

(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2004-510434
(P2004-510434A)

(43) 公表日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	4 B O 6 5
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	Z
		Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁)

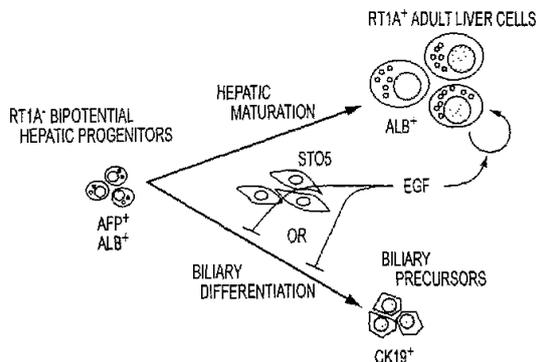
(21) 出願番号	特願2002-532583 (P2002-532583)	(71) 出願人	503125215 ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チ ャペル ヒル シービー 4 1 0 5 パイ ナム ホール 3 0 8
(86) (22) 出願日	平成12年10月3日 (2000. 10. 3)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月3日 (2003. 4. 3)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/027428	(72) 発明者	クボタ ヒロシ アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チ ャペル ヒル サマーウォーク サークル 2 7 3
(87) 国際公開番号	W02002/029012		
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002. 4. 11)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CZ, D E, DK, DM, DZ, EE, ES, F I, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, T M, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝前駆細胞のクローン増殖方法

(57) 【要約】

哺乳類の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を哺乳類の胚フィーダー細胞上で培地中で培養することを含む、哺乳類の内胚葉に由来する、肝前駆細胞のような前駆細胞、その子孫、またはその混合物の増殖方法が開発される。培地には1つまたは複数のホルモンおよび他の増殖剤が添加され得る。これらのホルモンおよび他の増殖剤には、インスリン、デキサメタゾン、トランスフェリン、ニコチンアミド、血清アルブミン、メルカプトエタノール、遊離脂肪酸、グルタミン、CuSO₄、およびH₂SeO₃が含まれ得る。また培地には抗体も含まれ得る。重要なことに、培地には血清が含まれない。本発明は、それぞれ上皮成長因子を添加または除去することによる、肝前駆細胞の肝実質細胞または胆管細胞への分化のような、前駆細胞のその成体の運命への分化の誘導方法も含まれる。その後、前駆細胞は、増殖および分化因子の同定、毒性試験、薬剤開発、抗菌試験、または人工肝臓のような体外臓器の調製といった過程の1つまたは複数において使用できるという点から、哺乳類前駆細胞を生産する方法は有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

培地の存在下でフィーダー細胞を含む層の上で、細胞間接着分子抗原を発現するが古典的主要組織適合性抗原は発現しない、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を培養する段階を含む、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物の増殖方法。

【請求項 2】

前駆細胞、その子孫、またはその混合物が脊椎動物細胞を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前駆細胞、その子孫、またはその混合物がヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、ブタ細胞、イヌ細胞、ウサギ細胞、ラット細胞、マウス細胞、またはその組み合わせを含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前駆細胞、その子孫、またはその混合物が肝臓、肺、腸、膵臓、甲状腺、性腺の前駆細胞、またはその組み合わせを含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前駆細胞、その子孫、またはその混合物が肝臓に由来する、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

培地が基礎培地を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

基礎培地がダルベッコ変法イーグル培地およびハム F 1 2 を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

培地が少なくとも 1 つのホルモンを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

ホルモンがインスリンである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

培地がグルココルチコイドホルモンをさらに含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

グルココルチコイドホルモンがデキサメタゾンである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

培地が鉄飽和トランスフェリンをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

培地がニコチンアミドをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

培地が血清アルブミンをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

培地が少なくとも 1 つの還元剤をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

還元剤がメルカプトエタノールである、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

培地が少なくとも 1 つの脂質補給剤を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

脂質補給剤が遊離脂肪酸混合物を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

遊離脂肪酸混合物が、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、またはその組み合わせを含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】

培地がグルタミン酸を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 21】

培地が微量元素をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

微量元素が $CuSO_4$ を含む、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

微量元素が H_2SeO_3 を含む、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

培地が抗酸化剤を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 5】

抗酸化剤が H_2SeO_3 を含む、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

培地が抗生物質をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 2 7】

培地が上皮成長因子をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 8】

フィーダー細胞の供給源が、少なくとも 1 つの脊椎動物から得た組織を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 9】

脊椎動物が胚を含む、請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

脊椎動物が、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、またはその組み合わせを含む、請求項 2 9 記載の方法。

20

【請求項 3 1】

フィーダー細胞がクローンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 2】

クローンが $STO5$ である、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

フィーダー細胞が間質細胞を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

フィーダー細胞が線維芽細胞を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 5】

肝前駆細胞が MHC クラス Ib を弱く発現する、 $OX18$ を弱く発現する、フェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン 19 を発現する、またはその組み合わせである、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 3 6】

$ICAM$ が $ICAM-1$ である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 7】

肝子孫細胞が MHC クラス Ib を発現する、 $ICAM$ を弱く発現する、 $OX18$ を弱く発現する、フェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン 19 を発現する、またはその組み合わせである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

$ICAM$ が $ICAM-1$ である、請求項 3 7 記載の方法。

40

【請求項 3 9】

肝前駆細胞、その子孫、またはその組み合わせが、積み重なったコロニーとして増殖する請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 0】

肝前駆細胞のクローニングをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 1】

クローニングに細胞数の希釈、クローニング・カラー (collar)、アガロース中での増殖、ピース上での増殖、フローサイトメトリー、またはその組み合わせが利用される、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

50

肝前駆細胞が少なくとも1回の有糸分裂を行なう、請求項1記載の方法。

【請求項43】

肝前駆細胞が少なくとも10回の有糸分裂を行なう、請求項42記載の方法。

【請求項44】

肝前駆細胞が、別の運命をもつ娘細胞を生む、請求項1記載の方法。

【請求項45】

娘細胞が胆管細胞に分化する、請求項44記載の方法。

【請求項46】

娘細胞が肝実質細胞に分化する、請求項44記載の方法。

【請求項47】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝増殖因子を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の増殖の刺激を観察する段階を含む、肝増殖因子の同定方法。

10

【請求項48】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝分化因子を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の分化を観察する段階を含む、肝分化因子の同定方法。

【請求項49】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝毒素を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、および肝前駆細胞の死を観察する段階を含む、肝毒素の同定方法。

20

【請求項50】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および肝前駆細胞・代謝に影響を与える能力があると考えられる薬剤を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の代謝の変化を観察する段階を含む、薬剤の開発方法。

【請求項51】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および抗菌効果を持つと考えられる薬剤を少なくとも1つ提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と薬剤とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の増殖の変化を観察する段階を含む、新規の抗菌剤の同定方法。

30

【請求項52】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物を提供する段階、および前駆細胞、その子孫、またはその混合物を、体外肝臓として働くために十分な細胞群が得られるまで、バイオリアクター中で培養する段階を含む、体外肝臓の調製方法。

【請求項53】

肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物を増殖させる方法であって、

(a) 細胞間接着分子抗原を発現し、主要組織適合性抗原を発現しない、少なくとも1つの肝前駆細胞を提供する段階、および

40

(b) 少なくとも1つのフィーダー細胞の生合成産物を含む培地中で肝前駆細胞を培養する段階

を含む方法。

【請求項54】

培地がグルココルチコイド、インスリン、上皮成長因子、ニコチンアミド、またはその組み合わせをさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

フィーダー細胞の生合成産物が、ペプチド、糖ペプチド、リポペプチド、脂質、糖脂質、炭化水素、蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、またはその組み合わせを含み、生合成産物が肝前駆細胞の増殖または分化を促進する、請求項53記載の方法。

50

【請求項 5 6】

フィーダー細胞の生合成産物が、インスリン様成長因子、インターロイキン 6 ファミリーの増殖因子、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、細胞外マトリックス、またはその組み合わせを含み、生合成産物が肝前駆細胞の増殖または分化を促進する、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 7】

少なくとも 1 つの肝前駆細胞が、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、またはマウスから得られる少なくとも 1 つの細胞を含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 8】

少なくとも 1 つの肝前駆細胞のクローニングをさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

10

【請求項 5 9】

増殖因子の添加をさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 6 0】

肝実質細胞、胆管細胞、またはその組み合わせを生産するための分化因子の添加をさらに含む、請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

培地が無血清である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6 2】

内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を無血清培地の存在下、フィーダー細胞を含む層の上で培養することを含む、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を増殖させる方法。

20

【請求項 6 3】

前駆細胞、その子孫、またはその混合物が肝臓、肺、腸、膵臓、甲状腺、性腺の前駆細胞またはその組み合わせを含む、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

培地がダルベッコ変法イーグル培地およびハム F 1 2 を含む、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 5】

培地が少なくとも 1 つのホルモンを含む、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 6】

ホルモンが、インスリン、グルココルチコイドホルモン、トランスフェリン、上皮成長因子、またはその組み合わせである、請求項 6 5 記載の方法。

30

【請求項 6 7】

フィーダー細胞の供給源が、少なくとも 1 つの脊椎動物から得た組織を含む、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 8】

脊椎動物が、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、またはその組み合わせを含む、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 6 9】

フィーダー細胞がクローンである、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 7 0】

フィーダー細胞が間質細胞を含む、請求項 6 2 記載の方法。

40

【請求項 7 1】

肝前駆細胞が、細胞間接着分子 (ICAM) 抗原を発現する、主要組織適合性抗原 (MHC) クラス I a 抗原を発現しない、MHC クラス I b を弱く発現する、OX 18 を弱く発現する、フェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン 19 を発現する、またはその組み合わせである、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 7 2】

ICAM が ICAM - 1 である、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】

肝子孫細胞が、MHC クラス I a を発現しない、MHC クラス I b を発現する、ICAM

50

を弱く発現する、OX18を弱く発現する、フェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン19を発現する、またはその組み合わせである、請求項62記載の方法。

【請求項74】

ICAMがICAM-1である、請求項73記載の方法。

【請求項75】

肝前駆細胞のクローニングをさらに含む、請求項62記載の方法。

【請求項76】

肝前駆細胞が少なくとも1回の有糸分裂を行なう、請求項75記載の方法。

【請求項77】

肝前駆細胞が少なくとも10回の有糸分裂を行なう、請求項75記載の方法。

【請求項78】

肝前駆細胞が、別の運命をもつ娘細胞を生む、請求項75記載の方法。

【請求項79】

娘細胞が胆管細胞に分化する、請求項78記載の方法。

【請求項80】

娘細胞が肝実質細胞に分化する、請求項78記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、多能性細胞、幹細胞、および他の初期肝前駆細胞を含む、哺乳類肝前駆細胞のクローン増殖のための新規の条件に関する。特に、本発明は合成培地および共培養でフィーダー細胞を使用して肝前駆細胞を増殖させる方法に関する。また、本発明はフィーダーとして使用され、肝前駆細胞の増殖を支持する能力のある細胞にも関する。

【0002】

2. 関連技術の説明

哺乳類組織の多能性前駆細胞群の同定は、臨床的および商業的に重要であり、また発生過程と組織のホメオスタシスの理解のためにも重要である。前駆細胞群は、遺伝子療法、細胞移植、および生体人工臓器の組織工学の理想的な標的である(Millar, A. D. 1992 Nature 357, 455; Langer, R. および Vacanti, J. P. 1993 Science 260, 920; Gage, F. H. 1998 Nature 392, 18)。

【0003】

増殖能および/または多能性の高い組織特異的な「運命づけられた」幹細胞または前駆細胞が存在することは、各々組織に合った特定の方法を用いてクローン同定した、造血幹細胞(Spangrude, G. J.ら、1998 Science 241, 58)、神経幹細胞(Davis, A. A. および Temple, S. 1994 Nature 372, 263; Stemple, D. L. および Anderson, D. J. 1992 Cell 71, 973)、および上皮幹細胞(Jones, P. H. および Watt, F. M. 1993 Cell 73, 713)の研究から明らかである。これらの前駆細胞は、正常な造血、神経、または上皮組織のホメオスタシスを担う、および重度の傷害後に再生応答を担う細胞だと考えられている(Hall, P. A. および Watt, F. M. 1989 Development 106, 619)。

【0004】

哺乳類の成体の肝臓は、通常は代謝回転が遅く、静止状態の組織であるにも関わらず、高度の肝毒性による傷害または部分的肝切除の後に回復する能力が非常に高い(Fishback, F. C. 1929 Arch. Pathol. 7, 955); (Higgins, G. M. および Anderson, R. M. 1931 Arch. Pathol. 12, 186)。マウスにおける最近の試験データでは、一連の移植実験で調べたところ、成体の実質細胞は、ほぼ無限の増殖可能性を持っていることが示唆された(O

10

20

30

40

50

verturfら、1997 *Am. J. Pathol.* 151, 1273); (Rhim, J.A.ら、1994 *Science* 263, 1149)。これらの実験では不均質の幹細胞群を利用しているため、観察された増殖可能性が成体の実質細胞に由来するのか、成体の実質細胞の垂集団に由来するのか、および/または実質細胞の未成熟期(即ち、前駆細胞)に由来するのかを証明する能力が限定されている。さらに実験では、使用された宿主がアルブミン・ウロキナーゼ導入遺伝子またはチロシン分解酵素の欠損を持っていたため、胆管上皮分化の証拠が示されていない;このいずれの宿主も、肝細胞系を選択するような特性を持つ。したがって、このアッセイ法では両能性細胞群の試験ができなかった。

【0005】

いくつかの組織学的試験により、妊娠中期の胎児の初期肝細胞が、胆管上皮および成熟幹細胞に分化する両能性の能力を持つことが確立している(Shiojiri, N. 1997 *Microscopy Res. Tech.* 39, 328-35)。肝臓の発生は、内胚葉の上皮が造心中胚葉と相互作用をした直後に、腹側前腸内胚葉から始まる(Douarin, N.M. 1975 *Medical Biol.* 53, 427); (Houssaint, E. 1980 *Cell Differ.* 9, 269)。この肝臓への関係づけは、マウスでは胎齢(E) 8日で起きる。肝臓発生の最初の段階は、形態学的変化の前に、内胚葉において血清アルブミンおよびフェトプロテインのmRNAが誘導されて、明らかになる(Gualdi, Rら、1996 *Genes Dev.* 10, 1670)。マウス胎齢E 9.5日で、特定の細胞が増殖し、糸のような形で横中隔の間充織に侵入し、肝臓原基を形成する。その後、肝臓の質量は劇的に増加するが、質量の増加は主に造血細胞によるもので、これはマウスではE 10に胎児肝にコロニーを形成し(Houssaint, E. 1981 *Cell Differ.* 10, 243)、肝細胞に影響を与えて極度にゆがんだ不規則な形をとらせる(Luzzatto, A.C. 1981 *Cell Tissue Res.* 215, 133)。興味深いことに、遺伝子ターゲティング変異マウスを用いた最近のデータは、いくつかの遺伝子の欠損により、E 12からE 15の間に、致死的な肝不全、実質細胞のアポトーシス、および/または壊死が引き起こされたことを示す(Gunes, C.ら、1998 *EMBO J.* 17, 2846)、(Hilberg, F.ら、1993 *Nature* 365, 1791)、(Motoyama, J.ら、1997 *Mech. Dev.* 66, 27)、(Schmidt, Cら、1995 *Nature* 373, 699)。ストレス活性化カスケード(Ganiatsas, S.ら、1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6881)、(Nishina, H.ら、1999 *Development* 126, 505)または抗アポトーシスカスケード(Beg, A.ら、1995 *Nature* 376, 167)、(Li, Q.ら、1999 *Science* 284, 321)、(Tanaka, Mら、1999 *Immunity* 10, 421)の一部である遺伝子の破壊は、不活化された遺伝子が広く発現されるにも関わらず、肝発生をひどく損なうが、造血は損なわない。肝細胞が発生ストレスの刺激に本来感受性なのか、胎児肝自体の中の特定の微小環境がそのような破壊的な効果を引き起こすのかは明らかではない(Doi, T.ら、1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2994)。一方で、成体肝の基礎的構築は、門脈を取り囲む胆管上皮の最初の円柱の出現に依存する(Shiojiri, N. 1997 *Microscopy Res. Tech.* 39, 328)。免疫組織学的には、肝内胆管上皮細胞の分化の最初の徴候は、胆汁特異的サイトケラチン(CK)の発現である。上皮細胞の細胞質中間フィラメント(IF)タンパク質であるCKタンパク質は、多重遺伝子族によってコードされ、組織および分化に特異的に発現される(Moll, Rら、1982 *Cell* 31, 11)。成体の肝実質細胞はCK19を全く発現しないが、成体の胆管上皮細胞は発現するので、CK19は胆汁マーカーの中で最も目を引くものの1つである。CK8とCK18のみが初期の肝細胞から成体の肝実質細胞まで通して発現される(Moll, Rら、1982 *Cell* 31, 11)。マウスのE 14に相当

10

20

30

40

50

するラットの発現のE15.5において、胆管前駆細胞はCK18抗体およびCK8抗体の両方によって強く染色され、一部の胆管前駆細胞はCK19を発現する。発生が進むに連れ、成熟しつつある胆管はCK19に加えてCK7も徐々に発現し始め、ALBの発現を失う(Shiojiri, Nら、1991 Cancer Res. 51, 2611)。ラットのE13という早い時期の肝細胞は均一な細胞群と考えられているが、全ての初期の肝細胞が胆管上皮細胞系に分化することができるのかどうか、およびこのような運命がどのようにして決定されるのかはまだ分かっていない。レトロウイルスベクターを用いるような、決定的な系統マーキング試験は肝細胞については行われておらず、両能性肝前駆細胞の立証に必要なクローン培養条件は決定されていない。

【0006】

クローン増殖分析の1つの大きな障害は、造血細胞の爆発的な増加であり、これにより肝細胞のエキスビボでの増殖が観察できなくなる。したがって、肝細胞の濃縮方法を用いる必要がある。胎児肝において造血細胞を分画が必要な表面マーカーは、詳細に調べられているが(Dzierzak, Eら、1998 Immunol. Today 19, 228)、肝前駆細胞のマーカーの研究は初期段階で、これらはまだあまり決定されていない(Sigal, Sら、1994 Hepatology 19, 999)。さらに、成体肝細胞で通常使用されるエキスビボの増殖条件では、ALB発現のような組織特異的機能の損失を伴った分化が起きる(Block, G.D.ら、1996 J. Cell Biol. 132, 1133)。組織特異的mRNAを合成するやや改善した能力と、翻訳後に完全に組織特異的遺伝子を調節する修復能力とは、無血清で、ホルモン、増殖因子、および/または一部の細胞外マトリックス成分が定義されている混合物を用いて維持された肝細胞にのみ、見受けられる(Jefferson, D.M.ら、1984 Mol. Cell Biol. 4, 1929; Enat Rら、1984 Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1411)。しかし、増殖する胎児肝細胞は、インビボでそのような血清タンパク質の発現を維持する。当技術分野で明らかでないのは、インビトロで肝前駆細胞を維持して増殖させるためにどうしたらよいかである。肝前駆細胞のエキスビボの増殖を維持する条件の同定には、未充足の需要がある。同様に、新しく肝組織から単離された肝前駆細胞のクローン増殖能力を決定するためのインビトロコロニー形成アッセイ(CFA)法に対する未充足の需要がある；クローン増殖は、培養液に接種された単一の細胞が、接種された細胞に由来するクローンの娘細胞群を生成する能力と定義される。高い細胞密度で接種され、肝臓培養において近接して増殖する細胞の塊からなるクローン増殖も他の研究者により記述されている(Block, G.D.ら J. Cell Biol. 1996, 132, 1133)；しかし、これらの以前の研究に記述されている細胞のコロニーは、継代培養(subculture)できず、したがって、定義からしてクローンとは言えず、有用性が限られている。

【0007】

インビトロで肝実質細胞を増殖させる試みもなされてきた。ノートン(Naughton)らの米国特許第5,510,524号は、肝細胞の培養は生体適合性であるが生きていない材料の3次元フレームワークに依存すると主張している。人工的フレームワークがなく、肝前駆細胞が増殖および培養できるような培養条件には未充足の需要がある。また、胆管細胞および肝実質細胞の両方を生成する能力のある両能性分化能を持ち、ならびに特に人工肝臓の成分としての利用、肝毒素の試験、および薬剤開発に適する、クローン化肝前駆細胞には未充足の需要がある。

【0008】

ノートンらの米国特許第5,559,022号では、「予備細胞(reserve cell)」の特徴付けに使用される染料であるエオシンYに結合する肝予備細胞を特許請求しているが、肝予備細胞の同定に、確立されたマーカーを使用しておらず、また予備細胞のクローン増殖の方法も、生存能力のある肝予備細胞の単離に用いたマーカーも提供されていない。少なくとも1つの特異的マーカーの発現および肝実質細胞または胆管細胞のいずれかに分化する能力を含め、肝前駆細胞に必須の多くの特徴を持つ細胞の単離および培

10

20

30

40

50

養法を開示している方法には、未充足の需要がある。肝前駆細胞のクローン増殖の方法にも未充足の需要がある。クローン増殖は、多能性肝前駆細胞の明確で厳密な区別および同定方法として必須である。

【0009】

ポンティング (Ponting) の米国特許第 5, 405, 772 号は、細胞増殖のための培地を特許請求している。米国特許第 5, 405, 772 号では、 $3 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ コレステロール、 $5 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヌクレオシド、および $2 \sim 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の I V 型コラーゲンまたは $0.5 \sim 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンのいずれかが必要とされる。これには肝前駆細胞の増殖に特異的で、かつ最適化された培地が必要である。

【0010】

クリ・ハーケチ (Kuri-Harcuch) らの米国特許第 4, 914, 032 号は、肝実質細胞を培養する過程を特許請求している。本発明とは反対に、米国特許第 4, 914, 032 号は肝前駆細胞の培養または肝細胞のクローン増殖の条件のいずれも開示していない。同様に、クリ・ハーケチらの米国特許第 5, 030, 105 号は、肝実質細胞培養を処理することによって薬剤を評価する方法を特許請求している。規定された細胞群を試験に使用するためのクローン増殖条件、および肝前駆細胞の培養のための方法には、未充足の需要がある。

10

【0011】

ノートンらの米国特許第 5, 858, 721 号は、間質細胞のトランスフェクションを特許請求している。しかし米国特許第 5, 858, 721 号は、生体適合性の生きていない材料のフレームワークを必要とする点で限定されている。これとは対照に、本発明では合成のメッシュワークを必要としない増殖条件といった未充足の需要がある。

20

【0012】

本発明者らは、はるかに有用な肝前駆細胞からではなく、肝実質細胞のような成熟した肝細胞を培養するのは不相当であると認識した。発明者らは肝前駆細胞の単離パラメーターおよびクローン増殖の要件を注意深く決定した。前駆細胞ならびに前駆細胞の選択および培養方法には、肝不全の患者の治療薬、および毒性物質の評価、および薬剤の評価を含め、多くの利用方法がある。

【0013】

リード (Reid) らの米国特許第 5, 576, 207 号および 5, 789, 246 号は、フィーダーおよびホルモン添加合成培地の必要性を開示している。これらの先行研究は、胚の肝臓の間質細胞と、規定された細胞外マトリックス基底、および無血清のホルモン添加培地を組み合わせ用いて、肝前駆細胞の増殖条件としている。しかし、使用された合成培地は本発明で使用されたものよりも、複雑であり；細胞は精製されたマトリックス基底 (I V 型コラーゲンおよびラミニン) 上に接種されたが、本明細書ではフィーダー (マトリックスを供給する) の上に直接まかれており；また、胚間質細胞は、胚肝臓からの初代培養として調製され、細胞株として確立されなかった。胚間質細胞株を使用することにより、フィーダー細胞は、はるかに簡単で、実際的で、再現性のある細胞支持手段となる。さらに、S T O フィーダーは肝前駆細胞に限定して支持するのではなく、複数の種類の組織から得た前駆細胞にも使用できると考えるのは、合理的である。先行特許では、肝前駆細胞培養液は、高い細胞密度で接種され、その増殖はコロニー形成として観察されたが、これは細胞のクローンではなく、塊の増殖が誘導されたことを意味する。

30

40

【0014】

3. 発明の概要

本発明は、前駆細胞、その子孫、またはその混合物を増殖させる方法に関する。特に、本発明は内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を増殖させる方法に関する。細胞は内胚葉組織から得られる。その後、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物は、培地中で、フィーダー細胞を含む層の上で培養される。前駆細胞、その子孫、またはその混合物は、脊椎動物細胞であり得る。前駆細胞、その子孫、またはその混合物は、I C A M または I C A M - 1 陽性、および古典的 M H C クラス I 抗原陰性の表現型を

50

発現する。古典的MHCクラスI抗原は、MHCクラスIa抗原とも呼ばれる。

【0015】

本発明は無血清の、ホルモン添加合成培地、およびフィーダー細胞を用いた肝幹細胞および他の前駆細胞の培養方法にも関する。また、本発明は前駆細胞の子孫、または前駆細胞および前駆細胞の子孫の組み合わせを培養する方法にも関する。好ましくは、前駆細胞は肝前駆細胞である。同様に、本発明は特定の培養条件を用いて肝臓の多能性前駆細胞をクローニングする方法にも関する。好ましくは、本発明は肝臓の多能性前駆細胞をクローニングする方法に関する。肝臓の多能性前駆細胞は、任意の無脊椎動物または脊椎動物種、より好ましくは哺乳類に由来できる。より好ましくは、肝臓の多能性前駆細胞は、ヒト、霊長類、ブタ、イヌ、ラット、ウサギ、またはマウスに由来する。最も好ましくは、多能性前駆細胞はヒトに由来する。本発明は肝前駆細胞およびその子孫のエクスピボの増殖に必要な特定の培養条件を開示する。本発明は肝前駆細胞のフィーダー細胞として、STOマウス胚細胞のような胚のフィーダー細胞の使用も開示する。フィーダー細胞は、本発明で開示される新規で無血清のホルモン添加合成培地(HDM)と組み合わせて使用される。この組み合わせによって、細胞が悪性形質転換せずに、E15ラット肝から種々のラット胎児肝細胞株を確立することができた。

10

【0016】

さらに、本発明は肝前駆細胞およびその子孫の増殖を支持する能力のあるフィーダー細胞のクローニング方法に関する。

【0017】

本発明はフィーダーとして使用されると肝前駆細胞の増殖を支持する、特定の細胞株にも関する。

20

【0018】

また、本発明は肝前駆細胞のクローニング方法にも関する。本発明は、新しく単離された肝前駆細胞のクローン増殖能力を決定するためのインビトロコロニー形成アッセイ(CFA)法の開発のための、幹細胞株およびHDM-STO共培養系の使用を開示する。CFAを、特異的な抗原プロファイルによって精製された細胞と組み合わせると、両能性肝前駆細胞が明らかになる。例えば、マウスのE11.5に対応するE13ラット肝から得た増殖能力の高い前駆細胞は、古典的MHCクラスI(RT1A¹)⁻、OX18(汎MHCクラスI)^{d u 1 1}、および細胞内接着分子1(ICAM-1)⁺という同じ表現型を持つ。

30

【0019】

また本発明はクローン肝細胞増殖を支持できる培地にも関する。培地は、いくつかの特定のホルモンおよび栄養を特徴とし、血清を含まない。

【0020】

さらに、本発明はフィーダー細胞の生合成産物を含む培地における肝前駆細胞の培養に関する。

【0021】

さらに本発明は肝実質細胞および胆管細胞の表現型を含む、肝細胞の分化の誘導方法に関する。本発明では、上皮成長因子(EGF)が、前駆細胞コロニーの増殖と、肝実質細胞または胆管上皮細胞としてのいずれかの運命の両方に影響を与えることが開示される。

40

【0022】

5. 好ましい態様の詳細な説明

本発明は幹細胞の増殖および利用の過程である。外胚葉、中胚葉、および内胚葉起源の組織を含め、種々の組織が、前駆細胞の適当な供給源である。外胚葉組織には、皮膚組織、脳組織、および他の神経組織が含まれる。中胚葉組織には、筋肉、血液、および造血系が含まれる。内胚葉組織には、消化管、胃、膵臓、甲状腺、および消化器系に伴う腺が含まれる。特に、本発明は肝幹細胞および他の肝前駆細胞の増殖の過程である。本過程には、単離した肝幹細胞および/または肝前駆細胞および/またはその子孫の細胞群を、クローン増殖すなわち非常に低い細胞密度での増殖を支持する能力のある増殖条件に暴露するこ

50

とを含む。好ましい態様では、この過程には、フィーダー細胞層上での肝前駆細胞の増殖を支持するため、無血清の、ホルモン添加合成培地の使用が含まれる。フィーダー細胞の機能は複数あり、栄養の供給、接着表面の提供、および肝前駆細胞の生存、増殖および/または分化に必要な特定の増殖因子および細胞外マトリックスを培地中に分泌することが含まれる。別の好ましい態様では、この過程には肝幹細胞および肝前駆細胞の増殖を支持する能力のある細胞の選択が含まれる。フィーダー細胞は、爬虫類、鳥類、甲殻類、魚類、環形動物、軟体類、線虫類、昆虫類、または哺乳類、好ましくはヒト由来でよい。好ましくは、フィーダー細胞は胚組織に由来する。また好ましくは、フィーダー細胞は胚組織に由来する。また好ましくは、フィーダー細胞は胚の肝組織に由来する。また、フィーダー細胞は遺伝子組換えされていても良い。さらに好ましい態様では、この過程には幹細胞を最適に支持するフィーダー細胞のクローニングが含まれる。

10

【0023】

親和性に基づく相互作用、例えば、アフィニティパニング、補体と組み合わせたイムノサージャー、フローサイトメトリー、遠心水簸、分画遠心等、肝幹細胞および肝前駆細胞を単離する任意の方法が使用できる。単離された肝幹細胞および前駆細胞は、一部または全ての表現型マーカー（古典的MHCクラスI⁻、ICAM-1⁺、OX18^{d u l l}、フェトプロテイン⁺、またはアルブミン⁺）を発現する能力を持つ。本発明の別の態様では、肝前駆細胞は、塊、コロニーまたはクラスターとして積み重なった細胞の形成で特徴付けられる増殖パターンを発現する。

【0024】

本発明の好ましい態様では、幹細胞は無血清のホルモン添加合成培地（HDM）で選択的に増殖する。

20

【0025】

HDMの組成には、約40 ng/mlまでのEGF、約5~10 µg/mlまでのインスリン、約10⁻⁶ Mまでのデキサメタゾンまたは他のグルココルチコイドホルモン、約10 µg/mlまでの鉄飽和トランスフェリン、約5 × 10⁻² Mまでのニコチンアミド、約2%までのウシ血清アルブミン、約5 × 10⁻⁴ Mまでの2-メルカプトエタノールまたは同等の還元剤、約8 µeq/lまでの遊離脂肪酸、約2 × 10⁻² Mまでのグルタミン、約1 × 10⁻⁶ MまでのCuSO₄、約3 × 10⁻⁸ MまでのH₂SeO₃、および選択的に抗生物質を添加した、ダルベッコ変法イーグル培地およびハムF12の混合物を含むがこれに限定されることのない、栄養培地が含まれる。抗生物質には、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、および他の当技術分野で一般的な抗生物質、およびその組み合わせが含まれる。当業者には、DMEM/F12の代わりに、最小限の試験後に、他の栄養培地、例えば、ハムF-10、Medium 199、またはMCDB 151およびMCDB 302を含むMCDBシリーズも使用できることが理解されると思われる。細胞培養の最も最低の条件は、ホルモンなしでフィーダーを使用することであり；上述のホルモン要件の中で最も重要なのはグルココルチコイド、インスリン、トランスフェリン、およびEGFで、これは前駆細胞の増殖のためのホルモン性分裂促進剤を構成している。他のホルモン因子も添加でき、2次的な増殖効果があるかも知れないが、上述の重要な要件を置き換えるものではない。同様に、当業者が行なえるようなホルモン組成の変更は、本発明の範囲内である。

30

40

【0026】

好ましい範囲には、10~50 ng/ml EGF、2~10 µg/mlインスリン、5 × 10⁻⁷ M~5 × 10⁻⁶ Mデキサメタゾン（9a-フルオロ-16a-メチル-プレドニゾロン）、5~20 µg/ml鉄飽和トランスフェリン、2~8 × 10⁻³ Mニコチンアミド、0.05~0.5%血清アルブミン、2~8 × 10⁻⁵ M 2-メルカプトエタノール、5~10 µeq遊離脂肪酸混合物、1~3 × 10⁻³ Mグルタミン、0.5~2 × 10⁻⁶ M CuSO₄、1~5 × 10⁻⁸ M H₂SeO₃、1~5 µMパルミチン酸、0.1~0.4 µMパルミトレイン酸、0.5~1.2 µMステアリン酸、0.5~2 µMオレイン酸、1~5 µMリノール酸、および0.2~0.

50

8 μ M リノレン酸が含まれる。

【0027】

本発明の無血清のホルモン添加合成培地は、肝細胞のクローン増殖に適している。このHDMには、ダルベッコ変法イーグル培地(DME)、ハムF12、RPMI 1640、ウィリアムズE培地等のようにいくつかのオプションのうちの任意の基礎培地を含み得る。好ましい態様は、ダルベッコ変法イーグル培地とハムF12の1:1の混合物(DMEM/F12、例えばGIBCO/BRL、Grand Island, NY)である。基礎培地には、好ましい濃度10 ng/mlの上皮成長因子EGF(例えば、Collaborative Biomedical Productsより)、好ましい濃度5 μ g/mlのインスリン(例えばSigma)、 10^{-6} Mデキサメタゾン(例えばSigma) 10、 10μ g/ml鉄飽和トランスフェリン(Sigma)、 4.4×10^{-3} Mニコチンアミド(例えばSigma)、0.2%ウシ血清アルブミン(例えばSigma)、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール(例えばSigma)、7.6 μ eq/l遊離脂肪酸混合物(2.4 μ Mパルミチン酸、0.21 μ Mパルミトレイン酸、0.88 μ Mステアリン酸、1 μ Mオレイン酸、2.7 μ Mリノール酸、および0.43 μ Mリノレン酸)、 2×10^{-3} Mグルタミン(例えばGIBCO/BRL)、 1×10^{-6} M CuSO_4 、 3×10^{-8} M H_2SeO_3 および抗生物質を添加する。インスリン様成長因子(IGF)、インターロイキン(IL)-6ファミリー、肝細胞増殖因子(HGF)、および線維芽細胞成長因子(FGF)を含むがこれらに限定されないフィーダー細胞から分泌される増殖因子は、フィーダーの効果を増強するために培地に添加でき、 20
単独または種々の組み合わせで添加してもフィーダーの効果を置き換えるものではない。これは、フィーダー細胞は、単独またはこれらの増殖因子との組み合わせで必要とされる他のシグナルも生産していることを意味する。

【0028】

本発明の別の態様では、肝前駆細胞は単一の前駆細胞から増殖する、すなわち、細胞がクローニングされる。コロニーで細胞を増殖させることは、単一の細胞に由来する細胞の増殖と黙示的および明示的に定義されるクローン増殖とは必ずしも同じではない。限界希釈法と呼ばれる、前駆細胞を培養プレートのウェル1つあたり1細胞またはそれ未満に希釈する方法を含め、当技術分野で周知のいくつかのクローニング方法の任意のものが適当である。同様に前駆細胞は、クローニングリング、選択的剥離、微粒子上の希釈培養、フローサイトメトリーを用いた単細胞ソート、マイクロピペットまたは光学ピンセットを用いた個々の細胞の選択、および寒天を用いてもクローニングできる。 30

【0029】

本発明の別の態様では、クローニングされた前駆細胞の多くが有糸分裂できる。前駆細胞は少なくとも1回の有糸分裂ができることが好ましく、少なくとも10回の分裂ができることがさらに好ましい。

【0030】

本発明のさらに別の態様では、肝前駆細胞およびその子孫は、フィーダー細胞の代謝および生合成産物を添加した培地で増殖する。添加物は、調整培地、すなわち生きたフィーダー細胞が以前にインキュベートされた培地の形でよい。好ましくは、添加は、フィーダー細胞の調整培地から、肝前駆細胞およびその子孫の増殖を維持し増加するタンパク質、ペプチド、脂質、炭化水素、および代謝調節因子を含む因子を単離する形で良い。タンパク質は、細胞外マトリックスの可溶性および不溶性成分、および上皮成長因子およびインスリン様成長因子を含む増殖因子を含み得る。 40

【0031】

さらに好ましくは、胚または成体細胞または他の適当な細胞であるフィーダー細胞の層を用いて、肝細胞は培養で選択的に増殖する。1つの態様では、フィーダー細胞は間質細胞または線維芽細胞である。線維芽細胞または他の適当な細胞は、例えばトランスフェクションにより、遺伝子組換えされていてよい。好ましくは、線維芽細胞または他の適当な細胞はヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、またはマウスの中胚葉細胞で 50

あるが、また他の哺乳類および鳥類の中胚葉細胞も適している。さらに、線維芽細胞は、クローニングされ肝前駆細胞を支持する能力について選択され得る。

【0032】

本発明の好ましい態様では、単離された肝前駆細胞は、上皮成長因子(EGF)または他の分化シグナルの選択的使用またはその欠如により、肝実質細胞または胆管細胞系に運命づけられている。

【0033】

本発明のさらに好ましい態様では、単離された幹細胞および他の肝前駆細胞は、体外肝補助装置として使用され得る人工肝臓の成分として使用できる。本発明のさらに好ましい態様では、単離された肝前駆細胞およびその子孫を含む人工肝臓は、肝の機能不全または不全を患う患者の生命を維持するために使用される。

10

【0034】

6. 実施例

以下の実施例は、本発明を例示するものであるが、本発明はこれらの具体的な実施例に限定されない。当業者はこれらの実施例から本発明を実行する手段を得るものと思われる。当業者は本発明の範囲に含まれる多くの別の態様を認識すると思われる。

【0035】

6.1 肝幹細胞および肝前駆細胞の調製および分析

ラット

チャールズ・リバー・ブリーディングラボラトリー(Charles River Breeding Laboratory)(Wilmington, MA)から、妊娠したフィッシャー334ラットを入手する。時刻を設定した妊娠には、午後に動物を一緒にして、プラグが観察された朝を0日とする。成体の肝細胞には、オスのフィッシャー334ラット(200~250g)が使用される。

20

【0036】

幹細胞株の確立

胎齢15日の胎児肝が調製される。単細胞懸濁液は、0.05%トリプシンおよび0.5 mM EDTAまたは10ユニット/mlサーモリシン(Sigma, St. Louis, MO)および100ユニット/mlデオキシリボヌクレアーゼI(Sigma)で肝臓を37°Cでインキュベートして得られる。細胞は、フィコール-パーク(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)に重ね、450gで15分間密度勾配遠心を行なう。th1120-3およびrter6またはrhel4321について、底部の画分の細胞を、それぞれ17 mg/ml IV型コラーゲン(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)または12 µg/mlラミニン(Collaborative Biomedical Products)でコートした組織培養ディッシュに接種する。無血清のホルモン添加培地HDMは、ダルベッコ変法イーグル培地および八ムF12の1:1の混合物(DMEM/F12、GIBCO/BRL、Grand Island, NY)に、20 ng/ml EGF(Collaborative Biomedical Products)、5 µg/mlインスリン(Sigma)、 10^{-7} Mデキサメタゾン(Sigma)、10 µg/ml鉄飽和トランスフェリン(Sigma)、 4.4×10^{-3} Mニコチンアミド(Sigma)、0.2%ウシ血清アルブミン(Sigma)、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール(Sigma)、7.6 µeq/l遊離脂肪酸、 2×10^{-3} Mグルタミン(GIBCO/BRL)、 1×10^{-6} M CuSO₄、 3×10^{-8} M H₂SeO₃ および抗生物質を添加したものである。記載の各濃度は、培地中の最終濃度である。4週間の培養後、トリプシン処理した細胞をマイトマイシンCで処理したSTOマウス胚線維芽細胞株(American Type Culture Collection, Rockville MD)のフィーダー層上で培養する。Th1120-3、rter6およびrhel4321は、胎児肝細胞の3つの独立した調製物からクローニングし、HDMを用いてSTOフィーダー細胞上で維持する。細胞株の確立後、全

30

40

50

での培養に関してEGFの濃度は10 ng/mlに低下させる。

【0037】

細胞接着アッセイ法

フィブロネクチン(Collaborative Biomedical Products)、ラミニン、およびIV型コラーゲンに対する細胞の接着は、これらのタンパク質を0.3~10 µg/mlでコートした96穴マイクロタイタープレート(Corning, Cambridge, MA)を用いて評価する。200gで15分間のパーコール(Pharmacia Biotech)密度勾配遠心によりSTO細胞を除去した後、各ウェル中で 3×10^4 細胞の肝細胞株th1120-3、rter6、およびrhe14321をHDMを用いて10時間培養する。浮遊細胞を除去するために2回すすいだ後、テトラゾリウム塩WST-1を含む新しい培地(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を添加して、生存可能な接着細胞の数を測定する。4時間後に、製造元のプロトコールにしたがって、吸光度を決定する。

10

【0038】

STO亜系統

ATCCから得た100個の親STO細胞は、10%の熱で不活化した胎児ウシ血清、 2×10^{-3} Mグルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、および抗生物質を添加したDMEM/F12中で、100mm培養ディッシュで7日間培養する。細胞の形態および増殖速度によって、さらに解析するために4つのサブクローンが選択される。rter6のCFAは4つのサブクローンで行われるが、その1つであるSTO6はマイトマイシンC処理後に培養プレートに接着しなくなる。1つのサブクローンSTO5はアダムス博士(Dr. J. M. Adams, The Walter and Elizabeth Hall Institute of Medical Research)から提供を受けたpEF-Hlx-MC1neoまたはpEF-MC1neoによってトランスフェクトする。Nde I部位で線状にしたプラスミドを、DOSPERリポソームトランスフェクション試薬(Boehringer Mannheim)によって細胞中に導入する。G418選択後、6つのクローンが単離される。各々3つのクローンがCFAで分析される。

20

【0039】

コロニーの免疫組織化学染色

培養プレートはメタノール-アセトン(1:1)で室温で2分間固定し、すすぎ、20%のヤギ血清(GIBCO/BRL)を含むハックス液(Hanks Balanced Salt Solution (HBSS))により、4でブロックする。フェトプロテインとアルブミンの二重免疫組織化学のためには、プレートは抗ラットアルブミン抗体(ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA)処理後にテキサスレッド結合抗ウサギIgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)、およびFITC結合抗ラットフェトプロテインポリクローナル抗体(Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands)とインキュベートする。アルブミンとCK19の二重標識には、抗フェトプロテイン抗体の代わりに、抗CK19モノクローナル抗体(Amersham, Buckinghamshire, England)およびFITC結合抗マウスIgG(Caltag, Burlingame, CA)が使用される。

30

40

【0040】

E13の胎児肝の解離

胎児肝は10 mM HEPES, 0.8 mM MgSO₄ および1 mM EGTA (pH 7.4)を添加した、Ca⁺⁺フリーの氷冷HBSS中に切開して入れる。肝臓は10 mM HEPES、0.8 mM MgSO₄、および1 mM CaCl₂で調製されたHBSS中の0.2% IV型コラーゲナーゼ(Sigma)および16.5ユニット/mlサーモリシン(Sigma)を用いて、粉碎する。37で10分間インキュベーションした後、細胞懸濁液を0.025%トリプシンおよび2.5 mM EDTA (Sig

50

ma) で10分間消化する。その後、1 mg/mlのトリプシン阻害剤 (Sigma) を添加してトリプシンを抑制する。最後に、細胞を200ユニット/mlデオキシリボヌクレアーゼI (Sigma) で処理する。全ての実験において、肝臓1つあたり3~5 x 10⁵ 細胞が得られる。

【0041】

成体肝細胞の単離

肝細胞を単離するために、2段階の肝臓灌流法が用いられる。灌流後、細胞を50gで1分間、2回遠心し、大きな実質細胞を濃縮する。生存度はトリパンプルー排除による測定によると>90%である。

【0042】

フローサイトメリー分析

細胞はFACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) で分析し、Moflow Flow Cytometer (Cytomation, Fort Collins, CO) を用いてソートする。E13胎児肝から得た細胞懸濁液は、非特異的抗体結合を予防するために、氷上で20%ヤギ血清 (GIBCO/BRL) および1%硬骨類のゼラチン (Sigma) を含むHBSSとインキュベートする。すすいだ後、細胞はFITC結合抗ラットRT1A^{a, b, 1}抗体B5 (Pharmingen, San Diego, CA) およびPE結合抗ラットICAM-1抗体1A29 (Pharmingen) と懸濁する。一部の实验では、3色染色のため、細胞はビオチン化抗ラット単形性MHCクラスI抗体OX18 (Pharmingen) で染色した後、ストレプトアビジン-レッド670 (GIBCO/BRL) による第2の染色を行なう。全ての染色は、10 mM HEPES, 0.8 mM MgSO₄, 0.2 mM EGTA、および0.2% BSA (pH 7.4) を含み、Ca⁺⁺フリーの氷冷HBSSを用いて行なう。確立された3つの細胞株は、トリプシン処理をして、パーコール密度勾配遠心によってフィーダー細胞を除去する。ラットヘパトーマ細胞株FTO-2Bおよびラット肝上皮細胞株WB-F344ならびに成体肝細胞は、胎児肝細胞株と比較するために染色する。細胞株は、それぞれフォアニエー博士 (Dr. R. E. K. Fournier, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)、およびソウ博士 (Dr. M. - S. Tsao, University of North Carolina, Chapel Hill, NC) から贈与された。細胞はブロックして、FITC結合B5, OX18, PE結合1A29、または抗FITC結合ラットインテグリン 1抗体Ha2/5 (Pharmingen) により染色する。OX18にはFITC結合抗マウスIgGが使用される。マウス細胞群を排除するために、3つの胎児肝細胞株の細胞懸濁液は、ビオチン化抗マウスCD98で染色後、ストレプトアビジン-レッド670および抗ラットモノクローナル抗体による第2の染色を行なう。

【0043】

細胞ごとに、異なる相対数で様々な抗原が発現される。現実的な使用法では、特定の抗原の発現レベルは、発現なし、低レベルの発現、多くの抗原にとって通常の発現レベル、および高レベルの発現であり得る。この使用法では、「低い (low)」という用語は弱い (weakまたはdull) と互換的に使用される。発現レベルのより詳しい記述を行なうこともできるが、多くの目的にはこれらの4つのレベルで充分である。例えばフローサイトメリーによる抗原発現の測定は、抗原発現について連続的な範囲を提供することは明らかである。

【0044】

肝細胞株、ソートした細胞、および成体肝細胞のCFA

肝細胞株は細胞株の維持に使用されたのと同じのHDMを用いて、マイトマイシンC処理STOフィーダー層上に、9.6 cm²あたり500細胞で、3連で播く。播く前に、細胞はトリプシン処理をして、パーコール密度勾配遠心によってフィーダー細胞を除去する。培養液は2日ごとに培地を取り換えながら10~14日インキュベートする。その後

10

20

30

40

50

、フェトプロテインおよびアルブミンの二重免疫蛍光染色が行われる。各ウェル100コロニーを、コロニーの形態、PまたはF型、およびフェトプロテインおよびアルブミンの発現について分析する。コロニーはDiff-Quick (Baxter, McGaw Park, IL)を用いて染色し、各ウェルのコロニー数を数える。初代のソートした細胞および成体肝細胞のCFAでは、記述のように播く細胞数を変更する。別のわずかな変更として、培養期間を14および17日の間に延長し、デキサメタゾンの濃度を 10^{-6} Mに上昇させる。他の手順は上述のように実行される。成体肝細胞のCFAでは、調製後、細胞懸濁液から、少数の肝細胞クランプが除去されない。したがって、クランプから不確定数のコロニーが作られる可能性がある。ソートした細胞上の胆管分化のCFAでは、コロニーのアルブミンおよびCK19の二重免疫蛍光染色がEGFの存在下または非存在下で、培養5日目に行われる。培養5日目に、CK19+細胞を1個を超えて持つコロニーは、CK19+コロニーとして数える。10日および15日目には、2個のCK19+細胞のクラスターを複数含むコロニー、または3個を超えるCK19+細胞のクラスターを1つ含むコロニーは、CK19+コロニーとして数える。各ウェルで約100のコロニーが数えられる。各点は3連の染色した培養物の平均 \pm SDを表す。

10

【0045】

6.2. ホルモン添加合成培地を用いた、マウス胚細胞のフィーダーを用いた胎児ラット肝細胞株の作製および解析

どれだけの期間、胎児肝細胞が維持され、エクスピボで増殖し、子孫を産生できるかを知るために、ラットE15肝細胞の単純な長期培養を試みる。造血単核細胞を除去するために密度勾配遠心を行なった後、胎児肝細胞をIV型コラーゲンまたはラミニンでコートした培養ディッシュおよびHDM (実施例6.1参照)を用いて培養する。細胞は4週間以上、生存する。しかし、新しくIV型コラーゲンまたはラミニンでコートしたディッシュ上の2次培養では、さらには増殖しない。マイトマイシンC処理のSTO胚マウス線維芽細胞株を2次培養のフィーダー層として使用すると、細胞の多くの塊が増殖する。最終的に、4つの独立した実験から、いくつかの安定した肝細胞株が確立される。

20

【0046】

フェトプロテインおよびアルブミンの免疫組織分析は、細胞株のクローニングの前に、連続的に増殖する細胞群で行われる。フェトプロテインおよびアルブミンの両方のタンパク質は、細胞群が肝細胞系起源であることを確認するマーカーとして使用される。Pコロニーと呼ばれる、細胞の積み重なりを形成する傾向のある細胞群では、フェトプロテインおよびアルブミンを強く発現したが、Fコロニーと呼ばれる平坦な単層では、フェトプロテインの発現が低下し、アルブミンは発現しなかった。胚マウス線維芽細胞STOは、いずれの抗体にも反応性を示さない。さらに解析するために、P型またはF型のコロニーという形態的な基準により、独立した実験で、3つのクローニングされた肝細胞株が選択される。Rhe14321 (図1A)は、主に小さな細胞の詰まったP型コロニーからなり、th1120-3 (図1C)は、F型コロニーの平らな単層のみを形成する。Rter6 (図1B)はこの2つの表現型の間である。興味深いことに、rter6の不均一性は、平らなコロニーを連続3回クローニングした後でも観察される。rhe14321およびrter6の単一細胞に由来するコロニーの不均一性を見るために、 9.6 cm^2 (6穴プレートの1つのウェル)あたり500細胞の密度で播種し、細胞をSTO線維芽細胞上で10~14日培養した。その後、コロニーの形態およびフェトプロテインおよびアルブミンの発現の解析をした。図2A、2B、2C、2D、2E、および2Fはその結果を表す。rhe14321 (図2B)およびrter6 (図2C)の細胞株、ならびにクローニング前の元の細胞群 (図2A)は、ほぼ全てのP型コロニーで強くフェトプロテインを発現するのに対して、F型コロニーでは発現しない。さらに、フェトプロテインとアルブミンの両方の強い発現は、P型コロニーのみに観察される。クローニングされた肝細胞株の形態的違いは、P型コロニーの割合と相関している (図2Bおよび2C)。rter6およびrhe14321のCFAのP型コロニーの割合は、それぞれ33.3% ($\pm 8.6\%$ SD)および65.7% ($\pm 4.0\%$ SD)である。1ウェル

30

40

50

あたりの総コロニー数を数えて、クローン増殖効率(コロニー効率)を計算する。r t e r 6 および r h e l 4 3 2 1 の効率は、それぞれ 45.7% (±1.3% S D) および 36.4% (±1.1% S D) である。t h 1 1 2 0 - 3 細胞は、側面の境界にそって互いに強く接着しあっており、単細胞懸濁液の調製が、非常に困難である。しかし、t h 1 1 2 0 - 3 細胞は、重なり合ったクラスターを形成しない。

【0047】

マウス肝細胞のラミニン、I V 型コラーゲン、およびフィブロネクチンのような細胞外マトリックス(E C M)タンパク質に対する接着は発生段階によって異なるため、各細胞株が特定の E C M 成分に接着するときの選好性を次に調べる。成体肝細胞での所見と同様に、I V 型コラーゲンは t h 1 1 2 0 - 3 の接着に最も効果的であるが(図 1 C)、r t e r 6 (図 1 B) および r h e l 4 3 2 1 (図 1 A) ではそれほどでもない。ラミニンは r h e l 4 3 2 1 の接着に最も有効な基質である(図 1 A)。この選好性は、マウス胎児肝細胞の初代培養と同様である。要約すると、P 型コロニーにおける フェトプロテインおよびアルブミンの保存された発現、ならびに r h e l 4 3 2 1 によるラミニンへの優先した接着は、P 型コロニーを産生している細胞群がより厳密に肝前駆細胞と関連していることを示唆する。

【0048】

6.3 コロニー形成のための S T O サブクロンの単離; 肝前駆細胞のアッセイ法
増殖能力の高い、両能性肝前駆細胞を同定するための C F A システムを開発するために、培養系は、クローン播種密度で細胞の増殖を支持し、重要な元の肝機能を保存するものでなくてはならない。初期の肝臓発生に最も重要なマーカーのうちの 2 つがアルブミンおよび フェトプロテインである。F 型ではなく P 型のコロニーがクローン増殖中に フェトプロテインおよびアルブミンの発現を維持するので、P 型コロニーを最適化する培養条件が最良である。したがって、r t e r 6 の P 型コロニーを支持する S T O サブクロンの能力が比較される。1 つのクローン S T O 5 は、他の全ての亜系統および親株以上に P 型コロニー形成を支持する(図 2 D)。r h e l 4 3 2 1 の C F A も、S T O 5 が親 S T O よりも有効なフィーダーであることを確認する(図 2 E)。E 1 0 . 5 の消化管の内側を覆っている間充織細胞で発現するマウス H 1 x 遺伝子産物は、胎児肝細胞の増殖に必須である。H 1 x 遺伝子の m R N A 発現が S T O サブクロンで分析されても、サブクロン間での発現の有意な差はない(データは示さず)。さらに、マウス H 1 x の S T O 5 中の安定なトランスフェクタントは、コロニー形成アッセイ法を改善しない(図 2 F)。しかし、トランスフェクタントの 1 つのクローンは、比較的高密度の継代で、S T O 5 の元の形態をより安定的に持続させるので、このクローンはさらなる実験に使用される。

【0049】

6.4 表面抗原マーカーおよびコロニー形成アッセイ法を用いた、E 1 3 胎児肝からの肝前駆細胞の同定

肝形成と大量の造血とが、胎児肝の中に共存する。これまで、造血前駆細胞の抗原性プロファイルは広く分析されてきたが、初期の肝前駆細胞の研究はまだ初期段階である。本研究で確立された 3 つの肝細胞株、成体肝癌細胞株(F T O - 2 B)、成体ラット肝由来の上皮細胞株(W B - F 3 4 4)、および新しく単離された成体肝細胞を用いて、肝細胞の抗原性プロファイルが分析される。F T O - 2 B、W B - F 3 4 4、および成体肝細胞と比較して、最も未熟な胎児肝細胞株 r h e l 4 3 2 1 は、古典的 M H C クラス I (R T 1 A¹) の発現がないという点で、非常に独特である(図 3 A ~ 3 X)。細胞株 t h 1 1 2 0 - 3 (図 3 I ~ 3 L) は、R T 1 A¹、O X 1 8 (汎 M H C クラス I)、および I C A M - 1 のパターンが r h e l 4 3 2 1 と類似しているが(図 3 A ~ 3 D)、r t e r 6 (図 3 E ~ 3 H) は R T 1 A¹ および O X 1 8 の発現が比較的高い(図 3)。さらに、異なる実験で得られた別の細胞株は、r h e l 4 3 2 1 と同一の形態を持つが、やはり R T 1 A¹、O X 1 8^{d u 1 1}、および I C A M - 1⁺ である。インテグリン b 1 の発現は、全ての細胞株で類似しているが、R T 1 A^{a, b, 1} および I C A M - 1 のパターンは細胞において独特である。成体肝細胞の抗原性プロファイルは R T 1 A¹⁺、O X 1 8⁺

10

20

30

40

50

、および ICAM-1⁺ である。成体ラット中では、赤血球を除く全ての骨髄細胞が MHC クラス I 分子を強く発現するので、胎児肝細胞群は、MHC クラス I 発現によって造血細胞群から分離できる。ラット E13 肝臓から得られた細胞懸濁液を抗 RT1A¹ および ICAM-1 抗体で染色する。図 4A は、RT1A¹ および ICAM-1 の 2 色染色パターンを示す。どの画分に肝細胞群が含まれているかを決定するために、蛍光活性化セルソートによって 5 つの画分を単離し、クローン増殖能力を CFA によってスクリーニングする。図 4B は、ソート後の、5 つの画分の再ソート結果を表す。アルブミンおよびフェトプロテインの発現で定義される肝細胞コロニーは、形態的にも区別可能なので、各ウェルの肝コロニーの数を数えることが可能である。肝コロニーの大部分は、RT1A¹ d^u l^l および ICAM-1⁺ のゲートで検出され (表 1、図 4B、ゲート 2)、P 型コロニーの頻度は 75.6% (± 4.9% SD) である。ゲート 1 は、はるかに少ないコロニー数を示し、他の画分のコロニー形成能力を持つ細胞の数はごくわずかだった。ゲート 1 および 2 では、全ての肝コロニーにおいて、フェトプロテインおよびアルブミンの両方の発現が確認される。ゲート 2 の細胞に由来する一部のコロニーは、他よりも大きい。肝細胞上の MHC クラス I 発現を詳細に調べるために、細胞分画のために、RT1A¹、ICAM-1、および OX18 の 3 色の染色、ならびにもう 1 つのパラメーターとして側方散乱光 (SSC) が使用される。胎児肝細胞は E11 という早期の胎齢でも脂肪滴を含むので (Luzzatto, 1981)、細胞の粒状度を反映する側方散乱光 (SSC) は、造血細胞から肝細胞を分離するために有用なパラメーターである。図 4C は、ゲート 2 に最も多数のコロニー形成細胞が含まれていることを示す。SSC に基づいて R2 でゲートをかけると、ゲート 2 に対応する細胞群は明らかに RT1A¹ および OX18^{d u l l} の表現型を示す (図 4C、4D)。CFA により、R4 にはゲート 2 よりも多くのコロニー形成細胞が含まれることが確認される (表 1)。これらの結果は、E13 ラット肝臓から得られた RT1A¹ および OX18^{d u l l}、および ICAM-1⁺ 細胞群の大部分が、フェトプロテイン⁺ およびアルブミン⁺ のコロニーを生成する肝細胞であることを示唆する。これは r h e l 4 3 2 1 細胞で見られるのと同じの抗原性プロファイルである (図 3)。

10

20

30

40

【0050】

【表 1】 RT1A および ICAM-1 の発現に基づいてソートした E13 胎児肝由来の肝コロニーの頻度

ゲート	接種した細胞 (ウェル当たり)	肝コロニー (ウェル当たり)	コロニー形成率 (%)
1	1000	8.7 ± 4.0	0.87
2	500	136.3 ± 4.6	27
3	5000	10.0 ± 7.9	0.13
4	5000	6.3 ± 0.6	0.13
5	5000	5.0 ± 1.0	0.10
R3	1000	7.0 ± 2.6	0.70
R4	500	269.3 ± 9.8	54

【0051】

STO5hlx 上でのコロニー形成培養は、E13 の胎児肝の各画分から得られる、示された数の細胞を含む。肝コロニーの数を、3 連の染色した培養物から確立した (平均 ± SD)。コロニー形成の効率は、培養液に接種した細胞のうち、16 日の培養後に分析したところ、コロニーを形成するようになった割合を示す。

【0052】

6.5. E13 肝細胞および成体肝細胞の異なる培養要件

E13 肝臓から得られたソートされた肝細胞の成長要件は、決められた STO5 フィーダ

50

—およびHDMを用いて調べられた。EGFは成体肝細胞の強力な増殖因子であることが以前から知られている。したがって、ソートした肝細胞のコロニー形成に対するEGFの効果調べる。RT1A¹⁻OX18^{du11}、ICAM-1⁺肝細胞のコロニーサイズはEGFがないと大きくなるが、成体肝細胞はEGFの存在下でのみ、コロニーを生成した(図6C)。さらに、成体肝細胞に由来するコロニーの形態は、通常F型であるが、RT1A¹⁻肝細胞はEGFなしでP型コロニーを形成する。しかし、コロニー効率はEGFがないとわずかに低下する(図6A)。興味深いことに、EGFのない培養条件は、2種類のPコロニー、P1およびP2を際立たせた。培養12日目にはコロニーの大部分はP2型であるが、図6Aのような典型的な形態を持たないコロニーもあるので、2つのタイプを完全に区別するのは困難である。これらの結果は、胎児肝細胞および成体肝細胞は、その増殖要件ならびにRT1A¹発現(図3および4)およびコロニーの形態において、本質的に異なることを示唆している。

10

【0053】

増殖が最大に到達したと思われる培養3週間後に、RT1A¹⁻、OX18、およびICAM-1の発現を評価する。図5B~5Dに示すように、RT1A¹の発現は誘導されず、OX18の発現は低下している。ICAM-1のレベルは変化しない。さらに、単一コロニーの平均細胞数を、回収した細胞数、ラット肝細胞の割合、およびコロニー効率から計算する。見積もられる細胞数は3~4 x 10³(表2)に達する。これは、コロニーを形成する単一細胞が、この培養条件では平均で約11~12回分裂したことを示す。

20

【0054】

【表2】単一肝コロニーにおける細胞数の計算

接種した細胞の数	播種密度(細胞/cm ²)	培養期間(日)	回収した細胞の数	ラット細胞の割合(%)	コロニー効率(%)	単一コロニーの平均細胞数
500	18	18	1.5 x 10 ⁶	58	41	4.2 x 10 ³
4000	51	21	6.0 x 10 ⁶	90	44	3.1 x 10 ³
4000	51	20	4.0 x 10 ⁶	69	21	3.3 x 10 ³

30

【0055】

図4CのR4からソートした細胞は、60mmまたは100mmのディッシュでSTO 5h1 x フィーダー細胞上で培養した。示された期間培養した後、全ての細胞を回収し、総細胞数を計算した。ラット細胞の割合は、ラットICAM-1およびマウスCD98の発現に基づく、フローサイトメトリー分析による。コロニー効率は、培養に接種された細胞のうち、コロニーを形成したものの割合を示す。3連の染色した培養(平均)からのデータは、平行して行なった実験から得られた。

40

【0056】

単一コロニー中の平均細胞数 = (回収した細胞の数 x ラット細胞のパーセンテージ / 100) / 接種した細胞の数 x コロニー効率 / 100)

【0057】

6.6 RT1A¹⁻肝前駆細胞が両能性である証拠

ラット胎齢E13において、肝細胞は成熟した肝実質細胞および胆管上皮細胞を生み出す両能性前駆細胞だと考えられる。しかし、本発明以前では、この2つの運命が単一の細胞から生ずるのかどうかを示す直接の証拠がなかった。RT1A¹⁻OX18^{du11}ICAM-1⁺の胎児肝細胞がこの培養系で胆管細胞系に分化できるかどうかを知るために、胆管上皮細胞に特異的なマーカーとして抗CK19でコロニーの染色を行なう。CK19は、胎児肝で15.5日以降に胆管上皮前駆細胞で発現され、この時点で細胞のアルブ

50

ミン発現が消失する。ソートされた R T 1 A¹⁻ I C A M - 1 + 細胞を E G F の存在下または非存在下で培養し、その運命は培養 5 日目に C K 1 9 およびアルブミンの発現によってモニターする。最初から 5 日後、E G F 処理した培養物では C K 1 9⁺ のコロニーがほとんどないが、E G F のない培養物では C K 1 9⁺ 細胞を含むコロニーがいくつか見られる。C K 1 9 の強度はかなり弱い、C K 1 9⁺ 細胞ではアルブミン発現が低下している。培養 10 日目には、C K 1 9 のみまたはアルブミンのみを発現するコロニーや、両方が陽性のコロニーが存在する。単一コロニーの中での C K 1 9⁺ およびアルブミン⁺ 細胞のパターンは相反している。両方陽性のコロニーおよび C K 1 9 のみ陽性のコロニーの数は、やはり E G F 非存在下のほうが高い (図 7 A)。E G F 存在下では、10 日目には多くのコロニーがアルブミン⁺ 細胞のみからなる (図 7 B)。最終的には、両方陽性のコロニーの数は、15 日目に E G F 非存在下では 100% 近くになる (図 7 A)。全体では、E G F は培養を通して C K 1 9⁺ のコロニーの出現を劇的に抑制する (図 7 B)。これらの結果は、E 1 3 胎児肝から得た R T 1 A¹⁻、O X 1 8^{d u l l}、および I C A M - 1⁺ 細胞が、胆管細胞系に分化でき、その運命はインビトロでは E G F に影響されることを示唆する (図 8)。

10

【0058】

6.7 肝幹細胞および肝前駆細胞のクローン増殖を支持する能力のあるフィーダー細胞の単離およびクローニングのためのプロトコール
ブタ、ビーグル、ウサギ、マウス、またはサルの新鮮な胚組織または凍結組織 (例えば、肝臓、肺、腎臓、筋肉、腸) を、カルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中で細かく切り刻む。P B S で 2 回すすいだ後、0.25% トリプシンと 37 で 10 分間、または室温で 60 分間電磁攪拌機を用いて攪拌しながら、細胞懸濁液をインキュベートする。残った細胞の塊は、懸濁液をメッシュで濾過して除去する。その後、細胞を血清 (例えば、10% 胎児ウシ血清) および任意の種々の増殖補給剤 (例えば、2 mM グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、および M E M 非必須アミノ酸) を添加した基礎培地 (例えば、イーグル M E M) を用いて組織培養ディッシュで培養する。プラスチックの基底および血清添加培地は、多くの場合中胚葉由来 (例えば、間質細胞) である支持細胞 (「フィーダー細胞」) の候補である細胞群の増殖を可能にし、かつ別の種類の細胞 (例えば、前駆細胞) の生存、増殖、および/または機能を支持する因子を提供する、一般的な条件である。フィーダー細胞は、コンフルエントまたはそれに近くなったら、0.05% トリプシンを用いて継代培養する。継代培養を数回行なったら、増殖した細胞を凍結ストックとして調製し、使用まで凍結保存する。フィーダー細胞の別の供給源は、市販の初代培養フィーダー細胞またはフィーダー細胞株である。いずれの場合も、適当なフィーダー細胞を同定するためには、以下の基準が必要である。

20

30

【0059】

フィーダー細胞は以下を支持する：

- 1) 古典的 M H C クラス I 抗原陰性、I C A M - 1 陽性、および/または非古典的 M H C クラス I 抗原弱陽性という表現型マーカーを持つ肝前駆細胞のクローン増殖；
- 2) 古典的 M H C クラス I 抗原陰性、I C A M - 1 陽性、非古典的 M H C クラス I 抗原弱陽性、フェトプロテイン陽性、アルブミン陽性、または C K 1 9 陽性という表現型マーカーを持つ子孫を持つ前駆細胞のクローン増殖；または
- 3) 両能性肝前駆細胞の定義に必要な、肝細胞系および胆管細胞系の両方への誘導可能な分化。

40

【0060】

当技術分野では、古典的 M H C クラス I 抗原は、M H C クラス I a 抗原としても知られる。非古典的 M H C クラス I 抗原は、M H C クラス I b 抗原としても知られる。M H C 抗原は、異なる種では異なる呼び方をされる：例えば、ラットでは R T 1、マウスでは H - 2、およびヒトでは H L A である。

【0061】

上記のアッセイ法は以下に説明される：

50

【0062】

肝前駆細胞のクローン増殖の条件

肝前駆細胞は、増殖を停止した、すなわち増殖を予防するように処理されたフィーダー細胞上に、 9.6 cm^2 あたり500細胞を接種する。フィーダー細胞は、マイトマイシンCまたは放射線照射（細胞の種類によって3000～5000ラド）で処理して、増殖を停止する。増殖停止したフィーダー細胞および前駆細胞には、無血清HDMを供給する。例えば、齧歯類細胞のHDMは、ダルベッコ変法イーグル培地とハムF12の1：1混合物に 10 ng/ml EGF、 $5 \mu\text{g/ml}$ インスリン、 10^{-6} M デキサメタゾン、 $10 \mu\text{g/ml}$ 鉄飽和トランスフェリン、 $4.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ニコチンアミド、0.2% ウシ血清アルブミン、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-メルカプトエタノール、 $7.6 \mu\text{eq/l}$ 遊離脂肪酸混合物、 $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ グルタミン、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ CuSO_4 、 $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ H_2SeO_3 および抗生物質を添加したものである。培養液は、2日ごとに培地を交換しながら10～14日間インキュベートする。その後、フェトプロテイン、アルブミン、および/またはCK19の2重免疫蛍光染色を行なって子孫の運命を同定する。フェトプロテインおよびアルブミンの発現について、約100のコロニーが分析される。さらに、コロニーの形態、P型かF型かも適切な子孫の同定に役に立つ場合がある。

10

【0063】

フィーダー細胞と肝前駆細胞の理想的な組み合わせは、同一の種から得られたものである。好ましくは、フィーダー細胞は肝前駆細胞と同一の組織および同一の種から得られる。しかし、1つの種からのフィーダーと別の種からの前駆細胞を混合することも可能である。例えば、齧歯類のフィーダーでさえも、ヒト肝前駆細胞に使用できる。可溶性および不溶性の因子（種および/または組織特異的な可能性がある）は、肝幹細胞または肝前駆細胞のクローン増殖を助ける。このような因子の供給源には、次のようなものがある：

20

1) 最適な種および組織のフィーダー細胞を培養した条件培地。フィーダー細胞は間質細胞のみならず、任意の種類で良い。

2) 重要な因子が既知の場合には、肝前駆細胞に活性を示す最適なフィーダー細胞に由来する適切な分子（シグナル）を合成するために、それぞれ転写または翻訳のためのcDNAまたはmRNAを任意の細胞に導入することによって生物活性のあるフィーダー細胞群を作製できる供給源。

30

3) 肝前駆細胞に活性な最適フィーダー細胞から得られるシグナルが、タンパク質、ペプチド、炭化水素、脂質、糖ペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質、またはその組み合わせであるかに関わらず、重要な因子が既知の場合には、そのようなシグナルを培地に添加することによってフィーダー細胞を完全に置き換えることもできる供給源。

【0064】

上述の実施例は、例示のためだけに説明されており、本発明の範囲または態様を制限するものではない。上記に特に説明されていない他の態様も、当業者には明らかであると思われる。しかし、そのような他の態様も、本発明の範囲および精神に含まれると考えられる。したがって、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ、正しく限定される。

【0065】

本明細書で引用された全ての特許および出版物は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】15日目の胎児ラットの肝臓から得た肝細胞株の特徴付けである。

【図2】線維芽細胞フィーダー細胞上のコロニー形成アッセイ法である。

【図3】成体肝細胞中の様々な細胞株上のラット細胞表面抗原の発現である。

【図4】13日目の胎児ラットの肝臓の表現型分析を現す。

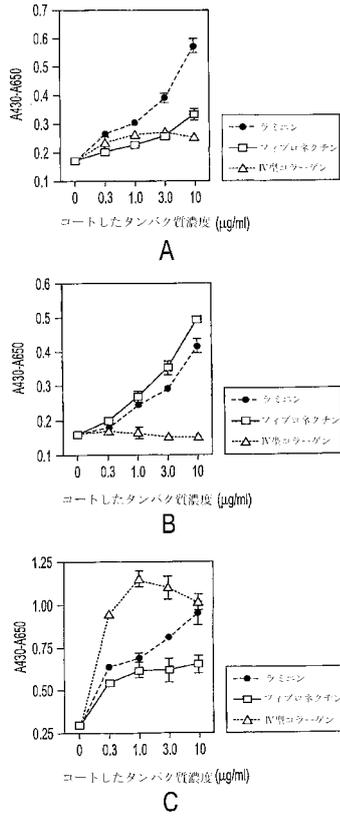
【図5】EGF存在下および非存在下での肝臓コロニーの特徴付けである。

【図6】RT1A¹肝細胞上のCK19発現の誘導を表す。

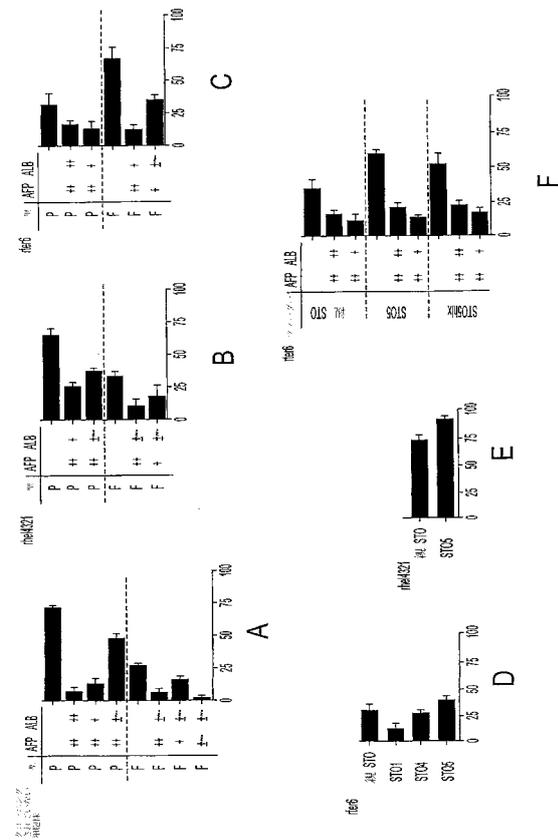
【図7】STO5フィーダー細胞上の肝臓コロニー形成の模式図である。

50

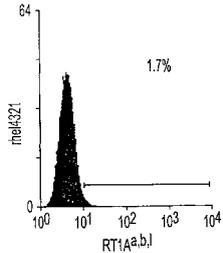
【 図 1 】



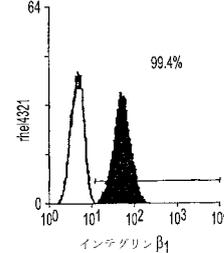
【 図 2 】



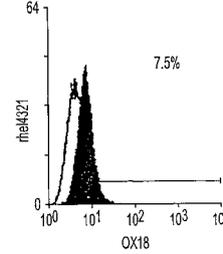
【 図 3 A 】



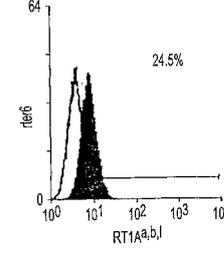
【 図 3 D 】



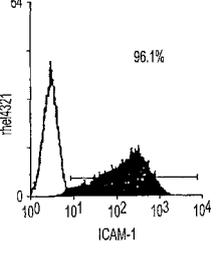
【 図 3 B 】



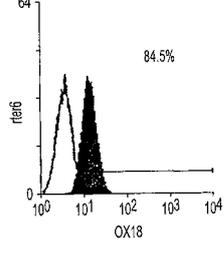
【 図 3 E 】



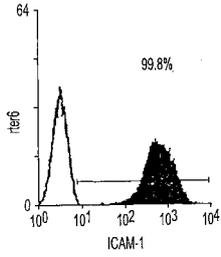
【 図 3 C 】



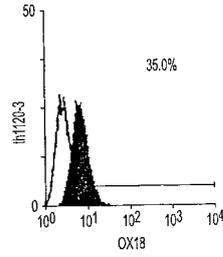
【 図 3 F 】



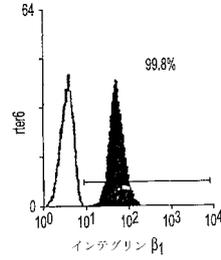
【 3 G】



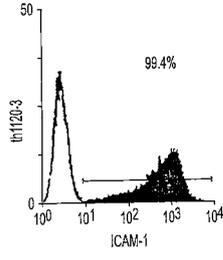
【 3 J】



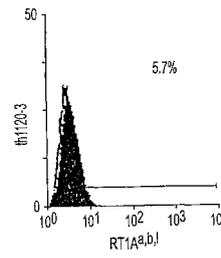
【 3 H】



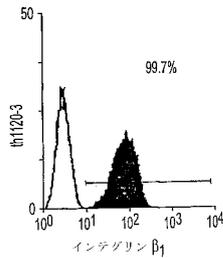
【 3 K】



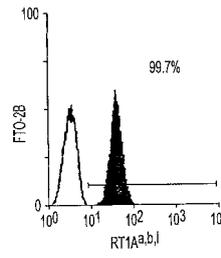
【 3 I】



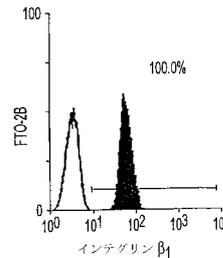
【 3 L】



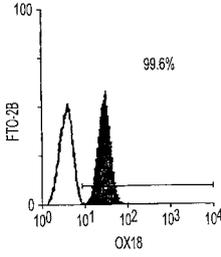
【 3 M】



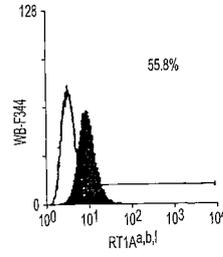
【 3 P】



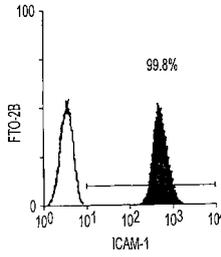
【 3 N】



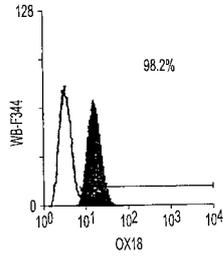
【 3 Q】



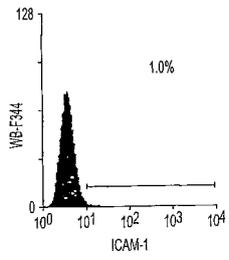
【 3 O】



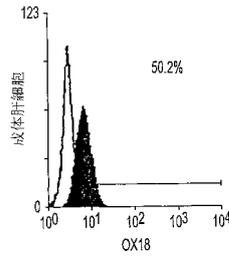
【 3 R】



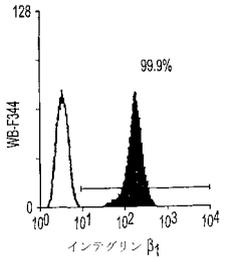
【 3 S】



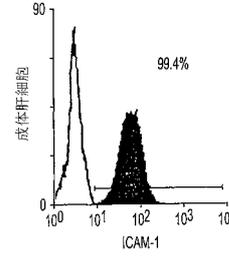
【 3 V】



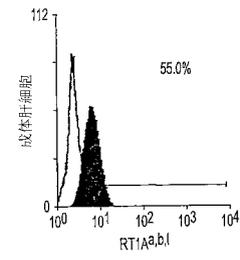
【 3 T】



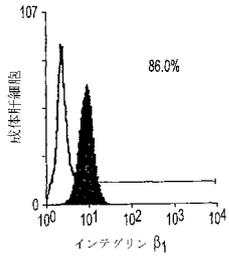
【 3 W】



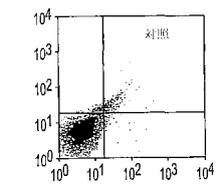
【 3 U】



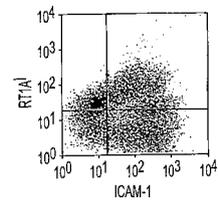
【 3 X】



【 4 A】

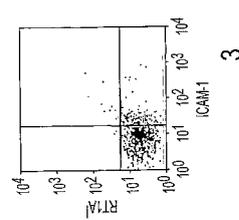


1

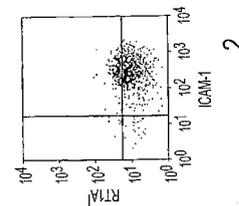


2

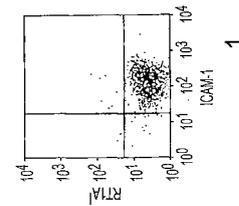
【 4 B】



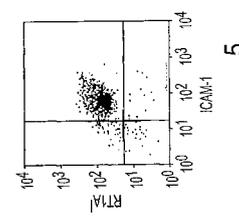
3



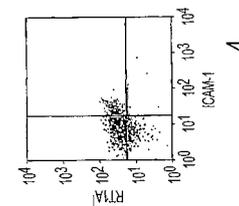
2



1

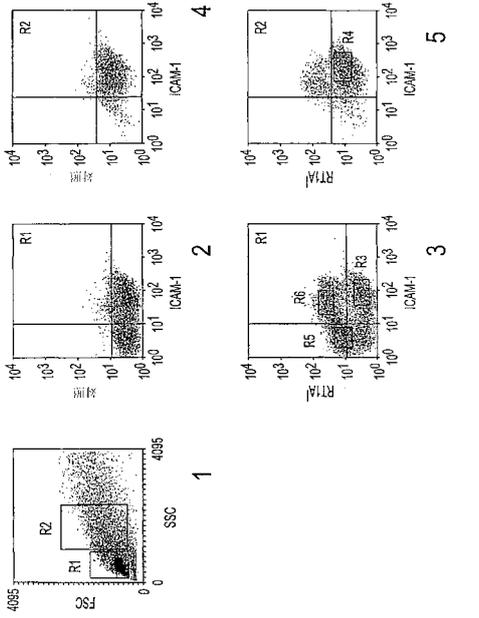


5

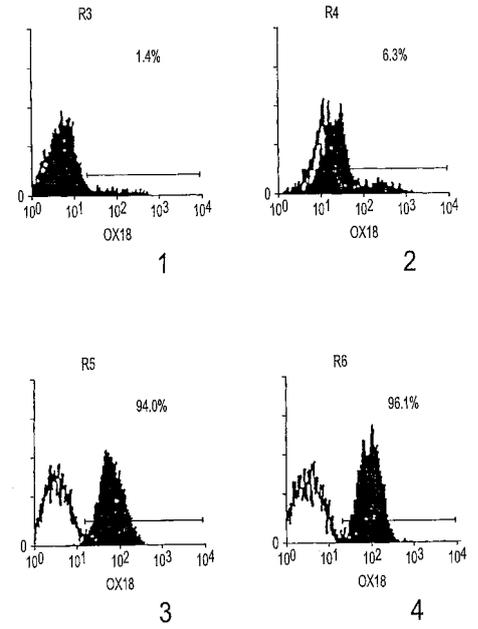


4

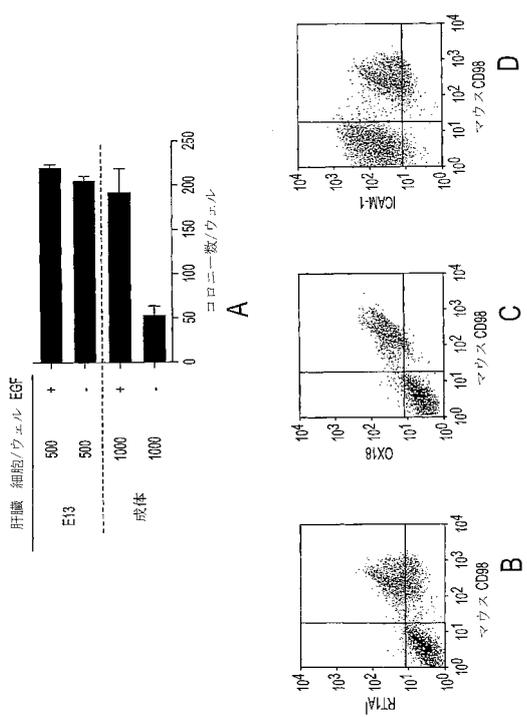
【 4 C 】



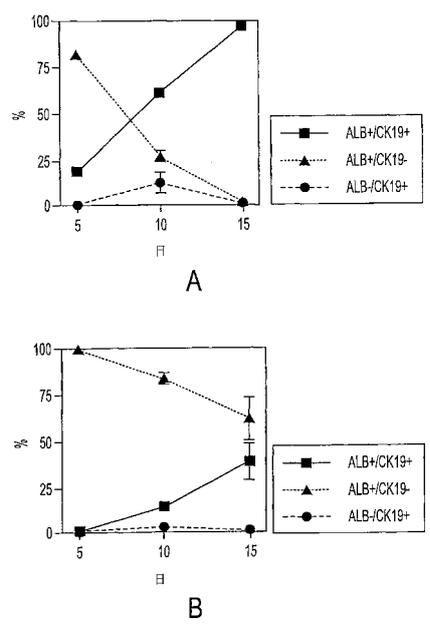
【 4 D 】



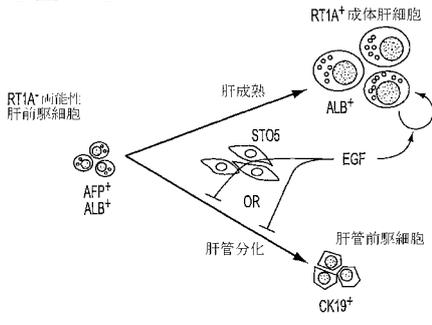
【 5 】



【 6 】



【 図 7 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



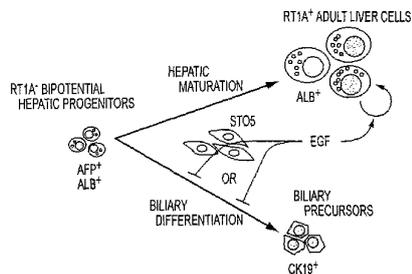
(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/29012 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 5/06, 5/08, G01N 33/50
 - (21) International Application Number: PCT/US00/27428
 - (22) International Filing Date: 3 October 2000 (03.10.2000)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (71) Applicant: UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA [US/US], 308 Bynum Hall, CB 4105, Chapel Hill, NC 27599-4105 (US).
 - (72) Inventors: KUBOTA, Hiroshi, 273 Summerwalk Circle, Chapel Hill, NC 27514 (US); REID, Lola, M., 3621 Sweeten Creek Road, Chapel Hill, NC 27516 (US).
 - (74) Agents: POULIQUEN, Corinne, M. et al., Pepper Hamilton LLP, 600 Fourteenth Street, N.W., Washington, DC 20005-2004 (US).
 - (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
 — with international search report
 — with amended claims
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: PROCESSES FOR CLONAL GROWTH OF HEPATIC PROGENITOR CELLS



(57) Abstract: A method for propagating mammalian endodermally derived progenitors such as hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof is developed which includes culturing mammalian progenitors, their progeny, or mixtures thereof on a layer of embryonic mammalian feeder cells in a culture medium. The culture medium can be supplemented with one or more hormones and other growth agents. These hormones and other growth agents can include insulin, dexamethasone, transferrin, nicotinamide, serum albumin, β-mercaptoethanol, free fatty acid, glutamine, CuSO₄, and H₂SeO₃. The culture medium can also include antibodies. Importantly, the culture medium does not include serum. The invention includes means of inducing the differentiation of the progenitors to their adult fates such as the differentiation of hepatic progenitor cells to hepatocytes or biliary cells by adding, or excluding epidermal growth factor, respectively. The method of producing mammalian progenitors is useful in that the progenitors can be used subsequently in one or more of the following processes: identification of growth and differentiation factors, toxicological studies, drug development, antimicrobial studies, or the preparation of an extracorporeal organ such as a bioartificial liver.



WO 02/29012 A1

WO 02/29012

PCT/US00/27428

**PROCESSES FOR CLONAL GROWTH OF HEPATIC PROGENITOR
CELLS**

5 1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel conditions for clonal growth of mammalian hepatic progenitors, including pluripotent cells, stem cells, and other early hepatic progenitor cells. In particular, the invention relates to methods of propagating hepatic progenitor cells using defined culture medium and feeder cells in co-cultures.

10 Moreover, the invention relates to the cells used as feeders and capable of sustaining hepatic progenitor cell growth.

2. DESCRIPTION OF RELATED ART

Identification of multipotential progenitor cell populations in mammalian tissues is important both for clinical and commercial interests and also for understandings of developmental processes and tissue homeostasis. Progenitor cell populations are ideal targets for gene therapy, cell transplantation and for tissue engineering of bioartificial organs (Millar, AD. 1992 *Nature* 357, 455; Langer, R. and Vacanti, J. P. 1993 *Science* 260, 920; Gage, F.H. 1998 *Nature* 392, 18).

20 The existence of tissue-specific, "determined" stem cells or progenitors having high growth potential and/or pluripotentiality is readily apparent from studies on hematopoietic stem cells (Spangrude, G.J. et al. 1988 *Science* 241, 58), neuronal stem cells (Davis, A. A., and Temple, S. 1994 *Nature* 372, 263; Stemple, D. L., and Anderson, D. J. 1992 *Cell* 71, 973) and epidermal stem cells (Jones, P. H. and Watt, F. M. 1993 *Cell* 73, 713), each having been identified clonally by using the particular methods appropriate for that tissue. These progenitors are regarded as the cells responsible for normal hematopoietic, neuronal or epidermal tissue homeostasis and for regenerative responses after severe injury (Hall, P. A., and Watt, F. M. 1989 *Development* 106, 619).

30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/29012

PCT/US00/27428

The mammalian adult liver has a tremendous capacity to recover after either extensive hepatotoxic injury or partial hepatectomy (Fishback, F. C. 1929 *Arch. Pathol.* 7, 955); (Higgins, G. M. and Anderson, R. M. 1931 *Arch. Pathol.* 12, 186), even though the liver is usually a quiescent tissue without rapid turnover. Data from recent studies in the mouse have been interpreted to suggest that adult parenchymal cells have an almost unlimited growth potentiality as assayed by serial transplantation experiments (Overturf et al. 1997 *Am. J. Pathol.* 151, 1273); (Rhim, J. A. et al. 1994 *Science* 263, 1149). These experiments made use of heterogeneous liver cell populations limiting the ability to prove that the growth potential observed derived from adult parenchymal cells, from a subpopulation of adult parenchymal cells and/or from immature stages of the parenchymal cells (i.e. progenitors). Furthermore, the studies show no evidence for biliary epithelial differentiation, since the hosts used had either albumin-urokinase transgenes or, in the other case, a tyrosine catabolic enzyme deficiency; both types of hosts have conditions that selected for the hepatocytic lineage. Therefore, the assay was incapable of testing for bipotent cell populations.

Several histological studies establish that early hepatic cells from midgestational fetuses have a developmental bipotentiality to differentiate to bile duct epithelium as well as to mature hepatocytes (Shiojiri, N. 1997 *Microscopy Res. Tech.* 39, 328-35). Hepatic development begins in the ventral foregut endoderm immediately after the endodermal epithelium interacts with the cardiogenic mesoderm (Douarin, N. M. 1975 *Medical Biol.* 53, 427); (Houssaint, E. 1980 *Cell Differ.* 9, 269). This hepatic commitment occurs at embryonic day (E) 8 in the mouse. The initial phase of hepatic development becomes evident with the induction of serum albumin and alpha-fetoprotein mRNAs in the endoderm and prior to morphological changes (Gualdi, R. et al. 1996 *Genes Dev.* 10, 1670). At E 9.5 of mouse gestation, the specified cells then proliferate and penetrate into the mesenchyme of the septum transversum with a cord-like fashion, forming the liver

WO 02/29012

PCT/US00/27428

anlage. Although the liver mass then increases dramatically, the increase in mass is due largely to hematopoietic cells, which colonize the fetal liver at E10 in the mouse (Houssaint, E. 1981 *Cell Differ.* 10, 243) and influence the hepatic cells to show an extremely distorted and irregular shape (Luzzatto, A. C. 1981 *Cell Tissue Res.* 215, 133). Interestingly, recent data from gene-targeting mutant mice indicates that impairment of a number of genes has led to lethal hepatic failure, apoptosis and/or necrosis of parenchymal cells between E12 to E15 (Gunes, C. et al. 1998 *EMBO J.* 17, 2846); (Hilberg, F. et al. 1993 *Nature* 365, 1791); (Motoyama, J. et al. 1997 *Mech. Dev.* 66, 27); (Schmidt, C. et al. 1995 *Nature* 373, 699). Especially gene disruptions that are part of the stress-activated cascade (Ganiatsas, S. et al. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6881); (Nishina, H. et al. 1999 *Development* 126, 505) or anti-apoptotic cascade (Beg, A. et al. 1995 *Nature* 376, 167); (Li, Q. et al. 1999 *Science* 284, 321); (Tanaka, M. et al. 1999 *Immunity* 10, 421) can result in severely impaired hepatogenesis, not hematopoiesis, in spite of the broad expression of the inactivated gene. It isn't clear whether hepatic cells are intrinsically sensitive to developmental stress stimuli or that the particular microenvironment in fetal liver per se causes such destructive effects (Doi, T. S. et al. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2994). On the other hand, the basic architecture of adult liver is dependent on the appearance of the initial cylinder of bile duct epithelium surrounding the portal vein (Shiojiri, N. 1997 *Microscopy Res. Tech.* 39, 328). Immunohistologically, the first sign of the differentiation of intrahepatic bile duct epithelial cells is the expression of biliary-specific cytokeratin (CK). CK proteins, the cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins of epithelial cells, are encoded by a multigene family and expressed in a tissue- and differentiation-specific manner (Moll, R. et al. 1982 *Cell* 31, 11). CK19 is one of the most remarkable biliary markers, because adult hepatocytes don't express CK19 at all, whereas adult biliary epithelial cells do express this protein. Only CK8 and CK18 are expressed through early hepatic cells to

WO 02/29012

PCT/US00/27428

adult hepatocytes (Moll, R. et al. *Cell* **1982**, *31*, 11. At E15.5 in the rat development, corresponding to E14 in the mouse, the biliary precursors are heavily stained by both CK18 and CK8 antibodies, and some biliary precursors express CK19. As development progresses, maturing bile ducts gradually express CK7 in addition to

5 CK19 and lose the expression of ALB (Shiojiri, N. et al. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2611). Although hepatic cells as early as E13 in the rat are thought to be a homogeneous population, it remains to be seen whether all early hepatic cells can differentiate to biliary epithelial cell lineage, and how their fates are determined. Definitive lineage-

10 marking studies, such as those using retroviral vectors, have not been done for hepatic cells, and clonal culture conditions requisite for the demonstration of any bipotent hepatic progenitor cells have not been identified.

For clonal growth analyses, one major obstacle is the explosive expansion of hematopoietic cells, marring the ability to observe *ex vivo* expansion of hepatic cells. Therefore an enrichment process for the hepatic population must be used. Although

15 the surface markers needed to fractionate the hematopoietic cells in fetal liver have been investigated in detail (Dzierzak, E. et al. *Immunol. Today* **1998**, *19*, 228), those for hepatic progenitor cells are still poorly defined, since the studies are in their infancy (Sigal, S. et al. *Hepatology* **1994**, *19*, 999). Furthermore, the *ex vivo* proliferation conditions typically used for adult liver cells result in their

20 dedifferentiation with loss of tissue-specific functions such as ALB expression (Block, G. D. et al. *J. Cell Biol.* **1996**, *132*, 1133). A somewhat improved ability to synthesize tissue-specific mRNAs and a restoration in the ability to regulate tissue-specific genes fully post-transcriptionally occurs only in liver cells maintained in the absence of serum and with a defined mixture of hormones, growth factors and/or with

25 certain extracellular matrix components (Jefferson, D. M. et al. *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 1929; Enat, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1984**, *81*, 1411). Proliferating fetal hepatic cells, however, maintain the expression

WO 02/29012

PCT/US00/27428

of such serum proteins *in vivo*. What has not been clear in the field is how to maintain and grow hepatic progenitors *in vitro*. There is an unfilled need for identification of conditions that sustain the *ex vivo* expansion of hepatic progenitor cells. Likewise there is an unfilled need for an *in vitro* colony forming assay (CFA) for defining
5 clonal growth potential of hepatic progenitors freshly isolated from liver tissue; clonal growth is defined as the ability of a single cell seeded into culture being able to generate a population of daughter cells that are clonally derived from the seeded cell. Others have described colony growth (Block, G. D. et al. *J. Cell Biol.* **1996**, *132*, 1133), consisting of aggregates of cells growing closely together in liver cultures
10 seeded at high cell densities; however, the colonies of cells described in these prior studies could not be subcultured and, therefore, by definition were not clonal and of limited utility.

Others have attempted to grow hepatocytes *in vitro*. U.S. Patent No. 5,510,254 to Naughton et al. claims the culture of hepatocytes depends on a three-
15 dimensional framework of biocompatible but non-living material. There is an unfilled need for hepatocyte culture conditions where no artificial framework is necessary and that provides the condition for hepatic *progenitors* to be expanded and cultured. Furthermore, there is a need for cloned hepatic progenitors with bipotential differentiation capability, that is ability to generate both biliary and hepatocytic
20 lineages, and suitability for use as components of a bioartificial liver, for testing of hepatotoxins and drug development, among other uses.

U.S. Patent No. 5,559,022 to Naughton et al., claims liver reserve cells that bind Eosin Y, a stain that was used to characterize the "reserve cells", but did not use well-established markers for liver cells, nor provided methods for clonal expansion,
25 nor provided markers by which to isolate viable liver reserve cells. There is an unfilled need for methods that teach how to isolate and culture cells that have many features essential to hepatic progenitors, including expression of at least one specific marker and the

WO 02/29012

PCT/US00/27428

potential to differentiate into either hepatocytes or biliary cells. There is also an unfilled need for methods for clonal growth of hepatic progenitors. Clonal growth is essential as a clear and rigorous distinction and identification of pluripotent hepatic progenitors.

5 U.S. Patent 5,405,772 to Ponting claims a culture medium for cell growth. The Patent No. 5,405,772 requires the use of 3-30 $\mu\text{g/ml}$ cholesterol, 5-30 $\mu\text{g/ml}$ nucleosides, and either 2-100 $\mu\text{g/cm}^2$ collagen IV or 0.5 – 100 $\mu\text{g/cm}^2$ fibronectin. There is a need for a culture medium that is specific for, and optimized for, hepatic progenitor cell growth.

10 U.S. Patent No. 4,914,032 to Kuri-Harcuch et al. claims a process for culturing hepatocytes. In contrast to the instant invention, Patent No. 4,914,032 fails to teach either the culture of hepatic progenitors or clonal growth conditions for hepatic cells. Likewise, U.S. Patent 5,030,105 to Kuri-Harcuch et al. claims methods of assessing agents by treating hepatocyte cultures. There is an unfilled need for clonal growth
15 conditions so that defined populations of cells may be used for testing and also for methods for the culture of hepatic progenitors.

The U.S. Patent No. 5,858,721 to Naughton et al. claims transfection of stromal cells. The 5,858,721 patent is limited, however, by the requirement for a framework of biocompatible, non-living material. The instant invention by contrast,
20 there is an unfilled need for growth conditions that do not require a synthetic meshwork.

The present inventors have recognized the inadequacy of growing mature liver cells, such as hepatocytes, rather than the far more useful hepatic progenitors. They have carefully defined the isolation parameters for hepatic progenitors and
25 requirements for clonal growth. The progenitor cells and the methods for selecting and culturing the progenitors have many uses, including utility in medicine for treatment of patients with liver failure, and utility for evaluation of toxicity agents, and utility for evaluation of drugs.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

US Patent Nos. 5,576,207 and 5,789,246 to Reid, et al. teach the need for feeders and a hormone-supplemented defined medium. These prior studies advocated use of embryonic liver stromal cells in combination with defined extracellular matrix substrata, and a serum-free, hormonally defined medium as conditions for expansion of hepatic progenitors. However, the defined medium used was more complex than 5 of hepatic progenitors. However, the defined medium used was more complex than the one used by the instant invention; the cells were plated onto purified matrix substrata (type IV collagen and laminin), whereas here they are plated directly onto the feeders (that supply that matrix); and the embryonic stromal cells were prepared as primary cultures of embryonic livers and were not established as cell lines. By use of 10 embryonic stromal cell lines, the feeder cells are provided by a far easier, more practical and more reproducible means of supporting the cells. Moreover, it is reasonable to assume that the STO feeders will not restrict support to just hepatic progenitors but can be used for progenitors from multiple tissue types. The prior patent, the hepatic progenitor cultures were seeded at high cell densities and 15 expansion of them was observed as colony formation, meaning that the aggregates of the cells, not clones of cells, were induced to proliferate.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method of propagating progenitors, their progeny, or mixtures thereof. In particular, the present invention relates to a method 20 of propagating endodermally-derived progenitors, their progeny, or mixtures thereof. The cells are derived from endodermal tissue. Then the endodermally-derived progenitors, their progeny, or mixtures thereof, are cultured on a layer comprising feeder cells in a culture medium. The progenitors, their progeny, or mixtures thereof, 25 can be vertebrate cells. The progenitors, their progeny, or mixtures thereof, can express the phenotype ICAM or ICAM-1 positive and classical MHC class I antigen negative. The classical MHC class I antigen is also termed MHC class Ia antigen.

The present invention also relates to a method of culturing hepatic stem and other progenitor cells using a serum-free, hormone-supplemented, defined medium 30 and feeder

WO 02/29012

PCT/US00/27428

cells. Also, the invention relates to a method of culturing the progeny of progenitor cells, or combinations of progenitor cells and progenitor progeny. Preferably, the progenitor cells are hepatic progenitors. Likewise, the present invention relates to a method of cloning hepatic pluripotent progenitor cells using specific culture
5 conditions. Preferably, the invention relates to a method of cloning hepatic pluripotent progenitor cells. The hepatic pluripotent progenitor cells may be derived from any invertebrate or vertebrate species and more preferably mammalian. Even more preferably, the hepatic pluripotent progenitor cells are human, primate, pig, dog, rat, rabbit or mouse in origin. Most preferably the pluripotent progenitor cells are
10 human in origin. The invention teaches particular culture conditions that are required for the *ex vivo* expansion of hepatic progenitor cells, and their progeny. The invention also teaches use of embryonic feeder cells, such as STO mouse embryonic cells, as feeder cells for hepatic progenitors. The feeder cells are used in combination with a novel serum-free, hormonally defined medium (HDM) taught in the invention. The
15 combination enabled the inventors to establish various rat fetal hepatic cell lines from E15 rat livers without malignant transformation of the cells.

Furthermore, the invention relates to methods of cloning feeder cells capable of sustaining propagation of hepatic progenitor cells, and their progeny.

The invention also relates to specific cell lines that, when used as feeders,
20 support hepatic progenitor cell growth.

The invention additionally relates to methods of cloning hepatic progenitor cells. The invention teaches the use of the hepatic cell lines and the HDM-STO co-culture system for development of an *in vitro* colony forming assay (CFA) for defining clonal growth potential of freshly isolated hepatic progenitors. The CFA,
25 when combined with cells purified by specific antigenic profile, reveals bipotent hepatic progenitors. For example, progenitors from E13 rat livers, corresponding to E11.5 in the mouse, and with high growth potential have the same phenotype as classical MHC class I (RT1A¹); OX18 (pan-MHC class I)^{del}, and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)⁺.

30 The invention additionally relates to the culture medium capable of sustaining clonal hepatic cell growth. The culture medium features several specific hormones and nutrients and an absence of serum.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

Further still, the invention relates to the culture of hepatic progenitors in medium with feeder cell biosynthetic products.

The invention further relates to methods of inducing hepatic cell differentiation, including production of hepatocyte and biliary cell phenotypes.

- 5 Epidermal growth factor (EGF) is taught in this invention to influence both growth of the progenitor colonies and their fates as either hepatocytes or biliary epithelial cells.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a characterization of hepatic cell lines from day 15 fetal rat liver.

- 10 Figure 2 is an assay of colony formation on fibroblast feeder cells.

Figure 3 is an expression of rat cell surface antigens on various hepatic cell lines in adult liver cells.

Figure 4 depicts phenotypic analysis of day 13 fetal rat livers.

- 15 Figure 5 depicts characterization of hepatic colonies in the absence and presence of EGF.

Figure 6 depicts induction of CK19 expression on RT1A¹⁺ hepatic cells.

Figure 7 is a schematic representation of hepatic colony formation on STO5 feeder cells.

20 5. DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The instant invention is a process for propagation and use of stem cells.

- Various tissues are appropriate sources of progenitors, including tissues of ectoderm, mesoderm and endoderm origin. The ectoderm tissues can include skin tissue, brain tissue and other nerve tissue. The mesoderm tissues can include muscle, the blood and hemopoietic systems. The endoderm tissues can include the gut, stomach, pancreas thyroid and glands associated with the digestive system. In particular, the instant invention is a process for the propagation of hepatic stem cells and of other hepatic progenitor cells. The process involves exposing populations of isolated hepatic stem cells and/or hepatic progenitor cells and/or their progeny, to growth conditions capable of sustaining clonal growth, that is, growth at very low cell densities. In a preferred embodiment, the process involves using a serum-free, hormone-supplemented, defined medium to support the propagation
- 25
- 30

WO 02/29012

PCT/US00/27428

of hepatic progenitor cells on a layer of feeder cells. The function of the feeder cells is multi-fold, including supplying nutrients, supplying an attachment surface, and secreting into the medium certain growth factors and extracellular matrix components needed for survival, growth and/or differentiation of the hepatic progenitor cells. In another preferred embodiment, the process involves selecting for cells that are capable of sustaining the growth of hepatic stem and hepatic progenitor cells. The feeder cells may be from reptiles, birds, crustaceans, fish, annelids, molluscs, nematodes, insects, or mammals, preferably human. Preferably, the feeder cells derive from embryonic tissues. Also, preferably, the feeder cells derive from embryonic tissue. Also, preferably, the feeder cells can derive from embryonic liver tissue. Additionally, the feeder cells may be genetically modified. In a still more preferred embodiment, the process involves cloning feeder cells that optimally sustain hepatic cells.

Any method of isolating hepatic stem and hepatic progenitor cells is acceptable, including by affinity-based interactions, e.g. affinity panning, immunosurgery in combination with complement, by flow cytometry, by centrifugal elutriation, by differential centrifugation, etc. The isolated hepatic stem and progenitor cells, have the capacity to express some or all of the phenotype markers (classical MHC class I, ICAM-1⁺, OX18^{dhll}, alpha-fetoprotein⁺, or albumin⁺). It is another embodiment of the invention that the hepatic progenitors express a growth pattern in the colonies characterized by formation of piled-up cells as aggregates, colonies or clusters.

It is a preferred embodiment of the instant invention that hepatic cells be selectively grown in a serum-free, hormone-supplemented, defined medium (HDM).

The composition of HDM comprises a nutrient medium including, but not limited to a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 to which is added up to about 40 ng/ml EGF, up to about 5-10 µg/ml insulin, up to about 10⁻⁶ M Dexamethasone or other glucocorticoid hormone, up to about 10 µg/ml iron-saturated transferrin, up to about 5 x 10⁻²M nicotinamide, up to about 2% bovine serum albumin, up to about 5 x 10⁻⁴M 2-mercaptoethanol or equivalent reducing agent, up to about 8 µeq/l free fatty acid, up to about 2 x 10⁻²M glutamine, up to about 1 x 10⁻⁶ M CuSO₄, up to about 3 x 10⁻⁸ M H₂SeO₃ and, optionally, antibiotics. Antibiotics can include

WO 02/29012

PCT/US00/27428

penicillin, streptomycin, gentamycin, and others common in the art, and combinations thereof. One skilled in the art will know that other nutrient media, e.g. Ham's F-10, Medium 199, or one of the MCDB series including MCDB 151 and MCDB 302, can, after minimal testing, be used in place of DMEM/F12. The most minimal conditions for cell expansion are use of the feeders in the absence of any hormones; and the most critical of the hormonal requirements listed above are glucocorticoids, insulin, transferrin, and EGF constituting the strict hormonal mitogens for progenitor cell expansion. Other hormonal factors can be added and might have secondary growth effects but do not replace the critical requirements noted above. Likewise, changes in the hormone constituents such as can be made by one of ordinary skill in the art, are within the scope of the instant invention.

Preferable ranges include 10-50 ng/ml EGF, 2-10 ug/ml insulin, 5×10^{-7} M to 5×10^{-6} M dexamethasone (9 α -fluoro-16 α -methyl-prednisolone), 5-20 ug/ml iron-saturated transferrin, $2-8 \times 10^{-3}$ M nicotinamide, 0.05 - 0.5% serum albumin, $2-8 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol, 5-10 ueq free fatty acid mixture, $1-3 \times 10^{-3}$ M glutamine, $0.5 - 2 \times 10^{-6}$ M CuSO₄, $1-5 \times 10^{-8}$ M H₂SeO₃, 1-5 uM palmitic acid, 0.1 - 0.4 uM palmitoleic acid, 0.5-1.2 uM stearic acid, 0.5 - 2 uM oleic acid, 1-5 uM linoleic acid, and 0.2 - 0.8 uM linolenic acid.

The serum-free, hormonally defined culture medium of the invention, is suitable for the clonal growth of hepatic cells. This HDM contains a basal medium that can be any of a number of options such as Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), Ham's F12, RPMI 1640, Williams E medium, etc. A preferred embodiment is a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 (DMEM/F12, from, for example GIBCO/BRL, Grand Island, NY). The basal medium is supplemented with epidermal growth factor, EGF (from, for example, Collaborative Biomedical Products) at a preferred concentration of 10 ng/ml, insulin (from, for example, Sigma) at a preferred concentration of 5 μ g/ml, 10^{-6} M Dexamethasone (from, for example, Sigma), 10 μ g/ml iron-saturated transferrin (Sigma), 4.4×10^{-3} M nicotinamide (from, for example, Sigma), 0.2% serum albumin (from, for example, Sigma), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (from, for example, Sigma), 7.6 μ eq/l free fatty acid mixture (2.4 uM palmitic acid, 0.21 uM

WO 02/29012

PCT/US00/27428

palmitoleic acid, 0.88 μM stearic acid, 1 μM oleic acid, 2.7 μM linoleic acid, and 0.43 μM linolenic acid), $2 \times 10^{-3}\text{M}$ glutamine (from, for example, GIBCO/BRL), $1 \times 10^{-6}\text{M}$ CuSO_4 , $3 \times 10^{-8}\text{M}$ H_2SeO_3 and antibiotics. The growth factors secreted by the feeder cells, including but not limited to insulin-like growth factors (IGFs), interleukin (IL)-6 family, hepatocyte growth factors (HGFs), and fibroblast growth factors (FGFs), can be added to the culture medium to augment feeder effects but have not been found to replace feeder effects when added singly or in various combinations, meaning that the feeder cells are producing other signals, yet unidentified that are needed alone or in combination with these growth factors.

It is a still further embodiment of the invention that the hepatic progenitor cells are propagated from a single progenitor cell, that is, that the cells are cloned. Growing cells in colonies does not necessarily equate with clonal growth which implicitly and explicitly is defined as propagation of cells derived from a single cell. Any of several methods of cloning known in the art are suitable, including diluting the progenitor cells to one cell, or less, per cell culture plate well, a method termed limiting dilution. Similarly progenitor cells may be cloned with the use of cloning rings, by selective ablation, by dilute culture on microparticles, by single-cell sorting using flow cytometry, by picking individual cells with micropipet or optical tweezers, and by agar.

It is a yet further embodiment of the invention that many of the cloned progenitor cells are capable of mitosis. It is preferred that the progenitor cells are capable of a least one cycle of mitosis and even more preferred that the progenitor cells are capable of at least ten cycles of division.

It is a still yet further embodiment of the invention that hepatic progenitor cells and their progeny are propagated in medium supplemented with metabolic and biosynthetic products of feeder cells. The supplement can take the form of conditioned medium, that is, medium previously incubated with living feeder cells. Preferably the supplementing can take the form of isolating from feeder cell-conditioned medium those factors including proteins, peptides, lipids, carbohydrates, and metabolic regulators that sustain and enhance the growth of hepatic progenitors and their progeny. The proteins

WO 02/29012

PCT/US00/27428

can include soluble and insoluble components of extracellular matrix and growth factors including epidermal growth factor and insulin-like growth factors.

It is further preferred that hepatic cells be selectively grown in culture using a layer of feeder cells, where those feeder cells are embryonic or adult cells or other suitable cells. In one embodiment the feeder cells are stromal cells or fibroblasts. The fibroblasts or other suitable cells may be genetically modified, e.g. by transfection. It is preferred that the fibroblasts or other suitable cells be human, non-human primate, pig, dog, rabbit, rat, or mouse mesodermal cells, and other mammalian and avian mesodermal cells are also suitable. Furthermore, the fibroblasts can be cloned and selected for the ability to support hepatic progenitor cells.

It is a preferred embodiment of the instant invention that isolated hepatic progenitor cells be committed to a hepatocyte or biliary cell lineage by the selective application, or absence, of epidermal growth factor (EGF), or other differentiation signal.

It is a still more preferred embodiment of the instant invention that isolated stem cells and other hepatic progenitor cells be used as a component of a bioartificial liver that can be used as an extracorporeal liver assist device. It is a still more preferred embodiment of the instant invention that the bioartificial liver containing isolated hepatic progenitor cells and their progeny be used to support the life of a patient suffering from liver malfunction or failure.

6. EXAMPLES

The following examples are illustrative of the invention, but the invention is by no means limited to these specific examples. The person of ordinary skill in the art will find in these examples the means to implement the instant invention. The person of ordinary skill in the art will recognize a multitude of alternate embodiments that fall within the scope of the present invention.

6.1. PREPARATION AND ANALYSIS OF HEPATIC STEM AND HEPATIC PROGENITOR CELLS

Rats. Pregnant Fisher 344 rats are obtained from Charles River Breeding Laboratory (Wilmington, MA). For timed pregnancies, animals are put together in the afternoon, and

WO 02/29012

PCT/US00/27428

the morning on which the plug is observed is designated day 0. Male Fisher 344 rats (200-250g) are used for adult liver cells.

Establishment of hepatic cell lines. Fetal livers are prepared from day 15 of the gestation. Single cell suspensions are obtained by incubating the livers with 0.05% trypsin and 0.5mM EDTA or 10units/ml thermolysin (Sigma, St. Louis, MO) and 100units/ml deoxyribonuclease I (Sigma) for at 37°C. The cells are overlaid on Ficoll-paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for gradient density centrifugation at 450g for 15 min. The cells from the bottom fraction are inoculated into tissue culture dishes coated with 17 mg/ml collagen type IV (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) or 12 µg/ml laminin (Collaborative Biomedical Products) for th1120-3 and rter6 or rhel4321, respectively. The serum-free hormonally defined culture medium, HDM, is a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 (DMEM/F12, GIBCO/BRL, Grand Island, NY), to which is added 20 ng/ml EGF (Collaborative Biomedical Products), 5 µg/ml insulin (Sigma), 10^{-7} M Dexamethasone (Sigma), 10 µg/ml iron-saturated transferrin (Sigma), 4.4×10^{-3} M nicotinamide (Sigma), 0.2% Bovine Serum Albumin (Sigma), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma), 7.6 µeq/l free fatty acid, 2×10^{-3} M glutamine (GIBCO/BRL), 1×10^{-6} M CuSO_4 , 3×10^{-8} M H_2SeO_3 and antibiotics. Each concentration given is the final concentration in the medium. After 4 weeks of culture, trypsinized cells are cultured on a feeder layer of mitomycin C-treated STO mouse embryonic fibroblast line (American Type Culture Collection, Rockville MD). Th1120-3, rter6, and rhel4321 are cloned from three independent preparations of fetal hepatic cells and are maintained on STO feeder cells with HDM. After the establishment of the cell lines, the concentration of EGF is reduced to 10 ng/ml for all cell cultures.

Cell adhesion assay. Adhesion of cells to fibronectin (Collaborative Biomedical Products), laminin and collagen type IV is evaluated using 96 well micro-titer plates (Corning, Cambridge, MA) coated with these proteins at 0.3 to 10µg/ml. After removing the STO cells by Percoll (Pharmacia Biotech) gradient density centrifugation at 200g for 15 min, 3×10^4 cells of the hepatic cell lines, th1120-3, rter6, and rhel4321, are cultured

WO 02/29012

PCT/US00/27428

in each well for 10 hours with HDM. After rinsing twice to remove floating cells, fresh medium with the tetrazolium salt WST-1 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) is added to measure the number of variable adherent cells. After 4 hours, the absorbance is determined according to the manufacturer's protocol.

5

STO Sublines. One hundred cells of parent STO from ATCC are cultured in 100mm culture dishes for 7 days in DMEM/F12 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2×10^{-3} M glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol and antibiotics.

Four subclones are selected for further characterization according to the cell morphology and the growth speed. Although CFA for rter6 is performed in the four subclones, one of them, STO6, does not persist in attaching to culture plates after mitomycin C-treatment. One subclone, STO5, is transfected with pEF-Hlx-MC1neo or pEF-MC1neo kindly provided from Dr. J. M. Adams, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. Linearized plasmids at *Nde I* site are introduced into cells by DOSPER liposomal transfection reagent (Boehringer Mannheim). After G418 selection, six clones are isolated. Three clones of each are analyzed by CFA.

Immunohistochemical Staining of Colonies. Culture plates are fixed in methanol-acetone (1:1) for 2 min at room temperature, rinsed and blocked by Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) with 20% goat serum (GIBCO/BRL) at 4°C. For double immunohistochemistry of alpha-fetoprotein and albumin, plates are incubated with anti-rat albumin antibody (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) followed by Texas Red-conjugated anti-rabbit IgG (Vector laboratories, Burlingame, CA) and FITC-conjugated anti rat alpha-fetoprotein polyclonal antibody (Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands). For double labeling of albumin and CK19, anti-CK19 monoclonal antibody (Amersham, Buckinghamshire, England) and FITC-conjugated anti mouse IgG (Caltag, Burlingame, CA) are used instead of anti alpha-fetoprotein antibody.

25

WO 02/29012

PCT/US00/27428

- Dissociation of E13 of fetal liver.* Fetal livers are dissected into ice-cold Ca^{++} free HBSS with 10mM HEPES, 0.8mM MgSO_4 and 1mM EGTA (pH7.4). The livers are triturated with 0.2% type IV collagenase (Sigma) and 16.5 units/ml thermolysin (Sigma) in HBSS prepared with 10mM HEPES, 0.8mM MgSO_4 , and 1mM CaCl_2 .
- 5 After incubation at 37°C for 10 min, the cell suspension is digested with 0.025% trypsin and 2.5mM EDTA (Sigma) for 10 min. Trypsin is then quenched by addition of 1mg/ml trypsin inhibitor (Sigma). Finally, the cells are treated with 200 units/ml deoxyribonuclease I (Sigma). In all experiments, $3-5 \times 10^5$ cells per liver are obtained.
- Isolation of adult liver cells.* The two step liver perfusion method is performed to
- 10 isolate liver cells. After perfusion, the cells are centrifuged for 1 min at 50g twice to enrich for large parenchymal cells. Cellular viability is >90% as measured by trypan blue exclusion.
- Flow cytometric analysis.* Cells are analyzed on a FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) and sorted using a Moflow Flow Cytometer (Cytomation, Fort
- 15 Collins, CO). The cell suspensions from E13 fetal liver are incubated with HBSS, containing 20% goat serum (GIBCO/BRL) and 1% teleostean gelatin (Sigma), on ice to prevent nonspecific antibody binding. After rinsing, the cells are resuspended with FITC-conjugated anti rat RT1A^{a,b,l} antibody B5 (Pharmingen, San Diego, CA) and PE-conjugated anti-rat ICAM-1 antibody 1A29 (Pharmingen). In some experiments
- 20 the cells are stained with biotinylated anti-rat monomorphic MHC class I antibody OX18 (Pharmingen) followed by a second staining with streptavidin-red670 (GIBCO/BRL) for 3 color staining. All stainings are performed with ice-cold Ca^{++} free HBSS containing 10mM HEPES, 0.8mM MgSO_4 , 0.2mM EGTA, and 0.2% BSA (pH7.4). The established three hepatic cell lines are trypsinized and fractionated
- 25 by Percoll density gradient centrifugation to remove feeder cells. The rat hepatoma cell line, FTO-2B, and the rat liver epithelial cell line, WB-F344, as well as adult liver cells are stained to compare with the fetal hepatic cell lines. The cell lines are kind gifts of Dr. R.E.K. Fournier, Fred

WO 02/29012

PCT/US00/27428

Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, and Dr. M.-S. Tsao, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, respectively. Cells are blocked and stained with FITC-conjugated B5, OX18, PE-conjugated 1A29 or anti FITC-conjugated rat integrin β_1 antibody Ha2/5 (Pharmingen). FITC-conjugated anti mouse IgG is used for OX18. Cell suspensions of three fetal hepatic cell lines are stained with biotinylated anti-mouse CD98 followed by a second staining with streptavidin-red670 as well as anti-rat moAb to gate out mouse cell populations.

Various antigens are expressed in different relative numbers by cells. In practical usage the level of expression of a particular antigen can be NO expression, a low level of expression, a level of expression that is normal or regular for many antigens, and a high level of expression. In this usage, the term "low is used interchangeably with a weak or dull. More detailed description of the level of expression can, alternatively, be made, but these four levels suffice for many purposes. It should be clear that measurement of antigen expression by, for example, flow cytometry, provides a continuous range for antigen expression.

CFA for hepatic cell lines, sorted cells, and adult liver cells. The hepatic cell lines are plated in triplicate at 500 cells per 9.6 cm² on mitomycin C-treated STO feeder layer with the same HDM as used for maintaining each cell line. Before plating, cell are trypsinized and fractionated by Percoll density gradient centrifugation to remove feeder cells. The cultures are incubated for 10 to 14 days with medium changes every other day. Double immunofluorescence staining of alpha-fetoprotein and albumin is then performed. 100 colonies per well are analyzed by the colony morphology, P or F type, and the expression of alpha-fetoprotein and albumin. The colonies are stained using Diff-Quick (Baxter, McGaw Park, IL) to count the number of the colonies per well. In the CFA for primary sorted cells and adult liver cells, the plating cell number is changed as described. As another minor modification, the culture period is expanded to between 14 and 17

WO 02/29012

PCT/US00/27428

days, and the concentration of dexamethasone is increased to 10^{-6} M. All other procedures are performed as above. In the CFA for adult liver cells, small numbers of clumps of liver cells are not eliminated from the cell suspension after the preparation. Therefore, an undefined number of the colonies might be produced from the clumps.

5 For CFA of biliary differentiation on sorted cells, double immunofluorescence staining of albumin and CK19 of the colonies is performed at 5 days each of the culture in the presence or absence of EGF. At day 5 of the cultures, any colony with more than one CK19⁺ cell is counted as a CK19⁺ colony. At day 10 and 15, colonies containing multiple clusters of two CK19⁺ cells or one cluster of more than

10 three CK19⁺ cells are counted as a CK19⁺ colony. About 100 colonies per well are counted. Each point represents the mean \pm SD from triplicate-stained cultures.

6.2. GENERATION AND CHARACTERIZATION OF FETAL RAT HEPATIC CELL LINES USING FEEDERS OF MOUSE EMBRYONIC CELLS WITH A HORMONALLY DEFINED MEDIUM.

15

Simple long-term cultures of rat E15 hepatic cells are attempted to see how long fetal hepatic cells could be maintained and expanded *ex vivo* to produce progeny. After a gradient density centrifugation to remove hematopoietic mononuclear cells, the fetal liver cells are cultured on culture dishes coated by collagen type IV or laminin and in HDM (see example 6.1). The cells survive well for more than 4 weeks.

20 However, secondary cultures on fresh collagen type IV- or laminin-coated dishes do not permit further expansion. When mitomycin C-treated STO embryonic mouse fibroblast cell lines are used as a feeder layer for the secondary cultures, many aggregates of cells grow. Eventually several stable hepatic cell lines are established

25 from four independent experiments.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

Immunohistochemical analysis of alpha-fetoprotein and albumin are performed in the continuous growing cell populations before cloning of the cell lines. Both proteins, alpha-fetoprotein and albumin, are used as the markers to confirm that cell populations originated from the hepatic lineage. The cell population with a tendency to form piles of cells, is called P-colonies, and has intense expression of alpha-fetoprotein and albumin, while the flattened monolayers, called F-colonies, have diminished expression of alpha-fetoprotein and no albumin. The embryonic mouse fibroblasts, STO, do not show any reactivity to either antibody. For further analysis, three cloned hepatic cell lines from independent experiments are selected by the morphological criteria of either P-type or F-type colonies. Rhes4321 (Fig. 1a) consists mostly of packed small cells, P-type colonies, whereas th1120-3 (Fig. 1c) makes only a flattened monolayer of F-type colonies. Rter6 (Fig. 1b) is an intermediate phenotype of these two. Interestingly, the heterogeneity of rter6 is still observed after three rounds of sequential cloning of the flattened colony. To see the heterogeneity of colonies derived from single cells in rhes4321 and rter6, the cells are cultured on STO fibroblasts for 10 to 14 days at a seeding density of 500 cells per 9.6 cm² (one well of a 6-well plate). The colonies are then characterized in terms of their morphology and their expression of alpha-fetoprotein and albumin. Fig. 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, and 2f shows the results. In the cell lines, rhes4321 (Fig. 2b) and rter6 (Fig. 2c), and in the original cell population prior to cloning (Fig. 2a), almost all P-type colonies strongly express alpha-fetoprotein, whereas F-type colonies of cells do not. Furthermore, the intense expression of both alpha-fetoprotein and albumin is observed only in P type colonies. The morphological difference in the cloned hepatic cell lines correlate to the percentage of the P type colony (Fig. 2b and 2c). The percentage of P type colonies in CFA of rter6 and rhes4321 is 33.3% (\pm 8.6% SD) and 65.7% (\pm 4.0% SD), respectively. The total colony number per well is counted to

WO 02/29012

PCT/US00/27428

calculate the clonal growth efficiency (colony efficiency). The efficiency of rter6 and rhel4321 is 45.7% (\pm 1.3% SD) and 36.4% (\pm 1.1% SD), respectively. The th1120-3 cells tightly attach to each other along their lateral borders making preparation of single cell suspensions difficult. However, the th1120-3 cells do not produce piled up clusters.

Next, the preferences of each of the cell lines to adhere to specific components of extracellular matrices (ECM) are tested, because the adhesion of mouse liver cells to such ECM proteins as laminin, collagen type IV, and fibronectin, changes in different developmental stages. Whereas collagen type IV is the most effective in the attachment of th1120-3 (Fig. 1c), similar to the findings for the adult liver cells, it works less well for rter6 (Fig. 1b) and rhel4321 (Fig. 1a). Laminin is the most effective substratum for adhesion of rhel4321 (Fig. 1a). This preference is similar to that of primary cultures of mouse fetal liver cells. In summary, the conserved expression of alpha-fetoprotein and albumin in P type colonies and preferential adherence to laminin by rhel4321, suggest that the cell populations producing P type colonies are more strictly associated with hepatic progenitor cells.

6.3. ISOLATION OF STO SUBCLONES FOR THE COLONY FORMATION; ASSAY OF HEPATIC PROGENITORS

To develop a CFA system to identify bipotent hepatic progenitors with high growth potential, the culture system has to be able to support cell expansion at clonal seeding densities and with conservation of critical original hepatic functions. albumin and alpha-fetoprotein are two of the most significant markers for early hepatic development. The culture conditions optimizing P type colonies should be the best, since P type, but not F type, colonies maintain the expression of alpha-fetoprotein and albumin during clonal expansion. Therefore, STO subclones are compared in their support of P type colonies of rter6. One of the clones, STO5, supports the P type colony formation more

WO 02/29012

PCT/US00/27428

than any of the other sublines and more than the parent line (Fig. 2d). The CFA of
rhel4321 also confirms that STO5 is a more effective feeder than the parent STO (Fig.
2e). The mouse Hlx gene product, expressed in the mesenchymal cells lining digestive
tract from E10.5, is essential for fetal hepatic cell expansion. Although the mRNA
5 expression for the Hlx gene is analyzed in all the STO subclones, there is no
significant difference in its expression among the subclones (data not shown).
Furthermore, the stable transfectants of mouse Hlx in STO5 do not result in an
improvement in the colony formation assays (Fig. 2f). One clone of the transfectants,
however, is used for further experiments, because the transfectant supports a more
10 stable persistence of the original morphology of STO5 at relatively high passages.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

6.4. IDENTIFICATION OF HEPATIC PROGENITORS FROM E13 FETAL LIVER USING THE SURFACE ANTIGENIC MARKERS AND THE COLONY FORMING ASSAY.

5

Hepatopoiesis and massive amounts of hematopoiesis co-exist in the fetal liver. So far, the antigenic profile of hematopoietic progenitors has extensively been analyzed, whereas studies of early hepatic progenitors are still in their infancy. The antigenic profile of hepatic cells is analyzed using the three hepatic cell lines established in this study, an adult hepatocarcinoma cell line (FTO-2B), an epithelial cell line from adult rat liver (WB-F344), and freshly isolated adult liver cells. Compared with FTO-2B, WB-F344, and adult liver cells, the pattern of the most immature of the fetal hepatic cell lines, rhl4321, is quite unique in that there is no expression of classical MHC class I (RT1A^I) (Fig. 3a-3x). The cell line, th1120-3 (Fig. 3i-3l), is similar to rhl4321 (Fig. 3a-3d) in the pattern of RT1A^I, OX18 (pan-MHC class I), and ICAM-1, whereas rter6 (Fig. 3e-3h) has relatively high expression of RT1A^I and OX18 (Fig.3). Additionally, another cell line from a different experiment, which has an identical morphology to rhl4321, is also RT1A^I⁻, OX18^{dim}, and ICAM-1⁺. Integrin b1 expression is similar in all the cell lines, while the pattern of RT1A^{a,b,1} and ICAM-1 is unique among them. The antigenic profile of adult liver cells is RT1A^I⁺, OX18⁺, and ICAM-1⁺. Since, in the adult rat, all bone marrow cells except mature erythrocytes strongly express MHC class I molecules, the fetal hepatic population can be separated from the hemopoietic cell populations by MHC class I expression. The cell suspensions from rat E13 livers are stained with anti RT1A^I and ICAM-1 antibodies. Fig. 4a shows the 2 color-staining pattern of RT1A^I and ICAM-1. To determine which fraction contains the hepatic cell population, five fractions are isolated by fluorescent activated cell sorting and then screened by CFA for clonal growth potential. Fig. 4b represents the result of resorting of the five fractions after sorting. The hepatic cell colonies, defined by expression of albumin and alpha-fetoprotein, are distinguishable also morphologically, enabling one to count the number of hepatic colonies per well. The majority of the hepatic colonies are detected in the gate RT1A^I^{dim} and ICAM-1⁺ (Table 1, Fig. 4b gate 2), and the frequency of the P type colony is 75.6%

10

15

20

25

30

22

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/29012

PCT/US00/27428

(\pm 4.9% SD). Gate 1 shows a much lower number of the colonies, and the other fractions contain negligible numbers of cells with colony forming ability. In gates 1 and 2, the expression of both alpha-fetoprotein and albumin is confirmed in all the hepatic colonies. Some of the colonies, derived from cells in gate 2, are larger than others. To investigate the MHC class I expression on the hepatic cells in detail, three color staining of RT1A¹, ICAM-1, and OX18 with the sidescatter (SSC) as another parameter is used for the cell fractionation. Sidescatter (SSC), a reflection of the granularity of cell, is a useful parameter for separation of hepatic from hematopoietic cells, because fetal hepatic cells contain lipid droplets as early as E11 of gestation (Luzzatto, 1981). Fig. 4c shows that the gate 2 contains the highest number of colony-forming cells. Gating R2 based on the SSC, the population corresponding to the gate 2 clearly shows RT1A¹ and OX18^{dim} phenotype (Fig. 4c, 4d). The CFA confirms that R4 harbors more colony-forming cells than gate 2 (Table 1). These results suggest that most of the RT1A¹, OX18^{dim}, and ICAM-1⁺ population from E13 rat liver are hepatic cells producing alpha-fetoprotein⁺ and albumin⁺ colonies. It is the identical antigenic profile found for rhel4321 cells (Fig. 3).

Table 1. The Frequency of hepatic colonies from sorted E13 fetal liver based on the expression of RT1A and ICAM-1.

Gate	Inoculated cell (per well)	Hepatic colony (per well)	Efficiency of colony formation (%)
1	1000	8.7 \pm 4.0	0.87
2	500	136.3 \pm 4.6	27
3	5000	10.0 \pm 7.9	0.13
4	5000	6.3 \pm 0.6	0.13
5	5000	5.0 \pm 1.0	0.10
R3	1000	7.0 \pm 2.6	0.70
R4	500	269.3 \pm 9.8	54

Colony forming culture on STO5hx containing indicated cell number from each fraction of E13 of fetal liver. Number of the hepatic colonies was established from

WO 02/29012

PCT/US00/27428

triplicate stained cultures (mean \pm SD). Efficiency of the colony formation express the percentage of cells inoculated to culture that went on to form colonies analyzed after 16 days of the culture.

5 6.5. DIFFERENT GROWTH REQUIREMENT OF E13 HEPATIC CELLS AND ADULT LIVER CELLS

The growth requirement of the sorted hepatic cells from E13 liver are studied using the defined STO5 feeders and the HDM. EGF has long been known as a potent growth factor for adult liver cells. Therefore, the effects of EGF for colony formation of sorted hepatic cells are investigated. The colony-size of the RT1A¹⁻ OX18^{dim} ICAM-1⁺ hepatic cells becomes bigger in the absence of EGF, whereas adult liver cells yielded colonies only in the presence of EGF (Fig. 6 c). Furthermore, the morphology of the colonies derived from adult liver cells is the typical F type, whereas all RT1A¹⁻ hepatic cells produce P type colonies without EGF. However, the colony efficiency is reduced slightly by the absence of EGF (Fig. 6a). Interestingly, the culture condition in the absence of EGF emphasized the two types of P-colonies, P1 and P2. Although the majority of the colonies is P2 type, at the 12th day of culture, it is difficult to distinguish the two types definitively because some of them do not have the typical morphology like Fig. 6a. These results suggest that fetal hepatic cells and adult liver cells are intrinsically different in their growth requirement as well as in their expression of RT1A¹ (Fig. 3 and 4) and colony morphology.

After 3 weeks of culture, when growth seems to reach a maximum, the expression of RT1A¹, OX18, and ICAM-1 is assessed. As shown in Fig. 5b-5d, the expression of RT1A¹ is not induced, while that of OX18 is reduced. The level of ICAM-1 does not change. Furthermore, the average cell number of single colony is calculated from the recovered cell number, the percentage of rat hepatic cells and the colony efficiency. The estimated cell number reaches 3 to 4 x 10³(Table 2). This indicates that the single cell forming the colonies divided approximately 11-12 times on average under this culture condition.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

Table 2. Calculation of the cell number in single hepatic colony.

	Inoculated cell number	Seeding density (cell/cm ²)	Culture length (day)	Recovered cell number	Percentage of rat cell (%)	Colony efficiency (%)	Average of cell number in single colony
5							
10	500	18	18	1.5 x 10 ⁶	58	41	4.2 x 10 ³
	4000	51	21	6.0 x 10 ⁶	90	44	3.1 x 10 ³
	4000	51	20	4.0 x 10 ⁶	69	21	3.3 x 10 ³

15 Sorted cells from R4 in Fig. 4c were cultured on STO5hx feeder in 60mm or 100mm dish. After the period indicated of the culture cell all cells were recovered and the total cell number counted. The percentage of rat cells is from flow cytometric analysis based on the expression of rat ICAM-1 and mouse CD98. Colony efficiency indicates the percentage of cells inoculated to culture that went on to form colonies. Data from

20 triplicate-stained cultures (mean) was obtained from the experiments run parallel with. Average of cell number in single colony = (Recovered cell number x Percentage of rat cell/100)/Inoculated cell number x Colony efficiency/100)

6.6. EVIDENCE FOR BIPOTENTIALITY IN RT1A⁺ HEPATIC PROGENITOR

25

At E13 of gestation in the rat, the hepatic cells are thought to have a bipotent precursor giving rise to the mature hepatocyte and bile duct epithelium. However, before the discoveries of the instant invention there has been no direct evidence whether the two fates originated from a single cell or not. To determine whether the

30 RT1A⁺ OX18^{anti} ICAM-1⁺ fetal hepatic cells can differentiate to the biliary lineage in this culture system, the colonies are stained by anti-CK19 as a specific marker for biliary epithelial cells. CK19 is expressed in the bile duct epithelial precursors after day 15.5 in the fetal rat liver at which time the expression of albumin disappears in the cells. The sorted RT1A⁺

WO 02/29012

PCT/US00/27428

ICAM-1⁺ cells are cultured in the presence or absence of EGF, and their fates are monitored by the expression of CK19 and albumin after 5 days of culture. After the first 5 days, the CK19⁺ colonies are negligible in the cultures treated with EGF, whereas a few colonies containing CK19⁺ cells occurred in those in the absence of EGF. Although the intensity of the CK19 expression is fairly weak, the CK19⁺ cells show reduced albumin expression. At the 10th day of the culture, some colonies apparently express only CK19 or albumin and others have dual positive expression. The pattern of the CK19⁺ and albumin⁺ cells in a single colony is reciprocal. The number of dual positive colonies and CK19 single positive colonies still is higher in the absence of EGF (Fig.7a). In the presence of EGF, many of the colonies consist only of albumin⁺ cells at the 10th day (Fig.7b). Eventually, the percentage of dual positive colonies reaches nearly 100% in the absence of EGF at day 15 (Fig.7a). Altogether, EGF dramatically suppresses the appearance of CK19⁺ colonies through the culture (Fig.7b). These results suggest that the RT1A¹, OX18^{dmll}, and ICAM-1⁺ cells from E13 fetal liver can differentiate towards the biliary lineage and their fate can be influenced by EGF *in vitro* (Fig. 8).

6.7. PROTOCOL FOR ISOLATION AND CLONING OF FEEDER CELLS CAPABLE OF SUSTAINING CLONAL GROWTH OF HEPATIC STEM AND HEPATIC PROGENITOR CELLS.

Fresh embryonic tissue or frozen tissue (e.g. liver, lung, kidney, muscle, intestine) from pig, beagle, rabbit, mouse or monkey is minced in calcium-free, phosphate-buffered saline (PBS). After rinsing with PBS a couple of times, the cell suspension is incubated with 0.25% trypsin for 10 min at 37^o or for 60 min at room temperature with agitating using a magnetic stirrer. The remaining cell chunks are removed by filtering the suspension thorough mesh. The cells are then cultured on tissue culture dishes with a basal medium (e.g. Eagle's MEM) supplemented with serum (e.g. 10% fetal calf serum) and with any of various growth supplements (e.g. 2mM glutamine, sodium pyruvate, and MEM nonessential amino acids). Plastic substratum and serum supplemented medium are generic conditions that permit expansion of a cell population that is a candidate as support cells ("feeder cells"), most commonly being mesodermally-derived (e.g. stromal

WO 02/29012

PCT/US00/27428

cells), and that provide factors supporting the survival, growth and/or functions of another cell type (e.g. progenitor cells). The feeder cells are subcultured with 0.05% trypsin when they become confluent or almost confluent. After several rounds of subculture, expanded cells are prepared as frozen stocks and stored as such until use.

5 An alternative source of feeder cells can be commercially available primary cultures of feeder cells or feeder cell lines. In any case, the following criteria are needed to identify the appropriate feeder cells:

The feeder cells support

- 10 1) clonal growth of hepatic progenitors with the phenotypic markers classical MHC class I antigen(s) negative, ICAM-1 positive, and/or nonclassical MHC class I antigen(s) dull positive;
- 2) clonal growth of progenitors with progeny with the phenotype markers classical MHC class I antigen(s) negative, ICAM-1 positive,
15 nonclassical MHC class I antigen(s) dull positive, alpha-fetoprotein positive, albumin positive or CK19 positive; or
- 3) inducible differentiation into both hepatic lineage and biliary lineage, required to define bipotent hepatic progenitors.

20 In the field, classical MHC class I antigen is also known as MHC class Ia antigen. Non-classical MHC class I antigen is also known as MHC class Ib antigen. The MHC antigens have different designations in different species: RT1 in rat, H-2 in mouse, and HLA in humans, for example.

25 The assays noted above are described below:

A clonal growth condition for hepatic progenitors

The hepatic progenitors are plated at 500 cells per 9.6 cm² on growth-arrested, i.e. cells treated to prevent proliferation, feeder cells. The feeder cells are growth-arrested
30 by treating them with mitomycin C or by irradiating (3000-5000 rads depending upon cell type). The growth-arrested feeder cells and progenitor cells are fed with a serum-free

WO 02/29012

PCT/US00/27428

HDM. As an example, HDM for the rodent cells is a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 with added 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulin, 10⁻⁶M Dexamethasone, 10 µg/ml iron-saturated transferrin, 4.4 x 10⁻³M nicotinamide, 0.2% bovine serum albumin, 5 x 10⁻⁵M 2-mercaptoethanol, 7.6 µeq/l free fatty acid, 2 x 10⁻³M glutamine, 1 x 10⁻⁶M CuSO₄, 3 x 10⁻⁸M H₂SeO₃ and antibiotics. The cultures are incubated for 10 to 14 days with medium changes every other day. Double immunofluorescence staining of alpha-fetoprotein, albumin, and/or CK19 is then performed for identifying the fate of the progeny. About 100 colonies are analyzed by the expression of alpha-fetoprotein and albumin. Furthermore the colony morphology, P or F type, could be useful identification of the relevant progeny.

The ideal combination of feeder cells and hepatic progenitors are those that originated from the identical species. Preferably, the feeder cells are from the same tissue and same species as the hepatic progenitors. However, mixing of feeders from one species and progenitors from another is possible. For example, even rodent feeder cells can be used for human hepatic progenitors. Soluble and insoluble factors (that can be species- and/or tissue-specific) help the clonal growth of hepatic stem cells or hepatic progenitors. The source of the factors is :

- 1) Conditioned medium from the cultured feeder cells of the optimal species and tissue. The feeder cells can be of any cell type, not just stromal cells.
- 2) When the critical factor(s) are known, one makes a biologically active feeder cell population by introduction into any cells of complementary DNA or mRNA for transcription or translation, respectively, for the synthesis of relevant molecules (signals) derived from optimal feeder cells active for hepatic progenitors.
- 3) If the critical factor(s) are known, one can also replace the feeder cells altogether by supplementing the medium with those signals, whether they be proteins, peptides, carbohydrates, lipids, glycopeptides, glycoproteins, lipoproteins, glycolipids, or a combination of these constituting the signals derived from optimal feeder cells active for hepatic progenitors.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

The above examples have been depicted solely for the purpose of exemplification and are not intended to restrict the scope or embodiments of the invention. Other embodiments not specifically described should be apparent to those of ordinary skill in the art. Such other embodiments are considered to fall, nevertheless, within the scope and spirit of the present invention. Thus, the invention is properly limited solely by the claims that follow.

All patents and publications cited herein are incorporated by reference in their entireties.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

WE CLAIM:

1. A method of propagating endodermally derived progenitors, their progeny, or mixtures thereof comprising culturing endodermally derived progenitors, their progeny, or mixtures thereof on a layer comprising feeder cells in the presence of a culture medium.
2. The method of claim 1 in which the progenitors, their progeny, or mixtures thereof comprise vertebrate cells.
3. The method of claim 2 in which the progenitors, their progeny, or mixtures thereof comprise human cells, non-human primate cells, pig cells, dog cells, rabbit cells, rat cells, mouse cells, or combinations thereof.
4. The method of claim 3 in which the progenitors, their progeny, or mixtures thereof comprise liver, lung, intestine, pancreas, thyroid, gonad progenitors, or combinations thereof.
5. The method of claim 4 in which the progenitors, their progeny, or mixtures thereof derive from liver.
6. The method of claim 1 in which the culture medium comprises a basal medium.
7. The method of claim 6 in which the basal medium includes Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12.
8. The method of claim 1 in which the culture medium comprises at least one hormone.
9. The method of claim 8 in which the hormone is insulin.
10. The method of claim 8 in which the culture medium further comprises a glucocorticoid hormone.
11. The method of claim 8 in which the glucocorticoid hormone is dexamethasone.
12. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises iron-saturated transferrin.
13. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises nicotinamide.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

14. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises serum albumin.
15. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises at least one reducing reagent.
- 5 16. The method of claim 15 in which the reducing agent is β -mercaptoethanol.
17. The method of claim 1 in which the culture medium comprises at least one lipid supplement.
18. The method of claim 17 in which the lipid supplement comprises a free
10 fatty acid mixture.
19. The method of claim 17 in which the free fatty acid mixture comprises palmitoleic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, or combinations thereof.
20. The method of claim 1 in which the culture medium comprises
15 glutamine.
21. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises trace elements.
22. The method of claim 21 in which the trace elements comprise CuSO_4 .
23. The method of claim 21 in which the trace elements comprise H_2SeO_3 .
- 20 24. The method of claim 1 in which the culture medium comprises an antioxidant.
25. The method of claim 24 in which the antioxidant comprises H_2SeO_3 .
26. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises antibiotics.
- 25 27. The method of claim 1 in which the culture medium further comprises epidermal growth factor.
28. The method of claim 1 in which the feeder cells have an origin which comprises a tissue from at least one vertebrate.
29. The method of claim 28 in which the vertebrate comprises an embryo.
- 30 30. The method of claim 29 in which the vertebrate comprises human, non-human primate, pig, dog, rabbit, rat, mouse, or combinations thereof.
31. The method of claim 1 in which the feeder cells are a clone.
32. The method of claim 31 in which the clone is ST05.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

33. The method of claim 1 in which the feeder cells comprise stromal cells.
34. The method of claim 1 in which the feeder cells comprise fibroblasts.
35. The method of claim 1 in which the hepatic progenitors express
intercellular adhesion molecule (ICAM) antigen, do not express major
5 histocompatibility antigen (MHC) class Ia antigen, express MHC class Ib, do not
express OX18, express alpha-fetoprotein, express albumin, express cytoke-
10 racitin-19, or combinations thereof.
36. The method of claim 35 in which the ICAM is ICAM-1.
37. The method of claim 1 in which the hepatic progeny do not express
10 MHC class Ia, express MHC class Ib, do not express ICAM, express OX18, express
alpha-fetoprotein, express albumin, express cytoke-
15 racitin-19, or combinations thereof.
38. The method of claim 37 in which the ICAM is ICAM-1.
39. The method of claim 1 in which the hepatic progenitors, their progeny,
or combinations thereof grow as piled-up colonies.
- 15 40. The method of claim 1 which further comprises cloning the hepatic
progenitors.
41. The method of claim 40 in which the cloning utilizes dilution of the
cell number, cloning collars, growth in agarose, growth on beads, flow cytometry, or
combinations thereof.
- 20 42. The method of claim 1 in which the hepatic progenitors undergo at
least one mitotic cell division.
43. The method of claim 42 in which the hepatic progenitors undergo at
least ten mitotic cell divisions.
44. The method of claim 1 in which the hepatic progenitors give rise to
25 daughter cells having a separate fate.
45. The method of claim 44 in which the daughter cells differentiate into
biliary cells.
46. The method of claim 44 in which the daughter cells differentiate into
hepatocytes.
- 30 47. A method of identifying hepatic growth factors comprising providing
hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and a sample suspected of
comprising at least one hepatic growth factor, combining the progenitors, their
progeny,

WO 02/29012

PCT/US00/27428

or mixtures thereof, and the sample, and observing stimulation of growth of the hepatic progenitors.

48. A method of identifying hepatic differentiation factors comprising providing hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and a sample suspected of comprising at least one hepatic differentiation factor, combining the progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and the sample, and observing differentiation of the hepatic progenitors.

49. A method of identifying a hepatic toxin comprising providing hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and a sample suspected of comprising at least one hepatic toxin, combining the progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and the sample, and observing the death of the hepatic progenitors.

50. A method of developing a drug comprising providing hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and a drug suspected of a capacity to affect hepatic progenitor, metabolisms and combining the progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and the sample, and observing a change in the metabolism of the hepatic progenitors.

51. A method of identifying novel antimicrobials comprising providing hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and at least one agent suspected of having an antimicrobial effect, combining the progenitors, their progeny, or mixtures thereof, and the agent, and observing changes in growth of the hepatic progenitors.

52. A method of preparing an extracorporeal liver comprising providing hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof and culturing the progenitors, their progeny, or mixtures thereof in a bioreactor until a sufficient population is obtained effective to serve as an extracorporeal liver.

53. A method of propagating hepatic progenitors, their progeny, or mixtures thereof comprising:

- (a) providing at least one hepatic progenitor and
- (b) culturing the hepatic progenitor in a culture medium comprising at least one feeder cell biosynthetic product.

54. The method of claim 53 in which the culture medium further comprises glucocorticoid, insulin, epidermal growth factor, nicotinamide, or combinations.

WO 02/29012

PCT/US00/27428

55. The method of claim 53 in which the feeder cell biosynthetic product comprises a peptide, a glycopeptide, a lipopeptide, a lipid, a glycolipid, a carbohydrate, a protein, a glycoprotein, a lipoprotein, or combinations thereof, in which the biosynthetic product enhances the proliferation or differentiation of the hepatic progenitor.
56. The method of claim 53 in which the feeder cell biosynthetic product comprises insulin-like growth factors, interleukin-6 family growth factors, hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor, extracellular matrix, or combinations thereof, in which the biosynthetic product enhances the proliferation or differentiation of the hepatic progenitor.
57. The method of claim 53 in which the at least one hepatic progenitor comprises at least one cell from human, non-human primate, pig, dog, rabbit, rat, or mouse.
58. The method of claim 53 which further comprises cloning the at least one hepatic progenitor.
59. The method of claim 53 further comprising adding a growth factor.
60. The method of claim 59 further comprising adding a differentiation factor to produce hepatocytes, biliary cells, or combinations thereof.

20

* * *

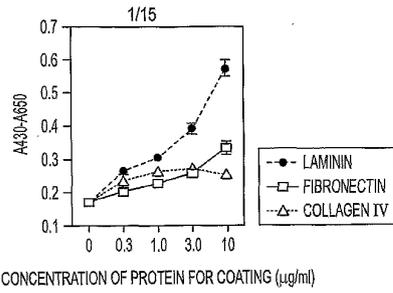


FIG. 1A

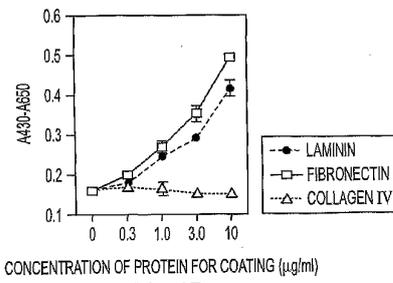


FIG. 1B

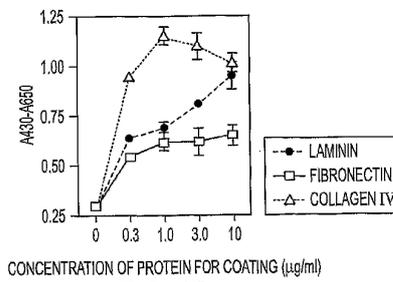


FIG. 1C

WO 02/29012

PCT/US00/27428

2/15

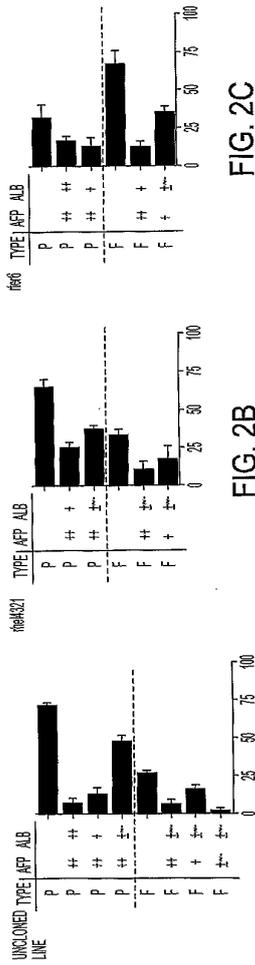


FIG. 2A

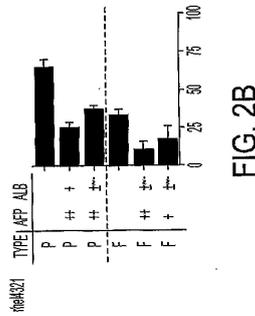


FIG. 2B

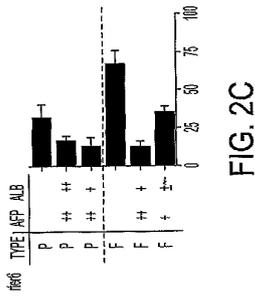


FIG. 2C

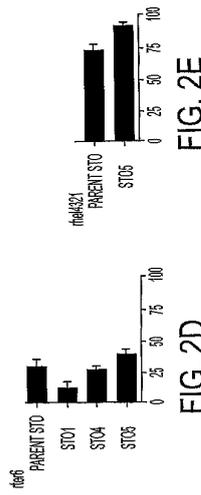


FIG. 2D

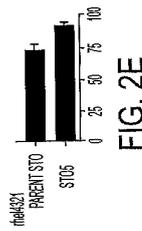


FIG. 2E

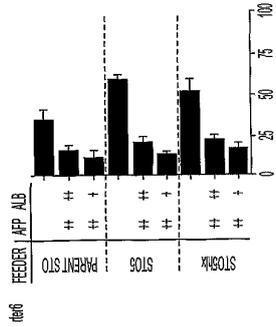


FIG. 2F

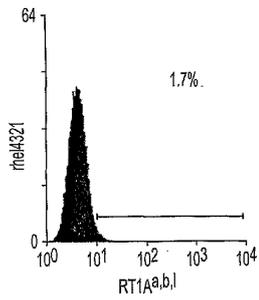


FIG. 3A

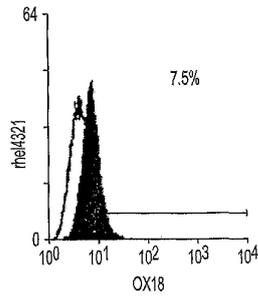


FIG. 3B

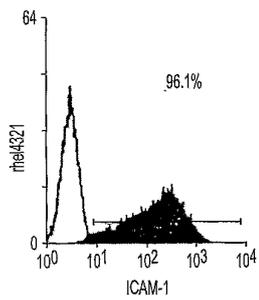


FIG. 3C

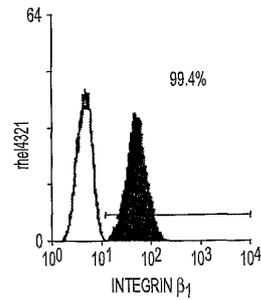


FIG. 3D

WO 02/29012

PCT/US00/27428

4/15

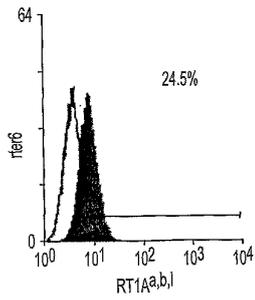


FIG. 3E

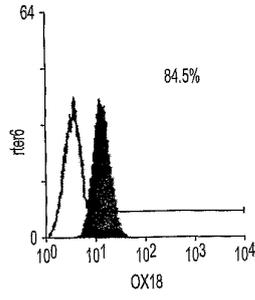


FIG. 3F

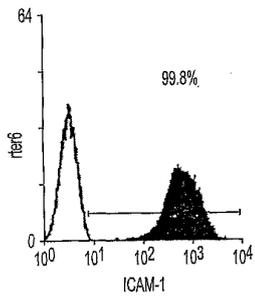


FIG. 3G

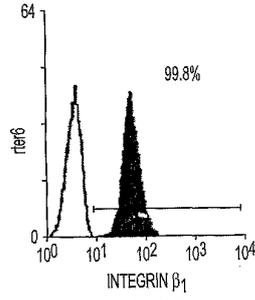


FIG. 3H

WO 02/29012

PCT/US00/27428

5/15

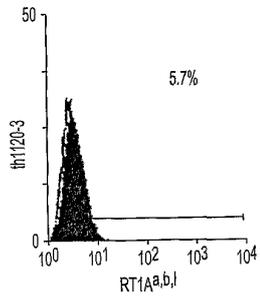


FIG. 3I

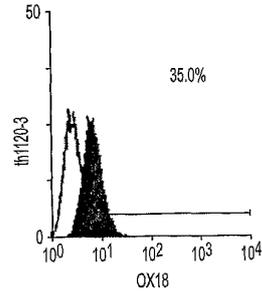


FIG. 3J

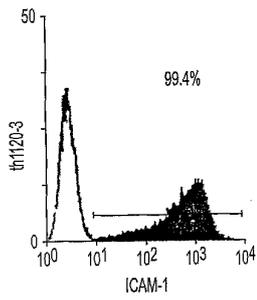


FIG. 3K

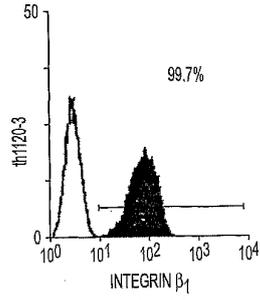


FIG. 3L

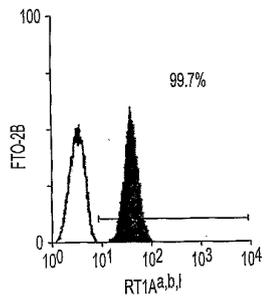


FIG. 3M

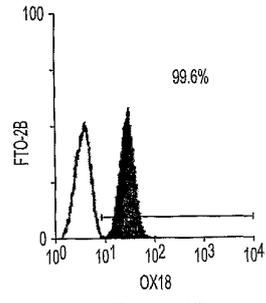


FIG. 3N

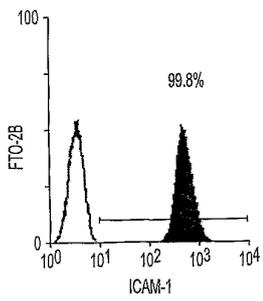


FIG. 3O

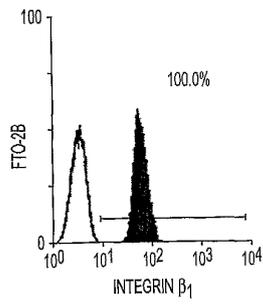


FIG. 3P

WO 02/29012

PCT/US00/27428

7/15

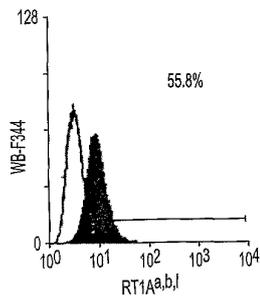


FIG. 3Q

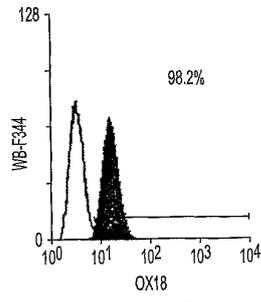


FIG. 3R

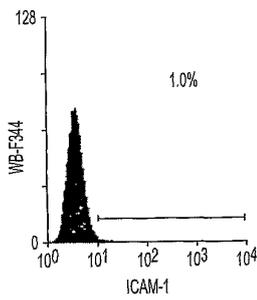


FIG. 3S

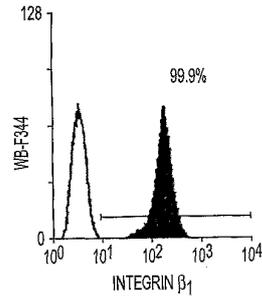


FIG. 3T

WO 02/29012

PCT/US00/27428

8/15

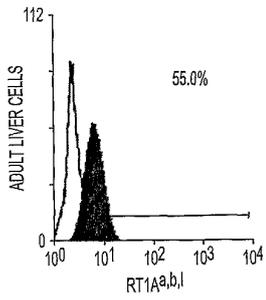


FIG. 3U

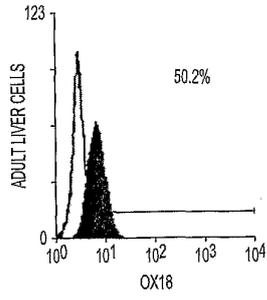


FIG. 3V

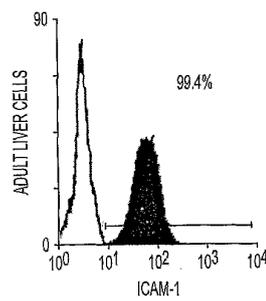


FIG. 3W

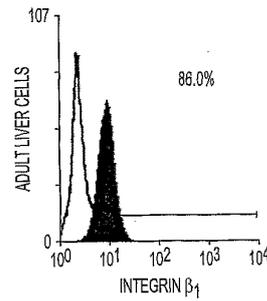


FIG. 3X

9/15

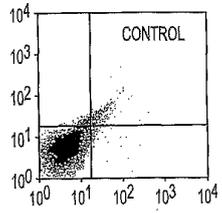


FIG. 4A-1

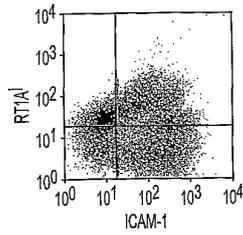


FIG. 4A-2

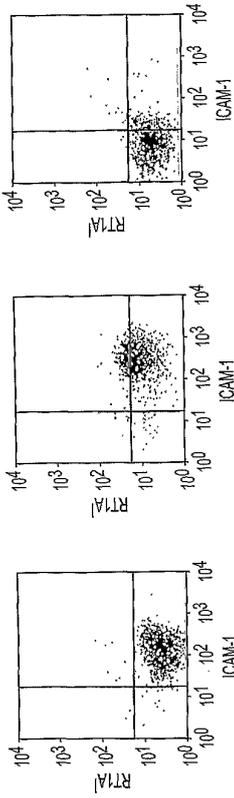


FIG. 4B-1

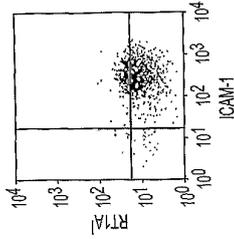


FIG. 4B-2

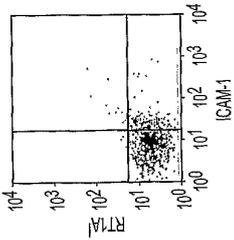


FIG. 4B-3

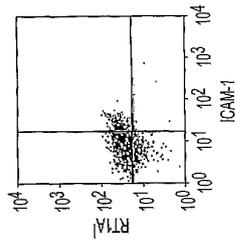


FIG. 4B-4

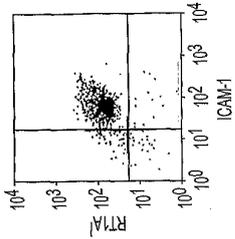


FIG. 4B-5

11/15

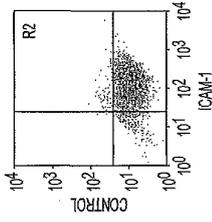


FIG. 4C-2

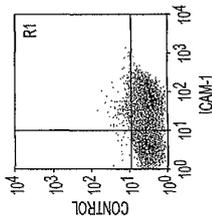


FIG. 4C-1

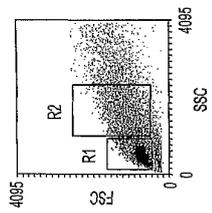


FIG. 4C-3

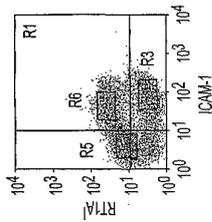
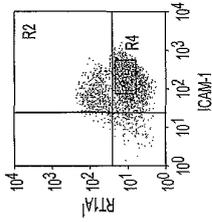


FIG. 4C-4

FIG. 4C-5

12/15

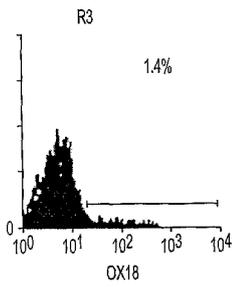


FIG. 4D-1

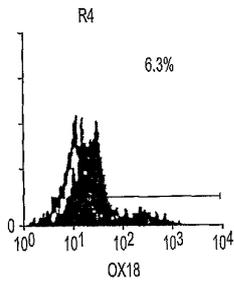


FIG. 4D-2

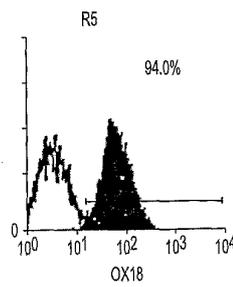


FIG. 4D-3

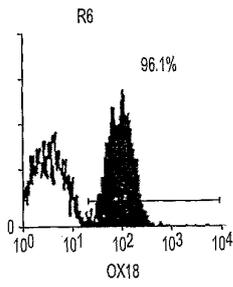


FIG. 4D-4

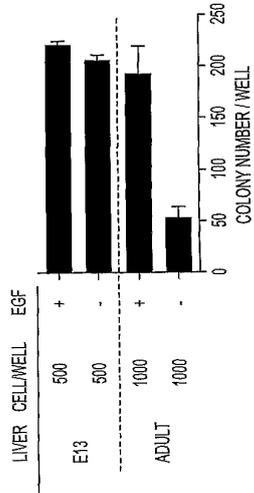


FIG. 5A

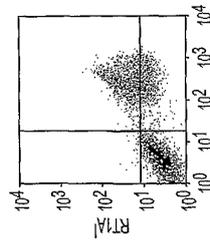


FIG. 5B

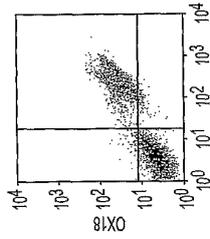


FIG. 5C

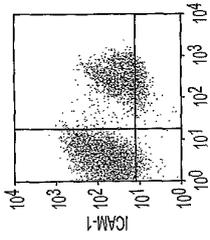


FIG. 5D

14/15

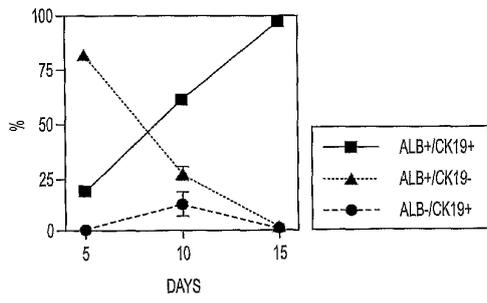


FIG. 6A

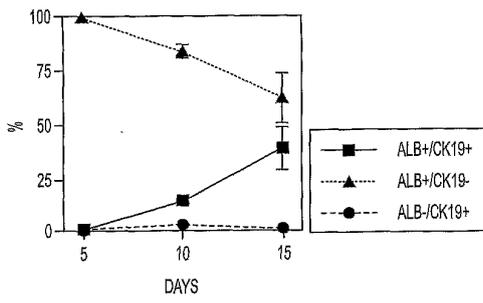


FIG. 6B

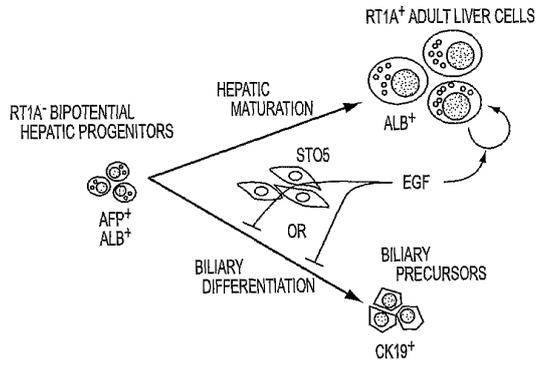


FIG. 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 00/27428
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/50		
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) IPC 7 C12N 601N		
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) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L.E. ROGLER: "Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro." THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 2, February 1997 (1997-02), pages 591-602, XP000993229 Ann Arbor, US	1-6,15, 16,26, 28-30, 34, 39-46, 53-60
Y	the whole document	7-14, 17-25, 27,33, 47-51
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 claims 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 ** 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 May 2001	Date of mailing of the international search report 21/05/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentteam 2 NL - 2299 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ryckebosch, A	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No. PCT/US 00/27428
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 03142 A (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE) 18 February 1993 (1993-02-18) cited in the application page 4, paragraph 4 -page 6, line 23	52
Y	page 14, paragraph 3 -page 15, last line	7-14, 17-25, 27,33, 47-51
Y	US 4 914 032 A (W. KURI-HARUCHI ET AL.) 3 April 1990 (1990-04-03) cited in the application column 3, line 50 -column 4, line 8; example 7	47-51
A	WO 95 13697 A (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY) 26 May 1995 (1995-05-26) page 1, line 1 - line 27; claims	1-60
A	EP 0 682 106 A (RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION OF JAPAN) 15 November 1995 (1995-11-15) page 3, line 1 - line 5; claims	1-60
T	H. KUBOTA ET AL.: "Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 97, no. 22, 24 October 2000 (2000-10-24), pages 12132-12137, XP002166481 Washington, US the whole document	1-60

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/27428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9303142 A	18-02-1993	AU 667680 B	04-04-1996
		AU 2402092 A	02-03-1993
		CA 2115140 A	18-02-1993
		EP 0597964 A	25-05-1994
		JP 7501206 T	09-02-1995
		US 6146889 A	14-11-2000
		US 5576207 A	19-11-1996
		US 5789246 A	04-08-1998
		US 6069005 A	30-05-2000
US 4914032 A	03-04-1990	US 5030105 A	09-07-1991
WO 9513697 A	26-05-1995	AU 1256395 A	06-06-1995
		CA 2177043 A	26-05-1995
		EP 0729297 A	04-09-1996
		JP 9505206 T	27-05-1997
		US 6069005 A	30-05-2000
		ZA 9409180 A	26-07-1995
EP 682106 A	15-11-1995	JP 7274951 A	24-10-1995
		US 6004810 A	21-12-1999
		CA 2146735 A	12-10-1995
		JP 8112092 A	07-05-1996

フロントページの続き

(72)発明者 レイド ローラ エム .

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル スウィーテン クリーク ロード 36
21

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB24 CB01 CB17 CB26 FA37 FB03 FB12 GC10

GC22

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR69 QS24 QX01

4B065 AA90X AC20 BB32 BB34 BB40 CA44