

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年2月18日(2016.2.18)

【公開番号】特開2014-128210(P2014-128210A)

【公開日】平成26年7月10日(2014.7.10)

【年通号数】公開・登録公報2014-037

【出願番号】特願2012-286978(P2012-286978)

【国際特許分類】

C 12 N 5/071 (2010.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 5/00 202 A

C 12 N 5/00 102

C 12 Q 1/68 Z N A A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月25日(2015.12.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells:以下、iPS細胞と略称する)から分化誘導した肝細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群から、肝細胞からなる細胞培養物を分別して得る方法であって、該細胞群を、血清または血清代替物質を含む下記表1または表2の組成の培地で培養する工程を含む方法。

【表1】

表1

L15-ES培地 (1L)	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1M 溶液	1.258 ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.203
MgSO <sub>4</sub> (anhyd)	0.098 g
KCl 1M 溶液	5.3655 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06
NaCl 5M 溶液	27.29 ml (7.915g)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.14014 g
アミノ酸	
L-アラニン	0.225 g
L-アルギニン, HCl	0
L-アスパラギン, H <sub>2</sub> O	0.25 g
L-システイン	0.12 g
L-シスチン, 2HCl	0 g
L-グルタミン	0.3 g
グリシン	0.2 g
L-ヒスチジン, HCl, H <sub>2</sub> O	0.25 g
L-イソロイシン	0.25 g
L-ロイシン	0.125 g
L-リジン, HCl	0.075 g
L-メチオニン	0.075 g
L-フェニルアラニン	0.125 g
L-セリン	0.2
L-スレオニン	0.3 g
L-トリプトファン	0.02 g
L-チロシン, 2Na, H <sub>2</sub> O	0 g
L-バリン	0.1 g
L-オルニチン, HCl	0.169 g
Gibco MEM ビタミン (100倍希釈) 10 ml	
ビタミン類	
塩化ナトリウム	0.085 g
塩化コリン	0.001 g
葉酸	0.001 g
myo-イノシトール	0.001 g
ナイアシンアミド	0.001 g
D-パントテン酸, 1/2Ca	0.001 g
ピリドキサール, HCl	0.001 g
リボフラビン	0.0001 g
チアミン, HCl	0.001 g
その他	
D(+)ガラクトース	0.9 g
D-グルコース	0 g
フェノールレッド, Na	0.01 g
グリセロール(比重1.26g/ml)	0.365 ml
ピルビン酸ナトリウム	0 ml
プロリン	0.03 g
7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液	36.6 ml
インスリン (10 <sup>-5</sup> M 溶液)	100 $\mu$ l
デキサメサゾン (10 <sup>-5</sup> M 溶液)	100 $\mu$ l
アプロチニン (50000U/ml 溶液)	1000 $\mu$ l
メルカプトエタノール (10 <sup>-4</sup> M 溶液)	1000 $\mu$ l
非必須アミノ酸	0 ml

## 【表2】

表2

L15-ES培地 (1L)	無機塩類	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1M 溶液	1.258 ml
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.203
	MgSO <sub>4</sub> (anhyd)	0.098 g
	KCl 1M 溶液	5.3655 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06
	NaCl 5M 溶液	27.29 ml (7.915g)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.14014 g
<b>アミノ酸</b>		
	L-アラニン	0.225 g
	L-アルギニン, HCl	0
	L-アスパラギン, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-システイン	0.12 g
	L-シスチン, 2HCl	0 g
	L-グルタミン	0.3 g
	グリシン	0.2 g
	L-ヒスチジン, HCl, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-イソロイシン	0.25 g
	L-ロイシン	0.125 g
	L-リジン, HCl	0.075 g
	L-メチオニン	0.075 g
	L-フェニルアラニン	0.125 g
	L-セリン	0.2
	L-スレオニン	0.3 g
	L-トリプトファン	0.02 g
	L-チロシン, 2Na, H <sub>2</sub> O	0 g
	L-バリン	0.1 g
	L-オルニチン, HCl	0.169 g
<b>Gibco MEM ビタミン (100倍希釈)</b>		
10 ml	ビタミン類	
	塩化ナトリウム	0.085 g
	塩化コリン	0.001 g
	葉酸	0.001 g
	myo-イノシトール	0.001 g
	ナイアシンアミド	0.001 g
	D-パントテン酸, 1/2Ca	0.001 g
	ピリドキサール, HCl	0.001 g
	リボフラビン	0.0001 g
	チアミン, HCl	0.001 g
<b>その他</b>		
	D(+)ガラクトース	0.9 g
	D-グルコース	0 g
	フェノールレッド, Na	0.01 g
	グリセロール(比重1.26g/ml)	0.365 ml
	ピルビン酸ナトリウム	0 ml
	プロリン	0.03 g
	7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液	36.6 ml
	メルカプトエタノール (10 <sup>-4</sup> M 溶液)	1000 μl
	非必須アミノ酸	0 ml

## 【請求項2】

血清または血清代替物質がノックアウト<sup>商標</sup>セラムリプレースメント (knockout<sup>TM</sup> serum replacement; 以下、KSRと略称する) である請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

KSRが、最終濃度10% (V/V) となるように添加されたKSRである請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

培養する工程が、少なくとも3日間培養する工程である請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項5】

iPS細胞から分化誘導した肝細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群が、iPS細胞から分

化誘導した肝前駆細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群である請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

iPS細胞から分化誘導した肝細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群が、ヒトiPS細胞に転写因子FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBP の各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチンM、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリンおよびトランスフェリンを含む培地中で分化誘導を行うことにより得られたヒト肝前駆細胞とヒトiPS細胞とを含む細胞群である請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: 以下、iPS細胞と略称する) から分化誘導した肝細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群から、肝細胞からなる細胞培養物を分別して得る方法であって、iPS細胞から分化誘導した肝細胞と未分化のiPS細胞とを含む細胞群が、ヒトiPS細胞に転写因子FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBP の各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチンM、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリンおよびトランスフェリンを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後8日目に得られたヒト肝前駆細胞と、ヒトiPS細胞とを含む細胞群を、最終濃度10% (V/V) となるように添加されたノックアウト商標セラム リプレースメントを含む下記表1または表2の組成の培地で少なくとも3日間培養する工程を含む方法。

【表3】

表1

L15-ES培地 (1L)	無機塩類	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1M 溶液	1.258 ml
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.203
	MgSO <sub>4</sub> (anhyd)	0.098 g
	KCl 1M 溶液	5.3655 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06
	NaCl 5M 溶液	27.29 ml (7.915g)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.14014 g
	アミノ酸	
	L-アラニン	0.225 g
	L-アルギニン, HCl	0
	L-アスパラギン, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-システイン	0.12 g
	L-シスチン, 2HCl	0 g
	L-グルタミン	0.3 g
	グリシン	0.2 g
	L-ヒスチジン, HCl, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-イソロイシン	0.25 g
	L-ロイシン	0.125 g
	L-リジン, HCl	0.075 g
	L-メチオニン	0.075 g
	L-フェニルアラニン	0.125 g
	L-セリン	0.2
	L-スレオニン	0.3 g
	L-トリプトファン	0.02 g
	L-チロシン, 2Na, H <sub>2</sub> O	0 g
	L-バリン	0.1 g
	L-オルニチン, HCl	0.169 g
Gibco MEM ビタミン (100倍希釈) 10 ml	ビタミン類	
	塩化ナトリウム	0.085 g
	塩化コリン	0.001 g
	葉酸	0.001 g
	myo-イノシトール	0.001 g
	ナイアシンアミド	0.001 g
	D-パントテン酸, 1/2Ca	0.001 g
	ピリドキサール, HCl	0.001 g
	リボフラビン	0.0001 g
	チアミン, HCl	0.001 g
その他	その他	
	D(+)ガラクトース	0.9 g
	D-グルコース	0 g
	フェノールレッド, Na	0.01 g
	グリセロール(比重1.26g/ml)	0.365 ml
	ピルビン酸ナトリウム	0 ml
	プロリン	0.03 g
	7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液	36.6 ml
	インスリン (10 <sup>-5</sup> M 溶液)	100 μl
	デキサメサゾン (10 <sup>-5</sup> M 溶液)	100 μl
	アプロチニン (50000U/ml 溶液)	1000 μl
	メルカプトエタノール (10 <sup>-4</sup> M 溶液)	1000 μl
	非必須アミノ酸	0 ml

【表4】

表2

L15-ES培地 (1L)	無機塩類	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1M 溶液	1.258 ml
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.203
	MgSO <sub>4</sub> (anhyd)	0.098 g
	KCl 1M 溶液	5.3655 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06
	NaCl 5M 溶液	27.29 ml (7.915g)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.14014 g
	アミノ酸	
	L-アラニン	0.225 g
	L-アルギニン, HCl	0
	L-アスパラギン, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-システイン	0.12 g
	L-シスチン, 2HCl	0 g
	L-グルタミン	0.3 g
	グリシン	0.2 g
	L-ヒスチジン, HCl, H <sub>2</sub> O	0.25 g
	L-イソロイシン	0.25 g
	L-ロイシン	0.125 g
	L-リジン, HCl	0.075 g
	L-メチオニン	0.075 g
	L-フェニルアラニン	0.125 g
	L-セリン	0.2
	L-スレオニン	0.3 g
	L-トリプトファン	0.02 g
	L-チロシン, 2Na, H <sub>2</sub> O	0 g
	L-バリン	0.1 g
	L-オルニチン, HCl	0.169 g
Gibco MEM ビタミン (100倍希釈) 10 ml	ビタミン類	
	塩化ナトリウム	0.085 g
	塩化コリン	0.001 g
	葉酸	0.001 g
	myo-イノシトール	0.001 g
	ナイアシンアミド	0.001 g
	D-パントテン酸, 1/2Ca	0.001 g
	ピリドキサール, HCl	0.001 g
	リボフラビン	0.0001 g
	チアミン, HCl	0.001 g
その他	その他	
	D(+)ガラクトース	0.9 g
	D-グルコース	0 g
	フェノールレッド, Na	0.01 g
	グリセロール(比重1.26g/ml)	0.365 ml
	ピルビン酸ナトリウム	0 ml
	プロリン	0.03 g
	7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液	36.6 ml
	メルカプトエタノール (10 <sup>-4</sup> M 溶液)	1000 μl
	非必須アミノ酸	0 ml