

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-535299

(P2019-535299A)

(43) 公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 T	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-528543 (P2019-528543)	(71) 出願人 517058945 プロセラ セラビューティクス アーペー スウェーデン国 146 21 トゥリン ゲ, ボックス 15, バクティガード アーペー 気付
(86) (22) 出願日 平成29年11月29日(2017.11.29)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日 令和1年7月1日(2019.7.1)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号 PCT/IB2017/001638	(74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 国際公開番号 W02018/100433	(74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)	(74) 代理人 230113332 弁護士 山本 健策
(31) 優先権主張番号 62/427,569	
(32) 優先日 平成28年11月29日(2016.11.29)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト心室前駆細胞を単離するための方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞(HVP)を単離する方法であって、TRA-1-60などのヒト多能性幹細胞上で発現される1つまたは複数の第1のマーカについて5~7日目の心筋前駆細胞の培養物を陰性選択し、それによってHVPを単離する方法を提供する。本方法は、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される第2のマーカの発現のための陽性選択をさらに含むことができる。第1のマーカ陰性/第2のマーカ陽性である単離されたHVPの、クローン集団を含む大きな集団も提供される。心臓修復のためのまたは心機能を向上させるためのHVPのインビボ使用の方法も提供される。試験化合物の心臓毒性スクリーニングのためのHVPの使用方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

心臓の心室前駆細胞を含む 5 ~ 7 日目の心筋前駆細胞の培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーと反応性の 1 つまたは複数の第 1 の作用物質と接触させること；および

第 1 のマーカー非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離すること

を含む方法。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシン、アルカリ性ホスファターゼ (AP)、およびその組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記培養物が、心筋前駆細胞の 6 日目の培養物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養物を、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 および TNFSF9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーに反応性の 1 つまたは複数の第 2 の作用物質とさらに接触させ；

第 2 のマーカー反応性の陽性細胞を、非反応性細胞から分離する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

1 つまたは複数の前記第 1 の作用物質との接触の前に、前記培養物を、1 つまたは複数の前記第 2 の作用物質と接触させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

1 つまたは複数の前記第 1 の作用物質との接触の後に、前記培養物を、1 つまたは複数の前記第 2 の作用物質と接触させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

1 つまたは複数の前記第 1 の作用物質との接触と同時に、前記培養物を、1 つまたは複数の前記第 2 の作用物質と接触させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 の作用物質が、前記第 1 のマーカーに結合する抗体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 2 の作用物質が、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 または TNFSF9 に結合する抗体である、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、LIFR である、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、JAG1 である、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、FZD4 である、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記第1のマーカ-が、TRA-1-60であり、前記第2のマーカ-が、FGFR3である、請求項5~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記第1のマーカ-が、TRA-1-60であり、前記第2のマーカ-が、TNFSF9である、請求項5~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記第1のマーカ-非反応性の陰性細胞が、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって反応性細胞から分離される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記第1のマーカ-非反応性の陰性細胞が、磁気活性化細胞選別(MACS)によって反応性細胞から分離される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項18】

前記第2のマーカ-反応性の陽性細胞が、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって非反応性細胞から分離される、請求項5~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記第2のマーカ-反応性の陽性細胞が、磁気活性化細胞選別(MACS)によって非反応性細胞から分離される、請求項5~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記ヒト心臓の心室前駆細胞を、それらがMLC2 ν 陽性になるように、さらに培養し、分化させる、請求項1~19のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項21】

ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

ヒト多能性幹細胞を、心筋前駆細胞を生成する条件下で培養して、5~7日目の心筋前駆細胞の培養物を得ること；

5~7日目の心筋前駆細胞の前記培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-と反応性の1つまたは複数の第1の作用物質と接触させること；および

第1のマーカ-非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離すること

を含む方法。

30

【請求項22】

少なくとも1つの前記第1のマーカ-が、TRA-1-60である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

少なくとも1つの前記第1のマーカ-が、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシン、アルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記培養物が、心筋前駆細胞の6日目の培養物である、請求項21に記載の方法。

40

【請求項25】

前記培養物を、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-に反応性の1つまたは複数の第2の作用物質とさらに接触させ；

第2のマーカ-反応性の陽性細胞を、非反応性細胞から分離する、請求項21~24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

1つまたは複数の前記第1の作用物質との接触の前に、前記培養物を、1つまたは複数の前記第2の作用物質と接触させる、請求項25に記載の方法。

50

【請求項 27】

1 つまたは複数の前記第 1 の作用物質との接触の後に、前記培養物を、1 つまたは複数の前記第 2 の作用物質と接触させる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

1 つまたは複数の前記第 1 の作用物質との接触と同時に、前記培養物を、1 つまたは複数の前記第 2 の作用物質と接触させる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 の作用物質が、前記第 1 のマーカーに結合する抗体である、請求項 21 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 2 の作用物質が、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 または TNFSF9 に結合する抗体である、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、LIFR である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカー、JAG1 である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、FZD4 である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、FGFR3 である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 1 のマーカーが、TRA-1-60 であり、前記第 2 のマーカーが、TNFSF9 である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 のマーカー非反応性の陰性細胞が、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって反応性細胞から分離される、請求項 21 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 のマーカー非反応性の陰性細胞が、磁気活性化細胞選別 (MACS) によって反応性細胞から分離される、請求項 21 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 2 のマーカー反応性の陽性細胞が、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって非反応性細胞から分離される、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 2 のマーカー反応性の陽性細胞が、磁気活性化細胞選別 (MACS) によって非反応性細胞から分離される、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記ヒト心臓の心室前駆細胞を、それらが MLC2v 陽性になるように、さらに培養し、分化させる、請求項 21 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団を得る方法であって、

単一のヒト心臓の心室前駆細胞を単離することであって、単一の前記ヒト心臓の心室前駆細胞が、(i) ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、(ii) JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 および TNFSF9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、単離すること；ならびに

前記第 1 のマーカー陰性 / 第 2 のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を、前記細胞

10

20

30

40

50

が少なくとも 1×10^9 細胞に拡大し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団が得られるような条件下で培養することを含む方法。

【請求項 4 2】

前記第 1 のマーカーが、TRA - 1 - 60 である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 のマーカーが、TRA - 1 - 60、TRA - 1 - 81、TRA - 2 - 54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ (AP)、およびその組合せからなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

前記単一の前記ヒト心臓の心室前駆細胞が、心臓前駆体培養 (CPC) 培地で培養される、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記単一の前記ヒト心臓の心室前駆細胞が、心室分化に偏るような条件下で培養される、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記単一の前記ヒト心臓の心室前駆細胞が、少なくとも 10×10^9 細胞に拡大される、請求項 4 1 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

請求項 4 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法によって得られる少なくとも 1×10^9 個のヒト心臓の心室前駆細胞 (HVP) のクローン集団。

20

【請求項 4 8】

少なくとも 1×10^6 個の精製されたヒト心臓の心室前駆細胞 (HVP) の単離された集団であって、HPVの前記集団は：(i) ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、(ii) JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 および TNFSF9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、集団。

【請求項 4 9】

前記第 1 のマーカーが、TRA - 1 - 60 である、請求項 4 8 に記載の単離された集団。

30

【請求項 5 0】

前記第 1 のマーカーが、TRA - 1 - 60、TRA - 1 - 81、TRA - 2 - 54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ (AP)、およびその組合せからなる群から選択される、請求項 4 8 に記載の単離された集団。

【請求項 5 1】

対象において心機能を増強する方法であって、請求項 4 8 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の HVP の集団を含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 5 2】

HVP の前記集団が、前記対象の心臓に直接的に投与される、請求項 5 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 3】

クローン集団が、前記対象の前記心臓の心室領域に直接的に投与される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記医薬組成物が、2次元または3次元のマトリックス上に製剤化された HVP の前記集団を含む、請求項 5 1 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記対象が、心筋梗塞を患っている、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 56】

前記対象が、先天性の心臓障害を有する、請求項 51～55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

ヒト心室組織を生成するための方法であって、

非ヒト動物の器官にヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を移植することであって、前記 HVP は、（i）ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、（ii）JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 および TNFSF9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、移植すること；ならびに

ヒト心室組織が生成されるように前記 HVP をインビボで成長させることを含む方法。

【請求項 58】

前記非ヒト動物が、免疫不全マウスである、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記器官が、腎臓または心臓である、請求項 57 または 58 に記載の方法。

【請求項 60】

以下の細胞マーカーパターン：（i）心臓中胚葉形成のピークの後；（ii）ピークの *Isl1* - 1 発現のとき；（iii）NKX2.5 発現のピークの前；（iv）下流遺伝子 *Mef2* および *Tbx1* のピーク発現の前；および（v）分化した収縮タンパク質遺伝子の発現の前のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つが存在するときに、前記 HVP が移植される、請求項 57～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記細胞が、ヒト心室前駆細胞を生成する条件下でのヒト多能性幹細胞のインビトロ培養の 5 日目と 7 日目の間（両端を含む）に移植される、請求項 57～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記細胞が、ヒト心室前駆細胞を生成する条件下でのヒト多能性幹細胞のインビトロ培養の 6 日目に移植される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

試験化合物の心臓毒性についてスクリーニングする方法であって、

ヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を提供することであって、前記 HVP は、（i）ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、（ii）JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3 および TNFSF9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、提供すること；

前記 HVP を前記試験化合物と接触させること；ならびに

前記 HVP への前記試験化合物の毒性を測定すること

を含み、

前記 HVP への前記試験化合物の毒性は、前記試験化合物の心臓毒性を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2016年11月29日に提出された米国仮出願番号第 62 / 427, 569 号に基づく優先権を主張しており、前述の出願の内容は、参考として本明細書によって援用される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

主に心筋梗塞により引き起こされる心不全は、世界中で成人と小児の両方における主要

10

20

30

40

50

な死因であり、世界中で急激に増加している (Bui, A. L. et al. (2011) Nat. Rev. Cardiol. 8: 30 - 41)。疾患は、心筋損傷中に生じる心室筋の喪失により主にもたらされ (Lin, Z. and Pu, W. T. (2014) Sci. Transl. Med. 6: 239rv1)、成人の心臓が再生反応を開始するごくわずかな能力により悪化する (Bergmann, O. et al. (2009) Science 324: 98 - 102; Senyo, S. E. et al. (2013) Nature 493: 433 - 436)。心臓移植は、治療的であり得るが、ヒト心臓器官ドナーの入手の可能性は著しく制限されており、純粋な、成熟かつ機能的ヒト心室筋組織の再生可能な供給源は、広範な臨床上の充足されていないニーズとなっている (Segers, V. F. M. and Lee, R. J. (2008) Nature 451: 937 - 942; Spater, D. et al. (2014) Development 141: 4418 - 4431)。

【0003】

ヒト多能性幹細胞 (hPSC) は、損傷したまたは病変した心臓における機能の潜在的な臨床的回復のため、多数の機能的な心筋細胞を生成する可能性を提供する。心機能を改善し、および/または損傷された心筋を富化し、再生するための幹細胞の心臓への移植が、提案されている (例えば、米国特許公開第20040180043号を参照)。成体の幹細胞が成長因子タンパク質での治療と併用して投与される併用療法もまた、提案されている (例えば、米国特許公開第20050214260号を参照)。

【0004】

心臓への細胞移植は心機能を向上させ、心臓組織を再生するための有望なアプローチを提供するが、どの細胞型を移植するかという問題は多くの調査の課題であった。心臓組織の再生で使用するために調査された細胞型には、骨髄細胞 (例えば、Orlic, D. ら (2001年) Nature 410 巻: 701 ~ 705 頁; Stamm, C. ら (2003年) Lancet 361 巻: 45 ~ 46 頁; Perin, E. C. ら (2003年) Circulation 107 巻: 2294 ~ 2302 頁を参照)、成体幹細胞 (例えば、Jackson, K. A. ら (2001年) J. Clin. Invest. 107 巻: 1395 ~ 1402 頁を参照)、骨髄由来の間葉性幹細胞 (例えば、Barbush, I. M. ら (2003年) Circulation 108 巻: 863 頁; Pettinger, M. F. および Martin, B. J. (2003年) Circ. Res. 95 巻: 9 ~ 20 頁を参照)、骨髄間質細胞 (Bittira, B. ら (2003年) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 24 巻: 393 ~ 398 頁)、間葉性幹細胞および胎児心筋細胞の組合せ (例えば、Min, J. Y. ら (2002年) Ann. Thorac. Surg. 74 巻: 1568 ~ 1575 頁を参照) ならびに、骨髄由来の単核細胞および骨髄由来の間葉性幹細胞の組合せ (例えば、米国特許出願公開第20080038229号を参照) が含まれる。移植のために心臓幹細胞を生成するためのインビトロでの成体哺乳動物心筋細胞の脱分化も、提案されている (例えば、米国特許出願公開第20100093089号を参照)。

【0005】

心機能を改善し、心臓組織を再生するための細胞移植のアプローチにおける大きな進歩は、心筋細胞、心平滑筋および心内皮細胞を生じる能力がある多能性心筋前駆細胞のファミリーの同定ならびに単離であった (Cai, C. L. et al. (2003) Dev. Cell. 5: 877 - 889; Moretti, A. et al. (2006) Cell 127: 1151 - 1165; Bu, L. et al. (2009) Nature 460: 113 - 117; 米国特許公開第20060246446号)。これらの心筋前駆細胞は、LIMホメオドメイン転写因子 *Isl1* (*Isl1*) の発現により特徴付けられ、したがって、*Isl1* + 心筋前駆細胞として言及される (前掲)。対照的に、*Isl1* は、分化した心臓細胞において発現しない。*Isl1* より、分化において後で生じる *Isl1* + 心臓前駆細胞のさらなるマーカーが、記載されており、それは、*Nkx2.5* および *flk1* を含む (例えば、米国特許公開第20100166714号を参照)

10

20

30

40

50

。

【0006】

Isl1 + 心臓前駆細胞の再生および分化は、Wnt / ベータ - カテニンシグナル伝達経路により制御されることが示された (例えば、Qyang, Y. et al. (2007) Cell Stem Cell. 1: 165 - 179; Kwon, C. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 10894 - 10899 を参照)。これは、多能性幹細胞を誘導して Isl1 + 系統に入り、Wnt シグナル伝達の調節を介して Isl1 + 集団の拡大のための方法の開発に至った (例えば、Lian, X. et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: E1848 - 57; Lian, X. et al. (2013) Nat. Protoc. 8: 162 - 175; 米国特許公開第 20110033430 号; 米国特許公開第 20130189785 号を参照)。

10

【0007】

一方、ヒト多能性幹細胞は、多に有望であり、大きな課題は、多様な心臓細胞の単純な分化からインビボでの巨大スケールの純粋な 3D 心室筋組織の形成に展開させる能力であり、最終的に、血管新生、細胞外基質の構築およびアライメント、ならびに成熟を必要とする。その目的に向い、心臓細胞 (心房性、心室性、ペースメーカー) の多様な集団が、人工的かつ脱細胞化基質と結び付けられ (Masumoto, H. et al. (2014) Sci. Rep. 4: 5716; Ott, H. C. et al. (2008) Nat. Med. 14: 213 - 221; Schaaf, S. et al. (2011) PLoS One 6: e26397)、血管細胞および導管 (Tulloch, N. L. et al. (2011) Circ. Res. 109: 47 - 59) ならびに microRNA のカクテル (Gama-Garvalho, M. et al. (2014) Cells 3: 996 - 1026) が、研究されてきたが、目標は、つかみどころがないままである。

20

【0008】

心筋前駆細胞のマーカーとしての Isl1 の同定は大きな進歩であったが、Isl1 は細胞内タンパク質であるので、それは大量の生存可能な細胞の単離で使用するのに適するマーカーでない。むしろ、細胞表面マーカーが、なお必要である。さらに、マーカーとしての Isl1 は、心臓系統の中で複数の細胞型に分化することができる集団を同定し、したがって、心臓系統の中の特定の細胞型に偏った心筋前駆細胞、特に心室細胞に分化する前駆体細胞を同定するマーカーへの必要性がなおある。したがって、心筋細胞を主に生成する、ならびに心筋芽前駆細胞の迅速な単離および大規模増殖を可能にするだろう心筋前駆細胞のさらなるマーカー、特に心筋前駆細胞の細胞表面マーカーへの大きな必要性が当該技術分野においてなおある。さらに、インビボで心室筋細胞に分化する心臓心室前駆体を単離し、それによって、心機能を増強するためにインビボでの心室前駆体または心室筋細胞の移植を可能にするための方法および組成物への大きな必要性が当該技術分野においてなおある。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0009】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2004 / 0180043 号明細書

【特許文献 2】米国特許出願公開第 2005 / 0214260 号明細書

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2008 / 0038229 号明細書

【特許文献 4】米国特許出願公開第 2010 / 0093089 号明細書

【特許文献 5】米国特許出願公開第 2006 / 0246446 号明細書

【特許文献 6】米国特許出願公開第 2010 / 0166714 号明細書

【特許文献 7】米国特許出願公開第 2011 / 0033430 号明細書

【特許文献 8】米国特許出願公開第 2013 / 0189785 号明細書

【非特許文献】

50

【0010】

- 【非特許文献1】Bui, A. L. et al. (2011) Nat. Rev. Cardiol. 8: 30 - 41
- 【非特許文献2】Lin, Z. and Pu, W. T. (2014) Sci. Transl. Med. 6: 239rv1
- 【非特許文献3】Bergmann, O. et al. (2009) Science 324: 98 - 102
- 【非特許文献4】Senyo, S. E. et al. (2013) Nature 493: 433 - 436
- 【非特許文献5】Segers, V. F. M. and Lee, R. J. (2008) Nature 451: 937 - 942 10
- 【非特許文献6】Spater, D. et al. (2014) Development 141: 4418 - 4431
- 【非特許文献7】Orlic, D. (2001年) Nature 410巻: 701 ~ 705頁
- 【非特許文献8】Stamm, C. (2003年) Lancet 361巻: 45 ~ 46頁
- 【非特許文献9】Perin, E. C. (2003年) Circulation 107巻: 2294 ~ 2302頁
- 【非特許文献10】Jackson, K. A. (2001年) J. Clin. Invest. 107巻: 1395 ~ 1402頁 20
- 【非特許文献11】Barbash, I. M. (2003年) Circulation 108巻: 863頁
- 【非特許文献12】Pettinger, M. F. および Martin, B. J. (2003年) Circ. Res. 95巻: 9 ~ 20頁
- 【非特許文献13】Bittira, B. (2003年) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 24巻: 393 ~ 398頁
- 【非特許文献14】Min, J. Y. (2002年) Ann. Thorac. Surg. 74巻: 1568 ~ 1575頁
- 【非特許文献15】Cai, C. L. et al. (2003) Dev. Cell. 5: 877 - 889 30
- 【非特許文献16】Moretti, A. et al. (2006) Cell 127: 1151 - 1165
- 【非特許文献17】Bu, L. et al. (2009) Nature 460: 113 - 117
- 【非特許文献18】Qyang, Y. et al. (2007) Cell Stem Cell. 1: 165 - 179
- 【非特許文献19】Kwon, C. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 10894 - 10899
- 【非特許文献20】Lian, X. et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: E1848 - 57 40
- 【非特許文献21】Lian, X. et al. (2013) Nat. Protoc. 8: 162 - 175
- 【非特許文献22】Masumoto, H. et al. (2014) Sci. Rep. 4: 5716
- 【非特許文献22】Ott, H. C. et al. (2008) Nat. Med. 14: 213 - 221
- 【非特許文献23】Schaaf, S. et al. (2011) PLoS One 6: e26397
- 【非特許文献24】Tulloch, N. L. et al. (2011) Circ. Res. 107: 1111 - 1119 50

s . 1 0 9 : 4 7 - 5 9

【非特許文献25】Gama - Garvalho, M. et al. (2014) Cells 3: 996 - 1026

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の要旨

この発明は、TRA - 1 - 60などのヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つのマーカーについての5～7日目の心筋前駆細胞（好ましくは6日目の前駆体）の陰性選択の使用が、それによって、ヒト心臓の心室前駆細胞（HV P）を培養物から単離するのに十分であることを実証する。単離したHV Pは、対象に導入したとき、それらの心室プログラミングに従って機能する心室筋細胞にほとんど排他的に分化し、それによってインビボ組織操作を可能にする。本明細書の方法によって提供される陰性選択の使用は、HV P集団の厳しい規定を確実にするだけでなく、バッチ変動および潜在的なテラトマを引き起こす細胞を排除する。

10

【0012】

本発明の方法では、TRA - 1 - 60などのヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つのマーカーの発現の欠如について心筋前駆細胞の5～7日目の培養物が選択され（陰性選択）、それによってHV Pの高度精製集団が単離される。本発明の方法は、JAG 1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの発現についての選択（陽性選択）をさらに含むことができる。これらのHV Pは、本明細書に記載されるように、インビトロまたはインビボのいずれかにおける様々な目的のために次に使用することができる。

20

【0013】

従って、一つの態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

心臓の心室前駆細胞を含む5～7日目の心筋前駆細胞の培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカーと反応性の1つまたは複数の第1の作用物質と接触させること；および

第1のマーカー非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離することを含む方法に関する。

30

【0014】

別の態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

ヒト多能性幹細胞を、心筋前駆細胞を生成する条件下で培養して、5～7日目の心筋前駆細胞の培養物を得ること；

5～7日目の心筋前駆細胞の前記培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカーと反応性の1つまたは複数の第1の作用物質と接触させること；および

第1のマーカー非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離することを含む方法に関する。

40

【0015】

一つの実施形態では、前記第1のマーカーは、TRA - 1 - 60である。他の実施形態では、前記第1のマーカーは、TRA - 1 - 60、TRA - 1 - 81、TRA - 2 - 54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシン、およびアルカリ性ホスファターゼ（AP）、ならびにその組合せからなる群から選択される。一つの実施形態では、前記培養物は、心筋前駆細胞の6日目の培養物である。

【0016】

50

HVPを単離するための方法の一つの実施形態では、前記培養物を、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも一つの第2のマーカ-に反応性の一つまたは複数の第2の作用物質とさらに接触させ；

第2のマーカ-反応性の陽性細胞を、非反応性細胞から分離する。

【0017】

一つの実施形態では、一つまたは複数の前記第1の作用物質との接触の前に、前記培養物を、一つまたは複数の前記第2の作用物質と接触させる。別の実施形態では、一つまたは複数の前記第1の作用物質との接触の後に、前記培養物を、一つまたは複数の前記第2の作用物質と接触させる。別の実施形態では、一つまたは複数の前記第1の作用物質との接触と同時に、前記培養物を、一つまたは複数の前記第2の作用物質と接触させる。

10

【0018】

ヒト心臓の心室前駆細胞を単離するための方法では、第1のマーカ-または第2のマーカ-に結合する各種の作用物質を第1のマーカ-または第2のマーカ-と反応性の作用物質として使用することができる。例えば、一実施形態では、少なくとも一つの第1の作用物質は、第1のマーカ-（例えば、TRA-1-60）に結合するモノクローナル抗体などの抗体である。一実施形態では、少なくとも一つの第2の作用物質は、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3またはTNFSF9に結合するモノクローナル抗体などの抗体である。さらに他の実施形態では、第1の作用物質および/または第2の作用物質は、第1のマーカ-または第2のマーカ-の可溶性リガンド、例えば可溶性リガンド融合タンパク質（例えば、可溶性リガンドIg融合タンパク質）であってよい。

20

【0019】

一実施形態では、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、TNFSF9である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、TNFSF9である。

30

【0020】

ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法では、第1のマーカ-非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離するために、および/または第2のマーカ-反応性の陽性細胞を非反応性細胞から分離するために、各種の分離法を使用することができる。例えば、一実施形態では、第1のマーカ-非反応性の陰性細胞は、蛍光活性化細胞選別（FACS）によって反応性細胞から分離される。一実施形態では、第2のマーカ-反応性の陽性細胞は、蛍光活性化細胞選別（FACS）によって非反応性細胞から分離される。一実施形態では、第1のマーカ-非反応性の陰性細胞は、磁気活性化細胞選別（MACS）によって反応性細胞から分離される。一実施形態では、第2のマーカ-反応性の陽性細胞は、磁気活性化細胞選別（MACS）によって非反応性細胞から分離される。

40

【0021】

一実施形態では、ヒト心臓の心室前駆細胞を、それらがMLC2v陽性になるように、さらに培養し、分化させる。

【0022】

なお別の態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団を得る方法であって、

単一のヒト心臓の心室前駆細胞を単離することであって、単一の前記ヒト心臓の心室前駆細胞が、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも一つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF

50

9 からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、単離すること；ならびに

前記第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を、前記細胞が少なくとも 1×10^9 細胞に拡大し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団が得られるような条件下で培養することを含む方法に関する。

【0023】

一つの実施形態では、前記第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、前記第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。

10

【0024】

一実施形態では、第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性であることに加えて、単一のヒト心臓の心室前駆細胞は、最初の培養時にIslet1陽性、Nkx2.5陰性およびflk1陰性である。単一の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、上記の方法(例えば、FACSまたはMACS)などの方法によって単離することができる。単一の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、上記のもの(例えば、モノクローナル抗体、可溶性リガンド融合タンパク質)などの第1のマーカ-または第2のマーカ-と反応性の作用物質を使用して単離することができる。さらなる培養および分化の後に、ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団は、心室マーカ-MLCV2を発現することができる。

20

【0025】

一実施形態では、単一の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、細胞が、心室分化に偏るような条件下でインビトロにおいて培養される。例えば、単一の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、MLC2v心室マーカ-を発現する心室細胞への細胞の分化を可能にする心臓前駆体培養(CPC)培地(20%ノックアウト血清代用物、2.5mM GlutaMaxおよび100 μ g/mlビタミンCを補填した80%先進DMEM/F12)で培養することができる。様々な実施形態では、単一の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、例えば少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞のクローン集団に拡大される。

30

【0026】

したがって、別の態様では、本発明は、単離されたヒト心臓の心室前駆細胞(HVP)のクローン集団に関係し、ここで、HVPは、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である。一実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。様々な実施形態では、このクローン集団は、例えば少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞を含む。好ましい実施形態では、このクローン集団は、少なくとも 1×10^9 個のTRA-1-60陰性/LIFR陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を含む。

40

【0027】

なお別の態様では、本発明は、少なくとも 1×10^6 個の精製されたヒト心臓の心室前駆細胞(HVP)の単離された集団であって、HPVの前記集団は：(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JA

50

G1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、集団を提供する。一つの実施形態では、前記第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、前記第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。様々な実施形態では、この単離された集団は、例えば少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞を含む。好ましい実施形態では、この単離された集団は、少なくとも 1×10^9 個のTRA-1-60陰性/LIFR陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を含む。

10

【0028】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載される第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を使用して対象における心機能を増強する方法に係る。例えば、一実施形態では、本発明は、対象における心機能を増強する方法を提供し、この方法は、第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞の単離された集団(例えば、クローン集団)、例えば、少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞のクローン集団を含む医薬組成物を投与することを含む。一実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。様々な実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3またはTNFSF9である。一実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-はLIFRである。一実施形態では、細胞集団は、対象の心臓に直接的に投与される。例えば、細胞集団は、対象の心臓の心室領域に直接的に投与することができる。一実施形態では、対象に投与される医薬組成物は、心室筋細胞を含む心筋パッチなどの3次元マトリックス上に製剤化された細胞集団を含む。対象は、心機能の増強を必要とする者、例えば心筋梗塞を患った者または先天性心臓障害を有する者である。

20

30

【0029】

なお別の態様では、本発明は、ヒト心室組織を生成するための方法であって、

非ヒト動物の器官にヒト心臓の心室前駆細胞(HVP)を移植することであって、前記HVPは、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、移植すること；ならびに

ヒト心室組織が生成されるように前記HVPをインビボで成長させることを含む方法に関する。

40

【0030】

非ヒト動物は、例えば、免疫不全マウスであってよい。器官は、例えば、腎臓(例えば、細胞は腎臓囊の下に移植される)または心臓であってよい。一つの実施形態では、以下の細胞マーカ-パターン:(i)心臓中胚葉形成のピークの後;(ii)ピークのIsl1発現のとき;(iii)NKX2.5発現のピークの前;(iv)下流遺伝子MEF-2およびTBX-1のピーク発現の前;および(v)分化した収縮タンパク質遺伝子の発現の前のうちの1つ、2つ、3つ、4つまたは5つが存在するときに、前記細胞が移植される。一つの実施形態では、前記細胞は、ヒト心室前駆細胞を生成する条件下でのヒト多能性幹細胞のインビトロ培養の5日目と7日目の間(両端を含む)に移植される。別の実施形態では、前記細胞は、ヒト心室前駆細胞を生成する条件下でのヒト多能性幹細胞のインビトロ培養の6日目に移植される。本方法は、非ヒト動物において生成されるヒ

50

ト心室組織を収集することをさらに含むことができる。

【0031】

本発明のさらに別の態様では、本明細書に記載されるヒト心臓の心室前駆細胞は、試験化合物の心臓毒性を評価するスクリーニングアッセイで使用することができる。従って、本発明は、試験化合物の心臓毒性についてスクリーニングする方法であって、

ヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を提供することであって、前記HVPは、（i）ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカについて陰性であり、（ii）JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカについて陽性である、提供すること；

前記HVPを前記試験化合物と接触させること；ならびに

前記HVPへの前記試験化合物の毒性を測定すること

を含み、

前記HVPへの前記試験化合物の毒性は、前記試験化合物の心臓毒性を示す、方法を提供する。

【0032】

細胞への試験化合物の毒性は、例えば、細胞生存度または細胞の他の生理的パラメータを評価することによって測定することができる。

【0033】

本発明の他の特性および利点は、以下の詳細な説明および請求項から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、ヒト多能性幹細胞（hPSC）からヒトIsl1+心筋芽前駆細胞を生成するための例示的な培養プロトコルの模式図である。

【0035】

【図2】図2は、Isl1、Nkx2.5およびcTn1の発現を示す、hPSCの心臓分化の間のタンパク質発現のウエスタンブロット解析の結果を示す。GAPDHを、対照として使用した。

【0036】

【図3】図3は、分化の6日目の細胞上でのIsl1の発現を示す、心筋芽前駆細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す。

【0037】

【図4】図4は、分化の6日目の細胞上でのIsl1およびJag1の共発現を示す、心筋芽前駆細胞の二重染色フローサイトメトリー解析の結果を示す。

【0038】

【図5】図5は、FZD4の発現を示す、hPSCの心臓分化の間のタンパク質発現のウエスタンブロット解析の結果を示す。GAPDHを、対照として使用した。

【0039】

【図6】図6は、分化の5日目の細胞上でのIsl1およびFZD4の共発現を示す、心筋芽前駆細胞の二重染色フローサイトメトリー解析の結果を示す。

【0040】

【図7】図7は、ヒト心室前駆体（HVP）細胞の生成、心室筋細胞へのそれらの最終的な分化、それらの抗体精製および移植におけるそれらの使用の模式図である。

【0041】

【図8】図8A～Bは、器官に対する器官の組織操作のための腎臓嚢内（図8A）または心筋内（図8B）へのHPVの移植の模式図である。

【0042】

【図9】図9は、細胞上でのIsl1およびLIFRの共発現を示す、ヒト心室前駆体（HVP）細胞の二重染色フローサイトメトリー解析の結果を示す。

【0043】

【図10A】図10A～Bは、未分化胚性幹（ES）細胞（図10A）と比較した、ヒト

10

20

30

40

50

心室前駆細胞（図10B）上でのLIFRおよびFGFR3の発現のフローサイトメトリック解析の結果を示す。

【図10B】図10A～Bは、未分化胚性幹（ES）細胞（図10A）と比較した、ヒト心室前駆細胞（図10B）上でのLIFRおよびFGFR3の発現のフローサイトメトリック解析の結果を示す。

【0044】

【図11】図11は、HVP分化プロセスの間の選択された発生遺伝子発現のRNA-seq解析を示す一連の棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

発明の詳細な説明

本発明は、心筋前駆細胞の5～7日目（好ましくは6日目）の培養物で実行される陰性選択工程がHVPを効果的に精製し、そのため、それらは機能的な心室パッチを形成することを含めて、機能的な心筋細胞をインビトロおよびインビボで形成するとの発見に基づいて、心室系統に偏ったヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を単離する方法、ならびにかかる前駆体細胞の単離された集団（例えば、クローン集団）およびインビトロまたはインビボのいずれかでのその使用方法を提供する。本明細書に記載される少なくとも1つの多能性幹細胞マーカーの発現に対する陰性選択の使用は、HVP集団の厳しい規定を確実にするだけでなく、パッチ変動および潜在的なテラトーマを引き起こす細胞を排除する。さらに、本明細書に記載されるように、多能性幹細胞マーカー発現への陰性選択とLIFR、JAG1、FZD4、FGFR3および/またはTNFSF9の発現への陽性選択との組合せは、HVP集団のさらに厳しい規定を可能にする。

【0046】

本発明がより容易に理解され得る目的で、ある種の用語がまず定義される。さらなる定義は、詳細な説明を通して説明される。

【0047】

本明細書において使用される、用語「Jagged1」、「Jag1」および「JAG1」を互換的に使用して、例えば、Oda, T. et al. (1997) *Genomics*, 43: 376-379; Oda, T. et al. (1997) *Nat. Genet.* 16: 235-242; Li, L. et al. (1998) *Immunity*, 8: 43-55; Bash, J. et al. (1999) *EMBO J.*, 18: 2803-2811; および Jones, E. A. et al. (2000) *J. Med. Genet.* 37: 658-662において記載されている当該技術分野において公知のタンパク質を指す。Jagged1タンパク質の非限定的な例は、Genbank受託番号P78504.3において説明されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質である。

【0048】

本明細書において使用される、用語「Frizzled4」、「Fzd4」および「FZD4」を互換的に使用して、例えば、Kinkoshi, H. et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264: 955-961; Tanaka, S. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10164-10169; および Robitaille, J. et al. (2002) *Nat. Genet.*, 32: 326-330において記載されている当該技術分野において公知のタンパク質を指す。Frizzled4タンパク質の非限定的な例は、Genbank受託番号Q9ULV1において説明されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質である。

【0049】

本明細書において使用される、用語「白血病抑制因子受容体」、「LIF受容体」および「LIFR」を互換的に使用して、例えば、Gearing, D. et al. (1991) *EMBO J.* 10: 2839-2848; Gearing, D. and Bruce, A. G. (1992) *New Biol.* 4: 61-65; および Schiema

10

20

30

40

50

nn, W. P. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5361-5365において記載されている当該技術分野において公知のタンパク質を指す。LIFRはまた、当該技術分野において、白血病抑制因子受容体アルファ、CD118、CD118抗原、SJS2、STWSおよびSWSとして言及される。LILFRタンパク質の非限定的な例は、Genbank受託番号NP_001121143.1において説明されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質である。

【0050】

本明細書において使用される、用語「線維芽細胞成長因子受容体3」、「FGF受容体3」および「FGFR3」を互換的に使用して、例えば、Keegan, K. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1095-1099; Thompson, L. M. et al. (1991) Genomics 11: 1133-1142; およびShiang, R. et al. (1994) Cell 78: 335-343において記載されている当該技術分野において公知のタンパク質を指す。FGFR3はまた、当該技術分野において、CD333、CD333抗原、EC2.7.10.1、JTK4、ACH、CEK2およびHSFGFR3EXとして言及される。FGFR3タンパク質の非限定的な例は、Genbank受託番号NP_000133.1において説明されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質である。

10

【0051】

本明細書において使用される、用語「腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー9」、「TNFSF9」、「4-1BB-L」および「CD137L」は、例えば、Alderson, M.R.ら(1994年) Eur. J. Immunol.、24巻: 2219~2227頁; Tan, J. T.ら(1999年) J. Immunol. 163巻: 4859~4868頁; およびXia, R.ら(2010年) Cytokine 50巻: 311~316頁に記載されている、当該技術分野において公知のタンパク質を指すために互換的に使用される。TNFSF9タンパク質の非限定的な例は、Genbank受託番号NP_003802.1に示されるアミノ酸配列を有するヒトタンパク質である。

20

【0052】

本明細書において使用される、用語「TRA-1-60抗原」および「TRA-1-60」は、TRA-1-60モノクローナル抗体によって認識される、当該技術分野において公知の抗原決定基を指すために互換的に使用され、この抗原決定基は、例えば、Marrink, J.ら(1991年) Int. J. Cancer、49巻: 368~372頁; Badcock, G.ら(1999年) Cancer Res. 59巻: 4715~4719頁; Schopperle, W.M.ら(2007年) Stem Cells 25巻: 723~730頁; およびFong, C. Y.ら(2009年) Stem Cell Rev. 5巻: 72~80頁に記載されるように、ヒト多能性幹細胞上で発現されるムチン様のシアル化硫酸ケラチンプロテオグリカンである。

30

【0053】

本明細書において使用される、用語「幹細胞」は、広義で使用され、伝統的な幹細胞、前駆細胞、プレ前駆細胞、貯蔵細胞などを含む。用語「幹細胞」または「前駆体」を本明細書において互換的に使用し、分化した、または分化可能な娘細胞を順に生じることができる多くの母細胞を生成する能力を有する、より前駆の細胞を増殖および生じる能力がある未分化の細胞を指す。娘細胞自体を誘導して、親の発生の可能性を有する1つまたは複数の細胞も保持しながら、1つまたは複数の成熟細胞タイプに連続して分化する子孫を増殖し、生み出すことができる。次に、用語「幹細胞」は、ある種の状況下で、実質的に分化することなく、増殖する能力を保持した、特定の状況下で、より特殊化もしくは分化した表現型に分化する能力または可能性を有する細胞を指す。1つの実施形態において、用語、前駆体または幹細胞は、その卑属(子孫)が、胚細胞および組織の向上する多様性において生じる、分化により、例えば、個々の特徴を完全に獲得することにより、しばしば異なる方向に特殊化する一般化母細胞を指す。細胞の分化は、多くの細胞分裂を介して典型的に生じる複雑なプロセスである。分化した細胞は、それ自体が、多能性細胞などからもたらされる多能性細胞から派生し得る。これらの多能性細胞のそれぞれが、幹細胞であ

40

50

るとみなされ得る一方、それぞれが生じることのできる細胞タイプの範囲はかなり変動し得る。幾つかの分化した細胞はまた、より大きな発生の可能性の細胞を生じる能力を有する。かかる能力は、天然であってもよく、または様々な因子での処理の際に人工的に誘導されてもよい。多くの生物学的場合において、幹細胞は、それらが、1つより多くの別々の細胞タイプの子孫を生み出すことができるが、これは、「幹細胞性」を必要としないので、「多能性」でもある。自己再生は、幹細胞定義の他の古典的な部分であり、本書類において使用される通り、必須である。理論において、自己再生は、2つの主要な機序のいずれかにより生じることができる。幹細胞は、一方の娘が、幹状態を保持し、他の娘が、幾つかの別々の他の特定の機能および表現型を発現しながら、非対称的に分割し得る。あるいは、集団内の幹細胞の幾つかは、2つの幹に対称的に分化することができ、したがって、全体としての集団内の幾つかの幹細胞を維持し、一方、集団内の他の細胞は、分化した子孫のみを生じる。公式には、幹細胞として始まる細胞は、分化した表現型に向けて前進し得るが、次に、「脱分化」としてしばしば言及される用語である、「逆転し」、幹細胞表現型を再度発現することが可能である。

10

20

30

40

50

【0054】

用語「前駆体細胞」を本明細書において使用して、それが分化により生じ得る細胞と比べて、より原始的である（例えば、完全に分化した細胞であるより、発生経路または向上に沿って初期工程にある）細胞表現型を有する細胞を指す。しばしば、前駆細胞はまた、有意または非常に高い増殖ポテンシャルを有する。前駆細胞は、発生経路、および細胞が発生し、分化する環境に依存し、複数の別々の分化した細胞タイプまたは単一の分化した細胞タイプを生じることができる。

【0055】

本明細書において使用される用語「多能性の」は、異なる条件下で、全3種の生殖細胞層（内胚葉、中胚葉および外胚葉）の細胞タイプ特徴に分化する能力を有する細胞を指す。多能性細胞は、例えば、ヌードマウスおよびテラトーマ形成アッセイを使用して、全3種の胚葉に分化するそれらの能力により、主に特徴付けられる。多能性についての好ましい試験は、3種の胚葉のそれぞれの細胞に分化する能力の証明であるが、多能性はまた、胚性幹（ES）細胞マーカーの発現により、証明される。幾つかの実施形態において、多能性細胞は、未分化の細胞である。

【0056】

本明細書において使用される用語「多能性」または「多能性状態」は、全3種の胚の胚葉：内胚葉（腸組織）、中胚葉（血液、筋肉、および血管を含む）、ならびに外胚葉（例えば、皮膚および神経）に分化する能力を有し、典型的には、インビトロで長期間、例えば、1年より長く、または30回より多くの継代、分裂する可能性を有する細胞を指す。

【0057】

用語「多能性」は、「多能性細胞」に関して使用されるとき、全3種の胚葉からもたらされる細胞の全てではないが、幾つかの細胞に分化することができる細胞を指す。したがって、多能性細胞は、部分的に分化した細胞である。多能性細胞は、当該技術分野において周知であり、多能性細胞の例は、例えば、造血幹細胞および神経幹細胞のような、成体の幹細胞を含む。多能性は、幹細胞が、所定の系統にある多くのタイプの細胞を形成し得るが、他の系統の細胞を形成し得ないことを意味する。例えば、多能性血液幹細胞は、多くの異なるタイプの血液細胞（赤血球、白血球、血小板など）を形成することができるが、それは、ニューロンを形成することができない。

【0058】

用語「胚性幹細胞」または「ES細胞」または「ESC」は、本明細書において互換的に使用され、胚の胚盤胞の内部細胞塊の多能性幹細胞を指す（米国特許第5,843,780号、第6,200,806号を参照、それらは、参照により本明細書に取り込まれる）。かかる細胞は、体細胞核移植からもたらされる胚盤胞の内部細胞塊から同様に得ることができる（例えば、米国特許第5,945,577号、第5,994,619号、第6,235,970号を参照、それらは、参照により本明細書に取り込まれる）。胚性幹細胞

胞の際立った特徴は、胚性幹細胞表現型を定義する。したがって、細胞が、他の細胞と区別することができるように、細胞は、それが胚性幹細胞の固有の特徴の1つまたは複数を有するならば、胚性幹細胞の表現型を有する。典型的な際立った胚性幹細胞特徴は、遺伝子発現特性、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件に対する応答性などを含むが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、ES細胞は、胚を破壊することなく、例えば、ヒト胚を破壊することなく、得ることができる。

【0059】

用語「成体の幹細胞」または「ASC」を使用して、胎児の、若齢の、および成体の組織を含む、非胚性組織からもたらされる任意の多能性幹細胞を指す。幹細胞は、血液、骨髄、脳、嗅上皮、皮膚、膵臓、骨格筋、および心筋を含む多種多様な成体の組織から単離されている。これらの幹細胞のそれぞれが、遺伝子発現、因子応答性、および培養中の形態に基づき特徴付けることができる。典型的な成体の幹細胞は、神経幹細胞、神経堤幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、および膵幹細胞を含む。上で示された通り、幹細胞は、事実上、全組織において常在することが見出されている。したがって、本発明は、幹細胞集団が、事実上あらゆる動物の組織から単離することができることを十分理解する。

10

【0060】

本明細書において使用される用語「ヒト多能性幹細胞」(hPSCと略される)は、幹細胞および多能性に関して上で考察された様々な異なる細胞タイプに分化する能力を有するヒト細胞である。ヒト多能性ヒト幹細胞は、例えば、誘導多能性幹細胞(iPSC)およびES細胞株のようなヒト胚性幹細胞を含む。

20

【0061】

本明細書において使用される用語「ヒト心筋前駆細胞」は、心臓系統に関与し、全3種の心臓系統細胞(心筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞)に分化する能力を有するヒト前駆体細胞を指す。

【0062】

本明細書において使用される用語「ヒト心筋芽前駆細胞」は、心臓系統に関与し、心筋細胞に主に分化する(すなわち、前駆細胞に由来する、分化した細胞の50%より多く、好ましくは、分化した細胞の60%、70%、80%または90%が心筋細胞である)ヒト前駆体細胞を指す。

30

【0063】

本明細書において使用される用語「心臓の心室前駆細胞」は、心臓系統に関与し、心臓の心室筋細胞に主に分化する(すなわち、前駆細胞に由来する、分化した細胞の50%より多く、好ましくは、分化した細胞の60%、70%、80%または90%より多くが心臓の心室筋細胞である)前駆体細胞を指す。このタイプの細胞はまた、本明細書において、ヒト心室前駆体、またはHV P、細胞としても言及される。

【0064】

用語「心筋細胞」は、心臓の筋細胞(例えば、心筋細胞)を指す。心筋細胞は、一般に、その細胞表面および/または細胞質において1つまたは複数の心臓特異的マーカーを発現するだろう。適切な心筋細胞特異的マーカーは、心トロポニンI、心トロポニン-C、トロポミオシン、カベオリン-3、GATA-4、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖-2a、ミオシン軽鎖-2v、リアノジン受容体、および心房性ナトリウム利尿因子を含むが、これらに限定されない。

40

【0065】

別の細胞に由来する細胞の文脈で使用される用語「に由来する」は、細胞が、異なる細胞タイプである細胞から生じた(例えば、それが変化したか、またはそれにより生み出された)ことを意味する。用語「に由来する」はまた、前駆体細胞から分化した細胞を指す。

【0066】

本明細書において使用される用語「Isl1+心筋前駆細胞」は、心臓系統に関与し、Isl1et1を発現するヒト前駆体細胞を指す。

50

【0067】

本明細書において使用される、用語「Isl1 + Jag1 + 心筋前駆細胞」、「Isl1 + Fzd4 + 心筋前駆細胞」、「Isl1 + Lifr + 心筋前駆細胞」、「Isl1 + Fgfr3 + 心筋前駆細胞」および「Isl1 + Tnfsf9 + 心筋前駆細胞」は、心臓系統に關与し、Isl1et1およびJag1、Fzd4、Lifr、Fgfr3またはTnfsf9のいずれかの両方を発現するヒト前駆体細胞をそれぞれ指す。

【0068】

細胞培養物中または細胞集団における細胞に関して、用語「實質的に含まない」は、その細胞培養物または細胞集団が、ないか、細胞培養物もしくは細胞集団に存在する細胞の総数の約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満の量で存在する特定の細胞タイプを意味する。

10

【0069】

細胞個体発生の文脈において、隣接の「分化した」、または「分化している」は、比較用語である。「分化した細胞」は、それが比較される細胞よりさらに下の発生経路に進んでいる細胞である。したがって、幹細胞は、系統が制限された前駆細胞（例えば、中胚葉系幹細胞）に分化することができ、それが、順に、さらに下の経路の他のタイプの前駆細胞（例えば、心筋細胞前駆体）に、次に、ある種の組織タイプにおいて特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力を保持し得るか、またはし得ない最終ステージの分化した細胞に分化することができる。

20

【0070】

本文脈における用語「分化」は、より特殊化し、さらなる分化の能力がない最終分化した細胞になることにさらに近づいた細胞と關連することが公知のマーカーを発現する細胞の形成を意味する。細胞が、より少なく關与した細胞から、特定の細胞タイプにますます關与する細胞に、最終的には、最終分化した細胞まで進む経路は、漸進的分化または漸進的關与としても言及される。より特殊化した（例えば、漸進的分化の進路に沿って進み始めた）が、まだ最終分化していない細胞は、部分的に分化したとして言及される。分化は、発生のプロセスであり、これにより、細胞は、特殊化表現型を想定し、例えば、他の細胞タイプと異なる1つもしくは複数の特徴または機能を想定する。幾つの場合において、分化した表現型は、幾つかの発生経路における成熟エンドポイントにある細胞表現型（いわゆる最終分化した細胞）を指す。多くだが、全てではない組織において、分化のプロセスは、細胞サイクルからの出口と結び付けられる。これらの場合において、最終分化した細胞は、それらの増殖する能力を失うか、または大いに制限する。しかしながら、本発明者らは、この明細書の文脈において、用語「分化」または「分化した」は、それらの発生の前のポイントよりそれらの運命または機能においてより特殊化した細胞を指し、最終分化した細胞と、最終分化していないが、それらの発生における前のポイントより特殊化した細胞の両方を含むことに注意する。未關与の細胞（例えば、幹細胞）から、特定の分化した細胞タイプへの増大する程度の關与を有する細胞まで、および、最終的に、最終分化した細胞までの細胞の発生は、漸進的な分化または漸進的な關与として知られている。前駆体細胞と比べて、「分化した」細胞は、その前駆体細胞と比べて1つまたは複数の表現型の差を有する。表現型の差は、限定するものではないが、形態学的な差ならびに、発現したマーカーの存在または非存在ばかりでなく、マーカーの量の差および一連のマーカーの共発現パターンにおける差を含む、遺伝子発現および生物学的活性における差を含む。

30

40

【0071】

本明細書において使用される用語「分化」は、原始的ステージからより成熟（すなわち、あまり原始的でない）細胞に向けた細胞の細胞発生を指す。

【0072】

本明細書において使用される、「増殖すること」および「増殖」は、細胞分裂による集団における細胞の数における増大（成長）を指す。細胞増殖は、一般に、成長因子および

50

他のマイトジェンを含む、環境に応答した複数のシグナル伝達経路の協調した活性化の結果と理解される。細胞増殖はまた、細胞増殖を阻害するか、もしくは負に影響する細胞内または細胞外シグナルおよび機序の作用からの放出により促進され得る。

【0073】

用語「再生」または「自己再生」または「増殖」は、互換的に使用され、細胞のそれ自体のより多くのコピー（例えば、複製）を作る細胞のプロセスを指す。幾つかの実施形態において、細胞は、長期間、および/または多くの月から年に渡り、同じ未分化の細胞（例えば、前駆体細胞タイプ）に分裂することにより、それ自体の再生の能力がある。幾つかの場合において、増殖は、単一細胞から2つの同一の娘細胞への繰り返される分裂による、細胞の拡大を指す。

10

【0074】

本明細書において使用される用語「系統」は、共通の先祖を有する細胞、または共通の発生運命を有する細胞、例えば、心室の心筋細胞に発生する発生運命を有する細胞を記載する用語を指す。

【0075】

本明細書において使用される用語「クローン集団」は、単一細胞の派生物に由来する細胞の集団を指す。すなわち、クローン集団内の細胞は、クローン集団を播種するために使用された単一細胞の全ての子孫である。

【0076】

本明細書において使用される、用語「HVPの単離された集団」および「HVPの精製された集団」は、HVP以外の細胞から精製され、そのため、集団がHVP以外の細胞の3%未満、より好ましくは2%未満、より好ましくは1%未満、より好ましくは0.5%未満を含有する、ヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）の集団を指すために互換的に使用される。

20

【0077】

本明細書において言及される用語「培地」は、細胞生存能を維持し、増殖を支持する栄養素を含有する、組織もしくは細胞集団を維持するための培地、または、細胞集団を培養するための培地（例えば、「培養培地」）である。細胞培養培地は、適切な組み合わせで以下のいずれかを含有してもよい：塩、緩衝液、アミノ酸、グルコースまたは他の糖、抗生物質、血清または血清代替物、およびペプチド成長因子のような他の成分など。特定の細胞タイプのため通常使用される細胞培養培地は、当業者に公知である。

30

【0078】

用語「表現型」は、実際の遺伝子型にもかかわらず、特定の一連の環境条件および因子下で、細胞または生物を定義するトータルの生物学的特徴の1つまたは多数を指す。

【0079】

本明細書において使用される「マーカー」は、細胞の特徴および/または表現型を記載する。マーカーは、対象となる特徴を含む細胞のセレクションのため使用することができる。マーカーは、特定の細胞で変動するだろう。マーカーは、特徴、細胞タイプに特定の形態学的、機能的もしくは生化学的（酵素的）特徴が、それとも細胞タイプにより発現される分子である。好ましくは、かかるマーカーはタンパク質であり、より好ましくは抗体のエピトープ、または当該技術分野において入手可能な他の結合分子、例えば細胞の表面に発現されるタンパク質を有する（「細胞表面マーカー」）。しかし、マーカーは、タンパク質（ペプチドおよびポリペプチド）、脂質、多糖類、核酸ならびにステロイドを含むが、これらに限定されない、細胞において見られる任意の分子からなり得る。形態学的特徴または形質の例は、形、サイズ、および細胞質に対する核の比を含むが、これらに限定されない。機能的特徴または形質の例は、特定の基質に接着する能力、特定の色素を取り込むかまたは排除する能力、特定の条件下で遊走する能力、および特定の系統に沿って分化する能力を含むが、これらに限定されない。マーカーは、当業者が入手可能な任意の方法により、検出され得る。本明細書において使用される、「マーカー陽性」である細胞はそのマーカーを発現する細胞を指し、一方、「マーカー陰性」である細胞はそのマーカー

40

50

を発現しない細胞を指す。集団レベルでは、「マーカー陽性」である細胞集団は、その集団内の細胞の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%がそのマーカーを発現する集団を指す。集団レベルでは、「マーカー陰性」である細胞集団は、その集団内の細胞の3%未満、より好ましくは2%未満、より好ましくは1%未満、より好ましくは0.5%未満がそのマーカーを発現する集団を指す。

【0080】

本明細書において使用される用語「単離された細胞」は、それが本来見られたか、またはかかる細胞の卑属であった生物から取り出された細胞を指す。場合により、細胞は、インビトロで、例えば、他の細胞の存在下で培養されている。場合により、細胞は、第2の生物に後で導入されるか、または当該細胞（または当該細胞が子孫である細胞）が単離された生物に再度導入される。

10

【0081】

本明細書において使用される、細胞の単離された集団に関して用語「単離された集団」は、細胞の混合されたまたは不均一な集団から取り出された、分離された細胞の集団を指す。幾つかの実施形態において、単離された集団は、当該細胞がそこから単離されるか、または富化された不均一な集団と比較して、細胞の実質的に純粋な集団である。

【0082】

特定の細胞集団に関する用語「実質的に純粋」は、トータルの細胞集団を作り上げる細胞に関して、少なくとも約75%、好ましくは、少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%、最も好ましくは、少なくとも約95%純粋である細胞の集団を指す。

20

【0083】

用語「対象」および「個体」は、互換的に使用され、本明細書において開示される心臓の心室前駆細胞が、例えば、幾つかの実施形態において、予防的処置を包含する処置のため、または本明細書に記載される方法および組成物が提供されるか、または複数提供される、疾患モデルのため、移植され得る、動物、例えば、ヒトを指す。ヒト対象のような特定の動物にとって特異的である疾患状態の処置について、用語「対象」は、その特定の動物を指す。用語「非ヒト動物」および「非ヒト哺乳類」は、本明細書において互換的に使用され、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、および非ヒト霊長類のような哺乳類を含む。用語「対象」はまた、哺乳類、爬虫類、両生類および魚類を含むが、これらに限定されない任意の脊椎動物を包含する。しかしながら、有利には、対象は、ヒトのような哺乳類であるか、または家畜化動物のような他の哺乳類、例えば、イヌ、ネコ、ウマなど、もしくは生産哺乳類、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタなどもまた、用語対象において包含される。

30

【0084】

本明細書において使用される、用語「レシピエント」は、移植された器官、組織または細胞を受け取るであろう対象を指す。

【0085】

本明細書において使用される用語「3次元基質」または「スキャフォールド」または「基質」は、生体適合可能な基質、スキャフォールドなどを含む組成物と広義で指す。3次元基質は、25で液体、ゲル、半固体、または固体であってもよい。3次元基質は、生分解性または非生分解性であってもよい。幾つかの実施形態において、3次元基質は、生体適合可能であるか、または生体吸収可能か、もしくは生体置換可能である。典型的な3次元基質は、ポリマーおよびコラーゲンを含むヒドロゲル、フィブリン、キトサン、MATRIGEL（商標）、ポリエチレングリコール、化学的に架橋結合可能なデキストランまたは光架橋結合可能なデキストランを含むデキストラン、粘膜下組織のような処理された組織基質などを含む。ある種の実施形態において、3次元基質は、同種成分、自家成分、または同種成分と自家成分の両方を含む。ある種の実施形態において、3次元基質は、合成または半合成物質を含む。ある種の実施形態において、3次元基質は、フィブリン由

40

50

来のスキヤフォールドのような、フレームワークまたはサポートを含む。

【0086】

本明細書において使用される、用語「投与すること」、「導入すること」および「移植すること」は、互換的に使用され、所望される部位での細胞の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路による、心筋芽前駆細胞および/または本明細書において記載される分化した心筋細胞の対象への留置を指す。細胞は、細胞の少なくとも一部が生存可能なままである対象において、所望される位置へのデリバリーをもたらす任意の適切な経路により投与することができる。対象への投与後の細胞の生存能の期間は、数時間と同等の長さ、例えば、24時間から、数日まで、数年と同等の長さまでであることができる。

【0087】

用語「統計学的に有意な」または「有意に」は、統計学的な有意を指し、一般に、マーカの正常、またはより低い濃度未満の2標準偏差(2SD)を意味する。用語は、差が存在するという統計学的証拠を指す。それは、帰無仮説が実際に真実であるとき帰無仮説を拒否する決断をする可能性として定義される。決断は、しばしば、p-値を使用してなされる。本明細書において使用される用語「実質的に」または「主に」は、少なくとも約60%、または好ましくは、少なくとも約70%もしくは少なくとも約80%、または少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%または少なくとも約99%以上、あるいは70%~100%の任意の整数の割合を意味する。

【0088】

用語「疾患」または「障害」は、本明細書において互換的に使用され、機能の性能を中断するかもしれないもしくは妨害する、および/または不快、機能不全、苦痛のような症状、または苦しめられた人もしくは人と接触したものに死さえを引き起こす、身体の、あるいは器官の幾つかの状態における任意の変化を指す。疾患または障害はまた、ジステンパー、病的な状態、病気、病弊、障害、病的状態、病、愁訴、軽い病気または情動に関連し得る。

【0089】

本明細書において使用される、語句「心血管状態、疾患または障害」は、対象、特に、ヒト対象における不十分な、所望されないまたは異常な心機能、例えば、虚血性心疾患、高血圧性心疾患および肺高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、ならびに鬱血性心不全に至る任意の状態により特徴付けられるすべての障害を含むことが意図される。不十分なまたは異常な心機能は、疾患、損傷および/または加齢の結果であり得る。背景として、心筋障害に対する応答は、幾つかの細胞が死ぬ一方、他のものは依然死んでいないものの、機能不全である冬眠状態になる明確な経路をたどる。これに、炎症性細胞の浸潤、瘢痕の一部としてのコラーゲンの沈着、新たな血管の内殖および持続細胞死の度合と並行して起こったものの全てが続く。本明細書において使用される、用語「虚血」は、血液の流入の低減に起因した任意の局所性組織虚血を指す。用語「心筋虚血」は、冠動脈硬化および/または心筋への不十分な酸素供給により引き起こされる循環障害を指す。例えば、急性心筋梗塞は、心筋組織に対する不可逆的な虚血発作を表す。この発作は、冠循環において閉塞性(例えば、血栓性または塞栓)現象をもたらす、心筋代謝需要が、心筋組織への酸素の供給を超える環境を生じる。

【0090】

本明細書において使用される、用語「処置すること」または「処置」は、本明細書において互換的に使用され、心血管状態、疾患または障害、すなわち、不十分なもしくは所望されない心機能により特徴付けられる任意の障害の少なくとも1つの副作用または症状を低減すること、または低下すること、または緩和すること、または停止させることを指す。心異常の副作用または症状は、当該技術分野において周知であり、呼吸困難、胸痛、動悸、眩暈、失神、浮腫、チアノーゼ、蒼白、疲労および死を含むが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、本明細書において使用される用語「処置」は、対象において心血管の状態の症状の発生を予防するための予防的処置または予防処置を指す。

【0091】

1つまたは複数の症状または臨床マーカーが、その用語が本明細書において定義される

10

20

30

40

50

通り、低減されるなら、処置は、一般に「有効」である。あるいは、疾患の進行が低減されるか、または停止されるなら、処置は、「有効」である。すなわち、「処置」は、症状の改善または疾患のマーカーの低下だけでなく、処置がないときに予測され得る症状の進行もしくは悪化の休止または遅延をも含む。有益なまたは所望される臨床結果は、1つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定化した（すなわち、悪化しない）状態、疾患の進行の遅延または遅くすること、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分的またはトータルのいずれか）、検出可能かまたは検出可能でないかのいずれかを含むが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない場合に予測される生存と比較して、延長された生存を意味し得る。処置の必要なものは、心臓の状態をすでに診断されたもの、ならびに遺伝子感受性または体重、食餌および健康状態のような他の要因に起因して心臓の状態を恐らく発症するものを含む。幾つかの実施形態において、処置するとの用語はまた、予防対策および/または予防的処置を包含し、疾患または障害の開始を防ぐために本明細書において開示される医薬組成物を投与することを含む。

10

【0092】

症状における治療上有意な低減は、対照または未処置の対象と比較して、測定されたパラメーターにおいて例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約125%、少なくとも約150%以上である。測定されたまたは測定可能なパラメーターは、疾患の臨床上検出可能なマーカー、例えば、生物学的マーカーの上昇または抑制されたレベル、ならびに症状または疾患もしくは障害についてのマーカーの臨床上許容されるスケールと関連するパラメーターを含む。本明細書において開示される組成物および製剤の総一日使用が、正当な医療判断の範囲内で主治医により決定されるであろうことは理解されるだろう。要求される正確な量は、処置される疾患のタイプのような要因に依存して変動するだろう。

20

【0093】

対象における心血管状態または疾患の処置に関して、用語「治療上有効量」は、安全であり、発生または心血管疾患もしくは障害を防ぐか、あるいは遅延させるのに十分な量を指す。したがって、量は、心血管疾患もしくは障害を治癒するかまたは寛解に持ち込むことができ、心血管疾患の進行を遅らせることができ、心血管疾患もしくは障害の症状を遅らせるか、または阻害することができ、心血管疾患もしくは障害の二次症状の確立を遅延するか、または阻害することができ、あるいは心血管疾患もしくは障害の二次症状の発症を阻害することができる。心血管疾患または障害の処置のための有効量は、処置されるべき心血管疾患のタイプ、症状の重症度、処置される対象、対象の年齢および一般的状態、投与の様式などに依存する。したがって、正確な「有効量」を特定することは可能ではない。しかしながら、任意の所定の場合について、適切な「有効量」は、日常的な実験のみを使用して当業者により決定され得る。処置の有効性は、当業者により判断され得、例えば、有効性は、本明細書において考察される心血管疾患または障害の動物モデルにおいて評価することができ、例えば、急性心筋梗塞または虚血-再灌流障害を有するげっ歯類の処置、および本明細書において開示される心血管疾患もしくは障害の少なくとも1つの症状の低下に至る組成物または製剤の任意の処置または投与、例えば、増大した心臓駆出分画、心不全の低下した率、低下した梗塞サイズ、低下した関連する罹患率（肺浮腫、腎不全、不整脈）、改善された運動負荷試験または他のクオリティ・オブ・ライフの測定、ならびに低下した死亡率が、有効な処置を示す。組成物が、心血管疾患または障害の処置のため使用される実施形態において、組成物の有効性が、心血管疾患の実験的動物モデル、例えば、虚血-再灌流障害の動物モデル（Headrick J P, Am J Physiol Heart Circ Physiol 285; H1797; 2003）、および動物モデル急性心筋梗塞（Yang Z, Am J Physiol Heart Circ Physiol 282; H949; 2002; Guo Y, J Mol Cell Cardiol 33; 825-830, 2001）を使用して、判断

30

40

50

することができる。実験動物モデルを使用するとき、処置の有効性は、無処置の動物に対して、処置された動物において、心血管疾患または障害の症状における低減、例えば、呼吸困難、胸痛、動悸、眩暈、失神、浮腫、チアノーゼ、蒼白、疲労および高血圧の1つまたは複数の症状における低減がより早く生じるとき、証明される。「より早く」により、例えば、腫瘍のサイズにおける低下が、少なくとも5%より早くだが、好ましくは、さらに、例えば、1日早く、2日早く、3日早く、またはそれ以上で生じることが意味される。

【0094】

本明細書において使用される、心血管疾患または障害の処置に関して使用されるとき用語「処置すること」を使用して、心血管疾患もしくは障害の症状および/または生化学的マーカーの低減を指し、例えば、少なくとも約10%による、心血管疾患の少なくとも1つの生化学的マーカーにおける低減が、有効な処置とみなされるだろう。心血管疾患にかかる生化学的マーカーの例は、例えば、血中のクレアチンホスホキナーゼ(CPK)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、乳酸脱水素酵素(LDH)の低減、および/または心血管疾患の症状における低下、および/または、心電図(ECGもしくはEKG)、または心エコー図(心臓超音波)、ドプラ超音波および核医学イメージングにより測定される当業者のいずれかにより決定される血流ならびに/あるいは心機能の改善を含む。少なくとも約10%による、心血管疾患の症状の低減はまた、本明細書において開示される方法による有効な処置であるとみなされるだろう。代替の例として、心血管疾患の症状における低減、例えば、少なくとも約10%による、以下の呼吸困難、胸痛、動悸、眩暈、失神、浮腫、チアノーゼなどの少なくとも1つの低減もしくはかかるシステムの休止、または少なくとも約10%による、心血管疾患の1つのかかる症状のサイズにおける低減もまた、本明細書において開示される方法により、感情的処置とみなされるだろう。幾つかの実施形態において、治療剤は、心血管疾患または障害を実際に除去し、むしろ丁度、症状を管理可能な程度まで低減することが好ましいが、要求されない。

【0095】

本明細書において開示される方法による処置に適している対象は、当業者に一般に公知の心筋梗塞(一般に、心臓発作として言及される)を診断する任意の方法により同定することができる、本明細書において開示される方法を使用した処置に適しており、かかる診断方法は、例えば、(i)クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、乳酸脱水素酵素(LDH)および他の心筋梗塞中に放出される酵素のレベルを検出するための血液検査；(ii)紙またはコンピューターモニター上のいずれかでの心臓の活性の図表による記録である心電図(ECGまたはEKG)を含むが、これらに限定されない。ECGは、疾患および/または損傷を検出する際に有益であり得；(iii)心エコー図(心臓超音波)は、先天性心疾患を調べ、心臓壁、弁および血管の機能異常を含む、心臓壁の異常を評価するために使用され；(iv)ドプラ超音波を使用して、心臓弁を通る血流を測定することができ；(v)核医学イメージング(当該技術分野において放射性核種スキャンングとしても言及される)は、器官の解剖学および機能の可視化を可能にし、これを使用して、冠動脈疾患、心筋梗塞、弁疾患、心移植拒絶を検出することができ、バイパス術の有効性をチェックできるか、または血管新生もしくは冠動脈バイパス手術のための患者を選択することができる。

【0096】

本明細書において互換的に使用され、心筋梗塞を指す用語「冠動脈疾患」および「急性冠症候群」は、心血管の状態、疾患または障害を指し、対象、特に、ヒト対象における不十分な、所望されないまたは異常な心機能、例えば、虚血性心疾患、高血圧性心臓疾患および肺高血圧性心臓疾患、弁膜症、先天性心疾患および鬱血性心不全に至る任意の状態により特徴付けられる全ての障害を含む。不十分なまたは異常な心機能は、疾患、損傷および/または加齢の結果であり得る。背景として、心筋障害に対する応答は、幾つかの細胞が死ぬ一方、他のものは依然死んでいないものの、機能不全である冬眠状態になる明確な経路をたどる。これに、炎症性細胞の浸潤、瘢痕の一部としてのコラーゲンの沈着、新た

10

20

30

40

50

な血管の内殖および持続細胞死の度合と並行して起こったものの全てが続く。

【0097】

本明細書において使用される、用語「虚血」は、血液の流入の低減に起因した任意の局所性組織虚血を指す。用語「心筋虚血」は、冠動脈硬化および/または心筋への不十分な酸素供給により引き起こされる循環障害を指す。例えば、急性心筋梗塞は、心筋組織に対する不可逆的な虚血発作を表す。この発作は、冠循環において閉塞性(例えば、血栓性または塞栓)現象をもたらし、心筋代謝需要が、心筋組織への酸素の供給を超える環境を生じる。

【0098】

本明細書において互換的に使用される用語「組成物」または「医薬組成物」は、当該技術分野においてありふれており、哺乳類、好ましくは、ヒトまたはヒト細胞への投与に適切である薬学的に許容可能な担体のような、賦形剤を通常含む組成物または製剤を指す。幾つかの実施形態において、医薬組成物は、例えば、標的組織への、直接注射によりもしくはカテーテル注入を介して標的組織または器官への直接的デリバリーのため特に製剤化することができる。他の実施形態において、組成物は、経口、点眼、非経口、静脈内、動脈内、皮下、鼻腔内、舌下、脊髄内、脳室内などを含むが、これらに限定されない、多数の経路の1つまたは複数を経た投与のため特に製剤化することができる。加えて、局所(例えば、口腔粘膜、呼吸粘膜)および/または経口投与のための組成物は、当該技術分野において公知であり、本明細書において記載される、液剤、懸濁剤、錠剤、ピル、カプセル剤、持続放出製剤、口腔リンス、または粉剤を形成することができる。組成物はまた、安定剤および保存剤を含むことができる。担体、安定剤およびアジュバントの例として、University of the Sciences in Philadelphia (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons, 21st Ed.

【0099】

本明細書において使用される、用語「投与すること」、「導入すること」および「移植すること」は、互換的に使用され、所望される部位もしくは組織位置にて、医薬組成物の少なくとも部分的な局在性をもたらす方法または経路による、心筋芽前駆細胞を含む医薬組成物、あるいは本明細書において記載される分化した心筋細胞(例えば、心室心筋細胞)の集団を含む組成物の対象への留置を指す。幾つかの実施形態において、医薬組成物は、対象において有効な処置をもたらす任意の適切な経路により投与することができ、すなわち、投与は、細胞の少なくとも一部が、所望される標的組織もしくは標的細胞位置に位置する対象における所望される位置または組織へのデリバリーをもたらす。

【0100】

本明細書において使用される語句「非経口投与」および「非経口投与される」は、通常注射による、経腸および局所投与以外の投与の様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内注射ならびに注入を含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される語句「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」および「末梢に投与される」は、それらが、動物の全身に入り、したがって、代謝および他の同様のプロセス、例えば、皮下または静脈内投与の対象になるように、心臓組織への直接的以外の、心血管の幹細胞および/またはそれらの子孫および/または化合物および/または他の物質の投与を意味する。

【0101】

語句「薬学的に許容可能」を、本明細書において利用して、合理的な恩恵/リスクの比と釣り合った過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なく、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに、正当な医療判断の範囲内で適切である化合物、物質、組成物、ならびに/あるいは投薬形態を指す。

【0102】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される語句「薬学的に許容可能な担体」は、対象作用物質を1つの器官、もしくは身体の一部から、別の器官、もしくは身体の一部に運ぶか、または輸送する際に関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入物質のような、薬学的に許容可能な物質、組成物あるいはビヒクルを意味する。それぞれの担体は、製剤の他の成分と適合可能であるという意味で、「許容可能」であるべきである。

【0103】

本明細書において使用される用語「薬物」または「化合物」または「試験化合物」は、疾患もしくは状態を処置するか、または予防するか、または制御するために対象に投与される、化学成分もしくは生物学的製品、または化学成分または生物学的製品の組み合わせを指す。化学成分または生物学的製品は、好ましくは、だが必須ではなく、低分子量化合物であるが、より大きな化合物、例えば、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リボタンパク質、アプタマー、ならびにその修飾物および組み合わせを含むが、これらに限定されない、核酸のオリゴマー、アミノ酸、または炭水化物であってもよい。

10

【0104】

本明細書において使用される用語「移植」は、新たな細胞（例えば、初期化された細胞）、組織（例えば、初期化された細胞から生じた分化した細胞）、または器官の宿主（すなわち移植レシピエントまたは移植対象）への導入を指す。

【0105】

本明細書において使用される、用語「マーカーと反応性の作用物質」は、マーカーに結合するかさもなければそれと相互作用する作用物質を指す。好ましくは、作用物質はマーカーに「特異的に」結合するかさもなければそれと相互作用し、そのためそれは他のマーカー以外のタンパク質に結合しないか、それと相互作用しない。

20

【0106】

本明細書において使用される用語「抗体」は、抗体全体および任意の抗原結合フラグメント（すなわち、「抗原結合部分」）またはその一本鎖を含む。「抗体」は、1つの好ましい実施形態において、ジスルフィド結合により間で結合された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において V_H として略される）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 CH_1 、 CH_2 および CH_3 からなる。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において V_L と略される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL からなる。本明細書において使用される抗体（または単に「抗体部分」）の用語「抗原結合部分」は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数のフラグメントを指す。

30

【0107】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、特定のエピトープについての単一結合特異性および親和性を提示する抗体を指す。

【0108】

本明細書において使用される用語「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を提示し、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および場合により定常領域を有する、抗体を指す。

40

【0109】

本明細書において使用される用語「ヒト化モノクローナル抗体」は、単一結合特異性を提示し、ヒトフレームワークおよび定常領域に合体させた、非ヒト抗体（例えば、マウスモノクローナル抗体）由来の重ならびに軽鎖 CDR_1 、 2 ならびに 3 を有する、抗体を指す。

【0110】

本明細書において使用される用語「キメラモノクローナル抗体」は、単一結合特異性を提示し、別の種由来の定常領域と結び付けられた1つの種由来の重および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。

50

【0111】

本明細書において使用される用語「融合タンパク質」は、2つの異なるタンパク質、またはその部分が、互いに作動可能に結合されている、典型的には、組換えDNAテクノロジーを使用して作られた複合タンパク質を指す。非限定的な例は、非免疫グロブリンタンパク質が、免疫グロブリンFc領域に作動可能に結合されている、Fc融合タンパク質である。

【0112】

本発明の様々な態様が、以下のサブセクションにさらに詳細に記載される。

【0113】

ヒト心臓の心室前駆細胞

マーカーとしてIsl1 (ISL1) を使用して、ヒト心室前駆細胞 (HVP) を生成するためのスケラブルな二段階培養プロトコールが開発されて、ヒト多能性幹細胞 (hPSC) からの数十億の純粋なHVPの生成および精製を可能にする細胞表面マーカーが同定された。この頑強な心臓分化プロトコールと組み合わせたRNA-seq技術を使用して、hPSC分化の異なる時点のゲノムスケールレベルの転写発現を実行した。これらの実験は、hPSCに由来したIsl1+心筋芽前駆細胞のための細胞表面マーカーとしての、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9の同定につながった。これらの実験は、米国特許出願公開第2016/0053229号および米国特許出願公開第2016/0108363号に詳細に記載され、そのそれぞれの全体的内容は、本明細書で明確に、参照により取り込まれる。

10

20

【0114】

さらに、RNA-seq実験は、さらなる潜在的表面マーカー、例えば、ブラキウリを発現する中胚葉細胞のための以下のマーカー：FZD10、CD48、CDID、CD8B、IL15RA、TNFRSF1B、TNFSF13、ICOSLG、SEMA7A、SLC3A2、SDC1およびHLA-A；ならびに心臓の中胚葉mesp1陽性細胞のための以下のマーカー：CXCR4、ANPEP、ITGA5、TNFRSF9、FZD2、CDID、CD177、ACVRL1、ICAM1、LICAM、NGFR、ABC G2、FZD7、TNFRSF13CおよびTNFRSF1B；ならびに心筋前駆細胞のための以下のマーカー：PDGFRAを同定した。分化の異なる段階の前駆体を単離するために、これらのさらなる心臓前駆体マーカーのいずれも、本発明の方法で使用することができる。

30

【0115】

これらのHVPは、4週ヒト胎児の心室チャンバにおいて同定することができる。さらに、マウスの正常なまたは損傷を受けた心臓への精製HVP細胞の移植の後、富化された前駆体細胞はcTnT+心筋細胞を生成し、前駆体細胞の心筋原的性質を実証した。これらのインビボ移植研究では、正常な心臓と比較して、心筋芽前駆細胞を移植した損傷心臓においてより大きな移植片が観察され、心筋細胞再生のための心筋芽前駆細胞の能力を実証した。

【0116】

本明細書で提供される心室前駆細胞の移植は、移植の5カ月後までに力を発生すること、カテコールアミンに応答すること、自動性を失うこと、T管を含有することおよび成体桿状細胞の肥大性成長を提示することができる、大きなサイズ（例えば、マウス心臓のサイズの2倍）の純粋で、機能的および成熟したヒト心室筋器官を生成する。したがって、ヒト心室生成は、本明細書で提供される精製HVPによって促進される細胞自律経路を通して達成することができる。本明細書で提供されるこれらのHVPは、マウス-ヒトキメラにおけるヒト心疾患の新しいインビボモデル、および心疾患のための器官に対する器官の再生治療戦略の開発を可能にする。

40

【0117】

ヒト心室前駆体 (HVP) を含有する培養物の生成

ヒト心室前駆体 (HVP) を含む心筋前駆細胞を含有する培養物は、HVPの生成に適

50

切な培養条件下でのヒト多能性幹細胞 (hPSC) の培養によって得ることができる。培養条件および適する出芽細胞の例示的なセットは、実施例 1 および実施例 10 に詳細に記載され、本明細書ではヒト心室前駆体生成 (HVP) プロトコールとも呼ばれる。適する hPSC 出芽細胞には、人工多能性幹細胞 (iPSC) および ES 細胞系などのヒト胚性幹細胞が含まれる。プロトコールのために、Wnt / - カテニンシグナル伝達は hPSC において先ず活性化され、その後インキュベーション期間が続き、その後 Wnt / - カテニンシグナル伝達の阻害が続く。Wnt / - カテニンシグナル伝達活性化は、Gsk3 阻害剤、好ましくは CHIR98014 (CAS 556813-39-9; 例えば Selleckchem から市販されている) とのインキュベーションによって達成される。Wnt / - カテニンシグナル伝達阻害は、Porcn 阻害剤、好ましくは Wnt-C59 (CAS 1243243-89-1; 例えば Selleckchem または Tocris から市販されている) とのインキュベーションによって達成される。Gsk3 阻害剤は心臓の中胚葉分化を促進するために使用されるが、一方、Porcn 阻害剤は中胚葉細胞からの心室前駆体分化を増強するために使用される。

10

20

30

40

50

【0118】

したがって、ヒト心室前駆体 (HVP) を含む培養物を生成する方法は、Gsk3 阻害剤、好ましくは CHIR98014 を含む培地においてヒト多能性幹細胞 (hPSC) を少なくとも 24 時間、より好ましくは 2 日間または 3 日間培養すること、その後、Porcn 阻害剤、好ましくは Wnt-C59 を含む (および Gsk3 阻害剤を欠く) 培地において hPSC を少なくとも 48 時間培養して HVP を生成することを含む。実験は、CHIR-98014 による 24 時間の処置の後、hPSC の 99% より多くが中胚葉マーカーブラキュリを発現したこと、および、CHIR-98014 による処置の 3 日後に、分化した細胞の 95% より多くが心臓中胚葉の印である Mesp1 を発現したことを示した。さらに、Wnt-C59 による 48 時間の処置は、中胚葉細胞からの心室前駆体分化を増強した。

【0119】

従って、Gsk3 および Porcn 阻害剤の使用のタイミングに関して、典型的には、培養の 0 日目に、hPSC は、Gsk3 阻害剤と共に培養され、培養の 3 日目に、培地を変更して、Gsk3 阻害剤を取り除き、次に、細胞は、培養の 5 日目の間中、Porcn 阻害剤を含有する培地と共に培養される。HVP 生成は、培養中の 5 ~ 7 日の間 (包括的) で最適であり、培養の 6 日目にピークがある。培養条件ならびに Gsk3 および Porcn 阻害剤の使用のタイミングについての他の非限定的な、典型的な詳細は、実施例 1 および実施例 10 において詳細に記載される。

【0120】

したがって、本明細書において使用される、「5 ~ 7 日目の心筋前駆細胞」または「6 日目の心筋前駆細胞」の培養物は、hPSC が 0 日目から 3 日目までの Wnt / - カテニンシグナル伝達の活性化 (例えば、Gsk3 阻害剤との培養による) と、その後の 3 日目から 5 日目までの Wnt / - カテニンシグナル伝達の阻害 (例えば、Porcn 阻害剤との培養による) に付され、そのため 5、6 および 7 日目に培養物が HVP を含有する培養物を指す。

【0121】

ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法

一態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞 (HVP) を単離する方法に係する。実施例 13 に記載の通りに、心筋前駆細胞の 5 ~ 7 日目の培養物から HVP を単離するのに十分である、ヒト多能性幹細胞の 1 つまたは複数の細胞表面マーカー (陰性マーカー) を使用した、陰性選択アプローチを開発した。したがって、一実施形態では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

心臓の心室前駆細胞を含む 5 ~ 7 日目の心筋前駆細胞の培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーと反応性の 1 つまたは複数の第 1 の作用物質と接触させること; および

第1のマーカ-非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離することを含む方法を提供する。

【0122】

別の態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞を単離する方法であって、

ヒト多能性幹細胞を、心筋前駆細胞を生成する条件下で培養して、5～7日目の心筋前駆細胞の培養物を得ること；

5～7日目の心筋前駆細胞の培養物を、ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-と反応性の1つまたは複数の第1の作用物質と接触させること；および

第1のマーカ-非反応性の陰性細胞を反応性細胞から分離し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞を単離することを含む方法に關係する。

【0123】

一実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ（AP）、およびその組合せからなる群から選択される。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ（AP）、およびその組合せからなる群から選択される。

【0124】

一実施形態では、培養物は、HVPを含む心筋前駆細胞の6日目の培養物である。HVPを含む心筋前駆細胞の5～7日目の培養物または6日目の培養物を、上記の通り調製することができる。

【0125】

HVPを単離するための方法のある特定の実施形態では、陰性選択工程に加えて陽性選択工程を組み込み、それによってHVPを単離することができる。したがって、ある特定の実施形態では、培養物を、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-に反応性の1つまたは複数の第2の作用物質とさらに接触させ；

第2のマーカ-反応性の陽性細胞を、非反応性細胞から分離する。

【0126】

一実施形態では、1つまたは複数の第1の作用物質との接触の前に、培養物を、1つまたは複数の第2の作用物質と接触させる。別の実施形態では、1つまたは複数の第1の作用物質との接触の後に、培養物を、1つまたは複数の第2の作用物質と接触させる。別の実施形態では、1つまたは複数の第1の作用物質との接触と同時に、培養物を、1つまたは複数の第2の作用物質と接触させる。

【0127】

一実施形態では、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、TNFSF9である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、TNFSF9である。

10

20

30

40

50

【0128】

一実施形態では、少なくとも1つの第2のマーカ-は、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される2つのマーカ-である。一実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、FZD4およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、FGFR3およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、TNFSF9およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1およびFZD4である。

【0129】

同じく実施例に記載の通り、Islet1は、心臓の心室前駆細胞によってJAG1、FZD4、LIFR、FGFR3および/またはTNFSF9と共発現されるマーカ-であり、したがって、両方のマーカ- (Islet1ならびにJAG1、FZD4、LIFR、FGFR3および/またはTNFSF9から選択される別のマーカ-) は、これらの前駆体細胞の単離を促進するための陽性マーカ-として使用することができる。したがって、上記の方法の別の実施形態では、ヒト細胞の培養物を、Islet1に反応性の第3の作用物質とも接触させ; Islet1/第1のマーカ-反応性の陽性細胞を、非反応性細胞から分離する。ヒト細胞の培養物は、第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質およびIslet1に反応性の第3の作用物質と同時に接触させることができる。あるいは、ヒト細胞の培養物は、第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質と接触させる前にIslet1に反応性の第3の作用物質と接触させることができる。あるいは、ヒト細胞の培養物は、Islet1に反応性の第3の作用物質と接触させる前に、第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質と接触させることができる。

10

20

【0130】

好ましい実施形態では、第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質は、モノクローナル抗体などの抗体である。非限定的な例には、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンまたはアルカリ性ホスファターゼ(AP)への結合特異性を有する、マウス、ウサギ、ヒト、ヒト化またはキメラのモノクローナル抗体が含まれる。第1のマーカ-に特異的に結合するモノクローナル抗体は、当該技術分野において市販されている(例えば、R&D Systems、Santa Cruz Biotechnology、Thermo Fisher Scientific、Abcam、Stem Cell Technologies)。さらに、第1のマーカ-に特異的に結合する抗体は、第1のマーカ-を抗原として使用して、当該技術分野において十分に確立されている標準の技術を使用して調製することができる。

30

【0131】

好ましい実施形態では、第2のマーカ-に反応性の第2の作用物質は、モノクローナル抗体などの抗体である。非限定的な例には、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3またはTNFSF9への結合特異性を有する、マウス、ウサギ、ヒト、ヒト化またはキメラのモノクローナル抗体が含まれる。JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3またはTNFSF9に特異的に結合するモノクローナル抗体は、当該技術分野において市販されている(例えば、R&D Systems、Santa Cruz Biotechnology、Thermo Fisher Scientific、Abcam、Stem Cell Technologies)。さらに、第2のマーカ-に特異的に結合する抗体は、第2のマーカ-を抗原として使用して、当該技術分野において十分に確立されている標準の技術を使用して調製することができる。

40

【0132】

別の実施形態では、第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質または第2のマーカ-に反応性の第2の作用物質は、マーカ-のリガンド、例えば可溶性リガンドまたは可溶性リガンド融合タンパク質である。例えば、Jagged1リガンドの非限定的な例には、N

50

otch - 1およびNotch - 2が含まれる。好ましくは、Jagged 1リガンドは、Notch - 1である。Frizzled 4リガンドの非限定的な例には、ネスチンタンパク質およびWnt受容体が含まれる。LIFRリガンドの非限定的な例には、白血病抑制因子(LIF)、オンコスタチンM(OSM)およびカルジオトロフィン - 1(CT - 1)が含まれる。好ましくは、LIFRリガンドは、LIFである。FGFR 3リガンドの非限定的な例には、線維芽細胞増殖因子1(FGF 1)、線維芽細胞増殖因子2(FGF 2)および線維芽細胞増殖因子9(FGF 9)が含まれる。TNFSF 9リガンドの非限定的な例は、4 - 1BB(CD 137; TNFRSF 9)である。可溶性リガンドは、標準的組換えDNA技術を使用して、例えば膜貫通および細胞質ドメインの欠失によって調製することができる。可溶性リガンドは、同じく標準的組換えDNA技術を使用して可溶性リガンド融合タンパク質に形質転換することができる。融合パートナーが融合タンパク質の分離を促進する結合性部分を含むことができる、融合タンパク質を調製することができる。

10

【0133】

同様に、Islet 1に反応性の作用物質は、例えば、抗Islet 1抗体(例えば、モノクローナル抗体)またはIslet 1リガンド融合タンパク質などのIslet 1リガンドであってよい。

【0134】

反応性細胞から第1のマーカ-非反応性の陰性細胞を分離するために、当該技術分野において公知の様々な異なる細胞分離技術の1つを使用することができる。一実施形態では、第1のマーカ-非反応性の陰性細胞は、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって反応性細胞から分離される。FACS技術および細胞を分離するためにそれを実行する装置は、当該技術分野において十分に確立されている。細胞分離のためにFACSが使用される時、好ましくは使用される第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質は、第1のマーカ-に特異的に結合する蛍光標識モノクローナル抗体である。代わりに、細胞分離は、例えば、磁気活性化細胞選別(MACS)によって達成することができる。細胞分離のためにMACSが使用される時、好ましくは使用される第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質は、第1のマーカ-に特異的に結合するモノクローナル抗体でコーティングされた磁気ナノ粒子である。代わりに、本発明の心臓の心室前駆細胞を単離する方法に、IsoRAftアレイおよびDEParray技術を限定されずに含む、当該技術分野において公知である他の単一細胞ソーティング方法を適用することができる。

20

30

【0135】

非反応性細胞から第2のマーカ-反応性の陽性細胞を分離するために、当該技術分野において公知の様々な異なる細胞分離技術の1つを使用することができる。一実施形態では、第2のマーカ-反応性の陽性細胞は、磁気活性化細胞選別(MACS)によって非反応性細胞から分離される。細胞分離のためにMACSが使用される時、好ましくは使用される第2のマーカ-に反応性の第2の作用物質は、第2のマーカ-に特異的に結合するモノクローナル抗体でコーティングされた磁気ナノ粒子である。代わりに、細胞分離は、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって達成することができる。FACS技術および細胞を分離するためにそれを実行する装置は、当該技術分野において十分に確立されている。細胞分離のためにFACSが使用される時、好ましくは使用される第2のマーカ-に反応性の第2の作用物質は、第2のマーカ-に特異的に結合する蛍光標識モノクローナル抗体である。代わりに、本発明の心臓の心室前駆細胞を単離する方法に、IsoRAftアレイおよびDEParray技術を限定されずに含む、当該技術分野において公知である他の単一細胞ソーティング方法を適用することができる。

40

【0136】

第1のマーカ-に反応性の第1の作用物質および第2のマーカ-に反応性の第2の作用物質と接触させる前に、心筋前駆細胞の生成に至る条件下でヒト多能性幹細胞を培養することができる。心筋前駆細胞を生成するための培養条件は、当該技術分野において記載され(例えば、Lian, X.ら(2012年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109巻: E

50

1848～1857頁；米国特許出願公開第20130189785号を参照）、実施例1および図1に、ならびに実施例10にも詳細に記載されている。一般的に、Wnt/
-カテニンシグナル伝達はhPSCにおいて先ず活性化され、その後インキュベーション
期間が続き、その後Wnt/
-カテニンシグナル伝達の阻害が続く。Wnt/
-カテニンシグナル伝達の活性化は、Gsk3阻害剤、好ましくはCHIR98014(CAS
556813-39-9)とのインキュベーションによって達成される。Wnt/
-カテニンシグナル伝達の阻害は、Porcn阻害剤、好ましくはWnt-C59(CAS1
243243-89-1)とのインキュベーションによって達成される。本発明の方法に
おける使用のため適切なhPSCは、19-11-1、19-9-7または6-9-9細
胞のような、誘導多能性幹細胞(iPSC)(Yu, J. et al. (2009) Sc
ience 324:797-801)、およびES03細胞(WiCell Research Institute)またはH9細胞のようなヒト胚性幹細胞株(Thomson, J. A. et al. (1998) Science 282:1145-1147)
を含む。心筋芽前駆体を生成するための適切な培養培地は、E8培地、mTeSR1培
地およびインスリンを除いたRPMI/B27、それぞれが、実施例1および/または実
施例11においてさらに記載される。

【0137】

好ましくは、ヒト心筋芽前駆細胞は、心室前駆細胞である。心筋芽前駆細胞を心室系統
に偏らせる、培養条件が、ここで、決定されている。これらの心室心筋芽前駆細胞は、R
PMI/B27培地において培養することができ、それらは、心室筋細胞にさらに分化す
ることができる。それらが、インビトロで心室細胞に分化する(例えば、下で記載される
MLC2vマーカーを発現する)ように、インビトロでの心臓の心室前駆細胞を培養する
ための好ましい培地は、心臓の前駆体培養(CPC)培地(20%ノックアウト血清代替
物、2.5mM Glutamaxおよび100μg/mlビタミンCを補填した高度D
MEM/F12)である。

【0138】

分化した心臓細胞の公知のマーカーを使用して、心筋前駆細胞の分化により生成される
細胞のタイプを同定することができる。例えば、心臓のトロポニンI(cTnI)を、心
筋細胞分化のマーカーとして使用することができる。CD144(VE-カドヘリン)を
、内皮細胞のマーカーとして使用することができる。平滑筋アクチン(SMA)を、平滑
筋細胞のマーカーとして使用することができる。MLC2vを、心室筋細胞のマーカーと
して使用することができる。未成熟心室筋細胞と心房性筋細胞の両方において発現される
、MLC2aを、それらの細胞タイプについてのマーカーとして使用することができる。
加えて、心房性筋細胞において特異的に発現される、サルコリピンを、心房性筋細胞につ
いてのマーカーとして使用することができる。心室において主に、心房において、比較的
低い程度まで発現される、ホスホランパンをまた、マーカーとして使用することができる
。心房性心筋細胞において発現される、Hey1とも呼ばれる、ヘアリー関連転写因子1
(HRT1)を、心房性心筋細胞についてのマーカーとして使用することができる。心室
心筋細胞において発現される、HRT2(Hey2)を、心室心筋細胞についてのマーカー
として使用することができる。加えて、IRX4は、発生の全てのステージ中で心室の
制限された発現パターンを有し、したがって、心室系統マーカーとして使用することが
できる。要約すると、心室において発現され、したがって、適切な心室マーカーである、遺
伝子は、MLC2v、IRX4およびHRT2であり、一方、心房において発現され、し
たがって、適切な心房性マーカーである遺伝子は、MLC2a、HRT1、サルコリピン
およびANF(心房性ナトリウム利尿因子)である。心室分化の好ましいマーカーは、M
LC2vである。

【0139】

ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団

別の態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団ならびにかかる前駆
体の単離されたクローン集団を得る方法を提供する。本発明は、10億またはそれより多

10

20

30

40

50

くの細胞のクローン集団を達成することができるように、心臓の心室前駆細胞の拡大および増殖を可能にする。かかる多数に心臓の心室前駆細胞をクローンで拡大させる能力は、心機能を増強するためのこれらの細胞のインビボでの首尾よい使用のために必要な特性であるが、その理由は、かかる使用が10億またはそれより多くのオーダーで細胞を必要とするからである。

【0140】

したがって別の態様では、本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団を得る方法であって、

単一のヒト心臓の心室前駆細胞を単離することであって、単一のヒト心臓の心室前駆細胞は、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、単離すること；ならびに

第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のヒト心臓の心室前駆細胞を、細胞が少なくとも 1×10^9 細胞に拡大し、それによってヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団が得られるような条件下で培養することを含む方法を提供する。

【0141】

一実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ(AP)、およびその組合せからなる群から選択される。

【0142】

一実施形態では、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第2のマーカ-は、TNFSF9である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、LIFRである。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、JAG1である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FZD4である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、FGFR3である。別の実施形態では、第1のマーカ-は、TRA-1-60であり、第2のマーカ-は、TNFSF9である。

【0143】

一実施形態では、少なくとも1つの第2のマーカ-は、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される2つのマーカ-である。一実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、FZD4およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、FGFR3およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、TNFSF9およびLIFRである。一実施形態では、第2のマーカ-は、JAG1およびFZD4である。

【0144】

好ましい実施形態では、単一のヒト心臓の心室前駆細胞は、最初の培養時にIslet1陽性、Nkx2.5陰性およびflk1陰性である。実施例にさらに記載されるように、かかる単一の細胞は、心筋芽前駆体の生成を促進する条件下での培養の概ね6日目に得ることができる。細胞が心室マーカ-MLC2vを発現するように、ヒト心臓の心室前駆

10

20

30

40

50

体のクローン集団をさらに培養し、インビトロで分化させることができる。

【0145】

好ましくは、単一のヒト心臓の心室前駆細胞は、蛍光活性化細胞選別（FACS）によって、磁気活性化細胞選別（MACS）によって、または両者の組合せによって単離される。一実施形態では、第1のマーカーについて陰性である細胞はMACS細胞によって単離され、JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される第2のマーカーについて陽性である細胞はFACSによって単離される。クローン増大のために、生じた第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性の集団から、単一のHVPを次に単離することができる。あるいは、当該技術分野において公知でありおよび/または本明細書に記載される他の細胞ソーティング方法によって、細胞を単離することができる。

10

【0146】

好ましくは、単一の第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、第1のマーカーに反応性の1つまたは複数の第1の作用物質、および第2のマーカーに反応性の1つまたは複数の第2の作用物質、例えば先に記載される第1のマーカーまたは第2のマーカーに反応性のモノクローナル抗体または他の作用物質を使用して単離される。

【0147】

好ましい実施形態では、単一の第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、先に記載される心臓前駆体培養（CPC）培地において培養される。

20

【0148】

好ましい実施形態では、単一の第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、細胞が、心室分化に偏るような条件下で培養される。好ましい培養条件には、CPC培地における培養が含まれる。

【0149】

様々な実施形態では、単一の第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞は、少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 3×10^9 細胞、少なくとも 4×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞、少なくとも 6×10^9 細胞、少なくとも 7×10^9 細胞、少なくとも 8×10^9 細胞、少なくとも 9×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞に拡大させることができる。

30

【0150】

したがって、本発明は、少なくとも 1×10^9 個のヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）のクローン集団も提供し、ここで、HVPは、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカーについて陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカーについて陽性である。一実施形態では、第1のマーカーは、TRA-1-60である。別の実施形態では、第1のマーカーは、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ（AP）、およびその組合せからなる群から選択される。別の実施形態では、第1のマーカーは、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG、SOX2、E-カドヘリン、ポドカリキシンおよびアルカリ性ホスファターゼ（AP）、およびその組合せからなる群から選択される。HVPのクローン集団は、ヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団を得るための本発明の方法によって入手できるかまたは得られる。様々な実施形態では、第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性のヒト心臓の心室前駆細胞のクローン集団は、少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 2×10^9 細胞、少なくとも 3×10^9 細胞、少なくとも 4×10^9 細胞、少なくとも 5×10^9 細胞、少なくとも 6×10^9 細胞、少なくとも 7×10^9 細胞、少なくとも 8×10^9 細胞、少なくとも 9×10^9 細胞または少なくとも 10×10^9 細胞を含む。インビトロでの心室系統への前駆体細胞の分化は

40

50

、心室系統の方へ偏らせるための本明細書に記載される条件下での培養によって達成することができる。さらに、インビボでの心臓の心室前駆細胞の移植は、インビボでの心室分化に至る。

【0151】

本発明は、心臓の心室前駆細胞のクローン集団を含む医薬組成物も提供する。医薬組成物は、典型的には、無菌であり、医薬投与に適した緩衝液、培地、賦形剤などを含み得る。1つの実施形態において、クローン集団を含む医薬組成物は、3次元(3D)基質上に製剤される。3D基質上に製剤された組成物は、心筋修復のためインビボに移植することができる心筋細胞パッチの形成に特に好ましい。さらに、組成物は、Domian, I. J. et al. (2009) Science 326: 426 - 429において記載される薄い筋フィルム(MTF)のような、細胞の2次元(2D)シートに製剤することができる。細胞組織のかかる2Dシートはまた、心筋修復のためインビボに移植することができる心筋細胞パッチの形成において使用することができる。

10

【0152】

インビボ組織操作

ヒト心室前駆体(HVP)が、ヌードマウスにおいて腎被膜下に移植された、実施例6および実施例7において記載される、インビボ移植研究は、腎被膜の表面上の成熟、機能的、ヒト心室筋の巨大な壁に自発的にアセンブルするHVPの能力を証明する。血管新生は、マウス脈管構造を心室筋壁と呼ぶことにより、パラクリン経路を介して生じ、一方、基質は、細胞の自律的経路を介して前駆体自体から生成される。HVPが、正常マウス心臓に移植される、実施例8において記載される、インビボ心筋内移植研究は、HVPが、それらが拡大し、続いて、分化し、心外膜の表面上のヒト心室筋の壁に成熟する、心外膜表面に自発的に遊走することを証明する。まとめると、これらの研究は、ヒト心室形成が、精製されたHVPを介してインビボで完全な細胞の自律的経路を介して生じることができ、これにより、器官に対する器官のインビボ組織操作においてそれらを使用することが可能となることを示す。

20

【0153】

ヒト心室心筋は、再生について制限された能力を有し、その大部分が、年齢10歳を超えると失われる(Bergmann, O. et al. (2015) Cell 161: 1566 - 1575)。したがって、心筋修復再生を生成するための新規ストラテジー、および心臓損傷中の組織操作アプローチは、再生生物学および医薬において熱心な研究の対象であった(Sahara, M. et al. (2015) EMBO J. 34: 710 - 738; Segers, V. F. M. and Lee, R. T. (2008) Nature 451: 937 - 942)。任意の実質器官の組織操作中に組織的血管新生および基質形成を達成する必要があると、仮説は、インビボでのインタクトな3-D実質器官の形成が、血管細胞および/または導管、ならびに収縮力のアライメントおよび生成を可能にするであろう生体材料および/または脱細胞化基質の添加を最終的に必要とするであろうということであった(Forbes, S. J. and Rosenthal, N. (2014) Nature Med. 20: 857 - 869; Harrison, R. H. et al. (2014) Tissue Eng. Part B Rev. 20: 1 - 16)。機能的実質器官の形成を達成するためのこれらの様々な成分の添加の複雑さは、臨床的实施に対してこれを減らすための試みを複雑にした(Webber, M. J. et al. (2014) Ann. Biomed. Eng. 43: 641 - 656)。hPSCは、今まで、多いに有望であったが、任意の哺乳類の系において、心臓の表面上で、インビボで純粋な、血管新生された、完全な機能的、かつ成熟3Dヒト心室筋器官を構築することは可能ではなかった(Vunjak-Novakovic, G. et al. (2011) Annu. Rev. Biomed. Eng. 13: 245 - 267)。

30

40

【0154】

ヒトESまたはiPS細胞株のいずれかの再生可能な供給源から数十億の精製されたHVPを生成する能力は、進行した心不全の設定における機能的心室筋の生成への新規アプ

50

ローチを表す。前駆体は、心筋内注射によりデリバリーされ、次に、それらが拡大し、分化し、前駆体マーカーを失う、心外膜表面に自己遊走することができる。数週間の経過を終え、細胞は、細胞サイクルを出て、T管の形成、カテコールアミン応答性、自動性の喪失、整列したサルコメア (sarcomeric) 構造を有する成体の杆体形の立体構造、および hPSC から分化した心筋細胞に由来する他の心筋パッチに匹敵する力を生成する能力を含む、成熟心室心筋の幾つかの独立したマーカーを提示する成体の杆体形の細胞を形成するよう進む (Tulloch, N. L. et al. (2011) *Circ. Res.* 109: 47 - 59)。この細胞の自律的経路のスケラビリティは、ヒト心室フリー壁に対応するレベルに近く、厚さ 1.5 cm を超える組み合わせられた厚さを有するヒト心室筋の異所性生成が可能になった (Basavarajah, S. et al. (2007) *Br. J. Sports Med.* 41: 784 - 788)。

10

【0155】

後のステージにある成体の心臓前駆体の大部分の部位である、心外膜の微小環境に遊走する能力は、HVPの固有の特性であり、心室形成中に心室のコンパクトなゾーンの拡大中にこれらの細胞の正常微小環境を模倣する。従前の研究は、血管透過性における急性虚血性損傷および崩壊の生成が、比較的少数のES細胞由来の心筋細胞の損傷された心筋への移植に必須であり (van Laake, L. W. et al. (2007) *Stem Cell Res.* 1: 9 - 24; Laflamme, M. A. et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25: 1015 - 1024)、そのときでさえ、生存率は低い (< 5%) (Laflamme, M. A. and Murry, C. E. (2011) *Nature* 473: 326 - 335; Laflamme, M. A. et al. (2005) *Am. J. Pathol.* 167: 663 - 671) ことを示した。急性虚血性損傷の非存在下で心外膜の表面上の広範な心室パッチを形成する心筋内HVPの能力は、さらなる生体材料、細胞、または外来遺伝子および/もしくはRNAの導入を必要とすることなく、横に広がった心筋症についての新規治療ストラテジーを提供する。

20

【0156】

より後のステージの前駆体が、心臓または非心臓のいずれかの状況における3次元心室組織の形成についての能力を提示せず、これにより、関与する心室システムを生成することの重要性を強調し、ならびに心室形成の特定のステージにある特定の心室前駆体を精製するので、インビボ正常心臓の心外膜の表面上で3D心室筋壁を形成する能力は、ISL1 / FZD4 / JAG1 / LIFR / FGFR3 / TNFSF9 陽性心室前駆体の固有の特性である。

30

【0157】

したがって、本発明は、本明細書に記載されるHVPを使用してインビボでヒト心室組織を生成する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、非ヒト動物の器官に第1のマーカー陽性/第2のマーカー陰性のHVPを移植すること、およびヒト心室組織が生成されるように前駆体をインビボで成長させることを含む。好ましくは、非ヒト動物は、それがヒト前駆体細胞に対して免疫応答を開始することができないように免疫不全である。一実施形態では、非ヒト動物は、免疫不全NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg tm1Wjl / SzJマウスまたは免疫不全SCID-ベージュマウス (Charles River France から市販されている) などのマウスである。一実施形態では、器官は、腎臓である (例えば、細胞は腎臓囊の下に移植される)。別の実施形態では、器官は、心臓である。様々な実施形態では、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 2×10^6 細胞、少なくとも 3×10^6 細胞、少なくとも 4×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞が移植される。

40

【0158】

移植のためのHVPを得るために、本明細書に記載されるように、HVPの生成に至る条件下でヒト多能性幹細胞 (hPSC) をインビトロで培養することができる (本明細書ではHVPGプロトコールと呼ばれる)。インビトロ培養後にHVPを移植するタイミン

50

グに関して、最適な心室組織生成のため、細胞は、移植の時にHVPにより発現される細胞マーカーに基づき定義され、HVP Gプロトコルの0日目として定義される、培養の開始後の日数にて決定され得る、ステージにて移植されるべきである。1つの実施形態において、細胞は、中胚葉マーカーMESP1のピーク発現として定義され得る、心臓中胚葉形成のピークの後に移植される。典型的には、MESP1発現は、培養の2日目～4日目(包括的)であり、3日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、ピークIslet-1発現に対応する時に移植される。典型的には、Islet1は、培養の4日目～8日目(包括的)であり、培養の6日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、NKX2.5発現のピークの前に移植される。典型的には、NKX2.5発現は、培養の6日目に始まり、培養の10日目にピークがあり、次に、以後維持される。1つの実施形態において、細胞は、下流遺伝子MEF-2およびTBX-1のピーク発現前に、移植される。典型的には、これらの下流遺伝子は、培養の5日目～15日目(包括的)に発現され、培養の8日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、分化した収縮性タンパク質遺伝子の発現前に、移植される。典型的には、収縮性タンパク質遺伝子(TNNT2およびMYH6を含む)の発現は、培養の10日目以降に始まる。ある種の実施形態において、細胞は、上述のマーカーパターンの2つ、3つまたは4つが存在するときの時点で、移植される。別の実施形態において、細胞は、上述のマーカーパターンの全5つが存在するときの時点で、移植される。1つの実施形態において、細胞は、培養の4日目～8日目(包括的)に移植される。より好ましい実施形態において、細胞は、培養の5日目～7日目(包括的)に移植される。最も好ましい実施形態において、細胞は、

10

20

【0159】

移植された細胞は、所望されるサイズ、量または厚さの心室組織の生成を可能にするのに適切な期間、非ヒト動物において成長させることができる。様々な実施形態において、細胞は、1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月または6カ月間成長させることができる。方法は、細胞成長および心室組織への分化の後、心室組織を非ヒト動物から回収することをさらに含み得る。

【0160】

心機能を増強する方法

本発明の心室前駆細胞を、インピボで使用して、細胞を心臓に直接移植することにより、心機能を増強することができる。HVPが、全3つのタイプの心臓系統細胞(心筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞)に分化する能力を有することは、ここで示されている(実施例3を参照)。さらに、心室系統に向けてバイアスをかける条件下で培養されたとき、HVPは、インピボの天然の心室環境に移植されるとき、主に心室筋表現型に適合することが今や示され、これは、これらの前駆細胞が、心室環境を「認識し」、インピボで適切に応答し、分化することを示している。心室環境に対する損傷は、心臓の疾患および障害における障害された心機能の大きな原因となるので、本発明の心室前駆細胞を使用して心室筋細胞を回復させる能力は、当該技術分野における大きな進歩を表す。

30

【0161】

したがって別の態様では、本発明は、対象において心機能を増強する方法であって、本発明の第1のマーカー陰性/第2のマーカー陽性の心臓の心室前駆細胞のクローン集団を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。好ましくは、クローン集団は、対象の心臓に直接的に投与される。より好ましくは、クローン集団は、対象の心臓の心室領域に直接的に投与される。一実施形態では、対象に投与される医薬組成物は、3次元マトリックス上に製剤化されたクローン集団を含む。

40

【0162】

対象において心機能を増強する本発明の方法は、心臓への損傷、または低減もしくは障害された心機能を含む様々な臨床的状况において使用することができる。かかる臨床的状况の非限定的な例は、心筋梗塞を患っている対象、および先天性心臓障害を患っている対象を含む。好ましい心血管状態、疾患または障害の例は、冠動脈疾患および急性冠症候群

50

を含む。

【0163】

したがって別の態様では、本発明は、対象において心血管の状態、疾患または障害を処置する方法であって、本発明の第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性の心臓の心室前駆細胞のクローン集団を含む医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。心血管の状態、疾患または障害の処置のために、心臓の心室前駆細胞の治療的有効量を投与することができる。好ましい心血管の状態、疾患または障害の例には、冠状動脈疾患および急性の冠動脈症候群が含まれる。

【0164】

インビトロでの心臓心室前駆細胞の使用方法

本発明の心臓心室前駆細胞は、心臓の成熟および分化の様々な態様の研究において、特に、心臓の成熟および分化のプロセスに關与する細胞シグナル伝達経路ならびに生物学的メディエータの同定において、インビトロで使用することができる。

【0165】

さらに、本発明のHVPは、心臓系統に關与し、さらに、心室分化に向けてバイアスをかけられるので、これらの前駆細胞はまた、試験化合物の心毒性を評価するのに有用である。全ての可能性のある新規薬物および治療剤は、それらが、ヒトにおける使用について安全であるとみなされる前に、心臓細胞に対するそれらの毒性について評価されなければならない。したがって、インビトロでの培養システムにおいて心毒性を評価する能力は、非常に有利である。

【0166】

したがって別の態様では、本発明は、試験化合物の心臓毒性についてスクリーニングする方法であって、

ヒト心臓の心室前駆細胞(HVP)を提供することであって、HVPは、(i)ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、(ii)JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、提供すること；

HVPを試験化合物と接触させること；ならびに

HVPへの試験化合物の毒性を測定すること

を含み、

HVPへの試験化合物の毒性は、試験化合物の心臓毒性を示す、方法を提供する。

【0167】

好ましい実施形態では、HVPは、本明細書に記載される方法によって細胞を単離することによって提供される。特に好ましい実施形態では、第1のマーカ-または第2のマーカ-に特異的に結合する抗体を使用して、心筋前駆細胞を含む細胞培養物から第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のHVPを分離することによって細胞は単離される。好ましくは、細胞は、本明細書に記載されるようにFACSまたはMACSを使用して単離される。さらに別の実施形態では、試験化合物と接触させる前にHVPはさらに培養され、MLC2v+心室細胞に分化させられる。

【0168】

細胞に対する試験化合物の毒性は、細胞生存能もしくは他の生理学的機能を評価する様々な異なる方法の1つまたは複数により評価することができる。好ましくは、細胞生存能に対する試験化合物の効果は、標準的細胞生存能アッセイを使用して測定され、ここで、試験化合物の存在下での低減された細胞生存能は、試験化合物の心毒性の指標である。加えてまたはあるいは、細胞成長を、測定することができる。加えてまたはあるいは、細胞接着、細胞シグナル伝達、表面マーカ-発現、遺伝子発現などのような、生理学的機能の他の指標を、測定することができる。同様に、生理学的機能のこれらの指標のいずれかに対する試験化合物の負の効果は、試験化合物の心毒性の指標である。

【0169】

本発明は、ヒト心臓の心室前駆細胞の分化をモジュレートする化合物を同定する方法で

10

20

30

40

50

あって、

ヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を提供することであって、HVPは、（i）ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、（ii）JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、提供すること；

試験化合物の存在下または不在下において細胞を培養すること；

試験化合物の存在下または不在下において細胞の分化を測定すること；ならびに

試験化合物の不在下における分化と比較してヒト心臓の心室前駆細胞の分化をモジュレートする試験化合物を選択し、それによって、ヒト心臓の心室前駆細胞の分化をモジュレートする化合物を同定すること

を含む方法をさらに提供する。

【0170】

1つの実施形態において、試験化合物は、ヒト心臓の心室前駆細胞分化を刺激する。別の実施形態において、試験化合物は、ヒト心臓の心室前駆細胞分化を刺激する。細胞の分化は、例えば、本明細書において記載される通り、培養された細胞上に出現する分化マーカ-の発現の測定により、測定することができる。

【0171】

好ましい実施形態では、HVPは、本明細書に記載される方法によって細胞を単離することによって提供される。特に好ましい実施形態では、第1のマーカ-または第2のマーカ-に特異的に結合する抗体を使用して、心筋前駆細胞を含む細胞培養物から第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のHVPを分離することによって細胞は単離される。好ましくは、細胞は、本明細書に記載されるようにFACSまたはMACSを使用して単離される。

【0172】

本発明は、ヒト心室心筋細胞機能をモジュレートする化合物を同定する方法であって、

ヒト心臓の心室前駆細胞（HVP）を提供することであって、HVPは、（i）ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも1つの第1のマーカ-について陰性であり、（ii）JAG1、FZD4、LIFR、FGFR3およびTNFSF9からなる群から選択される少なくとも1つの第2のマーカ-について陽性である、提供すること；

ヒト心室心筋細胞を生成する条件下で試験化合物の存在下または不在下において細胞を培養すること；

試験化合物の存在下または不在下においてヒト心室心筋細胞の機能を測定すること；ならびに

試験化合物の不在下における機能と比較してヒト心室心筋細胞機能をモジュレートする試験化合物を選択し、それによって、ヒト心室心筋細胞機能をモジュレートする化合物を同定すること

を含む方法をさらに提供する。

【0173】

1つの実施形態において、試験化合物は、ヒト心室心筋細胞機能を刺激する。別の実施形態において、試験化合物は、ヒト心室心筋細胞機能を阻害する。細胞の機能は、例えば、T管の形成、成体の杆体形の心室心筋細胞の獲得、および電氣的刺激に応答して力を生成する能力を含むが、これらに限定されない、心室細胞機能の任意の適切な指標の測定により、測定することができる。心室細胞機能のかかる指標を測定する適切なアッセイは、当該技術分野において公知である。

【0174】

好ましい実施形態では、HVPは、本明細書に記載される方法によって細胞を単離することによって提供される。特に好ましい実施形態では、第1のマーカ-または第2のマーカ-に特異的に結合する抗体を使用して、心筋前駆細胞を含む細胞培養物から第1のマーカ-陰性/第2のマーカ-陽性のHVPを分離することによって細胞は単離される。好ましくは、細胞は、本明細書に記載されるようにFACSまたはMACSを使用して単離さ

10

20

30

40

50

れる。

【0175】

ヒト心室前駆細胞を使用したインビボ動物モデル

心臓の疾患のモデルに基づくヒト i P S および E S 細胞の発生は、開発および発見中に心血管薬物における新たな限界を開放する。しかしながら、これまで、これらのシステムは、培養された細胞システムにおいて 2 D 構造物に基づく制限を有していた。加えて、細胞の胎児性および未成熟特性は、成体の心臓のそれらの有用性および忠実度を制限する。ヒト心臓疾患、特に、心不全は、腎臓のような、治療標的についての公知の部位である環境、ホルモン、および他の鍵となる器官により影響される、複雑な、多機能の、多器官の疾患である。異所性、またはインタクトな正常マウス心臓の表面上のいずれかに成熟した機能的ヒト心室器官を構築する能力は、通常、心室性不整脈、収縮力の生成、線維症、および再生の可能性のような、成熟ヒト心室筋チャンバにおいてアッセイされるのみであり得る研究を可能にする新規インビボでモデルを始める。したがって、インビトロでの組織培養システムの外側、かつインビボでの心不全の状況において直接的に、ヒト心臓の疾患を研究するための開始は、ここで明確に可能である。

10

【0176】

したがって、ヒト心室前駆細胞をまた使用して、インビボで試験化合物の心毒性を決定するため、またはインビボでヒト心臓の組織分化もしくは機能を調節する化合物を同定するためのような、ヒト心臓の組織機能のインビボでの評価、および化合物のインビボでのスクリーニングを可能にする動物モデルを創出する。したがって、本発明は、本明細書において記載される H V P を使用して、インビボでのヒト心室組織に対する試験化合物の効果を試験する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、

20

非ヒト動物の器官にヒト心臓の心室前駆細胞 (H V P) を移植することであって、 H V P は、 (i) ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、 (i i) J A G 1、 F Z D 4、 L I F R、 F G F R 3 および T N F S F 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、移植すること；

ヒト心室組織が生成されるように前駆体をインビボで成長させること；

非ヒト動物に試験化合物を投与すること；ならびに

非ヒト動物においてヒト心室組織に及ぼす試験化合物の効果を評価することを含む。

30

【0177】

別の実施形態では、本方法は、

非ヒト動物に試験化合物を投与することであって、非ヒト動物は非ヒト動物の器官に移植されるヒト心室前駆体 (H V P) を含み、 H V P は、 (i) ヒト多能性幹細胞上で発現される少なくとも 1 つの第 1 のマーカーについて陰性であり、 (i i) J A G 1、 F Z D 4、 L I F R、 F G F R 3 および T N F S F 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの第 2 のマーカーについて陽性である、投与すること；ならびに

非ヒト動物において H V P に及ぼす試験化合物の効果を評価することを含む。

40

【0178】

1 つの実施形態において、試験化合物の心毒性は、例えば、 (試験化合物の非存在下での組織または前駆体の生存能と比較した) 非ヒト動物においてヒト心室組織または H V P の生存能に対する試験化合物の効果を測定することにより、評価される。細胞生存能は、当該技術分野において公知の標準的方法により評価することができる。

【0179】

別の実施形態において、心臓の分化を調節する試験化合物の能力は、例えば、 (試験化合物の非存在下での組織または前駆体の分化と比較した) 非ヒト動物においてヒト心室組織または H V P の分化に対する試験化合物の効果を測定することにより、評価される。細胞の分化は、例えば、培養された細胞上に出現する分化マーカーの発現の測定により、測

50

定することができる。

【0180】

別の実施形態において、心機能を調節する試験化合物の能力は、例えば、(試験化合物の非存在下での組織または前駆体の機能と比較した)非ヒト動物においてヒト心室組織またはHVPの機能に対する試験化合物の効果を測定することにより、評価することができる。組織または前駆体の機能は、例えば、T管の形成、成体の杆体形の心室心筋細胞の獲得、および電氣的刺激に応答して力を生成する能力を含むが、これらに限定されない、心室細胞機能の任意の適切な指標の測定により、測定することができる。心室細胞機能のかかる指標を測定する適切なアッセイは、当該技術分野において公知である。

【0181】

好ましくは、非ヒト動物は、それが、ヒト前駆細胞に対する免疫応答を開始することができないよう、免疫不全である。1つの実施形態において、非ヒト動物は、免疫不全NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJマウスまたは免疫不全SCID-ベージュマウス(Charles River Franceから市販されている)のような、マウスである。1つの実施形態において、器官は、腎臓である(例えば、細胞は、腎被膜下に移植される)。別の実施形態において、器官は、心臓である。様々な実施形態において、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 2×10^6 細胞、少なくとも 3×10^6 細胞、少なくとも 4×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞が、移植される。

【0182】

動物モデルを生成するために、移植のためのHVPは、HVPの生成に至る条件下でインビトロでhPSCを培養することにより、上で記載された通り得ることができる。インビトロ培養後にHVPを移植するタイミングに関して、最適な心室組織生成のため、細胞は、移植の時にHVPにより発現される細胞マーカーに基づき定義され、HVPGプロトコルの0日目として定義される、培養の開始後の日数にて決定され得る、ステージにて移植されるべきである。1つの実施形態において、細胞は、中胚葉マーカーMESP1のピーク発現として定義され得る、心臓中胚葉形成のピークの後に移植される。典型的には、MESP1発現は、培養の2日目~4日目(包括的)であり、3日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、ピークIslet-1発現に対応する時に移植される。典型的には、Islet1は、培養の4日目~8日目(包括的)であり、培養の6日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、NKX2.5発現のピークの前に移植される。典型的には、NKX2.5発現は、培養の6日目に始まり、培養の10日目にピークがあり、次に、以後維持される。1つの実施形態において、細胞は、下流遺伝子MEF-2およびTBX-1のピーク発現前に、移植される。典型的には、これらの下流遺伝子は、培養の5日目~15日目(包括的)に発現され、培養の8日目にピークがある。1つの実施形態において、細胞は、分化した収縮性タンパク質遺伝子の発現前に、移植される。典型的には、収縮性タンパク質遺伝子(TNNT2およびMYH6を含む)の発現は、培養の10日目以降に始まる。ある種の実施形態において、細胞は、上述のマーカーパターンの2つ、3つまたは4つが存在するときの時点で、移植される。別の実施形態において、細胞は、上述のマーカーパターンの全5つが存在するときの時点で、移植される。1つの実施形態において、細胞は、培養の4日目~8日目(包括的)に移植される。より好ましい実施形態において、細胞は、培養の5日目~7日目(包括的)に移植される。最も好ましい実施形態において、細胞は、培養の6日目に移植される。

【0183】

移植された細胞は、試験化合物の投与に先立ち、所望されるサイズ、量または厚さの心室組織の生成を可能にするのに適切な期間、非ヒト動物において成長させることができる。様々な実施形態において、細胞は、1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月または6カ月間成長させることができる。

【0184】

10

20

30

40

50

本発明は、以下の実施例によりさらに説明され、それは、さらなる制限と解釈されるべきではない。図、ならびに本出願を通じて引用される全ての参考文献、特許および公開された特許出願は、明確に、参照により本明細書に取り込まれる。

【実施例】

【0185】

実施例1：ヒト多能性幹細胞におけるWntのシグナル伝達の調節によるヒトIsl1 + 心筋芽前駆体細胞の生成

古典的なWntシグナル伝達の一時的調節は、多数のhPSC株から高収量かつ純度で機能的な心筋細胞を生成するのに十分であることが示されている(Lian, X. et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: E1848-1857; Lian, X. et al. (2013) Nat. Protoc. 8: 162-175)。このアプローチにおいて、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達は、hPSCにおいてまず活性化され、インキュベーション期間が続き、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害が続く。元々公開されたプロトコールにおいて、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達活性化は、Gsk3阻害剤CHIR99021(GSK-3、 IC_{50} = 10 nM; GSK-3、 IC_{50} = 6.7 nM)とのインキュベーションにより達成され、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達阻害は、Porcn阻害剤IWP2(IC_{50} = 27 nM)とのインキュベーションにより達成された。本発明者らは、心臓の分化のためGsk3阻害剤およびWnt産生性阻害剤を使用したので、このプロトコールを、GiWiプロトコールと呼んだ。元々のプロトコールの効率を改善し、元々のプロトコールにおいて使用された小分子の可能性のある副作用を低減するために、より高い阻害効力を有する小分子の別のセットを使用する第2の生成プロトコールを開発した。この第2の生成GiWiプロトコールにおいて、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達活性化を、Gsk3阻害剤CHIR98014(CAS 556813-39-9; 例えば、 Selleckchemから市販されている)(GSK-3、 IC_{50} = 0.65 nM; GSK-3、 IC_{50} = 0.58 nM)とのインキュベーションにより達成し、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達阻害を、Porcn阻害剤Wnt-C59(CAS 1243243-89-1; 例えば、 SelleckchemまたはTocrisから市販されている)(IC_{50} = 74 pM)とのインキュベーションにより達成した。Gsk3阻害剤CHIR98014を使用して、心臓の中胚葉分化を促進し、一方、Porcn阻害剤Wnt-C59を使用して、中胚葉細胞からの心室前駆体分化を増強した。

【0186】

これらの小分子の使用を介した心筋細胞分化のため、hPSCを、マトリゲル(ベクソン・デッキンソンバイオサイエンス)コートプレート(コーニング)上、E8培地(Chen, G. et al. (2011) Nature Methods, 8: 424-429において記載される; 市販; STEMCELL Technologies)またはmTeSR1培地(市販; STEMCELL Technologies)において維持した。適切なhPSCは、19-11-1、19-9-7または6-9-9細胞のような誘導多能性幹細胞(iPSC)(Yu, J. et al. (2009) Science 324: 797-801)およびES03(WiCell Research Institute)またはH9細胞のようなヒト胚性幹細胞(hESC)(Thomson, J. A. et al. (1998) Science, 282: 1145-1147)を含む。

【0187】

マトリゲルコート表面上、mTeSR1培地中で維持したhPSCを、Accutase(ライフテクノロジーズ)で、37℃にて5分間、単一細胞に分離し、次に、マトリゲルコート細胞培養皿に、5 μ M ROCK阻害剤Y-27632(Selleckchem)を補填したmTeSR1培地中100,000~200,000細胞/cm²にて(-2日目)24時間播種した。次に、細胞をmTeSR1中で培養し、mTeSR1を毎日交換した。0日目に、次に、細胞を、1 μ M Gsk3阻害剤CHIR98014(Selleckchem)で24時間(0日目~1日目)、RPMI/B27-ins(イ

10

20

30

40

50

ンスリンを含まないB27添加物10mlを含むRPMI500ml)において処理した。次に、培地を、2 μ M Porcn阻害剤Wnt-C59 (Seleckchem)を含有する対応する培地に3日目に交換し、次に、5日目に培地交換中に取り除いた。7日目から開始し、3日毎に培地を交換しながら、細胞をRPMI/B27(ストック溶液:RPMI培地500ml+B27添加物10ml)において維持した。心筋芽前駆細胞を生成するためのこの典型的な培養プロトコルを、図1において模式的に説明する。

【0188】

フローサイトメトリーおよび免疫染色を行い、特定の系統のマーカーの発現を調べた。CHIR-98014での処理の24時間後、99%より多くのhPSCが、中胚葉マーカーブラキュリを発現した。CHIR-98014での処理の3日後、95%より多くの分化した細胞が、心臓の中胚葉を特徴付けるMesp1を発現した。培養プロトコルは、細胞が、心臓の中胚葉系統に同調的に分化することを可能にするばかりでなく、cTnTフローサイトメトリーおよび電気生理学解析により決定した通り、分化の14日後に90%より多くの心室筋細胞を再現性よく生成した。

【0189】

経時的なhPSCの心臓の分化をさらに評価するために、ウエスタンブロット解析を、0~7日目および11日目に行い、Isl1およびNkx2.5(心筋芽前駆体マーカー)ならびにcTnI(心筋細胞マーカー)の発現を調べた。細胞を、M-PER哺乳類タンパク質抽出試薬(Pierce)においてHaltタンパク質分解酵素およびホスファターゼ阻害剤カクテル(Pierce)の存在下で溶解した。タンパク質を、10%トリス-グリシンSDS/PAGE(インビトロジェン)により、変性条件下で分離し、ニトロセルロース膜に移した。TBS-T中の5%乾燥ミルクでブロッキング後、膜を、1次抗体と一晚4にインキュベーションした。次に、膜を洗浄し、抗マウス/ウサギペルオキシダーゼ結合2次抗体と室温にて1時間インキュベーションし、SuperSignal化学発光(Pierce)により現像した。結果を図2に示す。hPSCの心臓の分化中、Isl1発現は、4日目に始まり、6日目にその最大発現まで増大し、一方、Nkx2.5は、6日目について発現を開始し、10日後、その最大発現に達した。分化の11日目まで、心筋細胞(cTnI+細胞)を誘導しなかった。

【0190】

加えて、6日目の細胞の免疫染色を、Isl1発現について行った。細胞を、4%ホルムアルデヒドで15分間室温にて固定し、次に、PBSプラス0.4%トリトンX-100および5%無脂肪乾燥ミルク(バイオ・ラッド)中の1次抗体(抗Isl1)ならびに2次抗体で染色した。核を、DAPIを含むGoldアンチフェード試薬(インビトロジェン)で染色した。QImaging(登録商標)Retiga4000Rカメラを備えた落射蛍光顕微鏡(ライカDMIRB)を、画像解析のため使用した。結果は、相当な数のIsl1+細胞を示した。

【0191】

Isl1発現について6日目の細胞のフローサイトメトリー解析も行った。細胞を、Accutaseで10分間、単一細胞に分離し、次に、1%パラホルムアルデヒドで20分間室温にて固定し、0.1%トリトンX-100および0.5%BSAのPBSにおいて1次抗体および2次抗体で染色した。データを、FACSCaliberフローサイトメーター(ベクトン・ディッキンソン)において収集し、FloJoを使用して解析した。図3に示される結果は、95%より多くの細胞が、このステージにてIsl1を発現したことを示した。

【0192】

要約すると、この実施例は、6日以内に数十億ものIsl1+ヒトHPVの大規模の産生を効率的に可能にするヒト心室前駆体生成のためのプロトコル(HVPGプロトコル)を提供する。

【0193】

実施例2:心臓前駆細胞の細胞表面マーカーとしてのJagged1の同定

心臓の分化プロセス中にゲノムスケールレベルで生じる転写変化の特性を明らかにするために、RNA配列決定(RNA-seq)を、心臓の発生の転写景色を構築するための分化後の異なる時点にて行った。本発明者らは、0日目~7日目の試料、ならびに19日目および35日目の試料(時点当たりの2つの独立した生物学的複製物)においてRNA-seq実験を行った。illumina HiSeq 2000プラットフォームを使用して、2つのバッチのRNA-seq(読み取り長100bpおよび50bp)を行った。合計で、20の試料を調べた。BowtieおよびTophatを使用して、本発明者らの読み取り値を参照ヒトゲノム(hg19)にマッピングし、本発明者らは、RPKM方法(百万の読み取り値当たりの1キロベースの転写物当たりの読み取り値)を使用して、それぞれの遺伝子発現(Refseqによる遺伝子のアノテーション)を計算する。心筋細胞へのhPSCの分化は、5つの主要な細胞タイプ:多能性幹細胞(0日目)、中胚葉前駆体(1日目~2日目)、心臓の中胚葉細胞(3日目~4日目)、心臓フィールドの前駆体(5日目、6日目および7日目)、ならびに心筋細胞(10日以降)を含む。

10

【0194】

HVPGプロトコールを使用したhPSCからの心臓の分化の分子mRNA解析は、分化中に多能性マーカーOCT4、NANOGおよびSOX2の下方制御を伴った、遺伝子発現におけるダイナミックな変化を明らかにした。原条様遺伝子TおよびMIXL1の誘導は、CHIR-98014添加後最初の24時間以内に生じ、続いて、2日目および3日目に心臓の中胚葉マーカーMESP1が上方制御された。心筋マーカーTNNT2、TNNC1、MYL2、MYL7、MYH6、MYH7およびIRX4の発現を、分化のより後のステージ(10日目以降)にて検出した。

20

【0195】

この解析により、中胚葉細胞、心臓の前駆体および心筋細胞を含む、それぞれの分化ステージにて富化された遺伝子を同定した。1日目の分化した細胞に関連する中胚葉細胞は、プラキュリを発現する。本発明者らは、FZD10、CD48、CD1D、CD8B、IL15RA、TNFRSF1B、TNFSF13、ICOSLG、SEMA7A、SLC3A2、SDC1、HLA-Aを含む、中胚葉細胞についての可能性のある表面マーカーを同定した。同様の解析を通じて、本発明者らはまた、CXCR4、ANPEP、ITGA5、TNFRSF9、FZD2、CD1D、CD177、ACVRL1、ICAM1、L1CAM、NGFR、ABCG2、FZD7、TNFRSF13C、TNFRSF1Bを含む、心臓の中胚葉mesp1陽性細胞についての表面マーカーを同定した。

30

【0196】

ウエスタンブロット解析と一致し、ISL1 mRNAは、4日目と同等の早さで発現し、そのタンパク質発現がそのピークに達する1日前の、5日目にピークがあった。分化の5日目(心臓の前駆体ステージ、5日目にisl1 mRNA発現最大、6日目にisl1タンパク質発現最大)に、5日目の富化された遺伝子を、抗CD抗体アレイ(350種の公知のCD抗体のパネル)と比較し、多数の可能性のある細胞表面タンパク質マーカーを同定した。本発明者らは、FZD4、JAG1、PDGFRA、LIFR(CD118)、TNFSF9、FGFR3を含む、このステージで発現した多くの細胞表面タンパク質を同定した。

40

【0197】

細胞表面タンパク質Jagged1(JAG1)およびFrizzled4(FZD4)を、さらなる解析のため選択した。Jagged1発現を、以下および実施例3および実施例4において記載する通り、さらに研究した。Frizzled4発現を、実施例5において記載する通り、さらに研究した。

【0198】

まず、Isl1およびJag1の発現を、二重染色フローサイトメトリー技術を使用して、特性を明らかにした。フローサイトメトリー解析を、二重染色のため抗Isl1および抗Jag1抗体を使用して、実施例1において記載した通り、本質的に行った。結果を図4に示す。Jagged1発現は、Isl1の発現を追跡することが見いだされ、

50

分化の6日目に、I s l e t 1陽性細胞の全てがまたJ a g g e d 1を発現し、そして逆もまた同様である。これらの2つのマーカーの共発現パターンのため、J a g g e d 1抗体を使用して、94.1% I s l e t 1+細胞の分化した集団を、99.8%の純度のI s l e t 1+J a g g e d 1+細胞に富化した。

【0199】

I s l e t 1が、HVPにおけるI S L 1およびN K X 2.5発現の二重免疫染色を使用して、N k x 2.5遺伝子より早い発生の遺伝子であることも確認した。精製したHVPは、I S L 1遺伝子を均一に発現するが、このステージで、ごく少数の細胞が、N k x 2.5を発現し始める。

【0200】

さらに、4週目のヒト胎児心臓組織、新生児心臓組織、および8歳の心臓組織にて、抗I s l 1と抗J a g 1の両方での免疫染色を、実施例1において記載した通り、本質的に行った。結果は、インビボ胎児心臓において、I s l e t 1陽性細胞の全てがまた、J a g g e d 1を発現したことを明らかにした。しかしながら、新生児心臓および8歳の心臓は、I s l e t 1もJ a g g e d 1も発現しなかった。4週目のヒト胎児心臓の心室において、心臓のトロポニンT (c T n T)染色は、目に見えるサルコメア構造を明らかにした。加えて、4週目の胎児心臓において、50%を超える心室細胞が、I s l e t 1とJ a g g e d 1の両方を発現し、それは、ヒト新生児心臓の心室筋細胞におけるI s l e t 1とJ a g g e d 1の両方の発現の喪失を伴い、続く成熟中に著しく低下した。

【0201】

上記の実験は、J a g g e d 1が、I s l e t 1陽性心筋芽前駆細胞の細胞表面マーカーであることを示している。

【0202】

実施例3：I s l 1+J a g 1+心筋前駆細胞のクローン分化

I s l 1+J a g 1+細胞のクローン分化の可能性を特徴付けるために、心筋芽前駆細胞を、実施例1において記載した培養プロトコールにより生成し、1つの単一I s l 1+J a g 1+細胞を、マトリゲルコート48ウェルプレートの1つのウェルに播種した。細胞を、J a g 1の抗体で精製し、次に、1つの単一細胞を、1つのウェルに播種した。次に、単一細胞を、3週間、心臓前駆体培養(CPC)培地(2.5mM G l u t a M A X、100μg/mlピタミンC、20%ノックアウト血清代替物を補填した高度DME M/F12)において培養した。

【0203】

次に、3週間分化の細胞集団の免疫染色を、3種の抗体：心筋細胞についての心臓のトロポニンI (c T n I)、内皮細胞についてC D 1 4 4 (V E - カドヘリン)および平滑筋細胞について平滑筋アクチン(SMA)で行った。結果は、単一細胞で培養したI s l 1+J a g 1+細胞が、c T n I陽性細胞およびSMA陽性細胞を生じるが、V E - カドヘリン陽性細胞を生じないことを示し、これは、これらの生成されたI s l e t 1+細胞が、内皮系統に対する制限された分化可能性を有する心筋前駆体であることを示している。ヒト誘導多能性幹細胞(iPSC19-9-11株)からHVP Gプロトコールで分化させた精製したI s l e t 1+J a g g e d 1+細胞はまた、同様のインビトロ分化可能性および主にc T n I+SMA+細胞への分化を示したが、V E - カドヘリン+細胞への分化を示さなかった。数週間以内に、細胞は、心室特異的マーカーM L C 2 vを発現し、これは、最初のI S L 1+サブセットが、心室細胞運命に既に関与したことを示している。HVP Gプロトコールを使用して生成させたI s l e t 1+細胞の制限された血管性分化の可能性のため、これらの生成されたI s l e t 1+細胞は、既に報告されたK D R+集団と異なる前駆体集団(Y a n g , L . e t a l . (2 0 0 8) N a t u r e 4 5 3 : 5 2 4 - 5 2 8)、または全3種の系統の心血管細胞を生じることができる、多能性I S L 1+細胞と異なる前駆体集団(B u , L . e t a l . (2 0 0 9) N a t u r e 4 6 0 : 1 1 3 - 1 1 7 ; M o r e t t i , A . e t a l . (2 0 0 6) C e l l 1 2 7 : 1 1 5 1 - 1 1 6 5)を表し得る。

10

20

30

40

50

【0204】

これらの結果は、I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞を、単一細胞から、心筋細胞優位で、全3タイプの心臓系統細胞を含有する有意に拡大した細胞集団 (1×10^9 細胞以上) までインビトロで首尾よく培養できることを示した。さらに、これらの細胞を、拡大した期間、少なくとも2~3週間、数カ月間 (例えば、6カ月以上) でさえインビトロで培養することができる。心筋芽前駆細胞は、心筋細胞に徐々に分化し、増殖しないので、およそ2~3週間の培養期間が好ましい。

【0205】

実施例4: I s l 1 + J a g 1 + 心筋前駆細胞のインビボ発生の可能性

E S 0 3 ヒト胚性幹細胞 (h E S C) 株 (W i C e l l R e s e a r c h I n s t i t u t e から得た) は、心臓特異的 c T n T プロモーターによりもたらされた緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現する。E S 0 3 細胞を使用して、実施例1において記載した培養プロトコルを使用して、I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞を生成した。I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞を、重症複合免疫不全 (S C I D) であるベージュマウスの心臓に移植して、インビボでのそれらの発生の可能性を立証した。

10

【0206】

簡単に言うと、I s l 1 + J a g 1 + 細胞を、胸部開放法で N O D / S C I D - ガンママウスの左心室壁に直接注射した (レシピエント当たり 1, 0 0 0, 0 0 0 個の細胞)。心臓を、手術の2~3週間後に回収し、1% P F A において固定し、10 μ m で薄片を作った (n = 1 2)。移植したマウスの心臓の組織学的解析は、落射蛍光により、および抗 G F P 抗体での染色により検出した、G F P + ドナー細胞の存在を明らかにし、これは、I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞が、インビボに移植されたとき、心筋細胞に分化する能力があったことを示している。

20

【0207】

I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞をまた、S C I D であるベージュマウス (「損傷マウス」) の梗塞心臓に直接移植し、同様に移植した正常マウスと比較した。2週間後解析したとき、I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞を移植した損傷マウスが、同様に移植した正常マウスより大きな移植片を有し、これが、インビボでの I s l 1 + J a g 1 + 心筋芽前駆細胞の心筋細胞再生能力を示している。

30

【0208】

(実施例5)

心筋前駆細胞の細胞表面マーカーとしての F r i z z l e d 4 の同定

実施例2に記載の通りに、R N A - s e q 解析によって F r i z z l e d 4 (F Z D 4) は心筋前駆細胞において発現されると同定された。したがって、F Z D 4 を心筋前駆細胞の細胞表面マーカーとして確認するために、ウエスタンブロット解析によって心臓分化の間の F Z D 4 発現を評価した。図5に示すように、結果は、多能性幹細胞および最初の3日間の分化細胞において F Z D 4 が発現しないことを実証した。しかし、F Z D 4 は4日目に発現し始め、発現の5日目にその発現を最大にする。

【0209】

F Z D 4 および I s l 1 の共発現パターンを単一細胞レベルで数量化するために、F A C S 解析を実行した。図6に示すように、分化の5日目に、83%より多くの細胞が i s l 1 および F Z D 4 の両方を発現し、G i W i プロトコルを使用して、F Z D 4 が心筋前駆体分化の間の i s l 1 陽性細胞のための細胞表面マーカーであることを実証する。

40

【0210】

J A G 1 および F Z D 4 の両方がヒト心室前駆細胞上で実際に I S L 1 と共発現されたことを確認するために、h P S C に由来する6日目の分化細胞の三重免疫蛍光解析を、I s l e t 1、J a g g e d 1 および F r i z z l e d 4 に対する抗体で実行した。三重染色実験は、I s l 1 + 細胞が J a g g e d 1 および F r i z z l e d 4 の両方を発現したことを実証した。

【0211】

50

実施例 6：ヒト心室前駆体（HPV）はインビボで 3D 心室心筋器官を生成する

心室心筋チャンバの構築は、ヒト器官形成中の最も重大かつ初期工程の 1 つであり、遊走、増殖、血管新生、構築、および基質アライメントを含む、一連の協調した工程を必要とする。インビボで心室形成をもたらす HPV の能力を試験するために、本発明者らは、精製した HPV または未精製の HPV（ $92.0 \pm 1.9\%$ ISL1+）を免疫不全状態のマウスの腎被膜下に移植した。移植の 2 か月後、未精製の HPV を移植した動物は腫瘍を形成し、これは、腫瘍形成効率 100%（100%、4/4）をもたらし、一方、精製した HPV を移植した動物は、腫瘍を全く形成しなかった（0%、0/10）。

【0212】

精製した HPV が生着した腎臓を、組織学的解析のためさらにアッセイした。ヘマトキシリンおよびエオジン（H&E）染色が、マウス腎臓の表面上で 1 mm より厚い厚さを伴い長さ 0.5 cm を超え、心室特異的マーカー MLC2v を均一に発現した器官を明らかにした（O'Brien, T. X. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5157 - 5161）。得られたヒト筋肉器官は、完全に血管新生し、赤血球細胞を、血管において検出することができた。cTnT、MLC2v、および MLC2a 免疫染色の解析は、移植した HPV が、心筋細胞（cTnT+細胞）に分化したばかりでなく、さらに成熟して、MLC2a 発現について陰性である MLC2v+心室筋細胞になることを明らかにした。得られた心室筋器官は、マウス由来血管細胞により完全に血管新生し、これは、その血管新生が、HPV に由来するパラクライン合図を介して生じたという考えと一致する。

【0213】

構造化した血管を、VE-カドヘリンおよび平滑筋アクチン発現に対する抗体の免疫染色解析により明らかにした。加えて、ラミニン-1 鎖を標的にするヒト特異的モノクローナルラミニン抗体を使用して、HPV は、それらの細胞外基質としてそれら独自のヒトラミニンを分泌した（マウス腎臓領域は、ヒトラミニン免疫染色について陰性である）。加えて、本発明者らは、ヒトフィブロネクチン発現が、モノクローナルヒトフィブロネクチン抗体を使用して、血管近くの範囲に限定されることを見出した。

【0214】

心室形成をもたらす後のステージの心臓細胞の能力を評価するために、NKX2.5+細胞（分化の 10 日後）を、免疫不全状態の NSG マウスの腎被膜下に移植した。移植の 3 週間後に、NKX2.5+細胞を移植した動物は、目に見えるヒト筋肉移植片を全く形成せず、これは、HPV が、ピーク Islet-1 発現後にインビボでの心室形成についてのそれらの能力を失ったことを示している。

【0215】

まとめると、これらの研究は、HPV が、それら独自の心臓ラミニン由来基質、および新生心室器官への脈管構造を安定化させるのに働くフィブロネクチンを合成し、放出することができることを示す。

【0216】

実施例 7：HPV は細胞自律的経路を介してインビボで成熟機能性心室筋器官を生成する

ヒト心臓生物学および疾患の研究のための hPSC の有用性についての重大な制限の 1 つは、胎児アイソフォームの発現の成熟度および持続をそれらが欠くことである。HPV 由来器官が、機能的成熟心室筋になることができたかを決定するために、長期移植研究を行い、その後、T 管の形成（Brette, F. and Orchard, C. (2003) Circ. Res. 92: 1182 - 1192; Marks, A. R. (2013) J. Clin. Invest. 123: 46 - 52）、操作した心室組織の他の研究に匹敵する力を生成する能力、自動性の喪失、および成体の杆体形の心室心筋細胞の獲得を含む成体の心室心筋の十分に許容される特性のパネルの詳細な解析を行った。

【0217】

精製した HPV の移植の 5 か月後に、本発明者らの動物の全てにおいて、腫瘍を形成し

10

20

30

40

50

なかった。動物を屠殺し、生着した腎臓を、さらなる解析のため取り出した。5カ月間のヒト移植片は、半径0.4cm(直径0.8cm)を有する半球構造であった。5カ月間の体積は、1つの腎臓についておよそ0.13cm³であり、体積は、インビボのヒト成体の心臓に匹敵する厚さを達成する、ヒト心室筋を生着させる実現可能性を示唆する。杆体形の成熟ヒト心室筋細胞を、ヒト筋肉器官において観察した。加えて、本発明者らの成熟ヒト筋肉器官から採取した筋肉トリップは、電氣的刺激に応答して力(0.36±0.04mN)を生成し、 α -アドレナリン作動薬イソプレナリンでの処理後、それらの力の生成を増大した(0.51±0.02mN、対照と比較して $p < 0.05$)。まとめると、これらの研究は、HVPが、細胞の自律的経路を介して、すなわち、他の細胞、遺伝子、基質タンパク質、または生体材料を添加することなく、インビボで完全に機能的な成熟ヒト心室筋器官を生成する能力があることを示す。

【0218】

実施例8：HVPは心外膜微小環境に遊走し、インビボで正常なマウス心臓の表面上にヒト心室筋パッチを自発的に形成する

心外膜は、緻密な領域拡大中に心室チャンバの成長をもたらし、ならびに心筋障害後に拡大することができ、VEGFのような、公知の血管細胞運命スイッチに応答して血管新生をもたらすことができる成体の心外膜前駆体として働く、心臓前駆体のための公知の微小環境である(Giordano, F. J. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5780-5785; Masters, M. and Riley, P. R. (2014) Stem Cell Res. 13:683-692; Zangi, L. et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:898-907)。HVPが、正常な心臓の心外膜表面に自発的に遊走し得るかを決定するために、精製緑色蛍光タンパク質(GFP)-標識HVPを、免疫不全状態のマウスの心臓に心筋内注射した。移植の1週間後または1か月後、動物を屠殺し、生着した心臓を組織診断のため取り出した。移植の1週間後、GFP+細胞の大部分が、心筋において保持された。しかしながら、ほぼ全てのGFP+細胞が、移植の1か月後に心外膜に遊走した。加えて、GFP+細胞は、移植の1週間後にISL1+およびKi67+であった。

【0219】

Isl1+細胞の分化の可能性を追跡するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現hESC株(H9-cTnT-GFP)に由来するcTnTプロモーターから生成した、精製ISL1+JAG1+細胞を、重症複合免疫不全(SCID)であるベージュマウスの心臓に移植して、インビボでのそれらの発生の可能性を証明した。SCIDであるベージュマウスの心臓の心室への直接的なIsl1+Jag1+細胞の移植の1か月後、ヘマトキシリンおよびエオジン染色により、マウス心臓の心外膜に存在するヒト筋肉ストリップ移植片が明らかになった。加えて、免疫組織学的解析により、落射蛍光により、および抗GFP抗体での染色により検出したGFP+ドナー細胞の存在が明らかになった。より重要なことに、MLC2vおよびMLC2aの抗体で解析したとき、生着したヒト筋肉ストリップが、MLC2v陽性であり(100%の細胞+)、心房マーカーMLC2a陰性であり、これは、移植したISL1+細胞が、心筋細胞にさらに分化したばかりでなく、心室筋細胞になったことを示している。

【0220】

まとめると、これらの研究は、HVPが、心外膜微小環境に遊走することができ、そこで、再度外来細胞、遺伝子、基質、または生体材料を添加することなく、それらが拡大し、続いて、均一な心室筋パッチに分化することを示す。

【0221】

実施例9：追加実験の材料および方法

この実施例において、実施例1~8において使用した実験材料および方法についてのさらなる詳細を提供する。

【0222】

10

20

30

40

50

hPSCの維持

hESC (ES03、H9)およびヒトiPSC (19-9-11)を、既に公開された方法 (Lian, X. et al. (2013) Nat. Proc. 8:162-175; Lian, X. et al. (2013) Stem Cells 31:447-457) に従い、マトリゲル (ベクトン・デッキンソンバイオサイエンス) コートプレート上、mTeSR1培地 (STEMCELL Technologies) において維持した。

【0223】

ヒト心室前駆体生成 (HVP G) プロトコール

マトリゲルコート表面上、mTeSR1中で維持したhPSCを、Accutaseで、37℃にて10分間、単一細胞に分離し、次に、マトリゲルコート細胞培養皿に、5 μM ROCK阻害剤Y-27632を補填したmTeSR1中100,000~200,000細胞/cm²にて(-2日目)24時間播種した。-1日目に、細胞をmTeSR1において培養した。0日目に、細胞を、インスリンを含まないB27を補填したRPMI (RPMI/B27-ins) 中1 μM CHIR-98014 (Selleckchem) で24時間(0日目~1日目)処理し、次に、それを、1日目の培地交換中に取り出した。3日目に、培地の半分を、2 μM Wnt-C59 (Selleckchem) を含有するRPMI/B27-ins培地に交換し、次に、それを、5日目の培地交換中に取り出した。6日目に、細胞を、単一細胞に分離させ、抗JAG1または抗FZD4抗体で精製した。

10

20

【0224】

RNA-seqライブラリー構築

RNAを、単離し (RNeasy Mini kit、キアゲン)、定量し (Qubit RNA Assay Kit、ライフテクノロジーズ)、品質を管理した (BioAnalyzer 2100、アジレント)。各試料由来のRNA (800 ng) を、Illumina TruSeq mRNA Sample Prep Kit v2 (イルミナ) 用のインプットとして使用し、製造元の指示に従い、配列決定ライブラリーを創出した。簡単に言うと、ポリA含有mRNA分子を、ポリTオリゴ結合磁気ビーズを使用して精製した。精製後、mRNAを断片化し、ランダムプライマーおよび逆転写酵素を使用して、第1の鎖相補性DNAにコピーした。次に、第2の鎖cDNA合成を、DNAポリメラーゼIおよびRNaseHを使用して行った。cDNAをアダプターにライゲーションし、PCRで富化して、最終的なcDNAライブラリーを創出した。ライブラリーをプールし、製造元の指示によって、HiSeq 2000 (イルミナ) 装置上で配列決定した。

30

【0225】

RNA-seqデータ処理

RNA-seq読み取り値を編集し、Tophat2を使用して、hg19参照にマッピングした。平均して、1つの試料当たりおよそ2300万の読み取り値を生成し、これらの読み取り値の76%を独自にマッピングした。各遺伝子についての発現レベルを、パイソンスクリプトrpkmfor geneを使用して定量し、RefSeqを使用して注釈を付けた。少なくとも10の読み取り値を含む少なくとも1つの試料を含まない遺伝子を、解析から除いた。主成分分析およびヒートマップを、それぞれ、Rおよび遺伝子Eを使用して行った。

40

【0226】

移植

精製HVP 200万個のアリコート、エッペンドルフチューブに集めた。細胞をスピンドウンし、上清を捨てた。各チューブの細胞を、既に記載されたプロトコール (Shultz, L. D. et al. (2005) J. Immunol. 174:6477-6489) に従い、それぞれ、免疫不全マウス、NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJまたはSCID-ベージュ (Charles River

50

France) の腎被膜下に移植するか、または心臓に心筋内注射した。組織学的および生理学的解析のため、様々な時間間隔で、生着した腎臓または心臓を回収した。

【0227】

フローサイトメトリー

細胞を、Accutaseで10分間、単一細胞に分離し、次に、1%パラホルムアルデヒドで20分間室温にて固定し、PBSプラス0.1%トリトンX-100および0.5%BSAにおいて1次抗体および2次抗体で染色した。データを、FACSCaliberフローサイトメーター(ベクトン・ディッキンソン)において収集し、FlowJoを使用して解析した。

【0228】

免疫染色

細胞を、4%パラホルムアルデヒドで15分間室温にて固定し、次に、PBSプラス0.4%トリトンX-100および5%無脂肪乾燥ミルク(バイオ・ラッド)中の1次抗体ならびに2次抗体で染色した。核を、DAPIを含むGoldアンチフェード試薬(インビトロジェン)で染色した。画像解析のため、落射蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡(ZEISS、LSM700)を使用した。

【0229】

ウエスタンブロット解析

細胞を、M-PER哺乳類タンパク質抽出試薬(Pierce)においてHaltタンパク質分解酵素およびホスファターゼ阻害剤カクテル(Pierce)の存在下で溶解した。タンパク質を、10%トリス-グリシンSDS/PAGE(インビトロジェン)により、変性条件下で分離し、ニトロセルロース膜に移した。TBST中の5%乾燥ミルクでブロッキング後、膜を、1次抗体と一晩4℃にてインキュベーションした。次に、膜を洗浄し、抗マウス/ウサギペルオキシダーゼ結合2次抗体と室温にて1時間インキュベーションし、SuperSignal化学発光(Pierce)により現像した。

【0230】

電気生理学(パッチクランプ)

拍動する心室筋細胞クラスターを、顕微解剖し、記録前にガラスカバーガラスに再播種した。120mM K₂D-グルコン酸、25mM KCl、4mM MgATP、2mM NaGTP、4mM Na₂-ホスホ-クレアチン、10mM EGTA、1mM CaCl₂、および10mM HEPES(pH7.4、25℃にてHClで調節)からなる細胞内溶液を充填したハウケイ酸ガラスピペット(抵抗4~5MΩ)を使用して、活動電位活性を評価した。カバーガラス皿上に播種した培養した心筋細胞を、140mM NaCl、5.4mM KCl、1mM MgCl₂、10mM グルコース、1.8mM CaCl₂、および10mM HEPES(pH7.4、25℃にてNaOHで調節)を含有する細胞外溶液(タイロード液)に浸した。自発活動電位を、1kHzで低減フィルターをかけたMulticlamp 700B amplifier(モレキュラーデバイス、カリフォルニア州、米国)ソフトウェアを使用して行ったパッチクランプ技術(細胞全体、現在のクランプ配置)を使用して、37℃にて記録し、Digidata 1322AおよびClampex 9.6ソフトウェア(モレキュラーデバイス、カリフォルニア州、米国)を使用して、デジタル化し、保存した。

【0231】

統計学

データを、平均±平均の標準誤差(SEM)として表す。統計学的有意差を、2群間のスチューデントt検定(両側)により決定した。P<0.05を、統計学的に有意であるとみなした。

【0232】

実施例10:異種成分不含有のヒト心室前駆体分化プロトコール

この実施例において、定義した異種成分不含有の培養培地、Essential8を利用する、ヒト心室前駆体の分化についての代替りの分化プロトコールを提供する。ヒト多

10

20

30

40

50

能性幹細胞 (hPSC) の成長および拡大のため、Essential 8 培地が開発され、Chen, G. et al. (2011) Nat. Methods 8: 424 - 429 (そこで「E8」培地として言及される) においてさらに記載される。

【0233】

ビトロネクチン (またはラミニン 521) コート表面上、Essential 8 培地中で維持した hPSC を、パーゼン溶液で、37 °C にて 10 分間、単一細胞に分離し、次に、ビトロネクチン (またはラミニン 521) コート細胞培養皿に、5 μM ROCK 阻害剤 Y-27632 を補填した Essential 8 中 100,000 ~ 200,000 細胞 / cm² にて (-2 日目) 24 時間播種した。-1 日目に、細胞を Essential 8 培地において培養した。0 日目に、細胞を、RPMI 中 0.5 μM CHIR-98014 で 24 時間 (0 日目 ~ 1 日目) 処理し、次に、それを、1 日目の培地交換中に取り出した。3 日目に、培地の半分を、0.5 μM Wnt-C59 を含有する RPMI 培地に交換し、次に、それを、5 日目の培地交換中に取り出した。6 日目に、細胞 (ヒト心室前駆体) を、単一細胞に分離させ、抗 JAG1 または抗 FZD4 抗体で精製した。あるいは、細胞を、抗 LIFR 抗体または抗 FGFR3 抗体で精製した。

10

【0234】

(実施例 11)

白血病抑制因子受容体 (LIFR) および線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) の心筋前駆細胞の細胞表面マーカーとしての同定

この実施例では、実施例 1 ~ 8 に記載される心筋前駆細胞 (すなわち、ヒト心室前駆細胞) のためのさらなる細胞表面マーカーの発現は、フローサイトメトリー解析によって確認した。ヒト心室前駆体 (HVP) 細胞を実施例 1 または 10 に記載の通りに生成し、6 日目の細胞を標準のフローサイトメトリーによって解析した。

20

【0235】

図 9 は、抗 Islet 1 および抗白血病抑制因子受容体 (LIFR) 抗体を使用した二重染色フローサイトメトリー実験の結果を示す。結果は、HVP 細胞が Islet 1 および LIFR を共発現することを実証し、それによって、LIFR が HVP 細胞のための細胞表面マーカーであることを確認する。

【0236】

図 10 A ~ B は、6 日目の HVP 細胞上での LIFR および線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) の発現を未分化胚性幹 (ES) 細胞と比較した、フローサイトメトリー実験の結果を示す。結果は、LIFR および FGFR3 の両方が HVP 細胞上での発現のために高度に富化されることを実証し、それによって、LIFR および FGFR3 の両方が HVP 細胞のための細胞表面マーカーであることを確認する。

30

【0237】

(実施例 12)

精製されたヒト心臓心室前駆細胞の電気生理学

精製された HVP の成熟ポテンシャルを、インピトロで電気生理学を実行することによってさらに特徴付けた。成熟した HVP の電氣的性質は、活動電位 (AP) およびカルシウム移行 (CaT)、特に電氣的結合を提示する細胞の能力の光学式マッピングで調査した。6 日目の HVP のインピトロ光学式マッピングは、AP または CaT の自発的なまたは誘導された伝搬はなかったことを明らかにした。18 + 日目までに、自発的なおよび点刺激の後の AP および CaT の両方の伝搬は容易に明らかになり、ネットワーク活性および電氣的結合を示唆した。6 ~ 7 日目に、NKX2.5-GFP HVP は GFP⁻ であって、パッチクランピングは、細胞の全てが脱分極した静止膜電位を示すことを明らかにし、刺激の後にそれらは AP を発生することができなかった。後の時点と比較して、19 ~ 23 日目および 39 ~ 40 日目の細胞は 90% 超が GFP⁺ であり、GFP⁺ 細胞だけをパッチクランピングのために選択した。パッチされた細胞の全ては、自発的な心室様 (SV) AP を示した。しかし、19 ~ 23 日目と 39 ~ 40 日目の細胞の間で、SV AP の有意差はなかった。注目すべきことに、NKX2.5 GFP 細胞系に由来するこれ

40

50

らのHVPは調整することができ、約250ms(1000msの基礎的サイクル長で)のAPD₅₀を有することができ、これは、生来の成体ヒト心室細胞のそれを再現する(図2Mv;17、18)。まとめると、電気生理学的データは、インビトロで19日目までにHVPがそれらの成熟に到達することを示した。さらに、APおよびCaTの両方のインビトロでの伝導は連続的および均一であって、インビトロでの心室筋パッチにおける同期した電氣的結合を示した。

【0238】

(実施例13)

ヒト心臓の心室前駆細胞の単離のための陰性選択の使用

この実施例では、陰性選択を使用して、腎臓囊の下の移植を通してインビボで心室壁を生成するHVPの能力の直接的に解析するためにHVPを単離した。心筋前駆細胞の6日目の培養物を、本明細書に記載の通りに調製した。TRA-1-60陰性HVP集団を精製するために、多能性幹細胞表面マーカーTRA-1-60(<3%のTRA-1-60⁺)に磁気活性化細胞選別(MACS)を使用して、数百万の6日目の前駆体細胞を次に陰性選択した。

10

【0239】

300万のTRA-1-60陰性HVPを、免疫不全NSGマウスの腎臓囊の下に移植した。移植の2カ月後に、腎臓パッチは、マウス腎臓の表面の長さが0.6cmを超え、厚さが0.2cmを超える純粋なヒト心室筋壁を明らかにし、心筋細胞の超構造的構成要素および心室マーカーMLC2vの均一な発現を伴った。SMAおよびVE-カドヘリンの発現によって評価したとき、心室壁は完全に血管化されていた。移植されたHVPは心臓筋細胞(cTnT⁺細胞)に分化しただけでなく、さらに成熟してMLC2v+心臓筋細胞にもなった。移植片中のヒトフィブロネクチンの存在によって実証されるように、HVPはそれ自身のECMを分泌することもできた;移植片パッチの中には、ラミニンも検出された。さらに、大多数の細胞がKi67陰性であるので、心室筋パッチには非常に少ない増殖しかなかった。注目すべきことに、静脈内注入の後の腎臓HVP移植片上での赤色レクチン染色によって示されるように、ヒト心室筋壁はマウスの宿主循環に接続されていた。

20

【0240】

本発明者らは、インビボ腎臓HVPパッチの機能を次に調査した。6~7週齢の腎臓HVPパッチの生体外光学式マッピングは、刺激したとき、それらが電氣的に応答性であったことを明らかにした。様々な基礎的サイクル長(500~2000ms)で電氣的に調整したとき、全ての6+週齢の腎臓HVPパッチ(n=5)はAPを発生した。さらに、それらは、インビトロで成熟したHVPと同等のAPアップストローク、減衰時間および伝導速度を提示し、インビボで機能的な心筋細胞に分化する6日目のHVP細胞の注目に値する能力を鮮明にした。さらに、インビボの6+週齢の腎臓HVPパッチの超音波画像診断は、パッチの収縮する能力を明らかに示した。パッチの拍動は、1分につき概ね70拍動の頻度で起こった。移植片の断面表面積は、各収縮サイクルの間に19±4%(n=3)で収縮し、弛緩の間はベースラインに戻った。

30

【0241】

未熟なHVPが無傷の心臓に移植することができるかどうか判定するために、200万の精製されたNKX2.5 GFP標識HVP(LIFRに関して陽性に分類され、TRA-1-60に関して陰性に分類された)を、NSGマウスの心臓に対して心筋内に注射した。移植から8週後に動物を屠殺し、移植された心臓を組織学のために取り出した。心筋内注射の後、GFP⁺細胞のほぼ全ては、心外膜に移動した。HVP心臓パッチはNKX2.5を均一に発現し、心臓の心室マーカーcTnTおよびMLC2vについて陽性でもあったが、ペースメーカーマーカーHCN4には陰性であった。SMAおよびVE-カドヘリンの発現によって評価するとき、心室パッチは血管化されている。さらに、HVP心臓パッチは、それがヒトフィブロネクチンについて陽性染色されたのでそれ自身のECMを分泌しており、ラミニンが移植片を囲んでいるのを検出することもできる。まとめ

40

50

ると、これらの研究は、心臓においてHVPは移植することができ、心外膜ニッチに移動することができ、そこでそれらは拡大し、その後インピボで均一な心室筋パッチに分化することを実証する。

【0242】

これらの実験は、陰性選択されたHVP集団のインピボ機能を実証する。これらの実験は陰性選択マーカーとしてTRA-1-60を使用して実行されたが、他の適する陰性選択マーカーが当業者に明らかになる。例えば、図11は、HVP分化プロセスの間の選択された発生遺伝子発現のRNA-seq解析の結果を示す。0日目から7日目まで毎日、および19日目にRNAを採取した。35日目は、後期心筋細胞のための対照の役目をした。2つのパッチの細胞が、同時に分化を経た；このことは、各日の2つの生物学的反復を確実にした。図11に示す結果は、多能性マーカーOCT4、NANOGおよびSOX2が0日目に存在したが、分化の間に迅速に下方制御されて、6日目までに事実上不在であったことを実証する。多能性マーカーの下方制御の後、24時間目までに原条様遺伝子TおよびMIXL1の誘導が続き、2日目および3日目のMESP1の上方制御が続いた。心筋マーカーTNNT2、TNNC1、MYL2、MYL7、MYH6、MYH7およびIRX4の発現は、分化の後期に検出された。ISL1 mRNAは、4日目という早期に発現され、5日目、そのタンパク質発現がそのピークに到達した前日にピークに達した。したがって、この発現データは、TRA-1-60以外の多能性マーカー、例えばOCT4、NANOGおよび/またはSOX2も、HVPのための陰性選択マーカーとしての使用に適することを実証する。

10

20

【0243】

均等物

当業者は、たかだか日常的な実験を使用して、本明細書において記載される本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識するか、または確定することができるだろう。かかる均等物は、以下の請求項により包含されることが意図される。

【図1】

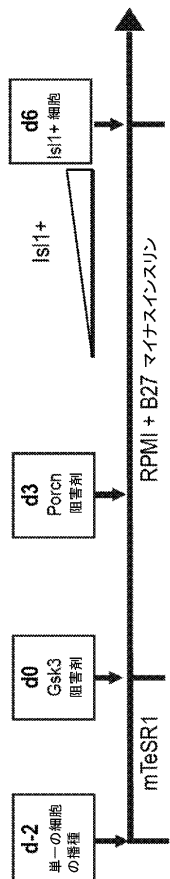


Fig. 1

【図2】

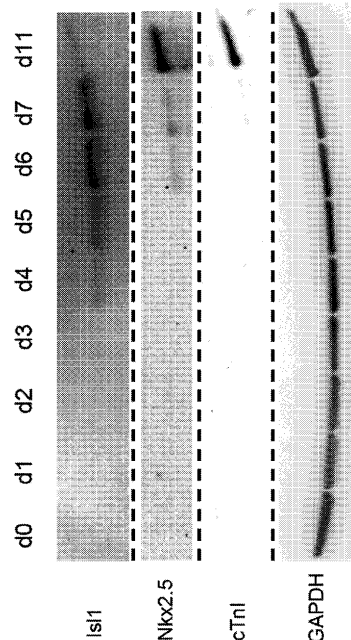


Fig. 2

【 図 3 】

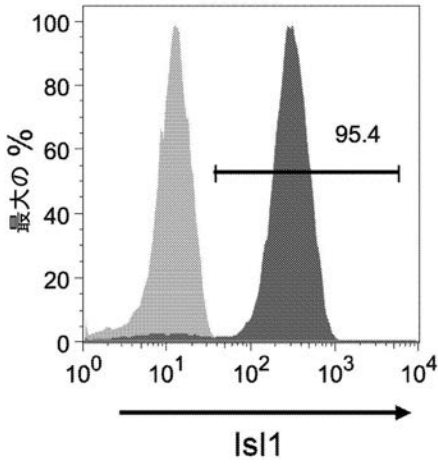


Fig. 3

【 図 4 】

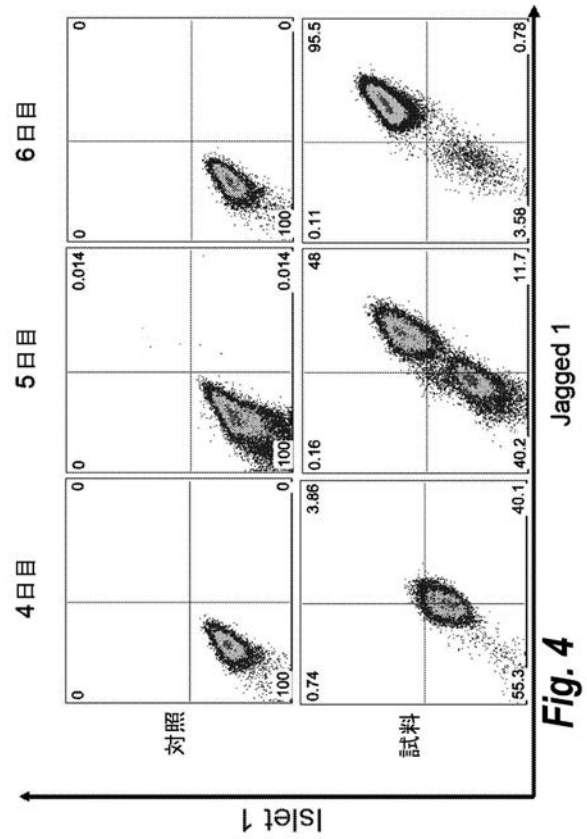


Fig. 4

【 図 5 】

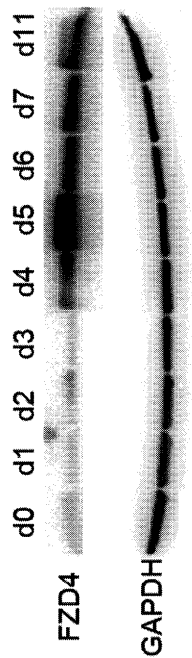


Fig. 5

【 図 6 】

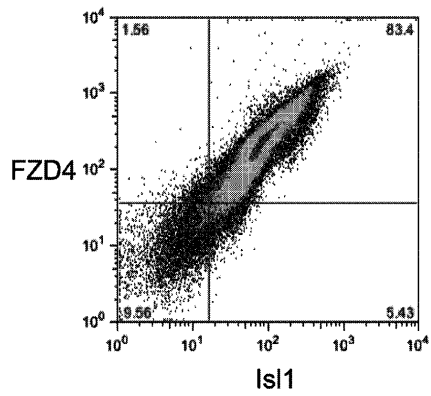


Fig. 6

【 図 7 】

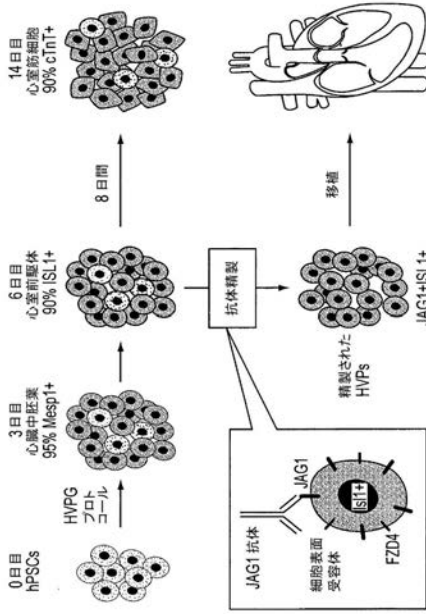


FIG. 7

【 図 8 】

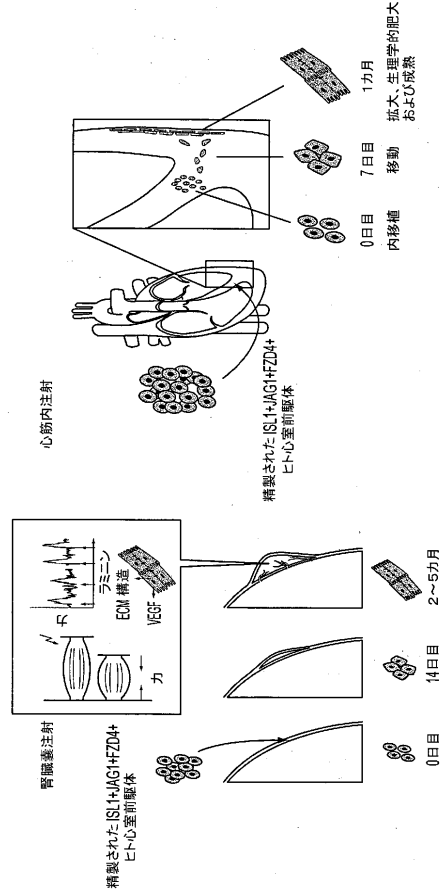


FIG. 8B

FIG. 8A

【 図 9 】

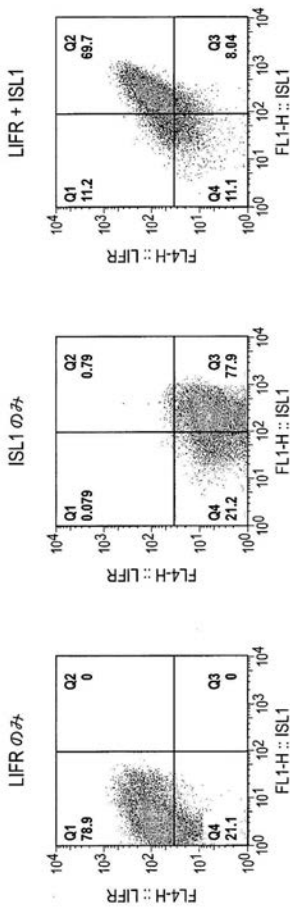


FIG. 9

【 図 10 A 】

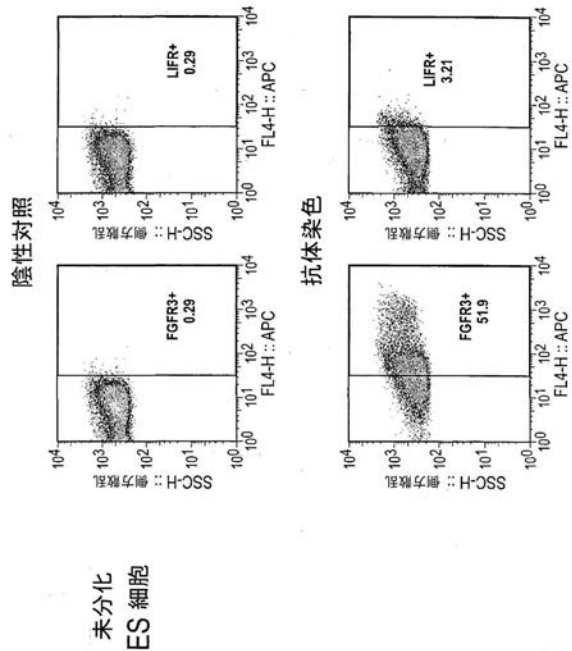


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】

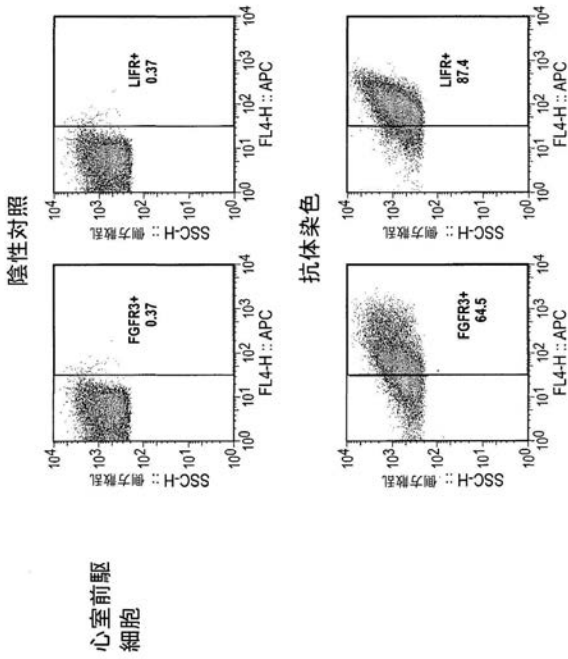


FIG. 10B

【 図 1 1 】

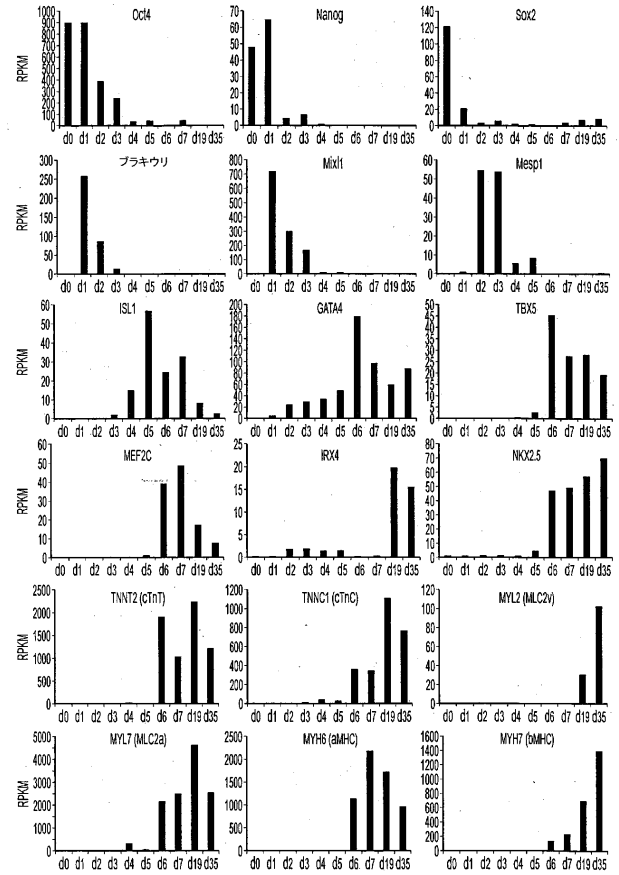


FIG. 11

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/001638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N5/077 C12Q1/6881 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/029122 A1 (CHIEN KENNETH R [US]; LIAN XIAOJUN [SE]) 25 February 2016 (2016-02-25)	41-63
Y	the whole document examples 2-8	5-40
X	US 2016/108363 A1 (CHIEN KENNETH R [US] ET AL) 21 April 2016 (2016-04-21)	41-63
Y	cited in the application the whole document claims 1-38 examples 1-8	5-40
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 March 2018	22/03/2018	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Zuber Perez, C	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/001638

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/297794 A1 (YAMASHITA JUN [JP] ET AL) 22 October 2015 (2015-10-22)	1-4
Y	the whole document page 6, paragraph 75 - page 7, paragraph 81; example 1 page 10; example 9 -----	5-40
Y	MASUDA SHIGEO ET AL: "Eliminating residual iPS cells for safety in clinical application", PROTEIN & CELL, SPRINGER ASIA, BEIJING, CN, vol. 6, no. 7, 4 June 2015 (2015-06-04), pages 469-471, XP035507309, ISSN: 1674-800X, DOI: 10.1007/S13238-015-0170-4 [retrieved on 2015-06-04] the whole document page 1; table 1 -----	5-40
X,P	WO 2017/172086 A1 (LEUNG CHUEN YAN [SE]; CLARKE JONATHAN [SE]; XU JIEJIA [SE]; SANTORO FE) 5 October 2017 (2017-10-05) the whole document -----	47-63
A	XIAOJUN LIAN ET AL: "Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions", NATURE PROTOCOLS, vol. 8, no. 1, 20 December 2012 (2012-12-20), pages 162-175, XP055053767, ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2012.150 the whole document -----	1-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/001638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016029122 A1	25-02-2016	EP 3183337 A1 JP 2017525393 A US 2016053229 A1 WO 2016029122 A1	28-06-2017 07-09-2017 25-02-2016 25-02-2016
US 2016108363 A1	21-04-2016	NONE	
US 2015297794 A1	22-10-2015	EP 2826855 A1 JP 5920741 B2 JP W02013137491 A1 US 2015297794 A1 WO 2013137491 A1	21-01-2015 18-05-2016 03-08-2015 22-10-2015 19-09-2013
WO 2017172086 A1	05-10-2017	US 2017240964 A1 WO 2017172086 A1	24-08-2017 05-10-2017

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/34	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 チェン, ケネス アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, サビル ストリート 1 9

(72) 発明者 クラルケ, ヨナタン
スウェーデン国 1 1 2 4 9 ストックホルム, スヴァルヴァルガタン 7 エルジーエイチ
1 1 1 0

(72) 発明者 レーティネン, ミイア
フィンランド国 0 4 3 2 0 トゥースラ, レートランチェ 3 - 5 エーエス 9

(72) 発明者 フォー, キュリー
スウェーデン国 1 1 3 3 1 ストックホルム, ヘルシンエヘイデン 3

(72) 発明者 レオン, チュエン ヤン
スウェーデン国 1 1 3 2 1 ストックホルム, ヴルカヌスガタン 4

F ターム (参考) 4B063 QA05 QA13 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR62 QX02
4B065 AA90X AB01 BD39 CA44
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BB64 CA04 MA16 MA17 MA23 MA35
MA37 MA43 MA52 MA56 MA57 MA58 MA59 MA66 NA14 ZA36
ZA45

专利名称(译)	分离人心室祖细胞的方法		
公开(公告)号	JP2019535299A	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2019528543	申请日	2017-11-29
[标]发明人	チエンケネスアール		
发明人	チエン, ケネス アール. クラルケ, ヨナタン レーティネン, ミイア フォー, キュリー レオン, チュエン ヤン		
IPC分类号	C12N5/071 C12N1/00 C12N5/10 C12Q1/02 A61P9/00 A61P9/10 A61K35/34 G01N33/53		
CPC分类号	A61P9/00 A61P9/10 C12N5/0657 C12N2501/415 C12N2501/727 C12N2506/02 C12N2506/45 A61K35/34 C12N2501/42 C12N2501/50 C12N2501/599 C12N2513/00 G01N33/5014 G01N33/5061		
FI分类号	C12N5/071 C12N1/00.T C12N5/10 C12Q1/02 A61P9/00 A61P9/10 A61K35/34 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR62 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BD39 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/MA16 4C087/MA17 4C087/MA23 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA43 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA57 4C087/MA58 4C087/MA59 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA45		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
優先権	62/427569 2016-11-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明提供了用于分离人心脏心室祖细胞 (HVP) 的方法, 其中针对在人多能干细胞上表达的一种或多种第一标记, 例如TRA-1-60, 阴性选择了第5-7天的心脏祖细胞的培养物, 从而隔离HVP。所述方法可以进一步包括阳性选择以表达选自JAG1, FZD4, LIFR, FGFR3和TNFSF9的第二标记。还提供了第一标志物阴性/第二标志物阳性的分离的HVP的大种群, 包括克隆种群。还提供了体内使用HVP进行心脏修复或改善心脏功能的方法。还提供了使用HVP进行测试化合物心脏毒性筛查的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2019-535299 (P2019-535299A) (2019.12.12)
(43) 公表日	令和1年12月12日 (2019.12.12)	
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5 / 0 7 1 (2010.01)	C 1 2 N 5 / 0 7 1	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1 / 0 0 (2006.01)	C 1 2 N 1 / 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006.01)	C 1 2 N 5 / 1 0	4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006.01)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
A 6 1 P 9 / 0 0 (2006.01)	A 6 1 P 9 / 0 0	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く	
(2) 出願番号	特願2019-528543 (P2019-528543)	(7) 出願人
(8) (22) 出願日	平成29年11月29日 (2017.11.29)	プロセク セラビューティクス アーベ
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月1日 (2019.7.1)	スウェーデン 1 4 6 2 1 トリン
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/001638	グ、ボックス 1 5、バクティガード
(87) 国際公開番号	W02018/100433	アーベ 気付
(87) 国際公開日	平成30年6月7日 (2018.6.7)	(74) 代理人
(3) 優先権主張番号	62/427,569	弁理士 山本 秀敏
(32) 優先日	平成28年11月29日 (2016.11.29)	100113413
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	弁理士 森下 夏樹
		100181674
		弁理士 飯田 貴敏
		100181641
		弁理士 石川 大輔
		230113332
		弁理士 山本 健作
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	ヒト心室前駆細胞を単離するための方法	