

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008 年 12 月 18 日 (18.12.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/153180 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/06 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/060980
- (22) 国際出願日: 2008 年 6 月 16 日 (16.06.2008)
- (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2007-157387 2007 年 6 月 14 日 (14.06.2007) JP
特願2007-157388 2007 年 6 月 14 日 (14.06.2007) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 松山 晃文 (MATSUYAMA, Akifumi) [JP/JP];
〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法
人大阪大学内 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菰田 弘 (KO-
MODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山
田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹
田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka
(JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外 (TANAKA, Mitsuo et al.); 〒
5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
I M P ビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可
能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,
KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF HEPATIC-LOBULE-LIKE CELL MASS FROM ADIPOSE-TISSUE-DERIVED CELL

(54) 発明の名称: 脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法

(57) Abstract: Disclosed are: a method for producing a hepatic-lobule-like cell mass from an adipose-tissue-derived cell, which is characterized by culturing the adipose-tissue-derived cell; a hepatic-lobule-like cell mass produced by the method; a method for the screening of a substance capable of promoting or inhibiting the formation of a hepatic-lobule-like cell mass, which is characterized by culturing an adipose-tissue-derived cell to produce the hepatic-lobule-like cell mass, wherein a candidate substance is added to a culture medium; and a kit for use in the screening method.

(57) 要約: 本発明は、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法およびそれにより得ることのできる肝小葉様細胞塊、脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とする、肝小葉様細胞塊の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、およびそのためのキットを提供する。

WO 2008/153180 A1

明 細 書

脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法

技術分野

- [0001] 本発明は、脂肪組織由来細胞から肝小葉細胞塊を得る方法、それにより得ることのできる肝小葉細胞塊、肝小葉の形成を促進または抑制する物質および肝小葉の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングする方法、およびそのためのキットなどに関するものである。

背景技術

- [0002] 本邦は、諸外国に比べてC型肝炎の罹患率が高い。C型肝炎ウイルスの感染により、慢性肝炎、肝硬変そして肝臓が発症することは既知の事実である。慢性肝炎、肝硬変の状態ではインターフェロンを主体とする内科的治療が効果的であるとされる。一方、肝臓が発症してしまえば、内科的に根治させることは不可能であり、外科的に腫瘍を摘出することが第1選択となる。しかし、現実には進行した肝硬変は肝臓の発症母地となるため、肝不全に対しても外科的治療を選択するしかなく、重篤な症例に至っては、TAEあるいはPEITといった治療法さえ試みることもできない。このような重篤な肝硬変患者に対して肝移植が行われるようになって久しい。しかし、脳死肝移植に関してはドナーの絶対的不足、また生体肝移植に関してはドナーの安全性、健康人にメスをいれるという倫理的問題がある。そこで、肝細胞再生による肝不全の治療という発想が生まれた。
- [0003] 近年、脂肪組織に、骨髄由来の間葉系幹細胞や臍帯血由来の幹細胞と同様に、transdifferentiationして脳神経系、筋骨格系、心脈管系、内分泌系の構成細胞に分化し得る細胞集団の存在が報告されている(非特許文献1)。脂肪組織は採取が容易であるので、採取された脂肪組織由来間葉系幹細胞を、脂肪組織が由来する対象のみならず、かかる対象以外の患者に用いたとしても倫理的問題は少ないとされる。
- [0004] 肝臓については、皮下脂肪組織由来幹細胞を用いて肝細胞に分化させたとの報告がある(非特許文献2)。しかしながら、治療に用いることができる、肝臓の最小機能単位である肝小葉を再生できるとの報告はなかった。

非特許文献1: Gmble J. et al., Cytotherapy. 2003; 5(5): 362-9

非特許文献2: Seo MJ. et al., Biochem Biophys Res Commun. 2005 Mar 4; 328(1): 258-64

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の解決課題は、脂肪組織由来細胞から肝臓の最小機能単位である肝小葉細胞塊を形成させる方法、およびそれにより得ることのできる肝小葉細胞塊を提供することである。さらに、肝小葉の形成を促進または抑制する物質および肝小葉の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングする方法、およびそのためのキットを開発することも、本発明の解決課題である。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、脂肪組織由来細胞から得られる未分化細胞を培養すること、とりわけ、浮遊化させた状態で培養することにより、高い確率で肝小葉様細胞塊を形成させ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0007] すなわち、本発明は、
- (1) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法、
 - (2) 未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程を含む、(1)記載の方法、
 - (3) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、次に、
(b) 該未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る、
工程を含む、(1)または(2)記載の方法、
 - (4) 未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程が、未分化細胞を浮遊化させた状態で培養し、肝小葉様細胞塊を形成させるものである、(2)または(3)記載の方法、
 - (5) (1)から(4)のいずれか記載の方法により得ることのできる、肝小葉様細胞塊、
 - (6) (5)記載の肝小葉様細胞塊に含まれる、肝細胞、
 - (7) (5)記載の肝小葉様細胞塊および／または(6)記載の肝細胞を含む、肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬組成物、

- (8)肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬品の製造のための、(5)記載の肝小葉様細胞塊および／または(6)記載の肝細胞の使用、
- (9)(5)記載の肝小葉様細胞塊および／または(6)記載の肝細胞を対象に投与することを特徴とする、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防方法、
- (10)脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を促進する物質であることを示す、肝小葉の形成を促進する物質をスクリーニングする方法、
- (11)(10)記載の方法により得ることのできる、肝小葉の形成を促進する物質、
- (12)脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を抑制する物質であることを示す、肝小葉の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法、
- (13)(12)記載の方法により得ることのできる、肝小葉の形成を抑制する物質、
- (14)(10)または(12)記載の方法に用いられる、肝小葉の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット、
- (15)脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して増大している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を上昇させる物質であることを示す、肝小葉の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法、
- (16)(15)記載の方法により得ることのできる、肝小葉の活性を上昇させる物質、
- (17)脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して低減している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を低下させる物質であることを示す、肝小葉の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法、
- (18)(17)記載の方法により得ることのできる、肝小葉の活性を低下させる物質、
- (19)(15)または(17)記載の方法に用いられる、肝小葉の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット、

を提供するものである。

発明の効果

[0008] 本発明により、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法およびそれにより得ることのできる肝小葉様細胞塊、肝小葉の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法およびそれにより得ることのできる肝小葉の形成を促進または抑制する物質、肝小葉の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングする方法およびそれにより得ることのできる肝小葉の活性を上昇または低下させる物質、ならびにかかるスクリーニングのためのキットなどが提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、得られた脂肪組織由来細胞の顕微鏡像である。
[図2]図2は、得られたアディポスフェアの顕微鏡像である。
[図3]図3は、得られた肝小葉様細胞塊の顕微鏡像である。
[図4]図4は、 α -フェトプロテインについての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対する α -フェトプロテインの発現の比率を表す。
[図5]図5は、アルブミンについての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対するアルブミンの発現の比率を表す。
[図6]図6は、ケラチン18についての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対するケラチン18の発現の比率を表す。
[図7]図7は、ケラチン19についての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対するケラチン19の発現の比率を表す。
[図8]図8は、CYP1B1についての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対するCYP1B1の発現の比率を表す。
[図9]図9は、グルタミン合成酵素についての定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。縦軸はGAPDHの発現に対するグルタミン合成酵素の発現の比率を表す。
[図10]図10は、肝小葉様細胞塊により産生された α -フェトプロテインについてのウェスタンブロット分析の結果である。
[図11]図11は、肝小葉様細胞塊により産生されたアルブミンについてのウェスタンブロット分析の結果である。

[図12]図12は、肝小葉様細胞塊における α -フェトプロテインの存在を免疫組織化学染色により示す顕微鏡像である。

[図13]図13は、肝小葉様細胞塊におけるアルブミンの存在を免疫組織化学染色により示す顕微鏡像である。

[図14]図14は、肝小葉細胞塊におけるDiI-LDLの取り込みを示す蛍光顕微鏡像である。

[図15]図15は、肝小葉細胞塊におけるグリコーゲンの蓄積をPAS染色により示す顕微鏡像である。

[図16]図16は、肝小葉様細胞塊により生成された尿素量を示すグラフである。

[図17]図17は、肝炎マウスモデルにおける肝小葉様細胞塊の移植による効果を示すグラフである。縦軸は総ビリルビン濃度(mg/dL)を表す。

[図18]図18は、マウス腎皮膜下への肝小葉様細胞塊の移植後における肝小葉様細胞塊の生着をHE染色により示す顕微鏡像である。

[図19]図19は、肝小葉様細胞塊の移植後におけるアルブミンの発現を免疫組織染色により示す顕微鏡像である。

[図20]図20は、移植後の肝小葉様細胞塊におけるグリコーゲンの蓄積をPAS染色により示す顕微鏡像である。

[図21]図21は、脂肪組織から得られたADMPCの顕微鏡像である。

[図22]図22は、ADMPC由来のRNAを用いたRT-PCRの結果より神経提細胞特異的なマーカー遺伝子の発現を示す。

[図23]図23は、ADMPC由来のRNAを用いたRT-PCRの結果を示す電気泳動像である。

[図24]図24は、ADMPCを6継代したときのRT-PCRの結果を示すものである。

[図25]図25は、ADMPCにおけるSca-1の定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はSca-1/GAPDHを表す。

[図26]図26は、ADMPCにおけるABCG2の定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はABCG2/GAPDHを表す。

[図27]図27は、ADMPCにおけるSSEA-4、CD29、CD44、CD73、CD105お

よびCD166の発現を示すFACS分析の結果である。

[図28]図28は、従来法によるADSCと比較してADMPCでは線維芽細胞の夾雑が少ないことを示すFACS分析の結果である。

[図29]図29は、ADMPCを分化させて得られた膵内分泌細胞の顕微鏡像である。

[図30]図30は、ADMPCを分化させて得られた肝細胞の顕微鏡像である。

[図31]図31は、ADMPCを分化させて得られた肝細胞における α -フェトプロテインの定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はAFP(α -フェトプロテイン)/GAPDHを表す。

[図32]図32は、ADMPCを分化させて得られた肝細胞におけるアルブミンの定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はアルブミン/GAPDHを表す。

[図33]図33は、ADMPCを分化させて得られた肝細胞におけるCYP1B1の定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はCYP1B1/GAPDHを表す。

[図34]図34は、ADMPCを分化させて得られた肝細胞におけるグルタミン合成酵素の定量的PCRによる発現量を示すグラフである。縦軸はグルタミン合成酵素/GAPDHを表す。

[図35]図35は、DMSOまたはOP9培養上清の存在下にて培養された細胞におけるRT-PCRの結果を示すものである。

[図36]図36は、定量的PCRによるDMSO存在下にて培養した細胞におけるNkx2.5の発現を示すグラフである。縦軸はNkx2.5/GAPDHを表す。

[図37]図37は、定量的PCRによるDMSO存在下にて培養した細胞におけるGATA-4の発現を示すグラフである。縦軸はGATA-4/GAPDHを表す。

[図38]図38は、定量的PCRによるDMSO存在下にて培養した細胞における α -CAの発現を示すグラフである。縦軸は α -CA/GAPDHを表す。

[図39]図39は、定量的PCRによるDMSO存在下にて培養した細胞におけるMLCの発現を示すグラフである。縦軸はMLC/GAPDHを表す。

[図40]図40は、定量的PCRによるDMSO存在下にて培養した細胞におけるMHCの発現を示すグラフである。縦軸はMHC/GAPDHを表す。

[図41]図41は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシートの強拡大像である。

[図42]図42は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシートの移植前2週間、移植前、移植後4週間および16週間における心エコー図である。上段はMIコントロール、下段はADMPC由来心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓のものである。

[図43]図43は、ADMPCを含むシートの移植前2週間、移植前、移植後4週間および16週間における心エコー図である。上段はMIコントロール、下段はADMPCを含むシートを移植した心臓のものである。

[図44]図44は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(丸)、およびADMPCを含むシート(四角)を移植した心臓のLVDdの改善を示すグラフである(縦軸の単位;mm)。

[図45]図45は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(丸)、およびADMPCを含むシート(四角)を移植した心臓のLVDsの改善を示すグラフである(縦軸の単位;mm)。

[図46]図46は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(丸)、およびADMPCを含むシート(四角)を移植した心臓の%EFの改善を示すグラフである。

[図47]図47は、ADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(丸)、およびADMPCを含むシート(四角)を移植した心臓の%FSの改善を示すグラフである。

[図48]図48は、ADMPCを含むシート(四角)と比較してADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(三角)を移植した心臓のLVDsの改善を示すグラフである。

[図49]図49は、ADMPCを含むシート(四角)と比較してADMPC由来心筋芽細胞を含むシート(三角)を移植した心臓の%EFの改善を示すグラフである。

[図50]図50は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓のHE染色像(100倍)である。

[図51]図51は、ADMPCを含むシートを移植した心臓のHE染色像(100倍)である。

[図52]図52は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒト α -CA抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図53]図53は、ADMPCを含むシートを移植した心臓を抗ヒト α -CA抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図54]図54は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒトMHC抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図55]図55は、ADMPCを含むシートを移植した心臓を抗ヒトMHC抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図56]図56は、ADMPC由来心筋芽細胞およびADMPCを含むシートの移植後における心臓の構造を、抗ヒト α -CA抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡像を示すグラフである。

[図57]図57は、ADMPC由来心筋芽細胞およびADMPCを含むシートの移植後における心臓の構造を、抗ヒトMHC抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡像を示すグラフである。

[図58]図58は、ADMPC由来心筋芽細胞およびADMPCを含むシートを移植した後における抗ヒト α -CA抗体陽性領域の厚みを表した図である。

[図59]図59は、ADMPC由来心筋芽細胞およびADMPCを含むシートを移植した後における抗ヒト α -CA抗体陽性領域の厚みを指標にグラフ化した図である。

[図60]図60は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒトHLA-ABC抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図61]図61は、ADMPCを含むシートを移植した心臓を抗ヒトHLA-ABC抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像(100倍)である。

[図62]図62は、ADMPCおよびADSCの脂肪細胞への分化状態をオイルレッドO染色により比較した図である。

[図63]図63は、ADMPCを分化させて得られた脂肪細胞に含まれる脂質含有量を示すグラフである。縦軸は脂質含有量(オイルレッドO含量/ウェル)を表す。

[図64]図64は、ADMPCおよびADSCの骨への分化状態をアリザリンレッド染色により比較した図である。

[図65]図65は、ADMPCおよびADSCの骨への分化状態をアルカリホスファターゼ活性により比較した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、1の態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂

肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に関するものである。本発明は、肝臓の最小機能単位である肝小葉に類似する細胞塊を形成できる点で非常に優れている。脂肪組織由来細胞とは、内臓脂肪組織または皮下脂肪組織から得られる細胞または細胞集団、あるいは間葉系肝細胞、ES細胞の様な幹細胞から分化誘導された生体内の脂肪組織に含まれる細胞に類似した細胞または細胞集団をいう。通常には、脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織由来幹細胞、脂肪組織由来間質細胞、後述の脂肪組織由来多系統前駆細胞、脂肪前駆細胞またはこれらに類似する細胞のいずれか、あるいはこれら全てまたは一部からなる混合物を含む細胞集団をいう。脂肪組織由来細胞は、当業者に公知の手段・方法により脂肪組織などから得ることができる。さらに、得られた脂肪組織由来細胞を、当業者に公知の手段・方法を用いて増殖させ、例えば、形質を安定させてもよい。脂肪組織由来細胞を、デキサメサゾンおよびアスコルビン酸を含む培地、例えば、ITS (10. 0mg/L インスリン、5. 5mg/L トランスフェリン、6. 7ng 亜セレン酸ナトリウム)、1nM デキサメサゾン、0. 1mM アスコルビン酸、10ng/mL rhEGF、および5% FCSを添加した60% DME M(低グルコース)および40% MCDB201培地中、フィブロネクチンコートディッシュなどの培養器にて培養することにより、脂肪組織由来細胞を増殖させてもよい。

[0011] 脂肪組織由来細胞が由来する動物種は、特に限定されず、好ましくは、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。得られた肝小葉様細胞塊を用いて疾患を予防または治療すべき動物種と同一の動物種、あるいは同一個体の脂肪組織由来細胞を用いることがより好ましい。脂肪組織は生体内に十分量存在し、比較的容易に得られるため、例えば、死体などの限られた材料から肝小葉を得る方法などと比較して、本発明は非常に優れている。例えば、自己由来の脂肪組織由来細胞を用いて本発明の上記方法を行い、得られた肝小葉様細胞塊を自己移植することで、拒絶反応を危惧することなく肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患を治療することが可能になる。

[0012] 肝小葉様細胞塊とは、生体内の肝小葉、およびそれに類似する機能・形態を有する細胞塊をいい、例えば、肝細胞、胆管上皮細胞、内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞などを含む。本発明の肝小葉様細胞塊は、個々の肝細胞と比べ、十分な量の分

泌タンパク質を産生できる点、高い代謝能を有する点、高い解毒能を有する点などで非常に優れている。また、細胞塊を形成させることで、例えば、移植等の目的に用い易いという利点も有する。

[0013] 本発明の、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊の取得方法は、重要な工程として、未分化細胞から肝小葉様細胞塊を形成させる工程を含むことが好ましい。本発明の、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊の取得方法は、重要な工程として、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程をさらに含むことが好ましい。これらの工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。

[0014] 未分化細胞とは、多種多様な細胞、例えば、肝前駆細胞、膵前駆細胞、心筋前駆細胞、血管内皮前駆細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞などに分化することのできる細胞をいう。未分化細胞を得る工程は、得られた未分化細胞を増殖させる工程をさらに含んでいてもよい。未分化細胞を増殖させることで、肝小葉様細胞塊の形成効率を増大させ、得られる肝小葉様細胞塊の数を増加させることなどが可能である。未分化細胞を得る工程は、例えば、ソーティング、MACS、ロゼッタ形成法などの抗原抗体反応による方法、密度勾配法、形態的に選別する方法、単一細胞クローン化などの既知の方法を用いて行われてもよいし、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることにより行われてもよい。すでに分化した細胞を死滅させ、かつ未分化細胞を生存・増殖させることが可能であるため、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることが好ましい。浮遊化状態での培養については、後述する。ここで、アディポスフェアとは、未分化細胞を主成分として含む球状体であると定義する。アディポスフェアの形成と次の肝小葉様細胞塊への分化は、連続してまたは同時に生じ得るので、アディポスフェアは未分化細胞の他に肝細胞、胆管上皮細胞、内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞などを含んでいてもよい。

[0015] 肝小葉様細胞塊を得る工程は、未分化細胞を例えば、線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、オンコスタチンM、上皮増殖因子、およびジメチルスルホキシドを含む培地にて培養することにより行われ、好ましくは、かかる工程は、未分化細胞を浮遊化させた状態で培養することにより行われる。浮遊化させて培養することで、生体

内の肝小葉に類似した形態を有する細胞塊をより容易に得ることができる。未分化細胞の浮遊化状態での培養は、培養容器との接着を防止あるいは抑制して遊離した状態に細胞を置いて、培養することを意味する。細胞の浮遊化は種々の公知の手段・方法で行うことができる。例えば、細胞の接着を防止あるいは抑制するように処理された、あるいは細胞の接着を防止あるいは抑制するような材料で作られた培養容器または装置を用いて細胞を浮遊化状態においてもよい。培養容器または装置としては、シリコン処理された培養容器(例えば、シリコン化フラスコ)または低接着性培養ディッシュ(例えば、ハイドロセル(CellSeed))のごとき低接着性培養容器などがある。あるいはハンギング・ドロップ培養法を用いて細胞を浮遊化させた状態で培養させてもよい。また、浮遊化の開始時点において、あるいは浮遊化を継続させるために、適宜、公知の手段・方法を併用してもよい。かかる手段・方法の例としては、トリプシン／EDTA、コラゲナーゼ、Cell Dissociation Buffer(GIBCO Invitrogen)などの酵素またはキレート剤により細胞を遊離させること、スクレーパーなどを用いて物理的に細胞を掻き取ること、あるいは細胞回収用温度応答性培養器材(例えば、レプセル(CellSeed))にて細胞を培養後、例えば、20℃で30分間インキュベーションして細胞を剥離させる方法などがある。未分化細胞を浮遊化させた状態で培養することにより、上記肝小葉様細胞塊が形成される。

[0016] 本発明は、もう1つの態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊に関するものである。上述の通り、本発明の肝小葉様細胞塊は肝細胞を含む。例えば、肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患またはその素因を有する対象または該対象と同種のものの脂肪組織から採取した細胞を用いて上記方法を行い、得られた肝小葉様細胞塊を該対象に移植することで、肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患を治療または予防することなどが可能である。

[0017] 本発明は、さらなる態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞に関するものである。

[0018] 本発明は、なおさらなる態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を含む、肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬組成物に関するものである。

肝機能の低下により生じる疾患とは、肝臓の機能の低下のみならず機能不全により生じる疾患を含み、例えば、肝炎、肝硬変、肝癌、肝不全、薬剤性肝障害、アルコール性肝障害、先天性代謝異常、胆汁うっ滞性肝障害などである。本発明の医薬組成物において、肝小葉様細胞塊または肝細胞はPBSのような適当な溶液中に懸濁されていてもよい。また、本発明の医薬組成物は、肝小葉様細胞塊または肝細胞の他、それらの肝臓への生着を促進させる物質、肝機能改善薬、適当な添加剤、賦形剤などを含んでいてもよい。

[0019] 本発明はまた、別のさらなる態様において、肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬品の製造のための、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊および／またはかかる肝小葉細胞塊に含まれる肝細胞の使用に関するものである。

[0020] 本発明は、別の態様において、上記培養方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を対象に投与することの特徴とする、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防方法に関するものである。拒絶反応等の点から、好ましくは、同一種、あるいは自己の脂肪組織由来細胞から得ることのできる肝小葉様細胞塊または肝細胞が本発明において用いられる。肝小葉様細胞塊または肝細胞は、例えば、腎皮膜下、経門脈的に肝臓内、大網内、腹腔内、脾臓内、皮下などに移植または注射されてもよい。対象は、いずれのものであってもよく、ヒト対象であってもよいし、ヒト以外の対象、例えば、マウス、サルなどの哺乳類であってもよい。肝小葉様細胞塊または肝細胞の投与量、投与回数などは、例えば、対象の状態、疾患の重篤度などの種々の因子に応じて適宜選択される。

[0021] 本発明はさらに、肝小葉細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を投与することの特徴とする、血中ビリルビン濃度を低減させる方法に関するものである。かかる方法は、*in vivo*および*in vitro*のいずれにおいて行われてもよい。

[0022] 本発明は、さらに別の態様において、脂肪組織を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することの特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を促進する物質であることを示す、肝小葉の形成を促進する物質をスクリーニン

グする方法に関するものである。上述の通り、肝小葉様細胞塊には肝細胞が含まれるので、かかる方法は、肝細胞への分化を促進する物質のスクリーニング方法も包含する。候補物質としては種々のものがあり、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、またはオンコスタチンMのアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。脂肪組織から肝小葉様細胞塊を得る際の候補物質の培地への添加は、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程、および未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程のいずれか、あるいは両方で1回または複数回行われてもよい。

[0023] 肝小葉様細胞塊の形成は、例えば、顕微鏡観察により形成された肝小葉様細胞塊の数を計測すること、培養上清中に分泌された α -フェトプロテイン、アルブミンなどを例えば、ELISAを用いて定量すること、 α -フェトプロテイン、アルブミン、CYP1B1、グルタミン合成酵素、ケラチン18、ケラチン19などの遺伝子の発現を定量的PCRにより測定すること、あるいは肝小葉への分化・形成に伴い発現が減少または増加することが分かっているマーカー物質、例えば、トランスサイレチン、 α 1-抗トリプシン、チロシンアミノトランスフェラーゼ、グルコース-6-ホスファターゼなどを定量的PCRまたはELISAなどにより測定することなどにより、調べることができる。

[0024] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の形成を促進する物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に用いて、得られる肝小葉様細胞塊の数を増加させてもよいし、肝小葉様細胞塊の形成速度を増大させてもよい。または、かかる物質を、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

[0025] 本発明のさらに別の態様は、脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を抑制する物質であることを示す、肝小葉の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。上述の通り、肝小葉様細胞塊には肝細胞が含まれるので、かかる方法は、肝細胞への分化を抑制する物質のスクリーニング方法も包含

する。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、四塩化炭素、フェノバルビタールなどの肝毒性を有する薬剤のアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、肝機能の亢進により生じる疾患の治療または予防に適していると考えられる。候補物質の培地への添加、肝小葉様細胞塊の形成を調べる手段・方法については上述の通りである。

[0026] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の形成を抑制する物質に関するものである。

[0027] 本発明は、なおさらに別の態様において、肝小葉の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織からの細胞取得手段、培地、培養容器、ならびに肝小葉様細胞塊の形成を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

[0028] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して増大している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を上昇させる物質であることを示す、肝小葉の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。肝小葉の活性とは、肝小葉の解毒作用、タンパク質合成能、代謝作用などをいう。

[0029] 肝小葉様細胞塊の活性の上昇は、例えば、培養上清中に分泌された α -フェトプロテイン、アルブミンなどをELISAなどを用いて定量し、かかるタンパク質量の増減により、あるいは α -フェトプロテイン、アルブミン、CYP1B1、グルタミン合成酵素、ケラチン18、ケラチン19などの遺伝子の発現を定量的PCRにより測定し、かかる遺伝子の発現の増減により、調べることができる。候補物質としては種々のものがあり、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、またはオンコスタチンMのアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。候補物質の培地への添加は、1回または複数回行われてもよい。

[0030] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることの

できる、肝小葉の活性を上昇させる物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に用いて、得られる肝小葉様細胞塊の活性を増大させてもよい。または、かかる物質を、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

[0031] 本発明は、別の態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して低減している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を低減させる物質であることを示す、肝小葉の活性を低減させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、四塩化炭素、フェノバルビタールなどが挙げられるが、これらに限定されない。候補物質の培地への添加、肝小葉様細胞塊の活性を調べる手段・方法については上述の通りである。

[0032] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の活性を低減させる物質に関するものである。

[0033] 本発明は、なおさらに別の態様において、肝小葉の活性を上昇または低減させる物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織からの細胞取得手段、培地、培養容器、ならびに肝小葉様細胞塊の活性を調べる手段等を含んでもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

[0034] 本発明は、1の態様において、脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団に関するものである。脂肪組織由来多系統前駆細胞は、内胚葉、中胚葉、外胚葉などの種々の細胞系列に分化することができる細胞であって、未分化マーカーであるIslet-1を発現する細胞をいう。脂肪組織由来多系統前駆細胞は、脂肪組織の他、胚性幹細胞などから分化させて得ることができる。脂肪組織由来多系統前駆細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる細胞集団を用いた再生医療により治療されるべき対象と同種または同一のもの

が好ましい。

[0035] 本発明の細胞集団は、非所望な夾雑物、例えば、赤血球、血管内皮細胞などの脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の割合が低いので、培養の容易さ、高い分化効率などの利点を有する。かかる夾雑物を除去する手段としては、脂肪組織由来多系統前駆細胞の比重との差を利用した手段・方法、例えば、比重法、脂肪組織由来多系統前駆細胞の付着性との差を利用した手段・方法、例えば、EDTAのようなキレート剤、トリプシンのような酵素を用いた方法、ソーティング、MACSなどの抗原抗体法、形態的に選別する方法、単一細胞クローン化、溶血法などが挙げられる。細胞集団における夾雑物の低減は、例えば、夾雑物が有するマーカーをRT-PCR、ELISAなどの方法を用いて定量することにより、顕微鏡下で視覚的に、あるいはフローサイトメリー、免疫組織染色により確認され得る。

[0036] 本発明の細胞集団は、好ましくは、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、96%、または99%の脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む。脂肪組織由来多系統前駆細胞がかかる割合含まれることにより、本発明の細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持が容易であること、分化させたときの効率が低いことなどの利点を有する。本発明の細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の他、フィーダー細胞のような脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持または分化に有効な細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでもよい。かかる細胞を含むことにより、上記利点が増強され得る。

[0037] 本発明は、別の態様において、脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法であって、(a)脂肪組織由来細胞集団から赤血球を除去し、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を得て；次に、(b)該前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団から脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を除去し、脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る、工程を含む方法に関するものである。本発明により、脂肪組織由来の脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を低減させ、脂肪組織由来多系統前駆細胞を高収率かつ高純度で得ることができる。本発明において、上記工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。本発明のこの態様に用いられる脂肪組織は、生体内の皮下脂肪組織および内臓脂肪組織のいずれであってもよ

い。脂肪組織が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、本発明の方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた再生医療により治療されるべき対象と同種または同一のものが好ましい。

[0038] 本明細書において用いられる脂肪組織由来細胞集団は、少なくとも脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団をいう。脂肪組織由来細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の他に、赤血球、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでいてもよい。脂肪組織由来細胞集団は、例えば、脂肪組織をコラゲナーゼなどの酵素により、あるいは物理的手段・方法により処理し、および／または脂質などを例えば、遠心分離、フィルター処理により除去して得られる。

[0039] 赤血球は脂肪組織由来多系統前駆細胞を吸着する性質を有し、これにより、脂肪組織由来多系統前駆細胞の収率を低下させ得る。従って、脂肪組織由来細胞集団から赤血球を除去することが必要になる。脂肪組織由来細胞集団からの赤血球の除去は、いずれの手段・方法により行われてもよく、例えば、赤血球とそれ以外の細胞の付着性の差に基づくもの以外の手段・方法で行われるものであってもよい。好ましくは、かかる除去は、比重法、溶血法、フィルター法により、より好ましくは、比重法により行われる。比重法は、適当な比重の比重液、例えば、Lymphoprepなどの市販の比重液を用いて行われ得る。用いられる比重液の比重は、赤血球とそれ以外の細胞の比重の間のものであればよく、好ましくは、1.063～1.119、より好ましくは、1.070～1.110、最も好ましくは、1.077である。

[0040] 本明細書において用いられる前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、少なくとも脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団をいう。前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の他に、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでいてもよい。上述の通り、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、実質上、赤血球を含まない。赤血球を除去して、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を形成させることで、続く脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の除去が容易かつ効率よく行われ得る。

[0041] 本明細書において用いられる脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞は、血管

内皮細胞、線維芽細胞などの付着細胞などをいう。前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団からの脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の除去は、いずれの手段・方法により行われてもよいが、好ましくは、トリプシン以外の物質、より好ましくは、EDTA、EGTAなどのキレート剤、最も好ましくは、EDTAを用いて行われる。好ましくは、かかる除去は、脂肪組織由来多系統前駆細胞とそれ以外の細胞との付着性の差に基づき、行われるものである。上記の他、例えば、フィルター濾過などにより、脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を除去することができる。これらの細胞を除去することで、得られる脂肪組織由来多系統前駆細胞集団の純度、および収率が上昇する。

[0042] 本発明は、別の態様において、上記脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞に関するものである。かかる脂肪組織由来多系統前駆細胞は、上述の通りIslet-1を発現する。

[0043] 本発明は、さらなる態様において、上記脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団に関するものである。かかる細胞集団は、赤血球、血管内皮細胞などの不所望な脂肪組織由来の細胞を実質上含まないが、フィーダー細胞などの脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持・分化などに有効な細胞を含んでいてもよい。

[0044] さらに、本発明により、シートを構成するのに十分な量の心筋芽細胞が提供される。従って、本発明は、1の態様において、心筋芽細胞を含むシートを提供するものである。本明細書において、心筋芽細胞とは、心筋細胞に分化するよう方向付けられた細胞であつて、 α -cardiac actin (α -CA) およびMyosin Light Chain (MLC)を発現している細胞をいう。心筋芽細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる心筋芽細胞を含むシートが適用される対象と同種、または同一のものが好ましい。例えば、対象と同種または同一動物由来の心筋芽細胞を含むシートを対象に移植することで、拒絶反応を危惧することなく重症心不全を治療することなどが可能となる。

[0045] 心筋芽細胞を含むシートとは、心筋芽細胞を必須構成成分として含む細胞塊をい

う。シートにおいて、心筋芽細胞は単層または重層のいずれの形態で含まれていてもよい。シート形態を有することにより、移植等に用いる際の取扱が容易になる。シートの心筋芽細胞以外の構成成分は、いずれのものであってもよく、例えば、脂肪組織由来幹細胞、心筋細胞、細胞用のスキャホールド、血管内皮、マトリクスなどが挙げられる。シートの大きさおよび厚さは、適用される傷害領域の大きさなど種々の条件に応じて適宜選択され得る。

[0046] シートに含まれる心筋芽細胞の割合は、特に限定されず、例えば、かかるシートが適用される対象の状態など種々の条件に応じて適宜選択され得る。該割合は、例えば、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%などである。心筋芽細胞の割合は、当業者に既知の手段、例えば、定量的RT-PCRを用いて心筋芽細胞マーカー遺伝子である α -CAまたはMLCを定量することにより、決定され得る。

[0047] 本発明のシートの機能は、公知の方法、例えば、シートを対象に移植して、移植された対象の心機能を心エコーにより、あるいは拡張末期径(LVDd)、収縮末期径(LVDs)、左室駆出率(%EF)または左室内径短縮率(%FS)などを計測することにより評価して、調べることができる。

[0048] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来幹細胞を培養することを特徴とする、心筋芽細胞を得る方法を提供する。該方法により、脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞を大量に得ることが可能となる。該方法は、脂肪組織由来細胞から脂肪組織由来幹細胞を得る工程を含んでもよい。脂肪組織由来幹細胞とは、内胚葉、中胚葉、外胚葉などの種々の細胞系列に分化することができる細胞をいい、未分化マーカーであるIslet-1を発現している脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)を含む。脂肪組織由来幹細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる脂肪組織由来幹細胞から得られた心筋芽細胞を用いて治療されるべき対象と同種または同一のものが好ましい。

[0049] 好ましくは、本発明の心筋芽細胞を得る方法は、脂肪組織由来幹細胞をDMSOまたはOP9培養上清の存在下で培養する工程を含むものである。かかる条件下で脂

肪組織由来幹細胞を培養することにより、該細胞が心筋芽細胞に分化および／または誘導され得る。かかる培養に用いられる培地は、適宜選択され得る。かかる培地は、例えば、レチノイン酸、BMP2、BMP4、TGF β 2、HGF、bFGF、チロキシン、オキシトシンまたは脂肪酸濃縮液などの種々の因子を含むものであってもよい。心筋芽細胞への分化は、例えば、 α -CAまたはMLCなどの心筋芽細胞マーカーの発現をRT-PCRによって測定することにより、調べることができる。

[0050] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を得る方法により得ることのできる心筋芽細胞を提供するものである。かかる心筋芽細胞を心筋梗塞、心筋症などの心疾患の治療に用いることもできるし、あるいは心筋芽細胞を含むシートの材料として用いることもできる。

[0051] 本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートを得る方法であって、下記工程：(a)脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させ、次に、(b)心筋芽細胞を含むシートを形成させる、を含む方法を提供するものである。これらの工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。かかる方法により、心筋芽細胞を含むシートを容易かつ効率的に得ることができる。脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させる工程は、上述の通りである。

[0052] 心筋芽細胞から心筋芽細胞を含むシートを形成させる工程は、当業者に既知の手段または方法により達成され得る。好ましくは、該工程は、心筋芽細胞を付着した状態で増殖させて細胞塊を形成させ、次に、形成された細胞塊を剥離することにより達成され得る。用いられる心筋芽細胞の数、および培養時間は、得られるシートの大きさ、シートに含まれる心筋芽細胞の数など種々の条件に応じて適宜選択され得る。例えば、心筋芽細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個を24～72時間培養することにより、シートを得てもよい。細胞塊の剥離は、種々の手段、例えば、物理的刺激により行われ得る。あるいは、心筋芽細胞を温度感受性培養皿にて培養し、例えば、20℃以下にてインキュベーションすることにより、細胞塊を剥離してもよい。

[0053] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を含むシートを得る方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシートに関するものである。かかる心筋芽細胞を含むシートを、心筋梗塞、心筋症などの心疾患の治療に用いることができる。

。

[0054] 本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートまたは心筋芽細胞を対象に移植することを特徴とする、心筋の機能低下により生じる疾患を治療および／または予防する方法に関するものである。心筋の機能低下により生じる疾患とは、例えば、急性心筋梗塞、陳旧性心筋梗塞、虚血性心筋梗塞、拡張型心筋症、先天性心疾患などである。対象への移植は、当業者に既知の方法により行われ得る。例えば、心筋芽細胞を含むシートを、心筋の機能が低下した領域に移植することにより、あるいは心筋芽細胞を冠動脈経由で移植することにより、行われ得る。移植するシートの大さおよび厚さ、シートに含まれる心筋芽細胞の数、および心筋芽細胞数は、対象の状態、傷害領域の大きさなど種々の条件に応じて適宜選択され得る。

[0055] 従って、本発明は、さらなる態様において、心機能の低下により生じる疾患を治療および／または予防するための、心筋芽細胞を含むシートまたは心筋芽細胞を含む組成物を提供するものである。かかる組成物は、該シートまたは心筋芽細胞以外に、例えば、PBS、培地、生着を促進させる物質、心機能改善薬、成長因子、増殖因子などを含んでいてもよい。

[0056] 本発明は、別の態様において、心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

(a)脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；

(b)脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、

を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を促進する物質であることを示す方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、レチノイン酸、BMP2、BMP4、TGF β 2、HGF、bFGF、チロキシン、またはオキシトンのアナログおよび誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化は上述の通りである。心筋芽細胞への分化は、種々の方法、例えば、 α -CAまたはMLCなどの心筋芽細胞マーカーの発現をRT-PCRによって測定することにより、調べることができる。

[0057] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞への分化を促進する

物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を促進する物質に関するものである。該物質を、上述の心筋芽細胞および心筋芽細胞を含むシートの製造方法に用いて、得られる心筋芽細胞およびシートを増大させてもよい。または、かかる物質を心機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

[0058] 本発明は、別の態様において、心筋芽細胞への分化を抑制する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

(a)脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；

(b)脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、

を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して抑制されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を抑制する物質であることを示す、方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、ノギンのアナログおよび誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0059] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞への分化を抑制する物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を抑制する物質に関するものである。該物質を心機能の上昇により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

[0060] さらに、本発明は、心筋芽細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織由来幹細胞、培地、培養容器、ならびに心筋芽細胞への分化を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

[0061] 本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

(a)脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；または

(b)候補物質存在下にて心筋芽細胞を含むシートを形成させ；

(c)心筋芽細胞を含むシートの形成を調べる、を含む、該形成が、候補物質不含系にて形成させたものと比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質であることを示す方法に関するものである。シートの形成を調べる方法は、上述の通りである。候補物質の添加は、上記工程(a)および(b)の両方において行われてもよいし、一方にて行われてもよい。

[0062] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質に関するものである。

[0063] さらに、本発明は、上記心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキットに関するものである。

[0064] 以下に実施例を示して本発明を詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

実施例 1

[0065] 脂肪組織由来細胞の単離および培養

ヒト脂肪組織を大きさ $2\sim 3\text{mm}^2$ の断片に刻み、コラゲナーゼIを用いて消化した。消化物を、10% FBSおよび抗生剤を含むDMEMにて24~36時間培養し、0.02% EDTAで処理して、脂肪組織由来細胞を得た。得られた脂肪組織由来細胞を60% DMEM(低グルコース)、40% MCDB201、 $1\times\text{ITS}$ (10.0mg/L インスリン、5.5mg/L トランスフェリン、6.7ng 亜セレン酸ナトリウム)、10ng/mL rh EGF、1nM デキサメサゾン、0.1mM アスコルビン酸、および5% FCS(Hyclone)を含む培地中、フィブロネクチンコートディッシュで3~5継代培養して拡大した。脂肪組織由来細胞の顕微鏡像を図1に示す。

[0066] 脂肪組織由来細胞からの未分化細胞の取得

脂肪組織由来細胞を0.25% トリプシン/EDTA(ナカライテスク)で処理して解離させ、単一化した細胞を、20% FCS、1mM グルタミン(GIBCO Invitrogen)、および1% 非必須アミノ酸(GIBCO Invitrogen)を含むノックアウトDMEM(GIBCO Invitrogen)中、低接着培養ディッシュ(Hydrocell;セルシード)にて2~3日間培養した。

細胞は自己凝集し、アディポスフェアを形成した。アディポスフェアの顕微鏡像を図2に示す。

[0067] 未分化細胞からの肝小葉様細胞塊の形成

得られたアディポスフェアを、PBSにて2～3回洗浄(1000～1200rpmにて遠心)し、60% DMEM(低グルコース)、40% MCDB201、1×ITS、1nM デキサメサゾン、100 μ M アスコルビン酸、10ng/ml rhEGF、bFGF、HGFおよびOSM(オンコスタチンM)を含む培地中、低接着培養ディッシュ(Hydrocell;セルシード)にて3～4週間培養した。培養開始の10日目から0.1% DMSOを添加して、肝小葉様細胞塊を得た。得られた肝小葉様細胞塊の顕微鏡像を図3に示す。

実施例 2

[0068] 肝小葉様細胞塊の肝細胞遺伝子発現特性

1. RNAの抽出

肝小葉様細胞塊からのRNAの抽出を、RNeasy Protect Mini Kit(QIAGEN)を用いて、以下の通り行った。肝小葉様細胞塊を回収し、10 μ l/ml 2-メルカプトエタノール(Nacalai Tesqu)を含むバッファーRLTを600 μ l/ 10^7 細胞の割合で加えた。20G針でピペッティングして、細胞をホモジェナイズし、次に、70% エタノール600 μ lを添加した。得られた混合液700 μ lを2mlのコレクションチューブ内のRNeasy Miniカラムに移し、1000rpmにて15秒間遠心した。次に、バッファーRW1 350 μ lをカラムに添加し、1000rpmにて15秒間遠心した。DNase Iストック溶液(QIAGEN)10 μ lを、バッファーRDD 70 μ lに添加して転倒混和し、RNeasy Miniカラム内のRNeasyシリカゲルメンブレンに添加し、室温で15分間インキュベーションした。バッファーRW1 350 μ lを添加し、1000rpmにて15秒間遠心した。2mlコレクションチューブを新たなものに交換した。カラムにバッファーRPE 500 μ lを添加し、1000rpmにて15秒間遠心した。さらに、バッファーRPE 500 μ lを添加し、1000rpmにて2分間遠心し、次に、1500rpmにて1分間遠心した。カラムを1.5mlコレクションチューブに移し、RNase free water30～50 μ lをRNeasyシリカゲルメンブレンに添加し、1000rpmにて1分間遠心し、RNAを抽出した。

[0069] 2. 1本鎖cDNAの作成

抽出したRNA溶液11.5 μ lに、0.5mM Random Primer(Invitrogen)0.5 μ lおよび10mM dNTPmix(Invitrogen)1 μ lを添加し、65°Cにて5分間反応させ、次に、氷上で冷却した。得られた混合物に5×First-Strandバッファー(Invitrogen)4 μ l、0.1M DTT(Invitrogen)1 μ l、RNaseOUT(Invitrogen)1 μ l、およびSuperScript III RT(Invitrogen)1 μ lを添加し、25°Cで5分間、50°Cで60分間、70°Cで15分間反応させ、1本鎖cDNAを作成した。得られたcDNAを使用まで4°Cにて保存した。

[0070] 3. リアルタイムPCR

作成したcDNA 9 μ lに、TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)10 μ lおよびTaqMan Gene Expression Assays(Applied Biosystems)1 μ lを添加した。Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCRシステムにて次の条件でリアルタイムPCRを行った:95°Cで10分間変性、95°Cで15秒間および60°Cで1分間を40サイクル。 α -フェトプロテイン、アルブミン、CYP1B1、グルタミン合成酵素、ケラチン18およびケラチン19について用いたTaqManプローブを以下の表1に示す。また、内部標準としてGAPDH(Applied Biosystems)を用いた。対照試料として、Seo MJ. et al., Biochem Biophys Res Commun. 2005 Mar 4; 328(1): 258-64記載の方法により得られた肝細胞(「従来法」と表す)、線維芽細胞、HepG2、および脂肪組織由来細胞(「ADSC」と表す)を用いた。結果を図4~9に示す(図中の縦軸は、蛍光強度を示す)。本発明の方法により得られた肝小葉様細胞塊が、従来法で得られた肝細胞と比較して、 α -フェトプロテイン、アルブミン、ケラチン18、ケラチン19、CYP1B1およびグルタミン合成酵素を高発現することが分かった。また、アルブミンを除くこれらの遺伝子の発現は、HepG2におけるものより有意に高かった。

[0071] [表1]

遺伝子名	参照配列	アッセイ I D
α -フェトプロテイン	NM_001134	Hs00173490_m1
アルブミン	NM_000477	Hs00609411_m1
チトクロム P 4 5 0、ファミリー 1、 サブファミリー B、ポリペプチド 1 (CYP1B1)	NM_000104	Hs00164383_m1
グルタミン合成酵素	NM_002065	Hs00374213_m1
ケラチン 1 8	NM_199187/NM_000224	Hs01941416_g1
ケラチン 1 9	NM_002276	Hs00761767_s1

実施例 3

[0072] 肝小葉様細胞塊による肝性タンパク質の産生

A. ウェスタンブロット分析

1. 試料の調製

肝小葉様細胞塊をPBS (Nacalai Tesque)で3回洗浄し、次に、M-PER (PIERCE)を添加した。細胞を超音波破碎にて溶解し、14000gにて15分間遠心して、未溶解の細胞成分を除去した。試料と当量のサンプルバッファー (Nacalai Tesque)を添加し、100℃にて5分間ボイルし、氷冷した。得られた試料のタンパク質濃度を、BCA Protein Assay Reagent (PIERCE)を用いて測定した。

[0073] 2. SDS-PAGE

電気泳動用ゲルミニプレート (PAG ミニ「第一」; 第一化学薬品)、ランニングバッファーを用いて、SDS-PAGEを行った。用いたタンパク質の量は、5 μ gであった。泳動条件は、スタッキングゲル中は10mA、ランニングゲル中は40mAとした。

[0074] 3. ウェスタンブロット

上記の泳動したゲルをブロッキングバッファーで10分間洗浄した。次に、ゲル中のタンパク質を、Wet式ブロッキング (100mA、一晚)にてニトロセルロースメンブレンに写し取った。

[0075] 4. 免疫染色

メンブレンを0.1% Tween20含有PBSにて10分間洗浄した。ブロッキングワン (Nacalai Tesque)を用いて室温で1時間反応させた。1次抗体として、Human Albumin抗体 (BETHYL)またはAlpha Fetoprotein Ab-2 (LAB Vision)の500倍希釈液と1時間反応させた。0.1% Tween20含有PBSにて15分間洗浄した (3回)。

2次抗体として、ポリクローナルブタ抗ウサギ免疫グロブリン／HRPまたはポリクローナルウサギ抗ヤギ免疫グロブリン／HRPの1000倍希釈液と1時間反応させた。0.1% Tween20含有PBSにて15分間洗浄した(3回)。ECL Plus Western Blotting Detection Reagentsを用いてバンドを検出した。結果を図10および11に示す。本発明の方法により得られた肝小葉様細胞塊が、 α -フェトプロテインおよびアルブミンを十分量産生することが分かった。

[0076] B. 免疫組織化学染色

1. 切片の作成

肝小葉様細胞塊をPBS (Nacali Tesque)で3回洗浄し、遠心した。得られたペレットをTissue-Tek OCT-compound (Sakura Finetech Inc.)に包埋し、 -30°C で保存した。クリオスタットを用いて $7\mu\text{m}$ の切片を作成し、スライドガラスに貼付し、 -30°C にて保存した。

[0077] 2. 免疫組織化学染色

上記の切片をドライヤーで乾燥させ、4% パラホルムアルデヒドにて30分間固定した。PBSにて5分間3回洗浄した。ブロッキングワン (Nacalai Tesque)を用いて室温にて1時間反応させた。PBSで5分間3回洗浄した。1次抗体のポリクローナルウサギ抗ヒトアルブミン抗体 (DAKO)の400倍希釈液、またはポリクローナルウサギ抗ヒト α -1-フェトプロテイン抗体 (DAKO)の300倍希釈液と1時間反応させた。PBSで10分間3回洗浄した。2次抗体のAlexaFluor[商標]466ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probes)の500倍希釈液と1時間反応させた。PBSで10分間3回洗浄した。Perma Fluor (日本ターナー)を用いて包埋し、顕微鏡にて観察した。結果を図12および図13に示す。肝小葉細胞塊における α -フェトプロテイン、およびアルブミンの存在を確認した。これにより、肝小葉細胞塊が実際にこれらのタンパク質を産生することが分かった。

実施例 4

[0078] 肝小葉様細胞塊によるLDLの取り込み

1. LDLのDiIによる標識

ヒトLDL(密度 $1.019-1.063\text{g/ml}$)を単離した。単離は、正常なリポたんぱく質

を有するドナーから連続的に超遠心にかけて、saline-EDTAで透析し、次いで0.2 μ mのフィルターでろ過をして滅菌することにより行った。続いて、前記LDLを0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)/PBS中において100mlのDMSO中の1, 1'-dioc-tadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI; Molecular Prob-es) (3mg/ml)と37°Cで8時間インキュベートすることにより、リポたんぱく質(LDL)をDiIで標識した。次に、このリポたんぱく質をPBSで透析し、使用前にろ過した。

2. LDLの取り込み

DiI-LDLの取り込みを検討するために、ADMPCから分化させた肝小葉細胞塊を10 μ g/ml DiI-LDLを含有する無血清DMEM中で37°C3時間インキュベ-トさせた。次いで、細胞を3回洗浄し、Permaflur上にマウントした。このスライドを共焦点レーザー走査顕微鏡(Floview FV1000、Olympus)を用いて調べた。結果を図14に示す。図14から、DiI-LDLが肝小葉細胞塊の細胞質領域に多く取り込まれていることが分かる。これにより、本発明により得られる肝小葉様細胞塊がLDLを取り込む機能を有することが確認できた。

実施例 5

[0079] 肝小葉様細胞塊によるグリコーゲンの蓄積(PAS染色)

分化させた肝小葉様細胞塊を4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋した。サンプルを5 μ mの厚さにスライスして切片を作成した。次いで、この切片を1% 過ヨウ素酸中で5分間酸化させ、脱イオン化水(dH₂O)で3回リンスした。続いて、シッフ試薬で15分間処理し、5~10分間dH₂Oでリンスした。さらにこの切片を1分間マイヤーヘマトキシリンで対比染色させ、dH₂Oでリンスし、光学顕微鏡で観察した。結果を図15に示す。図15から、肝小葉様細胞塊には多くの過ヨウ素酸シッフ染色(PAS)陽性細胞が存在することを観察できた。これにより、本発明により得られる肝小葉様細胞塊がグリコーゲンを蓄積する機能を有することが示された。

実施例 6

[0080] 肝小葉様細胞塊による尿素の生成

1. 尿素の生成

肝小葉様細胞塊を5mM NH₄Cl含有ハネクス緩衝塩溶液(Gibco) 5ml中で2時間

インキュベーションした。上清0.5mlの尿素濃度を、QuantiChrom Urea Assay Kit (Bioassay Systems)を用いて測定した。得られた濃度に上清の総体積をかけて、トータルの生成尿素量を計算した。対照としてHepG2を用いた。

[0081] 2. DNA量の測定

NH₄Cl含有ハンクス緩衝塩溶液を除去し、肝小葉様細胞塊をPBSにて洗浄した。緩衝液を添加し、超音波破碎を行い、細胞をホモジェナイズした。細胞ホモジネート50 μ lに緩衝液1mlを加え、さらに発色液50 μ lを添加して、攪拌した。得られた溶液の蛍光値を、励起:356nm、放出:458nmにて測定し、DNA濃度を決定した。DNA濃度に、添加した緩衝溶液の体積をかけて総DNAを計算した。

[0082] 3. 生成尿素量

得られたトータルの生成尿素量を総DNA量で割り、総生成尿素量を決定した。結果を図16に示す。肝小葉様細胞塊がHepG2と比較して、十分量の尿素を産生したことが分かった。これにより、本発明により得られる肝小葉様細胞塊が十分な解毒作用を有することが確認できた。

実施例 7

[0083] マウス肝炎モデルにおける肝小葉様細胞塊の移植効果

1. マウス肝炎モデルの作成

NOD-SCIDマウスに、四塩化炭素(CCl₄)を300 μ l/kgにて週2回、12週間腹腔内注入し、マウス肝炎モデルを作成した。

[0084] 2. 肝小葉様細胞塊の移植

肝小葉様細胞塊をハンクス緩衝塩溶液で洗浄し、遠心してペレットとした。上記のマウスをセボフルエンにて麻酔した。左傍正中切開にて開腹し、左腎臓を露出し、腎皮膜を剥離してポケットを作成した。作成したポケット内にペレット化した細胞塊を注入して移植した。腹壁を2層にて閉腹した。

[0085] 3. 解析

移植10日目に、マウスから採血し、血中ビリルビン濃度を測定した。結果を図17に示す。肝小葉様細胞塊を移植した群は、移植しなかった群と比較して、血中ビリルビン濃度が低減されることが分かった。さらに、上記の左腎臓を用いて下記の組織学的

解析を行った。肝小葉様細胞塊を移植した左腎臓を取り出し、すぐに10%ホルマリ
ンで固定した。次いで、パラフィンで包埋し、上記と同様の方法によりヘマトキシリンと
エオシン染色(図18)およびPAS染色(図20)を行った。一方で、肝小葉様細胞塊を
移植した腎臓を用いてアルブミンに対する免疫蛍光染色も行った。最初に、前記組
織をOCT-compound (Sakura Finetech Inc.) 中に入れ、すぐに凍結させた。7 μ m
の切片を作成し、4% パラホルムアルデヒド/PBS (WAKO) 中で30分間固定した。
この固定した切片をブロッキング溶液(ブロッキングワン; Nacalai Tesque)とインキュベ
ートした。次いで、抗ヒトALB抗体(ヤギポリクローナル、ウシ、マウスおよびブタALB
で吸着され、親和精製されている、Bethyl Laboratories)、次いでAlexaFluor546ロ
バ抗ヤギIgG抗体(Molecular Probes)でインキュベートした。処理した切片を蛍光顕
微鏡(BX61, Olympus)で観察した(図19)。図18から、肝小葉様細胞塊の生着を確
認できる。図19および図20各々からは、ALB抗体およびPAS染色陽性細胞を観察
でき、アルブミンが発現し、グリコーゲンが蓄積していることが分かった。これらのこと
は肝機能が維持されていることを示す。以上より、本発明の方法により得ることのでき
る肝小葉様細胞塊が、肝機能の低下により生じる疾患の治療に有効であることが分
かった。

実施例 8

[0086] ヒト対象からの脂肪組織の採取

インフォームドコンセントを受けた対象10人(男性4人および女性6人)から、胃癌手
術中に余分な脂肪組織を摘出した。プロトコールは、Osaka University Graduate Sch
ool of Medicine Review Boards for Human Researchに準ずるものであった。全ての対
象を少なくとも10時間絶食させた。対象の年齢は 55 ± 5 歳(平均 $\pm$ SE; 範囲40~6
0歳)であった。ステロイド剤またはTZDの投与を受けている対象はいなかった。対象
から、腹部皮下(筋膜表面の外側)脂肪組織および大網脂肪組織1~10gを得た。

[0087] ADMPCの単離および培養

脂肪組織を刻み、次に、0.075% コラゲナーゼ(Sigma Chemical Co.)含有ハンク
ス緩衝塩類溶液(HBSS)中、37°Cのウォーターバスにて振盪しながら1時間消化し
た。消化産物をCell Strainer(BD Bioscience)で濾過し、800gにて10分間遠心し

た。Lymphoprep (d=1.077) (Nycomed)を用い、比重法により赤血球を除去し、得られた前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を10% ウシ胎児血清 (Hyclone)を含むDMEM中に細胞を播種した。24時間培養して細胞を付着させ、洗浄後、EDTAで処理して、ADMPCを得た。次に、ADMPCを、培地I:60% DMEM-低グルコース、40% MCDB201、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ EGF、 1nM デキサメサゾン、 $100 \mu\text{M}$ アスコルビン酸、および5% FBS中、密度 $10,000\text{細胞}/\text{cm}^2$ にてヒトフィブロネクチンコートディッシュに播種し、3から5継代し、実験に用いた。10日間培養したADMPCの顕微鏡像を図21に示す。

実施例 9

[0088] ADMPCの発現特性

ADMPCおよびアディポスフェアから、Mag-Extractorキット (TOYOBO)を用いて製造元の推奨プロトコールに従い、トータルRNAを単離した。トータルRNA 500ng をDNase処理し、Superscript III逆転写酵素RNase H(-) (Invitrogen)を用いて、cDNAを合成した。Islet-1、Nkx2.5、GATA-4、 α -CA、MLC、MHC、ネスチン、Neurofilament 68、ソマトスタチン、snail、slug、およびGAPDHについて、KOD-plus (TOYOBO)を用いて、以下の条件でRT-PCRを行った: 94°C で2分間変性、次に、 94°C で15秒間の変性、予め決定した温度で30秒間のアニーリング、 68°C で30秒間の伸長を40サイクル。各遺伝子についてのアニーリング温度およびプライマー配列を表2に示す。対照として、特表2005-502352号公報記載の方法により得られた脂肪組織由来幹細胞 (以下、「ADSC」という)を用いた。得られた増幅産物を2% アガロースゲルにて電気泳動した。結果を図22～図24に示す。ADMPCは、アディポスフェアと同様に神経提細胞のマーカであるsnailおよびslugを発現することが示唆された。また、ADMPCは、未分化マーカ、特に心臓、肝臓、膵臓の前駆細胞のマーカとして知られているIslet-1を発現することが分かった。ADSCはIslet-1を発現しておらず、得られたADMPCがADSCとは異なる細胞であると確認した。

[0089] [表2]

遺伝子	プライマー配列	配列番号	アニーリング 温度 (°C)
I s l e t - 1	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	1	6 0
	AGGGGAGATTCAGTGTTGGTG	2	
N k x 2 . 5	GGTGGAGCTGGAGAAGACAGA	3	6 0
	CGACGCCGAAGTTCACGAAGT	4	
G A T A - 4	ACCAGCAGCAGCGAGGAGAT	5	6 0
	GAGAGATGCAGTGTGCTCGT	6	
α - C A	GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC	7	6 0
	AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	8	
M L C - 2 v	GCGCCAACTCCAACGTGTTCT	9	6 0
	GTGATGATGTGCACCAGGTTT	1 0	
M H C	GGGGACAGTGGTAAAAGCAA	1 1	6 0
	TCCCTGCGTTCCACTATCTT	1 2	
G A P D H	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	1 3	6 0
	AGGGGAGATTCAGTGTTGGTG	1 4	
n e s t i n	GGCGCACCTCAAGATGTCC	1 5	6 0
	CTTGGGGTCCTGAAAGCTG	1 6	
N e u r o f i l a m e n t	ATGAGTTCCTTCAGCTACGAGC	1 7	6 0
	GGGCATCAACGATCCAGAGC	1 8	
s o m a t o s t a t i n	GCTGCTGTCTGAACCCAAC	1 9	6 0
	CGTTCTCGGGGTGCCATAG	2 0	
s n a i l	AATCGGAAGCCTAACTACAGCG	2 1	6 0
	GTCCAGATGAGCATTGGCA	2 2	
s l u g	AAGCATTCAACGCCCTCCAAA	2 3	6 0
	AGGATCTCTGGTTGTGGTATGAC	2 4	

[0090] さらに、ADMPCについて上述の通りApplied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCRシステムにてリアルタイムPCRを行い、未分化マーカーであるSca-1およびABCG2の発現を調べた。用いたTaqManプローブを表3に示す。結果を図25および図26に示す。ADMPCがSca-1およびABCG2を発現していることを確認した。

[0091] [表3]

遺伝子名	参照配列	アッセイID
S c a - 1	NM_000332.2	Hs00165656_m1
A B C G 2	NM_004827.2	Hs00184979_m1

[0092] ADMPCのさらなる特性を調べるために、脂肪細胞から単離したADMPCをFAC

S分析にかけた。ADMPCを0.5g/Lトリプシン/0.53mM-EDTA溶液により培養ディッシュから分離し、0.1% FBS含有Dulbecco's Phosphate-buffered Saline(DPBS, Nacalai Tesque)中で懸濁した。一定量(5×10^5 細胞数)を、ヒトCD31(BD PharMingen)、CD105(Ancell)、CD133(R&D)に対するフルオレセインイソチオシアネート(FITC)抱合マウスモノクローナル抗体、ヒトCD29、CD34、CD45、CD56、CD73、CD166(BD PharMingen)、CD44、またはCD166(Ancell)に対するフィコエリトリン(PE)抱合マウスモノクローナル抗体と4°Cで30分間インキュベートした。さらに、インキュベートした細胞を、ヒトSSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81(Chemicon)、ABCG-2、CD117(BD PharMingen)、または線維芽細胞/上皮細胞(AbD Serotec)に対するマウスモノクローナル抗体と、ならびに陰性対照として用いる非特異的なマウス抗体とを4°Cで30分間インキュベートした。DPBSで洗浄後、細胞をPEで標識されたヤギ抗マウスIg抗体(BD PharMingen)と4°Cで30分間インキュベートした。3回洗浄を行った後、細胞をDPBSで再懸濁し、FACSCalibur flow cytometerおよびCellQuest Pro software(BD Biosciences)を用いてフローサイトメリーにより解析を行った。結果を図27および図28に示す。ADMPCは、造血系細胞および造血幹細胞(CD45、ABCG-2、CD34、CD133)(Mitchell et al., Stem Cells, 24, 376-85 (2006))、内皮細胞(CD31)のマーカ、表面抗原c-Kit(CD117)、ならびに一定のES細胞とEG(胚性生殖)細胞(TRA-1-60およびTRA-1-81)(James et al., 1998およびShamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 1372613731(1998))の表面マーカについて、対照と比べて発現にほとんど変化はなかった。一方、図27から、間葉系細胞および/または神経幹細胞(CD29、CD44、CD73およびCD105)(Mitchell et al., Stem Cells, 24, 376-85 (2006)およびBarry et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 265, 134139(1999))の表面マーカおよび時期特異的胚性抗原マーカ(SSEA-4)(Kannagi et al., EMBO J. 2, 23552361(1983))については、発現が上昇していることが確認できた。加えて、図28からは、従来法によるADSCには、線維芽細胞の表面抗原(Zuk et al., Mol. Biol. Cell. 13, 4279-4295(2002))陽性の細胞が83.4%存在するのに対して、ADMPCでは23%のみであり、線維芽細胞の夾雑が少ないことが分かった。これらのことより、本発

明によるADMPCは高い分化能を有し、さらには本発明の方法は精製度の高いADMPCを得ることができることが示された。

実施例 10

[0093] ADMPCの多分化能の確認

1. 膵臓細胞への分化能

ADMPCを国際公開公報WO2007/039986に記載の方法により、膵内分泌細胞へ分化させた。得られた膵内分泌細胞を図29に示す。ADMPCは、膵内分泌細胞に分化できること、すなわち、膵前駆細胞としての機能を有することを確認した。また、かかるADMPCから膵内分泌細胞への分化の効率は、ADSCからのものと比較して高いものであった(データは示していない)。

[0094] 2. 肝細胞への分化能

肝前駆細胞を肝芽細胞・肝細胞へと分化させることが知られているDMSO(0.1%)、HGF(10ng/mL)、bFGF(10ng/mL)、およびオンコスタチンM(10ng/mL)を培地Iに添加して培地IIを調製した。ADMPCを培地II中で14日間培養し、肝細胞を得た。得られた肝細胞を図30に示す。ADMPCは、肝細胞へと分化できること、すなわち、肝前駆細胞としての機能を有することを確認した。また、ADMPCから肝細胞への分化の効率は、ADSCからのものと比較して高いものであった(データは示していない)。

[0095] さらに、得られた肝細胞について上述の通りApplied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCRシステムにてリアルタイムPCRを行い、肝細胞への分化を示すマーカーである α -フェトプロテイン(AFP)、アルブミン、CYP1B1、グルタミン合成酵素の発現を調べた。対照として、ADMPCを用いた。結果を図31～34に示す。これらの遺伝子の発現が、得られた肝細胞において上昇していることが確認できた。

[0096] 3. 心筋細胞への分化能

ADMPCから心筋芽細胞への分化・誘導

DMSO(群1)、またはOP9培養上清(群2)を含む培地IにてADMPCを14日間培養し、得られた細胞における遺伝子の発現を上述の通りRT-PCRにより調べた。対照として、培地Iにて培養したADMPCを用いた。結果を図35に示す。群1および2

の細胞において、心筋芽細胞のマーカーである α -CAおよびMLCが発現していること、すなわち、ADMPCが心筋芽細胞へと分化・誘導されたことが確認できた。

[0097] 心筋芽細胞への分化・誘導期間の検討

次に、ADMPCをDMSO存在下で1、2、3、4、5、7、10、14日間培養して、心筋芽細胞への分化を調べた。対照としてADMPCおよび心筋細胞を用いた。結果を図36から40に示す。DMSO存在下で培養することにより、心筋芽細胞を得られることが分かった。

[0098] 心筋芽細胞を含むシートの作成

得られた心筋芽細胞を、DMSOを含む培地I中、温度感受性培養皿(株式会社セルシードより供与)中37℃にて培養し、細胞塊を形成させた。20℃以下にて30分間インキュベーションすることにより、細胞塊を剥離させ、心筋芽細胞を含むシートを得た(図41参照)。得られたシートを以下の移植実験に用いた。

[0099] 心筋梗塞モデルラットへのシートの移植

ヌードラットの冠動脈を結紮することにより、心筋梗塞モデルラットを作成した。次に、傷害領域にADMPC由来心筋芽細胞を含むシートを移植した。移植前2週間、移植前、移植後2週間、4週間および16週間における心機能を、エコーにより、拡張末期径(LVDd)、収縮末期径(LVDs)、左室駆出率(%EF)および左室内径短縮率(%FS)を計測して、評価した。対照として、上記同様形成させたADMPCを含むシートを用いた。結果を図42から49に示す。心筋芽細胞を含むシートを移植して2週間および10週間後のラットにおいて、壁運動を確認し、心機能が著しく改善されていることが分かった。これに対し、ADMPCを含むシートを移植したラットにおいて、2週間後では壁運動を確認したが、10週間後では確認できなかった。さらに、心筋芽細胞を含むシートでは、8週目以降において、LVDdが拡張し始め、EFが低下するのに対して、ADMPC由来心筋芽細胞(ADMPC由来心筋芽細胞はADMPCを0.1% DMSOにて48時間処理することで得られる)を含むシートでは、LVDd、EFともに維持され、心機能の改善を示した。

[0100] シートを移植した心臓の組織解析

移植後12週間および16週間にラットを犠牲死させて、心臓を摘出した。摘出した

心臓を4% パラホルムアルデヒド液で固定した後、70% エタノールに置換した。固定した心臓を数ミリ幅に切り出し、パラフィンで固めてブロックを作製した。得られたパラフィンブロックをマイクロームを用いて2 μ mに薄切し、スライドガラスに張り付け、乾燥させた。得られた薄切片についてヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織染色を以下の通り行った。

[0101] A. ヘマトキシリン・エオジン染色

薄切片を脱パラフィンし、水で洗浄した。ヘマトキシリン液で10分間染色し、ぬるま湯で3分間色だした。水洗後、エオジンで5分間染色した。アルコールで分別、脱水した。キシレンで透徹後封入し、顕微鏡にて観察した。結果を図50および51に示す。移植したシートが生着していることが確認できた。

[0102] B. 免疫組織染色

薄切片を脱パラフィンし、水で洗浄した。免疫賦活処理し、10% 正常ヤギ血清を添加したTBS-Tに浸漬し、4°Cにて24時間ブロッキングした。TBS-Tで洗浄後、10% 正常ヤギ血清を添加したTBS-Tで100倍希釈した1次抗体を試料に滴下し、37°Cで1時間反応させた。1次抗体として、抗ヒト α -cA抗体(American Research Products, Inc)、抗ヒトMHC抗体(Upstate cell signaling solutions)および抗ヒトHLA-ABC抗体(株式会社 ホクドー)を用いた。TBS-Tで洗浄後、シンプルステインラットMAX-PO(株式会社ニチレイバイオサイエンス)を滴下し、室温で30分間反応させた。TBS-Tで洗浄後、シンプルステインAEC溶液(株式会社ニチレイバイオサイエンス)を滴下し、検鏡しながら発色させた。水で洗浄後、ヘマトキシリン液で3分間染色し、核染色を行った。水で洗浄後、非水溶性封入剤(株式会社ニチレイバイオサイエンス)を滴下し、カバーガラスで封入し、顕微鏡および蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、ADMPCおよびADMPC由来心筋芽細胞を含むシートの移植領域において心筋へ分化した量および残存心筋の量を調べるために、 α -CA抗体陽性の領域の厚みを測定した。結果を図51から61に示す。心筋芽細胞を含むシートを移植した部位が、HLA-ABC陽性、すなわちヒト由来であり、 α -CAおよびMHCを発現し心筋へと分化し、残存心筋においても α -CAの発現が維持されていることが確認できた。従って、移植した心筋芽細胞が心筋細胞に分化転換し、かつ残存心筋が保護

されていることが分かった。

[0103] 4. 脂肪細胞への分化能

ADMPCを、脂肪細胞分化剤であるPPAR- γ アゴニストを用いて培養し、脂肪細胞へ分化させた。得られた脂肪細胞をオイルレッドO染色し、脂質含有量を測定した。対照としてADSCを用いた。結果を図62および63に示す。ADMPCは、脂肪細胞へと分化できること、すなわち、脂肪前駆細胞としての機能を有することが分かった。また、かかる分化の効率は、ADSCと比較して高いものであった。以上より、ADMPCが多系統細胞に分化する能力を有する細胞であることを確認した。

[0104] 5. 骨組織への分化能

ADMPCを、10nM デキサメタゾン、50mg/dl アスコルビン酸二リン酸、10mM β -グリセロリン酸(Sigma)、および10% FBSを含有するDMEM中で7日間培養することにより、骨組織への分化を誘導した。分化状態をアリザリンレッド染色およびアルカリホスファターゼ(ALPase)活性により確認した。アリザリンレッド染色については、得られた細胞を3回洗浄し、無水エタノールで固定した。固定後、細胞を0.1% NH_4OH (pH6.5)中の1% アリザリンレッドSで5分間染色し、 H_2O で洗浄した。ALPase活性においては、公知の方法に従って行った(Bessey, O. A. et al., J. Biol. Chem. 164, 321-329(1946))。詳細に説明すると、細胞を3回洗浄した後、0-4°Cにおいて1mlの0.9% NaCl、0.2% Triton X-100中でガラスホモジェナイザーを用いてホモジェナイズし、1200gで15分間遠心分離を行った。上澄み液のALPase活性を、基質としてp-ニトロフェニルリン酸(p-NP)を用いて調べた。詳細には、この上澄み液を0.5mM pNPおよび0.5mM MgCl_2 を含有する0.5M Tris/HCl緩衝液(pH9.0)においてアッセイした。反応混合物を37°Cで30分間インキュベートし、0.25体積の1N NaOHの添加により反応を止めた。pNPの加水分解を、分光光度計における410nmにおける吸光度の値の変化としてモニターした。p-ニトロフェノールを標準として用いた。1活性の単位を1分間に1nmolのp-NPが加水分解される量と定義した。細胞あたりのALPase活性をDNA量に基づいて計算した。DNA含有量を一般的な方法の改良により測定した(Labarca, C. et al., Biochem. 102, 344-352(1980))。洗浄後、細胞を0-4°Cにおいて1mlの2M NaCl/25m

M Tris-HCl(pH7.4)中でホモジェナイズした。12000gで10分間遠心分離後、25mlの5mg/ml ビスベンズイミダゾールを100mlの上澄み液に添加した。蛍光光度計により励起356nmにし、発光458nmの蛍光スペクトルをモニターした。DNA濃度を仔ウシの胸腺のDNAの様々な濃度から作成された標準曲線を用いて調べた。結果を図64および65に示す。本発明によるADMPCは、従来法を用いるADSCと比較してアリザリンレッド染色およびAP活性における強い陽性を示し、骨組織へと分化誘導されやすいことが確認できた。以上より、ADMPCが、脾臓、肝臓、心臓、脂肪、骨などを含む多系統の組織の細胞に分化する能力を有することが示された。

産業上の利用可能性

- [0105] 本発明により、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法、それにより得ることのできる肝小葉様細胞塊、肝小葉の形成を促進または抑制する物質および肝小葉の活性を上昇または低減する物質をスクリーニングする方法、およびそのためのキットが得られるので、肝硬変、肝癌などの予防または治療等の分野、ならびに肝臓再生の研究等の分野において有用である。

配列表フリーテキスト

- [0106] SEQ ID NO:1:lslet-1 forward primer
SEQ ID NO:2:lslet-1 reverse primer
SEQ ID NO:3:Nkx2.5 forward primer
SEQ ID NO:4:Nkx2.5 reverse primer
SEQ ID NO:5:GATA-4 forward primer
SEQ ID NO:6:GATA-4 reverse primer
SEQ ID NO:7:α-CA forward primer
SEQ ID NO:8:α-CA reverse primer
SEQ ID NO:9:MLC2v forward primer
SEQ ID NO:10:MLC2v reverse primer
SEQ ID NO:11:MHC forward primer
SEQ ID NO:12:MHC reverse primer
SEQ ID NO:13:GAPDH forward primer

SEQ ID NO:14:GAPDH reverse primer
SEQ ID NO:15:nestin forward primer
SEQ ID NO:16:nestin reverse primer
SEQ ID NO:17:Neurofilament 68 forward primer
SEQ ID NO:18:Neurofilament 68 reverse primer
SEQ ID NO:19:somatostatin forward primer
SEQ ID NO:20:somatostatin reverse primer
SEQ ID NO:21:snail forward primer
SEQ ID NO:22:snail reverse primer
SEQ ID NO:23:slug forward primer
SEQ ID NO:24:slug reverse primer

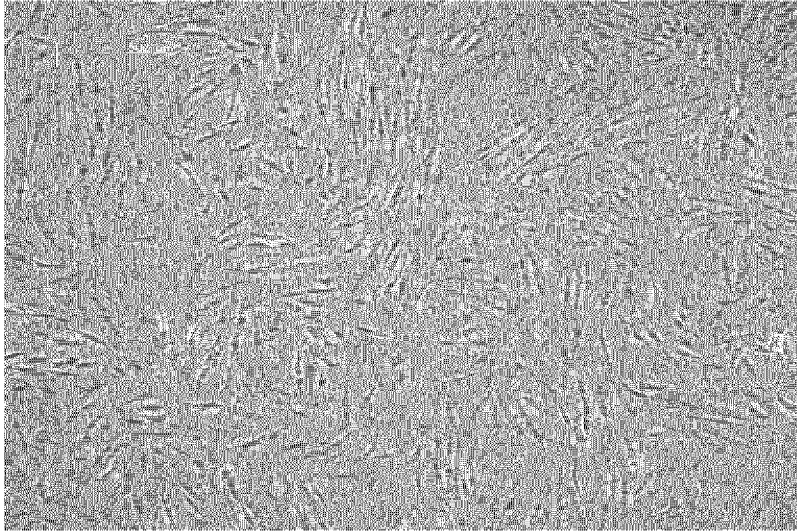
請求の範囲

- [1] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法。
- [2] 未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程を含む、請求項1記載の方法。
- [3] (a)脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、次に、
(b)該未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る、
工程を含む、請求項1または2記載の方法。
- [4] 未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程が、未分化細胞を浮遊化させた状態で培養し、肝小葉様細胞塊を形成させるものである、請求項2または3記載の方法。
- [5] 請求項1から4のいずれか記載の方法により得ることのできる、肝小葉様細胞塊。
- [6] 請求項5記載の肝小葉様細胞塊に含まれる、肝細胞。
- [7] 請求項5記載の肝小葉様細胞塊および／または請求項6記載の肝細胞を含む、肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬組成物。
- [8] 肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬品の製造のための、請求項5記載の肝小葉様細胞塊および／または請求項6記載の肝細胞の使用。
- [9] 請求項5記載の肝小葉様細胞塊および／または請求項6記載の肝細胞を対象に投与することを特徴とする、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防方法。
- [10] 脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を促進する物質であることを示す、肝小葉の形成を促進する物質をスクリーニングする方法。
- [11] 請求項10記載の方法により得ることのできる、肝小葉の形成を促進する物質。
- [12] 脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を抑制する物質であることを示す、肝小葉の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法。
- [13] 請求項12記載の方法により得ることのできる、肝小葉の形成を抑制する物質。
- [14] 請求項10または12記載の方法に用いられる、肝小葉の形成を促進または抑制す

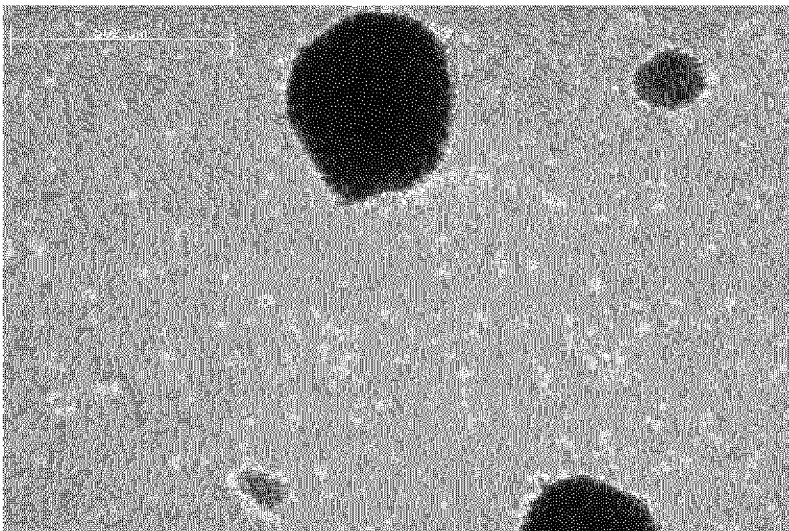
る物質をスクリーニングするためのキット。

- [15] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して増大している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を上昇させる物質であることを示す、肝小葉の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法。
- [16] 請求項15記載の方法により得ることのできる、肝小葉の活性を上昇させる物質。
- [17] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して低減している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を低下させる物質であることを示す、肝小葉の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法。
- [18] 請求項17記載の方法により得ることのできる、肝小葉の活性を低下させる物質。
- [19] 請求項15または17記載の方法に用いられる、肝小葉の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット。

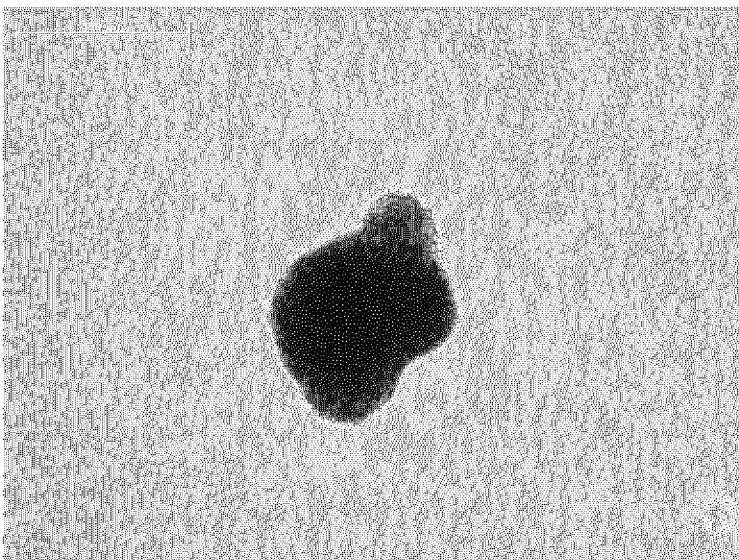
[図1]



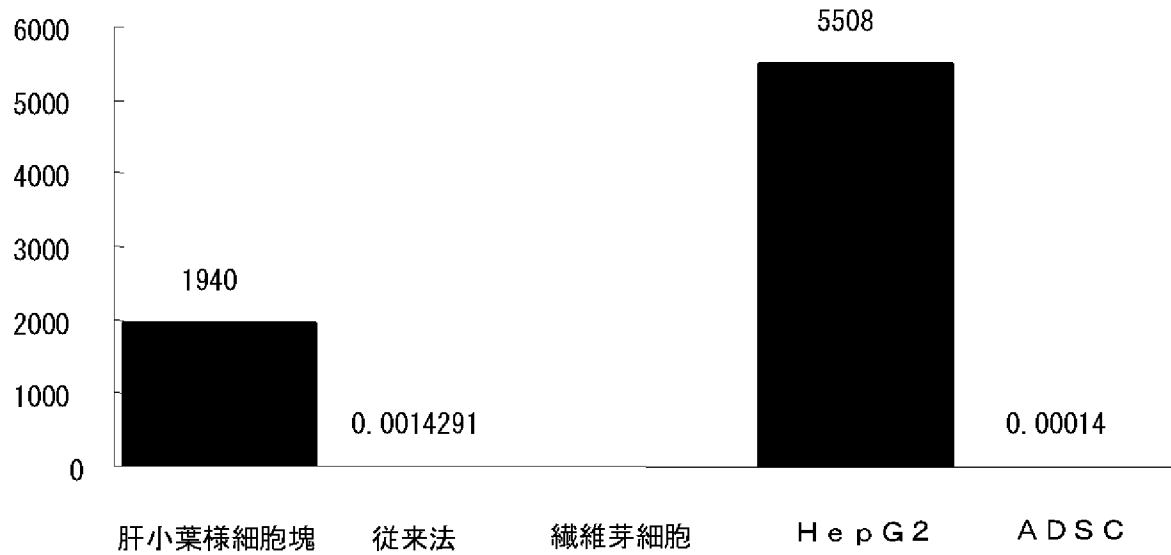
[図2]



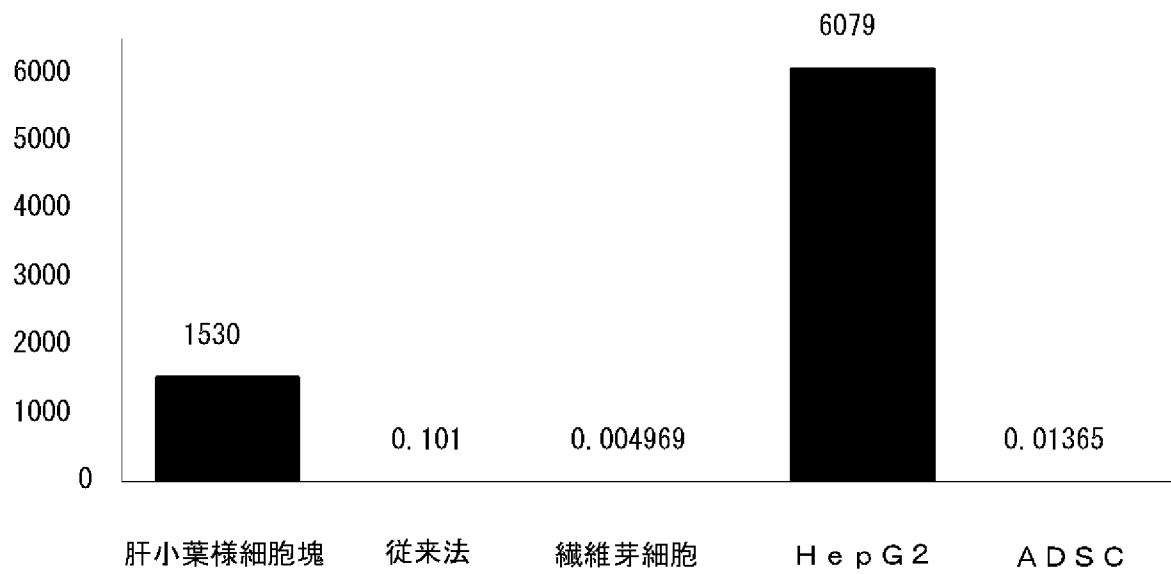
[図3]



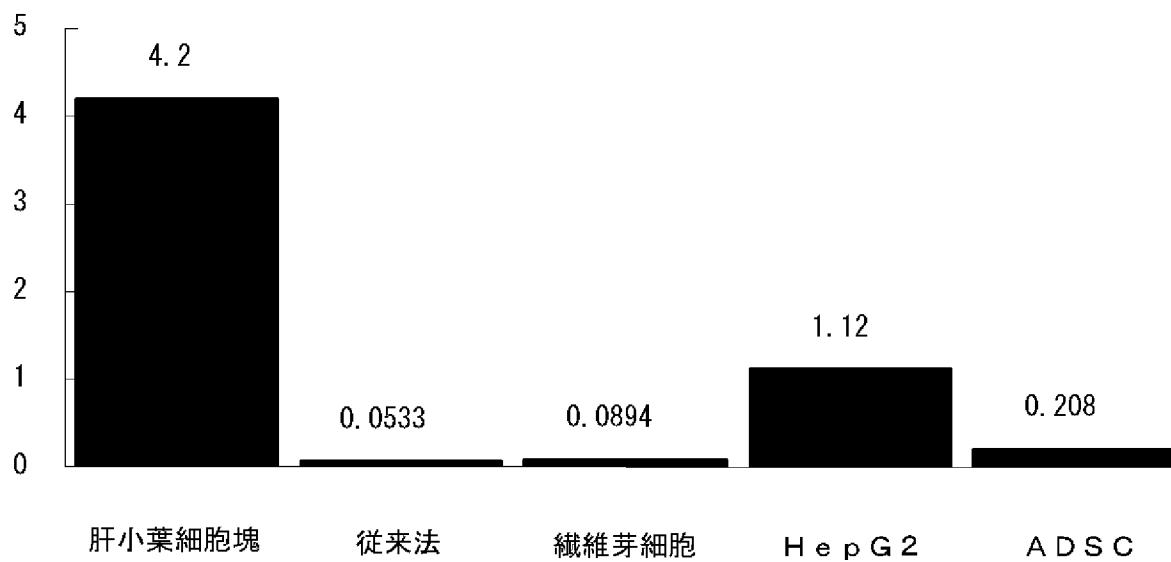
[図4]



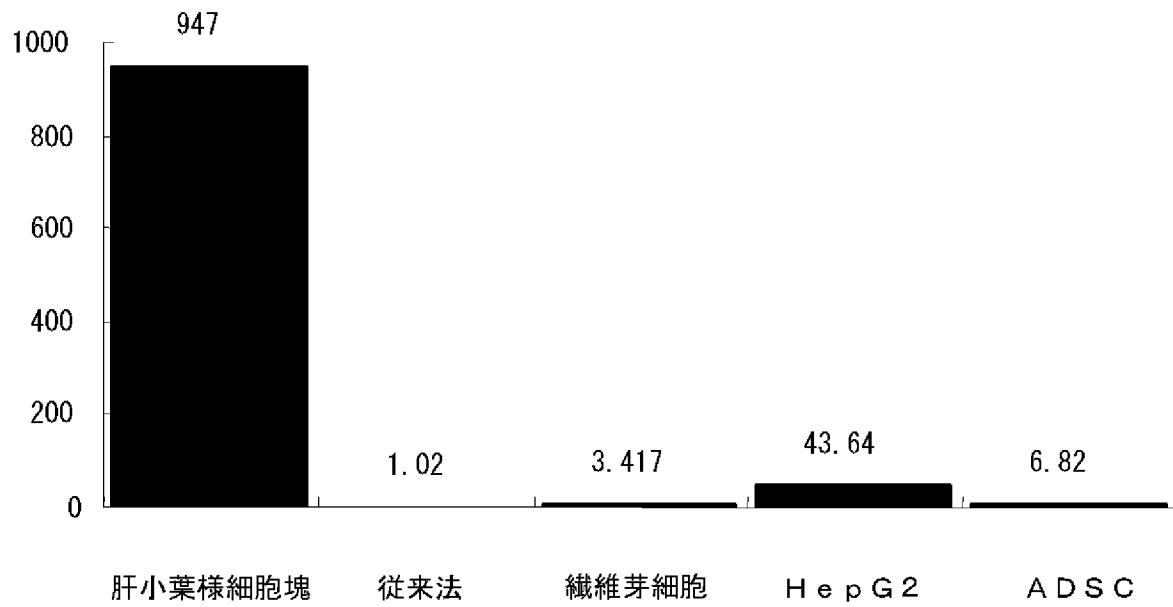
[図5]



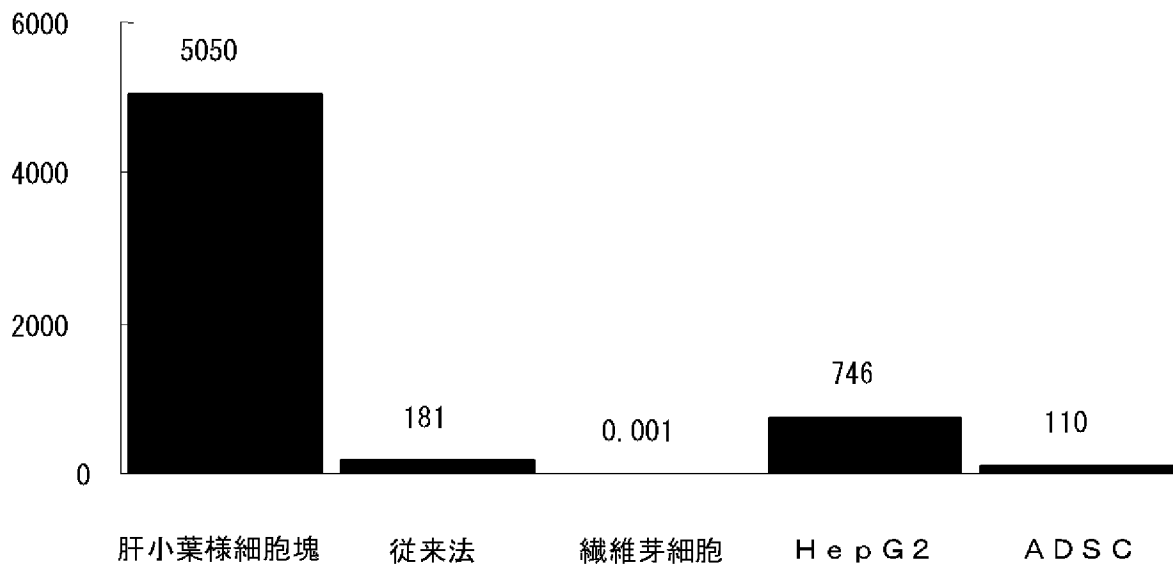
[図6]



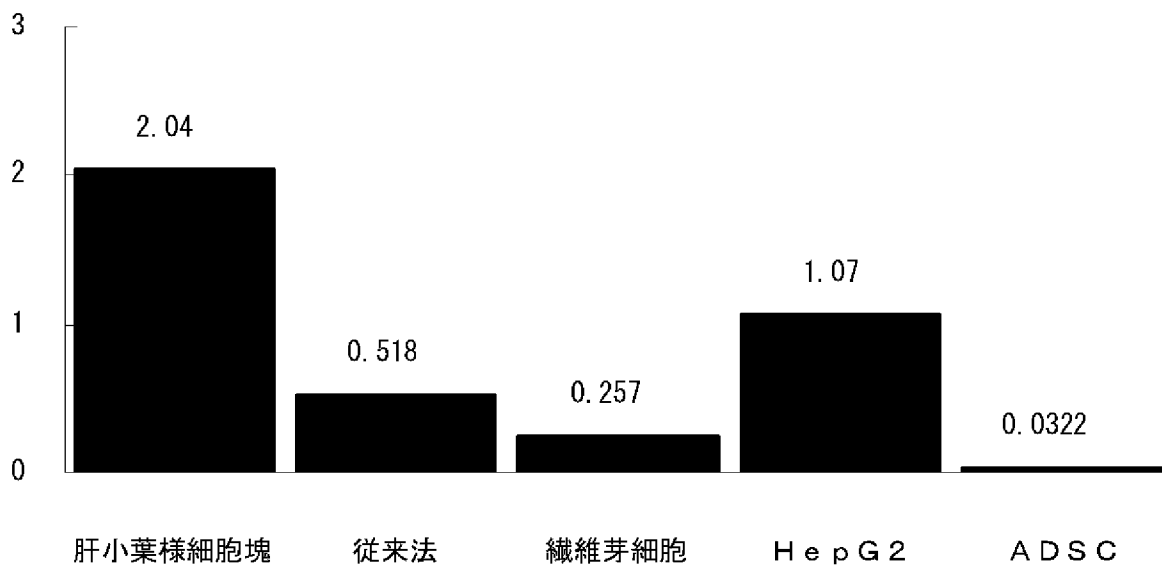
[図7]



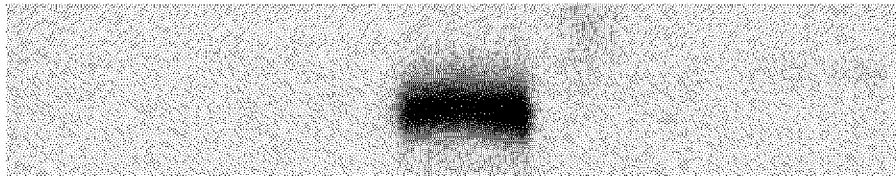
[図8]



[図9]

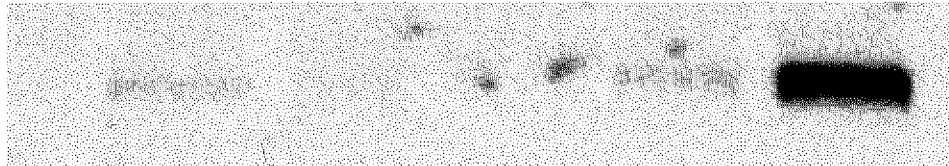


[図10]



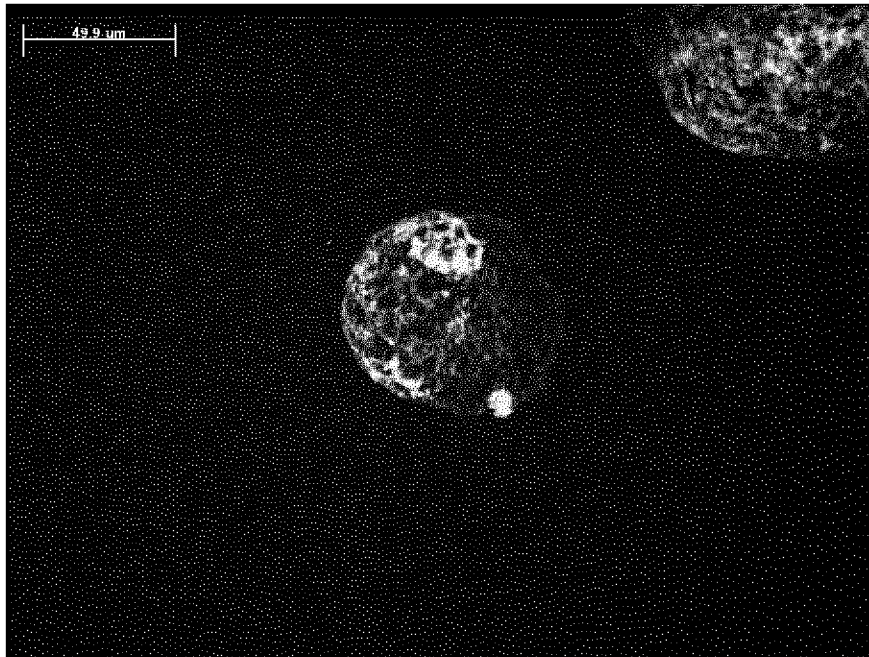
50 ng 500 ng 5000 ng A D S C 肝小葉様細胞塊

[図11]

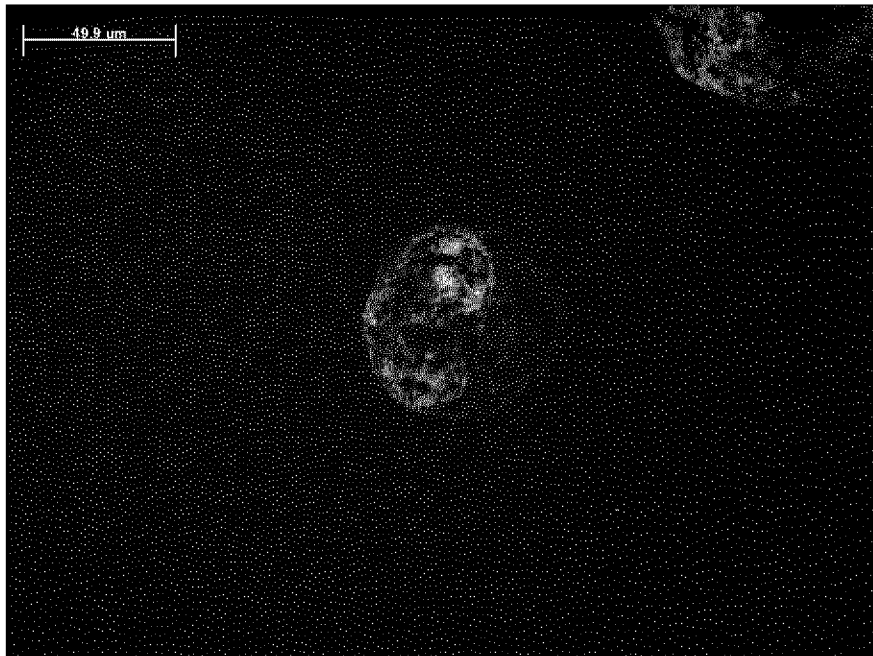


肝小葉様細胞塊 A D S C 0.005 ng 0.05 ng 0.5 ng

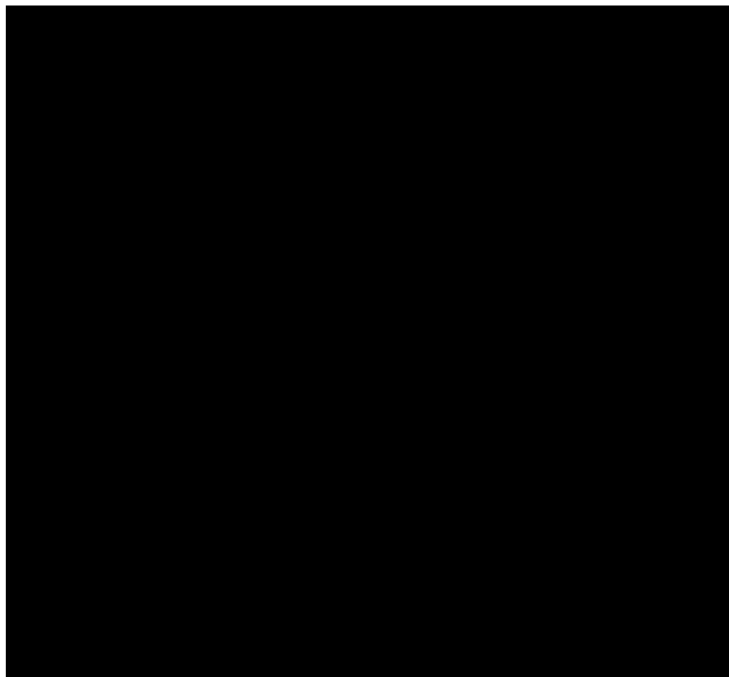
[図12]



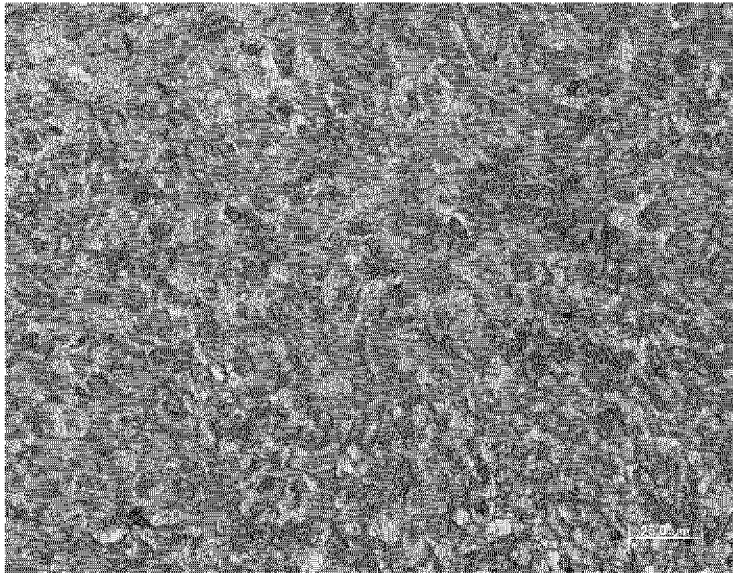
[図13]



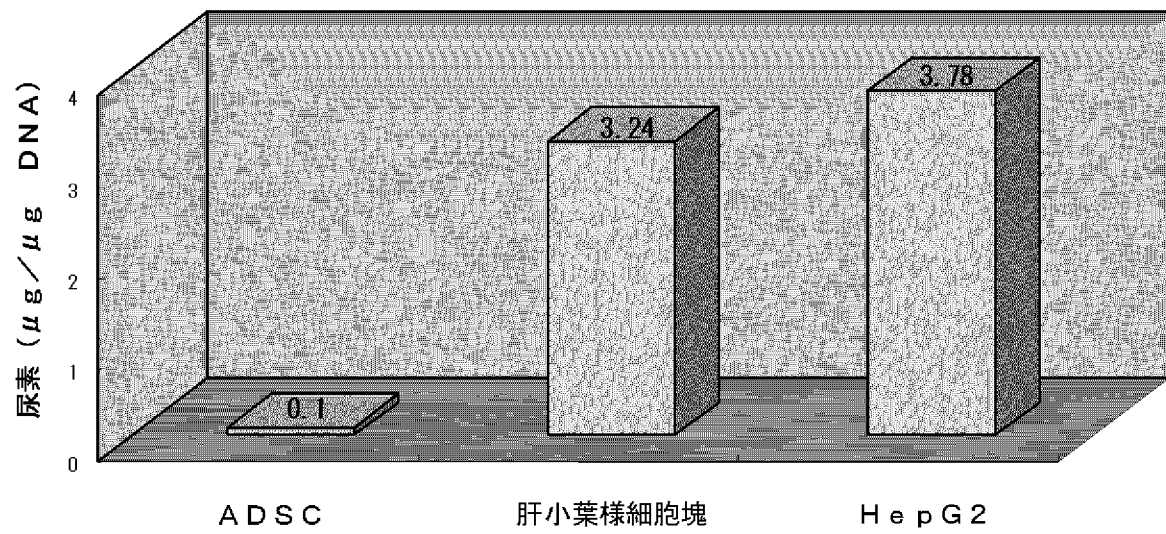
[図14]



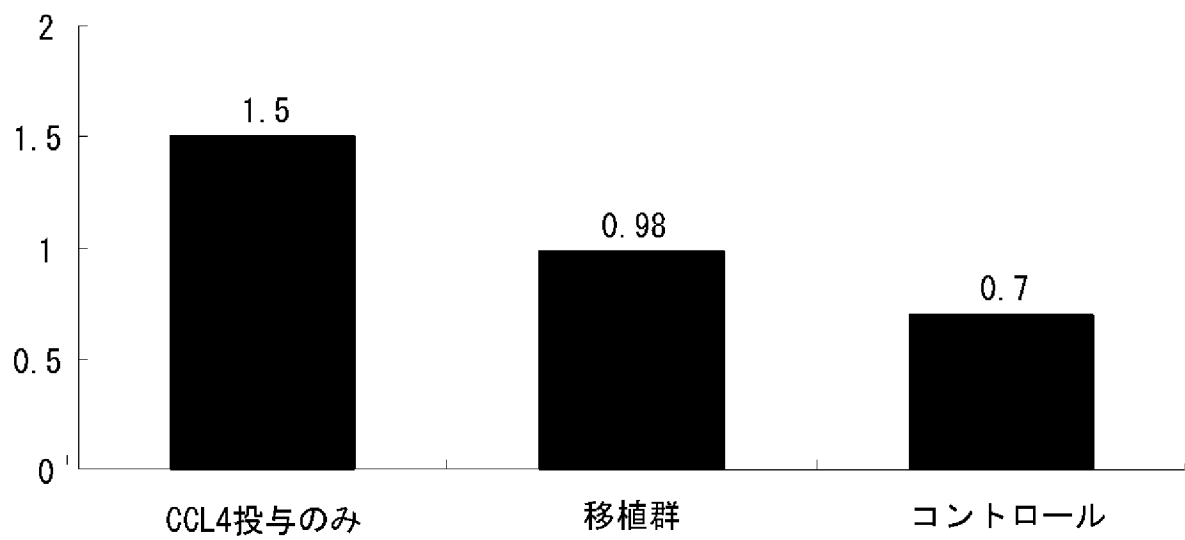
[図15]



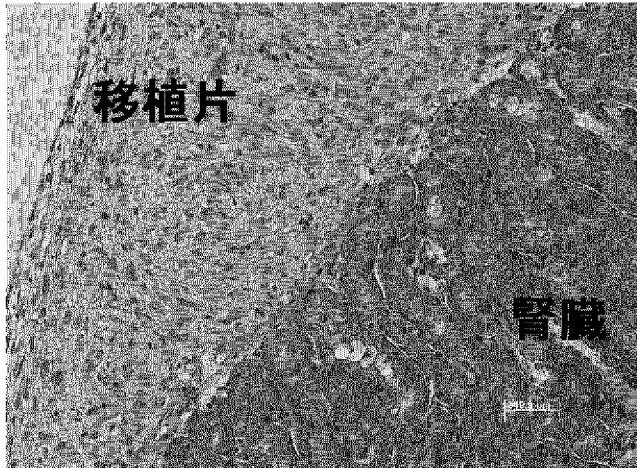
[図16]



[図17]



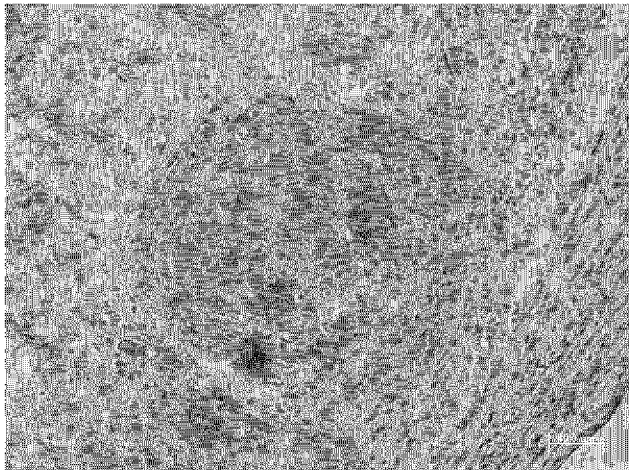
[図18]



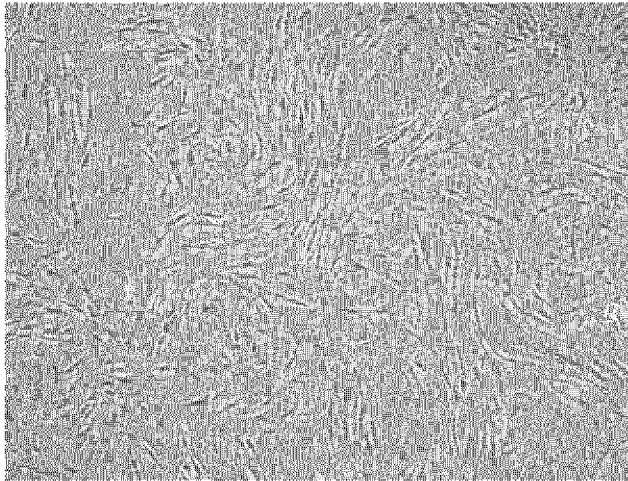
[図19]



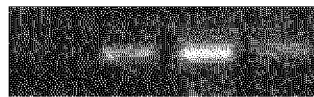
[図20]



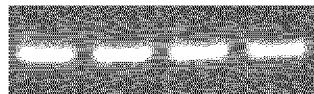
[図21]



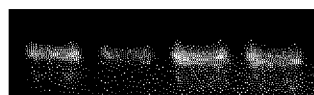
[図22]



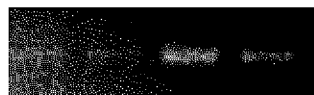
islet1



ネスチン



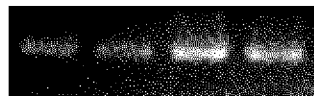
Neurofilament 68



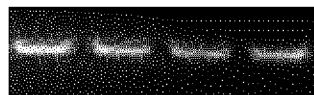
ソマトスタチン



snail



slug



GAPDH

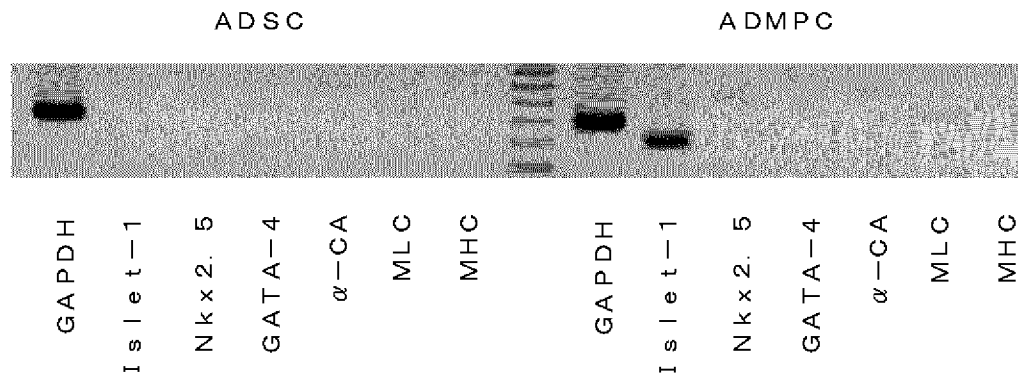
ADMPC (P1)

ADMPC (P5)

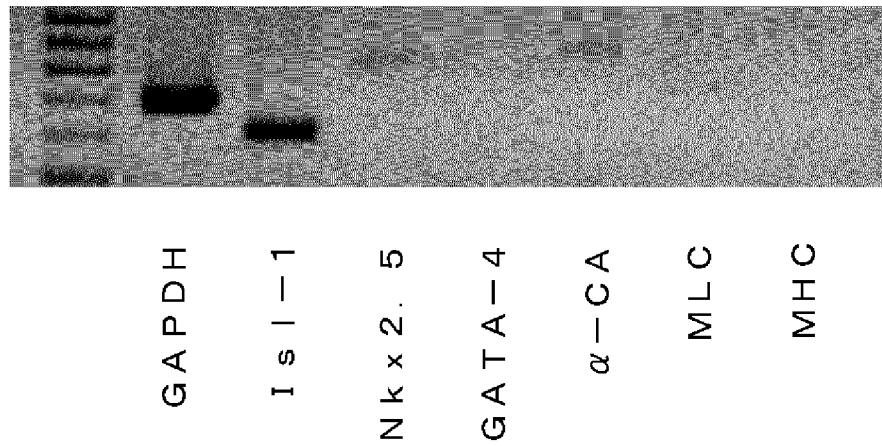
アディポスフェア (P1由来)

アディポスフェア (P5由来)

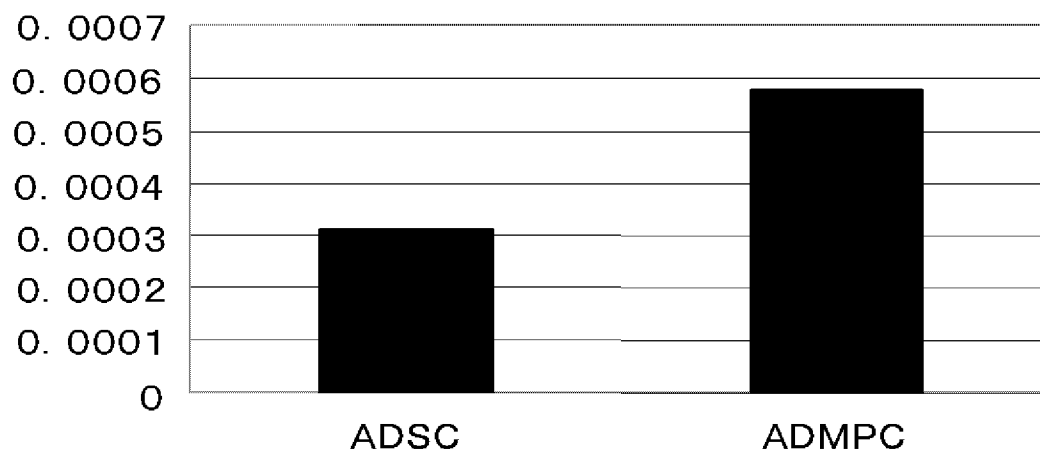
[図23]



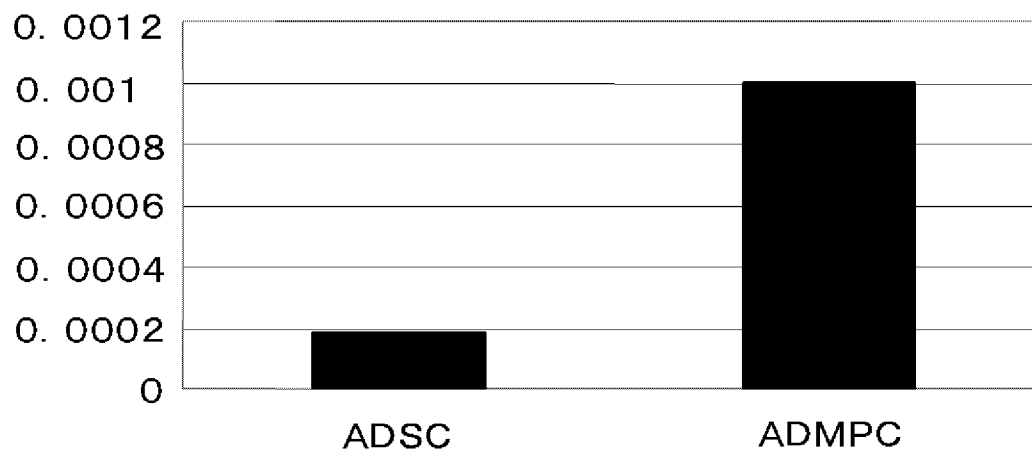
[図24]



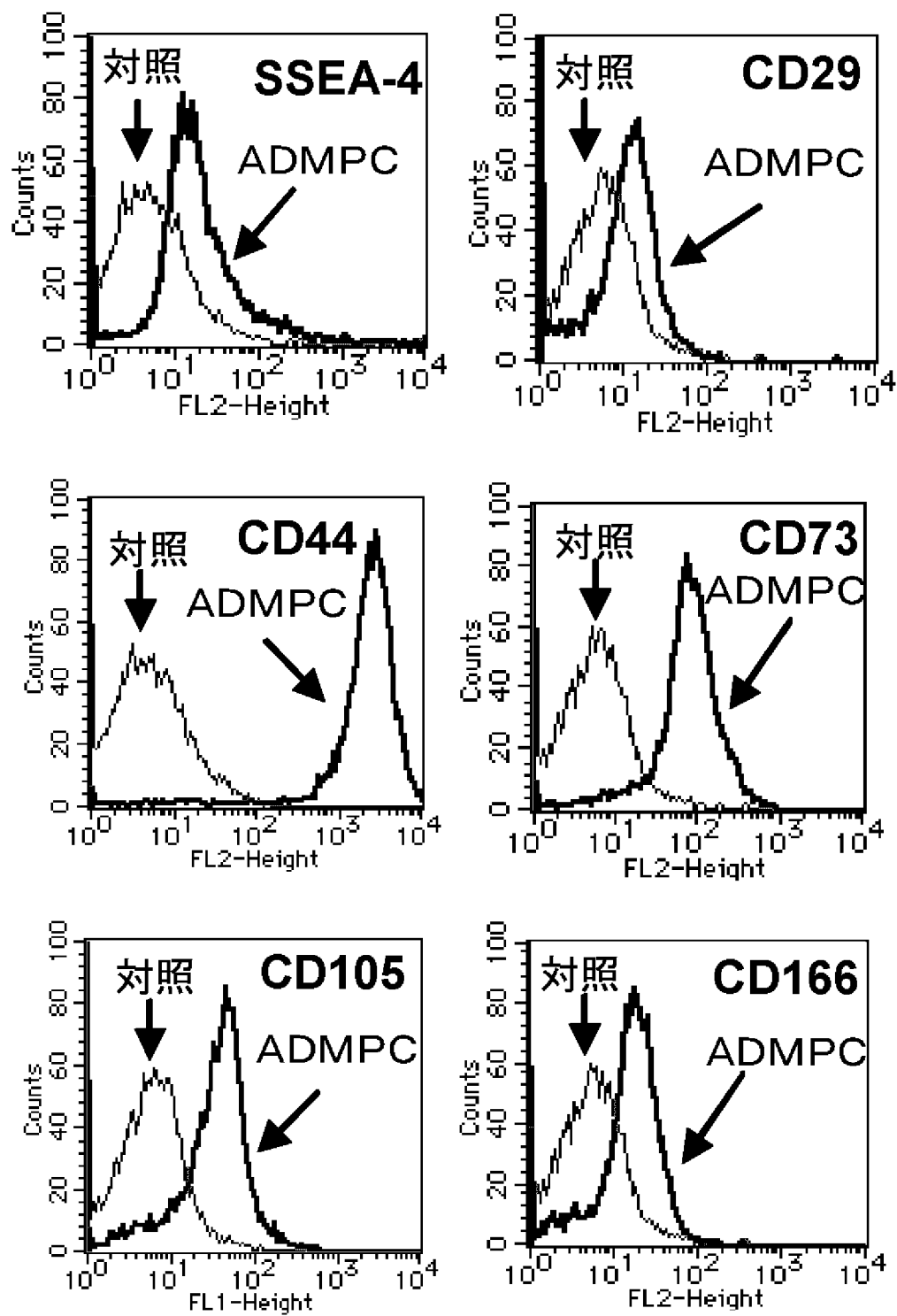
[図25]



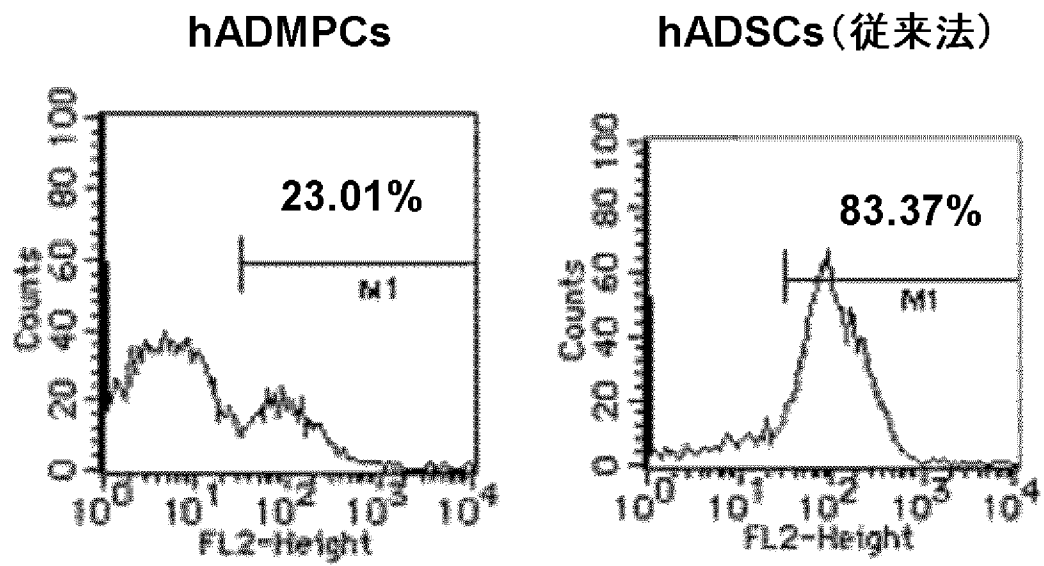
[図26]



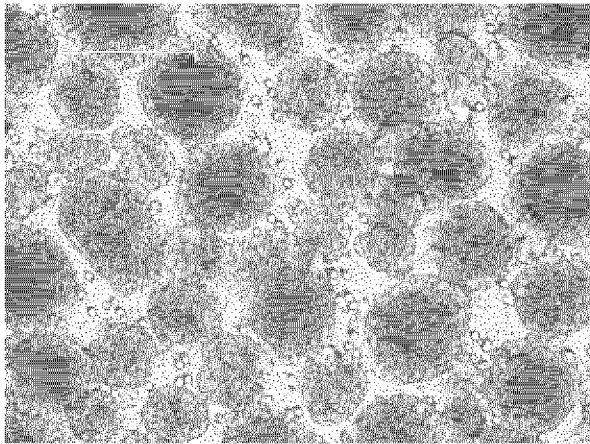
[図27]



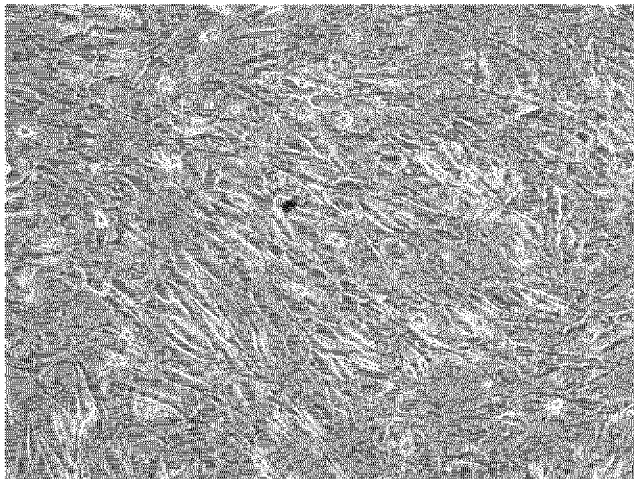
[図28]



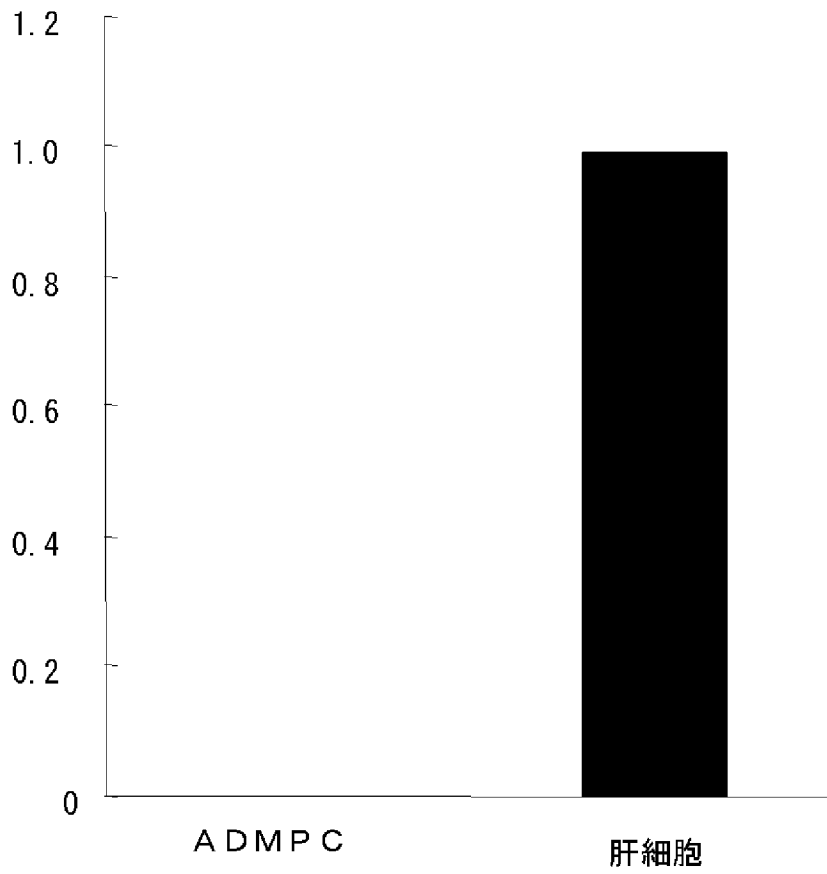
[図29]



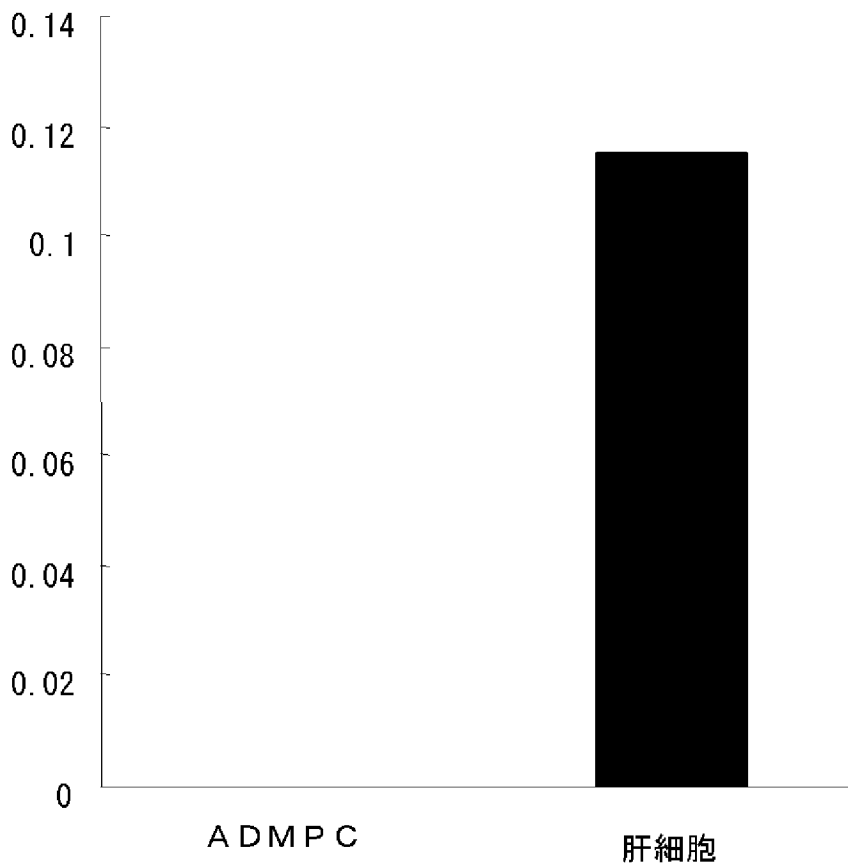
[図30]



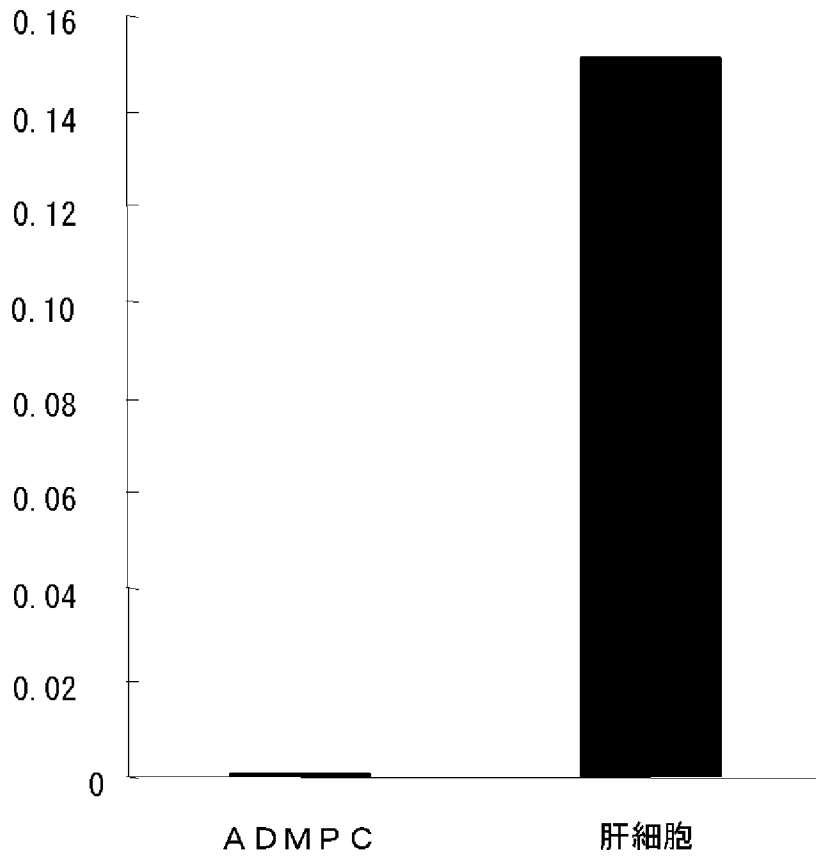
[図31]



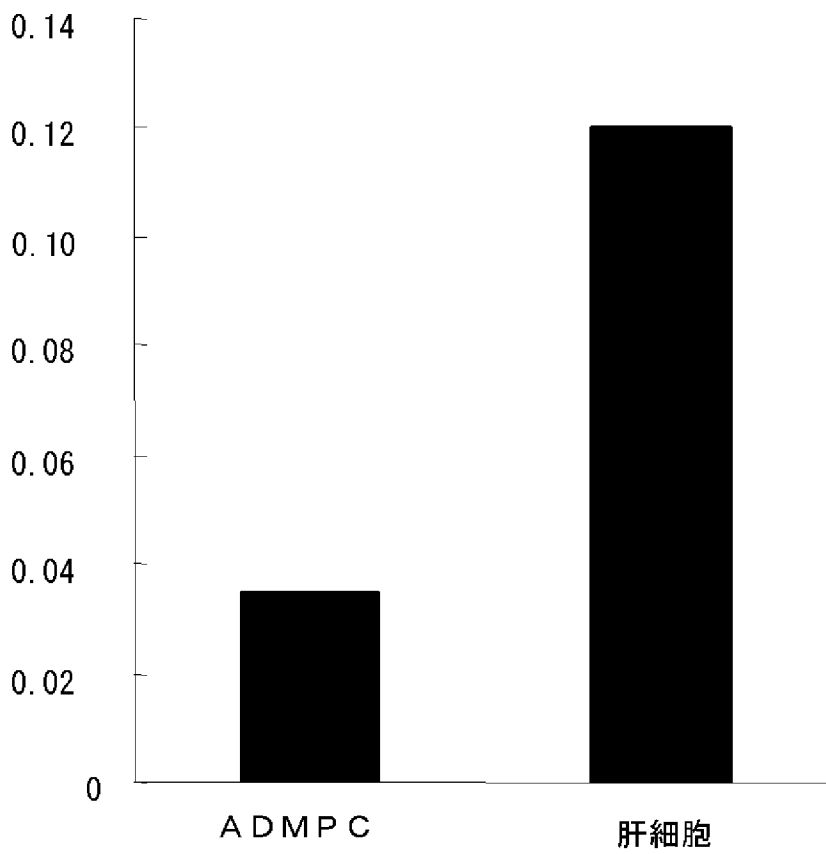
[図32]



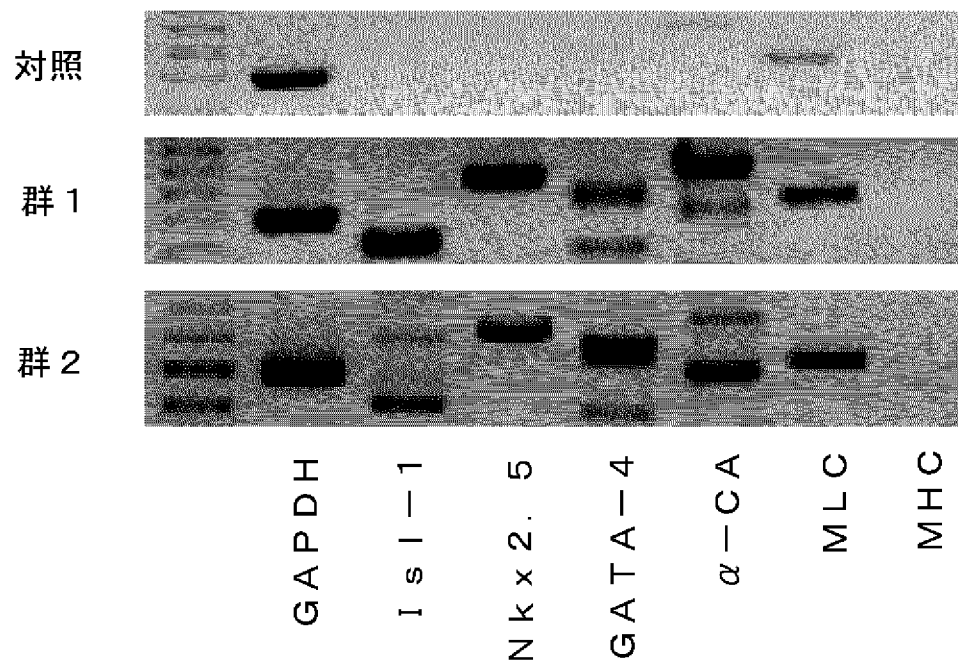
[図33]



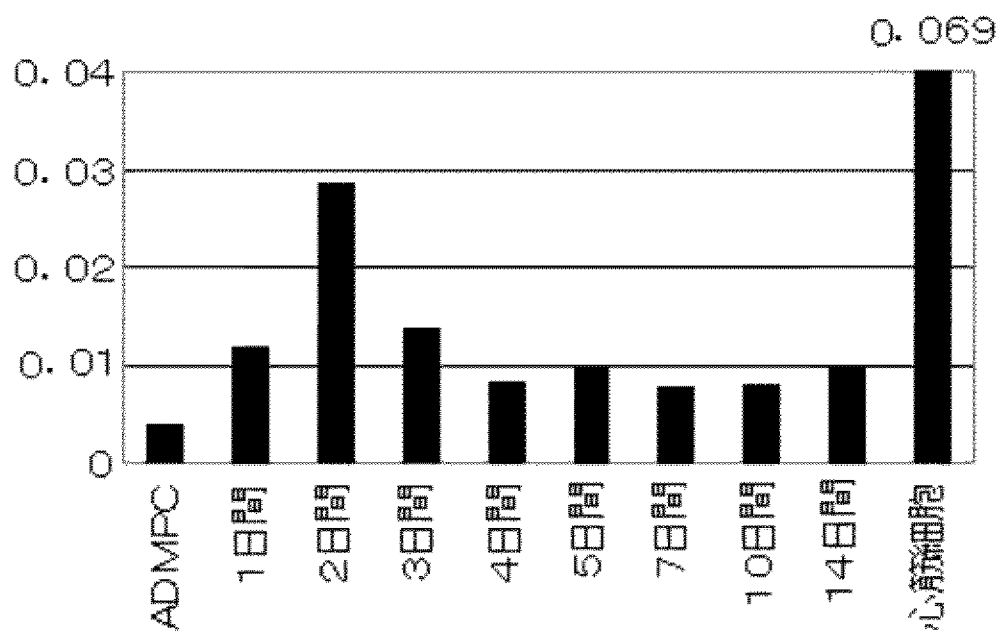
[図34]



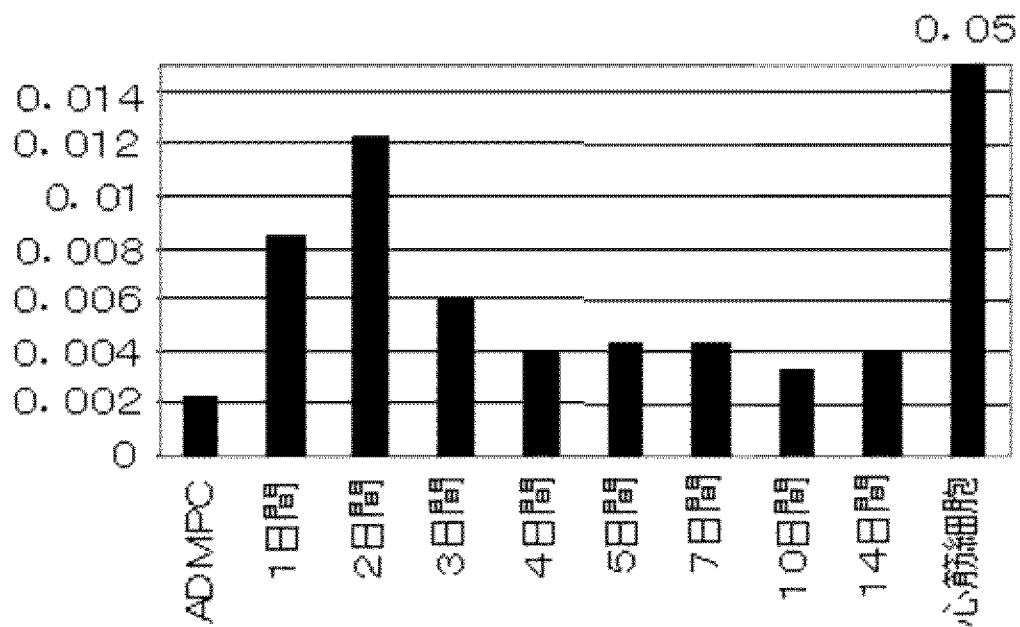
[図35]



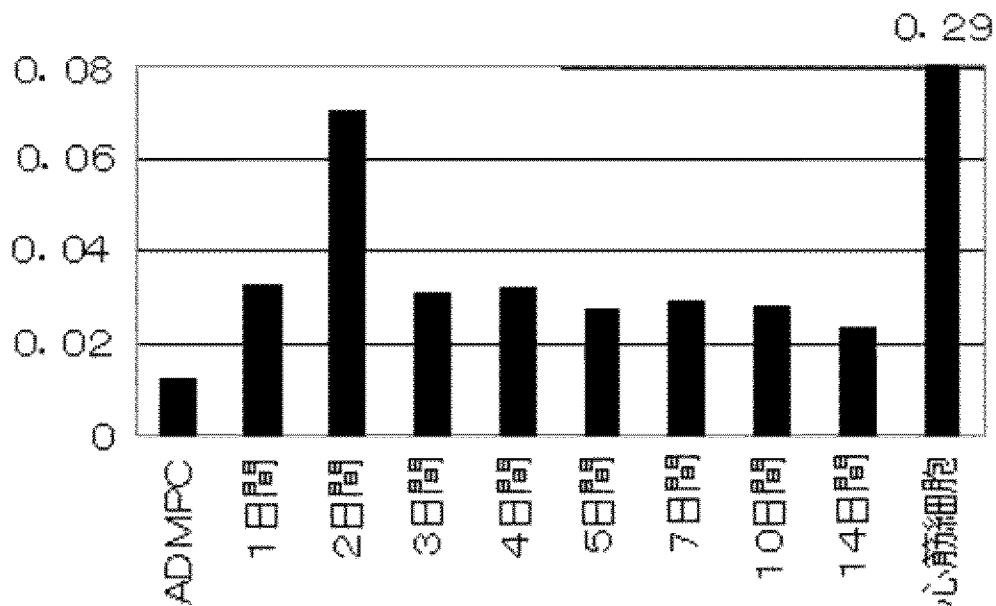
[図36]



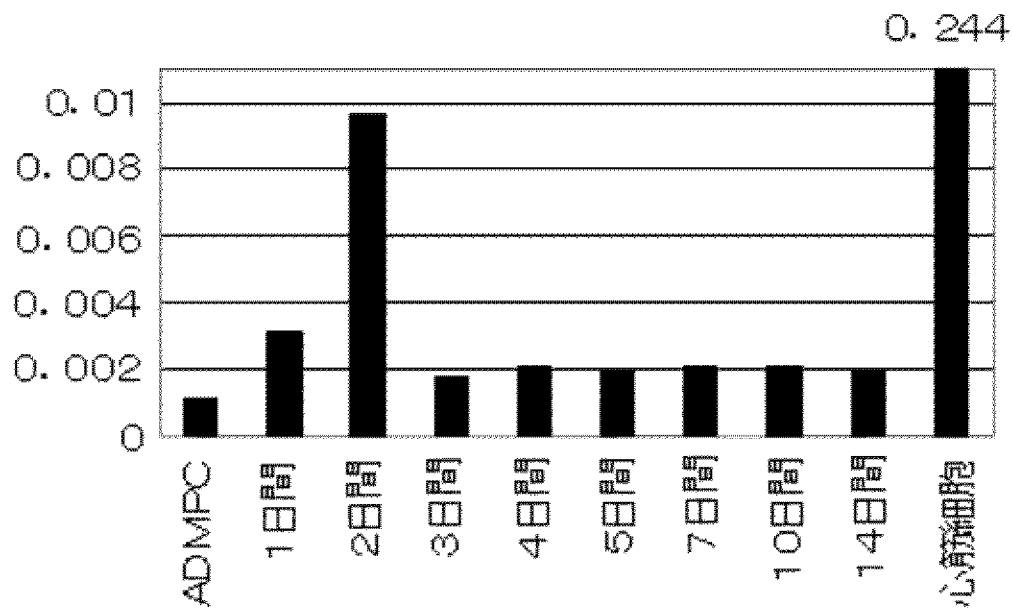
[図37]



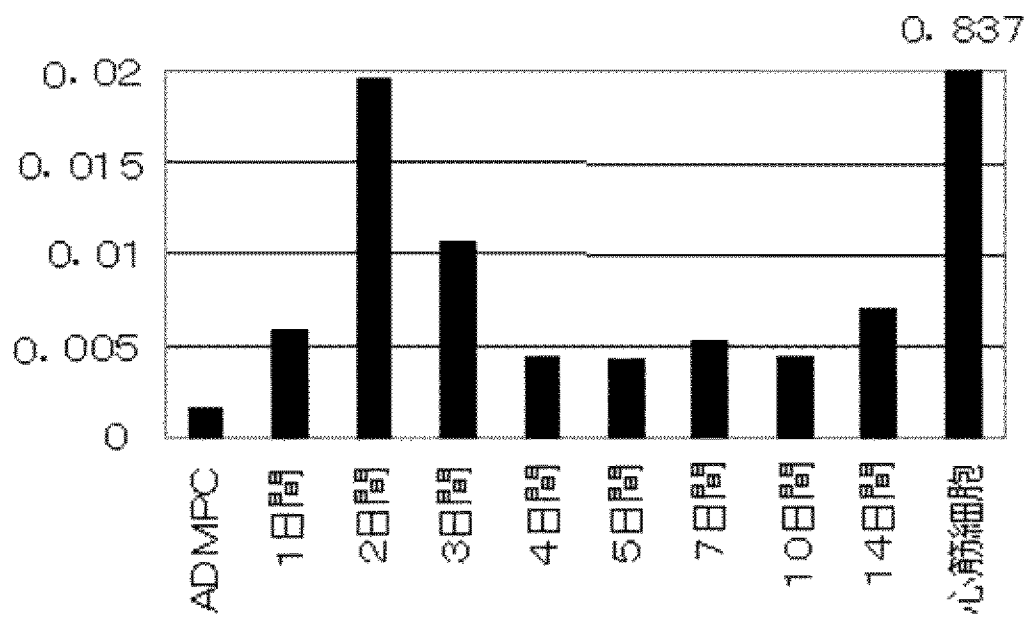
[図38]



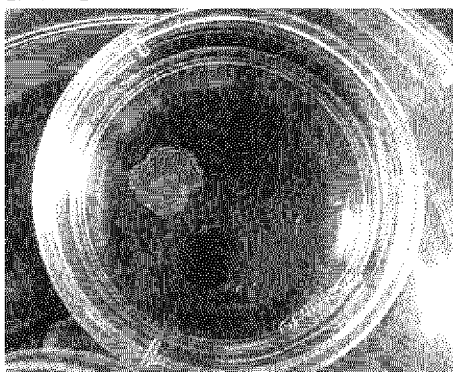
[図39]



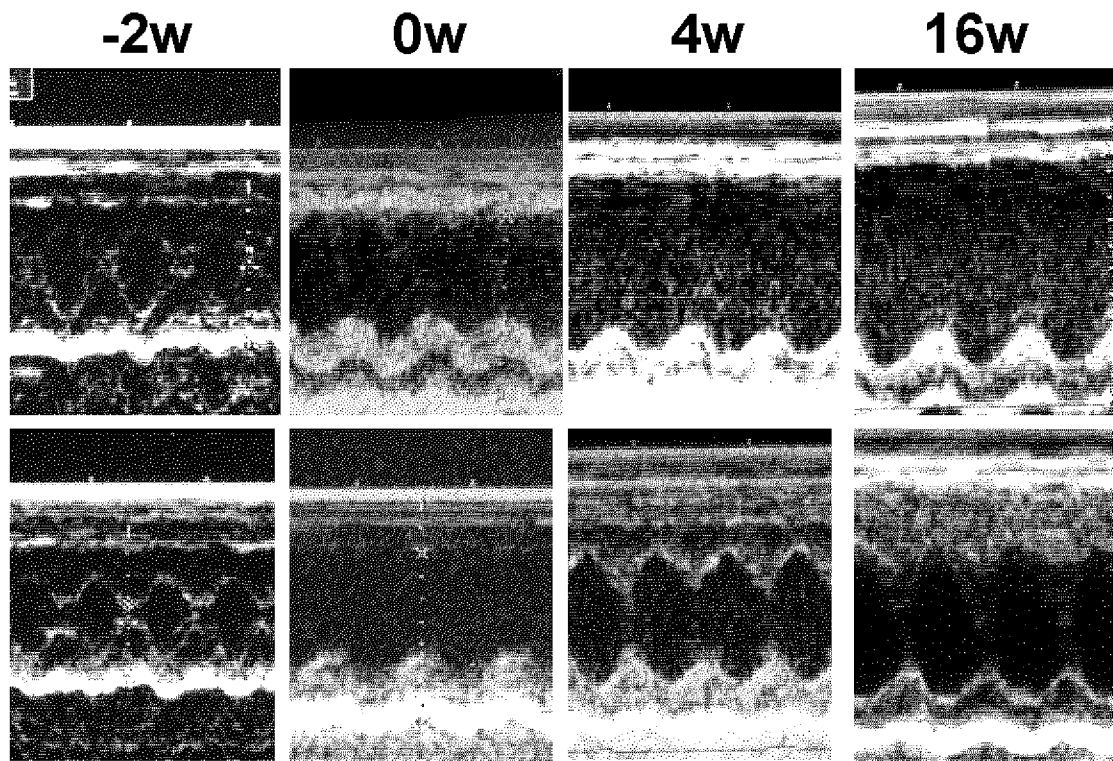
[図40]



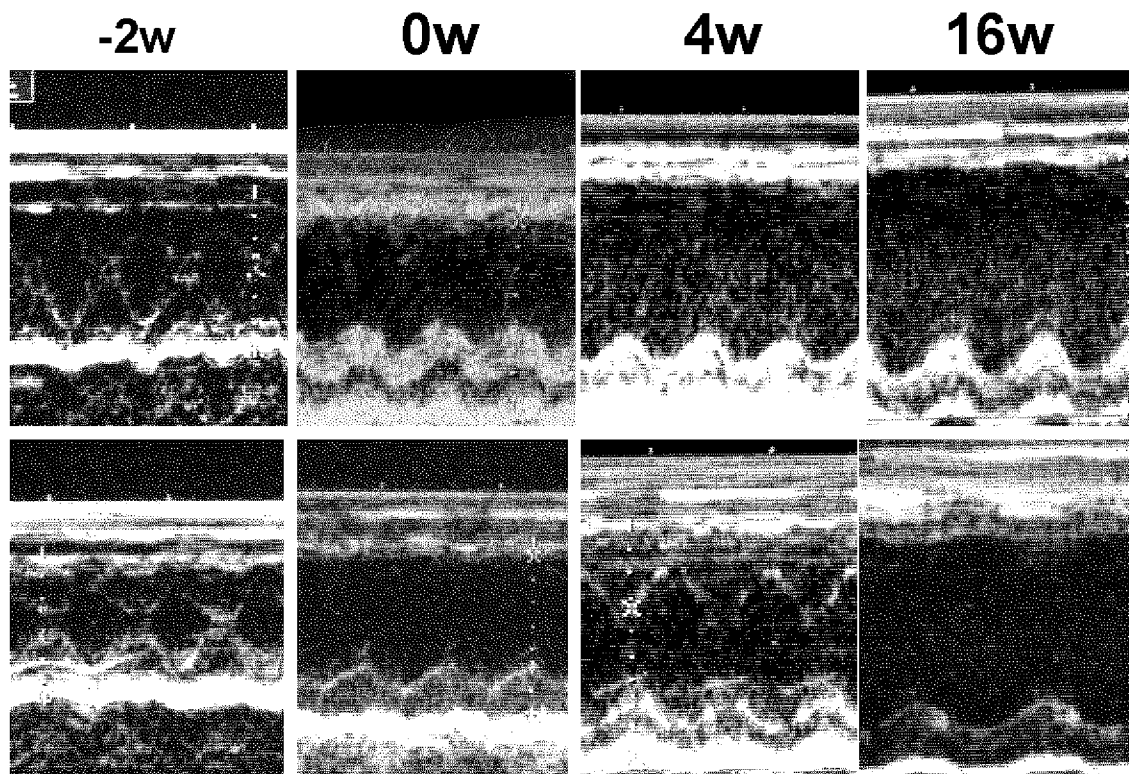
[図41]



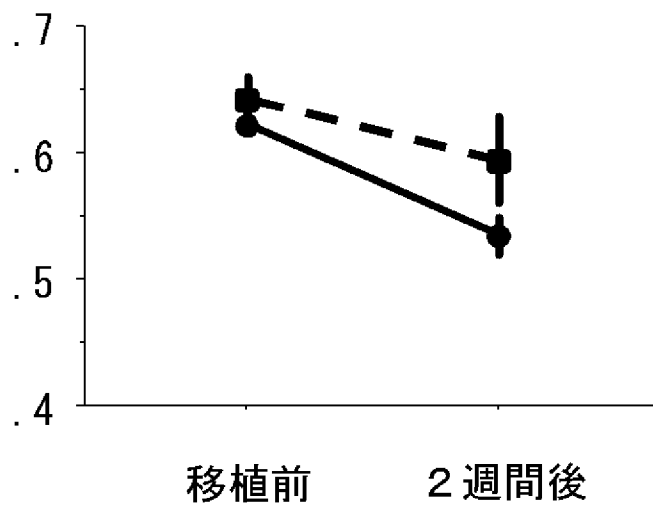
[図42]



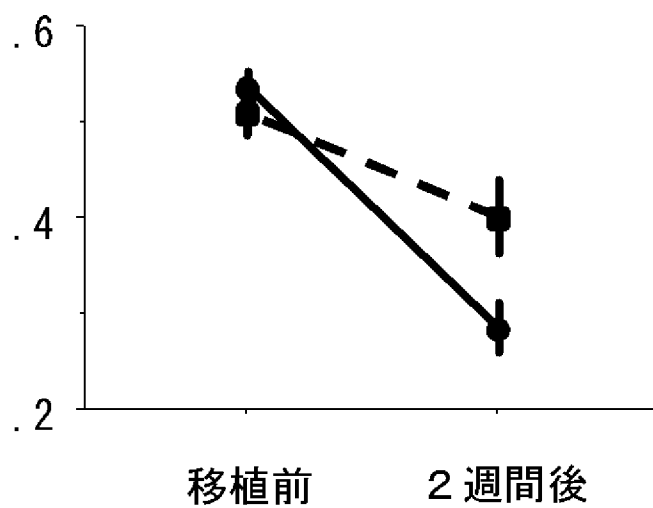
[図43]



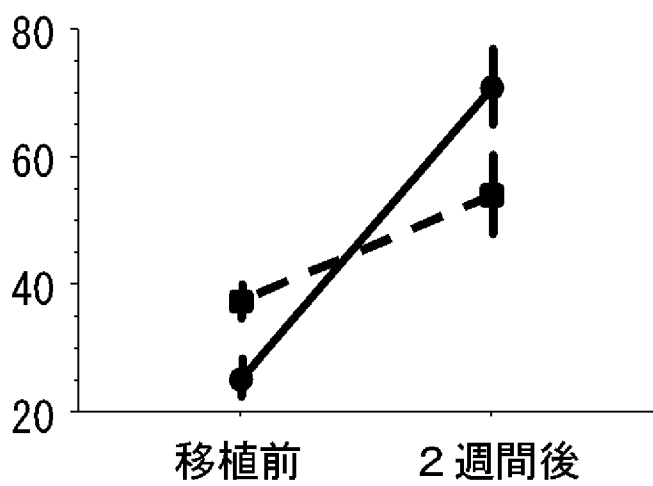
[図44]



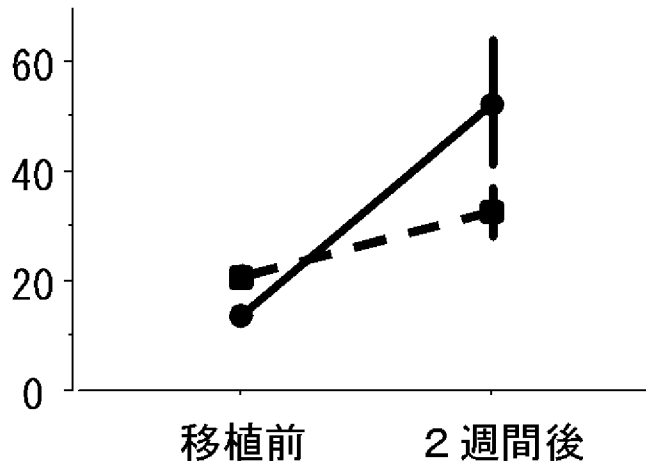
[図45]



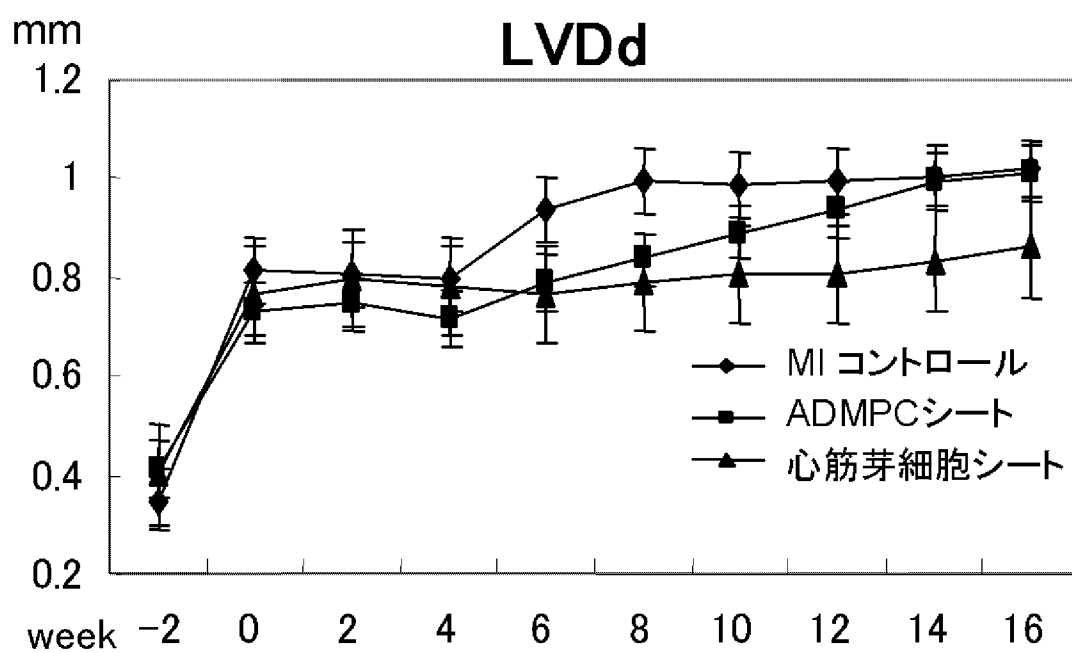
[図46]



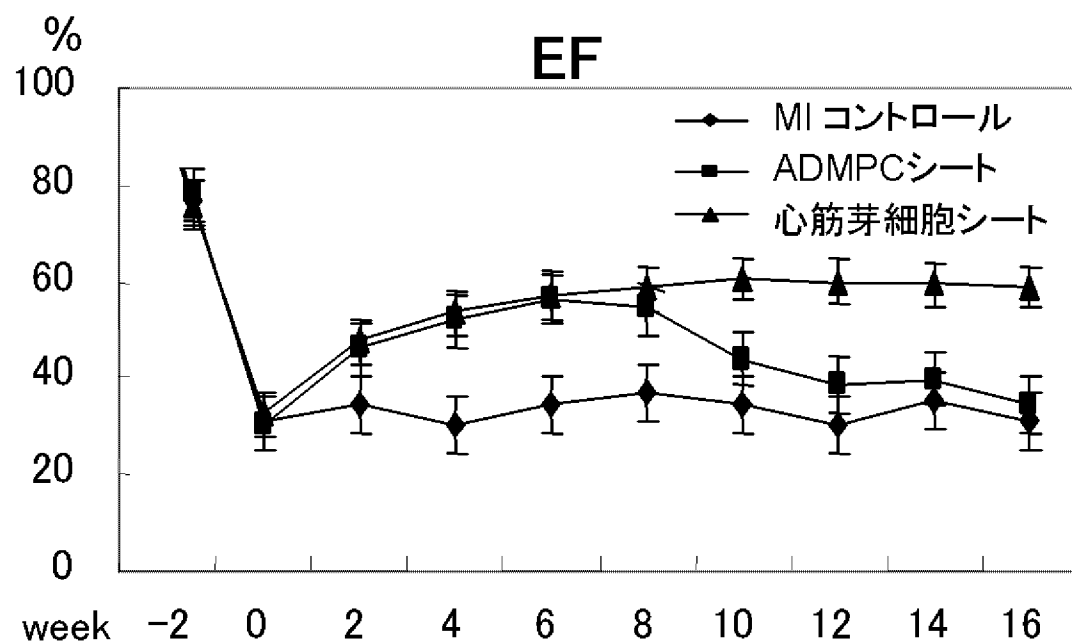
[図47]



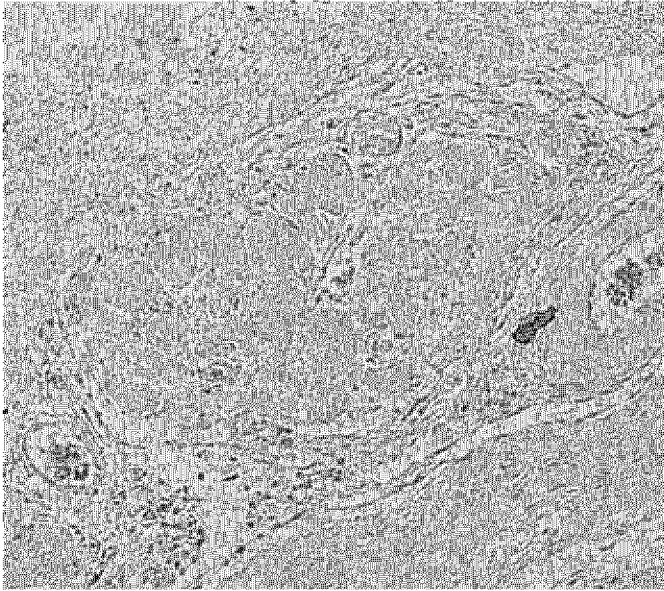
[図48]



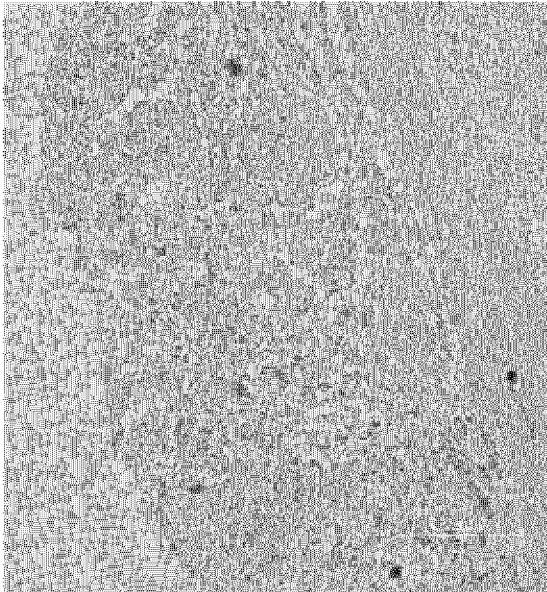
[図49]



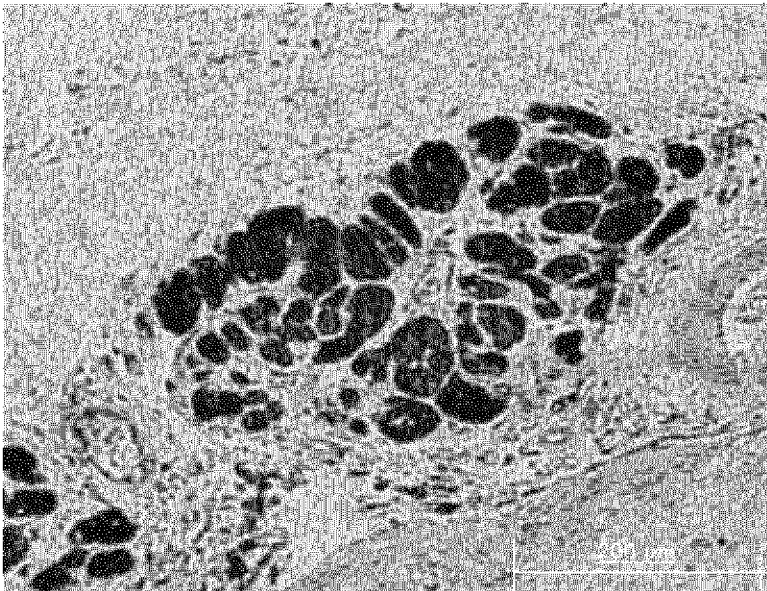
[図50]



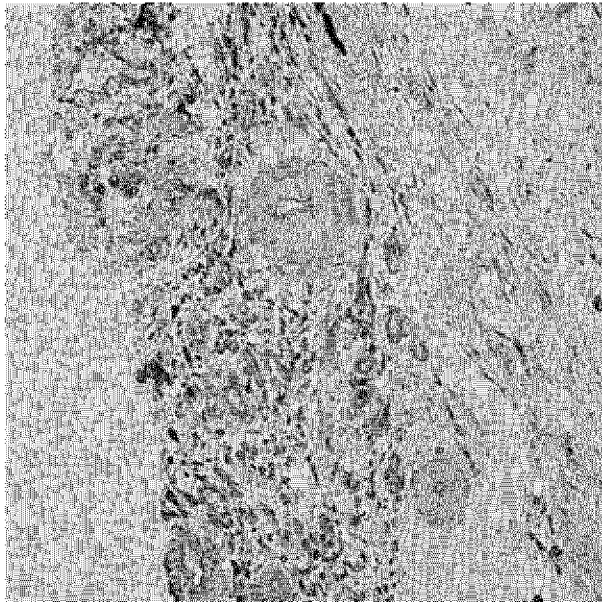
[図51]



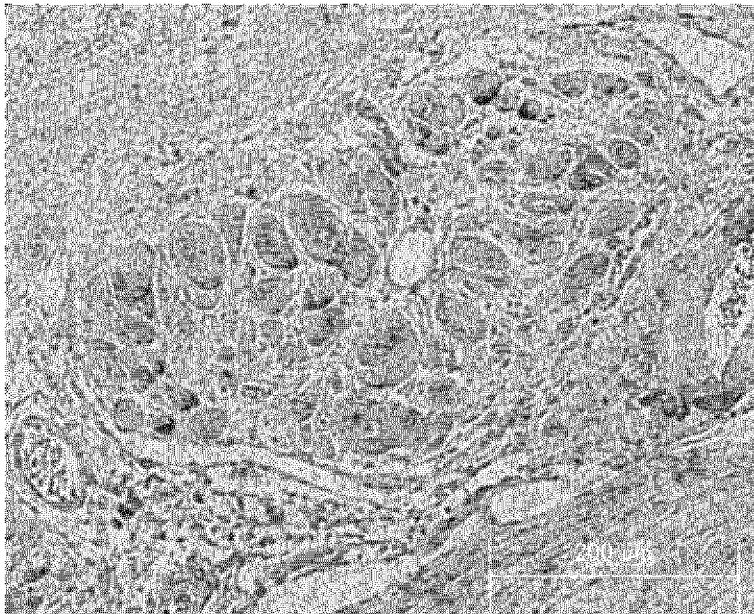
[図52]



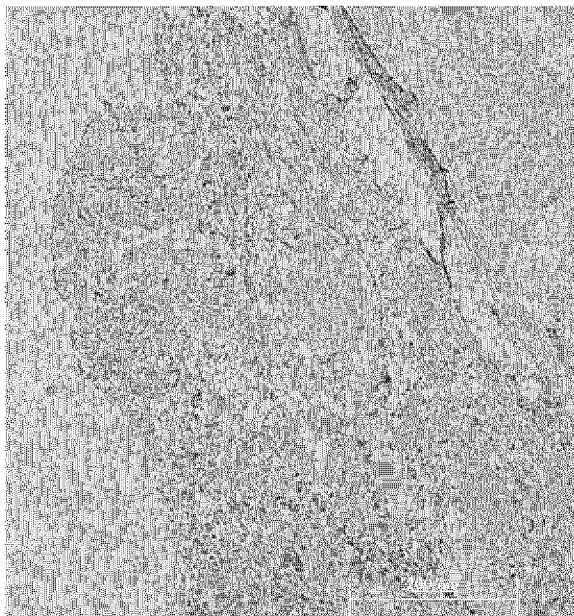
[図53]



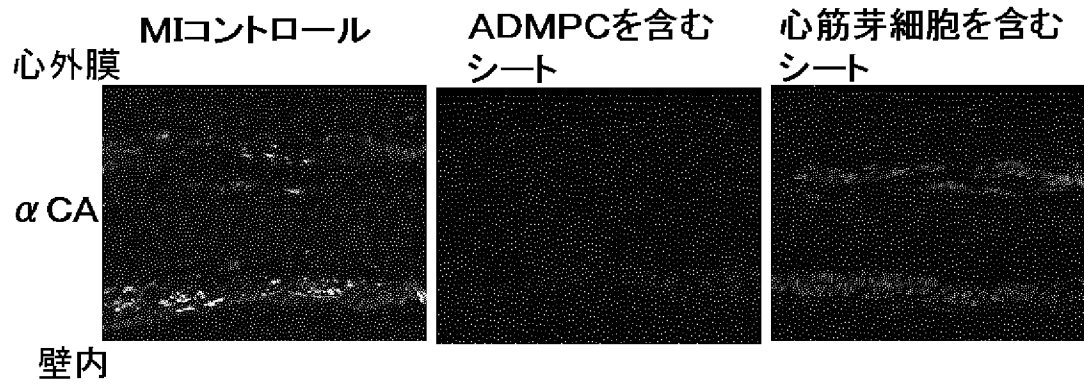
[図54]



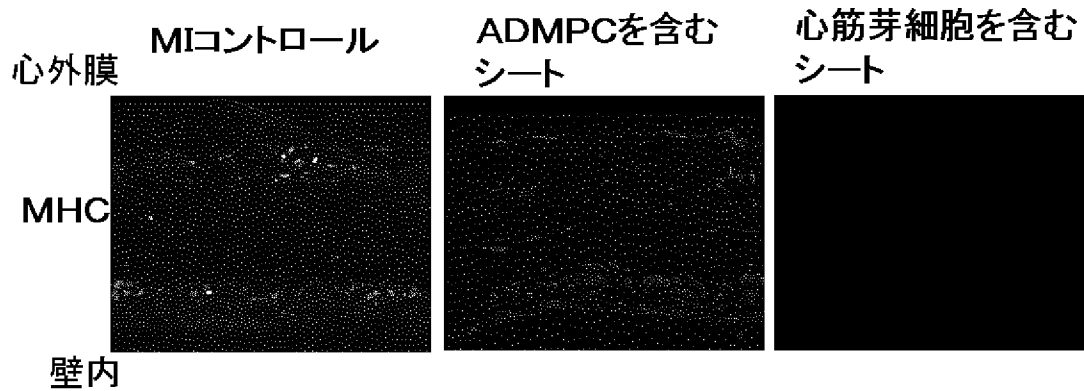
[図55]



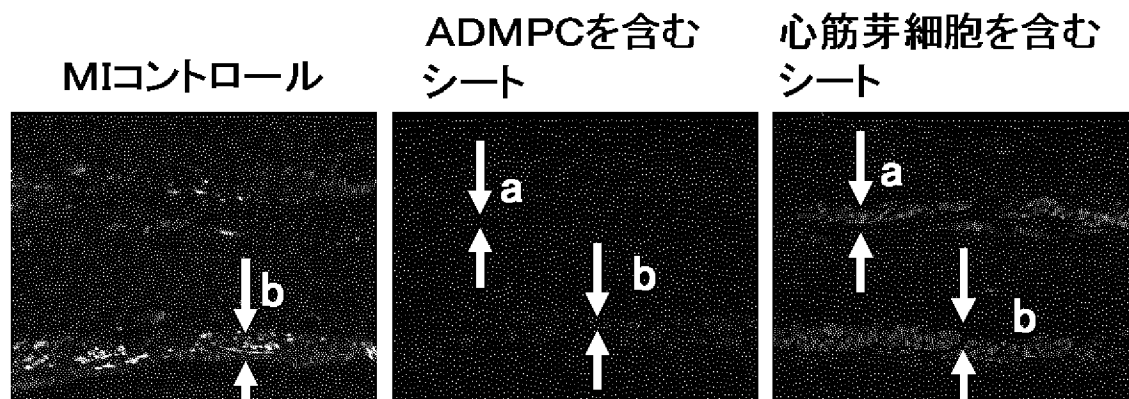
[図56]



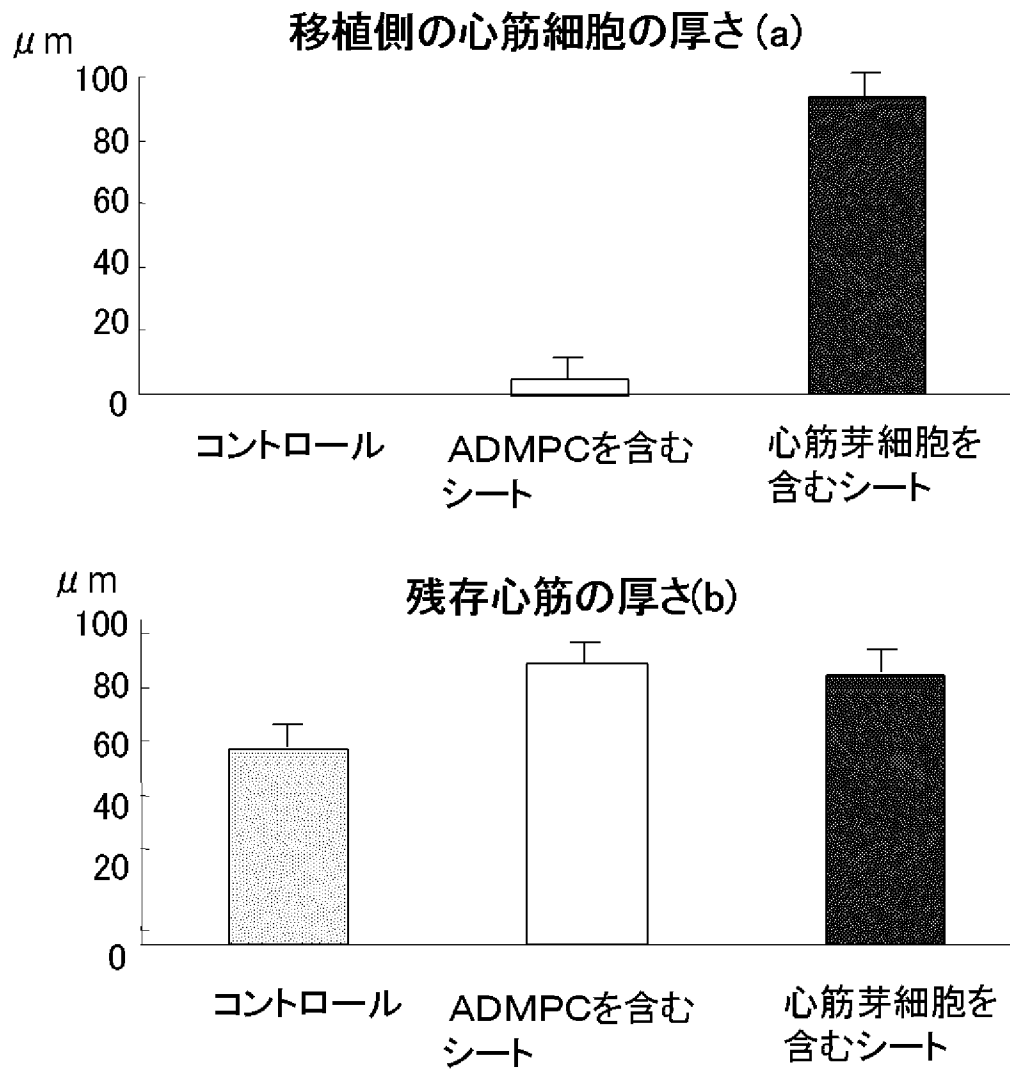
[図57]



[図58]



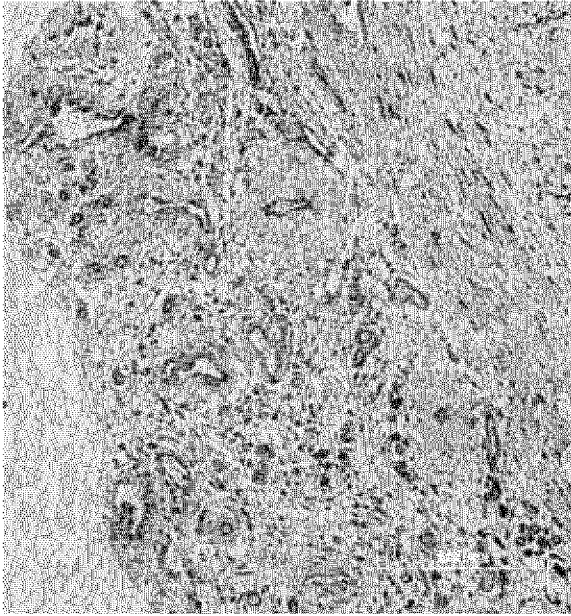
[図59]



[図60]

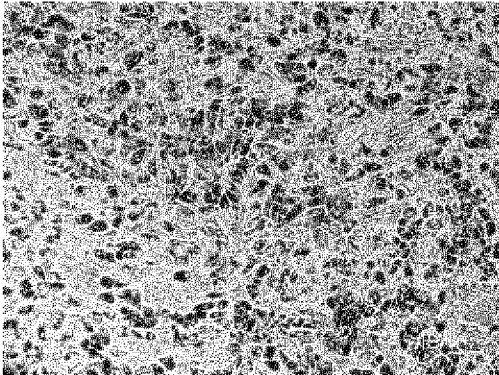


[図61]

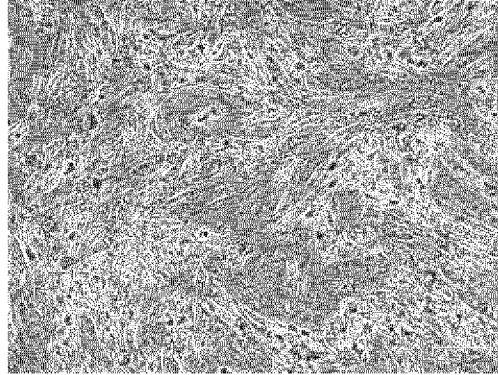


[図62]

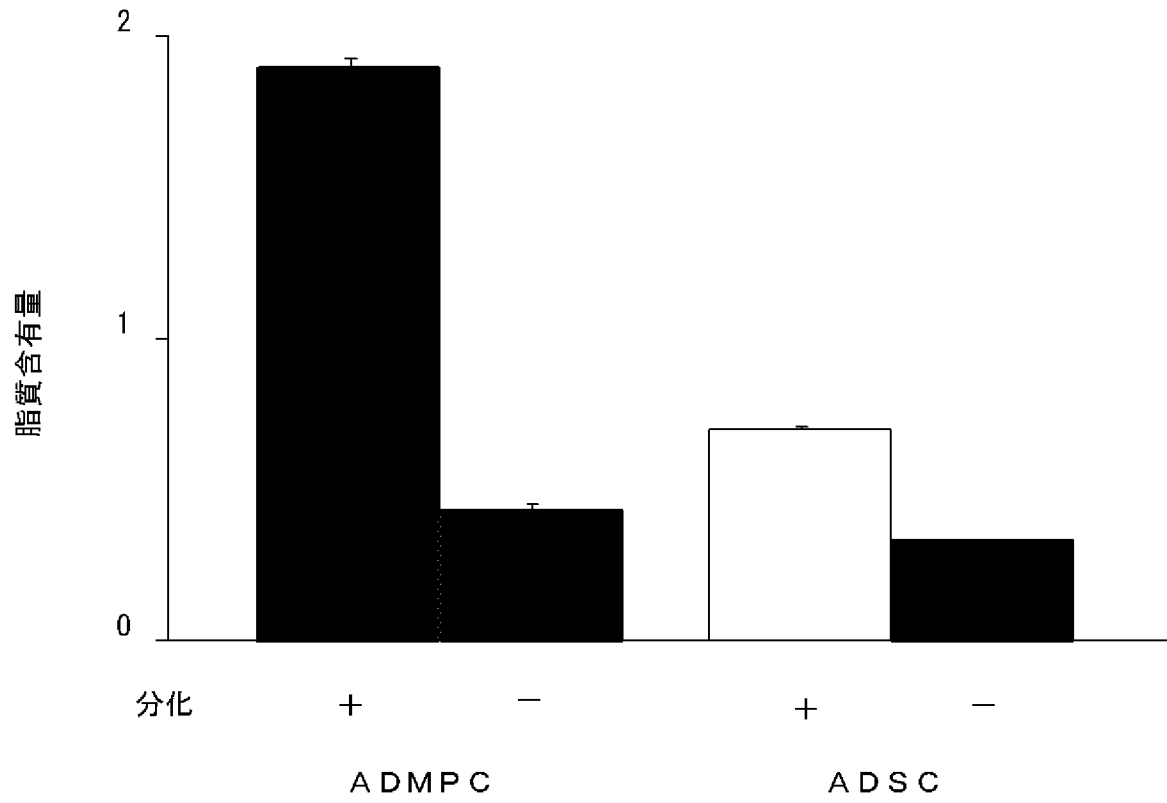
ADMPC



ADSC



[図63]



[図64]

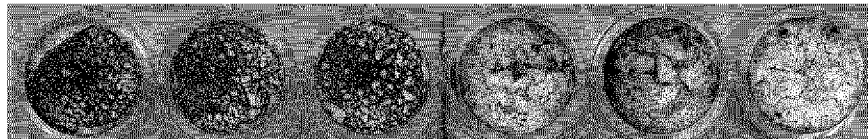
分化誘導後
7日目



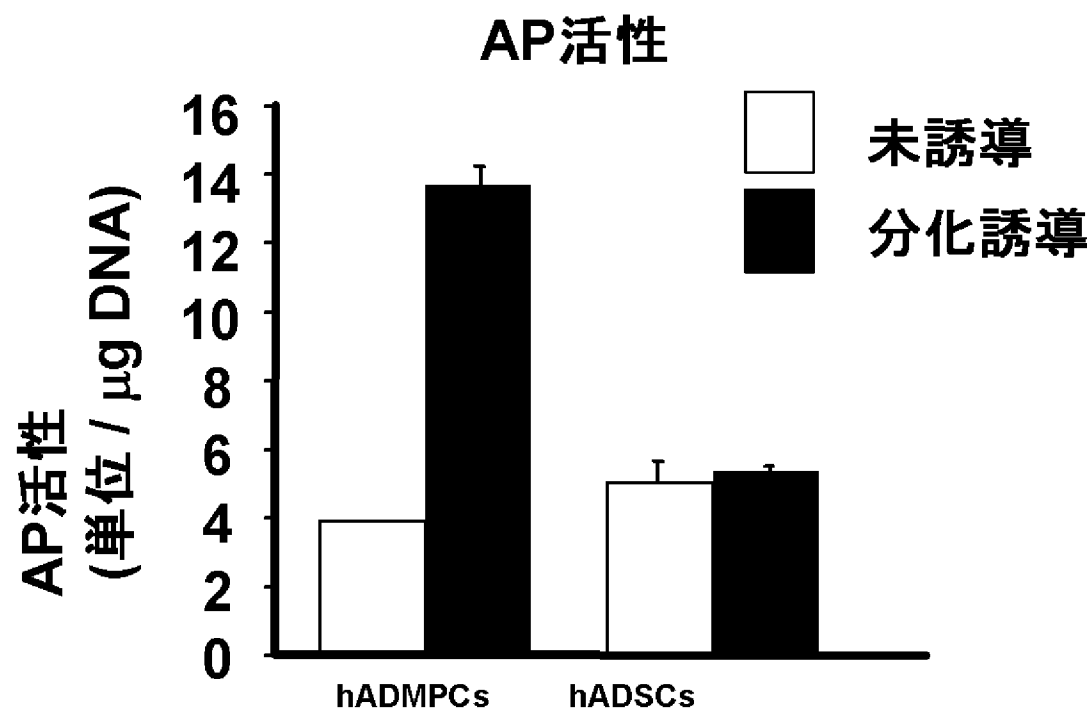
ADMPC

ADSC

分化誘導後
18日目



[図65]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/060980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/06(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(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)

C12N5/06, A61K35/12, A61L27/00, A61P1/16, C12N15/09, C12Q1/02

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	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	Banas Agnes, et al., Human adipose tissue-derived stem cells as a source of functional hepatocytes., Dai 65 Kai Proceedings of the Japanese Cancer Association (2006.8.28), p.504-505	$\frac{5-7}{1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19}$
$\frac{X}{Y}$	Takahiro OCHIAI, "Stem (Kan) Saibo kara Bunka Yudo shita Kansaiho no Riyo ni Kansuru Kenkyu", Heisei 17 Nendo Soyakuto Human Science Kenkyu Buntan Kenkyu Hokokusho (2006), pages 45 to 49	$\frac{5-7}{1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19}$
$\frac{X}{Y}$	Banas Agnes, et al., Human adipose tissue-derived stem cells as a source of functional hepatocytes., Regenerative Medicine (2007.2.19), Vol.6, Suppl, p.260	$\frac{5-7}{1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19}$

☒ 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
30 July, 2008 (30.07.08)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2008 (12.08.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/060980

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2006/082890 A1 (Okayama University), 10 August, 2006 (10.08.06), Claims & EP 1842905 A1 & WO 2006/082890 A1	<u>5-7</u> 1-4, <u>8, 10, 12</u> , 14, 15, 17, 19
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2006-254896 A (Effector Cell Institute, Inc.), 28 September, 2006 (28.09.06), Claims & US 2006/0154235 A1 & CA 2512667 A1	<u>5-7</u> 1-4, <u>8, 10, 12</u> , 14, 15, 17, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/060980

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 9 pertains to "a method for treatment of a human body by therapy" and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 11, 13, 16, 18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
With regard to "a substance produced by the screening method" recited in the inventions of claims 11, 13, 16 and 18, it is quite unclear as to what types of compounds are included within the scope of the substance or what
(continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/060980

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

types of compounds are excluded from the scope of the substance. Therefore, the statements of these claims are remarkably unclear. Thus, it is impossible to formulate a meaningful opinion on the novelty and the industrial applicability of the inventions of these claims.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/06(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/06, A61K35/12, A61L27/00, A61P1/16, C12N15/09, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

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 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	バナス アグネス, et al., Human adipose tissue-derived stem cells as a source of functional hepatocytes., 第 6 5 回日本癌学会学術総会記事(2006. 8. 28), p. 504-505	<u>5-7</u> 1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19
<u>X</u> Y	落合孝広, ステム (幹) 細胞から分化誘導した肝細胞の利用に関する研究, 平成 1 7 年度創薬等ヒューマンサイエンス研究 分担研究報告書 (2006), p. 45-49	<u>5-7</u> 1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19

☒ 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、国際出願日以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

3 0 . 0 7 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 8 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4 N

9 8 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	バナス アグネス, et al., Human adipose tissue-derived stem cells as a source of functional hepatocytes., 再生医療 (2007. 2. 19), Vol. 6, Suppl, p. 260	<u>5-7</u> 1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19
<u>X</u> Y	WO 2006/082890 A1 (国立大学法人岡山大学) 2006. 08. 10, 請求項 & EP 1842905 A1 & WO 2006/082890 A1	<u>5-7</u> 1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19
<u>X</u> Y	JP 2006-254896 A (株式会社 エフェクター細胞研究所) 2006. 09. 28, 請求項 & US 2006/0154235 A1 & CA 2512667 A1	<u>5-7</u> 1-4, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲9は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 11, 13, 16, 18 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲11, 13, 16, 18に係る発明の「スクリーニング方法により得ることのできる物質」については、化合物として具体的にどの化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求項に記載された発明に係る新規性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。