

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 8 月 25 日(25.08.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/102532 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/053875
- (22) 国際出願日: 2011 年 2 月 16 日(16.02.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-031718 2010 年 2 月 16 日(16.02.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 淳史 (SUZUKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 〇 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外 (ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 〇 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: INDUCED HEPATOCYTES

(54) 発明の名称: 誘導肝細胞

(57) Abstract: Hepatocytes can be produced from non-hepatic cells that can be produced at low cost and in an less invasive manner. HNF3 α , HNF3 β , or both HNF3 γ and HNF4 α are introduced into non-hepatic cells. It becomes possible to produce induced hepatocytes from somatic cells other than hepatocytes, such as skin cells. The use of the induced hepatocytes enables the establishment or development of cell transplantation into hepatocytes, artificial liver and drug reactivity tests, which cannot be communalized heretofore from the reason of the difficulty of obtaining the cells, as general medicine.

(57) 要約: 低侵襲、低コストで得られる肝臓細胞以外の細胞から肝臓細胞を生み出すことを課題とする。HNF3 α 、HNF3 β 、又は HNF3 γ 及び HNF4 α を、非肝臓細胞に導入する。本発明により、肝臓細胞以外の体細胞、例えば皮膚細胞から、誘導肝細胞を製造することができる。本発明により得られた誘導肝細胞を利用することで、これまで、細胞の調達の難しさから一般化できなかった肝臓への細胞移植、人工肝臓、薬剤反応性試験を、一般医療として確立・発展させることができる。



WO 2011/102532 A1

明細書

誘導肝細胞

技術分野

[0001] 本発明は、種々の細胞から肝臓細胞を製造する方法に関する。本発明は、ライフサイエンス、医療、薬理に関連する分野で有用である。

背景技術

[0002] ドナー臓器不足が深刻な肝移植に代わる新しい肝疾患治療法として期待される肝細胞移植、劇症肝炎の効果的な治療に向けて開発が進む人工肝臓、そして薬の効果や副作用を評価するための薬剤反応性試験のそれぞれにおいて、肝細胞は必要不可欠な細胞材料である。しかしながら、生体組織から直接採取できる肝細胞の数には限界があり、また肝細胞は生体外で増殖させることが困難なために、肝細胞を用いた医療応用へのステップは実験段階を脱することができていない。

[0003] 一方、肝細胞の新たな供給源として期待される胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)(特許文献1)に関しても、現時点において、これらの細胞から肝細胞を特異的に分化誘導する方法は見出されておらず、さらに、植後の腫瘍形成の危険性や倫理面の問題なども残されている。また、現状の薬剤反応性試験では、主に米国の企業から販売されている死体由来肝細胞や不死化肝細胞が用いられるが、これらの細胞の肝細胞としての機能のレベルは低く、さらにそれらを継続して購入するには莫大な費用がかかる。

[0004] 他方、肝特異的代謝酵素及び血清蛋白質をコードする遺伝子群の転写制御因子群の同定が行なわれている。そのような因子群はHNF(hepatocyte nuclear factor)と呼称され、これまでHNF1 α 、HNF1 β (vHNF1)、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 、HNF4 α 、HNF6、C/EBPファミリー、GATAファミリーが同定されてきた。また、肝発生とは無関係な研究から、肝発生や肝芽細胞に関与する遺伝子群として、Hlx遺伝子、Hex遺伝子、Prox1遺伝子が同定されてきた。より詳細には、骨髄由来のヒト間葉系幹細胞にHNF3 β を発現させて肝細胞様の細胞に分化させたという報告(非特許文献1)、脂肪由来のヒト間葉系幹細胞から肝細胞様の細胞を分化誘導したという報告(非特許文

献2)がある。また本発明者らは、マウス胎仔肝幹細胞(肝芽細胞)から肝細胞の分化機序について報告してきた(非特許文献3)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1： 国際公開WO2007/069666

非特許文献

[0006] 特許文献1： Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, Ikeda R, Terabayashi K, Matsumi Y, Gonda K, Okamoto H, Takubo K, Tajima F, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):597-606.

特許文献2： Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007 Jul; 46(1):219-28.

特許文献3： Suzuki A., Iwama A., Miyashita H., Nakauchi H., Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130, 2513-2524, 2003.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 肝細胞は利用価値の極めて高い細胞であるが、医療利用可能な質や量を満たすものを、安全かつ簡便に入手する方法は確立されておらず、肝細胞の医療応用にとって大きな問題となっている。この問題を解消し、肝細胞の医療利用を実現させるためには、低侵襲、低コストで得られる細胞から肝細胞を生み出すといった、これまでにない、画期的な新技術の開発が必要と考えられる。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、肝臓の発生過程において肝細胞分化に関連する12個の転写因子を選択した。そして、それらをコードする遺伝子をレトロウイルスに組み込み、マウス胎仔繊維芽細胞(MEF)に感染させたところ、HNF4α + HNF3α、HNF4α +

HNF3 β 、又はHNF4 α + HNF3 γ の遺伝子セットを導入した場合において、アルブミンや α -fetoprotein (AFP)、*E-cadherin*の強い発現誘導が認められた。また、MEFに対してHNF4 α とHNF3 β を導入し、適当な条件で培養を行ったものが、MEFとは完全に異なる上皮様の細胞形態を示し、*E-cadherin*、アルブミン、サイトケラチン 8-18のほか、肝細胞の中期分化マーカーである α -1-アンチトリプシンの発現も認められたことから、本発明を完成した。

[0009] 本発明は以下を提供する。

- 1) 非肝臓細胞から誘導肝細胞を製造する方法であって、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ 及びHNF4 α (好ましくは、HNF3 γ 及びHNF4 α)を、非肝臓細胞に導入する工程を含む、方法。
- 2) HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子 (好ましくは、HNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子)を、非肝臓細胞に導入する工程を含む、1)記載の製造方法。
- 3) 非肝臓細胞が、ヒト由来である、1)又は2)に記載の製造方法。
- 4) 1)～3)のいずれかーに記載の製造方法で製造された誘導肝細胞又はその子孫を含む、人工肝臓組織。
- 5) 非肝臓細胞に由来し、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子 (好ましくは、HNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子)が導入されている細胞。
- 6) HNF3 α 、HNF3 β 又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子 (好ましくは、HNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子)が導入された非肝臓細胞から誘導された、*E-cadherin*陽性であり、アルブミン、サイトケラチン-8、サイトケラチン-18又は α -1-アンチトリプシンを発現可能である細胞。
- 7) HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ とHNF4 α とからなる (好ましくは、HNF3 γ とHNF4 α とからなる)、非肝臓細胞から誘導肝細胞を製造する方法において使用するための、因子セット (例えば、キット)。
- 8) HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子とHNF4 α をコードする遺伝子 (好ましくは、HNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子)とからなる、

非肝臓細胞から誘導肝細胞を製造する方法において使用するための、遺伝子セット(例えば、キット)。

9) HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子とHNF4 α をコードする遺伝子(好ましくは、HNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子)が導入された非肝臓細胞を、成長因子の存在下で(所望により、細胞外マトリクス上で)、培養する工程を含む、誘導肝細胞の製造方法。

10) 5)に記載の細胞を移植する工程を含む、肝臓への細胞移植方法。

11) 5)に記載の細胞を用いる工程を含む、疾患の処置方法。

12) 5)に記載の細胞を用いる工程を含む、薬剤反応性の評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明により、肝臓細胞でない体細胞、例えば皮膚細胞から、肝臓細胞を製造することができる。本発明により得られた肝臓細胞を利用することで、これまで、細胞の調達の難しさから一般化できなかった肝細胞移植、人工肝臓、薬剤反応性試験を、一般医療として確立・発展させることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] (12因子から1因子除いたときの遺伝子発現誘導効果) 図1は、選択した肝細胞分化に関連する12個の転写因子の遺伝子発現誘導効果を示したグラフである。12個すべてを導入したMEFでは、アルブミン、 α -fetoprotein及びE-cadherinの遺伝子発現が認められた。12因子から1因子を除いた遺伝子セットを導入したMEFでは、HNF4 α 又はHNF6を除いた群でアルブミンの遺伝子発現が減少し、HNF4 α 又はHNF1 β を除いた群で α -fetoproteinの遺伝子発現が減少したが、E-cadherinの遺伝子発現を著しく低下させる群は見られなかった。

[図2] (1因子+HNF4 α の遺伝子発現誘導効果) 図2は、HNF4 α と他の1因子の同時導入の効果を示したグラフである。HHNF4 α +HNF3 α 、HNF4 α +HNF3 β 又はHNF4 α +HNF3 γ の遺伝子セットを導入した場合に、アルブミンや α -fetoprotein、E-cadherinの強い発現誘導が認められた。

[図3] (HNF4 α とHNF3 β の遺伝子導入後における上皮様細胞の増殖) 図3は、誘導された上皮様細胞の写真である。HNF4 α とHNF3 β を導入したMEFをI型コ

ラーゲンコートディッシュに移し、肝幹細胞用培地を用いて培養を行ったところ、細胞形態が MEFとは完全に異なる上皮様の細胞が出現した。

[図4] (HNF4 α とHNF3 β の導入によって出現する上皮様細胞におけるE-cadherin、アルブミン、CK8-18、 α -1-アンチトリプシンの発現) 図4は、HNF4 α とHNF3 β を導入した上皮様細胞の蛍光染色写真である。MEFから誘導された上皮様細胞のすべてが E-cadherin陽性であり、かつ、E-cadherinが細胞接着領域に局在していた。また、E-cadherin陽性細胞の多くが、アルブミンやサイトケラチン8-18を発現していた。また、 α -1-アンチトリプシンの発現も認められた(グラフ)。

[図5] (MEF由来上皮様細胞による肝臓組織の再構築) 図5は、MEFから誘導された上皮様細胞をFAHノックアウトマウスの肝臓へ移植し、1ヶ月経過したときの写真である。細胞がFAH陽性の成熟した肝細胞として FAHノックアウトマウスの肝臓組織中に生着し、肝臓組織を再構築していることが判明した。この結果から、HNF4 α と HNF3 β の導入によってMEFから誘導された上皮様細胞は、肝臓組織再構築能を有した肝上皮細胞であることが明らかとなった。なおコントロールではMEFを移植した。

[図6A] 図6Aは、HNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ それぞれをコードする遺伝子(マウス)のヌクレオチド配列を示したものである。

[図6B] 図6Bは、HNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ それぞれをコードする遺伝子(ヒト)のヌクレオチド配列を示したものである。

[図7] 図7は、HNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ それぞれのアミノ酸配列(マウス及びヒト)を示したものである。

[図8] (HNF4 α とHNF3 γ の導入によるヒト皮膚由来繊維芽細胞における遺伝子発現誘導効果) 図8は、ヒトの皮膚由来繊維芽細胞に対するHNF4 α とHNF3 γ の同時導入による遺伝子発現誘導効果を示したグラフである。マウスと同様に、アルブミンや α -fetoprotein、E-cadherinの強い発現誘導が認められた。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、特定の因子のセットを種々の細胞に導入することにより、肝臓細胞を製造することができる。

[0013] [肝臓細胞を製造するための因子セット]

本発明の肝臓細胞を製造するための因子セットは、本発明者が、肝芽細胞(肝幹/前駆細胞)又は内胚葉細胞で発現し、肝細胞分化に関係するか又はその可能性があると考えた12の因子、具体的にはHex、GATA4、GATA6、Tbx3、C/EBP α 、HNF1 α 、HNF1 β 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 、HNF4 α 及びHNF6からなる群から選択されたものである。

[0014] 本発明の因子セットは少なくともHNF4 α を含む。好ましい態様では、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ 及びHNF4 α を含むことを特徴としており、特に好ましい態様では、HNF4 α 、及びHNF3 β を含む。

[0015] これらの因子はいずれもヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する因子である。本発明においては、特に示した場合を除き、用いる因子は哺乳類動物のいずれに由来してもよい。本発明には、例えばマウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ、サル、ヒト由来の因子を用いることができる。

[0016] 本発明に用いる因子は、特定のisoformに限定されない。ヒトでは、少なくともHNF4 α に6個、HNF3 β に2個のisoformがあるが、本発明においてはいずれも用いることができる。

[0017] 本発明に特に関係のある因子及びその因子をコードするマウス及びヒト遺伝子のヌクレオチド配列のNCBI accession Noを下表に示す。

[0018] [表1]

名 称	特 徴	NCBI accession No. (マウス)	NCBI accession No. (ヒト)
HNF3 α	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、 内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_008259	NM_004496
HNF3 β	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、 内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_010446	NM_021784 NM_153675
HNF3 γ	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、 内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_008260	NM_004497
HNF4 α	核内受容体ファミリーに属する転写因子、 肝細胞の分化や細胞増殖制御に関与	NM_008261	NM_178849 NM_000457 NM_178850 NM_175914 NM_001030003 NM_001030004

[0019] 本出願に含まれる配列表には、配列番号1～4として、順に、マウスの HNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 遺伝子のヌクレオチド配列が示されている。また、配列番号5～10として、ヒトHNF4 α の6つのisoform、配列番号：11としてヒトHNF3 α 、配列番号：12及び13としてヒトHNF3 β の2つのisoform、配列番号：14として、ヒト HNF3 γ 遺伝子のヌクレオチド配列が示されている。各因子のアミノ酸配列は、遺伝子配列から導くことができる。本出願に含まれる配列表には、配列番号15～18として、順に、マウスのHNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ のアミノ酸配列が示されている。また、配列番号19～24として、ヒトHNF4 α の6つのisoforms (transcript variants 1-6)、配列番号：25としてヒトHNF3 α 、配列番号：26及び27としてヒトHNF3 β の2つの isoform、配列番号：28として、ヒトHNF3 γ のアミノ酸配列が示されている。

[0020] 本発明者の検討によると、マウス由来細胞を用いた実験では、HNF4 α +HNF3 α 及びHNF4 α +HNF3 β でも遺伝子発現誘導が起こるが、HNF4 α とHNF3 γ の組み合わせにおける遺伝子発現誘導効果が最も大きいという傾向がみられた。また、ヒト由来細胞でも、HNF4 α +HNF3 α 及びHNF4 α +HNF3 β で遺伝子発現誘導が得られることを確認したが、マウスと同様に、HNF4 α とHNF3 γ との組み合わせが最も効果的であるとの傾向であった。また、マウス由来細胞を用いた実験では、最終的に得られた細胞は、上記のどの組み合わせで因子を導入した場合であっても、アルブミン分泌能や遺伝子発現プロファイルなどには違いはあるが、大差は認められなかった。さらに、ヒト由来細胞を用いてHNF4 α のtranscript variants 1～5を試験した結果では、transcript variants 1～3、特にtranscript variant 3の効果が高いように思われた。

[0021] 本発明の範囲には、上述の因子及び当該因子をコードする遺伝子のほか、それらの変異体の使用も含まれる。すなわち、本発明で、ある因子をいうときは、特に記載した場合を除き、いずれも、(a) 配列表に示された、該当する配列番号のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b) 当該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、かつ当該因子の機能を有するタンパク質、並びに(c) 当該アミノ酸配列と少なくとも90%(好ましくは95%、より好ましくは98%)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ当該因子の機能を有するタンパク質を含む。また、本発明で、ある因子を

コードする遺伝子をいうときは、特に記載した場合を除き、いずれも、(d) 配列表の該当する配列番号のヌクレオチド配列からなる遺伝子；(e) 当該ヌクレオチド配列と相補的な配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ当該因子の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子；(f) 当該ヌクレオチド配列と少なくとも90%(好ましくは95%、より好ましくは98%)の同一性を有し、かつ当該因子の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子；並びに(a)～(c)のいずれか一のタンパク質をコードする遺伝子を含む。

[0022] このような変異体を得る手法は、当業者にはよく知られている。なお、ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、6M尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件又はこれと同等のハイブリダイゼーション条件を指し、さらに必要に応じ、本発明には、よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M尿素、0.4% SDS、0.1×SSC又はこれと同等のハイブリダイゼーション条件を適用してもよい。それぞれの条件において、温度は約40℃以上とすることができ、よりストリンジェンシーの高い条件が必要であれば、例えば約50℃、さらに約65℃としてもよい。アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の相同性は、カーリン及びアルチュールによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268、 1990、 Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993)を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0023] 本発明の因子セットは、上述の因子のほか、他の因子を含むことができる。他の因子及びその因子をコードするマウス及びヒト遺伝子のヌクレオチド配列のNCBI accession Noを下表に示す。

[0024]

[表2]

名 称	特徴	NCBI accession No. (マウス)	NCBI accession No. (ヒト)
Hex	ホメオドメイン型転写因子、肝発生時における肝芽細胞の移動と分化に関与	NM_008245	NM_002729
GATA4	GATA 転写因子ファミリーに属する転写因子、内胚葉の発生に関与	NM_008092	NM_002052
GATA6	GATA 転写因子ファミリーに属する転写因子、肝発生に関与	NM_010258	NM_005257
Tbx3	T-box 転写因子ファミリーに属する転写因子、肝発生時における肝芽細胞の増殖と肝細胞への分化に関与	NM_198052	NM_005996
C/EBP α	塩基性アミノ酸ジペプチドドメインを有する転写因子、肝発生時における肝細胞の分化に関与	NM_007678	NM_004364
HNF1 α	ホメオドメイン型転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_009327	NM_000545
HNF1 β	ホメオドメイン型転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与、胆管細胞の分化・成熟に関与	NM_009330	NM_000458
HNF6	ホメオドメイン型転写因子、肝発生時における肝芽細胞の肝細胞分化、及び、胆管細胞の分化・成熟に関与	NM_008262	NM_004498

[0025] なお転写因子Tbx3は、本発明者らが同定し、報告したものである(Suzuki A., Sekiya S., Buscher D., Izpisua Belmonte J.C., Taniguchi H. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. Development 135, 1589-1595, 2008.)。

[0026] 本明細書の実施例の結果(図 1)からは、HNF1 β やHNF6の影響も検討する必要があると思われる。

[0027] 本発明の肝臓細胞を製造するための因子セットは、上述の具体的に説明した因子に加えて、さらに別の因子を1又は2以上含むことができる。このような因子は、例えば、HNF3 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 及びHNF4 α からなる群から選択される一以上を発現させた体細胞に、種々の候補因子をコードする遺伝子を導入し、さらに高い確率で肝臓細胞を誘導することができた細胞を選択することにより、選抜することができる。

[0028] 本発明に用いられる因子は、その因子をコードする遺伝子から産生されるタンパク質自体のほか、そのタンパク質と別のタンパク質又はペプチドなどとの融合タンパク質の形態であってもよい。例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質やヒスチジンタグなどのペプチドとの融合タンパク質であってもよい。また、PTD(protein transduction domain)ペプチドとの融合タンパク質であってもよい。

このような融合タンパク質の調製方法は当業者によく知られている。

[0029] [導入手段]

本発明の、肝臓細胞を調製する方法は、特定の因子を対象細胞に導入する行程を含むが、この行程を実施するための具体的な手段は、特に限定されない。各因子は、本来、細胞内で遺伝子から転写され、翻訳され、タンパク質(転写因子)として機能していると考えられるので、因子を細胞へ直接導入することにより、又は因子をコードする遺伝子を物理化学的又はウイルスベクターを用いて細胞内に導入することにより、目的の効果を達成しうる。

[0030] 因子を細胞へ直接導入する手段の典型的な例は、膜透過機能を有するPTDペプチド(例えば、AntP、HIV/TAT、HSV/VP-22)を結合させることによる。この方法は、*in vivo*個体に応用でき、また既存のトランスフェクションでは遺伝子導入の困難な細胞を含むほぼすべての細胞に導入することができる点で優れている。また、細胞に対する煩雑な遺伝子導入操作を回避して、融合タンパク質を培養環境に添加するだけで因子を導入することができる点で、優れている。目的タンパク質とPTDの融合タンパク質の調製方法や、対象細胞内へ融合タンパク質を導入するための条件等は、当業者にはよく知られている。

[0031] 遺伝子を物理化学的に細胞内に導入する手段の例は、リン酸カルシウム法／リポフェクション法、エレクトロポレーション法、超音波遺伝子導入法、遺伝子銃による導入法、組換えイムノジーン法である。これらの方法はいずれも、当業者によく知られている。

[0032] 遺伝子をウイルスベクターを用いて細胞内に導入する際に用いられるウイルスベクターの例は、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターである。因子をコードする遺伝子を組み込んだベクターの作製、細胞への感染方法等は、当業者によく知られている。増殖能の低い細胞にも高い効率で遺伝子導入できるとの観点からは、レンチウイルスベクターによる方法が好ましいであろう。

[0033] 目的の遺伝子が導入されたか否かは、当業者であれば適宜行うことができる。例えば、ベクター上で、導入する遺伝子の下流にIRES(internal ribosome entry

site)を挟んでマーカー遺伝子(蛍光タンパク質をコードする遺伝子、薬剤耐性遺伝子等)をつないでおき、目的の遺伝子の産物と同時にマーカーを発現できるようにして、目的の遺伝子が導入された細胞を選抜又は可視化することができる。2つの目的遺伝子が同時に導入されているかどうかは、各々異なるマーカー遺伝子、例えば一方の目的遺伝子をGFP(緑色)につなぎ、もう一方の目的遺伝子をRFP1(赤色)につないだコンストラクトを作製することにより、確認できる。また、遺伝子導入された細胞を細胞株としてクローン化することができれば、細胞全体に対するPCRやサザンブロットティングで導入遺伝子の有無を確認できる。

[0034] [因子が導入される対象細胞]

本発明においては、因子が導入される対象細胞は、非肝臓細胞(non-hepatic cell)である。本発明で「非肝臓細胞」というときは、特に記載した場合を除き、後述する肝臓細胞以外の細胞をいう。

[0035] 因子が導入される対象細胞は、いずれの動物に由来してもよい。本発明は、例えばマウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ、サル、又はヒト由来の細胞を対象とすることができる。

[0036] 因子が導入される対象細胞は、胚性幹細胞(ES細胞)でも人工多能性幹細胞(iPS細胞)であってもよく、それ以外の体細胞であってもよい。胚性幹細胞(ES細胞)とは、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる幹細胞細胞株をいう。及び人工多能性幹細胞(iPS細胞)とは、体細胞へ特定の因子を導入することにより、ES細胞のように非常に多くの細胞に分化できる分化万能性と、分裂増殖を経てもそれを維持できる自己複製能を有する細胞をいう。

[0037] 体細胞には、何種類かの異なる機能を持つ細胞に分化する能力を持った幹細胞(例えば、間葉系幹細胞)と、ある機能に特化してしまいそれ以外の細胞にならない分化した細胞(例えば、繊維芽細胞、成体皮膚細胞)とが含まれる。

[0038] 因子が導入される対象細胞は、生殖系の細胞や、生殖系細胞由来の細胞、羊膜細胞(胎盤の細胞等を含む。)であってもよい。

[0039] 本発明を用いて肝臓細胞を製造するにあたり、用いる対象細胞は特に限定されず、胎児期の細胞でもよく、成熟した成体由来の細胞であってもよい。

[0040] レトロウイルスによって遺伝子を導入する場合、活発に増殖できる細胞を選択することが好ましい場合がある。この例として、胎児由来の繊維芽細胞と、成体骨髄由来の間葉系幹細胞を挙げることができる。

[0041] 本発明により得られた肝臓細胞をヒトの疾病の治療に用いるとの観点からは、用いる対象細胞はヒト(成人)由来のもの、例えば皮膚細胞から得た繊維芽細胞であることが好ましく、また患者本人又は患者と同系のヒトから分離した細胞を用いることが好ましい場合がある。

[0042] [肝臓細胞、誘導肝細胞]

本発明で「肝臓細胞(hepatic cell)」というときは、特に記載した場合を除き、胎児又は成体の、肝臓を構成する細胞、肝前駆細胞(hepatic progenitor cell) (肝幹細胞ということもある。)、及び部分的に肝細胞へ分化した細胞を含む。肝臓を構成する細胞は、肝実質細胞(肝細胞(hepatocyte))及び肝非実質細胞(類洞内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞、等)を含む。

[0043] 本発明により、非肝臓細胞から肝臓細胞の機能を有する細胞へ誘導された細胞を、既存の肝臓細胞と区別するため、誘導肝細胞(induced hepatocytes, iHeps)とすることができる。誘導肝細胞には、肝細胞様のもののほか、肝前駆細胞様のもの、又は部分的に肝細胞へ分化した細胞様のものが含まれる。

[0044] ある因子が導入された細胞が誘導肝細胞となったかどうかは、当業者であれば肝細胞分化マーカーであるアルブミンの発現の有無、肝細胞の中期分化マーカーである α -1-アンチトリプシンの発現の有無、グリコーゲン蓄積能の有無を指標に、及び／又は形態学的な観察により、判断することができる。場合により、 α -fetoproteinの発現を確認してもよい。また特定の肝細胞については、サイトケラチン8及び／又はサイトケラチン18(CK 8/18)の発現の有無、コレステロールから胆汁酸への生合成経路の初発段階反応を触媒するCYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxylase)の発現の有無、上皮細胞の代表的な接着分子であるE-cadherinの発現の有無を指標に判断してもよい。

[0045] [誘導方法]

本発明においては、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ 及びHNF4 α を導入された細胞は、

必要であれば標準的な培地(例えば、SCM(後掲参照文献1~4参照))で数時間~数週間、例えば2週間前後培養した後、適当な培養条件で培養することにより、肝臓細胞の機能を有する細胞へと誘導されうる。適当な培養のための条件は、細胞を維持する環境に成長因子が含まれ、所望により細胞外マトリクスが存在する培養条件下での培養を意味する。培地は、後掲参照文献2に記載の標準培地を好ましく用いることができる。

[0046] 培養のための環境に含まれうる成長因子の例は、肝臓細胞成長因子(hepatocyte growth factor, HGF)及び上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)等のサイトカインである。HGF及びEGFを含む培地が好ましい。

[0047] 培地中の成長因子の濃度は、誘導が可能であるかぎり、特に限定されず、また用いる成長因子の種類によっても異なるが、EGFの場合には、10~40ng/mL、好ましくは20ng/mL程度であり、HGFの場合は、10~50ng/mL、好ましくは20~40ng/mLである。

[0048] 成長因子の由来は特に限定されず、ヒト組換え体であってもよい。

[0049] 細胞外マトリクスの例は、コラーゲン(例えば、I型コラーゲン、IV型コラーゲン)、ラミニンである。I型コラーゲンを用いることが好ましい。

[0050] 細胞外マトリックスは、培養基材のコーティング剤として用いられることが好ましい。細胞外マトリックスによる培養容器のコーティングは、用いる細胞外マトリックスの種

[0051] 類に応じて当分野で通常実施されている方法によって行なうことができる。

[0052] 本発明において因子が導入される対象となる細胞として、ヒト成人由来の細胞を用いる場合、マウス由来の細胞に比べると殖能が低い場合が多いが、本発明の実施例で用いている誘導のための培地は、ヒト組換え成長因子を用いていることもあり、ヒト由来細胞にも適用することができる。得られた誘導肝細胞を医療に応用する際には、血清フリーで、かつ他生物由来の物質を排除した培養系により細胞が誘導されることが好ましい。

[0053] 誘導のための培養においては、培養容器にも特に限定はなく、例えば、フラスコ、ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロウエルプレート、培養バック、

ローラーボトルが用いられる。その他の培養条件は、肝臓細胞の培養のために知られた種々の条件を応用することができる。例えば、培養温度は、30～40℃、好ましくは37℃である。CO₂濃度は、例えば1～10%、好ましくは2～5%である。

[0054] 誘導のための培養は、通常、1日～数週間、好ましくは1週間～3週間、例えば2週間、継続して行うことができる。培養の適切な段階で、上述の肝細胞分化マーカーの発現の有無の確認や、形態的な観察を行うことにより、培養の終点や、次の段階、例えば、肝臓組織構築のために、三次元培養可能な培養器への細胞の継代や、個体への投与へ移行する段階を決定することができる。

[0055] 本発明者らの検討によると、MEFに対して HNF4 α と HNF3 β を導入することにより得られた細胞は、適切な条件での培養により、肝細胞マーカーを発現する上皮様の増殖を続ける細胞集団となり、その後の継代や凍結保存も可能なものであった。このことは、得られた細胞集団には分化した細胞に加え、より未分化な前駆細胞が混在していることを示しているといえる。

[0056] [用途]

本発明の方法により製造された細胞の用途は特に限定されず、細胞を利用して行われているあらゆる試験・研究、肝臓細胞を用いた疾病の治療などに使用することができる。例えば、本発明により得られた誘導肝細胞は又はその子孫は、*in vitro*又は*in vivo*で、人工肝臓組織を構成しうる。本発明により得られた誘導肝細胞又はその子孫を適切な方法で患者に投与することにより、肝臓への細胞移植を達成しうる。このような移植技術は、肝臓の一部切除及び／又は肝臓移植によって処置可能なものを含む各種肝臓疾患、例えば、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、自己免疫性肝炎、肝癌、肝細胞癌、胆管細胞癌、転移性肝癌、肝膿瘍、先天代謝異常症候群(例えば、遺伝性高チロシン血症Ⅰ型(フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ欠損症、肝腎型チロシン血症))等の疾患又は状態の処置のために有効であろう。本発明は、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ とHNF4 α とを用いる、肝臓疾患の処置方法を提供する。

実施例 1

[0057] 方法

細胞培養

マウス胎仔繊維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts (MEF))を マウス胎仔(C57BL/6 E13.5)から得て、10% ウシ胎児血清(fetal bovine serum (FBS))、L-glutamine (2 mmol/L)及びpenicillin/streptomycinを含むDME培地(Dulbecco's modified Eagle medium)で培養した。増殖中のMEFに対し、レトロウイルスによる遺伝子導入を5回繰り返した。

[0058] 最終導入から1日後、培地をSCM(standard culture medium、参照文献1～4)に交換した。SCM培地は、DMEM及びF-12 (Nacalai Tesque)の1:1混合物に下記を添加したものである。

10% FBS

insulin (1 µg/mL) (Wako, Tokyo, Japan)

dexamethasone (1x10⁻⁷ mol/L) (Sigma)

nicotinamide (10 mmol/L) (Sigma)

L-glutamine (2 mmol/L),

β-mercaptoethanol (50 µmol/L) (Sigma)

penicillin/streptomycin

[0059] SCM培地で2週間培養した後、細胞をタイプIコラーゲンコートディッシュ (Iwaki Glass, Tokyo, Japan)上に置き換え、ヒト組換え肝臓細胞成長因子(human recombinant hepatocyte growth factor, HGF))20 ng/mL(Sigma)及び上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)) (20 ng/mL) (Sigma)を含む培地で培養した。

[0060] 遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan)を用いて、キット付属のマニュアルに従い、total RNAを得た。TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Japan) 及び Applied Biosystems 7300 リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用い、Quantitative PCR (qPCR)を実施した。*E-cadherin* (TaqMan Gene Expression Assay ID: Mm00486909_g1) (Applied Biosystems)を除き、PCRプライマー及びプローブの情報は文献1～3に示されている。

[0061] レトロウイルス産生

レトロウイルスベクターpGCsam (murine stem cell virus, MSCV)(文献1参照)を用いた。下記の、12因子をコードするマウス由来の遺伝子各々を、ベクターにサブクローニングした。

[0062] [表3]

遺伝子	特徴	NCBI accession No (配列表中の配列番号)	対応するアミノ酸配列 (配列表中の配列番号)
Hex	ホメオドメイン型転写因子、肝発生時における肝芽細胞の移動と分化に関与	NM_008245	
GATA4	GATA 転写因子ファミリーに属する転写因子、内胚葉の発生に関与	NM_008092	
GATA6	GATA 転写因子ファミリーに属する転写因子、肝発生に関与	NM_010258	
Tbx3	T-box 転写因子ファミリーに属する転写因子、肝発生時における肝芽細胞の増殖と肝細胞への分化に関与	NM_198052	
C/EBP α	塩基性アミノ酸領域とロイシンジッパーを有する転写因子、肝発生時における肝細胞の分化に関与	NM_007678	
HNF1 α	ホメオドメイン型転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_009327	
HNF1 β	ホメオドメイン型転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与、胆管細胞の分化・成熟に関与	NM_009330	
HNF3 α	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_008259 (配列番号: 2)	(配列番号: 16)
HNF3 β	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_010446 (配列番号: 3)	(配列番号: 17)
HNF3 γ	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_008260 (配列番号: 4)	(配列番号: 18)
HNF4 α	核内受容体ファミリーに属する転写因子、肝細胞の分化や細胞増殖制御に関与	NM_008261 (配列番号: 1)	(配列番号: 15)
HNF6	ホメオドメイン型転写因子、肝発生時における肝芽細胞の肝細胞分化、及び、胆管細胞の分化・成熟に関与	NM_008262	

[0063] レトロウイルスを生産するため、gag遺伝子及びpol遺伝子を含むがenv遺伝子を含まない293細胞に、プラスミドDNA、VSV-G env発現プラスミド(pCMV-VSV-G) (H. Miyoshi氏より供与)の混合物をポリエチレンイミン(PEI)(Polysciences Inc., Warrington, PA)とともに供給し、そして感染細胞からの上清を集め、9000 g、4°Cで12時間遠心してウイルスを濃縮した。

[0064] 感染には、12-well培養プレートの各wellに対して140倍濃縮ウイルス50 μ Lを用いた。

[0065] 免疫染色

組織及び培養した細胞を固定し、抗アルブミン抗体(Biogenesis, Poole, UK)、抗E-

*cadherin*抗体(BD Biosciences)、抗Cytokeratin (CK) 8-18抗体(Progen, Heidelberg, Germany、CK8とCK18の両分子を検出することができる。)、及び抗 *fumarylacetoacetate hydrolase* (FAH)抗体(R. M. Tanguay氏より供与)を一次抗体としてインキュベートした。洗浄後、組織及び細胞に、HRP(horse radish peroxidase)標識二次抗体(1:500; Dako)、又はAlexa 488-及び/若しくはAlexa 555-標識二次抗体(1:200; Molecular Probes, Eugene, OR)を加え、4',6-diamino-2-phenylindole(DAPI)とともにインキュベートした。

[0066] 細胞移植

MEFから誘導された上皮様細胞(又はコントロールではMEF)をトリプシン処理し、洗浄し、200 μ lのSCMに懸濁して、門脈経由で注入することにより、FAH欠損マウス(FAH^{-/-}、参照文献4)の肝臓に細胞を移植した(1×10^7 cells/mouse)。FAH^{-/-}マウスは、遺伝性高チロシン血症I型のモデルとして知られており、通常は7.5 mg/lの2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) (Swedish Orphan International)を含む水を与えて維持しているが、細胞移植後は、この処置を停止した。

[0067] 2. 結果

繊維芽細胞を肝細胞に変化させるリプログラミング因子の同定

肝臓の発生過程において肝細胞分化に関連する 12個の転写因子をコードする遺伝子をレトロウイルスに組み込み、マウス胎仔繊維芽細胞(MEF)に感染させた。

[0068] 感染から2週間後、12因子すべてを導入した MEFでは、肝細胞及び肝前駆細胞で発現するアルブミンや *α -fetoprotein*、及び、上皮細胞マーカーである *E-cadherin*の遺伝子発現が認められた(図 1)。そこで次に、12因子の中で肝細胞へのリプログラミング機能を有する遺伝子を抽出すべく、12因子から1因子を除いた遺伝子セットをMEFに感染させた。その結果、HNF4 α やHNF6を除いた群ではアルブミンの遺伝子発現が減少し、また、HNF4 α やHNF1 β を除いた群では α -*fetoprotein*の遺伝子発現が減少した。一方、12因子から1因子を除いた場合では、*E-cadherin*の遺伝子発現を著しく低下させる群は見られなかった(図 1)。

[0069] 以上の結果から、アルブミンと *α -fetoprotein*の両遺伝子発現に深く関与することが示唆された HNF4 α に着目し、HNF4 α と他の1因子を同時に感染させる実験

を行った。その結果、HNF4 α + HNF3 α 、HNF4 α + HNF3 β 、又はHNF4 α + HNF3 γ の遺伝子セットを導入した場合において、アルブミンや α fetoprotein、*E-cadherin*の強い発現誘導が認められた(図 2)。

[0070] 繊維芽細胞のリプログラミングによる肝上皮細胞の出現

MEFに対して HNF4 α と HNF3 β を導入してから 2週間培養後、I型コラーゲンコートディッシュに細胞を移し、HGF及び EGFを含む肝幹細胞用培地を用いて引き続き培養を行った。その結果、細胞形態が MEFとは完全に異なる上皮様の細胞が出現することが判明した(図 3)。免疫染色の結果、これら上皮様細胞のすべてが *E-cadherin*陽性であり、かつ、*E-cadherin*が細胞接着領域に局在するといった上皮細胞特有の形態も獲得していることが判明した(図 4)。また、*E-cadherin*陽性細胞の多くが、肝細胞分化マーカーのアルブミンやサイトケラチン 8、サイトケラチン 18を発現していることも明らかとなった(図 4)。さらに、誘導された上皮様細胞では、肝細胞の中期分化マーカーである α -1-アンチトリプシンの発現も認められた(図 4)。

[0071] 以上の結果から、HNF4 α と HNF3 β の導入によって MEFから生まれる上皮様細胞は、肝上皮細胞であることが明らかとなった。培養中の MEFは早期に老化して細胞死を迎えるが、新しく生まれた上皮様の細胞集団は増殖を続け、その後、継代や凍結保存も可能である。従って、*E-cadherin*陽性の肝上皮細胞集団には、分化した肝細胞に加え、より未分化な肝前駆細胞が混在していると考えられる。すなわち、増殖能力の高い肝前駆細胞から、長期間にわたって、たくさんの肝細胞が供給されていると考えられる。

[0072] 繊維芽細胞から誘導された上皮様細胞による肝臓組織の再構築

HNF4 α と HNF3 β の導入によって MEFから誘導された上皮様細胞が肝上皮細胞であることを確かめるために、得られた上皮様細胞を FAHノックアウトマウスの肝臓へ移植し、肝臓組織の再構築能を解析した。

[0073] その結果、移植1ヶ月後において、ドナー細胞は FAH陽性の成熟した肝細胞としてFAHノックアウトマウスの肝臓組織中に生着し、肝臓組織を再構築していることが判明した(図 5)。

[0074] この結果から、HNF4 α と HNF3 β の導入によってMEFから誘導された上皮

様細胞は、肝臓組織再構築能を有した肝上皮細胞であることが明らかとなった。

実施例 2

[0075] Cell Applicationsから購入したヒト皮膚由来繊維芽細胞を添付プロトコル通りに培養し、誘導培地及びベクターは、実施例1と同様のものを用いて、下表のHNF4 α とHNF3 γ の導入によるにおける遺伝子発現誘導効果を確認した。

[0076] [表4]

名 称	特 徴	NCBI accession No. (配列表中の配列番号)	対応するアミノ酸配列 (配列表中の配列番号)
HNF3 γ	フォークヘッドDNA結合ドメインを有する転写因子、内胚葉や肝臓、膵臓の発生に関与	NM_004497	(配列番号: 28)
HNF4 α	核内受容体ファミリーに属する転写因子、肝細胞の分化や細胞増殖制御に関与	transcript variant 1 transcript variant 2 transcript variant 3 transcript variant 4 transcript variant 5	NM_178849 NM_000457 NM_178850 NM_175914 NM_001030003
			(配列番号: 5) (配列番号: 6) (配列番号: 7) (配列番号: 8) (配列番号: 9)

[0077] 図 8に、transcript variant 3を用いた場合の結果を示した。

[0078] HNF4 α のtranscript variants 1～5を試した結果、transcript variants 1～3、特にtranscript variant 3の効果が高いように思われた。ヒト由来細胞を用いた場合、HNF4 α +HNF3 α 及びHNF4 α +HNF3 β でも遺伝子発現誘導が得られることを確認したが、マウスと同様、HNF4 α とHNF3 γ との組み合わせが最も効果的であるとの傾向がみられた。

[0079] [実施例で参照した文献]

参照文献1 : Suzuki A., Iwama A., Miyashita H., Nakauchi H., Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. Development 130, 2513-2524, 2003.

参照文献2 : Suzuki A., Zheng Y.W., Kondo R., Kusakabe M., Takada Y., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. Flow cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. Hepatology 32, 1230-1239, 2000.

参照文献3 : Suzuki A., Zheng Y.W., Kaneko S., Onodera M., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. J Cell Biol 156, 173-184, 2002.

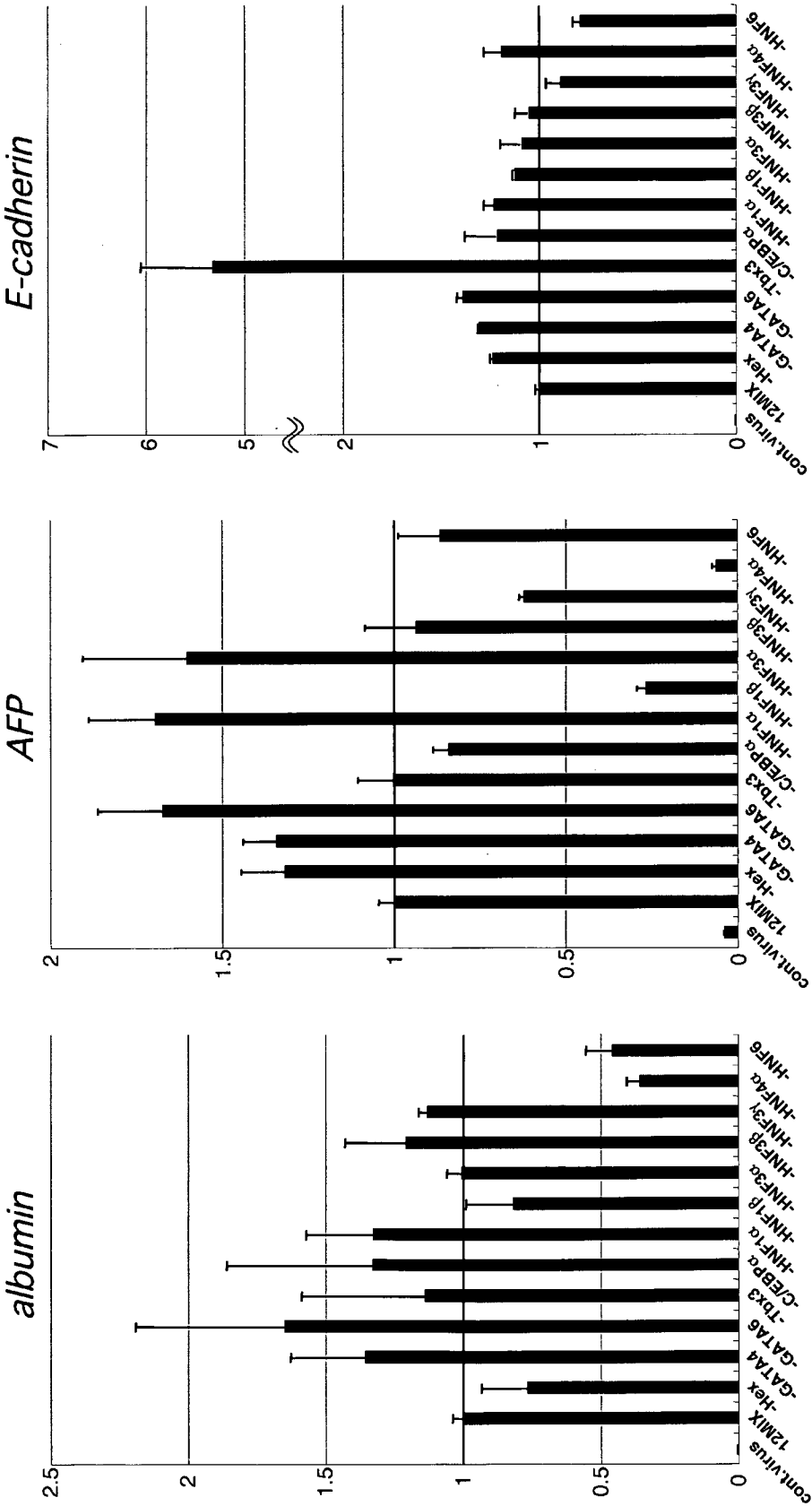
参照文献4 : Suzuki A., Sekiya S., Onishi M., Oshima N., Kiyonari H., Nakauchi H., Taniguchi H. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48, 1964-1978, 2008.

参照文献5 : Kaneko S, Onodera M, Fujiki Y, Nagasawa T, Nakauchi H. Simplified retroviral vector gcsap with murine stem cell virus long terminal repeat allows high and continued expression of enhanced green fluorescent protein by human hematopoietic progenitors engrafted in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 12, 35-44, 2001.

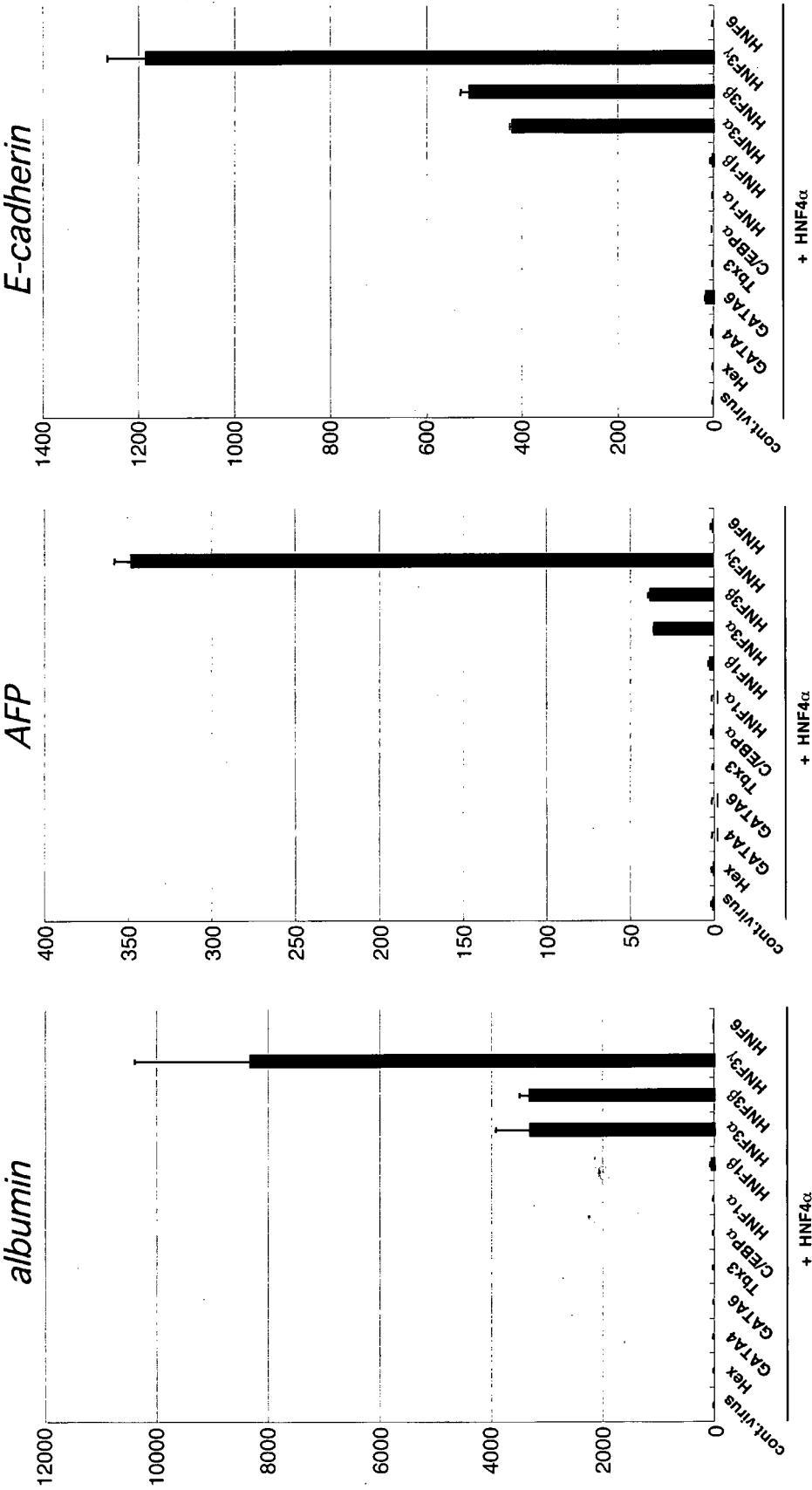
請求の範囲

- [1] 非肝臓細胞から誘導肝細胞を製造する方法であって、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ 及びHNF4 α を、非肝臓細胞に導入する工程を含む、方法。
- [2] HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子を、非肝臓細胞に導入する工程を含む、請求項1に記載の方法。
- [3] 非肝臓細胞が、ヒト由来である、請求項1又は2に記載の方法。
- [4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法で製造された誘導肝細胞又はその子孫を含む、人工肝臓組織。
- [5] 非肝臓細胞に由来し、HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子が導入されている細胞。
- [6] HNF3 α 、HNF3 β 又はHNF3 γ をコードする遺伝子及びHNF4 α をコードする遺伝子が導入された非肝臓細胞から誘導された、*E-cadherin*陽性であり、アルブミン、サイトケラチン-8、サイトケラチン-18又は α -1-アンチトリプシンを発現可能である細胞。
- [7] HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子とHNF4 α をコードする遺伝子とからなる、因子セット。
- [8] HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子とHNF4 α をコードする遺伝子とからなる、遺伝子セット。
- [9] HNF3 α 、HNF3 β 、又はHNF3 γ をコードする遺伝子とHNF4 α をコードする遺伝子が導入された非肝臓細胞を、成長因子の存在下で培養する工程を含む、誘導肝細胞の製造方法。
- [10] 請求項5に記載の細胞を移植する工程を含む、肝臓への細胞移植方法。
- [11] 請求項5に記載の細胞を用いる工程を含む、疾患の処置方法。
- [12] 請求項5に記載の細胞を用いる工程を含む、薬剤反応性の評価方法。

[図 1]

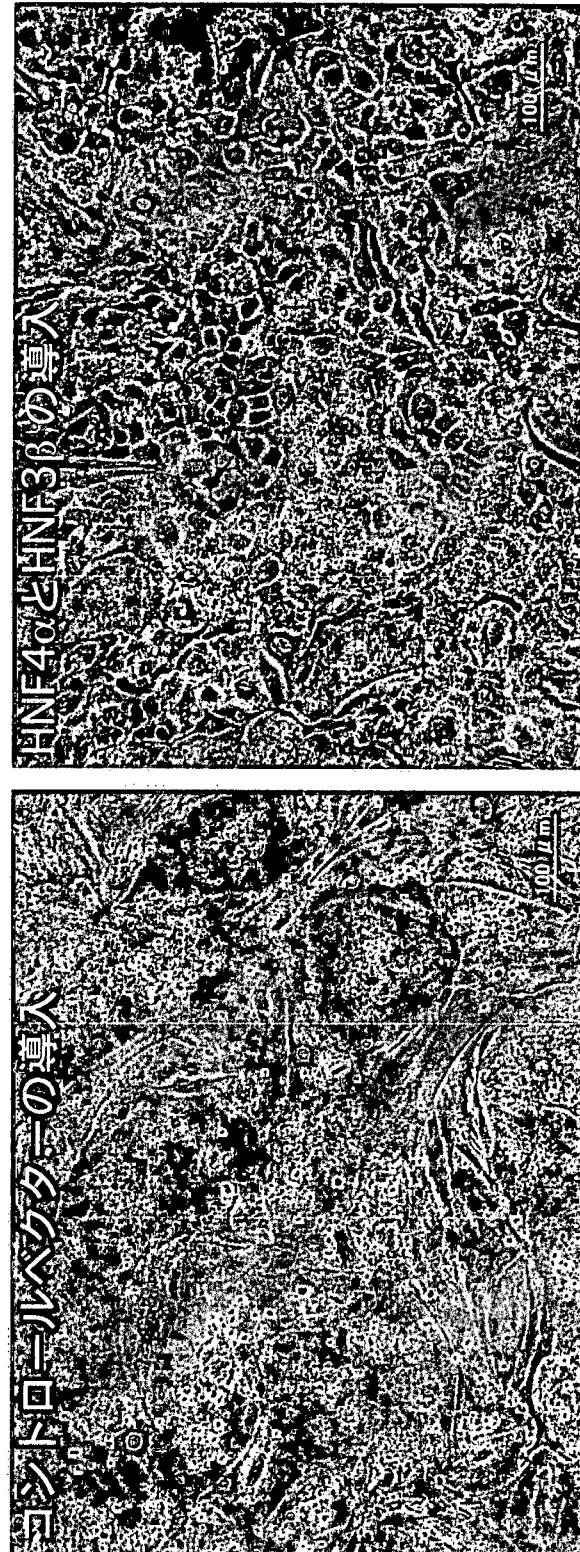


[図 2]



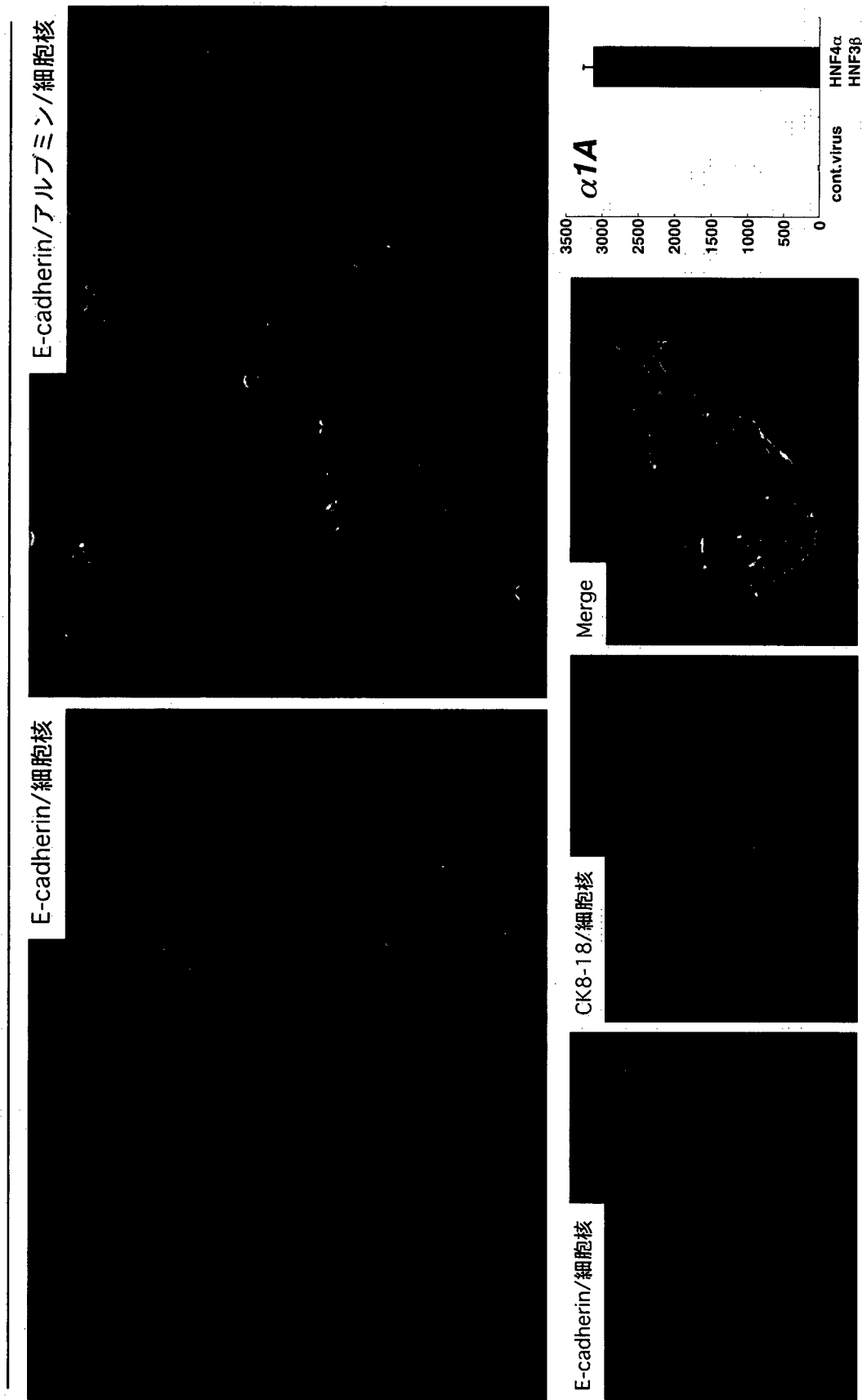
[図3]

感染から4週間後



[図4]

感染から4週間後

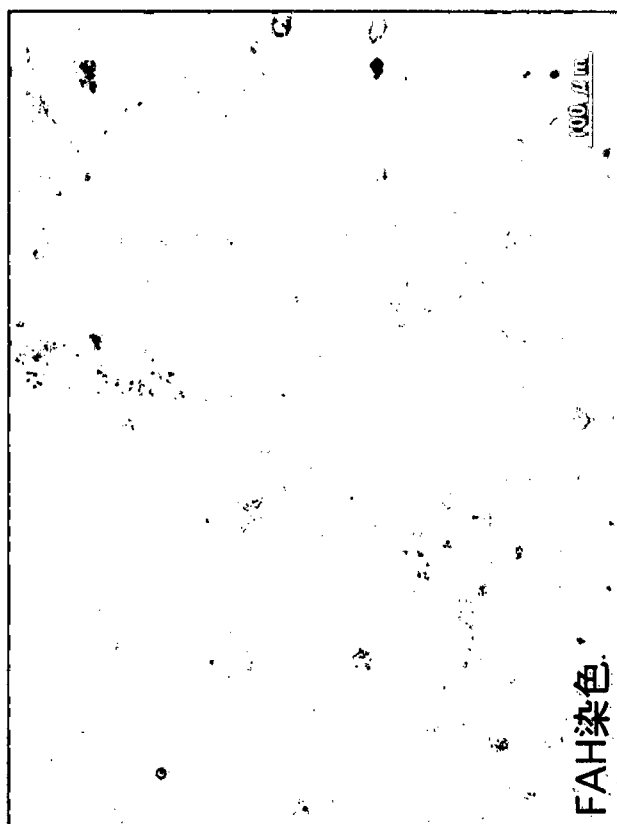


[図5]

MEF由来上皮様細胞の移植



コントロール



[図 6 A]

mHNF4 α :

[illegible]

mHNF3 α :

[illegible]

mHNF3β :

[illegible]

$mHNF3\gamma$:

[illegible]

8/9

[7]

mHNF4 α :

MRLSKTLVMDHMDYSAALDPAYTTFLEFENVQLTGNNDTSPSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPISGINGDI RAKKI ANI TD
VCESMKEQLVLVEWAKYIPAFCEPLDDQVALLPAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

mHNF3 α :

MLGAVKMEQHEPSDINSYYAEOEAYSSVSVNMNAGLGNMNTYMSAAAMGSGSNMSAGSMNMSYVAGMSPLAGMSPGAGAMAGMGGSAAGVAGMGPHLSPLSPLGGQAAAGMGLAPYANMNSMRYGOAGLSRARDPKTYRRSYTHAKPPYSYISLITMAIQOSPKNMLTLSEIY
QWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

mHNF3 β :

MLGAVKMEQHEPSDINSYYAEOEAYSSVSVNMNAGLGNMNTYMSAAAMGSGSNMSAGSMNMSYVAGMSPLAGMSPGAGAMAGMGGSAAGVAGMGPHLSPLSPLGGQAAAGMGLAPYANMNSMRYGOAGLSRARDPKTYRRSYTHAKPPYSYISLITMAIQOSPKNMLTLSEIY
QWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

mHNF3 γ :

MLGAVKMEHDLABNSYYPEAGEVSPVPTVPTMPLNSYMTLNLSSPYPGGLPASPLPSGLAPPAPAPLGPITFGLGSGSGSGYAGPGLVHKGMPKGRPLHAKPPYSYISLITMAIQOAPKMLTLSEIYQWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

hHNF4 α -a :

MRLSKTLVMDHMDYSAALDPAYTTFLEFENVQLTGNNDTSPSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI AD
VCESMKEQLVLVEWAKYIPAFCEPLDDQVALLPAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

hHNF4 α -b :

MRLSKTLVMDHMDYSAALDPAYTTFLEFENVQLTGNNDTSPSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI AD
VCESMKEQLVLVEWAKYIPAFCEPLDDQVALLPAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

hHNF4 α -c :

MRLSKTLVMDHMDYSAALDPAYTTFLEFENVQLTGNNDTSPSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI AD
VCESMKEQLVLVEWAKYIPAFCEPLDDQVALLPAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGPOQAEGRQSGDSGRPHVSSLSLSPLCRFQVA

hHNF4 α -d :

MVSWNAPLQAPVESYDTSFSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI ADVCESMKEQLVLVEWAKYIPAF
CELRLDDQVALLRAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

hHNF4 α -e :

MVSWNAPLQAPVESYDTSFSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI ADVCESMKEQLVLVEWAKYIPAF
CELRLDDQVALLRAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

hHNF4 α -f :

MVSWNAPLQAPVESYDTSFSEGNLNAPNLSLGSALCAICGDRATGKHGASSDGGCKGFFRRSVKKNHMSCRFSROCVNOKDKRQCRYLKQFRAGMKKEAVQNERIRI STRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSQOITSPVSGINGDI RAKKI ASI ADVCESMKEQLVLVEWAKYIPAF
CELRLDDQVALLRAHAGEHLLGATKRSWFKDVLILLGNDYIVPHOPELAEMSRVSI RIDEVLVFPQELQIDDNEYAYLKAI IFFPDQAKLSDPQKIKRISOVQVSLDYINDROYDSRGRFGEILLLLPTLQSI THOMI EDIQ I KLFQMAKIDNLLQE
MLLGGSPDAPHHAHPLHPLMQEHGNTNIVANTMPHLSNGOMCEWPRRGOAATPETOPSPPGSGSGEPYKLLPGAVATIKVPLSAIPQPTITKQEI

hHNF3 α :

MLGAVKMEQHEPSDINSYYAEOEAYSSVSVNMNAGLGNMNTYMSAAAMGSGSNMSAGSMNMSYVAGMSPLAGMSPGAGAMAGMGGSAAGVAGMGPHLSPLSPLGGQAAAGMGLAPYANMNSMRYGOAGLSRARDPKTYRRSYTHAKPPYSYISLITMAIQOSPKNMLTLSEIY
QWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

hHNF3 β -1 :

MHSAASMLGAVKMEQHEPSDINSYYAEOEAYSSVSVNMNAGLGNMNTYMSAAAMGSGSNMSAGSMNMSYVAGMSPLAGMSPGAGAMAGMGGSAAGVAGMGPHLSPLSPLGGQAAAGMGLAPYANMNSMRYGOAGLSRARDPKTYRRSYTHAKPPYSYISLITMAIQOSPKNMLTLSEIY
QWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

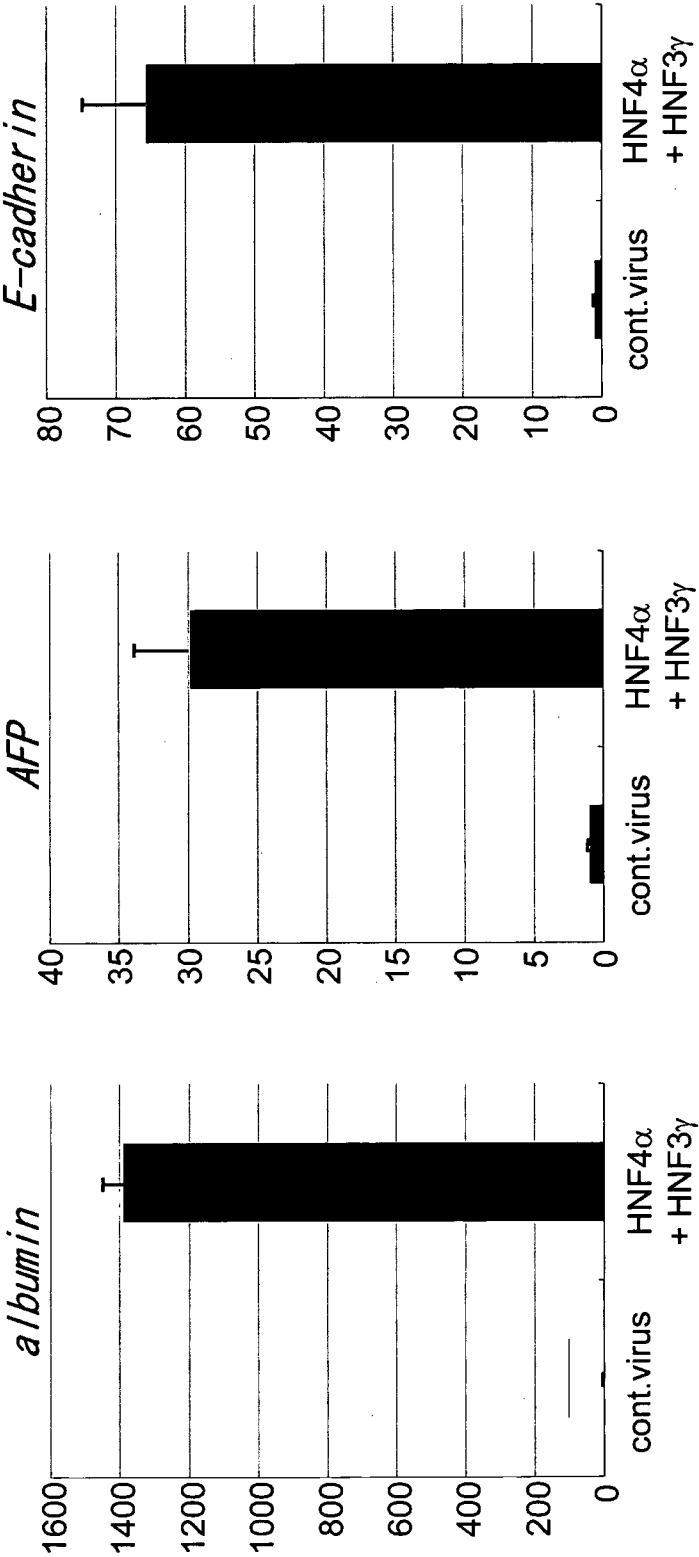
hHNF3 β -2 :

MLGAVKMEQHEPSDINSYYAEOEAYSSVSVNMNAGLGNMNTYMSAAAMGSGSNMSAGSMNMSYVAGMSPLAGMSPGAGAMAGMGGSAAGVAGMGPHLSPLSPLGGQAAAGMGLAPYANMNSMRYGOAGLSRARDPKTYRRSYTHAKPPYSYISLITMAIQOSPKNMLTLSEIY
QWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

hHNF3 γ :

MLGAVKMEHDLABNSYYPEAGEVSPVPTVPTMPLNSYMTLNLSSPYPGGLPASPLPSGLAPPAPAPLGPITFGLGSGSGSGYAGPGLVHKGMPKGRPLHAKPPYSYISLITMAIQOAPKMLTLSEIYQWIMDLFPYRQNRQNRQNSIRHLSFNDFVKVARSPOPKGGSWTLHPDSGNMFENGQYLRQRFKCBQKALKEAAGAGSGKATFAGSQAQQLGEAAGSASETPAGTESPHSASPCOEHRGGLSELKGPASALSPPEPAPSPGQQAQAAHLLGPHHPGLPPEAKLKEHYHAF
FNHPSINMLMSSEQHHSHHHQPHKMLKAYEVMHYFGYGSMPGSLANGPVTKTGLDASPLAADTSYQGVSRPVLNMS

[図 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12N5/00, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KHURANA, S et al., Hepatocyte nuclear factor-4alpha induces transdifferentiation of hematopoietic cells into hepatocytes. J Biol Chem. 2010 Feb 12, vol.285(7), pp.4725-4731	1-9,12
Y	ISHIZAKA, S et al., Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. FASEB J. 2002 Sep, vol.16(11), pp.1444-1446	1-9,12
A	BAILLY, A et al., Phenotypic effects of the forced expression of HNF4 and HNF1alpha are conditioned by properties of the recipient cell. J Cell Sci. 1998 Aug, vol.111 (Pt 16), pp.2411-2421	1-9,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 April, 2011 (18.04.11)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2011 (26.04.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053875

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	CHEN, ML et al., HNF-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. World J Gastroenterol. 2010 Oct 28, vol.16(40), pp.5092-5103	1-9, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053875

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10, 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 and 11 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KHURANA, S et al., Hepatocyte nuclear factor-4alpha induces transdifferentiation of hematopoietic cells into hepatocytes. J Biol Chem. 2010 Feb 12, vol.285(7), pp.4725-4731	1-9, 12
Y	ISHIZAKA, S et al., Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. FASEB J. 2002 Sep, vol.16(11), pp.1444-1446	1-9, 12

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 6 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4 N

9 1 2 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	BAILLY, A et al., Phenotypic effects of the forced expression of HNF4 and HNF1alpha are conditioned by properties of the recipient cell. J Cell Sci. 1998 Aug, vol.111 (Pt 16), pp.2411-2421	1-9, 12
P, A	CHEN, ML et al., HNF-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. World J Gastroenterol. 2010 Oct 28, vol.16(40), pp.5092-5103	1-9, 12

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 0 , 1 1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 0 , 1 1 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。