

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96114414

C12N 5/08 (2006.01,

※ 申請日期： 96.4.24

※IPC 分類：

C07K 14/78 (2006.01,

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 38/39 (2006.01,

肝臟再生作用中由脂肪所衍生之成熟幹細胞

ADIPOSE DERIVED ADULT STEM CELLS IN HEPATIC REGENERATION

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 路易西安那州立大學 / LOUISIANA STATE UNIVERSITY
2. 亞提索股份有限公司 / ARTECEL, INC.

代表人：(中文/英文)

- 1.
- 2.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國路易西安那州巴頓羅捷·路易西安那發現科技中心 206 號
商業發展·智慧財產部
Office of Intellectual Property, Commercialization and Development,
206 Louisiana Emerging Technology Center, Baton Rouge, LA 70803, U.S.A.
2. 美國加州陽光谷東伊弗林街 709 號
709 East Evelyn Avenue, Sunnyvale, CA 94086, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.
2. 美國 / U.S.A.

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 路德洛 約翰 W. / LUDLOW, JOHN W.
2. 金伯 傑佛瑞 M. / GIMBLE, JEFFERY M.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.
2. 美國 / U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006/04/25、 60/794,508

2. 美國、 2007/03/09、 60/894,128

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請案之交互參照

5 本案請求美國臨時專利申請案第60/794,508號，申請日
2006年4月25日及美國臨時專利申請案第60/894,128號，申請日2007年3月9日之優先權，二案揭示全文以引用方式併入此處。

本發明大致上係有關基於細胞之治療領域。更特別，
本發明係有關由衍生自非肝組織之幹細胞衍生肝幹細胞。

10 【先前技術】

發明背景

肝炎、暴露於肝毒素、及肝硬化繼發的肝臟衰竭單以
美國計算及威脅數以千計的生命。美國每年因肝病所導致的
直接醫療照護的成本估計於6百億美元至1千億美元以
15 上。每年又須由社會福利主管機關支付給病人和病人家屬
額外的2百億至4百億美元的病廢津貼。不幸，目前肝臟移植
乃除了姑息治療手段以外，病人所能選擇的唯一治療選
項。

但由於捐贈器官的短缺，等候肝臟名單上的全部病人
20 不到三分之一可以真正得到捐贈的肝臟。根據聯合器官共
享網路(UNOS)，目前美國共有15,700病人等候肝臟移植，
但每年只有4,000至5,000個可供移植的捐贈肝臟。除了少數
例外，由於一個捐贈的器官只能夠幫助一位接受者，過去
十年來可用的捐贈器官與等候移植的候選者間的差距逐漸

拉大。因此需要有新穎治療方法。

幹細胞治療對需要肝功能全部重建或部分重建者提供一個替代的治療選項。就多方面而言，肝細胞治療均屬全器官移植的期望的替代之道，原因在於一個肝臟可用來治療多位病人，且由於肝細胞治療所涉及的手術更安全、更容易，且病人的耗費費用較低。幹細胞移植提供可有效地改善衰竭的肝臟內部之生化功能的治療模式。

如此，需要有可由非肝組織衍生肝幹細胞之方法。

【發明內容】

10 發明概要

於本發明之一個實施例中，提供一種由非肝幹細胞衍生肝幹細胞之方法，該方法包含：(a)提供衍生自非肝組織之幹細胞；以及(b)於包含至少一種原纖維基質蛋白質之胞外基質上且於包含肝生長因子(HGF)之不含血清之培養基中培養該等幹細胞，其中該等衍生自非肝組織之幹細胞分化成肝幹細胞。非肝組織之實例包括但非限於脾臟、腸及脂肪組織。於一較佳實施例中，脂肪幹細胞係衍生自非肝幹細胞來源之脂肪組織；但非肝組織可得自任何成年哺乳動物。該至少一種原纖維基質蛋白質較佳係選自於由膠原蛋白I及膠原蛋白III所組成之組群。於本發明之若干實施例中，培養基可進一步包含腫瘤抑制素(Oncostatin) M、二甲亞砜(DMSO)或二者；而胞外基質可進一步包含纖維膠蛋白(fibronectin)、基質凝膠蛋白(matrigel)、玻璃原蛋白(vitrogen)或其組合。

於若干實施例中，大於約70%衍生自非肝組織之幹細胞分化成肝幹細胞。

於本發明之另一個實施例中，提供一種由非肝幹細胞誘導肝生長因子(HGF)表現之方法，該方法包含：(a)提供
 5 衍生自非肝組織之幹細胞；以及(b)於包含至少一種原纖維基質蛋白質之胞外基質上且於包含EGF、bFGF或二者之不含血清之培養基中培養該等幹細胞，其中該等衍生自非肝組織之幹細胞製造HGF。培養基進一步包含抗壞血酸鈉二磷酸鹽。

10 圖式簡單說明

第1圖為根據本發明由非肝幹細胞(例如ASC)衍生肝幹細胞之示意說明圖。

第2圖顯示相關的白蛋白(ALB)及 α -胎兒蛋白(AFP) mRNA於衍生自ASC之肝幹細胞中之表現。

15 第3圖顯示肝糖儲存於衍生自ASC之肝幹細胞。

第4圖顯示衍生自ASC之肝幹細胞之型態。

第5圖提供一線圖，顯示EGF及抗壞血酸鈉二磷酸鹽具有協同增效能力來於人ASC中誘導HGF之表現。

第6圖提供一線圖，比較有或無抗壞血酸二磷酸鹽之
 20 EGF及bFGF誘導HGF於ASC中之表現之能力。

第7圖為於ASC中表現之受體之RT-PCR分析。

第8圖顯示於暴露於脂多醣後0至24小時期間，於不等時間之所選定之細胞激素(n=6至8 ASC捐贈者)之分泌。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明係針對由非肝組織衍生肝幹細胞之方法。本發明並未限制於得自生命中任何階段的組織。換言之，本發明之方法包含成年組織、胎兒組織或胚胎組織。尤有甚者，組織來源可寬廣指示任一種非肝組織。「非肝組織」之非限制性實例包括脂肪組織、腸、腦、臍帶血及骨髓。如此雖然此處大部分發明係參照成年脂肪組織作說明，但此種參照僅供舉例說明之用，不可解譯為限制性。

10 由非肝組織衍生非肝幹細胞

非肝幹細胞可衍生自得自人類來源或其它哺乳動物來源之脂肪組織(亦即脂肪幹細胞「ASC」)。人ASC可分離自較佳係得自健康、男性或女性患者，例如自願接受抽脂手術的患者之皮下脂肪組織。鼠ASC也可分離自較佳為得自雄C57BL/6小鼠及/或得自雄ROSA-26小鼠之皮下脂肪組織。由此等來源於培養之5日內，典型由1毫升抽脂術的抽吸物中回升約250,000 ASC。平均人抽脂術的檢體大於約500毫升。由等量鼠脂肪組織可回收甚至更多個細胞，推定原因係由於捐贈者動物的年齡較輕之故。

20 由脂肪組織衍生脂肪幹細胞之方法呈現於USP Nos. 6153432、6391297、6429013、6555374、6841150、7001746、及7033587，各案揭示全文以引用方式併入此處。簡言之，於一個實例中，一旦獲得脂肪，將脂肪接受差異離心且於培養中擴增。1克組織於培養之24小時以內典型可獲得

50,000 至 100,000 幹細胞。擴增培養基較佳包含 60% DMEM(低葡萄糖)及 40% MCDB-201 補充以 10% 胎牛血清 (FBS)；5 微克/毫升胰島素、5 微克/毫升鐵傳遞蛋白及 5 奈克/毫升硒； 10^{-9} M 德莎美沙松(dexamethasone)；10 奈克/毫升表皮生長因子(EGF)及 10 奈克/毫升纖維母細胞生長因子，鹼性(bFGF)； 10^{-4} M 抗壞血酸 2-磷酸鹽；100 單位/毫升青黴素(penicillin)；及 100 單位/毫升鏈黴素(streptomycin)。不欲固定於任何理論或受任何理論所限，相信添加 EGF、bFGF 或二者至培養基，可提升 ASC 後來分化成肝幹細胞的能力。壞血酸 2-磷酸鹽對 ASC 具有類似的效果，特別就 ASC 表現 HGF 之能力而言具有類似的效果(容後詳述)。

HGF 可促進幹細胞朝向肝細胞系分化。添加 HGF 至本培養條件(如前文指示)，相信可互補分化的過程。如此，於本發明之一個實施例中，此處所述由細胞族群製造 HGF 可於試管內以及於活體內(例如當移植時)輔助其它方面皆為「初生」幹細胞之分化成為功能性肝細胞。

分化培養基

於德莎美沙松、胰島素、異丁基甲基黃嘌呤及噻唑啉二酮存在下，ASC 進行脂肪的生成。細胞堆積脂質液泡，可對中性脂質作染色，表示脂細胞特異性標記，包括所分泌的細胞激素瘦素(leptin)及脂肪酸結合蛋白質 aP2。但 ASC 的分化潛力非僅限於脂細胞系。為了分化成肝幹細胞及肝細胞，不含血清之擴增培養基進一步補充 10 奈克/毫升 EGF 及/或 10 奈克/毫升 bFGF、10 奈克/毫升 HGF、10 奈克/毫升腫

瘤抑制素M(OSM)、1% DMSO或其組合。

分化條件

ASC初步係以約 $5-15 \times 10^3$ 細胞/平方厘米之密度使用擴增培養基接種於預先塗覆以膠原蛋白I之組織培養皿上或孔上。經膠原蛋白I塗覆之組織培養皿於市面上可得(例如美崔吉 (MATRIGEL) 得自貝騰迪金森公司 (Becton Dickinson)、維仇貞 (VITROGEN) 得自漂爾杰公司 (PureGel))，其中任一者皆可用於本發明。此外，不欲固定於理論或受限於理論，本發明人習得於本發明方法中使用原先為肝基質蛋白(例如膠原蛋白類，包括膠原蛋白I及膠原蛋白III)為較佳，原因在於使用原纖維肝基質蛋白顯然較為可再現於活體內於成熟肝組織所出現的幹細胞環境。換言之，原纖維基質蛋白顯然可提供分化信號，此種分化信號為使用其它基質蛋白所不可得，或不夠強。

例如纖維膠蛋白屬於一種非原纖維分子；纖維膠蛋白為糖蛋白(膠原蛋白並非糖蛋白)，主要允許細胞附接至其它基質分子或組織培養皿。換言之，相信纖維蛋白成為鍵聯於細胞表面之接合素(integrin)至於器官(活體內)或組織培養皿底部(試管內)中之下方膠原蛋白基質的橋樑。如此，藉纖維膠蛋白結合所活化的信號可能與藉膠原蛋白結合所活化的信號有相當大差異。雖然無需使用非原纖維蛋白，諸如纖維膠蛋白，但可與根據本發明之原纖維蛋白質結合使用。於若干實施例中，胞外基質未含纖維膠蛋白。

藉此方式，相信本方法係針對將非肝幹細胞轉化成肝

幹細胞，於某些情況下，肝幹細胞隨後分化成為成熟肝細胞，而非非肝幹細胞直接分化成為肝細胞，全然跳過肝幹細胞的階段。此種註解示意顯示於第1圖。其它適合用於本發明之基質蛋白之實例包括胎兒肝基質蛋白。

- 5 於本最初期間，允許細胞達到大於約80%融合，可能需時3日，於前述擴增培養基中培養。當達到大於約80%融合時，細胞單獨以磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)洗兩次或三次，隨後置於不含血清之分化培養基內。ASC於此種培養條件下又維持4日至20日來進行分化。可於常規時間間隔收穫代
- 10 表性培養接受分析。

實例1

- 人ASC接種於(不含血清)之擴增培養基內。經2至3次繼代培養後，細胞群使用胰蛋白酶分散，以5,000至10,000細胞/平方厘米密度播種於經膠原蛋白I塗覆之培養皿上。讓細胞增殖至達到約80%融合，此時，培養基改成肝分化培養基[包含補充以10奈克/毫升HGF, 10奈克/毫升腫瘤抑制素M (OSM)及0.1% DMSO之不含血清之擴增培養基]。每3日更換一次培養基。
- 15

- 於分化後的不同時間點收集細胞溶解產物接受
- 20 RT-PCR分析，或固定後接受肝生物標記的組織學分析。若干用來評估試管內肝新生之生物標記包括：(a)藉RT-PCR表現之白蛋白(ALB)及 α -胎兒蛋白(AFP)；以及(b)肝糖儲存(藉陽性PAS染色檢定分析後期階段肝臟標記)。

第2圖顯示ASC於分化培養基中培養10日之AFP及ALB

之表現。總RNA係使用商用套件組而由細胞純化。2微克總RNA係使用MMLV-RT以寡dT (Oligo dT)於42°C於20微升反應中反轉錄1小時。使用2微升經稀釋(1:10) cDNA進行40週期PCR。於2%瓊脂糖凝膠上分離5微升經過擴增之產物，且使用EtBr變成目測可觀察。(親環素(Cyclophilin) B (Cyclo) 5 用作為輸入cDNA的對照組)。資料顯示雖然白蛋白係於該族群中表現，但同一個族群中極少或未存在有AFP，指示細胞群實質上包含肝幹細胞。確實，相信AFP表現指示存在有更大量可能從肝幹細胞分化來的成熟肝細胞。進一步分析證實此等細胞具有肝幹細胞的其它標記，包括正向表現Ep-CAM及ICAM-1，及負向表現MHC類別Ia。10

第3圖顯示早期繼代培養[p3] ASC播種於6孔培養皿上，成長至約80%融合，轉換成肝分化培養基。各孔於第0日(A圖)及第17日(B圖)固定，作肝糖染色(深色陰影)。第4圖進一步顯示具有肝細胞型態且已經於分化條件下培養1815 日的細胞。

此等資料共同指示ASC可分化成肝幹細胞。然後若干此等幹細胞成熟成為肝細胞或膽細胞(第1圖)，但也自我再生。

20 於本發明之另一個實施例中，提供一種方法來誘導細胞激素的表現，細胞激素可於由ASC再生肝細胞扮演某種角色。此等細胞激素包括HGF、VEGF、IL-6、LIF、TNF α 、瘦素及其組合。本發明提供提升此等細胞激素中之一者或全部之產量之培養條件。再度不欲固定於或受限於理論，

發明人習得於本發明方法使用原纖維基質蛋白(例如膠原蛋白I)通常為較佳，原因在於其顯然可更佳再現成年組織中肝幹細胞於活體內之環境。尤有甚者，單獨摻混EGF或連同抗壞血酸鈉，顯然於此等條件下實質上可提升細胞激素的產量。可促成肝臟再生用之細胞激素之產量之因素/條件包括巴豆酯類、FGF、肝素、缺氧(定義為 $<5\% \text{ O}_2$)或其組合。

實例2

人ASC於補充有3%血清之DMEM/F12培養基內繁殖，測定EGF及抗壞血酸鈉二磷酸鹽對細胞激素產量的影響。各孔重複三次，以每平方厘米 $5-10 \times 10^3$ 細胞播種，與EGF於0、0.1、1或10奈克/毫升+/-抗壞血酸鈉二磷酸鹽共同培養。於72小時後，收集培養基進行HGF之ELISA檢測。第5圖為資料代表圖，資料係規度化至皮克HGF/ 10^6 細胞(n=3)。單獨培養基不含HGF。資料驗證於無EGF及抗壞血酸鈉共存之下，HGF係以超過10.680皮克/ 10^6 細胞合成。但於兩種因子共存之下產量增高近5倍。

實例3

未經分化之人ASC於補充3%血清及10奈克/毫升或EGF或bFGF之DMEM/F12培養基內培養。第6A圖顯示於EGF存在下，未經分化之ASC表現HGF之濃度高於3000奈克/百萬個細胞，反映出相對於基準線濃度增高2倍。存在有抗壞血酸2-磷酸進一步增高EGF的誘導效果至25倍。於相同條件下，於無或有抗壞血酸2-磷酸鹽共存之下，脂細胞經分化之ASC表現HGF之程度分別為2.0倍及6.3倍(第6B圖)。

於bFGF存在下，由未經分化之人ASC表現HGF也有統計上增高(第6C圖)。但bFGF未能影響由脂細胞分化之ASC表現HGF(第6D圖)。

- 接著藉RT-PCR分析總RNA，驗證未經分化之huASC及
- 5 脂細胞分化之huASC可表現bFGF及EGF受體，以及表現HGF (c-met)受體(第7圖)。

ASC細胞激素表現

- 除了HGF外，人ASC分泌寬廣範圍之造血功能之細胞激素及其它功能之細胞激素。當以寡多醣(LPS，100奈克/
- 10 毫升)誘導時，其它方面皆為寂靜之ASC培養對下列mRNA具有較高穩態濃度：介白素6、7、8及11(IL-6、IL-7、IL-8、IL-11)；白血病抑制因子(LIF)；巨噬細胞-群落刺激因子(M-CSF)；粒狀細胞-巨噬細胞-群落刺激因子(GM-CSF)；粒狀細胞-群落刺激因子(G-CSF)；flt-3配體(Flt3L)，如第8圖
- 15 所示以及套組配體(KL，也稱作為幹細胞因子)；腫瘤壞死因子 α (TNF α)；及骨型態發生蛋白2及4 (BMP-2，BMP-4)。鼠及人骨髓衍生的幹細胞也可表現此等相同細胞激素。如下表1及第8圖所示，ASC可於LPS刺激後的24小時內顯著增高IL-6、IL-7、IL-8、GM-CSF、及M-CSF之分泌。

表1. LPS誘導細胞激素之分泌(ELISA，皮克/毫升)

時間LPS	0小時	8小時	24小時
M-CSF	4 ± 3	512 ± 98	977 ± 285
TNF α	0 ± 0	112 ± 82	30 ± 22
IL-1 α/β	N.D.	N.D.	N.D.
IL-6	1 ± 1	6083 ± 956	9204 ± 2676
IL-7	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.2	3.4 ± 0.7

藉此方式，於肝臟受傷後即刻或很快移植ASC，可促進肝臟再生，部分原因係透過局部釋放HGF及VEGF。將

5 ASC導入哺乳動物可藉技藝界已知且可利用之任一種方法包括注射來達成。於細胞輸送之另一種方法中，ASC包膠後，透過實質內注射或肝內注射而移植入接受者哺乳動物體內。例如嵌入褐藻酸鹽基質內部之移植細胞可提供數項優點，包括：(a)對細胞提供「3-D環境」可改善移植後的存

10 活率；(b)允許植入更大量的細胞；(c)形成支援生長與分化的顯微環境；以及(d)允許於移植前將多個因子(例如前述生長因子或多個細胞類型)共同包膠。

此外，因細胞係嵌入於親水膠體內部，較為不容易分散至身體的其它部位，細胞懸浮液用以移植時常見分散至

15 身體的其它部位。

簡言之，於將細胞混合入褐藻酸鈉溶液後，使用靜電珠粒產生裝置來進行細胞包膠。珠粒以相當於約 10^7 細胞/毫升之細胞濃度再度懸浮於PBS。於給予者動物充分麻醉與鎮定之後，採用無菌技術來進行迷你剖腹術。將針頭插入

組織周邊，藉直接注射來輸送細胞懸浮液(小鼠常見輸送0.1毫升)，透過局部壓迫來達成止血。此項技術同等也適用於人類模型和鼠模型。

- 第二種移植方法中，細胞於附接至塞托德士(Cytodex) 3 (阿莫杉法瑪西亞公司(Amersham Pharmacia))微載劑珠粒之後，將高達 10^6 細胞注射入脾臟。移植後，細胞快速轉位至肝血管竇，移植後的兩小時內可於肝臟檢測得。

劑量

- 用於人類，基於用於小鼠研究的經驗，當直接注射入肝循環系統時以約 3×10^9 細胞或1%肝臟重量的「劑量」為佳。確實用於小鼠以2百萬個細胞劑量為佳。中劑量和高劑量分別為4百萬個細胞和6百萬個細胞係基於先導試驗急性致命性研究的結果，其中每組3頭NOD-SCID小鼠個別投予1毫升體積0、2.5、5、10、20及40百萬人肝細胞劑量。移植10、20、及40百萬細胞，導致100%死亡率；移植5百萬細胞，於20小時以內造成3頭小鼠中的1頭死亡，而每頭小鼠2.5百萬細胞的耐受性良好選用。高劑量6百萬細胞於0.2毫升劑量體積投予，由於考慮為不會造成脾臟破裂的最高劑量，預期大部分動物皆可忍受該劑量(亦即MTD)。中劑量4百萬細胞由於為低劑量與高劑量間的中點故為較佳。

特別當治療人類時，全部處理步驟皆可根據cGMP標準使用適當標準作業程序(SOP)來進行。人ASC較佳係藉胰蛋白酶消化分離。細胞可即刻使用，或於使用前經過低溫保存。人ASC若經過低溫保存，則需解凍，懸浮於不含血清

之等滲透壓介質內，適合用來以不低於約0.1百萬細胞至不高於10百萬細胞/毫升之濃度輸注。藉香蒲藍排除檢定分析或相當的檢定分析評估細胞存活率。細胞係儲存於室溫或濕冰上，藉顯微鏡檢來評估是否存在有任何團塊。若觀察
5 得團塊，則細胞將於尼龍網(網眼40微米)過濾器上選擇，重新測定細胞終濃度。細胞以每千克體重1至10百萬個細胞之劑量靜脈輸注肝功能受損(例如因暴露於急性毒素而受損)之接受者。監控接受者的任何急性反應狀態例如發燒、畏寒、或精神狀態改變；若觀察得此等急性反應，則藉標準
10 醫療規劃進行症狀治療。然後藉每週測血清化學監控個體經歷隨後2個月時間，來評估肝功能的復原狀況。

如此，本發明有利於治療多種型式的肝衰竭，包括急性和慢性肝衰竭。自體或異體人ASC作為成年幹細胞用來改良肝功能的利用性對於患有繼發於暴露於毒素(四氯化
15 碳、乙醯胺芬(acetaminophen))、暴露於傳染因子(肝炎病毒、細胞巨病毒)、以及由於腫瘤轉移或外傷進行手術切除造成肝功能受損的病人有價值。人ASC分化成有功能的肝細胞及/或釋放支援內生性肝細胞子代的增生與分化之能力可於此等條件下提供改善與加速肝功能復原的機轉。

20 雖然已經就特定實施例說明本發明，但須了解可進一步修改，本案意圖涵蓋後述發明之任何變化、使用或變更。大致上，本發明原理包括悖離本揭示，但該等悖離係落入熟諳本發明相關技藝人士已知之實務或習知之實務之範圍，且可適用於如下於隨附之申請專利範圍中列舉之前述

各項特徵。

【圖式簡單說明】

第1圖為根據本發明由非肝幹細胞(例如ASC)衍生肝幹細胞之示意說明圖。

5 第2圖顯示相關的白蛋白(ALB)及 α -胎兒蛋白(AFP) mRNA於衍生自ASC之肝幹細胞中之表現。

第3圖顯示肝糖儲存於衍生自ASC之肝幹細胞。

第4圖顯示衍生自ASC之肝幹細胞之型態。

● 第5圖提供一線圖，顯示EGF及抗壞血酸鈉二磷酸鹽具
10 有協同增效能力來於人ASC中誘導HGF之表現。

第6圖提供一線圖，比較有或無抗壞血酸二磷酸鹽之EGF及bFGF誘導HGF於ASC中之表現之能力。

第7圖為於ASC中表現之受體之RT-PCR分析。

● 第8圖顯示於暴露於脂多醣後0至24小時期間，於不等
15 時間之所選定之細胞激素(n=6至8 ASC捐贈者)之分泌。

【主要元件符號說明】

● (無)

五、中文發明摘要：

本發明提供一種由衍生自非肝組織之幹細胞衍生肝幹細胞之方法。於本發明之一個實施例中，肝幹細胞係衍生自脂肪幹細胞。本發明也提供一種由脂肪幹細胞提升肝臟細胞激素(例如HGF)之製造之方法，該方法可用於移植時於活體內之肝組織再生。提供組織培養條件，包括培養基條件。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a method to derive hepatic stem cells from stem cells derived from non-liver tissue. In one embodiment of the invention, hepatic stem cells are derived from adipose stem cells. The invention also provides a method of enhancing hepatic cytokine production (e.g., HGF) from ASCs, which may be useful in the regeneration of liver tissue when transplanted in vivo. Tissue culture conditions, including media conditions, are provided.

十、申請專利範圍：

1. 一種由非肝幹細胞衍生肝幹細胞之方法，該方法包含：

(a) 提供衍生自非肝組織之幹細胞；以及

5 (b) 於包含至少一種原纖維基質蛋白質之胞外基質上且於包含肝生長因子(HGF)之不含血清之培養基中培養該等幹細胞，

其中該等衍生自非肝組織之幹細胞分化成肝幹細胞。

10 2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該非肝組織為脂肪組織。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該非肝組織為得自成年哺乳動物之組織。

15 4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該至少一種原纖維基質蛋白係選自於由膠原蛋白I及膠原蛋白III所組成之組群。

5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該至少一種原纖維基質蛋白為膠原蛋白I。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該培養基進一步包含腫瘤抑制素(Oncostatin) M、二甲亞砜(DMSO)或二者。

20 7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胞外基質進一步包含纖維膠蛋白(fibronectin)、基質凝膠蛋白(matrigel)、玻璃原蛋白(vitrogen)或其組合。

8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中大於約70%衍生自非肝組織之幹細胞分化成為肝幹細胞。

9. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該等衍生自非肝組織之幹細胞進一步係由繼代培養衍生而得。

10. 一種由非肝幹細胞誘導肝生長因子(HGF)表現之方法，該方法包含：

5 (a) 提供衍生自非肝組織之幹細胞；以及

(b) 於包含至少一種原纖維基質蛋白質之胞外基質上且於包含EGF、bFGF或二者之不含血清之培養基中培養該等幹細胞，

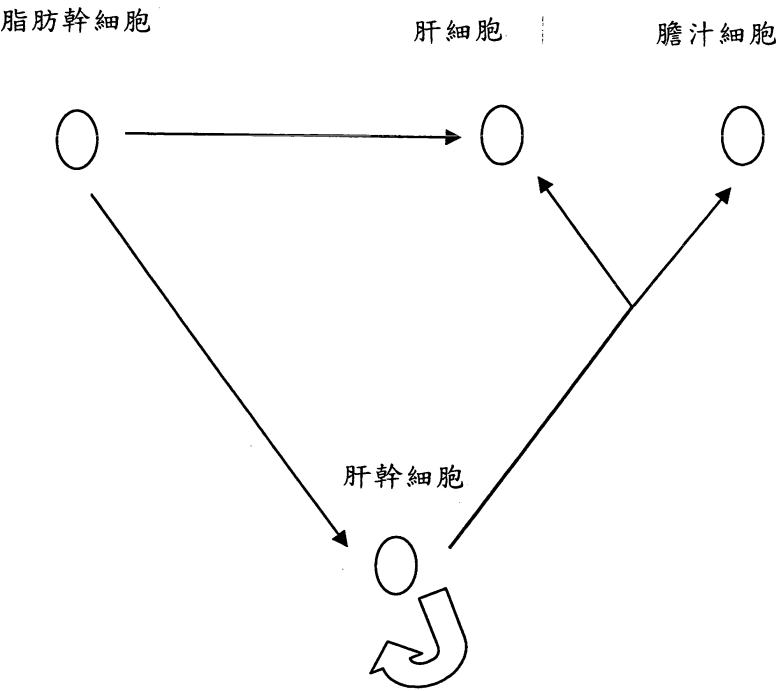
其中該等衍生自非肝組織之幹細胞製造HGF。

10 11. 如申請專利範圍第10項之方法，其中該培養基包含EGF及bFGF。

12. 如申請專利範圍第10項之方法，其中該培養基進一步包含抗壞血酸鈉二磷酸鹽。

15 13. 如申請專利範圍第11項之方法，其中該培養基進一步包含抗壞血酸鈉二磷酸鹽。

第 1 圖



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

發明專利說明書

97年1月2日	修正 補充
---------	----------

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 96114014

※申請日期： 96-04-24 ※IPC 分類：

C12N 5/08 (2006.01,

C07K 14/78 (2006.01,

A61K 38/39 (2006.01,

一、發明名稱：(中文/英文)

肝臟再生作用中由脂肪所衍生之成熟幹細胞

ADIPOSE DERIVED ADULT STEM CELLS IN HEPATIC REGENERATION

二、申請人：(共 2 人)**姓名或名稱：**(中文/英文)

1. 美國路易斯安納州立大學農業與機械學院董事會 / BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE
2. 亞提索股份有限公司 / ARTECEL, INC.

代表人：(中文/英文)

1. 哈格拉夫 卡洛琳 H. / HARGRAVE, CAROLYN H.
2. 摩斯里 肯 / MOSELEY, KEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國路易斯安納州巴頓盧治市西湖岸大道 3810 號系統大樓 115 室
Suite 115, System Building, 3810 West Lakeshore Drive, Baton Rouge, LA 70808 U. S. A.
2. 美國加州陽光谷東伊弗林街 709 號
709 East Evelyn Avenue, Sunnyvale, CA 94086, U. S. A.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U. S. A.
2. 美國 / U. S. A.

三、發明人：(共 2 人)**姓 名：**(中文/英文)

1. 路德洛 約翰 W. / LUDLOW, JOHN W.
2. 金伯 傑佛瑞 M. / GIMBLE, JEFFERY M.

國 籍：(中文/英文)

1. -2. 美國 / U. S. A.