明　細　書

発明の名称 ：

ヒト造血幹細胞などの血球系細胞を培養するために適した無血清培地および培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト造血幹細胞などの血球系細胞を培養するために適した無血清培地（特にアルブミンフリー）の組成および培養方法を開示する。本発明によれば、ヒト造血幹細胞などの血球系細胞を培養する方法が提供される。該方法は、ヒト造血幹細胞などの血球系細胞をポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの連結体部分により修飾されたポリエチレングリコールと接触させることを含み得る。

背景技術

[0002] 造血幹細胞の培養において、化学的に定義された培地を用いた増殖について研究が進められており、マウスの造血幹細胞については、化学的に定義された培地を用いた培養が可能であることが明らかにされている（非特許文献１）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ，　５７１：１１７－１２１，　２０１９

発明の概要

[0004] 本発明は、ヒト造血幹細胞などの血球系細胞を培養するために適した培地（例えば、無血清培地、例えば、アルブミンフリーの無血清培地、またはサイトカインフリーの無血清培地、例えば、アルブミンフリーかつサイトカインフリーの無血清培地）の組成および培養方法を提供する。

[0005] 本発明者らは、マウスの造血幹細胞（その分離方法に由来してＫＳＬ細胞と呼ばれることもある）が、アルブミンを含まない無血清培地中で、ポリビ

ニルアルコール（ＰＶＡ）を加えることによって、長期にわたって大量に増殖できることを見出し、報告している（Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ，　５７１：１１７－１２１，　２０１９）。しかしながら、ヒトの造血幹細胞に関しては、アルブミンを含まない無血清培地中で、増殖させる方法は確立されていない。今般、本発明者らは、ヒト造血幹細胞は、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール存在下で、幹細胞性を維持したまま、顕著な増殖を示すことを見出した。また、その際にサイトカインフリーの条件下においても造血幹細胞の増殖を維持できることを見出した。さらに、同条件下では、造血幹細胞に加えて、赤芽球、および巨核球、ならびにT細胞、B細胞、マクロファージ、および好中球などの白血球を含む様々な血球系細胞の増殖が可能であることを見出した。

[0006] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

［１］ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養する方法であって、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、ポリビニルアルコールを含むアルブミンフリーの培地（特に血清アルブミンフリーの培地）であり、かつ、

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含み、

上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が維持される、または増加する、

方法。

［２］増加したヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を得ることを含む、上記［１］に記載の方法。

［３］培養培地が、ＰＩ３Ｋアクチベータを含み、幹細胞因子（ＳＣＦ）を含まない、上記［１］または［２］に記載の方法。

［４］培養培地が、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯのアゴニストを含む、上記［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］培養培地が、ＳＣＦおよびＴＰＯの両方を含まない、上記［４］に記載の方法。

［５A］培養培地が、サイトカインフリーの培地である、上記［４］または［５］に記載の方法。

［６］培養培地が、４－Ｎ－［２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－４－イル］シクロヘキサン－１，４－ジアミン（ＵＭ１７１）をさらに含む、上記［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］培養期間が７日以上である、上記［６］に記載の方法。

［８］アルブミンを含まない、組成物であって、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞と、ポリビニルアルコールと、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上と；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストと；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストと、

を含む、組成物。

［９］ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含む、上記［８］に記載の組成物。

［１０］４－Ｎ－［２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－４－イル］シクロヘキサン－１，４－ジアミン（ＵＭ１７１）をさらに含む、上記［８］または［９

］に記載の組成物。

［１１］上記［１］～［７］のいずれかに記載の方法によって得られるヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞。

［１２］ポリビニルアルコールを含み、アルブミンを含まず、かつ、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地。

[0007] 〔１〕ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養するまたは製造する方法であって、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、ポリビニルアルコールを含み、かつ、

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含み、

上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が維持される、または増加する、

方法。

〔２〕前記培養培地が、無血清培地である、上記〔１〕に記載の方法。

〔３〕前記培養培地が、化学的に定義された培地である、上記〔１〕に記載の方法。

〔４〕前記培養培地が、アルブミンを実質的に含まない、上記〔１〕～〔３

〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕増加したヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を得ることを含む、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕培養培地が、ＰＩ３Ｋアクチベータを含み、幹細胞因子（ＳＣＦ）を含まない、上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕培養培地が、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯのアゴニストを含む、上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法。

〔８〕培養培地が、ＳＣＦおよびＴＰＯの両方を含まない、上記〔７〕に記載の方法。

〔８Ａ〕培養培地が、サイトカインフリーの培地である、上記〔７〕または〔８〕に記載の方法。

〔９〕培養培地が、４－Ｎ－〔２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド〔４，５－ｂ〕インドール－４－イル〕シクロヘキサン－１，４－ジアミン（ＵＭ１７１）をさらに含む、上記〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔１０〕培養期間が７日以上である、上記〔９〕に記載の方法。

〔１１〕ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞と、アルブミンの代替としてポリビニルアルコールと、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上と；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストと；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストと、

を含む、組成物。

〔１２〕ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含む、上記〔１１〕に記載の組成物。

〔１３〕４－Ｎ－〔２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド〔４，５－ｂ〕インドール－４－イル〕シクロヘキサ

ン－１，４－ジアミン（ＵＭ１７１）をさらに含む、上記〔１１〕または〔１２〕に記載の組成物。

〔１４〕上記〔1〕～〔１０〕のいずれかに記載の方法によって得られるヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞。

〔１５〕アルブミンの代替として、ポリビニルアルコールを含み、かつ、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地。

〔１６〕無血清培地である、上記〔１５〕に記載の培養培地。

〔１７〕化学的に定義された培地である、上記〔１５〕に記載の培地。

〔１８〕アルブミンを含まない、上記〔１５〕～〔１７〕のいずれかに記載の培地。

〔１９〕ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞である、上記〔1〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔２０〕ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞である、上記〔１１〕～〔１３〕のいずれかに記載の組成物。

〔２１〕ヒト細胞が、ヒト血球系細胞である、上記〔1〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔２２〕ヒト細胞が、ヒト血球系細胞である、上記〔１１〕～〔１３〕のいずれかに記載の組成物。

〔２３〕上記〔1〕～〔８〕、〔１９〕および〔２１〕のいずれかのいずれかに記載の方法によって得られるヒト細胞を含む培地。

〔２４〕無血清培地であり、アルブミンフリーかつサイトカインフリーである、上記〔２３〕に記載の培地。

[0008] 本発明によればまた、以下の発明が提供される。

［１Ｂ］ヒト細胞を培養する方法であって、

ヒト細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコールを含む、

方法。

［２Ｂ］増加したヒト細胞を得ることを含む、上記［１Ｂ］に記載の方法。

［３Ｂ］ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞である、上記［１Ｂ］または［２Ｂ］に記載の方法。

［４Ｂ］ヒト細胞培養用の培地組成物であって、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコールを含む、組成物。

［５Ｂ］ヒト細胞と、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコールを含む、組成物。

［６Ｂ］ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞である、上記［４Ｂ］または［５Ｂ］に記載の組成物。

［７Ｂ］上記［１Ｂ］～［３Ｂ］のいずれかに記載の方法によって得られるヒト細胞。

［８Ｂ］ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞である、上記［３Ｂ］に記載の方法。

［９Ｂ］ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞である、上記［６Ｂ］に記載の組成物。

［１０Ｂ］ヒト細胞が、ヒト血球系細胞である、上記［３Ｂ］に記載の方法。

［１１Ｂ］ヒト細胞が、ヒト血球系細胞である、上記［６Ｂ］に記載の組成物。

［１２Ｂ］上記［１Ｂ］～［３Ｂ］のいずれかに記載の方法によって得られるヒト細胞を含む培地。

［１３Ｂ］無血清培地であり、アルブミンフリーかつサイトカインフリーである、上記［１２Ｂ］に記載の培地。

［１４Ｂ］ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコールが、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールである、上記［１Ｂ］～［３Ｂ］、［８Ｂ］、および［１０Ｂ］のいずれかに記載の方法、もしくは、上記［４Ｂ］～［６Ｂ］、［９Ｂ］、および［１１Ｂ］のいずれかに記載の組成物、または、上記［１２］または［１３］に記載の培地。

[0009] ［１Ｃ］ヒト細胞を培養する方法であって、

ヒト細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、血清アルブミンフリーの培地であり、添加剤を含み、添加剤は、ポリビニルアルコールおよび修飾ポリアルキレンリコールからなる群から選択され、かつ、

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含み、

上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が維持される、または増加する、

方法。

［２Ｃ］ヒト細胞が、ヒト造血幹細胞およびヒト血球系細胞からなる群から選択される細胞である、上記［１Ｃ］に記載の方法。

［３Ｃ］ヒト細胞が、造血幹細胞以外の血球系細胞である、上記［１Ｃ］に記載の方法。

［４Ｃ］添加剤が、ポリビニルアルコールである、上記［３Ｃ］に記載の方

法。

［５Ｃ］添加剤が、修飾ポリアルキレングリコールである、上記［１Ｃ］または［２Ｃ］に記載の方法。

［６Ｃ］修飾ポリアルキレングリコールが、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコールである、上記［５Ｃ］に記載の方法。

［７Ｃ］修飾ポリアルキレングリコールが、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールである、上記［６Ｃ］に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、アルブミンフリーの無血清培地において、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を含む培地中で、マウス造血幹細胞（マウスＫＳＬ細胞）およびヒト造血幹細胞（ＣＤ３４＋ＣＤ３８－細胞）をそれぞれマウスおよびヒトの１０　ｎｇ／ｍＬの組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下で培養した結果を示す。

[図2]図２は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、マウスおよびヒトそれぞれの造血幹細胞を１０　ｎｇ／ｍＬの組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下で培養した造血幹細胞におけるＳＣＦおよびＴＰＯの下流のシグナル因子のリン酸化の程度を示す図である。記号「ｍ」は、マウス造血幹細胞を示し、「ｈ」は、ヒト造血幹細胞を示す。

[図3]図３は、ヒト造血幹細胞を、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、１０　ｎｇ／ｍＬのヒト組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのヒトトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下、かつ、ＡＫＴActivator II(AKTa)またはＰＩ３Ｋアクチベータ（ＰＩ３Ｋａ）の存在下で培養した結果を示す。

[図4]図４は、ヒト造血幹細胞を、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下、かつ１００　ｎｇ／ｍＬのヒトトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下において

、培養し、７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。図４では、ＳＣＦを含む条件とＳＣＦを含まない条件とが比較され、培養７日目の細胞総数およびＣＤ３４＋細胞の数に、条件間で統計学的な有意差が認められないことを示す。

[図5]図５は、アルブミンまたはＰＶＡの存在下において、各種ＴＰＯ受容体アゴニストでＴＰＯを代替して、ヒト造血幹細胞を培養したときの細胞数の推移を示す。記号「Ｂｕｔｙ」はブチザミドを表し、「ＥＩｔ」は、エルトロンボパグを表し、「Ａｖａ」は、アバトロンボパグを表す。

[図6]図６は、アルブミンおよびＰＶＡのいずれかの存在下において、各種ＴＰＯ受容体アゴニストでＴＰＯを代替して、ヒト造血幹細胞を培養したときの７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図7]図７は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ＰＩ３Ｋアクチベータ とＴＰＯまたはブチザミド（Ｂｕｔｙ）を含む培地中で、ヒト造血幹細胞を培養し、７日目の細胞総数、ＣＤ３４＋細胞の数、およびＧＥｍＭコロニーの数を示す。コロニーの種類は、顕微鏡下でコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製したのちに、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で判定を行った。Gは「顆粒球」、Eは「赤芽球」、mは「マクロファージ」、Mは「巨核球」を意味する。

[図8]図８は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータ若しくはＴＰＯ受容体アゴニストまたはこれらの組合せを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図9]図９は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびアゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目に得られた培養物中の各細胞集団の増殖率を示す。

[図10]図１０は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびアゴニストを

含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目および１４日目の細胞総数の推移およびＣＤ３４＋細胞の数の推移を示す。

[図11]図１１は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびｔｐｏ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目に得られる細胞のゲートの結果を示す。左のパネルは、ＣＤ３４とＣＤ３８をマーカーとするフローサイトメトリの結果であり、右のパネルはＣＤ４１ａとＣＤ４２ｂをマーカーとするフローサイトメトリの結果である。図１１の写真は、得られた培養物の光学顕微鏡写真である。

[図12]図１２は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびｔｐｏ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目に得られる細胞のコロニーアッセイの結果を示す。コロニーの種類は、顕微鏡下でコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製したのちに、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で判定を行った。Gは「顆粒球」、Eは「赤芽球」、mは「マクロファージ」、Mは「巨核球」を含有するコロニーであることを意味する。

[図13]図１３は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータと；ｔｐｏ受容体アゴニストと；ＳＲ－１およびＵＭ１７１のいずれかまたは両方と；を含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目の総細胞とＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図14]図１４は、条件１～３のそれぞれで培養し、１４日目の総細胞、およびＣＤ３４＋細胞の増殖率、並びにＣＤ４１＋細胞の細胞数を示す。

[図15]図１５は、条件１～３のぞれぞれで培養し、１４日目の培養物中の細胞のフローサイトメトリの結果である。上は、ＣＤ３４（横軸）およびＣＤ３８（縦軸）による結果を示し、下は、ＣＤ４１ａ（横軸）およびＣＤ４２ｂ（縦軸）による結果を示す。

[図16]図１６は、条件１～３のそれぞれで培養し、７日目のヒト造血幹細胞をマウスに移植し、１２週間後のマウスの末梢血中のヒト造血幹細胞の生着

を示す図である。

[図17]図１７は、譲渡されたさい帯血を単核球分離した後に、アルブミン、ＳＣＦおよびＴＰＯをいずれも含まないが、ＰＶＡとＰＩ３Ｋアクチベータ とＴＰＯ受容体アゴニストを含む培地で、ＵＭ１７１存在下または非存在下の条件で、１４日間培養して得られた培養物の総細胞数、ＣＤ３４＋細胞の割合（％）、生存細胞の割合（％）、およびＣＤ３４＋細胞数を示す。

[図18]図１８は、アルブミン非存在下におけるマウス造血幹細胞のインビトロ培養実験の結果を示す。マウス造血幹細胞の培養培地には、表示された成分が最終濃度で０．１％の濃度で含まれている。より具体的には、ＢＡＳＦ社製の同濃度のコリフォールR Ｐ１８８　ｂｉｏ（１８８　ｂｉｏ）、コリフォール（商標）　Ｐ　１８８　Ｇｅｉｓｍａｒ（１８８　Ｇｅｉｓｍａｒ）、ソルプラス（Ｓｏｌ＋）、コリフォール（商標）　Ｐ　４０７　Ｇｅｉｓｍａｒ（４０７　Ｇｅｉｓｍａｒ）、コリドン（商標）　３０　Ｏｒｉｇｉｎ　ＵＳＡ（３０　ＵＳＡ）、コリドン（商標）　１７　ＰＦ（１７　ＰＦ）、コリドン（商標）　２５（２５）、コリドン（商標）９０Ｆ（９０Ｆ）、およびコリドン（商標）１２ＰＦ（１２ＰＦ）をそれぞれ最終濃度０．１％で添加した上記培地が用いられた。

[図19]図１９は、アルブミン非存在下の無血清培地におけるＰＶＡまたはポリマーＡ存在下でのマウス造血幹細胞のインビトロでのコロニー形成実験の結果を示す。

[図20]図２０は、アルブミン非存在下の無血清培地においてＰＶＡまたはポリマーＡ存在下で培養したマウス造血幹細胞の幹細胞マーカーＣＤ２０１の陽性率（％）を示す。

[図21]図２１は、アルブミン非存在下の無血清培地においてＰＶＡまたはポリマーＡ存在下で培養したマウス造血幹細胞を照射マウスに造血幹細胞移植するスキーム（左）と、移植４週間後のマウスの末梢血（ＰＢ）中のキメラ率（％）を示す。キメラ率は、全血球細胞中の移植造血幹細胞由来の細胞の割合である。

[図22]図２２は、アルブミン非存在下の無血清培地においてＰＶＡまたはポリマーＡ存在下で培養したマウス造血幹細胞のＣＤ３４陽性細胞率（％）を示す。

[図23]図２３は、アルブミン非存在下の無血清培地においてＰＶＡまたはポリマーＡ存在下で培養したときのマウス造血幹細胞の数の変化を示す。

[図24]図２４は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、マウスおよびヒトそれぞれの造血幹細胞を１０　ｎｇ／ｍＬの組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下で培養した造血幹細胞におけるＳＣＦおよびＴＰＯの下流のシグナル因子のリン酸化の程度を示す図である。記号「ｍ」は、マウス造血幹細胞を示し、「ｈ」は、ヒト造血幹細胞を示す。

[図25]図２５は、ヒト造血幹細胞を、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、１０　ｎｇ／ｍＬのヒト組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのヒトトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下、かつ、ＡＫＴＡｃｔｉｖａｔｏｒ　ＩＩ（ＡＫＴａ）またはＰＩ３Ｋアクチベータ（ＰＩ３Ｋａ）の存在下で培養した結果を示す。

[図26]図２６は、ヒト造血幹細胞を、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下、かつ１００　ｎｇ／ｍＬのヒトトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下において、培養し、７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。図９では、ＳＣＦを含む条件とＳＣＦを含まない条件とが比較され、培養７日目の細胞総数およびＣＤ３４＋細胞の数に、条件間で統計学的な有意差が認められないことを示す。

[図27]図２７は、アルブミンまたはＰＶＡの存在下において、各種ＴＰＯ受容体アゴニストでＴＰＯを代替して、ヒト造血幹細胞を培養したときの細胞数の推移を示す。記号「Ｂｕｔｙ」はブチザミドを表し、「Ｅｌｔ」は、エルトロンボパグを表し、「Ａｖａ」は、アバトロンボパグを表す。

[図28]図２８は、アルブミンおよびＰＶＡのいずれかの存在下において、各種ＴＰＯ受容体アゴニストでＴＰＯを代替して、ヒト造血幹細胞を培養した

ときの７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図29]図２９は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ＰＩ３Ｋアクチベータとｔｐｏまたはブチザミド（Ｂｕｔｙ）を含む培地中で、ヒト造血幹細胞を培養し、７日目の細胞総数、ＣＤ３４＋細胞の数、およびＧＥｍＭコロニーの数を示す。コロニーの種類は、顕微鏡下でコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製したのちに、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で判定を行った。Ｇは「顆粒球」、Ｅは「赤芽球」、ｍは「マクロファージ」、Ｍは「巨核球」を意味する。

[図30]図３０は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータ若しくはＴＰＯ受容体アゴニストまたはこれらの組合せを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目の総細胞およびＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図31]図３１は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目に得られた培養物中の各細胞集団の増殖率を示す。

[図32]図３２は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、７日目および１４日目の細胞総数の推移およびＣＤ３４＋細胞の数の推移を示す。

[図33]図３３は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目に得られる細胞のゲートの結果を示す。左のパネルは、ＣＤ３４とＣＤ３８をマーカーとするフローサイトメトリの結果であり、右のパネルはＣＤ４１ａとＣＤ４２ｂをマーカーとするフローサイトメトリの結果である。図１６の写真は、得られた培養物の光学顕微鏡写真である。

[図34]図３４は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴ

ＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびｔｐｏ受容体アゴニストを含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目に得られる細胞のコロニーアッセイの結果を示す。コロニーの種類は、顕微鏡下でコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製したのちに、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で判定を行った。Ｇは「顆粒球」、Ｅは「赤芽球」、ｍは「マクロファージ」、Ｍは「巨核球」を含有するコロニーであることを意味する。

[図35]図３５は、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下で、ＳＣＦおよびＴＰＯを含まないが、ＰＩ３Ｋアクチベータと；ＴＰＯ受容体アゴニストと；ＳＲ－１およびＵＭ１７１のいずれかまたは両方と；を含む培養培地でヒト造血幹細胞を培養し、１４日目の総細胞とＣＤ３４＋細胞の増殖率を示す。

[図36]図３６は、条件１～３のそれぞれで培養し、１４日目の総細胞、およびＣＤ３４＋細胞の増殖率、並びにＣＤ４１＋細胞の細胞数を示す。

[図37]図３７は、条件１～３のぞれぞれで培養し、１４日目の培養物中の細胞のフローサイトメトリの結果である。上は、ＣＤ３４（横軸）およびＣＤ３８（縦軸）による結果を示し、下は、ＣＤ４１ａ（横軸）およびＣＤ４２ｂ（縦軸）による結果を示す。

[図38]図３８は、条件１～３のそれぞれで培養し、７日目のヒト造血幹細胞をマウスに移植し、１２週間後のマウスの末梢血中のヒト造血幹細胞の生着を示す図である。

[図39]図３９は、譲渡されたさい帯血を単核球分離した後に、アルブミン、ＳＣＦおよびＴＰＯをいずれも含まないが、ＰＶＡとＰＩ３Ｋアクチベータとｔｐｏ受容体アゴニストを含む培地で、ＵＭ１７１存在下または非存在下の条件で、１４日間培養して得られた培養物の総細胞数、ＣＤ３４＋細胞の割合（％）、生存細胞の割合（％）、およびＣＤ３４＋細胞数を示す。

[図40]図４０は、ＰＶＡまたはソルプラス（商標）存在下のアルブミンフリーかつサイトカインフリー培地におけるヒトＴ細胞の増殖を示す。

[図41]図４１は、ＰＶＡまたはソルプラス（商標）存在下のアルブミンフリー培地におけるヒト造血幹細胞の分化実験の結果を示す。造血幹細胞から幅

広い系列の血球系細胞が増殖分化（特に増殖）できることが示されている。

[図42]図４２は、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）細胞が、ＰＶＡまたはソルプラス（商標）存在下のアルブミンフリーかつサイトカインフリーの培地において増殖できることを示す。図中の「ＩＭ＋」は、イマニチブ存在下であることを意味し、「ＩＭ－」は、イマニチブ非存在下であることを意味する。

発明の詳細な説明

[0011] 本明細書では、「造血幹細胞」とは、血球系細胞に分化することができる幹細胞である。造血幹細胞は、骨髄、さい帯、胎盤、および末梢血から採取することができる。ヒト造血幹細胞は、ＣＤ３４陽性の細胞である。ヒトにおいて、造血幹細胞は、ＣＤ３４陽性ＣＤ３８陰性の細胞分画に多く含まれていることが知られている。従って、ヒト造血幹細胞は、ＣＤ３４陽性ＣＤ３８陰性であり得る。造血幹細胞は、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞をエクスビボで分化させて得られる細胞であってもよい。

[0012] 本明細書では、「血球系細胞」とは、造血幹細胞および造血幹細胞が分化して生じる細胞である。血球系細胞は、分化段階に応じて、造血幹細胞、造血前駆細胞、および血液細胞に大別される。造血幹細胞は、造血前駆細胞を経て血液細胞に分化する。より具体的には、造血幹細胞は、リンパ芽球を経てリンパ球（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）に分化し得る。造血幹細胞はまた、造血前駆細胞および単芽球を経て単球に分化し得る。造血幹細胞はまた、造血前駆細胞、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球、および桿状核球を経て好中球に分化し得る。造血幹細胞はまた、造血前駆細胞および骨髄芽球を経て、好酸球もしくは好塩基球などの顆粒球系白血球、またはマクロファージに分化し得る。造血幹細胞はまた、造血前駆細胞、前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、および正染性赤芽球を経て赤血球に分化し得る。造血幹細胞はまた、造血前駆細胞、前巨核球、および巨核球を経て血小板が産生され得る。これらの造血幹細胞から分化して生じる細胞はすべて血球系細胞である。血球系細胞としては、がん細胞および非がん細胞が挙げられる。がん細胞としては、例えば、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）細胞やＣ

ＭＬ幹細胞が挙げられる。

[0013] 本明細書では、「エクスビボ」とは、生体外を意味する。本明細書では、エクスビボはインビボ（生体内）との対比で用いられ、生体内に存在する細胞を生体内から生体外に取り出した状態を意味する。培養は、エクスビボで行われ得るものである。

[0014] 本明細書では、「陽性」は、その直前に存在する用語で特定される分子を細胞が発現していると認められることを意味する。本明細書では、「陽性」を単に「＋」と表記することがある。

[0015] 本明細書では、「ポリビニルアルコール」（ＰＶＡ）とは、ビニルアルコールの重合体を意味する。ポリビニルアルコールは、酢酸ビニルモノマーを重合させて得られるポリ酢酸ビニルをケン化して得ることができる。ポリビニルアルコールの重量平均分子量（M_W）は、例えば、１ｋＤａ～２０ｋＤａ、３ｋＤａ～１７ｋＤａ、５ｋＤａ～１５ｋＤａ、または７ｋＤａ～１３ｋＤａとすることができる。上記の方法でポリ酢酸ビニルをケン化してＰＶＡを得る場合には、ケン化率は、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上または９９％以上であり得る。

[0016] 本明細書では、「アルブミン」とは、血漿成分として知られるタンパク質である。アルブミンは、血漿タンパク質の６割を占めると言われ、血液、血清および血漿中に大量に存在する。アルブミンは、生体内において血液の浸透圧の維持を担ったり、脂肪酸およびホルモンなどの生体物質と結合してこれらを運搬する働きを担っていると考えられている。造血幹細胞の維持培養においても、血清アルブミンの重要性が知られている。ヒト血清アルブミン（以下、「ＨＳＡ」ということがある）は、ヒトの血清アルブミンであり、例えば、ＧｅｎＢａｎｋの登録番号：ＡＡＮ１７８２５．１で登録されたアミノ酸配列を有するタンパク質またはこれに対応するアミノ酸配列を有するヒト血清アルブミンであり得る。

[0017] 本明細書では、「アゴニスト」とは、受容体や酵素等のタンパク質を活性化させる物質をいう。

[0018] 本明細書では、「ＰＩ３Ｋ」とは、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼを意味する。ＰＩ３Ｋは、細胞の構成成分であるイノシトールリン脂質をリン酸化する酵素である。リン酸化されて生じるホスファチジルイノシトール３，４，５－三リン酸（ＰＩＰ３）は、Ａｋｔ（プロテインキナーゼＢとしても知られる）をリン酸化し、そのシグナルを下流に伝える。本明細書では、「ＰＩ３Ｋアクチベータ」とは、受容体チロシンキナーゼのアゴニスト、およびＰＩ３Ｋを活性化する物質を意味する。ＰＩ３Ｋアクチベータは、ＰＩ３Ｋに対する選択性を有し得る。

[0019] 本明細書では、「ＴＰＯ」とは、トロンボポイエチンを意味する。ＴＰＯは、造血幹細胞から巨核球への分化を担うタンパク質である。ＴＰＯは、造血幹細胞を正式に維持することに関与していることが知られている。ヒトトロンボポイエチンは、例えば、ＧｅｎＢａｎｋの登録番号：ＡＡＢ３３３９０．１で登録されたアミノ酸配列を有するタンパク質またはこれに対応するアミノ酸配列を有するトロンボポイエチンであり得る。

本明細書では、「ＴＰＯ受容体アゴニスト」とは、ＴＰＯ以外の物質であって、ＴＰＯ受容体を活性化する物質を意味する。ＴＰＯ受容体アゴニストとしては、ＴＰＯ以外のＴＰＯの変種、ペプチド、およびＴＰＯ受容体を活性化する化合物が挙げられる。本明細書で「化合物」は、有機化合物を包含する概念である。ＴＰＯ受容体アゴニストは、ＴＰＯ受容体に対する選択性を有し得る。

[0020] 本明細書では、幹細胞因子（ＳＣＦ）とは、造血機能の初期段階で働く造血細胞成長因子である。ヒト幹細胞因子は、例えば、ＧｅｎＢａｎｋの登録番号：ＡＡＡ８５４５０．１で登録されたアミノ酸配列を有するタンパク質またはこれに対応するアミノ酸配列を有するＳＣＦであり得る。

[0021] 本明細書では、「培養する」とは、細胞をその増殖または維持に適した条件下でインキュベートすることを意味する。インキュベートは、ヒト細胞の場合は、好ましくは、３７℃および５％CO_2雰囲気下において行われ得る。「培養」が増殖を伴う場合は、「培養」は増殖した細胞の生産であると理解

される。本明細書では、「培養」は、無血清培地中で行われ得る。本明細書では、「培養」は、化学的に定義された培養培地中（または完全合成培地中）で行われ得る。化学的に定義された培養培地は、無血清培地である。

[0022] 本明細書では、「培養培地」とは、細胞の培養のために用いられる培地を意味する。培養培地は、基本培地に必要な成分を追加することによって作製され得る。必要な成分とは、ｐＨ調整剤、グルコースなどの糖源、抗生物質（例えば、ペニシリン、およびストレプトマイシンなど）、およびグルタミンなどの必須アミノ酸、並びに、インシュリン、トランスフェリン、セレン（例えば、亜セレン酸ナトリウム）およびエタノールアミンなどの培養添加物であり得る。

[0023] 本明細書では、「含まない」とは、検出限界以上の濃度で含まない、または完全に含まないことを意味する。例えば、血清またはアルブミンの無添加の無血清培地は、アルブミンフリーであり、血清またはアルブミンを含まない。「アルブミンフリー」とは、アルブミンを検出限界以上の濃度で含有しない、または含有しないことをいう。また、「サイトカインフリー」とは、サイトカインを検出限界以上の濃度で含有しない、または含有しないことをいう。培地は、アルブミンフリーであり得る。培地は、サイトカインフリーであり得る。培地は、アルブミンフリーかつサイトカインフリーであり得る。

[0024] 本明細書では、「細胞傷害性」は、培養中に細胞数を減少させる作用または細胞を死滅させる作用を有する性質を意味する。本明細書では、「非細胞傷害性」は、培養により細胞数を減少させない性質をいう。物質によっては、濃度を高めることによって細胞傷害性が生じ得るが、この場合は、細胞傷害性を生じない程度に濃度を低下させても当該物質に期待される作用が発生する場合には、非細胞傷害性であると定義することができる。本明細書では、培地は細胞傷害剤を含まない、または細胞傷害性を有する薬剤を含まないは、細胞傷害剤または細胞傷害性を有する薬剤を細胞傷害性を生じさせるに十分な量含まないことを意味する。したがって、ある薬剤が高濃度では細胞

傷害性を有する場合であっても、細胞傷害性を生じさせない濃度で用いられるときには、当該薬剤は細胞傷害剤ではないし、細胞傷害性を有する薬剤ではない。

[0025] 本発明者らは、マウスの造血幹細胞（その分離方法に由来してＫＳＬ細胞と呼ばれることもある）が、アルブミンを含まない無血清培地中で、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を加えることによって、長期にわたって大量に増殖できることを見出し、報告している（Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５７１：１１７－１２１，２０１９）。しかしながら、ヒトの造血幹細胞に関しては、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、増殖させる方法は確立されていない。今般、本発明者らは、ヒト造血幹細胞は、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール存在下で、幹細胞性を維持したまま、顕著な増殖を示すことを見出した。本発明者らはまた、ヒト造血幹細胞は、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ＰＶＡ、ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下で、ＰＩ３Ｋ経路およびＡｋｔ経路を含む様々なシグナル経路の活性化が弱いことを見出した。本発明者らはまた、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ＰＶＡ、ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下で、ＰＩ３Ｋアクチベータを加えることによって、ヒト造血幹細胞およびヒト血球系細胞が増殖することを見出した。本発明者らはさらに、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ＰＶＡ存在下で、ＰＩ３Ｋアクチベータは、ＳＣＦを完全に代替できることを見出した。本発明者はさらにまた、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ＰＶＡおよびＰＩ３Ｋアクチベータ存在下で、ＴＰＯをＴＰＯ受容体アゴニストで代替できることを見出した。本発明者らはさらにまた、ヒト造血幹細胞およびヒト血球系細胞は、アルブミンを含まない無血清培地中であっても、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール、ＰＩ３Ｋアクチベータ、およびＴＰＯ受容体アゴニストの存在下で良好に増殖させることができることを見出した

が、この際に、ＳＣＦおよびＴＰＯを培地に添加する必要は無かった。本発明者らはさらにまた、ヒト造血幹細胞が、培地にＵＭ１７１を添加することによって長期に維持および増殖することができることを見出した。

[0026] 本発明によれば、

ヒト細胞を培養する方法であって、

ヒト細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、血清アルブミンフリーの培地であり、添加剤を含み、添加剤は、ポリビニルアルコールおよび修飾ポリアルキレンリコールからなる群から選択され、かつ、

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含み、

上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が維持される、または増加する、

方法

が提供される。

[0027] ヒト細胞は、ヒト造血幹細胞およびヒト血球系細胞からなる群から選択される細胞であり得る。また、ヒト細胞は、造血幹細胞以外の血球系細胞であり得る。血球系細胞は、造血前駆細胞および血液細胞からなる群から選択される細胞であり得る。血液系細胞は、リンパ芽球、リンパ球（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫＴ細胞）、例えば、ＣＤ３陽性細胞、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球、桿状核球、および好中球、骨髄芽球、好酸球および好塩基球などの顆粒球系白血球、マクロファージ、前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球、および赤血球、並びに前巨核球、および巨核球からなる群から選択される１以上の細胞であり得る。

ヒト細胞は、例えば、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）細胞およびＣＭＬ幹細胞からなる群から選択される１以上であり得る。

[0028] ある態様では、添加剤は、アルブミンを代替できる添加物であり得る。添加剤は、ある態様では、修飾ポリアルキレングリコールである。また、ある態様では、修飾ポリアルキレングリコールは、例えば、修飾ポリエチレングリコールであり得る。修飾ポリアルキレングリコールまたは修飾ポリエチレングリコールは、好ましくは、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されていることができる。

[0029] ある態様では、添加剤は、ポリビニルアルコールであり得る。

[0030] 本発明によれば、ＰＶＡまたは修飾ポリアルキレングリコールを添加することで、培養培地の血清アルブミンなどのアルブミンの添加量を低減することができ、好ましくは、培養培地をアルブミンフリーにすることができる。ある態様では、培養培地は、無血清培地であり得、例えば、アルブミンフリーの無血清培地であり得る。

[0031] 本発明によれば、ＰＩ３Ｋアクチベータは、ＳＣＦを代替できる。本発明によればまた、ＴＰＯ受容体アゴニストは、ＴＰＯを代替できる。このようにすることで、本発明によれば、培養培地に添加するＳＣＦおよびＴＰＯの量を低減することができ、好ましくは、培養培地をサイトカインフリーにすることができる。ある態様では、培養培地は、無血清培地であり得、例えば、サイトカインフリーの無血清培地であり得る。

[0032] またある態様では、培養培地は、ＰＶＡまたは修飾ポリアルキレングリコールを添加することで、培養培地の血清アルブミンなどのアルブミンの添加量を低減することができ、かつ、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを添加することで、培養培地のＳＣＦおよびＴＰＯ添加量を低減することができる。ある態様では、培養培地は、アルブミンフリーであり、かつサイトカインフリーの無血清培地であり得る。

[0033] また、本発明によれば、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養する

方法であって、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、ポリビニルアルコールを含み、アルブミンを含まず、かつ、

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含む、

方法が提供される。この実施形態において、上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が増加するまたは維持され得る。

[0034] 本発明によれば、培養培地中においてヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養する方法であって、

培養培地中において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞とポリビニルアルコールとを接触させることと、

培養培地中において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞と

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを接触させる；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを接触させる；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを接触させる、

ことを含む方法が提供される。この実施形態において、上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が増加するまたは維持され得る。

[0035] 本発明では、ＰＩ３Ｋアクチベータは、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞に対して細胞傷害性を有するものを用いない。すなわち、本発明において用いられるＰＩ３Ｋアク

チベータは、非細胞傷害性である。

また、本発明において用いられるＴＰＯ受容体アゴニストは、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞に対して非細胞傷害性である。ＰＩ３Ｋアクチベータが非細胞傷害性であるか否かは、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験によって当業者であれば適宜確認することができる。ここで、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験は、１％インスリン－トランスフェリン－セレン、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００　ｎｇ／ｍＬ　ＴＰＯおよび０．１％ＰＶＡを含むＩＭＤＭ培地を用いて確認することができる。また、ＴＰＯ受容体アゴニストが非細胞傷害性であるか否かは、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験によって当業者であれば適宜確認することができる。ここで、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験は、１％インスリン－トランスフェリン－セレン、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１０　ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦおよび０．１％ＰＶＡを含むＩＭＤＭ培地を用いて確認することができる。

[0036] 本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地であり得る。

[0037] 本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、

ポリビニルアルコールまたは修飾ポリアルキレングリコールを含み、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３Ｋアクチベータとｔｐｏ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地であり得る。

[0038] 本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、

アルブミン（特に血清アルブミン）フリーであり、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３Ｋアクチベータとｔｐｏ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地であり得る。

[0039] 本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、

ポリビニルアルコールを含み、アルブミンを含まず、かつ、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３Ｋアクチベータとｔｐｏ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地であり得る。

[0040] 本発明の培養培地は、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞をアルブミン非存在下で増殖させるために、非細胞傷害性のＰＩ３Ｋアクチベータの有効量とＰＶＡの有効量とを含みうる。本発明の培養培地は、ＳＣＦおよびＴＰＯのいずれかまたは両方をさらに含んでいてもよい。本発明の培養培地は、ＴＰＯの代わりに、非細胞傷害性のＴＰＯ受容体アゴニストの有効量を含んでいてもよい。本発明の培養培地は、非細胞傷害性のＰＩ３Ｋアクチベータの有効量と、ＰＶＡの有効量と、ＴＰＯおよび非細胞傷害性のＴＰＯ受容体アゴニストの有効量のいずれかまたは両方と、ＵＭ１７１とを含んでいてもよい。

[0041] 本発明によれば、ヒト造血幹細胞を培養する方法は、ヒト造血幹細胞から

巨核球系列の細胞を製造する方法であり得る。この実施態様において、培養方法で用いられる培養培地は、ＰＩ３Ｋアクチベータおよびｔｐｏ受容体アゴニストを含み、ＰＩ３Ｋアクチベータは、７４０Ｙ－Ｐであり、かつ、ＴＰＯ受容体アゴニストは、ブチザミドである、培養培地であり得る。この特定の態様において、培養培地は、ＵＭ１７１を含まないことができる。

[0042] 本発明のある態様では、本発明の培養方法は、４－Ｎ－［２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－４－イル］シクロヘキサン－１，４－ジアミン（以下、「ＵＭ１７１」ともいう）の存在下で培養することをさらに含み得る。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、ＵＭ１７１をさらに含み得る。これにより、ヒト造血幹細胞は、ヒト造血幹細胞としての性質を維持し易くなり得る、または、巨核球系列の細胞（例えば、巨核球前駆細胞および巨核球）への分化が抑制され得る。

[0043] 本発明のある態様では、本発明の培養方法は、４－Ｎ－［２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－４－イル］シクロヘキサン－１，４－ジアミン（以下、「ＵＭ１７１」ともいう）の存在下で培養することを含まない。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、ＵＭ１７１をさらに含まない。これにより、ヒト造血幹細胞は、巨核球系列の細胞（例えば、巨核球前駆細胞および巨核球）に分化しやすくなる。

[0044] また、本発明によれば、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養する方法であって、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養培地中で培養することを含み、

培養培地は、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールを含む、方法が提供される。この方法において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培地は、アルブミンを含まないことができる。この方法において、培養

培地は

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとをさらに含んでいてもよい。この実施形態において、上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が増加するまたは維持され得る。

[0045] 本発明によれば、培養培地中においてヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培養する方法であって、

培養培地中において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞とポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールとを接触させることを含む方法が提供される。この方法において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培地は、アルブミンを含まないことができる。この方法は、

培養培地中において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞と

（１）ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）アクチベータと、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）およびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを接触させる；

（２）幹細胞因子（ＳＣＦ）およびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを接触させる；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを接触させる、をさらに含んでいてもよい。この実施形態において、上記培養によって、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の数が増加するまたは維持され得る。

[0046] 本発明者らは、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、一部のＴＰＯ受容体アゴニストを含むいくつかの化合物がヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞に対して細胞傷害性を示し得ることを明らかにした。

従って、本発明によれば、本発明では、ＰＩ３Ｋアクチベータは、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞に対して非細胞傷害性である。

本発明ではまた、ＴＰＯ受容体アゴニストは、アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞に対して非細胞傷害性である。ＰＩ３Ｋアクチベータが非細胞傷害性であるか否かは、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験によって当業者であれば適宜確認することができる。ここで、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験は、１％インスリン－トランスフェリン－セレン、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００　ｎｇ／ｍＬ　ＴＰＯおよび０．１％ＰＶＡを含むＩＭＤＭ培地を用いて確認することができる。また、ＴＰＯ受容体アゴニストが非細胞傷害性であるか否かは、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験によって当業者であれば適宜確認することができる。ここで、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養試験は、１％インスリン－トランスフェリン－セレン、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１０　ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦおよび０．１％ＰＶＡを含むＩＭＤＭ培地を用いて確認することができる。

[0047] 本発明のある態様では、ＰＩ３Ｋアクチベータは、アミノ酸配列ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫＳＤＧＧＹＭＤＭＳで表されるペプチドであって、Ｙがリン酸化されたペプチド（「７４０Ｙ－Ｐ」ともいう）であり得る。

[0048] 本発明のある態様では、ＴＰＯ受容体アゴニストは、３－［４－［［［４－［２－メトキシ－３－（１－ｔｅｒｔ－ブチル－２－オキサペンタン－１－イル）フェニル］チアゾール－２－イル］アミノ］カルボニル］－２，６－ジクロロフェニル］－２－メチルプロペン酸（以下、「ブチザミド」ともいう）であり得る。

[0049] 本発明のある態様では、ＰＩ３Ｋアクチベータは、７４０Ｙ－Ｐであり、かつ、ＴＰＯ
受容体アゴニストは、ブチザミドである。

[0050] 本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、化学的に定義された培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、アルブミンフリー、サイトカインフリー、またはアルブミンフリーかつサイトカインフリーの培地（好ましくは無血清培地、より好ましくは化学的に定義された培地）である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、アルブミンフリーの培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、サイトカインフリーの培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、アルブミンフリーかつサイトカインフリーの培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、ＰＩ３Ｋアクチベータ、およびＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、アルブミンフリーかつサイトカインフリーの培地であって、ポリビニルアルコール、ＰＩ３Ｋアクチベータ、およびＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいる。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールを含む培地である。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール、ＳＣＦの代わりにＰＩ３Ｋアクチベータ、およびＴＰＯの代わりにＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、アル

ブミンフリーかつサイトカインフリーの無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール、ＰＩ３Ｋアクチベータ、およびＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール、ＳＣＦの代わりにＰＩ３Ｋアクチベータ、ＴＰＯの代わりにＴＰＯ受容体アゴニスト、および４－Ｎ－［２－ベンジル－７－（２－メチルテトラゾール－５－イル）－９Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－４－イル］シクロヘキサン－１，４－ジアミン（ＵＭ１７１）を含んでいてもよい。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、アルブミンフリーかつサイトカインフリーの無血清培地（好ましくは、化学的に定義された培地）であり、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール、ＰＩ３Ｋアクチベータ、ＴＰＯ受容体アゴニスト、およびＵＭ１７１を含んでいてもよい。本明細書では、培養液が「Ａの代わりにＢを含む」とは、培養液にＡを含ませないが、当該培養液がＢを含むことを意味する。

[0051] 本発明のある態様では、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養用の培地は、

ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールを含み、かつ、

（１）ＰＩ３Ｋアクチベータと、ＴＰＯおよびＴＰＯ受容体アゴニストからなる群から選択される１以上とを含む；

（２）ＳＣＦおよびＰＩ３Ｋアクチベータからなる群から選択される１以上と、ＴＰＯ受容体アゴニストとを含む；または

（３）ＰＩ３ＫアクチベータとＴＰＯ受容体アゴニストとを含む、

ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞用の培養培地であり得る。この態様では、培地はアルブミンを含まないことができる。上記ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養用の培地は、ＵＭ１７１をさらに含んでいてもよい。上記ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養用の培地は、本発明の培養方法に用いられ得る。本発明のヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養用の培地は、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を増殖させることができる。本発明のヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養用の培地は、ヒト造血幹細胞の幹細胞性を維持することができる。本発明のヒト造血幹細胞の培養用の培地は、ヒト造血幹細胞をその幹細胞性を維持しながら増殖させることができる。

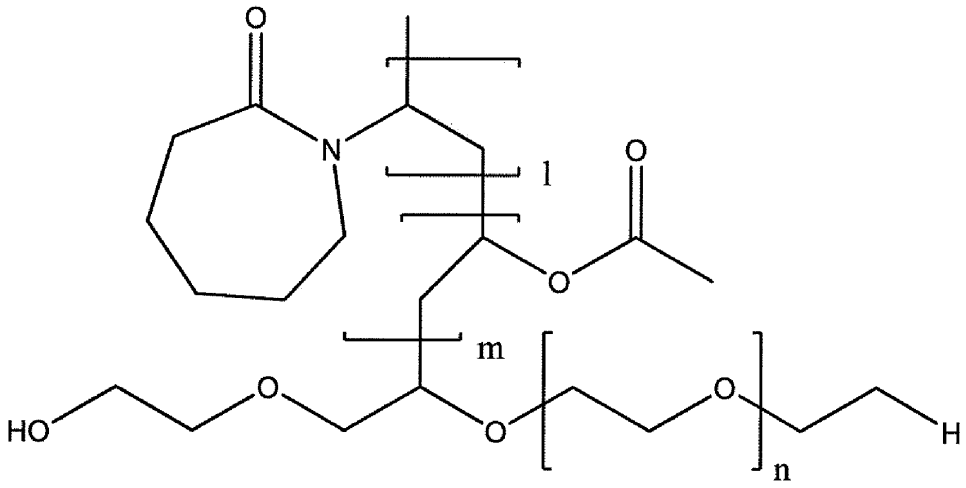
[0052] 培養培地は、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の培養に適したものを適宜用いることができる。基礎培地としては、Ｓ－ｃｌｏｎｅ　ＳＦ－３培地、Ｆ１２培地、ＳｔｅｍＳｐａｎ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＳＴＥＭα（ＳＴＥＭ　ＡＬＰＨＡ）、ＳｔｅｍＰｒｏ－３４無血清培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＳｔｅｍＰｒｏ　ＭＳＣ無血清培地（Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ）、ＨＳＣ－ＣＦＵ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）、Ｓ－Ｃｌｏｎｅ無血清培地（ＳＦ－０２、ＳＦ－０３、ＣＭ－Ｂ、ＳＦ－Ｂ）（三光純薬）、ＨＰＧＭ培地（三光純薬）、ＡＩＭ　Ｖ培地（Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ）、Ｍａｒｒｏｗ　ＭＡＸ骨髄培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＫｎｏｃｋＯｕｔ　ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ｉｎｖｔｒｏｇｅｎ）、Ｓｔｅｍｌｉｎｅ造血幹細胞増殖培地（Ｓｉｇｍａ）、ＳＹＮ無血清培地（ＳＹＮ　Ｈ、ＳＹＮ　Ｂ）（ＡｂＣｙｓ　ＳＡ）、ＳＰＥ　ＩＶ培地（ＡｂＣｙｓ　ＳＡ）、ＭｙｅｌｏＣｕｌｔ培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＨＰＧ無血清培地（Ｌｏｎｚａ）、ＵｌｔｒａＣＵＬＴＵＲＥ培地（Ｌｏｎｚａ）、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、ＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、ＭＥＭα（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、ＤＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、ＩＭＤＭ

培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、ＰＲＭＩ１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ他）、Ｈａｍ　Ｆ－１２培地（Ｇｉｂｃｏ他）、ＲＤ培地等を用いることができる。培養培地は、基礎培地を含む。培養培地は、例えば、インスリン、トランフフェリン（アポ）、亜セレン酸ナトリウム、およびエタノールアミンから選択される１以上、または全てを含んでいてもよい。培養培地は、ＨＥＰＥＳ、ピルビン酸ナトリウム、ビタミン類、アミノ酸類、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸等を含んでいてもよい。培養培地は、抗生物質（例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン）を含んでいてもよい。培養培地は、グルタミンを含んでいてもよい。培養培地は、例えば、インスリン、トランフフェリン（アポ）、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、および抗生物質を含んでいてもよく、さらにＨＥＰＥＳを含んでいてもよい。

[0053] 本発明の培養培地は、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコール（例えば、ポリエチレングリコール）を含み得る。

[0054] 本発明のすべての態様において、ポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコールは、以下化学式を有し得る：

[0055] [化1]



{式中、ｎは、５～５０のいずれかの自然数であり、ｍは、１０～１００のいずれかの自然数であり、ｌは、１０～２００のいずれかの自然数である。}

[0056] ある態様では、ｎは、５～２０、または１０～２０のいずれかの自然数であり、ｍは、２０～５０、または３０～４０のいずれかの自然数であり、ｌは、３０～１００、または５０～６０のいずれかの自然数であり得る。

[0057] なお、修飾されたポリアルキレングリコールは、上記エチレングリコール単位が、アルキレングルコール単位になった化合物であり得る。アルキレンは、炭素数が１～１０、例えば、１～５のアルキレンであり得、好ましくは、炭素数が２または３であり得る。

[0058] 本発明の培養培地は、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞をポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリエチレングリコール存在下の環境下で増殖させるために、非細胞傷害性のＰＩ３Ｋアクチベータの有効量とポリビニルカプロラクタムブロックおよびポリビニルアセタートブロックの共重合体により修飾されたポリアルキレングリコール（例えば、ポリエチレングリコール）の有効量とを含みうる。ここで、培地は、アルブミンを含まないことができる。本発明の培養培地は、ＳＣＦおよびＴＰＯのいずれかまたは両方をさらに含んでいてもよい。本発明の培養培地は、ＴＰＯの代わりに、非細胞傷害性のＴＰＯ受容体アゴニストの有効量を含んでいてもよい。本発明の培養培地は、非細胞傷害性のＰＩ３Ｋアクチベータの有効量と、ＰＶＡの有効量と、ＴＰＯおよび非細胞傷害性のＴＰＯ受容体アゴニストの有効量のいずれかまたは両方と、ＵＭ１７１とを含んでいてもよい。

[0059] 本発明によれば、ヒト造血幹細胞を培養する方法は、ヒト造血幹細胞から巨核球系列の細胞を製造する方法であり得る。この実施態様において、培養方法で用いられる培養培地は、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含み、ＰＩ３Ｋアクチベータは、７４０Ｙ－Ｐであり、かつ、ＴＰＯ受容体アゴニストは、ブチザミドである、培養培地であり得る。この特

定の態様において、培養培地は、ＵＭ１７１を含まないことができる。

[0060] 本発明のある態様では、本発明の培養方法は、ＵＭ１７１の存在下で培養することをさらに含み得る。本発明のある態様では、本発明の培養方法で用いられる培養培地は、ＵＭ１７１をさらに含み得る。

[0061] 本発明では、ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞は、ヒト造血幹細胞または当該ヒト血球系細胞の増殖に適した条件下で培養され得る。本発明では、培養物からヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を単離することをさらに含んでいてもよい。ヒト造血幹細胞の単離は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば、造血幹細胞マーカーを用いてフローサイトメトリなどによって実施することができる。ヒト造血幹細胞は、ヒト造血幹細胞として取得されてもよいし、その後、さらに他の細胞に分化させてから用いてもよい。ヒト造血幹細胞から他の細胞に分化させる場合には、当該他の細胞の分化に適した条件下で分化させたい細胞を培養することができる。ヒト血球系細胞の単離もまた、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば、当該ヒト血球系細胞のマーカーを用いてフローサイトメトリなどによって実施することができる。

[0062] 本発明によれば、本発明の培養方法によって得られたヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞が提供される。本発明の培養方法によって得られたヒト造血幹細胞は、ＣＤ３４および好ましくはＣＤ３８をマーカーとして精製され得る。本発明の培養方法によって得られたヒト造血幹細胞は、従来の方法で得られたヒト造血幹細胞よりもレシピエントへの移植後の生着率がよい。従って、本発明によれば、本発明の培養方法によって得られ、培養前と比較してレシピエントへの移植後の生着率が向上したヒト造血幹細胞が提供される。

[0063] 本発明の培養方法では、培養は、フィブロネクチン存在下で行われ得る。本発明の培養方法では、造血幹細胞とフィブロネクチンとが接触可能な条件下で行われ得る。培養は、本発明の培養方法では、好ましくは、例えば、培養容器の内側（例えば、底面）がフィブロネクチンでコーティングされてい

る。

[0064] 本発明の培養方法で用いられるアルブミンを含まない培地は、血清アルブミンを０．１（ｗ／ｖ）％未満、０．０５（ｗ／ｖ）％未満、０．０１（ｗ／ｖ）％未満、０．００５（ｗ／ｖ）％未満、０．００１（ｗ／ｖ）％未満、０．０００５（ｗ／ｖ）％未満、または０．０００１（ｗ／ｖ）％未満しか含まないか、完全に含まない。

[0065] 本発明の培養方法で用いられる培地は、組換えＴＰＯを含んでいてもよい。組換えＴＰＯは、例えば、哺乳動物の組換えＴＰＯであり得、組換えヒトＴＰＯであり得る。本発明のある態様では、ＴＰＯ濃度は、２０～２００ｎｇ／ｍＬであり、より好ましくは３０～１５０ｎｇ／ｍＬであり、さらに好ましくは、４０～１５０ｎｇ／ｍＬであり、例えば、１００ｎｇ／ｍＬとすることができる。

[0066] 本発明の培養方法で用いられる培地は、組換えＳＣＦをさらに含んでいてもよい。組換えＳＣＦは、例えば、哺乳動物の組換えＳＣＦであり得、組換えヒトＳＣＦであり得る。本発明のある態様では、ＳＣＦ濃度は、１～２００ｎｇ／ｍＬであり、より好ましくは１～１５０ｎｇ／ｍＬであり、さらに好ましくは、１～１００ｎｇ／ｍＬであり、例えば、１～５０ｎｇ／ｍＬであり、さらにより好ましくは、１～３０ｎｇ／ｍＬであり、さらにより好ましくは、１～２０ｎｇ／ｍＬであり、例えば、５～１５ｎｇ／ｍＬであり得る。

[0067] 本発明の培養方法で用いられる培地は、組換えＴＰＯと組換えＳＣＦを含んでいてもよい。この態様では、ＴＰＯ濃度は、２０～２００ｎｇ／ｍＬであり、より好ましくは３０～１５０ｎｇ／ｍＬであり、さらに好ましくは、４０～１５０ｎｇ／ｍＬであり、例えば、１００ｎｇ／ｍＬであり得、かつ、ＳＣＦ濃度は、１～２００ｎｇ／ｍＬであり、より好ましくは１～１５０ｎｇ／ｍＬであり、さらに好ましくは、１～１００ｎｇ／ｍＬであり、例えば、１～５０ｎｇ／ｍＬであり、さらにより好ましくは、１～３０ｎｇ／ｍＬであり、さらにより好ましくは、１～２０ｎｇ／ｍＬであり、例えば、５

～１５ｎｇ／ｍＬであり得る。ある好ましい態様では、本発明の培養方法で用いられる培地は、４０～１５０ｎｇ／ｍＬの組換えＴＰＯと１～５０ｎｇ／ｍＬの組換えＳＣＦを含んでいてもよい。ある好ましい態様では、本発明の培養方法で用いられる培地は、ＴＰＯ濃度がＳＣＦ濃度よりも高く、例えば、例えば、上記の濃度範囲に含まれる何れかの濃度であってよく、かつ、２倍以上、３倍以上、４倍以上、５倍以上、６倍以上、７倍以上、８倍以上、９倍以上、または１０倍以上高くてもよい。

[0068] 本発明の培養方法で用いられる培地は、ＦＩｔ３Ｌ（特に、ヒトＦＩｔ３Ｌ）をさらに含んでいてもよい。ＦＬＴ３は、ＦＭＳ関連チロシンキナーゼ３として知られる細胞表面の受容体（ＣＤ１３５ともよばれる）である。ＦＬＴ３は、例えば、造血幹細胞の表面に発現する。ＦＬＴ３Ｌは、ＦＬＴ３のリガンドであり、例えば、造血幹細胞および造血前駆細胞の正常な発生に関与する。本発明の培養方法で用いられる培地は、ＦＩｔ３Ｌに加えて、さらにＩＬ－３および／またはＧＭ－ＣＳＦを含んでいてもよい。インターロイキン－３（ＩＬ－３）は、造血成長因子であり、骨髄系前駆細胞の増殖および生存において重要な役割を果たす。ＧＭ－ＣＳＦは、顆粒球単球コロニー刺激因子であり、造血幹細胞に分化を促すサイトカインである。ＧＭ－ＣＳＦは、ＩＬ－３やＩＬ－５と協調的に作用して、造血幹細胞を骨髄系前駆細胞に分化させ得る。例えば、ＧＭ－ＣＳＦは、造血幹細胞を、例えば、前期赤芽球系前駆細胞(BFU-E)、顆粒球単球コロニー形成細胞(CFU-GM)、好酸球コロニー形成細胞(CFU-Eo)、および好塩基球コロニー形成細胞(CFU-Ba)に分化させ得る。ＧＭ－ＣＳＦは、CFU-GMを好中球と単球に、CFU-Eoを好酸球に分化させる働きを有する。ＣＦＵ－Ｂａは、ＩＬ－３またはＩＬ－５によって好塩気球に分化させ得る。したがって、本発明の培養方法で用いられる培地は、ＦＩｔ３Ｌを含んでいてもよく、ＩＬ－３および／またはＧＭ－ＣＳＦをさらに含んでいてもよい。また、本発明の培養方法は、各血球系細胞の増殖および／または分化に適した条件下でなされ得る。そのような培養条件は、アルブミンを含有する培地の培養条件として周知であり、アルブミンを

低減または欠失させた培地を用いた本願発明の培養方法においても同様に適用できる。

[0069] 本発明の培養方法で用いられる培地は、ＳＣＦの代わりにＰＩ３Ｋアクチベータを含み、および／または、ＴＰＯの代わりにＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明の培養方法で用いられる培地は、ＳＣＦの代わりにＰＩ３Ｋアクチベータを含み、かつ、ＴＰＯの代わりにＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明の培養方法で用いられる培地は、サイトカインフリーの培地であり、ＰＩ３ＫアクチベータおよびＴＰＯ受容体アゴニストを含んでいてもよい。本発明の培養方法で用いられる培地は、ＳＣＦの代わりにＰＩ３Ｋアクチベータを含み、かつ、ＴＰＯの代わりにＴＰＯ受容体アゴニストを含み、かつ、ＵＭ１７１をさらに含んでいてもよい。本発明の培養方法で用いられる培地は、サイトカインフリーの培地であり、ＰＩ３Ｋアクチベータ、ＴＰＯ受容体アゴニスト、およびＵＭ１７１を含んでいてもよい。

[0070] 本発明のヒト造血幹細胞の培養方法は、造血幹細胞を造血幹細胞の維持および／または増殖に十分な条件下で増殖させることをさらに含み得る。この態様では、例えば、造血幹細胞を、培養開始時から１０倍以上、５０倍以上、１００倍以上、２００倍以上、３００倍以上、４００倍以上、または５００倍以上に増殖させることを含み得る。

[0071] ヒト造血幹細胞の維持および／または増殖に十分な条件とは、例えば、上記培地中で培養する条件であり得る。ヒト造血幹細胞の維持および／または増殖に十分な条件とは、好ましくは、例えば、フィブロネクチン存在条件であり得、ヒト造血幹細胞とフィブロネクチンとが接触可能な条件であり得る。

[0072] 本発明のヒト血球系細胞の培養方法は、ヒト血球系細胞を当該ヒト血球系細胞の維持および／または増殖に十分な条件下で増殖させることをさらに含み得る。この態様では、例えば、造血幹細胞を、培養開始時から１０倍以上、５０倍以上、１００倍以上、２００倍以上、３００倍以上、４００倍以上

、または５００倍以上に増殖させることを含み得る。

[0073] 本発明の培養方法は、

増殖したヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞を培地から回収することをさらに含んでいてもよい。回収したヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞はさらに、濃縮または単離されてもよい。ヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の濃縮または単離は、細胞表面マーカーを用いて行うことができる。ヒト造血幹細胞の濃縮または単離に用いることができる細胞表面マーカーとしては、ＣＤ３４やＣＤ３８が挙げられる。造血幹細胞またはヒト血球系細胞の濃縮または単離は、セルソーターを用いて行うことができる。

[0074] 本発明によれば、エクスビボにおけるヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞の製造方法であって、

本発明の培養方法を含む方法が提供される。本発明の製造方法では、機能的なヒト造血幹細胞またはヒト血球系細胞が得られ得る。

ここで、機能的とは、ヒト造血幹細胞移植により、移植を受けたヒト個体（レシピエント）において造血系を回復できることを意味する。

実施例

[0075] 参考例１：アルブミンを含まない培養培地を用いた造血幹細胞の増殖試験

本参考例では、マウス造血幹細胞（ＫＳＬ）とヒト造血幹細胞（ＣＤ３４＋ＣＤ３８－）をアルブミンを含まない培養培地を用いて増殖させる試験を行った。培養培地は、Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５７１：１１７－１２１，２０１９に記載されたポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を含有し、アルブミンを含まない無血清培地とした。

[0076] 具体的には、マウス造血幹細胞の培養においては、培養培地は、１％インシュリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン（ＩＴＳＸ）、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００ ｎｇ／ｍＬマウストロンボポイエチン（ｍＴＰＯ）、および１０ ｎｇ／ｍＬマウス幹細胞因子（ｍＳＣＦ）を含むＦ１２培地とした。上記培地には、ＰＶＡが最終濃度０．１％となるように含ませた。 ヒト造血

幹細胞の培養においては、培養培地は、１％インシュリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン（ＩＴＳＸ）、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００　ｎｇ／ｍＬヒトトロンボポイエチン（ｈＴＰＯ）、および１０　ｎｇ／ｍＬヒト幹細胞因子（ｈＳＣＦ）を含むＩＭＤＭ培地とした。上記培地には、ＰＶＡが最終濃度０．１％となるように含ませた。

以下実施例で用いたすべての培地において、断りの無い限り、１％インシュリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン（ＩＴＳＸ）、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、およびＰＶＡを含むＩＭＤＭ培地（以下、「共通培地」ともいう）を用いた。従って、以降では、共通培地への添加成分に焦点をあてて培地を表記する。例えば、上記培地は、共通培地に加えてＴＰＯとＳＣＦを含むので、便宜的に、ＴＰＯ＋ＳＣＦ培地と呼ぶこととする。各因子の濃度まで表す場合には、ＳＣＦ１０＋ＴＰＯ１００と記載し、または、Ｓ１０＋Ｔ１００と省略して記載することもある。

[0077] マウス造血幹細胞としては、マウス骨髄のＫＳＬ細胞を用いた。具体的には、マウス骨髄細胞は、脛骨、大腿骨、骨盤から分離され、ＡＰＣ-ｃ－ＫＩＴ抗体で染色された。ｃ－ＫＩＴ＋細胞は、抗ＡＰＣ磁気ビーズとＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して濃縮された。その後、ｃ－ＫＩＴ濃縮細胞を、抗ＣＤ３４、抗ｃ－ＫＩＴ、抗ＳＣＡ１およびストレプトアビジン-ＡＰＣ／ｅＦｌｕｏｒ　７８０で９０分間染色する前にリニエージ抗体カクテル（ビオチン化ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５Ｒ、ＴＥＲ１１９、ＬＹ－６Ｇ　／　ＬＹ－６ＣおよびＣＤ１２７）で染色した。その後、細胞集団はＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　ＩＩ（ＢＤ）を使用し、ヨウ化プロピジウムを死滅染色として使用して、培地を含むウェルに直接選別して精製した。

[0078] ヒト造血幹細胞としては、ヒト骨髄のＣＤ３４＋ＣＤ３８－細胞を用いた。具体的には、市販されているヒト骨髄CD34陽性細胞（Lonza 2C-101）を購入した。

[0079] 結果は図１に示される通りであった。Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１９では、マウス造血幹細胞は、アルブミンを含まない無血清培地においては、ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下でさえ、長期間の増殖を維持することができなかった。しかしながら、Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９では、ＰＶＡを培地に添加することによって、マウス造血幹細胞はアルブミンを含まない無血清培地において長期に増殖することができることが示されている。図１に示されるようにマウス造血幹細胞は、ＰＶＡを含みアルブミンを含まない無血清培地で良好に増殖したが、ヒト造血幹細胞は、この培地においては、良好な増殖は観察されなかった。

[0080] 参考例２：マウス造血幹細胞とヒト造血幹細胞のシグナル伝達の相違

ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下におけるマウス造血幹細胞およびヒト造血幹細胞のシグナル経路を分析した。

[0081] アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、マウスおよびヒトそれぞれの造血幹細胞を１０　ｎｇ／ｍＬの組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下で培養した造血幹細胞におけるＳＣＦおよびＴＰＯの下流のシグナル因子のリン酸化の程度をリン酸化免疫染色法により解析した。まず、ＳＣＦおよびＴＰＯシグナルの下流の各因子のリン酸化状態を、それぞれの因子のリン酸化形態特異的な抗体を用いて検出した。具体的には、Ａｋｔ、ＰＩ３Ｋ、およびＳｔａｔ５などの代表的なシグナル伝達分子におけるリン酸化抗体を用いてサイトカインで刺激をした細胞へ反応させた後に蛍光顕微鏡により細胞に反応した抗体の蛍光強度を定量的に解析した。

[0082] すると、図２に示されるように、調べた７つの因子のうち、いくつかの因子ではマウス造血幹細胞とヒト造血幹細胞とでリン酸化状態の異なる因子がいくつか発見された。その中で、ＰＩ３ＫおよびＡｋｔについては、ＳＣＦおよびＴＰＯ添加２４時間後からマウス造血幹細胞ではリン酸化形態が多く求められたのに対して、ヒト造血幹細胞ではほとんどリン酸化形態が認められないか、またはマウス造血幹細胞におけるリン酸化形態量よりも少ない量

を示した。

[0083] そこで、０．３μＭ ＡＫＴａ（販売社名Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、製品番号１２３８７１）または２０μＭ ＰＩ３Ｋａを添加した培養培地において、ヒト造血幹細胞を培養した。培養３日後、５日後、および７日後に細胞を計数し、培養初日の細胞数を１としたときの各時点での細胞数の比を求めた。以下実施例において、ＰＩ３Ｋａとしては、７４０Ｙ－Ｐ（販売社名Ｔｏｃｒｉｓ、製品番号１９８３）を用いた。すると、図３に示されるように、ＰＩ３Ｋａ存在下では、ヒト造血幹細胞は、明確な増殖を示した。他方で、ＡＫＴａについては、本実験の環境下では、ヒト造血幹細胞に対する増殖作用は認められなかった。

[0084] 次に、ヒト造血幹細胞の培養に関して、ＰＩ３Ｋａが、ＳＣＦを完全に代替するか否かを調べた。ヒト造血幹細胞用の上記培養培地に２０μＭのＰＩ３Ｋａを添加した場合（Ｓ１０＋ＰＩ３Ｋａ２０＋Ｔ１００）と、上記培養培地に２０μＭのＰＩ３Ｋａを添加し、ＳＣＦを抜いた場合（ＰＩ３Ｋａ２０＋Ｔ１００）とで、ヒト造血幹細胞を７日間培養した後の、細胞総数と、抗ＣＤ３４抗体を用いたセルソーティングによる単離ＣＤ３４＋細胞の数を求めた。結果は、図４に示される通りであった。図４に示されるように、ＰＩ３Ｋａを添加した場合には、ＳＣＦの有無によって細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数に有意差は認められなかった。

[0085] 次に、ヒト造血幹細胞の培養に関して、ＴＰＯをＴＰＯ受容体アゴニストにより置き換えることができるか否かを調べた。ＴＰＯ受容体アゴニストとしては、ブチザミド、エルトロンボパグ、およびアバトロンボパグが知られている。上記培養培地からＴＰＯを抜いた組成に、０．１％組換えヒト血清アルブミン（Ａｌｂｕｍｉｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の存在下またはＰＶＡ存在下で、０．１μＭブチザミド、３μｇ／ｍＬエルトロンボパグ、または３μＭアバトロンボパグを添加した培地中で、ヒト造血幹細胞を培養した。本実験においては、ヒト造血幹細胞としては、ＭｐＩ３２Ｄ細胞を用いた。結果は、図５に示される通りであった。図５に示されるように、アルブ

ミン存在下では、ブチザミド、エルトロンボパグ、およびアバトロンボパグは、ＴＰＯの非存在下でヒト造血幹細胞の増殖を支持することができた。これに対して、ＰＶＡ存在下（アルブミン非存在下）では、ＴＰＯの非存在下でブチザミドはヒト造血幹細胞に対して顕著な細胞増殖効果を奏したが、アバトロンボパグではその効果は小さく、エルトロンボパグでは効果がほとんど認められなかった。

[0086] さらに、購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓをＣＤ３４＋細胞を分離したものを培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．０×10^5細胞を分注し、ヒト造血幹細胞用の培養培地からＴＰＯを抜いて、上記ＴＰＯ受容体アゴニスト（以下、「ＴＰＯａｇｏ」ということがある）のいずれかと置き換えて実験を行った。培養初日に対する培養７日目の細胞数の比を求めた。結果は、図６に示される通りであった。図６に示されるように、ヒト造血幹細胞は、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、ブチザミド存在下でのみ有意な細胞増殖を示した。アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、アバトロンボパグ存在下またはエルトロンボパグ存在下では、造血幹細胞が細胞死を起こしていた。しかしながら、これらのＴＰＯ受容体アゴニストは、生体内の環境では、肝硬変の外科的治療患者や再生不良性貧血の患者の治療に用いられる安全性の高い化合物である。本実施例の結果からは、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、いくつかのＴＰＯ受容体アゴニストは、ヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を示し得ることを示すものである。また、このことから、ＴＰＯ受容体アゴニストにはヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を有するものが存在すること、およびヒト造血幹細胞を培養するためには、ヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を有しないものを用いればよいことが示唆された。

[0087] 次に、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下においてＳＣＦとＴＰＯをＰＩ３ＫａおよびＴＰＯ受容体アゴニストで代替することができるか否かを調べた。以下実施例においては、ＴＰＯ受容体アゴニストとしてブチザミドを用い

た。購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．０×10^5細胞を分注し、ＳＣＦを２０μＭ　ＰＩ３Ｋａに置き換えた組成の培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯ１００）、およびＳＣＦを２０μＭ　ＰＩ３Ｋａに置き換え、ＴＰＯを０．１μＭブチザミドに置き換えた組成の培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ０．１μＭ）中でそれぞれ培養した。７日後に、細胞総数を求め、フローサイトメトリによりＣＤ３４＋細胞の数を求めた。その後、培養開始時と比較した増殖率を求めた。結果は、図７に示される通りであった。図７に示されるように、ブチザミドは、ＴＰＯを完全に代替できることが明らかとなった。さらに培養前後でＣＤ３４＋細胞をセルソーターでソーティングし、１００細胞ずつＭｅｔｈｏｃｕｌｔＨ４４１５に播種し、コロニーアッセイを行った。２週間後にコロニーをピックアップし、サイトスピン標本を作製して、ギムザ染色を行ったうえで、コロニーの種類を顕微鏡下で判定した。ＣＤ３４＋細胞５０個あたりのＧＥｍＭコロニーをカウントし培養前と比較したコロニー数の増加率を求めた。すると、ＧＥｍＭコロニー形成能において、ブチザミドは、ＴＰＯを完全に代替できることが明らかとなった。

[0088] さらに次には、ＳＣＦとＴＰＯを含まない培養培地に対して、ＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭのいずれかまたは両方を添加した培地中で、ヒト造血幹細胞の培養実験を行った。培養７日目に総細胞数および含まれるＣＤ３４＋細胞数をフローサイトメトリによって計数し、培養開始時に対する増殖率を求めた。すると、図８に示されるように、ＰＩ３Ｋａ単独またはブチザミド単独では、細胞の増加は確認され無かったが、ＰＩ３ＫａとＴＰＯａｇｏの両方が存在する場合に、細胞数が顕著に増加することが明らかとなった。

[0089] 更に次には、ＳＣＦとＴＰＯをＰＩ３ＫａとＴＰＯａｇｏで代替した培地

において、いずれの細胞集団が増殖し易いかを調べた。譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。細胞を抗ＣＤ３４-PE-Cy7抗体（販売社名ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、製品番号３４８７９１）、抗ＣＤ３８－Ｖ４５０抗体（販売社名ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、製品番号６４６８５１）、抗ＣＤ１３３－ＰＥ抗体（販売社名Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、製品番号１３０－０８０－８０１）、抗ＣＤ４５ＲＡ－ＡＰＣ抗体（販売社名ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、製品番号３０４１１２）、および抗ＣＤ４９ｆ－ＰＥ抗体（販売社名ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、製品番号３１３６１１）を用いてセルソーターによって分画した。ヒトさい帯血由来造血幹細胞の純化マーカーとして報告されているＣＤ３４＋分画、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ１３３＋分画、およびＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画のそれぞれについて、培養開始後７日目に総細胞数および含まれるＣＤ３４＋細胞数をフローサイトメトリによって計数し、培養開始時に対する増殖率を求めた。結果は、図９に示される通りであった。図９に示されるように、いずれの細胞分画においても顕著な細胞増殖が認められたが、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ１３３＋分画、およびＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画、特に、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画において細胞増殖が顕著であった。

[0090] 参考例３：ヒト造血幹細胞の長期培養実験

ヒト造血幹細胞を、上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ ０．１μＭを含む培養培地中で、培養した。培養開始後７日目、および１４日目に上記と同様にして細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数を求めた。結果は、図１０に示される通りであった。図１０に示されるように、細胞総数は、培養日数が経過すると共に増加したが、その一方で、ＣＤ３４＋細胞数は、７日目よりも１４日目において減少した。

[0091] 光学顕微鏡を用いて培養した細胞を観察すると、１４日目には、巨大な細

胞が認められた。この巨大な細胞が、巨核球または巨核球前駆細胞である可能性を確認するため、抗ＣＤ４１ａ－ＦＩＴＣ抗体（販売社名ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、製品番号５５５４６６）および抗ＣＤ４２ｂ抗体（販売社名ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、製品番号５５５４７３）を用いて、フローサイトメーターにより細胞を分画した。その結果、図１１に示されるように、培養開始後１４日目の細胞の大半は、ＣＤ４１ａ＋ＣＤ４２ｂ＋の細胞であった。但し、図１１に示されるように、この条件においてもＣＤ３４＋ＣＤ３８－細胞は増殖していた。

[0092] また、培養開始後１４日目に得られた培養物中のＣＤ３４＋細胞を１００細胞ずつＭｅｔｈｏｃｕｌｔＨ４４１５に播種し、コロニーアッセイを行った。２週間後にコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製した。その後、標本に関して、ギムザ染色を行った後、顕微鏡下でコロニー種類を判定した。結果は図１２に示される通りであった。コロニーの種類は、Ｇは「顆粒球」、Ｅは「赤芽球」、ｍは「マクロファージ」、Ｍは「巨核球」を含有するコロニーであることを意味する。図１２に示されるように、細胞コロニーの多くは、巨核球を含むものであった。

[0093] 参考例４：ヒト造血幹細胞の長期培養に更に適した条件の検討

ヒト造血幹細胞を増殖させることができる化合物存在下で、ヒト造血幹細胞の長期の培養を試みた。

[0094] 上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭを含む培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ　０．１μＭ）、および当該培地に対して、ＳＲ－１（５００ｎＭ）およびＵＭ１７１（３５ｎＭ）のいずれかまたは両方を更に添加して作製した培地（＋ＳＲ－１、＋ＵＭ１７１、および＋ＳＲ－１＋ＵＭ１７１）を用意した。購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．

０×１０^{5}細胞を分注し、用意した培地においてＣＤ３４＋細胞を培養した。培養開始後１４日目に上記と同様にして細胞総数およびＣＤ３４＋細胞を計数し、培養開始前からの増殖率を求めた。結果は、図１３に示される通りであった。図１３に示されるように、ＵＭ１７１を更に含む培養培地においては、細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数が増加し、ＣＤ３４＋細胞の増加率は、ＵＭ１７１を含まない培地と比較してＵＭ１７１を含む培地において有意に増大した。これに対して、ＳＲ－１は、本実験条件においては、細胞を死滅させた。

[0095] さらに、条件１：上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μM、およびＴＰＯａｇｏ ０．１μMを含む培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μM＋ＴＰＯａｇｏ ０．１μM）で１４日間培養するもの、条件２：７日目以降はブチザミドを含まない培地（ＰＩ３Ｋａ２０μM）条件で培養するもの（Ｄａｙ７－Ｂｕｔｙなし）、および、条件３：培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μM＋ＴＰＯａｇｏ ０．１μM）にＵＭ１７１を更に添加した培地（＋ＵＭ１７１）で１４日間培養するものの、３つの条件下でＣＤ３４＋細胞を培養して、細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数の増加率を求めた。また、ＣＤ４１＋細胞数をフローサイトメーターを用いて求めた。結果は、図１４に示される通りであった。図１４に示されるように、培養開始後７日目にブチザミドを抜いた培地で培養する条件２では、条件１と比較して、ＣＤ３４＋細胞数が増加し、ＣＤ４１＋細胞数が減少した。図１４に示されるように、ＵＭ１７１を更に添加した培地で培養する条件３では、条件１や２と比較して、ＣＤ３４＋細胞の増加率が顕著に増大し、ＣＤ４１＋細胞数が顕著に減少した。このことから、ＰＶＡ、ＰＩ３ＫａおよびＴＰＯａｇｏ存在下の無血清培地条件において、ＵＭ１７１は、ヒト造血幹細胞を増殖させ、巨核球前駆細胞や巨核球への細胞の分化を抑制することが明らかとなった（図１５参照）。

[0096] 参考例５：培養後のＣＤ３４＋細胞の移植実験

条件１～３のそれぞれで７日間培養したヒトＣＤ３４＋細胞を照射ＮＯＧ

マウスへ移植して細胞の生着を確認した。具体的には、培養後のヒトＣＤ３４＋細胞を１．５Ｇｙのγ線照射したＮＯＧマウスに１×１０^{4}細胞移植した。移植１２週間後に、前記ＮＯＧマウスの末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いて末梢血中の細胞成分を分析した。結果は、図１６に示される通りであった。図１６に示されるように、条件１および２において、造血幹細胞の生着率が、培養前ＣＤ３４＋細胞を移植したときにそれぞれ１４．９％および１１．１％であったのが、培養後のＣＤ３４＋細胞を移植するとそれぞれ６６．６％および５４．９％に増加した。また、条件３において、造血幹細胞の生着率が、培養前ＣＤ３４＋細胞を移植したときに１７％であったのが、培養後のＣＤ３４＋細胞を移植すると６７％に増加した。

[0097] このことから、アルブミン非存在下の無血清培地条件において、ＰＶＡ存在下で、ＰＩ３Ｋ活性化剤およびＴＰＯ受容体アゴニストは、ヒト造血幹細胞を良好に増殖させること、および増殖したヒトＣＤ３４＋細胞は、造血幹細胞としての性質を維持し、他個体への移植後の生着率を向上させることが明らかとなった。また、ヒト造血幹細胞は、この条件下において長期培養するとその一部が巨核球に分化し、これにより巨核球を得ることができる一方で、一部がＣＤ３４＋細胞として増殖する傾向を有する。ここにＵＭ１７１を添加すると、ＣＤ３４＋細胞の増殖率が向上し、巨核球への分化を抑制しうることも明らかとなった。

[0098] 次に、新鮮なヒトさい帯血からヒト単核球を分離した。条件１および条件３で、得られた細胞（５×１０^{5}細胞）を培養し、培養開始７日後および１４日後に総細胞数、ＣＤ３４＋細胞数、総細胞に占めるＣＤ３４＋細胞の割合、および細胞の生存率をそれぞれ求めた。結果は、図１７に示される通りであった。図１７に示されるように、いずれの条件下においても、ヒトさい帯血から得られた単核球は、培養と共に細胞総数を減少させた。一方で、条件３では、総細胞に占めるＣＤ３４＋細胞の割合が条件１よりも顕著に向上した。また、細胞の生存率も、条件３において条件１よりも有意に高かった。さらに、ＣＤ３４＋細胞数は、条件３で顕著な増大を示したのに対して、条

件１では、細胞数は維持された点では良好であったものの、細胞数の増加は認められなかった。

[0099] 実施例１：アルブミンを含まない培養培地を用いた造血幹細胞の増殖試験

本実施例では、マウス造血幹細胞（ＫＳＬ）とヒト造血幹細胞（ＣＤ３４＋ＣＤ３８－）をアルブミンを含まない培養培地を用いて増殖させる試験を行った。培養培地は、Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５７１：１１７－１２１，２０１９に記載されたアルブミンを含まない無血清培地において、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）の代わりに様々なポリマーを含む培地とした。

[0100] 具体的には、マウス造血幹細胞の培養においては、培養培地は、１％インシュリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン（ＩＴＳＸ）、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００ ｎｇ／ｍＬマウストロンボポイエチン（ｍＴＰＯ）、および１０ ｎｇ／ｍＬマウス幹細胞因子（ｍＳＣＦ）を含むＨａｍ’ｓ Ｆ１２培地とした。

ヒト造血幹細胞の培養においては、培養培地は、１％インシュリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン（ＩＴＳＸ）、２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン－グルタミン、１００ ｎｇ／ｍＬヒトトロンボポイエチン（ｈＴＰＯ）、および１０ ｎｇ／ｍＬヒト幹細胞因子（ｈＳＣＦ）を含むＩＭＤＭ培地とした。 以下の実施例では、特に断りのない限り、造血幹細胞の培養には、上記培養培地が用いられた。

[0101] 培地に添加するポリマーは、以下の通り：ポリビニルピロリドンＫ１２、ポビドンＫ１７、ポビドン、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリビニルカプロラクタム－ポリビニル酢酸－ポリエチレングリコールグラフトコポリマー（以下、「ポリマーＡ」という）とした。より具体的には、ＢＡＳＦ社製の同濃度のコリフォール（商標） Ｐ１８８ ｂｉｏ（１８８ ｂｉｏ）、コリフォール（商標） Ｐ １８８ Ｇｅｉｓｍａｒ

（１８８　Ｇｅｉｓｍａｒ）、ソルプラス（Ｓｏｌ＋）、コリフォール（商標）　Ｐ　４０７　Ｇｅｉｓｍａｒ（４０７　Ｇｅｉｓｍａｒ）、コリドン（商標）　３０　Ｏｒｉｇｉｎ　ＵＳＡ（３０　ＵＳＡ）、コリドン（商標）　１７　ＰＦ（１７　ＰＦ）、コリドン（商標）　２５（２５）、コリドン（商標）９０Ｆ（９０Ｆ）、およびコリドン（商標）１２ＰＦ（１２ＰＦ）をそれぞれ最終濃度０．１％で添加した上記培地を用意した。

[0102] マウス造血幹細胞としては、ＣＤ３４－ＣＤ１５０＋のマウス骨髄のＫＳＬ細胞分画を用いた。具体的には、マウス骨髄細胞は、脛骨、大腿骨、骨盤から分離され、ＡＰＣ－ｃ－ＫＩＴ抗体で染色された。ｃ－ＫＩＴ＋細胞は、抗ＡＰＣ磁気ビーズとＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して濃縮された。その後、ｃ－ＫＩＴ濃縮細胞を、抗ＣＤ３４、抗ｃ－ＫＩＴ、抗ＳＣＡ１およびストレプトアビジン－ＡＰＣ／ｅＦｌｕｏｒ　７８０で９０分間染色する前にリニエージ抗体カクテル（ビオチン化ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５Ｒ、ＴＥＲ１１９、ＬＹ－６Ｇ　／　ＬＹ－６ＣおよびＣＤ１２７）で染色した。その後、細胞集団はＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　ＩＩ（ＢＤ）を使用し、ヨウ化プロピジウムを死滅染色として使用して、培地を含むウェルに直接選別して精製した。

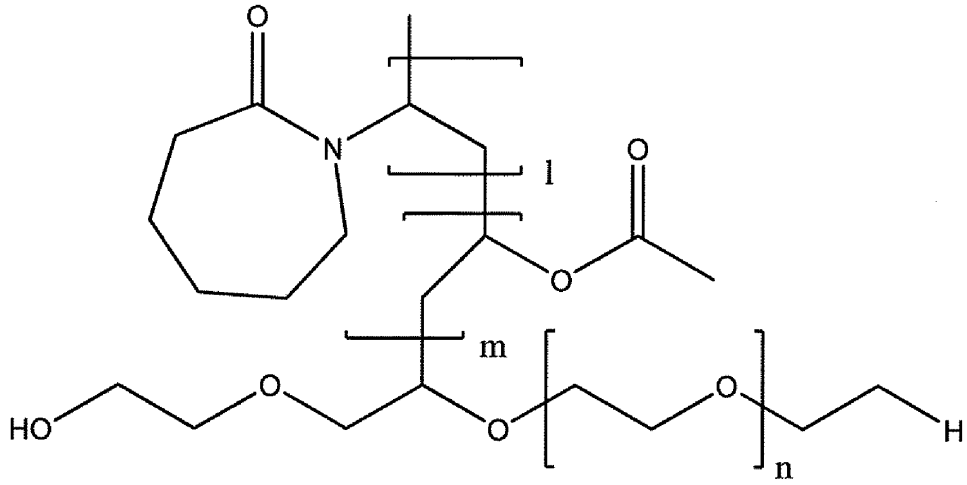
[0103] ヒト造血幹細胞としては、ヒト骨髄のＣＤ３４＋ＣＤ３８－細胞を用いた。具体的には、市販されているヒト骨髄ＣＤ３４陽性細胞（Ｌｏｎｚａ　２Ｃ－１０１）を購入した。

[0104] それぞれの培地中でマウス造血幹細胞を１週間培養し、培養後の細胞数を計数した。

[0105] 結果は図１８に示される通りであった。図１８に示されるようにマウス造血幹細胞は、ＰＶＡを含みアルブミンを含まない無血清培地で良好に増殖したが、ＰＶＡに代えて試した他の化合物の存在下では増殖せず、化合物Ａの存在下でのみ増殖を示した。

[0106] ソルプラス（商標）、以下構造を有する化合物であった：

[化2]



{式中、ｎは１３であり、ｍは３０であり、ｌは５７である。}

[0107] なお、Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１９では、マウス造血幹細胞は、アルブミンを含まない無血清培地においては、ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下でさえ、長期間の増殖を維持することができなかった。しかしながら、Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１９では、Ｆｉｇｕｒｅ ２ｂにおいて、ＰＶＡを培地に添加することによって、マウス造血幹細胞はアルブミンを含まない無血清培地において長期に増殖することができることが示されている。

[0108] このことから、マウス造血幹細胞は、アルブミン非含有の無血清培地中においても、ＰＶＡまたはポリマーＡの存在下において良好に増殖することが明らかになった。

[0109] マウス造血幹細胞を５０個／ウェルの割合で分取して、０．１％のＰＶＡまたはポリマーＡとＳＣＦおよびＴＰＯとの存在下で培養した。結果は、図１９に示される通りであった。図１９に示されるように、マウス造血幹細胞は、アルブミン非含有の無血清培地中においても、ＰＶＡまたはポリマーＡの存在下において良好にコロニー形成することが明らかになった。このことから、ＰＶＡおよびポリマーＡの存在下において、造血幹細胞が細胞分裂能を示すことが示された。

[0110] 増殖した細胞中のＣＤ２０１陽性細胞の割合をアルカリフォスファターゼ標識抗マウスＣＤ２０１抗体（ｅＢｉｏ１５６０）を用いて確認した。すると、図２０に示されるように、ポリマーＡ存在下で培養したマウス造血幹細胞は、ＰＶＡよりも多くの割合のＣＤ２０１陽性細胞を有することが分かった。ＣＤ２０１は、造血幹細胞のマーカーとして知られ、ＣＤ２０１陽性細胞の割合が多いことは、増殖によって幹細胞性がより良好に維持されたことを示唆するものである。

[0111] さらに、マウス造血幹細胞を最終濃度０．１％のポリマーＡまたはＰＶＡ存在下で１週間培養し、照射マウスに移植した。移植４週間後に移植された照射マウスの末梢血を分析し、移植した造血幹細胞に由来する血球のキメラ率を調べた。その結果、ポリマーＡ存在下で培養した造血幹細胞は、ＰＶＡで培養した造血幹細胞と同等のキメラ率（寄与率）を示した。このことは、ポリマーＡ存在下で培養された造血幹細胞の骨髄再構築能が、ＰＶＡ存在下で培養された造血幹細胞の骨髄再構築能と同等であったことを示す。

[0112] 実施例２：マウス造血幹細胞とヒト造血幹細胞のシグナル伝達の相違

ＳＣＦおよびＴＰＯ存在下におけるマウス造血幹細胞およびヒト造血幹細胞のシグナル経路を分析した。

[0113] アルブミン非存在下かつＰＶＡ存在下において、マウスおよびヒトそれぞれの造血幹細胞を１０　ｎｇ／ｍＬの組織因子（ＳＣＦ）および１００　ｎｇ／ｍＬのトロンボポイエチン（ＴＰＯ）存在下で培養した造血幹細胞におけるＳＣＦおよびＴＰＯの下流のシグナル因子のリン酸化の程度をリン酸化免疫染色法により解析した。まず、ＳＣＦおよびＴＰＯシグナルの下流の各因子のリン酸化状態を、それぞれの因子のリン酸化形態特異的な抗体を用いて検出した。具体的には、Ａｋｔ、ＰＩ３Ｋ、およびＳｔａｔ５などの代表的なシグナル伝達分子におけるリン酸化抗体を用いてサイトカインで刺激をした細胞へ反応させた後に蛍光顕微鏡により細胞に反応した抗体の蛍光強度を定量的に解析した。

[0114] すると、図２４に示されるように、調べた７つの因子のうち、いくつかの

因子ではマウス造血幹細胞とヒト造血幹細胞とでリン酸化状態の異なる因子がいくつか発見された。その中で、ＰＩ３ＫおよびＡｋｔについては、ＳＣＦおよびＴＰＯ添加２４時間後からマウス造血幹細胞ではリン酸化形態が多く求められたのに対して、ヒト造血幹細胞ではほとんどリン酸化形態が認められないか、またはマウス造血幹細胞におけるリン酸化形態量よりも少ない量を示した。

[0115] そこで、０．３μＭ ＡＫＴａ（販売社名Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、製品番号１２３８７１または２０μＭ ＰＩ３Ｋａを添加した培養培地において、ヒト造血幹細胞を培養した。培養３日後、５日後、および７日後に細胞を計数し、培養初日の細胞数を１としたときの各時点での細胞数の比を求めた。以下実施例において、ＰＩ３Ｋａとしては、７４０Ｙ－Ｐ（販売社名Ｔｏｃｒｉｓ、製品番号１９８３）を用いた。すると、図２５に示されるように、ＰＩ３Ｋａ存在下では、ヒト造血幹細胞は、明確な増殖を示した。他方で、ＡＫＴａについては、本実験の環境下では、ヒト造血幹細胞に対する増殖作用は認められなかった。

[0116] 次に、ヒト造血幹細胞の培養に関して、ＰＩ３Ｋａが、ＳＣＦを完全に代替するか否かを調べた。ヒト造血幹細胞用の上記培養培地に２０μＭのＰＩ３Ｋａを添加した場合（Ｓ１０＋ＰＩ３Ｋａ２０＋Ｔ１００）と、上記培養培地に２０μＭのＰＩ３Ｋａを添加し、ＳＣＦを抜いた場合（ＰＩ３Ｋａ２０＋Ｔ１００）とで、ヒト造血幹細胞を７日間培養した後の、細胞総数と、抗ＣＤ３４抗体を用いたセルソーティングによる単離ＣＤ３４＋細胞の数を求めた。結果は、図２６に示される通りであった。図２６に示されるように、ＰＩ３Ｋａを添加した場合には、ＳＣＦの有無によって細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数に有意差は認められなかった。

[0117] 次に、ヒト造血幹細胞の培養に関して、ＴＰＯをＴＰＯ受容体アゴニストにより置き換えることができるか否かを調べた。ＴＰＯ受容体アゴニストとしては、ブチザミド、エルトロンボパグ、およびアバトロンボパグが知られている。上記培養培地からＴＰＯを抜いた組成に、０．１％組換えヒト血清

アルブミン（Ａｌｂｕｍｉｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の存在下またはＰＶＡ存在下で、０．１μＭブチザミド、３μｇ／ｍＬエルトロンボパグ、または３μＭアバトロンボパグを添加した培地中で、ヒト造血幹細胞を培養した。本実験においては、ヒト造血幹細胞としては、Ｍｐｌ３２Ｄ細胞を用いた。結果は、図２７に示される通りであった。図２７に示されるように、アルブミン存在下では、ブチザミド、エルトロンボパグ、およびアバトロンボパグは、ＴＰＯの非存在下でヒト造血幹細胞の増殖を支持することができた。これに対して、ＰＶＡ存在下（アルブミン非存在下）では、ＴＰＯの非存在下でブチザミドはヒト造血幹細胞に対して顕著な細胞増殖効果を奏したが、アバトロンボパグではその効果は小さく、エルトロンボパグでは効果がほとんど認められなかった。

[0118] さらに、購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓをＣＤ３４＋細胞を分離したものを培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．０×10^5細胞を分注し、ヒト造血幹細胞用の培養培地からＴＰＯを抜いて、上記ＴＰＯ受容体アゴニスト（以下、「ＴＰＯａｇｏ」ということがある）のいずれかと置き換えて実験を行った。培養初日に対する培養７日目の細胞数の比を求めた。結果は、図２８に示される通りであった。図２８に示されるように、ヒト造血幹細胞は、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、ブチザミド存在下でのみ有意な細胞増殖を示した。アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、アバトロンボパグ存在下またはエルトロンボパグ存在下では、造血幹細胞が細胞死を起こしていた。しかしながら、これらのＴＰＯ受容体アゴニストは、生体内の環境では、肝硬変の外科的治療患者や再生不良性貧血の患者の治療に用いられる安全性の高い化合物である。本実施例の結果からは、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下では、いくつかのＴＰＯ受容体アゴニストは、ヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を示し得ることを示すものである。また、このことから、ＴＰＯ受容体アゴニストにはヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を有するものが存在

すること、およびヒト造血幹細胞を培養するためには、ヒト造血幹細胞に対して細胞傷害性を有しないものを用いればよいことが示唆された。

[0119] 次に、アルブミン非存在下ＰＶＡ存在下においてＳＣＦとＴＰＯをＰＩ３ＫａおよびＴＰＯ受容体アゴニストで代替することができるか否かを調べた。以下実施例においては、ＴＰＯ受容体アゴニストとしてブチザミドを用いた。購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．０×10^5細胞を分注し、ＳＣＦを２０μＭ　ＰＩ３Ｋａに置き換えた組成の培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯ１００）、およびＳＣＦを２０μＭ　ＰＩ３Ｋａに置き換え、ＴＰＯを０．１μＭブチザミドに置き換えた組成の培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ０．１μＭ）中でそれぞれ培養した。７日後に、細胞総数を求め、フローサイトメトリによりＣＤ３４＋細胞の数を求めた。その後、培養開始時と比較した増殖率を求めた。結果は、図２９に示される通りであった。図２９に示されるように、ブチザミドは、ＴＰＯを完全に代替できることが明らかとなった。さらに培養前後でＣＤ３４＋細胞をセルソーターでソーティングし、１００細胞ずつＭｅｔｈｏｃｕｌｔＨ４４１５に播種し、コロニーアッセイを行った。２週間後にコロニーをピックアップし、サイトスピン標本を作製して、ギムザ染色を行ったうえで、コロニーの種類を顕微鏡下で判定した。ＣＤ３４＋細胞５０個あたりのＧＥｍＭコロニーをカウントし培養前と比較したコロニー数の増加率を求めた。すると、ＧＥｍＭコロニー形成能において、ブチザミドは、ＴＰＯを完全に代替できることが明らかとなった。

[0120] さらに次には、ＳＣＦとＴＰＯを含まない培養培地に対して、ＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭのいずれかまたは両方を添加した培地中で、ヒト造血幹細胞の培養実験を行った。培養７日目に総細胞数および含まれるＣＤ３４＋細胞数をフローサイトメトリによって計数し、培養

開始時に対する増殖率を求めた。すると、図３０に示されるように、ＰＩ３Ｋａ単独またはブチザミド単独では、細胞の増加は確認され無かったが、ＰＩ３ＫａとＴＰＯａｇｏの両方が存在する場合に、細胞数が顕著に増加することが明らかとなった。

[0121] 更に次には、ＳＣＦとＴＰＯをＰＩ３ＫａとＴＰＯａｇｏで代替した培地において、いずれの細胞集団が増殖し易いかを調べた。譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。細胞を抗ＣＤ３４－ＰＥ－Ｃｙ７抗体（販売社名ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、製品番号３４８７９１）、抗ＣＤ３８－Ｖ４５０抗体（販売社名ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、製品番号６４６８５１）、抗ＣＤ１３３－ＰＥ抗体（販売社名Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、製品番号１３０－０８０－８０１）、抗ＣＤ４５ＲＡ－ＡＰＣ抗体（販売社名ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、製品番号３０４１１２）、および抗ＣＤ４９ｆ－ＰＥ抗体（販売社名ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、製品番号３１３６１１）を用いてセルソーターによって分画した。ヒトさい帯血由来造血幹細胞の純化マーカーとして報告されているＣＤ３４＋分画、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ１３３＋分画、およびＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画のそれぞれについて、培養開始後７日目に総細胞数および含まれるＣＤ３４＋細胞数をフローサイトメトリによって計数し、培養開始時に対する増殖率を求めた。結果は、図３１に示される通りであった。図３１に示されるように、いずれの細胞分画においても顕著な細胞増殖が認められたが、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ１３３＋分画、およびＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画、特に、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４９ｆ＋分画において細胞増殖が顕著であった。

[0122] 実施例３：ヒト造血幹細胞の長期培養実験

ヒト造血幹細胞を、上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ ０．１μＭを含む培養培地中で、培養した。培養開始後７日目、および１４日目に上記と

同様にして細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数を求めた。結果は、図３２に示される通りであった。図３２に示されるように、細胞総数は、培養日数が経過すると共に増加したが、その一方で、ＣＤ３４＋細胞数は、７日目よりも１４日目において減少した。

[0123] 光学顕微鏡を用いて培養した細胞を観察すると、１４日目には、巨大な細胞が認められた。この巨大な細胞が、巨核球または巨核球前駆細胞である可能性を確認するため、抗ＣＤ４１ａ－ＦＩＴＣ抗体（販売社名ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、製品番号５５５４６６）および抗ＣＤ４２ｂ抗体（販売社名ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、製品番号５５５４７３）を用いて、フローサイトメーターにより細胞を分画した。その結果、図３３に示されるように、培養開始後１４日目の細胞の大半は、ＣＤ４１ａ＋ＣＤ４２ｂ＋の細胞であった。但し、図３３に示されるように、この条件においてもＣＤ３４＋ＣＤ３８－細胞は増殖していた。

[0124] また、培養開始後１４日目に得られた培養物中のＣＤ３４＋細胞を１００細胞ずつＭｅｔｈｏｃｕｌｔＨ４４１５に播種し、コロニーアッセイを行った。２週間後にコロニーを採取し、サイトスピン標本を作製した。その後、標本に関して、ギムザ染色を行った後、顕微鏡下でコロニー種類を判定した。結果は図３４に示される通りであった。コロニーの種類は、Ｇは「顆粒球」、Ｅは「赤芽球」、ｍは「マクロファージ」、Ｍは「巨核球」を含有するコロニーであることを意味する。図３４に示されるように、細胞コロニーの多くは、巨核球を含むものであった。

[0125] 実施例４：ヒト造血幹細胞の長期培養に更に適した条件の検討

ヒト造血幹細胞を増殖させることができる化合物存在下で、ヒト造血幹細胞の長期の培養を試みた。

[0126] 上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭを含む培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ　０．１μＭ）、および当該培地に対して、ＳＲ－１（５００ｎＭ）およびＵＭ１７１（３５ｎＭ）のいずれかまたは両

方を更に添加して作製した培地（＋ＳＲ－１、＋ＵＭ１７１、および＋ＳＲ－１＋ＵＭ１７１）を用意した。購入したヒト骨髄ＣＤ３４＋細胞（販売社名Ｌｏｎｚａ、製品番号２Ｃ－１０１）あるいは、譲渡されたＦｒｅｓｈな臍帯血をｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを用いてＣＤ３４＋細胞を上記のように分離して培養実験に用いた。２４ウェルプレートに１ウェルあたり０．２～１．０×10^5細胞を分注し、用意した培地においてＣＤ３４＋細胞を培養した。培養開始後１４日目に上記と同様にして細胞総数およびＣＤ３４＋細胞を計数し、培養開始前からの増殖率を求めた。結果は、図３５に示される通りであった。図３５に示されるように、ＵＭ１７１を更に含む培養培地においては、細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数が増加し、ＣＤ３４＋細胞の増加率は、ＵＭ１７１を含まない培地と比較してＵＭ１７１を含む培地において有意に増大した。これに対して、ＳＲ－１は、本実験条件においては、細胞を死滅させた。

[0127] さらに、条件１：上記ヒト造血幹細胞用の培養培地であって、ＳＣＦとＴＰＯの代わりにＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭを含む培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ　０．１μＭ）で１４日間培養するもの、条件２：７日目以降はブチザミドを含まない培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ）条件で培養するもの（Ｄａｙ７－Ｂｕｔｙなし）、および、条件３：培養培地（ＰＩ３Ｋａ２０μＭ＋ＴＰＯａｇｏ　０．１μＭ）にＵＭ１７１を更に添加した培地（＋ＵＭ１７１）で１４日間培養するものの、３つの条件下でＣＤ３４＋細胞を培養して、細胞総数およびＣＤ３４＋細胞数の増加率を求めた。また、ＣＤ４１＋細胞数をフローサイトメーターを用いて求めた。結果は、図３６に示される通りであった。図３６に示されるように、培養開始後７日目にブチザミドを抜いた培地で培養する条件２では、条件１と比較して、ＣＤ３４＋細胞数が増加し、ＣＤ４１＋細胞数が減少した。図３６に示されるように、ＵＭ１７１を更に添加した培地で培養する条件３では、条件１や２と比較して、ＣＤ３４＋細胞の増加率が顕著に増大し、ＣＤ４１＋細胞数が顕著に減少した。このことから、ＰＶＡ、ＰＩ３Ｋａお

よびＴＰＯａｇｏ存在下の無血清培地条件において、ＵＭ１７１は、ヒト造血幹細胞を増殖させ、巨核球前駆細胞や巨核球への細胞の分化を抑制することが明らかとなった（図３７参照）。

[0128] 実施例５：培養後のＣＤ３４＋細胞の移植実験

条件１～３のそれぞれで７日間培養したヒトＣＤ３４＋細胞を照射ＮＯＧマウスへ移植して細胞の生着を確認した。具体的には、培養後のヒトＣＤ３４＋細胞を１．５Ｇｙのγ線照射したＮＯＧマウスに１×１０^{4}細胞移植した。移植１２週間後に、前記ＮＯＧマウスの末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いて末梢血中の細胞成分を分析した。結果は、図３８に示される通りであった。図３８に示されるように、条件１および２において、造血幹細胞の生着率が、培養前ＣＤ３４＋細胞を移植したときにそれぞれ１４．９％および１１．１％であったのが、培養後のＣＤ３４＋細胞を移植するとそれぞれ６６．６％および５４．９％に増加した。また、条件３において、造血幹細胞の生着率が、培養前ＣＤ３４＋細胞を移植したときに１７％であったのが、培養後のＣＤ３４＋細胞を移植すると６７％に増加した。

[0129] このことから、アルブミン非存在下の無血清培地条件において、ＰＶＡ存在下で、ＰＩ３Ｋ活性化剤およびＴＰＯ受容体アゴニストは、ヒト造血幹細胞を良好に増殖させること、および増殖したヒトＣＤ３４＋細胞は、造血幹細胞としての性質を維持し、他個体への移植後の生着率を向上させることが明らかとなった。また、ヒト造血幹細胞は、この条件下において長期培養するとその一部が巨核球に分化し、これにより巨核球を得ることができる一方で、一部がＣＤ３４＋細胞として増殖する傾向を有する。ここにＵＭ１７１を添加すると、ＣＤ３４＋細胞の増殖率が向上し、巨核球への分化を抑制しうることも明らかとなった。

[0130] 次に、新鮮なヒトさい帯血からヒト単核球を分離した。条件１および条件３で、得られた細胞（５×１０^{5}細胞）を培養し、培養開始７日後および１４日後に総細胞数、ＣＤ３４＋細胞数、総細胞に占めるＣＤ３４＋細胞の割合、および細胞の生存率をそれぞれ求めた。結果は、図３９に示される通りで

あった。図３９に示されるように、いずれの条件下においても、ヒトさい帯血から得られた単核球は、培養と共に細胞総数を減少させた。一方で、条件３では、総細胞に占めるＣＤ３４＋細胞の割合が条件１よりも顕著に向上した。また、細胞の生存率も、条件３において条件１よりも有意に高かった。さらに、ＣＤ３４＋細胞数は、条件３で顕著な増大を示したのに対して、条件１では、細胞数は維持された点では良好であったものの、細胞数の増加は認められなかった。

[0131] 実施例６：ヒト造血幹細胞のポリマーＡ存在下での培養実験

上記実施例によって、ヒト造血幹細胞は、マウス造血幹細胞とは異なり、ＰＩ３Ｋ経路の活性化が必要であることが明らかになり、ＴＰＯをＴＰＯ受容体アゴニストであるブチザミドで代替することが可能であることが明らかになった。また、ヒト造血幹細胞は、長期培養を行わない場合には、ＵＭ１７１非存在下で培養することができるが、長期培養を行う場合には、ＵＭ１７１存在下で培養することによって、巨核球系列への分化を抑制できることもまた明らかになった。

[0132] そこで、本実施例では、ヒト造血幹細胞を、上記においてＰＶＡをポリマーＡに代えて培養する実験、すなわち、ポリマーＡ、ＰＩ３Ｋアクチベータ、ＴＰＯ受容体アゴニスト、およびＵＭ１７１存在下で培養する実験を試みた。対照としては、ヒト造血幹細胞を、ＰＶＡ、ＰＩ３Ｋアクチベータ、ＴＰＯ受容体アゴニスト、およびＵＭ１７１存在下で培養する実験とした。ＰＩ３Ｋアクチベータとしては、ＰＩ３Ｋａを用い、ＴＰＯ受容体アゴニストとしては、ブチザミドを用い、濃度は上記実施例の通りであった。

[0133] 結果は、図２２に示される通りであった。ＰＶＡに代えてポリマーＡ存在下で培養したヒト造血幹細胞は、良好に増殖し、図２２に示されるように、ＣＤ３４陽性細胞の割合が高かった。また、ＣＤ３４陽性細胞の割合は、ＰＶＡ存在下よりもポリマーＡ存在下において高かった。このことから、ヒト造血幹細胞は、ポリマーＡ存在下で、かつＰＩ３Ｋ経路を活性化した条件下（かつＳＣＦ非存在下）において、良好に増殖することが示唆された。また

、ヒト造血幹細胞は、その条件下で、ＴＰＯをＴＰＯ受容体アゴニストに置き換えても、良好に増殖できることが示唆された。また、ヒト造血幹細胞は、ＵＭ１７１存在下で良好に増殖できることが明らかになった。

[0134] さらに、細胞数の変化を経時的に確認した。この実験では、ヒトの造血幹細胞の培養培地にＴ ｃｅｌｌ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙ Ｂｉｏｔｅｃ）およびヒトＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を添加した培地を用い、ヒト造血幹細胞を３週間にわたって培養した。その結果は、図２３に示される通りであった。図２３に示されるように、ＰＶＡ存在下およびポリマーＡ存在下において、ヒト造血幹細胞は同等に増殖した。

[0135] 実施例７：ヒトＣＤ３陽性細胞の培養

ヒトＣＤ３陽性細胞を通常の条件下でＴ Ｃｅｌｌ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ／Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｋｉｔ, ｈｕｍａｎ （Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてＣＤ２８抗体およびＣＤ３抗体により刺激して０．１％ＰＶＡもしくは０．１％ソルプラス（商標）を含むアルブミンフリーかつサイトカインフリーの基礎培地（1％ＩＴＳＸおよび1％ペニシリンを添加したＩＭＤＭ培地）で6週間にわたって培養した。初期細胞数は１０００個とした。結果は、図４０に示される通りであった。

[0136] 図４０に示されるように、ＣＤ３陽性細胞（主にＴ細胞が含まれる）は、ソルプラス存在下、およびＰＶＡ存在下のいずれにおいても良好に増殖することが示された。このことからアルブミンフリーの培養培地は、ヒトＴ細胞の維持および増殖に用いることができることが示された。

[0137] 実施例８：ヒトＣＤ３４陽性細胞からの血球細胞への分化

ヒトＣＤ３４陽性細胞（造血幹細胞）をＰＶＡまたはソルプラス（商標）を含むアルブミンフリーの基礎培地で培養した。初期細胞数は１０００個とした。造血幹細胞からの血球細胞への分化は、サイトカインカクテルを培地に添加することにより行った。培養は１０日間行った。結果は、図４１に示される通りであった。

[0138] 図４１のパネルＡに示されるように、ＣＤ３４陽性細胞を培養した培養液

中の細胞数は、ソルプラス存在下、およびＰＶＡ存在下のいずれにおいても良好に増加した。図４１のパネルＢに示されるように、ソルプラス存在下の培養によって得られた培養液中の細胞は、巨核球、赤芽球、好中球、およびマクロファージを含んでいた。この結果から、ほぼすべての血液細胞系列の細胞が得られ、かつ、それぞれが増殖していたことから、アルブミンフリーの環境下であっても、ＰＶＡまたはソルプラスなどの添加剤の存在下では、ヒト血球系細胞は良好に増殖、維持、および分化することができることが示された。

[0139] 実施例９：慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）細胞の培養

ＣＭＬ（慢性骨髄性白血病）患者の骨髄細胞サンプルをアルブミンフリーかつサイトカインフリー培養条件で１週間培養を行った。培地としては、０．１％ＰＶＡ、ＰＩ３Ｋａ２０μＭ、およびＴＰＯａｇｏ　０．１μＭを添加した基礎培地を用いた。培養は、ＣＭＬの原因遺伝子であるＢｃｒ－Ａｂｌ阻害剤（イマチニブ（ＩＭ））の存在下と非存在下で行われた。結果は、図４２に示される通りであった。

[0140] その結果、図４２に示されるように、培養前の全細胞数と比較してＩＭ非存在下では０．５％の細胞増殖が確認され、特に白血病幹細胞分画であるＣＤ３４陽性細胞では３０倍以上、絶対数では６倍以上の増幅／維持が確認された。これに対して、ＩＭ存在下においては細胞の大幅な増幅が認められなかったことから、ＩＭ＋で増殖した細胞はＣＭＬ白血病幹細胞であることが示された。