

(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2009-513143

(P2009-513143A)

(43) 公表日 平成21年4月2日(2009.4.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B O 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁)

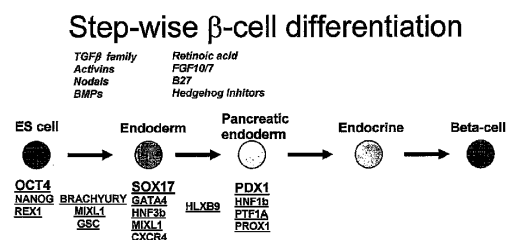
(21) 出願番号 特願2008-538095 (P2008-538095) (86) (22) 出願日 平成18年10月27日 (2006.10.27) (85) 翻訳文提出日 平成20年6月27日 (2008.6.27) (86) 国際出願番号 PCT/US2006/042413 (87) 国際公開番号 W02007/051038 (87) 国際公開日 平成19年5月3日 (2007.5.3) (31) 優先権主張番号 60/730, 917 (32) 優先日 平成17年10月27日 (2005.10.27) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 503431792 サイセラ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 921 21 サン ディエゴ ルーム 503 ビルディング 2 ジェネラル アトミク ス コート 3550 (74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之 (74) 代理人 100090516 弁理士 松倉 秀実 (74) 代理人 100106622 弁理士 和久田 純一 (74) 代理人 100089244 弁理士 遠山 勉
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P D X 1 発現背側及び腹側前腸内胚葉

(57) 【要約】

本明細書中に開示されるのは、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物、並びにその製造方法である。さらに、実質的に精製された背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、並びに背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を他の細胞型から富化、単離、及び精製するための方法も、本明細書中に開示される。背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る分化因子を同定する方法も開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト細胞を含む細胞培養物であって、該ヒト細胞のうちの少なくとも約 26% が CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6 及び SOX9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する膵臓 - 十二指腸ホメオボックス因子 - 1 (PDX1) 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞であり、該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側膵芽の細胞に分化することができる複能性細胞である細胞培養物。

【請求項 2】

前記マーカーが SERPINF2、DUSP9、CDH6 及び SOX9 から成る群から選択される、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 3】

前記マーカーが CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2 及び SLC27A2 から成る群から選択される細胞表面マーカーである、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 4】

前記 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が ADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4、XPR1、HOXA1、PDE11A、FAM49A 及び WNT5A から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 5】

前記マーカーが HOXA1、PDE11A、FAM49A 及び WNT5A から成る群から選択される、請求項 4 に記載の細胞培養物。

【請求項 6】

前記マーカーが ADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4 及び XPR1 から成る群から選択される細胞表面マーカーである、請求項 4 に記載の細胞培養物。

【請求項 7】

前記ヒト細胞の少なくとも 30% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 8】

前記ヒト細胞の少なくとも 40% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 9】

前記ヒト細胞の少なくとも 50% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 10】

前記ヒト細胞の少なくとも 60% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 11】

前記ヒト細胞の少なくとも 75% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 12】

ヒトフィーダー細胞が前記培養物中に存在し、そして該ヒトフィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 2% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 13】

P D X 1 の発現が前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中の α - フェトプロテイン (A F P)、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 1 4】

前記細胞培養物が臓側内胚葉細胞、壁側内胚葉細胞及び神経細胞から成る群から選択される細胞を実質的に含有しない、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 1 5】

レチノイドをさらに含む、請求項 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 1 6】

前記レチノイドがレチノイン酸 (R A) である、請求項 1 5 に記載の細胞培養物。

10

【請求項 1 7】

B 2 7 をさらに含む、請求項 1 6 に記載の細胞培養物。

【請求項 1 8】

ヒト細胞を含む細胞培養物であって、該ヒト細胞のうちの少なくとも約 2 % が C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する膵臓 - 十二指腸ホメオボックス因子 - 1 (P D X 1) 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞であり、該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側膵芽の細胞に分化することができる複能性細胞である、細胞培養物。

20

【請求項 1 9】

前記マーカーが S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 0】

前記マーカーが C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される細胞表面マーカーである、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 1】

前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーを実質的に発現しない、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

30

【請求項 2 2】

前記ヒト細胞の少なくとも 5 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 3】

前記ヒト細胞の少なくとも 1 0 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 4】

前記ヒト細胞の少なくとも 2 5 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

40

【請求項 2 5】

前記ヒト細胞の少なくとも 5 0 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 6】

前記ヒト細胞の少なくとも 7 5 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 7】

ヒトフィーダー細胞が前記培養物中に存在し、そして該ヒトフィーダー細胞以外のヒト

50

細胞の少なくとも約 2 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 8】

P D X 1 の発現が前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中の α - フェトプロテイン (A F P)、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカの発現より大きい、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 2 9】

前記細胞培養物が臓側内胚葉細胞、壁側内胚葉細胞及び神経細胞から成る群から選択される細胞を実質的に含有しない、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 3 0】

10

レチノイドをさらに含む、請求項 1 8 に記載の細胞培養物。

【請求項 3 1】

前記レチノイドがレチノイン酸 (R A) である、請求項 3 0 に記載の細胞培養物。

【請求項 3 2】

B 2 7 をさらに含む、請求項 3 1 に記載の細胞培養物。

【請求項 3 3】

細胞を含む細胞集団であって、該細胞のうちの少なくとも約 9 0 % が C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカを発現するヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞であり、該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側芽の細胞に分化することができる複能性細胞である細胞集団。

20

【請求項 3 4】

前記マーカが S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 3 5】

前記マーカが C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される細胞表面マーカである、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 3 6】

30

前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカを発現する、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 3 7】

前記マーカが H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される、請求項 3 6 に記載の細胞集団。

【請求項 3 8】

前記マーカが A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択される細胞表面マーカである、請求項 3 6 に記載の細胞集団。

40

【請求項 3 9】

前記細胞の少なくとも約 9 5 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 4 0】

前記細胞の少なくとも約 9 8 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 4 1】

50

P D X 1 の発現が前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中の A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、請求項 3 3 に記載の細胞集団。

【請求項 4 2】

細胞を含む細胞集団であって、該細胞のうちの少なくとも約 9 0 % が C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現するヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞であり、該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である細胞集団。

10

【請求項 4 3】

前記マーカーが S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

【請求項 4 4】

前記マーカーが C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される細胞表面マーカーである、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

【請求項 4 5】

前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーを実質的に発現しない、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

20

【請求項 4 6】

前記細胞の少なくとも約 9 5 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

【請求項 4 7】

前記細胞の少なくとも約 9 8 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

【請求項 4 8】

P D X 1 の発現が前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中の A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、請求項 4 2 に記載の細胞集団。

30

【請求項 4 9】

P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生する方法であって、以下の：

P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程；そして

C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への前記 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞集団の少なくとも約 2 6 % の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを前記細胞集団に供給する工程であって、該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程を包含する方法。

40

【請求項 5 0】

前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーも発現する、請求項 4 9 に記載の方法。

50

【請求項 5 1】

P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与える工程をさらに包含し、該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が、前記細胞集団中の背側偏向前腸内胚葉細胞中の A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択されるマーカーの存在を検出することにより確定される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される前記マーカー、或いは A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される前記マーカーの発現が定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) により確定される、請求項 5 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される前記マーカー、或いは A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される、前記マーカーの発現が免疫細胞化学により確定される、請求項 5 0 に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

P D X 1 の発現が前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中の α - フェトプロテイン (A F P)、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、請求項 4 9 に記載の方法。

30

【請求項 5 5】

前記レチノイドが R A である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 6】

R A が約 0 . 5 μ M ~ 約 5 0 μ M の範囲の濃度で供給される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

R A が約 1 μ M ~ 約 2 0 μ M の範囲の濃度で供給される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

R A が約 2 μ M の濃度で供給される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記培養物が約 5 日齢である場合に R A が供給される、請求項 5 5 に記載の方法。

40

【請求項 6 0】

前記培養物に B 2 7 を供給することをさらに包含する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記 B 2 7 が総培地の約 0 . 1 % ~ 約 2 0 % の範囲の濃度で供給される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

B 2 7 が総培地の約 0 . 5 % ~ 約 2 % の範囲の濃度で供給される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

B 2 7 が総培地の約 0 . 5 % の濃度で供給される、請求項 6 2 に記載の方法。

50

【請求項 64】

B27 が前記レチノイドとほぼ同時に供給される、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 65】

前記培養物にアクチビン A を供給することをさらに包含する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 66】

アクチビン A が約 10 ng/ml ~ 約 200 ng/ml の範囲の濃度で供給される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

アクチビン A が約 20 ng/ml ~ 約 100 ng/ml の範囲の濃度で供給される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

アクチビン A が約 25 ng/ml の濃度で供給される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が CMRL 培地中で増殖される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 70】

前記 CMRL 培地が約 2 μM の RA、約 25 ng/ml のアクチビン A 及び総培地の約 0.5% の B27 を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記 PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程が、多能性 (pluripotent) ヒト細胞を含む細胞集団を得ること、胚体内胚葉細胞への該多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で TGFβ スーパーファミリの少なくとも 1 つの増殖因子を該細胞集団に供給すること、そして胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることを包含し、該胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が該細胞集団中の胚体内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 72】

請求項 49 に記載の方法により産生される PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞。

【請求項 73】

PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を産生する方法であって、以下の：

PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程；そして

CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6 及び SOX9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への前記 PDX1 陰性胚体内胚葉細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な量で FGF-10 を前記細胞集団に供給する工程であって、該 PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程を包含する方法。

【請求項 74】

前記細胞集団が RA の非存在下で分化される、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記 PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が ADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4、XPR1、HOXA1、PDE11A、FAM49A 及び WNT5A から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーを発現しない、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 76】

PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与える工程をさらに包含し、該 PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が、前記

10

20

30

40

50

細胞集団中の腹側偏向前腸内胚葉細胞中のCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6及びSOX9から成る群から選択されるマーカーの存在を検出することにより確定される、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6及びSOX9から成る群から選択される前記マーカーの発現が定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)により確定される、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6及びSOX9から成る群から選択される前記マーカーの発現が免疫細胞化学により確定される、請求項76に記載の方法。

【請求項79】

PDX1の発現が前記PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中の α -フェトプロテイン(AFP)、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、請求項73に記載の方法。

【請求項80】

FGF-10が約5 ng/ml～約500 ng/mlの範囲の濃度で供給される、請求項73に記載の方法。

【請求項81】

FGF-10が約10 ng/ml～約100 ng/mlの範囲の濃度で供給される、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

FGF-10が約50 ng/mlの濃度で供給される、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記培養物が約3日齢である場合にFGF-10が供給される、請求項73に記載の方法。

【請求項84】

前記培養物にB27を供給することをさらに包含する、請求項73に記載の方法。

【請求項85】

前記B27が総培地の約0.1%～約20%の範囲の濃度で供給される、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

B27が総培地の約0.5%～約2%の範囲の濃度で供給される、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

B27が総培地の約0.5%の濃度で供給される、請求項86に記載の方法。

【請求項88】

B27が前記FGF-10とほぼ同時に供給される、請求項84に記載の方法。

【請求項89】

前記培養物にKAAD-シクロパミンを供給することをさらに包含する、請求項73に記載の方法。

【請求項90】

KAAD-シクロパミンが約0.1 μ M～約50 μ Mの濃度で供給される、請求項89に記載の方法。

【請求項91】

KAAD-シクロパミンが約0.5 μ M～約10 μ Mの範囲の濃度で供給される、請求項90に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 2】

K A A D - シクロパミンが約 0 . 5 μ M の濃度で供給される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が C M R L 培地中で増殖される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記 C M R L 培地が約 5 0 n g / m l の F G F - 1 0、約 0 . 5 μ M の K A A D - シクロパミン及び総培地の約 0 . 5 % の B 2 7 を含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記 C M R L 培地が R A を欠く、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程が、多能性ヒト細胞を含む細胞集団を得ること、胚体内胚葉細胞への該多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で T G F β スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を該細胞集団に供給すること、そして胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることを包含し、該胚体内胚葉細胞が生成するのに十分な時間が該細胞集団中の胚体内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

請求項 7 3 に記載の方法により産生される P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞。

【請求項 9 8】

P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、以下の：

P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞集団中の細胞を分化させる工程であって、該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程

前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中で発現されるが前記細胞集団中に存在する他の細胞型中では実質的に発現されないマーカーと結合する試薬を該細胞集団に供給する工程；そして

前記細胞集団中に存在する前記他の細胞型から、前記試薬と結合された前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を分離し、それにより P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する工程を包含する方法。

【請求項 9 9】

前記マーカーが A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記マーカーが C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記分化させる工程が P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得ること、背側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを該細胞集団に供給すること、そして P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることをさらに包含し、該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が該細胞集団中の P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

10

20

30

40

50

前記供給する工程が B 2 7 を供給することをさらに包含する、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

検出することが A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を検出することを包含する、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記細胞の少なくとも約 9 5 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

10

【請求項 1 0 5】

前記細胞の少なくとも約 9 8 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記試薬が抗体である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記抗体が A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される細胞表面ポリペプチドに対する親和性を有する、請求項 1 0 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 0 8】

請求項 9 8 に記載の方法により産生される P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【請求項 1 0 9】

P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、以下の：

P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の集団中の細胞を分化させる工程であって、該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程

30

前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中で発現されるが、前記細胞集団中に存在する他の細胞型中では実質的に発現されないマーカーと結合する試薬を該細胞集団に供給する工程；そして

前記細胞集団中に存在する前記他の細胞型から前記試薬と結合された前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を分離し、それにより P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する工程を包含する方法。

40

【請求項 1 1 0】

前記マーカーが C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択される、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記分化させる工程が P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得ること、腹側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量で F G F - 1 0 を該細胞集団に供給すること、そして P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることをさらに包含し、該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が該細胞集団中の P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の存在を検出す

50

ることにより確定される、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 112】

前記供給する工程が B27 を供給することをさらに包含する、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

検出することが CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2、SLC27A2、SERPINF2、DUSP9、CDH6 及び SOX9 から成る群から選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を検出することを包含する、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 114】

前記細胞の少なくとも約 95% が PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 115】

前記細胞の少なくとも約 98% が PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 116】

前記試薬が抗体である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 117】

前記抗体が CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2 及び SLC27A2 から成る群から選択される細胞表面ポリペプチドに対する親和性を有する、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

請求項 109 に記載の方法により産生される PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【請求項 119】

PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、以下の：

多能性細胞の集団を得る工程であって、該多能性細胞集団の少なくとも 1 つの細胞が ADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4、XPR1、HOXA1、PDE11A、FAM49A 及び WNT5A から成る群から選択されるマーカー遺伝子のいずれか 1 つのプロモーターの制御下にある核酸の少なくとも 1 つのコピーを含み、該核酸は蛍光タンパク質をコードする配列又はその生物学的活性断片を含む工程；

PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように前記多能性細胞を分化させる工程であって、該 PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は背側芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程；そして

前記細胞集団中に存在する他の細胞型から前記 PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を分離する工程を包含する方法。

【請求項 120】

前記富化細胞集団が少なくとも約 95% の PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記富化細胞集団が少なくとも約 98% の PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 122】

前記分化させる工程が PD X 1 陰性胚体内胚葉細胞への前記多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で TGF β スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を前記多能性細胞集団に供給すること、そして PD X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への PD X 1 陰性

10

20

30

40

50

胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを該 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給することをさらに包含する、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記レチノイドが R A である、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記供給する工程が B 2 7 を供給することをさらに包含する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (G F P) である、請求項 1 1 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 6】

前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) により前記細胞集団中に存在する他の細胞型から分離される、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

請求項 1 1 9 に記載の方法により產生される P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【請求項 1 2 8】

P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を產生する方法であって、以下の：

20

多能性細胞の集団を得る工程であって、該多能性細胞集団の少なくとも 1 つの細胞は C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択されるマーカー遺伝子のいずれか 1 つのプロモーターの制御下にある核酸の少なくとも 1 つのコピーを含み、該核酸は蛍光タンパク質をコードする配列又はその生物学的活性断片を含む工程；

P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を產生するように前記多能性細胞を分化させる工程であって、該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は腹側芽の細胞に分化することができる複能性細胞である工程；そして

非腹側偏向前腸内胚葉細胞から前記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を分離する工程

30

を包含する方法。

【請求項 1 2 9】

前記富化細胞集団が少なくとも約 9 5 % の P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記富化細胞集団が少なくとも約 9 8 % の P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記分化させる工程が P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞への前記多能性細胞の分化を促進するために十分な量で T G F β スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を前記多能性細胞集団に供給すること、そして P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量で F G F - 1 0 を該 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給することをさらに包含する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

40

【請求項 1 3 2】

前記供給する工程が B 2 7 を供給することをさらに包含する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (G F P) である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

50

前記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) により前記細胞集団中に存在する他の細胞型から分離される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

請求項 1 2 8 に記載の方法により産生される P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【請求項 1 3 6】

ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進することができる分化因子を同定する方法であって、以下の：

ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程；

前記細胞集団に候補分化因子を供給する工程；

10

第 1 の時点での前記細胞集団中のマーカーの発現を決定する工程；

第 2 の時点での前記細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程であって、該第 2 の時点は前記第 1 の時点の次に起こり、そして該第 2 の時点は前記候補分化因子を該細胞集団に供給することの後である工程；そして

前記第 2 の時点での前記細胞集団中のマーカーの発現が前記第 1 の時点での前記細胞集団中のマーカーの発現と比較した場合に増大又は低減されるかを判定する工程であって、該細胞集団中の該マーカーの発現の増大又は低減は候補分化因子が前記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進することができることを示す工程を包含する方法。

【請求項 1 3 7】

20

前記マーカーが A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4、X P R 1、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が前記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % を含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

ヒトフィーダー細胞が前記細胞集団中に存在し、そして該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 4 0】

前記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が前記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % を含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記ヒトフィーダー細胞が前記細胞集団中に存在し、そして前記フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化することができる、請求項 1 3 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 4 3】

前記ヒト胚体内胚葉細胞が前記候補分化因子に応答して腭臓前駆体細胞に分化する、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給することより前である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給するのとほぼ同時である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

50

【請求項 1 4 6】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給することの後である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記マーカーの発現が増大される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記マーカーの発現が減少される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記マーカーの発現が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) により確定される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 1 5 0】

前記マーカーの発現が、免疫細胞化学により確定される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記分化因子が小分子を含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記分化因子がポリペプチドを含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記分化因子が増殖因子を含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト PD X 1 陽性腹側偏向の前腸内胚葉細胞の分化を促進することができる分化因子を同定する方法であって、

20

ヒト PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程；

候補分化因子を前記細胞集団に供給する工程；

第 1 の時点で前記細胞集団中のマーカーの発現を確定する工程；

第 2 の時点で前記細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程であって、該第 2 の時点が前記第 1 の時点の後であり、且つ該第 2 の時点が該細胞集団に前記候補分化因子を供給することの後である、工程；そして

前記第 2 の時点での前記細胞集団中の前記マーカーの発現が、前記第 1 の時点での該細胞集団中の該マーカーの発現と比較して増大又は低減されているかを判定する工程であって、該細胞集団中の該マーカーの発現の増大又は低減は、前記候補分化因子が、前記ヒト PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進することができることを示す方法。

30

【請求項 1 5 5】

前記マーカーが CDH 6、GABRA 2、GRIA 3、IL 6 R、KCNJ 2、LGALS 3、LGALS 3 / GALIG、SERPINF 2、SLC 2 7 A 2、SERPINF 2、DUSP 9、CDH 6 及び SOX 9 から成る群から選択される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

前記ヒト PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が前記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

ヒトフィーダー細胞が前記細胞集団中に存在し、そして該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % が PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 5 8】

前記ヒト PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が前記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記ヒトフィーダー細胞が前記細胞集団中に存在し、そして該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % が PD X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

50

【請求項 1 6 0】

前記ヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化することができる、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記ヒト胚体内胚葉細胞が、前記候補分化因子に応答して、腭臓前駆体細胞に分化する、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給することより前である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給するのとほぼ同時である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記第 1 の時点が、前記候補分化因子を前記細胞集団に供給することの後である、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記マーカーの発現が増大される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記マーカーの発現が低減される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記マーカーの発現が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) により確定される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記マーカーの発現が、免疫細胞化学により確定される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記分化因子が小分子を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

前記分化因子がポリペプチドを含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記分化因子が増殖因子を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、医学及び細胞生物学の分野に関する。特に本発明は、哺乳動物の前腸内胚葉細胞を含む組成物、並びに背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、並びにこのような細胞の産生、単離及び使用方法に関する。

【0 0 0 2】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許仮出願第 6 0 / 7 3 0 , 9 1 7 号 (表題「 P D X 1 発現背側及び腹側前腸内胚葉 (PDX1-EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM) 」、2 0 0 5 年 1 0 月 2 7 日提出) (この記載内容は参照により本明細書中で完全に援用される) の本出願であり、そしてそれに対する優先権を主張する。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

ヒト多能性幹細胞、例えば胚性幹 (E S) 細胞及び胚性生殖 (E G) 細胞は、1 9 9 4 年に線維芽細胞フィーダーを含有しない培養物中で初めて単離され (Bongso 他、1994) 、そして線維芽細胞フィーダーを含有する培養物中でも単離された (Hogan, 1997) 。後に、Thomson、Reubinoﬀ 及び Shamblott は、有糸分裂不活性化マウスフィーダー層を用いたヒト E S 及び E G 細胞の連続培養を確立した (Reubinoﬀ 他、2000 ; Shamblott 他、1998 ; Thomson 他、1998) 。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

ヒトES及びEG細胞(hESC)は、ヒト発達の早期段階を研究するための、並びにいくつかの疾患状態、例えば真性糖尿病及びパーキンソン病における療法的介入のための独特の機会を提供する。例えばhESC由来のインスリン生産β細胞の使用は、糖尿病の治療のためにドナー膵臓からの細胞を利用する一般的細胞療法手順を上回る大幅な改善を提供する。しかしながら現在、hESCからインスリン生産β細胞を生成する方法は分かっていない。したがって、ドナー膵臓からの島細胞を利用する真性糖尿病のための一般的細胞療法処置は、移植に必要とされる高品質の島細胞の不足により制限される。単一I型糖尿病患者のための細胞療法は、約 8×10^8 個の膵臓島細胞の移植を要する(Shapiro他、2000; Shapiro他、2001a; Shapiro他、2001b)。したがって、少なくとも2つの健常ドナー器官が、上首尾の移植のために十分な島細胞を得るために必要とされる。ヒト胚性幹細胞は、ヒト細胞療法のための相当量の高品質分化細胞を発達させるための出発物質の供給源を提供する。

10

【 0 0 0 5 】

hESCを細胞療法用途に独特に適合させる2つの特性は、多能性、並びに長期間培養中にこれらの細胞を保持する能力である。多能性は、3つの一次胚葉(内胚葉、中胚葉、外胚葉)すべての誘導体に分化した、次に胚体外組織(例えば胎盤)及び生殖細胞のほかに、成熟生物体のすべての体細胞型を形成するhESCの能力により確定される。多能性はhESCに並外れた有用性を付与するが、この特性は、これらの細胞及びそれらの誘導体の研究及び操作のための独特の好機も有する。hESC培養物を分化する際に生じ得る非常に種々の細胞型のために、膨大な数の細胞型が極めて低い効率で産生される。さらに、任意の所定の細胞型の産生を評価する場合の成功は、適切なマーカーの確定に応じて決まる。効率的な指示分化の達成は、hESCの療法的用途のために大きな重要性を有する。

20

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

細胞療法用途で有用である細胞を生成するための出発材料としてhESCを使用するためには、上述の問題を克服することは有益であろう。例えば島細胞移植療法のために必要とされる細胞材料のレベルを達成するために、分化の極めて初期の段階でhESCを効率的に膵島/β-細胞株に向けることが有益である。

30

【 0 0 0 7 】

分化プロセスの効率的指示のほかに、膵島/β-細胞株への分化経路に沿って中間体細胞型を単離し、特性化すること、そして分化におけるさらなる工程のための適切な系統前駆体としてこのような細胞を用いることも有益である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明の実施の形態は、PD $\times$ 1陰性胚体前腸内胚葉細胞(内胚葉細胞)の細胞培養物に関する。いくつかの実施の形態では、前腸内胚葉は、HNF1b及びFOX α 1マーカーを発現するが、PD $\times$ 1を実質的に発現しない。本発明の他の実施の形態は、PD $\times$ 1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞(背側PD $\times$ 1陽性前腸内胚葉細胞)の細胞培養物に関する。いくつかの実施の形態では、PD $\times$ 1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は、表3から選択される1つ又は複数のマーカー、及び/又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーを発現する。付加的な実施の形態は、PD $\times$ 1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞(腹側PD $\times$ 1陽性前腸内胚葉細胞)の細胞培養物に関する。いくつかの実施の形態では、PD $\times$ 1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は、PD $\times$ 1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞における同一マーカーの発現と比較して、表3から選択される1つ又は複数のマーカーを発現するが、表4から選択されるマーカーを実質的に発現しない。

40

【 0 0 0 9 】

本発明の付加的な実施の形態は、PD $\times$ 1陰性前腸内胚葉細胞を含む富化、単離及び/又は精製した細胞集団に関する。他の実施の形態は、PD $\times$ 1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞

50

胞に関する。さらに他の実施の形態は、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む富化、単離及び／又は精製した細胞集団に関する。

【0010】

本発明の態様は、胚体内胚葉細胞からのPDX1陰性前腸内胚葉細胞の細胞培養物を産生する方法又はプロセスにも関する。このようなプロセスとしては、胚体内胚葉細胞の細胞培養物又は細胞集団中のTGFβスーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減又は排除することを包含する。いくつかの実施の形態では、TGFβスーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減又は排除することは、外因的に添加されるTGFβスーパーファミリー増殖因子、例えばアクチビンAを胚体内胚葉細胞の細胞培養物又は細胞集団から希釈又は除去することにより媒介される。いくつかの実施の形態では、前腸内胚葉細胞への胚体内胚葉細胞の分化は、FGFファミリー増殖因子及び／又はヘッジホッグ経路阻害剤を胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団に供給することにより増強される。いくつかの実施の形態では、胚体内胚葉細胞は、幹細胞に由来する。好ましくは幹細胞は、胚性幹細胞である。さらに好ましくは、幹細胞は、ヒト胚性幹細胞(hESC)である。いくつかの実施の形態では、PDX1陰性前腸内胚葉細胞は、レチノイド、例えばレチノイン酸の添加により、PDX1陽性内胚葉細胞(膀胱内胚葉細胞)に分化される。他の態様は、PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の細胞培養物を産生する方法又はプロセスに関する。このようなプロセスは、胚体内胚葉細胞にレチノイン酸を供給することを包含する。いくつかの実施の形態では、胚体内胚葉細胞は、幹細胞に由来する。好ましくは幹細胞は、胚性幹細胞である。さらに好ましくは、幹細胞は、ヒト胚性幹細胞(hESC)である。本発明のさらなる態様は、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の細胞培養物を産生する方法又はプロセスに関する。このようなプロセスは、胚体内胚葉細胞にFGFファミリー増殖因子を供給することを包含する。いくつかの実施の形態では、胚体内胚葉細胞は、幹細胞に由来する。好ましくは幹細胞は胚性幹細胞である。さらに好ましくは、幹細胞はhESCである。

【0011】

本発明の付加的な実施の形態は、PDX1陰性前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び／又は精製する方法に関する。このような実施の形態では、PDX1陰性前腸内胚葉細胞は、細胞表面分子のようなPDX1陰性前腸内胚葉細胞の細胞表面に発現される分子と結合する抗体、リガンド又は他の分子を用いることにより、細胞集団中の他の細胞から分離される。本発明の他の実施の形態は、PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び／又は精製する方法に関する。このような実施の形態では、PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は、表3から選択される細胞表面分子、或いは表4から選択される細胞表面分子のようなPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の細胞表面上で発現される分子と結合する抗体、リガンド又は他の分子を用いることにより、細胞集団中の他の細胞から分離される。本発明のさらに他の実施の形態は、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び／又は精製する方法に関する。このような実施の形態では、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は、表3から選択される細胞表面分子のようなPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の細胞表面で発現される分子と結合する抗体、リガンド又は他の分子を用いることにより、細胞集団中の他の細胞から分離される。

【0012】

本発明の実施の形態は、PDX1陰性前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び／又は精製する付加的な方法に関する。このような実施の形態では、PDX1陰性前腸内胚葉細胞の前駆体である多能性細胞又は複能性細胞は、HNF1b又はFOXA1のようなマーカー遺伝子の発現を内因的に制御するプロモーターの制御下で蛍光レポーター遺伝子を含有するように工学処理される。蛍光的タグ化PDX1陰性前腸内胚葉細胞は次に、蛍光活性化細胞選別器(FACS)により細胞集団中の他の細胞から分離される。本発明のさらに他の実施の形態は、PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び／又は精製する付加的な方法に関する。このような実施の形態では、PDX1陽性細胞の前駆体である多能性又は複能性のPDX1陰性細胞は、表3又は表4から選択されるマーカー遺伝子の発現を

内因的に制御するプロモーターの制御下で蛍光レポーター遺伝子を含有するように工学処理される。蛍光的タグ化 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は次に、蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) により細胞集団中の他の細胞から分離される。本発明のさらに他の実施の形態は、P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を富化、単離、及び / 又は精製する付加的方法に関する。このような実施の形態では、P D X 1 陽性細胞の前駆体である多能性又は複能性の P D X 1 陰性細胞は、表 3 から選択されるマーカー遺伝子の発現を内因的に制御するプロモーターの制御下で蛍光レポーター遺伝子を含有するように工学処理される。蛍光的タグ化 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は次に、F A C S により細胞集団中の他の細胞から分離される。

【 0 0 1 3 】

本発明のさらなる実施の形態は、ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の分化を促し得る分化因子を同定する方法に関する。この方法は、ヒト P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、細胞集団に候補分化因子を供給する工程、第 1 の時点での細胞集団中のマーカー、例えば H N F 1 b、F O X A 1 又は P D X 1 の発現を確定する工程、そして第 2 の時点での細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程を包含する。このような実施の形態では、第 2 の時点は第 1 の時点の後であり、そして第 2 の時点は候補分化因子を細胞集団に供給した後である。第 2 の時点での細胞集団中のマーカーの発現が第 1 の時点での細胞集団中のマーカーの発現と比較して増大又は低減される場合には、候補分化因子はヒト P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る。本発明のさらなる実施の形態は、ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る分化因子を同定する方法に関する。この方法は、ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、細胞集団に候補分化因子を供給する工程、第 1 の時点での細胞集団中の表 3 から選択されるマーカー、又は表 4 から選択されるマーカーのようなマーカーの発現を確定する工程、そして第 2 の時点での細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程を包含する。このような実施の形態では、第 2 の時点は第 1 の時点の後であり、そして第 2 の時点は候補分化因子を細胞集団に供給した後である。第 2 の時点での細胞集団中のマーカーの発現が第 1 の時点での細胞集団中のマーカーの発現と比較して増大又は低減される場合には、候補分化因子はヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る。本発明のさらなる実施の形態は、ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る分化因子を同定する方法に関する。この方法は、ヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、細胞集団に候補分化因子を供給する工程、第 1 の時点での細胞集団中の表 3 から選択されるマーカーのようなマーカーの発現を確定する工程、そして第 2 の時点での細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程を包含する。このような実施の形態では、第 2 の時点は第 1 の時点の後であり、そして第 2 の時点は候補分化因子を細胞集団に供給した後である。第 2 の時点での細胞集団中のマーカーの発現が第 1 の時点での細胞集団中のマーカーの発現と比較して増大又は低減される場合には、候補分化因子はヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る。

【 0 0 1 4 】

或る特定の権限において、「～を含む (comprising) 」という用語の任意の一般的に許容可能な定義はあり得ない。本明細書中で用いる場合、「～を含む」という用語は、任意の付加的な要素の含入を可能にする「オープン」言語を表すよう意図される。これに留意して、本発明の付加的な実施の形態を、以下の番号を付した段落を参照しながら説明する。

【 0 0 1 5 】

1 . ヒト細胞を含む細胞培養物であって、当該ヒト細胞の少なくとも約 2 6 % が表 3 から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する脾臓 - 十二指腸ホメオボックス因子 - 1 (P D X 1) 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞であり、当該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側脾芽の細胞に分化することができる複能性細胞である細胞培養物。

【 0 0 1 6 】

2. 表3から選択される上記マーカーが細胞表面で発現される、段落1の細胞培養物。

【0017】

3. 細胞表面で発現される上記マーカーがCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される段落2の細胞培養物。

【0018】

4. 上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される少なくとも1つのマーカーを発現する、段落1の細胞培養物。

【0019】

5. 表4から選択される上記マーカーが細胞表面で発現されるマーカーである、段落4の細胞培養物。

【0020】

6. 細胞表面で発現される上記マーカーがADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4及びXPR1から成る群から選択される、段落5の細胞培養物。

【0021】

7. 上記ヒト細胞の少なくとも30%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0022】

8. 上記ヒト細胞の少なくとも40%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0023】

9. 上記ヒト細胞の少なくとも50%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0024】

10. 上記ヒト細胞の少なくとも60%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0025】

11. 上記ヒト細胞の少なくとも75%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0026】

12. ヒトフィーダー細胞が上記培養物中に存在し、そして当該ヒトフィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約2%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落1の細胞培養物。

【0027】

13. PDX1の発現が上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中のα-フェトプロテイン(AFP)、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落1の細胞培養物。

【0028】

14. 上記細胞培養物が臓側内胚葉細胞、壁側内胚葉細胞及び神経細胞から成る群から選択される細胞を実質的に含有しない、段落1の細胞培養物。

【0029】

15. レチノイドをさらに含む、段落1の細胞培養物。

【0030】

16. 上記レチノイドがレチノイン酸(RA)である、段落15の細胞培養物。

【0031】

17. B27をさらに含む、段落16の細胞培養物。

【0032】

10

20

30

40

50

18. ヒト細胞を含む、細胞培養物であって、当該ヒト細胞の少なくとも約2%が表3から選択される少なくとも1つのマーカーを発現する脾臓 - 十二指腸ホメオボックス因子 - 1 (PDX1) 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞であり、当該PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化することができる複能性細胞である細胞培養物。

【0033】

19. 表3から選択される上記マーカーが細胞表面で発現されるマーカーである、段落18の細胞培養物。

【0034】

20. 細胞表面で発現される上記マーカーがCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される、段落19の細胞培養物。

10

【0035】

21. 上記PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される1つ又は複数のマーカーを実質的には発現しない、段落18の細胞培養物。

【0036】

22. 上記ヒト細胞の少なくとも約5%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

【0037】

23. 上記ヒト細胞の少なくとも約10%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

20

【0038】

24. 上記ヒト細胞の少なくとも約25%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

【0039】

25. 上記ヒト細胞の少なくとも約50%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

【0040】

26. 上記ヒト細胞の少なくとも約75%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

【0041】

27. ヒトフィーダー細胞が上記培養物中に存在し、そして当該ヒトフィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約2%がPDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落18の細胞培養物。

30

【0042】

28. PDX1の発現が上記PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中の α -フェトプロテイン (AFP)、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落18の細胞培養物。

【0043】

29. 上記細胞培養物が臓側内胚葉細胞、壁側内胚葉細胞及び神経細胞から成る群から選択される細胞を実質的に含有しない、段落18の細胞培養物。

40

【0044】

30. レチノイドをさらに含む、段落18の細胞培養物。

【0045】

31. 上記レチノイドがレチノイン酸 (RA) である、段落30の細胞培養物。

【0046】

32. B27をさらに含む、段落31の細胞培養物。

【0047】

33. 細胞を含む細胞集団であって、当該細胞のうちの少なくとも約90%が表3から選択される少なくとも1つのマーカーを発現するヒトPDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞であり、当該PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化すること

50

ができる複能性細胞である細胞集団。

【0048】

34. 表3から選択される上記マーカーが細胞表面で発現されるマーカーである、段落33の細胞集団。

【0049】

35. 細胞表面で発現される上記マーカーがCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される、段落34の細胞集団。

【0050】

36. 上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される少なくとも1つのマーカーを発現する、段落33の細胞集団。 10

【0051】

37. 表4から選択される上記マーカーが細胞表面で発現されるマーカーである、段落36の細胞集団。

【0052】

38. 細胞表面で発現される上記マーカーがADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4及びXPR1から成る群から選択される、段落37の細胞集団。

【0053】

39. 上記細胞の少なくとも約95%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落33の細胞集団。 20

【0054】

40. 上記細胞の少なくとも約98%がPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落33の細胞集団。

【0055】

41. PDX1の発現が上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中のAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落33の細胞集団。

【0056】

42. 細胞を含む細胞集団であって、当該細胞のうちの少なくとも約90%が表3から選択される少なくとも1つのマーカーを発現するヒトPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞であり、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側芽の細胞に分化し得る複能性細胞である細胞集団。 30

【0057】

43. 表3から選択される上記マーカーが細胞表面で発現されるマーカーである、段落42の細胞集団。

【0058】

44. 細胞表面で発現される上記マーカーがCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される、段落43の細胞集団。 40

【0059】

45. 上記PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される1つ又は複数のマーカーを実質的に発現しない、段落42の細胞集団。

【0060】

46. 上記細胞の少なくとも約95%がPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落42の細胞集団。

【0061】

47. 上記細胞の少なくとも約98%がPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落42の細胞集団。 50

【 0 0 6 2 】

48. PDX1の発現が上記PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中のAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落42の細胞集団。

【 0 0 6 3 】

49. PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生する方法であって、PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、及び表3から選択される少なくとも1つのマーカーを発現するPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への当該PDX1陰性胚体内胚葉細胞集団の少なくとも約26%の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを当該細胞集団に供給する工程であって、当該PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程を包含する方法。

10

【 0 0 6 4 】

50. 上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される少なくとも1つのマーカーも発現する、段落49の方法。

【 0 0 6 5 】

51. PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与える工程をさらに包含し、当該PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が上記細胞集団中の背側偏向前腸内胚葉細胞中の表4から選択されるマーカーの存在を検出することにより確定される、段落50の方法。

【 0 0 6 6 】

20

52. 表3又は表4から選択される上記マーカーの発現が定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)により確定される、段落50の方法。

【 0 0 6 7 】

53. 表3又は表4から選択される上記マーカーが免疫細胞化学により確定される、段落50の方法。

【 0 0 6 8 】

54. PDX1の発現が上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中の α -フェトプロテイン(AFP)、SOX7、SOX1、ZIC1及びNFMから成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落49の方法。

【 0 0 6 9 】

30

55. 上記レチノイドがRAである、段落49の方法。

【 0 0 7 0 】

56. RAが約0.5 μ M ~ 約50 μ Mの範囲の濃度で供給される、段落55の方法。

【 0 0 7 1 】

57. RAが約1 μ M ~ 約20 μ Mの範囲の濃度で供給される、段落56の方法。

【 0 0 7 2 】

58. RAが約2 μ Mの濃度で供給される、段落57の方法。

【 0 0 7 3 】

59. 上記培養物が約5日齢である場合にRAが供給される、段落55の方法。

40

【 0 0 7 4 】

60. 上記培養物にB27を供給することをさらに包含する、段落49の方法。

【 0 0 7 5 】

61. 上記B27が総培地の約0.1% ~ 約20%の範囲の濃度で供給される、段落60の方法。

【 0 0 7 6 】

62. B27が総培地の約0.5% ~ 約2%の範囲の濃度で供給される、段落61の方法。

【 0 0 7 7 】

63. B27が総培地の約0.5%の濃度で供給される、段落62の方法。

50

【0078】

64. B27が上記レチノイドとほぼ同時に供給される、段落60の方法。

【0079】

65. 上記培養物にアクチビンAを供給することをさらに包含する、段落49の方法。

【0080】

66. アクチビンAが約10ng/ml～約200ng/mlの範囲の濃度で供給される、段落65の方法。

【0081】

67. アクチビンAが約20ng/ml～約100ng/mlの範囲の濃度で供給される、段落66の方法。

【0082】

68. アクチビンAが約25ng/mlの濃度で供給される、段落67の方法。

【0083】

69. 上記PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞がCMRL培地中で増殖される、段落49の方法。

【0084】

70. 上記CMRL培地が約2μMのRA、約25ng/mlのアクチビンA及び総培地の約0.5%のB27を含む、段落69の方法。

【0085】

71. 上記PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程が多能性ヒト細胞を含む細胞集団を得ること、胚体内胚葉細胞への当該多能性細胞の分化を促進するのに十分な量でTGFβスーパーファミリーの少なくとも1つの増殖因子を当該細胞集団に供給すること、そして胚体内胚葉が形成されるのに十分な時間を与えることを包含し、当該胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が当該細胞集団中の胚体内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、段落49の方法。

【0086】

72. 段落49の方法により産生されるPDX1陽性背側偏向前腸内胚葉細胞。

【0087】

73. PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を産生する方法であって、PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、及び表3から選択される少なくとも1つのマーカーを発現するPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への当該PDX1陰性胚体内胚葉細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な量でFGFファミリー増殖因子を当該細胞集団に供給する工程であって、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程を包含する方法。

【0088】

74. 上記細胞集団がRAの非存在下で分化される、段落73の方法。

【0089】

75. 上記PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が表4から選択される1つ又は複数のマーカーを発現しない、段落73の方法。

【0090】

76. PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与える工程をさらに包含し、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに上記十分な時間が上記細胞集団中の腹側偏向前腸内胚葉細胞中の表3から選択されるマーカーの存在を検出することにより確定される、段落75の方法。

【0091】

77. 表3から選択される上記マーカーの発現が定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)により確定される、段落76の方法。

【0092】

78. 表3から選択される上記マーカーの発現が免疫細胞化学により確定される、段

10

20

30

40

50

落 7 6 の方法。

【 0 0 9 3 】

7 9 . P D X 1 の発現が上記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中の α - フェトブロテイン (A F P)、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び N F M から成る群から選択されるマーカーの発現より大きい、段落 7 3 の方法。

【 0 0 9 4 】

8 0 . 上記 F G F ファミリー増殖因子が F G F - 1 0 であり、当該 F G F - 1 0 が約 5 n g / m l ~ 約 5 0 0 n g / m l の範囲の濃度で供給される、段落 7 3 の方法。

【 0 0 9 5 】

8 1 . F G F - 1 0 が約 1 0 n g / m l ~ 約 1 0 0 n g / m l の範囲の濃度で供給される、段落 8 0 の方法。 10

【 0 0 9 6 】

8 2 . F G F - 1 0 が約 5 0 n g / m l の濃度で供給される、段落 8 1 の方法。

【 0 0 9 7 】

8 3 . 上記培養物が約 3 日齢である場合に上記 F G F ファミリー増殖因子が供給される、段落 7 3 の方法。

【 0 0 9 8 】

8 4 . 上記培養物に B 2 7 を供給することをさらに包含する、段落 7 3 の方法。

【 0 0 9 9 】

8 5 . 上記 B 2 7 が総培地の約 0 . 1 % ~ 約 2 0 % の範囲の濃度で供給される、段落 8 4 の方法。 20

【 0 1 0 0 】

8 6 . B 2 7 が総培地の約 0 . 5 % ~ 約 2 % の範囲の濃度で供給される、段落 8 5 の方法。

【 0 1 0 1 】

8 7 . B 2 7 が総培地の約 0 . 5 % の濃度で供給される、段落 8 6 の方法。

【 0 1 0 2 】

8 8 . B 2 7 が上記 F G F ファミリー増殖因子とほぼ同時に供給される、段落 8 4 の方法。

【 0 1 0 3 】

8 9 . 上記培養物にヘッジホッグ阻害剤を供給することをさらに包含する、段落 7 3 の方法。 30

【 0 1 0 4 】

9 0 . 上記ヘッジホッグ阻害剤が K A A D - シクロパミンであり、当該 K A A D - シクロパミンが約 0 . 1 μ M ~ 約 5 0 μ M の濃度で供給される、段落 8 9 の方法。

【 0 1 0 5 】

9 1 . K A A D - シクロパミンが約 0 . 5 μ M ~ 約 1 0 μ M の範囲の濃度で供給される、段落 9 0 の方法。

【 0 1 0 6 】

9 2 . K A A D - シクロパミンが約 0 . 5 μ M の濃度で供給される、段落 9 1 の方法。 40

【 0 1 0 7 】

9 3 . 上記 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が C M R L 培地中で増殖される、段落 7 3 の方法。

【 0 1 0 8 】

9 4 . 上記 C M R L 培地が約 5 0 n g / m l の F G F - 1 0、約 0 . 5 μ M の K A A D - シクロパミン及び総培地の約 0 . 5 % の B 2 7 を含む、段落 9 3 の方法。

【 0 1 0 9 】

9 5 . 上記 C M R L 培地 R A を欠く、段落 9 4 の方法。

【 0 1 1 0 】

96. 上記 PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程が多能性ヒト細胞を含む細胞集団を得ること、胚体内胚葉細胞への当該多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で TGFβ スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を当該細胞集団に供給すること、そして胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることを包含し、当該胚体内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が当該細胞集団中の胚体内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、段落 73 の方法。

【0111】

97. 段落 73 の方法により産生される PDX1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞。

【0112】

98. PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように PDX1 陰性胚体内胚葉細胞の集団中の細胞を分化させる工程であって、当該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程、当該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞中で発現されるマーカーと結合するが、当該細胞集団中に存在する他の細胞型中では実質的に発現されない試薬を当該細胞集団に供給する工程、及び当該細胞集団中に存在する当該他の細胞型から、当該試薬と結合された当該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を分離し、それにより PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する、分離する工程を包含する方法。

10

【0113】

99. 上記マーカーが ADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4 及び XPR1 から成る群から選択される、段落 98 の方法。

20

【0114】

100. 上記マーカーが CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2 及び SLC27A2 から成る群から選択される、段落 98 の方法。

【0115】

101. 分化させる工程が PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得ること、PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への PDX1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを当該細胞集団に供給すること（当該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は背側腭芽の細胞に分化し得る複能性細胞である）、そして PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることをさらに包含し、当該 PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が当該細胞集団中の PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、段落 98 の方法。

30

【0116】

102. 供給する工程が B27 を供給することをさらに包含する、段落 101 の方法。

【0117】

103. 検出することが表 4 から選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を検出することを包含する、段落 101 の方法。

40

【0118】

104. 上記細胞の少なくとも約 95% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落 98 の方法。

【0119】

105. 上記細胞の少なくとも約 98% が PDX1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落 98 の方法。

【0120】

106. 上記試薬が抗体である、段落 98 の方法。

【0121】

50

107. 上記抗体がADORA2A、CD47、EPB41L1、MAG、SFRP5、SLC16A10、SLC16A2、SLC1A3、SLC30A4、SLICK、SLITRK4、XPR1、CDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される細胞表面ポリペプチドに対する親和性を有する、段落106の方法。

【0122】

108. 段落98の方法により産生されるPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【0123】

109. PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を産生するようにPDX1陰性胚体内胚葉細胞の集団中の細胞を分化させる工程であって、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞中で発現されるマーカーと結合するが、当該細胞集団中に存在する他の細胞型中では実質的に発現されない試薬を当該細胞集団に供給する工程、及び当該細胞集団中に存在する当該他の細胞型から当該試薬と結合された当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を分離し、それによりPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する、分離する工程を包含する方法。

10

【0124】

110. 上記マーカーがCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される、段落109の方法。

20

【0125】

111. 分化させる工程がPDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞集団を得ること、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への当該PDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量でFGFファミリー増殖因子を当該細胞集団に供給すること（当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は腹側芽の細胞に分化し得る複能性細胞である）、そしてPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間を与えることをさらに包含し、当該PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が形成されるのに十分な時間が当該細胞集団中のPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の存在を検出することにより確定される、段落109の方法。

30

【0126】

112. 供給する工程がB27を供給することをさらに包含する、段落111の方法。

【0127】

113. 検出することが表3から選択される少なくとも1つのマーカーの発現を検出することを包含する、段落111の方法。

【0128】

114. 上記細胞の少なくとも約95%がPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落109の細胞集団。

40

【0129】

115. 上記細胞の少なくとも約98%がPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落109の細胞集団。

【0130】

116. 上記試薬が抗体である、段落109の方法。

【0131】

117. 上記抗体がCDH6、GABRA2、GRIA3、IL6R、KCNJ2、LGALS3、LGALS3/GALIG、SERPINF2及びSLC27A2から成る群から選択される細胞表面ポリペプチドに対する親和性を有する、段落116の方法。

50

【 0 1 3 2 】

1 1 8 . 段落 1 0 9 の方法により産生される P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【 0 1 3 3 】

1 1 9 . P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、多能性細胞の集団を得る工程であって、当該多能性細胞集団の少なくとも 1 つの細胞が表 4 から選択されるマーカー遺伝子のいずれか 1 つのプロモーターの制御下で核酸の少なくとも 1 つのコピーを含み、当該核酸は蛍光タンパク質をコードする配列又はその生物学的活性断片を含む工程、P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように当該多能性細胞を分化させる工程であって、当該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞は背側腭芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程、そして細胞集団中に存在する他の細胞型から当該 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を分離する工程を包含する方法。

10

【 0 1 3 4 】

1 2 0 . 上記富化細胞集団が少なくとも約 9 5 % の P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む、段落 1 1 9 の方法。

【 0 1 3 5 】

1 2 1 . 上記富化細胞集団が少なくとも約 9 8 % の P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む、段落 1 1 9 の方法。

【 0 1 3 6 】

1 2 2 . 分化させる工程が P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞への上記多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で T G F β スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を当該多能性細胞集団に供給すること、そして P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞への当該 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量でレチノイドを当該 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給することをさらに包含する、段落 1 1 9 の方法。

20

【 0 1 3 7 】

1 2 3 . 上記レチノイドが R A である、段落 1 2 2 の方法。

【 0 1 3 8 】

1 2 4 . 供給する工程が B 2 7 を供給することをさらに包含する、段落 1 2 3 の方法。

【 0 1 3 9 】

1 2 5 . 上記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (G F P) である、段落 1 1 9 の方法。

30

【 0 1 4 0 】

1 2 6 . 上記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) により細胞集団中に存在する他の細胞型から分離される、段落 1 1 9 の方法。

【 0 1 4 1 】

1 2 7 . 段落 1 1 9 の方法により産生される P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【 0 1 4 2 】

1 2 8 . P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞に富んだ細胞集団を産生する方法であって、多能性細胞の集団を得る工程であって、当該多能性細胞集団の少なくとも 1 つの細胞は表 3 から選択されるマーカー遺伝子のいずれか 1 つのプロモーターの制御下で核酸の少なくとも 1 つのコピーを含み、当該核酸は蛍光タンパク質をコードする配列又はその生物学的活性断片を含む工程、P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を産生するように当該多能性細胞を分化させる工程であって、当該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞は腹側腭芽の細胞に分化し得る複能性細胞である工程、そして非腹側偏向前腸内胚葉細胞から当該 P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を分離する工程を包含する方法。

40

【 0 1 4 3 】

1 2 9 . 上記富化細胞集団が少なくとも約 9 5 % の P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む、段落 1 2 8 の方法。

50

【 0 1 4 4 】

1 3 0 . 上記富化細胞集団が少なくとも約 9 8 % の P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む、段落 1 2 8 の方法。

【 0 1 4 5 】

1 3 1 . 分化させる工程が P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞への上記多能性細胞の分化を促進するのに十分な量で T G F β スーパーファミリーの少なくとも 1 つの増殖因子を当該多能性細胞集団に供給すること、そして P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な量で F G F ファミリー増殖因子を当該 P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給することをさらに包含する、段落 1 2 8 の方法。

【 0 1 4 6 】

1 3 2 . 供給する工程が B 2 7 を供給することをさらに包含する、段落 1 2 8 の方法。

【 0 1 4 7 】

1 3 3 . 上記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (G F P) である、段落 1 2 8 の方法。

【 0 1 4 8 】

1 3 4 . 上記 P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) により細胞集団中に存在する他の細胞型から分離される、段落 1 2 8 の方法。

【 0 1 4 9 】

1 3 5 . 段落 1 2 8 の方法により産生される P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の富化集団。

【 0 1 5 0 】

1 3 6 . ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る分化因子を同定する方法であって、ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、当該細胞集団に候補分化因子を供給する工程、第 1 の時点での当該細胞集団中のマーカーの発現を確定する工程、第 2 の時点での当該細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程であって、当該第 2 の時点は当該第 1 の時点の次に起こり、そして当該第 2 の時点は当該候補分化因子を当該細胞集団に供給することに続いて起こる工程、そして当該第 2 の時点での当該細胞集団中のマーカーの発現が当該第 1 の時点での当該細胞集団中のマーカーの発現と比較した場合に増大又は低減されるかを判定する工程であって、当該細胞集団中の当該マーカーの発現の増大又は低減は当該候補分化因子がヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進し得ることを示す工程を包含する方法。

【 0 1 5 1 】

1 3 7 . 上記マーカーが表 4 から成る群から選択される、段落 1 3 6 の方法。

【 0 1 5 2 】

1 3 8 . 上記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が上記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % を含む、段落 1 3 6 の方法。

【 0 1 5 3 】

1 3 9 . ヒトフィーダー細胞が上記細胞集団中に存在し、そして当該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 1 0 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落 1 3 6 の方法。

【 0 1 5 4 】

1 4 0 . 上記ヒト P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が上記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % を含む、段落 1 3 6 の方法。

【 0 1 5 5 】

1 4 1 . 上記ヒトフィーダー細胞が上記細胞集団中に存在し、そして当該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % が P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞である、段落 1 3 6 の方法。

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

142. 上記ヒト PDX 1 陽性背側偏向前腸内胚葉細胞が背側腭芽の細胞に分化し得る、段落 136 の方法。

【0157】

143. 上記ヒト胚体内胚葉細胞が上記候補分化因子に応答して腭臓前駆体細胞に分化する、段落 136 の方法。

【0158】

144. 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給することより前である、段落 136 の方法。

【0159】

145. 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給するのとはほぼ同時である、段落 136 の方法。

【0160】

146. 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給することの後である、段落 136 の方法。

【0161】

147. 上記マーカーの発現が増大される、段落 136 の方法。

【0162】

148. 上記マーカーの発現が低減される、段落 136 の方法。

【0163】

149. 上記マーカーの発現が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) により確定される、段落 136 の方法。

【0164】

150. 上記マーカーの発現が、免疫細胞化学により確定される、段落 136 の方法。

【0165】

151. 上記分化因子が小分子を含む、段落 136 の方法。

【0166】

152. 上記分化因子がポリペプチドを含む、段落 136 の方法。

【0167】

153. 上記分化因子が増殖因子を含む、段落 136 の方法。

【0168】

154. ヒト細胞を含む細胞集団中のヒト PDX 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進することができる分化因子を同定する方法であって、ヒト PDX 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞を含む細胞集団を得る工程、候補分化因子を当該細胞集団に供給する工程、第 1 の時点で当該細胞集団中のマーカーの発現を確定する工程、第 2 の時点で当該細胞集団中の同一マーカーの発現を確定する工程であって、当該第 2 の時点が当該第 1 の時点の後であり、当該第 2 の時点が当該細胞集団に当該候補分化因子を供給することの後である工程、そして当該第 2 の時点での当該細胞集団中のマーカーの発現が、当該第 1 の時点での当該細胞集団中のマーカーの発現と比較して増大又は低減されているかを判定する工程であって、当該細胞集団中のマーカーの発現の増大又は低減は、当該候補分化因子が、当該ヒト PDX 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞の分化を促進することができることを示す工程を含む方法。

【0169】

155. 上記マーカーが表 3 から成る群から選択される、段落 154 の方法。

【0170】

156. 上記ヒト PDX 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が上記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 10% を含む、段落 154 の方法。

【0171】

157. ヒトフィーダー細胞が上記細胞集団中に存在し、そして当該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 10% が PDX 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段

10

20

30

40

50

落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 2 】

1 5 8 . 上記ヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が上記細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % を含む、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 3 】

1 5 9 . 上記ヒトフィーダー細胞が上記細胞集団中に存在し、そして当該フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 9 0 % が P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞である、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 4 】

1 6 0 . 上記ヒト P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉細胞が腹側腭芽の細胞に分化し得る、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 5 】

1 6 1 . 上記ヒト胚体内胚葉細胞が、上記候補分化因子に応答して、腭臓前駆体細胞に分化する、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 6 】

1 6 2 . 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給することより前である、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 7 】

1 6 3 . 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給するのとほぼ同時である、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 8 】

1 6 4 . 上記第 1 の時点が、上記候補分化因子を上記細胞集団に供給することの後である、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 7 9 】

1 6 5 . 上記マーカーの発現が増大される、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 0 】

1 6 6 . 上記マーカーの発現が低減される、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 1 】

1 6 7 . 上記マーカーの発現が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) により確定される、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 2 】

1 6 8 . 上記マーカーの発現が、免疫細胞化学により確定される、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 3 】

1 6 9 . 上記分化因子が小分子を含む、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 4 】

1 7 0 . 上記分化因子がポリペプチドを含む、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 5 】

1 7 1 . 上記分化因子が増殖因子を含む、段落 1 5 4 の方法。

【 0 1 8 6 】

上記の方法及び組成物は、*in vitro* で培養される細胞にすることが理解されよう。しかしながら上記の *in vitro* 分化細胞組成物は、*in vivo* 用途のために用いられ得る。

【 0 1 8 7 】

本発明の付加的な実施の形態は、米国特許仮出願第 6 0 / 5 3 2 , 0 0 4 号 (表題「胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM) 」、2 0 0 3 年 1 2 月 2 3 日出願) 、米国特許仮出願第 6 0 / 5 6 6 , 2 9 3 号 (表題「 P D X 1 発現内胚葉 (PDX1 EXPRESSING ENDODERM) 」、2 0 0 4 年 4 月 2 7 日出願) 、米国特許仮出願第 6 0 / 5 8 6 , 5 6 6 号 (表題「胚体内胚葉の単離のためのケモカイン細胞表面受容体 (CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM) 」、2 0 0 4 年 7 月 9 日出願) 、米国特許仮

10

20

30

40

50

出願第 60 / 587 , 942 号 (表題「胚体内胚葉の単離のためのケモカイン細胞表面受容体 (CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM)」、2004 年 7 月 14 日出願)、米国特許出願第 11 / 021 , 618 号 (表題「胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM)」、2004 年 12 月 23 日出願)、及び米国特許出願第 11 / 115 , 868 号 (表題「PDX1 発現内胚葉 (PDX1 EXPRESSING ENDODERM)」、2005 年 4 月 26 日出願)、米国特許出願第 11 / 165 , 305 号 (表題「胚体内胚葉を分化させるための因子の同定方法 (METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM)」、2005 年 6 月 23 日出願) (これらの開示は参照により本明細書に完全に援用される) にも見出され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0188】

[詳細な説明]

原腸形成と呼ばれる初期ヒト発達におけるきわめて重大な段階は、受精後 2 ~ 3 週間で起こる。原腸形成は、3 つの一次胚葉が最初に特定化され、そして器官形成されるのがこの時期であるため、非常に有意である (Lu 他、2001 ; Schoenwolf and Smith, 2000)。外胚葉は、身体の外被及び全神経系の終局的形成に関与するが、一方、心臓、血液、骨、骨格筋及び他の結合組織は中胚葉に由来する。胚体内胚葉は、食道、胃並びに小腸及び大腸を含む全腸管、並びに腸管に由来する器官、例えば肺、肝臓、胸腺、上皮小体及び甲状腺、胆嚢及び膵臓の形成に関与する胚葉として定義される (Grapin-Botton and Melton, 2000 ; Kimelman and Griffin, 2000 ; Tremblay 他、2000 ; Wells and Melton, 1999 ; Wells and Melton, 2000)。非常に重要な区別は、胚体内胚葉と原始内胚葉と呼ばれる細胞の完全に別個の系統との間でなされるべきである。原始内胚葉は主として、胚体外組織、主に胎盤卵黄嚢の壁側内胚葉部分及び臓側内胚葉部分、並びにライヘルト膜の細胞外マトリックス物質の形成に関与する。

【0189】

原腸形成中、胚体内胚葉形成のプロセスは、中内胚葉細胞 (中胚葉又は内胚葉を形成するための細胞構成成分) が原始線条と呼ばれる構造を介して移動する細胞移動事象で開始する。胚体内胚葉は、線条の前部分を通して、そして結節 (線条の最前領域での特殊化構造) を通して移動する細胞に由来する。移動が起こると、胚体内胚葉はまず最前腸管に存在し、そして腸管の後端の形成に伴って終わる。

【0190】

発生中の PDX1 遺伝子発現

PDX1 (STF - 1、IDX - 1、IPF - 1、IUF - 1 及び GSF ととも呼ばれる) は、膵臓及び吻側十二指腸の発生のために必要とされる転写因子である。PDX1 は、後前腸内胚葉から生じる膵臓性内胚葉中で最初に発現され、そしてマウスでは E8.5 から出発して、外分泌細胞及び内分泌細胞の両方を生じる。その後、PDX1 はベータ細胞及びいくつかのデルタ細胞に制限されるようになる。この発現パターンは、成人で保持される。PDX1 は、発生の早期に十二指腸製内胚葉で (形成中の膵臓に隣接する)、次に十二指腸性腸細胞並びに腸内分泌細胞、洞性胃で、並びに総胆管、胆嚢管及び胆管でも発現される。発現のこの領域も、膵臓発現が主に吻側十二指腸に制限されるようになる時点で、限定されるようになる。

【0191】

マウス及びヒトにおける PDX1 の標的化崩壊は、膵臓無形成を引き起こす (Jonsson, J. 他, Nature, 606-609, 1994 ; Offield, MF, 他, Devel. 983-995, 1996 ; Stoffers, D. A. 他, Nature Genetics, 106-110, 1997)。PDX1 は、インスリン及びソマトスタチン膵臓内分泌細胞の最終的分化中にも必要とされ、そしてヒトにおける単一对立遺伝子の機能的崩壊は MODY4 型 (青年の成人発症型糖尿病) 及び後期開始 II 型糖尿病の重症膵臓機能不全に関連する (Stoffers D.A. 他, Nature Genetics 138-139, 1997)。

【0192】

膵臓の胚形成中、予定膵臓組織の出芽は原腸内胚葉の背側及び腹側で生じる。これらの

突出は、前腸内胚葉の最後端で領域限定的に起こる。マウスでは、これは受精後約 8 . 5 ~ 9 . 5 日目 (d p c) に、そしてヒトでは 3 0 d p c に起こる。ヒトにおいては 3 5 d p c までに、背側芽及び腹側芽が成長し、分枝管系を発達させ、融合して、限定器官を形成する。P D X 1 タンパク質は、早期腭芽が拡大し、そして管、腺房及び内分泌細胞を含む腭臓を構成する主細胞に分化するために必要とされる。

【 0 1 9 3 】

腸管の反対側面上の位置、並びに脊索及び心臓性中胚葉とのそれぞれの関連のため、背側腭臓構造及び腹側腭臓構造に関する発生プログラムは明瞭に異なる。背側腭臓原基及び腹側腭臓原基の特殊化を制御する独自の発生プログラムに関して、ヒト胚性幹細胞 (h E S C) から生成される胚体内胚葉 (D E) 培養から背側偏向及び腹側偏向 P D X 1 発現前腸内胚葉を産生するために、2つの別個の方法をわれわれは開発した。これらの P D X 1 発現 (P D X 1 陽性) 前腸内胚葉細胞は、腭臓及び十二指腸上皮、並びに前胃粘膜の内分泌細胞に発生することに対して応答能を有する。

【 0 1 9 4 】

本発明の態様は、胚体内胚葉細胞が、P D X 1 発現 (P D X 1 陽性) 前腸内胚葉細胞の少なくとも2つの区別可能な型に分化し得るという発見に関する。P D X 1 の発現の前に、胚体内胚葉細胞は P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞に分化し得るということもわれわれは発見した。これらの P D X 1 陰性細胞にレチノイド化合物、例えばレチノイン酸を供給することは、P D X 1 の発現を誘導する。本発明の別の態様では、胚体内胚葉細胞は分化して、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を形成する。本明細書中で用いる場合、P D X 1 陽性前腸内胚葉に関しては、「背側」又は「背側偏向」とは、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が、背側腭芽のような前腸の後部分の背側由来の組織を生じ得るものであるということの意味する。P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が一旦「背側偏向」になると、それは典型的には前腸の後部分の腹側由来の組織まで発生しない。別の態様では、胚体内胚葉細胞は、分化して、腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を形成する。本明細書中で用いる場合、P D X 1 陽性前腸内胚葉に関しては、「腹側」又は「腹側偏向」とは、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が、肝臓及び腹側腭芽のような前腸の後部分の腹側由来の組織を生じ得るものであるということの意味する。P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が一旦「腹側偏向」になると、それは典型的には前腸の後部分の背側由来の組織まで発生しない。

【 0 1 9 5 】

上記の発見にかんがみて、本発明の実施形態は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞、背側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、腹側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の組成物、及び / 又は背側偏向及び腹側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の混合物を含む組成物、並びにこのような組成物の産生方法に関する。本発明の他の実施形態は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の、このような細胞の分化を促進する因子に関するスクリーニングに関する。さらなる他の実施形態は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の背側、腹側又は混合集団を、このような細胞の分化を促進する因子に関してスクリーニングすることに関する。「混合集団」とは、有意量の背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の両方を含む細胞集団を意味する。

【 0 1 9 6 】

本明細書中で用いる場合、F G F ファミリー増殖因子としては、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 5、F G F 6、F G F 7、F G F 8、F G F 9、F G F 10、F G F 11、F G F 12、F G F 13、F G F 14、F G F 15、F G F 16、F G F 17、F G F 18、F G F 19、F G F 20、F G F 21、F G F 22 及び / 又は F G F 23 からなる群からから選択される F G F ファミリー増殖因子であるが、これらに限定されない。

【 0 1 9 7 】

本明細書中で用いる場合、ヘッジホッグ阻害剤としては、K K A D - シクロパミン、K K A D - シクロパミン類似体、ジェルピン、ジェルピン類似体、ヘッジホッグ経路遮断抗体、並びに当業者に既知のヘッジホッグ経路機能のその他の阻害剤が挙げられるが、これ

らに限定されない。

【0198】

P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞及びそれに関連したプロセス

本発明の実施形態は、P D X 1 陰性内胚葉細胞の産生のための新規の確立したプロセスであって、P D X 1 陰性内胚葉細胞が腸管の前腸 / 中腸領域 (P D X 1 陰性前腸 / 中腸内胚葉) 由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞であるプロセスに関する。本明細書中で用いる場合、「複能性」又は「複能性細胞」とは、限定数の他の特定細胞型を生じ得るが、3つの一次胚細胞株 (内胚葉、外胚葉及び中胚葉) すべてを生じ得るわけではない細胞型を指す。本明細書中で用いる場合、「前腸 / 中腸」は、腸管の前部分の細胞並びに腸管の中央部分の細胞 (前腸 / 中腸接合部の細胞を含む) を指す。

10

【0199】

本発明のいくつかの好ましい実施形態は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の産生のためのプロセスに関する。いくつかの実施形態では、これらのP D X 1 陰性前腸内胚葉細胞は、腸管の前部分 (P D X 1 陰性前腸内胚葉) 由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞である。

【0200】

P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の背側、腹側及び混合集団並びにそれに関連したプロセス

本発明の実施形態は、P D X 1 陰性内胚葉細胞の産生のための新規の確立したプロセスであって、P D X 1 陽性内胚葉細胞が腸管の前腸 / 中腸領域 (P D X 1 陽性前腸 / 中腸内胚葉) 由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞であるプロセスに関する。本発明の他の実施形態は、P D X 1 陽性内胚葉細胞の産生のための新規の確立したプロセスであって、P D X 1 陽性内胚葉細胞が腸管の前腸 / 中腸領域 (P D X 1 陽性前腸 / 中腸内胚葉) 由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞であるプロセスに関する。本明細書中で用いる場合、「複能性」又は「複能性細胞」とは、限定数の他の特定細胞型を生じ得るが、3つの一次胚細胞株 (内胚葉、外胚葉及び中胚葉) すべてを生じ得るわけではない細胞型を指す。本明細書中で用いる場合、「前腸 / 中腸」は、腸管の前部分の細胞並びに腸管の中央部分の細胞 (前腸 / 中腸接合部の細胞を含む) を指す。いくつかの実施形態は、P D X 1 陽性内胚葉細胞は背側前腸内胚葉細胞である。他の実施形態では、P D X 1 陽性内胚葉細胞は腹側前腸内胚葉細胞である。

20

【0201】

本発明野いくつかの好ましい実施形態は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の産生のためのプロセスに関する。いくつかの実施形態では、これらのP D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、腸管の前部分 (P D X 1 陽性前腸内胚葉) 由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞である。いくつかの実施形態では、P D X 1 陽性内胚葉細胞は、背側前腸内胚葉細胞である。他の実施形態では、P D X 1 陽性内胚葉細胞は腹側前腸内胚葉細胞である。

30

【0202】

付加的な好ましい実施形態は、前腸の後部分のP D X 1 陽性内胚葉細胞の産生のためのプロセスに関する。いくつかの実施形態では、これらのP D X 1 陽性内胚葉細胞は、腸管の前腸領域の後部分由来の細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞である。いくつかの実施形態では、P D X 1 陽性内胚葉細胞は、背側腭芽の細胞のような前腸の後部分に由来する細胞、組織又は器官に分化し得る背側内胚葉細胞である。他の実施形態では、P D X 1 陽性内胚葉細胞は、腹側腭芽の細胞のような前腸の後部分由来の細胞、組織又は器官に分化し得る腹側前腸内胚葉細胞である。

40

【0203】

背側及び / 又は腹側P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば本明細書中に記載される方法により産生されるものを用いて、完全分化インスリン産生 β -細胞を産生し得る。本発明のいくつかの実施形態では、陽性背側及び / 又は腹側P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を形成するよう、P D X 1 を実質的に発現しない胚体内胚葉細胞 (P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞、本明細書中では胚体内胚葉とも呼ばれる) を分化することにより、陽性背側及び / 又は腹側P D X 1 前腸内胚葉細胞は産生される。P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞は、本明細書中

50

に記載されるような多能性細胞、例えば胚性幹細胞を分化することにより、或いは任意の他の既知の方法により、調製され得る。多能性細胞から P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞を産生するための便利で且つ高効率的な方法は、米国特許第 1 1 / 0 2 1 , 6 1 8 号 (表題「胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM) 」、2 0 0 4 年 1 2 月 2 3 日提出) (この記載内容は参照により本明細書中で完全に援用される) に記載されている。

【 0 2 0 4 】

P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を産生するプロセスは、多能性細胞からの臍臓組織、例えば腺房細胞、管細胞及び島細胞の効率的産生のための基礎を提供する。或る特定の好ましい実施形態では、ヒト背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、ヒト P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に由来し、これは同様に h E S C に由来する。これらのヒト背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は次に、機能性インスリン産生 β 細胞を産生するために用いられ得る。有用量のインスリン産生 β 細胞を得るために、臍島 / β 細胞運命に到達する前に起こる分化工程の各々に関して、分化の高効率性が望ましい。背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の分化は機能性臍島 / β 細胞の産生に向かう早期工程に相当するため (図 1 に示すように) 、この工程での分化の高効率性が特に望ましい。

【 0 2 0 5 】

P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の効率的分化の望ましさにかんがみて、本発明のいくつかの態様は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の約 2 ~ 2 5 % の転換を生じる *in vitro* 方法に関する。本発明のいくつかの態様は、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の約 2 6 % から少なくとも約 7 5 % の転換を生じる *in vitro* 方法に関する。本発明の他の態様は、腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞の約 2 6 % から少なくとも約 7 5 % の転換を生じる *in vitro* 方法に関する。典型的には、上記の方法は、限定化及び一時的特定化方式での培養及び増殖因子の適用を包含する。P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞に関する細胞集団のさらなる富化は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞と特異的に結合する試薬を用いることによる集団中の他の細胞からの P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の単離及び / 又は精製により達成され得る。代替的方法として、P D X 1 発現の検出を可能にするために、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、レポーター遺伝子、例えば緑色蛍光タンパク質 (G F P) で標識され得る。このような蛍光標識細胞は次に、蛍光励起細胞選別器 (F A C S) により精製され得る。本発明のさらなる態様は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び富化細胞集団に、並びに P D X 1 陽性前腸内胚葉へのそしてそれからの分化に有用な因子を同定するための方法に関する。本発明の付加的態様は、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び富化細胞集団に、並びに背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉へのそしてそれからの分化に有用な因子を同定するための方法に関する。本発明のさらなる他の態様は、腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び富化細胞集団に、並びに腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉へのそしてそれからの分化に有用な因子を同定するための方法に関する。

【 0 2 0 6 】

細胞培養物又は細胞集団中の P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の量を確定するために、培養物中又は集団中の他の細胞からこの細胞型を区別する方法が望ましい。したがって本発明の或る特定の実施形態は、その存在、非存在及び / 又は相対発現レベルが P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を示す細胞マーカーに、並びにこのようなマーカーの発現を検出し、確定するための方法に関する。本明細書中で用いる場合、「発現」とは、材料又は物質の産生、及び材料又は物質の産生のレベル又は量を指す。したがって特定マーカーの発現の確定は、発現されるマーカーの相対量若しくは絶対量の検出、又は単にマーカーの存在若しくは非存在の検出のいずれかを指す。本明細書中で用いる場合、「マーカー」とは、観察され得るか又は検出され得る任意の分子を指す。例えばマーカーとしては、核酸、例えば特定遺伝子の転写体、遺伝子のボ

リペプチド産物、非遺伝子産物ポリペプチド、糖タンパク質、炭水化物、糖脂質、脂質、リポタンパク質又は小分子（例えば 10,000 amu 未満の分子量を有する分子）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0207】

本発明のいくつかの実施形態では、マーカーの存在、非存在及び／又は発現レベルは、定量的 PCR (Q-PCR) により確定される。例えば或る特定の遺伝子マーカー、例えば PD_X1、SO_X17、SO_X7、SO_X1、ZIC1、NFM、α-フェトプロテイン (AFP)、ホメオボックス A13 (HOXA13)、ホメオボックス C6 (HOC6)、及び／又は本明細書中に記載される他のマーカーにより産生される転写体の量が、定量的 Q-PCR により確定される。他の実施形態では、免疫組織化学を用いて、上記遺伝子により発現されるタンパク質を検出する。さらに他の実施形態では、Q-PCR 及び免疫組織化学的技法が、このようなマーカーの量又は相対的割合を同定すると共に確定するために用いられる。いくつかの実施形態では、背側及び腹側の両方の PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞に共通であるマーカー、例えば PD_X1、及び／又は表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーは、Q-PCR 及び／又は免疫組織化学により検出される。他の実施形態では、背側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞中で選択的に、特異的に又は独自の発現されるマーカー、例えば表 4 から選択される 1 つ又は複数のマーカーは、Q-PCR 及び／又は免疫組織化学により検出される。

10

【0208】

本明細書中に記載される分化の方法及び検出の方法を使用することにより、背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞を含む PD_X1 陽性前腸細胞を同定すること、並びに細胞培養物又は細胞集団中の背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞の比率を確定することが可能である。例えば、本発明のいくつかの実施形態では、産生される背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞又は細胞集団は、PD_X1 陰性細胞又は細胞集団よりも少なくとも約 2 桁大きいレベルで PD_X1 遺伝子を発現する。他の実施形態では、産生される背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞又は細胞集団は、PD_X1 陰性細胞又は細胞集団よりも 2 桁を超えるレベルで PD_X1 遺伝子を発現する。さらに他の実施形態では、産生される背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞又は細胞集団は、PD_X1 胚体内胚葉細胞又は細胞集団よりも約 2 桁以上大きいレベルで PD_X1、SO_X17、HOXA13 及び HOC6 から成る群から選択されるマーカーの 1 つ又は複数の発現する。さらに他の実施形態では、産生される背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞又は細胞集団は、PD_X1 陰性胚体内胚葉細胞又は細胞集団よりおよそ 2 桁又は 3 桁以上大きいレベルで、表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーを発現する。さらなる実施形態では、産生される背側 PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞又は細胞集団は、PD_X1 陰性胚体内胚葉細胞又は細胞集団よりおよそ 2 桁又は 3 桁以上大きいレベルで、表 4 から選択される 1 つ又は複数のマーカーを発現する。

20

30

【0209】

本明細書中に記載される組成物及び方法は、いくつかの有用な特徴を有する。例えば背側及び／又は腹側 PD_X1 陽性内胚葉を含む PD_X1 陽性内胚葉を含む細胞培養物及び細胞集団、並びにこのような細胞培養物及び細胞集団を産生する方法は、ヒト発達の初期の段階をモデリングするのに有用である。さらに、本明細書中に記載される組成物及び方法は、疾患状態、例えば真性糖尿病における治療的介入にも役立ち得る。例えば PD_X1 陽性前腸内胚葉は限られた数の組織の供給源として役立つため、純粋な組織又は細胞型の発達に用いられ得る。

40

【0210】

多能性細胞からの PD_X1 陰性胚体内胚葉（胚体内胚葉）の産生

PD_X1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び／又は細胞集団は、PD_X1 陰性胚体内胚葉（「胚体内胚葉」とも呼ばれる）を先ず産生することにより、多能性細胞から産生される。胚体内胚葉を含む細胞培養物及び富化細胞集団を産生するように多能性細胞を分化させるプロセスは、以下に簡潔に、また米国特許第 11/021,618 号（表題「

50

胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM)」、2004年12月23日出願) (その開示は参照により本明細書に完全に援用される) に詳細に記載されている。これらのプロセスのいくつかでは、出発材料として使用される多能性細胞は、幹細胞である。或る特定のプロセスでは、胚体内胚葉細胞を含む胚体内胚葉細胞培養物及び富化細胞集団は、胚性幹細胞から産生される。本明細書中で用いる場合、「胚性」とは、単一接合体で始まり、発生した配偶子細胞以外には多能性又は全能性細胞を含まない多細胞構造で終わる生物体の一連の発生段階を指す。配偶子融合により得られる胚のほかに、「胚性」という用語は、体細胞核移入により得られる胚を指す。胚体内胚葉細胞を派生させる好ましい方法は、胚体内胚葉産生のための出発材料として、ヒト胚性幹細胞を利用することである。このような多能性細胞は、桑実胚に由来する細胞、胚の内部細胞塊又は胚の生殖腺隆起に由来する細胞であり得る。ヒト胚性幹細胞は、当該技術分野で既知の方法を使用して、実質的な分化無しで多能性状態で培養物中で維持されることができる。このような方法は、例えば米国特許第5,453,357号、同第5,670,372号、同第5,690,926号、同第5,843,780号、同第6,200,806号及び同第6,251,671号に(その開示は参照により本明細書に完全に援用される)記載されている。

10

20

30

40

50

【0211】

胚体内胚葉細胞を産生するためのいくつかのプロセスにおいて、hESCは、フィーダー層上に保持される。このようなプロセスでは、hESCを多能性状態に保持させる任意のフィーダー層が用いられ得る。ヒト胚性幹細胞を培養するために一般的に用いられるフィーダー層のうちの1つは、マウス線維芽細胞の層である。さらに近年、ヒト線維芽細胞フィーダー層が、hESCの培養に用いるために開発された(米国特許出願第2002/0072117号(その開示は参照により本明細書に完全に援用される)参照)。胚体内胚葉を産生するための代替的プロセスは、フィーダー層の使用を伴わずに多能性hESCの保持を可能にする。フィーダーを使用しない条件下での多能性hESCの保持方法は、米国特許出願第2003/0175956号(その開示は参照により本明細書に完全に援用される)に記載されている。

【0212】

本明細書中で用いられるヒト胚性幹細胞は、血清を含有するか又は含有しないかのいずれかの培養物中に保持され得る。いくつかの胚性幹細胞保持手法では、血清代替物が用いられる。他の場合には、無血清培養技法、例えば米国特許出願第2003/0190748号(その開示は参照により本明細書に完全に援用される)に記載される技法が用いられる。

【0213】

幹細胞は、それらが胚体内胚葉へ分化されることを要するまで、日常的処理により多能性状態で培養物中で維持される。いくつかのプロセスでは、胚体内胚葉への分化は、胚体内胚葉への分化を促進するのに十分な量でTGF β スーパーファミリーの増殖因子を幹細胞培養物へ供給することにより達成される。胚体内胚葉の産生に有用であるTGF β スーパーファミリーの増殖因子は、ノーダル/アクチビン又はBMPサブグループから選択される。いくつかの好ましい分化プロセスでは、増殖因子は、ノーダル、アクチビンA、アクチビンB及びBMP4から成る群から選択される。さらに、増殖因子Wnt3a及び他のWntファミリー成員は、胚体内胚葉細胞の産生に有用である。或る特定の分化プロセスでは、上述の増殖因子のいずれかの組合せが使用され得る。

【0214】

胚体内胚葉細胞への多能性幹細胞の分化のためのプロセスのいくつかに関しては、胚体内胚葉細胞への幹細胞の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で増殖因子が培養物中に存在するように、上記増殖因子が細胞に供給される。いくつかのプロセスでは、上記増殖因子は、少なくとも約5 ng/ml、少なくとも約10 ng/ml、少なくとも約25 ng/ml、少なくとも約50 ng/ml、少なくとも約75 ng/ml、少なくとも約100 ng/ml、少なくとも約200 ng/ml、少なくとも約300 ng/ml、少なくとも約400 ng/ml、少なくとも約500 ng/ml、少なくとも約10

0 0 n g / m l、少なくとも約 2 0 0 0 n g / m l、少なくとも約 3 0 0 0 n g / m l、
少なくとも約 4 0 0 0 n g / m l、少なくとも約 5 0 0 0 n g / m l 又は約 5 0 0 0 n g
/ m l より高い濃度で細胞培養物中に存在する。

【 0 2 1 5 】

胚体内胚葉細胞への多能性幹細胞の分化のための或る特定のプロセスでは、上記の増殖
因子は、それらの添加後、細胞培養物から除去される。例えば増殖因子は、それらの添加
後、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、又は
約 1 0 日以内に除去され得る。好ましいプロセスでは、増殖因子は、それらの添加後約 4
日で除去される。

【 0 2 1 6 】

10

胚体内胚葉細胞の培養物は、低血清又は無血清の培地中で増殖され得る。或る特定の培
養条件下では、血清濃度は約 0 . 0 5 % (v / v) ~ 約 2 0 % (v / v) の範囲であり得
る。例えばいくつかの分化プロセスでは、培地の血清濃度は、約 0 . 0 5 % (v / v) 未
満、約 0 . 1 % (v / v) 未満、約 0 . 2 % (v / v) 未満、約 0 . 3 % (v / v) 未満
、約 0 . 4 % (v / v) 未満、約 0 . 5 % (v / v) 未満、約 0 . 6 % (v / v) 未満、
約 0 . 7 % (v / v) 未満、約 0 . 8 % (v / v) 未満、約 0 . 9 % (v / v) 未満、約
1 % (v / v) 未満、約 2 % (v / v) 未満、約 3 % (v / v) 未満、約 4 % (v / v)
未満、約 5 % (v / v) 未満、約 6 % (v / v) 未満、約 7 % (v / v) 未満、約 8 % (v / v)
未満、約 9 % (v / v) 未満、約 1 0 % (v / v) 未満、又は約 1 5 % (v / v)
) 未満又は約 2 0 % (v / v) 未満であり得る。いくつかのプロセスでは、胚体内胚葉細胞
は、血清を用いずに、又は血清代替物を用いて増殖される。さらに他のプロセスでは、
胚体内胚葉細胞は B 2 7 の存在下で増殖される。このようなプロセスでは、B 2 7 サプリ
メントの濃度は、約 0 . 1 % (v / v) ~ 約 2 0 % (v / v) の範囲であり得る。

20

【 0 2 1 7 】

P D X 1 陰性胚体内胚葉 (胚体内胚葉) への多能性細胞の分化のモニタリング

胚体内胚葉への h E S C 培養の進行は、胚体内胚葉に特徴的なマーカーの発現を確定す
ることによりモニタリングされ得る。いくつかのプロセスでは、或る特定のマーカーの発
現は、マーカーの存在又は非存在を検出することにより確定される。代替的には或る特定
のマーカーの発現は、マーカーが細胞培養物又は細胞集団の細胞中に存在するレベルを測
定することにより確定され得る。このようなプロセスでは、マーカー発現の測定は、定性
的又は定量的であり得る。マーカー遺伝子により産生されるマーカーの発現を定量する一
方法は、定量的 P C R (Q - P C R) の使用による。Q - P C R を実施する方法は、当該
技術分野で既知である。マーカー遺伝子発現を定量するために、当該技術分野で既知であ
る他の方法も用いられ得る。例えばマーカー遺伝子産物の発現は、対象のマーカー遺伝子
産物に特異的な抗体を用いることにより検出され得る。或る特定のプロセスでは、胚体内
胚葉に特徴的なマーカー遺伝子の発現並びに h E S C 及び他の細胞型に特徴的なマーカー
遺伝子の有意な発現の欠如が確定される。

30

【 0 2 1 8 】

以下の実施例でさらに記載するように、胚体内胚葉の信頼性の大きいマーカーは、S O
X 1 7 遺伝子である。したがって、本明細書中に記載するプロセスにより産生される胚体
内胚葉細胞は、S O X 1 7 マーカー遺伝子を発現し、それにより S O X 1 7 遺伝子産物を
産生する。胚体内胚葉の他のマーカーは、M I X L 1、G A T A 4、H N F 3 b、G S C
、F G F 1 7、V W F、C A L C R、F O X Q 1、C M K O R 1 及び C R I P 1 である。
胚体内胚葉細胞は、原始内胚葉及び臓側内胚葉の特徴である S O X 7 マーカー遺伝子のレ
ベルよりも高いレベルで S O X 1 7 マーカー遺伝子を発現する (表 1 を参照) ため、いく
つかのプロセスでは、S O X 1 7 及び S O X 7 の両方の発現がモニタリングされる。他の
プロセスでは、h E S C に特有の S O X 1 7 マーカー遺伝子及び O C T 4 マーカー遺伝子
の両方の発現がモニタリングされる。さらに、胚体内胚葉細胞は、A F P、S P A R C 又
は トロンボモジュリン (T M) マーカー遺伝子のレベルよりも高いレベルで S O X 1 7 マ
ーカー遺伝子を発現するため、これらの遺伝子の発現もまたモニタリングされ得る。

40

50

【 0 2 1 9 】

胚体内胚葉の別のマーカーは、C X C R 4 遺伝子である。C X C R 4 遺伝子は、細胞表面ケモカイン受容体をコードし、そのリガンドは、化学誘引物質 S D F - 1 である。成体における C X C R 4 受容体保有細胞の主要な役割は、骨髄への造血細胞の遊走、リンパ球輸送並びに様々な B 細胞及びマクロファージ血液細胞系統の分化であると考えられる [Kim, C., and Broxmeyer, H.J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)]。C X C R 4 受容体はまた、T 細胞への H I V - 1 の進入のための共受容体として機能する [Feng, Y. 他, Science, 272, 872-877 (1996)]。[McGrath, K.E. 他, Dev. Biology 213, 442-456 (1999)] により実施される広範囲の一連の研究では、ケモカイン受容体 C X C R 4 及びその特有のリガンドである S D F - 1 [Kim, C., and Broxmeyer, H., J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)] の発現は、マウスにおいて初期発達及び成体期中に示された。発達における C X C R 4 / S D F 1 相互作用は、いずれかの遺伝子がトランスジェニックマウスで崩壊される [Nagasawa 他, Nature, 382, 635-638 (1996), Ma, Q. 他, Immunity, 10, 463-471 (1999)] 場合、それが後期胚致死性をもたらしたことが実証された際に明らかとなってきた。McGrath 他は、C X C R 4 は、R N アーゼ保護及び *i n s i t u* ハイブリッド形成方法論の組合せを使用して初期原腸形成胚 (E 7 . 5) 中に検出される最も豊富なケモカイン受容体メッセンジャー R N A であることを実証した。原腸形成胚では、C X C R 4 / S D F - 1 シグナル伝達は、原始線条胚葉細胞を遊走することに主に関与されるようであり、この時期に存在する胚体内胚葉、中胚葉及び胚体外中胚葉上で発現される。E 7 . 2 - 7 . 8 マウス胚では、C X C R 4 及び α - フェトプロテインは、相互排他的であり、臓側内胚葉における発現の欠如を示している [McGrath, K.E. 他, Dev. Biology 213, 442-456 (1999)]。

10

20

【 0 2 2 0 】

多能性細胞を分化させることにより産生される胚体内胚葉細胞は、C X C R 4 マーカー遺伝子を発現するため、胚体内胚葉細胞の産生を追跡するために、C X C R 4 の発現をモニタリングすることができる。さらに、本明細書中に記載する方法により産生される胚体内胚葉細胞は、S O X 1 7、M I X L 1、G A T A 4、H N F 3 b、G S C、F G F 1 7、V W F、C A L C R、F O X Q 1、C M K O R 1 及び C R I P 1 を包含する胚体内胚葉の他のマーカーを発現するが、これらに限定されない。胚体内胚葉細胞は、S O X 7 マーカー遺伝子のレベルよりも高いレベルで C X C R 4 マーカー遺伝子を発現するため、C X C R 4 及び S O X 7 の両方の発現がモニタリングされ得る。他のプロセスでは、C X C R 4 マーカー遺伝子及び O C T 4 マーカー遺伝子の両方の発現がモニタリングされる。さらに、胚体内胚葉細胞は、A F P、S P A R C 又はトロンプモジュリン (T M) マーカー遺伝子のレベルよりも高いレベルで C X C R 4 マーカー遺伝子を発現するため、これらの遺伝子の発現もまたモニタリングされ得る。

30

【 0 2 2 1 】

内胚葉細胞における C X C R 4 の発現は、S O X 1 7 の発現を妨げないことが理解されよう。したがって、本明細書中に記載するプロセスにより産生される胚体内胚葉細胞は、S O X 1 7 及び C X C R 4 を大いに発現するが、A F P、T M、S P A R C 又は P D X 1 を大いには発現しない。

40

【 0 2 2 2 】

胚体内胚葉の富化、単離及び / 又は精製

上述のプロセスのいずれかにより産生される胚体内胚葉細胞は、このような細胞に特異的である親和性タグを使用することにより、富化、単離及び / 又は精製することができる。胚体内胚葉細胞に特異的な親和性タグの例は、胚体内胚葉細胞の細胞表面上に存在するが、本明細書中に記載する方法により産生される細胞培養物中に見出されるであろう他の細胞型上に実質的に存在するマーカー分子 (例えば、ポリペプチド) に特異的である抗体、リガンド又は他の結合剤である。いくつかのプロセスでは、C X C R 4 に結合する抗体は、胚体内胚葉細胞の富化、単離又は精製用の親和性タグとして使用される。他のプロセスでは、ケモカイン S D F - 1 又は S D F - 1 に基づく他の分子もまた、親和性タグとし

50

て使用され得る。このような分子としては、S D F - 1 フラグメント、S D F - 1 融合体又はS D F - 1 擬似体が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 2 3 】

抗体を作製し、また細胞単離のためにそれらを使用する方法は当該技術分野で既知であり、このような方法は、本明細書中に記載する抗体及び胚体内胚葉細胞を用いた使用に実施することができる。一プロセスでは、C X C R 4 に結合する抗体を磁気ビーズへ結合させた後、細胞間接着及び基材接着を低減させるように酵素的に処理した細胞培養物において胚体内胚葉細胞へ結合させる。続いて、ビーズと結合された胚体内胚葉細胞と未結合細胞を分離するのに使用される可動性磁界へ細胞 / 抗体 / ビーズ複合体を暴露させる。いったん胚体内胚葉細胞が培養物において他の細胞と物理的に分離されると、抗体結合は崩壊されて、細胞は、適切な組織培養培地中で再度平板培養される。

10

【 0 2 2 4 】

富化、単離又は精製された胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団を得るためのさらなる方法もまた使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、C X C R 4 抗体を、細胞間接着及び基材接着を低減させるように処理した胚体内胚葉含有細胞培養物とともにインキュベートさせる。続いて、細胞を洗浄して、遠心分離して、再懸濁させる。次に、細胞懸濁液を、一次抗体に結合することが可能な二次抗体（例えば、F I T C 結合抗体）とともにインキュベートさせる。続いて、細胞を洗浄して、遠心分離して、緩衝液中に再懸濁させる。次に、蛍光活性化細胞選別器（F A C S）を使用して、細胞懸濁液を分析及び選別する。C X C R 4 陽性細胞を、C X C R 4 陰性細胞と分離して回収して、それによりこのような細胞型の単離をもたらす。望ましい場合、単離細胞組成物は、代替的な親和性ベースの方法を使用することにより、或いは胚体内胚葉に特異的な同じか、又は異なるマーカーを使用したさらなる一連の選別によりさらに精製することができる。

20

【 0 2 2 5 】

さらに他のプロセスでは、胚体内胚葉細胞は、C X C R 4 に結合するリガンド又は他の分子を使用して、富化、単離及び / 又は精製される。いくつかのプロセスでは、分子はS D F - 1 又はそれらのフラグメント、融合体又は擬似体である。

【 0 2 2 6 】

好ましいプロセスでは、胚体内胚葉細胞は、幹細胞培養物が胚体内胚葉系統へと分化するように誘導された後、他の非胚体内胚葉細胞から富化、単離及び / 又は精製される。上述の富化、単離及び精製手法は、分化の任意の段階でこのような培養物を用いて使用することができることが理解されよう。

30

【 0 2 2 7 】

直ぐ上で記載された手法に加えて、胚体内胚葉細胞は、細胞単離のための他の技法によっても単離され得る。さらに胚体内胚葉細胞は、胚体内胚葉細胞の選択的生存又は選択的拡大を促す増殖条件で連続継代培養する方法によっても、富化されるか又は単離され得る。

【 0 2 2 8 】

本明細書中に記載する方法を使用して、胚体内胚葉細胞及び / 又は組織の富化、単離及び / 又は精製された集団は、少なくともいくつかの分化を受けた多能性細胞培養物又は細胞集団（例えば、幹細胞培養物又は細胞集団）から *in vitro* で産生することができる。いくつかの方法では、細胞は、無作為な分化を受ける。しかしながら、好ましい方法では、細胞は、主として胚体内胚葉へ分化するように誘導される。いくつかの好ましい富化、単離及び / 又は精製方法は、ヒト胚性幹細胞からの胚体内胚葉の *in vitro* 産生に関する。本明細書中に記載する方法を使用して、細胞集団又は細胞培養物は、未処理の細胞集団又は細胞培養物と比較した場合、少なくとも約 2 ~ 約 1 0 0 0 倍、胚体内胚葉含有量が富化され得る。

40

【 0 2 2 9 】

P D X 1 陰性胚体内胚葉（胚体内胚葉）を含む組成物

上記の方法により産生される細胞組成物としては、胚体内胚葉を含む細胞培養物、並び

50

に胚体内胚葉に富んだ細胞集団が挙げられる。例えば、培養物中の細胞の少なくとも約 50 ~ 80 % が胚体内胚葉細胞である胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物が産生され得る。分化プロセスの効率は、或る特定のパラメーター、例えば細胞増殖条件、増殖因子濃度及び培養工程の時機（これらに限定されない）を修正することにより調整され得るため、本明細書中に記載される分化手法は、胚体内胚葉への多能性細胞の約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、又は約 95 % より多い転換を生じ得る。胚体内胚葉細胞の単離が用いられるプロセスでは、例えば C X C R 4 受容体と結合する親和性試薬を用いることにより、実質的に純粋な胚体内胚葉細胞集団が回収され得る。

10

【0230】

P D X 1 陰性前腸内胚葉の産生

胚体内胚葉細胞は、これらの細胞のさらなる分化により腭臓分化に向けて特殊化されて、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞を産生し得る。本明細書中に記載される分化プロセスのいくつかでは、胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物並びに富化又は精製された細胞集団は、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び / 又は富化細胞集団へのさらなる分化のために用いられ得る。

【0231】

典型的には、胚体内胚葉細胞は、S O X 1 7 陽性胚体内胚葉細胞の細胞培養物又は細胞集団中での T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減するか又は排除することにより、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態では、T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減すること又は排除することは、外因的に添加される T G F β スーパーファミリー増殖因子、例えばアクチビン A を胚体内胚葉の細胞培養物又は細胞集団から希釈するか又は除去することにより媒介される。他の実施形態では、T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達は、フォリスタチン及び / 又はノギンのような T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を遮断する化合物を胚体内胚葉細胞に供給することにより、低減されるか又は排除される。いくつかの実施形態では、T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達は、胚体内胚葉細胞へのヒト多能性細胞の分化後、約 1 日間、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日又は 10 日超の間、低減されるか又は排除され得る。

20

30

【0232】

いくつかの実施形態では、前腸内胚葉細胞への胚体内胚葉細胞の分化は、F G F ファミリー増殖因子及び / 又はヘッジホッグ経路阻害剤を胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団に供給することにより増強される。このような実施形態では、F G F ファミリー増殖因子及び / 又はヘッジホッグ経路阻害剤が、胚体内胚葉細胞培養物中での T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減し又は排除した後、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日又は 10 日超で供給される。好ましい実施形態では、F G F ファミリー増殖因子及び / 又はヘッジホッグ経路阻害剤は、胚体内胚葉細胞培養物中での T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達を低減し又は排除することとほぼ同時に供給される。

40

【0233】

好ましい実施形態において、胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団に対して供給される F G F ファミリーの増殖因子は、F G F 10 及び / 又は F G F 7 である。しかし、他の F G F ファミリーの増殖因子又は F G F ファミリーの増殖因子類似体若しくは模倣体が、F G F 10 及び / 又は F G F 7 の代わりに、又はそれらに加えて供給され得ることが理解されよう。例えば、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 5、F G F 6、F G F 7、F G F 8、F G F 9、F G F 10、F G F 11、F G F 12、F G F 13、F G F 14、F G F 15、F G F 16、F G F 17、F G F 18、F G F 19、F G F 20、F G F 21、F G F 22 及び / 又は F G F 23 から成る群から選択される F G F ファミリーの増殖因子が供給され得る。このような実施形態では、F G F ファミリーの増殖因子及び /

50

又は F G F ファミリーの増殖因子類似体若しくは模倣体が、少なくとも約 10 ng/ml、少なくとも約 25 ng/ml、少なくとも約 50 ng/ml、少なくとも約 75 ng/ml、少なくとも約 100 ng/ml、少なくとも約 200 ng/ml、少なくとも約 300 ng/ml、少なくとも約 400 ng/ml、少なくとも約 500 ng/ml、又は少なくとも約 1000 ng/ml の濃度で存在するように、細胞培養物の細胞に供給される。

【0234】

他の好ましい実施形態において、ヘッジホッグ阻害因子は K A A D - シクロパミンである。しかし、他のヘッジホッグ阻害因子を用いることができることが理解されよう。このような阻害因子としては、K K A D - シクロパミン類似体、ジェルビン、ジェルビン類似体、ヘッジホッグ経路阻害抗体及び当業者に既知のヘッジホッグ経路機能の任意の他の阻害因子が挙げられるが、これらに限定されない。単独で、又は F G F ファミリーの増殖因子と共に用いられる場合、ヘッジホッグ阻害因子は、少なくとも約 0.01 μ M、少なくとも約 0.02 μ M、少なくとも約 0.04 μ M、少なくとも約 0.08 μ M、少なくとも約 0.1 μ M、少なくとも約 0.2 μ M、少なくとも約 0.3 μ M、少なくとも約 0.4 μ M、少なくとも約 0.5 μ M、少なくとも約 0.6 μ M、少なくとも約 0.7 μ M、少なくとも約 0.8 μ M、少なくとも約 0.9 μ M、少なくとも約 1 μ M、少なくとも約 1.1 μ M、少なくとも約 1.2 μ M、少なくとも約 1.3 μ M、少なくとも約 1.4 μ M、少なくとも約 1.5 μ M、少なくとも約 1.6 μ M、少なくとも約 1.7 μ M、少なくとも約 1.8 μ M、少なくとも約 1.9 μ M、少なくとも約 2 μ M、少なくとも約 2.1 μ M、少なくとも約 2.2 μ M、少なくとも約 2.3 μ M、少なくとも約 2.4 μ M、少なくとも約 2.5 μ M、少なくとも約 2.6 μ M、少なくとも約 2.7 μ M、少なくとも約 2.8 μ M、少なくとも約 2.9 μ M、少なくとも約 3 μ M、少なくとも約 3.5 μ M、少なくとも約 4 μ M、少なくとも約 4.5 μ M、少なくとも約 5 μ M、少なくとも約 10 μ M、少なくとも約 20 μ M、少なくとも約 30 μ M、少なくとも約 40 μ M 又は少なくとも約 50 μ M の濃度で供給され得る。

【0235】

胚体内胚葉細胞からの P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の集団の産生のための好ましい一プロセスでは、T G F β スーパーファミリー増殖因子シグナル伝達は、胚体内胚葉へのヒト多能性細胞の大部分の分化後（例えば、以下の実施例に記載されるように 3 日、4 又は 5 日間の分化プロトコール後）、約 2 日間低減されるか又は排除される。ほぼ同時に、胚体内胚葉細胞の細胞培養物又は細胞集団に、50 ng/ml の F G F - 10 及び 0.2 μ M の K A A D - シクロパミンを供給する。

【0236】

P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞の培養物は、低血清又は無血清の培地中で分化及びさらに成長させることができる。血清濃度は、約 0.05% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞は、血清代替物を用いて増殖させる。例えば、或る特定の実施形態では、培地の血清濃度は、約 0.05% (v/v) 未満、約 0.1% (v/v) 未満、約 0.2% (v/v) 未満、約 0.3% (v/v) 未満、約 0.4% (v/v) 未満、約 0.5% (v/v) 未満、約 0.6% (v/v) 未満、約 0.7% (v/v) 未満、約 0.8% (v/v) 未満、約 0.9% (v/v) 未満、約 1% (v/v) 未満、約 2% (v/v) 未満、約 3% (v/v) 未満、約 4% (v/v) 未満、約 5% (v/v) 未満、約 6% (v/v) 未満、約 7% (v/v) 未満、約 8% (v/v) 未満、約 9% (v/v) 未満、約 10% (v/v) 未満、約 15% (v/v) 未満又は約 20% (v/v) 未満であり得る。本明細書中に記載された或る特定のプロセスでは、分化の培地は、血清、又は血清代替物又はインスリン若しくはインスリン様増殖因子を含む任意のサプリメントを含まない。

【0237】

或る特定のプロセスでは、P D X 1 陰性前腸内胚葉細胞は、B 2 7 の存在下で成長させる。このような分化プロセスでは、B 2 7 は、約 0.1% (v/v) ~ 約 20% (v/v)

）の範囲の濃度で、或いは約20%（v/v）を上回る濃度で、培養培地へ供給され得る。或る特定のプロセスでは、培地中のB27の濃度は、約0.1%（v/v）、約0.2%（v/v）、約0.3%（v/v）、約0.4%（v/v）、約0.5%（v/v）、約0.6%（v/v）、約0.7%（v/v）、約0.8%（v/v）、約0.9%（v/v）、約1%（v/v）、約2%（v/v）、約3%（v/v）、約4%（v/v）、約5%（v/v）、約6%（v/v）、約7%（v/v）、約8%（v/v）、約9%（v/v）、約10%（v/v）、約15%（v/v）又は約20%（v/v）である。或いは、添加するB27サプリメントの濃度は、市販のB27ストック溶液の濃度の倍数単位で調整され得る。例えば、B27は、50倍ストック溶液としてInvitrogen(Carlsbad, CA)から入手可能である。十分な容量の成長培地へこのストック溶液を十分量添加することにより、所望の量のB27を補充した培地が生じる。例えば、成長培地90mlへ50倍B27ストック溶液10mlを添加することにより、5倍B27を補充した成長培地が生じる。培地中のB27サプリメントの濃度は、約0.1倍、約0.2倍、約0.3倍、約0.4倍、約0.5倍、約0.6倍、約0.7倍、約0.8倍、約0.9倍、約1倍、約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍、約20倍及び約20倍以上であり得る。

10

20

30

40

【0238】

いくつかの実施形態では、レチノイド酸（RA）等のレチノイドを含む培地に細胞を接触させることによるか、又はさもなければ細胞に供給することにより、PDX1陰性前腸内胚葉細胞をPDX1陽性前腸内胚葉細胞へとさらに分化させ得る。いくつかの実施形態では、レチノイドは、レチノイドが少なくとも約1nM、少なくとも約0.01μM、少なくとも約0.02μM、少なくとも約0.04μM、少なくとも約0.08μM、少なくとも約0.1μM、少なくとも約0.2μM、少なくとも約0.3μM、少なくとも約0.4μM、少なくとも約0.5μM、少なくとも約0.6μM、少なくとも約0.7μM、少なくとも約0.8μM、少なくとも約0.9μM、少なくとも約1μM、少なくとも約1.1μM、少なくとも約1.2μM、少なくとも約1.3μM、少なくとも約1.4μM、少なくとも約1.5μM、少なくとも約1.6μM、少なくとも約1.7μM、少なくとも約1.8μM、少なくとも約1.9μM、少なくとも約2μM、少なくとも約2.1μM、少なくとも約2.2μM、少なくとも約2.3μM、少なくとも約2.4μM、少なくとも約2.5μM、少なくとも約2.6μM、少なくとも約2.7μM、少なくとも約2.8μM、少なくとも約2.9μM、少なくとも約3μM、少なくとも約3.5μM、少なくとも約4μM、少なくとも約4.5μM、少なくとも約5μM、少なくとも約10μM、少なくとも約20μM、少なくとも約30μM、少なくとも約40μM又は少なくとも約50μMの濃度で存在するように、細胞培養物の細胞へ供給される。このような実施形態では、レチノイドは、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日又は約10日超で細胞に供給され、その後胚体内胚葉細胞培養物でのTGFβスーパーファミリー増殖因子シグナル伝達が低減又は除かれる。好ましい実施形態では、約0.05μM RA～約2μM RAが、約2～3日、PDX1陰性前腸内胚葉細胞培養物に供給され、その後TGFβスーパーファミリー増殖因子シグナル伝達が低減又は除去される。

【0239】

本明細書中に記載される分化プロセスでは、上記の分化因子が細胞培養物から除去され、その後それを添加することができる。例えば、上記の分化因子は、それらの添加後、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日又は約10日以内に除去され得る。

【0240】

PDX1陰性前腸内胚葉へのPDX1陰性胚体内胚葉の分化のモニタリング

50

HNF 1 b 及び / 又は FOX A 1 の発現、並びに PD X 1 の発現の欠如は、Q - PCR 及び / 又は免疫細胞化学のような上記の方法を用いて検出され及び / 又は定量されて、PD X 1 陰性前腸内胚葉への PD X 1 陰性胚体内胚葉の分化をモニタリングする。上記のマーカのほかに、本発明のいくつかの実施形態では、SOX 1 7 の発現も確定される。

【0241】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載する方法により産生される PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞培養物は、SOX 7、AFP、SOX 1、ZIC 1 又は NFM マーカー遺伝子を発現する細胞を実質的に含まない。或る特定の実施形態では、本明細書中に記載するプロセスにより産生される PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞培養物は、臓側内胚葉、壁側内胚葉及び / 又は神経細胞を実質的に含まない。

10

【0242】

PD X 1 陰性前腸内胚葉を含む組成物

本発明のいくつかの実施形態は、PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団のような細胞組成物に関し、ここで PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞は、腸管の前部分に由来する細胞、組織又は器官へ分化することができる多分化能細胞である。或る特定の実施形態によれば、PD X 1 陰性前腸内胚葉は哺乳類細胞であり、好ましい実施形態では、そのような細胞はヒト細胞である。

【0243】

本明細書中に記載する他の実施形態は、hESC、PD X 1 陰性胚体内胚葉細胞、PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞及び中胚葉細胞から成る群から選択される 1 つ又は複数の細胞型の細胞を含む細胞培養物又は細胞集団のような組成物に関する。いくつかの実施形態では、hESC は、培養物において総細胞の約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満又は約 1 % 未満を構成する。他の実施形態では、PD X 1 陰性胚体内胚葉細胞は、培養物において総細胞の約 90 % 未満、約 85 % 未満、約 80 % 未満、約 75 % 未満、約 70 % 未満、約 65 % 未満、約 60 % 未満、約 55 % 未満、約 50 % 未満、約 45 % 未満、約 40 % 未満、約 35 % 未満、約 30 % 未満、約 25 % 未満、約 20 % 未満、約 15 % 未満、約 12 % 未満、約 10 % 未満、約 8 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満又は約 1 % 未満を構成する。さらなる他の実施形態では、中胚葉細胞は、培養物において総細胞の約 90 % 未満、約 85 % 未満、約 80 % 未満、約 75 % 未満、約 70 % 未満、約 65 % 未満、約 60 % 未満、約 55 % 未満、約 50 % 未満、約 45 % 未満、約 40 % 未満、約 35 % 未満、約 30 % 未満、約 25 % 未満、約 20 % 未満、約 15 % 未満、約 12 % 未満、約 10 % 未満、約 8 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満又は約 1 % 未満を構成する。

20

30

【0244】

本発明のさらなる実施形態は、主要細胞型として PD X 1 陰性前腸内胚葉を含む本明細書中に記載するプロセスにより産生される細胞培養物又は細胞集団のような組成物に関する。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載するプロセスは、少なくとも約 99 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 86 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 84 %、少なくとも約 83 %、少なくとも約 82 %、少なくとも約 81 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 79 %、少なくとも約 78 %、少なくとも約 77 %、少なくとも約 76 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 74 %、少なくとも約 73 %、少なくとも約 72 %、少なくとも約 71 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 69 %、少なくとも約 68 %、少なくとも約 67 %、少なくとも約 66 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 64 %、少なくとも約 63 %、少なくとも約 62 %、少なくとも約 61 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 59 %、少なくとも約 58 %、少なくとも約 57 %、少なくとも約 56 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 54 %、少なくとも約 53 %、少なくとも約 52 %、少なくとも約 51 % 又は少なくとも約 50 % の PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び / 又は細胞集

40

50

団を産生する。好ましい実施形態では、この細胞培養物又は細胞集団の細胞は、ヒト細胞から成る。他の実施形態では、本明細書中に記載するプロセスは、少なくとも約 50 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 24 %、少なくとも約 23 %、少なくとも約 22 %、少なくとも約 21 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 19 %、少なくとも約 18 %、少なくとも約 17 %、少なくとも約 16 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 14 %、少なくとも約 13 %、少なくとも約 12 %、少なくとも約 11 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 9 %、少なくとも約 8 %、少なくとも約 7 %、少なくとも約 6 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 4 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 2 % 又は少なくとも約 1 % の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び / 又は細胞集団を産生する。好ましい実施形態では、この細胞培養物又は細胞集団の細胞は、ヒト細胞から成る。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団中の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞のパーセントは、培養物中に存在するフィーダー細胞を考慮せずに算出される。

10

20

30

40

50

【0245】

本発明のさらに他の実施形態は、PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞及び PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞の混合物を含む細胞培養物又は細胞集団のような組成物に関する。例えば、約 95 の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 5 の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が産生され得る。他の実施形態では、約 5 の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 95 の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が産生され得る。さらに、PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して他の比率の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団も意図される。例えば、約 1,000,000 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 100,000 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 10,000 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1,000 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 500 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 100 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 10 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 5 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 4 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 2 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 2 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 4 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 5 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 10 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 20 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 50 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 100 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1,000 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 10,000 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞、1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 100,000 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞及び約 1 個の PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1,000,000 個の PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む組成物が意図される。

【0246】

本発明のいくつかの実施形態では、PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞が産生される PDX 1 陰性胚体内胚葉細胞は、ヒト多能性幹細胞のようなヒト多能性細胞に由来する。或る特定

の実施形態では、ヒト多能性細胞は、桑実胚、胚の内部細胞塊又は胚の生殖腺隆起に由来する。或る特定の他の実施形態では、ヒト多能性細胞は、胚期を過ぎて発達した多細胞構造の生殖腺組織又は胚組織に由来する。

【0247】

本発明のさらなる実施形態は、ヒト PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を包含するヒト細胞を含む細胞培養物又は細胞集団のような組成物に関し、ここで SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 マーカーの発現は、少なくとも約 2 % のヒト細胞において、AFP、SOX 7、SOX 1、ZIC 1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも多い。他の実施形態では、SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 マーカーの発現は、少なくとも約 5 % のヒト細胞において、少なくとも約 10 % のヒト細胞において、少なくとも約 15 % のヒト細胞において、少なくとも約 20 % のヒト細胞において、少なくとも約 25 % のヒト細胞において、少なくとも約 30 % のヒト細胞において、少なくとも約 35 % のヒト細胞において、少なくとも約 40 % のヒト細胞において、少なくとも約 45 % のヒト細胞において、少なくとも約 50 % のヒト細胞において、少なくとも約 55 % のヒト細胞において、少なくとも約 60 % のヒト細胞において、少なくとも約 65 % のヒト細胞において、少なくとも約 70 % のヒト細胞において、少なくとも約 75 % のヒト細胞のヒト細胞において、少なくとも約 80 % のヒト細胞において、少なくとも約 85 % のヒト細胞において、少なくとも約 90 % のヒト細胞において、少なくとも約 95 % のヒト細胞において、或いは少なくとも約 98 % のヒト細胞において、AFP、SOX 7、SOX 1、ZIC 1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも多い。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団中のヒト細胞のパーセント（ここで、SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 マーカーの発現は、AFP、SOX 7、SOX 1、ZIC 1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも多い）は、フィーダー細胞を考慮せずに算出される。

10

20

【0248】

本発明のいくつかの実施形態は、ヒト PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団のような組成物に関し、ここで SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、少なくとも約 2 % ~ 少なくとも約 98 % を上回るヒト細胞において、PDX 1 マーカーの発現よりも多いことが理解されよう。いくつかの実施形態では、SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、少なくとも約 5 % のヒト細胞において、少なくとも約 10 % のヒト細胞において、少なくとも約 15 % のヒト細胞において、少なくとも約 20 % のヒト細胞において、少なくとも約 25 % のヒト細胞において、少なくとも約 30 % のヒト細胞において、少なくとも約 35 % のヒト細胞において、少なくとも約 40 % のヒト細胞において、少なくとも約 45 % のヒト細胞において、少なくとも約 50 % のヒト細胞において、少なくとも約 55 % のヒト細胞において、少なくとも約 60 % のヒト細胞において、少なくとも約 65 % のヒト細胞において、少なくとも約 70 % のヒト細胞において、少なくとも約 75 % のヒト細胞のヒト細胞において、少なくとも約 80 % のヒト細胞において、少なくとも約 85 % のヒト細胞において、少なくとも約 90 % のヒト細胞において、少なくとも約 95 % のヒト細胞において、或いは少なくとも約 98 % のヒト細胞において、PDX 1 マーカーの発現よりも多い。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団中のヒト細胞のパーセント（ここで、SOX 17、HNF 1b 及び / 又は FOXA 1 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、PDX 1 マーカーの発現よりも多い）は、フィーダー細胞を考慮せずに算出される。

30

40

【0249】

本明細書中に記載されるプロセスを用いて、他の細胞型を実質的に含有しない PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞を含む組成物が産生され得る。細胞培養物中又は細胞集団中の細胞に関して、「~を実質的に含有しない」という用語は、その細胞培養物又は細胞集団が含有しない特定の細胞型が、細胞培養物又は細胞集団中に存在する細胞の総数の約 5 % 未満の量で存在するということを意味する。本発明のいくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される PDX 1 陰性前腸内胚葉細胞集団又は細胞培養物は、AF

50

P、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカー遺伝子を有意に発現する細胞を実質的に含有しない。

【0250】

本発明の一実施形態では、マーカー遺伝子の発現に基づくPDX1陰性前腸内胚葉細胞の記述は、SOX17高、HNF1b高、FOXA1高、PDX1低、AFP低、SOX7低、SOX1低、ZIC1低且つNFM低である。

【0251】

PDX1陰性胚体内胚葉からの直接的なPDX1陽性前腸内胚葉の産生

本明細書中に記載されるPDX1陽性前腸内胚葉細胞を含むPDX1陽性前腸内胚葉細胞培養物及び細胞集団は、上記のような多能性細胞から生じるPDX1陰性胚体内胚葉細胞から産生される。好ましい方法は、出発物質としてヒト胚性幹細胞を利用する。一実施形態では、hESCは先ずPDX1陰性胚体内胚葉細胞に転換され、これは次に、PDX1陽性前腸内胚葉細胞に転換される。しかしながら、PDX1陽性前腸内胚葉の産生のための出発物質は、多能性細胞分化方法を用いて産生される胚体内胚葉細胞に限定されないと理解されたい。むしろ、任意のPDX1陰性胚体内胚葉細胞が、それらの起源と関係なく、本明細書中に記載される方法に用いられ得る。

【0252】

本発明のいくつかの実施形態では、PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び/又は富化細胞集団へのさらなる分化のために用いられ得る。例えばヒトPDX1陰性、SOX17陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団は、前の分化工程（即ち、多能性細胞を胚体内胚葉細胞に分化する工程）から残存している分化因子、例えばアクチビン、ノダル及び/又はBMPも含む。他の実施形態では、前の分化工程で利用された因子を細胞培養物又は細胞集団から除去した後、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞の分化のために用いられる因子を添加する。他の実施形態では、PDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞に関して富化される細胞集団は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞の産生のための供給源として用いられる。

【0253】

培養中のPDX1陰性胚体内胚葉細胞は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞への細胞の分化を促進する分化因子（前腸分化因子）をPDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物に供給することにより、PDX1陽性内胚葉細胞に分化される。本発明のいくつかの実施形態では、前腸分化因子は、レチノイド、例えばレチノイン酸（RA）である。いくつかの実施形態では、レチノイドは線維芽細胞増殖因子、例えばFGF-4又はFGF-10と一緒に用いられる。他の実施形態では、レチノイドは、増殖因子のTGFβスーパーファミリーの成員及び/又は馴化培地と一緒に用いられる。

【0254】

「馴化培地」とは、基本培地と比較して変更される培地を意味する。例えば培地の状態調節は、栄養素及び/又は増殖因子のような分子を、基本培地中の元のレベルから増やすか又は減じる。いくつかの実施形態では、一定期間、或る特定の条件下で或る型の細胞を増殖させるか又は保持させることにより、培地は状態調節される。例えば培地は、限定数の時間、限定温度で、限定組成物の培地中にhESCを拡張させ、分化させ又は保持させることにより状態調節され得る。当業者に理解されるように、細胞、培地型、持続時間及び環境条件の多数の組合せを用いて、ほぼ無限大数の馴化培地を生成し得る。本発明のいくつかの実施形態では、約1%～約20%の血清濃度を含む培地中で分化多能性細胞を増殖させるか又は保持させることにより、培地は状態調節される。他の実施形態では、約1ng/ml～約1000ng/mlのアクチビンAを含む培地中で分化多能性細胞を増殖させるか又は保持させることにより、培地は状態調節される。さらに他の実施形態では、約1ng/ml～約1000ng/mlのBMP4を含む培地中で分化多能性細胞を増殖させるか又は保持させることにより、培地は状態調節される。好ましい実施形態では、約

10

20

30

40

50

25 ng/ml のアクチビン A 及び約 2 μ M の RA を含む RPMI のような培地中で 24 時間、分化 hESC を増殖させるか又は保持させることにより、馴化培地は調製される。

【0255】

本発明のいくつかの実施形態では、PDX1 陽性前腸内胚葉への PDX1 陰性胚体内胚葉の分化を増強するために用いられる培地を状態調節するために用いられる細胞は、約 0% ~ 約 20% の血清及び / 又は TGF β スーパーファミリーの 1 つ又は複数の増殖 / 分化因子を含む RPMI のような培地中で約 5 日間に亘って、hESC のような多能性細胞から分化される細胞である。分化因子、例えばアクチビン A 及び BMP4 は、約 1 ng/ml ~ 約 1000 ng/ml の濃度で供給される。本発明の或る特定の実施形態では、培地を状態調節するために用いられる細胞は、低血清 RPMI 中で約 5 日間に亘って、hESC から分化される。いくつかの実施形態によれば、低血清 RPMI とは、低血清含有培地を指し、この場合、血清濃度は限定期間に亘って漸次増大される。例えば一実施形態では、低血清 RPMI は、細胞増殖の第 1 日目に約 0.2% のウシ胎児血清 (FBS)、細胞増殖の第 2 日目に約 0.5% FBS、そして細胞増殖の第 5 日目に約 2% FBS を含む。別の実施形態では、低血清 RPMI は、1 日目に約 0%、2 日目に約 0.2%、3 ~ 6 日目に約 2% の濃度を含む。或る特定の好ましい実施形態では、低血清 RPMI は、1 つ又は複数の分化因子、例えばアクチビン A 及び BMP4 を供給される。培地を状態調節するために用いられる細胞を調製するに際しての使用のほかに、低血清 RPMI は、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞からの PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の分化のための培地として用いられ得る。

10

20

【0256】

馴化培地は RPMI 以外の培地から調製され得るが、但し、このような培地は PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の増殖又は保持を妨げないと当業者に理解される。培地を状態調節するために用いられる細胞は種々の型のものであり得るということも理解される。新たに分化された細胞が培地を状態調節するために用いられる実施形態では、このような細胞は RPMI 以外の培地中で分化され得るが、但し、培地はこのような細胞の増殖又は保持を阻害しない。さらに、本明細書中に報告される作用を達成するためには他の時間で十分であるので、状態調節期間も状態調節のために用いられる細胞の調製期間も、それぞれ 24 時間又は 5 日である必要はないと当業者は理解する。

【0257】

概して、線維芽細胞増殖因子の TGF β スーパーファミリーの成員、馴化培地、又は任意のこれらの前腸分化因子の組合せと組合せたレチノイドの使用は、レチノイド単独より大きな、PDX1 陽性前腸内胚葉への PDX1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を引き起こす。好ましい実施形態では、RA 及び FGF-10 はともに、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞培養物に供給される。別の好ましい実施形態では、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞は、馴化培地、アクチビン A、アクチビン B 及び RA を含む培養中で分化される。

30

【0258】

本明細書中に記載される分化プロセスの実施形態のうちのいくつかに関して、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞への PDX1 陰性胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度で上記の前腸分化因子が細胞培養物又は細胞集団中に存在するよう、これらの因子は細胞に供給される。細胞培養物及び / 又は細胞集団に関して用いられる場合、「一部」という用語は、単一細胞から細胞培養物又は細胞集団の全体までの範囲で、任意のゼロ以外の量の細胞培養物又は細胞集団を意味する。

40

【0259】

本発明のいくつかの実施形態において、レチノイドは、少なくとも約 0.01 μ M、少なくとも約 0.02 μ M、少なくとも約 0.04 μ M、少なくとも約 0.08 μ M、少なくとも約 0.1 μ M、少なくとも約 0.2 μ M、少なくとも約 0.3 μ M、少なくとも約 0.4 μ M、少なくとも約 0.5 μ M、少なくとも約 0.6 μ M、少なくとも約 0.7 μ M、少なくとも約 0.8 μ M、少なくとも約 0.9 μ M、少なくとも約 1 μ M、少なくとも約 1.1 μ M、少なくとも約 1.2 μ M、少なくとも約 1.3 μ M、少なくとも約 1

50

・ 4 μ M、少なくとも約 1.5 μ M、少なくとも約 1.6 μ M、少なくとも約 1.7 μ M、少なくとも約 1.8 μ M、少なくとも約 1.9 μ M、少なくとも約 2 μ M、少なくとも約 2.1 μ M、少なくとも約 2.2 μ M、少なくとも約 2.3 μ M、少なくとも約 2.4 μ M、少なくとも約 2.5 μ M、少なくとも約 2.6 μ M、少なくとも約 2.7 μ M、少なくとも約 2.8 μ M、少なくとも約 2.9 μ M、少なくとも約 3 μ M、少なくとも約 3.5 μ M、少なくとも約 4 μ M、少なくとも約 4.5 μ M、少なくとも約 5 μ M、少なくとも約 10 μ M、少なくとも約 20 μ M、少なくとも約 30 μ M、少なくとも約 40 μ M 又は少なくとも約 50 μ M の濃度で存在するように細胞培養物の細胞に供給される。本明細書で用いられるように、「レチノイド」は、レチノール、レチナール又はレチノイン酸、及び任意のこれらの化合物の誘導体を表す。好ましい実施形態では、レチノイドはレチノイン酸である。

10

【0260】

本発明の他の実施形態では、線維芽細胞増殖因子ファミリーの 1 つ又は複数の分化因子は、細胞培養物中に存在する。例えばいくつかの実施形態では、FGF-4 は、少なくとも約 10 ng/ml、少なくとも約 25 ng/ml、少なくとも約 50 ng/ml、少なくとも約 75 ng/ml、少なくとも約 100 ng/ml、少なくとも約 200 ng/ml、少なくとも約 300 ng/ml、少なくとも約 400 ng/ml、少なくとも約 500 ng/ml、又は少なくとも約 1000 ng/ml の濃度で細胞培養物中に存在し得る。本発明のさらなる実施形態では、FGF-10 は、少なくとも約 10 ng/ml、少なくとも約 25 ng/ml、少なくとも約 50 ng/ml、少なくとも約 75 ng/ml、少なくとも約 100 ng/ml、少なくとも約 200 ng/ml、少なくとも約 300 ng/ml、少なくとも約 400 ng/ml、少なくとも約 500 ng/ml、又は少なくとも約 1000 ng/ml の濃度で細胞培養物中に存在し得る。いくつかの実施形態では、FGF-4 又は FGF-10 のいずれか（しかし両方ではない）は、RA と一緒に細胞培養物に供給される。好ましい実施形態では、RA は 1 μ M の濃度で細胞培養物中に存在し、そして FGF-10 は 50 ng/ml の濃度で存在する。

20

【0261】

本発明のいくつかの実施形態では、TGF β スーパーファミリーの増殖因子及び/又は馴化培地が細胞培養物中に存在する。これらの分化因子は、RA 及び/又はその他に中-前腸分化因子、例えば FGF-4 及び FGF-10（これらに限定されない）と組合せて用いられ得る。例えばいくつかの実施形態では、アクチビン A 及び/又はアクチビン B は、少なくとも約 5 ng/ml、少なくとも約 10 ng/ml、少なくとも約 25 ng/ml、少なくとも約 50 ng/ml、少なくとも約 75 ng/ml、少なくとも約 100 ng/ml、少なくとも約 200 ng/ml、少なくとも約 300 ng/ml、少なくとも約 400 ng/ml、少なくとも約 500 ng/ml、又は少なくとも約 1000 ng/ml の濃度で細胞培養物中に存在し得る。本発明のさらなる実施形態では、馴化培地は、全培地の少なくとも約 1%、少なくとも約 5%、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% の濃度で細胞培養物中に存在する。いくつかの実施形態では、アクチビン A、アクチビン B 及び馴化培地が RA とともに細胞培地に供給される。好ましい実施形態では、PD $\times$ 1 陰性胚体内胚葉細胞は、約 1 μ M の RA、約 25 ng/ml のアクチビン A 並びに分化 hESC により約 24 時間状態調節された低血清 RPMI 培地を含む培養中で PD $\times$ 1 陽性前腸内胚葉細胞に分化されるが、この場合、分化 hESC は約 100 ng/ml のアクチビン A を含む低血清 RPMI 中で約 5 日間分化されている。別の好ましい実施形態では、アクチビン B 及び/又は FGF-10 はさらにまた、それぞれ 25 ng/ml 及び 50 ng/ml で培養中に存在する。

30

40

【0262】

本発明の或る特定の実施形態では、上記の前腸分化因子は、それらの添加後、細胞培養物から除去される。例えば前腸分化因子は、それらの添加後、約 1 日、約 2 日、約 3 日、

50

約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日又は約 10 日以内に除去され得る。

【0263】

PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の培養は、低減された血清を含有する培地中で増殖され得る。血清濃度は、約 0.05% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は、血清代替品で増殖される。例えば、或る特定の実施形態では、培地の血清濃度は、約 0.05% (v/v) 未満、約 0.1% (v/v) 未満、約 0.2% (v/v) 未満、約 0.3% (v/v) 未満、約 0.4% (v/v) 未満、約 0.5% (v/v) 未満、約 0.6% (v/v) 未満、約 0.7% (v/v) 未満、約 0.8% (v/v) 未満、約 0.9% (v/v) 未満、約 1% (v/v) 未満、約 2% (v/v) 未満、約 3% (v/v) 未満、約 4% (v/v) 未満、約 5% (v/v) 未満、約 6% (v/v) 未満、約 7% (v/v) 未満、約 8% (v/v) 未満、約 9% (v/v) 未満、約 10% (v/v) 未満、約 15% (v/v) 未満又は約 20% (v/v) 未満であり得る。いくつかの実施形態では、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は血清を用いずに増殖される。他の実施形態では、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は血清代替品で増殖される。

10

【0264】

さらなる他の実施形態では、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は B27 の存在下で増殖される。このような実施形態では、B27 は、約 0.1% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲の濃度で、又は約 20% (v/v) より大きい濃度で、培地に供給され得る。或る特定の実施形態では、培地中の B27 の濃度は、約 0.1% (v/v)、約 0.2% (v/v)、約 0.3% (v/v)、約 0.4% (v/v)、約 0.5% (v/v)、約 0.6% (v/v)、約 0.7% (v/v)、約 0.8% (v/v)、約 0.9% (v/v)、約 1% (v/v)、約 2% (v/v)、約 3% (v/v)、約 4% (v/v)、約 5% (v/v)、約 6% (v/v)、約 7% (v/v)、約 8% (v/v)、約 9% (v/v)、約 10% (v/v)、約 15% (v/v) 又は約 20% (v/v) である。代替的には、添加する B27 サプリメントの濃度を、市販の B27 ストック溶液の濃度の位数単位で調整することができる。例えば、B27 は 50 倍ストック溶液として Invitrogen (Carlsbad, CA) で市販されている。このストック溶液を十分量、十分量の成長培地に添加することで、所望量の B27 を添加した培地が作られる。例えば、50 倍 B27 ストック溶液 10 ml を成長培地 90 ml に加えることで、5 倍 B27 を添加した成長培地が作られる。培地中の B27 サプリメントの濃度は、約 0.1 倍、約 0.2 倍、約 0.3 倍、約 0.4 倍、約 0.5 倍、約 0.6 倍、約 0.7 倍、約 0.8 倍、約 0.9 倍、約 1 倍、約 1.1 倍、約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10 倍、約 11 倍、約 12 倍、約 13 倍、約 14 倍、約 15 倍、約 16 倍、約 17 倍、約 18 倍、約 19 倍、約 20 倍及び約 20 倍超であり得る。

20

30

【0265】

PDX1 陰性胚体内胚葉からの背側 PDX1 陽性前腸内胚葉の産生

本明細書中に記載される背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞培養物及び細胞集団は、上記のような多能性細胞から生じる PDX1 陰性胚体内胚葉から産生される。さらに、上記のように、好ましい方法は出発材料としてヒト胚性幹細胞を利用する。一実施形態では、hESC はまず PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に転換され、これは次に、背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞に転換される。しかしながら、背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の産生のための出発材料は、多能性細胞分化方法を用いて産生される胚体内胚葉細胞に限定されないと理解される。むしろ、任意の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞は、それらの起源にかかわらず、本明細書中に記載される方法に用いられ得る。

40

【0266】

PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の混合集団の産生に関連して記載される場合、本発明のい

50

くつかの実施形態では、PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団は、背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び/又は富化細胞集団へのさらなる分化のために用いられ得る。例えばヒトPDX1陰性、SOX17陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団は、前の分化工程（即ち、多能性細胞を胚体内胚葉細胞に分化する工程）から残存している分化因子、例えばアクチビン、ノダル及び/又はBMPも含み得る。他の実施形態では、前の分化工程で利用された因子を細胞培養物又は細胞集団から除去した後、背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞の分化のために用いられる因子を添加する。他の実施形態では、PDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞に関して富化される細胞集団は、背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞の産生のための供給源として用いられる。

10

【0267】

培養物中のPDX1陰性胚体内胚葉細胞は、PDX1陰性、SOX17-陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物にレチノイド、例えばレチノイン酸(RA)を供給することにより、背側PDX1陽性内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態では、レチノイドは、増殖因子のTGFβスーパーファミリーの一成員及び/又はConnaught Medical Research Labs培地(CMR L培地)(Invitrogen, Carlsbad, CA)と一緒に用いられる。

【0268】

本明細書中に記載される分化プロセスの実施形態のいくつかに関して、背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度でこれらの因子が細胞培養物又は細胞集団中に存在するよう、RA又は上記の分化因子の組合せが細胞に供給される。細胞培養物及び/又は細胞集団に関して用いられる場合、「一部」という用語は、単一細胞から細胞培養物又は細胞集団の全体までの範囲で、任意のゼロ以外の量の細胞培養物又は細胞集団を意味する。好ましい実施形態において、「一部」という用語は、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%、少なくとも20%、少なくとも21%、少なくとも22%、少なくとも23%、少なくとも24%、少なくとも25%、少なくとも26%、少なくとも27%、少なくとも28%、少なくとも29%、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%又は少なくとも75%の細胞培養物又は細胞集団を意味する。

20

30

40

【0269】

本発明のいくつかの実施形態において、レチノイドは、少なくとも約0.01µM、少なくとも約0.02µM、少なくとも約0.04µM、少なくとも約0.08µM、少なくとも約0.1µM、少なくとも約0.2µM、少なくとも約0.3µM、少なくとも約0.4µM、少なくとも約0.5µM、少なくとも約0.6µM、少なくとも約0.7µM、少なくとも約0.8µM、少なくとも約0.9µM、少なくとも約1µM、少なくとも約1.1µM、少なくとも約1.2µM、少なくとも約1.3µM、少なくとも約1.4µM、少なくとも約1.5µM、少なくとも約1.6µM、少なくとも約1.7µM、少なくとも約1.8µM、少なくとも約1.9µM、少なくとも約2µM、少なくとも約

50

2 . 1 μ M、少なくとも約 2 . 2 μ M、少なくとも約 2 . 3 μ M、少なくとも約 2 . 4 μ M、少なくとも約 2 . 5 μ M、少なくとも約 2 . 6 μ M、少なくとも約 2 . 7 μ M、少なくとも約 2 . 8 μ M、少なくとも約 2 . 9 μ M、少なくとも約 3 μ M、少なくとも約 3 . 5 μ M、少なくとも約 4 μ M、少なくとも約 4 . 5 μ M、少なくとも約 5 μ M、少なくとも約 1 0 μ M、少なくとも約 2 0 μ M、少なくとも約 3 0 μ M、少なくとも約 4 0 μ M又は少なくとも約 5 0 μ Mの濃度で存在するように細胞培養物の細胞に供給される。

【 0 2 7 0 】

本発明の好ましい実施形態では、背側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の一集団は、外因性 F G F - 1 0 又は他の F G F ファミリー増殖因子の非存在下でレチノイン酸を供給することにより産生される。このような実施形態では、R A は約 2 μ M の濃度で供給される。好ましい実施形態では、R A は C M R L 培地中に約 2 μ M の濃度で供給される。

10

【 0 2 7 1 】

いくつかの実施形態では、アクチビン A 及び / 又はアクチビン B は、R A とともに細胞培養物に供給される。例えばいくつかの実施形態では、R A は約 2 μ M の濃度で細胞培養物に供給され、そしてアクチビン A 及び / 又はアクチビン B は、少なくとも約 5 n g / m l、少なくとも約 1 0 n g / m l、少なくとも約 2 5 n g / m l、少なくとも約 5 0 n g / m l、少なくとも約 7 5 n g / m l、少なくとも約 1 0 0 n g / m l、少なくとも約 2 0 0 n g / m l、少なくとも約 3 0 0 n g / m l、少なくとも約 4 0 0 n g / m l、少なくとも約 5 0 0 n g / m l、又は少なくとも約 1 0 0 0 n g / m l の濃度で細胞培養物に供給される。

20

【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態では、分化因子及び / 又は C R M L 培地は、h E S C からの分化の開始後、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 1 0 日、或いは約 1 0 日超で、P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給される。好ましい実施形態では、分化因子及び / 又は C R M L 培地は、h E S C からの分化の開始後約 5 日目に P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞に供給される。

【 0 2 7 3 】

本発明の或る特定の実施形態では、上記の分化因子は、それらの添加後に細胞培養物から除去される。例えば上記の分化因子は、それらの添加後、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日又は約 1 0 日以内に除去され得る。

30

【 0 2 7 4 】

背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の培養物は、低減された血清を含有する培地中で増殖され得る。血清濃度は、約 0 . 0 5 % (v / v) ~ 約 2 0 % (v / v) の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、血清代替品で増殖される。例えば、或る特定の実施形態では、培地の血清濃度は、約 0 . 0 5 % (v / v) 未満、約 0 . 1 % (v / v) 未満、約 0 . 2 % (v / v) 未満、約 0 . 3 % (v / v) 未満、約 0 . 4 % (v / v) 未満、約 0 . 5 % (v / v) 未満、約 0 . 6 % (v / v) 未満、約 0 . 7 % (v / v) 未満、約 0 . 8 % (v / v) 未満、約 0 . 9 % (v / v) 未満、約 1 % (v / v) 未満、約 2 % (v / v) 未満、約 3 % (v / v) 未満、約 4 % (v / v) 未満、約 5 % (v / v) 未満、約 6 % (v / v) 未満、約 7 % (v / v) 未満、約 8 % (v / v) 未満、約 9 % (v / v) 未満、約 1 0 % (v / v) 未満、約 1 5 % (v / v) 未満又は約 2 0 % (v / v) 未満であり得る。いくつかの実施形態では、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は血清を用いずに増殖される。他の実施形態では、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は血清代替品で増殖される。

40

【 0 2 7 5 】

さらなる他の実施形態では、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は B 2 7 の存在下で増殖される。このような実施形態では、B 2 7 は、約 0 . 1 % (v / v) ~ 約 2 0 % (v / v) の範囲の濃度で、又は約 2 0 % (v / v) より大きい濃度で、培地に供給され得る。或る特定の実施形態において、培地中の B 2 7 の濃度は、約 0 . 1 % (v / v)、約 0 . 2 % (v / v)、約 0 . 3 % (v / v)、約 0 . 4 % (v / v)、約 0 . 5 % (v / v)、

50

約 0.6% (v/v)、約 0.7% (v/v)、約 0.8% (v/v)、約 0.9% (v/v)、約 1% (v/v)、約 2% (v/v)、約 3% (v/v)、約 4% (v/v)、約 5% (v/v)、約 6% (v/v)、約 7% (v/v)、約 8% (v/v)、約 9% (v/v)、約 10% (v/v)、約 15% (v/v) 又は約 20% (v/v) である。代替的には、添加する B27 サプリメントの濃度を、市販の B27 ストック溶液の濃度の倍数単位で調整することができる。例えば、B27 は 50 × ストック溶液として Invitrogen (Carlsbad, CA) で市販されている。このストック溶液を十分量、十分量の成長培地に添加することで、所望量の B27 を添加した培地が作られる。例えば、50 × B27 ストック溶液 10 ml を成長培地 90 ml に加えることで、5 倍 B27 を補充した成長培地が作られる。培地中の B27 サプリメントの濃度は、約 0.1 倍、約 0.2 倍、約 0.3 倍、約 0.4 倍、約 0.5 倍、約 0.6 倍、約 0.7 倍、約 0.8 倍、約 0.9 倍、約 1 倍、約 1.1 倍、約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10 倍、約 11 倍、約 12 倍、約 13 倍、約 14 倍、約 15 倍、約 16 倍、約 17 倍、約 18 倍、約 19 倍、約 20 倍及び約 20 倍超であり得る。

10

【0276】

PDX1 陰性胚体内胚葉からの腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉の産生

本明細書中に記載される腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞培養物及び細胞集団は、上記のような多能性細胞から生じる PDX1 陰性胚体内胚葉から産生される。さらに、上記のように、好ましい方法は出発材料としてヒト胚性幹細胞を利用する。一実施形態では、hESC は先ず PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に転換され、これは次に、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞に転換される。しかしながら、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の産生のための出発材料は、多能性細胞分化方法を用いて産生される胚体内胚葉細胞に限定されないと理解される。むしろ、任意の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞は、それらの起源にかかわらず、本明細書中に記載される方法に用いられ得る。

20

【0277】

PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の混合集団の産生に関連して記載される場合、本発明のいくつかの実施形態では、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団は、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び / 又は富化細胞集団へのさらなる分化のために用いられ得る。例えばヒト PDX1 陰性、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団は、前の分化工程（即ち、多能性細胞を胚体内胚葉細胞に分化する工程）から残存している分化因子、例えばアクチビン、ノダル及び / 又は BMP も含み得る。他の実施形態では、前の分化工程で利用された因子を細胞培養物又は細胞集団から除去した後、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞への PDX1 陰性、SOX17 - 陽性胚体内胚葉細胞の分化のために用いられる因子を添加する。他の実施形態では、PDX1 陰性、SOX17 - 陽性胚体内胚葉細胞に関して富化される細胞集団は、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の産生のための供給源として用いられる。

30

40

【0278】

培養物中の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞は、PDX1 陰性、SOX17 - 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物に FGF ファミリー増殖因子或いは FGF ファミリー増殖因子類似体又は模倣物を供給することにより、腹側 PDX1 陽性内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態では、FGF ファミリー増殖因子或いは FGF ファミリー増殖因子類似体又は模倣物は、ヘッジホッグ阻害剤及び / 又は Connaught Medical Research Labs 培地（CRM L 培地）（Invitrogen, Carlsbad, CA）と一緒に用いられる。特に好ましい実施形態では、FGF - 10 及び / 又は KAAD - シクロパミンは、RA 又は他のレチノイドの非存在下で PDX1 陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物に供給される。或る特定の実施形態では、BMP4 は、RA 又は他のレチノイドの非存在下で FGF - 10 及び / 又は K

50

A A D - シクロパミン中に含まれ得る。F G F ファミリー増殖因子類似体又は模倣物及び / 又はヘッジホッグ阻害剤の添加後約 1 日 ~ 約 10 日後、レチノイド、例えば R A、又はレチノイド含有サプリメント、例えば B 2 7 が供給されて、P D X 1 の発現を誘導する。好ましい実施形態では、R A は、F G F ファミリー増殖因子類似体又は模倣物及び / 又はヘッジホッグ阻害剤の添加後約 2 日、約 3 日、約 4 日又は約 5 日目に供給される。他の実施形態では、B 2 7 は、F G F ファミリー増殖因子類似体又は模倣物及び / 又はヘッジホッグ阻害剤を供給するのとほぼ同時に供給される。

【0279】

本明細書中に記載される分化プロセスの実施形態のいくつかに関して、腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞への P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団の少なくとも一部の分化を促進するのに十分な濃度でこれらの因子が細胞培養物又は細胞集団中に存在するよう、レチノイド並びに上記の分化因子の組合せが細胞に供給される。細胞培養物及び / 又は細胞集団に関して用いられる場合、「一部」という用語は、単一細胞から細胞培養物又は細胞集団の全体までの範囲で、任意のゼロ以外の量の細胞培養物又は細胞集団を意味する。好ましい実施形態において、「一部」という用語は、少なくとも 5 %、少なくとも 6 %、少なくとも 7 %、少なくとも 8 %、少なくとも 9 %、少なくとも 10 %、少なくとも 11 %、少なくとも 12 %、少なくとも 13 %、少なくとも 14 %、少なくとも 15 %、少なくとも 16 %、少なくとも 17 %、少なくとも 18 %、少なくとも 19 %、少なくとも 20 %、少なくとも 21 %、少なくとも 22 %、少なくとも 23 %、少なくとも 24 %、少なくとも 25 %、少なくとも 26 %、少なくとも 27 %、少なくとも 28 %、少なくとも 29 %、少なくとも 30 %、少なくとも 31 %、少なくとも 32 %、少なくとも 33 %、少なくとも 34 %、少なくとも 35 %、少なくとも 36 %、少なくとも 37 %、少なくとも 38 %、少なくとも 39 %、少なくとも 40 %、少なくとも 41 %、少なくとも 42 %、少なくとも 43 %、少なくとも 44 %、少なくとも 45 %、少なくとも 46 %、少なくとも 47 %、少なくとも 48 %、少なくとも 49 %、少なくとも 50 %、少なくとも 51 %、少なくとも 52 %、少なくとも 53 %、少なくとも 54 %、少なくとも 55 %、少なくとも 56 %、少なくとも 57 %、少なくとも 58 %、少なくとも 59 %、少なくとも 60 %、少なくとも 61 %、少なくとも 62 %、少なくとも 63 %、少なくとも 64 %、少なくとも 65 %、少なくとも 66 %、少なくとも 67 %、少なくとも 68 %、少なくとも 69 %、少なくとも 70 %、少なくとも 71 %、少なくとも 72 %、少なくとも 73 %、少なくとも 74 % 又は少なくとも 75 % の細胞培養物又は細胞集団を意味する。

【0280】

本発明のいくつかの実施形態では、F G F ファミリー増殖因子或いは F G F ファミリー増殖因子類似体又は模倣物は、少なくとも約 10 ng / ml、少なくとも約 25 ng / ml、少なくとも約 50 ng / ml、少なくとも約 75 ng / ml、少なくとも約 100 ng / ml、少なくとも約 200 ng / ml、少なくとも約 300 ng / ml、少なくとも約 400 ng / ml、少なくとも約 500 ng / ml、又は少なくとも約 1000 ng / ml の濃度で存在するよう、細胞培養物の細胞に供給される。他の実施形態では、単独で、又は F G F - 10 と共に用いられる場合、K A A D - シクロパミンは、少なくとも約 0.01 μ M、少なくとも約 0.02 μ M、少なくとも約 0.04 μ M、少なくとも約 0.08 μ M、少なくとも約 0.1 μ M、少なくとも約 0.2 μ M、少なくとも約 0.3 μ M、少なくとも約 0.4 μ M、少なくとも約 0.5 μ M、少なくとも約 0.6 μ M、少なくとも約 0.7 μ M、少なくとも約 0.8 μ M、少なくとも約 0.9 μ M、少なくとも約 1 μ M、少なくとも約 1.1 μ M、少なくとも約 1.2 μ M、少なくとも約 1.3 μ M、少なくとも約 1.4 μ M、少なくとも約 1.5 μ M、少なくとも約 1.6 μ M、少なくとも約 1.7 μ M、少なくとも約 1.8 μ M、少なくとも約 1.9 μ M、少なくとも約 2 μ M、少なくとも約 2.1 μ M、少なくとも約 2.2 μ M、少なくとも約 2.3 μ M、少なくとも約 2.4 μ M、少なくとも約 2.5 μ M、少なくとも約 2.6 μ M、少なくとも約 2.7 μ M、少なくとも約 2.8 μ M、少なくとも約 2.9 μ M、少なくとも約 3 μ M、少なくとも約 3.5 μ M、少なくとも約 4 μ M、少なくとも約 4.5 μ M、少なくとも

約 $5 \mu\text{M}$ 、少なくとも約 $10 \mu\text{M}$ 、少なくとも約 $20 \mu\text{M}$ 、少なくとも約 $30 \mu\text{M}$ 、少なくとも約 $40 \mu\text{M}$ 又は少なくとも約 $50 \mu\text{M}$ の濃度で供給され得る。

【0281】

本発明の好ましい実施形態では、腹側偏向 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の一集団は、RA の非存在下で CML 培地中の 50 ng/ml の FGF-10 及び $0.5 \mu\text{M}$ の KAAD-シクロパミンを PDX1 陰性胚体内胚葉の一集団に供給することにより産生される。FGF-10 及び KAAD-シクロパミンの添加後約 2 日目に、 $2 \mu\text{M}$ の RA が添加されて、PDX1 陽性細胞への細胞の分化を完了する。

【0282】

いくつかの実施形態では、分化因子及び / 又は CML 培地は、hESC からの分化の開始後、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日、或いは約 10 日超で、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に供給される。好ましい実施形態では、分化因子及び / 又は CML 培地は、hESC からの分化の開始後約 3 日目に PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に供給される。

10

【0283】

本発明の或る特定の実施形態では、上記の分化因子は、それらの添加後に細胞培養物から除去される。例えば上記の分化因子は、それらの添加後、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日又は約 10 日以内に除去され得る。

【0284】

腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の培養物は、低減された血清を含有する培地中で増殖され得る。血清濃度は、約 0.05% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は、血清代替品で増殖される。例えば、或る特定の実施形態では、培地の血清濃度は、約 0.05% (v/v) 未満、約 0.1% (v/v) 未満、約 0.2% (v/v) 未満、約 0.3% (v/v) 未満、約 0.4% (v/v) 未満、約 0.5% (v/v) 未満、約 0.6% (v/v) 未満、約 0.7% (v/v) 未満、約 0.8% (v/v) 未満、約 0.9% (v/v) 未満、約 1% (v/v) 未満、約 2% (v/v) 未満、約 3% (v/v) 未満、約 4% (v/v) 未満、約 5% (v/v) 未満、約 6% (v/v) 未満、約 7% (v/v) 未満、約 8% (v/v) 未満、約 9% (v/v) 未満、約 10% (v/v) 未満、約 15% (v/v) 未満又は約 20% (v/v) 未満であり得る。いくつかの実施形態では、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は血清を用いずに増殖される。他の実施形態では、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は血清代替品で増殖される。

20

30

【0285】

さらなる他の実施形態では、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞は B27 の存在下で増殖される。このような実施形態では、B27 は、約 0.1% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲の濃度で、又は約 20% (v/v) より大きい濃度で、培地に供給され得る。或る特定の実施形態において、培地中の B27 の濃度は、約 0.1% (v/v)、約 0.2% (v/v)、約 0.3% (v/v)、約 0.4% (v/v)、約 0.5% (v/v)、約 0.6% (v/v)、約 0.7% (v/v)、約 0.8% (v/v)、約 0.9% (v/v)、約 1% (v/v)、約 2% (v/v)、約 3% (v/v)、約 4% (v/v)、約 5% (v/v)、約 6% (v/v)、約 7% (v/v)、約 8% (v/v)、約 9% (v/v)、約 10% (v/v)、約 15% (v/v) 又は約 20% (v/v) である。代替的には、添加する B27 サプリメントの濃度を、市販の B27 ストック溶液の濃度の倍数単位で調整することができる。例えば、B27 は 50 倍ストック溶液として Invitrogen (Carlsbad, CA) で市販されている。このストック溶液を十分量、十分量の成長培地に添加することで、所望量の B27 を添加した培地が作られる。例えば、50 倍 B27 ストック溶液 10 ml を成長培地 90 ml に加えることで、5 倍 B27 を添加した成長培地が作られる。培地中の B27 サプリメントの濃度は、約 0.1 倍、約 0.2 倍、約 0.3 倍、約 0.4 倍、約 0.5 倍、約 0.6 倍、約 0.7 倍、約 0.8 倍、約 0.9 倍、約 1 倍、約 1.1 倍、約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7

40

50

倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10 倍、約 11 倍、約 12 倍、約 13 倍、約 14 倍、約 15 倍、約 16 倍、約 17 倍、約 18 倍、約 19 倍、約 20 倍及び約 20 倍超であり得る。B27 が供給されるいくつかの実施形態では、PD X 1 陰性細胞の腹側 PD X 1 陽性前腸内胚葉への分化を達成するために、レチノイドが供給されない。

【0286】

PD X 1 陽性前腸内胚葉への PD X 1 陰性胚体内胚葉の分化のモニタリング

多能性細胞からの胚体内胚葉細胞の分化に関するのと同様に、PD X 1 陰性、SO X 1 7 陽性胚体内胚葉から PD X 1 陽性前腸内胚葉細胞への分化の進行は、これらの細胞型に特徴的なマーカーの発現を確定することによりモニタリングされ得る。このようなモニタリングは、種々の条件下での、例えば 1 つ又は複数の分化因子濃度及び環境条件下での所望量の PD X 1 陽性前腸内胚葉の産生のために十分である時間の量を確定させ得る。好ましい実施形態では、所望量の PD X 1 陽性前腸内胚葉の産生のために十分である時間の量は、PD X 1 の発現を検出することにより確定される。本発明のいくつかの実施形態では、或る特定のマーカーの発現は、マーカーの存在又は非存在を検出することにより確定される。代替的には、或る特定のマーカーの発現は、マーカーが細胞培養物又は細胞集団の細胞中に存在するレベルを測定することにより確定され得る。このような実施形態では、マーカー発現の測定は、定性的又は定量的であり得る。上記のように、マーカー遺伝子により産生される発現マーカーを定量する好ましい方法は、Q - PCR の使用による。特定の 10 20 20 実施形態では、Q - PCR は、PD X 1 陽性前腸内胚葉に特徴的なマーカー遺伝子の発現を、並びに他の細胞型に特徴的なマーカー遺伝子の発現の欠如を定量することにより、PD X 1 陽性前腸内胚葉細胞への PD X 1 陰性、SO X 1 7 陽性胚体内胚葉培養の細胞の進行をモニタリングするために用いられる。当該技術分野で既知である他の方法も、マーカー遺伝子発現を定量するために用いられ得る。例えばマーカー遺伝子産物の発現は、対象となる当該マーカー遺伝子産物に特異的な抗体を用いることにより検出され得る。本発明のいくつかの実施形態では、PD X 1 陽性前腸内胚葉に特徴的なマーカー遺伝子の発現並びに PD X 1 陰性胚体内胚葉、hESC 及び他の細胞型に特徴的なマーカー遺伝子の有意の発現の欠如が確定される。

【0287】

以下の実施例でさらに記載されるように、PD X 1 は、PD X 1 陽性前腸内胚葉と関連するマーカー遺伝子である。このようなものとして、本発明のいくつかの実施形態では、PD X 1 の発現が確定される。他の実施形態では、PD X 1 陽性前腸内胚葉中で発現される他のマーカー、例えば SO X 1 7、HO X A 1 3 及び / 又は HO X C 6 (これらに限定されない) の発現も確定される。PD X 1 は或る特定の他の細胞型 (即ち内蔵内胚葉及び或る特定の神経外胚葉) によっても発現され得るため、本発明のいくつかの実施形態は、内蔵内胚葉及び / 又は神経外胚葉に関連したマーカー遺伝子発現の非存在又は実質的非存在を実証することに関する。例えばいくつかの実施形態では、内蔵内胚葉及び / 又は神経細胞中で発現されるマーカー、例えば SO X 7、AFP、SO X 1、ZIC 1 及び / 又は NF M (これらに限定されない) の発現が確定される。

【0288】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される PD X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、SO X 7、AFP、SO X 1、ZIC 1 又は NF M マーカー遺伝子を発現する細胞を実質的に含有しない。或る特定の実施形態では、本明細書中に記載されるプロセスにより産生される PD X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、内蔵内胚葉、壁側内胚葉及び / 又は神経細胞を実質的に含有しない。

【0289】

背側 PD X 1 陽性前腸内胚葉への PD X 1 陰性胚体内胚葉の分化のモニタリング

以下の実施例中の表 3 及び / 又は表 4 に記載される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、背側 PD X 1 陽性内胚葉への PD X 1 陰性胚体内胚葉の分化をモニタリングするために、上記の方法、例えば Q - PCR 及び / 又は免疫細胞化学を用いて検出及び / 又は定量され

10

20

30

40

50

得る。背側偏向及び腹側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の両方に関連したマーカーは、表 3 に記載されている。これらのマーカーのうち、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択されるマーカーは、細胞表面マーカーである。背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉の産生をモニタリングするための表 3 に列挙されるいくつかの好ましいマーカーは、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される。背側偏向前腸内胚葉に関連したマーカーは、表 4 に記載されている。表 4 マーカーの各々は、他の P D X 1 陽性細胞と比較して、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞中で選択的に、特異的に又は独自の発現される。これらのマーカーのうち、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択されるマーカーは、細胞表面マーカーである。背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉の産生をモニタリングするための表 4 に列挙されるいくつかの好ましいマーカーは、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される。

【 0 2 9 0 】

上記のマーカーのほかに、本発明のいくつかの実施形態では、P D X 1 陽性前腸内胚葉中で発現される他のマーカー、例えば S O X 1 7、H O X A 1 3 及び / 又は H O X C 6 (これらに限定されない) の発現も確定される。P D X 1 は或る特定の他の細胞型 (即ち内蔵内胚葉及び或る特定の神経外胚葉) によっても発現され得るため、本発明のいくつかの実施形態は、内蔵内胚葉及び / 又は神経外胚葉に関連したマーカー遺伝子発現の非存在又は実質的非存在を実証することに関する。例えばいくつかの実施形態では、内蔵内胚葉及び / 又は神経細胞中で発現されるマーカー、例えば S O X 7、A F P、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M (これらに限定されない) の発現が確定される。

【 0 2 9 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、S O X 7、A F P、S O X 1、Z I C 1 又は N F M マーカー遺伝子を発現する細胞を実質的に含有しない。或る特定の実施形態では、本明細書中に記載されるプロセスにより産生される背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、内蔵内胚葉、壁側内胚葉及び / 又は神経細胞を実質的に含有しない。

【 0 2 9 2 】

腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉への P D X 1 陰性胚体内胚葉の分化のモニタリング

前節に記載されたように、背側偏向及び腹側偏向 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞に関連したマーカーは、表 3 に記載されている。このようなものとして、表 3 に記載されるマーカーのうちの 1 つ又は複数の発現は、上記の方法、例えば Q - P C R 及び / 又は免疫細胞化学を用いて検出及び / 又は定量されて、腹側 P D X 1 陽性内胚葉への P D X 1 陰性胚体内胚葉の分化をモニタリングし得る。表 3 に記載されるマーカーのうち、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2 及び S L C 2 7 A 2 から成る群から選択されるマーカーは、細胞表面マーカーである。腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉の産生をモニタリングするための表 3 に列挙されるいくつかの好ましいマーカーは、S E R P I N F 2、D U S P 9、C D H 6 及び S O X 9 から成る群から選択される。さらに、表 4 に記載されるマーカーは、背側偏向前腸内胚葉中で選択的に、特異的に又は独自の発現されるため、これらのマーカーのうちの 1 つ又は複数の、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉中での発現と比較した場合の、発現の欠如又は発現低減を検出することは、腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉への P D X 1 陰性胚体内胚葉の分化をモニタリングするために有用でもある。表 4 マーカーのうち、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択されるマーカーは、細胞表面マーカーである。背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉の産生をモニタリングするための表 4 に列挙されるいくつかの好ましいマーカーは、H O X A 1、P D E 1 1 A、F A M 4 9 A 及び W N T 5 A から成る群から選択される。このよう

なものとして、表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーを発現する P D X 1 陽性細胞中のこれらのマーカーの非存在又は微量の発現は、腹側 P D X 1 陽性ということを示す。

【 0 2 9 3 】

上記のマーカーのほかに、本発明のいくつかの実施形態では、P D X 1 陽性前腸内胚葉中で発現される他のマーカー、例えば S O X 1 7、H O X A 1 3 及び / 又は H O X C 6 (これらに限定されない) の発現も確定される。P D X 1 は或る特定の他の細胞型 (即ち内蔵内胚葉及び或る特定の神経外胚葉) によっても発現され得るため、本発明のいくつかの実施形態は、内蔵内胚葉及び / 又は神経外胚葉に関連したマーカー遺伝子発現の非存在又は実質的非存在を実証することに関する。例えばいくつかの実施形態では、内蔵内胚葉及び / 又は神経細胞中で発現されるマーカー、例えば S O X 7、A F P、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M (これらに限定されない) の発現が確定される。

10

【 0 2 9 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、S O X 7、A F P、S O X 1、Z I C 1 又は N F M マーカー遺伝子を発現する細胞を実質的に含有しない。或る特定の実施形態では、本明細書中に記載されるプロセスにより産生される腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物は、内蔵内胚葉、壁側内胚葉及び / 又は神経細胞を実質的に含有しない。

【 0 2 9 5 】

背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉の富化、単離及び / 又は精製

上記のプロセスのいずれかにより産生される P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞、例えば背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、このような細胞に特異的である親和性タグを用いることにより、富化され、単離され、及び / 又は精製され得る。背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞に特異的な親和性タグの例は、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の細胞表面に存在するが、本明細書中に記載される方法により産生される細胞培養物に見出される他の細胞型上には実質的に存在しないマーカー分子 (例えばポリペプチド) に特異的な抗体、リガンド又は他の結合作因である。いくつかのプロセスでは、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択される細胞表面マーカーと結合する抗体が、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の富化、単離又は精製のための親和性タグとして用いられる。

20

30

【 0 2 9 6 】

抗体を製造するための、且つ細胞単離のためにそれらを用いるための方法は当該技術分野で既知であり、このような方法は、本明細書中に記載される抗体並びに背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を伴う私用のために実行され得る。一プロセスでは、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から選択されるマーカーと結合する抗体は、磁気ビーズに付着されて、次に細胞間及び基質接着を低減するよう酵素的に処理された細胞培養物中の背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞と結合させられる。細胞 / 抗体 / ビーズ複合体は次に、非結合細胞からビーズ結合胚体内胚葉細胞を分離するために用いられる可動性磁場に曝露される。背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が培養中の他の細胞から一旦物理的に分離されると、抗体結合は崩壊され、そして細胞は適切な組織培養培地中に再び平板培養される。

40

【 0 2 9 7 】

富化、単離又は精製された背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞培養物又は集団を得るための付加的方法も用いられ得る。例えばいくつかの実施形態では、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G

50

A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択されるマーカーと結合する抗体は、細胞間及び基質接着を低減するよう処理された背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉含有細胞培養物とともにインキュベートされる。次に細胞は洗浄され、遠心分離され、そして再懸濁される。細胞懸濁液は次に、一次抗体と結合し得る二次抗体、例えば F I T C 接合抗体とともにインキュベートされる。次に細胞は、洗浄され、遠心分離され、そして緩衝液中に再懸濁される。次に細胞懸濁液は分析され、蛍光活性化細胞選別器 (F A C S) を用いて選別される。マーカー陽性細胞はマーカー陰性細胞から分離回収され、それによりこのような細胞型の単離を生じる。所望により、単離細胞組成物は、代替的親和性ベースの方法を用いることにより、或いは背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞に特異的である同一の又は異なるマーカーを用いる付加的回数の選別により、さらに精製され得る。

【 0 2 9 8 】

さらなる他のプロセスでは、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、C D H 6、G A B R A 2、G R I A 3、I L 6 R、K C N J 2、L G A L S 3、L G A L S 3 / G A L I G、S E R P I N F 2、S L C 2 7 A 2、A D O R A 2 A、C D 4 7、E P B 4 1 L 1、M A G、S F R P 5、S L C 1 6 A 1 0、S L C 1 6 A 2、S L C 1 A 3、S L C 3 0 A 4、S L I C K、S L I T R K 4 及び X P R 1 から成る群から選択されるマーカーと結合するリガンド又は他の分子を用いて、富化され、単離され、及び / 又は精製される。

【 0 2 9 9 】

好ましいプロセスでは、P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞培養物が背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉系統に向けて分化するよう誘導された後、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は他の細胞から富化され、単離され、及び / 又は精製される。上記の富化、単離及び精製手法は分化の任意の段階でこのような培養とともに用いられ得ると理解される。

【 0 3 0 0 】

直ぐ上に記載された手法のほかに、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、細胞単離のための他の技法によっても単離され得る。付加的には、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の選択的生存又は選択的拡張を促進する増殖条件での連続継代培養の方法によっても、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は富化されるか又は単離され得る。

【 0 3 0 1 】

本明細書中に記載される方法を用いて、少なくともいくつかの分化を経ている P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団から、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞又は組織の富化、単離及び / 又は精製集団が *i n v i t r o* で産生され得る。いくつかの方法では、細胞は無作為分化を受ける。しかしながら好ましい方法では、細胞は主に、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞に分化するよう指図される。いくつかの好ましい富化、単離及び / 又は精製方法は、ヒト P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞からの背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の *i n v i t r o* 産生に関する。本明細書中に記載される方法を用いて、細胞集団又は細胞培養物は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 2 ~ 約 1 0 0 0 倍、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉含量を富化され得る。いくつかの実施形態では、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 5 ~ 約 5 0 倍富化され得る。他の実施形態では、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 1 0 ~ 約 2 0 0 倍富化され得る。さらに他の実施形態では、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集

団又は細胞培養物と比較して少なくとも約40～約80倍富化され得る。或る特定の実施形態では、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約2～約20倍富化され得る。

【0302】

背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉の富化、単離及び／又は精製

本発明の付加的態様に関して、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞は、富化され、単離され、及び／又は精製され得る。本発明のいくつかの実施形態では、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞に関して富化される細胞集団は、細胞培養物からこのような細胞を単離することにより産生される。

【0303】

本発明のいくつかの実施形態では、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞は蛍光標識され、次に蛍光活性化細胞選別器(FACS)を用いることにより非標識細胞から単離される。このような実施形態では、蛍光タンパク質(GFP)をコードする核酸、又は発現可能な蛍光マーカー遺伝子、例えばルシフェラーゼをコードする遺伝子をコードする別の核酸は、PD_X1陽性細胞を標識するために用いられる。例えばいくつかの実施形態では、GFP遺伝子産物又はその生物学的活性断片の発現がこのようなプロモーターの制御下にあるよう、GFPをコードする核酸又はその生物学的活性断片の少なくとも1つのコピーが、表3又は表4から選択される遺伝子のプロモーターの下流で、多能性細胞、好ましくはヒト胚性幹細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、表3又は表4から選択されるマーカーをコードする核酸の全コード領域が、GFPをコードする核酸又はその生物学的活性断片により置換される。他の実施形態では、GFPをコードする核酸又はその生物学的活性断片は、表3又は表4から選択されるマーカーをコードする核酸の少なくとも一部とフレーム内で融合され、それにより融合タンパク質を生成する。このような実施形態では、融合タンパク質はGFPと類似の蛍光活性を保有する。

【0304】

蛍光的にしるしを付けられた細胞、例えば上記の多能性細胞は、上記のように、胚体内胚葉に、そして次に背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞に分化される。背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞は蛍光マーカー遺伝子を発現するが、一方、PD_X1陰性細胞はそうではないため、これら2つの細胞型は分離され得る。いくつかの実施形態では、蛍光標識背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞及び非標識PD_X1陰性細胞の混合物を含む細胞懸濁液は、FACSを用いて選別される。背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞は、PD_X1陰性細胞から別々に回収され、それによりこのような細胞型の単離を生じる。所望により、単離細胞組成物は、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞に特異的である同一の又は異なるマーカーを用いる付加的回数選別により、さらに精製され得る。

【0305】

上記の富化、単離及び精製手法は分化の任意の段階でこのような培養とともに用いられ得ると理解される。

【0306】

本明細書中に記載される方法を用いて、少なくともいくつかの分化を経ているPD_X1陰性、SO_X17陽性胚体内胚葉細胞培養物又は細胞集団から、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞又は組織の富化、単離及び／又は精製集団が*in vitro*で産生され得る。いくつかの実施形態では、細胞は無作為分化を受ける。しかしながら好ましい実施形態では、細胞は主に、背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞に分化するよう指図される。いくつかの好ましい富化、単離及び／又は精製方法は、ヒト胚性幹細胞からの背側及び／又は腹側PD_X1陽性前腸内胚葉細胞の*in vitro*産生に関する。

【0307】

本明細書中に記載される方法を用いて、細胞集団又は細胞培養物は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約2～約1000倍、背側及び／又は腹側PD_X1陽

10

20

30

40

50

性前腸内胚葉細胞含量を富化され得る。いくつかの実施形態では、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 5 ～ 約 5 0 0 倍富化され得る。他の実施形態では、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 1 0 ～ 約 2 0 0 倍富化され得る。さらに他の実施形態では、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 2 0 ～ 約 1 0 0 倍富化され得る。さらに他の実施形態では、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 4 0 ～ 約 8 0 倍富化され得る。或る特定の実施形態では、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は、非処理細胞集団又は細胞培養物と比較して少なくとも約 2 ～ 約 2 0 倍富化され得る。

10

【 0 3 0 8 】

背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉を含む組成物

本発明のいくつかの実施形態は、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞が背側芽及び／又は腹側芽のような腸管の前部分に由来する細胞、組織又は器官に分化し得る複能性細胞である細胞組成物に関する。或る特定の実施形態によれば、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞は哺乳類の細胞であり、好ましい実施形態では、このような細胞はヒト細胞である。

【 0 3 0 9 】

本発明の他の実施形態は、h E S C、P D X 1 陰性胚体内胚葉細胞、背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞及び中胚葉細胞から成る群から選択される 1 つ又は複数の細胞型の細胞から成る組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団に関する。いくつかの実施形態では、h E S C は、培養物中で全細胞の約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、又は約 1 % 未満含まれる。他の実施形態では、P D X 1 陰性確定的内胚葉細胞は、培養物中で全細胞の約 9 0 % 未満、約 8 5 % 未満、約 8 0 % 未満、約 7 5 % 未満、約 7 0 % 未満、約 6 5 % 未満、約 6 0 % 未満、約 5 5 % 未満、約 5 0 % 未満、約 4 5 % 未満、約 4 0 % 未満、約 3 5 % 未満、約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 2 % 未満、約 1 0 % 未満、約 8 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、又は約 1 % 未満含まれる。さらに別の実施形態では、中胚葉細胞は、培養物中で全細胞の約 9 0 % 未満、約 8 5 % 未満、約 8 0 % 未満、約 7 5 % 未満、約 7 0 % 未満、約 6 5 % 未満、約 6 0 % 未満、約 5 5 % 未満、約 5 0 % 未満、約 4 5 % 未満、約 4 0 % 未満、約 3 5 % 未満、約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 2 % 未満、約 1 0 % 未満、約 8 % 未満、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、又は約 1 % 未満含まれる。

20

30

【 0 3 1 0 】

本発明の付加的实施形態は、多数派細胞型として背側及び／又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む本明細書中に記載されるプロセスにより産生される組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団に関する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプロセスは、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 4 %、少なくとも約 8 3 %、少なくとも約 8 2 %、少なくとも約 8 1 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 7 9 %、少なくとも約 7 8 %、少なくとも約 7 7 %、少なくとも約 7 6 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 4 %、少なくとも約 7 3 %、少なくとも約 7 2 %、少なくとも約 7 1 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 6 9 %、少なくとも約 6 8 %、少なくとも約 6 7 %、少なくとも約 6 6 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 4 %、少なくとも約 6 3 %、少なくとも約 6 2 %、少なくとも約 6 1 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 5 9 %、少なくとも約 5 8 %、少なくとも約 5 7 %、少なくとも約 5 6 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 5 4 %、少なくとも約 5 3 %、少なくとも約 5 2

40

50

%、少なくとも約 51%、又は少なくとも約 50%の背側及び／又は腹側の PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び／又は細胞集団を産生する。好ましい実施形態では、この細胞培養物又は細胞集団の細胞は、ヒト細胞を含む。他の実施形態では、本明細書で記載されるプロセスは、少なくとも約 50%、少なくとも約 45%、少なくとも約 40%、少なくとも約 35%、少なくとも約 30%、少なくとも約 25%、少なくとも約 24%、少なくとも約 23%、少なくとも約 22%、少なくとも約 21%、少なくとも約 20%、少なくとも約 19%、少なくとも約 18%、少なくとも約 17%、少なくとも約 16%、少なくとも約 15%、少なくとも約 14%、少なくとも約 13%、少なくとも約 12%、少なくとも約 11%、少なくとも約 10%、少なくとも約 9%、少なくとも約 8%、少なくとも約 7%、少なくとも約 6%、少なくとも約 5%、少なくとも約 4%、少なくとも約 3%、少なくとも約 2%、又は少なくとも約 1%の背側及び／又は腹側の PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物及び／又は細胞集団を産生する。好ましい実施形態では、この細胞培養物又は細胞集団の細胞は、ヒト細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養物又は細胞集団中の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞のパーセンテージは、培養物中に残存するフィーダー細胞と関係なく算定される。

10

20

30

40

50

【0311】

本発明のさらに他の実施形態は、背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞及び PDX1 陰性胚体内胚葉細胞の混合物を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団に関する。例えば約 95 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 5 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が産生され得る。他の実施形態では、約 5 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 95 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が産生され得る。さらに、PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して他の比率の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が意図される。例えば約 1,000,000 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 100,000 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 10,000 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1,000 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 100 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 10 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 5 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 4 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 2 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 2 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の多能性細胞に対して少なくとも約 4 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の多能性細胞に対して少なくとも約 5 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 10 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 20 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 50 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 100 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1000 個の背側及び／又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞

に対して少なくとも約 10,000 個の背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 100,000 個の背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞、約 1 個の PDX1 陰性胚体内胚葉細胞に対して少なくとも約 1,000,000 個の背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物が意図される。

【0312】

本発明のいくつかの実施形態では、背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞が産生される PDX1 陰性胚体内胚葉細胞は、ヒト多能性細胞、例えばヒト多能性幹細胞に由来する。或る特定の実施形態では、ヒト多能性細胞は、桑実胚、胚の内部細胞塊又は胚の生殖腺隆起に由来する。或る特定の他の実施形態では、ヒト多能性細胞は、胚段階後に発生した多細胞構造の生殖腺組織又は胚組織に由来する。

10

【0313】

本発明のさらなる実施形態は、ヒト細胞、例えばヒト背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、PDX1 マーカーの発現がヒト細胞の少なくとも約 2% において AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも大きい組成物に関する。他の実施形態では、PDX1 マーカーの発現は、ヒト細胞の少なくとも約 5% で、ヒト細胞の少なくとも約 10% で、ヒト細胞の少なくとも約 15% で、ヒト細胞の少なくとも約 20% で、ヒト細胞の少なくとも約 25% で、ヒト細胞の少なくとも約 30% で、ヒト細胞の少なくとも約 35% で、ヒト細胞の少なくとも約 40% で、ヒト細胞の少なくとも約 45% で、ヒト細胞の少なくとも約 50% で、ヒト細胞の少なくとも約 55% で、ヒト細胞の少なくとも約 60% で、ヒト細胞の少なくとも約 65% で、ヒト細胞の少なくとも約 70% で、ヒト細胞の少なくとも約 75% で、ヒト細胞の少なくとも約 80% で、ヒト細胞の少なくとも約 85% で、ヒト細胞の少なくとも約 90% で、ヒト細胞の少なくとも約 95% で、又はヒト細胞の少なくとも約 98% で、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも大きい。いくつかの実施形態では、PDX1 の発現が AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現よりも大きい細胞培養物又は集団中のヒト細胞のパーセンテージは、フィーダー細胞を考慮せずに算定される。

20

【0314】

本発明のいくつかの実施形態は、ヒト背側及び / 又は腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、SOX17、HOXA13 及び HOXC6 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現がヒト細胞の少なくとも約 2% ~ 少なくとも約 98% より多くで AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現より大きい組成物に理解される。いくつかの実施形態では、SOX17、HOXA13 及び HOXC6 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、少なくとも約 5% のヒト細胞では、少なくとも約 10% のヒト細胞では、少なくとも約 15% のヒト細胞では、少なくとも約 20% のヒト細胞では、少なくとも約 25% のヒト細胞では、少なくとも約 30% のヒト細胞では、少なくとも約 35% のヒト細胞では、少なくとも約 40% のヒト細胞では、少なくとも約 45% のヒト細胞では、少なくとも約 50% のヒト細胞では、少なくとも約 55% のヒト細胞では、少なくとも約 60% のヒト細胞では、少なくとも約 65% のヒト細胞では、少なくとも約 70% のヒト細胞では、少なくとも約 75% のヒト細胞では、少なくとも約 80% のヒト細胞では、少なくとも約 85% のヒト細胞では、少なくとも約 90% のヒト細胞では、少なくとも約 95% のヒト細胞では、又は少なくとも約 98% のヒト細胞では、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現より大きい。いくつかの実施形態では、SOX17、HOXA13 及び HOXC6 から成る群から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現が AFP、SOX7、SOX1、ZIC1 及び / 又は NFM マーカーの発現より大きい細胞培養物又は細胞集団中のヒト細胞のパーセンテージは、フィーダー細胞を考慮せずに算定される。

30

40

【0315】

50

本発明の他の実施形態は、ヒト細胞、例えばヒト背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現がヒト細胞の少なくとも約 2 % において A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい組成物に関する。他の実施形態では、表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、ヒト細胞の少なくとも約 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 5 % で、又はヒト細胞の少なくとも約 9 8 % で、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい。いくつかの実施形態では、表 3 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現が A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい細胞培養物又は細胞集団中のヒト細胞のパーセンテージは、フィーダー細胞を考慮せずに算定される。

10

【0316】

本発明の他の実施形態は、ヒト細胞、例えばヒト背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、表 4 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現がヒト細胞の少なくとも約 2 % において A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい組成物に関する。他の実施形態では、表 4 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現は、ヒト細胞の少なくとも約 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 5 % で、又はヒト細胞の少なくとも約 9 8 % で、A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい。いくつかの実施形態では、表 4 から選択される 1 つ又は複数のマーカーの発現が A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きい細胞培養物又は集団中のヒト細胞のパーセンテージは、フィーダー細胞を考慮せずに算定される。

20

30

【0317】

本発明の他の実施形態は、ヒト細胞、例えばヒト腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、表 3 から選択されるマーカーの発現がヒト細胞の少なくとも約 2 % において A F P、S O X 7、S O X 1、Z I C 1 及び / 又は N F M マーカーの発現よりも大きく、そして表 4 から選択されるマーカーが背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞中の同一マーカーの発現と比較して、実質的に発現されない組成物に関する。他の実施形態では、表 3 から選択されるマーカーの発現は、ヒト細胞の少なくとも約 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 1 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 2 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 3 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 4 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 5 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 6 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 7 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 8 5 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 0 % で、ヒト細胞の少なくとも約 9 5 % で、又はヒト細胞の少なくとも約 9 8 % で、A F P、S O X

40

50

7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現よりも大きい。このような実施形態では、表4から選択されるマーカーは、背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞中の同一マーカーの発現と比較して、実質的に発現されない。いくつかの実施形態では、表3から選択されるマーカーの発現がAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現よりも大きく、そして表4から選択されるマーカーが背側PDX1陽性前腸内胚葉細胞中の同一マーカーの発現と比較して、実質的に発現されない細胞培養物又は集団中のヒト細胞のパーセンテージは、フィーダー細胞を考慮せずに算定される。

【0318】

本発明の付加的実施形態は、哺乳類内胚葉細胞、例えばヒト内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、PDX1マーカーの発現並びに表3又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現が内胚葉細胞の少なくとも約2%においてAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現より大きい組成物に関する。他の実施形態では、PDX1マーカーの発現、及び表3又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現は、内胚葉細胞の少なくとも約5%、内胚葉細胞の少なくとも約10%、内胚葉細胞の少なくとも約15%、内胚葉細胞の少なくとも約20%、内胚葉細胞の少なくとも約25%、内胚葉細胞の少なくとも約30%、内胚葉細胞の少なくとも約35%、内胚葉細胞の少なくとも約40%、内胚葉細胞の少なくとも約45%、内胚葉細胞の少なくとも約50%、内胚葉細胞の少なくとも約55%、内胚葉細胞の少なくとも約60%、内胚葉細胞の少なくとも約65%、内胚葉細胞の少なくとも約70%、内胚葉細胞の少なくとも約75%、内胚葉細胞の少なくとも約80%、内胚葉細胞の少なくとも約85%、内胚葉細胞の少なくとも約90%、内胚葉細胞の少なくとも約95%、又は内胚葉細胞の少なくとも約98%でAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現より大きい。

【0319】

本発明のさらに他の実施形態は、哺乳類内胚葉細胞、例えばヒト内胚葉細胞を含む組成物、例えば細胞培養物又は細胞集団であって、SOX17、HOXA13及びHOC6から成る群から選択される1つ又は複数のマーカーの発現並びに表3又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現が内胚葉細胞の少なくとも約2%においてAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現より大きい組成物に関する。他の実施形態では、SOX17、HOXA13及びHOC6から成る群から選択される1つ又は複数のマーカーの発現、及び表3又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現は、内胚葉細胞の少なくとも約5%、内胚葉細胞の少なくとも約10%、内胚葉細胞の少なくとも約15%、内胚葉細胞の少なくとも約20%、内胚葉細胞の少なくとも約25%、内胚葉細胞の少なくとも約30%、内胚葉細胞の少なくとも約35%、内胚葉細胞の少なくとも約40%、内胚葉細胞の少なくとも約45%、内胚葉細胞の少なくとも約50%、内胚葉細胞の少なくとも約55%、内胚葉細胞の少なくとも約60%、内胚葉細胞の少なくとも約65%、内胚葉細胞の少なくとも約70%、内胚葉細胞の少なくとも約75%、内胚葉細胞の少なくとも約80%、内胚葉細胞の少なくとも約85%、内胚葉細胞の少なくとも約90%、内胚葉細胞の少なくとも約95%、又は内胚葉細胞の少なくとも約98%でAFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカーの発現より大きい。

【0320】

本明細書中に記載されるプロセスを用いて、他の細胞型を実質的に含有しない背側及び/又は腹側PDX1陽性前腸内胚葉細胞を含む組成物が産生され得る。細胞培養物中又は細胞集団中の細胞に関して、「~を実質的に含有しない」という用語は、その細胞培養物又は細胞集団が含有しない特殊化細胞型が、細胞培養物又は細胞集団中に存在する細胞の総数の約5%未満の量で存在するということを意味する。本発明のいくつかの実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される背側及び/又は腹側PDX1陽性前腸内胚葉細胞集団又は細胞培養物は、AFP、SOX7、SOX1、ZIC1及び/又はNFMマーカー遺伝子を有意に発現する細胞を実質的に含有しない。

【0321】

本発明の一実施形態では、マーカー遺伝子の発現に基づいた背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の記述は、PDX1 高、表3から選択されるマーカー 高、表4から選択されるマーカー 高、AFP 低、SOX7 低、SOX1 低、ZIC1 低及びNFM 低である。

【0322】

本発明の一実施形態では、マーカー遺伝子の発現に基づいた腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞の記述は、PDX1 高、表3から選択されるマーカー 高、表4から選択されるマーカー 低（背側 PDX1 陽性前腸内胚葉での同じマーカーの発現と比較して）、AFP 低、SOX7 低、SOX1 低、ZIC1 低及びNFM 低である。

10

【0323】

SOX17 陽性胚体内胚葉細胞中の PDX1 の発現増大

本発明のいくつかの態様は、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団中での PDX1 遺伝子産物の発現を増大する方法に関する。このような実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、PDX1 遺伝子産物の発現を増大するために十分である量で分化因子と接触される。分化因子と接触される SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、PDX1 陰性又は PDX1 陽性のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、分化因子はレチノイドである。或る特定の実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、約 0.01 μ M ~ 約 50 μ M の範囲の濃度でレチノイドと接触される。好ましい実施形態では、レチノイドは RA である。

20

【0324】

本発明の他の実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団中での PDX1 遺伝子産物の発現は、SOX17 陽性細胞を線維芽細胞増殖因子ファミリーの分化因子と接触させることにより増大される。このような分化因子は、単独で又は RA と一緒に用いられ得る。いくつかの実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、約 10 ng/ml ~ 約 1000 ng/ml の範囲の濃度で線維芽細胞増殖因子と接触される。好ましい実施形態では、FGF 増殖因子は、FGF-10 である。

【0325】

本発明のいくつかの実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団中での PDX1 遺伝子産物の発現は、SOX17 陽性細胞を B27 と接触させることにより増大される。この分化因子は、単独で、又はレチノイド及び FGF ファミリー分化因子の一方若しくは両方と一緒に用いられ得る。いくつかの実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、約 0.1% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲の濃度で B27 と接触される。好ましい実施形態では、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞は、RA、FGF-10 及び B27 と接触される。

30

【0326】

SOX17 陽性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団中での PDX1 遺伝子産物の発現を増大するための方法は、低減された血清を含有するか又は全く含有しない増殖培地中で実行され得る。いくつかの実施形態では、血清濃度は、約 0.05% (v/v) ~ 約 20% (v/v) の範囲である。いくつかの実施形態では、SOX17 陽性細胞は、血清代替品を用いて増殖される。

40

【0327】

上記の方法は、背側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞中での表3及び/又は表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現を増大するためにも用いられ得ると理解される。同様に、このような方法は、腹側 PDX1 陽性前腸内胚葉細胞中での表3から選択される1つ又は複数のマーカーの発現を増大するために用いられ得る。

【0328】

PDX1 陽性前腸内胚葉細胞への PDX1 陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得る因子の同定

本発明の付加的態様は、PDX1 陽性前腸内胚葉細胞への PDX1 陰性胚体内胚葉細胞

50

の分化を促進し得る1つ又は複数の分化因子を同定する方法に関する。このような方法では、PDX1陰性胚体内胚葉細胞を含む細胞培養物又は細胞集団が得られ、そして細胞培養物又は細胞集団中でのPDX1の発現が確定される。PDX1の発現を確定した後、細胞培養物又は細胞集団の細胞は、候補分化因子と接触される。いくつかの実施形態では、PDX1の発現は、細胞と候補分化因子との接触時、又は接触直後に、確定される。PDX1発現は次に、細胞と候補分化因子との接触後の1つ又は複数の時点で確定される。候補分化因子との接触前のPDX1発現と比較して、PDX1の発現が候補分化因子との接触後に増大された場合、候補分化因子は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得ると同定される。

【0329】

いくつかの実施形態では、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得る因子を同定する上記の方法は、細胞培養物又は細胞集団中でのHOXA13遺伝子及び/又はHOXC6遺伝子の発現を確定することも包含する。このような実施形態では、HOXA13及び/又はHOXC6の発現は、細胞が候補分化因子と接触される前及び後の両方で確定される。候補分化因子との接触前のPDX1及びHOXA13発現と比較して、PDX1及びHOXA13の発現は、候補分化因子との接触後に増大された場合、候補分化因子は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得るとして同定される。同様に、候補分化因子との接触前のPDX1及びHOXC6発現と比較して、PDX1及びHOXC6の発現が候補分化因子との接触後に増大された場合、候補分化因子は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得ると同定される。好ましい実施形態では、候補分化因子は、細胞培養物又は細胞集団の細胞と候補分化因子との接触の前及び後の両方で、PDX1、HOXA13及びHOXC6の発現を確定することにより、候補分化因子は、PDX1陽性前腸内胚葉細胞へのPDX1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得ると同定される。好ましい実施形態では、PDX1、HOXA13及び/又はHOXC6の発現は、Q-PCRにより確定される。

【0330】

いくつかの実施形態では、PDX1、HOXA13及びHOXC6のうちの1つ又は複数の発現は、細胞と候補分化因子との接触の前というよりむしろ、細胞培養物又は細胞集団の細胞と候補分化因子との接触時又は接触直後に確定され得ると理解される。このような実施形態では、細胞と候補分化因子との接触時又は接触直後の1つ又は複数のPDX1、HOXA13及びHOXC6の発現は、細胞と候補分化因子との接触後の1つ又は複数の時点での1つ又は複数のPDX1、HOXA13及びHOXC6の発現と比較される。

【0331】

上記の方法のいくつかの実施形態では、細胞と候補分化因子との接触後にPDX1発現が確定される1つ又は複数の時点は、約1時間～約10日の範囲であり得る。例えばPDX1発現は、細胞と候補分化因子との接触後約1時間、細胞と候補分化因子との接触後約2時間、細胞と候補分化因子との接触後約4時間、細胞と候補分化因子との接触後約6時間、細胞と候補分化因子との接触後約8時間、細胞と候補分化因子との接触後約10時間、細胞と候補分化因子との接触後約12時間、細胞と候補分化因子との接触後約16時間、細胞と候補分化因子との接触後約24時間、細胞と候補分化因子との接触後約2日、細胞と候補分化因子との接触後約3日、細胞と候補分化因子との接触後約4日、細胞と候補分化因子との接触後約5日、細胞と候補分化因子との接触後約6日、細胞と候補分化因子との接触後約7日、細胞と候補分化因子との接触後約8日、細胞と候補分化因子との接触後約9日、細胞と候補分化因子との接触後約10日、又は細胞と候補分化因子との接触後約10日以後に確定され得る。

【0332】

本明細書中に記載される方法で用いるための候補分化因子は、ポリペプチド及び小分子のような化合物から選択され得る。例えば候補ポリペプチドとしては、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、細胞外基質タンパク質及び合成ペプチドが挙げられるが、これらに

10

20

30

40

50

限定されない。好ましい実施形態では、増殖因子は、F G Fファミリーからであり、例えばF G F - 1 0である。候補小分子としては、組合せ化学合成及び天然産物から生成される化合物、例えばステロイド、イソプレノイド、テルペノイド、フェニルプロパノイド、アルカロイド及びフラビノイドが挙げられるが、これらに限定されない。数千のクラスの天然及び合成小分子が利用可能であり、且つ本明細書中に記載される方法に用いるよう意図される小分子は上記で例示されたクラスに限定されないと当業者に理解される。典型的には、小分子は、1 0 , 0 0 0 a m u未満の分子量を有する。好ましい実施形態では、小分子はレチノイド、例えばR Aである。

【0333】

上記の方法を用いて、表4からの1つ又は複数のマーカーの発現をモニタリングすることにより、背側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞へのP D X 1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得る因子を同定し得ると理解される。いくつかの実施形態では、表3から選択される1つ又は複数のマーカー及び表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現がモニタリングされる。

10

【0334】

同様に、上記の方法を用いて、表3からの1つ又は複数のマーカーの発現をモニタリングすることにより、腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞へのP D X 1陰性胚体内胚葉細胞の分化を促進し得る因子を同定し得ると理解される。いくつかの実施形態では、表3から選択される1つ又は複数のマーカー及び表4から選択される1つ又は複数のマーカーの発現がモニタリングされる。

20

【0335】

背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る因子の同定

本明細書中に記載される或る特定のスクリーニング方法は、背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る少なくとも1つの分化因子を同定するための方法に関する。これらの方法のいくつかの実施形態では、背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞、例えばヒト背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞集団が得られる。次に細胞集団は、候補分化因子を供給される。候補分化因子を供給される前又はそれとほぼ同時である第1の時点で、マーカーの発現が確定される。代替的には、マーカーの発現は、候補分化因子の供給後に確定され得る。第1の時点の後、そして細胞集団に候補分化因子を供給する工程の後である第2の時点で、同一マーカーの発現が再び確定される。候補分化因子が背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得るか否かは、第1の時点でのマーカーの発現を第2の時点でのマーカーの発現と比較することにより確定される。第2の時点でのマーカーの発現が、第1の時点でのマーカーの発現と比較して増大されるか又は低減された場合には、候補分化因子は、背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得る。好ましい実施形態では、マーカーの発現は、Q - P C Rにより確定される。

30

【0336】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態は、ヒト背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞を含む細胞集団又は細胞培養物を利用する。例えば細胞集団は、ヒト背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞を実質的に精製した細胞集団であり得る。或いは細胞集団は、ヒト背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞の富化集団であって、この場合、細胞集団中のヒト細胞の少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%又は少なくとも約97%より以上が、ヒト背側及び/又は腹側P D X 1陽性前腸内胚葉細胞である。本明細書中に記載される他の実施形態では、細胞集団は、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、又は少なくとも約85%以上がヒト背側及び/又は

40

50

腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞であるヒト細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞集団は、非ヒト細胞、例えば非ヒトフィーダー細胞を含む。他の実施形態では、細胞集団は、ヒトフィーダー細胞を含む。このような実施形態では、上記フィーダー細胞以外のヒト細胞の少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 % 又は少なくとも約 95 % 以上がヒト背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞である。

【0337】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法の実施形態では、細胞集団は、候補（試験）分化因子と接触されるか、そうでなければそれを供給される。候補分化因子は、ヒト背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進する能力を有し得る任意の分子を含み得る。本明細書中に記載されるいくつかの実施形態では、候補分化因子は、1つ又は複数の型の細胞に関する分化因子であることが既知である分子を含む。代替的实施形態では、候補分化因子は、細胞分化を促進することが既知でない分子を含む。好ましい実施形態では、候補分化因子は、背側及び / 又は腹側 P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進することが既知でない分子を含む。

【0338】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態では、候補分化因子は、小分子を含む。好ましい実施形態では、小分子は、約 10,000 amu 又はそれ未満の分子量を有する分子である。いくつかの実施形態では、小分子はレチノイドを含む。いくつかの実施形態では、小分子はレチノイン酸を含む。

【0339】

本明細書中に記載される他の実施形態では、候補分化因子はポリペプチドを含む。ポリペプチドは、任意のポリペプチド、例えば糖タンパク質、リボタンパク質、細胞外基質タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン、インターロイキン又は増殖因子（これらに限定されない）であり得る。好ましいポリペプチドとしては、増殖因子が挙げられる。

【0340】

本明細書に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態において、候補分化因子は、アンフィレグリン、B-リンパ球刺激因子、IL-16、チモポイエチン、TRA IL/Apo-2、プレB細胞コロニー増強因子、内皮分化関連因子1 (EDF1)、内皮単球活性化ポリペプチドII、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、ナチュラルキラー細胞増強因子 (NKEFA)、骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic protein) 2、骨形成タンパク質8 (造骨タンパク質 (osteogenic protein) 2)、骨形成タンパク質6、骨形成タンパク質7、結合組織増殖因子 (CTGF)、CGI-149タンパク質 (神経内分泌分化因子)、サイトカインA3 (マクロファージ炎症性タンパク質1-α)、膠芽腫 (Glioblastoma) 細胞分化関連タンパク質 (GBDR1)、肝細胞癌由来増殖因子、ニューロメジンU-25前駆体、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血管内皮増殖因子B (VEGF-B)、T細胞特異的RANTES前駆体、胸腺樹状細胞誘導因子1、トランスフェリン、インターロイキン1 (IL1)、インターロイキン2 (IL2)、インターロイキン3 (IL3)、インターロイキン4 (IL4)、インターロイキン5 (IL5)、インターロイキン6 (IL6)、インターロイキン7 (IL7)、インターロイキン8 (IL8)、インターロイキン9 (IL9)、インターロイキン10 (IL10)、インターロイキン11 (IL11)、インターロイキン12 (IL12)、インターロイキン13 (IL13)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、エリスロポイエチン、トロンプオイエチン、ビタミンD3、上皮細胞増殖因子 (EGF)、脳由来神経栄養因子、白血病抑制因子、甲状腺ホルモン、塩基性線維芽細胞増殖因子 (

10

20

30

40

50

b F G F)、a F G F、F G F - 4、F G F - 6、ケラチノサイト増殖因子 (K G F)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、血小板由来増殖因子 - B B、 β 神経増殖因子、アクチビン A、形質転換増殖因子 β 1 (T G F - β 1)、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、バースト促進活性 (Burs t promoting activity) (B P A)、赤血球促進活性 (E P A)、P G E 2、インスリン増殖因子 1 (I G F - 1)、I G F - I I、ニュートロフィン増殖因子 (N G F)、ニュートロフィン 3、ニュートロフィン 4 / 5、毛様体神経栄養因子、神経膠由来ネキシン、デキサメタゾン、 β - メルカプトエタノール、レチノイン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、5 - アザシチジン、アンホテリシン B、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩 (Ascr orbate)、イソブチルキサンチン、インドメタシン、 β - グリセロールホスフェート、ニコチンアミド、D M S O、チアゾリジンジオン、T W S 1 1 9、オキシトシン、バソプレシン、メラニン細胞刺激ホルモン、コルチコトロピン (corticotropin)、リボトロピン、チロトロピン、成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、コルチコトロピン放出因子、ゴナドトロピン放出因子、プロラクチン放出因子、プロラクチン阻害因子、成長ホルモン放出因子、ソマトスタチン、チロトロピン放出因子、カルシトシン遺伝子関連ペプチド、副甲状腺ホルモン、グルカゴン様ペプチド 1、グルコース依存性インスリン分泌促進ポリペプチド、ガストリン、セクレチン、コレシストキシン、モチリン、血管活性腸管ペプチド、物質 P、膵臓ポリペプチド、ペプチドチロシンチロシン、神経ペプチドチロシン、インスリン、グルカゴン、胎盤性ラクトゲン、リラキシン、アンジオテンシン I I、カルシトリオール (calcitriol)、心房性ナトリウム利尿ペプチド、及びメラトニン、チロキシン、トリヨードチロニン、カルシトニン、エストラジオール、エストロン、プロゲステロン、テストステロン、コルチゾール、コルチコステロン、アルドステロン、エピネフィン、ノルエピネフリン (norepine pherine)、アンドロスチエン (androstiene)、カルシトリオール、コラーゲン、デキサメタゾン、 β - メルカプトエタノール、レチノイン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、5 - アザシチジン、アンホテリシン B、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩 (Ascr orbate)、イソブチルキサンチン、インドメタシン、 β - グリセロールホスフェート、ニコチンアミド、D M S O、チアゾリジンジオン、及び T W S 1 1 9 から成る群から選択される 1 つ又は複数の増殖因子を含む。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 1 】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態では、候補分化因子は、1つ又は複数の濃度で、細胞集団に供給される。いくつかの実施形態では、候補分化因子は、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度が約 0 . 1 n g / m l ~ 約 1 0 m g / m l の範囲であるよう、細胞集団に供給される。いくつかの実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 1 n g / m l ~ 約 1 m g / m l の範囲である。他の実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 1 0 n g / m l ~ 約 1 0 0 μ g / m l の範囲である。さらに他の実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 1 0 0 n g / m l ~ 約 1 0 μ g / m l の範囲である。好ましい実施形態では、細胞周囲の培地中の候補分化因子の濃度は、約 5 n g / m l、約 2 5 n g / m l、約 5 0 n g / m l、約 7 5 n g / m l、約 1 0 0 n g / m l、約 1 2 5 n g / m l、約 1 5 0 n g / m l、約 1 7 5 n g / m l、約 2 0 0 n g / m l、約 2 2 5 n g / m l、約 2 5 0 n g / m l、約 2 7 5 n g / m l、約 3 0 0 n g / m l、約 3 2 5 n g / m l、約 3 5 0 n g / m l、約 3 7 5 n g / m l、約 4 0 0 n g / m l、約 4 2 5 n g / m l、約 4 5 0 n g / m l、約 4 7 5 n g / m l、約 5 0 0 n g / m l、約 5 2 5 n g / m l、約 5 5 0 n g / m l、約 5 7 5 n g / m l、約 6 0 0 n g / m l、約 6 2 5 n g / m l、約 6 5 0 n g / m l、約 6 7 5 n g / m l、約 7 0 0 n g / m l、約 7 2 5 n g / m l、約 7 5 0 n g / m l、約 7 7 5 n g / m l、約 8 0 0 n g / m l、約 8 2 5 n g / m l、約 8 5 0 n g / m l、約 8 7 5 n g / m l、約 9 0 0 n g / m l、約 9 2 5 n g / m l、約 9 5 0 n g / m l、約 9 7 5 n g / m l、約 1 μ g / m l、約 2 μ g / m l、約 3 μ g / m l、約 4 μ g / m l、約 5 μ g / m l、約 6 μ g / m l、約 7 μ g / m l、約 8 μ g / m l、約 9 μ g

/ ml、約 10 μ g / ml、約 11 μ g / ml、約 12 μ g / ml、約 13 μ g / ml、約 14 μ g / ml、約 15 μ g / ml、約 16 μ g / ml、約 17 μ g / ml、約 18 μ g / ml、約 19 μ g / ml、約 20 μ g / ml、約 25 μ g / ml、約 50 μ g / ml、約 75 μ g / ml、約 100 μ g / ml、約 125 μ g / ml、約 150 μ g / ml、約 175 μ g / ml、約 200 μ g / ml、約 250 μ g / ml、約 300 μ g / ml、約 350 μ g / ml、約 400 μ g / ml、約 450 μ g / ml、約 500 μ g / ml、約 550 μ g / ml、約 600 μ g / ml、約 650 μ g / ml、約 700 μ g / ml、約 750 μ g / ml、約 800 μ g / ml、約 850 μ g / ml、約 900 μ g / ml、約 950 μ g / ml、約 1000 μ g / ml 又は約 1000 μ / ml 超である。

【0342】

10

本明細書中に記載されるスクリーニング方法の或る特定の実施形態では、細胞集団は、レチノイド、FGF10、FGF-4、BMP-4、アクチビンA、アクチビンB又は任意の他の前腸分化因子以外の任意の分子を含む候補分化因子を供給される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、レチノイン酸以外の任意の分子を含む候補分化因子を供給される。

【0343】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるスクリーニング方法の工程は、第1の時点及び第2の時点での少なくとも1つのマーカーの発現を確定することを包含する。これらの実施形態のいくつかでは、第1の時点は、候補分化因子を細胞集団に供給する前、又はそれとほぼ同時であり得る。或いはいくつかの実施形態では、第1の時点は、候補分化因子を細胞集団に供給した後である。いくつかの実施形態では、複数のマーカーの発現は、第1の時点で確定される。

20

【0344】

第1の時点での少なくとも1つのマーカーの発現を確定することのほかに、本明細書中に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態は、第1の時点の後であり、そして候補分化因子を細胞集団に供給した後である第2の時点で少なくとも1つのマーカーの発現を確定することを意図する。このような実施形態では、同一マーカーの発現が、第一及び第2の時点の両方で確定される。いくつかの実施形態では、複数のマーカーの発現が、第一及び第2の時点の両方で確定される。このような実施形態では、複数の同一マーカーの発現が、第1の時点及び第2の時点の両方で確定される。いくつかの実施形態では、その各々が第1の時点の後であり、そしてその各々が候補分化因子を細胞集団に供給した後である複数の時点で、マーカー発現が確定される。或る特定の実施形態では、マーカー発現はQ-PCRにより確定される。他の実施形態では、マーカー発現は免疫細胞化学により確定される。

30

【0345】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法の或る特定の実施形態では、その発現が第一及び第2の時点で確定されるマーカーは、前腸の後部由来である組織及び/又は器官を作り上げる細胞の前駆体である細胞へのヒト背側及び/又は腹側PDX1陽性前腸内胚葉細胞の分化に関連するマーカーである。いくつかの実施形態では、前腸の後部に由来する組織及び/又は器官は、最終分化細胞を含む。いくつかの実施形態では、マーカーは、膵臓細胞又は膵臓前駆体細胞を示す。いくつかの実施形態では、マーカーは表3又は表4から選択されるマーカーである。

40

【0346】

本明細書中に記載されるスクリーニング方法のいくつかの実施形態では、候補分化因子を細胞集団に供給することと、第2の時点でのマーカー発現を確定することとの間に十分な時間を経過させる。候補分化因子を細胞集団に供給することと第2の時点でのマーカーの発現を確定することとの間の十分な時間は、約1時間という短い時間から、約10日間という長い時間までであり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのマーカーの発現が、細胞集団に候補分化因子を供給した後で複数回確定される。いくつかの実施形態では、十分な時間は、少なくとも約1時間、少なくとも約6時間、少なくとも約12時間

50

、少なくとも約 18 時間、少なくとも約 24 時間、少なくとも約 30 時間、少なくとも約 36 時間、少なくとも約 42 時間、少なくとも約 48 時間、少なくとも約 54 時間、少なくとも約 60 時間、少なくとも約 66 時間、少なくとも約 72 時間、少なくとも約 78 時間、少なくとも約 84 時間、少なくとも約 90 時間、少なくとも約 96 時間、少なくとも約 102 時間、少なくとも約 108 時間、少なくとも約 114 時間、少なくとも約 120 時間、少なくとも約 126 時間、少なくとも約 132 時間、少なくとも約 138 時間、少なくとも約 144 時間、少なくとも約 150 時間、少なくとも約 156 時間、少なくとも約 162 時間、少なくとも約 168 時間、少なくとも約 174 時間、少なくとも約 180 時間、少なくとも約 186 時間、少なくとも約 192 時間、少なくとも約 198 時間、少なくとも約 204 時間、少なくとも約 210 時間、少なくとも約 216 時間、少なくとも約 222 時間、少なくとも約 228 時間、少なくとも約 234 時間、又は少なくとも約 240 時間である。

10

【0347】

本明細書中に記載される方法のいくつかの実施形態では、第 2 の時点でのマーカーの発現が、第 1 の時点でのこのマーカーの発現と比較して、増大したか又は低減したかがさらに確定される。少なくとも 1 つのマーカーの発現の増大又は低減は、候補分化因子が背側及び / 又は腹側 PDX 1 陽性前腸内胚葉細胞の分化を促進し得るということを示す。同様に、複数のマーカーの発現が確定される場合、第 2 の時点での複数のマーカーの発現が、第 1 の時点でのこの複数のマーカーの発現と比較して、増大したか又は低減したかをさらに確定する。マーカー発現の増大又は低減は、第一及び第 2 の時点での細胞集団中のマーカーの量、レベル又は活性を測定するか又はそうでなければ評価することにより確定され得る。このような確定は、他のマーカー、例えばハウスキーピング遺伝子発現と相対的であるか、或いは絶対的であり得る。マーカー発現が第 1 の時点に比べて、第 2 の時点で増大する或る特定の実施形態では、増大量は、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 60 倍、少なくとも約 70 倍、少なくとも約 80 倍、少なくとも約 90 倍、少なくとも約 100 倍、又は少なくとも約 100 倍超である。いくつかの実施形態では、増大量は 2 倍未満である。マーカー発現が第 1 の時点に比べて、第 2 の時点で低減する実施形態では、低減量は、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 60 倍、少なくとも約 70 倍、少なくとも約 80 倍、少なくとも約 90 倍、少なくとも約 100 倍、又は少なくとも約 100 倍超である。いくつかの実施形態では、低減量は 2 倍未満である。

20

30

【0348】

本明細書中に開示する方法それぞれを、背側及び / 又は腹側 PDX 1 陽性前腸内胚葉細胞に関して記載してきたが、或る特定の実施形態では、これらの方法は、本明細書中に記載される背側及び / 又は腹側 PDX 1 陽性前腸 / 中腸内胚葉細胞及び / 又は本明細書中に記載される前腸の後方部分の背側及び / 又は腹側 PDX 1 陽性内胚葉細胞を含む組成物を産生するのに使用することができることが理解されよう。さらに、本明細書中に開示する PDX 1 陽性内胚葉細胞型のいずれかを本明細書中に記載するスクリーニング方法に利用することができる。

40

【0349】

本発明を一般的に記載してきたが、例証の目的のためにのみ本明細書中に提供され、限定的であるよう意図されない或る特定の実施例を参照することによりさらなる理解が得られる。

【実施例】

【0350】

以下の実施例の多くは、多能性ヒト細胞の使用を記載する。多能性ヒト細胞を産生する方法は、当該技術分野で既知であり、多数の科学出版物、例えば米国特許第 5,453,357 号、第 5,670,372 号、第 5,690,926 号、第 6,090,622 号

50

、第 6 , 2 0 0 , 8 0 6 号及び第 6 , 2 5 1 , 6 7 1 号、並びに米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 2 9 3 5 0 号 (その開示は参照により本明細書に完全に援用される) に記載されている。

【 0 3 5 1 】

〔実施例 1〕

ヒト E S 細胞

内胚葉発達についての研究のために、本発明者等は、多能性であり、そして正常核型を保持しながら培養中に外見上無限に分裂し得るヒト胚性幹細胞を用いた。単離のために免疫学的又は機械的方法を用いて、5 日齢胚内部細胞塊から E S 細胞を得た。特にヒト胚性幹細胞株 h E S C y t - 2 5 を、患者によるインフォームドコンセント後に、体外受精周期からの過剰凍結胚から得た。解凍の直後に、E S 培地 (D M E M 、 2 0 % F B S 、 非必須アミノ酸、 β - メルカプトエタノール、I T S サプリメント) 中のマウス胚線維芽細胞 (M E F) 上に孵化胚盤胞を平板培養した。胚が培養皿に接着し、そして約 2 週間後、未分化 h E S C の領域を、M E F とともに新たな皿に移した。機械的に切断し、ディスペーゼで手短に消化し、その後、細胞クラスターを機械的に取り出して、洗浄し、再度平板培養することにより移動を成し遂げた。誘導以来、h E S C y t - 2 5 を、1 0 0 回にわたって逐次継代した。胚体内胚葉の産生のための出発物質として、h E S C y t - 2 5 ヒト胚性幹細胞株を用いた。

10

【 0 3 5 2 】

幹細胞又は他の多能性細胞は本明細書中に記載される分化手法のための出発物質としても用いられ得ると当業者により理解される。例えば当該技術分野で既知の方法により単離され得る胚性生殖腺隆起から得られる細胞は、多能性細胞出発物質として用いられ得る。

20

【 0 3 5 3 】

〔実施例 2〕

h E S C y t - 2 5 特性化

ヒト胚性幹細胞株 h E S C y t - 2 5 は、培養中に 1 8 ヶ月にわたって、正常な形態特性、核型特性、増殖特性及び自己再生特性を保持した。この細胞株は、O C T 4 、S S E A - 4 及び T R A - 1 - 6 0 抗原 (これらはすべて、未分化 h E S C に特有である) に対する強免疫反応性を示し、そしてアルカリ性ホスファターゼ活性、並びに他の確立された h E S C 株と同一の形態を示す。さらにヒト幹細胞株 h E S C y t - 2 5 は、懸濁液中で培養される場合、胚様体 (E B) も容易に形成する。その多能性の実証として、h E S C y t - 2 5 は、3 つの主要胚葉を表わす種々の細胞型に分化する。Z I C 1 に関する Q - P C R 、並びにネスチン及びより成熟したニューロンマーカーに関する免疫細胞化学 (I C C) により、外胚葉産生を実証した。 β - I I I チューブリンに関する免疫細胞化学染色を、初期ニューロンに特徴的な伸長細胞のクラスター中で観察した。予め、レチノイン酸で懸濁液中の E B を処理して、臓側内胚葉 (V E) 、胚体外系統への多能性幹細胞の分化を誘導した。処理された細胞は、高レベルの α - フェトプロテイン (A F P) 及び S O X 7 (V E の 2 つのマーカー) を 5 4 時間の処理により発現した。単層中で分化された細胞は、免疫細胞化学染色により実証されるように、散在性パッチ中で A F P を発現した。以下で記載するように、h E S C y t - 2 5 細胞株は、A F P 発現の非存在下での S O X 1 7 に関する実時間定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) 及び免疫細胞化学により立証されるように、胚体内胚葉も形成し得た。中胚葉への分化を実証するために、分化中の E B を、いくつかの時点でのブラキュリ遺伝子発現に関して分析した。ブラキュリ発現は、実験経過中に漸進的に増大した。上記に鑑みて、三胚葉を表わす細胞を形成する能力により示されるように、h E S C y t - 2 5 株は多能性である。

30

40

【 0 3 5 4 】

〔実施例 3〕

S O X 1 7 抗体の産生

h E S C 培養物における胚体内胚葉の同定に対する主要な妨害は、適切なツールの欠如である。したがって、本発明者等は、ヒト S O X 1 7 タンパク質に対する抗体の産生に着

50

手した。

【0355】

マーカーSOX17は、それが原腸形成中に形成する際に胚体内胚葉全体にわたって発現され、その発現は、器官形成の開始頃まで腸管で維持される（しかし、発現のレベルは、A-P軸に沿って様々である）。SOX17はまた、胚体外内胚葉細胞のサブセットでも発現される。このタンパク質の発現はまた、中胚葉又は外胚葉では観察されていない。SOX17は、胚体外系統を排除するためのマーカーと併用される場合、胚体内胚葉系統に適切なマーカーであることが現在発見されている。

【0356】

本明細書中で詳述するように、SOX17抗体は、SOX17陽性胚体内胚葉細胞の産生を目的とした様々な処理手順及び分化手順の影響を具体的に検査するのに利用された。AFP、SPARC及びトロポモジュリンに対して反応性がある他の抗体もまた、臓側内胚葉及び壁側内胚葉（胚体外内胚葉）の産生を除外するのに使用された。

【0357】

SOX17に対する抗体を産生するために、SOX17タンパク質のカルボキシ末端におけるアミノ酸172～414（配列番号2）に相当するヒトSOX17 cDNA（配列番号1）の一部（図2）は、抗体産生会社GENOVAC(Freiberg, Germany)にて、そこで開発された手順に従って、ラットにおける遺伝子免疫化に使用した。遺伝子免疫化に関する手段は、米国特許第5,830,876号、同第5,817,637号、同第6,165,993号及び同第6,261,281号、並びに国際特許出願公開第WO00/29442号及び同第WO99/13915号（その開示は参照により本明細書に完全に援用される）に見出すことができる。

【0358】

遺伝子免疫化に関する他の適切な方法はまた、非特許文献にも記載されている。例えば、Barry他は、Biotechniques 16: 616-620, 1994（その開示は参照により本明細書に完全に援用される）において遺伝子免疫化によるモノクローナル抗体の産生について記載している。特異的タンパク質に対する抗体を産生するための遺伝子免疫化方法の具体例は、例えば、Costaglia他(1998) ヒト甲状腺刺激ホルモン受容体に対する遺伝子免疫化は、甲状腺炎を引き起こし、且つ自然受容体を認識するモノクローナル抗体の産生を可能にする(Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor), J. Immunol. 160: 1458-1465、Kilpatrick他(1998) 遺伝子銃送達されるDNAベースの免疫化は、Flt-3受容体に対するマウスモノクローナル抗体の迅速な産生を媒介する(Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor), Hybridoma 17: 569-576、Schmolke他(1998) DNA免疫化により産生されるE2特異的モノクローナル抗体によるヒト血清におけるG型肝炎ウイルス粒子の同定(Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization), J. Virol. 72: 4541-4545、Krasemann他(1999) 異例の核酸ベースの免疫化戦略を用いたタンパク質に対するモノクローナル抗体の生成(Generation of monoclonal antibodies against proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy), J. Biotechnol. 73: 119-129、及びUlivieri他(1996) DNA免疫化によるヘリコバクター・ピロリ細胞空胞化毒素の規定部分に対するモノクローナル抗体の生成(Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization), J. Biotechnol. 51: 191-194（その開示は参照により本明細書に完全に援用される）に見出すことができる。

【0359】

SOX7及びSOX18は、図3に示される相関系統樹に表されるようにSOX17に対する最も密接なSOXファミリー類縁体である。本発明者等は、遺伝子免疫化により産生されるSOX17抗体がSOX17に特異的であり、またその最も密接なファミリー成

員と反応しないことを実証するために、陰性対照としてヒトSOX7ポリペプチドを用いた。特に、SOX7及び他のタンパク質は、ヒト線維芽細胞において発現させ、続いてウェスタンブロット及びICCによりSOX17抗体との交差反応性に関して分析した。例えば、SOX17、SOX7及びEGFP発現ベクターの産生、ヒト線維芽細胞へのそれらのトランスフェクション、並びにウェスタンブロットによる分析に関して以下の方法を利用した。SOX17、SOX7及びEGFPの産生に用いられる発現ベクターは、それぞれpCMV6 (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD)、pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, CA)及びpEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA)であった。タンパク質産生に関して、テロメラーゼ不死化MDXヒト線維芽細胞を、リポフェクタミン2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)の存在下で、スーパーコイルDNAで一過的にトランスフェクトした。総細胞溶解産物は、トランスフェクションの36時間後に、プロテアーゼ阻害剤のカクテル(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)を含有する50 mM TRIS-HCl (pH 8)、150 mM NaCl、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸中で回収した。NuPAGE (4~12%グラジエントポリアクリルアミド、Invitrogen, Carlsbad, CA)上でのSDS-PAGEにより分離され、且つPDVF膜(Hercules, CA)上へのエレクトロブロッティングにより移入された細胞タンパク質100 µgのウェスタンブロット分析は、10 mM TRIS-HCl (pH 8)、150 mM NaCl、10% BSA、0.05% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO)中のラットSOX17抗血清の1000倍希釈で、続いてアルカリホスファターゼ結合抗ラットIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)でプロービングして、ベクターブラックアルカリホスファターゼ染色(Vector Laboratories, Burlingame, CA)により明らかにした。使用されるタンパク質サイズ標準物質は、広範囲の色彩マーカー(Sigma, St. Louis, MO)であった。

10

20

30

40

50

【0360】

図4では、SOX17、SOX7又はEGFP cDNAで一過的にトランスフェクトされたヒト線維芽細胞から作製されるタンパク質抽出物を、SOX17抗体によりウェスタンブロットでプロービングした。hSOX17トランスフェクト細胞からのタンパク質抽出物のみが、ヒトSOX17タンパク質の予測46 Kda分子量に近い~51 Kdaのバンドを生じた。ヒトSOX7又はEGFPトランスフェクト細胞のいずれかから作製される抽出物に対してもSOX17抗体の反応性は見られなかった。さらに、SOX17抗体は、hSOX17発現構築物でトランスフェクトしたヒト線維芽細胞の核を明らかに標識したが、EGFPのみでトランスフェクトした細胞は標識しなかった。したがって、SOX17抗体は、ICCによる特異性を示す。

【0361】

〔実施例4〕

胚体内胚葉のマーカーとしてのSOX17抗体の確証

部分的に分化させたhESCをSOX17及びAFP抗体で同時標識して、SOX17抗体がヒトSOX17タンパク質に特異的であり、さらに胚体内胚葉をマークすることを実証した。SOX17、SOX7 (これは、SOX遺伝子ファミリーサブグループFの密接に関連する成員である(図3))及びAFPはそれぞれ、臓側内胚葉で発現されることが実証されている。しかしながら、AFP及びSOX7は、ICCにより検出可能なレベルでは、胚体内胚葉細胞では発現されず、したがってそれらは、真正(bonifide)の胚体内胚葉細胞に関する陰性マーカーとして用いることができる。SOX17抗体は、細胞の別個の分類として存在するか、或いはAFP陽性細胞と混合される細胞の集団を標識することが示された。特に、図5Aは、少数のSOX17細胞がAFPで同時標識されることを示すが、SOX17⁺細胞の区域においてAFP⁺細胞がほとんど存在しないか、或いは全く存在しない領域も見られた(図5B)。同様に、壁側内胚葉は、SOX17を発現することが報告されているため、壁側マーカーSPARC及び/又はトロンプモジュリン(TM)と共にSOX17による抗体の同時標識を使用して、壁側内胚葉であるSOX17⁺細胞を同定することができる。図6A~図6Cに示されるように、トロンプモジュリン

及びSOX17同時標識された壁側内胚葉細胞は、hESC細胞の無作為分化により産生された。

【0362】

上記細胞標識実験を考慮して、胚体内胚葉細胞の独自性は、マーカープロファイルSOX17^{hi}/AFP^{lo}/[TM^{lo}又はSPARC^{lo}]により樹立され得る。換言すると、SOX17マーカーの発現は、臓側内胚葉の特徴であるAFPマーカー、及び壁側内胚葉の特徴であるTM又はSPARCマーカーの発現よりも大きい。したがって、SOX17に関して陽性であるが、AFPに対して陰性であり、且つTM又はSPARCに対して陰性である細胞は、胚体内胚葉である。

【0363】

胚体内胚葉の予測となるようなSOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo}/SPARC^{lo}マーカープロファイルの特異性のさらなる徴候として、SOX17及びAFP遺伝子発現が、抗体標識細胞の相対数と定量的に比較された。図7Aに示されるように、レチノイン酸（臓側内胚葉誘導物質）又はアクチビンA（胚体内胚葉誘導物質）で処理したhESCは、SOX17 mRNA発現のレベルにおいて10倍の差をもたらした。この結果は、SOX17抗体標識細胞数における10倍の差に反映している（図7B）。さらに、図8Aに示されるように、hESCのアクチビンA処理は、処理無しと比較して6.8倍AFP遺伝子発現を抑制した。これは、図8B及び図8Cに示されるように、これらの培養物におけるAFP標識細胞の数の劇的な減少により可視的に反映された。これをさらに定量化するために、AFP遺伝子発現におけるこのおよそ7倍の減少は、フローサイトメトリーにより測定される場合のAFP抗体標識細胞数における同様の7倍の減少の結果であることが実証された（図9A及び図9B）。この結果は、Q-PCRにより観察されるような遺伝子発現の定量的変化は、抗体染色により観察されるような細胞型特定化における変化を反映することを示すという点で極めて有意である。

【0364】

ノーダルファミリー成員（ノーダル、アクチビンA及びアクチビンB-NAA）の存在下でのhESCのインキュベーションは、経時的にSOX17抗体標識細胞の有意な増加をもたらした。連続的なアクチビン処理の5日目までには、50%を超える細胞がSOX17で標識された（図10A～図10F）。アクチビン処理の5日後にはAFPで標識された細胞はほとんど存在しなかったか、或いは全く存在しなかった。

【0365】

要約すると、ヒトSOX17タンパク質のカルボキシ末端の242個のアミノ酸に対して産生される抗体は、ウェスタンブロットでヒトSOX17タンパク質を同定したが、その最も密接なSoxファミリー類縁体であるSOX7を認識しなかった。SOX17抗体は、主としてSOX17⁺/AFP^{lo}である分化hESC培養物における細胞のサブセット（95%を超える標識細胞）並びにSOX17及びAFP（臓側内胚葉）に関して同時標識する少量パーセント（5%未満）の細胞を認識した。アクチビンによるhESC培養物の処理は、SOX17遺伝子発現並びにSOX17標識細胞の顕著な増大をもたらし、AFP mRNAの発現及びAFP抗体で標識した細胞の数を劇的に抑制した。

【0366】

〔実施例5〕

Q-PCR遺伝子発現アッセイ

以下の実験では、リアルタイム定量的RT-PCR（Q-PCR）が、hESC分化に対する様々な処理の影響をスクリーニングするのに使用される主要なアッセイであった。特に、遺伝子発現のリアルタイム測定は、Q-PCRにより多数の時点で多数のマーカー遺伝子に関して分析した。細胞集団の全体的な動態のより良好な理解を得るために、所望の細胞型並びに望ましくない細胞型のマーカー遺伝子の特徴を評価した。Q-PCR分析の長所として、ゲノム配列が容易に入手可能である場合、その極度の感度及び必要なマーカーを開発することが比較的容易であることが挙げられる。さらに、Q-PCRの極めて高い感度により、相当大きな集団内での比較的少数の細胞からの遺伝子発現の検出が可能

10

20

30

40

50

となる。さらに、非常に低レベルの遺伝子発現を検出する能力は、集団内の「分化の偏り」に関する指標を提供する。これらの細胞の表現型の顕在的な分化に先立つ特定の分化経路に対する偏りは、免疫細胞化学的技法を使用して認知することはできない。このため、Q - P C R は、分化処理の成功をスクリーニングするための少なくとも補完的であり且つ免疫組織化学的技法よりも潜在的に相当優れている分析の方法を提供する。さらに、Q - P C R は、半ハイスループットスケール(semi-high throughput scale)の分析にて定量的方式で分化プロトコルの成功を評価するメカニズムを提供する。

【0367】

本実施例で採用するアプローチは、R o t o r G e n e 3 0 0 0 機器(Corbett Research)でのS Y B R G r e e n 化学及び2段階R T - P C R方式を使用して相対定量を実施することであった。このようなアプローチにより、今後のさらなるマーカー遺伝子の分析用のc D N A サンプルの積上げが可能となり、したがって、サンプル間の逆転写効率における可変性を回避した。

10

【0368】

プライマーは、これが混入ゲノムD N Aからの増幅を排除すると実験的に確定されているため、エクソン間境界にわたって存在するか、又は可能であれば少なくとも800bpのイントロンにまたがるように設計された。イントロンを含有しないマーカー遺伝子を使用したか、又はマーカー遺伝子が偽遺伝子を保有した場合、R N A サンプルのD N A ーゼI処理が実施された。

【0369】

20

本発明者等は、細胞サンプルにおける遺伝子発現の広範囲のプロファイル描写を提供するために、日常的にQ - P C Rを使用して、標的細胞型及び非標的細胞型の多数のマーカーの遺伝子発現を測定した。初期のh E S C分化(具体的には、外胚葉、中胚葉、胚体内胚葉及び胚体外内胚葉)に関連し、且つ確証されたプライマー組が利用可能であるマーカーを以下の表1に提供する。これらのプライマー組のヒト特異性もまた実証されている。h E S Cが多くの場合マウスフィーダー層上で増殖するため、このことは重要な事実である。最も典型的には、三重反復サンプルが各条件に関して採取され、各定量的確定に関連した生物学的可変性を評価するために二重反復で個別に分析された。

【0370】

30

P C R 鑄型を生成するために、総R N Aは、R N e a s y (Qiagen)を使用して単離されて、R i b o G r e e n (Molecular Probes)を用いて定量化された。総R N A 350 ~ 500 ngからの逆転写は、オリゴd Tプライマー及び無作為なプライマーのミックスを含有するi S c r i p t 逆転写酵素キット(BioRad)を使用して実施した。続いて、反応物それぞれ20 µLを総容量100 µLにまで希釈して、3 µLをそれぞれ400 nM順方向プライマー及び逆方向プライマーを含有するQ - P C R 反応物10 µL並びに2 × S Y B R G r e e n マスターミックス(Qiagen)5 µLにおいて使用した。2段階サイクリングパラメータは、85 ~ 94 (具体的には各プライマー組に関するアンプリコンの融点に従って選択される)で5秒の変性、続く60 での45秒のアニール/伸長を用いて使用された。各伸長段階の最後の15秒の間に、蛍光データを回収した。3点の10倍希釈シリーズを使用して、各実施に関する標準曲線を作成して、サイクル閾値(C t)をこの標準曲線に基づいて定量値へ変換した。各サンプルに関する定量値は、ハウスキーピング遺伝子性能に対して正規化され、続いて平均値及び標準偏差は、三重反復サンプルに関して算出された。P C R サイクリングの終わりには、融解曲線分析を実施して、反応物の特異性を確かめた。単一の特異的産物は、そのP C R アンプリコンに適したT_mでの単一ピークにより示された。さらに、逆転写酵素無しで実施される反応は、陰性対照として役立ち、増幅しない。

40

【0371】

Q - P C R 方法論を確立する際の第1の工程は、実験系における適切なハウスキーピング遺伝子(H G)の検証であった。H Gは、R N A インプット、R N A 完全性及びR T 効率に関してサンプルにわたって正規化するのに使用されるため、正規化が意味のあるもの

50

であるためには、H G がすべてのサンプル型において経時的に一定レベルの発現を示すことに価値があった。本発明者等は、分化h E S CにおけるサイクロフィリンG、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (H P R T)、 β -2-ミクログロブリン、ヒドロキシメチルピランシターゼ (H M B S)、T A T A結合タンパク質 (T B P) 及びグルクロニダーゼ β (G U S)の発現レベルを測定した。本発明者等の結果により、 β -2-ミクログロブリン発現レベルが、分化の間に増大されることが示され、したがって本発明者等は、正規化に関してこの遺伝子の使用を排除した。他の遺伝子は、経時的に、並びに複数の処理にわたって一貫した発現レベルを示した。本発明者等は規定通りに、サイクロフィリンG及びG U Sの両方を使用して、すべてのサンプルに関して正規化因子を算出した。多数のH Gの使用は、同時に正規化プロセスに固有の可変性を低減し、相対遺伝子発現値の信頼性を増大させる。

10

【0372】

正規化において使用するための遺伝子を獲得した後、続いてQ-PCRを利用して、種々の実験処理を施したサンプルにわたる多くのマーカー遺伝子の相対遺伝子発現レベルを確定した。用いたマーカー遺伝子は、それらが初期胚葉の代表的な特異的集団において富化を示すことから選択されており、特に胚体内胚葉及び胚体外内胚葉で差次的に発現される遺伝子の組に焦点を当てている。これらの遺伝子並びにそれらの関連富化プロファイルを表1に示している。

【0373】

【表1】

20

表1

胚葉	遺伝子	発現ドメイン
内胚葉	S O X 1 7 M I X L 1 G A T A 4 H N F 3 b	胚体内胚葉、臓側内胚葉及び壁側内胚葉 内胚葉及び中胚葉 胚体内胚葉及び原始内胚葉 胚体内胚葉及び原始内胚葉、中胚葉、神経板
胚体外	G S C S O X 7 A F P S P A R C T M	内胚葉及び中胚葉 臓側内胚葉 臓側内胚葉、肝臓 壁側内胚葉 壁側内胚葉／栄養外胚葉
外胚葉 中胚用	Z I C 1 B R A C H	神経管、神経前駆体 新生中胚葉

30

【0374】

多くの遺伝子が、2つ以上の胚葉で発現されるため、同じ実験内で多くの遺伝子の発現レベルを定量的に比較することが有用である。S O X 1 7は、胚体内胚葉で、またより程度は低い、臓側内胚葉及び壁側内胚葉で発現される。S O X 7及びA F Pは、この初期発達時点で、臓側内胚葉で発現される。S P A R C及びT Mは、壁側内胚葉で発現され、ブラキュリは、初期中胚葉で発現される。

40

【0375】

胚体内胚葉細胞は、高レベルのS O X 1 7 mRNA並びに低レベルのA F P及びS O X 7 (臓側内胚葉)、S P A R C (壁側内胚葉)及びブラキュリ (中胚葉)を発現すると予測された。さらに、Z I C 1は、初期外胚葉の誘導をさらに除外するのに本明細書で使用された。最後に、G A T A 4及びH N F 3 bは、胚体内胚葉及び胚体外内胚葉の両方で発現され、したがって、胚体内胚葉におけるS O X 1 7発現と相関する (表1)。表1に

50

記載するマーカー遺伝子が、様々なサンプル間でどのように互いに相関するかを実証し、したがって、胚体内胚葉及び胚体外内胚葉への、並びに中胚葉及び神経細胞型への分化の特異的パターンを示す代表的な実験を図 1 1 ~ 図 1 4 に示している。

【0376】

上記データを考慮すると、増大用量のアクチビンが、SOX17 遺伝子発現の増大をもたらしたことが明らかである。さらに、この SOX17 発現は、胚体外内胚葉とは対照的に主として胚体内胚葉を表した。この結論は、SOX17 遺伝子発現が、AFP、SOX7 及び SPARC 遺伝子発現と逆相関したという観察から生じる。

【0377】

〔実施例 6〕

胚体内胚葉へのヒト ES 細胞の定方向分化

ヒト ES 細胞培養物は、それらの未分化状態を能動的に維持しない条件下で培養される場合に、無作為に分化する。この不均一分化は、壁側内胚葉及び臓側内胚葉の両方から構成される胚体外内胚葉細胞 (AFP、SPARC 及び SOX7 発現) 並びに ZIC1 及びネスチン (外胚葉) 及びブラキュリ (中胚葉) 発現によりマークされるような初期外胚葉誘導体及び中胚葉誘導体の産生をもたらす。胚体内胚葉細胞出現は、ES 細胞培養物における特異的抗体マーカーの欠如に関して検査又は特定されていない。それ自体で、また初期状態で、ES 細胞培養物における初期胚体内胚葉産生は、十分研究されていない。胚体内胚葉細胞に関する満足のいく抗体試薬が入手不可能であったため、特性化の大部分が、外胚葉及び胚体外内胚葉に焦点を当ててきた。概して、無作為に分化された ES 細胞培養物において SOX17^{hi} 胚体内胚葉細胞と比較して、有意により多数の胚体外細胞型及び神経外胚葉細胞型が存在する。

【0378】

未分化 hESC コロニーは線維芽細胞フィーダーの床上に広がるため、コロニーの縁にある細胞は、コロニーの内部に存在する細胞とは異なった別の形態を呈する。これらの外側の縁細胞の多くが、それらのあまり一様ではない、より大きな細胞体の形態により、またより高いレベルの OCT4 の発現により識別され得る。ES 細胞が分化し始めると、ES 細胞は、未分化 ES 細胞に対して、OCT4 発現のレベルを上方又は下方へ変更させることが記載されている。未分化閾値を上回るか、又は下回る OCT4 レベルの変更は、多能性状態から離れた分化の初期状態の表れであり得る。

【0379】

未分化コロニーが SOX17 免疫細胞化学により検査される場合、時折 SOX17 陽性細胞の小さな 10 ~ 15 個の細胞クラスターが、外縁上の無作為な位置で、また未分化 hESC コロニー間の接合部で検出された。上述したように、外側コロニー縁のこれらの散在ポケットは、コロニーのサイズが拡大し、且つより混雑してくるため、古典的な ES 細胞形態から離れて分化する第 1 の細胞のいくつかであるようであった。より若くてより小さな完全未分化コロニー (1 mm 未満、4 ~ 5 日齢) は、コロニー内で又はコロニーの縁で SOX17 陽性細胞を示さなかったのに対して、より老齢のより大きなコロニー (直径 1 ~ 2 mm、5 日齢超) は、いくつかのコロニーの外縁で、或いは上述の古典的な hESC 形態を示さない縁の内部の領域で、SOX17 陽性 AFP 陰性細胞の散発的な単離パッチを有していた。これが有効な SOX17 抗体の第 1 の発達であった場合、このような初期「未分化」ES 細胞培養物で発達する胚体内胚葉細胞は、これまでに実証されていない。

【0380】

Q-PCR による SOX17 及び SPARC 遺伝子発現レベルの逆相関に基づくと、これらの SOX17 陽性 AFP 陰性細胞の大部分が、抗体同時標識による壁側内胚葉マーカーに関して陰性であろう。これは、図 15 A 及び図 15 B に示されるように、TM 発現壁側内胚葉細胞に関して具体的に実証された。ノーダル因子であるアクチビン A 及びアクチビン B への暴露は、TM 発現の強度及び TM 陽性細胞の数の劇的な減少をもたらした。アクチビン処理培養物に関する SOX17、AFP 及び TM 抗体を使用した三重標識により

10

20

30

40

50

、A F P 及び T M に関しても陰性である S O X 1 7 陽性細胞のクラスターが観察された (図 1 6 A ~ 図 1 6 D) 。これらは、分化 h E S C 培養物における S O X 1 7 陽性胚体内胚葉細胞の第 1 の細胞標示である (図 1 6 A ~ 図 1 6 D 及び図 1 7) 。

【 0 3 8 1 】

上述の S O X 1 7 抗体及び Q - P C R ツールを用いて、本発明者等は、S O X 1 7^{hi} / A F P^{lo} / S P A R C / T M^{lo} 胚体内胚葉細胞となるように h E S C を効率的にプログラミングすることが可能な多数の手順を探究してきた。本発明者等は、S O X 1 7 遺伝子発現に関して Q - P C R により集団レベルで、及び S O X 1 7 タンパク質の抗体標識により個々の細胞のレベルで測定される場合、これらの細胞の数及び増殖能力を増大させることを目的とした様々な分化プロトコルを適用した。

10

【 0 3 8 2 】

本発明者等はまず、i n v i t r o 細胞培養物において胚性幹細胞から胚体内胚葉細胞を創出するのに使用するためのノーダル / アクチビン / B M P のような T G F β ファミリー増殖因子の影響を分析及び記載した。通常の実験では、アクチビン A、アクチビン B、B M P 又はこれらの増殖因子の組合せを未分化ヒト幹細胞系 h E S C y t - 2 5 の培養物へ添加して、分化プロセスを開始させた。

【 0 3 8 3 】

図 1 9 に示されるように、1 0 0 n g / m l でのアクチビン A の添加は、分化の 4 日目までに、未分化 h E S C に対して、S O X 1 7 遺伝子発現の 1 9 倍の誘導をもたらした。アクチビン A と共に、アクチビンファミリーの第 2 の成員であるアクチビン B を添加することにより、併用アクチビン処理の 4 日目までに、未分化 h E S C を上回る 3 7 倍の誘導をもたらされた。最後に、アクチビン A 及びアクチビン B と共に、ノーダル / アクチビン由来の T G F β ファミリーの第 3 の成員、並びに B M P サブグループである B M P 4 を添加することにより、未分化 h E S C の誘導の 5 7 倍に誘導を増大させた (図 1 9) 。アクチビン及び B M P による S O X 1 7 誘導を、因子無しの培地対照と比較した場合、5 倍、1 0 倍及び 1 5 倍の誘導が 4 日目の時点で生じた。アクチビン A、アクチビン B 及び B M P による三重処理の 5 日目までに、S O X 1 7 は、h E S C の 7 0 倍より高く誘導された。これらのデータは、ノーダル / アクチビン T G F β ファミリー成員のより高い用量及びより長い処理時間が S O X 1 7 の増大された発現をもたらすことを示している。

20

【 0 3 8 4 】

ノーダル並びに関連分子アクチビン A、アクチビン B 及び B M P は、i n v i v o 又は i n v i t r o で S O X 1 7 の発現及び胚体内胚葉形成を促進する。さらに、B M P の添加は、おそらくノーダル補助受容体である C r i p t o のさらなる誘導により、改善された S O X 1 7 の誘導をもたらす。

30

【 0 3 8 5 】

本発明者等は、B M P 4 と一緒にアクチビン A 及びアクチビン B の組合せが、S O X 1 7 誘導、したがって胚体内胚葉形成の相加的増大をもたらすことを実証している。アクチビン A 及びアクチビン B と組み合わせた長期間 (4 日を超える) の B M P 4 添加は、壁側内胚葉及び臓側内胚葉並びに胚体内胚葉において S O X 1 7 を誘導し得る。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、添加の 4 日以内に処理から B M P 4 を除去することは有益である。

40

【 0 3 8 6 】

個々の細胞レベルでの T G F β 因子処理の影響を確定するために、経時的な T G F β 因子添加を、S O X 1 7 抗体標識を使用して検査した。すでに図 1 0 A ~ 図 1 0 F で示したように、経時的に S O X 1 7 標識細胞の相対数が劇的に増大した。相対定量化 (図 2 0) は、S O X 1 7 標識細胞の 2 0 倍を超える増大を示す。この結果は、細胞の数並びに S O X 1 7 遺伝子発現レベルの両方が、T G F β 因子暴露の時間とともに増大していることを示す。図 2 1 に示されるように、ノーダル、アクチビン A、アクチビン B 及び B M P 4 への暴露の 4 日後に、S O X 1 7 誘導のレベルは、未分化 h E S C に対して 1 6 8 倍に到達した。図 2 2 は、S O X 1 7 陽性細胞の相対数もまた、用量応答性であったことを示す。

50

100 ng/ml 以上のアクチビン A 用量は、SOX17 遺伝子発現及び細胞数を強く誘導することが可能であった。

【0387】

TGFβファミリー成員のほかに、Wntファミリーの分子が、胚体内胚葉の特定化及び/又は維持において役割を果たし得る。Wnt分子の使用もまた、アクチビン単独を上回るアクチビン+Wnt3aで処理したサンプルにおける増大したSOX17遺伝子発現により示されるように、胚体内胚葉へのhESCの分化に有益であった(図23)。

【0388】

上述の実験はすべて、添加因子を伴って10%血清を含有する組織培養培地を使用して実施した。驚くべきことに、図24A~図24Cに示されるように、血清の濃度が、添加アクチビンの存在下でSOX17発現のレベルに対して影響することを本発明者等は発見した。血清レベルが10%から2%へ低減すると、SOX17発現は、アクチビンA及びアクチビンBの存在下で3倍になった。

10

【0389】

最後に、本発明者等は、アクチビン誘導SOX17⁺細胞が、図25A~図25Dに表されるように培養物中で分裂することを実証した。矢印は、PCNA/DAPI標識有糸分裂プレートパターン及び位相差有糸分裂プロファイルにより明らかなように有糸分裂中であるSOX17/PCNA/DAPIで標識された細胞を示す。

【0390】

〔実施例7〕

20

ケモカイン受容体4(CXCR4)発現は、胚体内胚葉に関するマーカーと相関し、中胚葉、外胚葉又は臓側内胚葉に関するマーカーとは相関しない

上述したように、hESCは、TGFβファミリー、より具体的にはアクチビン/ノーダルサブファミリーのサイトカインの適用により、胚体内胚葉の胚葉へ分化するように誘導することができる。さらに、本発明者等は、分化培養培地におけるウシ胎児血清(FBS)の比率が、hESCからの胚体内胚葉分化の効率に影響を及ぼすことを示している。この影響は、培地においてアクチビンAの所定濃度で、より高いレベルのFBSが胚体内胚葉への最大限の分化を阻害するようなものである。外因性アクチビンAの非存在下では、胚体内胚葉系統へのhESCの分化は、非常に非効率であり、FBS濃度は、hESCの分化プロセスに対して相当穏やかに影響する。

30

【0391】

これらの実験では、0.5%、2.0%又は10%FBSを補充し、且つ100 ng/mlのアクチビンAを伴うか、又は伴わないRPMI培地(Invitrogen, Carlsbad, CA、カタログ番号61870-036)中で6日間増殖させることにより、hESCを分化させた。さらに、分化の最初の3日間にわたる0.5%~2.0%に及ぶFBSのグラジエントもまた、100 ng/mlのアクチビンAと併用した。6日後に、反復サンプルを各培養条件から回収して、リアルタイム定量的PCRにより相対遺伝子発現に関して分析した。残存細胞は、SOX17タンパク質の免疫蛍光検出用に固定した。

【0392】

CXCR4の発現レベルは、使用した7つの培養条件にわたって劇的に変化した(図26)。概して、CXCR4発現は、アクチビンA処理培養物(A100)では高く、外因性アクチビンAを施さない培養物(NF)では低かった。さらに、A100処理培養物の中でも、CXCR4発現は、FBS濃度が最も低かった場合に最も高かった。相対発現が、アクチビンAを施さない条件(NF)により一致するように、10%FBS条件におけるCXCR4レベルが顕著に低減した。

40

【0393】

上述したように、SOX17、GSC、MIXL1及びHNF3β遺伝子の発現は、胚体内胚葉としての細胞の特性化と一致する。7つの分化条件に関するこれらの4つの遺伝子の相対発現は、CXCR4の相対発現を反映する(図27A~図27D)。このことは、CXCR4もまた胚体内胚葉のマーカーであることを実証する。

50

【0394】

外胚葉系統及び中胚葉系統は、各種マーカーのそれらの発現により胚体内胚葉と識別することができる。初期中胚葉は、遺伝子ブラキュリ及びMOX1を発現する一方で、新生神経外胚葉は、SOX1及びZIC1を発現する。図28A～図28Dは、外因性アクチビンAを施さない培養物が、中胚葉及び外胚葉の遺伝子発現に関して優先的に富化されたこと、及びアクチビンA処理培養物の中でも、10%FBS条件がまた、中胚葉及び外胚葉のマーカー発現の増大レベルを有したことを実証している。発現のこれらのパターンはCXCR4のパターンと反比例し、CXCR4が、この発達期間でhESCに由来する中胚葉又は外胚葉中ではそれほど高度に発現されないことを示した。

【0395】

哺乳類発達中の初期に、胚体外系統への分化もまた起こる。ここでは、SOX17を包含する胚体内胚葉と共通して多くの遺伝子の発現を共有する臓側内胚葉の分化が特に関連している。胚体内胚葉を胚体外臓側内胚葉と識別するためには、これらの2つの間を識別できるマーカーを検査するべきである。SOX7は、臓側内胚葉では発現されるが、胚体内胚葉系統では発現されないマーカーを表す。したがって、SOX7発現の非存在下での強固なSOX17遺伝子発現を示す培養条件は、胚体内胚葉を含有し、臓側内胚葉を含有しない可能性が高い。SOX7が、アクチビンAを施さない培養物において高度に発現され、SOX7はまた、FBSが10%で包含される場合に、アクチビンAの存在下でさえ増大された発現を示したことが図28Eに示されている。このパターンは、CXCR4発現パターンの逆であり、CXCR4が、臓側内胚葉ではあまり高度に発現されないことを示唆する。

【0396】

上述の分化条件それぞれに存在するSOX17免疫反応性(SOX17⁺)細胞の相対数もまた確定した。hESCは、高用量アクチビンA及び低FBS濃度(0.5%～2.0%)の存在下で分化させた場合、SOX17⁺細胞は、培養物全体にわたって遍在的に分布した。高用量アクチビンAを使用した、FBSは10%(v/v)で包含された場合、SOX17⁺細胞は、相当低い頻度で出現し、培養物全体にわたって均一に分布されるのではなく、常に単離クラスターに出現した(図29A及び図29C、並びに図29B及び図29E)。外因性アクチビンAが使用されなかった場合に、SOX17⁺細胞のさらなる減少が観察された。これらの条件下では、SOX17⁺細胞はまたクラスターに出現し、これらのクラスターは、高アクチビンA低FBS処理で見出されるものよりも小さく、且つ相当稀であった(図29C及び図29F)。これらの結果は、CXCR4発現パターンが、各条件下で胚体内胚葉遺伝子発現に対応するだけでなく、胚体内胚葉細胞の数にも対応することを実証している。

【0397】

〔実施例8〕

胚体内胚葉に関して富化する分化条件は、CXCR4陽性細胞の比率を増大させる

アクチビンAの用量はまた、胚体内胚葉をhESCから得ることができる効率に影響を及ぼす。本実施例は、アクチビンAの用量を増大させることにより培養物におけるCXCR4⁺細胞の比率が増大することを実証する。

【0398】

hESCは、0.5%～2%FBS(分化の最初の3日にわたって0.5%から1.0%、そして2.0%へ増大される)及び0、10又は100ng/mlのアクチビンAを補充したRPMI培地中で分化させた。分化の7日後に、2%FBS及び2mM(EDTA)を含有するCa²⁺/Mg²⁺を伴わないPBS中で、室温で5分間、細胞を解離させた。細胞は、35µmナイロンフィルタに通して濾過して、計数して、ペレット化した。ペレットは、少量の50%ヒト血清/50%正常口バ血清中に再懸濁させて、氷上で2分間インキュベートして、非特異的抗体結合部位をブロックした。これに、50µl(およそ10⁵個の細胞を含有する)当たり1µlのマウス抗CXCR4抗体(Abcam、カタログ番号ab10403-100)を添加して、標識を氷上で45分間進めた。細胞は、2%ヒ

10

20

30

40

50

ト血清を含有する P B S (緩衝液) 5 m l を添加することにより洗浄して、ペレット化した。緩衝液 5 m l による 2 回目の洗浄を完了させた後、細胞は、 10^5 個の細胞当たり緩衝液 $50 \mu l$ 中に再懸濁させた。二次抗体 (F I T C 結合ロバ抗マウス、Jackson Immuno Research、カタログ番号 7 1 5 - 0 9 6 - 1 5 1) を最終濃度 $5 \mu g / m l$ で添加して、30 分間標識させた後、上述のように緩衝液中で 2 回洗浄を行った。細胞は、緩衝液中に 5×10^6 個の細胞 / m l で再懸濁させて、フローサイトメトリーの中心的な施設 (The Scripps Research Institute) にてスタッフにより F A C S V a n t a g e (Beckton Dickinson) を使用して分析及び選別した。細胞は、これに続くリアルタイム定量的 P C R による遺伝子発現分析用の総 R N A の単離のために、R L T 溶解緩衝液 (Qiagen) に直接回収した。

10

【 0 3 9 9 】

フローサイトメトリーにより確定される場合の C X C R 4⁺ 細胞の数は、アクチビン A の用量が分化培養培地中で増大されると、劇的に増加することが観察された (図 3 0 A ~ 図 3 0 C) 。 C X C R 4⁺ 細胞は、R 4 ゲート内に納まるものであり、このゲートは、事象の 0 . 2 % が R 4 ゲートに位置される二次抗体のみの対照を使用して設定された。C X C R 4⁺ 細胞数の劇的な増大は、アクチビン A 用量が増大される場合に、胚体内胚葉遺伝子発現における強固な増大と相関する (図 3 1 A ~ 図 3 1 D) 。

【 0 4 0 0 】

〔 実施例 9 〕

C X C R 4 陽性細胞の単離は、胚体内胚葉遺伝子発現に関して富化し、また中胚葉、外胚葉及び臓側内胚葉のマーカーを発現する細胞を激減させる

20

上記実施例 8 で同定される C X C R 4⁺ 細胞及び C X C R 4⁻ 細胞を回収して、相対遺伝子発現に関して分析し、母集団の遺伝子発現を同時に確定した。

【 0 4 0 1 】

C X C R 4 遺伝子発現の相対レベルは、アクチビン A の用量の増大に伴って劇的に増大した (図 3 2) 。これは、C X C R 4⁺ 細胞のアクチビン A 用量依存的増大と極めて強く相関した (図 3 0 A ~ 図 3 0 C) 。また、各集団からの C X C R 4⁺ 細胞の単離は、この集団中のほぼすべての C X C R 4 遺伝子発現を占めたことも明らかである。これは、これらの細胞を回収するための F A C S 方法の効率を実証している。

【 0 4 0 2 】

30

遺伝子発現分析により、C X C R 4⁺ 細胞は、C X C R 4 遺伝子発現の大部分を含有するだけでなく、C X C R 4⁺ 細胞はまた、胚体内胚葉の他のマーカーに関する遺伝子発現も含有することが明らかとなった。図 3 1 A ~ 図 3 1 D に示されるように、C X C R 4⁺ 細胞はさらに、S O X 1 7、G S C、H N F 3 B 及び M I X L 1 に関して A 1 0 0 母集団を上回って富化した。さらに、C X C R 4⁻ 分画は、これらの胚体内胚葉マーカーに関して非常に少ない遺伝子発現を含有した。さらに、C X C R 4⁺ 及び C X C R 4⁻ 集団は、中胚葉、外胚葉及び胚体外内胚葉のマーカーに関して逆パターンの遺伝子発現を示した。図 3 3 A ~ 図 3 3 D は、C X C R 4⁺ 細胞が、A 1 0 0 母集団に対してブラキュリ、M O X 1、Z I C 1 及び S O X 7 の遺伝子発現に関して激減したことを示す。この A 1 0 0 母集団は、低用量条件又はアクチビン A 無しの条件に対して、これらのマーカーの発現がすでに低かった。これらの結果は、高アクチビン A の存在下で分化される h E S C からの C X C R 4⁺ 細胞の単離は、胚体内胚葉に関して高度に富化され、且つ実質的に純粋な胚体内胚葉である集団を生じることを示す。

40

【 0 4 0 3 】

〔 実施例 1 0 〕

C X C R 4 を使用した細胞集団中の胚体内胚葉細胞の定量

本明細書中ですでに確定されるような、及び 2 0 0 3 年 1 2 月 2 3 日に出願された「胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM)」と題する米国仮特許出願第 6 0 / 5 3 2 , 0 0 4 号で確定されるような細胞培養物又は細胞集団中に存在する胚体内胚葉細胞の比率の定量を確認するために、C X C R 4 及び胚体内胚葉の他のマーカーを発現する細胞を F A C S によ

50

り分析した。

【0404】

上記実施例に記載されるような方法を使用して、hESCを分化させて、胚体内胚葉を産生した。特に、分化細胞培養物における収率及び純度を増大させるために、培地の血清濃度を以下の通りに制御した：1日目には0.2% FBS、2日目には1.0% FBS及び3～6日目には2.0% FBS。分化培養物は、3つの細胞表面エポトープであるE-カドヘリン、CXCR4及びトロンボモジュリンを使用して、FACSにより選別した。続いて、選別した細胞集団をQ-PCRにより分析して、胚体内胚葉及び胚体外内胚葉並びに他の細胞型に関するマーカーの相対発現レベルを確定した。最適に分化させた培地から採取されるCXCR4選別細胞は、98%を超える純度の胚体内胚葉細胞の単離をもたらした。

10

【0405】

表2は、本明細書中に記載する方法を使用してhESCから分化させた胚体内胚葉培養物に関するマーカー分析の結果を示す。

【0406】

【表2】

マーカー	表2 胚体内胚葉培養物の組成			
	培養物のパーセント	胚体内胚葉のパーセント	胚体外内胚葉のパーセント	hESC細胞のパーセント
SOX17	70-80	100		
トロンボモジュリン	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
他 (ECAD陰性)	10-20			
総計	100	100	100	100

20

【0407】

特に、表2は、CXCR4及びSOX17陽性細胞（内胚葉）が細胞培養物における細胞の70%～80%を構成したことを示す。これらのSOX17発現細胞のうち、少なくとも2%がTM（壁側内胚葉）を発現し、1%未満がAFP（臓側内胚葉）を発現した。TM陽性細胞とAFP陽性細胞との比率（組み合わせた壁側内胚葉及び臓側内胚葉、総計3%）をSOX17/CXCR4陽性細胞の比率から差し引きした後、細胞培養物の約67%～約77%が胚体内胚葉であったことが観察され得る。およそ10%の細胞が、hESCに関するマーカーであるE-カドヘリン（ECAD）に関して陽性であり、細胞の約10～20%が他の細胞型であった。

30

【0408】

FACS分離前に得られる分化細胞培養物における胚体内胚葉の純度は、5～6日の分化手順全体にわたって0.5%以下にFBS濃度を維持することにより、上述の低血清手順と比較して改善させることができることを本発明者等は発見している。しかしながら、5～6日の分化手順全体にわたって0.5%以下に細胞培養物を維持することはまた、産生される胚体内胚葉細胞の総数の低減をもたらす。

40

【0409】

本明細書中に記載する方法により産生される胚体内胚葉細胞は、それほどの分化を伴わずに50日より長い間、アクチビンの存在下で培養において維持及び拡大されている。このような場合では、SOX17、CXCR4、MIXL1、GATA4、HNF3β発現は、培養期間にわたって維持される。さらに、TM、SPARC、OCT4、AFP、SOX7、ZIC1及びBRACHは、これらの培養物では検出されなかった。このような細胞は、それほどの分化を伴わずに50日より実質的に長い間、培養において維持及び拡大させることができる可能性が高い。

50

【0410】

〔実施例11〕

胚体内胚葉細胞のさらなるマーカー

以下の実験では、精製胚体内胚葉及びヒト胚性幹細胞集団からRNAを単離した。続いて、遺伝子発現は、各精製集団由来のRNAの遺伝子チップ分析により分析した。Q-PCRも実施して、胚体内胚葉に関するマーカーとして、胚体内胚葉では発現されるが、胚性幹細胞では発現されない遺伝子の潜在性をさらに研究した。

【0411】

ヒト胚性幹細胞(hESC)は、20%ノックアウト血清代替物、4ng/mlの組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、L-グルタミン、非必須アミノ酸及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM/F12培地中で維持された。hESCは、100ng/mlの組換えヒトアクチビンA、ウシ胎児血清(FBS)及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したRPMI培地中で5日間培養することにより胚体内胚葉へ分化させた。FBSの濃度は、各日以下の通りに変化させた: 0.1%(1日目)、0.2%(2日目)、2%(3~5日目)。

【0412】

遺伝子発現分析用のhESC及び胚体内胚葉の精製集団を得るために、細胞を蛍光活性化細胞選別器(FACS)により単離した。免疫精製は、hESCに関してはSSEA4抗原(R&D Systems、カタログ番号FAB1435P)を使用して、また胚体内胚葉に関してはCXCR4(R&D Systems、カタログ番号FAB170P)を使用して達成された。細胞は、トリプシン/EDTA(Invitrogen、カタログ番号25300-054)を使用して解離させて、2%ヒト血清を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄して、氷上で10分間100%ヒト血清中に再懸濁させて、非特異的結合をブロックした。染色は、ヒト血清800µl中で 5×10^6 個の細胞にフィコエリトリン結合抗体200µlを添加することにより氷上で30分間実施した。細胞をPBS緩衝液8mlで2度洗浄して、同1ml中に再懸濁させた。FACS単離は、FACS Vantage(BD Biosciences)を使用して、The Scripps Research Instituteの中心的な施設により実施された。細胞は、RLT溶解緩衝液に直接回収して、RNAは、製造業者の指示書に従ってRNeasy(Qiagen)により単離した。

【0413】

精製RNAは、Affymetrixプラットフォーム及びU133プラス2.0高密度オリゴヌクレオチドアレイを使用して、発現プロファイルデータの作成のためにExpression Analysis(Durham, NC)に複製して提出した。提示されたデータは、2つの集団、すなわちhESCと胚体内胚葉との間で差次的に発現する遺伝子を同定する群の比較である。hESCに見出される発現レベルを上回る強固な上方変化を示す遺伝子は、胚体内胚葉の高度に特性化される新たな候補マーカーとして選択された。選択遺伝子は、上述のようにQ-PCRによりアッセイして、遺伝子チップ上に見られる遺伝子発現変化を確認し、また経時的なhESC分化のこれらの遺伝子の発現パターンを研究した。

【0414】

図34A~図34Mは、或る特定のマーカーに関する遺伝子発現の結果を示す。結果は、100ng/mlアクチビンAの添加の1日後、3日後及び5日後に分析した細胞培養物、5日目の分化手順の終わりに精製されたCXCR4発現性胚体内胚葉細胞(CXDE)に関して、及び精製hESCにおいて表示される。図34C及び図34G~図34Mの比較により、6つのマーカー遺伝子、すなわちFGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及びCRIP1が、互いにほぼ同一であり、且つまたCXCR4の発現のパターン及びSOX17/SOX7の比と同一である発現パターンを示す。上述したように、SOX17は、胚体内胚葉並びにSOX7発現胚体外内胚葉の両方において発現される。SOX7は胚体内胚葉で発現されないため、SOX17/SOX7の比は、全体として集団において証明されるSOX17発現への胚体内胚葉の寄与の信頼性高い推定を提供する。パネルCに対するパネルG~L及びMの類似性は、FGF17、VWF、CA

LCR、FOXQ1、CMKOR1及びCRIP1が、胚体内胚葉のマーカーである可能性が高いこと、及びそれらが胚体外内胚葉細胞で有意に発現されないことを示す。

【0415】

本明細書中に記載されるQ-PCRの結果は、ICCによりさらに確認することができることが理解されよう。

【0416】

〔実施例12〕

レチノイン酸及びFGF-10は、胚体内胚葉培養物において特異的にPDx1を誘導する

以下の実験は、RA及びFGF-10が胚体内胚葉細胞においてPDx1の発現を誘導することを実証する。

【0417】

ヒト胚性幹細胞をアクチビン有り又は無しで4日間培養した。4日目に、1 μ M RA及び50 ng/ml FGF-10を細胞培養物へ添加した。RA/FGF-10添加の48時間後に、PDx1マーカー遺伝子及び前腸内胚葉に特異的でない他のマーカー遺伝子の発現をQ-PCRにより定量した。

【0418】

胚体内胚葉細胞へのRAの適用は、臓側内胚葉(SOX7、AFP)、神経(SOX1、ZIC1)又はニューロン(NFM)遺伝子発現マーカーの発現を増大させずに(図36A~図36Fを参照)、PDx1遺伝子発現の強固な増大を引き起こした(図35を参照)。PDx1遺伝子発現は、1 μ M RA及び50 ng/ml FGF-10への暴露の48時間後に、胚体内胚葉において観察されるものよりもおよそ500倍高いレベルまで誘導された。さらに、これらの結果は、実質的なPDx1誘導が、RA適用に先立ってアクチビンを施さない培養物に比べてアクチビン処理細胞培養物に見出される160倍高いPDx1発現により示されるように、胚体内胚葉(SOX17)に予め分化させた細胞培養物においてのみ起こったことを示す。

【0419】

〔実施例13〕

FGF-10は、RA単独を上回るPDx1発現のさらなる増大を提供する

本実施例は、RA及びFGF-10の組合せが、RA単独よりも大いにPDx1発現を誘導することを示す。

【0420】

これまでの実施例と同様に、hESCは、アクチビン有り又は無しで4日間培養した。4日目に、細胞を以下のうちの1つで処理した：1 μ M RA単独、FGF-4又はFGF-10のいずれかと併用した1 μ M RA、或いはFGF-4及びFGF-10の両方と併用した1 μ M RA。PDx1、SOX7及びNFMの発現は、RA又はRA/FGFの96時間後に、Q-PCRにより定量された。

【0421】

アクチビン、これに続くレチノイン酸によるhESC培養物の処理は、PDx1遺伝子発現の60倍の増大を誘導した。RA処理物へのFGF-4の添加は、わずかに多いPDx1を誘導した(RA単独に対しておよそ3倍)。しかしながら、FGF-10及びレチノイン酸を共に添加することにより、PDx1の誘導はさらに、RA単独に対して60倍増強された(図37Aを参照)。この非常に強固なPDx1誘導は、アクチビン無し又はRA/FGF処理を用いた場合よりも1400倍超高かった。興味深いことに、FGF-4及びFGF-10の添加は、FGF-10の有益な効果を同時に根絶させて、FGF-4添加に起因してわずかなPDx1の増大のみをもたらした。

【0422】

RA/FGF-4又はRA/FGF-10の組合せの添加は、RA/FGFの組合せに暴露させない細胞と比較した場合、前腸内胚葉に関連しないマーカー遺伝子の発現を増大させなかった(図37B及び図37Cを参照)。

【0423】

〔実施例14〕

レチノイン酸用量は、*in vitro*で前方-後方(A-P)位置に影響を及ぼす

RAの用量が*in vitro*細胞培養物のA-P位置に影響を及ぼすかどうかを判定するために、以下の実験を実施した。

【0424】

ヒト胚性幹細胞は、アクチビン有り又は無しで4日間培養した。4日目に、50 ng/mlのFGF-10は、0.04 μM、0.2 μM又は1.0 μMで、RAを併用して培養物に添加された。PDX1マーカー遺伝子の発現並びに前腸内胚葉に特異的でない他のマーカーの発現をQ-PCRにより定量化した。

10

【0425】

50 ng/mlでのFGF-10と併用した様々な用量でのレチノイン酸の添加は、特異的な前方-後方位置パターンと相関する差次的遺伝子発現パターンを誘導した。RAの最大用量(1 μM)は、前方の内胚葉マーカー(HOXA3)の発現を優先的に誘導し、またPDX1の最も強固な増大をもたらした(図38A及び図38B)。RAの中間用量(0.2 μM)は、中腸内胚葉マーカー(CDX1、HOC6)を誘導した(図38C及び図41Eを参照)のに対して、RAの最小用量(0.04 μM)は、後腸内胚葉マーカー(HOXA13)を優先的に誘導した(図38Dを参照)。RA用量は、神経(SOX1)又はニューロン(NFM)マーカーのいずれかの相対発現に対して実質的に影響しなかった(図38F及び図38Gを参照)。本実施例は、*in vitro*でモルフォゲンとしての、特に分化hESCの内胚葉誘導体のモルフォゲンとしてのRAの使用を示す。

20

【0426】

〔実施例15〕

B27サプリメントの使用は、PDX1の発現を増強する

胚体内胚葉におけるPDX1発現は、多数の因子の使用及び細胞増殖/分化状態により影響を与え得る。以下の実験では、本発明者等はB27サプリメントの使用が胚体内胚葉細胞においてPDX1の発現を増強することを示す。

【0427】

ヒト胚性幹細胞は、マウス胚線維芽細胞フィーダー上で増殖させた未分化hES細胞を高用量のアクチビンA(0.5~2% FBS/DMEM/F12中100~200 ng/ml)で4日間処理することにより胚体内胚葉へ分化するように誘導された。アクチビンA無しの対照に、アクチビンAを添加せずに0.5~2% FBS/DMEM/F12を施した。4日目に、培養物に、2% FBS中のアクチビンA無し(無し)及び2%血清代替物中のアクチビンA無し(SR)、又は2% FBS/DMEM/F12中の2 μM RA及び50 ng/ml FGF-10と共に50 ng/mlのアクチビンA(無し、+FBS、+B27)、並びに同様に2%血清代替物(SR)の2 μM RA及び50 ng/ml FGF-10と共に50 ng/mlのアクチビンAのいずれかを施した。B27サプリメント(Gibco/BRL)は、2% FBS/DMEM/F12へ直接50倍希釈として添加した(+B27)。二重反復細胞サンプルを各点に関して採取して、総RNAを単離して、上述のようにQ-PCRへ付した。

30

40

【0428】

図39A~図39Eは、無血清サプリメントB27が、血清無しで増殖させた細胞におけるこのようなマーカー遺伝子発現と比較した場合、前腸内胚葉に特異的でないマーカー遺伝子の発現の増大を誘導することなく、PDX1遺伝子発現の誘導にさらなる有益性を提供することを示す。

【0429】

〔実施例16〕

PDX1の誘導を増強するためのアクチビンBの使用

本実施例は、アクチビンBの使用が、*in vitro*細胞培養物においてPDX1陽

50

性細胞へのPD_X1陰性細胞の分化を増強することを示す。

【0430】

ヒト胚性幹細胞は、マウス胚線維芽細胞フィーダー上で増殖させた未分化hESC細胞を低血清/RPMI中の高用量のアクチビンA(50 ng/ml)で6日間処理することにより胚体内胚葉へ分化するように誘導された。FBS用量は、1日目に0%、2日目に0.2%、及び3~6日目に2%であった。胚体内胚葉産生に関する陰性対照(NF)には、アクチビンAを添加せずに2%FBS/RPMIを施した。PD_X1発現を誘導するために、培養物それぞれに、6日目に2%FBS/RPMI中で2 µMにてレチノイン酸を施した。1日目~5日目にアクチビンAで処置した培養物に、種々の用量で組み合わせたアクチビンA及びアクチビンBを供給したか、或いは50 ng/mlのアクチビンA単独状態を維持した。アクチビンA無しの対照培養物(NF)にはアクチビンAもアクチビンBも供給しなかった。このRA/アクチビン処理は3日間実施して、3日目にPD_X1遺伝子発現を二重反復細胞サンプルからのQ-PCRにより測定した。

10

【0431】

図40Aは、25 ng/ml(A25)又は50 ng/ml(A50)のアクチビンAの存在下での10~50 ng/ml(a10、a25及びa50)の範囲の用量でのアクチビンBの添加が、50 ng/mlでアクチビンAのみを施した培養物を少なくとも2倍PD_X1発現を増大させたことを示す。アクチビンBの添加の結果としてのPD_X1の増大は、発達におけるこの時点で肝臓並びに膵臓に関するマーカーであるHNF6発現の増大を伴わなかった(図40Bを参照)。この結果は、膵臓へ分化している細胞の比率が肝臓に比べて増大していることを示唆する。

20

【0432】

〔実施例17〕

PD_X1の誘導を増強するための血清用量の使用

胚体内胚葉細胞におけるPD_X1の発現は、分化プロセス全体にわたって細胞培養物中に存在する血清の量により影響を受ける。以下の実験は、PD_X1陰性胚体内胚葉へのhESCの分化中の培養物における血清のレベルが、PD_X1陽性内胚葉へのこれらの細胞のさらなる分化中のPD_X1の発現に影響することを示す。

【0433】

ヒト胚性幹細胞は、マウス胚線維芽細胞フィーダー上で増殖させた未分化hESCを、低血清/RPMI中の高用量のアクチビンA(100 ng/ml)で5日間処理することにより胚体内胚葉へ分化するように誘導された。FBS用量は、1日目に0.1%、2日目に0.5%、及び3~5日目に0.5%、2%又は10%のいずれかであった。アクチビンA無しの対照(NF)には、毎日同じFBS/RPMI投与を施したが、アクチビンAは添加しなかった。PD_X1発現は、RAの添加により6日目に誘導を開始した。6~7日目中に、培養物に、0.5%FBS/RPMI中で2 µMにて、8日目に1 µMにて、及び9~11日目に0.2 µMにてレチノイン酸を施した。アクチビンAは、レチノイン酸処理中50 ng/mlへ低減させて、アクチビンA無しの対照(NF)から取り去った。

30

【0434】

図41Aは、3日間の胚体内胚葉誘導(3日目、4日目及び5日目)中のFBS投与は、レチノイン酸処理中にPD_X1遺伝子発現の誘導を変化させる持続的な能力を有したことを示す。これは、ZIC1(図41B)又はSOX7(図41C)遺伝子発現の発現パターンの有意な変更を伴わなかった。

40

【0435】

〔実施例18〕

PD_X1の誘導を増強するための条件培地の使用

また、胚体内胚葉細胞におけるPD_X1の発現に影響を与える他の因子及び成長条件を研究した。以下の実験は、PD_X1陽性内胚葉細胞へのPD_X1陰性胚体内胚葉細胞の分化に対する条件培地の影響を示す。

50

【0436】

ヒト胚性幹細胞は、マウス胚線維芽細胞フィーダー上で増殖させた未分化hESC細胞を、低血清/RPMI中の高用量のアクチビンA(100 ng/ml)で5日間処理することにより胚体内胚葉へ分化するように誘導された。FBS用量は、1日目に0.2%、2日目に0.5%、及び3~5日目に2%であった。

【0437】

続いて、5日間のアクチビンA処理により生成された胚体内胚葉培養物は、25 ng/mlでアクチビンAを含有する2%FBS/RPMI中でのRAの添加により、PDX1発現内胚葉へ分化するように4日間誘導させた。RAは、添加の最初の2日間に関しては2 μM、3日目には1 μM、及び4日目には0.5 μMであった。PDX1誘導に関するこの基本培地は、新鮮な状態で(2A25R)或いは4つの異なる細胞集団のうちの1つにより24時間条件付けした後に供給された。条件培地(CM)は、マウス胚線維芽細胞(MEF CM)から、或いは3つの条件、i)3%FBS/RPMI(CM2)又はii)アクチビンA(CM3)又はiii)骨形態形成タンパク質4(BMP4)(CM4)のうちの1つによりまず5日間分化させたhESCから生成した。アクチビンA又はBMP4因子は、上述したものと同一FBS投与レジメン(0.2%、0.5%、2%)下で100 ng/mlで供給された。これらの3つの異なる分化パラダイムは、PDX1誘導培地が条件付けられ得るヒト細胞の3つの非常に異なる集団を生じる。増殖因子を添加しない3%FBS(NF)は、大部分が胚体外内胚葉細胞、外胚葉細胞及び中胚葉細胞で構成される不均一集団を生じる。アクチビンA処理培養物(A100)は、大部分の胚体内胚葉をもたらし、BMP4処理培養物(B100)は、主として栄養外胚葉及び幾らかの胚体外内胚葉をもたらし、

10

20

【0438】

図42Aは、PDX1がRA処理の最初の2日間にわたって新鮮な培地及び条件培地において同等に誘導されたことを示す。しかしながら、3日目までには、PDX1発現は、新鮮な培地及びMEF条件培地処理において減少し始めた。分化されたhESCは、維持、或いは新鮮な培地よりも3~4倍高いレベルでPDX1遺伝子発現のさらなる増大をもたらす条件培地を生じた。hESC条件培地において高PDX1発現を維持する効果はさらに、RA処理の4日目に増幅されて、新鮮な培地よりも6~7倍高いレベルを達成した。図42Bは、条件培地処理が、CDX1遺伝子発現の相当低いレベルをもたらす、遺伝子は、PDX1発現内胚葉の領域では発現されなかったことを示す。これは、PDX1発現内胚葉の全体的な純度が、分化されたhESC培養物から生成される条件培地で胚体内胚葉を処理することによりかなり増強されたことを示している。

30

【0439】

図43は、PDX1遺伝子発現が、胚体内胚葉細胞へ適用させる条件培地の量に対する陽性の用量応答を示したことを示す。各プレートへ添加される培地の総容量は5 mlであり、条件培地の指示容量(図43を参照)は、新鮮な培地(A25R)へ希釈した。新鮮な培地4 mlへ添加される条件培地ちょうど1 mlは、依然として新鮮な培地単独5 mlよりも高いPDX1発現レベルを誘導及び維持することが可能であったことに留意されたい。これは、PDX1発現内胚葉の誘導に関する条件培地の有益な効果が、細胞から条件培地への幾らかの物質(単数又は複数)の放出に依存的であること、及びこの物質(単数又は複数)が、PDX1発現内胚葉の産生を用量依存的に増強することを示唆する。

40

【0440】

〔実施例19〕

PDX1へ結合する抗体の確証

PDX1へ結合する抗体は、細胞集団中のPDX1発現の誘導をモニタリングするための有用なツールである。本実施例は、PDX1に対するウサギポリクローナル抗体及びIgY抗体を使用して、このタンパク質の存在を検出することができることを示す。

【0441】

第1の実験では、細胞溶解産物におけるPDX1と結合するIgY抗PDX1(IgY

50

α - P D X 1) 抗体をウェスタンブロット分析により確認した。この分析で、M D X 1 2 ヒト線維芽細胞又は P D X 1 発現ベクターで予め 2 4 時間トランスフェクトした M D X 1 2 細胞由来の総細胞溶解産物 5 0 μ g への I g Y α - P D X 1 抗体の結合を比較した。細胞溶解産物は、S D S - P A G E により分離して、エレクトロブロッティングにより膜へ転写して、その後 I g Y α - P D X 1 一次抗血清で、それに続いてアルカリホスファターゼ結合ウサギ抗 I g Y (R b α - I g Y) 二次抗体でプロービングした。一次抗体及び二次抗体の種々の希釈は、細長い膜 (strips of the membrane) を分離するために以下の組合せで適用した: A (5 0 0 倍一次希釈、1 0 , 0 0 0 倍二次希釈)、B (2 , 0 0 0 倍、1 0 , 0 0 0 倍)、C (5 0 0 倍、4 0 , 0 0 0 倍)、D (2 , 0 0 0 倍、4 0 , 0 0 0 倍)、E (8 , 0 0 0 倍、4 0 , 0 0 0 倍)。

10

【 0 4 4 2 】

結合は、試験した抗体の組合せすべてにて P D X 1 発現ベクター (P D X 1 陽性) でトランスフェクトした細胞中で検出された。最大濃度の一次抗体及び二次抗体の両方を共に使用する場合 (組合せ A) で、結合は、トランスフェクトしていない (P D X 1 陰性) 線維芽細胞において観察されるのみであった。このような非特異的結合は、トランスフェクトした線維芽細胞及びトランスフェクトしていない線維芽細胞の両方において P D X 1 よりもわずかに高い分子量でのさらなるバンドの検出を特徴とした。

【 0 4 4 3 】

第 2 の実験では、P D X 1 へのポリクローナルウサギ抗 P D X 1 (R b α - P D X 1) 抗体の結合を免疫組織化学により試験した。このような実験用の P D X 1 発現細胞を産生するために、M S 1 - V 細胞 (A T C C # C R L - 2 4 6 0) を P D X 1 E G F P の発現ベクター (p E G F P - N 1 (Clontech) を用いて構築した) で一過的にトランスフェクトした。続いて、トランスフェクト細胞を R b α - P D X 1 及び α - E G F P 抗血清で標識した。トランスフェクト細胞は、C y 5 結合二次抗体の使用による E G F P 蛍光並びに α - E G F P 免疫組織化学の両方により可視化した。P D X 1 免疫蛍光は、 α - R b C y 3 結合二次抗体の使用により可視化した。

20

【 0 4 4 4 】

R b α - P D X 1 及び α - E G F P 抗体の結合は、G P F 発現と共局在化した。

【 0 4 4 5 】

〔 実施例 2 0 〕

30

ヒト膵臓組織の免疫組織化学

本実施例は、P D X 1 に対する特異性を有する抗体を使用して、免疫組織化学によりヒト P D X 1 陽性細胞を同定することができることを示す。

【 0 4 4 6 】

第 1 の実験では、ヒト膵臓のパラフィン包埋切片を、2 0 0 倍希釈でのモルモット抗インスリン (G p α - I n s) 一次抗体で、これに続いて 1 0 0 倍希釈での C y 2 へ結合されたイヌ抗モルモット (D α - G P) 二次抗体でインスリンに関して染色した。第 2 の実験では、ヒト膵臓の同じパラフィン包埋切片を、4 0 0 0 倍希釈での I g Y α - P D X 1 一次抗体で、これに続いて 3 0 0 倍希釈での A F 5 5 5 へ結合された R b α - I g Y 二次抗体で P D X 1 に関して染色した。第 1 の実験及び第 2 の実験から回収した画像を併せた。第 3 の実験では、I g Y α - P D X 1 抗体で染色した細胞を D A P I でも染色した。

40

【 0 4 4 7 】

ヒト膵臓切片の分析により、ランゲルハンス島の強力な染色の存在が明らかとなった。最強の P D X 1 シグナルは島 (インスリン陽性) に出現したが、弱い染色は腺房組織 (インスリン陰性) でも観察された。D A P I 及び P D X 1 同時染色は、P D X 1 が、大部分 (しかし、排他的ではない) 核へ局在化したことを示す。

【 0 4 4 8 】

〔 実施例 2 1 〕

レチノイン酸処理細胞からの P D X 1 の免疫沈降

50

R A の存在下で分化させた胚体内胚葉細胞における P D X 1 発現、及び R A を用いて分化させなかった胚体内胚葉細胞における P D X 1 の欠如をさらに確認するために、ウサギ抗 P D X 1 (R b α - P D X 1) 抗体を使用して、R A 分化させた胚体内胚葉細胞及び未分化の胚体内胚葉細胞の両方から P D X 1 を免疫沈降させた。免疫沈降させた R A は、I g Y α - P D X 1 抗体を使用してウェスタンブロット分析により検出した。

【 0 4 4 9 】

免疫沈降用の未分化の胚体内胚葉細胞溶解産物及び分化した胚体内胚葉細胞溶解産物を得るために、h E S C を低血清中で 1 0 0 n g / m l でのアクチビン A で 5 日間処理した (胚体内胚葉) 後、5 0 n g / m l でのアクチビン A 及び 2 μ M のオールトランス R A で 2 日間 (1 μ M で 1 日間、及び 0 . 2 μ M で 1 日間) 処理した (P D X 1 陽性前腸内胚葉) 。陽性対照として、細胞溶解産物はまた、P D X 1 発現ベクターでトランスフェクトした M S 1 - V 細胞 (A T C C # C R L - 2 4 6 0) から調製した。P D X 1 は、R b α - P D X 1 及びウサギ特異的二次抗体を各溶解産物へ添加することにより免疫沈降させた。沈降物を遠心分離により回収した。免疫沈降物を S D S 含有緩衝液中に溶解させた後、ポリアクリルアミドゲル上へ充填した。分離後、タンパク質をエレクトロブロッティングにより膜へ転写し、その後 I g Y α - P D X 1 一次抗体、これに続いて標識 R b α - I g Y 二次抗体でプロービングした。

10

【 0 4 5 0 】

M S 1 - V 陽性対照細胞から回収した免疫沈降物並びに 8 日目 (レーン d 8 、 R A 処理の開始の 3 日後) 及び 9 日目 (レーン d 9 、 R A の開始の 4 日後) の細胞からの免疫沈降物は、P D X 1 タンパク質に関して陽性であった (図 4 4) 。未分化の胚体内胚葉細胞 (すなわち、アクチビン A で処理した 5 日目の細胞 - 図 4 4 において (A) で示す) 及び未分化の h E S C (すなわち、未処理の 5 日目の細胞 - 図 4 4 において (N F) で示す) から得られた沈降物は P D X 1 に関して陰性であった。

20

【 0 4 5 1 】

〔 実施例 2 2 〕

P D X 1 プロモーター - E G F P トランスジェニック h E S C 系の生成

細胞単離に関して P D X 1 マーカーを使用するために、本発明者等は、P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞を発現可能なレポーター遺伝子で遺伝的にタグ付けした。本実施例は、P D X 1 調節領域の制御下でレポーター遺伝子を含むレポーターカセットを含むベクターの構築について記載する。本実施例はまた、このベクターでトランスフェクトした細胞 (例えば、ヒト胚性幹細胞) 、並びにそのゲノムに組み込まれたこのレポーターカセットを有する細胞の調製について記載する。

30

【 0 4 5 2 】

レポーター遺伝子で遺伝的にタグ付けした P D X 1 発現胚体内胚葉細胞系は、P D X 1 遺伝子の調節領域 (プロモーター) の制御下に G F P レポーター遺伝子を配置させることにより構築された。まず、E G F P 発現がヒト P D X 1 遺伝子プロモーターにより誘導されるプラスミド構築物は、ベクター p E G F P - N 1 (Clontech) の C M V プロモーターを P D X 1 転写開始部位の上流約 4 . 4 キロ塩基対 (k b) から下流約 8 5 塩基対 (b p) に及ぶヌクレオチド配列を含むヒト P D X 1 制御領域 (G e n b a n k アクセション番号 A F 1 9 2 4 9 6) で置き換えることにより生成された。この領域は、P D X 1 遺伝子の特徴とされる調節要素を含有し、トランスジェニックマウスにおいて正常な P D X 1 発現パターンを付与するのに十分である。得られたベクターにおいて、E F G P の発現は、P D X 1 プロモーターにより誘導される。いくつかの実験では、このベクターは、h E S C へトランスフェクトすることができる。

40

【 0 4 5 3 】

P D X 1 プロモーター / E G F P カセットを上記ベクターから切除して、続いてホスホグリセリン酸キナーゼ 1 プロモーターの制御下でネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む選択ベクターへサブクロニングした。選択カセットは、カセットの除去を可能にするために f l p リコンビナーゼ認識部位に隣接された。この選択ベクターを

50

線状化した後、標準的なリポフェクション方法を使用してhESCへ導入した。G418における選択の10～14日後に、未分化のトランスジェニックhESCクローンを単離及び拡大させた。

【0454】

〔実施例23〕

PDX1陽性前腸内胚葉の単離

以下の実施例は、PDX1プロモーター/EGFPカセットを含むhESCがPDX1陽性内胚葉細胞へ分化され、これに続いて蛍光活性化細胞選別器(FACS)により単離され得ることを実証する。

【0455】

PDX1プロモーター/EGFPトランスジェニックhESCは、アクチビンA含有培地中で5日間、これに続いてアクチビンA及びRAを含む培地中で2日間分化させた。続いて、分化細胞は、トリプシン消化により回収して、Becton Dickinson FACS Diva上でRNA溶解緩衝液又はPBSへ直接選別した。単一の生細胞のサンプルが、EGFPに関してゲーティングすることなく採取され(Live)、単一の生細胞は、EGFP陽性(GFP)及びGFP陰性(Neg)集団へゲーティングされた。一実験では、EGFP陽性分画は、蛍光強度に従って2つの同様のサイズの集団に分離された(Hi及びLo)。

【0456】

選別後、細胞集団は、Q-PCR及び免疫組織化学の両方により分析した。Q-PCRに関して、RNAは、Qiagen RNeasyカラムを使用して調製されて、その後cDNAへ変換された。Q-PCRは、上述したように実施した。免疫組織化学分析に関して、細胞をPBS中に選別して、4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定して、Cytospin遠心分離機を使用してスライドガラス上へ接着させた。サイトケラチン19(KRT19)に対する一次抗体はChemicon製であり、肝細胞核因子3β(HNF3β)に対する一次抗体はSanta Cruz製であり、グルコーストランスポーター2(GLUT2)に対する一次抗体はR&D systems製であった。FITC(緑色)又はローダミン(赤色)に結合させた適切な二次抗体を使用して、一次抗体の結合を検出した。

【0457】

分化細胞の典型的なFACS選別を図45に示す。本実施例における単離PDX1陽性細胞のパーセントはおよそ7%であり、約1%～約20%まで分化効率に応じて変化した。

【0458】

選別した細胞はさらに、Q-PCR分析に付した。分化細胞は、EGFP蛍光と内因性PDX1遺伝子発現との相関を示した。非蛍光性細胞と比較して、EGFP陽性細胞は、PDX1発現レベルの20倍を超える増大を示した(図46)。高及び低EGFP強度の細胞の分離は、EGFP発現レベルがPDX1発現レベルと相関することを示した(図47)。PDX1マーカー分析に加えて、選別した細胞は、臍臓内胚葉において発現されるいくつかの遺伝子のQ-PCR分析に付した。これらのマーカー遺伝子(NKX2.2、GLUT2、KRT19、HNF4α及びHNF3β)のそれぞれの産物はすべて、EGFP陽性分画で富化された(図48A～図48E)。対照的に、神経マーカーZIC1及びGFAPは、選別されたEGFP発現細胞において富化されなかった(図49A及び図49B)。

【0459】

免疫組織化学により、事実上すべての単離PDX1陽性細胞が、KRT19及びGLUT2を発現するとみなされた。この結果は、臍臓内胚葉系統の細胞に関して予測される。これらの細胞の多くはまた、抗体染色によりHNF3β陽性であった。

【0460】

〔実施例24〕

PDX1陽性背側前腸内胚葉及びPDX1陽性腹側前腸内胚葉の産生

本実施例は、PDX1陽性背側偏向前腸内胚葉の産生、並びにPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉の産生を記載する。

【0461】

各日、100 ng/mlの濃度でアクチビンAを培地に供給する3日又は5日プロトコルを用いて、未分化hESCから、胚体内胚葉を産生した。背側分化及び腹側分化の両方に関して、最初の5日間の培地組成は以下の通りであった：1日目 - RPMI + 0%ウシ胎児血清(FBS)、2日目 - RPMI + 0.2%FBS、3日目 - RPMI + 2.0%FBS、4日目 - RPMI + 2.0%FBS、及び5日目 - RPMI + 2.0%FBS。腹側分化に関して、100 ng/mlでのアクチビンA中で3日間、胚体内胚葉を産生し、次に3 ng/mlのBMP4及び50 ng/mlのFGF10に曝露した。最初の2日間はRPMI + 2%FBS中で、次いでその後、B27サプリメント(1部のB27対200部の培地(容積で) - (1:200))(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含有するConnaught Medical Research Labs(CMRL)培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)(Parker R.C.他, 1957. N.Y. Academy of Sciences 5: 303参照(この記載内容は参照により本明細書中で完全に援用される))中で、BMP4/FGF10添加を実行した。背側分化手法に関して、100 ng/mlのアクチビンA中で5日間、胚体内胚葉を産生し、次に、B27サプリメントを含有するCMRL培地(1:200)中の2 µMのレチノイン酸(RA)及び25 ng/mlのアクチビンAに曝露した。

10

【0462】

RAベースの背側分化手法では、PDX1の強力な誘導、並びにHHEX又はアルブミン(これらは腹側肝臓マーカーである)の発現誘導を伴わないHB9発現の保持が存在する(図50A~図50D)。RAを用いないが、代わりにFGF10及びBMPを用いる腹側分化プロトコルでは、PDX1遺伝子発現も強く誘導された。RA処理に対比して、HB9(背側内胚葉マーカー)発現は保持されず、そして腹側肝臓マーカー、例えばアルブミン及びHHEXはPDX1とともに強く誘導された(図50A~図50D)。これらのデータは、RAの存在下で、前腸PDX1発現内胚葉は肝臓(腹側器官)マーカーを欠き、そしてHB9のような背側マーカーを発現するというを示した。RAの非存在下では、PDX1発現は高HB9発現レベルを伴わなかった。さらに古典的肝臓マーカー、例えばアルブミン及びHHEXの発現は、肝臓が専ら腹側内胚葉に由来するため、胚体内胚葉が腹側分化プログラムを選択的に遂行するというを示した。

20

30

【0463】

〔実施例25〕

PDX1陽性腹側前腸内胚葉細胞の産生は胚体内胚葉形成によっている

本実施例は、種々の量の胚体内胚葉細胞を含む培養物からのPDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉の産生を記載する。胚体内胚葉を有しない培養物は、PDX1陽性腹側偏向前腸内胚葉の極めて少ない産生を示す。胚体内胚葉細胞の初期量が増大するように、腹側偏向前腸内胚葉の産生も増大する。

【0464】

4つの別個の条件を用いて、胚体内胚葉への種々の割合の分化を生じるhESCを処理した。4つの条件はすべて、1日目に0%FBSを、2日目に0.2%FBSを、そして3日目及び4日目に2%FBSを補充するRPMIを利用した。4つの条件を以下に示す：(a)5 µMのSU5402を伴う100 ng/mlのBMP4、(b)外因性増殖因子なし、(c)15 ng/mlのアクチビンA、並びに(d)100 ng/mlのアクチビンA。最初の4日間の分化の後、産生される胚体内胚葉の相対レベルはサーベラス(CER)及びSOX17発現レベルにより示され、それにより胚体内胚葉は条件(a)下では本質的に存在せず、条件(b)下では最小限であり、条件(c)下では存在し、そして条件(d)下では高度に存在した。次にすべての培養物を、RPMI中の2%FBSの基本培地中の3 ng/mlのBMP4、50 ng/mlのFGF10及び0.5 µMのKAAAD-シクロパミンとともに2日間、その後、B27抽出物の200倍希釈液を伴うCM

40

50

R L から成る基本培地中の 3 ng / mL の B M P 4、 50 ng / mL での F G F 1 0 及び $0.5 \mu \text{ M}$ の K A A D - シクロパミンとともに 6 日間、インキュベートした。

【 0 4 6 5 】

S U 5 4 0 2 及び B M P 4 の存在下で、その条件下では C E R 及び S O X 1 7 遺伝子発現の欠如により実証されるように胚体内胚葉が産生されず (図 5 1 A 及び 5 1 B)、B M P 4 / F G F 1 0 による処理 (腹側内胚葉条件) 後、P D X 1 又はアルブミン遺伝子発現の誘導は認められなかった (図 5 1 C 及び図 5 1 D)。これは、無増殖因子条件 (条件 (b)) に関しても同様にいえたが、この場合、低レベルの C E R 及び S O X 1 7 により示されるように、極最小レベルの胚体内胚葉が形成された (図 5 1 A 及び図 5 1 B)。P D X 1 及びアルブミン遺伝子発現は無増殖因子条件下では非常に低かった (図 5 1 C 及び図 5 1 D) が、遺伝子発現の量は、条件 (a) から産生されるものより有意に大きかった。中間 (15 ng / mL) 及び高 (100 ng / mL) 用量のアクチビン A で処理された h E S C は、高 S O X 1 7 遺伝子発現レベルにより示される強固な胚体内胚葉分化を生じた (図 5 1 B)。高用量アクチビン処理は、非常に高い C E R 発現レベルにより示されるような、主に前内胚葉形質を有する胚体内胚葉を産生した。条件 (c) 及び条件 (d) の処理はともに、高レベルの P D X 1 及びアルブミン遺伝子発現により示されるような強固な腹側内胚葉分化を示した (図 5 1 C 及び図 5 1 D)。前内胚葉はより後の内胚葉に分化する能力を依然として有するが、一方、後内胚葉細胞はより前方性の運命 (anterior fates) を獲得する能力を失っているため、P D X 1 及びアルブミン発現のレベルはほとんどの前内胚葉において最大であった。これらのデータは、腹側 P D X 1 発現前腸内胚葉及び肝臓の産生が胚体内胚葉の効率的産生によっているということを強く示した。

10

20

【 0 4 6 6 】

〔 実施例 2 6 〕

B M P 4 は P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉に必要でない

本実施例は、B M P 4 の非存在下での P D X 1 陽性腹側偏向前腸内胚葉の産生を記載する。

【 0 4 6 7 】

それぞれ 1 日目 ~ 3 日目に、0 %、0.2 % 及び 2 % F B S を補充した R P M I 基本培地中の 100 ng / mL のアクチビンに未分化 h E S C を曝露することにより、胚体内胚葉を産生した。アクチビン A 処理の 3 日後、2 % F B S を含有する R P M I から成る基本培地に培養物を切り替えて、以下の条件のうちの 1 つの下で保持した：(a) 50 ng / mL の F G F 1 0 及び $0.5 \mu \text{ M}$ の K A A D - シクロパミンを伴う 3 ng / mL の B M P 4、(b) 50 ng / mL の F G F 1 0 及び $0.5 \mu \text{ M}$ の K A A D - シクロパミン、或いは (c ~ e) 外因性因子なし。2 日後、上記の条件 (a ~ c) に従って、基本培地を C M R L + B 2 7 サプリメント (1 : 200) に取り替えて、細胞を保持した。代替的には、B 2 7 サプリメント (1 : 200) を有する R P M I (条件 (d)) 又は 2 % F B S を有する R P M I (条件 (e)) 中に外因性因子を伴わずに、細胞を保持した。同一の因子処理条件を、8 日より長い分化の間、保持した。

30

【 0 4 6 8 】

B M P 4 は、B M P 4 の非存在下での P D X 1 及びアルブミンの発現の強固な誘導により示されるように、P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉細胞又は肝臓内胚葉細胞のいずれかを産生するために必要でなかった (図 5 2 A 及び図 5 2 B)。B M P 4 添加は P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉の産生のためにあまり好ましくないと思われたが、F G F 1 0 及び K A A D - シクロパミン処理への B M P 4 の添加は腹側前腸肝臓内胚葉遺伝子発現を低減しない (図 5 2 A 及び図 5 2 B)。B 2 7 サプリメントを伴う C M R L の使用は、添加因子の非存在下 (条件 (c)) で P D X 1 発現を誘導する何らかの能力を有したが、一方、B 2 7 を伴う R P M I (条件 (d)) 及び 2 % F B S を伴う R P M I (条件 (e)) は P D X 1 発現の如何なる誘導も示さなかった (図 5 2 A)。肝臓遺伝子発現の誘導に及ぼす基本培地の有意の作用が存在するとは思われなかった。要するに、F G F 1 0 及び K A A D - シクロパミンは、P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉を産生するのに十分である。

40

50

〔実施例 27〕

P D X 1 陽性背側前腸内胚葉及び P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉の同定のためのマーカー
【0469】

本実施例は、特に、P D X 1 陽性背側前腸内胚葉及び P D X 1 陽性腹側前腸内胚葉の同定、検出、富化、単離、精製、標的化及び / 又は検証のために有用なマーカーを記載する。

【0470】

実施例 24 に記載されたように分化される細胞培養物を遺伝子チップ分析に付して、胚体内胚葉への、そしてさらにより成熟した背側内胚葉表現型及び腹側内胚葉表現型への h E S C の分化中に起こる遺伝子発現動態を包括的にモニタリングした。実施例 24 で示された時点で、二重反復サンプルを単離した。その内部標準操作手順に従って、Expression Analysis (Durham, NC) による Affymetrix の U 1 3 3 プラス 2 . 0 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、遺伝子発現プロファイルを確定した。手動検査による、並びに階層的クラスター分析によるこれら 7 つの条件 / 時点全体の遺伝子発現のパターンを評価した。腹側分化パラダイム及び背側分化パラダイムの両方で発現される新規の遺伝子を見出すために P D X 1 発現 (背側及び腹側) の一過性パターンを整合させる遺伝子発現のパターンを調べた。

10

【0471】

P D X 1 との発現パターンにおける有意の類似性を有し、したがって P D X 1 発現前腸内胚葉細胞中で同時発現され得る遺伝子が提供される。表 3 に列挙した遺伝子は、背側及び腹側の P D X 1 分化の両方で発現される。表 4 中の遺伝子は、背側偏向され、そして背側 P D X 1 パターンで選択的に発現される。

20

【0472】

表 3 は、背側及び腹側の P D X 1 陽性前腸内胚葉の両方で発現される 39 のマーカーを列挙する。列 1 は、各マーカーに関して一般的に既知の遺伝子記号を提示する。列 2 ~ 列 4 は、それぞれ UniGene、Locus Link 及び OMIM アクセッション番号を提示する。列 5 は、列 1 に記載したマーカーを含む核酸配列に関する GeneBank アクセッション番号を記載した。最後に列 6 は、列挙遺伝子マーカーによりコードされるポリペプチドマーカーの機能的活性の説明を提示する。

【0473】

表 3 に列挙したアクセッション番号は、これらのマーカーの各々の主要な核酸配列及びポリペプチド配列の両方を含めて表に記載した各配列についての特定情報を検索するために当業者に用いられ得ると理解される。

30

【0474】

【表 3 A】

表 3-1 腹側及び背側の PDX1 陽性前腸内胚葉の両方で発現するマーカー

遺伝子記号	U n i g e n e 番号	遺伝子座リンク (LocusLink)	OMIM	由来配列	遺伝子の記述 (Gene Descriptor)
ANXA4	Hs. 422986	307	106491	NM_001153	アネキシンA4
ASCL1	Hs. 524672	429	100790	BC001638	a c h a e t e - s c u t e 複合体様1 (ショウジョウバエ)
BNC1	Hs. 459153	646	601930	NM_001717	バソヌクレリン1
C10又はf30	Hs. 498740	222389		AW195407	染色体10のオープンリーディングフレーム30
C2又はf23	Hs. 368884	65055	609139	BE535746	染色体2のオープンリーディングフレーム23
C9又はf150	Hs. 445356	286343		AI972386	染色体9のオープンリーディングフレーム150
CDH6	Hs. 171054	1004	603007	BC000019	カドヘリン6、2型、K-カードヘリン (胎児の腎臓)
DACH1	Hs. 129452	1602	603803	AI650353	ダックスフンド相同体1 (ショウジョウバエ)
DUSP9	Hs. 144879	1852	300134	NM_001395	二重特異性ホスファターゼ9
ELMOD1	Hs. 495779	55531		AL359601	ELMODメイン含有1
FLJ21462f i s	Hs. 24321			AW236803	CDNAクローニンメージ: 5273964、部分c d s
FLJ22761	Hs. 522988	80201		W81116	機能未知タンパク質FLJ22761
GABRA2	Hs. 116250	2555	137140	NM_000807	γ-アミノ酪酸 (GABA) A受容体、α2
GRIA3	Hs. 377070	2892	305915	BC032004	グルタミン酸受容体、イオンチャンネル型 (ionotropic)、AMPA3
HNF4G	Hs. 241529	3174	605966	AI916600	肝細胞核因子4、γ
IDH2	Hs. 513141	3418	147650	U52144	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ2 (NADP+)、ミトコンドリア由来
IL6R	Hs. 135087	3570	147880	AV700030	インタロイキン6受容体
KCNJ2	Hs. 1547	3759	170390	AF153820	カリウム内向き整流チャンネル、サブファミリーJ、成員2
KLF3	Hs. 298658	51274		AA130132	K r u p p e l 様因子3 (塩基性)
LGALS3	Hs. 531081	3958	153619	AW085690	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3 (ガラクトシン3)
LGALS3/// GALIG	Hs. 531081	3958///	153619	BC001120	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3 (ガラクトシン3) // ガラクトシン3内在遺伝子
LIPC	Hs. 188630	3990	151670	NM_000236	リパーゼ、肝臓由来
MEIS1	Hs. 526754	4211	601739	NM_002398	M e i s 1、ミエロイド同種指向性ウイルス組込部位1相同体 (マウス)

10

20

30

40

【表 3 B】

遺伝子記号	U n i g e n e 番 号	遺伝子座リンク (LocusLink)	OMIM	由来配列	遺伝子の記述 (Gene Descriptor)
NR2F1	Hs. 519445	7025	132890	AI951185	核受容体サブファミリー2、F群、成員1
ONECUT2	Hs. 194725	9480	604894	NM_004852	単切断ドメイン、ファミリー成員2
PAPPA	Hs. 494928	5069	176385	AA148534	妊娠関連血漿タンパク質A、パップリジン (pappalysin) 1
PDE3B	Hs. 445711	5140	602047	NM_000753	ホスホジエステラーゼ3B、cGMP阻害
PGPEP1	Hs. 131776	54858		NM_017712	ピログルタミルペプチダーゼI
PMS2L1	Hs. 520575	5379	605038	D38503	減数分裂後分離増大2様1 (postmeiotic segregation increased 2-like 1)
SERPINF2	Hs. 159509	5345	262850	NM_000934	セリン (又はシステイン) プロテイナーゼ阻害因子、クレードF (α-2抗プラーズミン、色素上皮誘導因子)、成員2
SLC27A2	Hs. 11729	11001	603247	NM_003645	溶質担体ファミリー27 (脂肪酸輸送体)、成員2
SLN	Hs. 334629	6588	602203	NM_003063	サルコリピン
SOX9	Hs. 2316	6662	114290	NM_000346	SR Y (性決定領域Y) -ボックス9 (屈曲肢異形成、常染色体上の性転換)
SULT2A1	Hs. 515835	6822	125263	U08024	スルホトランスフェラーゼファミリー、細胞質由来、2A、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) -選択性、成員1
TFPI	Hs. 516578	7035	152310	BF511231	組織因子経路阻害因子 (リポタンパク質関連凝固阻害因子)
ZHX1	Hs. 521264	11244	604764	AI123518	亜鉛フィンガー及びホメオボックス1
ZNF467	Hs. 112158	168544		BE549732	亜鉛フィンガータンパク質467
ZNF503	Hs. 195710	84858		AA603467	亜鉛フィンガータンパク質503
	Hs. 142869			AI935586	転写遺伝子座

図 5 3 A ~ 図 5 3 E はさらに、P D X 1 と表 3 から選択されるマーカーとの間の発現プロファイルの共通点を例証する。特に図 5 3 A ~ 図 E は、この実験でモニタリングされる 7 つの条件 / 時点全体の P D X 1 の発現とほぼ同一の遺伝子発現パターンを表示した遺伝子の例を提示する。類似性のこの程度のパターン認識はほとんど、P D X 1 を発現し、したがってこれらのマーカーを、背側及び / 又は腹側の内胚葉起源の両方からの P D X 1 陽性前腸内胚葉に関する優れた新規の候補マーカーにする同一細胞中でのこれらの遺伝子の同時発現を反映する。

【 0 4 7 6 】

表 4 は、背側 P D X 1 陽性前腸内胚葉中で特異的及び / 又は選択的に発現される 5 0 個のマーカーを列挙する。列 1 は、各マーカーに関して一般的に既知の遺伝子記号を提示する。列 2 ~ 列 4 は、それぞれ U n i g e n e、L o c u s L i n k 及び O M I M アクセション番号を提示する。列 5 は、列 1 に記載したマーカーを含む核酸配列に関する G e n e b a n k アクセション番号を記載した。最後に列 6 は、列挙遺伝子マーカーによりコードされるポリペプチドマーカーの機能的活性の説明を提示する。

10

【 0 4 7 7 】

表 4 に列挙したアクセション番号は、これらのマーカーの各々の主要な核酸配列及びポリペプチド配列の両方を含めて表に記載した各配列についての特定情報を検索するために当業者に用いられ得ると理解される。

【 0 4 7 8 】

【表 4 A】

表 4 - 背側傾性の (dorsally-biased) PDX1 前腸内胚葉で発現したマーカー

遺伝子記号	Uni gene 番号	遺伝子座リンク (LocusLink)	OMIM	由来配列	遺伝子の記述 (Gene Descriptor)
ADORA2A	Hs. 197029	135	102776	NM_000675	アデノシン A2a 受容体
AMSH-LP	Hs. 16229	57559		A1638611	STAM (AMSH) 様タンパク質の SH3 ドメインに 関連する分子
BAIAP2LI	Hs. 489237	55971		AA628400	BAI1 関連タンパク質 2-様 1
CD47	Hs. 446414	961	601028	BG230614	CD47 抗原 (Rh 関連抗原、インテグリン関連シグナ ル伝達物質)
CHN2	Hs. 203663	1124	602851	AK026415	キメライン (キマエリン) 2
CLDN3	Hs. 25640	1365	602910	BE791251	クラウジン 3
CPVL	Hs. 233389	54504		NM_031311	カルボキシペプチダーゼ、卵黄形成様 // カルボキシ ペプチダーゼ、卵黄形成様
CREB3L1	Hs. 405961	90993		AF055009	cAMP 応答因子結合タンパク質 3 様 1
DACT1	Hs. 48950	51339	607861	NM_016651	ダッパ-相同体 1、β-カテニンのアンタゴニスト (ア フリカツメガエル)
DPP6	Hs. 490684	1804	126141	AW071705	ジペプチジルペプチダーゼ 6
ELF3	Hs. 67928	1999	602191	AF017307	E74 様因子 3 (ets ドメイン転写因子、上皮特異的)
ENPP2	Hs. 190977	5168	601060	L35594	外部スクレオチドフィロホスファターゼ / ホスホジェス テラーゼ 2 (オートタキシン (autotaxin))
EPB41L1	Hs. 437422	2036	602879	AA912711	赤血球膜タンパク質バンド 4. 1 様 1
FAM46C	Hs. 356216	54855		AL046017	配列相同性を有するファミリー 46、成員 C
FAM49A	Hs. 467769	81553		NM_030797	配列相同性を有するファミリー 49、成員 A // 配列 相同性を有するファミリー 49、成員 A
FLJ30596	Hs. 81907	133686		AI453203	機能未知タンパク質 FLJ30596
HOXA1	Hs. 67397	3198	142955	S79910	ホメオボックス A1
HOXA3	Hs. 533357	3200	142954	AW137982	ホメオボックス A3
HOXB2	Hs. 514289	3212	142967	NM_002145	ホメオボックス B2
LAFA	Hs. 444414	3899	601464	AW085505	AF4 関連のリンパ核タンパク質
LOC283658	Hs. 87194	283658		AA233912	機能未知タンパク質 LOC283658
MAF	Hs. 134859	4094	177075	AF055376	v-maf 筋腱膜性線維腫症遺伝子相同体 (トリ)

10

20

30

40

【表 4 B】

遺伝子記号	U n i g e n e 番 号	遺 伝 子 座 リ ン ク (LocusLink)	OMIM	由来配列	遺伝子の記述 (Gene Descriptor)
MAG	Hs. 515354	4099	159460	X98405	ミエリン関連糖タンパク質
MYCPBP	Hs. 513817	10260	600382	BE268538	c-mycプロモーター結合タンパク質
NR4A2	Hs. 165258	4929	168600	NM_006186	核受容体サブファミリー4、A群、成員2
NRXN3	Hs. 368307	9369	600567	AI129949	ニューレキシン3
NSE1	Hs. 260855	151354		AI601101	NSE1
PCGF5	Hs. 500512	84333		AL045882	ポリコーン群リングフィンガー5
PDE11A	Hs. 130312	50940	604961	AB038041	ホスホジェステラーゼ11A
PDE5A	Hs. 370661	8654	603310	BF221547	ホスホジェステラーゼ5A、cGMP特異的
PGA3		5220	169710	AI570199	ペプシノゲン3、I群 (ペプシノゲンA)
PLN	Hs. 170839	5350	115200	NM_002667	ホスホランペン
PTGIS	Hs. 302085	5740	145500	NM_000961	プロスタグランジンI2 (プロスタサイクリン) シンターゼ/プロスタグランジンI2 (プロスタサイクリン) シンターゼ
RARB	Hs. 436538	5915	180220	NM_000965	レチノイン酸受容体、 β
RGN	Hs. 77854	9104	300212	D31815	レグカルシン (老化マーカータンパク質30)
RND1	Hs. 124940	27289	609038	U69563	RhoファミリーGTPアーゼ1
SFRP5	Hs. 279565	6425	604158	NM_003015	分泌frizzled関連タンパク質5
SGKL	Hs. 380877	23678	607591	AV690866	血清/グルココルチコイド調節キナーゼ様
SLC16A10	Hs. 520321	117247	607550	N30257	溶質担体ファミリー16 (モノカルボン酸輸送体)、成員10
SLC16A2	Hs. 75317	6567	300095	NM_006517	溶質担体ファミリー16 (モノカルボン酸輸送体)、成員2
SLC1A3	Hs. 481918	6507	600111	NM_004172	溶質担体ファミリー1 (神経膠の高親和性グルタミン酸輸送体)、成員3
SLC30A4	Hs. 162989	7782	602095	NM_013309	溶質担体ファミリー30 (亜鉛輸送体)、成員4
SLICK	Hs. 420016	343450		AI732637	ナトリウム活性化ATP感受性カリウムチャンネル及び塩素活性化ATP感受性カリウムチャンネル
SLITRK4	Hs. 272284	139065		AL080239	SLIT様ファミリー及びNTRK様ファミリー、成員4
ST8SIA3	Hs. 298923	51046		NM_015879	ST8 α -N-アセチル-ニューラミンイド (neuraminide) α -2, 8-シアリルトランスフェラーゼ3

10

20

30

40

【表 4 C】

遺伝子記号	U n i g e n e 番号	遺伝子座リリンク (LocusLink)	OMIM	由来配列	遺伝子の記述 (Gene Descriptor)
WNT5A	Hs. 152213	7474	164975	AI968085	ウイングレス型MMTV組込部位ファミリー、成員5A //ウイングレス型MMTV組込部位ファミリー、成員5A
XPR1	Hs. 227656	9213	605237	AF089744	異種指向性及びポリトロープのレトロウイルス受容体
	Hs. 535688			AK001582	CDNA FLJ10720 f i s、クロニンT2R P3001116
	Hs. 127009			A1935541	転写遺伝子座
	Hs. 4749			AL137310	CDNA FLJ31660 f i s、クロニンT2R I2004410

図 5 4 A ~ 図 5 4 D は、背側内胚葉条件 (R A 処理) における特異的 (H O X A 1 及び P D E 1 1 A) 又は選択的 (F A M 4 9 A 及び W N T 5 A) 発現を示す遺伝子発現のパターンを表示する遺伝子の例を提示する。これらのマーカーは、P D X 1 陽性背側偏向前腸内胚葉の同定のための新規の候補遺伝子である。

【 0 4 8 0 】

〔 実施例 2 8 〕

P D X 1 陰性前腸内胚葉の産生

本実施例は、P D X 1 陰性前腸内胚葉の産生を記載する。

【 0 4 8 1 】

ヒト胚性幹細胞を 2 段階プロトコールにより 7 日間分化させて、P D X 1 細胞を得た。第一段階は、D E を強固に産生するためのアクチビン A 中での 5 日間の分化から成る (D'Amour, K. 他, Nature Biotechnology 23, 1534-1541, (2005))。段階 2 は、F G F 1 0 (5 0 n g / m l) 及び K A A D - シクロパミン (0 . 5 μ M) を含有する 2 % F B S を伴う新鮮な R P M I 中での 2 日分化から成る。

10

【 0 4 8 2 】

F G F 1 0 (5 ~ 5 0 0 n g / m l) の添加は、K A A D - シクロパミン (0 . 1 ~ 2 μ M、ソニックヘッジホッグ阻害剤) の添加とともに有益であり、これらは胚体内胚葉細胞を前腸内胚葉ドメインにさらに特殊化した。

【 0 4 8 3 】

本明細書中に記載される方法、組成物及び装置は、目下、好ましい実施形態を代表するものであり、例示であって、本発明の範囲を限定するものではない。その変更及びその他の使用は当業者に行われ、これらは本発明の精神に包含され、そして開示の範囲により限定される。したがって本発明の範囲及び精神を逸脱することなく、本明細書に開示される発明に種々の置換及び修正がなされ得るということは、当業者には明らかである。

20

【 0 4 8 4 】

添付の特許請求の範囲及び本開示全体を通して用いられる場合、「本質的に ~ から成る」という語句は、当該語句の後ろに列挙される任意の要素を含むことを意味し、列挙した要素に関する開示において特定される活性又は作用を妨害しないか又は関与しない他の要素に限定される。したがって「本質的に ~ から成る」という語句は、列挙した要素が必要とされるか又は必須であるが、他の要素は任意であり、それらが列挙した要素の活性又は作用に影響を及ぼすかにかかわらず存在してもしなくてもよいことを示す。

30

【 0 4 8 5 】

本明細書中には多くの文献及び特許文献が引用されている。本特許文書中に引用される個々、及び全ての引用はその全体が引用として組み入れられる。

【 0 4 8 6 】

いくつかの参考文献については完全な引用を本文中に示した。その他の引用文献については、本文中の引用は著者と発行年によるものであり、完全な引用を以下に示す。

【 0 4 8 7 】

Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L., and Stainier, D. Y. (1999). Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. Dev Biol 215, 343-357.

40

【 0 4 8 8 】

Alexander, J., and Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. Curr Biol 9, 1147-1157.

【 0 4 8 9 】

Aoki, T. O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M. R., Peyrieras, N., and Rosa, F. M. (2002). Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGF β -related type I receptor. Dev Biol 241, 273-288.

【 0 4 9 0 】

Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F., and C

50

- onstam, D. B. (2002). Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4, 981-985.
 【 0 4 9 1 】
- Beddington, R. S., Rashbass, P., and Wilson, V. (1992). Brachyury-a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl*, 157-165.
 【 0 4 9 2 】
- Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C, and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod P*, 2110-2117.
 【 0 4 9 3 】
- Chang, H., Brown, C. W., and Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823. 10
 【 0 4 9 4 】
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., and Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-1928.
 【 0 4 9 5 】
- Dougan, S. T., Warga, R. M., Kane, D. A., Schier, A. F., and Talbot, W. S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development* 130, 1837-1851. 20
 【 0 4 9 6 】
- Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. L, Schier, A. F., and Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395, 181-185.
 【 0 4 9 7 】
- Feng, Y., Broder, C. C, Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
 【 0 4 9 8 】
- Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., and Sekiguchi, K. (2003). Molecular basis of constitutive production of basement membrane components: Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 30
 【 0 4 9 9 】
- Grapin-Botton, A., and Melton, D. A. (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16, 124-130.
 【 0 5 0 0 】
- Harris, T. M., and Childs, G. (2002). Global gene expression patterns during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells into parietal endoderm. *Funct Integr Genomics* 2, 105-119. 40
 【 0 5 0 1 】
- Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438.
 【 0 5 0 2 】
- Hogan, B. L. (1997). Pluripotent embryonic cells and methods of making same (U.S.A., Vanderbilt University).
 【 0 5 0 3 】
- Howe, C. C, Overton, G. C, Sawicki, J., Solter, D., Stein, P., and Strickland, S. (1988). Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads. *Differentiation* 37, 20-25. 50

【 0 5 0 4 】

Hudson, C, Clements, D., Friday, R. V., Stott, D., and Woodland, H. R. (1997). X sox17alpha and -beta mediate endoderm formation in Xenopus. *Cell* 91, 397-405.

【 0 5 0 5 】

Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H., and Moore, E. E. (1987). Fetomodulin: marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP. *Dev Biol* 122, 483-491.

【 0 5 0 6 】

Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C, Kurohmaru, M., Sana i, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tarn, P. P., and Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129, 2367- 2379.

10

【 0 5 0 7 】

Katoh, M. (2002). Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* 9, 363-368.

【 0 5 0 8 】

Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C, Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B., and Stainier, D. Y. (2001). casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish. *Genes Dev* 15, 1493- 1505.

20

【 0 5 0 9 】

Kim, C. H., and Broxmeyer, H. E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 65, 6-15.

【 0 5 1 0 】

Kimelman, D., and Griffin, K. J. (2000). Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 350-356.

【 0 5 1 1 】

Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*. 757,1651-62.

30

【 0 5 1 2 】

Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A. J., Wolfman, N. M., ten Dijke, P., and Kuehn, M. R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. *J Biol Chem* 276, 656-661.

【 0 5 1 3 】

Labosky, P. A., Barlow, D. P., and Hogan, B. L. (1994a). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp* 182, 157- 168; discussion 168-178.

【 0 5 1 4 】

Labosky, P. A., Barlow, D. P., and Hogan, B. L. (1994b). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120, 3197-3204.

40

【 0 5 1 5 】

Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M. M., and Kemler, R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* 3, 171-181.

【 0 5 1 6 】

Lu, C. C, Brennan, J., and Robertson, E. J. (2001). From fertilization to gastru

50

lation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.

【 0 5 1 7 】

Ma, Q., Jones, D., and Springer, T. A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10, 463-471.

【 0 5 1 8 】

McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. (1999) Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol.* 213, 442-56.

【 0 5 1 9 】

10

Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187, 265-276.

【 0 5 2 0 】

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

【 0 5 2 1 】

Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.

20

【 0 5 2 2 】

Ogura, H., Araga, J., and Mikoshiba, K. (2001). Behavioral abnormalities of *Zic1* and *Zic2* mutant mice: implications as models for human neurological disorders. *Behav Genet* 31, 317-324.

【 0 5 2 3 】

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.

【 0 5 2 4 】

Rodaway, A., and Patient, R. (2001). Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* 105, 169-172.

30

【 0 5 2 5 】

Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C, Patient, R., and Holder, N. (1999). Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126, 3067-3078.

【 0 5 2 6 】

Rohr, K. B., Schulte-Merker, S., and Tautz, D. (1999). Zebrafish *zic1* expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mech Dev* 55, 147-159.

40

【 0 5 2 7 】

Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621.

【 0 5 2 8 】

Schoenwolf, G. C, and Smith, J. L. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates. *Methods Mol Biol* 755, 113-125.

【 0 5 2 9 】

Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13623-13628.

50

tl Acad Sci U S A 95, 13726-13731.

【 0 5 3 0 】

Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., and Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-238.

【 0 5 3 1 】

Shapiro, A. M., Ryan, E. A., and Lakey, J. R. (2001a). Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 241-264.

【 0 5 3 2 】

Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lakey, J., Korbitt, G. S., and Rajotte, R. V. (2001b). Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes? Insulin independence should be dominant force in islet transplantation. *Bmj* 322, 861.

【 0 5 3 3 】

Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y., and Aiso, S. (1996). Cloning and characterization of *Xenopus laevis* xSox7 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1309, 73-76.

【 0 5 3 4 】

Smith, J. (1997). Brachyury and the T-box genes. *Curr Opin Genet Dev* 7, 474-480.

【 0 5 3 5 】

Smith, J. C., Ames, N. A., Conlon, F. L., Tada, M., Umbhauer, M., and Weston, K. M. (1997). Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 337-346.

【 0 5 3 6 】

Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P., and Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res* 29, 4274-4283.

【 0 5 3 7 】

Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., and Aiso, S. (1999). Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7. *Biochim Biophys Acta* 1445, 225-231.

【 0 5 3 8 】

Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23, 788-794.

【 0 5 3 9 】

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

【 0 5 4 0 】

Tremblay, K. D., Hoodless, P. A., Bikoff, E. K., and Robertson, E. J. (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development* 127, 3079-3090.

【 0 5 4 1 】

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

10

20

30

40

50

【 0 5 4 2 】

Varlet, L, Collignon, J., and Robertson, E. J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* 124, 1033-1044.

【 0 5 4 3 】

Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P., and Robertson, E. J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* 17, 1646-1662.

【 0 5 4 4 】

Weiler-Guettler, H., Aird, W. C5 Rayburn, H., Husain, M., and Rosenberg, R. D. (1996). Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos. *Development* 122, 2271-2281.

【 0 5 4 5 】

Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L. J., and Rosenberg, R. D. (1992). Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* SP, 2155-2159.

【 0 5 4 6 】

Wells, J. M., and Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 75, 393-410.

【 0 5 4 7 】

Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127, 1563-1572.

【 0 5 4 8 】

Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation. *Trends Genet* 6, 104-105.

【 0 5 4 9 】

Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.

【 0 5 5 0 】

Zhou, X., Sasaki, H, Lowe, L., Hogan, B. L., and Kuehh, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543-547.

【 0 5 5 1 】

Jonsson, J., et al., *Nature*, 606-609, 1994

【 0 5 5 2 】

Offield, MF, et al. *Devel.* 983-995, 1996

【 0 5 5 3 】

Stoffers, D.A., et al. *Nature Genetics*, 106-110 1997

【 0 5 5 4 】

Stoffers D.A., et al. *Nature Genetics* 138-139, 1997

【 0 5 5 5 】

Stafford et al. *Genes Evol.* 432-441 , 2004

【 0 5 5 6 】

Chen et al., *Dev. Biol.* 144-160, 2004

【 0 5 5 7 】

Martin, M., et al. *Dev. Biol.* 2005

【 0 5 5 8 】

Molotkov, A., et al. *Dev. Dyn.* 950-957, 2005

【 0 5 5 9 】

10

20

30

40

50

Harrison, K.A., et al. Nature Genetics 71-75 1999

【 0 5 6 0 】

Li, H., et al. Nature Genetics 67-70, 1999

【 0 5 6 1 】

Kawahira, H., et al. Dev. Biology 280, 111-121, 2005

【図面の簡単な説明】

【 0 5 6 2 】

【図 1】h E S C からの β 細胞の産生に関して提唱される分化経路の概略図である。経路における第 1 の工程は、E S 細胞から胚体内胚葉系列へ送り、また脾臓内胚葉、内分泌内胚葉又は島 / β 細胞へのさらなる分化事象に先立つ第 1 の工程を表す。経路における第 2 の工程は、P D X 1 陽性前腸内胚葉への S O X 1 7 陽性 / P D X 1 陰性胚体内胚葉の変換を示す。これらの移行を媒介するのに有用ないくつかの要因は、イタリック体で表示している。標的細胞を規定するための関連マーカーには下線を付している。

10

【図 2】保存モチーフの位置を表示し、且つ G E N O V A C による免疫化手順に使用される領域を強調するヒト S O X 1 7 c D N A の概略図である。

【図 3】S O X 1 7 が、S O X 7 に、また幾分劣るが S O X 1 8 に最も密接に関連することを示す相関系統樹を示す図である。S O X 1 7 タンパク質は、同種内の S O X F 群サブファミリーの他の成員に対するよりも種相同体間でより密接に関連する。

【図 4】ラット抗 S O X 1 7 抗体でブローピングしたウェスタンブロットを示す図である。このブロットは、線維芽細胞において過剰発現されるヒト S O X 1 7 タンパク質に関するこの抗体の特異性（レーン 1）及び E G F P との免疫反応性の欠如（レーン 2）或いは最も密接に関連する S O X スーパーファミリー成員である S O X 7（レーン 3）を実証する。

20

【図 5】図 5 A 及び図 5 B は、相当数の A F P⁺同時標識細胞を表示する S O X 1 7⁺細胞のクラスター（A）を示す顕微鏡写真である。これは、A F P⁺細胞がほとんど又は全く観察されない他の S O X 1 7⁺クラスター（B）と著しく対照している。

【図 6】図 6 A ~ 図 6 C は、壁側内胚葉及び S O X 1 7 を示す顕微鏡写真である。パネル A は、h E S 細胞の無作為に分化された培養物における壁内胚葉細胞の細胞表面上に位置するヒトトロポモジュリン（T M）タンパク質に関する免疫細胞化学を示す。パネル B は、T M 及び S O X 1 7 に関して二重標識された A で示されるのと同じ野である。パネル C は、D A P I 標識された核を伴う同野の位相差画像である。D A P I 標識された核と S O X 1 7 標識化との完全な相関に留意されたい。

30

【図 7】図 7 A 及び図 7 B は、定量的 P C R（Q - P C R）による S O X 1 7 遺伝子発現及び S O X 1 7 特異的抗体による抗 S O X 1 7 陽性細胞を示す棒グラフである。パネル A は、未分化対照培地（S R 2 0）に対して、アクチビン A が S O X 1 7 遺伝子発現を増大させる一方で、レチノイン酸（R A）は S O X 1 7 発現を強く抑制することを示す。パネル B は、これらの変化の同一パターン並びに類似した規模が、S O X 1 7⁺細胞数に反映されることを示しており、S O X 1 7 遺伝子発現の Q - P C R 測定は、単一細胞レベルでの変化を大きく反映することを示す。

【図 8】図 8 A は、アクチビン A の存在下での分化 h E S C の培養は、低レベルの A F P 遺伝子発現を維持するのに対して、10%ウシ胎児血清（F B S）中で無作為に分化することが可能である細胞は、A F P の強力なアップレギュレーションを示すことを示す棒グラフである。発現レベルの差異は、およそ 7 倍である。図 8 B 及び図 8 C は、10% F B S 単独（上部）に対するアクチビン A 処理状態（下部）で観察される A F P⁺細胞の非常に希少且つ小さなクラスターにより示されるように、アクチビン A による A F P 発現の抑制もまた単一細胞レベルで明白であることを示す 2 つの顕微鏡写真の画像である。

40

【図 9】図 9 A 及び図 9 B は、フローサイトメトリーを使用した A F P⁺細胞数の定量化を示す比較画像である。この図は、アクチビン A の存在（右パネル）及び非存在（左パネル）下での A F P 遺伝子発現の変化の規模（図 8 A）が A F P⁺細胞の数に正確に対応することを実証し、さらに個々の細胞レベルで起こる変化を示すための Q - P C R 分析の有

50

用性を支持する。

【図10】図10A～図10Fは、ノーダル、アクチビンA及びアクチビンB（NAA）へのhESCの暴露が、5日間にわたってSOX17⁺細胞の数の著しい増大をもたらすことを示す顕微鏡写真である（A～C）。DAPI染色された核により示されるように（D～F）、SOX17⁺細胞の相対存在量を、各野に存在する細胞の総数と比較することにより、すべての細胞のおよそ30～50%が、NAAによる5日の処理後にSOX17に対して免疫反応性であることを観察することができる。

【図11】アクチビンA（0、10、30又は100 ng/ml）は、分化hESCにおけるSOX17遺伝子発現を用量依存的に増大させることを実証する棒グラフである。増大された発現は、接着培養上での3日間の処理後にすでに強固であり、同様に続く1日、3日及び5日の懸濁培養まで継続する。

【図12】図12A～図12Cは、MIXL1（パネルA）、GATA4（パネルB）及びHNF3b（パネルC）の発現に対するアクチビンAの影響を実証する棒グラフである。アクチビンA用量依存的増大はまた、胚体内胚葉の3つの他のマーカーであるMIXL1、GATA4及びHNF3bに関しても観察される。アクチビン用量に応答した増大された発現の規模は、SOX17に関して観察される規模と際立って類似しており、アクチビンAが、4つすべての遺伝子を同時発現する細胞の集団（SOX17⁺、MIXL1⁺、GATA4⁺及びHNF3b⁺）を特定していることを強く示している。

【図13】図13A～図13Cは、AFP（パネルA）、SOX7（パネルB）及びSPARC（パネルC）の発現に対するアクチビンAの影響を実証する棒グラフである。臓側内胚葉マーカーAFPの発現においてアクチビンA用量依存的減少が見られる。原始内胚葉（SOX7）及び壁側内胚葉（SPARC）のマーカーは、依然として未変化のままであるか、或いはいくつかの時点で抑制を示し、アクチビンAが、これらの胚体外内胚葉細胞型を特定するように作用しないことを示している。このことはさらに、SOX17、MIXL1、GATA4及びHNF3bの増大された発現が、アクチビンAに応答した胚体内胚葉細胞の数の増大に起因し得るという事実を支持する。

【図14】図14A及び図14Bは、ZIC1（パネルA）及びブラキュリ発現（パネルB）に対するアクチビンAの影響を示す棒グラフである。神経マーカーZIC1の一貫した発現は、神経分化に対するアクチビンAの用量依存的影響が見られないことを実証する。ブラキュリの減少された発現により示されるように、100 ng/mlのアクチビンA処理により媒介される中胚葉分化の顕著な抑制が見られる。これは、中内胚葉前駆体からの胚体内胚葉の増大された特定の結果である可能性が高い。より低レベルのアクチビンA処理（10 ng/ml及び30 ng/ml）は、未処理対照培養物に対して分化のより後期の時点でブラキュリの発現を維持する。

【図15】図15A及び図15Bは、アクチビンによる処理に応答した減少された壁側内胚葉分化を示す顕微鏡写真である。TM^{hi}壁側内胚葉の領域は、血清単独で分化される場合、培養物の至るところで見られる（A）のに対して、アクチビンが包含される場合、TM⁺細胞の分化は乏しく（B）、TM免疫反応性の全体的な強度はより低い。

【図16】図16A～図16Dは、アクチビンA及びアクチビンBによる処理に応答したマーカー発現を示す顕微鏡写真である。hESCは、アクチビンA及びアクチビンBにより連続4日間処理して、SOX17、AFP及びTM抗体で三重標識した。パネルA - SOX17、パネルB - AFP、パネルC - TM及びパネルD - 相/DAPI。AFP（B）及びTM（C）免疫反応性の完全な非存在と関連した数多くのSOX17陽性細胞（A）に留意されたい。

【図17】hESCからのin vitroでの胚体内胚葉及び臓側内胚葉の出現を示す顕微鏡写真である。臓側内胚葉の領域はAFP^{hi}/SOX17^{lo/-}により同定される一方で、胚体内胚葉は、完全に反対のプロファイルであるSOX17^{hi}/AFP^{lo/-}を示す。この野は、これらの2つの領域の互いに対する近接性に起因して選択的に選択された。しかしながら、何度もSOX17^{hi}/AFP^{lo/-}領域がAFP^{hi}細胞の任意の領域からの絶対的な単離で観察され、これは臓側内胚葉細胞とは別個の胚体内胚葉細胞の発達を示唆す

10

20

30

40

50

る。

【図 1 8】TGFβファミリーのリガンド及び受容体を表す概略図である。AR Smad 及びBR Smadを活性化する因子は、ヒト胚性幹細胞からの胚体内胚葉の産生に有用である(J Cell Physiol. 187: 265-76を参照)。

【図 1 9】個々のTGFβ因子及びTGFβ因子の組合せによる処理の結果として、経時的にSOX17発現の誘導を示す棒グラフである。

【図 2 0】TGFβ因子の組合せによる処理の結果として、経時的にSOX17⁺細胞数の増大を示す棒グラフである。

【図 2 1】TGFβ因子の組合せによる処理の結果として、経時的にSOX17発現の誘導を示す棒グラフである。

【図 2 2】アクチビンAが、SOX17⁺細胞数の用量依存的増大を誘導することを示す棒グラフである。

【図 2 3】アクチビンA及びアクチビンBで処理した培養物へのWnt3aの添加が、アクチビンA及びアクチビンB単独により誘導されるレベルを上回ってSOX17発現を増大させることを示す棒グラフである。

【図 2 4】図 2 4 A ~ 図 2 4 C は、胚体内胚葉への分化が低FBS状態で増強されることを示す棒グラフである。2%FBSを含有する培地(2AA)中でのアクチビンA及びBによるhESCの処理は、10%FBS培地(10AA)中での同じ処理と比較して、2~3倍高いレベルのSOX17発現をもたらす(パネルA)。胚体内胚葉マーカーMIXL1の誘導(パネルB)はまた、同じ方法で影響を及ぼし、AFP(臓側内胚葉)の抑制(パネルC)は、10%FBS状態よりも2%FBSにおいて高い。

【図 2 5】図 2 5 A ~ 図 2 5 D は、SOX17⁺細胞が培養中に分裂していることを示す顕微鏡写真である。SOX17免疫反応性細胞は、hESCコロニーの分化中の縁に存在し(C、D)、増殖細胞核抗原(PCNA)で標識される(パネルB)が、OCT4では同時標識されていない(パネルC)。さらに、明確な有糸分裂の外観が、SOX17⁺細胞(矢印)並びにOCT4⁺の未分化hESC(矢じり)の両方において核のDAPI標識化により観察することができる(D)。

【図 2 6】様々な培地条件下での分化hESCにおけるCXCR4の相対発現レベルを示す棒グラフである。

【図 2 7】図 2 7 A ~ 図 2 7 D は、胚体内胚葉マーカーのパネルが、どのようにして図 2 6 で示されるのと同じ分化処理にわたってCXCR4と非常に類似した発現のパターンを共有するかを示す棒グラフである。

【図 2 8】図 2 8 A ~ 図 2 8 E は、中胚葉(ブラキユリ、MOX1)、外胚葉(SOX1、ZIC1)及び臓側内胚葉(SOX7)に関するマーカーが、どのようにして図 2 6 で示されるのと同じ処理にわたってCXCR4発現に対する逆相関を示すかを示す棒グラフである。

【図 2 9】図 2 9 A ~ 図 2 9 F は、図 2 6 ~ 図 2 8 で示される3つの培地条件にわたってSOX17免疫反応性細胞における相対的な差異を示す顕微鏡写真である。

【図 3 0】図 3 0 A ~ 図 3 0 C は、分化培地に添加されるアクチビンAの増大濃度によるCXCR4⁺細胞数の増大を実証するフローサイトメトリードットプロットである。

【図 3 1】図 3 1 A ~ 図 3 1 D は、高用量アクチビンA処理から単離されるCXCR4⁺細胞(A100-CX+)が、母集団(A100)よりも胚体内胚葉マーカーに関してさらに一層富化されることを示す棒グラフである。

【図 3 2】蛍光活性化細胞選別器(FACS)を使用して単離されるCXCR4⁺細胞及びCXCR4⁻細胞からの遺伝子発現、並びに母集団中の遺伝子発現を示す棒グラフである。これは、CXCR4⁺細胞が各母集団に存在する本質的にすべてのCXCR4遺伝子発現を含有し、またCXCR4⁻集団がCXCR4遺伝子発現をほとんど含有しないか、或いは全く含有しないことを実証する。

【図 3 3】図 3 3 A ~ 図 3 3 D は、これらの非胚体内胚葉マーカーの発現においてすでに抑制されている高用量アクチビンA処理から単離されるCXCR4⁺細胞における中胚葉

10

20

30

40

50

(ブラキュリ、MOX1)、外胚葉(ZIC1)及び臓側内胚葉(SOX7)遺伝子発現の欠乏を実証する棒グラフである。

【図34-1】図34A~図34Mは、胚体内胚葉細胞を同定するのに使用することができるマーカー遺伝子の発現パターンを示す棒グラフである。胚体内胚葉マーカーであるFGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及びCRIP1の発現分析は、それぞれパネルG~パネルLに示される。これまでに記載した系統マーキング遺伝子であるSOX17、SOX7、SOX17/SOX7、TM、ZIC1及びMOX1の発現分析は、それぞれパネルA~パネルFに示される。パネルMは、CXCR4の発現分析を示す。パネルA~パネルMそれぞれに関して、hESCと標識した列は、精製ヒト胚性幹細胞からの遺伝子発現を示し、2NFは、2%FBSで処理した細胞(アクチビン添加無し)を示し、0.1A100は、0.1%FBS、100ng/mlアクチビンAで処理した細胞を示し、1A100は、1%FBS、100ng/mlアクチビンAで処理した細胞を示し、2A100は、2%FBS、100ng/mlアクチビンAで処理した細胞を示す。

【図34-2】図34の続き

【図34-3】図34の続き

【図35】4日目に添加されるレチノイン酸(RA)及び線維芽細胞増殖因子-10(FGF-10)の存在下での、アクチビン有り及び無しでの4日後及び6日後のhESCの培養物におけるPDx1遺伝子の相対発現を示すグラフである。

【図36】図36A~図36Fは、4日目に添加されるレチノイン酸(RA)及び線維芽細胞増殖因子-10(FGF-10)の存在下での、アクチビン有り及び無しでの4日後及び6日後のhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。パネルは、以下のマーカー遺伝子:(A)SOX17、(B)SOX7、(C)AFP、(D)SOX1、(E)ZIC1及び(F)NFMの発現の相対レベルを示す。

【図37】図37A~図37Cは、4日目に添加されるレチノイン酸(RA)、線維芽細胞増殖因子-10(FGF-10)及び線維芽細胞増殖因子-4(FGF-4)の存在下又は非存在下での、アクチビン有り及び無しでの4日後及び8日後のhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。パネルは、以下のマーカー遺伝子:(A)PDx1、(B)SOX7及び(C)NFMの発現の相対レベルを示す。

【図38】図38A~図38Gは、4日目に添加される1μM、0.2μM又は0.04μMのレチノイン酸(RA)と組み合わせて50ng/ml FGF-10と接触させた胚体内胚葉細胞の培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。パネルは、以下のマーカー遺伝子:(A)PDx1、(B)HOXA3、(C)HOXC6、(D)HOXA13、(E)CDX1、(F)SOX1及び(G)NFMの発現の相対レベルを示す。

【図39】図39A~図39Eは、レチノイン酸(RA)、線維芽細胞増殖因子-10(FGF-10)及び以下の:血清代替物(SR)、ウシ胎児血清(FBS)又はB27のうちの1つの組合せの存在下での、アクチビン有り及び無しでの4日後及び8日後のhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。パネルは、以下のマーカー遺伝子:(A)PDx1、(B)SOX7、(C)AFP、(D)ZIC1及び(E)NFMの発現の相対レベルを示す。

【図40】図40A~図40Bは、6日後(RAの添加の直前)及び9日目(RAへの暴露の3日後)のhESCの培養物における脾臓(PDx1、HNF6)及び肝臓(HNF6)に関するマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。25ng/ml(A25)又は50ng/ml(A50)のいずれかのアクチビンAの存在下で、10ng/ml(a10)、25ng/ml(a25)又は50ng/ml(a50)の用量でアクチビンBの添加を比較するように、様々な条件が包含された。任意のアクチビンA又はアクチビンB無しの条件(NF)は、胚体内胚葉及びPDx1陽性内胚葉の産生に関する陰性対照として作用する。パネルは、以下のマーカー遺伝子:(A)PDx1及び(B)HNF6の発現の相対レベルを示す。

10

20

30

40

50

【図 4 1】図 4 1 A ~ 図 4 1 C は、5 日目（レチノイン酸の添加の直前）並びに R A 暴露の 2 日後、4 日後及び 6 日後（それぞれ 7 日目、9 日目及び 1 1 日目）の、 100 ng/ml （A 1 0 0）、 50 ng/ml （A 5 0）を有する、又はアクチビン A 無し（N F）の h E S C の培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。各棒の真下のパーセント表示は、3 日 ~ 5 日の分化中の F B S 用量を示す。7 日目に開始して、R A（R）で処理した細胞を、0.5% F B S を含む R P M I 培地中で増殖させた。R A 濃度は、7 日目に $2 \mu\text{M}$ 、9 日目に $1 \mu\text{M}$ 及び 1 1 日目に $0.2 \mu\text{M}$ であった。パネルは、以下のマーカー遺伝子：（A）P D X 1、（B）Z I C 1、（C）S O X 7 の発現の相対レベルを示す。

【図 4 2】図 4 2 A ~ 図 4 2 B は、まず胚体内胚葉を誘導させるために低 F B S 中アクチビン A で（5 日目）、続いて P D X 1 発現内胚葉を誘導させるために 25 ng/ml アクチビン A 及び R A を含む新鮮な（A 2 5 R）培地、又は様々な条件培地（M E F C M、C M # 2、C M # 3 及び C M # 4）及び R A で処理した h E S C の培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。マーカー発現は、5、6、7、8 及び 9 日目に確定された。パネルは、以下のマーカー遺伝子：（A）P D X 1、（B）C D X 1 の発現の相対レベルを示す。

【図 4 3】まず胚体内胚葉を誘導させるために低 F B S 中アクチビン A で、続いてアクチビン A 及びレチノイン酸を含む新鮮な培地（A 2 5 R）、又は新鮮な培地中へ希釈される条件培地中の様々な量の R A で処理した h E S C の培養物における P D X 1 の相対発現を示すグラフである。培地の総容量は、すべての場合で 5 ml である。

【図 4 4】R A 及び 50 ng/ml アクチビン A の添加の 3 日後（d 8）及び 4 日後（d 9）の R A 処理した胚体内胚葉細胞から免疫沈降される P D X 1 を示すウェスタンブロットである。

【図 4 5】P D X 1 プロモーターの制御下にある E G F P レポーターで遺伝的にタグ付けした P D X 1 陽性前腸内胚葉細胞の蛍光活性化細胞選別器（F A C）の結果を表示する概略グラフである。

【図 4 6】生細胞（L i v e）、E G F P 陰性細胞（N e g）及び E G F P 陽性細胞（G F P +）の選別された集団に関するハウスキーピング遺伝子に対して正規化した相対 P D X 1 発現レベルを示すグラフである。

【図 4 7】生存細胞（L i v e）、E G F P 陰性細胞（N e g）、最小の E G F P シグナル強度（L o）を有する E G F P 陽性細胞集団の半数及び最大の E G F P シグナル強度（H i）を有する E G F P 陽性細胞集団の半数の選別された集団に関するハウスキーピング遺伝子に対して正規化した相対 P D X 1 発現レベルを示すグラフである。

【図 4 8】図 4 8 A から図 4 8 E は生細胞（L i v e）、E G F P 陰性細胞（N e g）及び E G F P 陽性細胞（G F P +）の選別された集団中の 5 つの膵臓内胚葉マーカーのハウスキーピング遺伝子に対して正規化した相対発現レベルを示すグラフである。パネル：A - N K X 2.2、B - G L U T 2、C - H N F 3 β 、D - K R T 1 9 及び E - H N F 4 α 。

【図 4 9】図 4 9 は、生細胞（L i v e）、E G F P 陰性細胞（N e g）及び E G F P 陽性細胞（G F P +）の選別された集団中の 2 つの非膵臓内胚葉マーカーのハウスキーピング遺伝子に対して正規化した相対発現レベルを示すグラフである。パネル：A - Z I C 1 及び B - G F A P。

【図 5 0】図 5 0 A ~ 図 5 0 D は、任意の要素を添加する前の分化の開始時（0 d）、及び 3 日間 100 ng/ml アクチビン A（A 1 0 0）（3 d）、その後 4 ~ 1 1 日目で 3 ng/ml B M P 4 及び 50 ng/ml F G F - 1 0（B 3 F 5 0）（7 d、9 d 及び 1 1 d）の存在下、又は 5 日間 100 ng/ml アクチビン A（A 1 0 0）（5 d）、その後 6 日目及び 7 日目で 25 ng/ml アクチビン A 及び $2 \mu\text{M}$ R A（A 2 5 R）（7 d）の存在下のいずれかでの h E S C の培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。このパネルは、以下のマーカー遺伝子：（A）A L B、（B）P D X 1、（C）H B 9 及び（D）H H E X の発現の相対レベルを示す。

【図 5 1 - 1】図 5 1 A ~ 図 5 1 D は、任意の要素を添加する前の分化の開始時（0 d）

10

20

30

40

50

、及び4つの以下の条件の1つで分化して4日後のhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである：(a) 100 ng/ml BMP4 及び 5 µM SU5402 (B/SU)、(b) 要素なし(NF)、(c) 15 ng/ml アクチビンA (A15)、又は(d) 100 ng/ml アクチビンA。この分化の後に、5～12日目で3 ng/ml BMP4、50 ng/ml FGF-10 及び 0.5 µM KAAD-シクロパミン(B3F50K0.5)の存在下でインキュベートする(6d、8d、10d 及び 12d)。このパネルは、以下のマーカー遺伝子：(A) CER、(B) SOX17、(C) PDX1 及び (D) ALB の発現の相対レベルを示す。

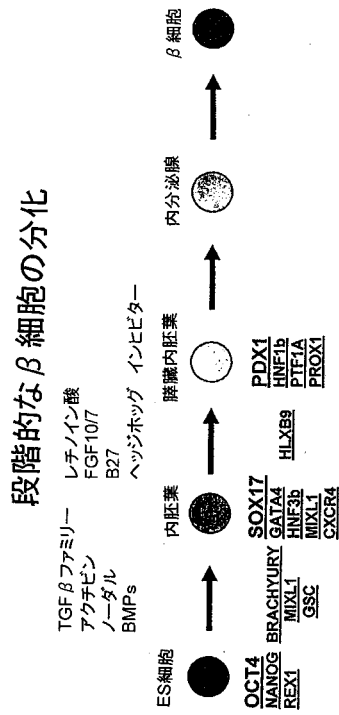
【図51-2】図51の続き

【図52】図52A～図52Bは、任意の要素を添加する前の分化の開始時(0d)、3日間100 ng/ml アクチビン(A100)の存在下で(3d)、4日目及び5日目で、要素なし(NF)、50 ng/ml FGF-10 及び 0.5 µM KAAD-シクロパミン(FK)、又は3 ng/ml BMP4、50 ng/ml FGF-10 及び 0.5 µM KAAD-シクロパミン(BFK)の存在下で(5d)、並びに6日目～13日目で、RPMI培地において要素なし(2R)、B27を添加したRPMI培地において要素なし(0RB)、B27を添加したCMRL培地において要素なし(0CB)、B27を添加したCMRL培地において50 ng/ml FGF-10 及び 0.5 µM KAAD-シクロパミン(FK)、又はB27を添加したCMRL培地において3 ng/ml BMP4、50 ng/ml FGF-10 及び 0.5 µM KAAD-シクロパミン(BFK)の存在下で(7d、9d、11d 及び 13d)、hESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。このパネルは、以下のマーカー遺伝子：(A) PDX1 及び (B) ALB の発現の相対レベルを示す。

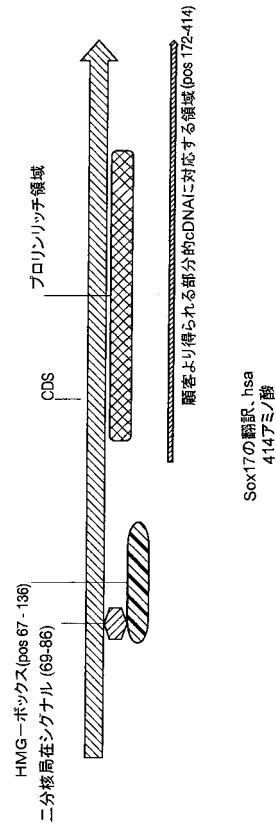
【図53】図53A～図53Eは、任意の要素を添加する前の分化の開始時(0d)、及び3日間100 ng/ml アクチビンA(A100)(3d)、その後4～11日目で3 ng/ml BMP4 及び 50 ng/ml FGF-10 (B3F50)(7d、9d 及び 11d)の存在下、又は5日間100 ng/ml アクチビンA(A100)(5d)、その後6日目及び7日目で25 ng/ml アクチビンA 及び 2 µM RA(A25R)(7d)の存在下のいずれかでのhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。このパネルは、以下のマーカー遺伝子：(A) PDX1、(B) SERPINF2、(C) DUSP9、(D) CDH6 及び (E) SOX9 の発現の相対レベルを示す。

【図54】図54A～図54Dは、任意の要素を添加する前の分化の開始時(0d)、及び3日間100 ng/ml アクチビンA(A100)(3d)、その後4日目～11日目で3 ng/ml BMP4 及び 50 ng/ml FGF-10 (B3F50)(7d、9d 及び 11d)の存在下、又は5日間100 ng/ml アクチビンA(A100)(5d)、その後6及び7日目で25 ng/ml アクチビンA 及び 2 µM RA(A25R)(7d)の存在下のいずれかでのhESCの培養物におけるマーカー遺伝子の相対発現を示すグラフである。このパネルは、以下のマーカー遺伝子：(A) HOXA1、(B) PDE11A、(C) FAM49A 及び (D) WNT5A の発現の相対レベルを示す。

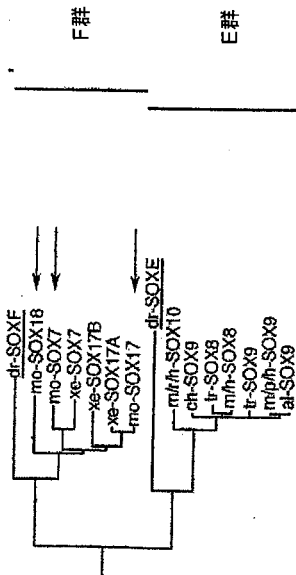
【図 1】



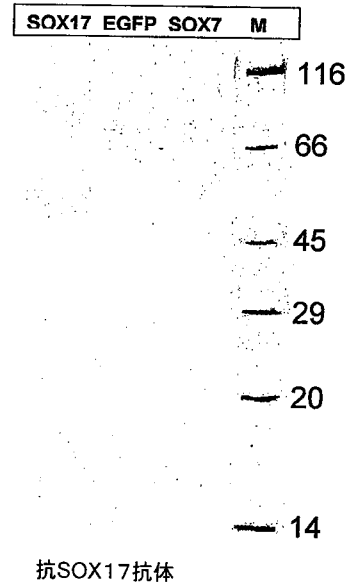
【図 2】



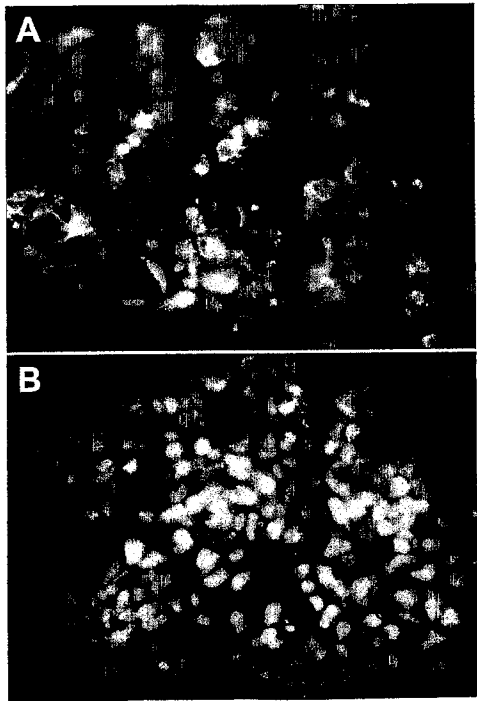
【図 3】



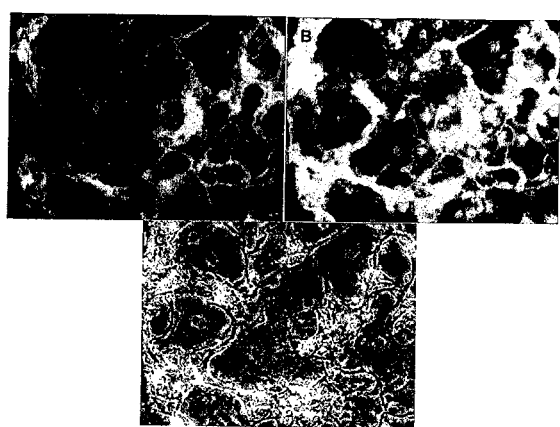
【図 4】



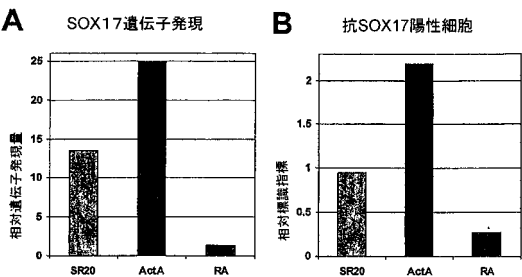
【 図 5 】



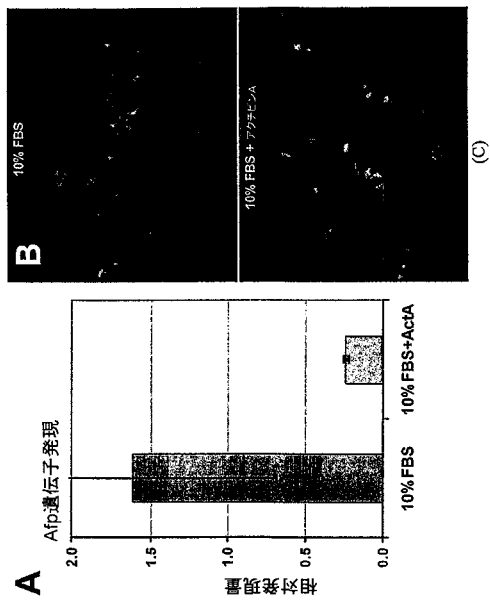
【 図 6 】



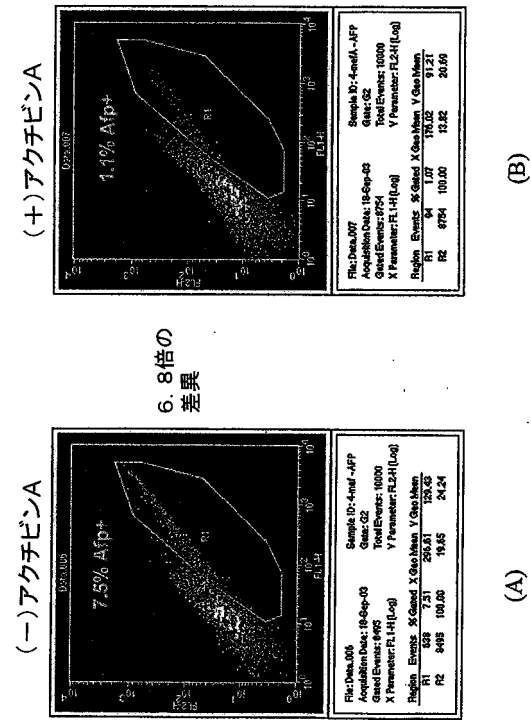
【 図 7 】



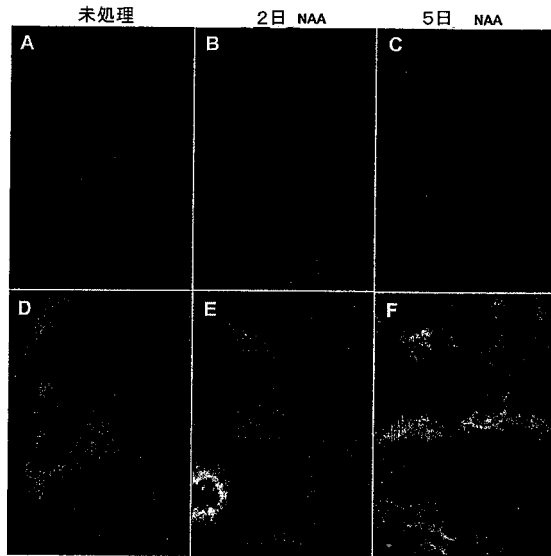
【 図 8 】



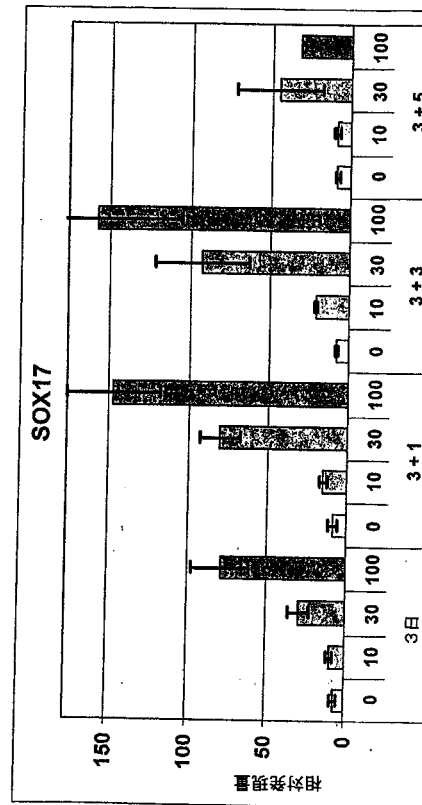
【 図 9 】



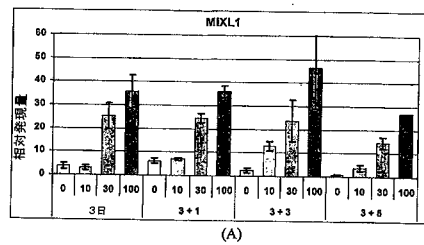
【図 10】



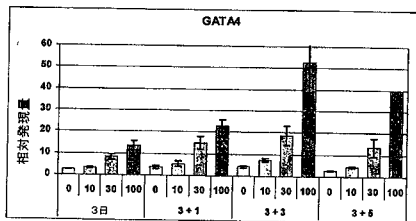
【図 11】



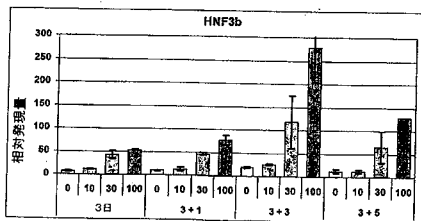
【図 12】



(A)

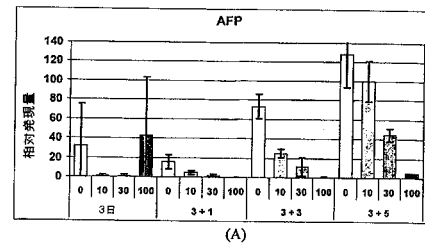


(B)

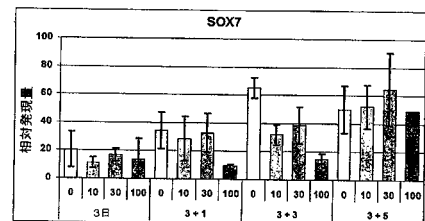


(C)

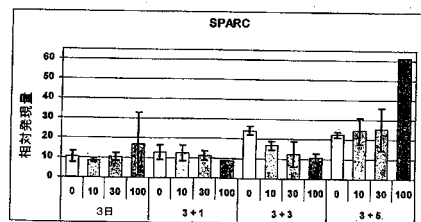
【図 13】



(A)

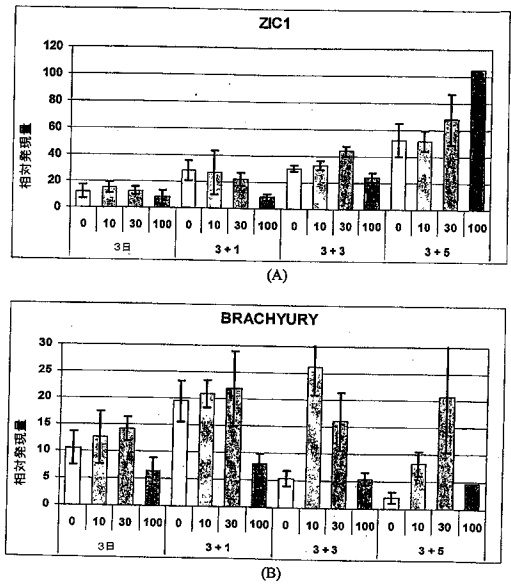


(B)

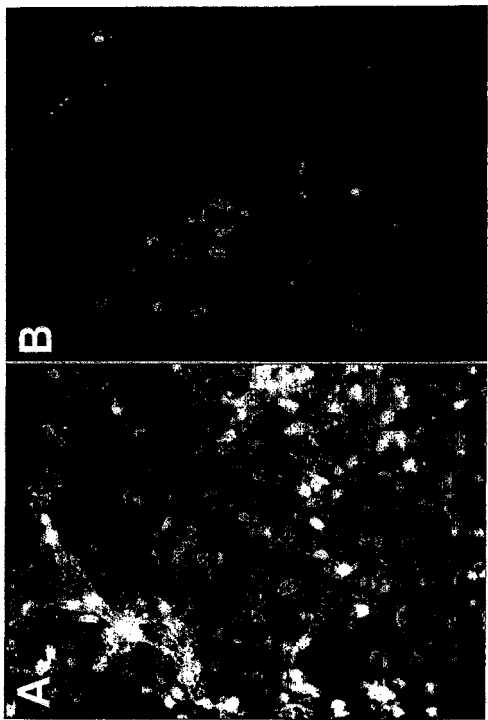


(C)

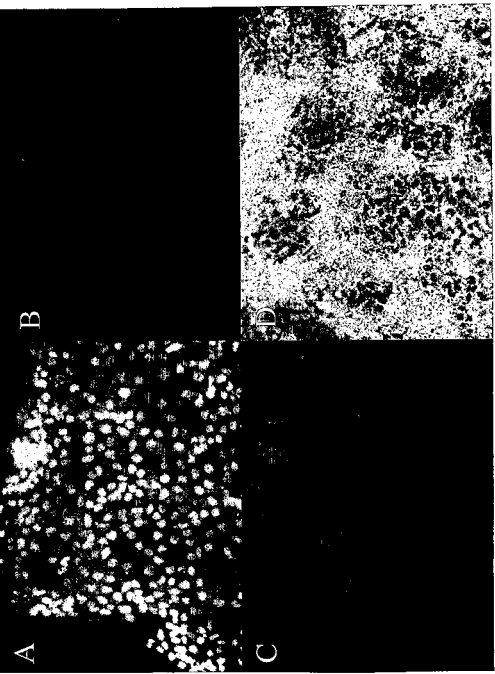
【 図 1 4 】



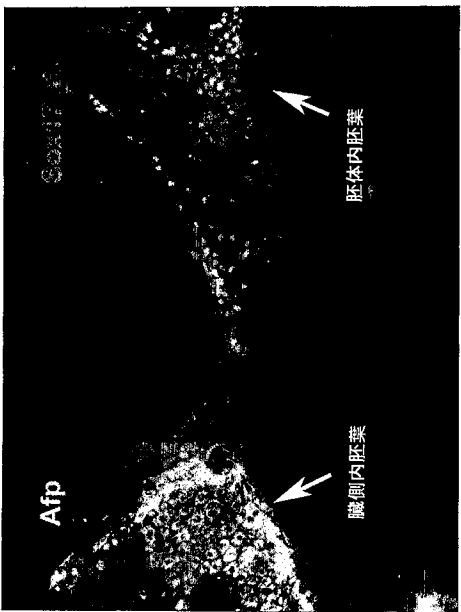
【 図 1 5 】



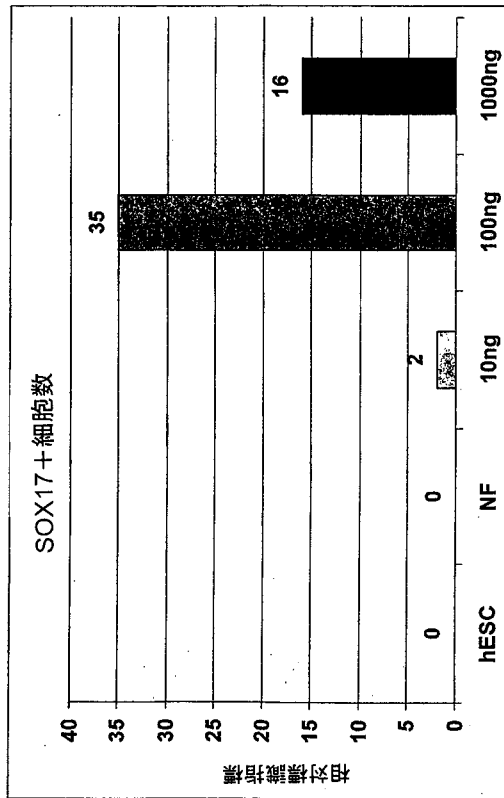
【 図 1 6 】



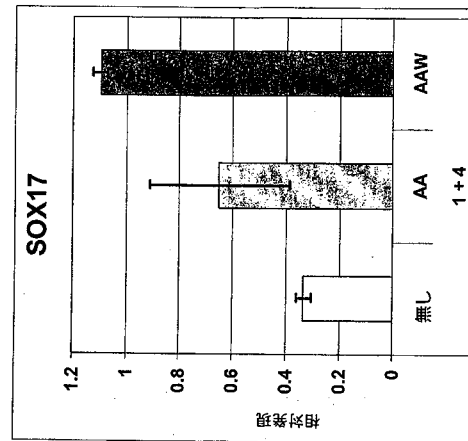
【 図 1 7 】



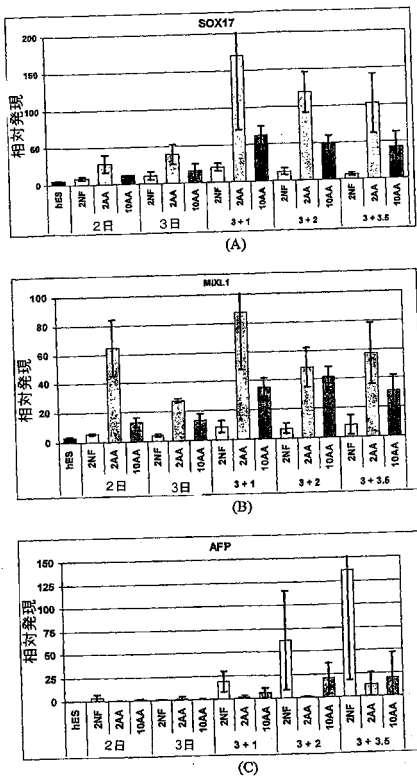
【図 2 2】



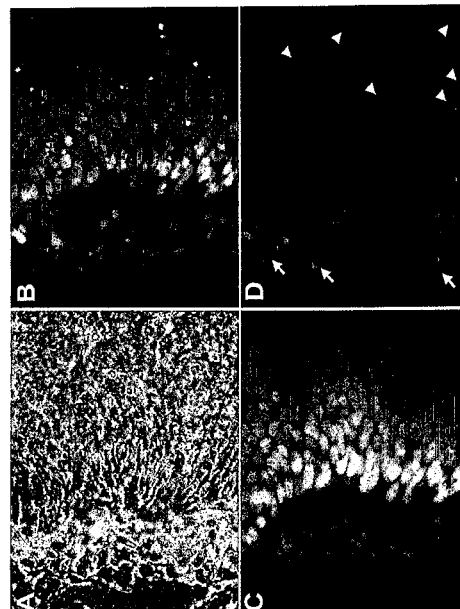
【図 2 3】



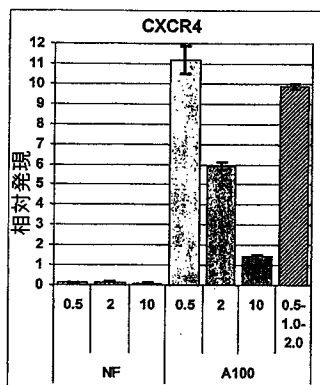
【図 2 4】



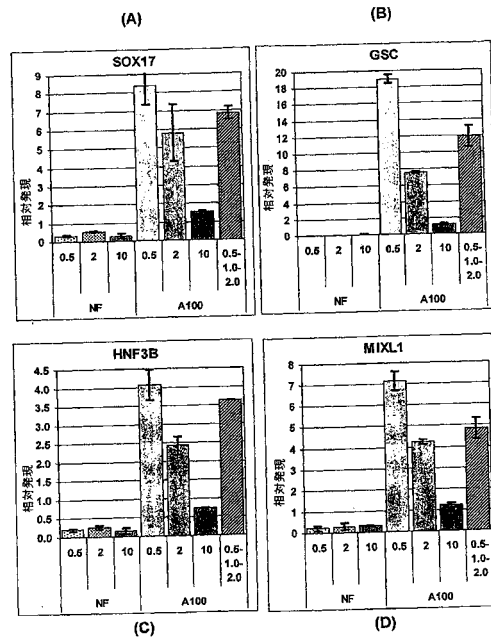
【図 2 5】



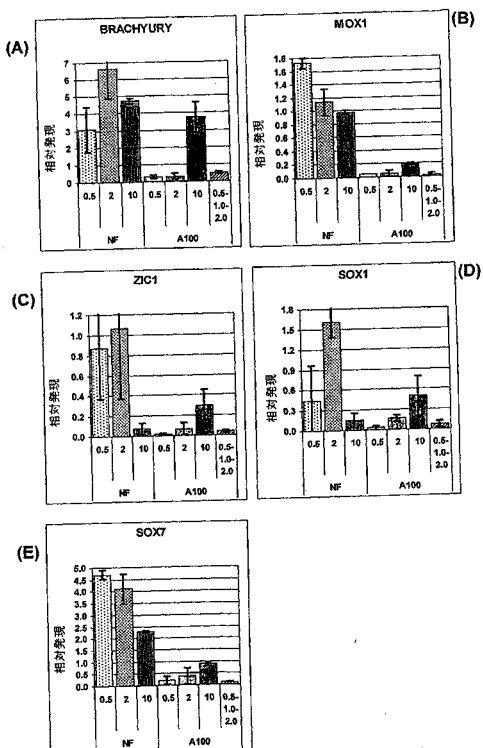
【図 26】



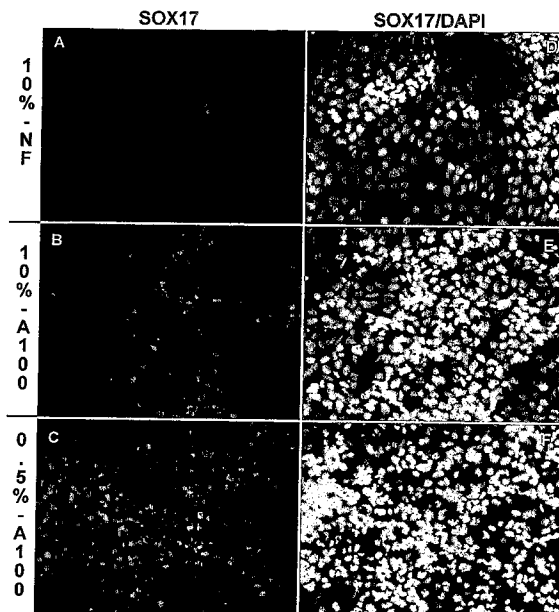
【図 27】



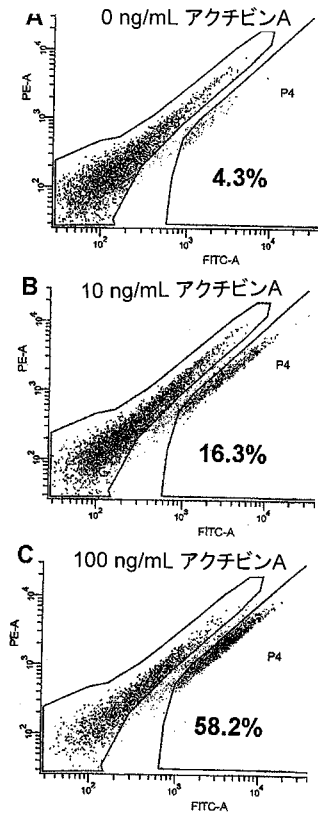
【図 28】



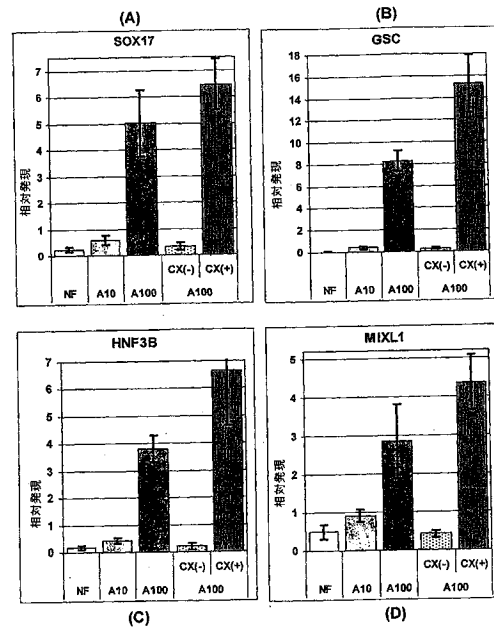
【図 29】



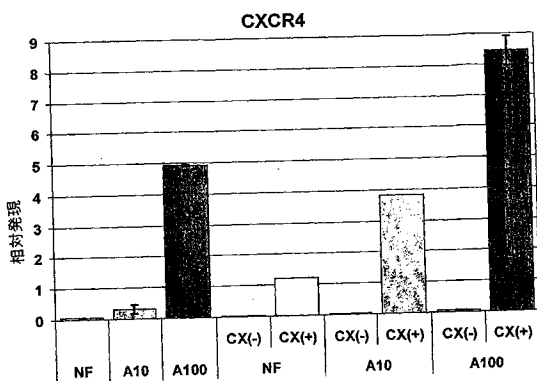
【図 30】



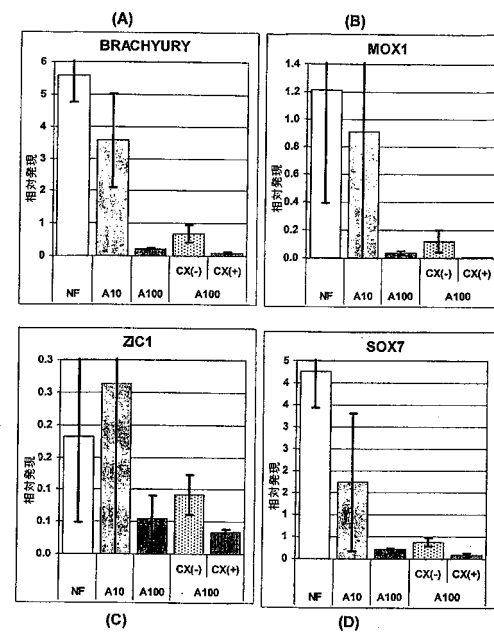
【図 31】



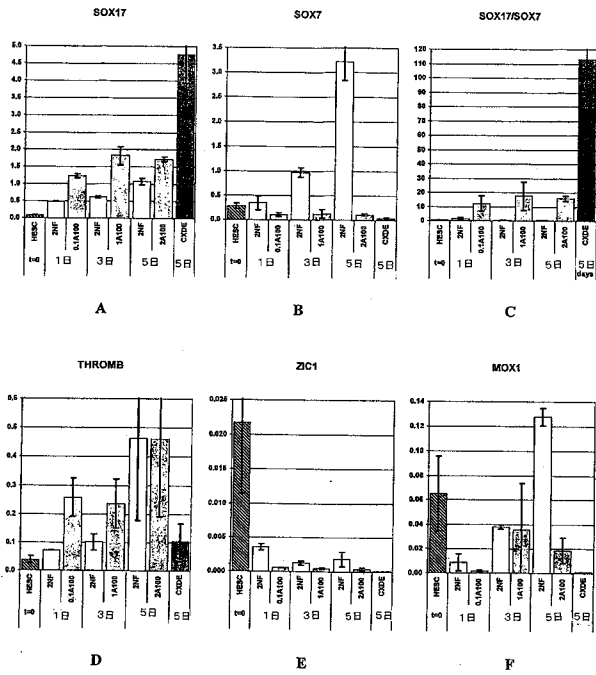
【図 32】



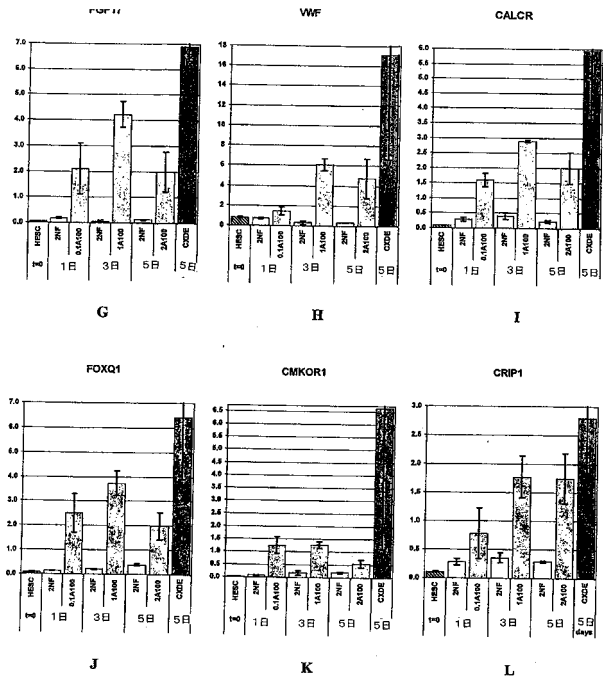
【図 33】



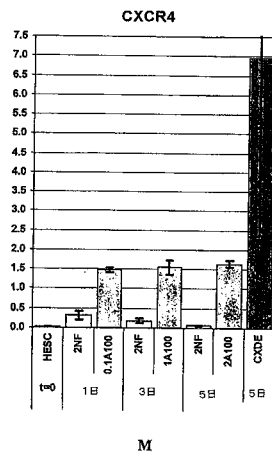
【図 34 - 1】



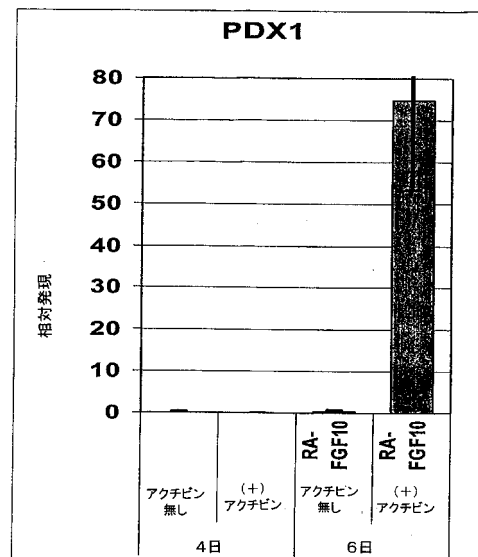
【図 34 - 2】



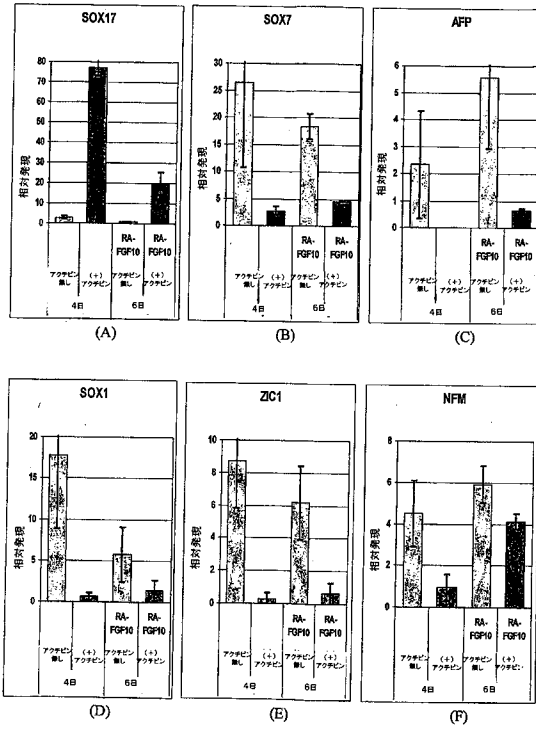
【図 34 - 3】



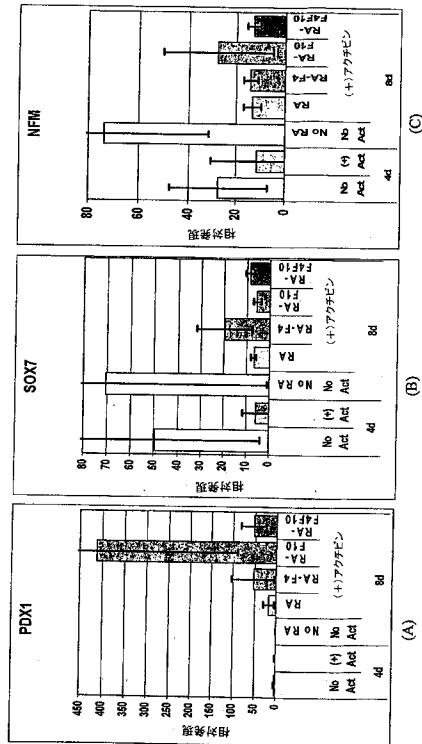
【図 35】



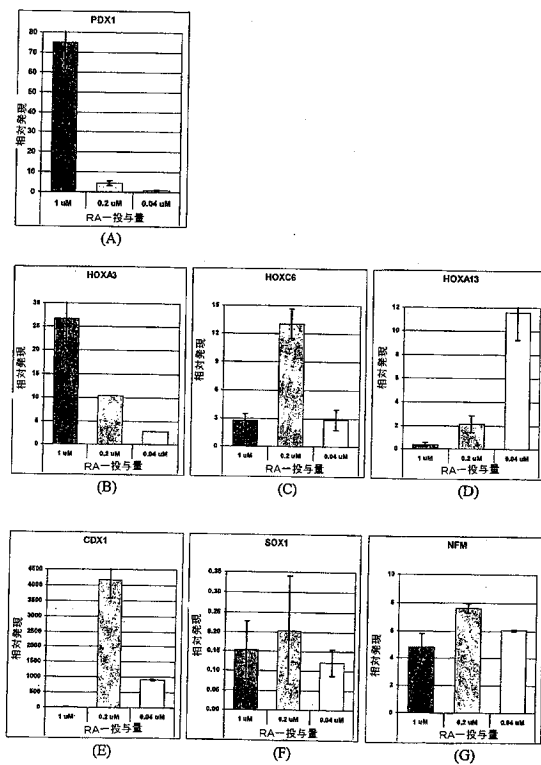
【図 3 6】



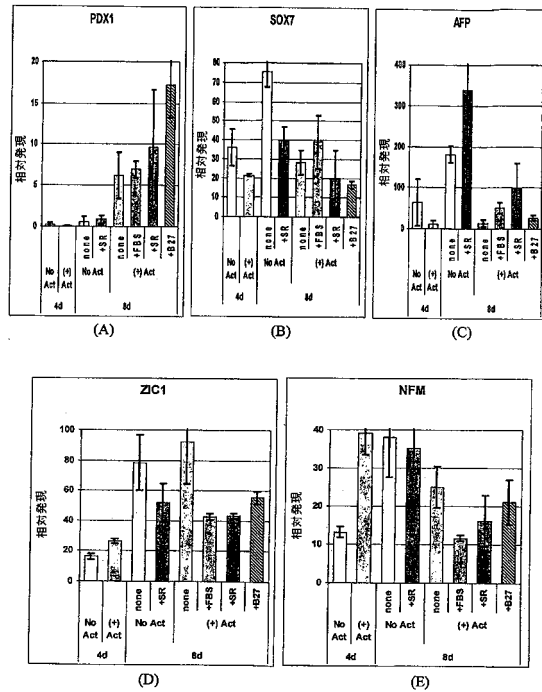
【図 3 7】



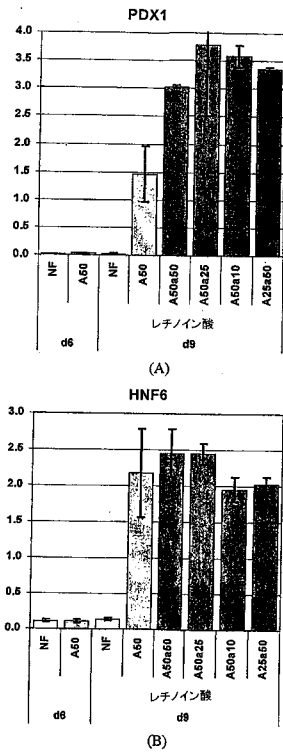
【図 3 8】



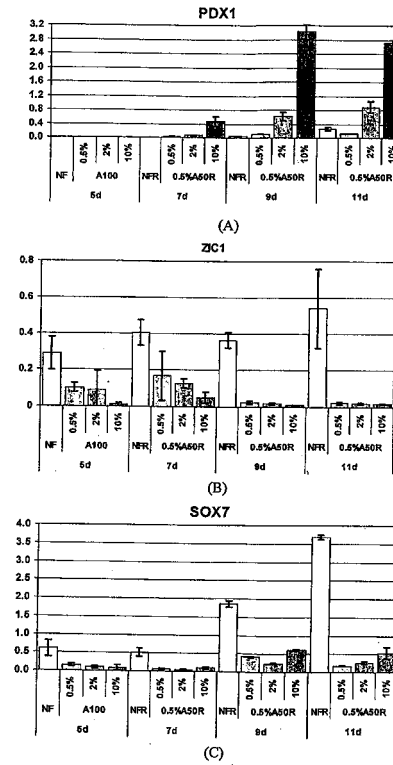
【図 3 9】



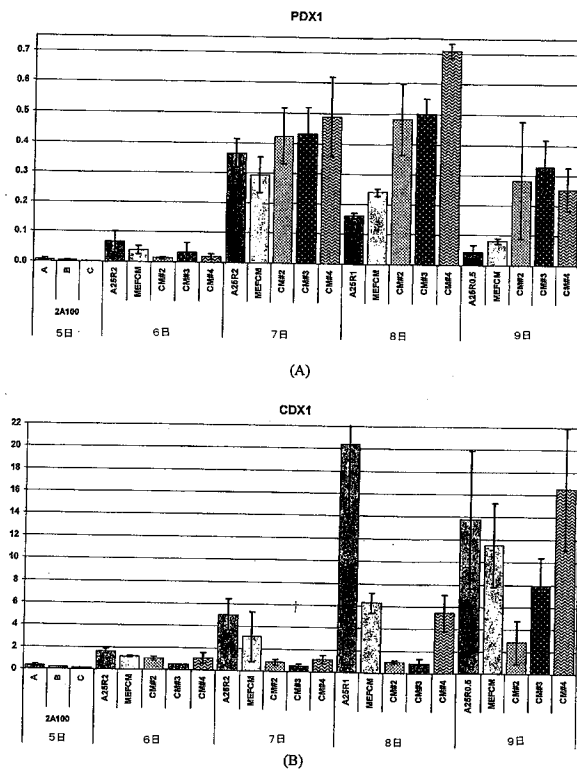
【図 40】



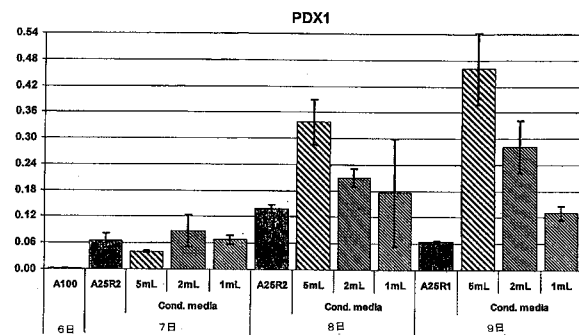
【図 41】



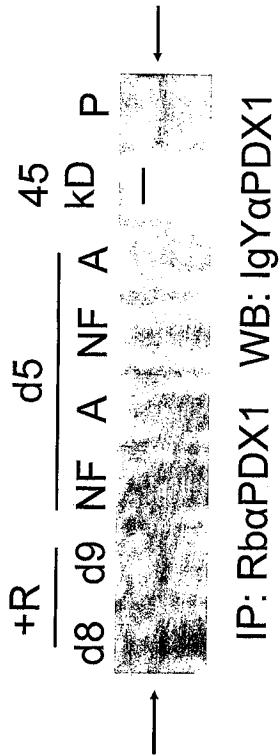
【図 42】



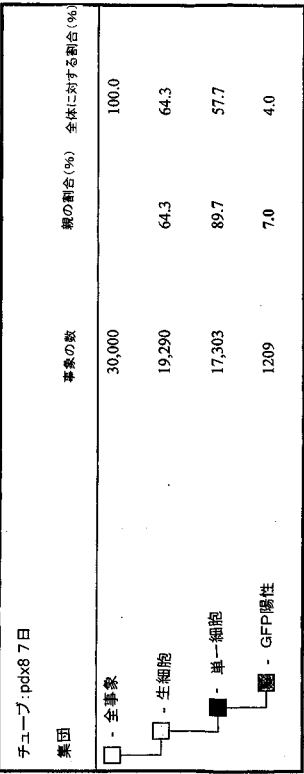
【図 43】



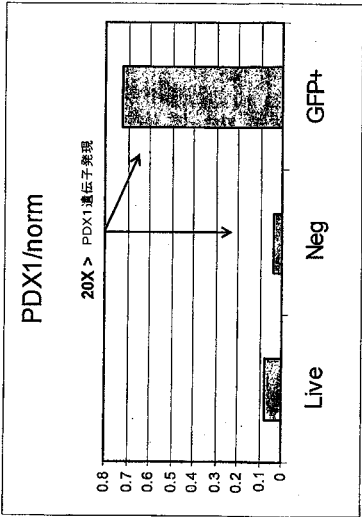
【 図 4 4 】



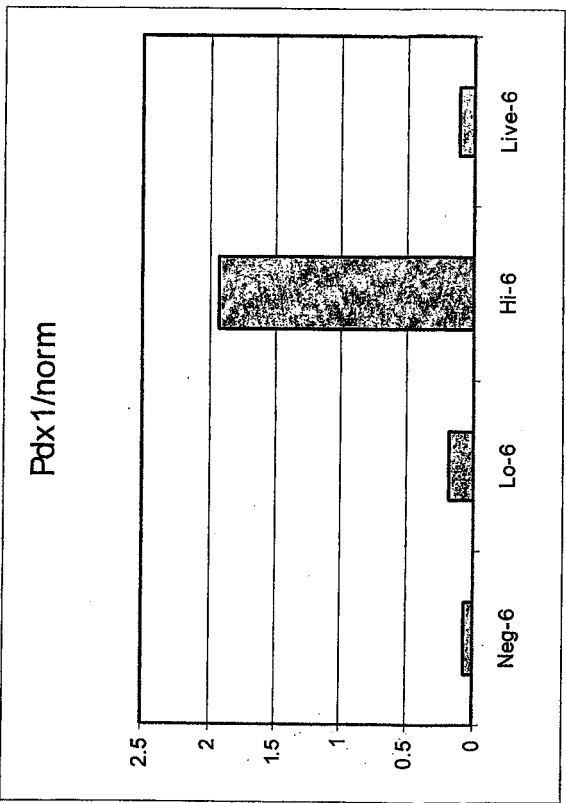
【 図 4 5 】



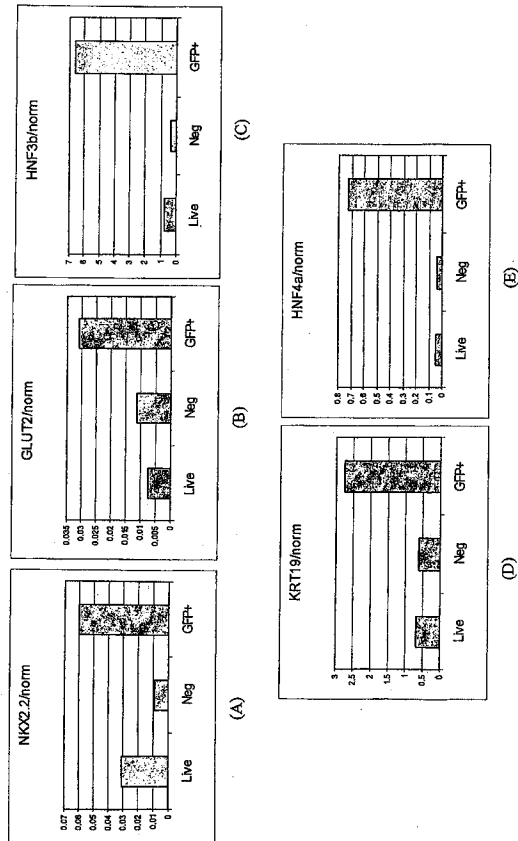
【 図 4 6 】



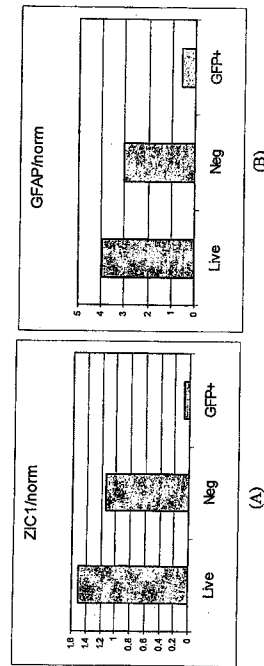
【 図 4 7 】



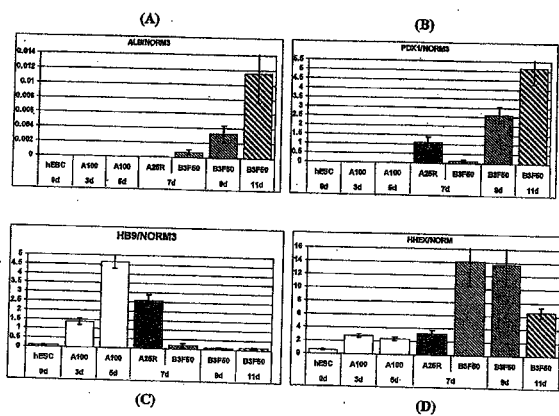
【 図 4 8 】



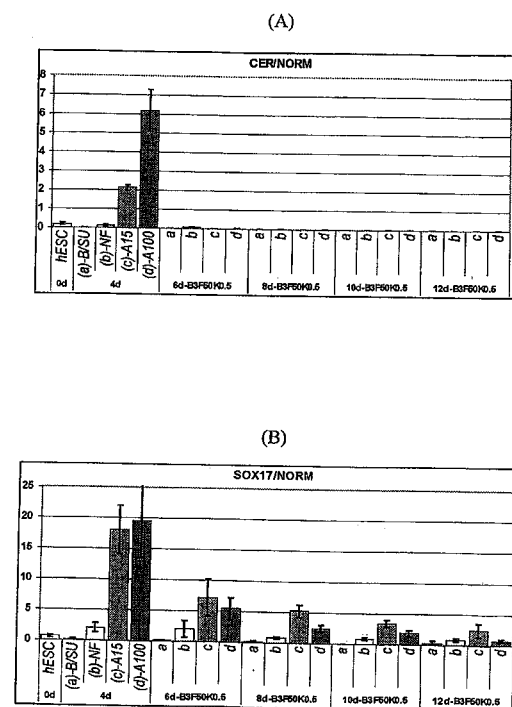
【 図 4 9 】



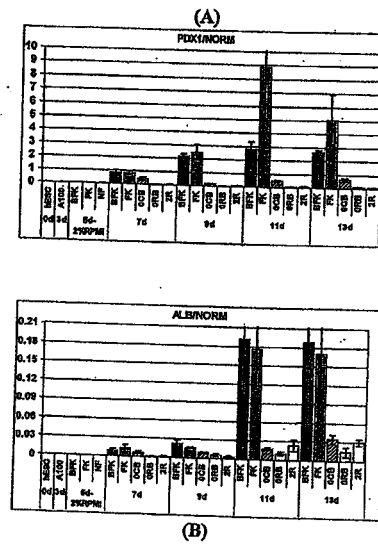
【 図 5 0 】



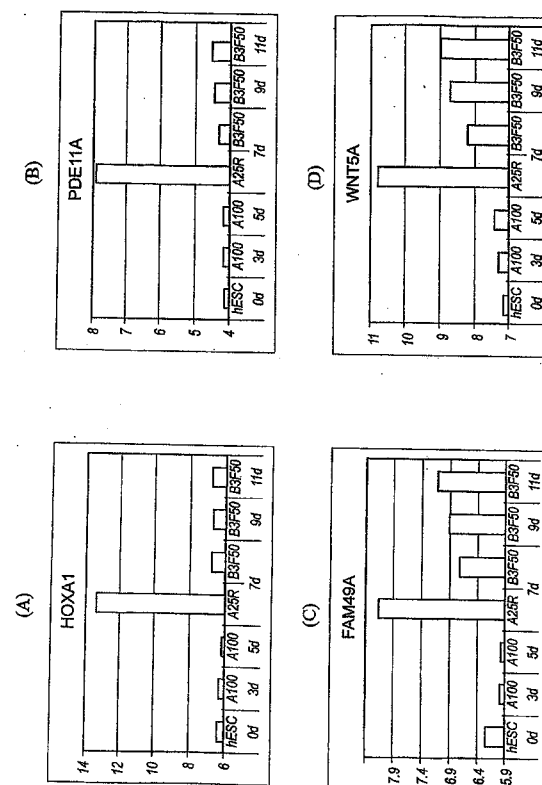
【 図 5 1 - 1 】



【 図 5 2 】



【 図 5 4 】



【配列表】

2009513143000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/042413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/08		
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		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEGEV H ET AL: "DIFFERENTIATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS INTO INSULIN-PRODUCING CLUSTERS" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 22, no. 3, 2004, pages 265-274, XP009038283 ISSN: 1066-5099	1-134, 136-154, 156-171
A	the whole document	135,155
X	WO 2005/097977 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND [US]; ODORICO JON [US]; KAHAN BRENDA [US];) 20 October 2005 (2005-10-20)	1-134, 136-154, 156-171
A	examples 1,2	135,155
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *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 *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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 March 2007		Date of mailing of the international search report 16/04/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer LOUBRADOU-BOURGES, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/042413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASSADY S ET AL: "INSULIN PRODUCTION BY HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 50, August 2001 (2001-08), pages 1691-1697, XP001146659 ISSN: 0012-1797	1-134, 136-154, 156-171
A	-----	135, 155
X	WO 03/050249 A2 (GERON CORP [US]; FISK GREGORY J [US]; INOKUMA MARGARET S [US]) 19 June 2003 (2003-06-19)	1-134, 136-154, 156-171
A	examples 4-6	135, 155
A	US 2002/187548 A1 (KELLER GORDON M [US] ET AL) 12 December 2002 (2002-12-12) claim 38	136-171
A	WO 2005/063971 A (NOVOCELL INC [US]; D AMOUR KEVIN ALLEN [US]; AGULNICK ALAN D [US]; BAE) 14 July 2005 (2005-07-14) the whole document	1-171
P,X	US 2006/003313 A1 (D AMOUR KEVIN A [US] ET AL) 5 January 2006 (2006-01-05) the whole document	1-171
P,X	WO 2005/116073 A (NOVOCELL INC [US]; D AMOUR KEVIN ALLEN [US]; AGULNICK ALAN D [US]; ELI) 8 December 2005 (2005-12-08) the whole document	1-171
P,X	WO 2006/016999 A (NOVOCELL INC [US]; D AMOUR KEVIN ALLEN [US]; AGULNICK ALAN D [US]; ELI) 16 February 2006 (2006-02-16) the whole document	1-171
P,A	D'AMOUR K A ET AL: "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 12, 28 October 2005 (2005-10-28), pages 1534-1541, XP002385437 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-171
P,A	MADSEN O D: "Stem cells and diabetes treatment" APMIS 2005 DENMARK, vol. 113, no. 11-12, 2005, pages 858-875, XP002423118 ISSN: 0903-4641 1600-0463 the whole document	1-171
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/042413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	D'AMOUR K A ET AL: "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells" NATURE BIOTECHNOLOGY 2006 UNITED STATES, vol. 24, no. 11, 2006, pages 1392-1401, XP002423119 ISSN: 1087-0156 1546-1696 the whole document	1-171

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/042413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005097977 A	20-10-2005	AU 2005230832 A1 CA 2555571 A1 EP 1730268 A2 GB 2427874 A US 2005260749 A1	20-10-2005 20-10-2005 13-12-2006 10-01-2007 24-11-2005
WO 03050249 A2	19-06-2003	AU 2002364143 A1 CA 2470539 A1 CN 1602351 A EP 1463798 A2 GB 2399823 A GB 2415432 A JP 2006500003 T	23-06-2003 19-06-2003 30-03-2005 06-10-2004 29-09-2004 28-12-2005 05-01-2006
US 2002187548 A1	12-12-2002	US 2003175955 A1 US 2004106195 A1	18-09-2003 03-06-2004
WO 2005063971 A	14-07-2005	AU 2004309421 A1 CA 2549605 A1 EP 1709159 A2 KR 20060114355 A	14-07-2005 14-07-2005 11-10-2006 06-11-2006
US 2006003313 A1	05-01-2006	NONE	
WO 2005116073 A	08-12-2005	AU 2005247869 A1 CA 2564114 A1 EP 1740612 A2 US 2005266554 A1	08-12-2005 08-12-2005 10-01-2007 01-12-2005
WO 2006016999 A	16-02-2006	NONE	

フロントページの続き

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

(74)代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74)代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72)発明者 ダムール, ケヴィン アレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 6 サン ディエゴ イースト エヴァンス ロード
2 7 3 9

(72)発明者 アグルニック, アラン ディー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0 サン ディエゴ トリー サークル 4 6 7 1
アパートメント エフ 2 0 2

(72)発明者 エリアゼル, スーザン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 8 サン ディエゴ クリーク ブリッジ プレイス
1 1 0 5 6

(72)発明者 ベートゲ, エマニュエル イー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 エンシニタス サンセット ドライブ 3 0 8

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC14 BA25 BB08 BB19 BB34 CA44

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009513143A5	公开(公告)日	2009-08-13
申请号	JP2008538095	申请日	2006-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	西色拉寺公司		
申请(专利权)人(译)	Saisera公司		
[标]发明人	ダムールケヴィンアレン アグルニックアランディー エリアゼルスーザン ベートゲエマニュエルイー		
发明人	ダムール,ケヴィン アレン アグルニック,アラン ディー. エリアゼル,スーザン ベートゲ,エマニュエル イー.		
IPC分类号	C12N5/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C12N5/0606 C12N5/0676 C12N2501/117 C12N2501/119 C12N2501/155 C12N2501/16 C12N2501/385 C12N2501/405 C12N2501/41 C12N2501/415 C12N2502/13 C12N2506/02 C12N2510 /00 C12N5/0603		
FI分类号	C12N5/00.E G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AC14 4B065/BA25 4B065/BB08 4B065/BB19 4B065/BB34 4B065/CA44		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	60/730917 2005-10-27 US		
其他公开文献	JP5404047B2 JP2009513143A		

摘要(译)

本文公开了包含背侧和/或腹侧PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞培养物及其制备方法。本文还公开了包含基本上纯化的背侧和/或腹侧PDX1-阳性前肠内胚层细胞的细胞群，以及用于富集，分离和纯化来自其他细胞类型的背侧和/或腹侧PDX1-阳性前肠内胚层细胞的方法。还公开了鉴定能够促进背侧和/或腹侧PDX1-阳性前肠内胚层细胞分化的分化因子的方法。