

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7203427号

(P7203427)

(45)発行日 令和5年1月13日(2023.1.13)

(24)登録日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/071(2010.01)

C 1 2 N 5/071

Z N A

A 0 1 K 67/027(2006.01)

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

1 1 0

請求項の数 32 (全92頁)

(21)出願番号 特願2019-543338(P2019-543338)

(86)(22)出願日 平成30年2月13日(2018.2.13)

(65)公表番号 特表2020-507327(P2020-507327
A)

(43)公表日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/018032

(87)国際公開番号 WO2018/152120

(87)国際公開日 平成30年8月23日(2018.8.23)

審査請求日 令和3年1月15日(2021.1.15)

(31)優先権主張番号 62/459,003

(32)優先日 平成29年2月14日(2017.2.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 504279968

ユニバーシティ オブ ピッツバーグ -
オブ ザ コモンウェルス システム オブ
ハイヤー エデュケーション
アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバ
ニア州、ピッツバーグ、サッカレイ ア
ヴェニュー 1 3 0、ガードナー スティ
ール カンファレンス センター ファー
スト フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト人工多能性幹細胞を操作して肝臓組織を作製する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト肝細胞を作製するための方法であって、

a) 有効量のアクチビンA、線維芽細胞成長因子(FGF)-2および骨形成タンパク質(BMP)-4を含む第1の培地中でヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を約2〜約3日間培養して、中内胚葉細胞を作製する工程；

b) FGF-2およびBMP-4の非存在下において有効量のアクチビンAを含む第2の培地中で該中内胚葉細胞を約2〜約3日間培養して、胚体内胚葉細胞を作製する工程；

c) 有効量のジメチルスルホキシド(DMSO)および肝細胞成長因子(HGF)を含む第3の培地中で該胚体内胚葉細胞を約8〜約14日間培養して、肝特異化細胞を作製する工程であって、該培地は、低グルコース培地である、工程；および

d) 有効量のHGF、ウルソデオキシコール酸、コレステロール、パルミチン酸、オレイン酸、リファンピシンを含む第4の培地中で該肝特異化細胞を培養して、それにより、ヒトiPSC由来ヒト肝細胞を作製する工程であって、該第4の培地は、低グルコース培地である、工程

を含む、方法。

【請求項2】

前記第1の培地が、約50〜約200ng/mLのアクチビンA、約10〜約50ng/mLのFGF-2および約20〜約100ng/mLのBMP-4を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 2 の培地が、約 50 ～ 約 200 ng/mL のアクチビン A を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 の培地が、有効量の L-グルタミンをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の培地および前記第 2 の培地が、毎日補充される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 3 の培地が、約 1 ～ 約 3 パーセント体積/体積 (v/v) の DMSO および約 20 ～ 約 150 μ g/mL の HGF を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記第 3 の培地が、約 0.5 ～ 約 2 % v/v の L-グルタミンをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 4 の培地が、約 20 ～ 約 150 μ g/mL HGF、約 50 mM ～ 約 150 mM ウルソデオキシコール酸、約 10 μ M ～ 約 50 μ M パルミチン酸、約 10 μ M ～ 約 50 μ M 約オレイン酸および約 10 μ M ～ 約 50 μ M リファンピシンを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 4 の培地が、有効量の L-グルタミン、DMSO および/またはデキサメタゾン をさらに含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記第 4 の培地が、約 0.5 ～ 約 2 % v/v の L-グルタミンをさらに含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 4 の培地が、約 1 ～ 約 3 % v/v の DMSO を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 4 の培地が、約 0.5 ～ 約 2 mM デキサメタゾンを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記第 3 の培地および前記第 4 の培地が、1 日おきに補充される、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

e) 前記肝特異化細胞および/または前記ヒト iPSC 由来肝細胞を免疫無防備状態の非ヒト動物の肝臓に移植することによって、該肝特異化細胞および/または該ヒト iPSC 由来肝細胞を拡大し、ヒト肝細胞を作製する工程、および

f) 該拡大された肝特異化細胞および/または該ヒト iPSC 由来肝細胞および/または該ヒト肝細胞を回収する工程

40

をさらに含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫無防備状態の非ヒト動物が、トランスジェニックラットである、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記トランスジェニックラットが、肝臓特異的プロモーターを含む導入遺伝子を有する Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}ラットでありであり、該プロモーターは、融合タンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結されており、該融合タンパク質は、FKBP12 およびカスパーゼ 9 を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記プロモーターが、アルブミンプロモーターである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 18】

前記肝特異化細胞および／または前記ヒト i P S C 由来肝細胞が、約 3 日間～約 24 ヶ月間にわたって、前記トランスジェニックラットにおいて拡大される、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記肝特異化細胞および／または前記ヒト i P S C 由来肝細胞を前記肝臓に移植する前に、前記免疫無防備状態の非ヒト動物の非ヒト肝細胞の成長を阻害する工程を含む、請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

非ヒト肝細胞の成長を阻害する工程が、有効量の放射線またはレトロルシンを前記免疫無防備状態の非ヒト動物に投与する工程を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

約 0.5×10^6 ～約 10×10^6 個のヒト肝細胞が、前記免疫無防備状態の非ヒトトランスジェニック動物に移植される、請求項 14～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

ヒト肝細胞を作製するための方法であって、

a) 有効量のアクチビン A、線維芽細胞成長因子 (F G F) - 2 および骨形成タンパク質 (B M P) - 4 を含む第 1 の培地中でヒト人工多能性幹細胞 (i P S C) を約 2 ～約 3 日間培養して、中内胚葉細胞を作製する工程；

b) F G F - 2 および B M P - 4 の非存在下において有効量のアクチビン A を含む第 2 の培地中で該中内胚葉細胞を約 2 ～約 3 日間培養して、胚体内胚葉細胞を作製する工程；および

c) 有効量のジメチルスルホキシド (D M S O) および肝細胞成長因子 (H G F) を含む第 3 の培地中で該胚体内胚葉を約 8 ～約 14 日間培養して、肝特異化細胞を作製する工程であって、該培地は、低グルコース培地である、工程を含む、方法。

【請求項 23】

前記第 1 の培地が、約 50 ～約 200 ng / m L のアクチビン A、約 10 ～約 50 ng の F G F - 2 および約 20 ～約 100 ng / m L の B M P - 4 を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 2 の培地が、約 50 ～約 200 ng / m L のアクチビン A を含む、請求項 22 または請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 2 の培地が、有効量の L - グルタミンをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 1 の培地および前記第 2 の培地が、毎日補充される、請求項 22 ～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 3 の培地が、約 1 ～約 3 パーセント v / v の D M S O および約 20 ～約 150 μ g / m L の H G F を含む、請求項 22 ～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 3 の培地が、約 0.5 ～約 2 % v / v の L - グルタミンをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 3 の培地が、1 日おきに補充される、請求項 22 ～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 i P S C が、プロモーターに作動可能に連結された異種核酸分子で形質転換される

10

20

30

40

50

、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ヒト肝細胞が、プロモーターに作動可能に連結された異種核酸を含む、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記異種核酸が、s h R N A であるか、または C a s 9 をコードする、請求項 3 0 または請求項 3 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の引用

本願は、2 0 1 7 年 2 月 1 4 日に出版された米国仮出願第 6 2 / 4 5 9 , 0 0 3 号の利益を主張する。この出願の全体は、本明細書に参考として援用される。

【0 0 0 2】

分野

本願は、幹細胞の分野、詳細には、人工多能性幹細胞からヒト肝細胞を作製するための方法に関する。

【0 0 0 3】

政府支援の謝辞

本発明は、米国立衛生研究所によって授与された助成金番号 D K 0 9 9 2 5 7 の下、米国政府の支援を受けて行われた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景

肝臓移植は、生体ドナーもしくは死体ドナー由来の肝臓の一部または死体全肝を用いる、重篤な末期肝疾患に対する唯一の治癒的療法である。肝臓移植待機者名簿に掲載されている人の 3 分の 1 しか、移植を受けられず、肝臓の需要は、次の 2 0 年間で 2 3 % 上昇すると予測されている。臓器の入手可能性は、実施可能な肝臓移植の数の制約条件となっている。

【0 0 0 5】

ヒト人工多能性幹細胞 (i P S C) は、自己の細胞 / 操作された肝臓の治療および疾患モデリングに対して肝細胞の供給源を提供することによって、肝疾患の研究および治療に一大革命を起こす可能性がある。しかしながら、インビトロではヒト i P S C を肝細胞 (i P S C - H e p) に分化させることが進展しているにもかかわらず、ヒト初代成体肝細胞がインビボにおいて増殖して肝臓に完全に取って代わるその能力を再現し、臨床適用にとって十分な細胞数を生成する細胞には、到達していない。さらに、i P S C から肝細胞への分化を指示するためのプロトコルは、たいてい、最適以下の肝機能しか有しない未熟な表現型をもたらした。これらの欠損は、ヒト肝疾患をげっ歯類において再現しようとする試みを阻み、i P S C - H e p の臨床上の潜在性に対する懐疑論の原因となった。機能的な人工多能性幹細胞由来肝細胞 (i P S - H e p) が無限に入手可能になるならば、肝臓の再増殖 (repopulation) および操作された肝臓組織が、そのタスクに最適である。自己の組織から、機能する肝臓細胞の即時に入手可能かつ無尽蔵の供給源を作り出せば、肝不全を有する患者において早期の介入が可能になる。近年のゲノム編集技術の進歩と組み合わせることで、そのような肝臓細胞は、荒廃した肝臓に基づく先天性代謝異常を処置するために広く使用でき、生涯にわたる免疫抑制薬のレジメンの必要性および免疫抑制薬の合併症を取り除く。したがって、正常な成体肝細胞と同一の機能および再生 - 反応性を有するヒト i P S C - H e p を臨床的に妥当な数で確実に作製するための有効な系が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0006】

要旨

1つの実施形態において、ヒト肝細胞を作製するための方法が本明細書中に開示される。その方法は、a) 有効量のアクチビンA、線維芽細胞成長因子(FGF)-2および骨形成タンパク質(BMP)-4を含む第1の培地中でヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を約2~約3日間培養して、中内胚葉細胞を作製する工程；b) FGF-2およびBMP-4の非存在下において有効量のアクチビンAを含む第2の培地中でその中内胚葉細胞を約2~約3日間培養して、胚体内胚葉(definitive endoderm)細胞を作製する工程；c) 有効量のジメチルスルホキシド(DMSO)および肝細胞成長因子(HGF)を含む第3の培地中でその胚体内胚葉を約8~約14日間培養して、肝臓前駆細胞を作製する工程であって、その培地は、低グルコース培地である、工程；d) 有効量のHGF、ウルソデオキシコール酸(urso deoxycholic acid)、コレステロール、パルミチン酸、オレイン酸、リファンピシンを含む第4の培地中でその肝臓前駆細胞を培養して、ヒト肝細胞を作製する工程であって、第4の培地は、低グルコース培地である、工程を含む。その方法は、免疫無防備状態の動物においてヒト肝細胞を拡大する工程も含み得る。

10

【0007】

別の実施形態において、ヒト肝細胞を作製するための方法が開示され、その方法は、a) 有効量のアクチビンA、線維芽細胞成長因子(FGF)-2および骨形成タンパク質(BMP)-4を含む第1の培地中でヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を約2~約3日間培養して、中内胚葉細胞を作製する工程；b) FGF-2およびBMP-4の非存在下において有効量のアクチビンAを含む第2の培地中でその中内胚葉細胞を約2~約3日間培養して、胚体内胚葉細胞を作製する工程；c) 有効量のジメチルスルホキシド(DMSO)および肝細胞成長因子(HGF)を含む第3の培地中でその胚体内胚葉を約8~約14日間培養して、肝臓前駆細胞を作製する工程であって、その培地は、低グルコース培地(0.2~2グラム/リットルのグルコース)である、工程；およびd) その肝臓前駆細胞を免疫無防備状態の非ヒトトランスジェニック動物の肝臓に移植する工程；およびe) その免疫無防備状態の非ヒトトランスジェニック動物の肝臓から肝細胞を回収する工程を含む。1つの非限定的な具体例では、そのトランスジェニック動物は、肝細胞において発現される誘導性Casp9導入遺伝子を有するRag2^{-/-}Il2rg^{-/-}ラットである。

20

30

【0008】

なおも別の実施形態では、トランスジェニックラットが開示され、そのトランスジェニックラットは、融合タンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結された、肝臓において発現されるプロモーター(例えば、アルブミンプロモーターもしくはトランスサイレチンプロモーターおよび/またはアルファ-1-抗トリプシンプロモーター)を含む導入遺伝子を有するRag2^{-/-}Il2rg^{-/-}ラットであり、その融合タンパク質は、FKBP12およびカスパーゼ9を含み、そのトランスジェニックラットの肝臓においてヒト肝細胞が拡大され得る。

【0009】

本発明の上記のおよび他の目的、特徴および利点は、添付の図面に照らして進める以下の詳細な記載からさらに明らかになる。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ヒトiPS-hepを用いた、免疫無防備状態のラットにおける肝臓再増殖のためのワークフローの模式図。

【0011】

【図2】ヒトiPSCを用いた肝臓分化の1つの方法の模式図。限定培地を細胞上に順次加えて、胚体内胚葉(ステージ1および2)を惹起し、肝特異化(ステージ3)を誘導する。ステージ3の終わりに、iHep細胞を剥離し、サイズによって選別して、再播種す

50

る。それらの細胞に、肝成熟化（ステージ４）を誘導するための限定培地を加える。

【００１２】

【図３】単一細胞継代の１日後の*hIPSC*の光学顕微鏡写真。

【００１３】

【図４Ａ～４Ｂ】図４Ａ～４Ｂ。ステージ２（図２を参照のこと）の後の*hIPSC*の胚体内胚葉の特徴づけ。Ａ）胚体内胚葉誘導後の細胞における*SOX17*の免疫蛍光法。核を*DAPI*で対比染色した。Ｂ）*RTqPCR*によって評価した、多能性細胞および胚体内胚葉細胞における*Oct3/4*および*SOX17*の発現。

【００１４】

【図５】ヒト肝臓遺伝子の遺伝子アレイ。肝臓遺伝子を発生中のそれらの発現に従ってクラスタ化したところ、それらの遺伝子は、相対的な経路発現と関連した。発生の後期に発現した経路を同定し、それらの発現に従って分類した。

10

【００１５】

【図６】肝特異化細胞として定義される肝特異化（ステージ３）中のヒト*iPS*細胞の特徴づけ。ヒト成体肝細胞、ヒト胎児肝細胞およびステージ３の*iPS*由来肝細胞（*iHep*）の細胞における*HNF4*（緑色）、アルブミン（緑色）およびαフェトプロテイン（赤色）の免疫蛍光法。核を*DAPI*で対比染色した。

【００１６】

【図７】肝特異化細胞として定義される肝特異化（ステージ３）後のヒト*iPS*細胞の遺伝子発現の特徴づけ。未分化ヒト*iPS*細胞、胚体内胚葉細胞、および*Duncan*プロトコル（*Si-Tayeb*ら、*Hepatology* 51（１）：297-305, 2010を参照のこと）として知られる公知の公開プロトコル（２つの異なるステージ；２および３において）、本開示のプロトコル（ステージ３）を用いて肝細胞に分化したヒト*iPS*細胞、*iCell-hep*（*CDI*）、ヒト胎児肝細胞およびヒト成体肝細胞における*RTqPCR*によって評価された、発生因子（*Oct3, 4*、*SOX17*）、肝臓核因子（*HNF4*、*FOXA2*、*HNF1a*、*FOXA1*）および肝臓特異的代謝因子（*PPARA*、*LXR*、*CAR*、*Cebpa*）の発現。

20

【００１７】

【図８】*iHep*として定義される肝成熟化（ステージ４）後のヒト*iPS*細胞の遺伝子発現。ヒト成体肝細胞、ヒト胎児肝細胞およびステージ４の*iHep*細胞における*HNF4*（緑色）、アルブミン（緑色）およびαフェトプロテイン（赤色）の免疫蛍光法。核を*DAPI*で対比染色した。

30

【００１８】

【図９】ヒト新鮮成体肝細胞、ヒト*iPS*およびヒト*iHep*細胞（ステージ４、本開示の方法）における*mir-122*の相対的発現。

【００１９】

【図１０】肝成熟化後の*iHep*（ステージ４）の大集団および小集団の遺伝子発現。ヒト*iPS*細胞の肝特異化（ステージ３）の後、得られた細胞を回収し、重量に基づく遠心分離によって大集団（細胞ペレット）と小集団（上清中の細胞）とに分離する。次いで、両方の集団を肝成熟化（ステージ４）に供する。次いで、ステージ４の細胞の小集団および大集団における肝臓の核因子（*HNF4*、*FOXA2*、*FOXA1*）および代謝因子（*PPARA*、*PXR*、*LXR*、*CAR*、*RXR*、*ABCA1*、*cMET*、*UGTA1*、*FAH*、*Cebpa*）の発現を、*RTqPCR*によってヒト成体肝細胞と比較して評価した。大集団および小集団は、遺伝子発現およびミトコンドリア量に基づいて決定される。

40

【００２０】

【図１１Ａ～１１Ｂ】図１１Ａ～１１Ｂ。*iHep*の小集団および大集団（ステージ４）におけるミトコンドリアプロファイルの特徴づけ。Ａ）*MitoTracker Green* FM色素によるミトコンドリアの蛍光。核を*DAPI*で対比染色した。Ｂ）ミトコンドリアDNAの相対的発現を、*qPCR*によって評価した。

【００２１】

50

【図12】iHepの小集団および大集団（ステージ4）の脂質プロファイルの特徴づけ。100万個の細胞あたりのmmol単位での細胞内の脂質含有量。

【0022】

【図13A】図13A～13B。（A）HEK293細胞において、構築物の機能性を証明できた。エタノールによって刺激された細胞と比べて、pMSCV-F-del Casp9-IRES-GFPでトランスフェクトされたHEK293細胞では1nmol/lの最大量でAP1903の効果があつた。エタノールで処置された細胞と同様に、AP1903で処置されたがトランスフェクトされていない細胞も、いかなる効果も示さなかつた。（B）次いで、肝臓特異的発現のためのアルブミンプロモーターの制御下Casp9-IRES-GFPのためのプラスミドを作製した。

10

【図13B】図13A～13B。（A）HEK293細胞において、構築物の機能性を証明できた。エタノールによって刺激された細胞と比べて、pMSCV-F-del Casp9-IRES-GFPでトランスフェクトされたHEK293細胞では1nmol/lの最大量でAP1903の効果があつた。エタノールで処置された細胞と同様に、AP1903で処置されたがトランスフェクトされていない細胞も、いかなる効果も示さなかつた。（B）次いで、肝臓特異的発現のためのアルブミンプロモーターの制御下Casp9-IRES-GFPのためのプラスミドを作製した。

【0023】

【図14】両方のプラスミドによってコードされる遺伝子（iCASP9およびeGFP）が、トランスフェクトされたH4-IEEC3細胞において十分に発現される。

20

【0024】

【図15A-15B】図15A～15B。Il2rg（A）およびRag2（B）遺伝子に対する標的配列におけるCRISPR媒介性変異についての配列決定アッセイ。複数の欠失および挿入がそれぞれダッシュおよび文字によって描かれており、最上部の行に示されているWT配列（配列番号34および35）とアラインメントされている。配列番号34および36～46が、図15Aに示されており、配列番号35および47～48が、図15Bに示されている。

【0025】

【図16】ヒト胎児肝細胞（21週齢）およびヒトiHep（本開示の方法）の移植は、特異的なヒトアルブミンの発現によって示されるように、30日後、生着および再増殖しているヒト肝細胞の大コロニーの存在を実証した。さらに、同様のレベルの、HNF4遺伝子のゲノムDNAが、30日後の移植肝臓において検出された。

30

【0026】

【図17】XSCID移植ラットの肝臓におけるヒト特異的マーカーの存在を裏付けるために、ヒト特異的ミトコンドリアおよび特異的ヒトシクロムCYP3A4も使用する。3つのヒト特異的マーカーの発現は、再増殖コロニーの同様のパターンに従う。

【0027】

【図18】レトロルシン／肝切除術によって前処置され、本方法（本開示の方法）、Duncanのプロトコルのいずれかおよび商業的に入手可能なヒトiPS-肝細胞（CDI, Fujifilm）を用いてヒトiHepを移植されたXSCIDラット肝臓の免疫組織化学解析。

40

【0028】

【図19A-19B】図19A～19B。hiPS-tet-On-Cas9/GFPの特徴づけ。A）ドキシサイクリンを用いたときおよび用いないときの、hiPS-Tet-On-Cas9/GFP細胞の明視野顕微鏡法および蛍光顕微鏡法。B）RTqPCRによって評価された、ドキシサイクリンを用いたときおよび用いないときの、hiPS-Tet-On-Cas9/GFP細胞におけるCas9/GFPシステムの相対的発現。

【0029】

【図20A-20B】図20A～20B。hiPS-shMIR-SIRT1細胞におけるSIRT1ノックダウンの特徴づけ。A）RTqPCRによって評価された、ドキシサ

50

イクリンを用いたときおよび用いないときの、*hiPSC-shMIR-SIRT1* クローンにおける *SIRT1* 発現量。B) ドキシサイクリンを用いたときおよび用いないときの、*hFF-shMIR-SIRT1*、*hiPSC-shMIR-SIRT1* および *hiPSC-TagRFP* における *SIRT1* 発現のウエスタンブロット解析。*GADPH* をローディングコントロールとして使用した。

【0030】

【図21】 *pEALB123-iCasp9-IRES-GFP* プラスミドの模式図。

【0031】

【図22A-22B】 図22A~22B。肝臓再増殖の前および後のヒト *iPSC-Hep* (本開示の方法) の機能的な肝成熟化。(A) 肝臓指向性の分化プロトコルの終わりに、ヒト *iPSC-Hep* は、成熟ヒト特異的シトクロム *P450 3A4 (CYP3A4)* を発現せず、アルファ-1-抗トリプシン (*A1AT*) および尿素を、単離されたばかりのヒト胎児肝細胞 (在胎齢22週) のレベルで産生しなかった (各群 $n=3$)。 (B) ちょうど30日 (d) 後に、再生中のラット肝臓では、ヒト *iPSC-Hep* のコロニーが、成熟酵素 *CYP3A4* を発現した。

【0032】

【図23A-23B】 図23A~23B。ヒト *iPSC-Hep* およびヒト初代胎児 *hep* の増殖。(A) 初代ヒト胎児肝細胞は、恒常的に複製する。ヒト *iPSC-Hep* およびヒト初代胎児 *hep* (各群 $n=3$) のいずれかの培養中の増殖能を、プロモデオキシウリジン (*BrdU*) 免疫蛍光法 (明ドット (*bright dots*)) 標識によって12時間 (h) にわたって測定し、定量した。ヒト *iPSC-Hep* は、肝臓分化後に恒常的な増殖を示した。スケールバー: $100\text{ }\mu\text{m}$ 。(B) *BrdU* で標識された細胞のパーセンテージのグラフが提供されている。3つの異なる区域、および1区域あたり少なくとも100個の *BrdU* 免疫蛍光法で陽性の核を定量した。

【0033】

【図24A-24B】 図24A~24B。ヒト成体肝細胞、ヒト胎児肝細胞およびヒト *iPSC-Hep* の、免疫無防備状態のラットにおけるロバストな肝臓再増殖。(A) ラット動物に、ヒト成体肝細胞 ($n=25$)、胎児肝細胞 ($n=23$) またはヒト *iPSC-Hep* (開示のプロトコル) のいずれかを移植した。ヒト特異的アルブミンの免疫組織化学によって示されるように、90日に、肝臓の (or the liver) ほぼ80%が、ヒト成体肝細胞またはヒト胎児肝細胞に取って代われ、肝臓のほぼ70%が、ヒト *iPSC-Hep* (開示のプロトコル) に取って代わられた。(B) 移植の90日後にヒトアルファ1抗トリプシンを測定するための酵素結合免疫吸着測定法は、ラット肝臓内にヒト肝細胞が存在することを裏付けた。*ELISA* によって血清をアルファ1抗トリプシンについて解析した ($n=4$ 、各実験群)。

【0034】

【図25A-25B】 図25A~25B。ラットからのヒト化肝臓の単離。(A) ラット肝臓にコラゲナーゼ溶液を灌流して、単一細胞をもたらす。(B) 消化された肝臓を濾過し、遠心分離して、肝細胞だけを精製する。

【0035】

【図26A】 図26A~26B。ヒト肝細胞の磁気ベースの精製。(A) 得られた単一細胞懸濁物を、磁気活性化細胞選別を用いてラット細胞を枯渇させるための磁気マイクロビーズを含むラット特異的抗体で標識する。(B) 得られた細胞懸濁物は、ラット *MHC* クラス1に対する抗体 (*RT1A*) (*Miltenyi Biotec*) を用いて免疫磁気標識され得る。次いで、細胞を *MACS* カラム (*Miltenyi Biotec*) において陽性画分と陰性画分とに選別する。抗体濃度および磁気カラムが異なる種々のプロトコル (A~F 群) を試験し、ヒト細胞が高富化されるように最適化したところ、*FACS* 解析によって示されるとおり、最良に最適化されたプロトコルでは、収集された陰性細胞画分において最大99.9%のヒト細胞に達した。

【図26B】 図26A~26B。ヒト肝細胞の磁気ベースの精製。(A) 得られた単一細胞

10

20

30

40

50

胞懸濁物を、磁気活性化細胞選別を用いてラット細胞を枯渇させるための磁気マイクロビーズを含むラット特異的抗体で標識する。(B)得られた細胞懸濁物は、ラットMHCクラス1に対する抗体(RT1A)(Miltenyi Biotec)を用いて免疫磁気標識され得る。次いで、細胞をMACSカラム(Miltenyi Biotec)において陽性画分と陰性画分とに選別する。抗体濃度および磁気カラムが異なる種々のプロトコル(A~F群)を試験し、ヒト細胞が高富化されるように最適化したところ、FACS解析によって示されるとおり、最良に最適化されたプロトコルでは、収集された陰性細胞画分において最大99.9%のヒト細胞に達した。

【発明を実施するための形態】

【0036】

配列表

添付の配列表に列挙される核酸配列およびアミノ酸配列は、37C.F.R.1.822に規定されているように、ヌクレオチド塩基に対しては標準的な文字略語およびアミノ酸に対しては3文字コードを用いて示されている。各核酸配列の一方の鎖だけしか示されていないが、相補鎖は、表示された鎖の参照によって包含されると理解される。配列表は、参照により本明細書中に援用されるASCIIテキストファイル[Sequence Listing, February 13, 2018, 72.0KB]として提出される。

【0037】

詳細な説明

免疫不全マウスを機能的に再増殖させることができることは、肝臓再増殖ができない肝細胞様細胞と対比して肝細胞を作製したことに対するベンチマークになった。これまで、幹細胞由来のヒト肝細胞様細胞の生着は、限定的でしかなかったことが報告されている。ヒト人工多能性細胞を利用して、免疫無防備状態の動物において肝臓を再増殖させ得る肝細胞および肝細胞前駆細胞を作製する効率的な肝分化プロトコルが、本明細書中に開示される。免疫無防備状態のラットモデルの開発も開示され、そのラットモデルでは、肝細胞が、これらのラットの肝臓に生着し得、拡大し得、再増殖し得る。

【0038】

本開示の方法を用いると、自家移植によって肝不全を処置するための前臨床ステップとして、ヒト肝細胞を作製することができる。さらに、異種核酸(例えば、Cas9またはshRNAをコードする核酸に作動可能に連結されたドキシサイクリン(doxycycline)プロモーターであるがこれらに限定されない)を含むヒトiPS細胞の操作も開示される。次いで、これらの細胞は、sgRNAをコードする核酸を導入することによって目的の任意の遺伝子を標的とするため、または移植および肝臓再増殖の後に目的の任意の遺伝子をダウンレギュレートするために使用することができる(例えば、図1を参照のこと)。

【0039】

用語

別段述べられない限り、専門用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Oxford University Pressにより出版されたBenjamin Lewin, Genes V, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Blackwell Science Ltd.により出版されたKendrewら(編), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびVCH Publishers, Inc.により出版されたRobert A. Meyers(編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見出すことができる。

本開示の様々な実施形態の再調査を容易にするために、以下に特定の用語の説明を提供する:

【0040】

10

20

30

40

50

アクチビン：細胞の分化および増殖を含むいくつかの生物学的プロセスの制御に関与する、トランスフォーミング成長因子ベータ（TGF-ベータ）スーパーファミリーのメンバー。アクチビンAは、膜貫通レセプターセリン／トレオニンキナーゼの複合体を介してその生物学的作用を媒介し、特定のアクチビンAレセプターに結合する、このファミリーのメンバーである。それは、2つのサブユニットから構成される二量体である。アクチビンAは、POUクラス5ホメオボックス1（Oct-3／4）、nanog、nodalおよびnodalシグナル伝達制御因子、左右決定因子1および2（Lefty-BおよびLefty-A）のような多能性のマーカーのSMAD依存性活性化転写を介して幹細胞維持の制御に関与する。アクチビンAは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンなどのいくつかのホルモンの転写も刺激する。アクチビンAに対する例示的な配列は、2017年1月20日に利用可能であるGENBANK（登録商標）アクセッション番号NM_002192（参照により本明細書中に援用される）に提供されている。

10

【0041】

変更する：有効量の目的の物質またはパラメータ（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは細胞の特性）の変化。ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたは酵素活性の変更は、細胞の生理学的特性（例えば、細胞の分化、増殖または老化）に影響し得る。その物質の量は、生成される物質の量の差異、所望の機能を有する物質の量の差異またはその物質の活性化の差異によって、変化し得る。その変化は、増加または減少であり得る。その変更は、インビボまたはインビトロにおけるものであり得る。いくつかの実施形態において、変更することは、物質の有効量（レベル）、細胞の増殖および／もしくは生存、または酵素などのタンパク質の活性の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の増加または減少である。

20

【0042】

動物：例えば、哺乳動物および鳥類を含むカテゴリーである、生存している多細胞脊椎動物。哺乳動物という用語は、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「被験体」は、ヒト被験体と動物被験体の両方を含む。

【0043】

生物学的サンプルまたはサンプル：被験体の細胞、組織または体液（例えば、末梢血、血清、血漿、脳脊髄液、骨髄、尿、唾液、組織生検材料、外科的検体および剖検材料）から得られたサンプル。

30

【0044】

骨形成タンパク質（BMP）：異所の部位において骨形成を誘導することができた脱石灰化した骨の抽出物において最初に同定されたタンパク質の1ファミリー。BMPは、骨材料に微量で見られる（およそ1マイクログラム／kg乾燥重量骨）。このファミリーのほとんどのメンバー（BMP-1を除く）は、タンパク質のトランスフォーミング成長因子-βファミリーに属する。

BMPは、脱石灰化した骨および骨肉腫細胞から単離され得る。BMPは、また、胚の種々の上皮組織および間葉系組織において発現されることが示されている。BMPは、骨形成を開始する前に間葉系型細胞から軟骨細胞および骨芽細胞への分化を誘導するように作用するタンパク質である。BMPは、骨折部位の近くだけでなく異所の位置でも軟骨形成細胞および骨形成細胞の分化を促進する。これらのタンパク質のいくつかは、骨芽細胞においてアルカリホスファターゼおよびコラーゲンの合成を誘導する。一部のBMPは、骨芽細胞に直接作用し、それらの成熟を促進すると同時に、筋性分化を抑制する。他のBMPは、代表的な線維芽細胞から軟骨細胞への変換を促進し、非骨原性細胞型において骨芽細胞表現型の発現を誘導することもできる。BMPには、BMP-1～BMP-15（例えば、BMP-2およびBMP-4）が含まれる。BMP-2およびBMP-4およびBMP-7は、骨形成を促進すると示された。BMP2／4は、BMP4の分泌シグナルがBMP2の分泌シグナルで置き換えられたハイブリッド遺伝子である（Pengら、Mol. Therapy 4：95-104，2001（参照により本明細書中に援用される

40

50

）を参照のこと）。BMP-1の例示的なアミノ酸（amino acid）配列は、2017年2月11日に入手可能であるGENBANK（登録商標）アクセッション番号KR709446.1（参照により本明細書中に援用される）に提供されている。

【0045】

細胞培養物：制御された条件下で成長した細胞。初代細胞培養物は、生物から直接採取された、最初の継代培養の前の、細胞、組織または臓器の培養物である。細胞は、細胞の成長および／または分裂を促す条件下の成長培地に入れられると、培養中に拡大され、より大きな細胞集団となる。細胞が培養中に拡大されるとき、細胞増殖速度は、代表的には、それらの細胞数が2倍になるのに必要な時間の長さ（別名、倍加時間として知られている）によって測定される。

【0046】

肝硬変：小葉の正常な微視的構造が失われていること、および壊死性の実質組織が、最終的には臓器を不規則な結節へと収縮させ、分割する結合組織の線維帯で再生的に取って代わられることを特徴とする慢性肝疾患の一群のことを指す。肝硬変は、非常に長い潜伏期を有し、通常その後、急激な腹痛、および吐血、就下性浮腫または黄疸を伴う腫脹が生じる。進行期には、腹水、著しい黄疸、門脈圧亢進症、拡張蛇行静脈および中枢神経系障害が存在することがあり、それらは、肝性昏睡の結果になり得る。

【0047】

収集する：本明細書中で使用されるとき、拡大されたヒト肝細胞を「収集する」とは、単離されたヒト肝細胞を注射されたマウス（レシピエントマウスとも称される）から、拡大された肝細胞を取り出すプロセスのことを指す。収集は、必要に応じて、他の細胞型から肝細胞を分離することを含む。1つの実施形態において、拡大されたヒト肝細胞は、Fah欠損マウスの肝臓から収集される。いくつかの例では、拡大されたヒト肝細胞は、FRGマウスまたはF^{PM}RGマウスの肝臓から収集される。

【0048】

インターロイキンレセプターの共通γ鎖（Il2rg）：インターロイキンレセプターの共通ガンマ鎖をコードする遺伝子。Il2rgは、IL-2、IL-4、IL-7およびIL-15をはじめとしたいくつかのインターロイキンに対するレセプターの構成要素である（Di Santoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:377-381, 1995）。Il2rgを欠損している動物は、B細胞およびT細胞の減少を示し、ナチュラルキラー細胞を欠く。Il2rgは、インターロイキン-2レセプターガンマ鎖としても知られる。

【0049】

凍結保存された：本明細書中で使用されるとき、「凍結保存された」とは、液体窒素中などの零度未満の低温に冷却することによって保存または維持された細胞または組織のことを指す。これらの低温では、細胞死に導き得る生化学反応を含むいずれの生物学的活性も、効果的に停止される。細胞膜に組み込まれ、その構造を変化させる凍結保存剤を用いることにより、細胞生存能を維持することができる。

【0050】

低下した肝機能：肝臓の健康状態または機能を測定するいくつかのパラメータのうちのいずれか1つの異常な変化。低下した肝機能は、本明細書中で「肝機能不全」とも称される。肝機能は、当該分野で周知のいくつかの手段（例えば、肝臓の組織像の検査および肝臓酵素または他のタンパク質の測定であるがこれらに限定されない）のいずれか1つによって評価できる。例えば、肝機能不全は、肝臓のネクロシス、炎症、線維症、酸化的損傷または異形成によって示すことができる。場合によっては、肝機能不全は、肝細胞癌などの肝がんによって示される。肝機能不全を評価するために検査され得る肝臓酵素および肝臓タンパク質の例としては、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、ビリルビン、アルカリホスファターゼおよびアルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。肝機能不全は、全般的な肝不全もたらし得る。肝機能を検査するための手順は、当該分野で周知であり、例えば、Gro

10

20

30

40

50

mpeら (Genes Dev. 7: 2298-2307, 1993) および Manni
ngら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 11928-11
933, 1999) によって教示されたものである。

【0051】

欠損：本明細書中で使用されるとき、「欠損」とは、mRNA発現および／または機能的なタンパク質を実質的に減少させるかまたは無くす変異を目的の遺伝子に含む、マウスなどの動物のことを指す。本明細書中で使用されるとき、機能タンパク質の「発現の喪失」という用語は、発現の完全な喪失のことだけを指すのではなく、機能タンパク質の発現の実質的な減少（例えば、約80%、約90%、約95%または約99%の減少）も含む。1つの実施形態において、その動物は、ホモ接合性の破壊（例えば、ホモ接合性の欠失）を目的の遺伝子に含む。破壊には、例えば、挿入、欠失、1つもしくはそれを超える点変異またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。Rag1欠損、Rag2欠損およびIl2rg欠損とは、mRNA発現または機能タンパク質の産生を実質的に減少させるかまたは無くす変異を、それぞれRag1、Rag2およびIl2rgに含む動物のことを指す。Rag1、Rag2およびIl2rgノックアウトマウスは、以前に報告されており、商業的に入手可能である。

10

【0052】

胚体内胚葉：ブラキユリ (brachyury) ($brach^+$) を発現しない細胞であって、分化誘導条件の存在下において、消化管、肺細胞、肝臓細胞、脾臓細胞および関連構造を含む内臓の上皮細胞を生成することができる細胞。

20

【0053】

枯渇させる：減少させることまたは除去すること。本明細書中で使用されるとき、「マクロファージの枯渇」とは、動物におけるマクロファージを排除するか、除去するか、減少させるか、または殺滅するプロセスのことを指す。マクロファージが枯渇した動物は、必ずしも完全にマクロファージを欠くわけではなく、少なくとも、マクロファージの数または活性の減少を示す。1つの実施形態において、マクロファージの枯渇は、機能的なマクロファージの少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%または100%の減少をもたらす。

【0054】

分化：比較的特殊化されていない細胞（例えば、胚性幹細胞または他の幹細胞）が、成熟した細胞に特徴的な特殊化された構造的特徴および／または機能的特徴を獲得するプロセスのことを指す。同様に、「分化する」とは、このプロセスのことを指す。代表的には、分化している間、細胞構造は変わり、組織特異的なタンパク質が出現する。

30

【0055】

破壊：本明細書中で使用されるとき、遺伝子における「破壊」とは、任意の挿入、欠失もしくは点変異またはそれらの任意の組み合わせのことを指す。いくつかの実施形態では、破壊によって、mRNAおよび／または機能タンパク質の発現が部分的または完全に失われる。

【0056】

胚性幹細胞：必要に応じて細胞株として連続的に継代されている、胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊に由来する胚性細胞。この用語には、好ましくは、胚の残りの部分を破壊せずに、その胚の1つまたはそれを超える割球から単離された細胞が含まれる。この用語には、体細胞核移植によって作製された細胞も含まれる。「ヒト胚性幹細胞」(hES細胞)は、必要に応じて細胞株として連続的に継代されている、ヒト胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊に由来する胚性細胞を含む。hES細胞は、精子もしくはDNAと卵細胞の受精、核移植、単為生殖によって得られてもよいし、HLA領域がホモ接合であるhES細胞を作製する手段によって得られてもよい。ヒトES細胞は、精子と卵細胞との融合、核移植、単為生殖、またはクロマチンのリプログラムおよびその後のリプログラムされたクロマチンが原形質膜に取り込まれることによって作製された、接合体、割球または胚盤胞期の哺乳動物胚から作製されるかまたは得られることにより、胚性細胞が作製され得る。ヒ

40

50

ト胚性幹細胞としては、MAO1、MAO9、ACT-4、No. 3、H1、H7、H9、H14およびACT30胚性幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない。ヒト胚性幹細胞は、その起源またはそれらを作製するために使用される特定の方法に関係なく、(i) 3つすべての胚葉の細胞に分化する能力、(ii) 少なくともOct-4およびアルカリホスファターゼの発現、ならびに(iii) 免疫無防備状態の動物に移植されたときに奇形腫をつくる能力に基づいて同定され得る。

【0057】

生着する：動物に細胞または組織を植え付けること。本明細書中で使用されるとき、レシピエントマウスにおけるヒト肝細胞の生着とは、ヒト肝細胞が注射後にレシピエントマウスに植え付けられるプロセスのことを指す。生着したヒト肝細胞は、レシピエントマウスにおいて拡大することができる。本明細書中に記載されるように、「有意な生着」とは、肝臓における肝細胞の少なくとも約1%がヒト細胞であるレシピエントマウスのことを指す。「高度に生着した」マウスは、肝細胞の少なくとも約60%がヒト細胞である肝臓を有するマウスである。しかしながら、生着効率は、それより高い場合があり、例えば、マウスの肝臓における肝細胞の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または少なくとも約95%が、ヒト肝細胞である。

【0058】

拡大する：量を増加させること。本明細書中で使用されるとき、ヒト肝細胞を「拡大する」とは、ヒト肝細胞の数が増加するように細胞分裂が生じるのを可能にするプロセスのことを指す。

【0059】

いくつかの実施形態において、「拡大」は、細胞培養物中の細胞の数または量が細胞分裂に起因して増加するプロセスである。同様に、用語「拡大」または「拡大される」とは、このプロセスのことを指す。用語「増殖する」、「増殖」または「増殖される」は、語「拡大する」、「拡大」または「拡大される」と交換可能に使用されてもよい。代表的には、拡大期の間は、細胞は、分化して、成熟した細胞を形成することはなく、分裂して、より多くの細胞を形成する。

【0060】

本明細書中に記載されるように、ヒト肝細胞は、レシピエントラットにおいて拡大し得る。拡大から生じるヒト肝細胞の数は、異なり得る。いくつかの実施形態において、レシピエントラットにおけるヒト肝細胞の拡大は、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも250倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍または少なくとも1000倍の増加をもたらす。

【0061】

発現：ある遺伝子のコードされた情報が、細胞の、活動の(operational)一部、非活動の一部、または構造の一部に変換されるプロセス(例えば、タンパク質の合成)。遺伝子発現は、外部シグナルによって影響され得る。例えば、細胞がホルモンに曝露されると、ホルモン誘導性遺伝子の発現が刺激され得る。異なるタイプの細胞は、同一のシグナルに異なって応答し得る。遺伝子の発現はまた、DNAからRNAを経てタンパク質までの経路におけるいずれかの箇所で制御され得る。制御には、転写、翻訳、RNAの輸送およびプロセッシング、mRNAなどの中間分子の分解に対する調節、または産生された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区画化(compartmentalization)もしくは分解を介した調節が含まれ得る。

【0062】

線維芽細胞成長因子(FGF)：任意の動物に由来する任意の好適な線維芽細胞成長因子およびその機能的フラグメント(例えば、レセプターに結合して、そのレセプターの活性化に関連する生物学的作用を誘導するもの)。種々のFGFが公知であり、それらとしては、FGF-1(酸性線維芽細胞成長因子)、FGF-2(塩基性線維芽細胞成長因子、bFGF)、FGF-3(int-2)、FGF-4(hst/K-FGF)、FGF

10

20

30

40

50

－5、FGF－6、FGF－7、FGF－8、FGF－9およびFGF－98が挙げられるが、これらに限定されない。「FGF」とは、線維芽細胞成長因子タンパク質（例えば、FGF－1、FGF－2、FGF－4、FGF－6、FGF－8、FGF－9またはFGF－98）またはその生物学的に活性なフラグメントもしくは変異体のことを指す。FGFは、任意の動物種に由来し得る。1つの実施形態において、FGFは、げっ歯類、鳥類、イヌ、ウシ、ブタ、ウマおよびヒトを含むがこれらに限定されない哺乳動物のFGFである。FGFのうちの多くのもののアミノ酸配列および作製するための方法は、当該分野で周知である。

【0063】

ヒトbFGF（FGF－2とも呼ばれる）のアミノ酸配列およびその組換え発現のための方法は、参照により本明細書中に援用される米国特許第5,439,818号に開示されている。ウシbFGF（FGF－2）のアミノ酸配列およびその組換え発現のための様々な方法は、参照により本明細書中に援用される米国特許第5,155,214号に開示されている。これらの146個の残基の形態を比較すると、それらのアミノ酸配列は、2つの残基だけが異なり、ほぼ同一である。組換えFGF－2および他のFGFは、米国特許第4,956,455号に詳細に記載されている技法を用いて、医薬品品質（98%またはそれを超える純度）に精製され得る。

【0064】

FGF誘導物質には、FGFの活性なフラグメントが含まれる。その最も単純な形態において、その活性なフラグメントは、メチオニンアミノペプチダーゼによる処理などの、N末端のメチオニンの除去に対する周知の技法を用いて、N末端のメチオニンを除去することによって作製される。2番目に望ましい切断型には、リーダー配列を有しないFGFが含まれる。当業者は、リーダー配列のことを、細胞膜の通過を促進するが、活性にとって必要でなく、成熟タンパク質には見られない、タンパク質のN末端における一続きの疎水性残基として認識している。ヒトおよびマウスのbFGFは、商業的に入手可能である。

【0065】

成長因子：細胞の成長、生存および／または分化を促進する物質。成長因子には、成長刺激物質（マイトジェン）として機能する分子、細胞遊走を刺激する因子、走化性物質として機能するかまたは腫瘍細胞の細胞遊走もしくは侵入を阻害する因子、細胞の分化機能を調節する因子、アポトーシスに関与する因子、あるいは成長および分化に影響せずに細胞の生存を促進する因子が含まれる。成長因子の例は、線維芽細胞成長因子（例えば、FGF－2）、上皮成長因子（EGF）、肝細胞成長因子（HGF）および神経成長因子（NGF）ならびにアクチビン（*activin*）－Aである。

【0066】

肝病原体：肝臓の細胞に感染する任意の病原体（例えば、細菌、ウイルスまたは寄生虫の病原体）のことを指す。いくつかの実施形態において、肝病原体は、HBVまたはHCVなどの「肝指向性ウイルス」（肝臓を標的とするウイルス）である。

【0067】

肝細胞癌（HCC）：HCCは、代表的にはウイルス性肝炎、肝臓毒または肝硬変に起因する肝臓炎症を有する患者において生じる、肝臓の原発性悪性腫瘍である。

【0068】

肝細胞：肝臓の細胞質塊の70～80%を構成する細胞の1タイプ。肝細胞は、タンパク質合成、タンパク質貯蔵、および炭水化物の変換、コレステロール、胆汁酸塩およびリン脂質の合成、ならびに外来性および内在性の物質の解毒、改変および排出に関与する。肝細胞は、胆汁の形成および分泌も惹起する。肝細胞は、血清アルブミン、フィブリノゲン、および凝固因子のプロトロンビン群を産生し、リポタンパク質、セルロプラスミン、トランスフェリン、補体および糖タンパク質を合成するための主要部位である。さらに、肝細胞は、薬物および殺虫剤などの外来性化合物、ならびにステロイドなどの内因性化合物を代謝する、解毒するおよび不活性化する能力を有する。「肝細胞前駆体」は、肝細胞に分化する未熟な細胞である。これらの細胞は、肝未熟マーカーを発現し得る（例えば、

10

20

30

40

50

ヒト胎児肝細胞は、アルブミンおよびアルファフェトプロテインを発現する)。「ヒト肝特異化細胞」は、本開示の方法を用いる分化のステージ3の後の細胞であり、肝細胞核因子4アルファ(HNF4a)をコードするmRNAとHNF4aタンパク質の両方を、正常なヒト単離成体肝細胞に匹敵するレベルで発現する未熟な肝細胞である。ヒト肝特異化細胞はまた、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質アルファ(CEBPa)のmRNAを、ヒト胎児肝細胞(20~24週の在胎期間(gestational age))に匹敵するレベルで発現する。IPS細胞由来肝細胞(iHep)は、本明細書中に開示される方法を用いた、分化のステージ4の後の細胞である。これらの細胞は、以下のマーカー：HNFa、肝臓Xレセプター(LXR)、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼファミリー1メンバーA1(UGT1A1)に対するmRNAおよびタンパク質をすべて、正常ヒト単離成体肝細胞に匹敵するレベルで発現する。IPS細胞由来肝細胞(iHep)はまた、フマリリアセト酢酸ヒドロラーゼ(FAH)およびATP結合カセットトランスポーターABCA1のmRNAレベルを、正常ヒト単離成体肝細胞によって発現されるレベルのおよそ50%のレベルで発現する。「iHep」は、薬物および殺虫剤などの外来性化合物、ならびにステロイドなどの内因性化合物を代謝する、解毒するおよび不活性化する能力が低下しているので、成熟したヒト肝細胞とは異なる。

【0069】

肝細胞成長因子(HGF)：癌原性c-Metレセプターに結合した後にチロシンキナーゼシグナル伝達カスケードを活性化することによって、細胞の成長、細胞の運動性および形態形成を制御する成長因子。肝細胞成長因子は、間葉系細胞によって分泌され、多機能性サイトカインとして、主に上皮起源の細胞に対して作用する。その有糸分裂誘発、細胞運動性およびマトリックス浸潤を刺激する能力は、血管新生、腫瘍形成および組織再生における中心的役割をそれに与える。ヒト肝細胞成長因子に対する例示的なアミノ酸配列およびmRNA配列は、参照により本明細書中に援用されるGENBANK(登録商標)アクセッション番号NM_000601.5、2016年10月8日に提供されている。

【0070】

ヘテロ接合性：対応する染色体遺伝子座に異なる対立遺伝子を有すること。例えば、特定の遺伝子変異がヘテロ接合性の動物は、その遺伝子の一方の対立遺伝子に変異を有するが、他方には有しない。

【0071】

ホモ接合性：1つまたはそれを超える遺伝子座に同一の対立遺伝子を有すること。本明細書中で使用されるとき、「破壊がホモ接合性」とは、ある遺伝子の両方の対立遺伝子の同一の破壊(例えば、挿入、欠失または点変異)を有する生物のことを指す。

【0072】

免疫無防備状態または免疫不全：免疫系の少なくとも1つの必須機能を欠いていること。本明細書中で使用されるとき、「免疫無防備状態の」動物または「免疫不全の」動物は、免疫系の特定の構成要素を欠いているか、または免疫系の特定の構成要素の機能を欠いている動物である。1つの実施形態において、マウスまたはラットなどの免疫無防備状態の(免疫不全の)動物は、機能的なB細胞、T細胞および/またはNK細胞を欠いている。別の実施形態において、免疫無防備状態の(免疫不全の)動物は、マクロファージをさらに欠いている。いくつかの実施形態において、「免疫無防備状態の(免疫不全の)動物」は、以下の遺伝的変更：Rag1^{-/-}、Rag2^{-/-}、Il2rg^{-/-}、SCID、NODおよびヌードのうちの1つまたはそれを超えるものを含む。免疫不全の系統は、当該分野で周知であり、The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)またはTaconic(Hudson, NY)などから商業的に入手可能である。いくつかの実施形態において、免疫無防備状態の(免疫不全の)動物は、1つまたはそれを超える免疫抑制剤を投与されたラットである。

【0073】

免疫抑制剤：免疫系の1つまたはそれを超える態様(例えば、液性免疫系もしくは細胞免疫系または補体系の構成要素)の機能または活性を低下させる任意の化合物。本開示の

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、免疫抑制剤は、FK506、シクロスポリンA、フルダラビン、ミコフェノレート、プレドニゾン、ラパマイシンもしくはアザチオプリンまたはそれらの組み合わせである。

【0074】

公知の免疫抑制剤としては、(1)代謝拮抗物質(例えば、プリン合成阻害剤(例えば、アザチオプリンおよびミコフェノール酸)、ピリミジン合成阻害剤(例えば、レフルノミドおよびテリフルノミド(teriflunomide))および抗葉酸剤(例えば、メトトレキサート))；(2)マクロライド(例えば、FK506、シクロスポリンAおよびピメクロリムス)；(3)TNF- α 阻害剤(例えば、サリドマイドおよびレナリドミド)；(4)IL-1レセプターアンタゴニスト(例えば、アナキンラ)；(5)ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)阻害剤(例えば、ラパマイシン(シロリムス)、デフォロリムス(deforolimus)、エベロリムス、テムシロリムス、ゾタロリムスおよびバイオリムスA9)；(6)コルチコステロイド(例えば、プレドニゾン)；および(7)いくつかの細胞性標的または血清標的のいずれか1つに対する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

例示的な細胞性標的およびそれらのそれぞれの阻害剤化合物としては、補体成分5(例えば、エクリズマブ)；腫瘍壊死因子(TNF)(例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴール、アフエリモマブおよびゴリムマブ(golimumab))；IL-5(例えば、メボリズマブ)；IgE(例えば、オマリズマブ)；BAYX(例えば、ネレリモマブ(nerelimumab))；インターフェロン(例えば、ファラリモマブ(faralimumab))；IL-6(例えば、エルシリモマブ(elsilimumab))；IL-12およびIL-13(例えば、レブリキズマブおよびウステキヌマブ)；CD3(例えば、ムロモナブ-CD3、オテリキシズマブ(otelixizumab)、テプリズマブ(teplizumab)、ビジリズマブ(visilizumab))；CD4(例えば、クレノリキシマブ、ケリキシマブおよびザノリムマブ(zanolimumab))；CD11a(例えば、エファリツマブ)；CD18(例えば、エルリズマブ(erlizumab))；CD20(例えば、アフツズマブ(afutuzumab)、オクレリズマブ(ocrelizumab)、パスコリズマブ(pascolizumab))；CD23(例えば、ルミリキシマブ)；CD40(例えば、テネリキシマブ(teneliximab)、トラリズマブ(toralizumab))；CD62L/L-セレクチン(例えば、アセリズマブ(aselizumab))；CD80(例えば、ガリキシマブ(galiximab))；CD147/バシギン(basigin)(例えば、ガビリモマブ(gavilimumab))；CD154(例えば、ルプリズマブ(ruplizumab))；BLyS(例えば、ベリムマブ(Belimumab))；CTLA-4(例えば、イピリムマブ(ipilimumab)、トレメリムマブ(tremelimumab))；CAT(例えば、ベルチリムマブ(bertilimumab)、レルデリムマブ(lerdelimumab)、メテリムマブ(metelimumab))；インテグリン(例えば、ナタリズマブ)；IL-6レセプター(例えば、トシリズマブ)；LFA-1(例えば、オズリモマブ(odulimumab))；およびIL-2レセプター/CD25(例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ、イノリモマブ(inolimumab))が挙げられるが、これらに限定されない。

【0076】

他の免疫抑制剤(immunosuppressive agents)としては、ゾリモマブアリトックス(zolimomabaritox)、アトロリムマブ(atorolimumab)、セデリズマブ(cedelizumab)、ドルリキシズマブ(dorlixizumab)、フォントリズマブ(fontolizumab)、ガンテネルマブ、ゴミリキシマブ(gomiliximab)、マスリモマブ(maslimomab)、モロリムマブ(morolimumab)、パキセリズマブ(paxelizumab)

mab)、レスリズマブ (reslizumab)、ロベリズマブ (rovelizumab)、シプリズマブ (simplizumab)、タリズマブ (talizumab)、テリモマブアリトックス (telimomab aritox)、バパリキシマブ (vapaliximab)、ベパリモマブ (vepalimomab)、抗胸腺細胞グロブリン、抗リンパ球グロブリン；CTLA-4阻害剤（例えば、アバタセプト、ベラタセプト）；アフリベルセプト (aflibercept)；アレファセプト (alefacept)；リロナセプト (rilonacept)；およびTNF阻害剤（例えば、エタネルセプト）が挙げられる。

【0077】

免疫抑制：免疫系の活性または機能を低下させる作用のことを指す。免疫抑制は、免疫抑制剤化合物を投与することによって達成され得るか、または疾患もしくは障害の作用であり得る（例えば、HIV感染に起因する免疫抑制または遺伝的欠陥に起因する免疫抑制）。

10

【0078】

人工多能性幹細胞 (iPSC)：ある特定の遺伝子の発現を誘導することによって、非多能性細胞、代表的には成体の体細胞から人工的に得られる多能性幹細胞の1タイプ。iPSCは、哺乳動物などの任意の生物から得ることができる。いくつかの実施形態において、iPSCは、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ブタ、ウシ、非ヒト霊長類またはヒトから作製される。ヒト由来のiPSCは、例示的なiPSCである。

【0079】

iPSCは、多くの点（例えば、ある特定の幹細胞の遺伝子およびタンパク質の発現、クロマチンのメチル化パターン、倍加時間、胚様体形成、奇形腫形成、生存可能なキメラ形成、ならびに効力および分化可能性 (differentiability)）においてES細胞と類似している。iPSCを作製するための方法は、当該分野で公知である。例えば、iPSCは、代表的には、ある特定の幹細胞関連遺伝子（例えば、Oct-3/4 (Pou5f1) およびSox2）を成体線維芽細胞などの非多能性細胞にトランスフェクションすることによって得られる。トランスフェクションは、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルス、レンチウイルスまたはアデノウイルス）を介して達成され得る。例えば、細胞は、レトロウイルス系を用いてOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc、またはレンチウイルス系を用いてOCT4、SOX2、NANOGおよびLIN28でトランスフェクトされ得る。3～4週間後、トランスフェクトされた細胞のうちの少数が、多能性幹細胞と形態学的におよび生化学的に似るようになり始め、代表的には、形態学的選択、倍加時間、またはレポーター遺伝子および抗生物質選択によって単離される。1つの例において、成人細胞由来のiPSCは、Yuらの方法 (Science 318 (5854) : 1224, 2007) またはTakahashiらの方法 (Cell 131 (5) : 861-72, 2007) によって作製される。iPSCは、iPS細胞としても知られる。iPS-Hepは、iPSCに由来する成熟した肝細胞である。

20

30

【0080】

単離された：その構成要素が天然に存在する環境（例えば、細胞）内の他の生物学的構成要素、すなわち、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質ならびにオルガネラから実質的に分離されているかまたは精製されている、「単離された」生物学的構成要素、例えば、核酸、タンパク質（抗体を含む）またはオルガネラ。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語は、宿主細胞において組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

40

【0081】

「単離された肝細胞」とは、臓器ドナーなどの特定の供給源から得られた肝細胞のことを指す。いくつかの実施形態において、「単離された肝細胞」は、ドナーの身体から取り出された肝細胞である。いくつかの実施形態において、「単離された肝細胞」は、懸濁液中の肝細胞または組織片内に含まれている肝細胞である。特定の例において、単離された

50

肝細胞は、他の細胞型から実質的に分離もしくは精製された肝細胞、または脂肪組織もしくは線維性組織などの他の組織タイプから精製された肝細胞である。

【0082】

哺乳動物：この用語は、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方を含む。哺乳動物の例としては、ヒトならびに家畜（*veterinary*）動物および実験動物（例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウサギおよびマウス）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

マーカーまたは標識：例えば、ELISA、分光測定法、フローサイトメトリー、免疫組織化学、免疫蛍光法、顕微鏡法、ノーザン解析またはサザン解析によって、検出が可能な作用物質（*agent*）。例えば、マーカーは、核酸分子またはタンパク質に結合され得、それにより、その核酸分子またはタンパク質の検出が可能になる。マーカーの例としては、放射性同位体、ニトロイミダゾール（*nitroimidazole*）、酵素基質、補助因子、リガンド、化学発光物質、フルオロフォア、ハプテン、酵素およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。標識するための方法および様々な目的に適切なマーカーの選択の指針は、例えば、Sambrookら（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989）およびAusubelら（*In Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998）に論じられている。

【0084】

いくつかの実施形態において、マーカーは、フルオロフォア（「蛍光標識」）である。フルオロフォアは、特定の波長の光に曝露されることによって励起されたとき、例えば異なる波長の、光を発する（すなわち、蛍光を発する）、化学的化合物である。フルオロフォアは、その発光プロファイルすなわち「色」に関して記載され得る。緑色フルオロフォア、例えば、Cy3、FITCおよびオレゴングリーンは、通常、515～540 nmの範囲の波長における発光によって特徴づけられる。赤色フルオロフォア、例えば、テキサスレッド、Cy5およびテトラメチルローダミンは、通常、590～690 nmの範囲の波長における発光によって特徴づけられる。他の実施形態において、マーカーは、抗体によって認識されるタンパク質タグ、例えば、ヒスチジン（His）タグ、赤血球凝集素（HA）タグまたはc-Mycタグである。

【0085】

培地または成長培地：特定の細胞集団の成長（細胞の増殖／拡大）を支援するのに必要な栄養分と培養条件との合成セット。1つの実施形態において、それらの細胞は、iPSCなどの幹細胞である。別の実施形態において、それらの細胞は、肝細胞前駆細胞または肝細胞である。成長培地は、一般に、炭素源、窒素源、およびpHを維持するための緩衝剤を含む。1つの実施形態において、成長培地は、幹細胞の成長を向上させる様々な栄養分が補充された、DMEMなどの基礎培地を含む。さらに、その基礎培地には、ウマ、仔ウシまたはウシ胎仔の血清などの添加物が補充され得る。「低グルコース」培地は、約0.2～約2 g/Lのグルコースを含む。

【0086】

中内胚葉細胞：ブラキユリ（*brachy*）を発現する細胞であって、分化誘導条件の存在下において、中胚葉および中胚葉誘導体（例えば、心筋および骨格筋、血管平滑筋、内皮および造血細胞）を産生することができ、肝臓細胞を含む内胚葉および内胚葉誘導体も産生することができる細胞。

【0087】

ヌードマウス：胸腺を変質させるかまたは胸腺を無くし、多数のT細胞の減少に起因する免疫系の阻害をもたらす、遺伝的変異を有するマウス系統のことを指す。そのマウスの表現型の外観は、体毛がない。ヌードマウスは、フォークヘッドボックスN1（Foxn1）遺伝子の自然の欠失がある。

【0088】

作動可能に連結された：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的関係性であるように配置されるとき、その第1の核酸配列は、その第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合、そのプロモーターは、そのコード配列に作動可能に連結されている。通常、作動可能に連結されたDNA配列は、近接しており、2つのタンパク質コード領域をつなぎ合わせる必要がある場合、それらは、同じ読み枠にある。

【0089】

薬学的に許容され得るキャリア：本発明において有用な薬学的に許容され得るキャリアは、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) には、本明細書中に開示される融合タンパク質の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

【0090】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、薬学的および生理学的に許容され得る流体（例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、グリセロールなど）をビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体の組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセルの形態）の場合、従来の無毒性の固体キャリアは、例えば、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含み得る。投与される薬学的組成物は、生物学的に中性のキャリアに加えて、少量の無毒性の補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート）を含み得る。

【0091】

医薬品：被験体または細胞に適切に投与されたとき、所望の治療効果または予防効果を誘導することができる化学的化合物または組成物。「インキュベートする」は、薬物が細胞と相互作用するための十分な長さの時間を含む。「接触させる」は、固体または液体の形態の薬物を細胞とインキュベートすることを含む。

【0092】

多能性幹細胞：（a）免疫不全（SCID）マウスに移植されると奇形腫を誘導することができ；（b）3つすべての胚葉の細胞型に分化することができ（例えば、外胚葉、中胚葉および内胚葉の細胞型に分化することができ）；（c）胚性幹細胞の1つまたはそれを超えるマーカーを発現する（例えば、Oct 4、アルカリホスファターゼ、SSEA-3表面抗原、SSEA-4表面抗原、nanog、TRA-1-60、TRA-1-81、SOX2、REX1などを発現する）が、胚および胚体外膜を形成できない（全能でない）、幹細胞。

【0093】

例示的な多能性幹細胞としては、胚盤胞期胚の内部細胞塊（ICM）に由来する胚性幹細胞、ならびに卵割期胚または桑実胚期胚の1つまたはそれを超える割球に由来する（必要に応じて、その胚の残りの部分を破壊せずに）胚性幹細胞が挙げられる。これらの胚性幹細胞は、受精、または体細胞核移植（SCNT）、単為生殖および雄性発生を含む無性生手段（asexual mean）によってもたらされた胚性物質から作製され得る。PSCは、すべての胚外組織（例えば、インビボにおける胎盤またはインビトロにおけるトロホブラスト）に寄与する能力を欠いているので、PSC単独では、子宮に移植されても胎仔または成体の動物に発達できない。

【0094】

多能性幹細胞には、因子（本明細書中でリプログラミング因子と称される）の組み合わせを発現させることまたはその発現を誘導することによって、体細胞をリプログラムすることにより作製される「人工多能性幹細胞（iPSC）」も含まれる。iPSCは、胎生期、出生後、新生児、若年期または成体の体細胞を使用して作製され得る。ある特定の実施形態において、体細胞を多能性幹細胞にリプログラムするために使用され得る因子として

は、例えば、Oct 4（時折、Oct 3／4と称される）、Sox 2、c-MycおよびKlf 4、NanogおよびLin 28が挙げられる。いくつかの実施形態において、体細胞は、体細胞を多能性幹細胞にリプログラムする、少なくとも2つのリプログラミング因子、少なくとも3つのリプログラミング因子または4つのリプログラミング因子を発現させることによってリプログラムされる。iPSCは、胚性幹細胞に特性が似ている。

【0095】

ポリヌクレオチド：任意の長さの核酸配列（例えば、直鎖状配列）。ゆえに、ポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドが含まれ、染色体に見られる遺伝子配列も含まれる。

「オリゴヌクレオチド」は、天然のホスホジエステル結合によってつなが合わされたヌクレオチドが複数つなが合わされたものである。オリゴヌクレオチドは、6～300ヌクレオチド長のポリヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドアナログとは、オリゴヌクレオチドと同様に機能するが天然に存在しない部分を有する部分のことを指す。例えば、オリゴヌクレオチドアナログは、天然に存在しない部分（例えば、変更された糖部分または糖間結合）を含み得る（例えば、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド）。天然に存在するポリヌクレオチドの機能的なアナログは、RNAまたはDNAに結合し得、その機能的なアナログには、ペプチド核酸（PNA）分子が含まれる。

【0096】

ポリペプチド：3つまたはそれを超える共有結合的に付着されたアミノ酸。この用語は、タンパク質、タンパク質フラグメントおよびタンパク質ドメインを包含する。「DNA結合」ポリペプチドは、DNAに特異的に結合する能力を有するポリペプチドである。

【0097】

用語「ポリペプチド」は、天然に存在するタンパク質ならびに組換え的にまたは合成的に作製されたタンパク質を網羅するように明確に意図されている。用語「ポリペプチドの機能的フラグメント」とは、そのポリペプチドの活性を保持するポリペプチドのすべてのフラグメントのことを指す。生物学的に機能的なフラグメントは、例えば、抗体分子に結合することができるエピトープほど小さいポリペプチドフラグメントから、細胞内での表現型変化の特徴的な誘導またはプログラミングを受けることができる大きいポリペプチドまで、サイズが異なり得る。「エピトープ」は、抗原との接触に応答して生成される、免疫グロブリンに結合することができるポリペプチドの領域である。したがって、インスリンの生物学的活性を含むより小さいペプチド、すなわちインスリンの保存的バリエーションは、有用であるものとして含められる。

【0098】

用語「実質的に精製されたポリペプチド」は、本明細書中で使用されるとき、それが天然に伴っている他のタンパク質、脂質、炭水化物または他の物質を実質的に含まないポリペプチドのことを指す。1つの実施形態において、ポリペプチドは、それが天然に伴っている他のタンパク質、脂質、炭水化物または他の物質を少なくとも50%、例えば、少なくとも80%含まない。別の実施形態において、ポリペプチドは、それが天然に伴っている他のタンパク質、脂質、炭水化物または他の物質を少なくとも90%含まない。なおも別の実施形態において、ポリペプチドは、それが天然に伴っている他のタンパク質、脂質、炭水化物または他の物質を少なくとも95%含まない。

【0099】

保存的置換は、1つのアミノ酸を、サイズ、疎水性などが似ている別のアミノ酸で置き換える。保存的置換の例を下記に示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

元の残基	保存的置換	
Ala	Ser	
Arg	Lys	
Asn	Gln, His	
Asp	Glu	10
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
His	Asn; Gln	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln; Glu	
Met	Leu; Ile	20
Phe	Met; Leu; Tyr	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	

30

【0100】

保存的であるか否かを問わずアミノ酸変化をもたらす cDNA 配列におけるバリエーションは、コードされるタンパク質の機能的同一性および免疫学的同一性を保存するために最小限に抑えられるべきである。タンパク質の免疫学的同一性は、それが抗体によって認識されるかを判定することによって評価され得る；そのような抗体によって認識されるバリエーションは、免疫学的に保存されている。任意の cDNA 配列バリエーションが、好ましくは、20 以下の、好ましくは、10 より少ないアミノ酸置換を、コードされるポリペプチドに導入し得る。バリエーションアミノ酸配列は、例えば、天然のアミノ酸配列と 80%、90% またはさらには 95% もしくは 98% 同一であり得る。

【0101】

40

プロモーター：プロモーターは、核酸の転写を指示する一連の核酸調節配列である。プロモーターは、必要な核酸配列（例えば、ポリメラーゼ II タイププロモーターの場合、TATA エlement）を転写開始部位の付近に含む。プロモーターは、必要に応じて、転写開始部位から数千塩基対も離れて位置し得る遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含む。

【0102】

プロモーターは、構成的に活性なプロモーター（すなわち、構成的に活性／「オン」状態であるプロモーター）、誘導性プロモーター（すなわち、そのプロモーターの状態である活性／「オン」または不活性／「オフ」が、外部刺激、例えば、特定の温度、化合物またはタンパク質の存在によって制御される、プロモーター）、空間的に限定されたプロモ

50

ーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなど）であり得るか、または時間的に限定されたプロモーターであり得る（すなわち、そのプロモーターは、胚発生の特定の段階、または生物学的プロセス、例えば、マウスの毛嚢サイクルの特定の段階において「オン」状態または「オフ」状態である）。

【0103】

誘導性プロモーターの例としては、T7 RNAポリメラーゼプロモーター、T3 RNAポリメラーゼプロモーター、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）制御プロモーター、ラクトース誘導プロモーター、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン制御プロモーター、ステロイド制御プロモーター、金属制御プロモーター、エストロゲンレセプター制御プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。誘導性プロモーターは、ドキシサイクリン；RNAポリメラーゼ、例えば、T7 RNAポリメラーゼ；エストロゲンレセプター；エストロゲンレセプター融合物などを含むがこれらに限定されない分子によって制御され得る。

10

【0104】

レシピエント：本明細書中で使用されるとき、「レシピエントラット」は、本明細書中に記載される単離されたヒト肝細胞を注射されるラットである。代表的には、ヒト肝細胞の一部（パーセンテージは変動し得る）が、レシピエントマウスに生着する。1つの実施形態において、レシピエントラットは、免疫不全ラットである。

【0105】

組換え：組換え核酸は、天然に存在しない配列を有する核酸、または切り離された2つの配列セグメントを人工的に組み合わせることによって作製された配列を有する核酸である。この人工的な組み合わせは、化学合成によって、またはより一般的には、単離された核酸セグメントの人工的な操作、例えば、遺伝子操作技法によって達成されることが多い。同様に、組換えタンパク質は、組換え核酸分子によってコードされるタンパク質である。

20

【0106】

リコンビナーゼ活性化遺伝子1（Rag1）：免疫グロブリンV（D）J組換えの活性化に関与する遺伝子。RAG1タンパク質は、DNA基質の認識に関与するが、安定な結合および切断の活性には、RAG2も必要である。

【0107】

リコンビナーゼ活性化遺伝子2（Rag2）：免疫グロブリン遺伝子座およびT細胞レセプター遺伝子座の組換えに関与する遺伝子。Rag2遺伝子を欠損している動物は、V（D）J組換えを起こすことができず、機能的なT細胞およびB細胞が完全に喪失している（Shinkaiら、Cell 68：855-867，1992）。

30

【0108】

連続移植：ヒト肝細胞をインビボにおいて拡大するためのプロセスであって、そのプロセスでは、第1のマウスにおいて拡大された肝細胞が収集され、さらなる拡大のために、第2のマウスに注射などによって移植される、プロセス。連続移植は、第3、第4またはさらなるマウスをさらに含み得る（Overturfら、Am. J. Pathol. 151：1078-9107，1997）。

【0109】

重症複合免疫不全（SCID）マウス：V（D）J組換えを起こすことができないがゆえに機能的なT細胞およびB細胞を欠くマウスの系統のことを指す。SCIDマウスは、補体系のいくつかの成分を活性化する能力も損なわれている。SCIDマウスは、Prkdc^{scid}変異がホモ接合性である。

40

【0110】

幹細胞：変更されない娘細胞を作製するユニークな能力（自己再生；細胞分裂は、親細胞と同一の少なくとも1つの娘細胞を作製する）および特殊化された細胞型を生じるユニークな能力（潜在力）を有する細胞。幹細胞には、胚性幹（ES）細胞、胚性生殖（EG）細胞、生殖細胞系列幹（GS）細胞、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、脂肪組織由来幹細胞（ADSC）、成体複能性前駆細胞（MAPC）、成体複能性生殖細胞系列幹細胞（

50

maGSC) および無制限体性幹細胞 (USSC) が含まれるが、これらに限定されない。インビボでの幹細胞の役割は、動物の通常の生活において破壊された細胞を置き換えることである。一般に、幹細胞は、無制限に分裂できる。分裂後、幹細胞は、幹細胞として残存してもよいし、前駆細胞になってもよいし、最終分化まで進んでもよい。前駆細胞は、少なくとも1つの所与の細胞型の完全に分化した機能的な細胞を作製することができる細胞である。一般に、前駆細胞は、分裂できる。分裂後、前駆細胞は、前駆細胞として残存してもよいし、最終分化まで進んでもよい。1つの実施形態において、幹細胞は、肝細胞を生じる。

【0111】

治療薬：被験体に適切に投与されたとき、所望の治療効果または予防効果を誘導することができる、化学的化合物、小分子または他の組成物（例えば、アンチセンス化合物、抗体、プロテアーゼ阻害剤、ホルモン、ケモカインまたはサイトカイン）。本明細書中で使用されるとき、「候補作用物質」は、それが特定の疾患または障害に対する治療薬として機能し得るか判定するためのスクリーニングのために選択された化合物である。

【0112】

力価：本開示の文脈において、力価とは、サンプル中の特定の病原体の量のことを指す。

【0113】

導入遺伝子：ある生物の細胞またはゲノムに導入された外来性核酸配列。

【0114】

トランスジェニック動物：その細胞の一部に染色体外のエLEMENTとして存在するかまたは生殖系列DNA（すなわち、その細胞のほとんどまたはすべてのゲノム配列）に安定に組み込まれた、非内在性（異種）核酸配列を有する非ヒト動物、通常、哺乳動物。異種核酸は、当該分野で周知の方法に従って、遺伝子操作、例えば、宿主動物の胚または胚性幹細胞の遺伝子操作によって、そのようなトランスジェニック動物の生殖系列に導入される。「導入遺伝子」は、かかる異種核酸、例えば、発現構築物の形態の異種核酸（例えば、「ノックイン」トランスジェニック動物の作製の場合）、または標的遺伝子内にもしくは標的遺伝子に隣接して挿入されたとき、標的遺伝子の発現を低下させる異種核酸（例えば、「ノックアウト」トランスジェニック動物の作製の場合）を指すことを意味する。遺伝子の「ノックアウト」は、標的遺伝子の機能を低下させる、遺伝子配列における変更、好ましくは、標的遺伝子の発現が検出不可能になるかまたはわずかになるような、遺伝子配列における変更を意味する。トランスジェニックノックアウト動物は、標的遺伝子のヘテロ接合性ノックアウトまたは標的遺伝子のホモ接合性ノックアウトを含み得る。「ノックアウト」には、コンディショナルノックアウトも含まれ、コンディショナルノックアウトでは、例えば、その動物が標的遺伝子の変更を促進する物質に曝露されることにより、標的遺伝子部位における組換えを促進する酵素（例えば、Cre-loxシステムにおけるCre）が導入されることにより、または標的遺伝子の変更を出生後に指示するための他の方法で、標的遺伝子の変更が生じ得る。

【0115】

移植する (Transplant) または移植する (transplanting) : 1つの被験体から別の被験体にまたは同じ被験体の別の領域に臓器、組織または細胞を移植する (grafting) プロセスのことを指す。

【0116】

未分化：胚起源または成体起源の分化細胞と識別する、未分化細胞の特徴的なマーカーおよび形態学的特色を示す細胞。したがって、いくつかの実施形態において、未分化細胞は、細胞系譜特異的マーカーを発現しない。

【0117】

ベクター：ベクターが宿主細胞において複製する能力および／または組み込む能力を妨害せずに、外来核酸の挿入を可能にする核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞においてその複製を可能にする核酸配列を含み得る。ベクターは、1つまたはそれを超える選択マーカー遺伝子および他の遺伝的ELEMENTも含み得る。組み込みベクターは、

10

20

30

40

50

それ自体を宿主核酸に組み込むことができる。発現ベクターは、挿入された遺伝子の転写および翻訳を可能にするのに必要な制御配列を含むベクターである。1つの実施形態において、ベクターは、プラスミドベクターである。別の実施形態において、ベクターは、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター）である。

【0118】

別段説明されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、語「または」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、「および」を含むと意図される。ゆえに、「AまたはBを含む」は、A、またはB、またはAおよびBを含むことを意味する。すべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および核酸またはポリペプチドに対して与えられるすべての分子量または分子質量の値は、近似値であり、説明のために提供されているとさらに理解されるべきである。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、好適な方法および材料が、下に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参照により援用される。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法および例は、単なる例証であって、限定していると意図されない。

【0119】

肝細胞を作製するための方法

ヒト体細胞を使用してヒト人工iPSCを調製し、さらにそれを使用して、ヒト肝細胞を作製することができる方法が、本明細書中に提供される。そのヒトiPSCまたはヒト肝細胞は、異種プロモーターに作動可能に連結された核酸分子で形質転換され得る。必要に応じて、その核酸分子は、Cas9をコードするか、または阻害性RNAに転写される。

【0120】

人工多能性幹細胞（iPSC）を作製するための方法

iPSC細胞は、未分化状態でインビトロにおいて無限に維持され得るが、実質的に任意の細胞型に分化することができる。

【0121】

体細胞

出発体細胞は、目的の任意の細胞であり得る。哺乳動物起源（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラットなど）の生殖細胞以外の任意の細胞を、iPSC作製のための出発物質として使用することができる。1つの実施形態において、幹細胞は、ヒト幹細胞である。例としては、とりわけ、角化上皮細胞、粘膜上皮細胞、外分泌腺上皮細胞、内分泌細胞、肝臓細胞、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、筋細胞、血液および免疫系の細胞、神経系の細胞（神経細胞およびグリア細胞を含む）、色素細胞ならびに前駆細胞（造血幹細胞を含む）が挙げられる。細胞分化の程度、細胞が収集される動物の齢などに制限はなく；未分化前駆細胞（体性幹細胞を含む）および最終分化した成熟細胞ですら、本発明における体細胞の供給源として同様に使用できる。体細胞は、成体細胞または胎児細胞であり得る。非限定的な具体例において、体細胞は、線維芽細胞である。別の非限定的な具体例において、体細胞は、肝細胞である。

【0122】

体細胞の供給源としての個体の選択は、特に限定されない。得られた細胞を被験体に移植する場合、同種異系の細胞が使用され得る。したがって、いくつかの実施形態において、iPSCは、被験体とMHC（例えば、HLA）がマッチしない。いくつかの実施形態において、得られたiPSCが、ヒトの再生医療に使用されるとき、細胞は、処置されるべき被験体の体細胞、またはその患者のHLA型と同じもしくは実質的に同じHLA型を有する別の被験体の体細胞から収集され得る。したがって、幹細胞は、自己由来であり得るか、または実質的に同じHLA型であり得る。「実質的に同じHLA型」は、ドナーの

H L A型が、ドナーの体細胞に由来する i P S Cの分化を誘導することによって得られた移植細胞が被験体に移植されたとき生着し得る程度に患者のH L A型とマッチすることを示す。被験体は、必要に応じて、免疫抑制剤で処置され得る。1つの例において、それは、主要なH L A（例えば、H L A－A、H L A－BおよびH L A－D Rという3つの主要遺伝子座、H L A－C wをさらに含む4つの主要遺伝子座）が同一であるH L A型を含む。

【0123】

ヒトから単離された体細胞は、核リプログラムのステップに供される前に、細胞の選択に従ってそれらの培養に適すると知られている培地を用いて前培養され得る。そのような培地の非限定的な具体例としては、約5～20%ウシ胎仔血清（F C S）を含む最小必須培地（M E M）、ダルベッコ変法イーグル培地（D M E M）、R P M I 1 6 4 0培地、1 9 9培地、F 1 2培地などが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、ヒトなどの哺乳動物由来の特定の細胞型を増殖させるための適切な組織培養条件を容易に確かめることができる。いくつかの実施形態において、完全にゼノフリーなヒト i P S Cを得るために、F C Sなどの非ヒト動物由来の成分を培地に含めない場合がある。様々な体細胞の培養に適したヒト由来成分（特に、成長因子などの組換えヒトタンパク質）、非必須アミノ酸、ビタミンなどが補充された基本培地を含む培地は、商業的に入手可能であり；当業者は、体細胞の供給源に従って、適切なゼノフリー培地を選択することができる。ゼノフリー培地を用いて前培養された体細胞は、適切なゼノフリー細胞解離液を用いて培養容器から分離、回収され、その後、それらは、核リプログラミング物質と接触される。

【0124】

別段下記に明確に示されない限り、一般に細胞は、約35～38℃、通常37℃、約4～6% C O₂、通常5% C O₂において培養される。

【0125】

C a s 9およびs g R N Aをコードする核酸分子に作動可能に連結されたドキシサイクリン誘導性プロモーターを含む構築物

米国特許仮出願番号62／369, 698（参照により本明細書中に援用される）に開示されているように、体細胞は、C a s 9をコードする核酸に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーターを含む核酸分子を導入するためにトランスフェクトされ得る。これらの体細胞を用いることにより、i P S Cを作製することができ、そのi P S Cは、本明細書中に開示される方法を用いて肝細胞に分化され得る。次いで、組換えを誘導するために、S g R N Aが、そのi P S Cまたはi P S C由来肝細胞に導入され得る。

【0126】

当業者は、本システムおよび方法において任意のC a s 9タンパク質を使用できることを認識する。このプロモーターは、C a s 9の誘導性発現を提供する。T e t－O nシステムでは、r t T Aタンパク質は、テトラサイクリンによって結合された場合のみ、オペレーター（ドキシサイクリン（d e o x y c y c l i n e）プロモーター）に結合することができる。したがって、そのプロモーターは、ドキシサイクリンによって活性化される。本明細書中に開示されるシステムは、3 G T E T技術に基づく誘導性発現プラットフォームを利用する。このプロモーターの配列を下記に示す（配列番号1）。

【化1】

```
ATCGATACTAGACTCGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGAAGAG
TTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGCAGACTTTACTCCCTATCAGTGATAGAG
AACGTATAAGGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGACCAGTTTACTCCCT
ATCAGTGATAGAGAACGTATCTACAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATAT
CCAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATAAGCTTTAGGCGTGTACGGTGCGG
GCCTATAAAAGCAGAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA（配列番号 1）
```

【0127】

ドキシサイクリン誘導性プロモーターは、非常に高感度であり、もれなく転写を提供する。誘導性遺伝子操作を用いることにより、本明細書中に開示される方法を用いて、目的の遺伝子のノックダウン、ノックインまたは二重ノックインーノックダウンを作製することができる。ドキシサイクリン誘導性プロモーターの1形態が、T e t - o n - 3 G システムである。このシステムは、これらの2つのエレメントから構成される：(1) ユビキチンCプロモーターの支配下において構成的に発現される、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子誘導性プロモーター (r t T A) ; (2) 目的の配列の転写を調節するテトラサイクリン応答エレメント (T R E) 。T R E は、最小プロモーターの上流に配置された19 b p の細菌 t e t - O 配列の7つのリピートから構成され、T e t - O n の非存在下では非常に低い基礎発現を有する。r t T A タンパク質は、ドキシサイクリンに結合された場合のみ、T R E に結合する。ドキシサイクリンをこのシステムに加えると、目的の配列(蛍光レポーター遺伝子; C a s 9 など)の転写が惹起される。例示的な構築物を図1に示す。さらなる好適なプロモーターは、例えば、公開されている米国特許出願番号2014/0107190(参照により本明細書中に援用される)に開示されている。

【0128】

いくつかの実施形態において、C a s 9 をコードする核酸配列に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーターが、体細胞に導入される。有用な1つのC a s 9 は、下記の配列番号2に示されているような、化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) 由来のものである。

【化2】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKR
TARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKY
PTIYHLRKKLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLF IQLVQTYNQLFEE
NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKL
QLSKDQYDDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQ
DLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF I K P I L E K M D G T E E L L V K L N R E
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRF
AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVK
YVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
YHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIAN
LAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELG
SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT
RSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVET
RQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLN
AVVGTALIKKPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE
IRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR
KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYK
EVKLDLIKLPKYSLEFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASHYEKLGKSPEDNEQ
KQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENI IHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD (配列番号2)。

【0129】

他の実施形態において、化膿性連鎖球菌の Cas 9 ペプチドは、文献に記載されている変異 (Fonfara ら、Nucleic Acids Res. 2014 Feb; 42 (4): 2577-90; Nishimasu H. ら、Cell. 2014 Feb 27; 156 (5): 935-49; Jinek M ら、Science. 2012 Aug 17; 337 (6096): 816-21; および Jinek M. ら、Science. 2014 Mar 14; 343 (6176) に記載されている機能的な変異を含むがこれらに限定されない) のうちの 1 つまたはそれを超える変異を含み得る。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書中に開示されるシステムおよび方法は、二本鎖ヌクレアーゼ活性を有する野生型 Cas 9 タンパク質、一本鎖ニッカーゼとして作用する Cas 9 変異体、または改変されたヌクレアーゼ活性を有する他の変異体とともに使用され得る。

10

【0130】

Cas 9 ペプチドは、活性化 Cas 9 (Cas 9a) であり得る。好適な Cas 9 配列には、SpCas9-HF1、dCas9-VP64 が含まれる。好適な Cas 9 分子は、例えば、Chavez ら、Nat. Methods 12: 326-328, October 1, 2015 (参照により本明細書中に援用される) に開示されている。必要に応じて、相乗的なアクチベーターが、Cas 9 とともにコードされ得る。インターネットの sam.genome-engineering.org (参照により本明細書中に援用される) を参照のこと。

【0131】

CRISPR-Cas 9 は、短ガイド RNA (sgRNA) を用いることにより、ヌクレアーゼ Cas 9 を標的部位に導いて、二本鎖切断を生じ、DNA 編集を起こす DNA 修復プロセスを刺激する。オフターゲット効果を回避するために、改変 Cas 9 を、報告されたオフターゲット効果なしに、利用することができる (SpCas9-HF1)。SpCas9-HF1 は、所望の鋳型配列が送達され、相同組換え修復という細胞機構によって使用される限り、機能喪失だけでなく機能獲得も可能にする。さらに、SpCas9-HF1 は、sgRNA ライブラリーを用いたホールゲノム機能喪失スクリーニングに使用され得る。全ゲノムスクリーニングに向けて機能獲得を可能にするために、CRISPR-Cas 9 相乗活性化媒介物 (Synergistic Activation Mediator) (SAM) 複合体が使用され得る。これは、不活性な Cas 9-VP64 融合物および活性化ヘルパータンパク質から構成されるタンパク質複合体である (MS2-P65-HSF1)。この複合体は、sgRNA と相互作用することにより、標的遺伝子のロバストな転写性活性化を保証する。このシステムは、機能獲得スクリーニングのために本方法において使用され得る。

20

30

【0132】

Cas 9 は、遺伝子を阻害するために使用され得る (Cas 9i)。これは、sgRNA によってガイドされたとき、二本鎖 DNA の部位特異的切断によって機能喪失を誘導し、二本鎖切断 (DSB) 修復機構を活性化させる、触媒活性の Cas 9 である。したがって、Cas 9 の使用は、遺伝子の機能喪失をもたらす。単一の gRNA または gRNA のライブラリーが、機能喪失スクリーニングに使用され得る。CRISPR ノックアウトライブラリーまたは単一の gRNA は、標的化された遺伝子において挿入または欠失を誘導することによって遺伝子を非機能的にする。

40

【0133】

Cas 9 は、触媒活性のヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの実施形態において、Cas 9 ヌクレアーゼは、HNH 様エンドヌクレアーゼおよび RuvC 様エンドヌクレアーゼを含む。したがって、いくつかの実施形態において、二本鎖 DNA 切断をもたらすために、HNH 様エンドヌクレアーゼが、sgRNA に相補的な DNA 鎖を切断し、RuvC 様ドメインが、非相補 DNA 鎖を切断する。Cas 9 エンドヌクレアーゼは、特定の sgRNA を用いて特定のゲノム標的にガイドされ得る (下記を参照のこと)。

【0134】

50

必要に応じて、マーカーをコードする核酸分子も、ドキシサイクリン誘導性プロモーターまたは別のプロモーターに作動可能に連結され得る。マーカーとしては、酵素および蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。マーカーは、タンパク質（分泌タンパク質、細胞表面タンパク質または内部タンパク質を含む；細胞によって合成されるかまたは取り込まれる）；核酸（例えば、mRNAまたは酵素活性の核酸分子）または多糖であり得る。目的の細胞型のマーカーに特異的な抗体、レクチン、プローブまたは核酸増幅反応によって検出可能なそのような任意の細胞構成要素の決定基が含まれる。マーカーは、生化学的アッセイもしくは酵素アッセイ、または遺伝子産物の機能に依存する生物学的応答によっても同定され得る。これらのマーカーをコードする核酸配列は、プロモーターに作動可能に連結され得る。さらに、他の遺伝子（例えば、幹細胞が分化するのに影響し得るかまたは機能もしくは生理機能に影響し得る遺伝子）も含まれ得る。

10

【0135】

非限定的な具体例において、マーカーは、tdTomato蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質である。他の実施形態において、マーカーをコードする核酸分子は、ドキシサイクリンプロモーターに作動可能に連結されない。

【0136】

いくつかの実施形態において、Cas9をコードする核酸に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーターが、ベクターに含まれる。いくつかの目標（例えば、制御された高コピー数を達成すること、および細菌におけるプラスミド不安定性の潜在的な原因を回避すること、およびヒト細胞を含む哺乳動物細胞での使用に適合するプラスミド選択のための手段を提供すること）を考慮に入れて、プラスミドがデザインされた。ヒト細胞において使用するためのプラスミドの2つの要件に特に注意が払われた。第1に、それらは、大腸菌における維持および発酵に適しており、大量のDNAを生成および精製することができる。第2に、それらは、安全であり、ヒト患者および動物において使用するために適している。第1の要件は、細菌の発酵中に比較的容易に選択され得るおよび安定に維持され得る高コピー数プラスミドを必要とする。第2の要件は、選択マーカーおよび他のコード配列などのエレメントへの注意を必要とする。いくつかの実施形態において、有用なプラスミドは、（1）高コピー数複製起点、（2）選択マーカー（例えば、カナマイシン、ピューロマイシン、ネオマイシンなどによる抗生物質選択のためのneo遺伝子であるがこれらに限定されない）、（3）転写終結配列（チロシナーゼエンハンサーを含む）、および（4）様々な核酸カセットを組み入れるためのマルチクロニング部位；および（5）チロシナーゼプロモーターに作動可能に連結されたマーカーをコードする核酸配列から構成される。タンパク質をコードする核酸を誘導するための当該分野で公知のプラスミドベクターは数多く存在する。これらとしては、米国特許第6,103,470号；米国特許第7,598,364号；米国特許第7,989,425号；および米国特許第6,416,998号（これらは参照により本明細書中に援用される）に開示されているベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0137】

核酸を導入するために、ポリオーマ、SV40 (Madzakら、1992, J. Gen. Virol., 73:1533-1536)、アデノウイルス (Berkner, 1992, Cur. Top. Microbiol. Immunol., 158:39-6; Berlinerら、1988, Bio Techniques, 6:616-629; Gorzigliaら、1992, J. Virol., 66:4407-4412; Quantinら、1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584; Rosenfeldら、1992, Cell, 68:143-155; Wilkinsonら、1992, Nucl. Acids Res., 20:2233-2239; Stratford-Perricaudetら、1990, Hum. Gene Ther., 1:241-256)、ワクシニアウイルス (Mackettら、1992, Biotechnology, 24:495-499)、アデノ随伴ウイルス (Muzyczka, 1992, Cur. Top. Microbiol. Immunol., 1

40

50

58:91-123; Onら、1990, Gene, 89:279-282)、HSVおよびEBVを含むヘルペスウイルス(Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-90; Johnsonら、1992, J. Virol., 66:2952-2965; Finkら、1992, Hum. Gene Ther. 3:11-19; Breakfieldら、1987, Mol. Neurobiol., 1:337-371; Fresseら、1990, Biochem. Pharmacol., 40:2189-2199)、シンドビスウイルス(H. Herweijerら、1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167; 米国特許第5,091,309号および同第5,2217,879号)、アルファウイルス(S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22; I. Frolovら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377)、ヒトヘルペスウイルスベクター(HHV)(例えば、HHV-6およびHHV-7)、ならびに鳥類起源のレトロウイルス(Brandyopadhyayら、1984, Mol. Cell Biol., 4:749-754; Petropoulosら、1992, J. Virol., 66:3391-3397)、マウス起源のレトロウイルス(Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:1-24; Millerら、1985, Mol. Cell Biol., 5:431-437; Sorgeら、1984, Mol. Cell Biol., 4:1730-1737; Mannら、1985, J. Virol., 54:401-407)およびヒト起源のレトロウイルス(Pageraら、1990, J. Virol., 64:5370-5276; Buchschalcherら、1992, J. Virol., 66:2731-2739)を含むウイルスベクターが利用され得る。バキュロウイルス(Autographa californica多核多角体病ウイルス; AcMNPV)ベクターが使用され得る。ベクターは、商業的供給源(例えば、PharMingen, San Diego, Calif.; Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.; Stratagene, La Jolla, Calif.)から入手することができる。好適なベクターは、例えば、米国特許出願公開番号2010/0247486(参照により本明細書中に援用される)に開示されている。非限定的な具体例において、ベクターは、レトロウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)、麻疹ウイルスベクター、アルファウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびポリオウイルスベクターである。

【0138】

いくつかの実施形態において、ベクターは、レンチウイルスベクターである。細胞の感染に対するレンチウイルスの利点は、導入遺伝子の持続的な発現が可能である点である。レンチウイルス(Lentiviruses)としては、1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、2型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-2)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、ヒツジのビスナウイルス(VISNA)およびヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)が挙げられるが、これらに限定されない。レンチウイルスベクターは、当該分野で周知である(例えば、Naldiniら、Science, 272(5259):263-267, 1996; Zuffereyら、Nat Biotechnol, 15(9):871-875, 1997; Blomerら、J Virol, 71(9):6641-6649, 1997; 米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照のこと)。組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、インビボとインビトロの両方における遺伝子導入および核酸配列の発現に使用され得る。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルス(ここで、好適な宿主細胞は、パッケージング機能、すなわち、gag、polおよびenv、ならびにrevおよびtatを有する2つまたはそれを超えるベクターでトランスフェクトされる)は、米国特許第5,994,136号(参照により本明細書中に援用され

10

20

30

40

50

る)に記載されている。

【0139】

組換えレンチウイルスは、エンベロープタンパク質と、特定の細胞型のレセプターに標的化するための抗体または特定のリガンドとを連結することによって、特定の細胞型に標的化され得る。標的的特異的ベクターを作製するために、目的の配列（制御領域を含む）が、特定の標的細胞上のレセプターに対するリガンドをコードする別の遺伝子とともに、ウイルスベクターに挿入される。組換えレンチウイルスは、天然の感染性ウイルスを構成しているある特定の遺伝子が排除され、標的細胞に導入されるべき目的の核酸配列で置き換えられるように、遺伝的に改変され得る。

【0140】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込み得る。次いで、そのように移入された遺伝物質は、宿主細胞内で転写され、おそらくタンパク質に翻訳される。他の実施形態において、レンチウイルスベクターは、そのベクターがエピソームの形態で存在するような、非組み込みレンチウイルスベクターである。

【0141】

レンチウイルスベクターは、ベクター内にコードされている遺伝子の発現の改善を助ける追加のエレメントをさらに含み得る。長末端反復（LTR）などの、標的細胞のゲノムへのベクターの組み込みに必要な領域。したがって、レンチウイルスベクターは、5'LTRおよび3'LTRを含み得る。「5'LTR」とは、内在性配列を欠失させるおよび／もしくは変異させるならびに／または異種配列を付加することによって、対応する天然の5'LTRから改変されてもよいし、改変されなくてもよい、レトロウイルスまたはレンチウイルスの5'長末端反復のことを指す。5'LTRは、天然のものまたは合成のものであり得る。「3'LTR」とは、内在性配列を欠失させるおよび／もしくは変異させるならびに／または異種配列を付加することによって、対応する天然の（すなわち、野生型レトロウイルスに既存である）3'LTRから改変されてもよいし、改変されなくてもよい、レトロウイルスまたはレンチウイルスの3'長末端反復のことを指す。3'LTRは、天然のものまたは合成のものであり得る。

【0142】

レンチウイルスPsi（ψ）配列などのキャプシド形成配列が、ベクターに含められ得る。いくつかの実施形態において、RNAの核外輸送を向上させる配列（例えば、HIV-1 REV応答エレメント（RRE）配列を含む配列）が、ベクターに含められ得る。RNAの核外輸送を向上させる別の配列は、CTE配列である（Ohら、2007、Retrovirology、2007 Jun、5；4：38.）。これらの配列は、組み込まれたレンチウイルスベクターのコピー数の決定にも有用である。DNAの核内輸送を増強させる他の配列は、HIV-2、SIV、FIV、EIAV、BIV、VISNAおよびCAEV由来のレンチウイルスのcPPT CTS配列である。これらの配列のいずれもが、ベクターに含められ得る。

【0143】

別の実施形態において、レンチウイルスベクターは、3'長末端反復領域（LTR）における欠失の結果としての、別の形態の自己不活性化（SIN）ベクターである。いくつかの例において、そのベクターは、ウイルスプロモーター内に欠失を含む。HIV LTRなどのレンチウイルスのLTRは、ウイルスプロモーターを含む。このプロモーターは、比較的効率であるが、例えば、tatによってトランス活性化されると、tat媒介性のトランス活性化が転写速度を約100倍高めるので、そのプロモーターは、効率的になる。いくつかの状況において、ウイルスプロモーターの存在は、導入遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターの転写に干渉し得る。そのような干渉を最小限に抑え、導入遺伝子の発現をよりうまく制御するために、レンチウイルスのプロモーターは、欠失されてもよい。

【0144】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、5'から3'の向きで、5' L

10

20

30

40

50

T R（野生型または改変型）、R e v 応答エレメント（R R E）、c ポリプリントラクト（c P P T）、転写制御領域、C a s 9 に連結されたドキシサイクリンプロモーター、必要に応じた転写制御エレメント、および 3' L T R を含む。

【0145】

D N A のトランスフェクションの方法としては、リン酸カルシウム共沈殿、従来の機械的手順（例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソームに包まれたプラスミドの挿入、またはウイルスベクター）が挙げられる。

【0146】

ウイルス遺伝子送達系は、R N A ベースまたは D N A ベースのウイルスベクターであり得る。エピソーム遺伝子送達系は、プラスミド、エプスタイン・バーウイルス（E B V）ベースのエピソームベクター、酵母ベースのベクター、アデノウイルスベースのベクター、サルウイルス 40（S V 40）ベースのエピソームベクター、ウシパピローマウイルス（B P V）ベースのベクターまたはレンチウイルスベクターであり得る。

【0147】

マーカーとしては、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質または赤色蛍光タンパク質）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼまたはホタル／ウミシイタケルシフェラーゼまたは n a n o l u c）または他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0148】

いくつかの実施形態において、上記方法は、ガイド R N A（g R N A）をコードする核酸を導入する工程も含む。いくつかの実施形態において、本明細書中に開示される方法は、i P S C の形成を誘導する前に、s g R N A をコードする核酸を体細胞に導入する工程を含み得る。他の実施形態において、本明細書中に開示される方法は、C a s 9 に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーターを含む i P S C に、s g R N A をコードする核酸を導入する工程を含み得る。さらなる実施形態において、本明細書中に開示される方法は、i P S C（C a s 9 に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーターを含む）が分化するように誘導した後に、s g R N A をコードする核酸を分化細胞に導入する工程を含み得る。

【0149】

s g R N A をコードする核酸は、構成的プロモーターに連結され得る。好適なプロモーターとしては、U 6 プロモーターまたはユビキチンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【化 3】

CGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATAT
TAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAA
ATTATGTTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTT
GGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAGACGGTTGTAAATGAGCACAC
AAAATACACATGCTAAAAATATTATATTCTATGACCTTTATAAAAATCAACCAAAATCTTC
TTTTTAATAACTTTAGTATCAATAATTAGAATTTTTTATGTTTCCTTTTTTGCAAACTTTTAA
TAAAAATGAGCAAAAATAAAAAAACGCTAGTTTTTAGTAACTCGCGTTGTTTTCTTCACCT
TTAATAATAGCTACTCCACCACCTTGTTCTTAAGCGGTCAGCTCCTGCTTCAATCATTTTT
TGAGCATCTTCAAATGTTCTAACTCCACCAGCTGCTTTAACTAAAGCATTGTCTTTAAC
AACTGACTTCATTAGTTTAAACATCTTCAAATGTTGCACCTGATTTTGAAAATCCTGTTG
ATGTTTTTAACAAATTCTAATCCAGCTTCAACAGCTATTTTACAAGCTTTTCATGATTTCTT
CTTTTGTTAATAAACAATTTTCCATAATACATTTAACAACATGTGATCCAGCTGCTTTTT
TTACAGCTTTTCATGTCTTCTAAACTAATTCATAATTTTTGTCTTTTAATGCACCAATAT
TTAATACCATATCAATTTCTGTTGCACCATCTTTAATTGCTTCAGAACTTCGAATGCTT
TTGTAGCTGTTGTGCATGCACCTAGAGGAAAACCTACAACATTTGTTATTCCTACATTT
GTGCCTTTTAATAATTCTTTACAATAGCTTGTTCAATATGAATTAACACAAACTGTTGC
AAAATCAAATTCAATTGC (配列番号 6)

10

20

【0150】

いくつかの実施形態において、これらのプライマーは、iPSCまたはそのiPSCから分化した細胞へのsgRNAをコードする核酸を配列決定するとき、使用される。好適なプライマーとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

hU6-F 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3' (配列番号 32)

LK0.1 5' 5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3' (配列番号 33)

30

【0151】

他の実施形態において、誘導性プロモーターが使用され、sgRNAが出発体細胞に導入される。sgRNAは、iPSCから分化した細胞にも導入され得る。組換えが所望であるとき、いくつかの状況において、発現は、この誘導性プロモーターから誘導され得る。したがって、発現は、出発体細胞、iPSC、またはiPSCから分化した細胞において誘導され得る。これらのプロモーターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

40

50

【表 2 - 1】

標的組織(Target Issue)	プロモーター	ベクター	導入遺伝子	参考文献
肝臓	Apo A-I	Ad	Apo A-I	[De Geest ら、2000]
	ApoE	HCAAd	ApoE	[Kim ら、2001]
	α_1 -抗トリプシン(hAAT)	Ad HCAAd プラスミド	Apo A-I hAAT 第IX因子	[Van Linthout ら、2002] [Schniedner ら、1998] [Schniedner ら、2002] [Miao ら、2001] [Ehrhardt ら、2002]
	hAAT および Apo A-I	レトロウイルス	hAAT	[Okuyama, 1996]
	トランスサイレチン	HCAAd	hGH	[Burcin ら、1999]
	肝臓富化 アクチベーター	トランス ジェニック	LUC	[Kistner ら、1996]
	アルブミン	HCAAd レンチウイルス	第VIII因子 第IX因子	[Reddy ら、2002] [Follenzi ら、2002]
	ホスホエノールピルビン 酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)	HCAAd	VLDLR	[Oka ら、2001]
	RNA ^P _{II} プロモーター	レトロウイルス	hAAT	[Rettinger ら、1994]
内皮	PAI-1 ICAM-2, エンドグリン ICAM-2, flt-1, vWF	AAV プラスミド Ad	トロンボモジュリン エンドグリン lacZ	[Mimur J, 2001] [Velasco ら、2001] [Nicklin ら、2001]
	MCK	Ad プラスミド Ad/AAV	LacZ, LUC hBSAg γ -サルコグリカン	[Hauser ら、2000] [Larochelle ら、2002] [Weeratna ら、2001] [Cordier ら、2000]
筋肉	SMC α -アクチン	プラスミド Ad Ad AAV	LUC Rb/E2F ハイブリッド GFP, lacZ, IFN γ 第IX因子	[Keogh ら、1999] [Prentice ら、1997] [Wills ら、2001] [Ribault ら、2001] [Hagstrom ら、2000]
	ミオシン重鎖	プラスミド AAV	CAT lacZ, hGH	[Skarli ら、1998] [Aikawa ら、2002]
	ミオシン軽鎖	Ad AAV	LacZ, LUC GFP, アンチセンス	[Griscelli ら、1998] [Franz ら、1997] [Phillips ら、2002]
	サイトケラチン 18	プラスミド	LacZ, CFTR	[Chow ら、1997] [Koehler ら、2001]
上皮	CFTR	Ad	LacZ, LUC	[Imler ら、1996] [Suzuki ら、1996]
	GFAP, NSE, シナプシン I、プレプロエンケファリン、 ドーパミン β - ヒドロキシラーゼ(d β H)	Ad AAV プラスミド、 Ad	LacZ, GFP LUC, GFP CAT, GFP, lacZ	[Smith-Arica ら、2000] [Glover ら、2002] [Xu ら、2001] [Hwang ら、2001]

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

標的組織	プロモーター	ベクター	導入遺伝子	参考文献
	プロラクチン	Ad	LacZ, HSV-tk	[Southgate ら、2000]
	ミエリン塩基性タンパク質	AAV	GFP	[Chen ら、1998]
赤血球	アンキリン	レトロウイルス レンチウイルス	γ -グロビン フェロケラターゼ	[Sabatino ら、2001] [Richard ら、2001]
	α -スペクトリン、グロビン	レンチウイルス	GFP, β/γ -グロビン	[Moreau-Gaudry ら、2001]
	HLA-Dra	レンチウイルス	GFP	[Cui ら、2002]
	CD4	レトロウイルス	GFP	[Zhao-Emonet JC, 2000]
	デクチン-2	プラスミド	GFP, LUC	[Morita ら、2001]

略語: PAI-1、プラスミノゲン活性化因子インヒビター1; ICAM-2、細胞間接着分子2; flt-1、fms様チロシンキナーゼ-1; vWF、フォンウィルブラント因子; MCK、筋肉クレアチンキナーゼ; CFTR 嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子; GFAP、グリア線維性酸性タンパク質; NSE、神経細胞特異的エンドラーゼ (endolas e); LUG、ルシフェラーゼ; GFP、緑色蛍光タンパク質; HSV-tk、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ。

Papadakis ら、Current Gene Therapy 4: 89-113, 2004 (参照により本明細書中に援用される) からの表。当業者は、有用なプロモーターを容易に特定できる。

【0152】

プロモーターは、構成的プロモーター (例えば、ユビキチンプロモーターであるがこれに限定されない) であり得る。下記を参照のこと。

【0153】

Cas9 RNAガイドシステムは、Cas9を、標的DNAにおける所望の二本鎖 (ds) 切断の遺伝子座に導く2-RNA構造を形成するトランス活性化crRNA (tracrRNA) と塩基対形成した成熟crRNAからなる。いくつかの実施形態において、塩基対形成したtracrRNA: crRNAの組み合わせは、配列特異的Cas9 dsDNA切断を指示する能力を保存しているガイド配列 (例えば、sgRNA) を生成するように単一RNAキメラとして操作される (Jinek, M. ら、Science. 17 Aug 2012: 337; 816-821を参照のこと)。いくつかの実施形態において、Cas9-ガイド配列複合体は、目的の遺伝子内の標的配列において一方または両方の鎖を切断する。したがって、Cas9エンドヌクレアーゼ (Jinek, M. ら、Science. 2012; Mali, P. ら、Nat Methods. 2013 Oct; 10 (10): 1028-1034) およびsgRNA分子は、目的の遺伝子の配列特異的な標的認識、切断およびゲノム編集に使用される。1つの実施形態において、切断部位は、特定のヌクレオチド (例えば、20ヌクレオチドの標的の16、17または18番目のヌクレオチドであるがこれらに限定されない) に存在する。1つの非限定的な例において、切断部位は、20ntの標的配列の17番目のヌクレオチドに存在する (図1および図3を参照のこと)。切断は、二本鎖切断であり得る。切断部位は、任意の遺伝子のコード領域に存在し得るか、または非コード領域 (例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど) に存在し得る。いくつかの実施形態において、機能喪失がもたらされる。他の実施形態において、機能獲得がもたらされる。

【0154】

いくつかの実施形態において、sgRNA分子は、標的ゲノム標的がプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) を有するように選択される。いくつかの実施形態において、ガイドRNAによるDNA認識およびその結果としてのエンドヌクレアーゼによる切断には、標的の直ぐ後にプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) (例えば、5'-NGG-3')

が存在することが必要である。

【0155】

いくつかの実施形態において、PAMから約3塩基対上流の部位において切断が生じる。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、二本鎖核酸配列を切断する。

【0156】

いくつかの実施形態において、ガイド配列は、配列内の二次構造の程度を低下させるように選択される。二次構造は、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムが、最小のギブス自由エネルギーの計算に基づいている。そのような1つのアルゴリズムの例は、mFold (Zuker and Stiegler, Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148) である。折り畳みアルゴリズムの別の例は、セントロイド構造予測アルゴリズムを使用するオンラインウェブサーバーであるRNAfoldである (例えば、A. R. Gruberら、2008, Cell 106 (1): 23-24; およびPA Can and G M Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12): 1151-62を参照のこと)。ガイド配列は、crispr.mit.eduに見られるMIT CRISPRデザインツールまたはwww.e-crisp.org/E-CRISPに見られるE-CRISPツールを用いてデザインされ得る。tracrRNAおよびガイド配列をデザインするためのさらなるツールは、Naito Yら、Bioinformatics. 2014 Nov 20およびMaら、BioMed Research International, Volume 2013 (2013), Article ID 270805に記載されている。crRNAは、18~48ヌクレオチド長であり得る。crRNAは、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド長であり得る。1つの例において、crRNAは、20ヌクレオチド長である。さらなる実施形態において、tracrRNAは、予め最適化され、83ヌクレオチド長である。配列番号3を参照のこと。下記を参照のこと：

【化4】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGA
AAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTTT (配列番号3)。

【0157】

上で述べたように、本明細書中に開示されるシステムは、sgRNAなどの1つまたはそれを超えるヌクレオチド配列に作動可能に連結された、プロモーター (例えば、U6またはH1プロモーターであるがこれらに限定されない) を含む得る。

【0158】

U6プロモーターは、以下の核酸配列を含む得る：

【化5】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGA
GATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGT
AGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGACTA
TCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAA
AGGACGAAACACC (配列番号4、本明細書中に参考として援用されるGENBANK(登録商標)
アクセッション番号X07425.1もまた参照のこと)。

【0159】

U6 sgRNA配列は、下記に開示され、tracrRNAに下線が引かれている。トレーサー配列は、RNA転写を終結させるための7つのチミジンを含む。小文字の「g」、「ga」および2つ目の「g」は、SapIrev部位とSapI部位との境界であり、sgRNAをコードする核酸が挿入されている。

【化 6】

GGCGCGCCGGATCCGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATAC
 AAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTAC
 AAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGT
 TTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTT
 ATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAGAGCGaGCTCTTCgGTTTTAGAGCTAG
 AAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTC
 GGTGCTTTTTTTTGGTACCGGCGCGCC (配列番号 5)

10

【0160】

いくつかの実施形態において、1つより多いDNA切断が、1つより多いsgRNAを使用することによって導入され得る。例えば、2つの切断を達成するように、2つのsgRNAが利用され得る。2つまたはそれを超えるsgRNAが、標的核酸において2つまたはそれを超える切断事象を配置するために使用されるとき、ある実施形態では、その2つまたはそれを超える切断事象は、同じまたは異なるCas9タンパク質によって行われ得ると企図される。例えば、2つの二本鎖切断を配置するために2つのsgRNAが使用されるとき、両方の二本鎖切断をもたらすために、単一のCas9ヌクレアーゼが使用され得る。

20

【0161】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、a) タイプII Cas9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたドキシサイクリンプロモーター、b) 真核細胞において目的の遺伝子とハイブリダイズする1つまたはそれを超えるCRISPR-CasガイドRNAをコードする1つまたはそれを超えるヌクレオチド配列に作動可能に連結されたU6プロモーターを含む1つまたはそれを超えるベクターの使用を含む。構成要素(a)および(b)は、同じまたは異なるベクター上に位置し得、それによって、1つまたはそれを超えるガイドRNAが、真核細胞において目的の遺伝子を標的とし、Cas9タンパク質が、目的の遺伝子を切断する。このようにして、目的の遺伝子の配列が、標的細胞において改変される。好適なベクターは、上記に開示されている。

30

【0162】

本開示の方法は、発現の増加または減少を含む、目的の任意の遺伝子を標的とするために使用され得る。したがって、任意の遺伝子をノックインまたはノックアウトするための方法が、本明細書中に開示される。

【0163】

いくつかの標的は、それらが肝臓に存在するかまたは肝臓の状態が代謝障害である限りにおいて、アミロイドニューロパチー(TTR、PALB)；アミロイドーシス(APOA1、APP、AAA、CVAP、AD1、GSN、FGA、LYZ、TTR、PALB)；肝硬変(KRT18、KRT8、CIRH1A、NAIC、TEX292、KIAA1988)；肝臓脂肪症(SIRT1、EGFR、GH、SIRT6)；嚢胞性線維症(CFTR、ABCC7、CF、MRP7)；糖原病(SLC2A2、GLUT2、G6PC、G6PT、G6PT1、GAA、LAMP2、LAMPB、AGL、GDE、GBE1、GYS2、PYGL、PFKM)；肝細胞腺腫、142330(TCF1、HNF1A、MODY3)、早期発症型肝不全および神経障害(SCOD1、SCO1、HNF4a、FOXA2、FOXA1、HNF1a、FXR、LXR、PPRa、FOXO1、PGCA、PXR、CAR、RXR、NTCP、OATP、ABCA1、CX32、ABC B11)、肝リパーゼ欠損(LIPC)、肝芽腫、がんおよび癌(CTNNB1、PDGFRL、PDGRL、PRLTS、AXIN1、AXIN、TP53、P53、LFS1、IGF2R、MPRI、MET、CASP8、MCH5)；腎髄質嚢胞症(Medullary c

40

50

ystic kidney disease) (UMOD、HNFJ、FJHN、MCKD2、ADMCKD2) ; フェニルケトン尿症 (PAH、PKU1、QDPR、DHPR、PTS) ; 多発性嚢胞腎および多嚢胞性肝疾患 (FCYT、PKHD1、ARPKD、PKD1、PKD2、PKD4、PKDTS、PRKCSH、G19P1、PCLD、SEC63) ; 肝臓再生 (GH、JAK2、STAT5、SHC、SOS、GRB2、RAS、RAF、MEK、ERK1/2、FAK、P130、CRKII、MEKK、JNK、P38、IRS1-3、P13K、AKT、PLC、PKC、GHR、IGF-1、IGF-2、ALS、SOCS2、SHP1、EGFR、AR、P21、HB-EGF、EGF、TGFA、C-SRC、STAT1、STAT3、P110、P85、AKT、mTOR、GSK3B、IKK、NFKB、CREB、PLC、PKC、PIP2、IP3、DAG、C-MYC、ADAM17、PDGFA、PDGFRA、PDGFRb、C/EBPa、p27) ; 代謝欠陥 (metabolic deficiencies) (OTC、ALB、AFP、TDO、PEPCK、UGT1A1、A1AT、TAT、ADH1、CPS) ; 肝臓解毒 (CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP3A7、CYP7A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8) ; 胆管細胞の機能 (CFTR、SOX9、CK7、CK19、HNF6、HNF1b) である。他の好ましい標的としては、PCSK9 ; Hmgcr ; SERPINA1 ; ApoB ; およびまたはLDLのうちの1つまたはそれを超えるものが挙げられるのうちのいずれか1つまたはそれを超えるものが挙げられる (include any one or more of include one or more of) 。当然のことながら、本開示の方法は、代謝障害を標的とすることに限定されない。これらの標的は、単に例として提供される。

【0164】

非限定的な特定の実施形態において、目的の遺伝子は、SIRT1、SIRT6、SLC5A5またはβ-カテニンである。

【0165】

B. 阻害性核酸分子

阻害性核酸は、目的の任意のタンパク質の発現および／または活性を低下させる。出発体細胞、すなわち得られたiPSCは、そのような阻害性RNAをコードする核酸でも形質転換され得る。したがって、iPSCは、転写されて阻害性RNAを生成する核酸分子に作動可能に連結された、肝臓特異的プロモーターなどのプロモーターを含み得る。さらに、shRNA配列は、目的の遺伝子に対する活性なshmir配列の同定に使用され得る。shmir配列は、ドキシサイクリンによって活性化される誘導性プロモーターの支配下に置かれている。ドキシサイクリンの存在下では、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) が、テトラサイクリン応答エレメント (TRE) 内のtetOオペレーター配列を認識する。このシステムは、目的の遺伝子のノックダウンをもたらすshmirを活性化する。このダウン技術を用いることにより、ゲノム内の任意の遺伝子を80%超までノックダウンすることができる。いくつかの例では、例えばSIRT1に対するshmir鑄型オリゴヌクレオチドカセットが、ヒトEF1aプロモーターの支配下でシャトルプラスミドにクローニングされている。

【0166】

いくつかの非限定的な具体例において、特定の完全長SIRT1標的cDNAのコード領域が、PCR増幅され、pVall-標的をもたらす確認ベクターpValなどのベクターのEGFPコード領域の下流にクローニングされる。シャトルプラスミドのEF1a標的領域は、組換えクローニングによってpVall-標的に移入される。NIH-3T3細胞が、約50%の培養密度において確認プラスミドでトランスフェクトされ、標準的な細胞培養条件下で48時間インキュベートされる。次いで、全RNAが単離され、1μgが、ランダムヘキサマーおよびオリゴdTプライマーの混合物を用いて逆転写される。NT-shRNAコントロールベクターによってコードされるマーカー転写物を内部参照遺伝子として用いて、そのベクターでトランスフェクトされた細胞において見られる標的cDNA発現レベルと比べた標的cDNA発現レベルの定量によって、Shmirのサイレ

10

20

30

40

50

ンシング効率が確認される。検証基準（＞８０％ノックダウン、完全なノックアウトまたはノックイン）を満たすシステムを、p c L V i（３Ｇ）レンチウイルスベクターにクローニングした。

【０１６７】

いくつかの例において、そのような阻害核酸分子は、肝臓において発現される遺伝子の発現または活性を少なくとも２０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％またはさらには１００％低下させる。１つの実施形態は、標的の発現の干渉または阻害に使用され得るRNA干渉（RNAi）（例えば、低分子阻害性RNA（siRNA）または短ヘアピンRNAであるがこれらに限定されない）である。肝臓において発現される遺伝子を特異的に標的とするRNAiは、例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、ThermoFisher ScientificおよびSigma Aldrichから商業的に入手可能である。

【０１６８】

一般に、siRNAは、DicerまたはDCL酵素による比較的長い二本鎖RNA分子の切断によって生成される（Zamore, Science, 296:1265-1269, 2002; Bernsteinら、Nature, 409:363-366, 2001）。動物および植物では、siRNAは、RISCにアセンブルされ、RISCの配列特異的なリボ核酸分解（ribonucleolytic）活性を導き、それによって、細胞質においてmRNAまたは他のRNA標的分子が切断される。核でも、siRNAは、ヘテロクロマチン関連ヒストンおよびDNAメチル化を導き、個々の遺伝子または大きなクロマチンドメインの転写サイレンシングをもたらす。

【０１６９】

本開示は、肝臓において発現される遺伝子の発現の干渉または阻害に適したRNAを使用でき、そのRNAは、発現の干渉または阻害が望まれる標的遺伝子のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一の配列を有する約１９～約４０ヌクレオチドの二本鎖RNAを含む。本開示の目的上、発現の干渉または阻害が望まれる標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と「実質的に同一の」RNAの配列は、約３０パーセント以下しか異ならず、いくつかの実施形態では、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と約１０パーセント以下しか異ならない。特定の実施形態において、そのRNAの配列は、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特定の一部と全く同一である。

【０１７０】

したがって、有用なsiRNAは、約１５～約４０ヌクレオチド長の二本鎖RNA、および各鎖に０～５ヌクレオチドの長さを有する３'または５'オーバーハングを含み、その二本鎖RNAの配列は、目的のタンパク質をコードする核酸のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一である（上記を参照のこと）。特定の例において、その二本鎖RNAは、目的のタンパク質をコードする核酸と実質的に同一の約１９～約２５ヌクレオチド、例えば、２０、２１または２２ヌクレオチドを含む。さらなる例において、その二本鎖RNAは、目的のタンパク質をコードする核酸と１００％同一の約１９～約２５ヌクレオチドを含む。この文脈において、「約」とは、整数の量だけを指すことに注意（not）されたい。１つの例において、「約」２０ヌクレオチドとは、１９～２１ヌクレオチド長のヌクレオチドのことを指す。

【０１７１】

二本鎖RNAにおけるオーバーハングに関して、そのオーバーハングの長さは、一方のオーバーハングの長さが他方の鎖におけるオーバーハングの長さに依存しないという点において、それらの２本の鎖で独立している。具体例において、３'または５'オーバーハングの長さは、少なくとも一方の鎖において０ヌクレオチドであり、いくつかの場合において、それは、両方の鎖において０ヌクレオチドである（したがって、平滑末端のdsRNAである）。他の例では、３'または５'オーバーハングの長さは、少なくとも一方の鎖において１ヌクレオチド～５ヌクレオチドである。より詳細には、いくつかの例において、

3' または 5' オーバーハングの長さは、少なくとも一方の鎖において 2 ヌクレオチドであるか、または両方の鎖において 2 ヌクレオチドである。特定の例において、dsRNA 分子は、両方の鎖において 2 ヌクレオチドの 3' オーバーハングを有する。

【0172】

したがって、提供される 1 つの特定の RNA 実施形態において、二本鎖 RNA は、20、21 または 22 ヌクレオチドを含み、3' オーバーハングの長さは、両方の鎖において 2 ヌクレオチドである。本明細書中に提供される RNA の実施形態において、二本鎖 RNA は、約 40～60% のアデニン+ウラシル (AU) および約 60～40% のグアニン+シトシン (GC) を含む。より詳細には、具体例において、二本鎖 RNA は、約 50% AU および約 50% GC を含む。

10

【0173】

少なくとも 1 つの修飾リボヌクレオチドを例えば二本鎖 RNA のセンス鎖にさらに含む RNA も本明細書中に記載される。特定の例において、修飾リボヌクレオチドは、少なくとも一方の鎖の 3' オーバーハング、またはより詳細にはセンス鎖の 3' オーバーハングに存在する。修飾リボヌクレオチドの例としては、検出可能な標識 (例えば、ローダミンまたは FITC などのフルオロフォア) を含むリボヌクレオチド、チオホスフェートヌクレオチドアナログ、デオキシヌクレオチド (この塩基分子はリボ核酸であるので、修飾されているとみなされる)、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-アミノシチジン、4-チオウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、5-(3-アミノアリル)-ウラシル、イノシンまたは 2'-O-Me-ヌクレオチドアナログが挙げられることが特に企図される。

20

【0174】

目的の遺伝子に対するアンチセンス分子およびリボザイム分子も、本明細書中に開示される方法において有用である。アンチセンス核酸は、特定の mRNA 分子の少なくとも一部に相補的な DNA または RNA 分子である (Weintraub, Scientific American 262:40, 1990)。細胞において、アンチセンス核酸は、対応する mRNA にハイブリダイズして、二本鎖分子を形成する。細胞は、二本鎖である mRNA を翻訳しないので、アンチセンス核酸は、その mRNA の翻訳に干渉する。約 15 ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい。なぜなら、それらは、容易に合成され、目的のタンパク質を産生する標的細胞に導入されたとき、それより大きな分子よりも問題を引き起こす可能性が低いからである。遺伝子のインビトロ翻訳を阻害するためにアンチセンス法を使用することは、周知である (例えば、Marcus-Sakura, Anal. Biochem. 172:289, 1988 を参照のこと)。

30

【0175】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 ヌクレオチド長であり得る。アンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いた化学合成および酵素的ライゲーション反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド、またはその分子の生物学的安定性を高めるようにもしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された二重鎖の物理的安定性を高めるようにデザインされた多様な修飾ヌクレオチド (例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチド) を用いて化学的に合成され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例としては、とりわけ、5'-フルオロウラシル、5'-ブロモウラシル、5'-クロロウラシル、5'-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキユーオシン、イノシンが挙げられる。

40

【0176】

転写を止めるためにオリゴヌクレオチドを使用することは、オリゴヌクレオチドが二重らせんの DNA に巻きついて三本鎖ヘリックスを形成する三重鎖ストラテジーとして知ら

50

れている。ゆえに、これらの三重鎖化合物は、選択された遺伝子におけるユニークな部位を認識するようにデザインされ得る (Maherら、Antisense Res. and Dev. 1 (3) : 227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design 6 (6) : 569, 1991)。このタイプの阻害性オリゴヌクレオチドも、本明細書中に開示される方法において有用である。

【0177】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼと類似の様式で他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を有するRNA分子であり、リボザイムもまた有用である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列の修飾によって、RNA分子における特定のヌクレオチド配列を認識し、切断する分子を操作することが可能である (Cech, J. Amer. Med. Assn. 260 : 3030, 1988)。このアプローチの主な利点は、それらが配列特異的であるので、特定の配列を有するmRNAだけが不活性化されるという点である。

【0178】

リボザイムには基本的なタイプが2つあり、すなわち、テトラヒメナ型 (Hasselhoff, Nature 334 : 585, 1988) および「ハンマーヘッド」型である。テトラヒメナ型リボザイムは、4塩基長の配列を認識し、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、11~18塩基長の塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、その配列が標的mRNA種にもっぱら存在する確率が高くなる。その結果として、特定のmRNA種を不活性化する場合、ハンマーヘッド型リボザイムが、テトラヒメナ型リボザイムよりも好ましく、18塩基の認識配列が、それより短い認識配列よりも好ましい。

【0179】

様々な送達系が知られており、それらを用いることにより、siRNAおよび他の阻害性核酸分子を治療薬として投与することができる。そのような系としては、例えば、リボソームによる被包、微小粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、治療的分子を発現することができる組換え細胞 (例えば、Wuら、J. Biol. Chem. 262, 4429, 1987を参照のこと)、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての治療的核酸の構築などが挙げられる。Cas9を導入するための上記に開示されたいずれのベクターも、阻害性核酸を導入するためにも使用することができる。

【0180】

iPSCを作製するためのリプログラミング

当業者に公知の方法を用いて人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製するために、体細胞がリプログラムされ得る。当業者は、人工多能性幹細胞を容易に作製できる。例えば、米国特許出願公開番号20090246875、米国特許出願公開番号2010/0210014; 米国特許出願公開番号20120276636; 米国特許第8,058,065号; 米国特許第8,129,187号; 米国特許第8,278,620号; PCT公開番号WO2007/069666A1および米国特許第8,268,620号 (これらは参照により本明細書中に援用される) を参照のこと。一般に、核リプログラミング因子を用いることにより、体細胞から多能性幹細胞が作製される。いくつかの実施形態において、Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、NanogおよびLin28のうちの少なくとも3つまたは少なくとも4つが使用される。他の実施形態において、Oct3/4、Sox2、c-MycおよびKlf4が、使用される。

【0181】

体細胞からiPSCを誘導することができる一般に1つまたはそれを超える因子である核リプログラミング物質またはこれらの物質をコードする核酸 (ベクターに組み込まれた形態を含む) で細胞が処理される。核リプログラミング物質には、一般に、少なくともOct3/4、Klf4およびSox2、またはこれらの分子をコードする核酸が含まれる。p53の機能的な阻害剤、L-mycまたはL-mycをコードする核酸、およびLin28もしくはLin28bまたはLin28もしくはLin28bをコードする核酸が、さらなる核リプログラミング物質として使用され得る。Nanogも、核リプログラミ

ングに使用され得る。米国特許出願公開番号2012/0196360に開示されているように、iPSCを作製するための例示的なリプログラミング因子としては、(1) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc (Sox2は、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17またはSox18で置き換えることができ；Klf4は、Klf1、Klf2またはKlf5で置き換え可能である)；(2) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、SV40ラージT抗原 (SV40LT)；(3) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、ヒトパピローマウイルス (HPV) 16 E6；(4) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、HPV16 E7 (5) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、HPV16 E6、HPV16 E7；(6) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、Bmi1；(7) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28；(8) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28、SV40LT；(9) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28、TERT、SV40LT；(10) Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、SV40LT；(11) Oct3/4、Esrrb、Sox2、L-Myc (Esrrbは、Esrrgで置き換え可能である)；(12) Oct3/4、Klf4、Sox2；(13) Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、SV40LT；(14) Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HPV16 E6；(15) Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HPV16 E7；(16) Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HPV16 E6、HPV16 E7；(17) Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、Bmi1；(18) Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28 (19) Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28、SV40LT；(20) Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28、TERT、SV40LT；(21) Oct3/4、Klf4、Sox2、SV40LT；または(22) Oct3/4、Esrrb、Sox2 (Esrrbは、Esrrgで置き換え可能である) が挙げられる。1つの非限定的な例において、Oct3/4、Klf4、Sox2およびc-Mycが、使用される。他の実施形態において、Oct4、NanogおよびSox2が使用される。例えば、米国特許第7,682,828号(参照により本明細書中に援用される)を参照のこと。これらの因子には、Oct3/4、Klf4およびSox2が含まれるが、これらに限定されない。他の例では、それらの因子には、Oct3/4、Klf4およびMycが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの非限定的な例において、Oct3/4、Klf4、c-MycおよびSox2が使用される。他の非限定的な例において、Oct3/4、Klf4、Sox2およびSal4が使用される。

【0182】

これらの核リプログラミング物質のマウスcDNA配列およびヒトcDNA配列は、WO2007/069666(参照により本明細書中に援用される)で述べられているNCBIアクセッション番号に照らして入手可能である。1つもしくはそれを超えるリプログラミング物質またはこれらのリプログラミング物質をコードする核酸を導入するための方法は、当該分野で公知であり、例えば、米国特許出願公開番号2012/0196360および米国特許第8,071,369号(この両方が参照により本明細書中に援用される)に開示されている。

【0183】

細胞は、核リプログラミング物質とともに培養された後、例えば、幹細胞の培養に適した条件下で培養され得る。マウス細胞の場合、培養は、通常の培地に白血病抑制因子(LIF)を分化抑制因子として加えて行われる。ヒト細胞の場合、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)を加えることが望ましい。

【0184】

いくつかの実施形態において、細胞は、フィーダー細胞として、細胞分裂を終結させるために放射線または抗生物質で処置されたマウス胎仔線維芽細胞の共存下で培養される。フィーダーとしてよく使用されるマウス胎仔線維芽細胞としては、STO細胞株(ATC

10

20

30

40

50

C CRL-1503)などが挙げられ; iPSCを誘導する場合、有用な細胞は、ネオマイシン耐性遺伝子およびLIF遺伝子をSTO細胞(SNL76/7 STO細胞; ECACC 07032801)(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085, 1990)などに安定的に組み込むことによって作製され得る。マイトマイシンCで処置されたMEFは、Milliporeから商業的に入手可能である。ガンマ照射されたMEFは、一般に、Global Stemから商業的に入手可能である。一般に、体細胞には、MEFの非存在下においてリプログラミング因子を形質導入する。いくつかの実施形態において、形質導入の約7~8日後に、それらの細胞は、MEF上に再播種される。

【0185】

重要な多能性因子であるNANOGの発現および胚性幹細胞特異的な表面抗原(SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81)が、完全に再プログラムされたヒト細胞を同定するために日常的に使用されている。機能的なレベルにおいて、iPSCは、胚の3つすべての胚葉から系統に分化する能力も示す。

【0186】

いくつかの実施形態において、ヒトiPSCを作製するように体細胞を誘導する際、それらの細胞がドキシサイクリンに曝露されると、10%超のヒト人工多能性幹細胞が、Cas9を発現する。さらなる実施形態では、細胞がドキシサイクリンに曝露されると、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%または約50%超のヒト人工多能性幹細胞が、Cas9を発現する。非限定的な具体例では、細胞がドキシサイクリンに曝露されると、約35%~約45%(例えば、約38%~約42%、例えば約40%)のヒト人工多能性幹細胞が、Cas9を発現する。この文脈において、「約」は、1パーセント以内を示唆する。他の実施形態において、細胞がドキシサイクリンに曝露されると、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%または50%超のヒト人工多能性幹細胞クローンまたはコロニーが、Cas9を発現する。非限定的な具体例では、細胞がドキシサイクリンに曝露されると、35%~45%(例えば、38%~42%、例えば40%)のヒト人工多能性幹細胞クローンまたはコロニーが、Cas9を発現する。

【0187】

iPSCの分化

ヒトiPSCをヒト肝細胞に分化させるためのいくつかの方法が、本明細書中に開示される。本開示の方法において、インビトロ工程を用いることにより、ヒトiPSCからヒト肝細胞が作製される。必要に応じて、そのヒト肝細胞は、免疫無防備状態の動物(例えば、免疫無防備状態のトランスジェニックラットであるがこれに限定されない)において拡大され得る。

【0188】

いくつかの実施形態において、ヒト肝細胞を作製するための方法が、本明細書中に提供される。その方法は、a)有効量のアクチビンA、線維芽細胞成長因子(FGF)-2および骨形成タンパク質(BMP)-4を含む第1の培地中でヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を、中内胚葉細胞が作製されるのに十分な長さの時間にわたって培養する工程を含む。特定の分化誘導条件の存在下において、中内胚葉細胞は、肝臓細胞を含む内胚葉および内胚葉誘導体を作製することができ、中胚葉および中胚葉誘導体(例えば、心筋および骨格筋、血管平滑筋、内皮ならびに造血細胞)を作製することもできる。いくつかの実施形態において、ヒトiPSCは、第1の培地中で2~3日間(例えば、2、2.5または3日間)培養される。培養条件は、一般に、約37℃および大気酸素(例えば、約21%酸素)における標準的な培養条件である。

【0189】

いくつかの非限定的な例において、第1の培地は、例えば、約50~約200 ng/mLのアクチビンA(例えば、約100~約200 ng/mLのアクチビンA)を含み得る。したがって、第1の培地は、約50、60、70、80、90、100、110、12

10

20

30

40

50

0、130、140、150、160、170、180、190または200 ng/mLのアクチビンAを含み得る。さらなる非限定的な例において、第1の培地は、約10～約50 ng/mLのFGF-2（例えば、約20～約50 ngのFGF-2）を含み得る。したがって、第1の培地は、約20、25、30、35、40、35または50 ng/mLのFGF-2を含み得る。さらなる非限定的な例において、第1の培地は、約20～約100 ng/mLのBMP-4（例えば、約30～約90 ng/mLのBMP-4）を含み得る。したがって、第1の培地は、約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100 ng/mLのBMP-4を含み得る。その培地は、いくつかの非限定的な例において、毎日または1日おきに取り替えられ得る。第1の培地中でIPSCを培養することにより、中内胚葉細胞が作製される。

10

【0190】

次いで、中内胚葉細胞が、外から加えられたFGF-2およびBMP-4の非存在下において有効量のアクチビンAを含む第2の培地中で、胚体内胚葉細胞が作製されるのに十分な長さの時間にわたって培養される。いくつかの実施形態において、中内胚葉細胞は、第2の培地中で約2～約3日間（例えば、2、2.5または3日間）培養されることにより、胚体内胚葉細胞が作製される。いくつかの非限定的な例において、第2の培地は、例えば、約50～約200 ng/mLのアクチビンA（例えば、約100～約200 ng/mLのアクチビンA）を含み得る。したがって、第1の培地は、約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190または200 ng/mLのアクチビンAを含み得る。さらなる非限定的な例において、第2の培地は、有効量のL-グルタミンをさらに含む。例えば、第2の培地は、約0.5～約2%体積/体積（v/v）のL-グルタミン（例えば、約0.5%、1.0%、1.5%または2% L-グルタミンを含み得る。第2の培地は、例えば、毎日または1日おきに取り替えられ得る。

20

【0191】

胚体内胚葉は、有効量のジメチルスルホキシド（DMSO）および肝細胞成長因子（HGF）を含む第3の培地中で培養される。いくつかの実施形態において、第3の培地は、約1～約3パーセント体積/体積（v/v）のDMSO（例えば、約1、1.5、2、2.5または3パーセントv/vのDMSO）を含む。さらなる実施形態において、第3の培地は、約20～約150 μg/mLのHGF（例えば、約50 μg/mL～約100 μg/mL HGF）を含む。非限定的な具体例において、第3の培地は、約20、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150 μg/mLのHGFを含む。さらなる非限定的な例において、第3の培地は、有効量のL-グルタミンをさらに含む。例えば、第3の培地は、約0.5～約2%体積/体積（v/v）のL-グルタミン（例えば、約0.5%、1.0%、1.5%または2% L-グルタミン）を含み得る。通常、第3の培地は、低グルコース培地であり、例えば、0.2～2グラム/リットルのグルコースを含む。胚体内胚葉は、第3の培地中で約8～約14日間（例えば、約8、9、10、11、12、13または14日間）培養されることにより、肝特異化細胞（ステージ3）が作製される。第3の培地は、毎日または1日おきに補充され得る。

30

【0192】

いくつかの実施形態において、肝特異化細胞は、免疫無防備状態の動物に移植される。下記を参照のこと。したがって、肝特異化細胞は、免疫無防備状態の動物において肝細胞に分化し、また、免疫無防備状態の動物において拡大される。

【0193】

必要に応じて、肝特異化細胞は、有効量のHGF、ウルソデオキシコール酸、コレステロール、パルミチン酸、オレイン酸、リファンピシン、および必要に応じてコレステロールを含む第4の培地中で培養されることにより、ヒトiPS細胞由来肝細胞（iHep）が作製される。通常、第4の培地は、低グルコース培地であり、例えば、約0.2～約2

40

50

グラム／リットルのグルコースを含む。第4の培地は、毎日または1日おきに補充され得る。

【0194】

いくつかの実施形態において、第4の培地は、約20～約150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のHGF（例えば、約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のHGF）を含む。非限定的な具体例において、第4の培地は、約20、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のHGFを含む。さらなる実施形態において、第4の培地は、約50 mM～約150 mMウルソデオキシコール酸（例えば、約75～約125 mMウルソデオキシコール酸、例えば、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150 mMウルソデオキシコール酸）を含む。さらなる実施形態において、第4の培地は、約10 μM ～約50 μM パルミチン酸（例えば、20 μM ～約40 μM パルミチン酸）を含む。非限定的な具体例において、第4の培地は、約10、15、20、25、30、35、40、45または50 μM パルミチン酸を含む。さらなる実施形態において、第4の培地は、約10 μM ～約50 μM オレイン酸（例えば、20 μM ～約40 μM オレイン酸）を含む。非限定的な具体例において、第4の培地は、約10、15、20、25、30、35、40、45または50 μM オレイン酸を含む。なおもさらなる実施形態において、第4の培地は、約10 μM ～約50 μM リファンピシン（例えば、20 μM ～約40 μM リファンピシン）を含む。非限定的な具体例において、第4の培地は、約10、15、20、25、30、35、40、45または50 μM リファンピシンを含む。

【0195】

さらなる実施形態において、第4の培地は、有効量のL-グルタミン、DMSOおよび／またはデキサメタゾンを含み得る。例えば、第4の培地は、約0.5～約2 % v/vのL-グルタミン（例えば、約0.5%、1.0%、1.5%または2% L-グルタミン）を含み得る。さらなる例において、第4の培地は、約1～約3パーセント v/vのDMSO（例えば、約1、1.5、2、2.5または3パーセント v/vのDMSO）を含む。さらなる例において、第4の培地は、約0.5～約2 mMデキサメタゾン（例えば、約0.5、1.0、1.5または2 mMデキサメタゾン）を含む。

【0196】

上記の方法は、ヒト i Hep をインビボにおいて（例えば、免疫無防備状態の非ヒト動物の肝臓において）拡大する工程も含み得る。この拡大は、下記の項に開示される。

【0197】

他の実施形態において、本開示の方法によって作製された細胞は、それらの細胞が凍結されたとき生存可能であるように、細胞膜に組み込まれ、その構造を変化させ得る凍結保存剤を使用することなどによって、凍結保存され得る。凍結保存剤の例示的な非限定的な例は、グリセロールおよびDMSOである。

【0198】

哺乳動物宿主における肝細胞の拡大

本開示の方法は、肝特異化（ステージ3）細胞および／またはヒト i Hep（ステージ4）を免疫無防備状態の非ヒト動物に移植する工程を含み得る。任意の免疫無防備状態の非ヒト動物を、本明細書中に開示される方法において使用することができる。いくつかの非限定的な具体例において、免疫無防備状態の非ヒト動物は、ラット、マウス、ブタまたはウサギである。免疫無防備状態の非ヒト動物は、重症複合免疫不全（SCID）のマウスもしくはラットを有し得るか、またはヌードマウスもしくはヌードラットであり得る。他の例では、免疫無防備状態の動物は、フマリルアセト酢酸（fumarylacetoacetate）ヒドロラーゼ（FAH）欠損のマウス、ラットおよび／またはブタである。特許出願番号PCT/US2008/065937；米国特許出願番号14/241,316および米国特許第9,000,257号（すべてが参照により本明細書中に援用される）を参照のこと。

【0199】

肝特異化細胞および／またはヒト i H e p は、当該分野で公知の任意の好適な手段を用いて任意の組織に移植され得る。1つの実施形態において、収集されたヒト肝特異化細胞および／または i H e p は、レシピエント動物の脾臓に、注射などによって移植される。別の実施形態において、拡大されたヒト成熟肝細胞（ステージ5の後）は、レシピエント動物の肝臓に移植される。

【0200】

ヒト肝特異化細胞および／または i H e p は、ヒト成熟肝細胞の作製および拡大を可能にするのに十分な時間にわたってレシピエント動物において保持される。拡大のための正確な時間は、日常的な実験によって経験的に決定され得る。1つの実施形態において、ヒト肝細胞は、最大6ヶ月間拡大される。別の実施形態において、ヒト成熟肝細胞は、少なくとも約4週間、少なくとも約6週間、少なくとも約8週間、少なくとも約12週間、少なくとも約16週間、少なくとも約20週間、少なくとも約24週間、少なくとも約28週間、少なくとも約36週間、少なくとも約48週間、少なくとも約72週間および少なくとも約96週間、拡大される。ヒト肝細胞の拡大の程度は、様々であり得る。いくつかの実施形態において、レシピエントラットにおけるヒト肝細胞の拡大は、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍または少なくとも約1000倍の増加をもたらす。

【0201】

肝臓におけるヒト肝細胞の生着、成熟および拡大の成功には、いくらかの程度の肝機能不全を有する免疫無防備状態の動物が必要である。異なる種々のタイプの免疫無防備状態のマウス（R A G - 2 ノックアウトマウスまたは S C I D マウスを含み、この両方がB細胞およびT細胞を欠く）のマウス肝臓では、ヒト肝細胞が再増殖されてきた（米国特許第6,509,514号；P C T 公開番号 W O 0 1 / 0 7 3 3 8 ；米国特許出願公開番号2005-0255591（参照により本明細書中に援用される））。いくつかのグループが、げっ歯類において初代ヒト肝細胞を生着させ、拡大させた（米国特許第6,509,514号；P C T 公開番号 W O 0 1 / 0 7 3 3 8 ；米国特許出願公開番号2005-0255591）。D a n d r i ら（H e p a t o l o g y 33:981-988, 2001）は、ヒト肝細胞の、マウス肝臓での再増殖の成功を報告した。それ以来、他のグループも、マウスにおけるヒト肝臓細胞生着の成功を報告した。さらに、P C T 公開番号2008/151283（参照により本明細書中に援用される）は、F a h 欠損動物、および肝細胞を拡大するためのそれらの使用を開示している。

【0202】

いくつかの実施形態において、レシピエントは、その動物における天然の肝臓細胞の成長反応を阻害する作用物質で処置される。その因子は、例えば、放射線照射、またはレトリクルシン、またはチロシキナーゼ阻害剤である抗悪性腫瘍剤（例えば、ソラフェニブ（s o r a f e n i b）であるがこれに限定されない）、または抗悪性腫瘍性アルキル化剤（例えば、シスプラチンであるがこれに限定されない）であり得る。簡潔には、ヒト肝細胞をレシピエントに移植する前に、レシピエントの肝臓細胞の成長反応を阻害するのに十分な長さの時間にわたって、有効量の作用物質がレシピエントに投与される。

【0203】

リコンビナーゼ活性化遺伝子2（R a g 2）およびインターロイキンレセプターの共通ガンマ鎖（I l 2 r g）が欠損している二重変異ラットは、ヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞をインビボにおいて拡大するための効率的なインビボシステムを提供する。したがって、いくつかの実施形態、免疫無防備状態の非ヒト動物は、R a g 2 - / - / I l 2 r g - / - 動物（例えば、マウスまたはラット）である。いくつかの非限定的な例において、本方法は、R a g 2 - / - I l 2 r g - / - が欠損しているラットを使用し得る。

【0204】

1つの実施形態において、上記ラットは、カスパーゼ9（C a s p 9）をコードする核

10

20

30

40

50

酸分子も含む R a g 2 - / - / I l 2 r g - / - ラットである。例示的な C a s p 9 アミノ酸配列は、GENBANK（登録商標）アクセッション番号 NM001229（2017年1月20日、参照により本明細書中に援用される）に開示されている。C a s p 9 をコードする核酸は、肝臓において発現されるプロモーター（肝臓特異的プロモーター）（例えば、アルブミンプロモーターもしくはトランスサイレチンプロモーターおよび／またはアルファ-1-抗トリプシンプロモーターであるがこれらに限定されない）に作動可能に連結され得る。肝臓特異的プロモーターの非限定的な例は、Liver Specific Gene Promoter Database (LSPD, rulai.cshl.edu/LSPD/) に提供されており、例えば、トランスサイレチン (TTR) プロモーターまたは TTR 最小プロモーター (TTRm)、アルファ-1-抗トリプシン (AAT) プロモーター、アルブミン (ALB) プロモーターまたは最小プロモーター、アポリポタンパク質 A1 (APOA1) プロモーターまたは最小プロモーター、補体因子 B (CFB) プロモーター、ケトヘキソキナーゼ (KHK) プロモーター、ヘモペキシン (HPX) プロモーターまたは最小プロモーター、ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ (NNMT) プロモーターまたは最小プロモーター、（肝臓）カルボキシエステラーゼ 1 (CES1) プロモーターまたは最小プロモーター、プロテイン C (PROC) プロモーターまたは最小プロモーター、アポリポタンパク質 C3 (APOC3) プロモーターまたは最小プロモーター、マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ 2 (MASP2) プロモーターまたは最小プロモーター、ヘプシジン (hepcidin) 抗菌ペプチド (HAMP) プロモーターまたは最小プロモーター、およびセルピンペプチダーゼ阻害剤クレード C (アンチトロンビン)、メンバー 1 (SERPINC1) プロモーターまたは最小プロモーターが挙げられる。これらのプロモーターは、有意な程度の、導入遺伝子の肝臓特異的発現をインビボにおいて（および／または肝細胞／肝細胞株においてインビトロで）もたらず。いくつかの実施形態において、プロモーターは、FKBP12 などの FK506 結合タンパク質をコードする核酸にも作動可能に連結され得る。選択的なアポトーシスが含められ得る。Di Stasi ら、N Engl J Med. 2011 3; 365 (18) : 1673-83 および PCT 公開番号 WO2011146862（両方が参照により本明細書中に援用される）を参照のこと。

【0205】

外来性 C a s p 9 をコードする遺伝子を含む免疫無防備状態のラット (R a g 2 - / - / I l 2 r g - / -) が、インビボにおけるヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト成熟 i 肝細胞 (i H e p a t o c y t e s) および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞の生着および拡大のために使用されることが本明細書中に記載される。

【0206】

いくつかの実施形態において、トランスジェニックラットは、融合タンパク質、詳細には、カスパーゼ 9 (C a s p 9、GENBANK（登録商標）アクセッション番号 NM001229、2017年2月11日、参照により本明細書中に援用される）に融合された FK506 結合タンパク質 (FKBP)（例えば、FKBP12）をコードする核酸に作動可能に連結された肝臓特異的組織プロモーターを含む。FKBP12（例えば、GENBANK（登録商標）番号 AH002818、2017年2月11日、参照により本明細書中に援用される）は、C a s p 9 に直接融合され得るか、または FKBP12 と C a s p 9 との間にリンカーが含まれ得る。そのリンカーは、例えば、4~10 アミノ酸長（例えば、4、5、6、7、8、9 または 10 アミノ酸長）であり得る。好適なリンカーは、当該分野で公知である。非限定的な具体例において、肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーターおよび／またはトランスサイレチンプロモーターおよび／またはアルファ-1-抗トリプシンプロモーターである。

【0207】

カスパーゼ-9 は、アポトーシスおよびサイトカインプロセッシングに関わるシステインプロテアーゼのカスパーゼファミリーのメンバーである。細胞は、アポトーシス刺激を受

10

20

30

40

50

けると、ミトコンドリアがシトクロム c を放出し、次いで、そのシトクロム c は、d A T P とともに、哺乳動物の C e d - 4 ホモログである A p a f - 1 に結合する。F 3 6 が V に置換した、完全な成熟コード配列を有するヒト 1 2 k D a F K 5 0 6 結合タンパク質は、合成二量体化薬である A P 1 9 0 3 に対する結合部位を提供する (J e m a l , A . ら、C A C a n c e r J . C l i n i c . 5 8 , 7 1 - 9 6 (2 0 0 8) ; S c h e r , H . I . a n d K e l l y , W . K . , J o u r n a l o f C l i n i c a l O n c o l o g y 1 1 , 1 5 6 6 - 7 2 (1 9 9 3) (参照により本明細書中に援用される) を参照のこと)。

【0208】

有用なプラスミドの1つの非限定的な具体例は、本明細書中に開示される p E A L B 1 2 3 - i C a s p 9 _ I R E S - G F P である。その p E A L B 1 2 3 - i C a s p 9 _ I R E S - G F P プラスミドを、プラスミド p E A L B 1 2 3 C A T (W e n a n d L o c k e r , D N A C e l l B i o l 1 9 9 5 , 1 4 : 2 6 7 - 7 2 (参照により本明細書中に援用される) からアルブミン / α フェトプロテインのラットプロモーター / エンハンサー配列、およびプラスミド p M S C V - F - d e l C a s p 9 . I R E S . G F P 2 A d d g e n e P l a s m i d # 1 5 5 6 7、S t r a a t h o f ら、B l o o d 2 0 0 5 , 1 0 5 : 4 2 4 7 - 5 4 (参照により本明細書中に援用される) を参照のこと) から F K B P 1 2 (V 3 6) - p 3 0 C a s p a s e 9 配列をクローニングすることによって構築した。このプラスミドにおいて使用されるラットアルブミンプロモーターは、ラット肝細胞だけで発現されることから、ラット肝細胞だけが、F K B P 1 2 (V 3 6) - p 3 0 C a s p a s e 9 配列を発現し得ることが保証される。この改変されたカスパーゼ9システムは、改変された F K 結合タンパク質に融合されて、誘導化合物の存在下における条件的な二量体化を可能にする。p E A L B 1 2 3 C A T から使用される配列は、以下である：

10

20

30

40

50

【化 7 - 1】

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGC
ATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGA
CAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCAT
CAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTA
ACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAA
GAGCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTTCCTCCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTA
CCCGTATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGACTCGCTGATCCT
TGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCCACCTCGGGGGTCTTTCATTTGGAGGTT
CCACCGAGATTTGGAGACCCCTGCCTAGGGACCACCGACCCCCCGCCGGGAGGTAAAG
CTGGCCAGCGGTTCGTTTCGTGTCTGTCTCTGTCTTTGTGCGTGTTTGTGCCGGCATCTAA
TGTTTGCGCCTGCGTCTGTACTAGT
CCGCGGACACTGCTGTAACTCTCCTTGACCTATATCGATGTTCTAGTGTACCTTTATTG
ACTTTGACATATTTCTGTCCTTTTAAAGTTCGGCGGGCAGCTCGGTTGCTCAATTCGTCTC
TGGACTCTTTTACTTTGTTCCCTGTGTGGGGGAAGAAAAAATATTTTCTCCTCTAAACAC
CAAAGATCCAAAGATAAAATTCCTTTGATGGAGGGAAAACAGCCCCCTTCCCCATTT
TGATTTTCTTTCGAGCGAAACATGTTTCACAGCCAACGGGGAGGGTAAAGGATTCCCCC
CCCCGCCCAGATAGGCTCGAATTAAACAAAGGAGGGAGAGTTGACAGAAACCAACCA
AGGGGAGGATTATGGTGACGTCTGGGGCTAGATGTGAAGAGATCAAGGAAGAAACCA
GCAGAGAAGACATTGGTCAGGCTTGTCATGAGCAGTGTGATGGTGCCTATACATTTTC
ATGCTGGGCAGAAACATCTTTCCACATTTGACCTCCAGTTCCTTGATGTAATCATATGT
TTGGGGTTCCTTGAGAAAGTGTGGGGAGAGTCTTCATATATTAGCTCAAGGAACATGT
ATAGAATAGGTAGAGAGAATTTAGCAGCATTAGGGAAACAGACAAAGAAAACGTCAG
GCAAACGTGGGGCTGCCCTCTCAATCCTTGAGTTCCAGTAATTTAGAGACTATAACAG
TCACGAGATCGTTCTCTGCTCACAGATAACAAGAGCAGGGGGTAAGTGTAACAAAATC
TTCAGAGTAAGGAGGGCCATAGTGGTCTAAAACACTCCTTATAGTTGGAGTGCGTCGC
TTTGCAGGGTTCATTTGAAAATCTGAAGGTTTCCTTGCGAGACGCTAGATTCCATACCA
TTCTCACATATGCTTTTGTGCCTGTGGAGTTTCAGACCTAGATAAGAGAATGATTGAAT
ATTTCACTAACGTTCTGTTACCAGAAGAGCGTGAGAGGCGTGATTCATTTGTGGGC

10

20

30

40

50

【化 7 - 2】

GTAAATCGCTGACTACCATTTGATTGATGACATTTGATTTCTGTTTGTAAGATGATG
CTGTGTTTCGGATGTTGTGCTAAGCACCATGGTAAATGCAAGAAGTTAATCATCTGGG
AAAGGGCCAGATTGCCTCCCGAGAAGACTGGGACTTAAGGGCACACATGAAGTTCCTG
AGAAGTCAATCTAGAGAGTGTTAGAAGTTGTCAGAGAGGGACCTTCTCTAGTGAGTGC
TAAACACCCACAGACAATTATATGATCGATGCCTTGAGAACTGGTGGTAAGTTATTAT
AAGCATTGAAGGGCAAGGCACTAGAAATGTAAGAACTATGCTTTCATGGAACACACA
CACAGACACACACACAGATACCCACATGCACACACACACACATGCACACGCACACAG
ACACACACATACACACAGACATACATACACACACAGCACATACACACATACATACATG
CACACACAGAGAGCAAGCACACACAGAGAGAGTCATACACACACACACACAAACACA
CAAACACACAAACACACAAGCAGACACAAACAGACACAGCAAAAAGGATCCTGAAG
GAGTGAAAGTCATTTTCTGCCAACTCACATGTGCAGTCTAACTGTGCATTCTAGAAGTG
CCAGTCCTAAGAATGGTGATATTTACTCACACCTTTTTAGAAATATTTGTAGCTGTCCA
GCATTTAGGACACACCACTCCGCCTCCACACATGAAAGTATACTTTCAGAGAAGTATT
ATTTTGTGAGATGAATCATAAGACTCAGAATCAGTCATGTTAAATTATTCACCGAATGT
CATAGGACTGATACTGGCACACACACGATTAGCATCTTCTGATGGCGGGGTTTCAGTT
TACCGGGTCACGCTGCACTGGGGAAGATTGAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAGAA
CAAGAATTGGAGCAGCCGAAAGTATTTGCTGCGAACTCTGTACTTAGGACTTAGCTT
TGAGCAATAGCCCCGAAAGGTTTTAGCACTGTTTGCGGTGAGCACACAAACCGTGTT
CAAAGCTCCTCCTTATCTCTCCTGCGGCATTTGCCGTCTCTGGTTCTGCACACGGTTTC
TCACCCGCTCCCACACACCTACACTAAGCCCTGTAAGCTGGAGCTATTCCAGTATCCAT
CCCCTCTGTGTGATTCTGGAGATAGGAAGCAATACACCAGTGCCTGTCAACTTCTTCGA
TCTGCAAATCAGGGTGTTTGGCCCAACATTCTGAGGAGTAAAAAGCAAGCTTGAT
TACATTAACTCACACATACTAAACCAGAACAGTAGGGTAAACCAATCTCTGTCTCT
GTCTCTCTGTCTCTCTCCCTCACTCCCTCTTGCTTTCTCTCTAGGAGTCAGTATGTGTGA
ACTTAGCTTTTAAAGCATTTTTTCTTTAATTTTACTTCATCCACATTACGAAATTTTAT
GTGGATTTCTCACTTCCTGTCAGCGATGCCTTCACCCACGTGGCTTTGTTAGATTACAC
ATTGCAGTAGTTTAATTGGTCTCATCTCTTTTTGACAGCAGCAGAGACATTTTCAAAGG
ACAGAGATGATTTTTTTTTTTTACCAGCTCCTCTTTGAGGTCCTTCATGAAGCGGGAAC
ACGAGGTCTTAAGAGACAGCCTGTGCCAGCCTCATCAAAAACACTGCCCCCATTAGG
TTGCCAGTAGGTAAAGCCCTTAGCATCATAGTCTTAGCCACCTGAGTTCCATCTCTGGA
GCTCTCAGAAGAGCGGAGAGAGAGATCAGACTCTACAGGGTTGCCTCTGACTGCCACT
GAGGGTCTGCCAACTTTTTGTGTCATGGGGAGTTGAACCCAGAGCCTCACACAACTC
GGCGAGCCACGATCCGCTGAGTCCTGCCATTTCTGAACACTGTGTCTCACATATTGCCT
TTCTTCTCATTCTGAACTACGCTGTTCTCTCCATTAATGGGTCTCTCGCTGTCTTTTAC

10

20

30

40

50

【化 7 - 3】

AATTCCTCGAGGTAAAAGGCAAGCCTTGCTATTCGGCCTACCTACCAACTTTTCTTTGG
GTCTCTTGGAATGTGACTTCCTCTAAAAATACCTCACC GG TAGAAAAGACACTAGGAG
CTGTTTTCTTCCACATAGCAGGACATCCATCAGAGAACTTGGATACAGTGGATGCAG
TCATTTTTCCACCAGATGAGATGTGGTCTCAGTCAGTAATGCTGACACTCATTGCTGAC
ACTTCCCTTCAGTGAACAACATCTCATATGCGGACTTCACACTTTTTGTTGAATGAATC
ATGGAACCCCCAACTGTTGAGTTCTACTTGGTGGCGGCCCTATTCTGAGTGACCCCTCTT
ACTAGTTTATCTAACCCTCGTTTATTA AAAAGGATATTAATTTTCGTA ACTATAATTTT
ATATGTTGGGAGTAAACCATTTTGAGTGT TTTGTCCAATGTCACCTGACCGACAGTTT
GAATAGTCGGGGGTAGAGCCTTTTCGTATACTAAAGTCCAGTTTGT TTAACCATATTGCT
TCAGTGGGGTTTCATGGGCTCAGGAAGTAACGAATGAACCAGACATAGAGCTATGAA
AGGTATGTGGTGCGAGCTCAGCCCTTGCGACAAAGCTTTGAGCAACAGCCCCGCGTGGG
CTTAGGGTTGTTGTCAGTTGGTGTTAGAGACCTCACACAAAGTCATGTGGCAGATAAC
CCGGAGGCAAAATTCAAACCCAGTCGCCATATGCTCATGTTTAACGGTGACCCTGTGC
ACCTTTCTGATCACATGCTTTGGAATTGCAAAGATCTCCCCACAAGGCAGAGTGCAGA
GAGAATTAAGGATGACATAACCTGTGGGCTGGGCTGATCTGGGCTGCTCCTCTTGGC
TTAGGTGTAGAAGCATAGCAGTGAATTGGTGACTGATATAACGTGTATTTATTATCTAT
AGTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGATCAT
ATTTACACATGATTCATCTAGCCTTTATGAAAGGATGATGAAACCAGACATTTAGCCTT
GCGGTTACATGCATACTAGCAAGAACTCGATATAGGATCTTTAAAGGTAGGAAGATC
TCAGAGTGGTCAAGGAGAGGTGTAGCACACCTGTAATCCAGGACCCAGGAGATAGGA
AAATCAGGA ACTCAAAGCCAACTGCTCACAAACCGACCATGCAAACGATTGACCAAA
CTAAATGGAGACTCTTATTTCACTTTAAACCTTGTC ACTGGATAAATACATTCATTA
TCTACTCAGCAAGTGT TGGGTCCTGTCTCAACACTTGACGTGCTATGCATAGTGTA AAA
CGTACTCAGTGTACTTAGACCATTTATTGTTATTTTATCCAATGAGTAGGGATGAGAGG
AGAGGGAGACAGAGACAGAGACAGAGACAGAGACAGAGAGAGACAGAGACAGAGA
GAGACAGAGAGAGACAGAGAGAGACAGAGAGAGAGACAGAGAGGAGAGAGAGAGGAG
AGAGATAGAGAGGACAGAGAAGACAGAGAGAAGAGCAGTAGACAGACACACAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAG
AGAGAGACAGAGAGAGAGACAGATAGACACACAGAGAGAGAGAAAGAGAGGGAGAGA
GAGACACAGAGAGAGAGAGGTAGACAGACAGACACACATACACACAGACAGACAGACA
GACAGACACACACACACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGTCTGATTTCCCTTGCAATCTAGAAAGTTAA
CGTTAAACTCTGGCCTGTCATTGCTTTGTTCTATTTTGAGAACAGGAAGAAGTGCAGGT
ATGGTCTGATAATAAGGCCCTTATTGTGTGTGTTTCTTGGTTTCTATTATTAATATGTTAT

10

20

30

40

50

【化 7 - 4】

GAAAATCTTTCCATTACATCAACTATTAATCTACAAAATCGGTTTGATAGCGGCATTGC
TCTCCATTTAATGAATACACTATATTTATTTCTGGTGTAAGTCATTTTGTTTTATAATC
ACATCTTTAAAGTAGCTACTCACAGGCTATGCAGATGACTCAGCTGTAAAGGGCCCTTT
CTGCTCTTCTAGAGGCCCTAGGTTCAATTCCCAGCCCACAGGGCAGCTCATAACCCACCT
GTGACTCCAGTTCCGAGGGATCCAATGCCCTCTTCTGACCTCTGCAGCTTCAGATGGCA
AACATACTTAAGGGATTAGTTAAACAACCTTTTTTTTTTCGAATTGGCAAGGATCATAT
GATTTTGTAATGGCGCCGGAACCAATGAAATGCTAGCTTAGTGTGGTTAATGATCTAC
CGGTATTGGTTAGAGAAGTATATTATCGCGAGTTTCTCTGCACACAGACCACCTTTTCCT
GTCCAGATCTGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAA (配列番号 8)

10

【0209】

pMSCV-F-del Casp9. IRES. GFPから使用される配列は、以下
である：

【化 8 - 1】

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCA
AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAG
TTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGT
GATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACT
GACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCAC
ATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGA
GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGG
CTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTC
TGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC
GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAA
GAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGC
TGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGC
TGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAAT
GGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTG
GTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTC
CCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC
GACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC
TACTTTCCCAGGTTTGTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA
CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT
AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA
TTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCAGTCGACTATCCGTACGACGTACCAG
ACTACGCACTCGACTAAGAATTCATCGAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCCCTAACGTT
ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCAC

20

30

40

50

【化 8 - 2】

CATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGA
GCATTTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTG
AAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTT
GCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGT
ATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTT
GTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCC
AGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGT
GTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTTCCTT
TGAAAAACACGATAATACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT
GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG
GCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTG
CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCC
AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAGT
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGC
CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGA
TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCC
GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTC
TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGTAGCCGGCTAACGTTAACAACCGGTA
CCTCTAGAACTATAGCTAGCATGCGCAAATTTAAAGCGCTGATATCGATAAAATAAAA
GATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGC
AAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGA
GAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATA
TCTGTGGTAAGCAGTTCTTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGC
GGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGA
CCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGTTTCTCGCTTCTGTT
CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGC
CAGTCCTCCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGAG
TTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTA
CCCGTCAGCGGGGGTCTTTTCATGGGTAAACAGTTTCTTGAAGTTGGAGAACAAACATTCTG
AGGGTAGGAGTCGAATATTAAGTAATCCTGACTCAATTAGCCACTGTTTTGAATCCACA

10

20

30

40

50

【化 8 - 3】

TACTCCAATACTCCGTAAATAGTTCATTATGGACAGCGCAGAAAGAGCTGGGGAGAAT
TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
CCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC
GGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAA
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
GACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCT
GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTATA
GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA
AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTG
TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATC
AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG
TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGC
GAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC
CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCA
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTC
GGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGC
AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCC
GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTG
GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTC
GATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTC

10

20

30

40

50

【化 8 - 4】

TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT
TCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGA
CATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGAT
GACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
CGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTC
GGGGCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCG
GTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCA
TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTTC
CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCANNNNCGCTCTCCCTTATGCGACT
CCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAG
GAATGGTGATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACC
ATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCCAT
CGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGC
CACGATGCGTCCGGCGTAGAGGCGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTG
GTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGC
CATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAA (配列番号 9)

10

20

【0210】

コードされる例示的なアミノ酸配列は、以下である：

iCasp9:

【化 9】

MLEGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIR
GWEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGF
GDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLH
FMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCP
VSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHFGEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQ
EGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQS
LLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSVDYPYDVPDYALD (配列番号 10)

30

40

GFP:

【化 10】

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSSEGEEDATYGLTKLFICTTGKLPVPWPTL
VTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
(配列番号 11)

50

AmpR:

【化 1 1】

MSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAIT
MSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGDHSVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTMPVAMA
TTLRKLLTGELLTLASRQQIDWMEADKVAGPLLRSLPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAA
LGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW

(配列番号 12)

10

L a c Z アルファ :

PFAIQAAQLLGRAIGAGLFAITP (配列番号 1 3)

リンカー :

以下によってコードされる、A l b プロモーターと i C a s p 9 との間のリンカー :

ATTACGCCACC (配列番号 1 4)

i C a s p 9 と I R E S / G F P との間のリンカー :

GA

【 0 2 1 1】

以下の構成要素が、有用な構築物に含められ得る。

M L V - L T R :

CGTCTGTACTAGT (配列番号 1 5)

開始アルファフェトプロテインエンハンサー :

CCGCGGACACTGC (配列番号 1 6)

複合体 3 エンハンサー :

【化 1 2】

GTGTACCTTTATTGACTTTGACATATTTCTGTCCTTTTAAGTTCGGCGGGCAGCTCGGTT
GCTCAATTCGTCTCTGGACTCTTTTACTTTGTTTCCTGTGTGGGGGAAGAAAAAATATTT
TCTCCTCTAAACACCAAAGATCCAAAGATAAAATTCCTTTGATGGAGGGGAAAACAGCC

(配列番号 17)

30

複合体 2 エンハンサー :

【化 1 3】

CACACACGATTAGCATCTTCTGATGGCGGGGTTTCAGTTTACCGGGTCACGCTGCACTG
GGGAAGATTTCGAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAGAACAAAGAATTGGAGCAGCCGGA
AAGTATTTGCTGCGAACTCTGTACTTAGGACTTAGCTTTGAGCAATAGCCCCGAAAGG
TTTTAGCACTGTTTTCGGGTCAGCACACAAACCGTGGTTCAAAGCTCCTCCTTATCTCTT
CCTGC (配列番号 18)

40

複合体 1 エンハンサー :

50

【化 1 4】

ATGTCACCTGACCGACAGTTTGAATAGTCGGGGGTAGAGCCTTTCGTATACTAAAGTC
CAGTTTGTTTAACCATATTGCTTCAGTGGGGTTTCATGGGCTCAGGAAGTAACGAATGA
ACCAGACATAGAGCTATGAAAGGTATGTGGTGCGAGCTCAGCCCTTGCGACAAAGCTT
TGAGCAACAGCCCGCGTGGGCTTAGGGTTGTTTGCAGTTGGTGTTAGAGACCTCACAC
AAAGTCATGTGGCAGATAACCCGGAGGCAAAATTCAAACCCAGTCGCCATATGCTCAT
GTTTAACGGTGACCCTGTGCACCTTTCTGATCACATGCTTTGGAATTGCAAAGAT (配列番号 19)

10

終結アルファフェトプロテインエンハンサー：

TTCTGACCTCTGCAG (配列番号 20)

【0 2 1 2】

A l b 1 2 3 プロモーター：

【化 1 5】

GCTTCAGATGGCAAACATACTTAAGGGATTTAGTTAAACAACCTTTTTTTTTTCGAATTG
GCAAGGATCATATGATTTTGTAATGGCGCCGGAACCAATGAAATGCTAGCTTAGTGTG
GTTAATGATCTACCGGTATTGGTTAGAGAAGTATATTATCGCGAGTTTCTCTGCACACA
GACCACCTTTCCTGTCCA (配列番号 21)

20

HNF1:

GGTTAATGATCTACC (配列番号 22)

T A T A ボックス：

TATATTAT

Icasp9:

30

40

50

【化 1 6】

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCA
AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAG
TTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGT
GATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACT
GACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCAC
ATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGG
AGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTG
GCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTT
CTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTG
CGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCA
AGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTG
CTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGG
CTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAA
TGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGT
GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGT
CCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT
CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACT
CTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCT
TAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTA
ATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCAGTCGACTATCCGTACGACGTACCA
GACTACGCACTCGACTAA (配列番号 23)

10

20

30

IRES:

【化 1 7】

ATTCATCGAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTG
GAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGC
AATGTGAGGGCCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTC
CCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTG
GAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCC
CACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAA
GGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGG
CTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTA
TGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAA
AACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATA
CC (配列番号 24)

40

GFP:

50

【化 1 8】

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTG
GCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC
GCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
GGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG
CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGC
CCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC
TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA (配列番号 25)

10

ポリ A :

20

【化 1 9】

TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGTAGCCGGCTAACGTTAACAACCGGTA
CCTCTAGAACTATAGCTAGCATGCGCAAATTTAAAGCGCTGATATCGATAAAATAAAA
GATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGC
AAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGA
GAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATA
TCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGC
GGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGA
CCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGT
TCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCG
CCAGTCCTCCG (配列番号 26)

30

L a c O :

AATTGTTATCCGCTCACAATTCC (配列番号 27)

C o l E 1 開始点 :

40

50

【化 2 0】

GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC
 GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC
 CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTG
 TCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
 CAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGC
 CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
 GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT
 TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGA
 TCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA
 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
 TCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA (配列番号 28)

10

AmpR:

【化 2 1】

CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAG
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
 ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
 CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
 GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT
 TCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAA
 AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTG
 TTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG
 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
 GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
 TTAAAAGTGCTCAT (配列番号 29)

20

30

L a c Z アルファ:

CCATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC
 TATTACGCCA (配列番号 30)

40

M 1 3 - フォワード:

TGTAAAACGACGGCCAGT (配列番号 31)。

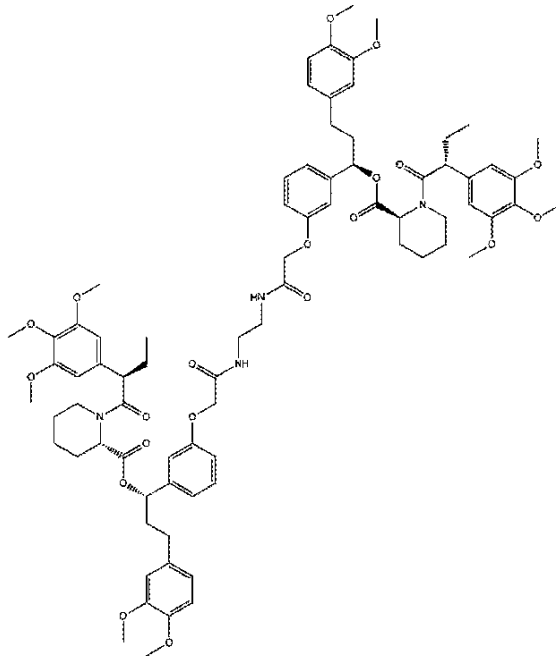
【0 2 1 3】

F K B P 1 2 および C a s p 9 を含む融合タンパク質に作動可能に連結されたアルブミ
 ンプロモーターを有する導入遺伝子は、本明細書中で「A L B - i C a s p 9」と称され
 る。理論に拘束されるものではないが、アルブミンプロモーターは、肝臓細胞においての
 み発現を提供する。F K B P 1 2 構成要素は、条件的な二量体化を提供し、詳細には、二
 量体化の小分子化学誘導物質 (small molecule chemical induce)、すなわち A P 1 9
 0 3 または A P 2 0 1 8 7 でトランスジェニック動物を処置した際に条件的な二量体化を
 提供する。A P 1 9 0 3 の化学式は、C 7 8 H 9 8 N 4 O 2 0 である。A P 2 0 1 8 7 の

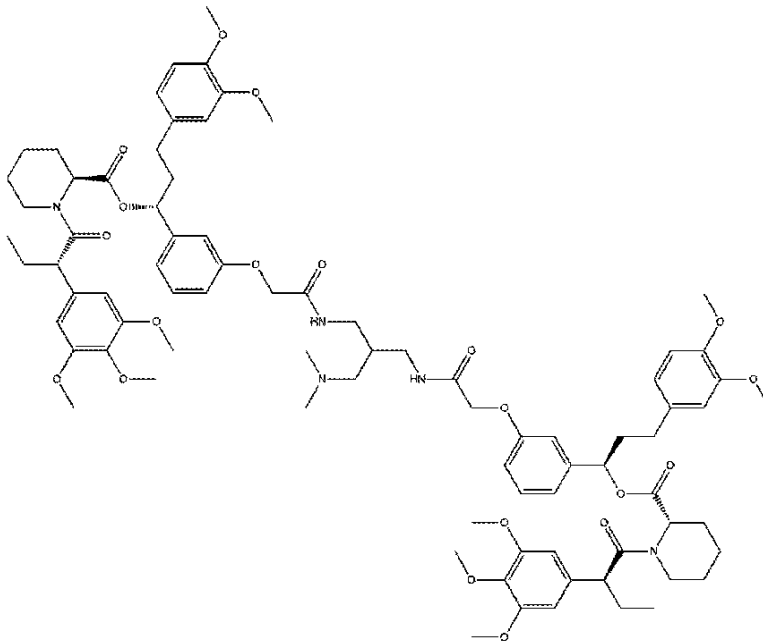
50

化学式は、 $C_{82}H_{107}N_5O_{20}$ である。これらの分子を下記に示す。

【化 2 2】



AP1903



AP20187

【0 2 1 4】

したがって、いくつかの実施形態において、ALB-iCasp9を含む導入遺伝子を含むラットが、本開示の方法において使用される。そのラットは、例えば、 $Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}$ ラットであり得る。いくつかの実施形態において、そのラットは、細胞質内のカスパーゼ-3を活性化して、レシピエントラットの肝細胞においてアポトーシスを直接引き起こす、有効量の二量体化の化学誘導物質（AP1903および／またはAP20187）で処置される。二量体化の化学誘導物質（AP1903）は、いくつかの経路（腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下および経口）によって投与され得る。用量は、ラット

肝細胞の成長を阻害し得る、例えば、約 0.01 ~ 約 10 mg / kg (例えば、約 0.1 ~ 約 10 mg / kg または約 1 ~ 約 10 mg / kg) であり得る。これらの化合物の投与および効果は、例えば、PCT 公開番号 WO 2011 / 146862 (参照により本明細書中に援用される) に開示されている。

【0215】

図 13B および図 21 は、例示的な有用な構築物を示している。例示的な完全な核酸配列を下記に提供する：

【化 23-1】

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGC
ATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGA
CAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCAT
CAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTA
ACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAA
GAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTA
CCCGTATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGACTCGCTGATCCT
TGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCCACCTCGGGGGTCTTTCATTTGGAGGTT
CCACCGAGATTTGGAGACCCCTGCCTAGGGACCACCGACCCCCCGCCGGGAGGTAAG
CTGGCCAGCGGTTCGTTTCGTGTCTGTCTCTGTCTTTGTGCGTGTTCGTGCCGGCATCTAA
TGTTTGCGCCTGCGTCTGTACTAGTCCGCGGACACTGCTGTAACCTCTCCTTGACCTATA
TCGATGTTCTAGTGTACCTTTATTGACTTTGACATATTTCTGTCCTTTTAAAGTTCGGCGG
GCAGCTCGGTTGCTCAATTCGTCTCTGGACTCTTTTACTTTGTTTCCTGTGTGGGGGAAG
AAAAAATATTTTCTCCTCTAAACACCAAAGATCCAAAGATAAAATTCCTTTGATGGAG
GGAAAACAGCCCCCCTTCCCCATTTTGATTTCTTTTCGAGCGAAACATGTTTACAGCCA
ACGGGGAGGGTAAAGGATTCCCCCCCCCGCCAGATAGGCTCGAATTAAACAAAGGA
GGGAGAGTTGACAGAAACCAACCAAGGGGAGGATTATGGTGACGTCTGGGGCTAGAT
GTGAAGAGATCAAGGAAGAAACCAGCAGAGAAGACATTGGTCAGGCTTGTATGAGC
AGTGTGATGGTGCCTATACATTTTCATGCTGGGCAGAAACATCTTTCCACATTTGACCT
CCAGTTCCTTGATGTAATCATATGTTTGGGGTTCCTTGAGAAAGTGTGGGGAGAGTCTT

10

20

30

40

50

【化 2 3 - 2】

CATATATTAGCTCAAGGAACATGTATAGAATAGGTAGAGAGAATTTAGCAGCATTAGG
GAAACAGACAAAAGAAAACGTCAGGCCAAACTGTGGGCTGCCCTCTCAATCCTTGAGTTC
CCAGTAATTTAGAGACTATAACAGTCACGAGATCGTTTCTTGCTCACAGATAACAAGA
GCAGGGGGTAAGTGTAACAAAATCTTCAGAGTAAGGAGGGCCATAGTGGTCTAAAAC
ACTCCTTATAGTTGGAGTGCGTCGCTTTGCAGGGTTCATTTGAAAATCTGAAGGTTTCC
TTGCGAGACGCTAGATTCCATACCATTCTCACATATGCTTTTGTGCCTGTGGAGTTTCA
GACCTAGATAAGAGAATGATTGAATATTTCACTAACGTTCTGTTACCAGAAGAGCGTG
AGAGGCGTGTGATTCAATTTGTGGGCGTAAATCGCTGACTACCATTGATTGATGACAT
TTGATTTCTGTTTGTAAAGATGATGCTGTGTTTCGGATGTTGTGCTAAGCACCATGGTA
AATGCAAGAAGTTAATCATCTGGGAAAGGGCCAGATTGCCTCCCAGAAGACTGGGACT
TAAGGGCACACATGAAGTTCCTGAGAAGTCAATCTAGAGAGTGTTAGAAGTTGTCAG
AGAGGGACCTTCTCTAGTGAGTGCTAAACACCCACAGACAATTATATGATCGATGCCT
TGAGAACTGGTGGTAAGTTATTATAAGCATTGAAGGGCAAGGCACTAGAAATGTAAG
AACTATGCTTTCATGGAACACACACACAGACACACACACAGATACCCACATGCACACA
CACACACATGCACACGCACACAGACACACACATACACACAGACATACATACACACAC
AGCACATACACACATACATACATGCACACACAGAGAGCAAGCACACACAGAGAGAGT
CATAACACACACACACAAAACACACAAAACACACAAAACACACAAGCAGACACAAAACAG
ACACAGCAAAAAGGATCCTGAAGGAGTGAAAGTCATTTTCTGCCAACTCACATGTGCA
GTCTAACTGTGCATTCTAGAAGTGCCAGTCCTAAGAATGGTGATATTTACTCACACCTT
TTTAGAAATATTTGTAGCTGTCCAGCATTTAGGACACACCACTCCGCCTCCACACATGA
AAGTATACTTTCAGAGAAGTATTATTTTGTGAGATGAATCATAAGACTCAGAATCAGT
CATGTTAAATTATTCACCGAATGTCATAGGACTGATAACTGGCACACACACGATTAGC
ATCTTCTGATGGCGGGGTTTCAGTTTACCGGGTCACGCTGCACTGGGGAAGATTCGAGG
ATTTATGGAAAAAGTCAACAGAACAAAGAATTGGAGCAGCCGGAAGTATTTGCTGCG
AACTCTGTACTTAGGACTTAGCTTTGAGCAATAGCCCCGAAAGGTTTTAGCACTGTTTG
CGGTCAGCACACAAACCGTGGTTCAAAGCTCCTCCTTATCTCTTCTGCGGCATTTGCC
GTCTCTGGTTCTGCACACGGTTTCTCACCCGCTCCACACACCTACACTAAGCCCTGTA
AGCTGGAGCTATTCCAGTATCCATCCCCTCTGTGTGATTCTGGAGATAGGAAGCAATA
CACCAGTGCCTGTCAACTTCTTCGATCTGCAATCAGGGTGTTTGGCCCACAACATTCC
TGGGAGTAAAAAGCAAGCTTGGATTACATTAACCTCACCACATACTAAACCAGAACCAG
TAGGGTAAACCAATCTCTGTCTCTGTCTCTGTCTCTCTCCCTCACTCCCTCTTGCTTT
CTCTCTAGGAGTCAGTATGTGTGAACCTTAGCTTTTAAAGCATTTTTTTCTTTAATTTTAC
TTCATCCACATTACGAAATTTTATGTGGATTTCTCACTTCCTGTCAGCGATGCCTTCACC
CACGTGGCTTTGTTAGATTACACATTGCAGTAGTTTAATTGGTCTCATCTCTTTTGACA

10

20

30

40

50

【化 2 3 - 3】

GCAGCAGAGACATTTTCAAAGGACAGAGATGATTTTTTTTTTTTACCAGCTCCTCTTTG
AGGTCCTTCATGAAGCGGGAACACGAGGTCCTTAAGAGACAGCCTGTGCCAGCCTCAT
CAAAAACACTGCCCCCATTAGGTTGCCAGTAGGTAAAGCCCTTAGCATCATAGTCTTA
GCCACCTGAGTTCCATCTCTGGAGCTCTCAGAAGAGCGGAGAGAGAGATCAGACTCTA
CAGGGTTGCCTCTGACTGCCACTGAGGGTCTGCCAACTTTTTGTGTCATGGGGAGTTGA
ACCCAGAGCCTCACACAACTCGGCGAGCCACGATCCGCTGAGTCCTGCCATTTCTGA
ACACTGTGTCTCACATATTGCCTTTCTTCTCATTCCCTGAACACGCTGTTCTCTCCATTA
ATGGGTCTCTCGCTGTCTTTTACAATTCCTCGAGGTAAAAGGCAAGCCTTGCTATTCCG
CCTACCTACCAACTTTTCTTTGGGTCTCTTGGAATGTGACTTCCTCTAAAAATACCTC
ACCGGTAGAAAGACACTAGGAGCTGTTTTCTTCCACATAGCAGGACATCCATCAGAG
AACTTGATACAGTGGATGCAGTCATTTTCCACCAGATGAGATGTGGTCTCAGTCAGT
AATGCTGACACTCATTGCTGACACTTCCCTTCAGTGAACAACATCTCATATGCGGACTT
CACACTTTTTGTGTAATGAATCATGGAACCCCAACTGTTGAGTTCTACTTGGTGCGG
CCCTATTCTGAGTGACCTCTTACTAGTTTATCTAACCCTCGTTTATTAAAAAGGATATT
AATTTTCGTAACATAATTTTTATATGTTGGGAGTAAAACCATTTTGAGTGTTTTGTTCA
ATGTCACCTGACCGACAGTTTGAATAGTCGGGGGTAGAGCCTTTCGTATACTAAAGTC
CAGTTTGTTTAACCATATTGCTTCAGTGGGGTTTCATGGGCTCAGGAAGTAACGAATGA
ACCAGACATAGAGCTATGAAAGGTATGTGGTGCGAGCTCAGCCCTTGCGACAAAGCTT
TGAGCAACAGCCCGCGTGCGCTTAGGGTTGTTTGCAGTTGGTGTAGAGACCTCACAC
AAAGTCATGTGGCAGATAACCCGGAGGCAAAATTCAAACCCAGTCGCCATATGCTCAT
GTTTAACGGTGACCCTGTGCACCTTTCTGATCACATGCTTTGGAATTGCAAAGATCTCC
CCACAAGGCAGAGTGCAGAGAGAATTAAGGATGACATAACCCTGTGGGCTGGGCTGA
TCTGGGCTGCTCCTCTTGCTTAGGTGTAGAAGCATAGCAGTGAATTGGTGACTGATAT
AACGTGATTTATTATCTATAGTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTATGATCATATTTACACATGATTCATCTAGCCTTTATGAAAGGATGAT
GAAACCAGACATTTAGCCTTGCGGTTACATGCATACTAGCAAGAAACTCGATATAGGA
TCTTTAAAGGTAGGAAGATCTCAGAGTGGTCAAGGAGAGGTGTAGCACACCTGTAATC
CAGGACCCAGGAGATAGGAAAATCAGGAACTCAAAGCCAACTGCTCACAAACCGACC
ATGCAAACGATTGACCAAATAAAATGGAGACTCTTATTTCACTTTAAACCTTTGTCAC
TGGATAAATACATTCAATTATCTACTCAGCAAGTGTGGGTCTGTCTCAACACTTGACG
TGCTATGCATAGTGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACG
AATGAGTAGGGATGAGAGGAGAGGGAGACAGAGACAGAGACAGAGACAGAGACAGAGAC
GAGAGACAGAGACAGAGAGAGACAGAGAGAGACAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAC
AGAGAGGAGAGAGAGGAGAGAGATAGAGAGGACAGAGAAGACAGAGAGAAGAGCA

10

20

30

40

50

[illegible]

40

【化 2 3 - 5】

TACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGT
CCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCT
GGTTGCTTTAATTCCTCCGGAACCTTTTCTTTAAACATCAGTCGACTATCCGTA
CGACGTACCAGACTACGCACTCGACTAAGAATTCATCGAGCGGGATCAATTCCGCCCC
CCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATAT
GTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTG
TCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG
TTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTG
TAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCA
AAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCCGCACAACCCAGTGCCACGTTGTG
AGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGC
TGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC
ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGG
ACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT
ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC
AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG
TACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC
AAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGG
TCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GTAAAGCGGCCGCGACTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGTAGCCGGC
TAACGTTAACAACCGGTACCTCTAGAACTATAGCTAGCATGCGCAAATTTAAAGCGCT
GATATCGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGA
CCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAA
ATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGA
ATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA
ACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGT
TTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATC

10

20

30

40

50

【化 2 3 - 6】

AGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCA
CAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGATAGACTGCGTCGCCCCGGGTACCCGTGT
ATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGG
TCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATGGGTAACAGTTTCTTG
AAGTTGGAGAACAACATTCTGAGGGTAGGAGTCGAATATTAAGTAATCCTGACTCAAT
TAGCCACTGTTTTGAATCCACATACTCCAATACTCCGTAAATAGTTCATTATGGACAGC
GCAGAAAGAGCTGGGGAGAATTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACAT
ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC
ATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGC
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTC
ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGT
TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG
GGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTAT
CCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC
CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTG
ACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA
ATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAG
TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG
CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCT
CCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTAT
GGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGT
GCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC

10

20

30

40

50

【化 2 3 - 7】

AGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCG
TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATG
CGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT
CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAG
CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT
TTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC
GTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC
CCTTTCGTCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGA
TTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAA
ATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGC
CANNNNCGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGA
GGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACA
GTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCC
GAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACC
GCACCTGTGGCGCCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGCGATTAGTCC
AATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCAC
CAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCC
AGAAAA (配列番号 7)

10

20

30

【0 2 1 6】

ヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞の生着および拡大は、驚いたことに、免疫無防備状態のラット（例えば、A L B - i C a s 9 導入遺伝子を含む R a g 2 - / - / I l 2 r g - / - ラット）において非常に効率的である。例えば、1 0 0 万～1 0 0 0 万個、例えば、2 0 0 万、3 0 0 万、4 0 0 万、5 0 0 万、6 0 0 万、7 0 0 万、8 0 0 万または9 0 0 万個のヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞が、ラットに注射され得る。1 0 % 効率と仮定すると、1 0 0 , 0 0 0 ～1 ' 0 0 0 , 0 0 0 個のヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞が、レシピエントラットにおいて生着する。次いで、後の拡大からの平均収量は、約1 億個～約1 0 億個のヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞であり、これは、1 0 0 ～1 0 0 0 倍の細胞数増加に等しい。本開示のラットは、ヒト肝特異化細胞および／またはヒト i H e p および／またはヒ

40

50

ト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞の連続移植にも使用され得る。連続移植は、複数のラットを必要とし得、ヒト肝特異化細胞および／またはヒト i Hep および／またはヒト成熟 i 肝細胞および／またはヒト胎児肝細胞および／またはヒト成体肝細胞のさらなる拡大をもたらし得る。

【0217】

インビボにおいてヒト肝細胞を拡大する方法が本明細書中に開示され、その方法は、単離されたヒト肝細胞を注射などによって免疫無防備状態の非ヒト動物（例えば、免疫無防備状態のラット（であるがこれに限定されない））に移植する工程、およびそのヒト肝細胞を拡大する工程、および拡大されたヒト肝細胞を免疫無防備状態の非ヒト動物から回収する工程を含む。

【0218】

例示的な使用

肝細胞の導入によって患者の肝臓組織を再構成することは、肝臓移植を予想した一時的な処置として、または孤立性代謝欠損（isolated metabolic deficiencies）（Bumgardnerら、Transplantation 65：53-61，1998）を有する患者に対する最終的処置として、急性肝不全を有する患者にとって有望な治療の選択肢である。肝細胞の再構成は、例えば、遺伝子治療のために遺伝的に改変された肝細胞を導入するため、あるいは疾患、物理的損傷もしくは化学的損傷または悪性疾患の結果として失われた肝細胞に取って代わるために、用いられ得る（米国特許第6，995，299号）。例えば、家族性高コレステロール血症に罹患している患者の遺伝子治療においてトランスフェクトされた肝細胞を使用することが報告されている（Grossmanら、Nat. Genet. 6：335，1994）。さらに、拡大されたヒト肝細胞を使用して人工肝臓補助デバイスを占める（populate）ことができる（米国特許第9，485，971号（参照により本明細書中に援用される））を参照のこと）。本開示の方法によって作製される細胞に対する例示的な使用は、例えば、米国特許第9090878号に提供されている。いくつかの例示的な使用を下記に列挙する。

【0219】

本開示の方法は、被験体の肝臓を再構成するための肝細胞を作製することができる。肝細胞の導入（「肝細胞移植」とも称される）によって患者の肝臓組織を再構成することは、肝臓移植を予想した一時的な処置として、または孤立性代謝欠損（Bumgardnerら、Transplantation 65：53-61，1998）もしくは肝硬変を有する患者に対する最終的処置として、急性肝不全を有する患者にとって有望な治療の選択肢である。肝不全は、肝炎などの感染によっても引き起こされ得る。

【0220】

治療的な肝臓再構成を達成する際の主な障壁は、「同種移植片拒絶反応」（宿主の細胞とドナーの細胞が遺伝的かつ表現型的に異なる場合）と称される現象である、宿主による移植肝細胞の免疫拒絶である。同種移植片拒絶反応の予防において、免疫抑制剤は、部分的にしか成功していない（Javreguiら、Cell Transplantation 5：353-367，1996；Makowkaら、Transplantation 42：537-541，1986）。

【0221】

本明細書中で作製されるヒト肝細胞は、被験体のMHCとマッチし得、かつ／または被験体自身の細胞から作製され得るので、それらは、自家性である。いくつかの実施形態において、その肝細胞は、外来性遺伝子を含む。他の実施形態において、その肝細胞は、遺伝的欠損を修正するためにヒト宿主に移植される。例示的な使用を下記に開示する。

【0222】

（1）肝機能不全および／または肝不全の治療：

本明細書中に開示される方法によって作製された細胞を投与することによって、肝臓の欠陥を処置する方法が開示される。これらの細胞は、肝臓の欠陥（例えば、中毒性肝疾患、代謝性肝疾患、急性肝壊死、アセトアミノフェンの作用、ヘモクロマトーシス、ウィル

10

20

30

40

50

ソン病、クリグラー・ナジャー、遺伝性チロシン血症、家族性肝内胆汁分泌停止（*cholestasis*）3型、オルニチントランスカルバミラーゼ（*OTC*）欠乏、および尿素回路障害であるがこれらに限定されない）を有する任意の被験体に投与され得る。本開示の方法によって作製された細胞は、肝炎（例えば、慢性ウイルス性A、B、C型肝炎および急性A、B、C、D、E型肝炎）またはサイトメガロウイルスおよび単純ヘルペスウイルスによる感染症を処置するためにも使用され得る。本開示の方法によって作製された細胞は、トキソプラズマ症、肝脾住血吸虫症によって引き起こされる肝機能不全、梅毒、レプトスピラ症およびアメーバ症に関連する肝機能不全を処置するためにも使用され得る。本開示の方法によって作製された細胞は、代謝疾患（例えば、ヘモクロマトーシス、ジルベール症候群、デュビン・ジョンスン症候群およびローター症候群であるがこれらに限定されない）を処置するためにも使用され得る。本開示の方法によって作製された細胞は、アルコール性肝疾患（例えば、脂肪肝、線維症、硬化症、肝硬変および中毒性肝疾患などの状態であるがこれらに限定されない）を処置するためにも使用され得る。

【0223】

（2）バイオ人工肝臓（BAL）デバイス

末期肝不全を有する患者において、BALデバイスを使用すれば、肝臓移植までの時間を埋めることができる。BALデバイスは、肝臓が行う解毒機能を支援するようにデザインされているので、急性肝不全に関連するCNS合併症のリスクおよび重症度を低下させる。BALデバイスは、3つの患者群：劇症肝不全を有する患者、目前に迫る移植を待っている患者、および肝臓移植を早期に失敗した患者にとって有益であり得る。いくつかの肯定的な結果が、肝不全を有する患者において見られたが、BALデバイスの有用性のさらなる調査は、好適な細胞が不足していることによって妨げられている。現在のところ、腫瘍細胞接種、免疫応答および人獣共通感染症の可能性に関連し得る腫瘍由来細胞株または動物細胞が、使用されている。大量のヒト肝細胞（*hepatocyte*）が利用可能になれば、最適化された（*optimized*）BALデバイスの作製によって、肝臓が自発的に再生するまでまたはドナーの肝臓が入手可能になるまで患者をつなぐことができることになる。

【0224】

（3）薬学的試験

創薬では、1つまたはそれを超える化合物を、肝細胞の機能または表現型を調節する能力についてスクリーニングすることが必要である。したがって、本開示の方法によって作製された細胞は、薬理学的作用物質の効果を判定するためのアッセイにおいて使用され得る。これらのアッセイは、本開示の方法によって作製された細胞に対してインビトロにおいて行われ得るか、または本開示の方法によって作製された肝細胞を移植された動物においてインビボで行われ得る。

【0225】

これらのアッセイでは、タンパク質またはRNAが評価され得る。これは、当該分野で利用可能な周知の技法のいずれか（例えば、FACSおよび他の抗体ベースの検出方法、ならびにPCRおよび他のハイブリダイゼーションベースの検出方法）によって行われ得る。試験される作用物質の1つまたはそれを超える生物学的効果についての生物学的アッセイを行うこともできる。発現／分泌に対するアッセイとしては、ELISA、qRT-PCR、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、ドットブロットおよび免疫組織化学が挙げられるが、これらに限定されない。

【0226】

大規模なコンビナトリアルライブラリーを用いて細胞をスクリーニングすることによって、作用物質を同定することができる。これらの化合物ライブラリーは、有機小分子、アンチセンス核酸、*siRNA*、DNAアプタマー、ペプチド、抗体、非抗体タンパク質、サイトカイン、ケモカインおよび化学誘引物質を含むがこれらに限定されない作用物質のライブラリーであり得る。

【0227】

いくつかの実施形態において、ヒト肝細胞（またはトランスジェニック動物において拡大され、収集されたヒト肝細胞）を移植されたラットなどのトランスジェニック動物を使用することにより、薬物代謝および薬物動態のいくつかのパラメータのうちのいずれか1つが評価される。例えば、薬物代謝、インビボにおける薬物／薬物相互作用、薬物半減期、排泄／排出の経路、尿、便、胆汁、血液または他の体液中の代謝産物、シトクロム p 4 5 0 誘導、腸肝再循環および酵素／トランスポーター誘導を評価する研究が行われ得る。

【0228】

いくつかの実施形態において、ヒト肝細胞（またはトランスジェニック動物において拡大され、収集されたヒト肝細胞）を移植されたトランスジェニックラットなどのトランスジェニック動物を使用することにより、化合物（治療薬または候補作用物質（例えば、小分子または生物製剤）、環境トキシンまたは生物学的トキシンを含む）または遺伝子送達系の毒性および安全性が評価される。例えば、ヒト肝細胞の細胞周期増殖が評価され得る（例えば、化合物への曝露後のがんのリスクを判定するために）。肝細胞に対する毒性も、組織学的検査、アポトーシス指標、肝機能検査などによって評価され得る。肝細胞代謝の解析（例えば、安定な同位体前駆体の感染後の代謝産物の解析）も行われ得る。

【0229】

特定の薬物の有効性も、ヒト肝細胞を移植されたラットなどのトランスジェニック動物において評価され得る。そのような薬物としては、例えば、高脂血症／アテローム性動脈硬化症、肝炎およびマラリアを処置するための薬物が挙げられる。

【0230】

いくつかの実施形態において、ヒト肝細胞（または本開示のトランスジェニックラットにおいて拡大され、収集されたヒト肝細胞）を含む本開示のトランスジェニックラットは、遺伝子治療プロトコルおよびベクターを調べるために使用される。例えば、以下のパラメータが評価され得る：ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含む遺伝子送達ビヒクルの形質導入効率；遺伝的ペイロードの組み込みの頻度および位置（組み込み部位の解析）；遺伝的ペイロードの機能性（遺伝子発現レベル、遺伝子ノックダウン効率）；および遺伝的ペイロードの副作用（インビボのヒト肝細胞における遺伝子発現またはプロテオミクスの解析）。

【0231】

選別された新鮮ヒト肝細胞は、臨床上の自家細胞移植に使用することができる。患者由来の i P S 細胞が、代謝性遺伝的肝疾患（例えば、尿素回路障害、分岐鎖アミノ酸障害、クリグラー・ナジャー症候群、原発性高シュウ酸尿症、家族性高コレステロール血症、ニーマン・ピック c 型、コレステリルエステル貯蔵病、ウィルソン病、新生児ヘモクロマトーシス、チロシン血症、糖原病、アルファ-1-抗トリプシン欠損症（alpha-1-antitrypsin deficiency）、ミトコンドリア欠損症、フェニルケトン尿症であるがこれらに限定されない）を引き起こす単一変異を有する場合、これらの患者由来の i P S - 肝細胞は、遺伝子編集され、門脈経路を用いた患者の肝臓への細胞注入によって直接患者に移植して戻され得る。これらの患者由来の i P S - 肝細胞は、自家移植のための肝臓移植片を生物工学処理するためにも使用され得る。例えば、公開番号：WO 2 0 1 5 1 6 8 2 5 4（参照により本明細書中に援用される）の特許の METHOD OF PREPARING ARTIFICIAL ORGANS, AND RELATED COMPOSITIONS。

【0232】

本開示は、以下の非限定的な実施例によって例証される。

【実施例】

【0233】

実施例 1

例示的な方法

ヒト i P S C を作製するための方法の模式図を図 2 に示す。

A - 単一細胞継代による分化の惹起

・分化を開始する前に、分化している h i P S コロニーをマークし、吸引する。

10

20

30

40

50

- ・ h i P S コロニーが 6 0 % コンフルエンスに達したら、それらを慎重に P B S で洗浄し、A c c u t a s e 処理によって単一細胞として剥離する。
- ・ h i P S 細胞を 3 0 0 G で遠心分離し、m T e S R に再懸濁する。
- ・ 5 0 万 ~ 2 0 0 万個の h i P S 細胞を、G F R でコーティングされた 6 ウェルプレートにプレーティングし、低酸素恒温器において一晚維持する。

【 0 2 3 4 】

B - 胚体内胚葉の分化 (ステージ 1 および 2)

- ・ 細胞が、2 0 ~ 3 0 % のコンフルエンスに達したら (図 3)、R P M I、インスリン補充なしの B 2 7、1 % の非必須アミノ酸、1 0 0 n g / m l アクチビン A、2 0 n g / m l B M P 4 および 1 0 n g / m l F G F 2 を含む限定培地を、その細胞に 2 日間にわたって毎日加え、細胞を通常の O₂ 恒温器に入れる (ステージ 1)。
- ・ R P M I、インスリン補充なしの B 2 7、1 % の非必須アミノ酸、1 0 0 n g / m l アクチビン A を含む限定培地を、その細胞に 2 日間にわたって毎日加え、細胞を通常の O₂ 恒温器に入れる。
- ・ 4 日間の分化の後、細胞のサブセットを胚体内胚葉分化について試験する (ステージ 2)。

- ・ 内胚葉 (E n d o d e r m i c) 細胞を、免疫蛍光法 (赤色) を用いて S O X 1 7 発現について試験する。すべての核を D A P I (青色) で対比染色する (図 4 A)。肝特異化 (ステージ 3) を進めるためには、8 0 % 超の細胞が S O X 1 7 を発現する必要がある。
- ・ 続いて、他の内胚葉細胞を R N A 解析によって検証する。全 R N A を 1 つのウェルから単離する。1 μ g を、ランダムヘキサマーとオリゴ d T プライマーとの混合物を用いて逆転写する。S O X 1 7、O c t 3 / 4 に対する q R T - P C R を行う (図 4 B)。

【 0 2 3 5 】

C - 肝特異化および成熟化の処方の方法

- ・ 初期、中期、後期の胎児肝および成体肝を階層的にクラスター化して、発生中にヒト肝臓から差次的に発現された遺伝子を明らかにした (図 5)。
- ・ この解析によって、肝発生中の栄養および代謝に関連する重要な発生経路が特定された。解糖代謝経路および胆汁酸産生経路が、肝発生に不可欠であることが明らかになった。したがって、本発明者らは、低グルコース培地を用いる本発明者らのステージ 3 の処方 (肝特異化)、ならびに胆汁酸およびコレステロール剤を用いたステージ 4 の処方 (肝成熟化)を開発した。

【 0 2 3 6 】

D - 肝特異化 (ステージ 3)

- ・ 4 5 % D M E M 低グルコース 1 g / l、4 5 % F - 1 2、1 0 % ノックアウト血清、1 % 非必須アミノ酸、0 . 5 % L - グルタミン、1 % 2 0 μ g / m l H G F および 1 % D M S O を含む限定培地を、1 0 日間にわたって 1 日おきに細胞に加える。
- ・ 肝成熟化 (ステージ 4) に進む前に肝特異化について試験する場合、細胞のサブセット。
- ・ 肝細胞を免疫蛍光法によって H N F 4 (緑色)、アルブミン (緑色) および α - フェトプロテインについて試験する。すべての核を D A P I (青色) で対比染色する。8 0 % 超の細胞が、H N F 4 およびアルブミンを発現し、1 0 % 未満の細胞が、α - フェトプロテインを発現する (図 6)。
- ・ 続いて、細胞を R N A 解析によって検証する。全 R N A を 1 つのウェルから単離する。1 μ g を、ランダムヘキサマーとオリゴ d T プライマーとの混合物を用いて逆転写する。h i P S、胚体内胚葉、D u n c a n のプロトコルの i C e l l - H e p (C D I)、胎児肝細胞および成体肝細胞と比較した肝転写因子および肝代謝因子に対する q R T - P C R を行う (図 7)。

【 0 2 3 7 】

以前は、肝細胞を作製するために E S 細胞を使用した (S o t o - G u t i e r r e z A , ら、R e v e r s a l o f m o u s e h e p a t i c f a i l u r e u s i n g a n i m p l a n t e d l i v e r - a s s i s t d e v i c e c o n t a

ining ES cell-derived hepatocytes. Nat Biotechnol. 2006 Nov; 24 (11) : 1412-9およびSoto-Gutierrez A, ら、Differentiation of mouse embryonic stem cells to hepatocyte-like cells by co-culture with human liver nonparenchymal cell lines. Nat Protoc. 2007; 2 (2) : 347-56 (両方が参照により本明細書中に援用される)を参照のこと)。本開示のプロトコルを用いて、得られた肝細胞様細胞においていくつかの肝細胞核因子が高発現であったことが明らかになった。このプロトコルは、SOX17 (胚体内胚葉マーカー)を発現する80~90%の細胞をもたらす2段階の胚体内胚葉誘導、成体型のヒトHNF4α (肝細胞において最も重要な核因子)を発現する90%の細胞をもたらす1段階の肝特異化を含む。さらに、肝臓再生に関連する転写因子が、得られた細胞において、ヒト成体肝細胞とヒト胎児肝細胞との間のレベルで発現された (FOXA2、HNF1α、FOXA1、PPARα、LXR、PXRおよびCARおよびCEBPa)。

【0238】

他のヒトiPS由来肝細胞 (例えば、Duncanプロトコルを用いたもの (Si-Tayeb K, and Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology. 2010 Jan; 51 (1) : 297-305) または商業的に入手可能なヒトiPS由来肝細胞 (Cellular Dynamics International, CDI, a Fujifilm company) は、有意に低いレベルのこれらの肝臓特異的転写因子を示す。したがって、優れた効果が本開示のプロトコルを使用して実証された。

【0239】

E-肝細胞の剥離

- ・細胞をPBSで洗浄し、トリプシン、TrypleまたはAccutase処理のいずれかによって剥離する。
- ・細胞を50Gで2分間遠心分離する。
- ・ペレットにした細胞 (大集団) および上清に含まれる細胞 (小集団) を、別々に1ウェルあたり100万個の細胞で再播種する。ヒトiPS細胞の肝特異化 (ステージ3) の後、得られた細胞を回収し、遠心分離によって重量に基づいて、大集団 (細胞ペレット) および小集団 (上清中の細胞) に分離する。次いで、両集団を肝成熟化 (ステージ4) に供する。
- ・細胞を通常の恒温器に一晩入れる。

【0240】

F-肝成熟化 (ステージ4)

- ・細胞が、30~40%コンフルエンスに達したら、45%DMEM 低グルコース1g/l、45%F-12、10%ノックアウト血清、1%非必須アミノ酸、0.5%L-グルタミン、0.1%ゲンタマイシン/アンホテリシン-B、1%ペニシリン (Penicillin) /ストレプトマイシン、1%50ug/ml HGF、1%DMSO、0.5uMデキサメタゾン、0.1%アスコルビン酸、脂肪酸非含有の0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ヒドロコルチゾン、0.1%トランスフェリン、0.1%インスリン、100uMウルソデオキシコール酸、1xコレステロール、20uMパルミチン酸、30uMオレイン酸、20uMリファンピシンを含む限定培地を、その細胞に4日間にわたって1日おきに加える。
- ・成熟肝細胞を、免疫蛍光法によってHNF4 (緑色)、アルブミン (緑色) およびα-フェトプロテインについて試験する。すべての核をDAPI (青色) で対比染色する。90%超の細胞が、HNF4およびアルブミンを発現し、5%未満の細胞が、α-フェトプロテインを発現する (図8)。

10

20

30

40

50

【0241】

得られた肝臓細胞を、脂肪酸と胆汁酸との組み合わせ、生体異物および成長因子に曝露して、細胞のほぼ100%が、アルファフェトプロテイン（未熟肝マーカー）の検出可能な発現なしにアルブミンを発現し、分泌する表現型をもたらす成熟化工程が、組み入れられた（図8）。

【0242】

・成体肝において最も頻度の高いmiRNAであり、肝臓ホメオスタシスにとって重要な因子である、Mir-122レベルをマイクロRNA qPCRによって確かめる。全マイクロRNAを1つのウェルから単離する。1μgを、ランダムヘキサマーの混合物を用いて逆転写する。mir-122に対するqRT-PCRを行う（図9）。

10

【0243】

G-小集団 対 大集団の特徴づけ

・分化の終わりに（ステージ4）、小集団と大集団の両方の細胞を特徴づける。
・FACS解析を用いて細胞をサイズで選別する。大集団の細胞は、小集団の細胞よりも粒状であることが明らかになった。
・細胞をRNA解析によって解析する。両集団の全RNAを1つのウェルから単離する。1μgを、ランダムヘキサマーとオリゴdTプライマーとの混合物を用いて逆転写する。大集団および小集団における肝転写因子および肝代謝因子に対するqRT-PCRを、成体肝細胞と比較して行う。大集団の細胞は、成体肝細胞により近いプロファイルを有する（図10）。

20

【0244】

肝成熟化後の大集団および小集団からのステージ4のiHepの遺伝子発現解析は、大集団のiHepが、より高いレベルの肝臓特異的核因子（FOXA2、HNF1α、FOXA1、PPARα、LXR、PXRおよびCARおよびCEBPa）ならびに臨床的に関連する肝酵素および膜レセプター（ABCA1、cMET、UGTA1、FAH）を発現することを示す。

【0245】

・代謝活性を評価するために、小集団および大集団の細胞を、MitoTracker Green FMキットによって、およびmtDNA含有量を測定することによって、ミトコンドリア含有量について試験する。大集団の細胞は、より高いmtDNA含有量を有し、成体肝細胞に似ている（図11Aおよび11B）。
・小集団および大集団の細胞を、Enzychrom™ Triglyceride Assay Kitによって脂質含有量について定量する。大集団の細胞は、肝細胞の重要な特徴である細胞内トリグリセリドをより多く有する（図12）。
・ステージ4の大集団の細胞は、再増殖研究に使用される、成熟した定義されたiHepである。

30

【0246】

実施例2

Rag2^{-/-}-Il2rg^{-/-}-ALB-iCasp9ラットの操作

A-iCasp9自殺プラスミドの機能試験および肝臓特異的発現に向けたiCasp9プラスミドのクローニング。

40

ヒトiPS-Hepが再増殖したラット肝臓は、げっ歯類細胞とヒト細胞との両方によって再構成され得るので、そのヒト構成要素を肝臓の100%まで最大にし、肝臓の灌流／単離後にヒト細胞を精製する系は、有益である。自殺システムは、形質導入細胞（transduce cells）においてアポトーシスを効率的に誘導することによって、これらのプロセスを増強するようにデザインされ得る。ヒトカスパーゼ9から操作された自殺遺伝子によってコードされる誘導性カスパーゼ9（iCasp9）を組み入れた。このシステムは、免疫原性（immunogenic）ではなく、細胞周期非依存的様式で形質導入細胞を殺滅し得る。iCasp9は、変異させたFK506結合タンパク質でカスパーゼ動員ドメインを置き換えて条件的二量体化を可能にすることによって操作

50

された融合タンパク質である。したがって、二量体化の化学誘導物質（AP1903）の存在下において、二量体化したiCasp9は、細胞質内のカスパーゼ-3を直接活性化して、形質導入細胞においてアポトーシスを直接引き起こす。したがって、本発明者らは、ラットアルブミンプロモーターをコードすることによって肝臓細胞において特異的に発現され得るiCasp9自殺システムを作製することに決めた（図13を参照のこと）。

【0247】

HEK293細胞を、pMSCV-F-del-iCasp9-IRES-GFP（Addgene）でトランスフェクトする。

【0248】

・トランスフェクション効率を評価するために、細胞を、TagRFPコントロールプラスミド（DNAの総量の1/10）でコトランスフェクトする。

・3日目に、トランスフェクトされた細胞および陰性コントロールをモニターし、カウントし、カスパーゼ3/7アッセイ（Promega；G8091）に向けて播種する（1E04細胞/96ウェル）。トランスフェクションあたり/陰性コントロール細胞を以下のとおり播種した。

【0249】

小分子（二量体化の化学誘導物質）AP1903（ApexBio）の濃度につき、2ウェル。陰性コントロールについて同量。シャトルコントロールの場合も、濃度ごとにウェルに播種する。

【0250】

・4日目に、AP1903による刺激を開始する（0；0，1；1；10nmol/l）。シャトルコントロールは、スタノール（sthanol）のみで処理された細胞を含む。直ちにT=0hを測定し、T=24hを終点として測定する（図13）。

・iCasp9-IRES-GFP構築物を、ラットアルブミンプロモーターpEAlb123とともにクローニングする。

・H4-II-E-C3におけるiCasp9発現（mRNA）を、qRT-PCRによって定量する。細胞をプラスミドpEAlb123-iCasp9-IRES-GFPおよびpcDNA3-CMV-eGFP（陽性コントロール）でトランスフェクトする。

・細胞を回収し、RNAを単離する。iCASP9およびeGFP特異的PCRプライマーを使用して、発現を測定する（図14）。

【0251】

実施例3

Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}（FRG）ラットの操作

SCIDマウスは、生物医学的研究において同種異系組織移植および異種組織移植のための宿主として広く使用されている。しかしながら、実験用ラットは、生理学的研究、薬理学的研究、毒物学的研究および移植研究にとっての理想モデルであり、近年、CRISPR/Cas9システムが、ラットにおける効率的なゲノム操作ツールであることが判明してきた。ゆえに、本発明者らは、この技術を使用して、ダブルノックアウトRag2およびIl2rg（F344-Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} [FRG]）ラットを作製する（図15Aおよび15Bを参照のこと）。

【0252】

・Il2rg遺伝子のエキソン2およびRag2遺伝子のエキソン3を標的とするgRNAのデザインは、gRNA-Il2rg、CCTATAGTGCATAGTGAGGTおよびgRNA-Rag2、TAGCTGGGTAACGAAGAGGTである。

・そのデザインされたgRNAおよびCas9 mRNAを、マイクロマニピュレータ（Narishige, Tokyo Japan）を用いて、受精したF344卵母細胞にマイクロインジェクトする。

・一晚培養した2細胞胚を偽妊娠のWistar雌ラットの卵管に移す。

・8匹の新生仔動物のジェノタイピングから、それらのすべてが、4bp~27bpの欠失および1bpの挿入を含む変異をIl2rg遺伝子の標的化配列に有することが明らか

10

20

30

40

50

になった。

・25匹の新生仔動物のジェノタイピングから、それらのうちの2匹が、18bpの欠失および2bpの挿入を含む変異をRag2遺伝子の標的化配列に有することが明らかになった。

【0253】

実施例4

Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}ラットへの自殺システムALB-iCasp9の組み入れ

レシピエントラットの肝臓をドナーのヒトiPS由来肝細胞に置き換えるために、iCasp9自殺システムを、CRISPR媒介ノックイン法によってSCID (Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}) ラットに組み入れる。

・ラットRosa26遺伝子座の「セーフハーバー (safe harbor)」の組み込み部位を、CRISPR/Cas9システムによってALB-iCasp9プラスミドで標的とする。

・2つのgRNAを構築する：1つは、ラットRosa26遺伝子座を標的化してゲノムDNAを切断し、もう1つは、ALBプロモーター配列の5'を標的化してプラスミドDNAを並行して切断するためのものである。2つの80bp一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) を、それらの2つの切断末端をライゲートするようにデザインする。

・100ng μL^{-1} のCas9 mRNA、50ng μL^{-1} の2つの各gRNA、50ng μL^{-1} の2つの各ssODNおよび5ng μL^{-1} のALB-iCasp9プラスミドの混合物をF344ラット胚にマイクロインジェクトする。

・2細胞胚を偽妊娠のWistarラットに移して、ALB-iCasp9ノックイン (KI) ラットを得る。

・ALB-iCasp9 KIラットをFRG (Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}) ラットと交配させると、自殺システムALB-iCasp9がレシピエントFRGラットの肝臓に組み入れられる。

・二量体化の化学誘導物質 (AP1903) の処理によって、細胞質内のカスパーゼ-3が活性化されて、レシピエントFRGラット肝細胞においてアポトーシスが直接引き起こされる。

・二量体化の化学誘導物質 (AP1903) は、いくつかの経路 (腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下および経口) によって種々の用量 (0.01~10mg/kg) で投与され得る。

【0254】

実施例5

ヒトiPS由来肝細胞を用いたXSCID (Il2rg^{-/-}) ラットの肝臓再増殖

A-肝細胞移植に向けた肝臓のプレコンディショニング

重篤な症例の急性肝不全およびある特定の遺伝性の代謝肝疾患 (例えば、1型チロシン血症、アルファ-1抗トリプシン欠損症) によって引き起こされる傷害は、その移植された正常な肝細胞または補助的な肝臓移植片にとって成長の利点をもたらす、天然の肝臓の再生能を完全に停止し得る。この知識に基づいて、肝細胞移植を用いた肝臓再増殖の動物モデルを作った。同様に、肝細胞移植後の肝臓再増殖のモデルを開発し、それによって、ピロリジジンアルカロイド (レトロルシン) で予め処置された動物の肝臓においてドナー由来細胞の選択的な成長が達成される。レトロルシンは、常在の肝細胞の有糸分裂阻害および老化を引き起こして、そのアルカロイドへの曝露後に移植されたドナー由来細胞の選択的な増殖をもたらす。このモデルでは、単離された肝細胞を2/3部分肝切除術と併せて送達したとき、移植後2~3ヶ月以内にレシピエント肝臓のほぼ完全な置き換えが観察される。ゆえに、この再生-プレコンディショニングレジメンを用いる。

【0255】

・体重が100~140gのラットの腹腔内に、レトロルシン (Sigma) (各30mg/kg) を2週間あけて2回注射する。

・100%エタノール中のレトロルシン原液 (10mg/mL) を希釈する。注射の前に

、原液を、滅菌食塩溶液で希釈して、動物 1 匹あたりの正確な用量に調整する（30 mg / kg）。通常、エタノールの最終濃度は、10%またはそれ未満であるべきである。レトロロシンは、異なる経路（腹腔内、静脈内、皮下および筋肉内）を用いて投与され得る。

・腹腔内注射の場合、針の穿刺点を配置する。

・膝のすぐ上の腹部を横断する仮想の線を引く。針をこの線に沿って、正中線近くかつ動物の右側に挿入する。

・ラットは、通常、レトロロシンの最後の注射の 4 週間後に実験に使用する。

・レトロロシン投与の肝臓プレコンディショニング効果は、肝臓照射によっても代用される。小動物照射研究プラットフォームを用いて 50 Gy の肝臓への選択的に投与。プレコンディショニング照射の 24 時間後に細胞移植を行う。

10

【0256】

B-ヒト i P S 由来肝細胞の移植のためのプロトコル

・2%イソフルランと酸素（1～2リットル／分）との混合物による麻酔誘導のために、ラットをチャンバーに入れる。

・麻酔誘導後、電気バリカンで腹壁を剪毛する。スタイロフォーム（Styrofoam）パッドでできた手術台の上に動物を置き、ゴムバンドおよびプッシュピンを用いて 4 本の脚すべてをその台に固定し、顔面を遠い側の麻酔システムのノズルに向ける。

・開腹術中の麻酔を誘導するために、3～4%の酸素流とともにイソフルラン吸入を開始する。

・腹壁を消毒剤（ベタジンの後、70%エタノール）で消毒する。過剰な消毒剤を滅菌ガーゼで拭き取って、内臓がこれらの消毒剤に曝露されるのを回避する。

20

・剣状突起から恥骨まで、腹部の皮膚および筋肉を長い正中線で切開する。鉗子を用いて下部腹壁を両側性に引っ込めること（retracting）によって、腹腔を露出させる。プッシュピンまたは 18 G の針を用いて鉗子をその台の適切な位置に固定して、十分な露出を行い、よく見えるようにする。

・腹部切開を行った後、麻酔維持のためにイソフルラン流量を 1～2%に低下させる。

・開腹術後、食塩溶液で湿らせた滅菌ガーゼを小腸の下に置く。湿らせた綿棒を用いて、その滅菌ガーゼの上に小腸をねじらずにやさしく整列させる。湿らせたガーゼで小腸を包み、小腸を腹腔の左側に位置させて、腹部大動脈を露出させる。

・2/3 肝切除術に向けて、鉗子を用いて 2-0 絹縫合糸を左側葉の基部（肝門の近く）に置く。縫合糸の右端を鉗子で保持しつつ、綿棒の先端（cotton tip）を用いて、左側葉を元の位置まで回転させて、縫合糸がその左側葉を一回りするようにする。次いで、左側葉上部にわたって縫合糸の 2 端を結んで、できるだけ左側葉の基部の近くに結び目を配置させる。結ばれた側葉を縫合糸のすぐ上で切断する。

30

・中葉を特定し、縫合糸を断端（stump）と中葉との間に置く。中葉を縫合糸の上に引き下ろす。結び目の線に従って、縫合糸の 2 端を結ぶ。結ばれた中葉を縫合糸の上で切断すると、結び目の上に虚血性の基部およびなおも灌流されている中葉の小部分が下にできる。

・2/3 肝切除術の後、300～500 マイクロリットルの DMEM 培養培地に懸濁された 500 万個の細胞を脾臓内に（intrasplically）注射する。

・次いで、腹部に温かい食塩水を灌注し、4-0 Vicryl で筋肉および皮膚を 2 層に閉じる。失われた血液を補うために、さらなる食塩水を投与し得る。すべての手技を、滅菌実験室フード内において滅菌された状態で行う。

40

【0257】

C-ヒト i P S 由来肝細胞を用いた肝臓再増殖の経時的な特徴づけ

免疫欠損マウスを機能的に再増殖させることができることは、肝臓再増殖ができない肝細胞様ファクシミリ（facsimile）と対比して真の肝細胞を作製したことに対するベンチマークになった。興味深いことに、他のプロトコルを用いたときは、幹細胞由来のヒト肝細胞様細胞の生着は、限定的でしかなかったことが報告されている。結局、自己の肝臓細胞の臨床移植には、多数の肝臓細胞を作製する必要がある。したがって、肝臓再増殖に使用され、十分な数の高度に機能的な i P S C-Hep を作製するための、肝臓再

50

増殖用の動物モデルを確立するために、500万個のiPSC-Hepまたはヒト胎児から単離された肝細胞（胎児Hep）をXSCIDラットの脾臓に移植した。移植の前に、レシピエント動物をレトロルシン（特異的に肝細胞の細胞周期を阻害する薬物）で前処置し、移植時に70%部分肝切除術を行うことにより、下記の肝臓プレコンディショニングについての項に示されるような、移植された細胞にとって選択的成長の利点がある環境を作った。

【0258】

- ・コントロール群として、ヒト胎児肝細胞を移植に使用した。
- ・ヒト胎児肝細胞を、20～23週の妊娠期間において妊娠を終結させた後に得られた胎児肝臓から単離した。
- ・初代ヒト胎児肝細胞を、0.5mg/mlのコラゲナーゼ（タイプXI、Sigma-Aldrich, Saint-Louis MO, Cat. #C7657）を含むEMEM（Lonza, Walkersville, MD）中においてラボシェーカー上で40分間、組織を消化することによって単離した。
- ・生存率をトリパンプルー排除試験によって評価したところ、常に>85%であった。
- ・単離手順後に、下記に示されるような移植に向けて胎児肝細胞を調製した。
- ・ヒトiPS-肝細胞（本明細書中に開示される方法を用いて調製される）を、本明細書中に開示されるように分化させる。
- ・ヒトiPS-肝細胞（Duncanプロトコル）を以下の刊行物（Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology. 2010 Jan; 51(1): 297-305（参照により本明細書中に援用される））に示されているように分化させる。
- ・ヒトCDI（Fujifilm）iPS-肝細胞をCDI（<https://cellulardynamics.com>）から購入した。
- ・すべての実験群の移植されたXSCIDラットからの肝臓を、肝細胞移植の30日後および60日後に回収した。その肝臓組織を4%PFAで固定し、パラフィンに包埋する。30日に、肝臓の各葉の組織切片を、ヒト特異的アルブミン（Bethyl）（図16）、ならびにヒト特異的ミトコンドリア（millipore）およびCYP3A4（Abcam）（図16）に対する免疫組織化学検査に供した。
- ・さらに、ヒト細胞の存在を判定するために、30日にラット肝臓のホモジネートを調製し、ゲノムDNAを抽出した。ヒトHNF4遺伝子を、taqmanプライマー（Thermo Fisher, RPLP0_CCKAK1K, Cat# 4400294およびHs07218401_cn HNF4 copy Cat# 4400291、両方の種の検出用）を用いるDNA PCRによって定量した（図17）。
- ・他のヒトiPS-肝細胞の再増殖能および他の標準的なプロトコルを比較するために、商業的に入手可能なヒトiPS-肝細胞（Cellular Dynamics International, CDI, a Fujifilm company）を、レトロルシンで処置され、肝切除されたXSCIDラットに移植した。また、iPS-肝細胞を、文献に以前に報告されたDuncanプロトコル（Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology. 2010 Jan; 51(1): 297-305（参照により本明細書中に援用される））を用いて分化させた。

【0259】

移植の60日後に、処置された肝臓を回収し、ラット肝臓内のヒト肝細胞の存在につい

10

20

30

40

50

て解析した。商業的に入手可能なヒトiPS-肝細胞（Cellular Dynamics International, CDI, a Fujifilm company）およびDuncanプロトコルを用いて作製されたヒトiPS-肝細胞は、門脈の周囲に細胞が生着しているだけで、再増殖の証拠はない。対照的に、本開示の方法によって作製されたヒトiPS-肝細胞（「Alexプロトコル」とも呼ばれる）は、ラット肝臓で再増殖しているヒト肝細胞の大きなコロニーの存在を示す（図18）。

【0260】

下記の表に、試験した構成要素を列挙する。

【表3】

ステージ	条件	試薬	用量の範囲	時間の範囲
1	O2 21%, 37C 毎日培地を 交換	アクチビンA	50～200ng/mL	2～3日間
		FGF2	10～50ng/mL	
		BMP4	20～100ng/mL	
2	O2 21%, 37C 毎日培地を 交換	アクチビンA	50～200ng/mL	2～3日間
3	O2 21%, 37C 1日おきに 培地を交換	L-Glu	0.5～2%	8～14日間
		DMSO	1～3%	
		HGF	20～150ug/mL	
		低グルコース培養培地	0.2～2 g/L	
4	O2 21%, 37C 1日おきに 培地を交換	L-Glu	0.5～2%	4～6日間
		DMSO	1～3%	
		HGF	20～150ug/mL	
		デキサメタゾン	0.5～2mM	
		ウルソデオキシコール酸	50～150mM	
		コレステロール	0.5～1x	
		パルミチン酸	10～50uM	
		オレイン酸	10～50uM	
		リファンピシン	10～50uM	
5	滅菌条件	移植時間	N/A	ヒトiPS由来Hepはステージ3の終わりおよび/またはステージ4の終わりに移植され得る
		再増殖時間	N/A	3日間～24ヶ月間
		移植細胞数	0.5～10×10 ⁶	最後のレトロルシン前処置の4週間後
		レトロルシン前処置	5～50mg/kg	2～6週間
		肝切除パーセンテージ	0～90 %	
		小分子 (AP1903)	0.01～10mg/kg	3～12ヶ月間にわたって毎週

【0261】

実施例6

CRISPR/Cas9技術とともにhiPS-Tet-On-Cas9を用いた、機能的なゲノム編集およびスクリーニングに向けたラットにおけるヒト肝臓の作製

A-hiPS-Tet-On-Cas9の作製

- ・hiPS-Tet-On-Cas9を、米国特許仮出願番号62/369,698（参照により本明細書中に援用される）に開示されている方法を用いて操作した。
- ・Cas9効率について試験するために、ドキシサイクリンを0,5 μg/mlの最終濃度まで加え、細胞を48時間培養した。
- ・GFPレポータータンパク質の存在を蛍光顕微鏡法によってモニターした（図19A）。
- ・全RNAを各ウェルから単離し、1 μgを、ランダムヘキサマーとオリゴdTプライマーとの混合物を用いて逆転写した。各Cas9/GFPシステムの発現を、非誘導細胞および参照遺伝子に関連する標的cDNA発現レベルの定量によって決定した（図19B）。

10

【0262】

B-hiPS-Tet-On-Cas9ゲノム編集（edition）およびスクリーニングのインビボアッセイ

ウイルスによるsgRNAの作製

- ・単一sgRNA（Addgene）のプールされたプラスミドライブラリーを、レンチウイルスパッケージングプラスミド（Addgene）を用いてHEK-293T細胞にトランスフェクトした。
- ・トランスフェクションの後、培養培地を回収し、ベクター原液を濃縮した。

20

単一のまたはプールされた（pooled）sgRNAによるhiHeps-Tet-On-Cas9形質導入

- ・hiPS-Tet-On-Cas9細胞を、「1-hiPS細胞から肝細胞への分化（1-Differentiation of hiPS cells into hepatocytes）」において開発された方法を用いてiHepに分化させた。
- ・形質導入の2日前に、ドキシサイクリンをhiHeps-Tet-On-Cas9細胞の培地に加えた。
- ・次いで、hiHeps-Tet-On-Cas9細胞にsgRNAレンチウイルスを形質導入した。翌日、確かに形質導入された細胞を、抗生物質選択によって選択する。

【0263】

30

インビボスクリーニング

- ・確かに形質導入されたhiHeps-Tet-On-Cas9細胞は、本開示の方法（「細胞治療用の患者特異的iPS由来肝細胞の作製」を参照のこと）を用いて、免疫不全のラット肝臓（IL2rg^{-/-}またはRag2^{-/-}、IL2rg^{-/-}、ALB-iCasp9モデル）を再増殖できる。
- ・機能的アッセイ評価は、スクリーニング検査の特色（例えば、増殖；腫瘍形成；冬眠に対する細胞応答など）に依存する。
- ・インビボスクリーニングは、レーザーキャプチャーによる解剖および次世代シーケンシングによるさらなる解析を含む。

【0264】

40

C-hiPS-Tet-On-shRNA技術を用いた遺伝子機能のための、ラットにおけるヒト肝臓の作製

1. 遺伝子ノックダウンシステム

- ・hiPS-Tet-On-shMIR-SIRT1を操作した（米国特許仮出願番号62/369,698（参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。
- ・SIRT1のノックダウン効率について試験するために、ドキシサイクリンを0,5 μg/mlの最終濃度まで加え、細胞を48時間培養した。
- ・全RNAを各ウェルから単離し、1 μgを、ランダムヘキサマーとオリゴdTプライマーとの混合物を用いて逆転写した。各SIRT1の発現を、非誘導細胞および参照遺伝子に関連する標的cDNA発現レベルの定量によって決定した（図20A）。

50

・タンパク質を抽出し、SIRT1発現について解析した(図20B)。

【0265】

2. hiPS-Tet-On-shRNA-SIRT1を用いた、ラットにおけるヒト肝臓の作製

・hiPS-Tet-On-shRNA-SIRT1細胞は、「1-hiPS細胞から肝細胞への分化」において開発された方法を用いてiHepに分化することができ、開発された方法(「細胞治療用の患者特異的iPS由来肝細胞の作製」を参照のこと)によって、免疫不全のラット肝臓(I l 2 r g^{-/-}またはR a g 2^{-/-}、I l 2 r g^{-/-}、A L B-i C a s p 9モデル)を再増殖できる。

・完全な再増殖の後、ドキシサイクリン(スクロース水中、2mg/mL)を加えることによって、SIRT1に対する特異的かつ条件的なノックダウンを有するヒト化ラット肝臓モデルが提供される。

【0266】

実施例7

細胞治療用の患者特異的iPS由来肝細胞の作製

iPSC細胞は、未分化状態でインビトロにおいて無限に維持され得るが、実質的に任意の細胞型に分化することができる。体細胞を用いて、目的の1つまたはそれを超える遺伝子のノックインおよび/またはノックアウトが非常に効率的である人工多能性幹細胞を調製する方法が、本明細書中に提供される。

【0267】

A-移植に向けたラットにおけるヒトiPS由来肝細胞の大量作製

・Yamankaプロトコル(例えば、米国特許出願公開番号20090246875、米国特許出願公開番号2010/0210014;米国特許出願公開番号20120276636;米国特許第8,058,065号;米国特許第8,129,187号;米国特許第8,278,620号;PCT公開番号WO2007/069666A1および米国特許第8,268,620号(参照により本明細書中に援用される))を参照のこと)を用いて、iPS細胞を患者の血液または皮膚生検材料から誘導する。一般に、核リプログラミング因子を用いることにより、体細胞から多能性幹細胞が作製される。いくつかの実施形態において、Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、NanogおよびLin28のうちの少なくとも3つまたは少なくとも4つが使用される。他の実施形態では、Oct3/4、Sox2、c-MycおよびKlf4が使用される。

・iPS細胞は、本明細書中に記載されるような肝細胞に分化でき、完全に機能的で完全に成熟した自己の肝細胞を作製するために、免疫無防備状態の動物(例えば、肝臓をプレコンディショニングしたRag2^{-/-}I l 2 r g^{-/-}ALB-i C a s p 9またはXSCIDラット)に移植される。

・これらの患者由来のiPS-肝細胞は、臨床上の自家細胞移植に使用することができる。患者由来のiPS細胞が、代謝性遺伝的肝疾患(例えば、尿素回路障害、分岐鎖アミノ酸障害、クリグラー・ナジャー症候群、原発性高シュウ酸尿症、家族性高コレステロール血症、ニーマン・ピックc型、コレステリルエステル貯蔵病、ウィルソン病、新生児ヘモクロマトーシス、チロシン血症、糖原病(glycogenstorage disease)、アルファ-1-抗トリプシン欠損症、ミトコンドリア欠損症、フェニルケトン尿症であるがこれらに限定されない)を引き起こす単一変異を有する場合。これらの患者由来のiPS-肝細胞は、遺伝子編集され、門脈経路を用いた患者の肝臓への細胞注入によって直接患者に移植して戻され得る。

・これらの患者由来のiPS-肝細胞は、自家移植のための肝臓移植片を生物学処理する(bioengineering)ために使用され得る。例えば、METHOD OF PREPARING ARTIFICIAL ORGANS, AND RELATED COMPOSITIONSというタイトルのPCT公開番号WO2015/168254(参照により本明細書中に援用される)を参照のこと。

・ヒト初代肝細胞およびiPSC-Hep-ラット肝臓のロバストな拡大

有効な再生刺激を送達し得るラットモデルにおいて増殖する、本開示の動物モデルが作製したヒトiPSC-Hepを評価した。ヒト初代成体肝細胞またはヒト初代胎児肝細胞（試験された5人より多い異なるヒト成体細胞ドナーまたはヒト胎児細胞ドナー）または本開示のプロトコルを用いて作製されたヒトiPSC-Hep（試験された3つより多い異なるヒトiPS細胞株）（図24A）を移植した90日後に、ラット肝臓のほぼ70～80%が再増殖できることが明らかになった。移植の90日後に、動物を殺し、肝臓組織を4%PFAで固定し、パラフィンに包埋した。肝臓の各葉の組織切片を、ヒト特異的アルブミンに対する免疫組織化学検査に供した。アルブミン陽性細胞の定量を、ImageJソフトウェアを用いて×20倍率で、動物1匹あたり10枚の画像におけるおよそ500～800個の肝細胞をカウントすることによって行った。さらに、血液サンプルをラットの外側尾静脈から移植後毎月採取して、血清を抽出した。血清ヒトアルファ-1-抗トリプシンを、ヒトアルファ-1-抗トリプシンELISAキット（Bethyl Laboratories）を用いて調べ、ヒト血清と比較した。ヒトiPSC-Hepを用いたときの再生の程度は、単離されたばかりのヒト成体肝細胞およびヒト胎児肝細胞のそれに匹敵した（図24A）。これらの実験から、ラット肝臓が、初代ヒト成体肝細胞、初代（primatery）胎児肝細胞またはヒトiPSC-Hepを大量に再増殖できることが実証される。したがって、得られたヒト肝細胞を、種々の目的のために富化し、使用することができる。

【0268】

実施例8

トランスジェニックラット作製用のプラスミド

pEALB123-iCasp9-IRES-GFPプラスミドを、プラスミドpMSCV-F-delCasp9.IRES.GFPz9（Straathofら、Blood 2005, 105:4247-54（参照により本明細書中に援用される））（Addgene Plasmid #15567）からのFKBP12（V36）-p30Caspase9配列とともに、プラスミドpEALB123CAT（Wen and Locker, Blood 2005, 105:4247-54（参照により本明細書中に援用される））からアルブミン/αフェトプロテインのラットプロモーター/エンハンサー配列をクローニングすることによって構築した。このプラスミドにおいて使用されるラットアルブミンプロモーターは、ラット肝細胞だけで発現されることから、ラット肝細胞だけが、FKBP12（V36）-p30Caspase9配列を発現できることが保証される。この改変されたカスパーゼ9システムを、改変されたFK結合タンパク質に融合することにより、条件的二量体化が可能になる。小分子（二量体化の化学誘導物質、例えば、AP1903またはAP20187）を加えると、そのシステムは二量体化し、カスパーゼ9が活性化して、改変されたカスパーゼ9を発現している細胞のアポトーシスを急速にもたらす。図13A～Bおよび図21を参照のこと。

【0269】

実施例9

再生している肝臓におけるヒトiPSC-Hepの肝成熟化

分化したヒトiPSCが初代肝細胞として機能する能力を決定するために、成熟ヒト特異的シトクロムP450 3A4（CYP3A4）の発現を、培養細胞の免疫蛍光法によって調べた。本明細書中に開示される方法を用いて作製されたヒトiPSC-Hepは、単離されたばかりの正常なヒト成体肝細胞と比べて、成熟CYP3A4を発現しなかった。さらに、培養中にヒトアルファ-1-抗トリプシン（A1AT）および尿素を産生する能力を調べた（図22A）。ヒトアルファ-1-抗トリプシンELISAキット（Bethyl Laboratories）およびABNOVATM尿素アッセイキット（ABNOVATM Corporation KA1652（ThermoFisher））を製造者の指示に従って用いて、コントロールと比較して、培養培地を試験した。ヒトiPSC-Hepは、単離されたばかりの初代ヒト肝細胞と比べて、30%のA1ATおよび20%の尿素を産生した（図22A）。再増殖された免疫抑制ラットにおける細胞移植後の

CYP3A4の発現を免疫蛍光法によって調べたところ、CYP3A4の発現が30日(d)に見られることが見出された。これらの結果は、ヒトiPSC-Hepは、インサイチュにおいて成熟する能力を有すること、およびゆえにインビボバイオリクターへの移植後に成体の肝機能を示し得ることを示した。

【0270】

実施例10

ヒトiPSC-Hepはインビトロにおいて増殖する

HiPSC-Hepの増殖能をBrdUの組み入れによって評価した。プロモデオキシウリジン(BrdU)(Invitrogen)を10 μ L/mLの濃度で培地に12時間(h)投与した。DAPIで対比染色したBrdUの免疫蛍光法によって、増殖を解析した。3つの異なる区域、およびBrdU免疫蛍光法で陽性の1区域あたり少なくとも100個の核を定量した。正常な胎児肝臓細胞は、成長し続け、ラット肝臓に実験的に注入されると、再生刺激(または肝実質の喪失)に応答して選択的に増殖できる(Dabevaら、Am J Pathol 2000;156:2017-31)。およそ30%のヒトiPSC-Hepおよび10%の単離されたばかりのヒト胎児Hepが、BrdU陽性だった(図23A)。これらのデータは、ヒトiPSC-Hepが、活発な細胞周期を有し、肝臓分化後にインビトロにおいて増殖することを示す。

【0271】

実施例11

ヒト肝臓細胞の高富化

ヒト細胞を単離し、ラット細胞の存在を排除するために、25%ヒト肝臓細胞および75%ラット肝臓細胞を含む細胞懸濁物を調製した。ヒト/ラット細胞懸濁物を、ラットMHCクラス1(RT1A)で免疫磁気標識し、磁気活性化細胞選別(MACS)によって選別した。抗体濃度を最適化するためにいくつかのプロトコルを試験し、インキュベーション時間を試験した。種々の濃度の抗フィコエリトリン(PE)超高純度マイクロビーズおよびMACSカラムタイプを用いて、A~F群を試験した。細胞画分をフローサイトメトリーによってヒト白血球抗原(HLA-1 ABC)および(RT1A)の発現について解析した(A~F群、図26B)。高純度の単離が達成された。

【0272】

A-肝臓の単離(図25)

・ヒト化肝臓ラット由来の初代肝細胞を、イソフルラン麻酔下での肝臓灌流によって単離した。簡潔には、まず肝臓に、下大静脈(IVC)を通してEGTAを灌流した後、L-緩衝液、最後にLIBERASE™(Roche Applied Science, Branford, CT)を10~15分間灌流した。

・細胞培養フード内で、細胞細胞スクレーパー(cell a cell scraper)を用いて、振盪しながら細胞を優しく分散させた。

・単離後、細胞をPBE緩衝液(ヒト肝細胞培地+0.5%BSA+0.2mMEDTA)中に収集し、遠心分離し、洗浄し、血球計を用いてカウントした。

【0273】

B-MACS(登録商標)セパレータ技術によるヒト細胞の選別

・細胞を、1:100~1:5希釈された抗ラット抗体(すなわち、PE標識された、抗RT1Aまたは任意のラット特異的マーカー)とともに、1mL/10 $\times$ 10⁶個の細胞の濃度において4℃で30分間インキュベートした。

・細胞を、5 $\times$ 10⁶個の細胞に対して1mLのPBE緩衝液(ヒト肝細胞培地+0.5%BSA+0.2mMEDTA)で洗浄し、50Gで5分間遠心分離した。

【0274】

細胞を、1:10~1:2.5希釈された抗PEマイクロビーズ(MACS Miltenyi Biotec, Auburn, CA)とともに、1mL/100 $\times$ 10⁶個の細胞の濃度において4℃で14分間インキュベートした。

【0275】

10

20

30

40

50

細胞を、 5×10^6 個の細胞に対して 1 mL の PBE 緩衝液（ヒト肝細胞培地 + 0.5 % BSA + 0.2 mM EDTA）で洗浄し、50 G で 5 分間遠心分離した。

【0276】

細胞を PBE 緩衝液に再懸濁し、CS カラム（MACS Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を製造者の指示に従って使用する MACS セパレータの磁場によって選別した。

【0277】

細胞の純度を、ヒト（HLA-1）およびラット（RT1A）膜マーカーに対するフローサイトメトリ解析によって評価した。様々な RT1A 抗体濃度および 2 つの異なる磁気カラムを用いて、種々のプロトコルを試験した（A～F 群）（図 26B）。最善のプロトコルは、ヒト肝臓細胞をおよそ 99.9 % に富化したことから（図 26B）、細胞懸濁物からラット細胞が完全に枯渇したことが示された。このプロトコルは、1 回の選別につき最大 10 億個の肝臓細胞（ラット全肝臓からの細胞懸濁物を選別するための十分な能力）を、ヒト細胞をほぼ完全に富化できた状態で選別するために使用することができる。これらの結果は、表面マーカー RT1A に基づく磁気細胞選別が、ヒト集団を富化するために有効であることを示している。これらの研究は、磁気ベースの選別を用いてヒト細胞を高度に富化できることを実証している。

【0278】

開示された発明の原理が適用され得る多くの可能性のある実施形態を考慮すると、例証された実施形態は、本発明の単なる好ましい例であって、本発明の範囲を限定すると見なされるべきでないことが認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の請求項によって定義される。ゆえに、本発明者らは、これらの請求項の範囲および趣旨の中に入るすべてを本発明者らの発明として主張する。

10

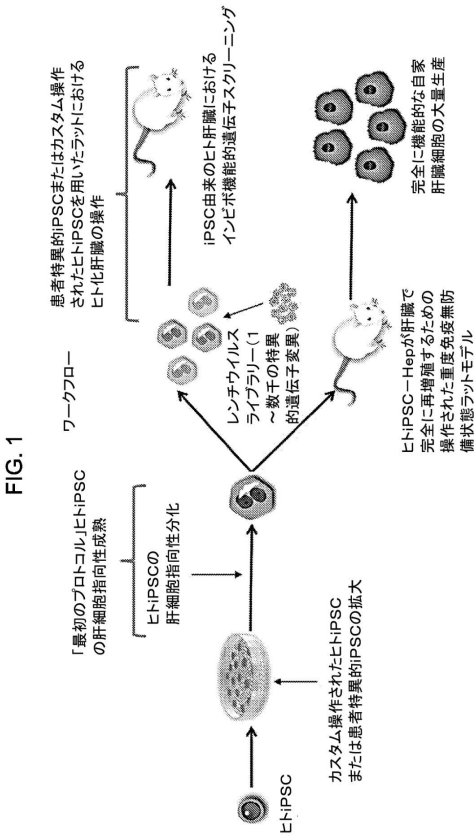
20

30

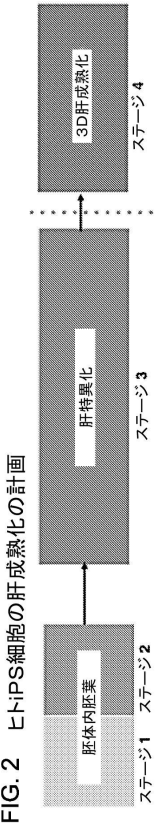
40

50

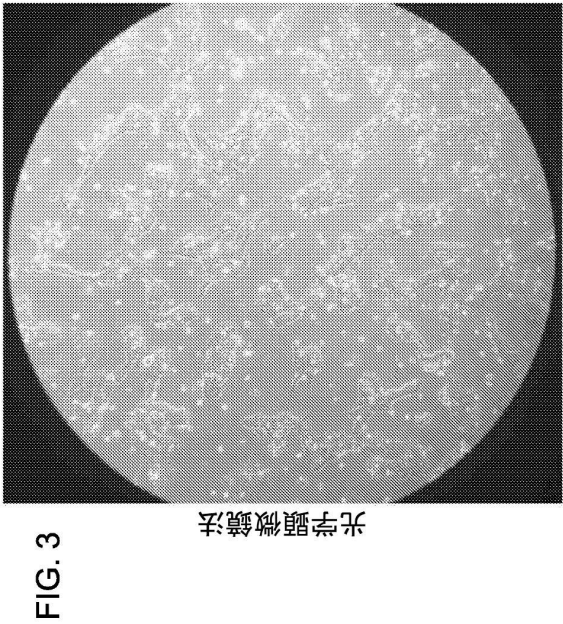
【図面】
【図 1】



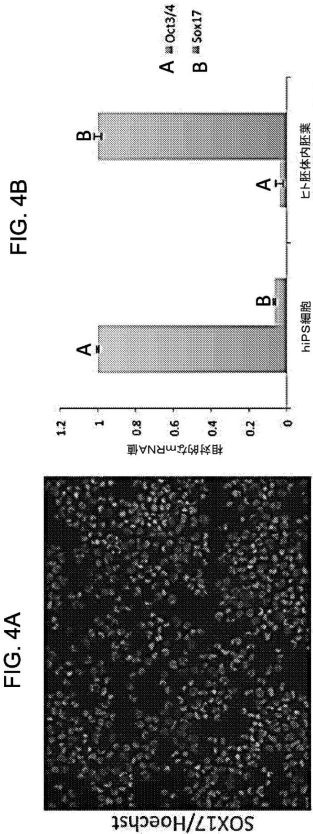
【図 2】



【図 3】



【図 4 A - 4 B】



10

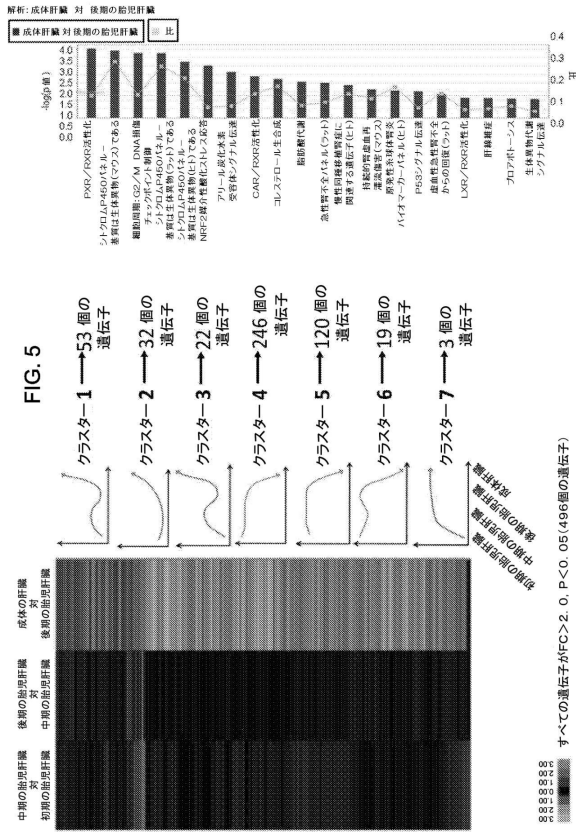
20

30

40

50

【図 5】



【図 6】

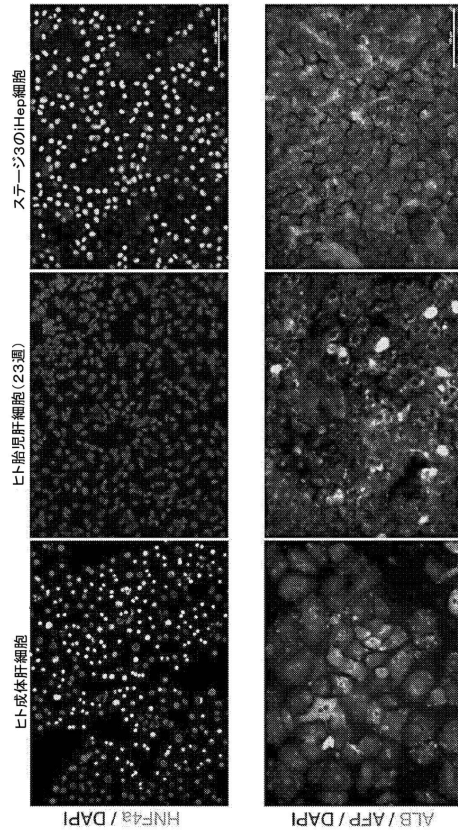
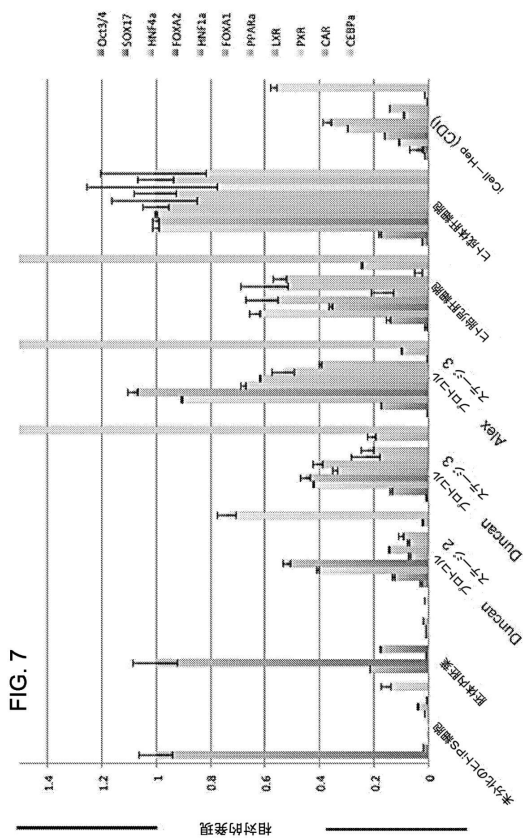


FIG. 6
ヒトIPS細胞の肝特異化(ステージ3)

10

20

【圖 7】



【図 8】

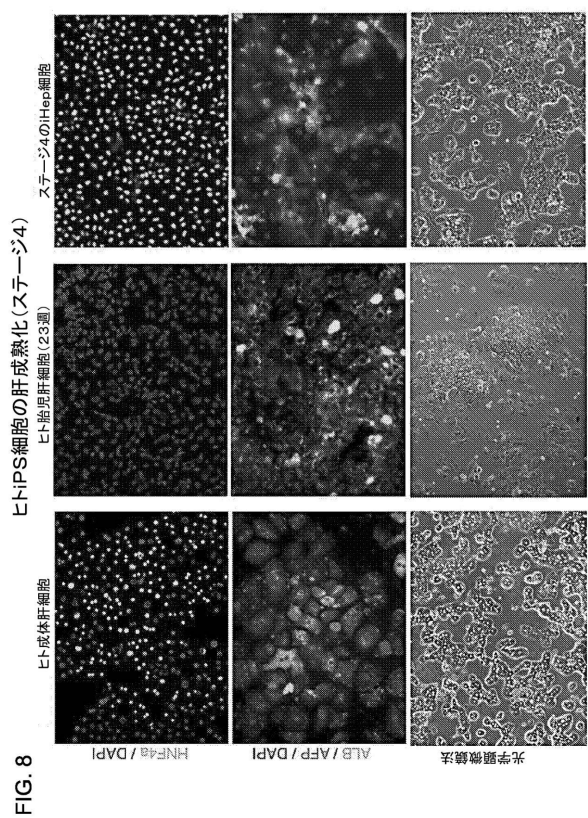
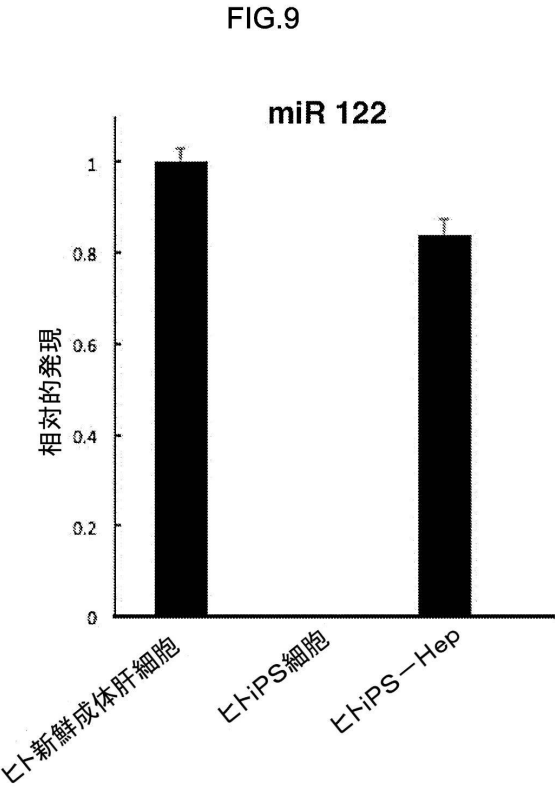


FIG. 8
ヒトPS細胞の肝成熟化(ステージ4)

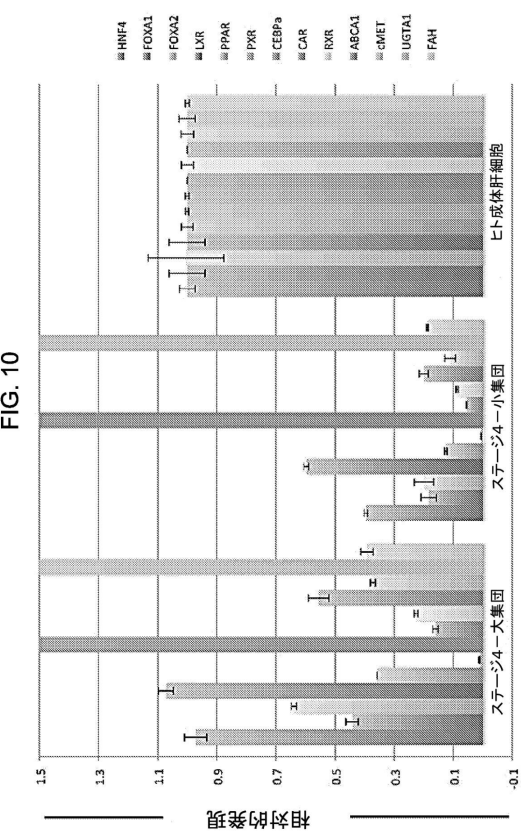
30

40

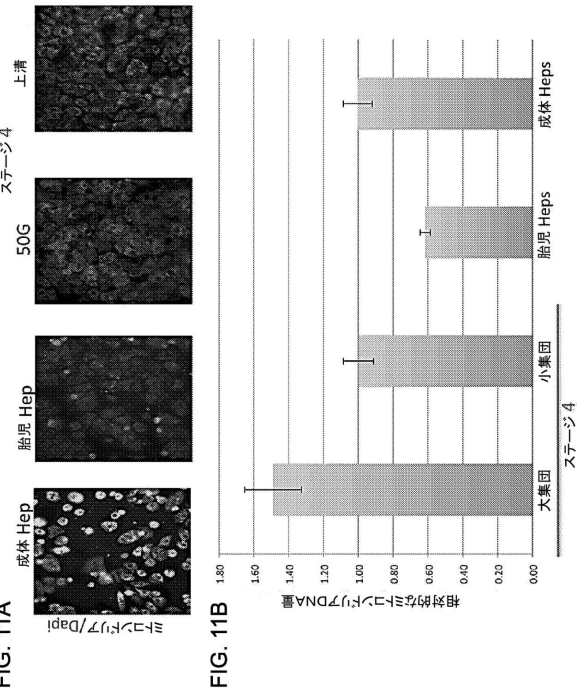
【図 9】



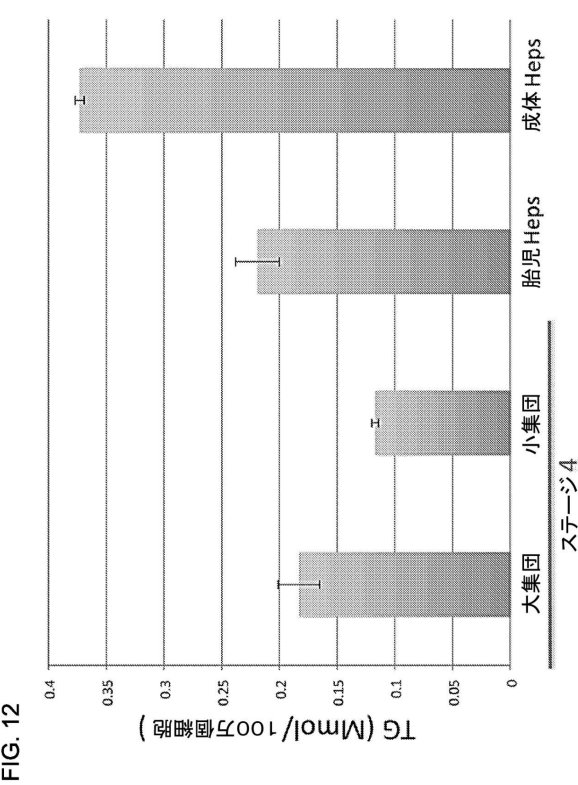
【図 10】



【図 11 A - 11 B】



【図 12】



10

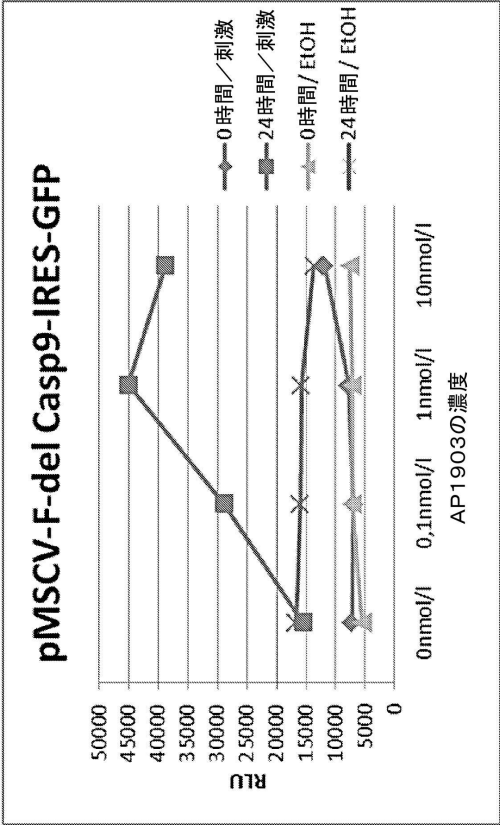
20

30

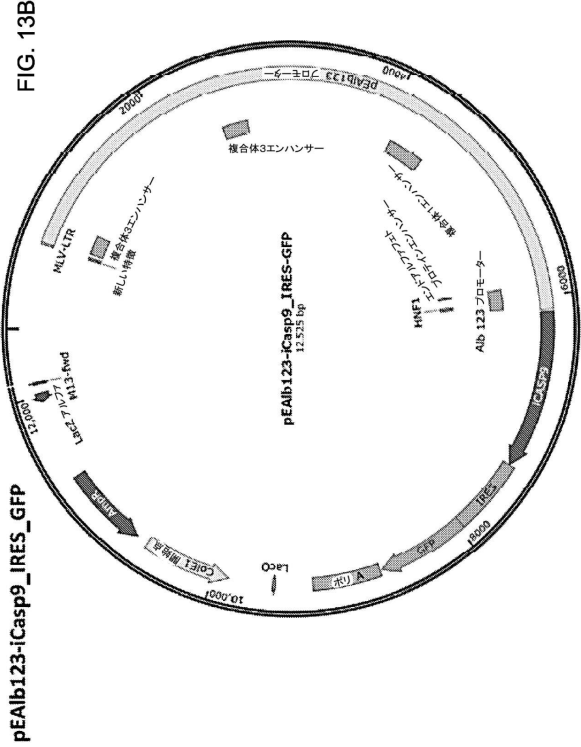
40

50

【図 13 A】



【図 13 B】



【図 14】

FIG. 14

ウイルス	標的	Cp 種別		Cp 参照 (トポインマレーゼ I(TOPI))	
		MW	Stdev	MW	Stdev
pEAb123-iCasp9_IRES_GFP	Casp9	22.49	0.03	21.51	0.02
pCDNA3-CMV-eGFP		no product	0.00	21.59	0.04
pEAb123-iCasp9_IRES_GFP	eGFP	22.33	0.00	21.51	0.02
pCDNA3-CMV-eGFP		18.24	0.01	21.59	0.04

【図 15 A】

FIG. 15A

		PAM	gRNA-112rg
F344	wt		AGCCGACCAACCTCACTATGCACTATAGGTATGAG
No.1	-4		AGCCGACCAACC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.2	-27		AGCA-- (Δ27bp) --CTATGCACTATAGGTATGAG
	-5		AGCCGACCAAC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.3	+1		AGCCGACCAACCTTCACTATGCACTATAGGTATGAG
	-4		AGCCGACCAACC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.4	+1		AGCCGACCAACCTTCACTATGCACTATAGGTATGAG
	-4		AGCCGACCAACC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.5	-5		AGCCGACCAAC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.6	-5		AGCCGACCAAC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.7	-5		AGCCGACCAAC-----TATGCACTATAGGTATGAG
No.8	-9		AGCCGAC-----TATGCACTATAGGTATGAG

10

20

30

40

50

【図 2 3 A - 2 3 B】

FIG. 23B

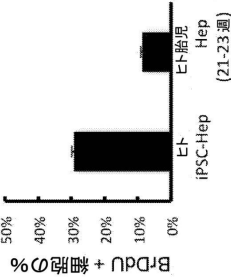
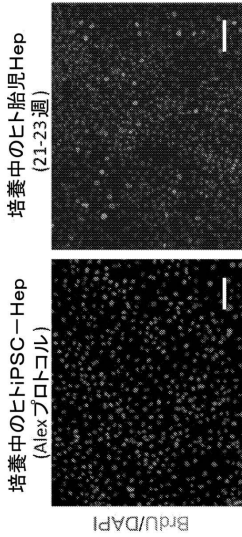


FIG. 23A



【図 2 5 A - 2 5 B】

FIG. 25B

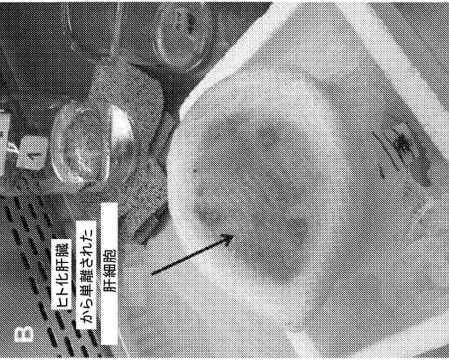
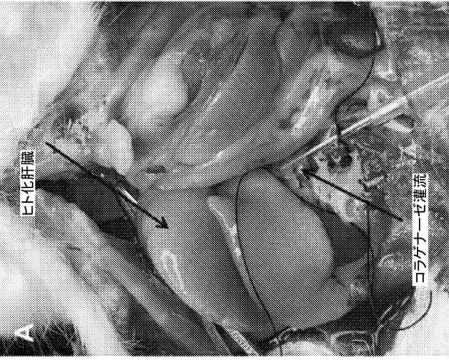
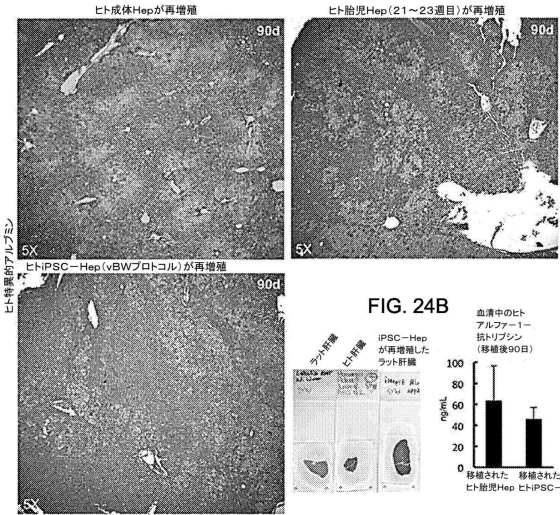


FIG. 25A



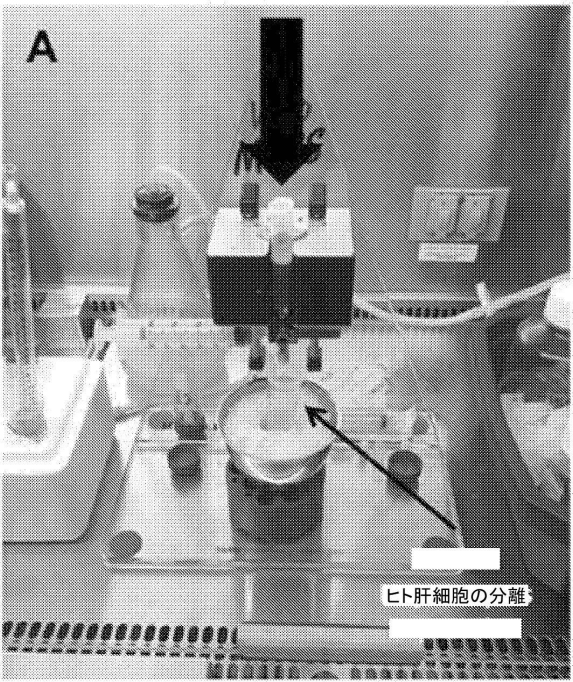
【図 2 4 A - 2 4 B】

FIG. 24A



【図 2 6 A】

FIG. 26A



10

20

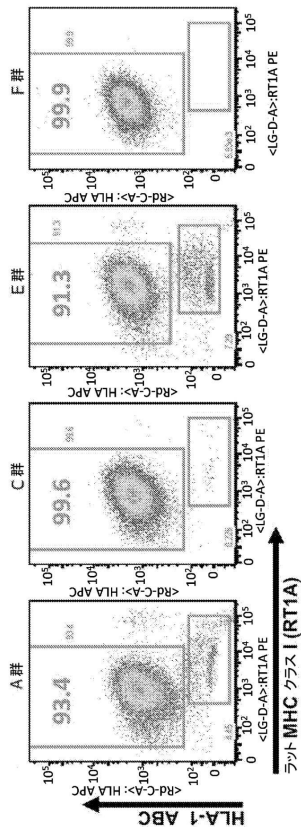
30

40

50

【図 26 B】

FIG. 26B



【配列表】

0007203427000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ソトーグティエレス, アレハンドロ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15221, ピッツバーグ, サウス ブラドック 569, ア
partment 2
- (72)発明者 真下 知士
大阪府吹田市山田丘2-2
- (72)発明者 コラン ドゥ ロルテ, アレキサンドラ シルヴィ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15232, ピッツバーグ, メープル ハイツ コート 1057
- (72)発明者 アルバレス, エドゥアルド セルバンテス
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15206, ピッツバーグ, エヌ セント クレア ストリート
716
- (72)発明者 レベ, ホルヘ グズマン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15206, ピッツバーグ, エス エイキン アベニュー 23
3, アpartment 2
- (72)発明者 半田 寛
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15206, ピッツバーグ, シェイディ アベニュー 401,
アpartment シー-402
- (72)発明者 タケイシ, カズキ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15206, ピッツバーグ, シェイディ アベニュー 401,
アpartment シー-303
- (72)発明者 ワン, ヤン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15213, ピッツバーグ, ナイアガラ スクエア 3235
- (72)発明者 ポポビッチ, ブラニミル
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15206, ピッツバーグ, エス エイキン アベニュー 23
3, アpartment 2
- 審査官 山本 匡子
- (56)参考文献 特表2013-535980 (JP, A)
特表2011-519580 (JP, A)
特開2007-228962 (JP, A)
中国特許出願公開第106119284 (CN, A)
特表2016-515401 (JP, A)
特開2016-198110 (JP, A)
特表2014-525248 (JP, A)
国際公開第2011/146862 (WO, A1)
特表2016-521709 (JP, A)
特表2015-523063 (JP, A)
特表2016-540497 (JP, A)
American Journal of Pathology, 1998年07月, 153(1), pp.319-329
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 1/00-5/28
C12Q 1/00-3/00
G01N
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/CAPLUS/REGISTRY (ST
N)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)