ Mを表す) ; 38回の継代培養にわたってTLFの存在下で成長し、抗SSEA4抗体で標識されたI-3 ES細胞の蛍光像 (図1 f、サイズバーは6 μ Mを表す) ; 30回の継代培養にわたってTLFの存在下で成長し、抗TRA-60抗体で標識されたI-6 ES細胞の蛍光像 (図1 g、サイズバーは6 μ Mを表す) ; 21回の継代培養にわたってTFの存在下で成長し、抗TRA-81抗体で標識されたI-3 ES細胞の蛍光像 (図1 h、サイズバーは6 μ Mを表す) が示される。蛍光像は、倒立型蛍光顕微鏡 (図1 e) または共焦点顕微鏡 (図1 f ~ 図1 h) のいずれかを使用して記録された。

図2 a ~ 図2 c は、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したhES細胞のインビトロ分化を例示する。支持細胞非含有システムで成長した細胞に由来するEBの組織学的断面が示される。図2 a - TFにおいて28回の継代培養にわたって成長した後のI-3細胞株に由来する24時間経た純然たるEB (サイズバーは100 μ Mを表す) ; 図2 b - TFにおいて28回の継代培養にわたって成長したI-3細胞株に由来する14日齢のEB (サイズバーは50 μ Mを表す) ; 図2 c - TLFにおいて30回の継代培養にわたって成長した細胞株I-3に由来する14日齢のEB (サイズバーは25 μ Mを表す)。EBの外側の保護的上皮 (図2 b、矢印)、および間葉組織によって取り囲まれる柱状上皮からなるボール様構造 (図2 c) に留意すること。図2 d ~ 図2 f は、本発明の支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおける様々な培地において成長したES細胞から形成された14日齢のEBに由来する細胞における中胚葉および外胚葉の代表的なマーカーの発現を例示する。様々なES細胞株に由来するEB細胞が様々な抗体プローブで蛍光免疫染色された。図2 d - 22回の継代培養にわたってTLFにおいて成長し、神経特異的チューブリンに対する抗体を使用して免疫染色されたI-6細胞株 (サイズバーは6 μ Mを表す)。図2 e - 30回の継代培養にわたってTLFにおいて成長し、平滑筋アクチンに対する抗体を使用して免疫染色されたI-3細胞株 (サイズバーは6 μ Mを表す)。図2 f - 28回の継代培養にわたってTFにおいて成長し、CD31に対する抗体を使用して免疫染色されたI-3細胞株 (サイズバーは6 μ Mを表す)。

図3は支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したI-3ES細胞またはI-6ES細胞の分化段階およびそれらに由来する胚様体(EB)の分化段階のRT-PCR決定を例示する。RT-PCR反応が、I-3ES細胞、I-6ES細胞、またはそれらに由来するEBから抽出されたRNAサンプルに対して行われた。レーン1-19回の継代培養にわたってTFにおいて成長したI-3ES細胞;レーン2-20回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞;レーン3-23回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン4-28回の継代培養にわたってTFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン5-30回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン6-29回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン7-22回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-6ES細胞に由来する14日齢のEB。反応の特異性がRNAの非存在下で確認された(図3、レーン8)。レーン3~6のEBサンプルはI-3ES細胞の4つの異なるバッチに由来したことに留意すること。

10

図4a~図4cは、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスでのTLFにおいてそれぞれ26回および19回の継代培養にわたって成長したI-3ES細胞株およびI-6ES細胞株に由来する奇形腫の組織学的断面を例示する。奇形腫の断面には、有髄神経(図4a)、ヒアリン軟骨の細部(図4b)、および、杯細胞が多い分泌上皮(図4c)が含まれる。サイズバーは25μMを表す。

図5a~図5cは、支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したES細胞コロニーを例示する形態学顕微鏡写真である。血清代替物および増殖因子のTF組合せの存在下で22回の継代培養にわたってヒト細胞フィブロネクチンにおいて成長したI-3ES細胞株の明視野像が示される。図5d~図5fは、支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したヒトI-3ES細胞株およびヒトH-9ES細胞株における未分化細胞に典型的な表面マーカーの発現を例示する免疫組織化学顕微鏡写真である。16回の継代培養にわたってTFの存在下でヒト細胞フィブロネクチンにおいて培養され、抗TRA-1-60抗体(図5d)または抗TRA-1-81抗体(図5e)で標識されたヒトI-3ES細胞株の明視野像、ならびに、10回の継代培養にわたってTLFの存在下でヒト血漿フィブロネクチンにおいて培養され、抗SSEA4抗体で標識されたヒトH-9ES細胞株の明視野像(図5f)が示される。

20

30

図6a~図6cは、異種非含有かつ支持細胞非含有の状態のもとでヒトフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したhES細胞のインビトロ分化を例示する。様々な培養条件のもとで成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEBの像が示される。図6a-17回の継代培養にわたるTLF増殖因子の存在下におけるヒト細胞フィブロネクチンマトリックス;図6b-17回の継代培養にわたるTF増殖因子の存在下におけるヒト細胞フィブロネクチンマトリックス;図6c-16回の継代培養にわたるTLF増殖因子の存在下におけるヒト血漿フィブロネクチンマトリックス。

図7は支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したI-3細胞の分化段階およびそれに由来する胚様体(EB)の分化段階のRT-PCR決定を例示する。RT-PCR反応が、I-3ES細胞またはそれに由来するEBから抽出されたRNAサンプルに対して行われた。レーン1-22回の継代培養にわたってTFにおいて成長したI-3ES細胞;レーン2-18回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞;レーン3-17回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞;レーン4-17回の継代培養にわたってTFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン5-17回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB;レーン6-16回の継代培養にわたってTLFにおいて成長したI-3ES細胞に由来する14日齢のEB。反応の特異性がRNAの非存在下で確認された(図7、レーン7)。

40

図8a~図8cは、様々な培養条件のもとでのI-3hES細胞株の成長速度(図8a

50

)、I - 6 h E S 細胞株の成長速度 (図 8 b) および H - 9 h E S 細胞株の成長速度 (図 8 c) を例示する。ウシフィブロネクチンマトリックスにおいて、増殖因子の T L F 組合せの存在下で培養されたときの、I - 3 h E S 細胞株、I - 6 h E S 細胞株および H - 9 h E S 細胞株の成長速度 (それぞれ、図 8 a、図 8 b および 図 8 c、ピンク色曲線)、または T F 組合せの存在下で培養されたときのそれらの成長速度 (それぞれ、図 8 a、図 8 b および 図 8 c、黒色曲線)、あるいは、ヒトフィブロネクチンマトリックスにおいて、増殖因子の T F 組合せの存在下で培養されたときのそれらの成長速度 (それぞれ、図 8 a、図 8 b および 図 8 c、明青色曲線)、または M E F 支持細胞上で培養されたときのそれらの成長速度 (それぞれ、図 8 a、図 8 b および 図 8 c、暗青色の曲線) が示される。図 8 d は、未分化 h E S 細胞の成長を助ける様々な培養条件の能力を例示する棒グラフである。ヒト E S 細胞が下記の培養条件のもとで培養された: マウス胚性繊維芽細胞 (M E F)、T G F、L I F および b F G F の存在下でのウシフィブロネクチン (T L F B F)、T G F、L I F および b F G F の存在下でのヒトフィブロネクチン (T L F H F)、T G F および b F G F の存在下でのウシフィブロネクチン (T F B F)、T G F および b F G F の存在下でのヒトフィブロネクチン (T F H F)、L I F および T G F の存在下でのウシフィブロネクチン (L T)、L I F および b F G F の存在下でのウシフィブロネクチン (L F)、T G F だけの存在下でのウシフィブロネクチン (T)、ならびに、b F G F だけの存在下でのウシフィブロネクチン (F)。未分化細胞の百分率が 2 日ずつ延ばして測定された。

10

図 9 a ~ 図 9 f は、様々な条件のもとでの支持細胞非含有システムで成長したヒト E S 細胞およびヒト E S 細胞コロニーを例示する。支持細胞非含有システムで成長した様々な E S 細胞株の明視野像が示される。図 9 a - 5 回の継代培養にわたって T L F の存在下で包皮マトリックスにおいて成長した I - 6 細胞株 (サイズバーは 7 5 μ M を表す) ; 図 9 b - M E F 馴化培地の存在下で 1 2 回の継代培養にわたって M a t r i g e l ^{R T M} において成長した I - 3 . 2 細胞株 (サイズバーは 5 0 μ M を表す) ; 図 9 c - 数回の継代培養にわたって T L F の存在下で M E F マトリックスにおいて成長した I - 6 細胞株 (サイズバーは 7 5 μ M を表す) ; 図 9 d - T F の存在下で 2 1 回の継代培養にわたってフィブロネクチンにおいて成長した I - 3 細胞株 (サイズバーは 5 0 μ M を表す) ; 図 9 e - T L F の存在下で 1 2 回の継代培養にわたって M a t r i g e l ^{R T M} において成長した I - 6 細胞株 (サイズバーは 7 5 μ M を表す) ; 図 9 f - 2 0 回の継代培養にわたってフィ

20

30

ブロネクチンにおいて成長した I - 3 細胞株 (サイズバーは 3 8 μ M を表す)。図 1 0 a ~ 図 1 0 f は、フィブロネクチン (図 1 0 a および 図 1 0 b)、M E F マトリックス (図 1 0 c、図 1 0 e および 図 1 0 f) または M a t r i g e l ^{R T M} (図 1 0 d) において成長した I - 6 E S 細胞株および I - 3 E S 細胞株に由来する S C I D ベージュマウスにおける奇形腫の組織学的断面を例示する。奇形腫の断面はヘマトキシリン & エオシンで染色され、断面には、杯細胞を含む腸様上皮 (図 1 0 a)、成熟した軟骨組織 (図 1 0 b および 図 1 0 c)、胚筋管 (図 1 0 d)、層状上皮 (図 1 0 e) および有髄神経 (図 1 0 f) が含まれる。サイズバーは 4 0 μ M を表す。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 5 7 】

40

本発明は、支持細胞非含有かつ異種非含有の培養条件を用いてヒト胚性幹細胞株を確立および拡大する方法に関する。本発明はさらに、異種混入物を含まず、また、培養において多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができ、従って、ヒト治療のための非常に好適であるヒト胚性幹細胞株に関する。

【 0 0 5 8 】

本発明に従って、支持細胞および異種の混入物を含まないヒト胚性幹細胞株を調製する方法の原理および操作は、図面および付随する記述を参照してより良く理解することができる。

【 0 0 5 9 】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用におい

50

て、下記の説明において示される細部、または実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施することが可能であり、または様々な方法で実施される。また、本明細書中で用いられる表現法および用語法は記述のためであり、限定であるとして見なしてはならないことを理解しなければならない。

【0060】

ヒトES細胞を未分化状態で維持するために、ES培養では、細胞増殖を維持し、ES細胞の分化を阻害し、かつ多能性を持続させる条件を細胞に提供しなければならない。そのような培養条件は、典型的には、幹細胞の増殖のために必要とされる因子を分泌し、一方

10

【0061】

支持細胞層の使用に関連する制限（例えば、支持細胞の混入および規定されていない培養システムなど）に対抗するために、より規定された支持細胞非含有培養システムが開発されている。支持細胞非含有培養システムでは、ES細胞が接着するマトリックスと、細胞増殖のために必要とされるサイトカインおよび増殖因子をES細胞に提供し、一方で同時に、細胞分化を阻害する培養培地とが用いられる。

【0062】

一般に使用されているマトリックスには、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出された基底膜調製物（例えば、Matrigel^{RTM}）、またはウシのフィブロネクチン/ラミニンが含まれる。そのようなマトリックスは、通常、マウス胚性繊維芽細胞(MEF)馴化培地が補充されるか、または、ウシ血清および増殖因子が補充された合成培地が補充される。

20

【0063】

支持細胞非含有培養システムを使用してヒトES細胞を培養するための以前の試みでは、新鮮な培養培地および増殖因子混合物が補充されたMatrigel^{RTM}マトリックスまたはラミニンマトリックスが用いられた（米国特許出願第20030017589号）。しかしながら、これらの支持細胞非含有マトリックスは動物組織に由来しており、従って、ヒトES細胞を動物病原体にさらし得る。また、これらの実験では、6つの異なる増殖因子の組合せが、培養された細胞に不可逆的な損傷を与え得る極めて高い濃度で使用された。実際に、米国特許出願第20030017589号において明らかにされたように、ES細胞の倍加時間は約19時間であった。このことは腫瘍形成性の表現型を示唆している。その上、これらの条件のもとでは、細胞の50%~70%のみが、支持細胞非含有培養システムでの14回の継代培養の後で未分化細胞の形態学を示しただけであった。

30

【0064】

そのような培養条件は研究目的のためには好適であり得るが、ヒトES細胞は、ヒトにおける細胞置換治療または組織再生のために利用されるときには動物材料を本質的には含まない十分に規定された培養条件のもとで培養されなければならない。

【0065】

本発明を実施に移しているとき、本発明者らは、異種の混入物を含まず、それにもかかわらず、少なくとも38回の継代培養にわたって培養においてヒト幹細胞を持続させることができる支持細胞非含有の培養条件を考案した。下記の実施例の節において例示されるように、そのような条件のもとで培養された幹細胞は、多能性、不死性、未分化増殖能力および正常な核型を含むES細胞の特徴をすべて維持した。従って、本発明の支持細胞非含有培養システムは、増殖性状態で少なくとも38回の継代培養にわたってヒトES細胞を維持することができ、その一方で、ESの多能性を持続させることができる完全な動物非存在培養環境を初めて提供する。また、そのような条件のもとで培養されたES細胞の85%以上が未分化細胞の形態学を30時間~35時間の倍加時間とともに示した。

40

【0066】

従って、本発明によれば、多能性かつ増殖性の未分化状態で維持することができ、かつ異種の混入物を本質的に含まないヒト胚性幹細胞株を確立する方法が提供される。

50

【0067】

本明細書中で使用される表現「幹細胞株」は、特定の専門化された機能を有する他の細胞タイプ（すなわち、「完全に分化した」細胞）に分化することができる細胞、または、未分化状態で維持することができる細胞（以降、「多能性幹細胞」）を示す。

【0068】

本発明の幹細胞は、任意の年齢の個体の骨髄組織から、または、新生児個体の臍帯血から得られる造血幹細胞、妊娠後に形成される胚組織（例えば、胚盤胞）から得られる胚性幹（ES）細胞、あるいは胚性生殖（EG）細胞であり得る。幹細胞の誘導および調製は本明細書中下記においてさらに記載される。本発明の好ましい幹細胞はヒト胚性幹細胞である。

10

【0069】

本発明の1つの態様によれば、本発明の方法は、ヒト胚性幹細胞を得ること、マトリックスと、増殖因子を含む組織培養培地とを含む支持細胞非含有培養条件のもとでヒト胚性幹細胞を培養し、それによりヒト胚性幹細胞株を確立することによって達成される。

【0070】

本発明のこの態様によれば、培養は、細胞の生存および増殖を促進するが、分化を制限する細胞密度で幹細胞をマトリックスに置床することによって達成される。典型的には、約15000細胞/cm²～約200000細胞/cm²の置床密度が使用される。

【0071】

幹細胞の単一細胞懸濁物が通常の場合には播種されるが、小さいクラスターもまた使用されることが理解される。この目的のために、クラスター破壊のために利用される酵素消化（下記の実施例の節の実施例1を参照のこと）が、幹細胞が完全に分散される前に停止され、細胞が、塊（すなわち、10細胞～200細胞）が形成されるようにピペットで粉碎される。しかしながら、様々な対策が、細胞の分化を生じさせる大きいクラスターを避けるために取られる。

20

【0072】

本発明の幹細胞は、広く知られている細胞培養方法を使用して得ることができる。例えば、ヒト胚性幹細胞をヒト胚盤胞から単離することができる。ヒト胚盤胞は、典型的には、ヒトのインピボでの着床前の胚から、または、体外受精（IVF）胚から得られる。あるいは、単一細胞のヒト胚を胚盤胞段階に拡大することができる。ヒトES細胞を単離するために、透明帯が胚盤胞から除かれ、内側の細胞塊（ICM）が、栄養外胚葉細胞が溶解され、穏やかなピペティングにより無傷のICMから除かれる免疫手術によって単離される。その後、ICMは、その成長を可能にする適切な培地を含有する組織培養フラスコに入れられる。9日後～15日後に、ICM由来の成長物が機械的解離または酵素的分解のいずれかによって塊に解離され、その後、細胞は新鮮な組織培養培地に再び置床される。未分化の形態学を示すコロニーがマイクロピペットによって個々に選択され、塊に機械的に解離され、再び置床される。得られるES細胞は、その後、1週間～2週間毎に常法により分割される。ヒトES細胞の調製方法に関するさらなる詳細については、Thomson他[米国特許第5843780号；Science、282：1145、1998；Curr. Top. Dev. Biol.、38：133、1998；Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92：7844、1995]；Bongso他[Hum. Reprod.、4：706、1989]；Gardner他[Fertil. Steril.、69：84、1998]を参照のこと。

30

40

【0073】

市販の幹細胞もまた本発明のこの態様に関して使用できることが理解される。ヒトES細胞をNIHヒト胚性幹細胞登録部門（<http://escr.nih.gov>）から購入することができる。市販の胚性幹細胞株の非限定的な例には、BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03およびTE32がある。

【0074】

50

本発明によって使用される幹細胞はまた、ヒトの胚性生殖（EG）細胞から得ることができる。ヒトEG細胞は、当業者に知られている研究室技術を使用して妊娠の約8週～11週のヒト胎児から得られる原始生殖細胞から調製される。生殖隆起部が分離され、小さい塊に切られ、塊は、その後、機械的解離によって細胞に分割される。EG細胞は、その後、適切な培地を伴う組織培養フラスコにおいて成長させられる。細胞は、EG細胞と一致する細胞形態学が観測されるまで培地を毎日取り替えながら培養される（典型的には7日～30日または1回～4回の継代培養の後）。ヒトEG細胞の調製方法に関するさらなる詳細については、Shamblo tt他 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 13726, 1998] および米国特許第6090622号を参照のこと。
【0075】

10

本明細書中上記で述べられるように、幹細胞は、好ましくは、支持細胞層の代わりにマトリックスを含む支持細胞非含有培養システムにおいて培養される。本明細書中で使用される用語「マトリックス」は、支持細胞の細胞付着機能を代用することができる任意のマトリックスを示す。そのようなマトリックスは、典型的には、幹細胞が付着することができる細胞外成分を含有し、従って、好適な細胞基質を提供する。

【0076】

本発明との使用のために特に好適なものは、基底膜に由来する細胞外マトリックス成分、または、接着分子受容体-リガンドカップリングの一部を形成する細胞外マトリックス成分である。Matrigel（登録商標）は、本発明との使用のために好適である市販マトリックスの一例（Becton Dickinson、米国）である。Matrigel（登録商標）は、室温でゲル化して、再構成された基底膜を形成する、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍細胞から得られる可溶性の調製物である。Matrigel（登録商標）はまた、増殖因子低下調製物として得ることができる。本発明との使用のために好適である他の細胞外マトリックス成分および細胞外マトリックス成分混合物には、単独または様々な組合せでのラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパラン硫酸などが含まれる。本発明の好ましいマトリックスはフィブロネクチン由来マトリックスである。

20

【0077】

完全な動物非存在培養条件が所望される場合、マトリックスは、好ましくは、ヒト起源に由来するか、または組換え技術を使用して合成される。そのようなマトリックスには、例えば、ヒト由来フィブロネクチン、組換えフィブロネクチン、ヒト由来ラミニン、包皮繊維芽細胞マトリックス、または合成フィブロネクチンマトリックスが含まれる。ヒト由来フィブロネクチンは血漿フィブロネクチンまたは細胞フィブロネクチンに由来し得る：これらはともにSigma（St. Louis、MO、米国）から得ることができる。ヒト由来ラミニンおよび包皮繊維芽細胞マトリックスをSigma（St. Louis、MO、米国）から得ることができる。合成フィブロネクチンマトリックスをSigma（St. Louis、MO、米国）から得ることができる。

30

【0078】

マトリックスタンパク質の組換え合成を、発現ベクターを使用することによって達成することができる。マトリックスタンパク質（例えば、ヒト血漿フィブロネクチン）をコードするポリヌクレオチドセグメントを、哺乳動物細胞（例えば、HeLa細胞など）を形質転換するために好適であり、かつ、形質転換された細胞におけるこの酵素の発現を行わせるために好適である市販の発現ベクターシステムに連結することができる。そのような市販のベクターシステムは、既存のプロモーター配列またはエンハンサー配列を置換し、または複製し、または変異させるために、および/または任意のさらなるポリヌクレオチド配列（例えば、さらなる選択マーカーをコードする配列、またはレポーターポリペプチドをコードする配列など）を導入するために、一般に使用されている様々な組換え技術によって容易に改変され得ることが理解される。

40

【0079】

好適な哺乳動物発現ベクターには、pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pZ

50

e o S V 2 (+ / -)、p S e c T a g 2、p D i s p l a y、p E F / m y c / c y t o、p C M V / m y c / c y t o、p C R 3 . 1 (これらはInvitrogenから入手可能である)、p C I (これはPromegaから入手可能である)、p B K - R S V および p B K - C M V (これらはStratageneから入手可能である)、p T R E S (これはClontechから入手可能である)、ならびにそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【0080】

本発明の好ましい実施形態によれば、培養培地は、細胞増殖のために必要とされるサイトカインおよび増殖因子 [例えば、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (b F G F) および白血病阻害剤因子 (L I F)]、ならびに、幹細胞の分化を阻害する、トランスフォーミング増殖因子₁ (T G F₁) などの因子を含む。

10

【0081】

そのような培養培地は、合成された組織培養培地、例えば、血清、血清代替物および/または増殖因子が補充されたK o - D M E M (Gibco - Invitrogen Corporation product (Grand Island, NY, 米国)) などであり得る。

【0082】

血清は、ウシ胎児血清、ヤギ血清またはヒト血清を含む任意の供給源のものが可能である。好ましくは、ヒト血清または代替血清^{T M} (Gibco - Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, 米国) が、動物非存在の環境をヒトES細胞に提供するために利用される。

20

【0083】

代替血清^{T M} は、アルブミンまたは代用アルブミン、アミノ酸、ビタミン、トランスフェリンまたは代用トランスフェリン、抗酸化剤、インスリンまたは代用インスリン、コラーゲン前駆体、および微量元素を含む (国際特許出願公開WO 98 / 30679 (Price, P. J 他))。動物非存在の培養条件を提供するために、アルブミンまたは代用アルブミンは、好ましくはヒト供給源に由来し、および/または組換えタンパク質である。

【0084】

培養培地、血清および血清代替物を、組織培養製品の任意の市販の供給者から得ることができ、例には、Gibco - Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, 米国)、Sigma (St. Louis, MO, 米国) およびATCC (Manassas, VA, 米国) が含まれる。

30

【0085】

本発明によって使用される血清および血清代替物は、1% ~ 40% (より好ましくは5% ~ 35%、最も好ましくは10% ~ 30%) の濃度範囲で提供される。

【0086】

現時点で好ましい実施形態によれば、血清代替物は15%の濃度で提供される (実施例の節の実施例1および実施例4を参照のこと)。

【0087】

本発明の増殖因子は任意の組合せで使用することができ、ES細胞の増殖のために、その一方で同時に、ES細胞の分化を阻害するために好適な任意の濃度で幹細胞に与えることができる。

40

【0088】

本発明による好適な増殖因子には、トランスフォーミング増殖因子₁ (T G F₁)、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (b F G F) およびヒト組換え白血病阻害剤因子 (L I F)、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、組換えヒトオンコスタチンM、インターロイキン6 (I L - 6) F l t - 3 リガンドおよび幹細胞因子 (S C F) などが含まれるが、これらに限定されない。そのような増殖因子は、組織培養試薬の任意の供給者から、例えば、Gibco Invitrogen Corporation Products (米国)、R & D Systems Inc. (Minneapolis, MN, 米国) および C

50

hemicon International Inc. (Temecula, CA, 米国) などから得ることができる。

【0089】

下記の実施例の節の実施例1に示されるように、ES細胞が、20%血清代替物が補充された培養培地の存在下においてウシフィブロネクチン上で培養されるとき、増殖因子のTGF_β₁およびbFGFの組合せ(TF)と、増殖因子のTGF_β₁、LIFおよびbFGFの組合せ(TLF)とはともに、ヒトES細胞を少なくとも53回および56回の継代培養にわたってそれぞれ維持することができる。

【0090】

従って、本発明の好ましい実施形態によれば、支持細胞非含有システムで培養されるときにES細胞に補充するために使用される増殖因子には、TGF_β₁、bFGFおよび/またはLIFが含まれる。

【0091】

支持細胞非含有培養システムのもとでは、TGF_β₁は0.06ng/ml~0.24ng/mlの濃度範囲で提供され、より好ましくは0.10ng/ml~0.20ng/mlで、最も好ましくは0.12ng/mlで提供され、LIFは500u/ml~2000u/mlの濃度範囲で提供され、より好ましくは750u/ml~1500u/mlで、最も好ましくは1000u/mlで提供され、bFGFは2ng/ml~8ng/mlの濃度範囲で提供され、より好ましくは3ng/ml~6ng/mlで、最も好ましくは4ng/mlで提供される。

【0092】

あまり好ましくないが、hES細胞の培養は、血清または血清代替物が補充された培地の代わりに馴化培地を使用して代わりに行うことができる。

【0093】

馴化培地は、特定の培養期間の後に存在する単層細胞培養物(すなわち、支持細胞)の増殖培地である。馴化培地には、培養における単層細胞によって分泌された増殖因子およびサイトカインが含まれる。

【0094】

馴化培地は、培養において単層を形成する様々な細胞から回収することができる。例には、MEF馴化培地、包皮馴化培地、ヒト胚性繊維芽細胞馴化培地、およびヒトファロピウス管上皮細胞馴化培地などが含まれる。

【0095】

特に好適な馴化培地は、ヒト細胞に由来する馴化培地であり、例えば、馴化培地を製造するために好適な条件のもとでの増殖培地においてヒト包皮細胞を培養することによって製造される包皮馴化培地などである。

【0096】

そのような増殖培地は、支持細胞を培養するために好適な任意の培地であり得る。増殖培地には、未分化状態における幹細胞の成長に役に立つ様々な栄養性の因子、例えば、アミノ酸(例えば、L-グルタミン)、抗酸化剤(例えば、β-メルカプトエタノール)および増殖因子などを補充することができる。血清および血清代替物が、他のところ(米国特許出願第10/368045号)で記載されるような効果的な濃度範囲で加えられる。

【0097】

支持細胞は、未分化状態での幹細胞の増殖を助けるための分泌された因子の十分な蓄積を可能にするために十分な期間にわたって増殖培地において培養される。典型的には、培地は、37°Cで4時間~24時間培養することによって馴化される。しかしながら、培養期間は、幹細胞の成長および分化に対する馴化培地の影響を評価することによって増減することができる。

【0098】

培地を馴化するための装置の選択は馴化培地の規模および目的に基づく。大規模な製造では、好ましくは、専用の装置を使用することが伴う。連続細胞培養システムが、Fur

10

20

30

40

50

ey (2000)、Genetic Eng. News、20:10に総説される。

【0099】

十分な因子が培地に蓄積した後、増殖培地（すなわち、馴化培地）は支持細胞から分離され、回収される。支持細胞は、細胞が、培地を馴化するその能力を保持するならば、さらなる培養期間にわたって培地のさらなるバッチを馴化するために繰り返し使用できることが理解される。

【0100】

好ましくは、馴化培地は使用前に滅菌される（例えば、20 μMフィルターを使用する過）。本発明の馴化培地は、幹細胞に対して直接的に加えることができ、または、塩過などによって効果的な因子を濃縮するために抽出することができる。さらなる使用のために、馴化培地は好ましくは -80 で凍結貯蔵される。

10

【0101】

本発明の方法によれば、幹細胞は、ヒト胚性幹細胞株を確立するために、支持細胞非含有培養条件のもとで培養される。

【0102】

確立されたヒト胚性幹細胞株は未分化幹細胞によって特徴づけられる。本発明によれば、未分化幹細胞株は、少なくとも50%、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも85%の未分化幹細胞を含む。

20

【0103】

下記の実施例の節の実施例1および実施例4において記載されるように、未分化幹細胞は、当業者によって胚起源または成体起源の分化した細胞から明瞭に区別可能である異なった形態学を有する。典型的には、未分化幹細胞は、大きい核/細胞質比率、目立った核、および、細胞間結合が十分に識別できない密集したコロニー形成を有する。未分化幹細胞のさらなる特徴が本明細書中下記に記載される。

【0104】

本発明の教示に従って培養されたとき、幹細胞の成長は、その分化状態を決定するためにモニターされる。例えば、形態学的な測定を含めて、いくつかの方法を、本明細書中に記載されるように培養された細胞の細胞分化を明らかにするために使用することができる。

30

【0105】

本発明の好ましい実施形態によれば、培養条件は、増殖性で、それにもかかわらず、未分化の状態で幹細胞を無限に維持することができる完全な異種非含有かつ支持細胞非含有の環境を幹細胞に提供する。従って、培養条件には、ヒト由来（または組換え）マトリックスと、TGF_{β1}、LIFおよびbFGFの増殖因子が補充された細胞培地とが含まれる。

【0106】

下記の実施例の節の実施例4および実施例5に示されるように、本発明者らは、ES細胞を、ヒト血清または血清代替物が補充されたヒト由来フィブロネクチンマトリックスにおいて培養することができ、それにより、動物病原体または何らかの他の混入物を含まない多能性幹細胞培養物が提供されることを例示している。これらの条件のもとでは、本発明の教示を使用して得られたES細胞株は、増殖性かつ未分化の状態を少なくとも38回の継代培養にわたって維持した。

40

【0107】

培養工程の期間中、幹細胞はその分化状態についてさらにモニターされる。細胞分化は、分化を示すことが知られている細胞特異的または組織特異的なマーカーを調べたときに決定することができる。例えば、霊長類ES細胞は、段階特異的な胎児性抗原（SSEA4）、腫瘍拒絶抗原（TRA）-1-60およびTRA-1-81を発現し得る。

【0108】

下記の実施例の節の実施例2および実施例4に示されるように、異種非含有培養培地お

50

よび選択された増殖因子が補充された支持細胞非含有培養で成長したES細胞は、未分化細胞について典型的な細胞表面マーカーのSSEA4、TRA-1-60およびTRA-1-81を発現した。

【0109】

組織/細胞特異的なマーカーは、この分野で広く知られている免疫学的技術を使用して検出することができる(Thomson JA他(1998)、Science、282:1145~7)。例には、膜結合マーカーについてのフローサイトメトリー、細胞外マーカーおよび細胞内マーカーについての免疫組織化学、ならびに、分泌された分子マーカーについての酵素免疫アッセイが含まれるが、これに限定されない。

【0110】

ES細胞の分化の決定はまた、アルカリホスファターゼ活性の測定によって行うことができる。未分化のヒトES細胞は、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定処理し、製造者の説明書(Vector Laboratories、Burlingame、California、米国)に従ってVector Red基質キットを用いて発色させることによって検出され得るアルカリホスファターゼ活性を有する。

【0111】

上記で述べられるように、本発明の幹細胞株は多能性を少なくとも38回の継代培養にわたって維持する。そのような多能性は、胚様体(EB)の形成によってインビトロでモニターすることができ、また同様に、奇形腫の形成によってインビボでモニターすることができる。

【0112】

胚様体は、ES細胞を支持細胞層または支持細胞非含有培養システムから取り出したときに形成される。ES細胞の取り出しは、限定された時間のIV型コラゲナーゼ処理を使用して行うことができる。培養表面から解離させた後、細胞は、血清およびアミノ酸が補充された培養培地を含有する組織培養プレートに移される。下記の実施例の節の実施例3および実施例5に示されるように、懸濁培養において14日後、本発明の教示に従って得られたES細胞は胚の中胚葉細胞、外胚葉細胞および内胚葉細胞を含有するEBに分化した。従って、このことは、本発明のES細胞株が、本発明によって使用される支持細胞非含有培養条件のもとでは多能性を保持していることを明瞭に明らかにしている。

【0113】

EB細胞の分化レベルは、Oct-4の発現の喪失、および、他のマーカー(例えば、-フェトプロテイン、NF-68kDa、-カルジアックおよびアルブミンなど)の増大した発現レベルを追跡することによってモニターすることができる。特異的な遺伝子の発現レベルをモニターするために有用な様々な方法がこの分野では広く知られており、これらには、RT-PCR、RNAインサイチュウハイブリダイゼーション、ウエスタンブロット分析および免疫組織化学が含まれる。

【0114】

EB細胞株の多能性能力はまた、細胞をSCIDマウスに注入することによって確認することができる[Evans MJおよびKaufman M(1983)、正常なマウス胚から直接的に成長した多能性細胞、Cancer Surv.、2:185~208]。この場合、SCIDマウスは、注入したときに奇形腫を形成する。奇形腫は、4%パラホルムアルデヒドを使用して固定処理され、3つの胚葉(すなわち、内胚葉、中胚葉および外胚葉)について組織学的に調べられる。

【0115】

下記の実施例の節の実施例3に示されるように、本発明の選択された増殖因子の組合せ(すなわち、TF組合せおよびTLF組合せ)が補充された、フィブロネクチンに基づく支持細胞非含有培養システムで培養されたES細胞は、機能的な奇形腫を形成した。このことは、インビボで分化するES細胞の多能性能力を明らかにしている。

【0116】

分化状態をモニターすることに加えて、幹細胞は、多くの場合、すべての染色体が存在

10

20

30

40

50

し、かつ培養期間中に検出可能に変化していない細胞学的な正倍数性を確認するために、核型についてモニターされている。培養された幹細胞は、標準的なギムザ染色を使用して核型を決定することができ、対応する種の発表されている核型と比較することができる。

【0117】

本発明の教示に従って培養された幹細胞は、TF組合せまたはTLF組合せの増殖因子が補充されたとき、フィブロネクチンマトリックスにおける30回および32回の継代培養の後、それぞれ正常な核型を保持している（実施例の節の実施例2を参照のこと）。

【0118】

増殖性かつ未分化の状態を少なくとも38回の継代培養にわたって維持するその多能性および能力は、本発明の教示に従って得られたES細胞培養物を単一細胞クローニングのための優れた供給源にしている。

【0119】

従って、上記の方法はさらに、好ましくは異種を含まず、かつ支持細胞を含まない本発明の培養条件のもとで、上記のヒト胚性幹細胞株に由来する単一細胞を培養し、それにより、単一細胞に由来するES培養物を確立するというさらなる工程を含むことができる。

【0120】

単一細胞クローニングの様々な方法がこの分野では広く知られている（例えば、米国特許第6548655号、Amit他、2000、Dev. Biol.、227:271~8を参照のこと）。そのような方法では、典型的には、細胞群を細胞培養物から選択すること、その細胞群を単一細胞に解離すること、および、細胞増殖を促進させ、その一方で同時に、細胞分化を阻害する条件で単一細胞を別々に成長させることが含まれる。単一細胞クローンが得られると、単一細胞クローンは、好適な培養条件のもとでES細胞株に拡大することができる。

【0121】

本発明のES細胞株は異種混入物および支持細胞混入物を含まないので、ヒトでの細胞に基づく治療および組織再生のために使用することができる。

【0122】

従って、本発明の別の態様によれば、細胞置換および/または組織再生を必要としている個体を処置する方法で、異種混入物および支持細胞混入物を含まないhES細胞調製物を個体に投与することを含む方法が提供される。

【0123】

好ましくは、この方法はさらに、本明細書中上記に記載される方法論を使用してhES細胞調製物を調製する工程を含む。

【0124】

本明細書中で使用される「細胞置換および/または組織再生を必要としている個体を処置する」は、障害（例えば、細胞置換および組織再生を必要とする神経学的障害、筋肉障害、心臓血管傷害、血液学的障害、皮膚障害および肝臓障害など）に罹患している個体を処置することを示す。

【0125】

表現「処置する」は、疾患、障害または状態に罹患している個体、あるいは、疾患、障害または状態と診断された個体において、疾患、障害または状態の発達を阻害するか、または停止させること、および/あるいは、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を生じさせることを示す。当業者は、疾患、障害または状態の発達を評価するために使用することができる様々な方法論およびアッセイ、同様に、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を評価するために使用することができる様々な方法論およびアッセイを承知している。

【0126】

本明細書中で使用される「投与する」は、任意の好適な経路を使用して、例えば、経口投与、舌下投与、静脈内投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与、皮内投与、クモ膜下投与、腹腔内投与、脾臓内投与、肝臓内投与、膵臓内投与、心臓内投与、硬膜外投与、眼内

10

20

30

40

50

投与、頭蓋内投与、吸入投与、直腸投与、膺投与および同様な投与を使用して、ヒトES細胞調製物を個体に与えるための手段を示す。

【0127】

本明細書中における得られた幹細胞は、そのまま（すなわち、未分化調製物）、あるいは、部分的または完全な分化の後で投与することができる。培養されたヒトES細胞は、限定された発達系譜の細胞に、または最終分化細胞に分化させることができる。幹細胞の分化は、胚様体を形成させる懸濁培養において未分化のヒトES細胞を過度に成長させることによって、または、特定の様式で分化を促進させる条件のもとにES細胞を置くことによって開始させることができる。そのような条件には、栄養物、増殖因子またはサイトカインを除くこと、あるいは、栄養物、増殖因子またはサイトカインを培地に加えること、あるいは、酸素圧力を変化させること、あるいは、培養表面における基質を変更することが含まれ得る。

10

【0128】

未分化幹細胞または分化幹細胞は、様々な障害を処置することにおいて利用することができる。例えば、稀突起神経膠細胞系譜の部分的に分化したES細胞を、ミエリン障害を処置するために使用することができる（ミエリン疾患の修復：動物モデルにおける方針および進歩、Molecular Medicine Today、1997、554頁～561頁）。軟骨細胞または間葉系譜の部分的に分化したES細胞を骨障害および軟骨障害の処置において使用することができる（米国特許第4642120号）。また、上皮系譜の部分的に分化したES細胞を創傷または火傷の皮膚再生において使用することができる（米国特許第5716411号）。

20

【0129】

細胞置換治療に加えて、本発明のES細胞株はまた、支持細胞由来のcDNAで比較的汚染されていないcDNAラブラリーを調製するために利用することができる。mRNAが標準的な技術によってES細胞から調製され、さらに逆転写されて、cDNAが形成される。cDNA調製物は、この分野で知られている技術によって、胚性繊維芽細胞および望ましくない特異性の他の細胞から得られたヌクレオチドを用いてサブトラクションされて、サブトラクションされたcDNAラブラリーを得ることができる。

【0130】

本発明のES細胞株は、幹細胞の特性に影響を及ぼす因子（例えば、小分子薬物、ペプチドおよびポリヌクレオチドなど）または条件（例えば、培養条件または操作など）についてスクリーニングするために使用することができる。例えば、成長に影響を及ぼす物質、毒素または潜在的な分化因子を、培養培地へのそれらの添加によって調べることができる。

30

【0131】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、下記実施例を考察すれば、当業技術者には明らかになるであろう。なおこれら実施例は本発明を限定するものではない。さらに、先に詳述されかつ本願の特許請求の範囲の項に特許請求されている本発明の各種実施態様と側面は各々、下記実施例の実験によって支持されている。

【実施例】

40

【0132】

上記説明とともに、以下の実施例を参照して本発明を例示する。なおこれら実施例によって本発明は限定されない。

【0133】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学及び組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技法は文献に詳細に説明されている[例えば以下の諸文献を参照されたい。「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら1989年；Ausubel, R.M.編1994年「Current Protocols in Molecular Biology」I～III巻；Ausubelら著1989年「Curre

50

nt Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, 米国メリーランド州バルチモア; Perbal 著「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, 米国ニューヨーク1988年; Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books, 米国ニューヨーク; Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 米国ニューヨーク1998年; 米国特許の4666828号、4683202号、4801531号、5192659号及び5272057号に記載される方法; Cellis, J. E. 編「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻1994年; Freshney「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」Wiley-Liss, N.Y., 1994年; Coligan, J. E. 編「Current Protocols in Immunology」I~III巻1994年; Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange, 米国コネティカット州ノーウォーク1994年; MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co., 米国ニューヨーク1980年; また利用可能な免疫検定法は、例えば以下の特許と科学文献に広範囲にわたって記載されている。米国特許の3791932号、3839153号、3850752号、3850578号、3853987号、3867517号、3879262号、3901654号、3935074号、3984533号、3996345号、4034074号、4098876号、4879219号、5011771号及び5281521号; Gait, M. J. 編「Oligonucleotide Synthesis」1984年; Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Nucleic Acid Hybridization」1985年; Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編「Transcription and Translation」1984年; Freshney, R. I. 編「Animal Cell Culture」1986年; 「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press 1986年; Perbal, B. 著「A Practical Guide to Molecular Cloning」1984年及び「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press, 米国カリフォルニア州サンディエゴ1990年; Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press, 1996年; Robertson EJ著「Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach」Oxford: IRL Press, 1987年; Nagy Aら「Manipulating the Mouse Embryo」Cold Spring Harbor Lab Press, Third Edition, 2003年; Thomson, J. A., Marshall, V. S. Primate embryonic stem cells. Current Topics in Developmental Biology 38, 133-165, 1998年; Marshall, V. S., Waknitz, M. A., Thomson, J. A. Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells. Methods in Molecular Biology 158, 11-18, 2001年; なおこれらの文献類は、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その外の一般的な文献は、

10

20

30

40

50

本明細書を通じて提供される。本明細書に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。本明細書に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0134】

(実施例1)

異種非含有培地が補充された支持細胞非含有培養システムはES細胞株を成長させるために好適である

ヒトES細胞を、支持細胞非含有の十分に規定された環境をES細胞培養物に提供するために、血清代替物および選択された増殖因子の存在下でのフィブロネクチンに基づく細胞システムに移した。

10

【0135】

材料および実験方法

ES細胞培養物：ヒトES細胞株のI-6、I-3 [Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J., ヒト胚性幹細胞の誘導および自然分化、J Anat., 200, 225~232 (2002)] およびH-9 [Thomson, J. A. 他、ヒト胚盤胞に由来する胚性幹細胞株、Science, 282, 1145~7 (1998)] が、15%の血清代替物(SR)が補充された85%のKo-DMEM、2mMのL-グルタミン、0.1mMのβ-メルカプトエタノール、1%の非必須アミノ酸ストック液、および4ng/mlのbFGFからなる培養培地(これらはすべてが、Gibco Invitrogen corporation products (米国) から得られる)で、46回、39回および25回の継代培養にわたってそれぞれ、マウス胚性繊維芽細胞(MEF)とともに培養された。ES細胞は、その後、20%のSR、80%の培養培地、および増殖因子の下記組合せの1つの存在下でのウシ由来フィブロネクチン被覆プレート(50μg/10cm², Biological Industries (Beth Haemek, イスラエル))に移された：「T」-0.12ng/mlのTGF_{β1} (R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, 米国))；「TF」-0.12ng/mlのTGF_{β1} および4ng/mlのbFGF (Gibco Invitrogen corporation products (米国))；「LF」-1000u/mlの白血球阻害剤因子(LIF, CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA, 米国)) および4ng/mlのbFGF；または「TLF」-0.12ng/mlのTGF_{β1}、1000u/mlのLIF および4ng/mlのbFGF。附着性細胞が、1mg/mlのIV型コラゲナーゼ(Gibco Invitrogen corporation products (米国))を30分間使用して4日毎~6日毎に分けられ、新鮮な培地を含有するフラスコに再び置床された。凍結プロトコルに従って、細胞を、10%のDMSO (Sigma (St. Louis, MO, 米国))、10%のヒト血清 (CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA, 米国)) または15%のSR、および80%のKo-DMEM (Gibco Invitrogen corporation products (米国)) からなる凍結液を使用して液体窒素で凍結した。

20

30

【0136】

形態学的評価 - ES細胞を、位相差を使用する倒立型顕微鏡(Olympus, IX70, 日本)で調べた(生細胞)。

40

【0137】

実験結果

支持細胞非含有培養システムにおけるhES細胞の増殖能力 - I-3、I-6 およびH-9の系統に由来するES細胞を、本明細書中上記の方法に詳しく記載されるように、選択された増殖因子が補充された血清代替物の存在下でのフィブロネクチン被覆プレートに移した。培養培地に、bFGFだけが補充されたとき、または、LIF およびbFGFが補充されたとき(LF)、細胞は数回の継代培養にわたって増殖し続け、その後、分化に変わった。また、ES培養培地にTGF_{β1} だけが補充されたとき、ES細胞は、10回を

50

越える継代培養にわたって未分化状態で維持されたが、増殖が悪く、15回目の継代培養までにゆっくり消失していった。他方で、ES培養培地に、TGF β ₁およびbFGFが補充されたとき(TF)、または、TGF β ₁、LIFおよびbFGFが補充されたとき(TLF)、細胞は増殖し続け、MEFにおいて成長したhES細胞と同様に、hES細胞の正常な特徴を維持していた。しかしながら、TFの組合せで成長した細胞は、それぞれの継代培養の期間中、1枚のプレートに分けられたが、TLFの組合せで成長した細胞は、MEFにおいて成長したES細胞と同様に、2枚~3枚のプレートに分けられた。このことは、増殖速度がTLFの組合せの存在下では大きいことを明らかにしている。従って、TLF組合せの増殖因子が補充された支持細胞非含有培養システムは、MEFにおいて成長したES細胞の倍加時間と同様な少なくとも25時間の倍加時間を伴ってhES細胞の正常な成長を助けることができた。

10

【0138】

支持細胞非含有培養システムにおけるESコロニーおよびES細胞の形態学的特徴 - 支持細胞非含有培養システムで成長したESコロニーの形態学的特徴は、TLF組合せの増殖因子が補充されたときには(224日を越える)56回を越える継代培養の後でさえ、TF組合せの増殖因子が補充されたときには(212日を越える)53回を越える継代培養の後でさえ、MEFにおいて成長したESコロニーの形態学的特徴と区別できなかった(示されず)。また、本発明のフィブロネクチン-支持細胞非含有システムでのそれらの継代培養から4日目において、hES細胞培養物は、30時間~35時間の倍加時間を有する、85%~90%の未分化細胞からなった。この倍加時間は、MEFにおいて成長したhES細胞の倍加時間と一致する。

20

【0139】

より高倍率で見たとき、支持細胞非含有培養システムで成長したhES細胞は、大きい核対細胞質比率、1個~3個の核の特筆すべき存在、および、細胞間の典型的な間隔を伴って、小さく、かつ円形であった(図1a~図1d)。

【0140】

支持細胞非含有培養システムで成長したES細胞は、MEFにおいて成長したES細胞の生存率と類似する生存率を有する - ES貯蔵のために、支持細胞非含有培養システムで成長したES細胞を15%のSRおよび10%のDMSOの存在下で凍結した。凍結ES細胞がさらに解凍され、再び置床されたとき、凍結ES細胞は、MEFにおいて成長したES細胞の生存率と類似する生存率を示した。

30

【0141】

従って、これらの結果は、TF組合せおよびTLF組合せの増殖因子がhES培養物のために好適であり、しかし、TFの組合せは、低い増殖能力のためにTLFの組合せよりも劣っていることを明らかにしている。さらに、支持細胞非含有培養システムで成長したES細胞は、MEFにおいて成長したES細胞の形態学的特徴および生存率と同様な形態学的特徴および生存率を示した。

【0142】

(実施例2)

異種非含有培地が補充された支持細胞非含有培養システムは、表現型が一致するES細胞の成長を助ける

40

異種非含有培地が補充された支持細胞非含有培養システムで成長したhES細胞の表現型特徴が、未分化細胞に典型的な細胞表面マーカーを使用して評価された。

【0143】

材料および実験方法

核型分析 - ES細胞の有糸分裂中期が、コルセミド(KaryoMaxコルセミド溶液、Invitrogen(Grand Island, NY、米国))を使用して阻止され、核膜が、標準的なプロトコル(ヒト細胞遺伝学命名法に関する国際システム、ISCN)による低張溶液において溶解された。染色体のGバンド形成が、製造者(Giems a、Merck)の説明書に従って行われた。サンプルあたり少なくとも20個の細胞の

50

核型がISCNに従って分析および報告された。

【0144】

免疫組織化学 - 細胞が4%パラホルムアルデヒドにおいて20分間固定処理され、PBS (Biological Industries (Beth Haemek, イスラエル)) における2%の正常ヤギ血清において15分間ブロッキング処理され、SSEA1、SSEA3、SSEA4のマウス抗ヒト抗体 (Hybridomaバンク (Iowa, 米国))、TRA-60、TRA-81のマウス抗ヒト抗体 (P Andrews (Sheffield大学 (英国) によって提供) の1:50希釈物と4で一晩インキュベーションされた。その後、細胞はPBSで洗浄され、フルオロクロムCys3にコンジュゲート化されたロバ抗マウスIgG抗体 (Chemicon International (Temecula, CA, 米国)) の1:100希釈物とさらにインキュベーションされた。細胞を倒立型蛍光顕微鏡 (CARL Zeiss, ドイツ) または共焦点顕微鏡 (Bio-Rad laboratories (Hertfordshire, 英国)) で可視化した。

10

【0145】

実験結果

異種非含有培地が補充されたフィブロネクチン型支持細胞非含有培養システムは他の支持細胞型プロトコルのような一致した核型を有するES細胞をもたらす - 核型分析が、異種非含有培地が補充されたフィブロネクチン型支持細胞非含有培養システムでの連続培養の後のhES細胞に対して行われた。核型分析は、2つの培地条件 (TFおよびTLF)、および、支持細胞非含有培養システムでの6回~32回の継代培養の異なる段階における3つのhES細胞株 (I-3、I-6およびH-9) を表す9個の別個の培養物に対して行われた。この分析により、正常な核型が、TH培地で培養されたときの30回目の継代培養、およびTLF培地で培養されたときの32回目の継代培養において調べられた140個の細胞のうちの136個の細胞において明らかにされた。同じ群の4つの細胞において、47の異常な核型 (すなわち、XXX) が見出された。これら4つの細胞は、ほぼ1年間にわたって培養されており、TLFが補充された支持細胞非含有培養システムにおいてそのうちの20回の継代培養が行われた誘導後71回目の継代培養においてであった。以前に報告されているように [Amit, M.、クローン誘導されたヒト胚性幹細胞株は多能性および増殖能力を長期間の培養にわたって維持する、Dev. Biol.、227: 271~8 (2000)]、染色体の不安定性が、MEFにおいて8ヶ月間にわたって培養されたとき、ES細胞において生じ得る。まとめると、これらの結果から、本発明の支持細胞非含有培養システムはhES細胞の正常かつ安定な核型を助けていることが示唆される。

20

30

【0146】

異種非含有培地が補充された支持細胞非含有培養システムで培養されたヒトES細胞は胎児性表面マーカーを発現する - ヒトES細胞の正常な成長を維持させるフィブロネクチン型支持細胞非含有培養システムの能力をさらに特徴づけるために、IHCが、TRA-1-60、SSEA4、TRA-1-81、SSEA3およびSSEA1を含む胎児性表面マーカー抗体を用いてヒトES細胞に対して行われた。TF増殖因子およびTLF増殖因子が補充された培養における17回および38回の継代培養の後、I-3、I-6のヒトES細胞は、段階特異的な胎児性抗原4 (SSEA4)、腫瘍拒絶抗原 (TRA) - 1およびTRA-1-81の大きい発現レベルが明らかにされた (図1e~図1h)。これらのマーカーは未分化ES細胞の典型的な特徴である [Thomson JA他 (1998)、ヒト胚盤胞に由来する胚性幹細胞株、Science、282: 1145~7; Thomson JA他 (1996)、コモンマームセット (Callithrix jacchus) の胚盤胞に由来する多能性細胞株、Biol. Reprod.、55: 254~9; Thomson JA他 (1995)、霊長類胚性幹細胞物の単離、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92: 7844~8]。特筆すべきことに、段階特異的な胎児性抗原3 (SSEA3) が適度に発現していただけであり、一方、段階特異的

40

50

な胎児性抗原 1 (S S E A 1) (マウス E S 細胞の特異マーカー) の発現は検出されなかった (データは示されず) 。

【 0 1 4 7 】

これらの結果は、 T F または T L F の増殖因子が補充された支持細胞非含有培養システムは、長期間の培養期間の後でさえ、ヒト E S 細胞を未分化状態で維持することができることを明らかにしている。

【 0 1 4 8 】

(実施例 3)

異種非含有培地が補充された支持細胞非含有培養システムは機能的な E S 細胞の成長を助ける

血清代替物および異種非含有増殖因子が補充されたフィブロネクチン型支持細胞非含有の培養システムで成長したヒト E S 細胞が、インビトロで胚様体を形成し、かつインビボで奇形腫を形成するその能力について調べられた。

【 0 1 4 9 】

材料および実験方法

ヒト E S 細胞からの胚様体 (E B) の形成 - 支持細胞非含有培養システムで成長したヒト E S 細胞を I V 型コラゲナーゼ (1 m g / m l) によって 6 ウエルプレート (4 0 c m ² ~ 6 0 c m ²) 培養物から取り出し、 1 0 0 0 μ l の G i l s o n ピペットチップを使用して小さい塊にさらに解離させた。その後、解離した細胞を、 2 0 % の規定されたウシ胎児血清 (F B S d 、 H y C l o n e (U t a h 、 米 国)) が補充された 8 0 % の K o - D M E M 、 1 m M の L - グルタミン、 0 . 1 m M の β - メルカプトエタノール、および 1 % の非必須アミノ酸ストック液からなる培地で 5 8 m m ペトリディッシュ (G r e i n e r 、 ドイツ) において培養した。別途記されない限り、すべてが G i b c o I n v i t r o g e n c o r p o r a t i o n (米 国) から購入された。 E B の形成が懸濁状態で 1 4 日後に調べられた。

【 0 1 5 0 】

奇形腫の形成 - E S 細胞を 6 ウエルプレート (6 0 c m ²) における 6 個のコンフルエントなウエルから取り出し、 4 週齢のオス S C I D ベージュマウス (H a r l a n (J e r u s a l e m 、 イスラエル)) の後脚筋肉に注射した。注射後少なくとも 1 2 週目に、得られた奇形腫はホルムアルデヒドにおいて固定処理され、組織学的に調べられた。

【 0 1 5 1 】

逆転写酵素 (R T) 結合 P C R - 総 R N A を、 1 7 回 ~ 2 5 回の継代培養にわたって支持細胞非含有培養システムで成長した未分化のヒト E S 細胞、または、支持細胞非含有条件で成長した E S 細胞から得られた 1 4 日齢の E B のいずれかから、 T r i 試薬キット (S i g m a - A l d r i c h C o r p . (S t . L o u i s 、 M O 、 米 国)) を製造者のプロトコルに従って使用して単離した。 c D N A 合成が、 M M L V R T - R N a s e H - マイナス (P r o m e g a C o r p . (M a d i s o n 、 W I 、 米 国)) を製造者の説明書に従って使用して 1 μ g の総 R N A テンプレートに対して行われた。 P C R プライマーおよび反応条件が本明細書中下記の表 1 に記載される。すべての P C R 反応は、 9 4 ° C で 5 分間の最初の鎖の変性を含んだ。 P C R 生成物は、 2 % アガロースゲル電気泳動を使用してサイズ分画された。

10

20

30

40

【表 1】

表 1 : PCRプライマーおよびPCR条件

遺伝子産物 (アクセション番号)	配列番号	フォワード(F)プライマーおよびリバース(R)プライマー (5'→3')	反応条件	サイズ(bp)
Oct-4 (S81255)	配列番号: 1 配列番号: 2	F: GAGAACAATGAGAACCTTCAGGA R: TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	30 サイクル, 60 °Cでアニーリング, 1.5 mM MgCl ₂ 中	219
アルブミン (AF542069)	配列番号: 3 配列番号: 4	F: TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG R: AAGGCAAGTCAGCAGCCATCTCAT	35 サイクル, 60 °Cでアニーリング, 1.5 mM MgCl ₂ 中	302
α-フェトプロテイン (BC027881)	配列番号: 5 配列番号: 6	F: GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAA R: TCCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAAT	30 サイクル, 60 °Cでアニーリング, 1.5 mM MgCl ₂ 中	216
NF-68KD (AY156690)	配列番号: 7 配列番号: 8	F: GAGTGAAATGGCACGATACCTA R: TTTCTCTCCTTCTTCACCTTC	30 サイクル, 60 °Cでアニーリング, 2 mM MgCl ₂ 中	473
α-心臓アクチン (NM_005159)	配列番号: 9 配列番号: 10	F: GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC R: AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	35 サイクル, 65 °Cでアニーリング, 2 mM MgCl ₂ 中	486
LIF-受容体 (NM_002310)	配列番号: 11 配列番号: 12	F: CAAAAGAGTGTCTGTGAG R: CCATGTATTACATTGGC	35 サイクル, 61 °Cでアニーリング, 1.5 mM MgCl ₂ 中	459
β-アクチン (NM_001101)	配列番号: 13 配列番号: 14	F: ATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCG R: CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	35 サイクル, 62 °Cでアニーリング, 1.5 mM MgCl ₂ 中	838

【 0 1 5 2 】

実験結果

E S細胞は、支持細胞非含有培養システムから取り出された後、インビトロで胚の胚葉細胞タイプに自然分化する - フィブロネクチンに基づく支持細胞非含有の培養システムで培養されたヒト E S細胞が、支持細胞に基づくプロトコルによって得られるヒト E S細胞と、表現型だけでなく、機能的に一致することを確認するために、E S細胞を、T L Fにおける22回 ~ 30回の継代培養の後、およびT Fにおける28回の継代培養の後の支持細胞非含有培養から取り出して、懸濁状態で成長させた。結果として、h E S細胞は、M E Fにおいて成長したE S細胞によって生じた胚様体 (E B) と類似する胚様体を形成した (図 2 a ~ 図 2 c)。単離されたE Bの機能性が、様々な胎児性細胞マーカーを使用するI H Cによってさらに調べられた。図 2 d ~ 図 2 f にさらに示されるように、E Bは、外胚葉起源に由来する神経特異的チューブリン、平滑筋アクチン、および中胚葉起源のC D - 3 1マーカーを発現した。

【 0 1 5 3 】

E B内におけるE S一致の遺伝子発現が、R T - P C Rを使用してさらに確認された。E B内において、幹細胞は胚の3つの胚葉 (すなわち、中胚葉、内胚葉および外胚葉) の代表的な細胞に分化した。図 3 に示されるように、T L FまたはT Fが補充された支持細胞非含有培養システムで成長した未分化E S細胞は、高レベルのO c t 4 (図 3)、すなわち、多能性の胚性幹細胞および胚性生殖細胞についてのマーカー [P e s c e MおよびS c h o l e r H R、O c t - 4 : 哺乳動物発生の開始におけるゲートキーパー、(2 0 0 1)、S t e m C e l l s、1 9 : 2 7 1 ~ 8] を発現したが、14日齢のE Bから集められた細胞は、胚の外胚葉と関連づけられる神経フィラメント (N F - 6 8 k D)、胚の中胚葉に関連する - 心臓アクチン、ならびに、ともに胚の内胚葉の指標である - フェトプロテインおよびアルブミンを含む、細胞分化に関連する様々な遺伝子を発現した。E Bサンプルにおける低下したO c t 4発現は、全能性細胞が体細胞系譜に分化した後における低下したO c t 4発現の以前の報告 [T h o m s o n J A他 (1 9 9 8)、ヒト胚盤胞に由来する胚性幹細胞株、S c i e n c e、2 8 2 : 1 1 4 5 ~ 7 ; R e u

binoff BE他(2000)、ヒト胚盤胞由来の胚性幹細胞株：インビトロでの体細胞分化、Nat. Biotechnol.、18：399～404]と一致していた。以前に他のところで報告されているように[Sculdiner M.他、ヒトES細胞に由来する細胞の分化に対する8個の増殖因子の影響、Proc Natl Acad Sci USA、97：11307～12(2000)；Amit、M.他、ヒト胚性幹細胞株のためのヒト支持細胞層、Biol. Reprod.、68：2150～2156(2003)；Kehat, I.他、ヒト胚性幹細胞株は心筋細胞の構造的性質および機能的性質を有する筋細胞に分化することができる、J Clin Invest、108：407～14(2001)]、ES細胞培養物はある程度のバックグラウンド分化を有し得る。実際に、細胞特異的遺伝の一部(アルブミンおよび - 心臓アクチンなど)はまた、本発明の未分化ES細胞においても発現した(図3)。

10

【0154】

従って、これらの結果は、本発明の支持細胞非含有培養で成長したヒトES細胞は、様々な体細胞系譜に分化する細胞とともに機能的なEBを生じさせることができることを明らかにしている。

【0155】

支持細胞非含有培養で成長したヒトES細胞はインビボで胚の胚葉に分化する - 胚の胚葉へのヒトES細胞の分化を助ける本発明の支持細胞非含有培養システムの能力をさらに立証するために、ES細胞は、インビボでの奇形腫形成について調べられた。SCIDベージュマウスへの注射の後、TLFにおいて26回および19回の継代培養にわたってそれぞれ培養されていたI-3細胞およびI-6細胞は奇形腫を形成することができた。それぞれの奇形腫は、外胚葉起源の有髄神経(図4a)、中胚葉起源であるヒアリン軟骨の詳細(図4b)、および、内胚葉と関連づけられる、杯細胞が多い分泌上皮(図4c)を含む胚の3つの胚葉の代表的な組織を含有していた。

20

【0156】

まとめると、本発明の支持細胞非含有培養システムで成長したヒトES細胞は、このように、支持細胞に基づく培養で成長した細胞と機能的に異なっていた。分化後、ES細胞は、胚の3つの胚葉のすべてに関連する遺伝子をインビトロで発現し、同様に、3つの胚葉のすべてから生じる組織からなる奇形腫をインビボで形成した。他の支持細胞非含有プロトコルとは異なり、本発明の培養システムは、ヒトES細胞を増殖させるために好適な十分に規定された異種非含有の培養培地を含有した。

30

【0157】

(実施例4)

完全な異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムは、表現型が一致するヒトES細胞を成長させるために好適である

動物非存在の環境はヒトES細胞の何らかの将来の臨床的使用のためには非常に重要であるので、完全な異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムが、hES細胞を培養するためのマトリックスとしてヒト起源のフィブロネクチン、ならびに、異種非含有の補充された培地、および増殖因子を使用して開発された。

【0158】

実験結果

異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムはヒトES細胞の成長を助ける - hES細胞培養のための完全な動物非存在の十分に規定された環境を得るために、ヒト起源のフィブロネクチンが支持細胞非含有培養システムとして使用された。培養培地には、本明細書中上記の実施例1における材料および実験方法で記載されるように、T、LF、TFおよびTLFの増殖因子組合せが補充された血清代替物(15%)が含まれた。ヒト血漿フィブロネクチン(ヒト血漿から得られるフィブロネクチン(Sigma, St. Louis, MO, 米国))および細胞フィブロネクチン(ヒト包皮繊維芽細胞から得られる細胞フィブロネクチン(Sigma, St. Louis, MO, 米国))はともに、TFおよびTLFの両方の増殖因子組合せの存在下で少なくとも38回の継代培養(約110回の

40

50

倍加)にわたってhES細胞の未分化成長を助けることが見出された。また、本発明のフィブロネクチン-支持細胞非含有システムでの継代培養から4日目において、hES細胞培養物は、MEFにおいて成長したhES細胞の倍加時間と一致する30時間~35時間の倍加時間を有する、85%~90%の未分化細胞からなった。このことは、hES細胞の正常な成長を伝えるこれらの異種非含有培養システムの能力を明らかにしている。

【0159】

これらの結果は、長く持続する増殖性かつ未分化のヒトES細胞培養物の成長を助ける、異種非含有培養システムが補充されたヒト起源のフィブロネクチンの能力を明らかにしている。

【0160】

異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムで成長したヒトES細胞は、ウシ由来フィブロネクチンに基づく支持細胞非含有の培養システムで成長したES細胞と表現型が区別することができない-血清代替物およびTF増殖因子が補充されたヒト細胞フィブロネクチン培養システムで22回の継代培養にわたって成長した細胞は未分化細胞の形態学を保持していた。ES細胞は、大きい核対細胞質比率、1個~3個の核の特筆すべき存在、および、細胞間の典型的な間隔を伴って、小さく、かつ円形であった(図5a~5c)。

【0161】

また、異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムで成長したヒトES細胞は、32回の継代培養の後で正常な核型を有することが見出された(示されず)。

【0162】

その上、IHCによってさらに解明されたように、完全な異種非含有かつ支持細胞非含有のシステムで16回の継代培養にわたって培養されたヒトES細胞は、TRA-1-60、SSEA4、TRA-1-81を含むすべての特徴的な胎児性表面マーカーを発現した(図5d~図5f)。

【0163】

従って、これらの結果は、正常かつ安定な核型を有する非常に増殖性の培養を維持し、かつ、すべての典型的な胎児性表面マーカーを発現する、表現型が一致するヒトES細胞を助ける完全な異種非含有かつ支持細胞非含有のシステムの能力を明らかにしている。

【0164】

従って、これらの結果から、ヒトES細胞の誘導および培養のための本発明の異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムの使用が示唆される。

【0165】

(実施例5)

完全な異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムで成長したヒトES細胞は、他の培養システムで成長したES細胞と機能的に区別することができない

血清代替物および異種非含有増殖因子が補充されたヒトフィブロネクチン型支持細胞非含有培養システムで成長したヒトES細胞が、インビボで胚様体を形成するその能力について調べられた。

【0166】

ES細胞は、支持細胞非含有培養システムから取り出された後、インビトロで胚の胚葉細胞タイプに自然分化する-異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムで培養されたヒトES細胞が、支持細胞に基づくプロトコルによって得られるヒトES細胞と、表現型だけでなく、機能が一致することを確認するために、ES細胞を、ヒト細胞フィブロネクチンマトリックスおよびヒト血漿フィブロネクチンマトリックスにおいてそれぞれ、17回および16回の継代培養の後の支持細胞非含有培養から取り出した。結果として、hES細胞は、MEFにおいて成長したES細胞によって生じた胚様体(EB)と類似する胚様体を形成した(図6a~図6c)。

【0167】

EB内におけるES一致の遺伝子発現が、RT-PCRを使用してさらに確認された。EB内において、幹細胞は胚の3つの胚葉(すなわち、中胚葉、内胚葉および外胚葉)の

10

20

30

40

50

代表的な細胞に分化した。図7に示されるように、T L FまたはT Fが補充された異種非含有かつ支持細胞非含有の培養システムで成長した未分化細胞は高レベルのO c t 4およびL I F受容体を発現した(図7)が、14日齢のE Bから集められた細胞は、胚の外胚葉と関連づけられる神経フィラメント(N F - 6 8 k D)、胚の中胚葉に関連する - 心臓アクチン、ならびに、ともに胚の内胚葉の指標である - フェトプロテインおよびアルブミンを含む、細胞分化に関連する様々な遺伝子を発現した。

【0168】

従って、これらの結果は、本発明の完全な異種非含有かつ支持細胞非含有の培養で成長したヒトE S細胞は、様々な体細胞系譜に分化する細胞とともに機能的なE Bを生じさせることができることを明らかにしている。

【0169】

(実施例6)

支持細胞非含有培養システムは未分化のヒト胚性幹細胞の正常な成長速度および大きい割合を支える

ヒト胚性幹細胞を増殖する支持細胞非含有培養システムの能力をさらに特徴づけるために、未分化幹細胞の成長速度および割合が、様々な培養条件のもとでのh E S細胞において明らかにされた。

【0170】

支持細胞非含有培養システムは、支持細胞に基づく培養システムと類似する、未分化ヒトE S細胞の正常な成長速度および大きい割合を維持する - h E Sの成長を助ける本発明の支持細胞非含有培養システムの能力を明らかにするために、未分化幹細胞の成長速度および割合が支持細胞非含有培養システムにおいて測定された。図8 a ~ 図8 cに示されるように、h E S細胞がT L F組合せの増殖因子の存在下でウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて培養されたとき、I - 3 h E S細胞の成長速度(図8 a、ピンク色曲線)、I - 6 h E S細胞の成長速度(図8 b、ピンク色曲線)およびH - 9 h E S細胞の成長速度(図8 c、ピンク色曲線)は、M E Fにおいて培養されたh E S細胞の成長速度と類似していた。その上、h E S細胞がT F組合せの増殖因子のみの存在下でヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて培養されたとき、I - 3 h E S細胞の成長速度(図8 a、明青色曲線)、I - 6 h E S細胞の成長速度(図8 b、明青色曲線)およびH - 9 h E S細胞の成長速度(図8 c、明青色曲線)は、M E Fにおいて培養されたh E S細胞の成長速度と類似していた。他方で、これらの細胞がT F組合せの増殖因子の存在下でウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて培養されたとき、I - 3 h E S細胞の成長速度(図8 a、黒色曲線)、I - 6 h E S細胞の成長速度(図8 b、黒色曲線)およびH - 9 h E S細胞の成長速度(図8 c、黒色曲線)の成長速度は、M E Fにおいて培養されたh E S細胞の成長速度と比較して低くなっていた。従って、T L F組合せの増殖因子が補充されたウシフィブロネクチンマトリックス、および、T F組合せの増殖因子のみが補充されたヒトフィブロネクチンマトリックスは、M E Fにおいて達成される成長速度と類似するh E S細胞の大きい正常な成長速度を助けている。

【0171】

支持細胞非含有培養システムで培養されたヒトE S細胞は未分化細胞の大きい割合を維持する - 未分化h E S細胞株を増殖する本発明の支持細胞非含有システムの能力をさらに特徴づけるために、未分化細胞の割合が、培養での4日後、6日後および10日後に測定された。図8 dに示されるように、h E S細胞が、T F組合せまたはT L F組合せの増殖因子の存在下、ヒト由来のフィブロネクチンマトリックスまたはウシ由来のフィブロネクチンマトリックスのいずれかにおいて培養されたとき、細胞の大きな割合(85%~90%)が、培養での6日後でさえ、未分化のままであった。他方で、h E S細胞が、L T組合せ、L F組合せ、T組合せまたはF組合せの増殖因子の存在下でウシフィブロネクチンマトリックスにおいて培養されたとき、未分化細胞の割合は、培養での4日後において77%~85%であり、培養での6日後には60%~75%に減少した。従って、これらの結果は、フィブロネクチンおよびT F増殖因子またはT L F増殖因子を利用する本発明の

10

20

30

40

50

支持細胞非含有培養システムが、MEFのもとで達成される割合と同様な未分化細胞の大きな割合を維持することができることを明らかにしている。

【0172】

(実施例7)

TLF組合せおよびTF組合せの増殖因子は他の支持細胞非含有培養システムでES細胞を維持するために好適である

他の支持細胞非含有システムを補うTLF組合せおよびTF組合せの増殖因子の能力をさらに立証するために、さらなるマトリックスが使用されている。

【0173】

実験結果

最初にMEFにおいて培養されたヒトES細胞を下記の支持細胞非含有培養システムに移した：Matrigel^{RTM}、自家製のMEFマトリックス、および自家製の包皮繊維芽細胞マトリックス、これらはすべて、血清代替物および選択された組合せの増殖因子が補充された。TLF組合せまたはTF組合せの増殖因子を使用したとき、hES細胞は、Matrigel^{RTM}、MEFマトリックスおよび包皮繊維芽細胞マトリックスにおいて問題なく成長した(図9a~図9f)。Matrigel^{RTM}マトリックスまたはMEFマトリックスのいずれかが利用されたとき、細胞は(120日を越える)未分化状態で30回の継代培養を越え、EBを生じさせ、奇形腫を形成した(図10c~図10f)。しかしながら、これらのマトリックスは動物非存在でもなく、また、十分に規定されたものでもなく、このため、フィブロネクチンには好都合な選択肢が残っている。

【0174】

ES細胞が、SRと、TF増殖因子およびTLF増殖因子とが補充された包皮繊維芽細胞マトリックスにおいて成長したとき、細胞は(20日を越える)未分化状態で5回の継代培養を越え、典型的なES細胞の形態学的特徴を持続した(図9a)。このマトリックスは動物非存在かつ支持細胞非含有の培養システムであるが、包皮繊維芽細胞マトリックスは、フィブロネクチンマトリックスと比較した場合、十分に規定されたシステムではない。

【0175】

従って、これらの結果は、血清代替物およびTLF組合せまたはTF組合せの増殖因子からなる異種非含有の十分に規定された培養培地は、様々な支持細胞非含有培養システムにおいてhES細胞を維持および増殖するために好適であることを明らかにしている。

【0176】

明確にするために異なる実施形態の状況について記載してきた本発明の一定の特徴は、1つの実施形態において組み合わせ得ることもできることが認識される。逆に、簡潔にするために1つの実施形態の状況について記載した本発明の種々の特徴を、個別または任意の適切な組み合わせで得ることもできる。

【0177】

本発明を特定の実施形態と共に記載しているが、多数の変更形態、修正形態、および変形形態が当業者に明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれるこのような全ての変更形態、修正形態、および変形形態が含まれることが意図される。全ての刊行物、本明細書中に記載した特許および特許出願は、その全体が、それぞれの刊行物、本明細書中に記載した特許および特許出願があたかも特別または個別に本明細書中で参考として援用されるように示されるような範囲に本明細書中で参考として援用される。さらに、本出願における任意の引例の引用または識別により、このような引例が先行技術として本発明で利用可能であることを承認すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】図1a~図1dは、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したES細胞コロニーおよび単一ES細胞を例示する顕微鏡写真である。図1e~図1hは、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリ

10

20

30

40

50

ックスにおいて成長したヒト I - 3 E S 細胞株および I - 6 E S 細胞株における未分化細胞に典型的な表面マーカーの発現を例示する免疫組織化学顕微鏡写真である。

【図 2】図 2 a ~ 図 2 c は、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長した h E S 細胞のインビトロ分化を例示する。図 2 d ~ 図 2 f は、本発明の支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおける様々な培地において成長した E S 細胞から形成された 1 4 日齢の E B に由来する細胞における中胚葉および外胚葉の代表的なマーカーの発現を例示する。

【図 3】支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長した I - 3 E S 細胞または I - 6 E S 細胞の分化段階およびそれらに由来する胚様体 (E B) の分化段階の R T - P C R 決定を例示する。

10

【図 4】図 4 a ~ 図 4 c は、支持細胞非含有システムでウシ由来のフィブロネクチンマトリックスでの T L F においてそれぞれ 2 6 回および 1 9 回の継代培養にわたって成長した I - 3 E S 細胞株および I - 6 E S 細胞株に由来する奇形腫の組織学的断面を例示する。

【図 5 a - c】支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長した E S 細胞コロニーを例示する形態学顕微鏡写真である。

【図 5 d - f】支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長したヒト I - 3 E S 細胞株およびヒト H - 9 E S 細胞株における未分化細胞に典型的な表面マーカーの発現を例示する免疫組織化学顕微鏡写真である。

【図 6】図 6 a ~ 図 6 c は、異種非含有かつ支持細胞非含有の状態のもとでヒトフィブロネクチンマトリックスにおいて成長した h E S 細胞のインビトロ分化を例示する。

20

【図 7】支持細胞非含有システムでヒト由来のフィブロネクチンマトリックスにおいて成長した I - 3 細胞の分化段階およびそれらに由来する胚様体 (E B) の分化段階の R T - P C R 決定を例示する。

【図 8】図 8 a ~ 図 8 c は、様々な培養条件のもとでの I - 3 h E S 細胞株の成長速度 (図 8 a)、I - 6 h E S 細胞株の成長速度 (図 8 b) および H - 9 h E S 細胞株の成長速度 (図 8 c) を例示する。図 8 d は、未分化 h E S 細胞の成長を助ける様々な培養条件の能力を例示する棒グラフである。

【図 9】図 9 a ~ 図 9 f は、様々な条件のもとでの支持細胞非含有システムで成長したヒト E S 細胞およびヒト E S 細胞コロニーを例示する。

【図 10】図 10 a ~ 図 10 f は、フィブロネクチン (図 10 a および図 10 b)、M E F マトリックス (図 10 c、図 10 e および図 10 f) または M a t r i g e l ^{R T M} (図 10 d) において成長した I - 6 E S 細胞株および I - 3 E S 細胞株に由来する S C I D ページマウスにおける奇形腫の組織学的断面を例示する。

30

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 7 9 】

配列番号 1 ~ 1 4 は一本鎖 D N A オリゴヌクレオチドの配列である。

【 8 】

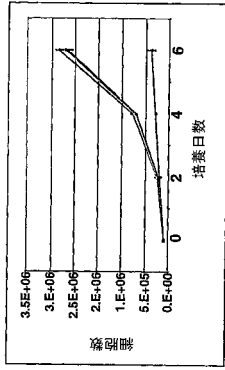


Fig. 8b

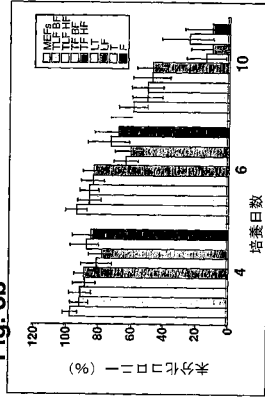


Fig. 8d

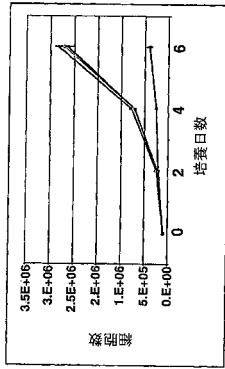


Fig. 8a

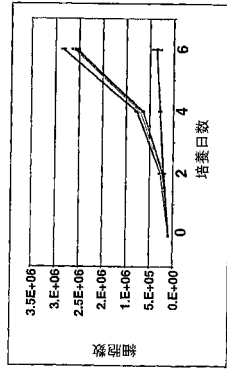
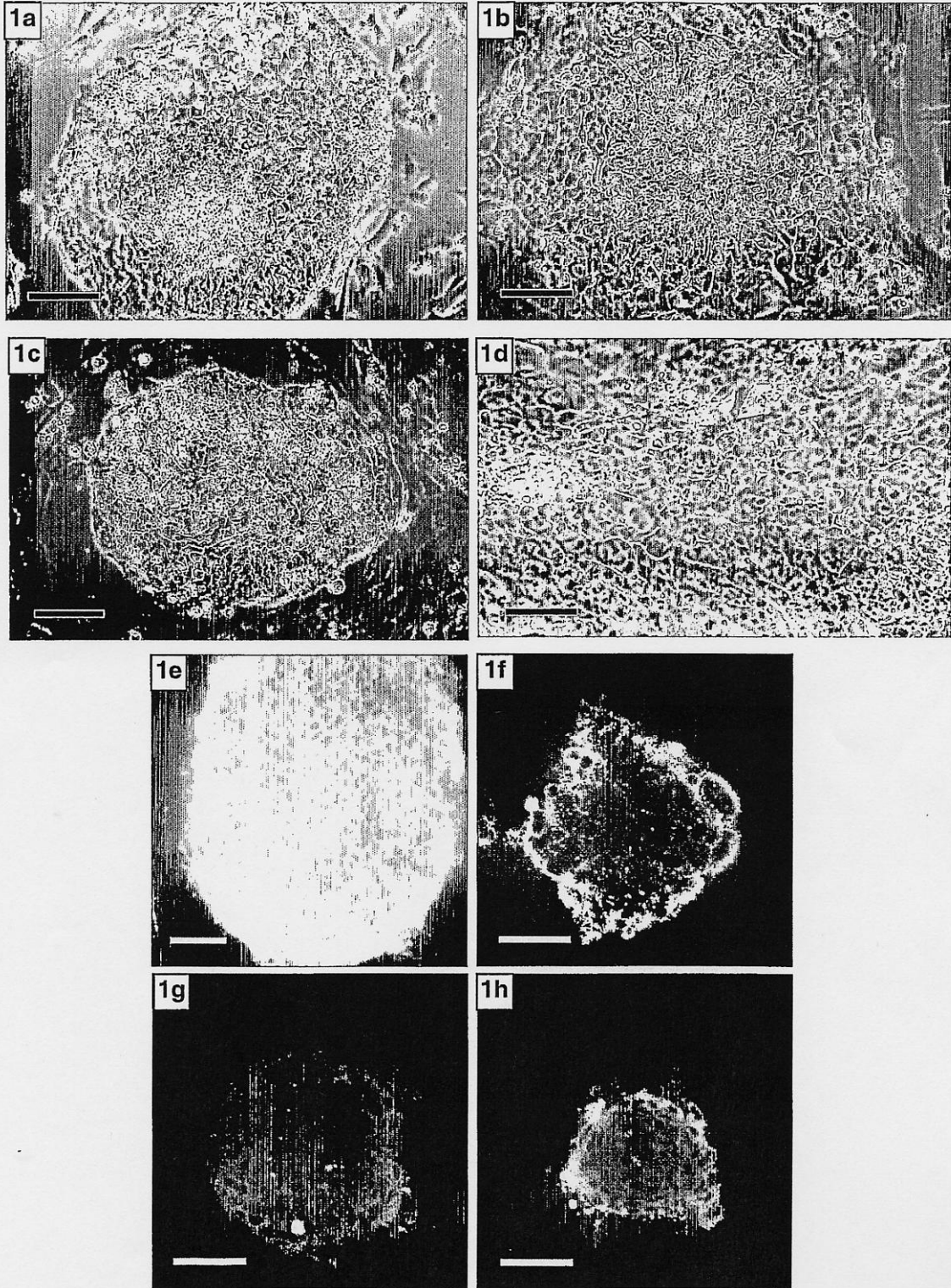


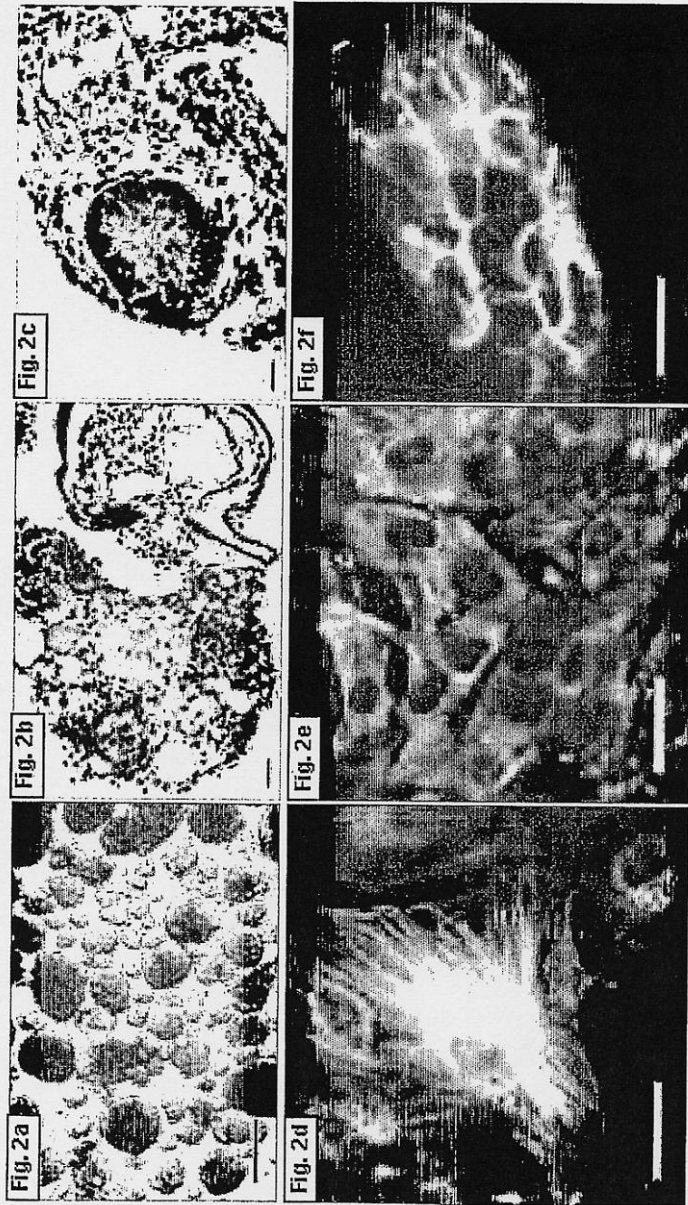
Fig. 8c

【 図 1 】



Figs. 1a-h

【 図 2 】



Figs. 2a-f

【図3】

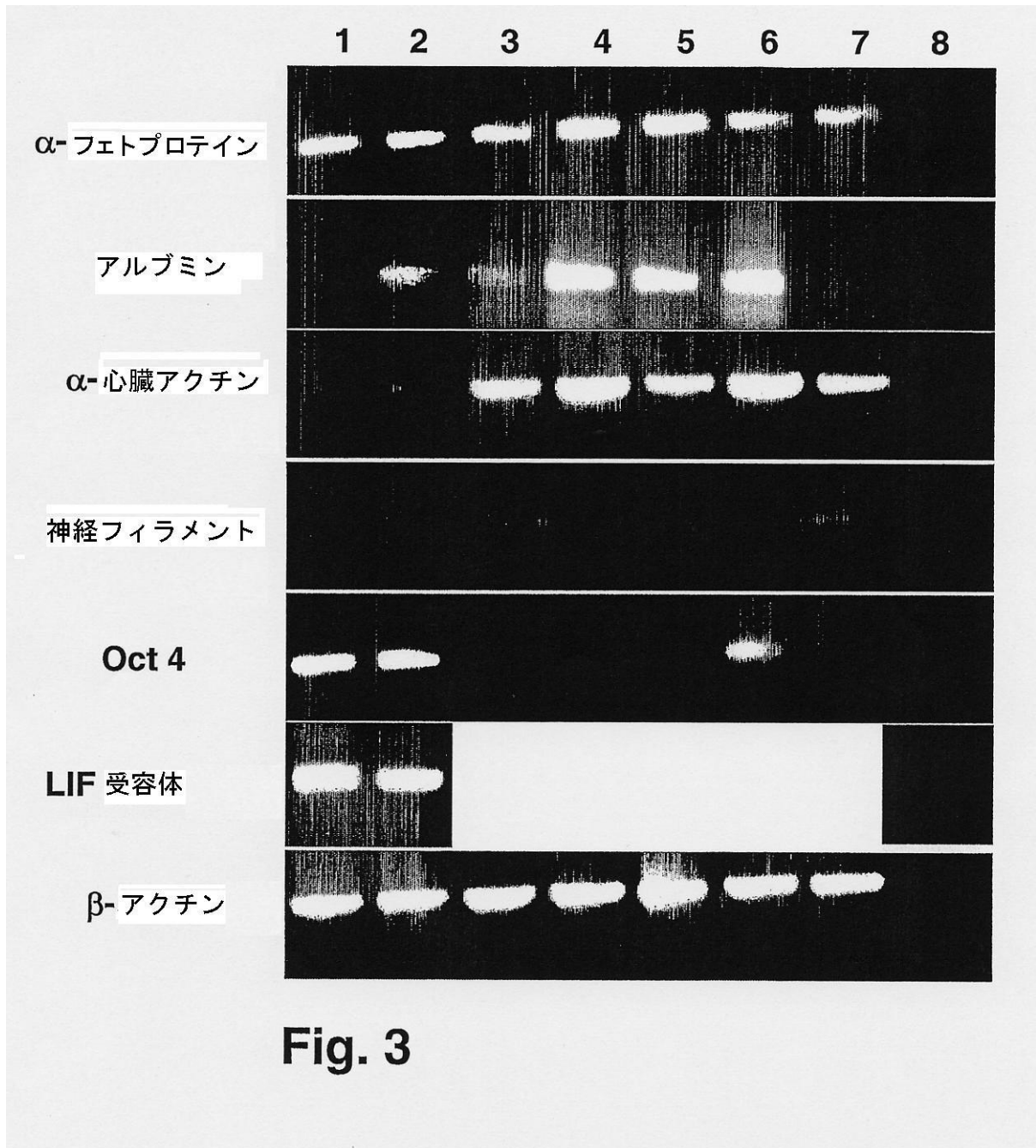
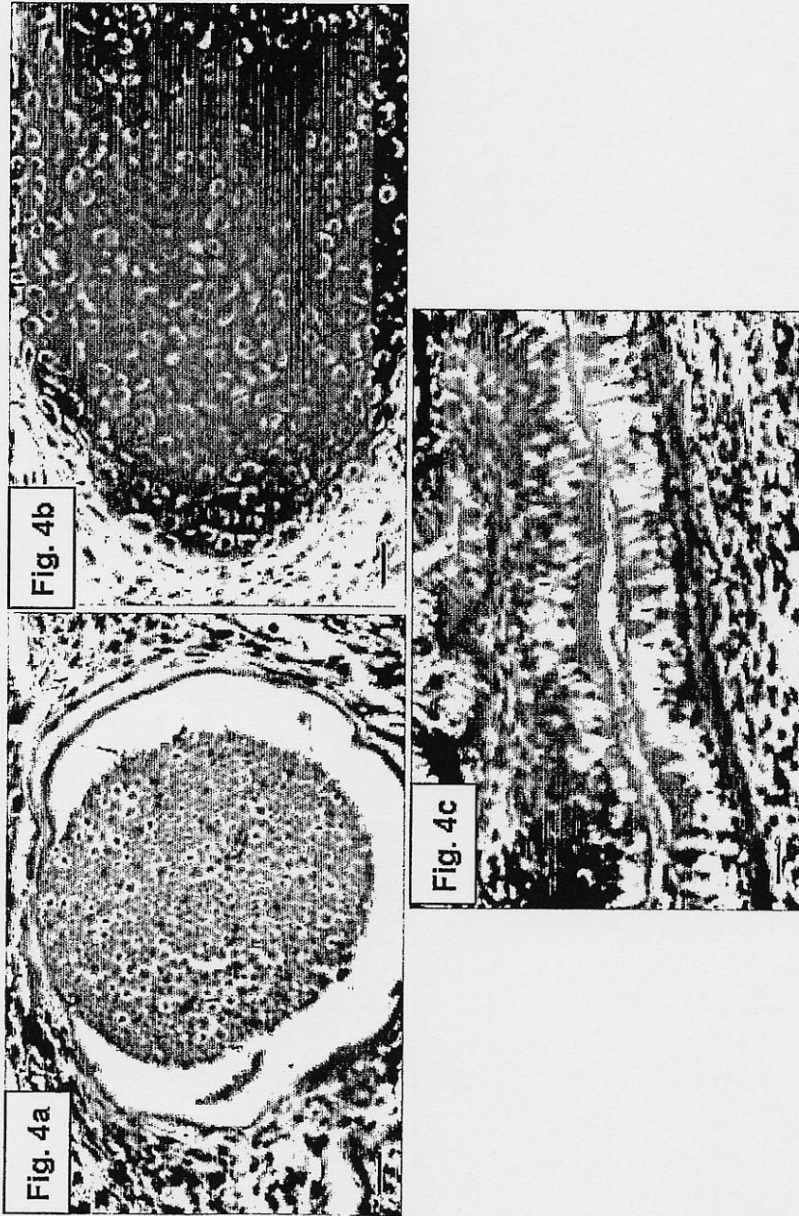



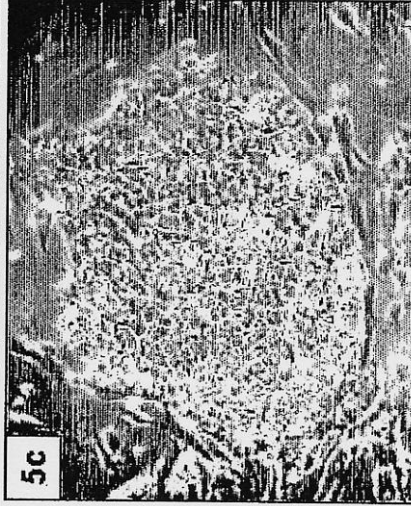
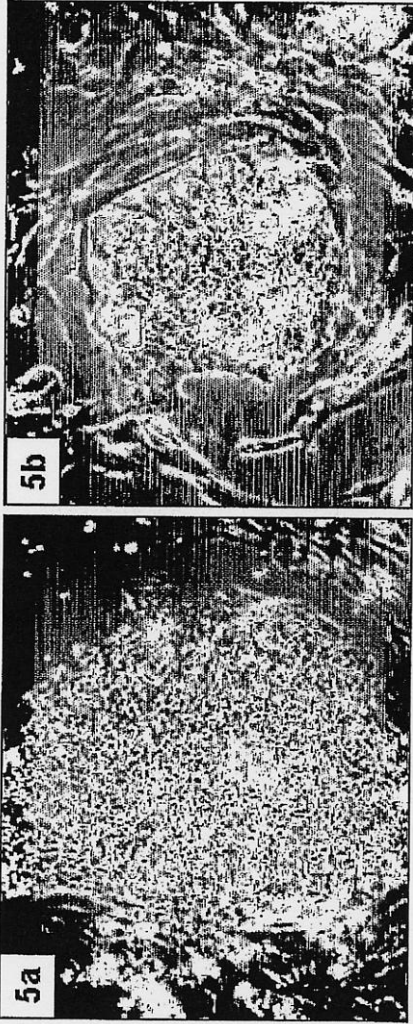
Fig. 3

【 図 4 】



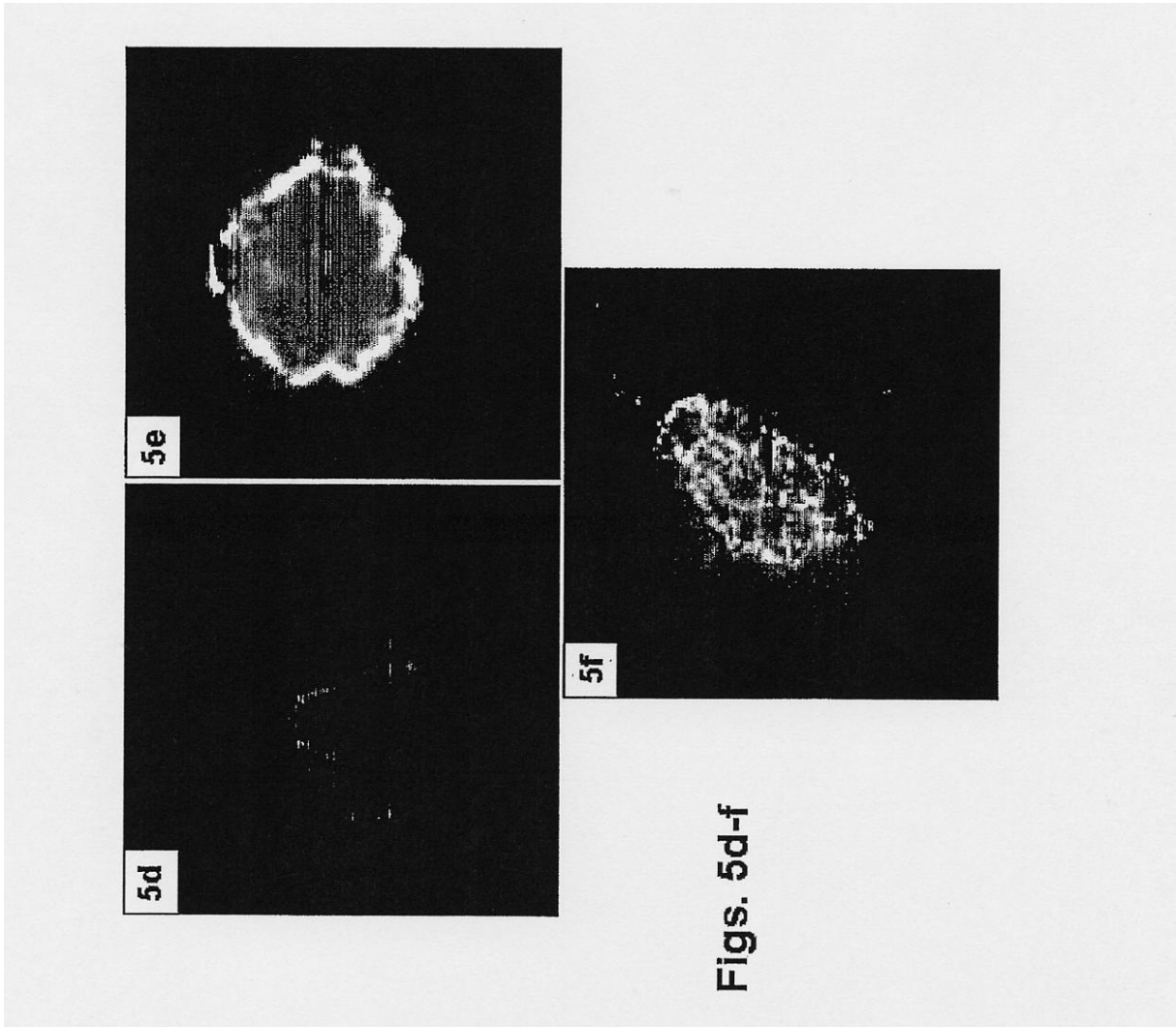
Figs. 4a-c

【 5 a - c】



Figs. 5a-c

【 5 d - f】



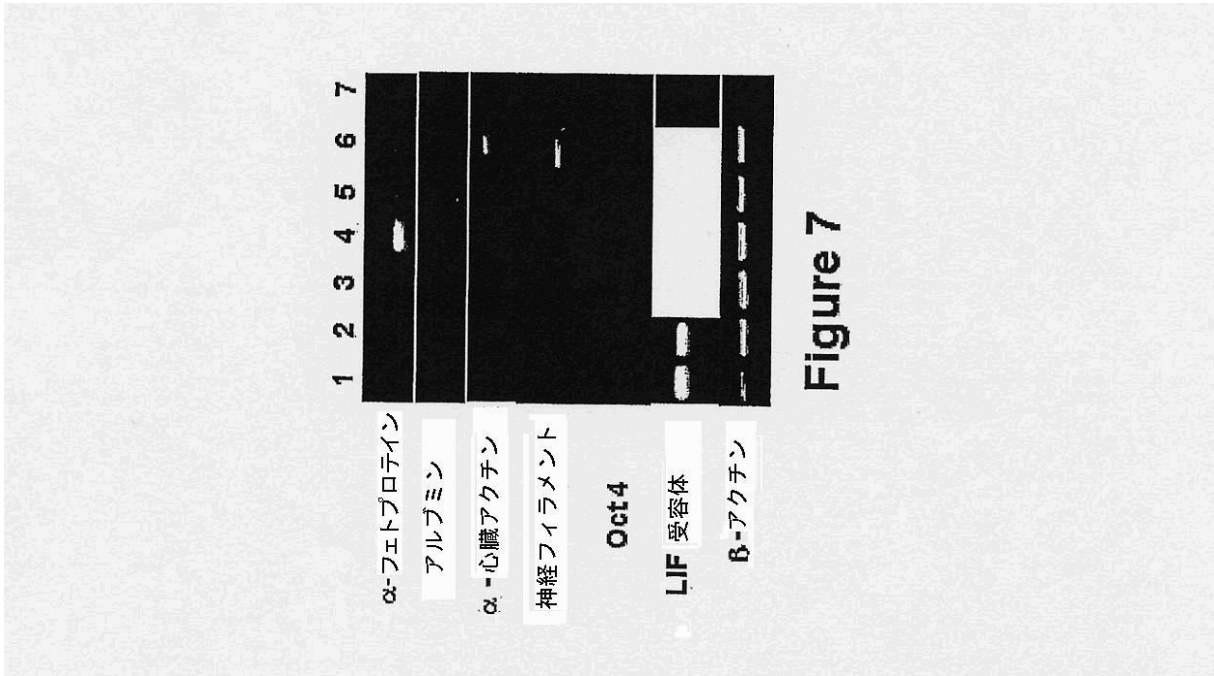
Figs. 5d-f

【 図 6 】

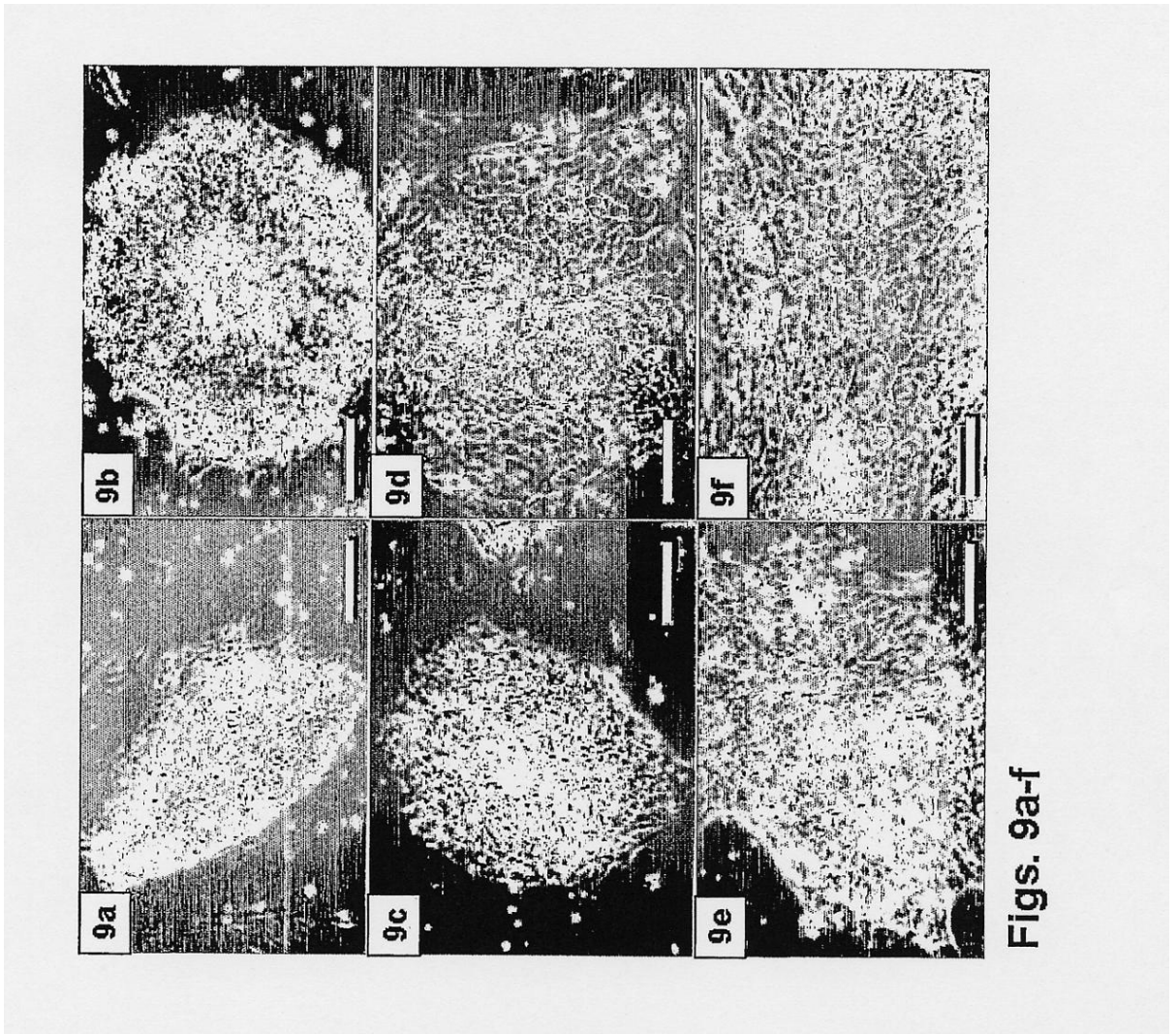


Figs. 6a-c

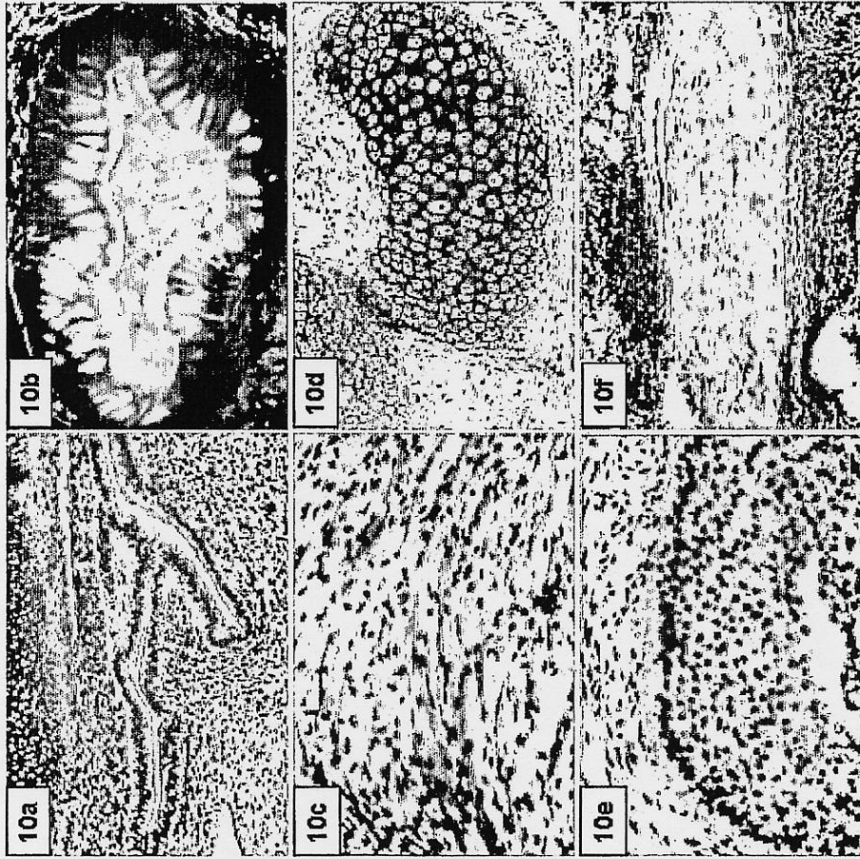
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 10 】



Figs. 10a-f

【 配列表 】

[0004613069000001.xml](#)

フロントページの続き

(72)発明者 イツコビッツ エルドア, ジョセフ
イスラエル, 34 987 ハイファ, シェエリット ハブレタ ストリート 42

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第99/020741(WO, A1)
特開2001-017163(JP, A)
国際公開第01/088104(WO, A1)
国際公開第01/051616(WO, A1)
特表平03-503241(JP, A)
Nat Biotechnol. 2001 Oct;19(10):971-4.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/0735
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
Science Direct
Wiley InterScience
CiNii