

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年12月7日(07.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/209211 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/020344
- (22) 国際出願日: 2017年5月31日(31.05.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-110488 2016年6月1日(01.06.2016) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所(NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 古江 美保(FURUE, Miho); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP). 福田 隆之(FUKUDA, Takayuki); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP). 水口 裕之(MIZUGUCHI, Hiroyuki); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号 アドレスビル6階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- 一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING HEPATIC STEM CELL-LIKE CELLS

(54) 発明の名称: 肝幹細胞様細胞の調製方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a culture medium for use in the preparation of hepatic stem cell-like cells from a culture medium in which a hepatoblast hetero cell mass having, coexisting therein, cells in various differentiation stages including hepatic progenitor cells is present. When a hepatoblast hetero cell mass is cultured in a HepSCF+2F culture medium, a colony having a decidedly different morphological characteristic property from the hepatoblast hetero cell mass can be isolated and it is confirmed that the colony is composed of hepatic stem cell-like cells that exhibit decidedly different marker expression from the hepatoblast hetero cell mass.

(57) 要約: 肝前駆細胞を含む様々な分化段階の細胞が共存するヘパトブラストヘテロ細胞集団が存在する培地から、肝幹細胞様細胞を調製するための培地を提供することを課題とする。HepSCF+2F培地においてヘパトブラストヘテロ細胞集団を培養したところ、上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団とは明らかに異なる形態的特徴を有するコロニーを単離することができ、かかるコロニーは、ヘパトブラストヘテロ細胞集団とは明らかに異なるマーカー発現を示す肝幹細胞様細胞であることを確認した。

WO 2017/209211 A1

明 細 書

発明の名称：肝幹細胞様細胞の調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヘパトブラストヘテロ細胞集団から肝幹細胞様細胞を調製する方法や、かかる肝幹細胞様細胞から肝前駆細胞様細胞等を調製する方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、肝硬変、劇症肝炎、肝がん等の重篤な肝臓疾患患者の治療には肝移植が有効とされ、肝臓の臓器そのものの一部をドナーからレシピエントへ移植することが広く行われているが、ドナー不足の問題や、また、移植後に免疫抑制療法が生涯必要になる場合がある等レシピエント側の負担が大きいなどの問題がある。

[0003] したがって、近年、細胞レベルでの移植が注目されているが、移植細胞としてヒト肝細胞そのものの利用を試みる場合、臓器から酵素的に分離することにより採取された細胞は、インビトロにおいて通常増殖能をほとんど有さず、また、培養や凍結保存することにより、肝細胞としての機能が通常急速に失われることが知られており、実用化は今のところ難しいとされている。肝臓臓器移植に代わる新しい治療法の開発が模索されており、中でも、ES細胞やiPS細胞から誘導した肝実質細胞等の再生医療への応用に期待が高まっている。

[0004] 他方、肝臓は、薬を解毒する主要な臓器であることから、医薬品の毒性評価をする場合の主要な標的臓器の一つとされている。従来、実験動物を使って毒性の予測が行われているが、「種差の壁」の限界があり、ヒトにおける毒性についての予測性は十分とはいえない。また、利便性・汎用性の観点から、また実験動物使用制限の観点からも、ヒト培養細胞を用いた、よりよい安全性予測系・有効性評価系の開発や移植用細胞の開発が期待されてきた。しかし、現行のヒト肝臓由来初代培養細胞は、インビトロにおいて通常増殖

能をほとんど有さず、また、培養や凍結保存することにより、肝細胞としての機能が通常急速に失われることが知られている。さらに、多大な費用をかけて毒性評価を行い、治験を経て市場に流通し始めた薬剤においても、薬剤性肝障害が起きること等を原因として早々に市場から撤退した例が報告されている。

[0005] そのため、均一な機能を有し、ロット毎の管理が可能である細胞を大量に、比較的安価に供給できる、ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞に由来する肝実質細胞等を毒性評価に用いることに注目が集まってきており、かかる目的においても多能性幹細胞から肝細胞への高効率に分化誘導するための方法の研究がすすんでいる。

[0006] これまで、多能性幹細胞から肝実質細胞へ分化させるための方法として、多能性幹細胞からアクチビンと酪酸ナトリウムを含む培地で内胚葉細胞を誘導し、次にDMSO(dimethyl sulfoxide)を含む培地で培養することにより分化が進み、AFP(alpha-fetoprotein)等が強く発現するヘパトブラストが誘導され、さらに、オンコスタチンM(OSM)を含む培地において成熟肝細胞へ誘導する方法が報告されている(例えば、非特許文献1参照)。また、多能性幹細胞からアクチビンを含む培地で内胚葉細胞を誘導し、FGF4(fibroblast growth factor-4)とBMP2(bone morphogenetic protein-2: 骨形成因子-2)を含む培地でAFP等を発現するヘパトブラストを誘導し、さらにHGF(hepatocyte growth factor: 肝細胞増殖因子)を含む培地やOSMを含む培地において培養を続けることにより、肝細胞を誘導する方法が報告されている(例えば、非特許文献2参照)。そしてまた、iPS細胞からFOXA2(forkhead box a2)とHNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4: 肝細胞核因子4)とAFPとが発現するヘパトブラストと称される肝前駆細胞を誘導した後、HGFを含む培地やOSMを含む培地において培養を続けることにより、肝細胞を誘導する方法が報告されている(例えば、非特許文献3参照)。さらに、多能性幹細胞からRPMI+B27培地にアクチビンとWnt3aとHGFとを添加した培地で内胚葉が誘導され、KO

ーDMEM 20% KSR培地にDMSOを添加した培地で培養することにより肝前駆細胞が誘導され、さらに、OSMとデキサメタゾンを添加した培地で培養することにより、肝細胞を誘導する方法が報告されている（例えば、非特許文献4参照）。

[0007] しかしながら、上記多能性幹細胞から誘導されたヘパトブラストや、肝前駆細胞（以下、単に「ヘパトブラストヘテロ細胞集団」ともいう）は、HNF4 α 及び／又はAFP等の共通するマーカーの発現はあるものの、実際には分化の程度が多岐にわたっており、分化が十分に進まない細胞、増殖能が不十分な細胞、分化が進んだ場合にも肝細胞としての機能を果たすことができない細胞、肝細胞としての機能が長続きしない細胞等、様々な細胞が混在する細胞集団であって、実際に肝細胞等として機能できる細胞に誘導された細胞は、多能性幹細胞の多くとも10～30%にとどまっているとされる。また、上記文献におけるヘパトブラストヘテロ細胞集団は、肝細胞への分化途上の段階にあることが確認されている細胞であるが、各分化段階で増殖や保存をすることは困難であるとされる。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Stem Cells 2008;26:894-902
非特許文献2：Hepatology 2007;45:1229-1239
非特許文献3：Hepatology 2010;51:297-305
非特許文献4：Hepatology 2012;55:1193-1203

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明者らは、化学合成培地である基礎培地の適切な組成と、サプリメント成分の様々な組合せについて検討を続けており、カルシウムイオンと、グルコースと、ピルビン酸イオンとを含む基礎培地に、インスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、セレン酸、

脂肪酸不含アルブミン、ヘパリン、FGF-2、FGF-4、及びHGFからなるサプリメントを添加した培地が、増殖能や分化能を保持したままの肝前駆細胞を培養し、保存することができることを確認している（特開2015-6137号公報）。しかしながら、かかる培地においては、肝前駆細胞を培養及び保存するという目的は達成したものの、様々な分化段階の肝前駆細胞が共存するため、機能性の高い肝細胞に分化することができる肝前駆細胞を効率よく選抜することは難しい場合があった。

[0010] 本発明の課題は、従前の肝前駆細胞を含む様々な分化段階の細胞が共存するヘパトブラストヘテロ細胞集団から、肝幹細胞様細胞を調製するための培地を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、ヒト多能性幹細胞から分化誘導されたヘパトブラストヘテロ細胞集団について種々の培地を用いて培養することにより検討を行ってきたが、FGF-4を用いないということに一つの特徴がある、HepSCF+2F培地を用いて培養を行ったところ、驚くべきことに、上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団とは明らかに異なる形態的特徴を有し、コロニーとして単離することができる細胞を培地上に見いだした。かかるコロニーを単離し、HepSCF+2F培地上で培養を続け、発現マーカーについて解析したところ、従来知られている肝前駆細胞様細胞よりも未分化性を維持したマーカー発現を示した。かかる単離された細胞は、形態学的特徴及びマーカーの発現状況から、ヒト肝臓に存在し、自己複製能を有し、肝臓が損傷を受けた際に肝臓修復に寄与する能力があるとされる肝幹細胞に極めて近い、インビトロで作製された肝幹細胞様細胞であることが確認された。

[0012] さらに、上記単離された肝幹細胞様細胞は、そのままHepSCF+2F培地において培養を続けることにより、未分化性の程度をほぼ維持したまま増殖させることができることを確認したうえで、さらにもう一段階分化を進めることを試みた。すなわち、上記肝幹細胞様細胞をHepSCF+2F培地からHepSCF+4F培地に培地交換して培養したところ、肝前駆細胞

様細胞に分化することが確認された。上記肝幹細胞様細胞や肝前駆細胞様細胞は増殖能や分化能が維持されており、肝実質細胞様細胞や胆管様細胞への分化も容易であることを確認し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の工程 (a) ~ (d) を順次備える多能性幹細胞から肝幹細胞様細胞を調製する方法。

(a) 多能性幹細胞からヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製する工程；

(b) 工程 (a) において調製されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、ヘパトブラスト培地に HGF と FGF 7 とを添加した肝幹細胞様細胞調製培地に播種する工程；

(c) 工程 (b) において播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、前記肝幹細胞様細胞調製培地に 2 回以上継代する工程；

(d) 前記肝幹細胞様細胞調製培地に産生した肝幹細胞様細胞コロニーを前記肝幹細胞様細胞調製培地から単離する工程；

[2] ヘパトブラスト培地が、0.03 mM ~ 1 mM のカルシウムイオンと、500 mg/L ~ 4500 mg/L のグルコースとを含む基礎培地に、サプリメントを構成する培地成分を添加することにより作製される培地であることを特徴とする上記 [1] 記載の方法。

[3] 肝幹細胞様細胞調製培地を培養容器の内側にコートされたフィブロネクチン上に調製することを特徴とする上記 [1] 又は [2] 記載の方法。

[4] 上記 [1] ~ [3] のいずれか記載の方法で調製された肝幹細胞様細胞。

[5] 上記 [4] 記載の肝幹細胞様細胞を、ヘパトブラスト培地に HGF と FGF 7 と SB431542 と Y-27632 とを添加した肝前駆細胞様細胞調製培地で培養する工程を備える肝前駆細胞様細胞を調製する方法。

[6] 上記 [5] 記載の方法で調製された肝前駆細胞様細胞。

[7] 上記 [6] 記載の肝前駆細胞様細胞を、ヘパトブラスト培地に HGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、

アスコルビン酸、オンコスタチンM、Wnt3a及びDAPTを添加した肝実質細胞様細胞調製培地で培養する工程を備える肝実質細胞様細胞を調製する方法。

[8] 上記[7]記載の方法で調製された肝実質細胞様細胞。

[9] 以下の工程(f)～(h)を順次備える上記[6]記載の肝前駆細胞様細胞から胆管様細胞を調製する方法。

(f) コラーゲン溶液に10倍濃度の基礎培地を1割の割合で混合した混合溶液を調製する工程；

(g) 肝前駆細胞様細胞を、前記基礎培地にヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、HGF、及びEGFを添加した胆管誘導用培地1に浮遊させ、上記コラーゲン混合溶液と混ぜ、肝前駆細胞様細胞を培養する工程；

(h) 工程(g)で培養された細胞を、前記基礎培地にヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、HGF、EGF、並びに、1% FBS及び／又はTGF- β を添加した胆管誘導用培地2で培養することにより、胆管様細胞を調製する工程；

[10] 上記[9]記載の方法で調製された胆管様細胞。

[11] ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とを添加した肝幹細胞様細胞を調製するための培地。

[12] ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とSB431542とY-27632とを添加した肝幹細胞様細胞から肝前駆細胞様細胞を調製するための培地。

[13] ヘパトブラスト培地にHGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、アスコルビン酸、オンコスタチンM、Wnt3a及びDAPTを添加した肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞を調製するための培地。

[14] ヘパトブラスト培地が、0.03 mM～1 mMのカルシウムイオンと、500 mg/L～4500 mg/Lのグルコースとを含む基礎培地に、サプリメントを構成する培地成分を添加することにより作製される培地であることを特徴とする上記[11]～[13]のいずれか記載の培地。

発明の効果

[0014] 本発明の肝幹細胞様細胞を単離するための培地を用いて、ヘパトブラストヘテロ細胞集団から、肝幹細胞様コロニーを単離することにより、同一コロニー由来の肝幹細胞様細胞を調製することが可能となり、かかる肝幹細胞様細胞から、肝前駆細胞様細胞を効率的に調製し、さらに均一な機能を有する肝実質細胞様細胞や胆管様細胞を大量に比較的安価に供給できる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] H9細胞由来のヘパトブラストヘテロ細胞集団の位相差画像を示す。

[図2] HepSCF+2F培地での1回目の継代後の細胞集団における蛍光免疫染色の画像を示す。(a) FOXA2 (b) HNF4 α (c) AFP (d) Merge (FOXA2+HNF4 α +AFP)である。

[図3] HepSCF+2F培地中のコロニーから単離された細胞の位相差画像である。

[図4] HepSCF+4F培地中の肝前駆細胞様細胞の位相差画像を示す。

[図5] HepSCF+4F培地中の細胞における蛍光免疫染色の画像を示す。

(a) FOXA2 (b) HNF4 α (c) AFP (d) Hoechst (e) Phase-contrastである。

[図6] ヘパトブラストヘテロ細胞集団を各種培地で培養して得られたコロニーについて、イメージアナライザーにより、FOXA2陽性細胞やHNF4 α 陽性細胞、及びAFP陽性細胞の比率を解析した結果を示すグラフである。

[図7] HepSCF+2F培地へ各種因子を添加した培地で、HepSCF+2F培地において単離した細胞を培養した場合の、細胞生存アッセイを行った結果を示すグラフである。*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.005$

[図8] D o t c o m株由来のヘパトブラストヘテロ細胞集団の位相差画像を示す。

[図9] H e p S C F + 2 F 培地中のコロニーの位相差画像を示す。

[図10] H e p S C F + 2 F 培地中の D o t c o m株由来細胞のコロニーから単離された細胞の位相差画像を示す。

[図11] H e p S C F + 4 F 培地中の肝前駆細胞様細胞の位相差画像を示す。

[図12] H e p S C F + 2 F 培地（2 F）で培養した肝幹細胞様細胞と、該肝幹細胞様細胞を H e p S C F + 4 F 培地（2 F + S B + Y）で培養した細胞のマーカー発現のグラフである。Undiffは多能性幹細胞を示す。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.005$

[図13]肝幹細胞様細胞を H e p S C F + 4 F 培地（H B C）で培養後、H e p S C F + 7 F（7 F）、H e p S C F + 7 F + D a（7 F + D a）、又は H e p S C F + 7 F + D a + W n 培地（7 F + D a + W n）で培養した場合の各種肝細胞系分化誘導マーカー発現のグラフである。Undiffは多能性幹細胞を示す。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.005$

[図14]肝実質細胞様細胞の蛍光免疫染色の画像を示す。（a）A L B（b）A A T（Alpha-1 antitrypsin）（c）H o e c h s t（d）B r i g h t F i e l d（e）M e r g e（A L B + A A T）である。

[図15]コラーゲンゲル培養により誘導された胆管様細胞の画像を示す。

[0016] 本発明のヘパトブラストヘテロ細胞集団から肝幹細胞様細胞を調製する方法としては、多能性幹細胞からヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製する工程（a）；工程（a）において調製されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、ヘパトブラスト培地に H G F と F G F 7 とを添加した肝幹細胞様細胞調製培地に播種する工程（b）；工程（b）において播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、前記肝幹細胞様細胞調製培地に2回以上継代する工程（c）；前記肝幹細胞様細胞調製培地に産生した肝幹細胞様細胞コロニーを前記肝幹細胞様細胞調製培地から単離する工程（d）；を順次備える方法であ

れば特に制限されず、工程（d）において単離された肝幹細胞様細胞コロニーを肝幹細胞様細胞調製培地において培養して肝幹細胞様細胞を調製することもできる（工程（e））。上記肝幹細胞様細胞をヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とSB431542とY-27632とを添加した肝前駆細胞様細胞調製培地で培養することにより、肝前駆細胞様細胞を調製することもできる。なお、本発明における多能性幹細胞、ヘパトブラストヘテロ細胞集団、肝幹細胞様細胞コロニー、肝幹細胞様細胞、肝前駆細胞様細胞、肝実質細胞様細胞、胆管様細胞等は、ヒト細胞である。

[0017] 上記工程（a）において、ヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製する方法としては、多能性幹細胞から公知の方法を用いて調製する方法であれば特に制限されず、多能性幹細胞としては、初期胚より単離される胚性幹細胞（embryonic stem cells：ES細胞）や、胎児期の始原生殖細胞から単離される胚性生殖細胞（embryonic germ cells：EG細胞）（例えばProc Natl AcadSci USA, 1998, 95:13726-31参照）や、出生直後の精巣から単離される生殖細胞系列幹細胞（germline stem cells：GS細胞）（例えば、Nature, 2008, 456:344-9参照）や、腸骨骨髓、顎骨骨髓等の骨髓由来の幹細胞、脂肪組織由来の幹細胞などの間葉系幹細胞、及び皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子を導入することで、被検体自身の体細胞の脱分化を誘導し、ES細胞同様の多能性を有する体細胞由来人工多能性幹細胞（若しくは、誘導多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；iPS細胞））を挙げることができるが、具体的には、ヒトES細胞H9株（WA09）、ヒトES細胞H1（WA01）株（ウィスコンシン大学樹立、WISC Bank分譲）や、KhES-1、KhES-2及びKhES-3（いずれも京大再生研付属幹細胞医学研究センター樹立、理研バイオリソースセンター分譲）や、HES3、HES4、及びHES6（モナッシュ大学樹立、WISC Bank分譲）などのヒトES細胞や、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、C-Myc遺伝子及びSox2遺伝子を導入することによって得られるiPS細胞（京都大学樹立、理研バイオリソースセンター分譲）や、Tic（JCRB1331株）、Dotcom（JC

R B 1 3 2 7 株)、 S q u e a k y (J C R B 1 3 2 9 株)、 及び T o e (J C R B 1 3 3 8 株)、 L o l l i p o p (J C R B 1 3 3 6 株) (以上成育医療センター樹立、医薬基盤・健康・栄養研究所・J C R B 細胞バンク分譲) や、 U T A - 1 株及び U T A - 1 - S F - 2 - 2 株 (いずれも東京大学樹立、医薬基盤・健康・栄養研究所・J C R B 細胞バンク分譲) や、 O c t 3 / 4 遺伝子、 K l f 4 遺伝子及び S o x 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞 (Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106) 等の i P S 細胞を例示することができる。発現マーカーにおいては、 O C T - 3 / 4 や N A N O G 等の未分化マーカーを強く発現していることが特徴である。

[0018] 上記多能性幹細胞からヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製する公知の方法としては、多能性幹細胞に遺伝子導入する方法や多能性幹細胞の分化を誘導する成分を添加した培地において培養する方法であれば特に限定されない。

[0019] 上記多能性幹細胞に遺伝子導入する方法としては、以下の 1) 及び 2) の方法、並びにこれらの方法に改良を加えた方法を例示することができる。

1) H E X 遺伝子、 H N F 4 α 遺伝子、 H N F 6 遺伝子及び S O X 1 7 遺伝子から選択されるいずれか 1 又は複数の遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込むことにより、ヒト多能性幹細胞に導入することを特徴とする、幹細胞からヘパトブラスト (ヘテロ) 細胞集団を分化誘導する方法 (国際公開 W O 2 0 1 1 / 0 5 2 5 0 4 号パンフレット参照) ;

2) F O X A 2 遺伝子を、アデノウイルスベクターを用いてヒト多能性幹細胞に導入し、次いで、 F O X A 2 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターと H N F 1 α 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターとを、前記ヒト多能性幹細胞に導入することにより、 (ヘテロ) ヘパトブラスト細胞集団を調製する方法 ;

[0020] 上記ヒト多能性幹細胞の分化を誘導する成分を添加した培地において培養する方法としては、以下の 3) ~ 9) の方法、並びにこれらの方法に改良を加えた方法を例示することができる。

[0021] 3) 肝幹細胞や肝前駆細胞の調製方法としては、マトリゲル上のRPMI 1640/B27 (ーインスリン) 培地に100 ng/mLのアクチビンA、20 ng/mLのFGF2、及び10 ng/mLのBMP4を添加した培地にヒトES細胞やヒトiPS細胞を播種し、培地交換を毎日行い培養を2日間行った後、3日目に、培地を、RPMI 1640/B27 (ーインスリン) 培地に100 ng/mLのアクチビンAを添加した培地へ交換し、更に2～5日間培養し、決定内胚葉になったと判断された細胞について、培地を、RPMI 1640/B27 (+インスリン) 培地に10 ng/mLのFGF2、及び20 ng/mLのBMP4を添加した培地に変更、毎日培地を交換してさらに3～8日間培養し、肝細胞へ分化する肝幹細胞様の形態になった細胞について、RPMI 1640/B27 (+インスリン) 培地に20 ng/mLのHGFを添加したものに變更し、さらに数日培養をすることにより、ヘパトブラスト (ヘテロ) 細胞集団を調製する方法 (NIHセンター法) ;

なお、上記RPMI 1640/B27 (ーインスリン) 培地は、RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640培地に、2%のインスリン不含B-27サプリメントを添加した培地を例示することができる。RPMI 1640/B27 (+インスリン) 培地は、上記RPMI 1640/B27 (ーインスリン) 培地において、インスリン不含B-27サプリメントの代わりに、2%のB27サプリメント (50×) を添加した培地である。

[0022] 4) BDマトリゲル上のRPMI 1640培地に100 ng/mLのアクチビンA及び1 mMのNaBを添加した培地にヒトES細胞やヒトiPS細胞を播種し、培地交換を毎日行い培養を1～3日間行った後、培地を、RPMI 1640培地に100 ng/mLのアクチビンA及び0.5 mMのNaBを添加した培地へ交換し、更に2～5日間培養し、決定内胚葉になったと判断された細胞について、20% KSR (Knockout™ Serum Replacement、ThermoFisher Scientific社製) を添加したノックアウト-DMEM培地 (Kn

ockout-Dulbecco' s modified Eagle' s medium) に 1 % の DMSO を添加した培地に変更し、5 ~ 10 日さらに培養をすることにより、ヘパトブラスト(ヘテロ)細胞集団を調製する方法 (We i C u i 法) ;

[0023] 5) フィブロネクチンでコートした 10 ng/mL のアクチビン A と 12 ng/mL の FGF 2 を添加した CDM (化学合成培地) に、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を播種し、1 ~ 3 日培養し、培地を、PVA を添加した CDM 培地に、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の Ly 294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)、 10 ng/mL のアクチビン A、及び 12 ng/mL の FGF 2 を添加した培地に変更して、さらに 1 ~ 5 日培養し、内胚葉分化を誘導し、内胚葉細胞の特徴が現われた細胞について、培地を、PVA を添加した CDM 培地に 50 ng/mL の FGF 10 を添加した培地に変更してさらに 1 ~ 4 日培養し、さらに培地を PVA を添加した CDM 培地に 50 ng/mL の FGF 10 と、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のレチノイン酸と、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の SB 431542 を添加した培地に変更してさらに 1 ~ 3 日培養することにより、ヘパトブラスト(ヘテロ)細胞集団を調製する方法 (V a l l i e r 法) ;

[0024] 6) 多能性細胞をアクチビンとナトリウムを含む培地で内胚葉細胞を誘導し、次に DMSO (dimethyl sulfoxide) を含む培地で培養することにより分化が進み、AFP 等が強く発現するヘパトブラスト(ヘテロ)細胞集団を誘導する方法 (例えば、非特許文献 1 参照) ;

7) 多能性細胞をアクチビンを含む培地で内胚葉細胞を誘導し、FGF 4 (fibroblast growth factor-4) と BMP 2 (bone morphogenetic protein-2) を含む培地で AFP 等を発現するヘパトブラスト(ヘテロ)細胞集団を誘導する方法 (例えば、非特許文献 2 参照) ;

8) 多能性細胞から FOXA 2 と HNF 4 α と AFP とが発現するヘパトブラストと称される肝前駆細胞を誘導する方法 (例えば、非特許文献 3 参照) ;

9) 多能性幹細胞から RPMI + B27 培地にアクチビンと Wnt 3 a と

HGFとを添加した培地で内胚葉を誘導し、KO-DMEM20%KSR培地にDMSOを添加した培地で培養することによりヘパトブラスト(ヘテロ)細胞集団を誘導する方法(例えば、非特許文献4参照)；

以上の1)～9)の方法により得られたヘパロブラストヘテロ細胞集団は、ゆるやかに肝細胞(様細胞)に向かって分化しながら増殖することが特徴である。

[0025] 上記工程(b)において、ヘパトブラストヘテロ細胞集団を播種する肝幹細胞様細胞調製培地としては、ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とを添加した培地であれば特に制限されず、ヘパトブラスト培地としては、例えば、0.03mM～1mMのカルシウムイオンと、500mg/L～4500mg/Lのグルコースとを含む基礎培地に、サプリメントを構成する培地成分を添加することにより作製される培地を挙げることができる。上記基礎培地は、調製が容易であり、ロットごとのばらつきを防ぐ点から化学合成培地が好ましい。ここで「培地」とは、「培地成分」に水を添加した状態のものをいう。

[0026] 上記HGF(hepatocyte growth factor)としては、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができるHGFや、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物(培養上清、培養細胞等)から分離精製したHGFを挙げることができる。また、本発明の効果を奏する限りにおいて、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が欠失又は置換されている誘導体を含めることができる。かかるHGFは、例えば、0.1～50ng/mL、好ましくは1～20ng/mL、より好ましくは5～15ng/mL、さらに好ましくは7～12ng/mLの終濃度になるように、上記ヘパトブラスト培地に添加することにより、上記肝幹細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0027] 上記F G F 7 (Fibroblast Growth Factor-7) としては、F G F 7を産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物（培養上清、培養細胞等）から分離精製したF G F 7を挙げることができ、また、本発明の効果を奏する限りにおいて、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が欠失又は置換されている誘導体を含めることができる。かかるF G F 7は、0.1～50 ng/mL、好ましくは1～20 ng/mL、より好ましくは5～15 ng/mL、さらに好ましくは7～12 ng/mLの終濃度になるように、上記ヘパトブラスト培地に添加することにより、上記肝幹細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0028] 上記肝幹細胞様細胞調製培地は、細胞と培養容器との接着性を高めるために培養容器の内側にコートされたフィブロネクチン上に調製することが好ましく、フィブロネクチンをコートして用いる方法としては、物理的に吸着させたり、培養容器の細胞接着領域に反応性の官能基を導入して化学結合により容器表面に細胞接着因子を固定化する等の周知の方法を用いることができるが、具体的には、培養容器にフィブロネクチンを含む溶液を添加し、1時間から12時間、好ましくは2時間から8時間、より好ましくは3時間から5時間、例えば37℃にて乾燥させないように静置し、細胞を播種する直前に上記溶液を吸引除去する方法を例示することができる。フィブロネクチンの濃度としては、0.5～5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、好ましくは1～3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、より好ましくは1.5～2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を例示することができる。

[0029] 上記基礎培地には、1又は2種類、好ましくは3種類以上の無機塩（類）や、1又は2種類以上、好ましくは5種類以上、より好ましくは10種類以上、さらに好ましくは15種類以上のアミノ酸（類）や、1又は2種類以上、好ましくは3種類以上、より好ましくは6種類以上、さらに好ましくは9種類以上のビタミン（類）や、1又は2種類以上、好ましくは3種類以上の微量成分（類）などを含むことが好ましく、ペニシリンやストレプトマイシ

ン等の抗生物質を適宜含むこともできる。上記各成分や各構成物質の濃度としては、多能性幹細胞の培養に適切であり、ヘパトブラストヘテロ細胞集団への分化を妨げるもののない、当業者において、公知の培地を参考として適切と考えられるいずれの濃度を挙げることができる。

[0030] 上記無機塩類としては、具体的には、硫酸銅五水和物、硝酸鉄(III)九水和物、硫酸鉄(II)七水和物、塩化マグネシウム六水和物、硫酸マグネシウム、硫酸マグネシウム（無水物）、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸水素二ナトリウム（無水物）、リン酸水素二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、硫酸亜鉛七水和物、硫酸マンガン、硝酸カルシウム、硝酸カルシウム四水和物、硝酸鉄、硝酸鉄（III）九水和物、炭酸水素ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム四水和物、塩化ニッケル(II)六水和物、ケイ酸ナトリウム、塩化スズ(II)二水和物、メタバナジウム酸アンモニウム、硫酸亜鉛七水和物、硫酸銅(II)五水和物等を挙げることができる。

[0031] 上記アミノ酸類としては、具体的には、グリシン、アルギニン、アスパラギン酸、アスパラギン、シスチン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン等を挙げることができ、上記各アミノ酸にはそれぞれ、L-体のアミノ酸とそれらの誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物が含まれる。例えば、上記アルギニンの派生物としては、L-塩酸アルギニン、L-アルギニン-塩酸塩等を挙げることができ、上記アスパラギン酸の派生物としては、L-アスパラギン酸ナトリウム塩一水和物、L-アスパラギン酸一水和物、L-アスパラギン酸カリウム、L-アスパラギン酸マグネシウム等を挙げることができ、上記システインの派生物としては、L-システイン二塩酸塩、L-システイン塩酸塩一水和物等を挙げることができ、上記L-リジンの派生物としては、L-リジン塩酸塩等を挙げることができ、上記グルタミン酸の派生物としては、L-グルタ

ミン酸一ナトリウム塩等を挙げることができ、上記アスパラギンの派生物としては、L-アスパラギン一水和物等を挙げることができ、上記チロシンの派生物としては、L-チロシン二ナトリウム二水和物等を挙げることができ、上記ヒスチジンの派生物としては、ヒスチジン塩酸塩、ヒスチジン塩酸塩一水和物等を挙げることができる。

[0032] 上記ビタミン類としては、公知のビタミンの他、ビタミン様物質を含み、具体的には、ビオチン、コリン、パントテン酸、葉酸、ナイアシン、パラミノ安息香酸（PABA）、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB12、イノシトール等を挙げることができ、上記各ビタミンにはそれぞれ、これらの誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物が含まれる。例えば、上記コリンの派生物としては、塩化コリン等を挙げることができ、上記ナイアシンの派生物としては、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ニコチニックアルコール等を挙げることができ、上記パントテン酸の派生物としては、パントテン酸カルシウム、パントテン酸ナトリウム、パンテノール等を挙げることができ、上記ピリドキシンの派生物としては、ピリドキシン塩酸塩、ピリドキサル塩酸塩、リン酸ピリドキサル、ピリドキサミン等を挙げることができ、上記チアミンの派生物としては、塩酸チアミン、硝酸チアミン、硝酸ビスチアミン、チアミンジセチル硫酸エステル塩、塩酸フルスルチアミン、オクトチアミン、ベンフォチアミン等を挙げることができる。

[0033] 上記微量成分としては、増殖能を維持したままヘパトブラストヘテロ細胞集団を培養するにあたり、有利に作用する成分であることが好ましく、リポ酸、プトレシン、チミジン、アデニン、グルタチオン、HEPES（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）、フェノールレッド等、通常培地成分として用いられている成分及びこれらの誘導体並びにそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物を挙げることができ、かかる派生物としては、グルタチオン還元型やグルタチオン酸化型、プトレシン二塩酸塩、アデニン硫酸塩等を挙げることができる。

[0034] 前記 500 mg/L ~ 4500 mg/L のグルコースとしては、800 mg/L ~ 2000 mg/L のグルコースが好ましく、1100 mg/L ~ 1500 mg/L のグルコースがより好ましい。また、糖（類）として、ラクトース、マンノース、フルクトース、ガラクトース等の単糖類や、スクロース、マルトース、ラクトース等の二糖類から選ばれる 1 又は 2 以上の糖類をさらに添加することもできる。

[0035] 前記 0.03 mM ~ 1 mM のカルシウムイオンは、上記糖（類）、無機塩（類）、アミノ酸（類）、ビタミン（類）、微量成分（類）等の構成成分を含む基礎培地の成分に水を添加することにより培地中に生じるカルシウムイオンの合計濃度であり、0.05 ~ 0.8 mM のカルシウムイオンが好ましく、0.1 ~ 0.6 mM のカルシウムイオンがより好ましく、0.2 ~ 0.5 mM のカルシウムイオンがより好ましく、カルシウムイオンを生じさせる基礎培地の構成成分としては、上記パントテン酸カルシウム、硝酸カルシウム、塩化カルシウムを例示することができるが、これらに限定されない。

[0036] 上記基礎培地としては、以下の表 1 に示される組成の基礎培地を具体的に例示することができるが、市販のダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM ; Iscove's Modified Dulbecco's Medium :）、MCDB 培地、F12NUT-MIX 培地、RPMI 1640 培地等の化学合成培地の組成を改変し、及び／又は、これらの培地のいずれか 2 以上を適当な割合で混合し、500 mg/L ~ 4500 mg/L のグルコース、及び、0.03 mM ~ 1 mM のカルシウムイオンとを含む培地とすることもできる。

[0037]

[表1]

基礎培地	mg / L
硝酸カルシウム 四水和物	5 - 100
塩化カリウム (KCl)	50 - 1000
硫酸マグネシウム (MgSO ₄) (無水塩)	10 - 150
塩化ナトリウム (NaCl)	1000 - 20000
炭酸水素ナトリウム (NaHCO ₃)	500 - 10000
リン酸水素ナトリウム (Na ₂ HPO ₄) 無水塩	100 - 2000
リン酸二水素ナトリウム一水和物 (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	10 - 150
硫酸亜鉛七水和物	0.01 - 0.1
硝酸鉄 (III) 九水和物 (Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O)	0.005 - 0.075
塩化カルシウム(無水)	10 - 200
硫酸銅 (II) 五水和物	0.0005 - 0.01
硫酸鉄 (II) 七水和物	0.1 - 2
塩化マグネシウム (無水)	10 - 200
D-グルコース	500 - 4500
グルタチオン	0.05 - 1
HEPES	1000 - 15000
フェノールレッド	1 - 20
プトレシン二塩酸塩	0.01 - 0.4
チミジン	0.1 - 1.5
リボ酸	0.02 - 5
L-アラニン	1 - 20
L-アルギニン	10 - 1000
L-アスパラギン (free base)	1 - 100
L-アスパラギン一水和物	0.5 - 50
L-アスパラギン酸	0.5 - 50
L-シスチン二塩酸塩	5 - 500
L-グルタミン酸	1 - 100
L-グルタミン	50 - 5000
グリシン	0.1 - 100
L-ヒスチジン (free base)	0.3 - 300
L-ヒスチジン · HCl · H ₂ O	0.1 - 100
L-ヒドロキシプロリン	1 - 20

L-イソロイシン	1-500
L-ロイシン	1-500
L-リジン塩酸塩	0.5-500
L-メチオニン	0.2-200
L-フェニルアラニン	0.3-300
L-プロリン	0.2-200
L-セリン	0.5-500
L-トレオニン	0.3-300
L-トリプトファン	1-100
L-チロシン二ナトリウム二水和物	0.4-400
L-バリン	0.5-500
ビオチン	0.005-0.5
D-パントテン酸カルシウム	0.2-10
塩化コリン	1-100
葉酸	0.2-10
L-イノシトール	0.2-200
ナイアシンアミド	0.2-5
4-アミノ安息香酸	0.02-20
塩酸ピリドキシン	0.2-5
リボフラビン	0.05-0.5
塩酸チアミン	0.2-7
ビタミンB12	0.02-1
アデニン硫酸塩	3-300
硫酸マンガン (II) 一水和物	0.000005-0.0005
塩化ニッケル (II) 六水和物	0.000005-0.0005
ケイ酸ナトリウム	0.005-0.2
塩化スズ (II) 二水和物	0.000005-0.0005
モリブデン酸アンモニウム四水和物	0.0001-0.0015
メタバナジウム酸アンモニウム	0.0001-0.001

[0038] また、上記基礎培地の好適な例としては、以下表2に示される組成のHepSCF基礎培地を好適に挙げることができる。

[0039]

[表2]

He p S C F 基礎培地	mg / L
硝酸カルシウム 四水和物	2 5
塩化カリウム (K C l)	2 5 5 . 9 2
硫酸マグネシウム (M g S O ₄) (無水塩)	3 6 . 6 2 7 5
塩化ナトリウム (N a C l)	6 8 9 8 . 6
炭酸水素ナトリウム (N a H C O ₃)	2 0 2 5
リン酸水素ナトリウム (N a ₂ H P O ₄) 無水塩	3 4 1 . 9 6
リン酸二水素ナトリウム一水和物 (N a H ₂ P O ₄ · H ₂ O)	3 1 . 2 5
硫酸亜鉛七水和物	0 . 0 7 2
硝酸鉄 (III) 九水和物 (F e (N O ₃) ₃ · 9 H ₂ O)	0 . 0 2 5
塩化カルシウム (無水)	5 1 . 6 6 5
硫酸銅 (II) 五水和物	0 . 0 0 1 3 7 5
硫酸鉄 (II) 七水和物	0 . 6 9 5
塩化マグネシウム (無水)	6 1
D - グルコース	1 2 9 0 . 4 8
グルタチオン	0 . 2 5
HEPES	3 3 5 0
フェノールレッド	5 . 5 8 5
プトレシン二塩酸塩	0 . 0 8
チミジン	0 . 3 6 5
リボ酸	0 . 1 0 5
L - アラニン	4 . 4 5 5
L - アルギニン	1 7 6 . 3 3 5
L - アスパラギン (free base)	1 2 . 5
L - アスパラギン一水和物	7 . 5
L - アスパラギン酸	6 . 9 9 5
L - シスチン二塩酸塩	5 0 . 9 1 5
L - グルタミン酸	1 2 . 3 5
L - グルタミン	6 5 9
グリシン	1 3 . 7 5 5
L - ヒスチジン (free base)	2 8 . 5 8 5
L - ヒスチジン · HCl · H ₂ O	1 0 . 5
L - ヒドロキシプロリン	5
L - イソロイシン	8 8 . 9 3

L-ロイシン	71.55
L-リジン塩酸塩	55.635
L-メチオニン	20.205
L-フェニルアラニン	30.16
L-プロリン	22.27
L-セリン	49.525
L-トレオニン	34.7
L-トリプトファン	11.375
L-チロシン二ナトリウム二水和物	41.405
L-バリン	46.075
ビオチン	0.0575
D-パントテン酸カルシウム	1.1815
塩化コリン	8.73
葉酸	1.65
i-イノシトール	19.56
ナイアシンアミド	1.2685
4-アミノ安息香酸	0.25
塩酸ピリドキシン	1.281
リボフラビン	0.169
塩酸チアミン	1.42
ビタミンB12	0.20625
アデニン硫酸塩	36.395
硫酸マンガン(II)一水和物	0.000055
塩化ニッケル(II)六水和物	0.00006
ケイ酸ナトリウム	0.0305
塩化ズズ(II)二水和物	0.0000565
モリブデン酸アンモニウム四水和物	0.00062
メタバナジウム酸アンモニウム	0.00029

[0040] 前記サプリメントを構成する培地成分としては、ピルビン酸ナトリウム、インスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、セレン酸、脂肪酸不飽和アルブミン、ヘパリンを挙げることができ、サプリメントの使用形態としては、1又は2以上の上記成分からなるサプリメントを複数個に分別しておいてもよいし、多数の上記成分を含む一つのサプリメントとしてまとめておくこともできる。

[0041] 前記ピルビン酸ナトリウムとしては、例えば0.01~1mg/mL、好ましくは0.05~0.5mg/mL、より好ましくは0.075~0.25mg/mL、さらに好ましくは0.08~0.15mg/mLの終濃度に

なるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。

[0042] 前記インスリンとしては、ブタ由来インスリン、ウシ由来インスリン、ヒト由来インスリン等の天然由来のインスリンや、アニマルプロダクトフリーグレードのインスリンとしてウシ型、ブタ型、又はヒト型等の遺伝子組換え体のインスリンを挙げることができ、特にヒト型の遺伝子組換え体インスリン（リコンビナントヒトインスリン）を好適に例示することができ、例えば $1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは $7.5 \sim 12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは $9 \sim 11 \mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。

[0043] 前記トランスフェリンとしては、ブタ由来トランスフェリン、ウシ由来トランスフェリン、ヒト由来トランスフェリン等の天然由来のトランスフェリンや、アニマルプロダクトフリーグレードのインスリンとしてウシ型、ブタ型、又はヒト型等の遺伝子組換え体のトランスフェリンを挙げることができ、さらに鉄低含有の apo 型のトランスフェリンが、鉄と結合している holo 型のトランスフェリンよりも好ましく、特にヒト型の遺伝子組換え体 Apo トランスフェリン（リコンビナントヒト apo トランスフェリン）を好適に例示することができ、例えば $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは $2 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは $3 \sim 7 \mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。

[0044] 前記 2-メルカプトエタノールとしては、常法により合成された化学合成物を例示することができ、例えば $0.01 \sim 15 \mu\text{M}$ 、好ましくは $5 \sim 13 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $7.5 \sim 12.5 \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $9 \sim 11 \mu\text{M}$ の終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。

- [0045] 前記エタノールアミンとしては、2-アミノエタノール、又はモノエタノールアミンとも呼ばれ、常法により合成された化学合成品をアニマルプロダクトフリーグレードとして好適に例示することができ、例えば1～30 μM 、好ましくは5～20 μM 、より好ましくは7.5～12.5 μM 、さらに好ましくは9～11 μM の終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。
- [0046] 前記セレン酸としては、セレン酸とその誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物を含むことができ、常法により化学合成されたセレン酸、セレン酸ナトリウム、亜セレン酸ナトリウム、亜セレン酸水素ナトリウム等を例示することができ、セレン酸ナトリウム換算で例えば1～45 nM、好ましくは10～35 nM、より好ましくは15～30 nM、さらに好ましくは20～26 nMの終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。
- [0047] 前記脂肪酸不含アルブミンとしては、卵白アルブミン、ブタ由来アルブミン、ウシ由来アルブミン、ヒト由来アルブミン等の天然由来のアルブミンや、アニマルプロダクトフリーグレードのアルブミンとしてウシ型、ブタ型、又はヒト型等の遺伝子組換え体のアルブミンであって、脂肪酸を含有していないアルブミンを挙げることができ、特にウシ血清由来アルブミンであって脂肪酸を含んでいないウシ血清由来の脂肪酸不含アルブミンを好適に例示することができ、例えば0.01～50 mg/mL、好ましくは0.2～20 mg/mL、より好ましくは0.25～1 mg/mL、さらに好ましくは0.3～0.7 mg/mLの終濃度になるように上記サプリメントの一構成成分として、前記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。
- [0048] 前記ヘパリンとしては、ウロン酸とアミノグリコシドからなるグリコサミノグリカンの構造を有する、抗血液凝固作用を有する因子を挙げることがで

き、天然物、合成品にかかわらず、本発明の効果を奏する限りにおいて、ヘパリンとその誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物を含むことができ、常法により化学合成されたヘパリンナトリウム塩やヘパリンカルシウム塩を好適に例示することができ、例えば1～500 ng/mL、好ましくは10～200 ng/mL、より好ましくは50～150 ng/mL、さらに好ましくは80～120 ng/mLの終濃度になるように、前記サプリメントの一構成成分として、上記基礎培地に添加することにより、ヘパトブラスト培地を調製することができる。また、ヘパリンと同様、グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸を単独で、又はヘパリンと共に使用することもできる。

[0049] 上記ヘパトブラスト培地の具体例としては、以下の表3に示されるHepSCF培地を好適に挙げるることができる。

[0050] [表3]

HepSCF培地		
基礎培地	HepSCF基礎培地	
サプリメント（終濃度）	ピルビン酸ナトリウム	0.11 mg/mL
	インスリン	10 µg/mL
	アポトランスフェリン	5 µg/mL
	2-メルカプトエタノール	10 µM
	2-エタノールアミン	10 µM
	セレン酸	23 nM
	脂肪酸不含アルブミン	4 mg/mL
	ヘパリンナトリウム塩	100 ng/mL

[0051] 上記肝幹細胞様細胞調製培地の具体例としては、以下の表4に示されるHepSCF+2F培地を好適に挙げるることができる。

[0052]

[表4]

H e p S C F + 2 F 培地		
基礎培地	H e p S C F 基礎培地	
サプリメント（終濃度）	ビルビン酸ナトリウム	0.11mg/mL
	インスリン	10μg/mL
	アボトランスフェリン	5μg/mL
	2-メルカプトエタノール	10μM
	2-エタノールアミン	10μM
	セレン酸	23nM
	脂肪酸不含アルブミン	4mg/mL
	ヘパリンナトリウム塩	100ng/mL
2因子（+2F）	HGF	10ng/mL
	FGF7	10ng/mL

[0053] 上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団（全体）において発現しうる分化誘導マーカーとしては、FOX A 2、HNF 4 α、KRT 19（ケラチン19）、EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule：上皮細胞接着分子)、NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule：神経細胞接着分子)、ICAM (intercellular adhesion molecule：細胞間接着分子)、CD 13、CD 133、AFP等を例示することができる。

[0054] 上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団の形態的特徴としては、顕微鏡観察下においてやや大きい上皮様細胞の様相を呈するものや、やや小さい上皮様細胞、あるいは、間葉系細胞様の様相を呈する細胞などを含むヘテロな細胞集団として観察されることを挙げることができる。

[0055] 前記工程（c）において、工程（b）において播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を肝幹細胞様細胞調製培地に継代する方法としては、従来公知の継代方法であれば特に制限されず、例えば、培地交換後12時間～20日、好ましくは3～15日、より好ましくは4～6日に行うことを例示することができるが、培養されている細胞集団の状況によっては、55～99%コンフルエント、好ましくは65～95%コンフルエント、さらに好ましくは70～90%コンフルエントに達した場合等、コンフルエンスによって判断することもできる。継代回数としては、例えば2回以上、好ましくは3

回以上、より好ましくは4回以上、さらに好ましくは5回以上を挙げることができる。

[0056] 前記工程（d）において肝幹細胞様細胞調製培地に産生した肝幹細胞様細胞コロニーとしては、肝幹細胞様細胞調製培地上に産生する単一の細胞から増殖した細胞群を挙げることができ、上記コロニーの形態としては、実体顕微鏡下で観察したときに、高く盛り上がっている形態や、細胞がやや小さく、細胞と細胞の間隙が非常に狭いコロニーの形態等を挙げることができる。また、肝幹細胞様細胞コロニーを単離する方法としては、従来公知の方法を用いることができるが、例えば、顕微鏡下又は目視にて、先端の細いプラスチックパスツールの先端や、マイクロピペットのチップの先端を用いてコロニーを培地から剥離する方法を挙げることができる。コロニーを肝幹細胞様細胞調製培地から単離する前に、ディスペラー等の分散酵素により処理することもできる。

[0057] 前記工程（e）における肝幹細胞様細胞を調製する方法としては、工程（d）において単離された肝幹細胞様細胞コロニーを上記肝幹細胞様細胞調製培地において培養する方法であれば特に制限されず、2以上のコロニーから肝幹細胞様細胞を調製する場合は、コロニー毎に、肝幹細胞様細胞を調製することが好ましく、コロニー毎に処理することによりロット管理が容易となり、肝実質細胞様細胞や胆管様細胞へ分化誘導率が50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上となる肝幹細胞様細胞を取得することができる。

[0058] 上記肝幹細胞様細胞としては、ヒト肝臓に存在するヒト肝幹細胞と同等の特性を有する細胞を挙げることができ、ヒト肝幹細胞と同等の特性としては、ヒト肝幹細胞と同等の分化誘導マーカー発現や、肝前駆細胞様細胞への分化能を有すること等を挙げることができる。

[0059] 上記肝幹細胞様細胞は、分化や増殖のスピードが非常に遅いので、例えば、HepSCF+2F培地等において培養を続け、適宜継代することにより、増殖させることができるとともに、適切な保存方法により長期間保存する

こともできる。上記肝幹細胞様細胞の保存方法としては、ディスパーゼ等の剥離溶液を用いて細胞剥離し、次いで、肝幹細胞様細胞調製培地にDMSO溶液を添加した凍結保存液に上記剥離細胞を浮遊させ、適切な容器に封入した後マイナス70℃～80℃に凍結させた後、液体窒素中で保存する方法を挙げることができる。かかる方法により上記肝幹細胞様細胞は半永久的に保存することができ、解凍後に適切に分化誘導された肝実質様細胞や胆管様細胞は、細胞移植療法における有力なツールとなり、またインビトロにおいて薬剤や化合物の毒性や代謝を評価するためのツールとなりうる。

[0060] 上記ヒト肝幹細胞と同等の分化誘導マーカー発現としては、NCAM、CD29、KLF5 (kruppel like transcription factor 5: Kruppel型転写因子-5)、SOX17 (SRY-related HMG-box transcription factor-17)、CK19 (サイトケラチン19)、FOXA2、HNF4 α 、SOX9、SHH (ソニック・ヘッジホッグ)、LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5)、EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule: 上皮細胞接着分子)、DLK1 (delta-like 1 homolog: デルタ様1ホモログ)、ICAM、CD133等が発現することを挙げることができ、特にFOXA2、HNF4 α が有意に発現することや、初期肝細胞マーカーとして知られているAFP及び／又は初期～成熟肝細胞分化マーカーとして知られているALB (アルブミン) が顕著に低く発現すること又は発現しないことを挙げることができる。

[0061] さらにまた、OCT-3/4やNANOG等の未分化マーカーを発現しないことをヒト肝幹細胞と同等の特性として含めることができ、具体的には、肝細胞様細胞前駆細胞との比較において、AFPやALBの発現が肝細胞様細胞前駆細胞と比較するとそれぞれ2分の1以下、好ましくは3分の1以下、より好ましくは5分の1以下、特に好ましくは10分の1以下であることを例示することができる。

[0062] 上記肝幹細胞様細胞が、肝前駆細胞様細胞への分化能を有するか否かは、上記肝幹細胞様細胞から肝前駆細胞様細胞を調製することができるか否かに

よって決定することもでき、前述のとおり肝幹細胞様細胞をヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とSB431542とY-27632とを添加した肝前駆細胞様細胞調製培地で培養することにより、肝前駆細胞様細胞を調製することができる。

[0063] 上記HGFとしては、例えば、0.1～50 ng/mL、好ましくは1～20 ng/mL、より好ましくは5～15 ng/mL、さらに好ましくは7～12 ng/mLの終濃度になるように、また、FGF7としては、例えば、0.1～50 ng/mL、好ましくは1～20 ng/mL、より好ましくは5～15 ng/mL、さらに好ましくは7～12 ng/mLの終濃度になるように、それぞれ上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝前駆細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0064] 上記SB431542としては、TGF (transforming growth factor) - β のType IレセプターであるALK5の強力で選択的な阻害物質であることが知られている、CAS No. 301836-41-9の化合物又はその誘導体を挙げることができ、例えば、0.1～50 μ M、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは5～15 μ M、さらに好ましくは7～12 μ Mの終濃度になるように肝前駆細胞様細胞調製培地に添加することにより、また、上記Y-27632としては、ROCK (Rho結合キナーゼ) 阻害剤であることが知られている、CAS No. 331752-47-7の化合物又はその誘導体を挙げることができ、例えば、0.1～50 μ M、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは5～15 μ M、さらに好ましくは7～12 μ Mの終濃度になるように肝前駆細胞様細胞調製培地に添加することができる。

[0065] 上記肝前駆細胞様細胞調製培地の具体例としては、以下の表5に示されるHepSCF+4F培地を好適に挙げることができる。

[0066]

[表5]

H e p S C F + 4 F 培地		
基礎培地	H e p S C F 基礎培地	
サプリメント（終濃度）	ビルビン酸ナトリウム	0. 1 1 m g / m L
	インスリン	1 0 μ g / m L
	アボトランスフェリン	5 μ g / m L
	2-メルカプトエタノール	1 0 μ M
	2-エタノールアミン	1 0 μ M
	セレン酸	2 3 n M
	脂肪酸不含アルブミン	4 m g / m L
	ヘパリンナトリウム塩	1 0 0 n g / m L
4 因子（+ 4 F）	H G F	1 0 n g / m L
	F G F 7	1 0 n g / m L
	S B 4 3 1 5 4 2	1 0 μ M
	Y-2 7 6 3 2	1 0 μ M

[0067] 上記肝前駆細胞様細胞としては、ヒト肝臓に存在するヒト肝前駆細胞と同等の特性を有する細胞を挙げることができ、ヒト肝前駆細胞と同等の特性としては、ヒト肝前駆細胞と同等の形態や、ヒト肝前駆細胞と同等の分化誘導マーカー発現や、肝実質細胞様細胞や胆管様細胞へ、必要に応じて即座に分化する能力を有すること等を挙げることができる。

[0068] 上記ヒト肝前駆細胞と同等の形態としては、肝幹細胞よりは細胞自体の大きさが大きく、扁平であり、細胞と細胞の間隙が明瞭なコロニーが形成された形態等を挙げることができる。

[0069] 上記肝前駆細胞様細胞は、例えば、H e p S C F + 4 F 培地等において培養・継代することにより、適宜増殖させることができ、また、肝前駆細胞様細胞の保存方法としては、ディスペーゼ等の剥離溶液を用いて細胞剥離し、次いで、肝幹細胞様細胞調製培地にDMSO溶液を添加した凍結保存液に上記剥離細胞を浮遊させ、適切な容器に封入した後マイナス70℃～80℃に凍結させた後、液体窒素中で保存する方法を挙げることができる。かかる方法により半永久的に保存され、解凍後に適切に分化誘導された肝実質様細胞や胆管様細胞は、細胞移植療法における有力なツールとなりえ、またインビトロにおいて薬剤や化合物の毒性や代謝を評価するためのツールとなりうる

。

- [0070] 上記ヒト肝前駆細胞と同等の分化誘導マーカー発現の特徴としては、肝幹細胞様細胞と比較してCD13、AFP、ALB等がより多く発現していること、特にAFP及びALBの発現が有意に増加することを挙げることができる。また、肝幹細胞様細胞と比較してKLF5、SOX17、CK19、HNF4 α 、SOX9、SHH、LGR5、EpCAM、及び／又はDLK1の遺伝子発現が有意に減少することを挙げることができる。
- [0071] 上記肝前駆細胞様細胞が肝実質細胞様細胞や胆管様細胞への分化能を有するか否かは、上記肝前駆細胞様細胞から、肝実質細胞様細胞や胆管様細胞を調製することができるか否かによって決定することもできる。
- [0072] 上記肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞の調製方法としては、公知の方法であれば特に制限されないが、肝前駆細胞様細胞をHepSCF培地で洗浄し細胞を剥離後、HepSCF+4F培地に懸濁し、コンフルエントになった肝前駆細胞様細胞をHepSCFにHGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、アスコルビン酸、OSM、Wnt3a (Wingless-type MMTV integration site family, member 3A)、及びDAPT (N-[(3,5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-Ala-2-フェニル-L-Gly-t-tert-ブチル-OH)を添加した培地に培地交換し、さらに培地交換を1~15日毎に行いながら培養する方法を例示することができる。
- [0073] 上記HGFとしては、HepSCF+4Fにおける濃度よりも高く、例えば、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mL、より好ましくは10~30ng/mL、さらに好ましくは15~25ng/mLの終濃度になるように、上記ヘパトブラスト培地（例えばHepSCF）に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。
- [0074] 上記SB431542としては、例えば、0.1~50 μ M、好ましくは1~20 μ M、より好ましくは5~15 μ M、さらに好ましくは7~12 μ Mの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実

質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0075] 上記Y-27632としては、例えば、0.1～50 μ M、好ましくは1～20 μ M、より好ましくは5～15 μ M、さらに好ましくは7～12 μ Mの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0076] 上記ニコチンアミドとしては、例えば、0.1～50 mM、好ましくは1～20 mM、より好ましくは5～15 mM、さらに好ましくは7～12 mMの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0077] 上記デキサメタゾンとしては、例えば、0.01～5 μ M、好ましくは0.1～2 μ M、より好ましくは0.5～1.5 μ M、さらに好ましくは0.7～1.2 μ Mの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0078] 上記アスコルビン酸としては、例えば、0.001～1.0 mg/mL、好ましくは0.01～0.2 mg/mL、より好ましくは0.05～0.15 mg/mL、さらに好ましくは0.07～0.12 mg/mLの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0079] 上記OSMとしては、例えば、0.1～100 ng/mL、好ましくは1～50 ng/mL、より好ましくは10～30 ng/mL、さらに好ましくは15～25 ng/mLの終濃度になるように上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0080] 上記Wnt3aとしては、例えば、0.1～100 ng/mL、好ましくは1～50 ng/mL、より好ましくは10～30 ng/mL、さらに好ましくは15～25 ng/mLの終濃度になるように、上記ヘパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0081] 上記DAPTとしては、例えば、0.1～50 μ M、好ましくは1～20

μM 、より好ましくは $5\sim 15\ \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $7\sim 12\ \mu\text{M}$ の終濃度になるように上記へパトブラスト培地に添加することにより肝実質細胞様細胞調製培地を調製することができる。

[0082] また、以下の（a）～（c）の方法により肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞へ誘導することもできる。

（a）肝前駆細胞様細胞を、市販の肝細胞専用培地に、肝細胞培養用添加因子セットからhEGF（組換えヒト上皮細胞成長因子）を除いたものを添加し、 20 ng/mL のオンコスタチンMを添加した培地に、肝前駆細胞様細胞を播種し、 $2\sim 8$ 日間、好ましくは $4\sim 7$ 日間培養することにより、肝実質細胞様細胞へ分化する方法（NIHセンター肝細胞分化方法）；

（b）肝前駆細胞様細胞を、 8.3% のウシ胎児血清（FBS）を添加したL15培地に、 10 ng/mL のHGF、及び 20 ng/mL のオンコスタチンMを添加した培地を用い、肝前駆細胞様細胞を播種し、 $3\sim 10$ 日間、好ましくは $5\sim 9$ 日間培養することにより、肝前駆細胞様細胞を、肝実質細胞様細胞へ分化する方法（Weickert肝細胞分化方法）；

（c）肝前駆細胞様細胞を、ポリビニルアルコール（PVA）を添加したCDM培地に、 30 ng/mL のFGF4、 50 ng/mL のHGF、 50 ng/mL のEGFを添加した培地を用い、肝前駆細胞様細胞を播種し、 $5\sim 15$ 日間、好ましくは $8\sim 12$ 日間培養することにより、肝前駆細胞様細胞を、肝実質細胞様細胞へ分化する方法（Vallier肝細胞分化方法）；

[0083] 上記肝実質細胞様細胞としては、ヒト肝臓に存在するヒト肝実質細胞と同等の特性を有する多能性幹細胞から調製された細胞を挙げることができ、ヒト肝実質細胞と同等の特性としては、ヒト肝実質細胞と同等の形態や、ヒト肝実質細胞と同等の分化誘導マーカー発現を有することを挙げることができる。

[0084] 上記ヒト肝実質細胞と同等の形態としては、細胞がかなり大きく、扁平な形態をもち、多核の細胞も存在する点を挙げることができる。

[0085] 上記ヒト肝実質細胞と同等の分化誘導マーカー発現の特徴としては、肝前

駆細胞様細胞と比較してALBの発現が増えることを挙げることができ、また、ALBとCYP3A4の発現が増えることを挙げることができる。さらに、AAT、UGT1A1、TDO、TTR（Transferrin：トランスフェリン（プレアルブミン））、GSTA1、ASGR1、CYP（Cytochrome P450）1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5、CYP7A1等の成熟肝細胞マーカーとして知られているマーカーが、肝前駆細胞様細胞と比較して顕著に強く発現することをも含めることができる。

[0086] 上記肝前駆細胞様細胞から胆管様細胞の調製方法としては、従来公知の方法であれば特に制限されず、例えば、以下の工程（f）～（h）を順次備える肝前駆細胞様細胞から胆管様細胞を調製するコラーゲンゲル培養法を挙げることができる。

（f）コラーゲンゲル溶液に10倍濃度の基礎培地を1割の割合で混合した混合溶液を調製する工程；

（g）肝前駆細胞様細胞を、前記基礎培地にヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、0.1～100 ng/mL、好ましくは1～50 ng/mL、より好ましくは10～30 ng/mL、さらに好ましくは15～25 ng/mLのHGF、及び0.1～100 ng/mL、好ましくは1～50 ng/mL、より好ましくは10～30 ng/mL、さらに好ましくは15～25 ng/mLのEGFを添加した胆管誘導用培地1に浮遊させ、上記コラーゲン混合溶液と混ぜ、肝前駆細胞様細胞を培養する工程；

（h）工程（g）で培養された細胞を、前記基礎培地にヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、HGF、EGF、及び1% FBS又はTGF- β を添加した胆管誘導用培地2で培養することにより、胆管様細胞を調製する工程；

- [0087] 上記胆管様細胞としては、ヒト肝臓に存在するヒト胆管細胞と同等の特性を有する細胞を挙げることができ、ヒト胆管細胞と同等の特性としては、ヒト胆管細胞と同等の形態を有すること等を挙げることができる。
- [0088] 上記ヒト胆管細胞と同等の形態としては、細胞群が管状の分岐構造を形成していることを挙げることができる。
- [0089] 本発明における分化誘導マーカーの発現を確認する方法としては、各マーカーの発現を、遺伝子レベルで確認する方法や、タンパク質レベルで確認する方法等を挙げることができる。上記各マーカーの発現を遺伝子レベルで確認する場合には、各マーカー遺伝子に対する特異的プライマー対を用いた遺伝子発現解析法、特異的プローブを用いたノーザンブロットング法等によって確認することができる。これらの方法に用いられるプローブやプライマーは、各遺伝子の配列情報に基づいて適宜設計し、適当なオリゴヌクレオチド合成装置を用いて適宜作製することができる。上記各マーカーの発現をタンパク質レベルで確認する方法としては、各マーカーの特異抗体を用いた、免疫染色法、ELISA法等を挙げることができるほか、タンパク質の発現量を解析することができる、イメージアナライザーにより行うことができる。
- [0090] 上記免疫染色法としては、本発明の方法で培養した細胞を、PBS中4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定後、FBSでブロッキングを行った後、各対象マーカータンパク質の抗体と標識抗体とを用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡観察により判定する方法を例示することができる。
- [0091] 上記遺伝子発現解析法としては、本発明の方法で培養した細胞を溶解・破碎後精製したRNAから、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、プライマーや適切な試薬を用いてリアルタイムPCR法を行い、その結果から遺伝子発現を評価する方法を挙げることができる。
- [0092] 本発明は、ヒト肝幹細胞様細胞を調製するための培地を作製するためのキットを提供する。かかるキットは、水に添加して調製した場合に、0.03 mM~1 mMのカルシウムイオンと、500 mg/L~4500 mg/Lの

グルコースとを含む基礎培地を構成する成分群とピルビン酸ナトリウム、インスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、セレン酸、脂肪酸不含アルブミン、ヘパリン又はヘパラン硫酸からなるサプリメントを構成する成分群と、HGFとFGF7等の特別成分群1とを備える。上記基礎培地、サプリメント、又は特別成分を構成する成分は、一部の又は全部の成分（組成物）を個別に包装され、又は2以上の成分を混合して包装される（キット用包装）。上記キットは、さらに培養細胞について、ヒト肝幹細胞の特性の有無を判定するための、分化マーカータンパク質に対する抗体や、分化マーカー遺伝子を検出するためのプライマー、プローブや、添付文書等の付属品を含むこともできる。また、本発明は、肝幹細胞様細胞から肝前駆細胞様細胞を調製するための培地を作製するためのキットを提供する。かかるキットは、上記基礎培地を構成する成分群と、上記サプリメントを構成する成分群と、HGFとFGF7とSB431542とY-27632を含む特別成分群2を備え、上記キット用包装に倣って包装され、上記付属品も含めることができる。さらに本発明は、肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞を調製するための培地を作製するためのキットを提供する。かかるキットは、上記基礎培地を構成する成分群と、上記サプリメントを構成する成分群と、HGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、アスコルビン酸、オンコスタチンM、Wnt3a及びDAPTを含む特別成分群3とを備え、上記キット用包装に倣って包装され、上記付属品も含めることができる。

[0093] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、実施例において用いられる多能性幹細胞であるES細胞株やiPS細胞株については、政府指針に従い分与を受け実験に供した。他の細胞株についても国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所に保管されており、一定条件下で分譲可能である。

実施例

[0094] [実施例1]

[ヒトES細胞由来ヘパトブラストヘテロ細胞集団の作製]

上記非特許文献3を参考に、以下のとおり、ヒトES細胞株H9（以下、「H9細胞」ともいう）から、ヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製した。

[0095] 10 ng/mLのFGF2（片山化学工業社製）を添加したKnock Out血清代替培地（KSR、ThermoFisher Scientific社製）を改良した培地（Knock Out改良培地）において放射線照射により不活性化されたマウス胚フィーダー細胞（MEF）上にて維持されていたH9細胞をフィーダーフリーにて、2 μ g/cm²の牛フィブロネクチン上でhESF-FX培地（和光純薬工業社製）を用いてT25フラスコで培養した。細胞剥離液アキュターゼ（Merck Millipore社製）1 mLを添加し、室温で2～3分間静置した。10 mLのmTESR培地（STEMCELL Technologies社製）をT25フラスコに添加し、H9細胞をスクレーパーで剥離した。剥離したH9細胞をT25フラスコから15 mL遠沈管に回収し、さらにT25フラスコを2 mLのmTESR培地を用いてリンスすることにより、H9細胞を遠沈管に再回収した。遠沈管に回収及び再回収されたH9細胞を含むmTESR培地を800 rpmにて2分間遠心した。遠沈管から上清を除き、タッピングをすることにより細胞を分散させた後、10 mLのmTESR培地を遠沈管に添加し、再度、800 rpmにて2分間遠心した。遠沈管から上清を除き、mTESR培地を遠沈管に添加して細胞を懸濁し、600000個細胞/ウェルになるようにH9細胞をGelTrex（ThermoFisher Scientific社製）をコーティングした24ウェルプレートに播種した。なお、上記Knock Out改良培地は、終濃度20%のKSR、0.1 mMの2-メルカプトエタノール（シグマアルドリッチ社製）、2 mMのL-グルタミン（ThermoFisher Scientific社製）、0.1 mMの非必須アミノ酸（ThermoFisher Scientific社製）、及び4又は10 ng/mLのヒトリコンビナントFGF2を添加したKnock OutTMDMEM/F-12培地（ThermoFisher Scientific社製）である。

[0096] 播種されたH9細胞は、37℃にて、5%CO₂存在下にてインキュベータ

ーを用いて24時間培養された。24時間後、500mLのRPMI1640 (ThermoFisher Scientific社製) / B27 (ーインスリン) (ThermoFisher Scientific社製) に、non-essential amino acidと100ng/mLのアクチビンAと10ng/mLのBMP4と20ng/mLのFGF2とを添加した培地に交換し、2日間培養した。

[0097] 2日後、上記培養細胞をRPMI1640 / B27 (ーインスリン) にnon-essential amino acidと100ng/mLのアクチビンAとを添加した培地に交換し、3日間培養した。3日後、上記培養細胞をRPMI1640 / B27 にnon-essential amino acidと20ng/mLのBMP4と20ng/mLのFGF2とを添加した培地に交換し、5日間培養した。5日後、RPMI1640 / B27 に非必須アミノ酸と20ng/mLのHGF (R&Dシステムズ社製) とを添加した培地に交換し、2日間培養した。

[0098] 上述の手順で得られたH9細胞由来の細胞の位相差画像を図1に示す。かかる位相差画像は、位相差顕微鏡 (M125 Leica社製) により撮影された。画像から明らかなとおり、上皮様細胞や間葉系細胞様細胞が混在する一方で、ヘパトブラストの形態に似たコロニーも確認できた点で、ヘテロなヘパトブラスト細胞集団 (ヘパトブラストヘテロ細胞集団) であるといえる。

[0099] [実施例2]

[ヒトES細胞由来肝幹細胞様細胞の単離]

上記H9細胞由来ヘパトブラストヘテロ細胞集団を2日間培養後に培地を除き、ヘパトブラストヘテロ細胞集団に0.5mLのディスパーゼ (Roche社製) を添加し、37℃にて4分間静置した。静置後ディスパーゼを除き、3mLの前記HepSCF培地で洗浄後、2mLのHepSCF培地を添加し、スクレーパーで細胞を剥離した。

[0100] (ヘパトブラストヘテロ細胞集団のHepSCF+2F培地での培養)

上記剥離された細胞は、15mLの遠沈管に回収され、1000rpmにて1分間遠心後、遠沈管から上清を除き、HepSCF培地に10ng/mLのHGFと10ng/mLのFGF7 (R&Dシステムズ社製) を添加す

ることにより調製されたHepSCF+2F培地に懸濁し、 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチン（Sigma Aldrich社製）をコーティングした6ウェルプレートに播種した。播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、 37°C にて5% CO_2 存在下にてインキュベーターを用いて4日間培養後、HepSCF+2F培地に1回目の継代を行った。

[0101] （ヘパトブラストヘテロ細胞集団の蛍光免疫染色）

上記蛍光免疫染色を以下の手順で行った。6ウェルプレートに細胞を播種し（0日）、6～8日後に、培養上清を除き、細胞をPBSで洗浄した。洗浄した細胞に4%パラホルムアルデヒド（PFA）（和光純薬工業社製）を移し、室温で15分間静置して、細胞をウェルに固定した。4%PFAを除き、PBSで細胞を3回洗浄した。固定した細胞を洗浄後3%FBSを添加し、室温にて30分間ウシ血清を用いてブロッキングした。3%FBSを除き、一次抗体を加えた後 4°C にて一晩反応させた後、一次抗体を除きPBSで3回洗浄した。PBSでの洗浄後二次抗体を加え、室温にて1時間反応させ、二次抗体を除いてPBSで1回洗浄した後、蛍光顕微鏡下に観察を行った。結果を図2（a）～（d）に示す。「Merge」は、各抗体による染色画像をオーバーレイしたものである。

[0102] 図2から明らかなとおり、HepSCF+2F培地での1回目の継代後の細胞集団においては、FOXA2（a）は全体的に強く発現しており、HNF4 α （b）は、発現が強い細胞と発現が弱い細胞が観察され、AFP（c）は、全体的に発現しているが、発現が特に強い細胞と発現が弱い細胞が見受けられた。Merge（d）において、矢印の部分が、AFPの発現が弱まっていることから肝幹細胞コロニーとなるのではないかと予想した。

[0103] （肝幹細胞様細胞の位相差画像）

前記第1回目の継代後のH9細胞由来のヘパトブラストヘテロ細胞集団は、2日間毎にさらにHepSCF+2F培地で継代を行い、顕微鏡下又は目視にて観察を続けた。2継代目にそれまでのヘテロな細胞集団とは明らかに形態の異なるコロニーを見いだしたため、マイクロピペットのチップの先端

を用いてかかるコロニーを培地から剥離することにより単離した。コロニーから単離された細胞群の位相差画像を図3に示す。実体顕微鏡下で観察したときに、高く盛り上がっている形態や、細胞がやや小さく、細胞と細胞の間隙が非常に狭いコロニーを形成することから肝幹細胞の特徴を示していることが確認された。

[0104] [E S細胞由来肝幹細胞様細胞の肝前駆細胞様細胞への分化]

上記HepSCF+2F培地において増殖しているES細胞(H9)由来の肝幹細胞様細胞を、HepSCFに10ng/mLのHGF、10ng/mLのFGF7、10μMのSB431542(TOCRIS社製)、10μMのY-27632(和光純薬工業社製)を添加した培地(HepSCF+4F培地)で培養したところ、上記単離された肝幹細胞コロニー由来の細胞が、さらに肝前駆細胞様細胞に分化していることが確認された。上記HepSCF+4F培地中の肝前駆細胞様細胞の位相差画像を図4に示す。顕微鏡による観察により、肝幹細胞より大きく扁平な形態であり、細胞と細胞の間隙が明瞭なコロニーが確認されたことから、肝前駆細胞様細胞であることがわかる。

[0105] 上記HepSCF+4F培地中でH9由来の肝幹細胞様細胞から誘導された細胞群について、FOXA2、AFP、HNF4αをマーカーとして用いて、蛍光免疫染色により細胞の陽性率を解析した。具体的な手順は、上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団の蛍光免疫染色の手順にしたがった。なお、核を染色するためにヘキスト33342を用いて染色を行った。「Brightfield」は位相差画像を撮影したものである。結果を図5に示す。

[0106] (結果)

図5(a)、(b)、(c)、(d)、(e)から明らかなおとおり、上記HepSCF+4F培地中の肝幹細胞から誘導された細胞群は、FOXA2、HNF4αとともにAFPを強く発現していることが確認され、肝幹細胞からさらに分化した肝前駆細胞様細胞であることが確認された。

[0107] [実施例3]

[ヒト i P S 細胞由来へパトブラストヘテロ細胞集団の作製]

i P S 細胞を遺伝子導入によりへパトブラストヘテロ細胞集団に誘導した。ヒト i P S 細胞として、ヒト i P S 細胞 D o t c o m 株 (J C R B 1 3 2 7) (医薬基盤健康栄養研・ J S C B 細胞バンク) (以下「 D o t c o m 株 」ともいう) を使用した。中内胚葉 (mesendoderm) 分化を促進するために、上記ヒト i P S 細胞を、細胞分離試薬アキュターゼ (ミリポア社製) を用いて単細胞に分離した。 B D マドリゲル (登録商標) (コーニング社製) 上に、ヒト E S 細胞分化誘導用基礎培地 h E S F - D I F (細胞科学研究所製) に、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトリコンビナントインスリン (シグマ社製) 、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトアポトランスフェリン (シグマ社製) 、 $10 \mu\text{M}$ の 2 -メルカプトエタノール (シグマ社製) 、 $10 \mu\text{M}$ のエタノールアミン (シグマ社製) 、 $10 \mu\text{M}$ のセレン酸ナトリウム (シグマ社製) 、 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ のウシ血清アルブミン (シグマ社製) (P B S (phosphate-buffered saline) にて調製) 、 及び $100 \text{ng}/\text{mL}$ のアクチビン A (R & D システムズ社製) をサプリメントとして添加した培地に、上記分離単細胞を播種した。この日を分化 0 日目とする。2 日間培養し、ヒト i P S 細胞由来中内胚葉様細胞 (mesendoderm cells) を得た。

[0108] 2 日後、内胚葉細胞を作製するため、上記 D o t c o m 株由来中内胚葉様細胞を、 H O X A 2 遺伝子を挿入した A d ベクター (A d - F O X A 2) に、 1500VP (vector particle) / 細胞に 1.5 時間感染させた。 A d - F O X A 2 感染細胞を、 B D マトリゲル上に、 $100 \text{ng}/\text{mL}$ のアクチビン A を添加した h E S F - D I F 培地において、分化 6 日目まで培養を続けることにより、内胚葉細胞を得た。

[0109] 上記内胚葉細胞からへパトブラストヘテロ細胞集団への分化をさらに進めるため、分化 6 日目に、上記内胚葉細胞に、上記 A d - F O X A 2 と、 H N F 4 α 遺伝子を挿入した A d ベクター (A d - H N F α) とを、 $1,500 \text{VP}$ (vector particle) / 細胞にて 1.5 時間感染させた。 A d - F O X A 2 ・ A d - H N F α 感染細胞を、 B D マトリゲル上に、骨形成タンパク質 4 (bon

e morphogenetic protein 4: (BMP 4)、R & Dシステムズ社製) 及び 20 ng/mL の FGF-4 (R & Dシステムズ社製) を添加した肝細胞培養培地 (hepatocyte culture medium: HCM) (Lonza社製) において、3日間培養した。

[0110] 上述の手順で得られた Dot com 株由来の細胞の位相差画像を図 8 に示す。画像から明らかなとおり、上皮系様の細胞や間葉系細胞様細胞が存在する一方で、肝前駆細胞様細胞も確認できた点で、ヘパトブラストヘテロ細胞集団であるといえる。

[0111] [実施例 4]

[ヒト iPS 細胞由来肝幹細胞様細胞の単離]

上記 Dot com 株由来ヘパトブラストヘテロ細胞集団を 2 日間培養後に上記 HCM 培地を除き、ヘパトブラストヘテロ細胞集団に 0.5 mL のディスパーゼを添加し、37℃にて 4 分間静置した。静置後ディスパーゼを除き、3 mL の Hep SCF 培地で洗浄後、2 mL の Hep SCF 培地を添加し、スクレーパーで細胞を剥離した。

[0112] (ヘパトブラストヘテロ細胞集団の Hep SCF + 2F 培地での培養)

上記剥離された細胞は、15 mL の遠沈管に回収され、1000 rpm にて 1 分間遠心後、遠沈管から上清を除き、HGF + FGF 7 を添加した Hep SCF 培地 (Hep SCF + 2F 培地) 培地に懸濁され、2 μ g/cm² のフィブロネクチンがコーティングされた 6 ウェルプレートに播種された。播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、37℃にて 5% CO₂ 存在下にてインキュベーターを用いて培養を行った。4 日から 7 日間毎に Hep SCF + 2F 培地で数回継代を行い、顕微鏡下又は目視にて観察を続けたところ、2 継代から 3 継代目にそれまでのヘテロな細胞集団ではなく、コロニーとして増殖している細胞を見いだした (図 9 参照)。マイクロピペットのチップの先端を用いてかかるコロニーを培地から剥離することにより単離した。コロニーから単離された細胞の位相差画像を図 10 に示す。4 継代後も細胞が小さく、強くパッキングされたコロニーを形成する点でヒト肝幹細胞の特徴

を示した。

[0113] 前記剥離された細胞は、また、HepSCF培地に、BMP4、HGF、FGF7、BMP4+HGF、BMP4+FGF7、又はBMP4+HGF+FGF7を添加した培地にそれぞれ懸濁され、 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンがコーティングされた各培地のウェルに播種された。いずれの培地においても2継代目に核：細胞質の比が大きい、強くパッキングされた小さいコロニーが形成されたが、BMP4、BMP+HGF、BMP4+FGF7を添加した培地においては、強くパッキングされたコロニーは消失した。一方、HGF、FGF7、BMP4+HGF+FGF7を添加した培地においては4継代後も強くパッキングされたコロニーが形成された

[0114] 1回から5回継代を行った細胞について、継代後5～8日後の細胞を、抗体を用いて免疫染色を行った。HepSCF培地に、BMP4+HGF、BMP4+FGF7、又はBMP+HGF+FGF7を添加した培地で培養された細胞は、平たくて大きい細胞で、より肝実質細胞への分化が進んでいると考えられた。一方、HepSCF培地に、HGF、FGF7、HGF+FGF7を添加した培地で培養された細胞は、強くパッキングされた細胞で、FOXA2やHNF4 α の抗体による染色が強く、AFPでの染色は弱く、肝細胞への分化がより進んでいないと考えられた（データ示さず）。さらに5回目の継代後5～8日経過した細胞について、イメージアナライザー（In Cell Analyzer 2000; GE Healthcare Life Sciences社製）による解析を行った。結果を図6に示す。

[0115] 図6から明らかとなおり、HepSCF+HGF+FGF7（HepSCF+2F培地）で培養され、コロニーとして単離された細胞は、他のいずれの5継代目の細胞よりもFOXA2陽性細胞やHNF4 α 陽性細胞の比率が高く、AFPの発現は比較的低かった。したがって、上記単離されたコロニーは、内胚葉細胞の特徴を有し、かつ初期ヘパトブラストマーカを発現していることから肝細胞系の細胞であることは明確であるが、ヘパトブラストヘテロ細胞集団においては、未分化度の高い細胞であり、分化の速度が遅い

細胞であると考えられ、肝幹細胞様細胞であると判断した。

[0116] なお、HepSCF+2F培地の作用を確認するために、前記Valleyer法により調製したTic細胞由来のヘパトブラストヘテロ集団や、非特許文献3に記載のDuncan法により調製されたH9細胞由来のヘパトブラストヘテロ細胞集団についても培養を行った。いずれにおいても、強くパッキングされたコロニーが形成され、かかるコロニーを単離することにより肝幹細胞様細胞が調製できることが確認された

[0117] [実施例5]

[iPS細胞由来肝幹細胞様細胞の肝前駆細胞様細胞への分化]

以上のとおり、HepSCF+2F培地において単離することができる細胞（コロニー）は、未分化性が高く維持されているため、分化処理のコントロールがしやすく、肝細胞分化のための培地として適切であると考えられたが、細胞の増殖速度が非常に遅い。そのため、他の因子を添加することにより、増殖速度や分化速度を速めることができるかを検討した。検討した因子は、LY294002、GFX（GF109203X）、SB431542、MAPK／ERKキナーゼの一種であるMEK1及びMEK2の選択的阻害剤であるU0126、BIO、及びY-27632である。

[0118] 細胞生存アッセイにおいては、AlamarBlueアッセイが用いられた。細胞は、 1×10^4 細胞の密度にて96ウェルプレートに播種され、3日ごとに培地交換を行いながら7日間培養された。AlamarBlue試薬は、各ウェルに添加され、CO₂インキュベーター下で7℃にて3時間培養された後、各ウェルの蛍光強度がマイクロプレートリーダー（EnSpire PerkinElmer社製）により測定された。細胞生存アッセイによる結果を図7に示す。

[0119] 図7から明らかなとおり、細胞生存アッセイによると、HepSCF+2F培地へY-27632を添加した培地における、細胞生存率はHepSCF+2F培地における細胞生存率のほぼ2倍であった。SB431542のHepSCF+2F培地への添加は、やや細胞生存率を増加させた。U0126のHepSCF+2F培地への添加は細胞生存性に変化をほとんどもた

らさなかった。HepSCF+2F培地へのLY294002の添加は、細胞生存性を低くした。HepSCF+2F培地へBIO又はGFxを添加すると、細胞生存性は非常に低くなり、7日目以降に細胞が消失した。

[0120] Y-27632をHepSCF+2F培地に添加すると細胞の生存性が増加し、また、SB431542をHepSCF+2F培地に添加すると細胞の生存性がやや増加したことから、10 μ MのY-27632と10 μ MのSB431542とを組み合わせるHepSCF+2F培地に添加した効果を検討した。

[0121] SB431542の添加は、HNF4 α 、NCAM、及びCD133の発現を減少させ、AFP及びALBの発現を増加させた。Y-27632の添加は、FOXA2、HNF4 α 、NCAM、CD13及びEPCAMの発現を減少させた。U0126の添加はFOXA2、CK19及びCD133の発現を減少させ、AFP及びALBの発現を増加させた（データ示さず）。

[0122] 細胞生存アッセイと肝細胞系マーカーの発現の結果から、10 μ MのY-27632と10 μ MのSB431542とを組み合わせるHepSCF+2F培地に添加した効果を検討したところ、細胞生存率は2.7倍になり、細胞の形態が変化し、丸石状になった。

[0123] 上記HepSCF+2F培地において増殖しているDotcom株由来の肝幹細胞様細胞を、HepSCF+4F培地（HepSCF+2F+10 μ MのSB431542+10 μ MのY-27632）で培養したところ、上記単離されたコロニー由来の細胞が、さらに肝前駆細胞様細胞に分化し、増殖が行われることが確認された。HepSCF+4F培地中の肝前駆細胞様細胞の位相差画像を図11に示す。各矢印が指す細胞が、肝幹細胞よりやや大きく扁平な形態であることから、肝前駆細胞様細胞であることがわかる。

[0124] 前記HepSCF+2F培地で培養されたDotcom株由来の肝幹細胞様細胞とさらに上記HepSCF+4F培地で培養された肝前駆細胞様細胞とについて、各マーカーについて遺伝子発現解析を行った。

[0125] 細胞溶解液RLTバッファを用いて、肝幹細胞様細胞及び肝前駆細胞様

細胞をそれぞれ溶解後、各細胞溶解液をQ i a s h u l e d d e rカラムに回収し、13000rpmにて2分間遠心して、細胞を破碎した。破碎された各細胞からR N e a s yキットを使用して、RNAを精製し、精製した各RNA250ngと逆転写酵素を含むS u p e r S c r i p t（登録商標）V I L O™c D N A S y n t h e s i sキットを用いてc D N Aを合成した。合成されたc D N A、標的プライマーセット、S Y B R P r e m i x E x T a q I Iを用いて、リアルタイムPCRを行い、リアルタイムPCRの結果から、マーカー遺伝子発現を評価した。結果を図12に示す。

[0126] 図12から明らかなとおり、H e p S C F + 2 F培地によりD o t c o m株由来のヘパトブラスト誘導された肝幹細胞様細胞については、未分化のi P S細胞と比較して、肝実質細胞方向への分化が進んでいることを示すN C A M、C D 2 9、K L F 5、S O X 1 7、C K 1 9、F O X A 2、H N F 4 α 、S O X 9、S H H、L G R 5、E p C A M、D L K 1、I C A M、C D 1 3 3の発現量が顕著に（***）増加した。相対的遺伝子発現量（Relative gene expression）としては、少なくとも3倍、ほとんどの場合4倍以上増加した。また、初期肝細胞マーカーとして知られているA F Pと初期～成熟肝細胞分化マーカーとして知られているA L BやC D 1 3の発現量は、未分化のi P S細胞と比較してごく微量増加しているにとどまり、肝幹細胞としての特徴が強く示されていることが確認された。

[0127] また、H e p S C F + 4 F培地において誘導された細胞については、H e p S C F + 2 F培地において誘導された肝幹細胞様細胞と比較して、N C A M、K L F 5、S O X 1 7、C K 1 9、H N F 4 α 、S O X 9、S H H、L G R 5、E p C A M、及びD L K 1の遺伝子発現は顕著に（***）減少した。相対的な遺伝子発現量（Relative gene expression）としては、少なくとも二分の一、ほとんどの場合四分の一以下になった。また、C D 2 9、F O X A 2、I C A M、及びC D 1 3 3の遺伝子発現量にほとんど変化はなく、C D 1 3、A F P、及びA L Bの発現は顕著に（***）増加した。

[0128] 以上の結果より、H e p S C F + 2 F培地で単離された細胞をH e p S C

F + 4 F 培地にて培養した場合、CD 1 3、A F P、及びA L Bが強く発現した。一方、N C A M、C D 2 9、K L F 5、S O X 1 7、C K 1 9、H N F 4 α 、S O X 9、及びE p C A Mの発現が弱くなり、i P S細胞由来肝前駆細胞様細胞が生じていることを確認した。

[0129] [実施例 6]

[i P S細胞由来肝前駆細胞様細胞の肝実質細胞様細胞への分化誘導]

上記D o t c o m株由来肝前駆細胞様細胞を肝実質細胞様細胞へ分化の誘導を検討した。上記6ウェルプレートで培養しているi P S細胞由来肝前駆細胞様細胞からH e p S C F + 4 F培地を除き、1 m Lのディスパーゼを移して、3 7℃にて1分間静置した。静置後i P S細胞由来肝前駆細胞様細胞を7 m LのH e p S C F培地で洗浄し、さらに5 m LのH e p S C F培地を添加し、スクレーパーで細胞を剥離した。剥離した肝前駆細胞様細胞を1 5 m Lの遠沈管に回収し、プレートをさらにH e p S C F培地を用いてリンスすることにより、肝前駆細胞様細胞を遠沈管に再回収した。遠沈管に回収及び再回収された肝前駆細胞様細胞を含むH e p S C F培地を1 0 0 0 r p mにて1分間遠心した。上清を除き、タッピングで細胞を分散させた後、H e p S C F培地に1 0 n g / m LのH G F、1 0 n g / m LのF G F 7、1 0 μ MのS B 4 3 1 5 4 2、及び1 0 μ MのY - 2 7 6 3 2を添加したH e p S C F + 4 F培地で懸濁し、 $2 \times 1 0^4 \sim 4 \times 1 0^4$ 個 / ウェルの細胞を 2μ g / c m²のフィブロネクチンがコートされた4 8ウェルプレートに播種した。

[0130] H e p S C F + 4 F培地にさらに別の因子、E G F、ニコチンアミド、及び／又はデキサメタゾンを添加してさらに肝前駆細胞様細胞の培養について検討を続けたところ、細胞生存率は、E G Fのみを添加した場合と、E G F、ニコチンアミド、及びデキサメタゾンを添加した場合は増加したが、ニコチンアミドとデキサメタゾンを添加した場合は変化がなかった。肝細胞系遺伝子の発現は、ニコチンアミドとデキサメタゾンを添加した場合は変化がほとんどなく、E G Fのみを添加した場合は減少した。特にH e p S C F

+4 F 培地に EGF を添加した場合には、ヘパトブラスト様細胞で発現していた肝細胞としての特徴的なマーカーの発現が減少し、肝細胞への分化能が低減することが考えられた。

[0131] 肝前駆細胞様細胞が分化能を維持しているかどうかを確認するために、HepSCF+4 F 培地において、80～90%コンフルエントになった肝前駆細胞様細胞を上記Valleir肝細胞分化方法(Nat. Protoc. 8 (2013) 430-437)やDuncan (非特許文献3)ら論文で報告している方法で培養を行ったところ、細胞死や、肝細胞系細胞の形態以外への形態の変化を招いたので、さらに添加因子の検討を続け、FGF7を用いることなくHepSCFに20 ng/mLのHGF、10 μ MのSB431542、10 μ MのY-27632、10 mMのニコチンアミド、1 μ Mのデキサメタゾン、0.1 mg/mLのアスコルビン酸、20 ng/mLのOSMを添加した培地を、HepSCF+7 F 培地として、検討することとした。

[0132] HepSCF+4 F 培地において、80～90%コンフルエントになった肝前駆細胞様細胞を、上記HepSCF+7 F 培地、上記HepSCF+7 F に10 μ MのDAPTを添加した7 F+Da 培地、又は、上記HepSCF+7 F に10 μ MのDAPT、20 ng/mLのWnt3aを添加したHepSCF+7 F+Da+Wn 培地を用い、8日毎に培地を交換して培養を続けた。

[0133] HepSCF+4 F 培地、HepSCF+7 F 培地、HepSCF+7 F+Da 培地、HepSCF+7 F+Da+Wn 培地での培養30日目の細胞において、AFP、ALB、AAT、UGT1A1、TDO、TTR、GSTA1、ASGR1、CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5、CYP7A1の19種類のマーカー発現についてRNA解析を行い、マーカー発現を評価した。結果を図13に示す。

[0134] (結果)

図13から明らかなとおり、従来ヘパトブラスト細胞や肝前駆細胞と比較

的強く発現することが知られているAFPやTTRが、HepSCF+7F培地、HepSCF+7F+Da培地、HepSCF+7F+Da+Wn培地で培養された細胞では発現量が低下し、肝実質細胞様細胞への分化が進んでいることが推定された。一方、成熟肝細胞マーカーとして知られ、肝（実質）細胞で発現することが知られている、ALB、AAT、UGT1A1、TDO、GSTA1、ASGR1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5、CYP7A1等の肝細胞の具体的な機能を示すマーカーのいずれにおいても、HepSCF+4F培地（HBC）と比較して4倍以上発現していた。一方、常在的に肝実質細胞では発現していないことが知られているCYP1A1の発現は弱かった。また、7F培地や、7F+Da培地で培養された細胞よりも、HepSCF+7F+Da+Wn培地で培養された細胞において、肝細胞の具体的な機能を示すマーカーが強く発現しており、HepSCF+7F+Da+Wn培地において、肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞への分化の程度が高いことが示されている。なお、HepSCF+4F培地にニコチンアミドとデキサメタゾンを加えた培地（ネガティブコントロール用培地）よりも、HepSCF+7F+Da+Wn培地のほうが、上記成熟肝細胞マーカー群が顕著に強く発現することも確認している（データ示さず）。したがって、HepSCF+7F+Da+Wn培地は、肝実質細胞様細胞調製培地として適していることが確認された。

[0135] 上記HepSCF+7F+Da+Wn培地での培養30日目の細胞について、ALB及びAATをマーカーとして用いて、蛍光免疫染色により細胞の陽性率を解析した。具体的な手順は、上記ヘパトブラストヘテロ細胞集団の蛍光免疫染色の手順にしたがった。結果を図14に示す。

[0136] 図14から明らかなとおり、7F+Da+Wn培地で培養された肝前駆細胞様細胞は、培養後ALBとAATの発現が非常に強く、肝実質細胞様細胞に分化していることが確認された。

[0137] [実施例7]

[i P S細胞由来肝前駆細胞様細胞の胆管様細胞への分化誘導]

上記D o t c o m株由来肝前駆細胞様細胞を胆管様細胞へ分化を誘導した。上記6ウェルプレートで培養されているi P S細胞由来肝前駆細胞様細胞からH e p S C F + 4 F培地を除き、1 m Lのディスパーゼを移して、3 7℃にて1分間静置した。静置後i P S細胞由来肝前駆細胞様細胞を7 m LのH e p S C F培地で洗浄し、さらに5 m LのH e p S C F培地を添加し、スクレーパーで細胞を剥離した。剥離した肝前駆細胞様細胞を1 5 m Lの遠沈管に回収し、プレートをさらにH e p S C F培地を用いてリンスすることにより、肝前駆細胞様細胞を遠沈管に再回収した。遠沈管に回収及び再回収された肝前駆細胞様細胞を含むH e p S C F培地を1 0 0 0 r p mにて1分間遠心した。上清を除き、タッピングで細胞を分散させた後、D M E M / F 1 2 (ThermoFisher Scientific社製)に、1 0 μ g / m Lのヒトインシュリン、5 μ g / m Lのヒトアポトランスフェリン、1 0 μ Mの2-アミノエタノール、1 0 μ Mの2-メルカプトエタノール、1 0 n Mのセレン酸ナトリウム、4 m g / m Lの脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、2 0 n g / m LのH G F、及び2 0 n g / m LのE G Fを添加した胆管誘導用培地1で培養して、胆管細胞誘導用細胞懸濁液を調製した。

- [0138] 0. 2 4 %のタイプ1コラーゲン、1 × D M E M、2 0 m MのH E P E S、0. 2 2 %のN a H C O₃、及び5 m MのN a O Hを含むコラーゲングル溶液と混合してコラーゲングル溶液とし、4 8ウェルプレートに播種し、3 7℃にて3 0分間C O₂インキュベーターでゲル化させた。3 0分後、コラーゲングル化したコラーゲングル溶液の上に、D M E M / F 1 2に1 0 μ g / m Lのヒトインシュリン、5 μ g / m Lのヒトアポトランスフェリン、1 0 μ Mの2-アミノエタノール、1 0 μ Mの2-メルカプトエタノール、1 0 n Mのセレン酸ナトリウム、4 m g / m Lの脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、2 0 n g / m LのH G F、及び2 0 n g / m LのE G Fを添加した胆管誘導用培地1を浮遊させ、3 7℃にてC O₂インキュベーターで肝前駆細胞様細胞を培養した。

[0139] 上記培養開始 1 日後から、2 日毎に DMEM/F12 に $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトインシュリン、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトアポトランスフェリン、 $10 \mu\text{M}$ の 2-アミノエタノール、 $10 \mu\text{M}$ の 2-メルカプトエタノール、 10nM のセレン酸ナトリウム、 $4 \text{mg}/\text{mL}$ の脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、 $20 \text{ng}/\text{mL}$ の HGF、 $20 \text{ng}/\text{mL}$ の EGF、及び 1% FBS を添加した胆管誘導用培地 2 に培地交換し、10 日間コラーゲンゲル培養を行った。

[0140] 上記コラーゲンゲル培養を行った培地において、顕微鏡により観察を行ったところ明らかな胆管分化細胞が現れたので 4% PFA で 30 分間固定し、0.5% トリトン X-100 を含む PBS 溶液で、細胞のパーミライズを行った。3% の FBS を含む PBS 溶液でブロッキングを室温にて 30 分間行った。抗 CK19 抗体で 4°C にて一晩反応させた後 PBST で 3 回洗浄した。二次抗体 AP（アルカリフォスファターゼ）を添加して 4°C にて一晩反応させた後 PBST（Phosphate Buffered Saline with Tween（登録商標）20）で 3 回洗浄した。AP の基質を加えて反応させ、発色後、PBST で 2 回洗浄した。顕微鏡で観察して、画像を撮影した。結果を図 15 に示す。

[0141] 図 15 より明らかなとおり、細胞は、管状の分岐構造であり、胆管細胞と同等の構造を有する胆管様細胞であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0142] 本発明は、医療分野において非常に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（a）～（e）を順次備える多能性幹細胞から肝幹細胞様細胞を調製する方法。
- （a）多能性幹細胞からヘパトブラストヘテロ細胞集団を調製する工程；
- （b）工程（a）において調製されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とを添加した肝幹細胞様細胞調製培地に播種する工程；
- （c）工程（b）において播種されたヘパトブラストヘテロ細胞集団を、前記肝幹細胞様細胞調製培地に2回以上継代する工程；
- （d）前記肝幹細胞様細胞調製培地に産生した肝幹細胞様細胞コロニーを前記肝幹細胞様細胞調製培地から単離する工程；
- [請求項2] ヘパトブラスト培地が、0.03mM～1mMのカルシウムイオンと、500mg/L～4500mg/Lのグルコースとを含む基礎培地に、サプリメントを構成する培地成分を添加することにより作製される培地であることを特徴とする請求項1記載の方法。
- [請求項3] 肝幹細胞様細胞調製培地を培養容器の内側にコートされたフィブロネクチン上に調製することを特徴とする請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか記載の方法で調製された肝幹細胞様細胞。
- [請求項5] 請求項4記載の肝幹細胞様細胞を、ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とSB431542とY-27632とを添加した肝前駆細胞様細胞調製培地で培養する工程を備える肝前駆細胞様細胞を調製する方法。
- [請求項6] 請求項5記載の方法で調製された肝前駆細胞様細胞。
- [請求項7] 請求項6記載の肝前駆細胞様細胞を、ヘパトブラスト培地にHGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、アスコルビン酸、オンコスタチンM、Wnt3a及びDAPTを添加した肝実質細胞様細胞調製培地で培養する工程を備える肝実質細胞

胞様細胞を調製する方法。

[請求項8] 請求項7記載の方法で調製された肝実質細胞様細胞。

[請求項9] 以下の工程（f）～（h）を順次備える請求項6記載の肝前駆細胞様細胞から胆管様細胞を調製する方法。

（f）コラーゲンゲル溶液に10倍濃度の基礎培地を1割の割合で混合した混合溶液を調製する工程；

（g）肝前駆細胞様細胞を、前記基礎培地にヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、HGF、及びEGFを添加した胆管誘導用培地1に浮遊させ、上記コラーゲン混合溶液と混ぜ、肝前駆細胞様細胞を培養する工程；

（h）工程（g）で培養された細胞を、前記基礎培地に、ヒトインシュリン、ヒトアポトランスフェリン、2-アミノエタノール、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、HGF、EGF、並びに、1% FBS及び／又はTGF- β を添加した胆管誘導用培地2で培養することにより、胆管様細胞を調製する工程；

[請求項10] 請求項9記載の方法で調製された胆管様細胞。

[請求項11] ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とを添加した肝幹細胞様細胞を調製するための培地。

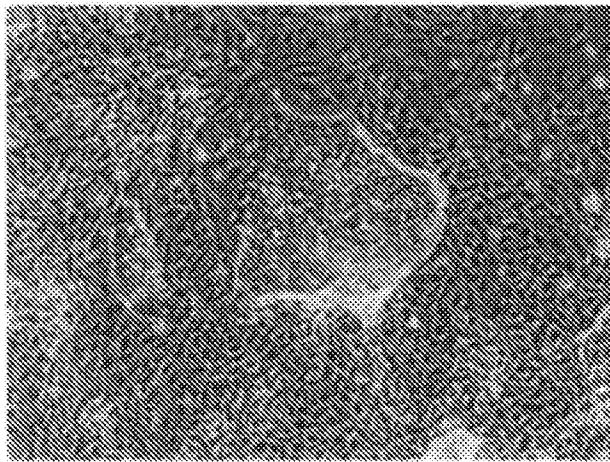
[請求項12] ヘパトブラスト培地にHGFとFGF7とSB431542とY-27632とを添加した肝幹細胞様細胞から肝前駆細胞様細胞を調製するための培地。

[請求項13] ヘパトブラスト培地にHGF、SB431542、Y-27632、ニコチンアミド、デキサメタゾン、アスコルビン酸、オンコスタチンM、Wnt3a及びDAPTを添加した肝前駆細胞様細胞から肝実質細胞様細胞を調製するための培地。

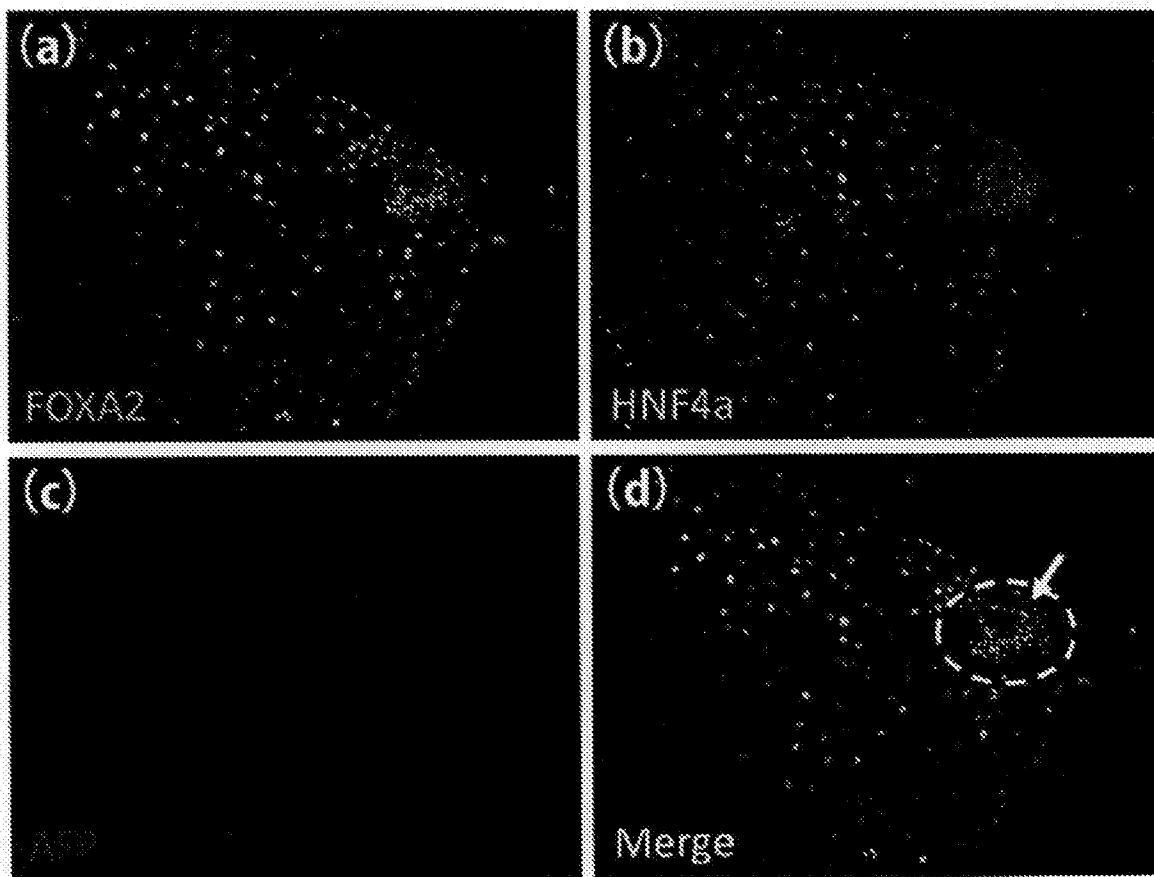
[請求項14] ヘパトブラスト培地が、0.03mM～1mMのカルシウムイオンと

、 $500\text{ mg/L} \sim 4500\text{ mg/L}$ のグルコースとを含む基礎培地に、サプリメントを構成する培地成分を添加することにより作製される培地であることを特徴とする請求項11～13のいずれか記載の培地。

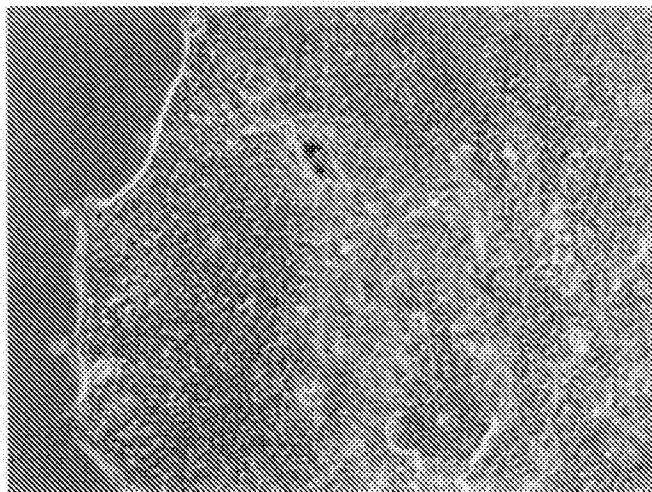
[図1]



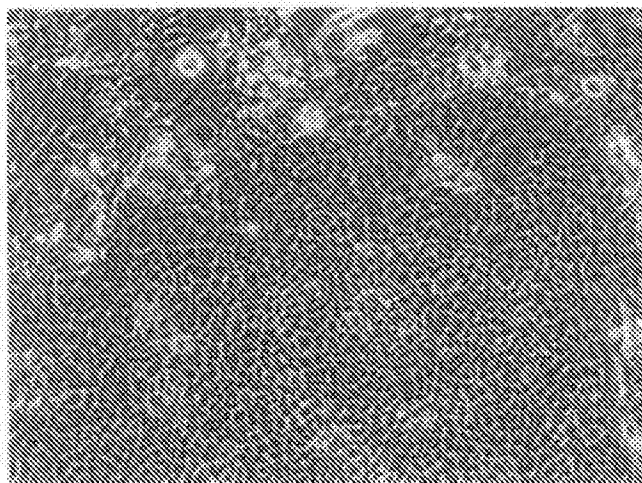
[図2]



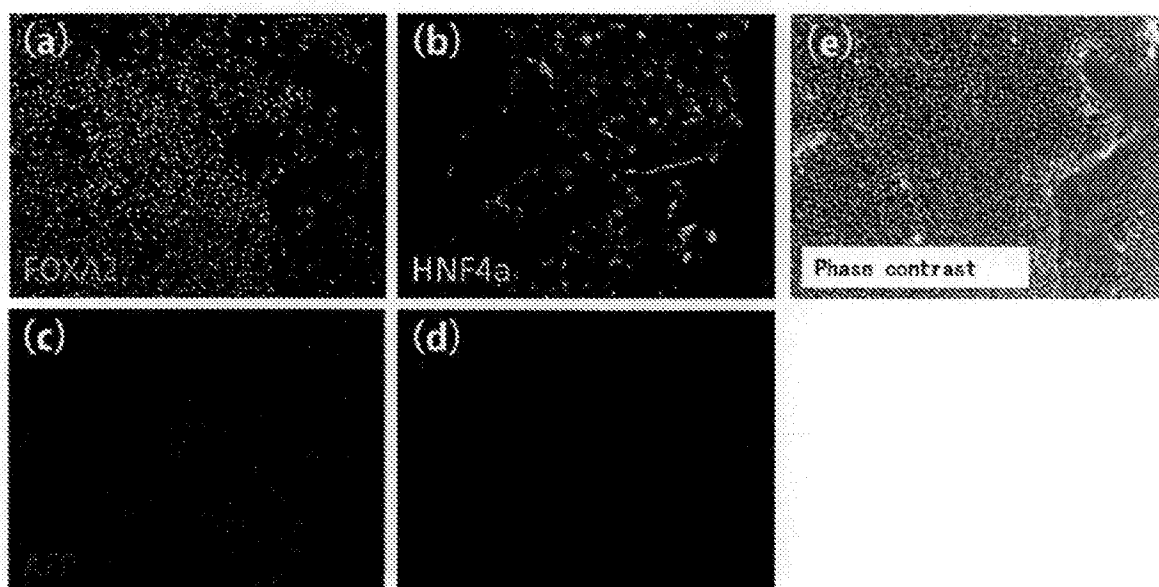
[図3]



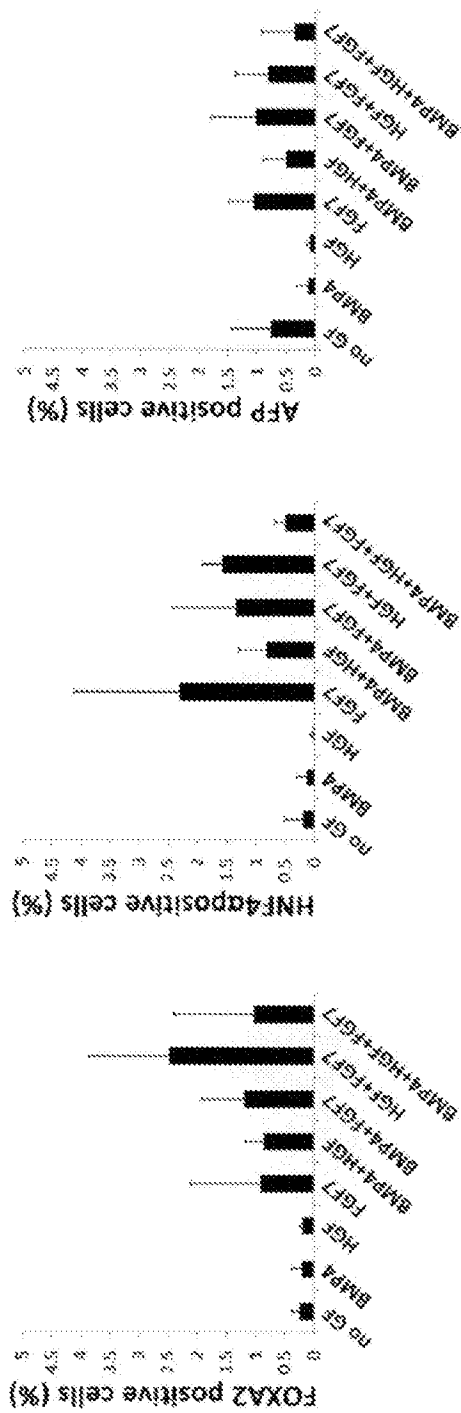
[図4]



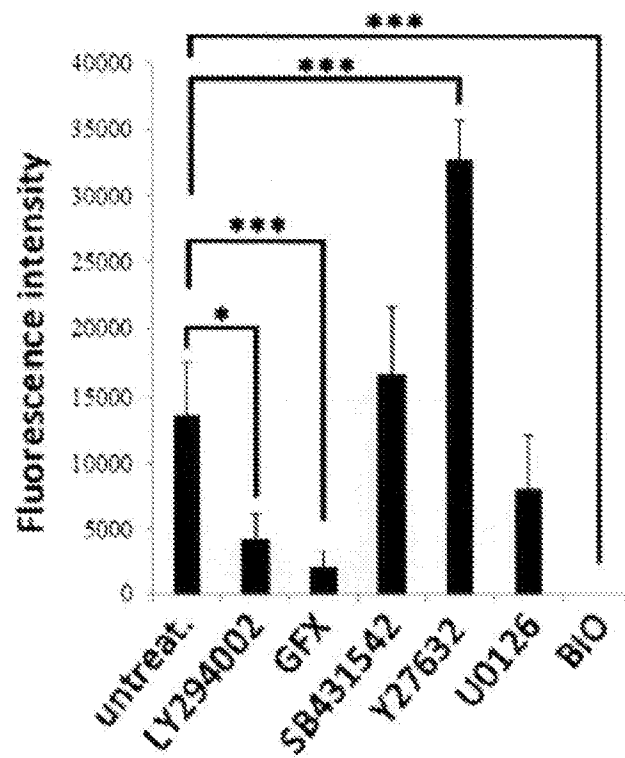
[図5]



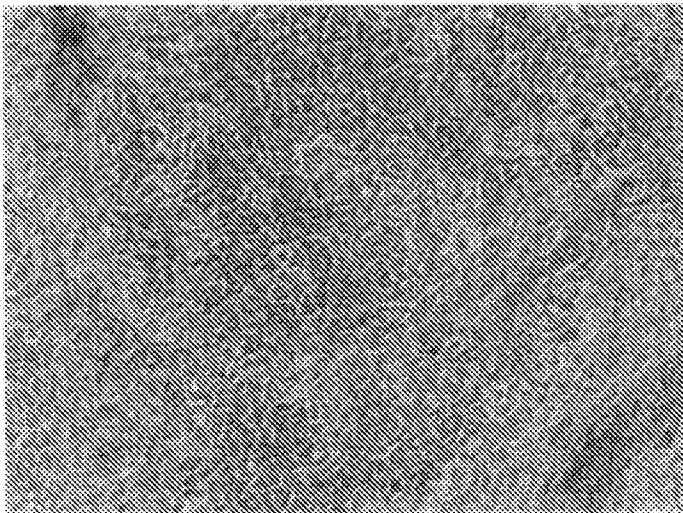
[図6]



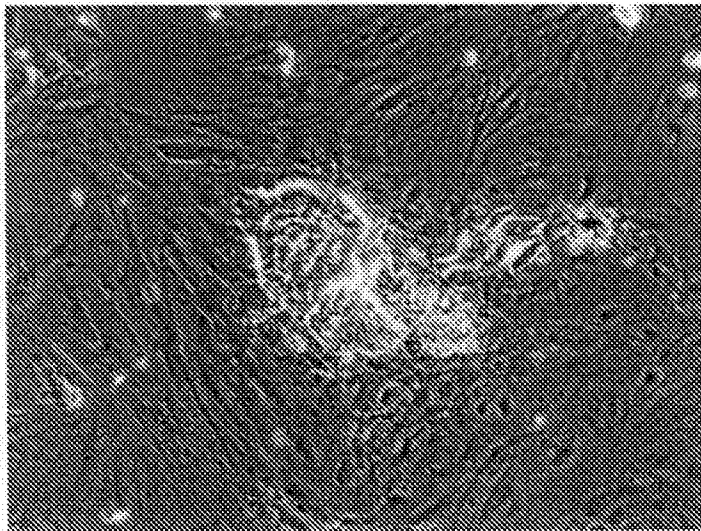
[図7]



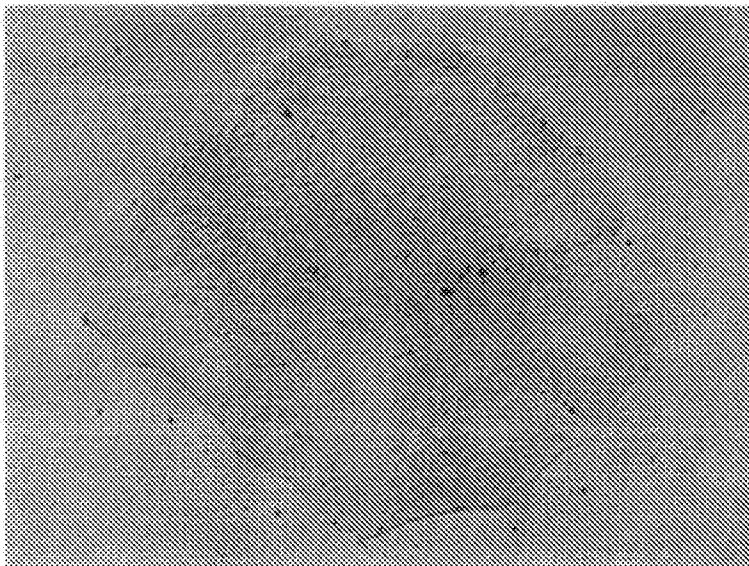
[図8]



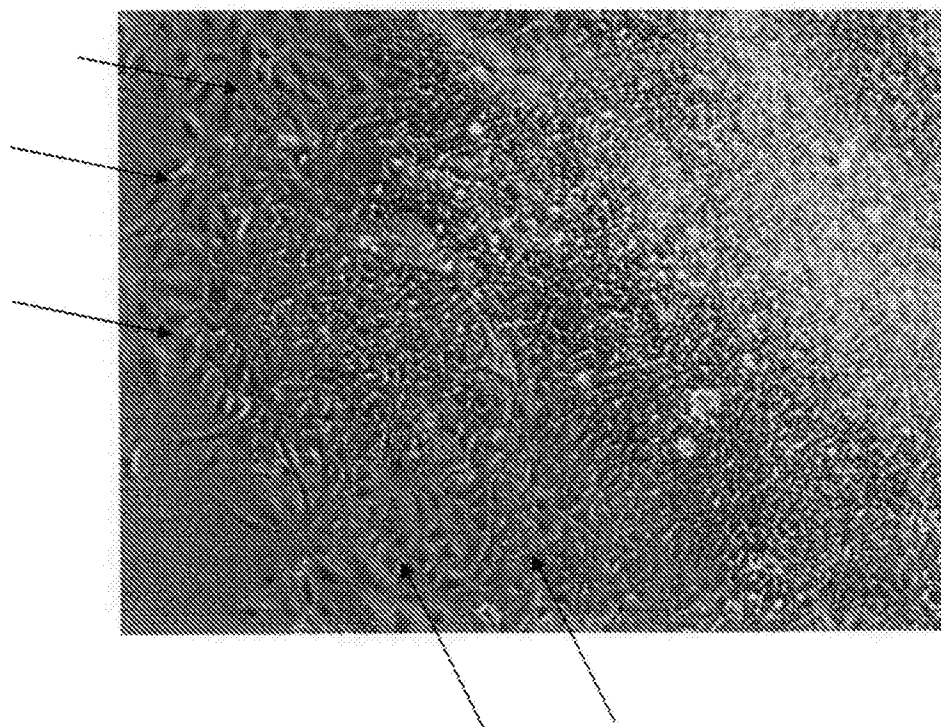
[図9]



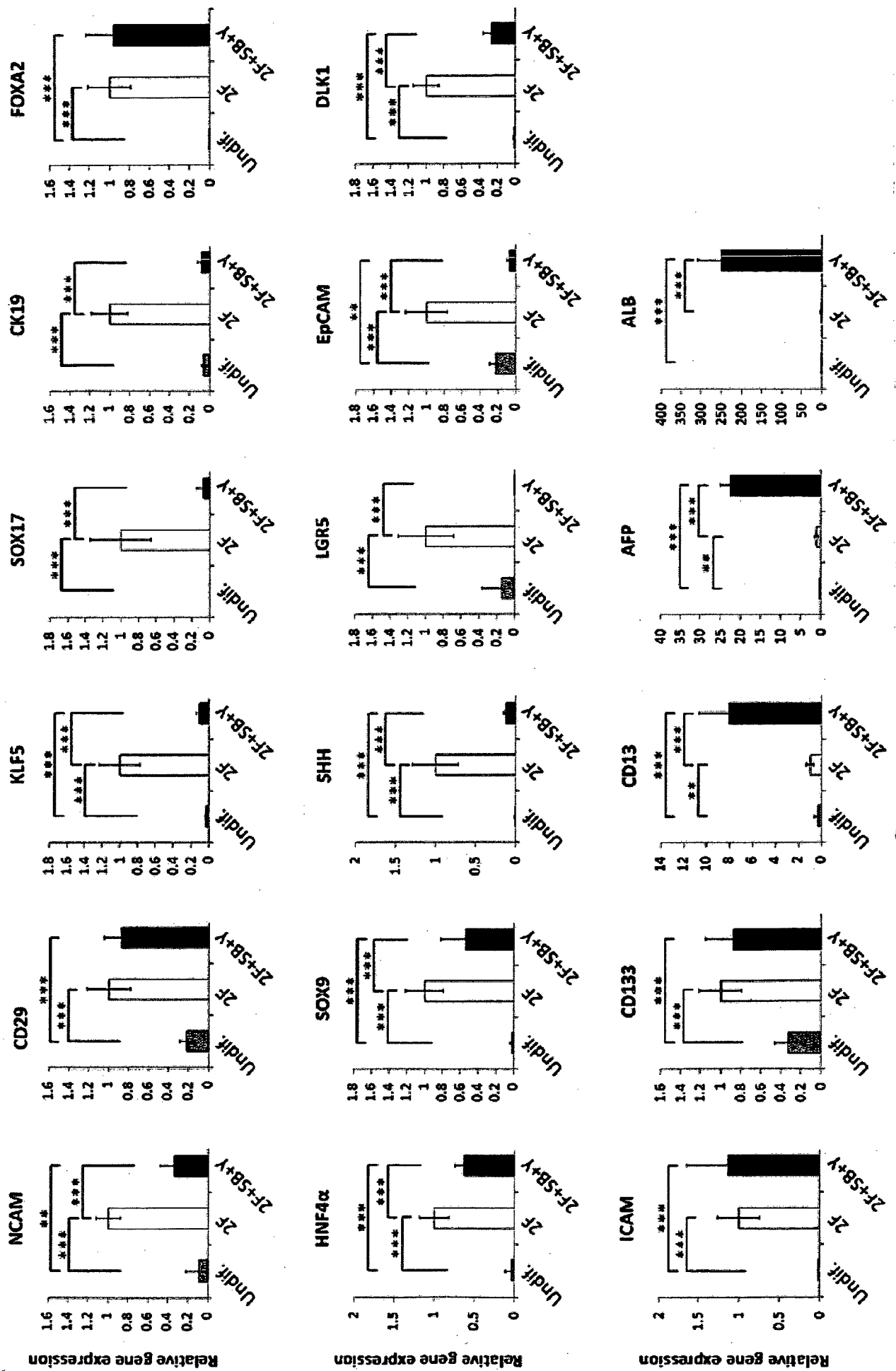
[図10]



[図11]

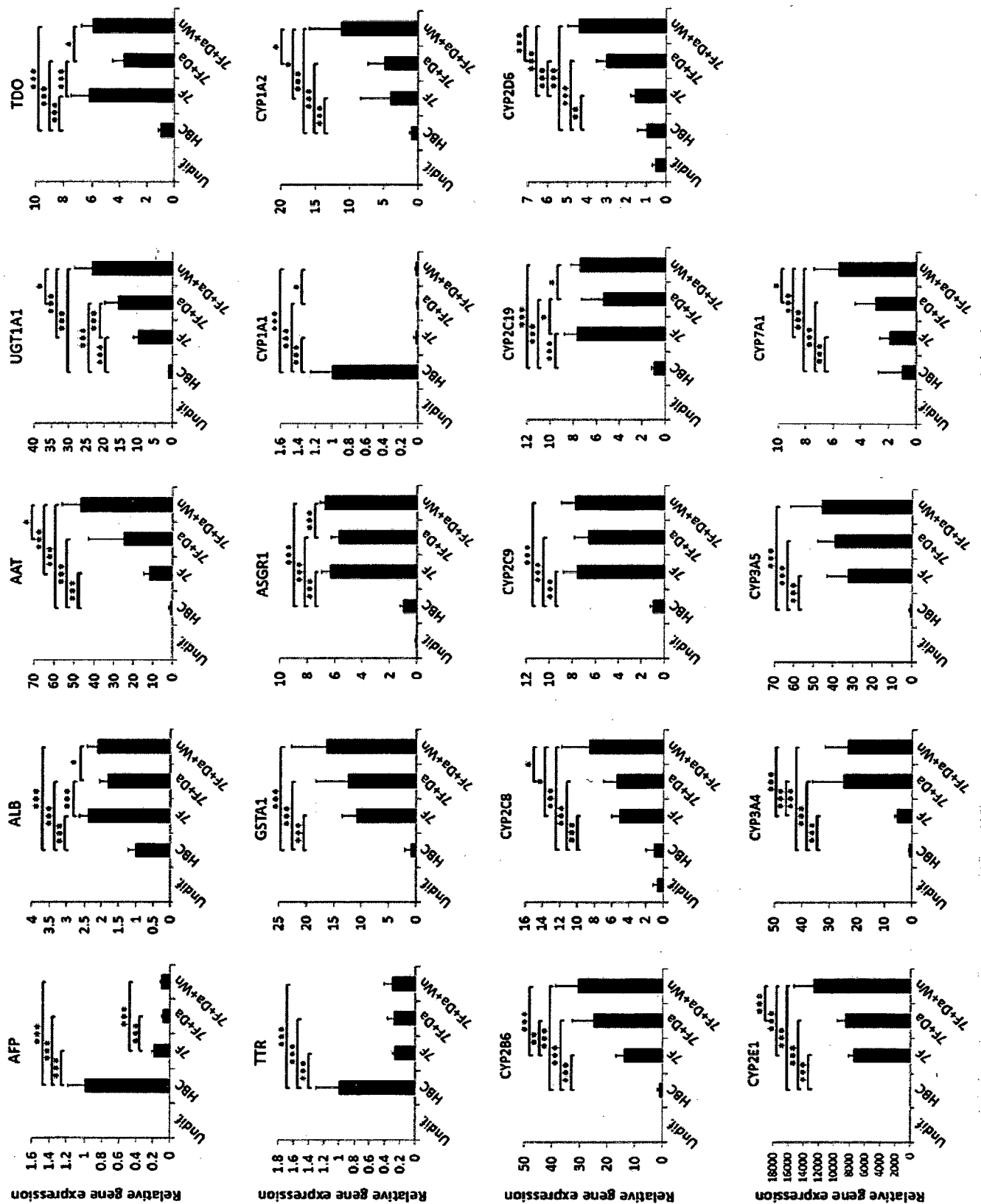


[図12]

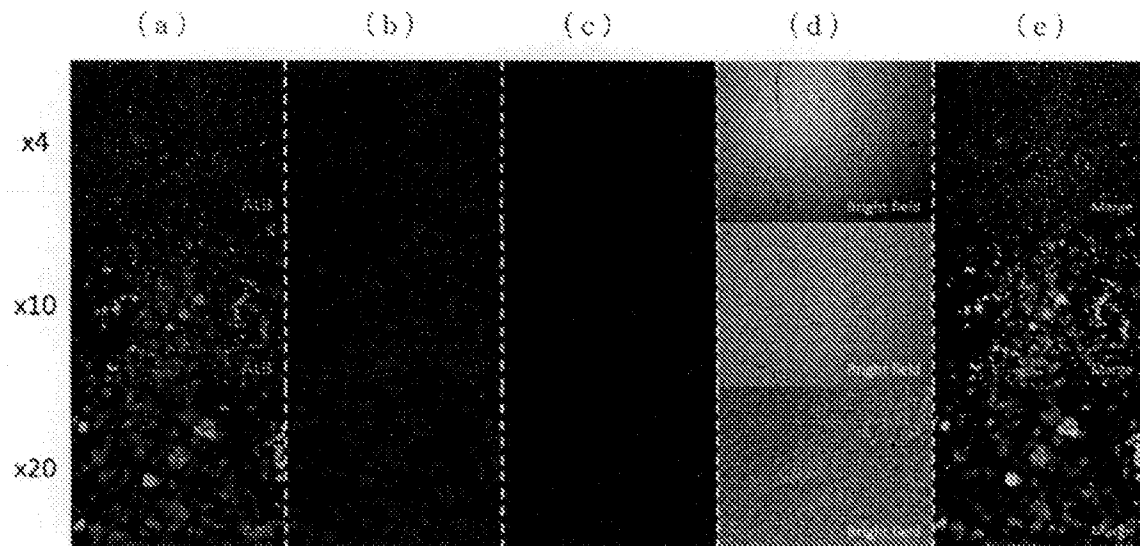


差替え用紙(規則26)

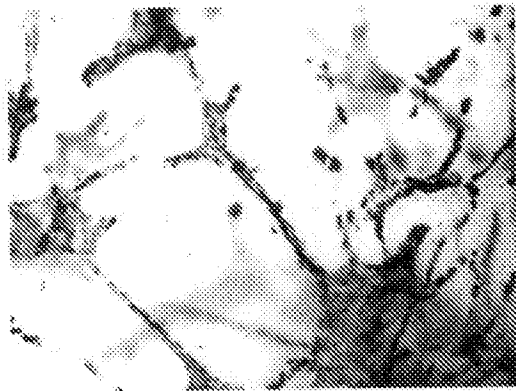
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00, C12N5/074, C12N5/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	FUKUDA, Takayuki, et al., Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions, Experimental Cell Research, 2017.02.17, Vol. 352, No. 2, pp. 333-345, entire text	1-14
X Y A	JP 2012-533310 A (Beijing Huayuanbochuang Technology Co., Ltd.), 27 December 2012 (27.12.2012), claims; paragraphs [0047], [0048], [0063], [0064], [0094]; examples 1 to 3 & US 2012/0190059 A1 claims; examples 1 to 3 & WO 2011/009294 A1 & EP 2457998 A1 & CN 101962628 A	4, 6, 8, 10, 11 12 1-3, 5, 7, 9, 13, 14

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 August 2017 (03.08.17)

Date of mailing of the international search report
15 August 2017 (15.08.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2013/018851 A1 (National Cancer Center), 07 February 2013 (07.02.2013), claims; example 11 & US 2013/0071931 A1 claims; example 11	12 1-11, 13, 14
X A	ZHAO, Dongxin, et al., Promotion of the efficient metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes by correcting specification defects, Cell Research, 2013, Vol. 23, pp. 157-161, fig. 1	4, 6, 8 1-3, 5, 7, 9-14
X A	JP 2005-520513 A (University of North Carolina at Chapel Hill), 14 July 2005 (14.07.2005), claims; examples & US 2004/0018621 A1 claims; examples & WO 2003/078588 A2 & EP 1490480 A & KR 10-2006-0010693 A & CN 1742082 A	4 1-3, 5-14
A	JP 2009-17891 A (FURCHT, Leo T.), 29 January 2009 (29.01.2009), & US 2004/0107453 A1 & WO 2002/064748 A2 & EP 1367899 A & KR 10-2008-0092336 A & CN 101336112 A	1-14
A	JP 2016-10406 A (Tetsuya ISHIKAWA), 21 January 2016 (21.01.2016), & US 2013/0023045 A1 & WO 2011/096223 A1 & EP 2532741 A1 & CN 102858958 A & KR 10-2013-0012114 A	1-14
A	JP 2015-6137 A (National Institute of Biomedical Innovation), 15 January 2015 (15.01.2015), (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/00, C12N5/074, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	FUKUDA, Takayuki, et al., Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions, Experimental Cell Research, 2017.02.17, Vol. 352, No. 2, pp. 333-345, 全文	1-14
X	JP 2012-533310 A (北京華源博創科技有限公司) 2012.12.27, 特許	4, 6, 8, 10, 11
Y	請求の範囲, [0047], [0048], [0063], [0064], [0094], 実施例 1-3	12
A	& US 2012/0190059 A1 Claims, Example 1-3 & WO 2011/009294 A1 & EP 2457998 A1 & CN 101962628 A	1-3, 5, 7, 9, 13, 14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.2017

国際調査報告の発送日

15.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

千葉 直紀

4 B

3 4 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2013/018851 A1 (独立行政法人国立がん研究センター) 2013.02.07, 特許請求の範囲, 実施例 11 & US 2013/0071931 A1 Claims, Example 11	12 1-11, 13, 14
X A	ZHAO, Dongxin, et al., Promotion of the efficient metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes by correcting specification defects, Cell Research, 2013, Vol. 23, pp. 157-161, 第 1 図	4, 6, 8 1-3, 5, 7, 9-14
X A	JP 2005-520513 A (ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル) 2005.07.14, 特許請求の範囲, 実施例 & US 2004/0018621 A1 Claims, Example & WO 2003/078588 A2 & EP 1490480 A & KR 10-2006-0010693 A & CN 1742082 A	4 1-3, 5-14
A	JP 2009-17891 A (ファークト, レオ ティー) 2009.01.29, & US 2004/0107453 A1 & WO 2002/064748 A2 & EP 1367899 A & KR 10-2008-0092336 A & CN 101336112 A	1-14
A	JP 2016-10406 A (石川哲也) 2016.01.21, & US 2013/0023045 A1 & WO 2011/096223 A1 & EP 2532741 A1 & CN 102858958 A & KR 10-2013-0012114 A	1-14
A	JP 2015-6137 A (独立行政法人医薬基盤研究所) 2015.01.15, (ファミリーなし)	1-14