

(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  
2016 年 6 月 30 日(30.06.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/104717 A1

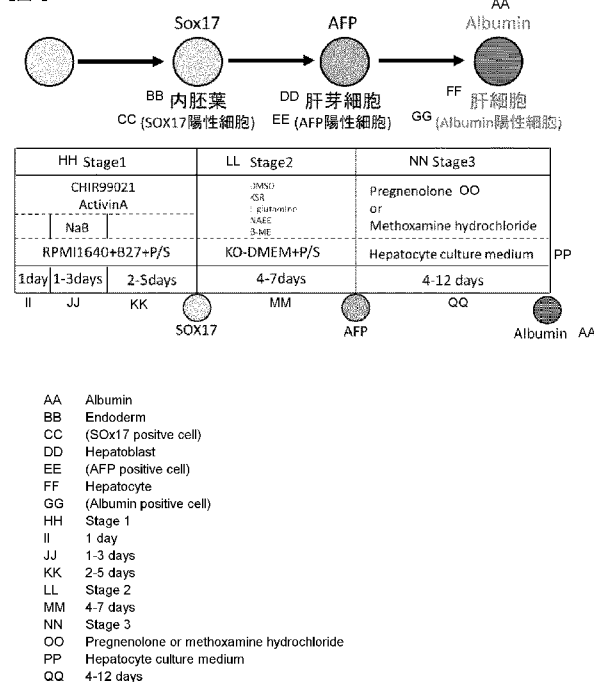
- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/086260
- (22) 国際出願日: 2015 年 12 月 25 日(25.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-265062 2014 年 12 月 26 日(26.12.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 長船 健二(OSAFUNE, Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 小高 真希(KO-TAKA, Maki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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),

[続葉有]

(54) Title: HEPATOCYTE INDUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 肝細胞誘導方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a method for inducing hepatocytes from hepatoblasts. Provided is a method for inducing hepatocytes from hepatoblasts, said method including a step in which hepatoblasts are cultured in a culture medium containing a chemical selected from a group consisting of pregnenolone and an adrenergic agonist. Hepatoblasts can be obtained by culturing endodermal cells in a culture medium containing DMSO, and endodermal cells can be obtained by culturing pluripotent stem cells in a culture medium containing Activin A and a GSK-3 $\beta$  inhibitor. Therefore, by employing the method of the present invention, it is also possible to provide a method of producing hepatocytes from pluripotent stem cells.

(57) 要約: 肝芽細胞から肝細胞を製造する方法を提供する。肝芽細胞をプレゲネロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で培養する工程を含む、肝芽細胞から肝細胞の製造方法を提供する。肝芽細胞は、内胚葉細胞を DMSO を含む培地中で培養することによって得ることができ、内胚葉細胞は多能性幹細胞を、Activin A および GSK-3 $\beta$  阻害剤を含む培地で培養することによって得ることができる。従って、本発明の方法を用いることで、多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法も合わせて提供し得る。



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 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))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：肝細胞誘導方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞から肝細胞を分化誘導する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 肝硬変などの慢性肝不全、急性肝不全など肝不全が原因で毎年多くの患者が亡くなっている。これらの疾患の根治的治療法として現在肝移植が行われている。肝移植は侵襲性が高いことから、より安全性の高い肝細胞移植が提言されている。しかし、肝細胞移植は、一度に大量の細胞を必要とするため、ドナーの不足が問題となっている。

[0003] 医薬品候補化合物の開発中止に至る主要な原因として、「肝毒性」が挙げられることから、医薬品の開発において、ヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* での毒性評価が行われている。しかし、初代培養肝細胞は、均一口ットの安定供給が困難であるため、検査結果が安定しないことが問題となっている。

[0004] そこで、移植や医薬品探索のための肝細胞を胚性幹細胞（ES細胞）または人工多能性幹細胞（iPS細胞）といった多能性幹細胞を用いて製造することが注目されている。これまで、多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法として、多くの報告がされている（特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）。報告されている方法において肝細胞へ効率よく成熟させるためには、HGFやオンコスタチンMといったタンパク質が用いられている。このようなタンパク質を用いることで、細胞誘導にかかるコストが高くなることや、タンパク質の製造ロット差による効率の違いが生じるなどの問題も散見する。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：W02001/081549

## 非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : Takayama K, et al, Stem Cell Reports. 1:322-335, 2013.  
非特許文献2 : Kajiwara M, et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 12538-12543, 2012  
非特許文献3 : Hay DC, et al, Stem Cells. 26: 894-902, 2008. 上記特許文献および非特許文献は引用により本願の一部を構成する。

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本願の課題は、肝芽細胞から肝細胞をインビトロで分化誘導する方法を提供することにある。本願はまた、内胚葉細胞から肝芽細胞を誘導し、次いで肝芽細胞から肝細胞を分化誘導するインビトロの方法を提供することを課題とする。より具体的に本願は多能性幹細胞から内胚葉細胞を誘導し、内胚葉細胞から肝芽細胞を誘導し、さらに肝芽細胞から肝細胞を分化誘導するインビトロで行われる方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、内胚葉細胞をジメチルスルホキシド(以下DMSO)を含む培地中で培養することで肝芽細胞を誘導し、当該肝芽細胞をプレグネノロンまたはアドレナリン作動薬を含む培地中で培養することにより、肝細胞へ分化誘導できることを初めて見出した。本発明はそのような知見を基にして完成されたものである。

- [0009] すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

〔1〕肝芽細胞をプレグネノロンまたはアドレナリン作動薬を含む培地中で培養する工程を含み、当該肝芽細胞がAFP陽性である、肝細胞を製造する方法。

〔2〕前記アドレナリン作動薬が、アドレナリン、ノルアドレナリン、エチレフリン、ナファゾリン、フェニレフリン、メトキシアミンおよびミドドリンから成る群より選択される試薬である、〔1〕に記載の方法。

〔 3 〕 前記アドレナリン作動薬が、エチレフリン、フェニレフリンおよびメトキシアミンから選択される試薬である、〔 2 〕に記載の方法。

〔 4 〕 前記肝芽細胞が、内胚葉細胞をDMSOを含む培地中で培養する工程を含む方法で製造された細胞であり、当該内胚葉細胞がSOX17陽性細胞である、〔 1 〕から〔 3 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 5 〕 前記内胚葉細胞が、多能性幹細胞を、Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地中で培養する工程を含む方法で製造された細胞である、〔 4 〕に記載の方法。

〔 6 〕 前記多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造する工程が、Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程をさらに含む、〔 5 〕に記載の方法。

〔 7 〕 前記GSK3 $\beta$ 阻害剤が、CHIR99021であり、前記HDAC阻害剤が、NaB（酪酸ナトリウム）である、〔 6 〕に記載の方法。

〔 8 〕 前記多能性幹細胞がiPS細胞である、〔 5 〕から〔 7 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 9 〕 前記iPS細胞がヒトiPS細胞である、〔 8 〕に記載の方法。

〔 1 0 〕 前記多能性幹細胞がES細胞である、〔 5 〕から〔 7 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 1 1 〕 多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法であって、以下の工程（i）から（iii）：

（i）多能性幹細胞を、Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地中で培養する工程、

（ii）工程（i）で得られた細胞をDMSOを含む培地中で培養する工程、および

（iii）工程（ii）で得られた細胞をプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で培養する工程、を含む、前記方法。

〔 1 2 〕 前記アドレナリン作動薬が、アドレナリン、ノルアドレナリン、エチレフリン、ナファゾリン、フェニレフリン、メトキシアミンおよびミドドリ

ンから選択される試薬である、[11]に記載の方法。

[13] 前記アドレナリン作動薬が、エチレフリン、フェニレフリンおよびメトキサミンから選択される試薬である、[12]に記載の方法。

[14] 前記工程(i)において、Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程をさらに含む、[13]に記載の方法。

[15] 前記GSK3 $\beta$ 阻害剤が、CHIR99021であり、前記HDAC阻害剤が、NaB（酪酸ナトリウム）である、[14]に記載の方法。

[16] 前記多能性幹細胞がiPS細胞である、[11]から[15]のいずれか1項に記載の方法。

[17] 前記iPS細胞がヒトiPS細胞である、[16]に記載の方法。

[18] 前記多能性幹細胞がES細胞である、[11]から[15]のいずれか1項に記載の方法。

[19] [1]から[17]のいずれか1項に記載の方法で製造された肝細胞と被検物質を接触させる工程を含む、被検物質の代謝産物を検出する方法。

[20] [1]から[17]のいずれか1項に記載の方法で製造された肝細胞と被検物質を接触させる工程を含む、被検物質の薬物代謝酵素の誘導を検出する方法。

## 発明の効果

[0010] 内胚葉細胞から肝細胞へ比較的低分子の化合物を用いて誘導することが可能となった。内胚葉細胞は多能性幹細胞より誘導することができ、本発明の方法によって安定した性質の肝細胞を提供することが可能となった。本発明の肝細胞誘導方法は全てインビトロで実施される。本発明の方法で製造された肝細胞は、肝不全等の肝疾患の再生医療や薬物の有効性や安全性評価等にも使用され得る。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、ヒトiPS細胞から肝細胞を誘導する模式図を示す。

[図2]図2Aは、Stage 3において各薬剤（DMSO、HGF+オンコスタチンM、メト

キサミン塩酸塩およびプレグネノロン)を用いて誘導した細胞を抗アルブミン抗体で免疫染色した像を示す。図2Bは、Stage 3において各薬剤(DMSO、HGF+オンコスタチンM、メトキサミン塩酸塩およびプレグネノロン)を用いて誘導した場合のアルブミン陽性細胞率を測定した結果を示す。

[図3]図3は、Stage 3において各薬剤(DMSO、HGF+オンコスタチンM、メトキサミン塩酸塩およびプレグネノロン)を用いて誘導した細胞におけるアルブミンのmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。縦軸の値は、 $\beta$ -アクチンのmRNA発現量を内部標準として用いて補正した蛍光強度のうちDay 0を1とした場合の相対値を示す。

[図4]図4は、Stage 3において各薬剤(DMSO、エチレフリン、フェニレフリン、メトキサミン、HGF+オンコスタチンM)を用いて誘導した細胞でのアルブミン陽性細胞率を測定した結果を示す。

[図5]図5は、Stage 3において各薬剤(DMSO、エチレフリン、フェニレフリン、メトキサミン、HGF+オンコスタチンM)を用いて誘導した細胞におけるアルブミンのmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。Stage 2の6日目を1とした相対値で示す。

[図6]図6は、Stage 3において各薬剤(medium only(DMSO)、エチレフリン、フェニレフリン、メトキサミン、HGF+オンコスタチンM)を用いて誘導した細胞でのアルブミン分泌量を示す。図中、HepG2細胞は、ヒト肝癌由来細胞株からのアルブミン分泌量を示す。

[図7]図7は、Panc1(ヒト膵癌由来細胞株)、HepG2(ヒト肝癌由来細胞株)、Stage 3においてHGF+オンコスタチンMを用いて誘導した細胞(HGF+0sM)、またはStage 3において1 $\mu$ Mのメトキサミンを用いて誘導した細胞に対して100 $\mu$ Mのオメプラゾールを添加(+)または添加しなかった(-)場合におけるCYP1A1のmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。CYP1A1のmRNA発現量は、 $\beta$ アクチンのmRNA発現量に対する相対値で表す。

[図8]図8は、HepG2、Stage 3においてDMSOを用いて誘導した細胞(DMSO)、Stage 3においてHGF+オンコスタチンMを用いて誘導した細胞(HGF+0sM)

、またはStage 3において1 $\mu$ Mのメトキサミンを用いて誘導した細胞（メトキサミン）に対して1mg/mlのICG（Indocyanine green）を添加して1時間培養した後の顕微鏡像（上図）、各細胞（HepG2、DMSO、HGF+オンコスタチンMおよびメトキサミン）のOil Red染色像（中図）、およびPAS染色像（下図）を示す。

[図9]図9 Aは、Stage 3において各薬剤（DMSO、HGF+オンコスタチンM、メトキサミンおよびプレグネノロン）を用いて誘導した細胞を抗CYP3A4抗体により染色した免疫染色像を示す。図9 Bは、Stage 3において各薬剤（DMSO、HGF+オンコスタチンM、メトキサミンおよびプレグネノロン）を用いて誘導した細胞におけるCYP3A4のmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。CYP3A4のmRNA発現量は、DMSOを用いて誘導した細胞における発現量に対する相対値で表す。

[図10]図10は、Stage 3において、各濃度のメトキサミンを用いた場合のアルブミンのmRNAの発現量をq-PCRで測定した結果を示す。図中、St2d6は、Stage 2の6日目の結果を示し、GFsは、HGF+オンコスタチンMを用いた結果を示す。

[図11]図11は、各条件で誘導した細胞におけるCYP1A1、CYP3A5、CYP3A7、CYP3A4、CYP2A19およびTATのmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。図中、undiffは、iPS細胞での結果を示し、D6は、分化誘導6日目の細胞の結果を示し、D12は、分化誘導12日目の細胞の結果を示し、D20(-)は、Stage 3にてHepatocyte Culture Mediumに無添加で培養した分化誘導20日目の細胞の結果を示し、D20 GFsは、Stage 3にてHGF+オンコスタチンMを添加して分化誘導した20日目の細胞の結果を示し、D20 Methoは、Stage 3にてメトキサミンを添加して分化誘導した20日目の細胞の結果を示す。

[図12]図12は、各条件で誘導した細胞におけるCYP3A4、CYP1A2およびCYP2B6のmRNA発現量をq-PCRで測定した結果を示す。CYP3A4は、40 $\mu$ M リファンピシンを添加（Rif(+)）または無添加（Rif(-））の

結果を示し、CYP1A2は、40 $\mu$ M オメプラゾールを添加 (Ome(+)) または無添加 (Ome(-)) の結果を示し、CYP2B6は、100 $\mu$ M フェノバルビタールを添加 (Phe(+)) または無添加 (Phe(-)) の結果を示す。図中、HepG2は、HepG2細胞における結果を示し、GFsは、Stage 3にてHGF+オンコスタチンMを添加して分化誘導した細胞の結果を示し、Methoは、Stage 3にてメトキサミンを添加して分化誘導した細胞の結果を示す。

[図13]図13は、各iPS細胞株を用いて本発明の方法により誘導した細胞におけるアルブミン分泌量を示す。

[図14]図14は、アルブミンのプロモーター下にGFPを組み込んだiPS細胞を用いて本発明の方法により誘導した後のFACSの結果を示す。図中、(+)は、GFP陽性細胞群を示し、(-)は、GFP陰性細胞群を示す。当該GFP陽性細胞の含有率は、39.9%である。

[図15]図15は、各iPS細胞株を用いて本発明の方法により誘導した細胞におけるアルブミン分泌量を示す。図中、DMS0は、Stage 3にてDMS0を添加して分化誘導した細胞の結果を示し、GFsは、Stage 3にてHGF+オンコスタチンMを添加して分化誘導した細胞の結果を示し、(-)は、Stage 3にてメトキサミンのみを添加して分化誘導した細胞の結果を示し、 $\alpha$ 1は、Stage 3にてメトキサミンおよびドキサゾシンを添加して分化誘導した細胞の結果を示し、 $\alpha$ 2は、Stage 3にてメトキサミンおよびヨヒンビン添加して分化誘導した細胞の結果を示し、 $\beta$ 1は、Stage 3にてメトキサミンおよびメトプロロールを添加して分化誘導した細胞の結果を示し、 $\beta$ 1は、Stage 3にてメトキサミンおよびブトキサミンを添加して分化誘導した細胞の結果を示す。

[図16]図16は、ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞について、RNA sequencing解析により遺伝子発現プロファイルの比較を行った結果であり、主成分分析 (PCA) を示す。

[図17]図17は、ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞について、RNA sequencing解析により遺伝子発現プロファイルの比較を行った結果であり、肝臓マーカー遺伝子発現のヒートマップを示す。

[図18]図 1 8 は、マウスES細胞から肝細胞を誘導する模式図を示す。

[図19]図 1 9 は各条件で誘導した細胞におけるTat、Cyp3a11、Cyp3a13および $\beta$  アクチンの発現を示す。

[図20]図 2 0 はStage 3で各薬剤（DMSO、HGF+オンコスタチンM（G F s）、メトキサミン）を用いて誘導した細胞群を抗アルブミン抗体、抗Cyp3a4抗体、および抗C/ebp $\beta$  抗体で免疫染色した像を示す。

### 発明を実施するための形態

[0012] 本発明を以下に詳細に説明する。

[0013] 本発明では、肝芽細胞をプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で培養する工程を含む、肝細胞を製造する方法を提供する。

[0014] 本発明の一態様において、肝細胞は、アルブミンのmRNAを発現している細胞と定義される。

本発明の別の態様においては、肝細胞はグリコーゲンの蓄積、低比重リポタンパク質（LDL）の取り込み、アルブミンの分泌、アンモニア代謝と尿素合成、シトクロムP450活性、脂質代謝、薬物代謝などの肝細胞の機能として公知の機能のいずれかひとつ、あるいは複数の組み合わせによって特徴づけられる細胞と定義してもよい。肝細胞の判定は、かかる機能に係わるタンパク質の発現によって確認することができる。本発明において、肝細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された集団であってもよい。好ましくは、20%以上、30%以上、40%以上または50%以上の肝細胞が含まれる細胞集団である。

[0015] 本発明において、肝芽細胞とは、肝細胞および胆管上皮細胞へ分化する能力を有する細胞であり、AFP、Dlk、E-cadherin、Liv2、CD13およびCD133から成る群より選択される少なくとも一つのマーカー遺伝子が陽性である細胞である。好ましくは、AFP陽性の細胞である。

[0016] 本発明の方法において、肝芽細胞から肝細胞を製造するにあたり、肝芽細胞をプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬

剤を含む培地中で培養する。

[0017] 本願の方法において、肝芽細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された集団であってもよい。好ましくは、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上または100%の肝芽細胞が含まれた細胞集団である。肝芽細胞を純化する方法する方法として、AFP、Dlk、E-cadherin、Liv2、CD13またはCD133などの遺伝子マーカーに対する抗体を用いて染色し、染色された細胞をフローサイトメーター（FACS）や磁気細胞分離装置（MACS）を用いて濃縮する方法が例示される。より好ましくは、Dlk、E-cadherin、Liv2、CD13またはCD133に対する抗体を用いる方法である。Dlk、E-cadherin、Liv2、CD13またはCD133に対する抗体は、市販の抗体を適宜利用することができる。

[0018] 肝芽細胞を含む細胞集団の培養物が培養皿へ接着されている状態で提供される場合、接着状態を維持し、肝芽細胞を含む培養物の培地をプレグネロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地と交換することによって、本願の方法を実施することができる。また、肝芽細胞を含む細胞集団の培養物が、培地中に浮遊状態で提供される場合、当該肝芽細胞を含む細胞集団培養物の培地をプレグネロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地と交換して、そのまま浮遊培養条件で培養してもよく、あるいはコーティング処理した培養皿を用いて当該肝芽細胞を含む細胞集団培養物をプレグネロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で接着培養しても良い。好ましくは、肝芽細胞から肝細胞の製造工程は接着培養で行う。

[0019] 肝芽細胞が細胞同士が接着した細胞塊として提供される場合には任意の方法で実質的に分離（または解離）することで単一細胞の状態に分離した後、培養しても良い。分離の方法としては、例えば、力学的分離や、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液Accutase(TM)およびAccumax(TM)（Innovative Cell Technologies, Inc）が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液

を用いた分離が挙げられる。

[0020] 肝芽細胞から肝細胞を製造するにあたり接着培養する場合、コーティング処理された培養皿にて培養しても良い。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD Biosciences)、Synthemax (Corning)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン (好ましくは、ラミニン 1 1 1、4 1 1 または 5 1 1 が例示される)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、またはこれらの断片およびこれらの組み合わせが挙げられる。肝芽細胞を含む細胞集団が接着培養物として提供される場合、当該肝芽細胞が得られた条件を継続し、培地のみを交換することによって肝細胞の誘導を行うことが好ましい。

[0021] 本発明において、肝芽細胞から肝細胞を製造するにあたり浮遊条件で培養するとは、細胞を培養皿に対して非接着の状態で培養することである。浮遊条件の培養は特に限定はされないが、肝芽細胞と培養皿の接着性を向上させる目的で人工的に処理 (例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理) されていないもの、または、人工的に接着を抑制する処理 (例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸 (poly-HEMA) によるコーティング処理) したものを使用して行うことができる。

[0022] 本発明の肝芽細胞から肝細胞の製造工程に使用される培地は、肝細胞の培養用培地へプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を適宜添加して調製することができる。肝細胞の培養用培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Lonza社のHBM™ Basal Medium、HCM™ SingleQuots™ Kit、HMM™ Basal MediumまたはHMM™ SingleQuots™ Kit、PromoCell社のHepatocyte Growth MediumまたはHepatocyte Maintenance Medium、もしくはSigma-Aldrich社のHepatocyte Mediumおよびこれらの混合培地などが包含される。これらの基礎培地には、血清 (例えば、ウシ胎児血清 (FBS)) が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。無血清の場合は必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut

t Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよい。培地にはまた、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン類 (例えば、ニコチンアミド、アスコルビン酸)、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、グルカゴン、ヒドロコルチゾン、EGF (Epidermal growth factor)、デキサメタゾン、およびこれらの同等物など1つ以上の物質も含有し得る。

[0023] 本発明において、プレグネノロンは、Sigma-Aldrich社等の市販されているものを使用することができる。本発明で用いるプレグネノロンの培地中の濃度は、0.01  $\mu\text{M}$ から10  $\mu\text{M}$ 、好ましくは、0.05  $\mu\text{M}$ から5  $\mu\text{M}$ 、より好ましくは、0.1  $\mu\text{M}$ から2.5  $\mu\text{M}$ である。

[0024] 本発明において、アドレナリン作動薬とは、アドレナリン受容体に直接結合して作用することができる物質である。好ましくは、少なくとも $\alpha 1$ 受容体に結合する物質であり、例えば、アドレナリン、ノルアドレナリン、エチレフリン、ナファゾリン、フェニレフリン、メトキサミンおよびミドドリンから成る群より選択される薬剤が挙げられる。本発明において好ましいアドレナリン作動薬は、エチレフリン、フェニレフリン、およびメトキサミンから成る群より選択される薬剤である。本発明で、エチレフリン、フェニレフリン、またはメトキサミンを用いる場合の培地中の濃度は、0.01  $\mu\text{M}$ から10  $\mu\text{M}$ 、好ましくは、0.05  $\mu\text{M}$ から5  $\mu\text{M}$ 、より好ましくは、0.1  $\mu\text{M}$ から2.5  $\mu\text{M}$ である。

[0025] 本発明の肝芽細胞から肝細胞を製造する工程の日数は、長期間培養することで肝細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、例えば、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上または14日以上が挙げられる。より好

ましくは、4日以上12日以下であり、8日間である。

[0026] 本発明の肝芽細胞から肝細胞を製造する工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2～5%である。

[0027] 本発明の肝芽細胞は、内胚葉細胞から製造されたものであって良い。内胚葉細胞から肝芽細胞を製造するにあたり、内胚葉細胞をジメチルスルホキシド（DMSO）を含む培地中で培養する工程を含み得る。

[0028] 本発明において、内胚葉細胞とは、消化管、肺、甲状腺、脾臓、肝臓などの器官の組織を形成する細胞へと分化する細胞であり、SOX17、FOXA2またはCXCR4などの遺伝子マーカーが発現している細胞が例示される。より好ましくは、SOX17が陽性である細胞が挙げられる。

[0029] 本発明の方法において、内胚葉細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された集団であってもよい。好ましくは、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上または100%の内胚葉細胞が含まれた細胞集団である。内胚葉細胞を純化する方法する方法として、SOX17、FOXA2またはCXCR4などの遺伝子マーカーに対する抗体を用いて染色し、染色された細胞をフローサイトメーター（FACS）や磁気細胞分離装置（MACS）を用いて濃縮する方法が例示される。より好ましくは、CXCR4に対する抗体を用いる方法である。CXCR4に対する抗体は、市販の抗体を適宜利用することができる。

[0030] 内胚葉細胞を含む細胞集団が培養皿へ接着されている状態で提供される場合、接着状態を維持し、内胚葉細胞を含む細胞集団の培地をDMSOを含有するものに交換することによって、本工程を実施することができる。また、内胚葉細胞を含む細胞集団の培養物が、培地中に浮遊状態で提供される場合、当該内胚葉細胞を含む細胞集団培養物の培地をDMSOを含有する培地と交換して、そのまま浮遊培養条件培養しても良く、あるいはコーティング処理した培養皿を用いて内胚葉細胞を含む細胞集団をDMSOを含有する培地中で接着培養しても良い。

- [0031] 本発明において、内胚葉細胞を浮遊条件で培養するとは、細胞を培養皿に対して非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、内胚葉細胞と培養皿の接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、または、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）したものを使用して行うことができる。
- [0032] 本発明において、内胚葉細胞を接着培養するとは、コーティング処理された培養皿を用いて内胚葉細胞を培養することである。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル（BD Biosciences）、Synthemax（Corning）、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン（例えば、ラミニン111、411または511、またはその断片）、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられ、好ましくは、マトリゲル、Synthemaxまたはゼラチンである。
- [0033] 内胚葉細胞を培養するにあたり、内胚葉細胞が細胞同士が接着した細胞塊として提供される場合にはこれを任意の方法で実質的に分離（または解離）することで単一細胞の状態として培養してもよいし、または、細胞同士が接着した細胞塊の状態でもよい。分離の方法としては、例えば、力学的分離や、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液Accutase(TM)およびAccumax(TM)（Innovative Cell Technologies, Inc）が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離が挙げられる。
- [0034] 本発明の内胚葉細胞から肝芽細胞の培養工程に使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へDMSOを適宜添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清（FBS））が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。無

血清培地の場合には必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよい。また基礎培地には脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。1つの実施形態において、基礎培地は、DMEM培地に、KSR、L-グルタミン、NEAA、2-メルカプトエタノールおよび抗生物質を含む培地である。

[0035] 本発明において、DMSOは、Sigma-Aldrich社等の市販されているものを使用することができる。本工程で用いるDMSOの培地中の濃度は、0.01%から10%、好ましくは、0.1%から5%、より好ましくは、1%である。

[0036] 本発明の内胚葉細胞から肝芽細胞を製造する工程の日数は、長期間培養することで肝細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、例えば、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上が挙げられる。より好ましくは、4日以上7日以下である。

[0037] 本発明の内胚葉細胞から肝芽細胞を製造する工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2～5%である。

[0038] 本発明において、内胚葉細胞は、多能性幹細胞から製造されたものであってよい。多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造する方法としては、例えば、アクチビンAおよびWntシグナル伝達経路を活性化する方法、接着培養条件下でWntシグナル伝達経路を活性化する方法 (W02007/050043)、支持細胞 (例えば、M15細胞) と共培養する方法 (W02006/126574) などが例示される。本パラグラフに記載の文献は引用により本願の一部を構成する。

[0039] より好ましい多能性幹細胞からの内胚葉細胞の製造方法は、多能性幹細胞

をActivin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程を含む方法である。さらに好ましくは、Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤を含む培地で培養する工程をさらに含む方法である。具体的には次の工程を含む方法である；

(1) 多能性幹細胞をActivin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程；

(2) (1) で得られた培養細胞をActivin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程；および

(3) (2) で得られた培養細胞をActivin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程。

[0040] 本発明はまた、上述した工程を含む、多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法を提供する。詳細には、以下の (i) から (iii) の工程を含む、多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法である；

(i) 多能性幹細胞を、Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地中で培養する工程、

(ii) 工程 (i) で得られた細胞をDMSOを含む培地中で培養する工程、および

(iii) 工程 (ii) で得られた細胞をプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で培養する工程。

[0041] 本発明の方法において、多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造するにあたり、当該多能性幹細胞は、任意の方法で実質的に分離（または解離）することで単一細胞の状態、または、細胞同士が接着した細胞塊の状態で培養してもよく、より好ましくは、単一細胞の状態に分離して培養する方法である。分離の方法としては、例えば、力学的分離や、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液Accutase(TM)およびAccumax(TM) (Innovative Cell Technologies, Inc) が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離が挙げられる。

[0042] 多能性幹細胞は、浮遊培養により培養しても、あるいは、コーティング処

理された培養皿を用いて接着培養してもよい。より好ましくは、接着培養である。

[0043] 本発明の方法において多能性幹細胞の浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、または、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）したものを使用して行うことができる。

[0044] 本発明の方法において接着培養とは、細胞との接着性を向上させる目的で人工的にコーティング処理された培養皿にて培養することを意味する。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル（BD Biosciences）、Synthemax（Corning）、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン（例えば、ラミニン111、411または511、またはその断片）、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられ、好ましくは、マトリゲル、Synthemaxまたはゼラチンである。

[0045] 本発明の多能性幹細胞から内胚葉細胞の培養工程に使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へActivin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤またはHDAC阻害剤を適宜添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清（FBS））が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR)（ES細胞培養時の血清代替物）（Invitrogen）、N2サプリメント（Invitrogen）、B27サプリメント（Invitrogen）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX（Invitro

gen)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。1つの実施形態において、基礎培地は、RPMI 1640培地に、B27サプリメントおよび抗生物質を含む培地である。

[0046] 本発明において、Activin Aには、ヒトおよび他の動物由来のActivin A、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、R&D systems社等の市販されているものを使用することができる。本工程で用いる培地中のActivin Aの濃度は、1 ng/mlから1000 ng/ml、好ましくは、10 ng/mlから500 ng/ml、より好ましくは、50 ng/mlから200 ng/mlである、より好ましくは、90 ng/mlから100 ng/mlである。

[0047] 本発明において、GSK-3 $\beta$ 阻害剤は、GSK-3 $\beta$ の機能、例えば、キナーゼ活性を阻害できるものである限り特に限定されず、例えば、インジルビン誘導体であるBI0 (別名、GSK-3 $\beta$ 阻害剤IX ; 6-ブロモインジルビン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、フェニル $\alpha$ ブロモメチルケトン化合物であるGSK-3 $\beta$ 阻害剤VII (4-ジブロモアセトフェノン)、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts (別名、GSK-3 $\beta$ ペプチド阻害剤 ; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>) および高い選択性を有するCHIR99021 (Nature (2008) 453: 519-523、本文献は引用により本願の一部を構成する) が挙げられる。これらの化合物は、例えば、Stemgent、CalbiochemやBiomol社等から入手可能であり、また自ら作製してもよい。本工程で用いる好ましいGSK-3 $\beta$ 阻害剤としては、CHIR99021が挙げられる。本工程で用いるGSK-3 $\beta$ 阻害剤の濃度は、使用するGSK-3 $\beta$ 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、GSK-3 $\beta$ 阻害剤としてCHIR99021を用いる場合、培地中の濃度は0.01  $\mu$ Mから100  $\mu$ M、好ましくは、0.1  $\mu$ Mから10  $\mu$ M、さらに好ましくは、1  $\mu$ Mから3  $\mu$ Mである。

[0048] 本発明において、HDAC阻害剤は、例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、NaB、Vorinostat、NCC-149、NCH-47、NCH-51、MS-275、FK228、Apici

din、およびMGCD-0103などが挙げられる。これらの化合物は、Sigma-Aldrich社等で市販されているものを使用することができる。好ましくは、NaBである。本工程で用いるNaBの濃度は、10  $\mu$ Mから10 mM、好ましくは、100  $\mu$ Mから1 mM、より好ましくは、0.3 mMから0.5 mMである。

[0049] 本発明において、塊状で提供される多能性幹細胞を単一細胞の状態に分離する場合、最初の多能性幹細胞をActivin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程に用いる培地はROCK阻害剤を含んでいてもよい。ROCK阻害剤は、Rho-キナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632 (例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000)参照)、Fasudil/HA1077 (例、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照)、H-1152 (例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照)、Wf-536 (例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照) およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸 (例、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使用できる (例えば、米国特許出願公開第2005/020926 1号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照)。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。本工程で用いる好ましいROCK阻害剤としては、Y-27632が挙げられる。本工程で用いるROCK阻害剤の濃度は、使用するROCK阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合、0.1  $\mu$ Mから100  $\mu$ M、好ましくは、1  $\mu$ Mから50  $\mu$ M、さらに好ましくは、5  $\mu$ Mから20  $\mu$ Mである。本パラグラフに記載の文献は引用により本願の一部を構成する。

[0050] 本発明の多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造する工程の日数は、長期間培

養することで肝細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、例えば、4日以上、6日以上、8日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上、15日以上、16日以上、17日以上、18日以上、19日以上、または20日以上が挙げられる。好ましくは、「(1) Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程」が1日であり、「(2) Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程」が、1日以上3日以下であり、さらに「(3) Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地で培養する工程」が、2日以上5日以下である。

[0051] 本発明の多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造する工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2~5%である。

[0052] 本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、本発明で使用する肝細胞に誘導される任意の細胞が包含される。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹 (ES) 細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹 (ntES) 細胞、精子幹細胞 (「GS細胞」)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」)、人工多能性幹 (iPS) 細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞 (Muse細胞) などが含まれる。多能性幹細胞としては特にES細胞、iPS細胞、例えばヒトiPS細胞が例示される。

[0053] iPS細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、例えば、Oct 3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、

W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。本パラグラフに記載の文献は引用により本願の一部を構成する。

[0054] 体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば(1)神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2)組織前駆細胞、(3)リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0055] また、得られる肝細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が

起こらないという観点から、当該幹細胞の製造に用いるiPS細胞は、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一または実質的に同一である体細胞を用いて製造されることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、移植先の個体とHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座またはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

[0056] 本発明では、上述した方法により得られた肝細胞を含む肝疾患治療剤を提供する。肝細胞としては、他の細胞種が含まれる細胞集団であってもよく、肝細胞、例えばアルブミン陽性細胞が純化された集団であってもよい。好ましくは、20%以上、30%以上、40%以上または50%以上の肝細胞が含まれる細胞集団である。肝細胞を純化する方法する方法として、アルブミンに対する抗体またはヒト肝細胞特異的抗体K8216（W02003/080670、本文献は引用により本願の一部を構成する）を用いて染色し、染色された細胞をフローサイトメーター（FACS）や磁気細胞分離装置（MACS）を用いて濃縮する方法が例示される。

患者への治療剤の投与方法としては、例えば、得られた肝細胞をシート化して、患者の肝臓に貼付する方法、得られた肝細胞を生理食塩水等に懸濁させ、患者の肝臓に直接移植する方法、マトリゲル等から構成されたスキャフォールド上で三次元培養し、得られた肝細胞塊を移植する方法などが挙げられる。

[0057] 本発明において、肝疾患治療剤に含まれる肝細胞の細胞数は、移植片が投与後に生着できれば特に限定されなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製すればよい。

[0058] 本発明の分化誘導方法で調製した肝細胞を用いて被検物質の代謝について*in vitro*で試験することができる。試験に用いる肝細胞としては、他の細胞種が含まれる細胞集団であってもよく、肝細胞、例えばアルブミン陽性細胞が純化された集団であってもよい。例えば、20%以上、30%以上、40%以上または50%以上の肝細胞が含まれる細胞集団である。*in vitro*で試験

することに用いる肝細胞の純化の方法は、上述した抗体を用いて純化する方法に加えて、アルブミン遺伝子のプロモーターと機能的に連結したマーカー遺伝子を有する細胞を用いて、当該マーカー遺伝子を検出することによって行うこともできる。本発明において、「マーカー遺伝子」とは、細胞内で翻訳され指標として機能しうるタンパク質であり、例えば、蛍光タンパク質、発光タンパク質、蛍光、発光もしくは呈色を補助するタンパク質、薬剤耐性遺伝子によってコードされるタンパク質などが含まれるが、これらに限定されない。

[0059] 本発明において、蛍光タンパク質としては、Sirius、BFP、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPerなどの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange（例えば、hmK02）、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberryなどの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRaspberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

[0060] 本発明において、発光タンパク質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ ラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらに限定されない。

[0061] 本発明において、薬剤耐性遺伝子によってコードされるタンパク質は、対応する薬剤に対して抵抗性を有するタンパク質であれば何でもよい。本発明における薬剤耐性遺伝子は、例えば、抗生物質耐性遺伝子を含むが、これらに限定されない。抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、カナマイシン耐性

遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられる。

[0062] 本発明において、アルブミン遺伝子のプロモーターと機能的に連結したマーカー遺伝子を有する細胞は、例えば、上記のマーカー遺伝子をアルブミン遺伝子のプロモーター領域の下流に機能的に連結したベクターを常法に従って細胞内に導入することにより作製することができる。当該ベクターは、細胞に導入するだけでも良く、相同組換えによってアルブミン遺伝子座にマーカー遺伝子が組み込まれていても良い。

[0063] 当該被検物質の代謝試験は、(i) 本発明の方法で得られた肝細胞に被検物質を接触させる工程、および(ii) 被検物質の代謝産物を検出する工程を含む。工程(i)での「接触」とは、本発明によって製造された肝細胞を培養する培地に被検物質を添加することによって行われ得る。被験化合物の添加のタイミングは特に限定されない。従って、被検物質を含まない培地で培養を開始した後、ある時点で被検物質を添加することにしても、予め被検物質を含む培地で培養を開始することにしてもよい。

[0064] 被検物質には、例えば、医薬品や栄養食品等の既存成分或いは候補成分などが包含される。2種類以上の被検物質を同時に添加することにより、被検物質間の相互作用、相乗作用などを調べてもよい。被検物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なアッセイ系を構築することができる。

[0065] 被検物質を接触させる期間は任意に設定可能である。接触期間は例えば10分間～3日間、好ましくは1時間～1日間である。接触を複数回に分けて行うことにしてもよい。

[0066] 被検物質の代謝とは、エステルなどの加水分解、酸化反応（特にシトクロムP450による酸化）、還元反応などによる被検物質の化学修飾が例示され、

このような代謝の有無は、例えば、代謝産物の検出によって行うことができる。好ましくは、工程（i）の後得られた培養液をサンプルとして、予想される代謝産物を定性的又は定量的に測定する。測定方法は被検物質並びにその予測される代謝産物に応じて適切なものを選択すればよいが、例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（FIA法）、酵素免疫測定法（EIA法））等を採用可能である。

[0067] 典型的には、被検物質の代謝産物が検出されたとき、「被検物質が代謝された」と判定する。また、代謝産物の量に応じて被検物質の代謝量を評価することができる。

[0068] この他にも、本発明で得られた肝細胞を用いて薬物代謝酵素（例えば、シトクロム、UGT）の発現誘導を確認することができる。薬物代謝酵素の発現はmRNAレベル又はタンパク質レベルで評価することができる。例えば、薬物代謝酵素のmRNAレベルに上昇を認めたとき、「被検物質は薬物相互作用を起こす疑いがある」と判定することができる。

[0069] 一方、本発明の分化誘導方法で調製した肝細胞を用いて被検物質の毒性を試験することもできる。当該方法では、（i）本発明の方法で得られた肝細胞に被検物質を接触させる工程と、（ii）工程（i）後の肝細胞の状態を調べる工程を行う。工程（i）は、前記被検物質の代謝と同様である。

[0070] 工程（ii）では、被検物質を接触させた後の肝細胞の状態を調べ、被検物質の毒性を評価する。肝細胞の状態は、生存率の測定、細胞形態の観察、培養液中の肝障害マーカー（GOT、GPT等）の測定などによって把握することができる。例えば、被検物質の接触によって生存率の低下を認めたとき、「被検物質は肝毒性を有する」と判定することができる。また、被検物質の接触によって細胞形態の異常を認めたときや、培養液中の肝障害マーカーの量が上昇したときも同様に、「被検物質は肝毒性を有する」と判定することができる。生存率の低下の程度や肝障害マーカーの量に応じて定量的な判定を行ってもよい。

[0071] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は

それらの実施例によって制限されないものとする。

## 実施例 1

### [0072] ALBUMINGFPヒトiPS細胞株

ヒトiPS細胞 (201B6、648A1、648B1、604A1、604B1、604A3、606A1、606B1 および610B1) は、京都大学の山中教授より受領し、従来の方法で培養した (Takahashi K, et al. Cell. 131:861-72)。201B6は、Cell. 131:861-872, 2007に記載の方法で作製し、648A1、648B1、604A1、604B1、604A3、606A1、606B1および610B1は、Okita K, et al. Stem Cells. 31:458-466, 2013に記載の方法で製造された。本パラグラフに記載の文献は引用により本願の一部を構成する。

### [0073] アルブミン陽性細胞の誘導

#### <Stage 1>

201B6は、Accutase (Innovative Cell Technologies、AT-104) を加えて単一細胞へ分離し、 $2 \times 10^5$  cells/wellでMatrigel basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced (BD) をコートした24 wellプレートへ播種し、 $1 \mu\text{M}$  CHIR99021 (Stemgent)、100 ng/ml ActivinA (R&D systems)、2% B27 (Invitrogen) および0.5% PenStrep (Invitrogen) を添加したRPMI1640中で1日間培養した (Stage 1-1) (day1)。

[0074] 続いて、0.5 mM NaB (Sigma) を添加し、3日間培養した (Stage 1-2) (day4)。さらに、培地を除去し、 $1 \mu\text{M}$  CHIR99021 (Axon Medchem)、100 ng/ml ActivinA (R&D systems)、2% B27 (Invitrogen) および0.5% PenStrep (Invitrogen) を添加したRPMI1640中で5日間培養した (Stage 1-3) (day9)。以上の工程により得られた細胞をSOX17の抗体で染色し、SOX17陽性細胞の含有率を調べたところ、SOX17陽性細胞 (内胚葉細胞) を70%から80%含む細胞群を得た。

#### [0075] <Stage 2>

Stage 1の後、培地を除去し、1% DMSO、20% KSR (Invitrogen)、1 mM L-グルタミン酸、1% NEAA (Invitrogen)、0.1 mM  $\beta$ メルカプトエタノールお

よび0.5% PenStrepを添加したKnockout™ DMEM (Invitrogen) へ培地を交換し、7日間培養し、得られた細胞をAFPの抗体で染色し、AFP陽性細胞の含有率を調べたところ、AFP陽性細胞（肝芽細胞）を40%から60%含む細胞群を得た（day16）。

[0076] <Stage 3>

Stage 2の後、培地を除去し、150 nMまたは1  $\mu$ Mのプレグネノロン（東京化成）またはメトキサミン塩酸塩（Sigma）を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) (LONZA) へ培地を交換し、4日間、8日間または12日間培養した。このとき、対照として、1% DMSO、または20 ng/ml HGF および20 ng/ml オンコスタチンM (HGF+0sM) を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) にて同様に細胞を培養した。

[0077] 誘導アルブミン陽性細胞の評価

Stage 3にて得られた細胞群を抗アルブミン抗体（BETHYL, A80-229A）を用いて免疫染色した（図2）。また、アルブミンのmRNAの発現量を定量PCRを用いて測定した（図3）。使用したプライマーは、Forward:5' -CGCTATTAGTTCGTTACACCA-3'（配列番号：1）およびReverse:5' -TTTACAACATTTGCTGCCCA-3'（配列番号：2）である。この結果、Stage 3において8日間培養した場合に最も効率よくアルブミンを発現する細胞が得られることが確認された。アルブミン産生細胞の製造効率は、核染色（DAPI）陽性の細胞数に対してアルブミン陽性細胞の割合をアルブミン陽性細胞率として、In cell analyzerで解析した（図2B）。

[0078] Stage 3において、プレグネノロンの濃度は、150 nMおよび1  $\mu$ Mのいずれでも同様の結果であった。

## 実施例 2

[0079] Stage 1およびStage 2の培養日数の検討

Stage 1のNaBを含有する培地中で培養する期間（Stage 1-2）を1日とした場合でも最終的に得られるアルブミン陽性細胞の収率として同様の効果が得られること、さらにNaBを除いた培地で培養する期間（Stage 1-3）を2日と

した場合でも同様の効果が得られることが確認された。従って、Stage 1は、4日間から9日間の範囲において行うことで肝細胞の誘導が可能であることが確認された。

[0080] さらに、Stage 2の培養期間を4日間とした場合でも7日間培養した場合と最終的に得られるアルブミン陽性細胞の収率としては同様の効果が得られることが確認された。

### 実施例 3

#### [0081] 代替化合物の探索

メトキサミン塩酸塩の代替物として、類似化合物（アドレナリン受容体作動薬、特に $\alpha$ 受容体刺激作用を有する薬剤）の効果を検討した。上述のStage 3において、1  $\mu$ Mのエチレフリン、フェニレフリンまたはメトキサミン塩酸塩を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) を用いて8日間培養し、アルブミン陽性細胞率およびアルブミンのmRNAの発現量を前記と同様の方法で測定したところ、エチレフリンおよびフェニレフリンは、共にメトキサミン塩酸塩と同等の効果を示すことが確認された（図4および5）。さらに、得られた細胞集団から培養液中へ分泌されたアルブミン量をELISA法を用いて測定したところ、Stage 3においてエチレフリン、フェニレフリンおよびメトキサミン塩酸塩のいずれかを培養液へ添加することで、アルブミンの分泌能を有する細胞が誘導できることが示された（図6）。

[0082] 以上の結果より、肝芽細胞から肝細胞を製造する工程において、プレグネノロンまたはアドレナリン受容体作動薬など低分子化合物を用いることで、効率よく肝細胞を得ることができることが示唆された。

### 実施例 4

#### [0083] 誘導肝細胞の評価（薬物代謝酵素誘導反応）

上述した方法のStage 1の期間を6日間（Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間）、Stage 2の期間を6日間とした。Stage 2にて得られた細胞集団を20 ng/ml HGFおよび20 ng/ml OncostatinオンコスタチンM（HGF+0sM）を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit)

中で8日間培養して得られた細胞集団、Stage 2にて得られた細胞集団を1  $\mu$ Mのメトキサミン塩酸塩を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuotes Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団、Panc1 (ヒト膵癌由来細胞株：理研バイオリソースセンター) およびHepG2 (ヒト肝癌由来細胞株) を用いた。各細胞集団を、100  $\mu$ Mのオメプラゾール (Sigma) を添加または添加しないHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuotes Kit) 中で2日間培養した後、CYP1A1のmRNAの発現量を定量PCRにて測定した。使用したプライマーは、Forward: 5'-CCACCAAGAACTGCTTAGCC-3' (配列番号：3) およびReverse: 5'-CAGCTCCAAAGAGGTCCAAG-3' (配列番号：4) である。CYP1A1のmRNA量を $\beta$ アクチンのmRNA量と比較した値をCYP1A1の相対発現量として算出し、各細胞での相対発現量を図7に示した。その結果、HepG2細胞、並びにStage 2にて得られた細胞集団をHGF+0sMまたはメトキサミン塩酸塩を添加して誘導した細胞集団では、オメプラゾールの添加によりCYP1A1の発現が誘導されることが確認された。メトキサミンを用いて多能性幹細胞より誘導した肝細胞は、オメプラゾールによるCYP1A1の発現誘導を引き起こすことから、医薬品の薬物相互作用の検討に用いることができることが示唆された。

#### [0084] 誘導肝細胞の評価 (肝機能評価)

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間、およびStage 3にて20 ng/ml HGFおよび20 ng/ml オンコスタチンM (HGF+0sM) を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuotes Kit) 中で8日間培養して得られた肝細胞、Stage 3にて1  $\mu$ Mのメトキサミン塩酸塩を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuotes Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団またはStage 3にてDMSOを添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuotes Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団およびHepG2へ、1 mg/ml ICG (インドシアニングリーン) (Sigma) を添加して、1時間培養した後、各細胞におけるICGの取り込みを観察したところ、HepG2、およびHGF+0sMまたはメトキサミン塩酸塩を添加して誘導した細胞では、細胞内へのICGの取り込みが確認さ

れた（図8上図）。従って、同細胞は、薬物代謝機能を有していることが示唆された。

[0085] また、HGF+0sM、メトキサミン塩酸塩、またはDMSOを添加して誘導した細胞、およびHepG2を、Oil Redにより染色したところ、HepG2、HGF+0sMおよびメトキサミンにおいて、一部の細胞に脂肪滴の蓄積が観察された（図8中図）。

[0086] さらに、HGF+0sM、メトキサミン塩酸塩、またはDMSOを添加して誘導した細胞集団、およびHepG2をPAS染色したところ、HepG2、HGF+0sMおよびメトキサミンにおいて、赤紫色に染色される細胞が多数観察された（図8下図）。従って、メトキサミン塩酸塩を添加して誘導した細胞は、グリコーゲンの蓄積能を有することが確認された。

[0087] 誘導肝細胞の評価（薬物代謝酵素の発現評価）

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間、およびStage 3にて20 ng/ml HGFおよび20 ng/ml オンコスタチンM (HGF+0sM) を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団、Stage 3にて1  $\mu$ Mのメトキサミン塩酸塩を添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団、Stage 3にて1  $\mu$ Mのプレグネロンを添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団、またはStage 3にてDMSOを添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) 中で8日間培養して得られた細胞集団を、CYP3A4抗体 (Proteintech Group) を用いて免疫染色（図9A）を行った。この結果、DMSO以外を用いて誘導された細胞集団では、CYP3A4を発現する細胞が確認された。同様に、これらの細胞集団におけるCYP3A4のmRNAの発現量を定量PCRで測定したところ、DMSO以外を用いて誘導された肝細胞では、CYP3A4が強く発現していることが確認された（図9B）。使用したプライマーは、Forward:5'-AAGACCCCTTTGTGGAAAAC-3'（配列番号：5）およびReverse:5'-CGAGGCGACTTTCTTTCATC-3'（配列番号：6）で

ある。

[0088] 以上より、本発明の方法を用いて製造された肝細胞を用いて被検物質の肝代謝を判定することができることが示唆された。

## 実施例 5

### [0089] メトキサミンの濃度の検討

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を8日間の条件において、Stage 3で添加するメトキサミン塩酸塩の濃度をそれぞれ、0 M、1 fM、1 pM、1 nM、1  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ Mで作製された細胞集団のアルブミンのmRNAの発現量を定量PCRを用いて測定した(図10)。その結果、1 fM以上の濃度のメトキサミン塩酸塩を用いた場合、アルブミンを発現する細胞が得られることが確認された。

### [0090] 誘導肝細胞の評価(薬物代謝酵素の発現評価)

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を8日間の条件において、1  $\mu$ Mのメトキサミン塩酸塩を用いて得られた細胞における各薬物代謝酵素(CYP1A1、CYP3A5、CYP3A7、CYP3A4、CYP2C19)およびチロシニアミノトランスフェラーゼ(TAT)の発現量を定量PCRを用いて測定した(図11)。用いたprimerの配列は、以下表1に示す。その結果、本発明の方法を用いて作製された細胞集団は、HGF+0sMを用いた場合と同等の薬物代謝酵素等を発現していることが確認された。

[表1]

|                 |                            |         |
|-----------------|----------------------------|---------|
| CYP3A5-Foward   | CTCTCTGTTTCCAAAAGATACC     | 配列番号：7  |
| CYP3A5-Reverse  | TGAAGATTATTGACTGGGCTG      | 配列番号：8  |
| CYP3A7-Forward  | AGATTTAATCCATTAGATCCATTTCG | 配列番号：9  |
| CYP3A7-Reverse  | AGGCGACCTTCITTTTATCTG      | 配列番号：10 |
| CYP2C19-Forward | GAACACCAAGAATCGATGGACA     | 配列番号：11 |
| CYP2C19-Reverse | TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA     | 配列番号：12 |
| TAT-Forward     | ATCTCTGTTATGGGGCGTTG       | 配列番号：13 |
| TAT-Reverse     | TGATGACCACTCGGATGAAA       | 配列番号：14 |

#### [0091] 薬物相互作用の影響の評価

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を6日間の条件を用いて製造された細胞を用いて、各薬物代謝酵素の薬物による影響を検討した。詳細には、Stage 3の期間を6日間目の細胞へ40  $\mu$ M リファンピリシンを添加し、2日後にCYP3A4のmRNA発現量を定量PCRを用いて測定した。同様に、40  $\mu$ M オメプラゾールを添加し、CYP1A2のmRNA発現量を測定し、100  $\mu$ M フェノバルビタールを添加し、CYP2B6のmRNA発現量を測定した。その結果、本発明の方法により得られた細胞において各薬物代謝酵素が対応する薬物と接触させることで発現誘導が起きることが確認された(図12)。従って、当該細胞を用いて薬物相互作用を評価することが可能であることが示唆された。

#### [0092] 各iPS細胞株における肝細胞分化誘導

上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を8日間の条件を用いて、648A1、648B1、604A1、604B1、604A3、606A1、606B1および610B1から誘導し、分泌されるアルブミン量を測定したところ、いずれのiPS細胞株からも少なくとも一日あたり2  $\mu$ g/mlを分泌する機能を有する細胞が製造できることが確認された(図13)。

#### [0093] アルブミン陽性細胞の含有率の測定

ヒトiPS細胞(201B6)のアルブミン遺伝子座の開始コドンの下流へGFP-polyAを連結するよう、常法に従って、相同組換えを行った。当該相同組換えにより、アルブミンの発現と連携してGFPを発現する細胞株を作製した(以下、アルブミンレポーターiPS細胞という)。アルブミンレポーターiPS細胞を、上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を8日間の条件を用いて、肝細胞を誘導し、GFP陽性細胞の含有率を測定した(図14)。その結果、誘導後の細胞群において、アルブミン発現細胞は、39.9%含

有されていることが確認された。

#### [0094] 肝細胞誘導メカニズムの検討

メトキサミンによる肝細胞誘導効率を上昇させるメカニズムを検討するため、各アドレナリン受容体の遮断薬を添加し、アルブミンの分泌量を検討した。上述した方法のStage 1の期間を6日間(Stage 1-1を1日間、Stage 1-2を2日間およびStage 1-3を3日間)、Stage 2の期間を6日間およびStage 3の期間を8日間の条件にて、Stage 3において、メトキサミンおよび各アドレナリン受容体の遮断薬を添加した。用いたアドレナリン受容体の遮断薬は、 $\alpha$  1 遮断薬として10  $\mu$ M ドキザソシン (Sigma) を使用し、 $\alpha$  2 遮断薬として10  $\mu$ M ヨヒンビン (Sigma) を使用し、 $\beta$  1 遮断薬として10  $\mu$ M メトプロロール (Sigma) を使用し、 $\beta$  2 遮断薬として10  $\mu$ M ブトキサミン (Sigma) を使用した。その結果、メトキサミンに対して、ドキザソシンを添加した場合において、アルブミン分泌量が低下した(図15)。従って、iPS細胞から肝細胞を誘導するにあたり、少なくとも $\alpha$  1 作動することでその誘導効率を上昇させることができることが示唆された。

#### [0095] 遺伝子発現プロファイル解析

ヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞について、RNA sequencing解析により遺伝子発現プロファイルの比較を行った。図16は主成分分析(PCA)を、図17は肝臓マーカー遺伝子発現のヒートマップを示す。これらの結果より、既存の増殖因子(HGF&0sM)で分化誘導した肝細胞とメトキサミンで分化誘導した肝細胞は、遺伝子発現プロファイルがほぼ同じであることが確認された。

### 実施例 6

#### [0096] ES細胞から肝細胞の誘導

##### <Stage 1>

マウスES細胞(D3株)は、0.25%トリプシン-EDTA (GIBCO) を加えて単一細胞へ分離した。フィーダー細胞を除くため、ゼラチンコートしたプレートへ播種して10~20分後にES細胞と培養液とを含む上清を回収し、次いで $2.0 \times 10^4$ ~ $8.0 \times 10^4$  cells/wellとなるようMatrigel basement Membrane Matrix Growth Fac

tor Reduced (BD) をコートした24 wellプレートへ播種した。1  $\mu$ M CHIR99021 (Axon Medchem)、100 ng/ml Activin A (R&D systems)、2% B27 (Invitrogen) および0.5% PenStrep (Invitrogen) を添加したRPMI1640中で1日間培養した (Stage 1-1) (day1)。

[0097] 続いて培地へ0.5 mM NaB (Sigma) を添加し、1日間培養した (Stage 1-2) (day2)。培地を除去し、0.5 mM NaB (Sigma)、1  $\mu$ M CHIR99021 (Axon Medchem)、100 ng/ml Activin A (R&D systems)、2% B27 (Invitrogen) および0.5% PenStrep (Invitrogen) を添加したRPMI1640中で4日間培養した (Stage 1-3) (day 6)。以上の工程により得られた細胞をSox17の抗体で染色し、Sox17陽性細胞の含有率を調べたところ、Sox17陽性細胞 (内胚葉細胞) を60%から80%含む細胞群を得た。

[0098] <Stage 2>

Stage 1の後、培地を除去し、1 %DMSO、20%KSR (Invitrogen)、1 mM L-グルタミン酸、1% NEAA (Invitrogen)、0.1 mM  $\beta$ メルカプトエタノール、0.5 mM NaB (Sigma) および0.5% PenStrepを添加したKnockout™DMEM (Invitrogen) へ培地を交換し、6日間培養して細胞を得た。得られた細胞をAFPの抗体で染色し、AFP陽性細胞の含有率を調べたところ、AFP陽性細胞 (肝芽細胞) を40%から60%含む細胞群を得た (day 12)。

[0099] <Stage 3>

Stage 2の後、培地を除去し、1  $\mu$ Mのプレグネノロン (東京化成)、メトキシサミン塩酸塩 (Sigma)、エチレフリンまたはフェニレフリンを添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) (LONZA) へ培地を交換し、8日間培養した。このとき、対照として、1% DMSO、または20 ng/ml HGF および20 ng/mlオンコスタチンMを添加したHepatocyte Culture Medium (HCM SingleQuots Kit) にて同様に細胞を培養した。

[0100] 誘導肝細胞の評価

未分化細胞 (ES細胞)、Day 6の細胞 (Stage 1終了)、Day 12の細胞 (Stage 2終了時)、Stage 3でHGF+オンコスタチンM(GFs)、メトキシサミン、エチレ

フリン、フェニレフリン、プレグネノロンを添加した培地にて8日間培養した細胞 (Day20)、および成熟マウス肝細胞のそれぞれにおけるチロシンアミノトランスフェラーゼ (Tat)、薬物代謝酵素 (Cyp3a11およびCyp3a13)、および $\beta$ アクチンの発現を測定した。結果を図19に示す。

Stage 3においてプレグネノロン、アドレナリン作動薬であるメトキサミン、エチレフリン、フェニレフリンを添加して誘導された細胞集団は、HGF+0sMを用いた場合と同様の薬物代謝酵素等を発現していることが確認された。

[0101] また、Stage 3においてメトキサミンを添加した培地を用いて8日間培養した細胞を、陽性コントロールとしてStage 3においてHGF+0sMを添加した培地、陰性コントロールとしてDMSOを添加した培地で同様に培養した細胞を抗アルブミン抗体 (Albumin) 抗Cyp3a4抗体、および抗C/ebp $\beta$ で免疫染色した。結果を図20に示す。いずれもHGF+0sMを添加した培地を用いた細胞群とメトキサミンを添加した培地を用いた細胞群で、非常によく似た発現が認められた。

### 産業上の利用可能性

[0102] 以上詳述したように、本発明は、多能性幹細胞から肝細胞を分化誘導する方法を提供する。これにより、本方法で製造された肝細胞は、肝不全等の肝臓疾患の治療のための再生医療や医薬品の安全性試験、薬物代謝検査などに使用され得る。

### 請求の範囲

- [請求項1] 肝芽細胞をプレグネノロンまたはアドレナリン作動薬を含む培地中で培養する工程を含み、当該肝芽細胞がAFP陽性である、肝細胞を製造する方法。
- [請求項2] 前記アドレナリン作動薬が、アドレナリン、ノルアドレナリン、エチレフリン、ナファゾリン、フェニレフリン、メトキサミンおよびミドドリンから成る群より選択される試薬である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記アドレナリン作動薬が、エチレフリン、フェニレフリンおよびメトキサミンから選択される試薬である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記肝芽細胞が、内胚葉細胞をDMSOを含む培地中で培養する工程を含む方法で製造された細胞であり、当該内胚葉細胞がSOX17陽性細胞である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記内胚葉細胞が、多能性幹細胞を、Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地中で培養する工程を含む方法で製造された細胞である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記多能性幹細胞から内胚葉細胞を製造する工程が、Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程をさらに含む、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記GSK3 $\beta$ 阻害剤が、CHIR99021であり、前記HDAC阻害剤が、NaB（酪酸ナトリウム）である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項5から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記iPS細胞がヒトiPS細胞である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記多能性幹細胞がES細胞である、請求項5から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項11] 多能性幹細胞から肝細胞を製造する方法であって、以下の工程（i）から（iii）：

(i) 多能性幹細胞を、Activin AおよびGSK-3 $\beta$ 阻害剤を含む培地中で培養する工程、

(ii) 工程 (i) で得られた細胞をDMSOを含む培地中で培養する工程、および

(iii) 工程 (ii) で得られた細胞をプレグネノロンおよびアドレナリン作動薬から成る群より選択された薬剤を含む培地中で培養する工程、

を含む、前記方法。

[請求項12] 前記アドレナリン作動薬が、アドレナリン、ノルアドレナリン、エチレフリン、ナファゾリン、フェニレフリン、メトキシアミンおよびミドドリンから選択される試薬である、請求項11に記載の方法。

[請求項13] 前記アドレナリン作動薬が、エチレフリン、フェニレフリンおよびメトキシアミンから選択される試薬である、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 前記工程 (i) において、Activin A、GSK-3 $\beta$ 阻害剤およびHDAC阻害剤を含む培地で培養する工程をさらに含む、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記GSK3 $\beta$ 阻害剤が、CHIR99021であり、前記HDAC阻害剤が、NaB（酪酸ナトリウム）である、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 前記多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項11から15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 前記iPS細胞がヒトiPS細胞である、請求項16に記載の方法。

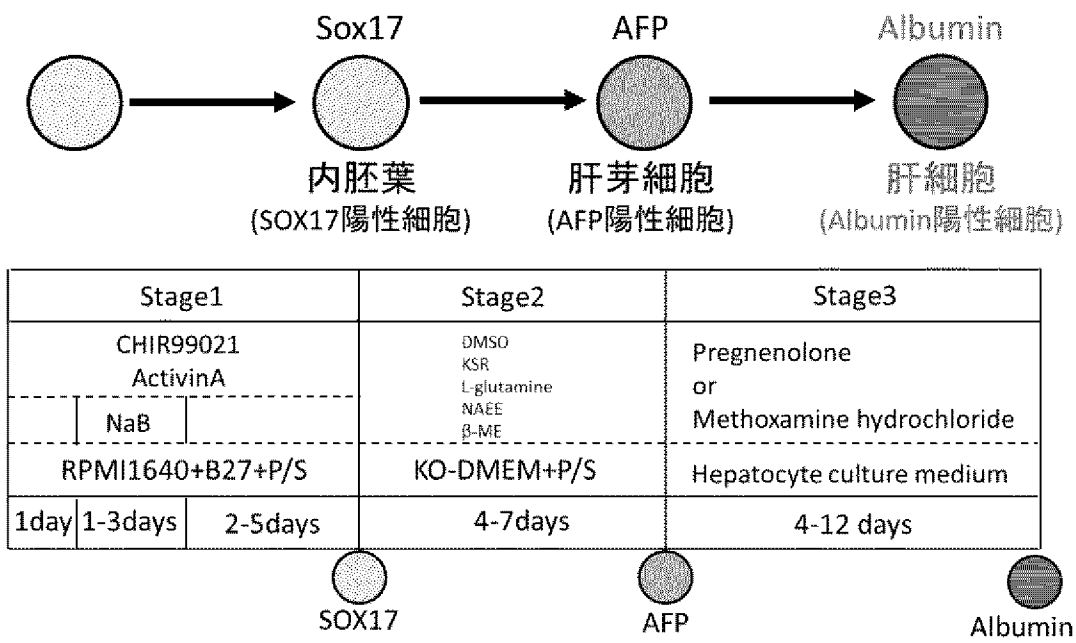
[請求項18] 前記多能性幹細胞がES細胞である、請求項11から15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項19] 請求項1から18のいずれか1項に記載の方法で製造された肝細胞と被検物質を接触させる工程を含む、被検物質の代謝産物を検出する方法。

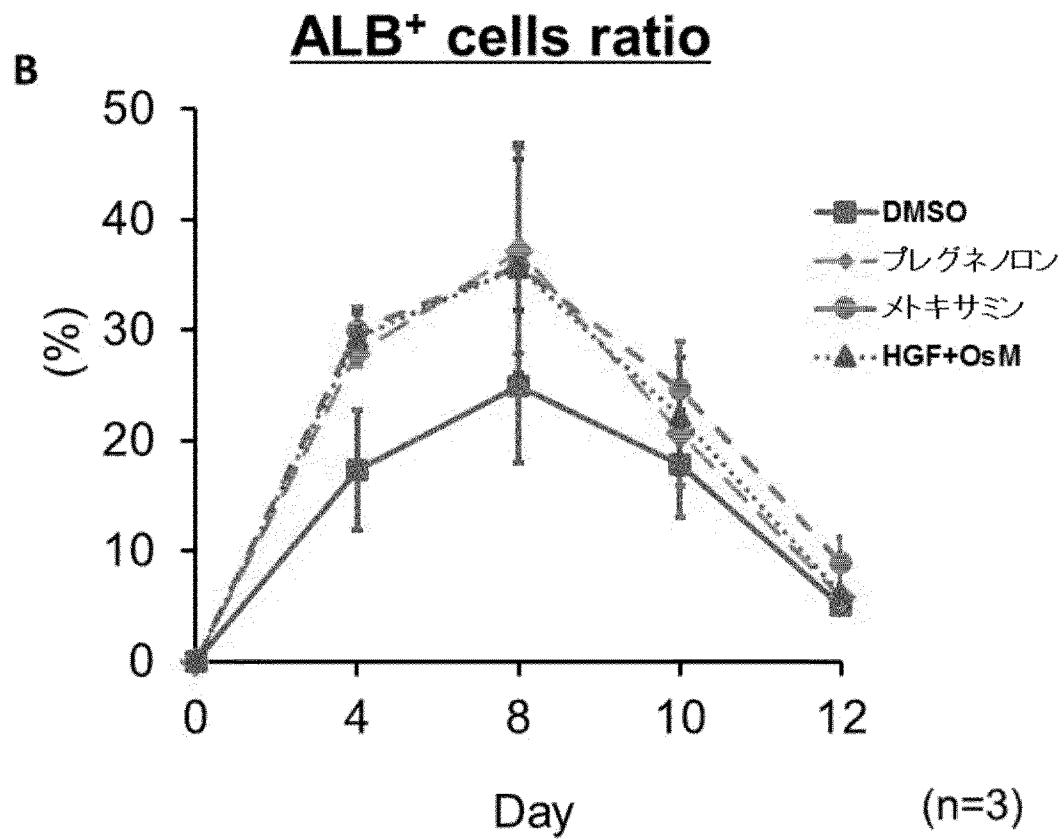
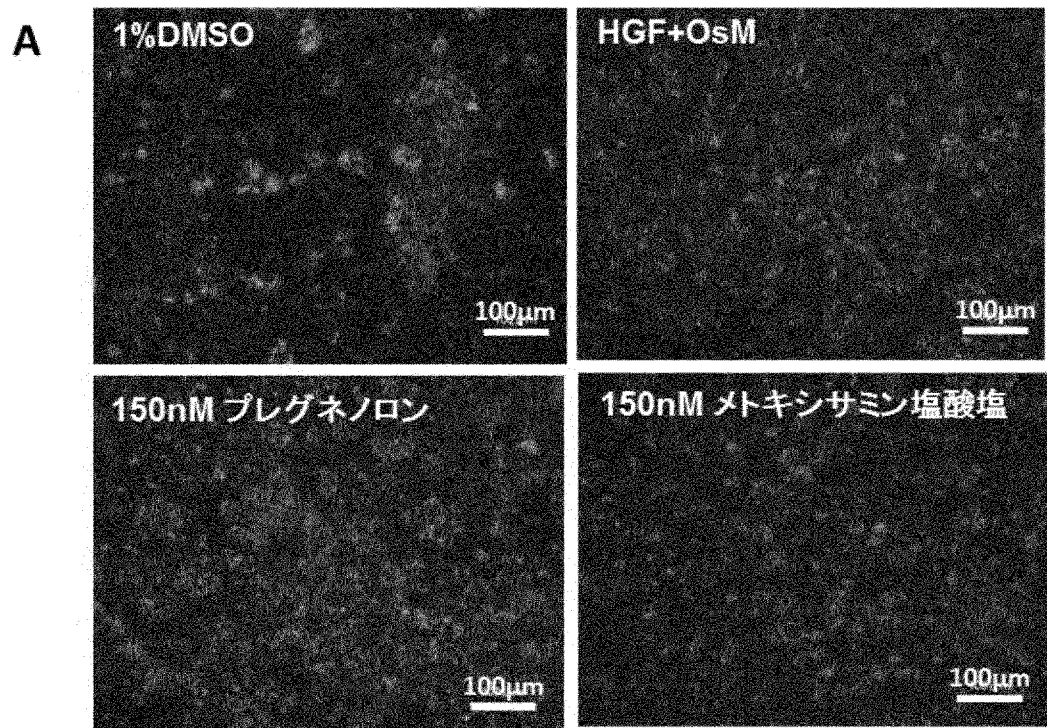
[請求項20] 請求項1から18のいずれか1項に記載の方法で製造された肝細胞と被検物質を接触させる工程を含む、被検物質の薬物代謝酵素の誘導を

検出する方法。

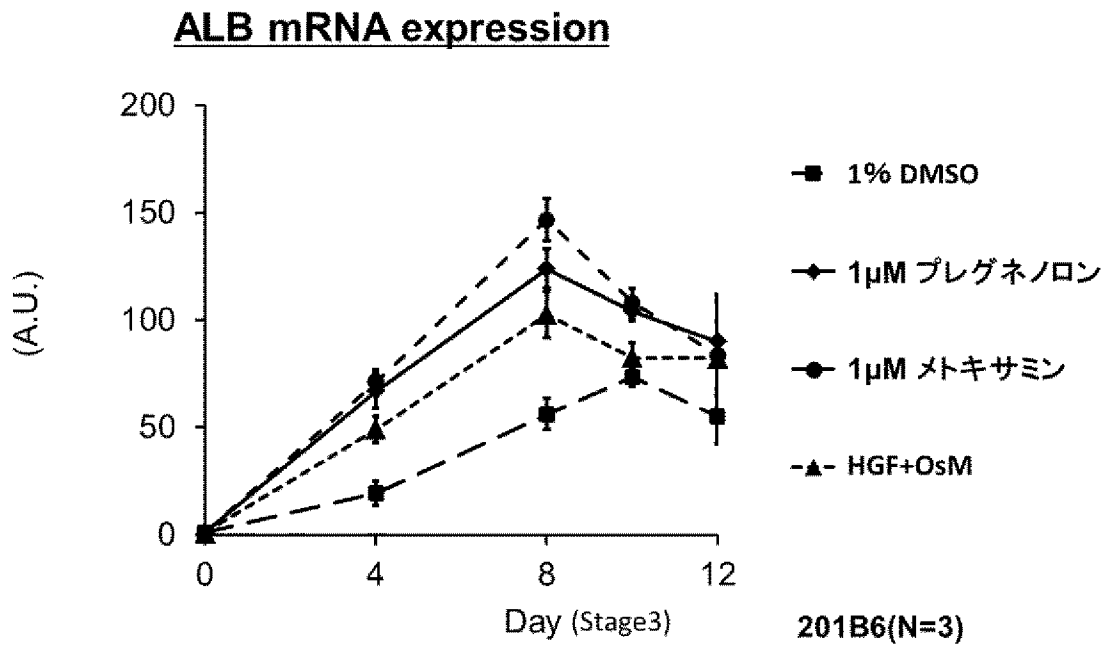
[図1]



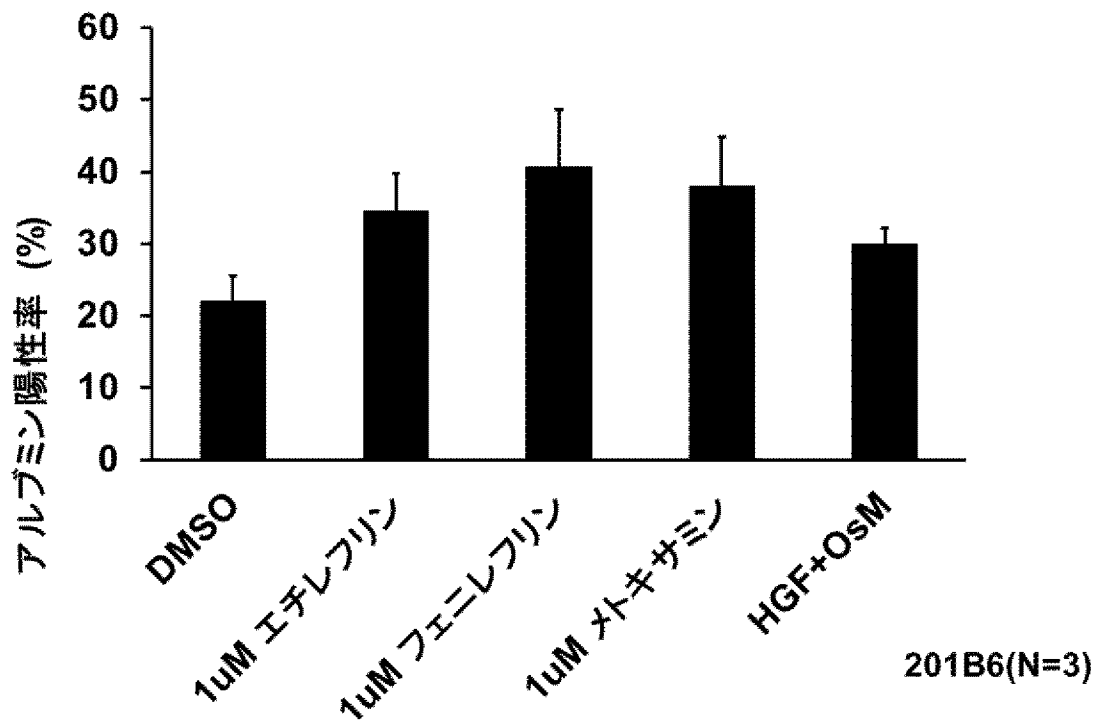
[図2]



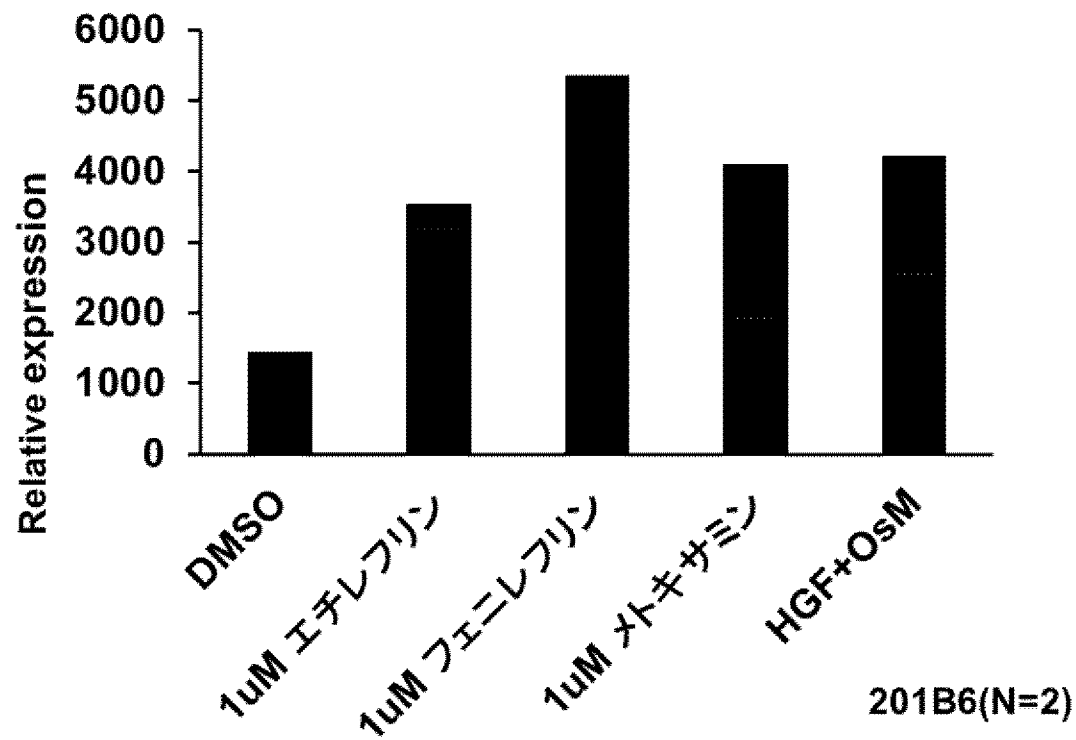
[図3]



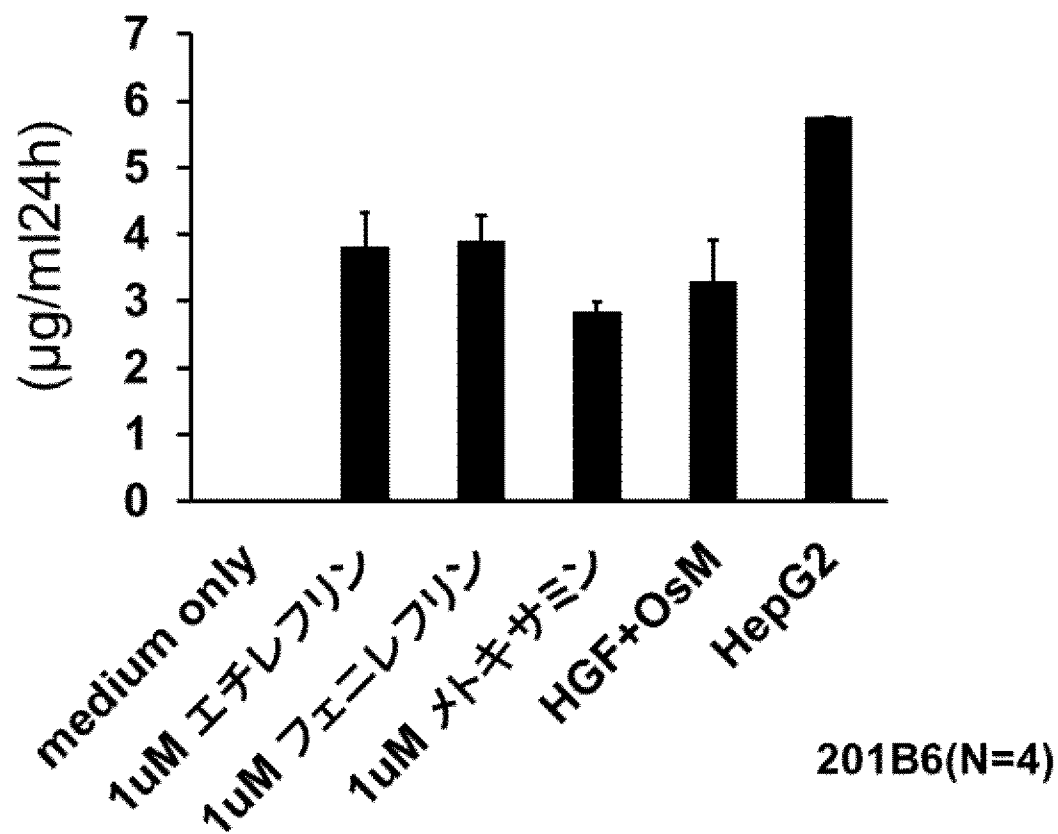
[図4]



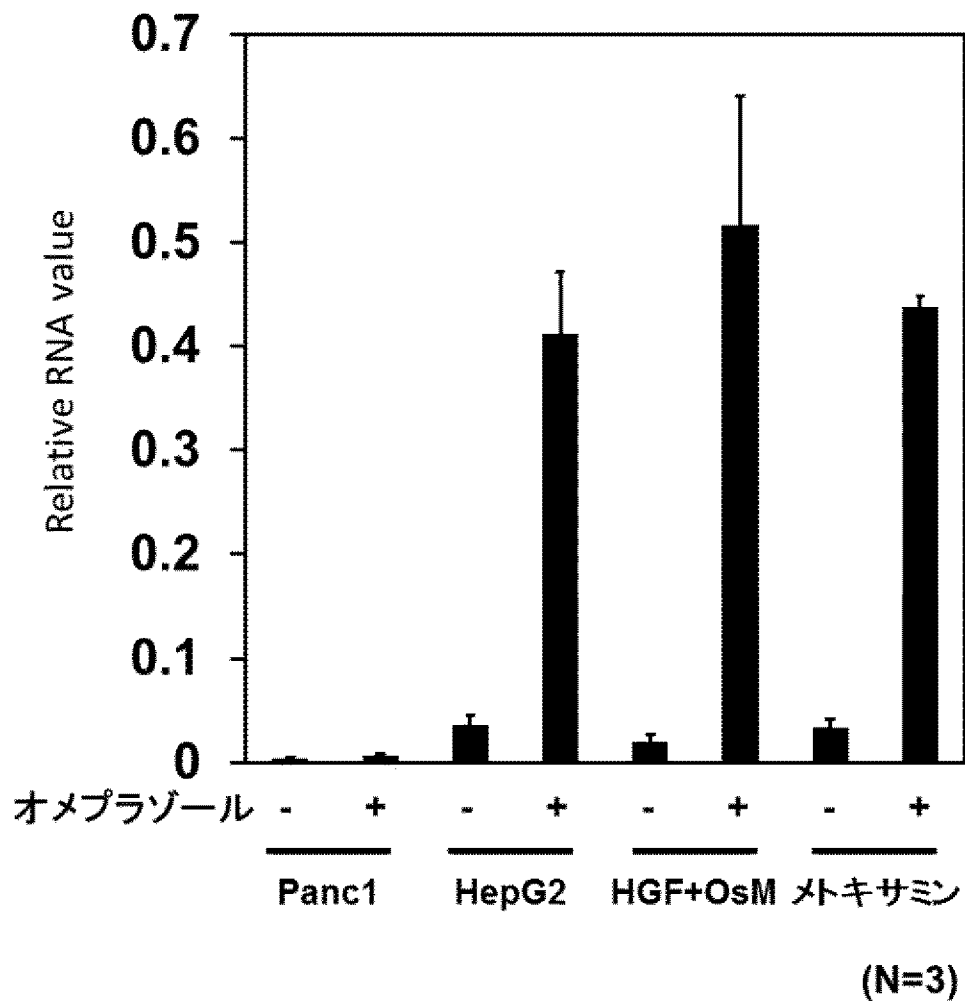
[図5]

**ALB mRNA**

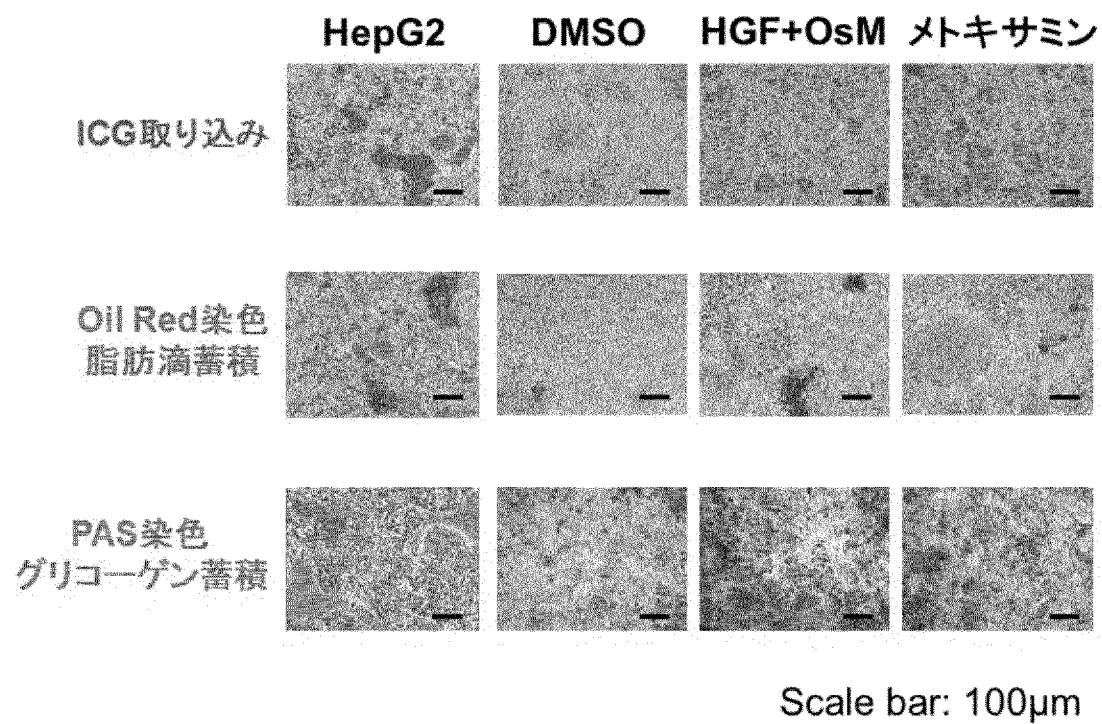
[図6]

**Albumin secretion**

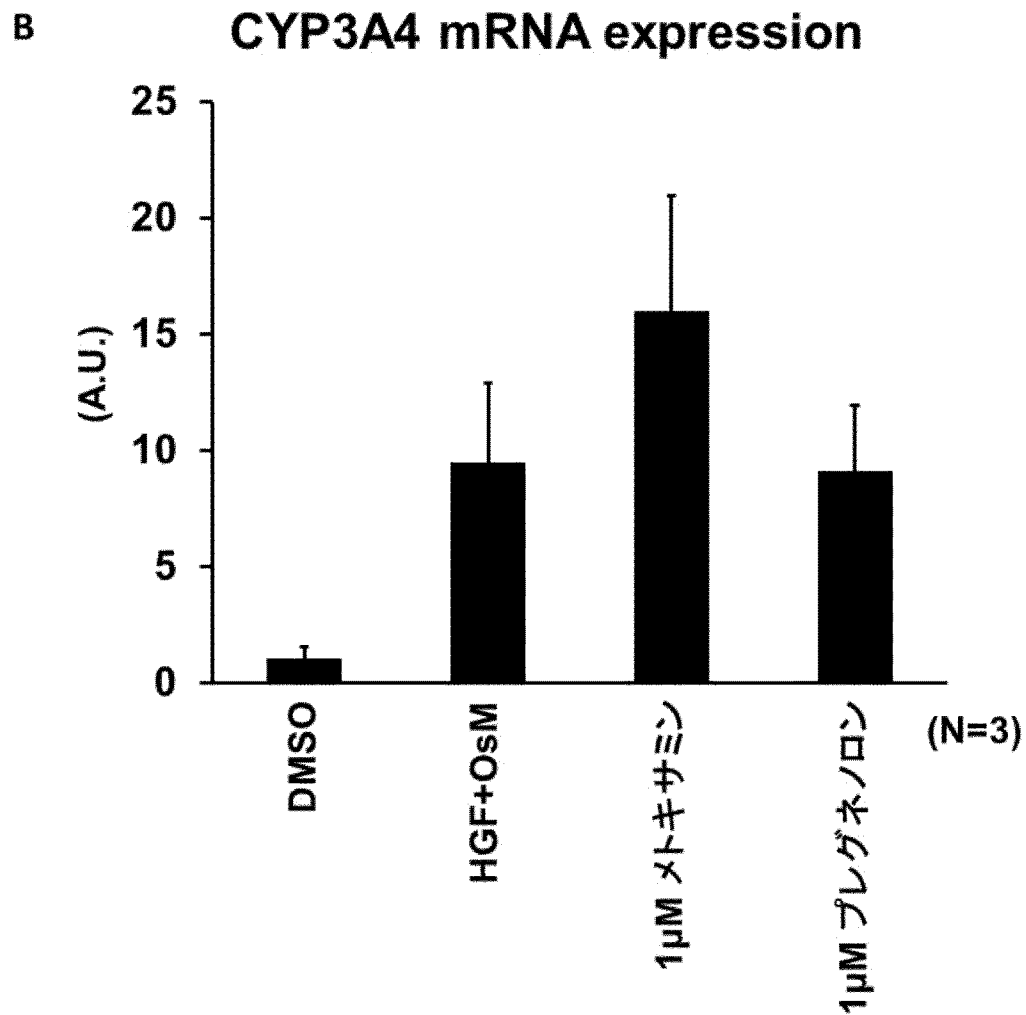
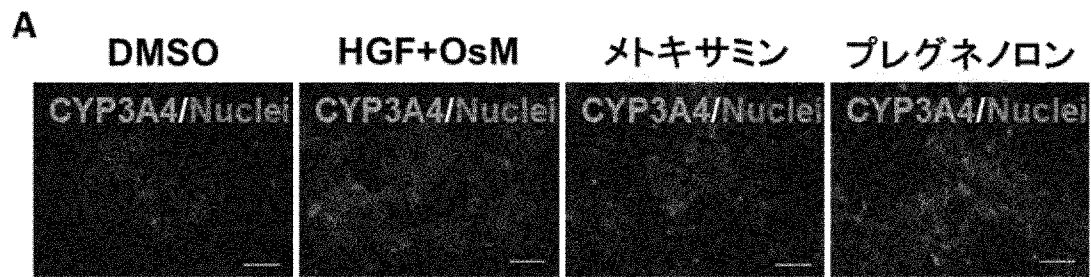
[図7]

**CYP1A1 mRNA induction**

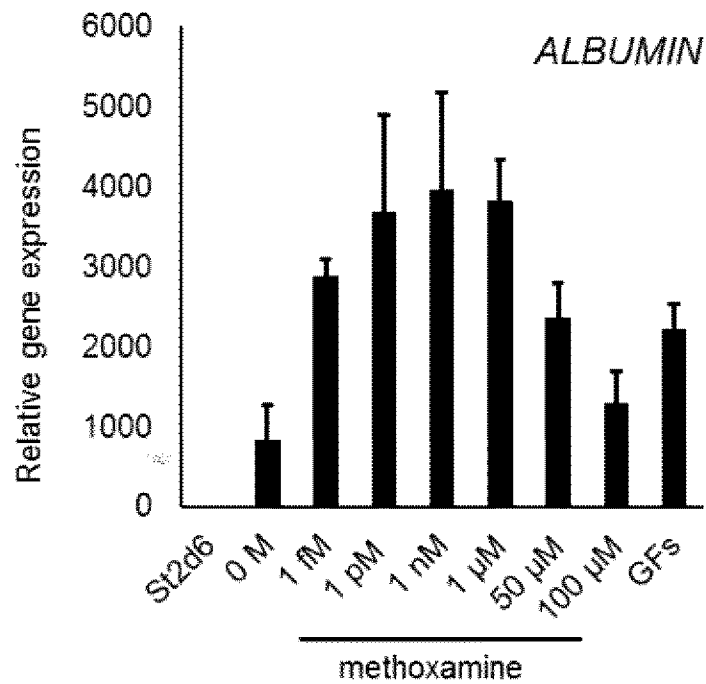
[図8]



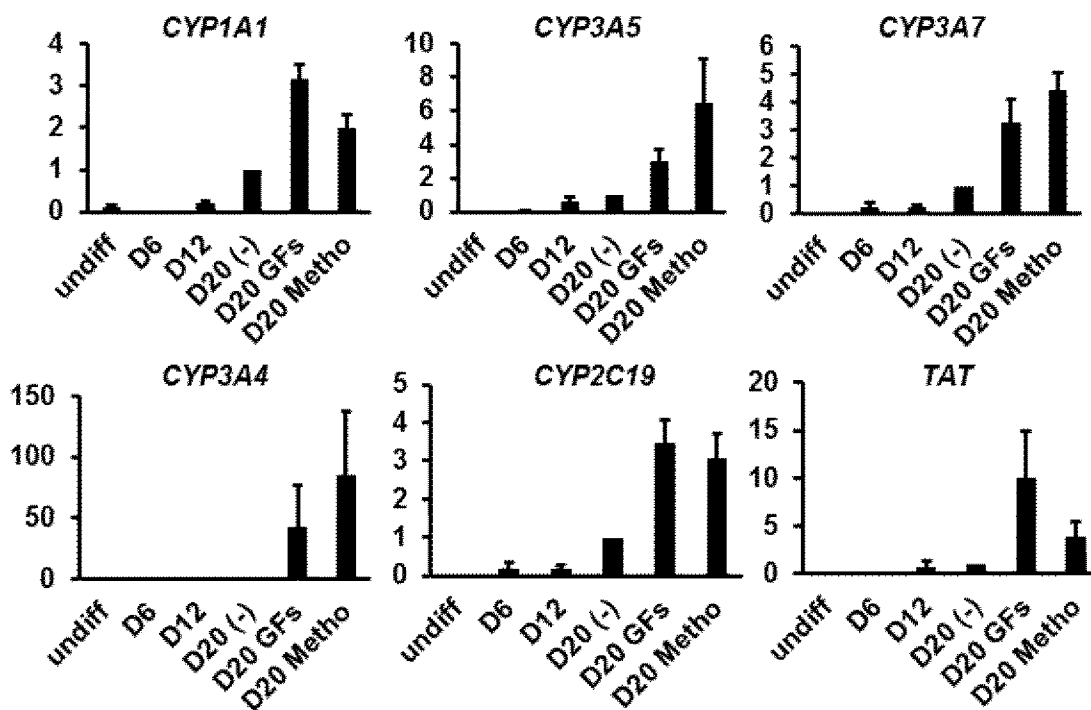
[図9]



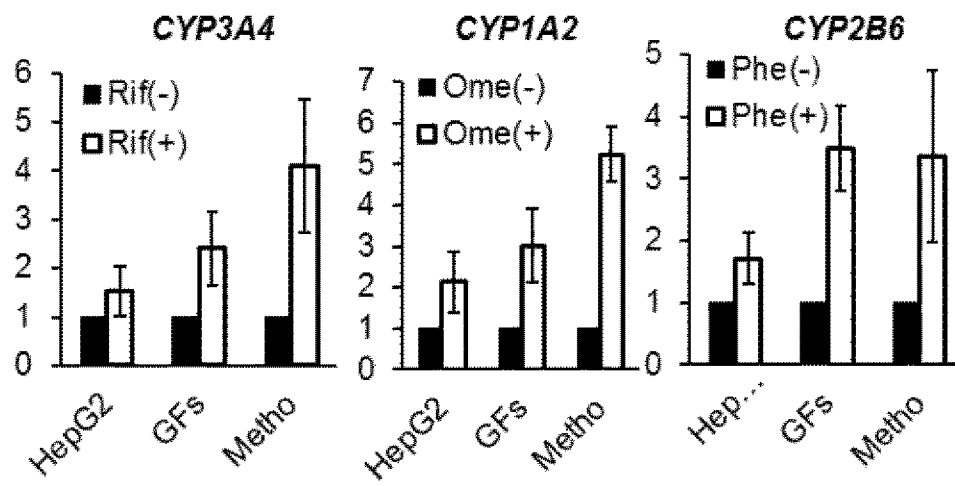
[図10]



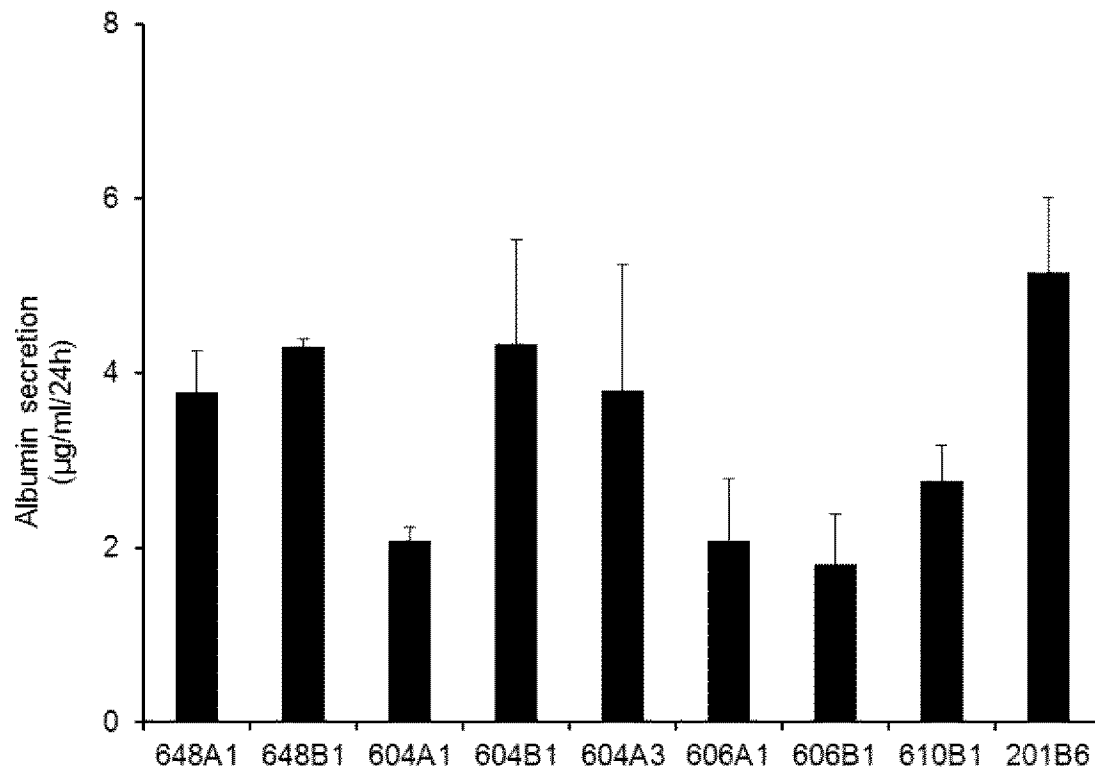
[図11]



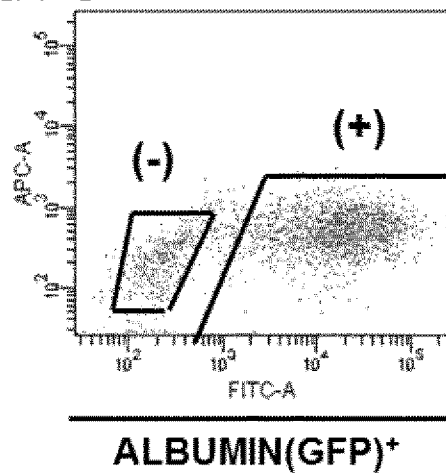
[図12]



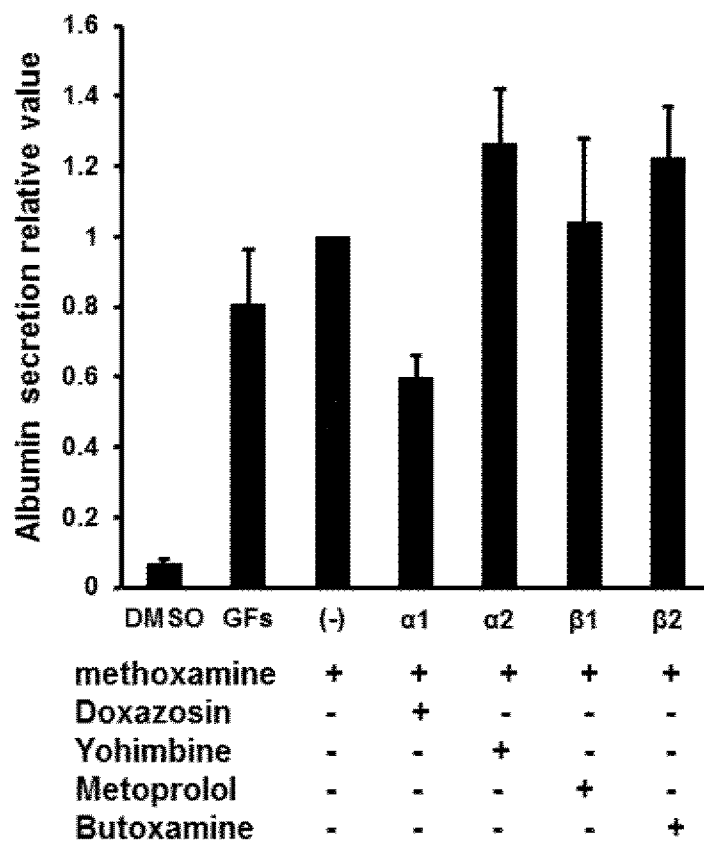
[図13]



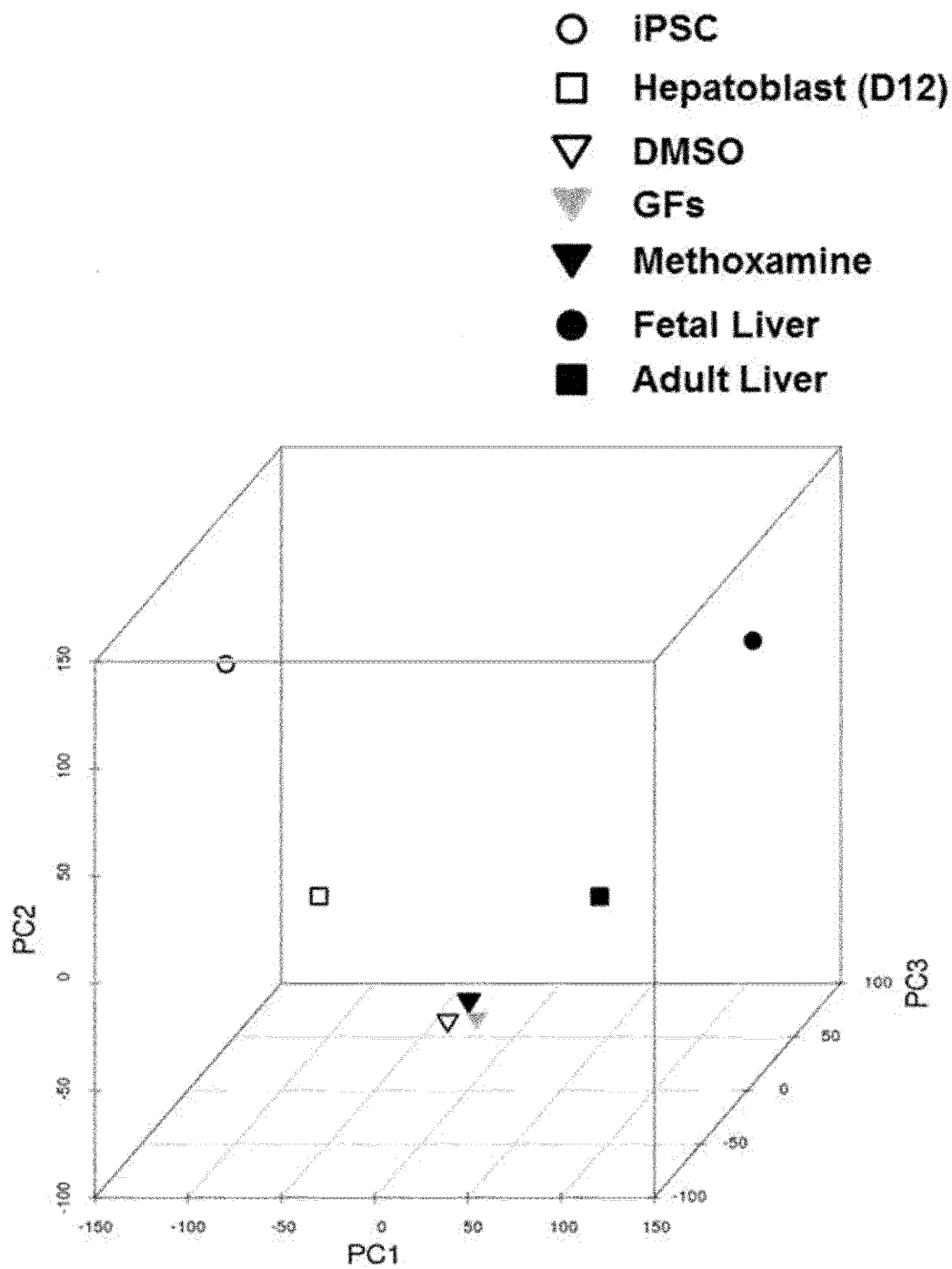
[図14]



[図15]

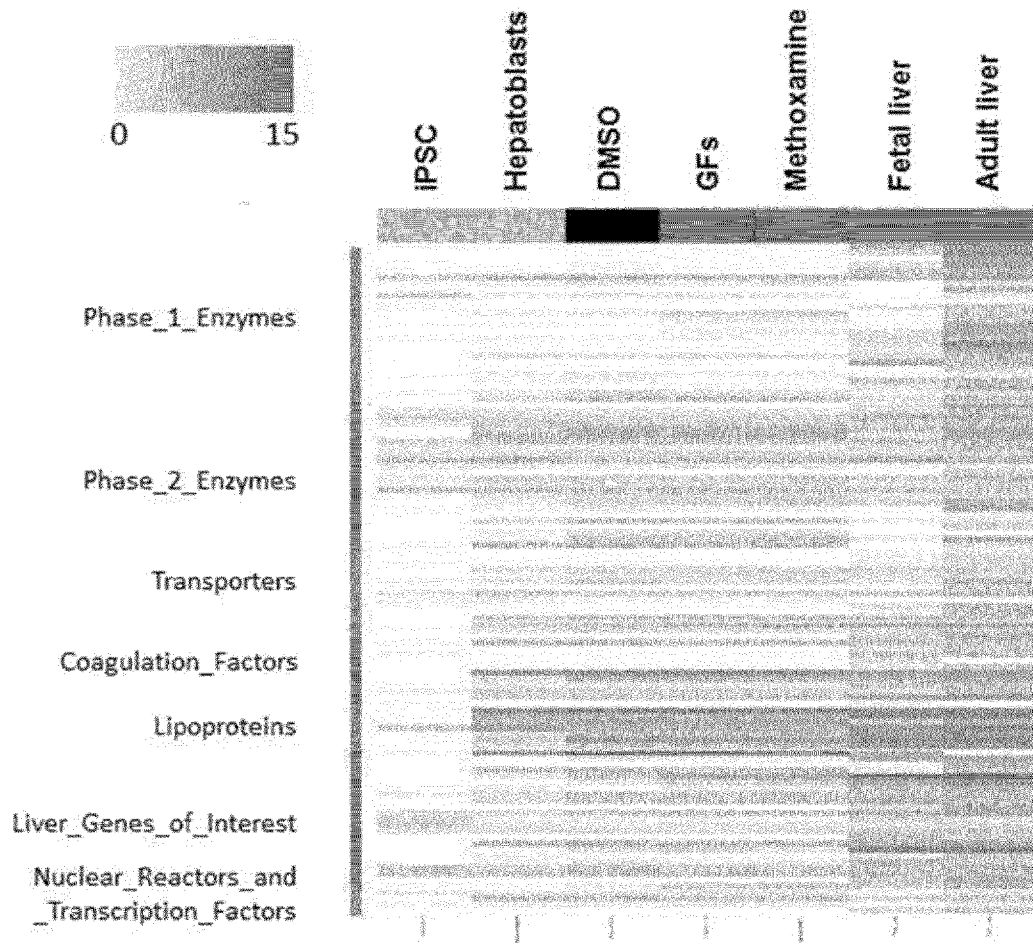


[図16]

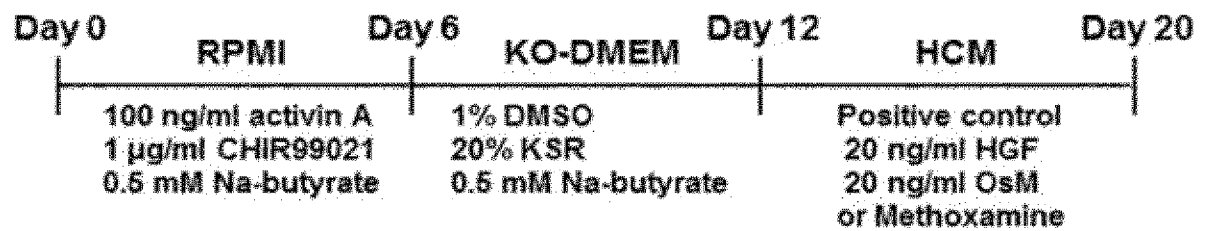


PCA(PC1 vs PC2 vs PC3)

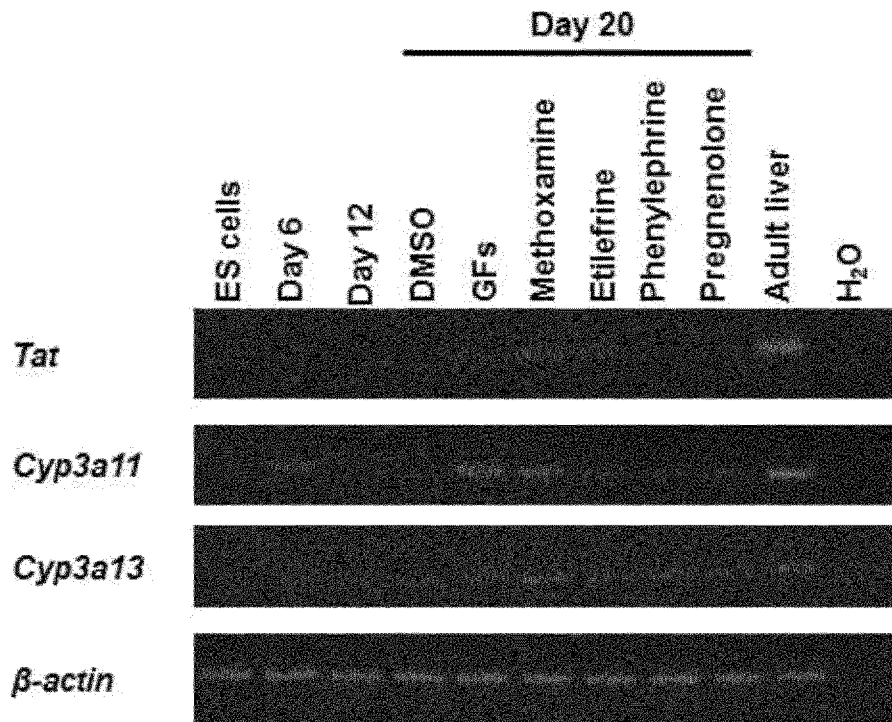
[図17]



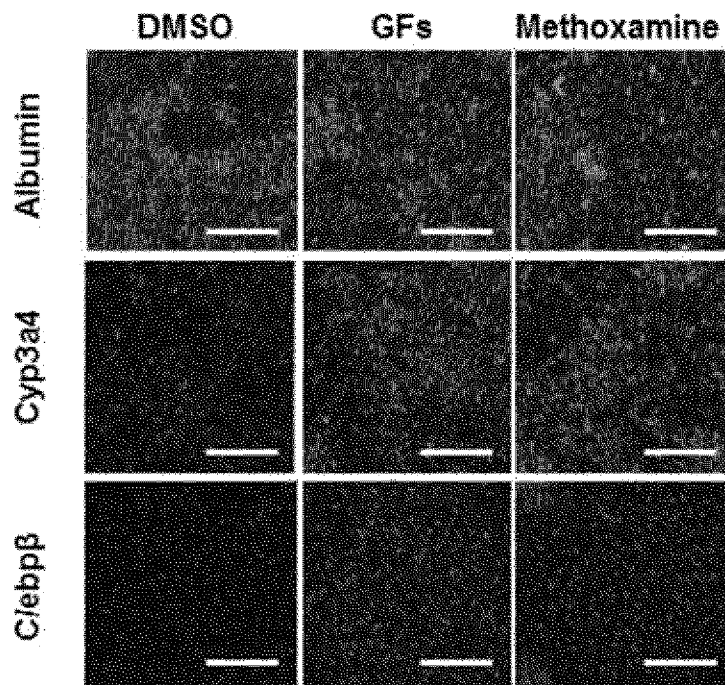
[図18]



[図19]



[図20]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/086260

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/50(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)

C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50

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 | 1996-2016 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2016 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2016 |

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                  | Relevant to claim No. |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <u>X</u><br><u>Y</u> | WO 2013/183571 A1 (Nagoya City University),<br>12 December 2013 (12.12.2013),<br>particularly, claims; paragraphs [0050], [0051],<br>[0076]<br>(Family: none)       | <u>19, 20</u><br>1-20 |
| <u>X</u><br><u>Y</u> | JP 2013-252081 A (Japan Health Sciences<br>Foundation),<br>19 December 2013 (19.12.2013),<br>particularly, claims; paragraph [0025]; example<br>1<br>(Family: none) | <u>19</u><br>1-20     |

☒ 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  
24 March 2016 (24.03.16)

Date of mailing of the international search report  
05 April 2016 (05.04.16)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/086260

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | WO 2014/083132 A1 (CELLECTIS SA),<br>05 June 2014 (05.06.2014),<br>particularly, claims; page 49, lines 21 to 29;<br>page 57, lines 8 to 21; example 9<br>& JP 2016-503304 A & US 2015/0307839 A1<br>& EP 2925859 A1 & CN 105143445 A                                           | <u>19</u><br>1-20     |
| Y         | WO 2012/144535 A1 (Kyoto University),<br>26 October 2012 (26.10.2012),<br>particularly, Background Art, paragraph [0005]<br>& US 2014/0234341 A1<br>particularly, Background Art, paragraph [0005]                                                                              | 1-20                  |
| Y         | MIYAMOTO Shigeki et al., Expression of<br>cytochrome P450 enzymes in hepatic organoid<br>reconstructed by rat small hepatocytes, Journal<br>of Gastroenterology and Hepatology, 2005,<br>Vol.20, p.865-872, particularly, abstract, fig.<br>4, 5, table 1                       | 1-20                  |
| Y         | JP 2010-029211 A (The Salk Institute for<br>Biological Studies),<br>12 February 2010 (12.02.2010),<br>particularly, paragraph [0078]; examples; fig.<br>7<br>& US 2003/0064430 A1 & WO 1999/035246 A1<br>& EP 2036925 A1<br>particularly, examples; fig. 7                      | 1-20                  |
| Y         | ZARET Kenneth S., REGULATORY PHASES OF EARLY<br>LIVER DEVELOPMENT: PARADIGMS OF ORGANOGENESIS,<br>Nature Reviews, 2002, Vol.3, p.499-512,<br>particularly, fig. 4                                                                                                               | 1-20                  |
| Y         | KONSTANDI Maria et al., Role of PPAR $\alpha$ and HNF4 $\alpha$<br>in Stress-Mediated Alterations in Lipid<br>Homeostasis, PLOS ONE, 2013, Vol.8, Issue8,<br>e70675, particularly, fig. 4                                                                                       | 1-20                  |
| A         | KUBOTA Akira et al., Role of Pregnane X<br>Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor in<br>Transcriptional Regulation of p $\alpha$ r, CYP2, and<br>CYP3 Genes in Developing Zebrafish,<br>TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2014.11.25, Vol.143,<br>No.2, p.398-407, particularly, abstract | 1-20                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i,  
G01N33/50(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. C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50

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 6 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 6 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X<br>Y          | WO 2013/183571 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 2013.12.12,<br>特に、[特許請求の範囲] [0050] [0051] [0076]<br>(ファミリーなし)    | 19, 20<br>1-20 |
| X<br>Y          | JP 2013-252081 A (公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団)<br>2013.12.19,<br>特に、[特許請求の範囲] [0025] [実施例 1]<br>(ファミリーなし) | 19<br>1-20     |

☑ 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                                 | 「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       |
| 「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                         | 「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                       |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                     |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                       |

国際調査を完了した日

2 4 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 4 . 2 0 1 6

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)

原 大樹

4 N

5 2 7 8

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<br>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<br>請求項の番号    |
| X<br>Y                | WO 2014/083132 A1 (CELLECTIS SA) 2014. 06. 05,<br>特に、特許請求の範囲・p. 49 の 21-29 行・p. 57 の 8-21 行・実施<br>例 9<br>& JP 2016-503304 A & US 2015/0307839 A1 & EP 2925859 A1<br>& CN 105143445 A                                                                   | <u>19</u><br>1-20 |
| Y                     | WO 2012/144535 A1 (国立大学法人京都大学) 2012. 10. 26,<br>特に、[背景技術] の [0005]<br>& US 2014/0234341 A1,<br>特に [背景技術] の [0005]                                                                                                                                      | 1-20              |
| Y                     | MIYAMOTO Shigeki et al., Expression of cytochrome P450 enzymes<br>in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes,<br>Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2005, Vol.20,<br>p. 865-872,<br>特に、要約、図 4、図 5、表 1                         | 1-20              |
| Y                     | JP 2010-029211 A (ザ ソールク インスチテュート フォア バ<br>イオロジカル スタディズ) 2010. 02. 12,<br>特に [0078] [実施例] [図 7]<br>& US 2003/0064430 A1 & WO 1999/035246 A1 & EP 2036925 A1,<br>特に、[実施例] [図 7]                                                                         | 1-20              |
| Y                     | ZARET Kenneth S., REGULATORY PHASES OF EARLY LIVER DEVELOPMENT:<br>PARADIGMS OF ORGANOGENESIS,<br>Nature Reviews, 2002, Vol.3, p. 499-512,<br>特に、図 4                                                                                                   | 1-20              |
| Y                     | KONSTANDI Maria et al., Role of PPAR $\alpha$ and HNF4 $\alpha$ in<br>Stress-Mediated Alterations in Lipid Homeostasis,<br>PLOS ONE, 2013, Vol.8, Issue8, e70675,<br>特に、図 4                                                                            | 1-20              |
| A                     | KUBOTA Akira et al., Role of Pregnane X Receptor and Aryl<br>Hydrocarbon Receptor in Transcriptional Regulation of pax, CYP2,<br>and CYP3 Genes in Developing Zebrafish,<br>TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2014. 11. 25, Vol.143, No. 2, p. 398-407,<br>特に、要約 | 1-20              |