

(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
2010年12月16日(16.12.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/143747 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060254
- (22) 国際出願日: 2010年6月10日(10.06.2010)
- (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 2009-139271 2009年6月10日(10.06.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人奈良県立医科大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NARA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 Nara (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島祥介 (NAKAJIMA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP). 山田高嗣 (YAMADA, Takat-

sugu) [JP/JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP). 植田剛 (UEDA, Takeshi) [JP/JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF ARTIFICIAL INTESTINAL TRACT

(54) 発明の名称: 人工腸管の作製法

図 1



(57) Abstract: A method for producing an artificial intestinal tract from an artificial pluripotent stem (iPS) cell, which comprises forming an embryoid body from a purified iPS cell using a three-dimensional culture system, culturing the embryoid body, and culturing the embryoid body using a two-dimensional attached culture system, thereby inducing the differentiation into an intestinal tract; an artificial intestinal tract produced by the method; and use of the artificial intestinal tract in regenerative medicine.

(57) 要約: 人工多能性幹(iPS)細胞から人工腸管を作製する方法であって、三次元立体培養系を用いて純化 iPS 細胞から胚様体を形成及び培養し、その後、二次元付着培養系を用いて該胚様体を培養し、これによって腸管を分化誘導することを含ま方法、そのような方法によって作製された人工腸管、並びに、再生医療への人工腸管の使用に関する。

WO 2010/143747 A1



(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, 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 (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, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))

明 細 書

人工腸管の作製法

技術分野

本発明は、人工多能性幹(iPS)細胞から人工腸管を作製する方法に関する。

本発明はまた、上記方法によって作製された人工腸管、並びに、該人工腸管の再生医療への利用に関する。

背景技術

今日、再生医療が脚光を浴びている。これは、山中らによって iPS 細胞が発見されたからである（特許文献 1、非特許文献 1）。iPS 細胞は、特定の転写因子の作用によって体細胞から誘導される、胚性幹(ES)細胞に類似した特性を有しており、様々な細胞や組織に分化する能力をもつ細胞である（非特許文献 1～3）。ES 細胞が、卵子又は卵母細胞に由来するのに対して、iPS 細胞は、個体の体細胞から誘導することができるため、iPS 細胞から誘導された分化細胞又は組織を個体に移植したときの拒絶反応のリスクがほとんどないという利点がある。それゆえに、iPS 細胞を再生医療に役立てるための研究が行われている。

ES 細胞は、はじめマウス受精卵から誘導され（非特許文献 4）、その後ヒト ES 細胞も樹立された（非特許文献 5）。ES 細胞、特にマウス ES 細胞からは、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞、インスリン産生細胞、ドーパミン産生細胞などの細胞に分化誘導することが多数報告されている（非特許文献 6～9）。これに対して、iPS 細胞の利用研究は始まったばかりであり、iPS 細胞から分化細胞への誘導については報告が少ない。

本発明に関わる人工腸管に関しては、マウス ES 細胞からの腸管様細胞塊の構築（特許文献 2）、マウス ES 細胞からの腸管の分化誘導（非特許文献 10～11）などが報告されている。この報告のなかで、懸垂培養（hanging drop culture）系で ES 細胞から形成された胚様体を、付着培養に供することによって蠕動運動する腸管が作製されており、このとき、ES 細胞の状態や培養条件が重要なファクターに

なると指摘されている。

しかしながら、エピジェネティックな研究により、iPS 細胞は ES 細胞と同一でないという報告もされているため（非特許文献 12）、また iPS 細胞自体の特性化が十分でないために、ES 細胞の情報がそのまま iPS 細胞に適用できるという保証もない。このような状況のなかで、iPS 細胞から蠕動する腸管の分化誘導が実現されるならば、再生医療への応用の期待が一層高まることになるだろう。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 日本国特許第 4183742 号

特許文献 2 日本国特開 2006-239169 号公報

非特許文献

非特許文献 1 Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell 126:663-676 (2006)

非特許文献 2 Takahashi, K. et al., Cell 131:861-872 (2007)

非特許文献 3 Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007)

非特許文献 4 Evans, M. J. and Kaufman, M. H., Nature 292:154-156 (1981)

非特許文献 5 Klimanskaya, I. et al., Nature 444:481-485 (2006)

非特許文献 6 Klug, M. G. et al., J. Clin. Invest. 98:216-224 (1996)

非特許文献 7 Bain, G. et al., Dev. Biol. 168:342-357 (1995)

非特許文献 8 McDonald, J. W. et al., Nat. Med. 12:1410-1412 (1999)

非特許文献 9 Lumelsky, N. et al., Science 292:1389-1394 (2001)

非特許文献 10 Yamada, T. and Nakajima, Y., Frontiers in Gastroenterology 10(3):66-74 (2005) (メディカルレビュー社、日本)

非特許文献 11 Yamada, T. et al., Stem Cells 20:41-49 (2002)

非特許文献 12 Deng, J. et al., Nature Biotechnology 27:353-360 (2009)

発明の概要

人工多能性幹(iPS)細胞をヌードマウスに移植した場合、テラトーマ(teratoma)を形成することから、iPS 細胞は多分化能を有するものと考えられ、理論上、さ

さまざまな細胞に分化することが予想される。しかし、受精卵から樹立された ES 細胞の多能性と違って、哺乳動物の皮膚細胞などの体細胞に特定の種類の再プログラム化因子を遺伝子導入して作製された iPS 細胞の分化多能性について、体を構成するすべての細胞、組織、臓器等に分化するかどうかについては、確実な情報が存在しない。

本発明者らは、先に、胚性幹(ES)細胞から人工腸管を分化誘導する方法を報告したが、今回、さらに適用範囲が広いと考えられる iPS 細胞からの人工腸管の作製について研究を行った。

したがって、本発明の目的は、iPS 細胞から人工腸管を作製する方法を提供することである。

本発明は、要約すると、以下の特徴を含む。

第 1 の態様において、本発明は、人工多能性幹(iPS)細胞から人工腸管を作製する方法であって、三次元立体培養系を用いて、純化 iPS 細胞から胚様体を形成及び培養し、その後、二次元付着培養系を用いて該胚様体を培養し、これによって腸管を分化誘導することを含む、上記方法を提供する。

その実施形態において、上記三次元立体培養系が懸垂培養系であることを特徴とする。

別の実施形態において、上記 iPS 細胞が哺乳動物体細胞由来であることを特徴とする。

別の実施形態において、上記二次元付着培養の前に、前記胚様体の形成及び培養を 5～7 日間、好ましくは 6 日間、行うことを特徴とする。

別の実施形態において、上記懸垂培養系において、1 滴 (約 15～30 μ l) あたりの細胞数が約 400～3,000、例えば約 500～2,000 である、好ましくは 1 滴 (約 15 μ l) あたりの細胞数が 500～1,000 であることを特徴とする。

別の実施形態において、上記腸管は、神経ネットワークを有することを特徴とする。

本発明の方法によって作製される上記腸管は、三胚葉系由来の腸管構成成分からなり、かつ、蠕動運動することを特徴とする。

したがって、第 2 の態様において、本発明はまた、上記のいずれかの方法で作

製された人工腸管を提供する。

第3の態様において、本発明はさらに、患者の腸疾患に起因した再生医療のための治療剤の製造への、上記の人工腸管の使用を提供する。

本発明により、患者の体細胞から誘導された iPS 細胞を使用して人工腸管を作製することができるため、移植に伴う拒絶反応のリスクを回避できるという利点が提供される。またこれによって、胚性幹 (ES) 細胞からの人工腸管の作製と比べて適用範囲が格段に広がるという利点もある。

図面の簡単な説明

図1は、iPS 細胞から分化誘導された tubular formation (管状) の人工腸管を示す。

図2は、iPS 細胞から分化誘導された dome-like formation (ドーム状) の人工腸管を示す。ES 細胞から分化誘導された人工腸管は、このタイプが多いが、iPS 細胞から分化誘導された人工腸管は、図1の tubular formation のほうが多い傾向にある。

図3は、本発明の人工腸管における、蠕動運動 (繰り返す収縮と弛緩) にともなう腸管内容物 (黒) の運搬機能 (図3A~3C)、およびその拡大像 (図3D~3F) を示す。

図4は、本発明の人工腸管における、iPS 細胞から分化誘導された神経細胞の神経細胞体と神経線維 (図4A)、および大きな神経細胞の集合体である神経節 (ganglion) の存在 (図4B) を示す。図中、スケールバーは 30 μm を表す。

発明を実施するための形態

1. 定義

以下に、本明細書で使用する用語の定義を記載する。しかし、これらの定義は、限定的に解釈されるべきでなく、業界で使用される最も広義に解釈されるべきである。

人工腸管は、人工多能性幹 (iPS) 細胞から分化誘導された、蠕動運動する腸管を指す。腸管を構成する成分は、三胚葉 (すなわち、外胚葉、内胚葉及び中胚葉)

由来のもの、例えば、神経細胞、粘膜上皮細胞、微絨毛、結合組織、平滑筋層などを含む。

人工多能性幹細胞又は iPS 細胞は、再プログラム化因子により体細胞から初期化された ES 細胞様の分化多能性幹細胞をいう。この細胞は、Oct3/4、Nanog（あるいは、OCT3/4、NANOG）などの ES 細胞特異的なマーカーを発現する。iPS 細胞はまた、動物の体を構成する種々の細胞に分化する能力、及び核型を保持したまま半永久的に増殖し続ける能力を有する。

再プログラム化は、分化した細胞が、未分化細胞、特に分化多能性細胞に誘導、変換される過程及び手段を指す。

三次元立体培養系は、二次元（平面）培養ではない立体的に培養を行う系であり、例えば懸垂培養(Keller, J., *Physiol. (Lond)* 168:131-139 (1998)、特開 2008-178367 号公報)、浮遊培養(同上)、微小重力環境下の三次元培養系(T. Uemura et al., *Space Utiliz Res* 25:170-173 (2009))などが含まれる。懸垂培養は、ハンギングドロップ培養(hanging drop culture)とも称せられ、重力と表面張力を利用する培養法であり、水滴状に垂れ下げた培養液の中で細胞を培養する方法である。浮遊培養は、細胞を、細胞非接着性ポリマーでコーティングするなどして培養器に付着させることなく、液体培地のなかに浮遊させた状態で増殖させる培養法である。浮遊培養では、予め形成させた胚様体又は凝集塊（もしくは集積体）を浮遊させて培養することができる。微小重力環境下の三次元培養は、RWV(rotating wall vessel)バイオリアクターを使用して行うことが可能であり、三次元的組織構築が可能なが知られている。

フィーダー細胞は、増殖させようとする細胞を未分化のまま維持するという培養条件を整えるために使用される補助的細胞であり、この細胞自体は、増殖しないようにマイトマイシン C などの抗生物質又は放射線照射などで予め処理されている。

胚様体は、iPS 細胞が凝集して生じた細胞集塊である。

哺乳動物は、ヒトを含む霊長類、マウスを含むげっ歯類、ウシを含む有蹄類などを非制限的に含む。好ましい哺乳動物はヒトである。

体細胞は、生殖細胞（卵母細胞、精原細胞）、生殖幹細胞（胚性幹細胞、精子幹

細胞)又は分化全能性細胞を除くすべての体性細胞であり、成熟又は胎児性細胞(線維芽細胞、毛細胞、筋肉細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞、膵外分泌細胞、脳細胞、肺細胞、腎細胞、皮膚細胞、リンパ球、上皮細胞、内皮細胞等)、幹細胞(造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞、歯髄幹細胞等)、前駆体細胞などの細胞を包含する。体細胞は、初代培養細胞、継代細胞、株化細胞などの細胞も包含する。

三胚葉系は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉からなり、それぞれ特定の細胞、組織、臓器に分化することができる。

腸管構成成分は、腸管を構成する、三胚葉系由来の細胞をいう。

蠕動運動は、腸管に特有の協調運動をいう。

2. iPS細胞の作製

本発明で使用可能な iPS 細胞は、ヒトやマウスを含むあらゆる動物、好ましくは哺乳動物の体細胞の再プログラム化によって人工的に誘導されうる(例えば、Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell 126:663-676 (2006)、Takahashi, K. et al., Cell 131:861-872 (2007)、Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007) 参照)。再プログラム化は、特に限定されず、公知の任意の方法によって行うことができる。そのような方法には、特定の再プログラム化因子の組合せを使用する方法、再プログラム化因子とマイクロ RNA (miRNA) を組合せる方法、などが含まれる。

再プログラム化因子の組合せの例は、以下のものに限定されないが、Oct3/4, Sox2, Klf4 及び c-Myc、あるいは OCT3/4, SOX2, KLF4 及び c-MYC、あるいはそれらのホモログ、の組合せ、Oct3/4, Sox2 及び Klf4、あるいは OCT3/4, SOX2 及び KLF4、あるいはそれらのホモログ、の組合せ、Oct3/4, Sox2, Nanog 及び Lin28、あるいは OCT3/4, SOX2, NANOG 及び LIN28、あるいはそれらのホモログ、の組合せなどを含む (Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell 126:663-676 (2006)、Takahashi, K. et al., Cell 131:861-872 (2007)、Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007))。これらの再プログラム化因子は、核酸(すなわち、遺伝子、DNA もしくは RNA)又はタンパク質のいずれかである。

上記の再プログラム化因子のアミノ酸配列及び塩基配列は、例えば米国 NCBI

のwebサイトにアクセスすることによって入手可能である。例えば、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog 及び Lin28 について、マウスの各配列（アミノ酸配列及び塩基配列）はそれぞれ、NM_013633, NM_011443, NM_010637, NM_010849, NM_028016, NM_145833 として登録されているし、また、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG 及び LIN28 について、ヒトの各配列（アミノ酸配列及び塩基配列）はそれぞれ、NM_203289 もしくは NM_002701, NM_003106, NM_004235, NM_002467, NM_024865, NM_024674 として登録されている。

再プログラム化因子と miRNA の組合せの例は、以下のものに限定されないが、Oct3/4, Sox2 及び Klf4、あるいは OCT3/4, SOX2 及び KLF4、あるいはそれらのホモログと、miR-291-3p, miR-294 又は miR-295、あるいはそれら miRNA のホモログ、との組合せを含む (Judson, R. L. et al., Nature Biotechnology 27:459-461 (2009))。miR-291-3p, miR-294 又は miR-295 は、マウス miR-290 クラスターのサブセットであり、マウス iPS 細胞の誘導の際に Oct3/4, Sox2 及び Klf4 による体細胞の再プログラム化の効率を高める作用をもつ。

本明細書で使用する「ホモログ」なる用語は、示された再プログラム化因子又は miRNA と同じファミリーに属するが、それが由来する生物種が異なる場合に使用される。

再プログラム化は、再プログラム化因子又は miRNA を体細胞内に導入することによって行われる。再プログラム化因子が核酸の場合には、それは、ウイルス、プラスミドなどのベクターを介して体細胞内に導入されうる。ウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが含まれる。また、プラスミドには、哺乳動物細胞用プラスミドのいずれも使用可能である (Okita, K. et al., Science 322:949-953 (2008))。このうち、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はプラスミドを使用する場合には、細胞ゲノムに再プログラム化因子 DNA が組み込まれないし (Stadtfield, M. et al., Science 322:945-949 (2008))、また、センダイウイルスベクターを使用する場合には、再プログラム化ののちに、該ベクターは破壊されると言われている。

ベクターには、再プログラム化因子 DNA の他に、プロモーター、エンハンサー、

ターミネーター、リボソーム結合サイト、ポリアデニル化サイトなどの制御要素、選択マーカー、レポータージーンなどが適宜含まれる。選択マーカーには、例えば、薬剤耐性遺伝子、例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などの陽性マーカー、並びに、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの陰性マーカーなどが含まれる。また、レポータージーンには、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、GUS(β -グルクロニダーゼ)、FLAGなどの遺伝子配列が含まれる。

細胞への再プログラム化因子の導入は、ウイルス感染、エレクトロポレーション、カチオン性リポソーム、膜透過性ペプチドベクター(WO2007/132555)、膜透過性ペプチド表面修飾リポソームなどを利用する方法によって行うことができる。特に、リポソームや膜透過性ペプチドベクターは、再プログラム化因子タンパク質の細胞内導入のために利用できる。

ベクターの構築を含む遺伝子組換えのための一般的な技術は、例えば Sambrook, J. ら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Ausubel, F.M. ら, *Short protocols in Molecular Biology: A Compendium Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1999)などに記載されている。

iPS 細胞の誘導は、日本国特許第 4183742 号、Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Cell* 126:663-676 (2006)、Takahashi, K. et al., *Cell* 131:861-872 (2007)などに記載される方法によって行うことができる。

iPS 細胞の誘導法の 1 つの例は、フィーダー細胞 (マイトマイシン C 処理した STO 細胞又は SNL 細胞) 上で体細胞を、37°C、5%CO₂ 存在下で、適切な誘導培地中で培養し、体細胞と再プログラム化因子又は該因子をコードする DNA (好ましくは、ベクター) を接触させて培養し、約 2~3 週間後に生じた iPS 様コロニーを同定・選択する。

iPS 細胞の誘導法の別の例は、はじめに適切な培養培地中、37°C、5%CO₂ 存在下で体細胞と再プログラム化因子又は該因子をコードする DNA (好ましくは、ベクター) を接触させて約 4~7 日間培養し、その後、該細胞を、適切な培養培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で、同様のフィーダー細胞上で培養し、約 25~約 30 日又は

それ以上の後に生じた iPS 様コロニーを同定・選択する。

培養培地としては、例えば、10～15%FCS を含有する DMEM、DMEM/F12 又は DME 培地（これらの培地にはさらに、LIF(leukemia inhibitory factor)、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）、あるいは、bFGF 又は SCF を含有する ES 細胞培養用培地、例えばマウス ES 細胞培養用培地（例えば TX-WES 培地、トロンボ X 社）又は霊長類 ES 細胞培養用培地（例えば霊長類（ヒト&サル）ES 細胞用培地、リプロセル）、などを使用しうる。

上記の培養の間には、培養開始 2 日目以降から毎日 1 回新鮮な培地と培地交換を行う。また、再プログラム化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ 100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

ディッシュ上の上記 iPS 様コロニーを、トリプシン及びコラゲナーゼ IV を含む溶液（CTK 溶液）を用いて処理し、残ったコロニーを上記フィーダー細胞上に撒いて ES 細胞培養用培地で同様に培養することにより、iPS 細胞を継代することができる。このとき、80～90%コンフルエントになるまで培養し、継代を繰り返す。

iPS 細胞の同定は、ES 細胞のマーカー遺伝子である Oct3/4 もしくは OCT3/4、Nanog もしくは NANOG などの遺伝子の発現を RT-PCR 法で検出することによって行うことができる。さらにまた、樹立した細胞をヌードマウスの背側の腹側部に移植することによってテラトーマ（奇形腫）の形成を確認する。

3. iPS 細胞からの胚様体の作製

iPS 細胞から胚様体を作製するに際して、iPS 細胞を高純度に精製する必要がある。上記の方法で作製され継代された iPS 細胞には、線維芽細胞（例えばマウス胎仔線維芽細胞(MEF)）などのフィーダー細胞、継代を繰り返す際に生じた僅かな分化細胞などが混在するため、このような細胞を除去することが重要である。混在する細胞を除くために、例えば、ゼラチン上に iPS 細胞を撒いて培養することを繰り返し、これによって純化 iPS 細胞を得る。このとき MEF を取り除きながら未分化状態を維持するために、iPS 細胞培養培地に LIF を含有させる。

具体的には、線維芽細胞（フィーダー）上で、上記培養培地中、37℃、5% CO₂ 存在下で iPS 細胞（培養ディッシュ 100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞）を 2

日間培養し、さらに、増殖した iPS 細胞コロニーから線維芽細胞を除去するために、ゼラチン上に iPS 細胞を撒いて、iPS 細胞培養培地で 2 日間培養し、再度、ゼラチン上で iPS 細胞を 1 日間培養する。iPS 細胞の培養開始から約 5 日間で純度の高い iPS 細胞を得ることができる。

本発明で使用可能な iPS 細胞の純度は、95%以上、好ましくは 97%以上、より好ましくは 99%以上である。本明細書で「純化 iPS 細胞」とは、iPS 細胞が 95%以上含有する細胞をいう。

上記のようにして得られた純化 iPS 細胞を使用して胚様体を作製する。MEF の混入が多く、iPS 細胞の純度が低い場合、人工腸管の分化誘導効率はきわめて低くなることから、iPS 細胞の純化すなわち MEF などのフィーダー細胞の除去が、人工腸管の作製には非常に重要であることが明らかとなった。またこのとき、培養系として、三次元立体培養系又は二次元平面培養系を使用できるが、三次元立体培養系、又は三次元立体培養と二次元平面培養を組み合わせた系、が好ましい。三次元立体培養系として、例えば懸垂培養系、浮遊培養系、微小重力環境下の三次元培養系などが挙げられる。好ましい培養系は、懸垂培養系である(Keller et al., J. Physiol. (Lond) 168:131-139 (1998)、日本国特開 2006-239169 号公報)。

懸垂培養系は、培養液をシャーレの蓋の裏などにぶら下げて培養する培養系であり、iPS 細胞は重力の影響で、培養滴の下側に凝集し、胚様体と呼ばれる凝集塊が短時間で形成される。この培養系では、培養滴の体積に応じて iPS 細胞数を決定することが望ましく、例えば 1 滴(約 15~30 μ l)あたり約 400~3,000 細胞、例えば約 500~2,000 細胞、好ましくは 1 滴(約 15 μ l)あたり約 500~1,000 細胞が適する細胞濃度である。

上記の培養系で胚様体を作製するための培地は、例えば、約 10~15%FCS を含有する DMEM、DMEM/F12 又は DME 培地を基礎として、これに、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノール、ピルビン酸ナトリウム、penicillin/streptomycin などを含むものを用いることができる。これと同様の培地は、浮遊培養系や微小重力環境下の三次元培養系でも使用可能である。

上記のような懸垂培養によって、iPS 細胞を 5~7 日間、好ましくは 6 日間、培養した胚様体を得る。胚様体の培養日数は 5 日間よりも 6 日間のほうが、人工腸

管の分化誘導効率が高くなることから、胚様体の培養日数が人工腸管の発生に非常に重要であることが今回明らかとなった。

4. 人工腸管の分化誘導

上記のようにして iPS 細胞を 5~7 日間、好ましくは 6 日間培養して得られた胚様体を、胚様体作製用の培地と同じ培地を用いて約 14 日間、二次元付着培養することによって、管腔構造を有する蠕動運動する腸管を分化誘導することができる (図 1、図 3 参照)。

誘導された腸管を構成する細胞群として、微絨毛を有する Goblet 細胞などの粘膜上皮細胞、結合組織、平滑筋細胞、漿膜、カハール間質細胞、神経細胞などが検出されたが、これらは、三胚葉系からの細胞群である。規則的な自動収縮に加えて、大きく波打ち、うねるような蠕動運動は、腸管に特有な動きである。

形態学的に見た場合、ES 細胞からの人工腸管 (ES-Gut) は dome-like formation (ドーム状) が多く、tubular formation (管状) のものは少なかったのに対し、本発明の iPS 細胞からの人工腸管 (iGut) では、dome-like formation (ドーム状) (図 2) よりも tubular formation (管状) (図 1) を取るものが多く認められた。ここで、ドーム状組織は、細胞が縦向きに増殖・集積して組織が形成されるのに対して、管状組織は、細胞が横向きに増殖・集積して組織が形成されると考えられる。この相違の原因として、ES 細胞と iPS 細胞の細胞特性の違いによるものか、胚様体における内部微小環境の段階での違いによるものかは不明である。

iPS 細胞からの人工腸管は、結果的には、胚性幹 (ES) 細胞から人工腸管を誘導したときと類似した培養条件で得ることができた。しかし、ヒト ES 細胞に関して、ヒト ES 細胞を調製する段階で受精卵を破壊するという倫理上の問題があるし、並びに、仮にそのような問題が解決されたとしても、移植に伴う拒絶反応のために受精卵の提供者のみへの使用に限定されるなどの問題がある。これに対して、本発明の方法では、患者の体細胞を出発材料とするため、上記のような倫理上の問題や拒絶反応の問題はないと考えられる。確かに、iPS 細胞は、形態や増殖様式、分化多能性、テラトーマ (teratoma) 形成能などの特性の点で ES 細胞と類似しているが、iPS 細胞からの体細胞や体組織への分化誘導については十分な知見はないのが実状である。特に、体細胞を再プログラム化して作製した iPS 細胞が、臓

器分化誘導能を有するかどうかについては、全く未知のことである。こうしたなかで、ES細胞と同様の培養条件でiPS細胞から、腸管固有の細胞の複雑な集合体である人工腸管という臓器を分化誘導できたことは、予想できないことであり画期的である。

5. 医療への応用

本発明はさらに、患者の腸疾患に起因した再生医療のための治療剤の製造への、上記の人工腸管の使用を提供する。

ウイルス、微生物などの汚染のない厳重に管理されたクリーンルーム内で、患者から採取した体細胞の初代培養細胞または継代培養細胞からiPS細胞を樹立し、このiPS細胞から、本発明の方法により作製された人工腸管を、再生医療のための治療剤として使用する。治療剤には、少なくとも、人工腸管の他に、それを維持するための培地（必要であれば血清を含む）、人工血液などが含まれる。

腸疾患には、例えば、潰瘍性大腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患、ヒルシュスプルング病のような腸管運動異常疾患などの難治性あるいは先天性の疾患などが含まれる。

本発明の人工腸管は、患者自身の体細胞から誘導されるため、拒絶反応のない移植用の臓器として、再生医療やテーラーメイド医療のために使用できる全く新しい治療戦略になる可能性を有する。

上で説明した本発明方法によって、体外で人工腸管を作製し、これを、患者の障害のある腸管部分と置換するか又は該腸管部分に移植する。これによって、患者の腸が正常に機能するようになると考えられる。

さらにまた、患者由来あるいは疾患固有のiPS細胞から人工腸管を作製することにより、腸疾患の病態の機序解明、薬剤効果および毒性の評価、腸からの栄養の吸収試験、感染性腸炎のモデル作成などが可能となるだけでなく、創薬や細胞移植治療への臨床応用にも大いに役立つものと考えられる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって制限されないものとする。

実施例

[実施例 1]

<iPS 細胞からの胚様体の作製>

iPS 細胞

京都大学 iPS 細胞研究センターによって、マウスの皮膚細胞（体細胞）に、4 つの初期化因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）DNA を pMXs レトロウイルスベクターを介して遺伝子導入して作製された iPS 細胞を、理化学研究所を介して京都大学より供与された。以下の実験では、このマウス iPS 細胞を使用した。

iPS 細胞の維持培養

京都大学から供与された iPS 細胞は、一度、解凍して分注したのち、 -180°C で凍結保存された。iPS 細胞の未分化維持のために、未分化因子を放出する MEF（マウス胎仔線維芽細胞）をフィーダー細胞として、その上で iPS 細胞を培養した。その際の培養液は、以下の表 1 に示した。

[表 1]

iPS 細胞培養用 DMEM 培地

DMEM powder	1 袋(1000ml 用)
NaHCO ₃	3.025g
Cellgro DDW	1000ml
Hepes	25ml
Penicillin/Streptomycin	10ml
FCS(ウシ血清)	187.5ml
MTG	150 μ l
LIF	12.5ml

胚様体 (embroid body) の作製

iPS 細胞から、様々な細胞が秩序立って構成する複雑な臓器に分化誘導 (cell-to-organ) するために、三次元立体培養系を使用した。具体的には、シャーレの蓋の裏に iPS 細胞を含む培養液をぶら下げて培養する懸垂培養 (hanging drop culture) 系を用いて、iPS 細胞から胚様体を作製した。この培養系では、iPS 細胞は重力の影響で、培養滴の下に凝集し、1 日で胚様体と呼ばれる凝集塊が形成された。

上記のように iPS 細胞を維持培養し、凍結した iPS 細胞は、融解して実験に使

用されるが、その中には、マウス胎仔線維芽(MEF)細胞が混入している。腸管分化誘導を行うときには、このMEF細胞がiPS細胞に混じることによって分化が阻害されることが今回明らかになった。そのため、可能な限りiPS細胞の純度を高くするためにMEF細胞を取り除く必要があった。そこで、MEFがゼラチンに付着しやすい性質を利用し、iPS+MEFをゼラチンコートしたシャーレのうえで何度か培養することにより、MEFを除去した。

実際、胚様体を作製する手順は、以下のとおりである。

- (1) 凍結されたMEFを解凍して培養する。培養液は上記表1のものと同じである。この操作は、iPS細胞を解凍する前日に行う。
- (2) iPS細胞を解凍してMEFの上で2日間培養培養する。
- (3) iPS細胞がコロニーを形成して未分化な状態を維持したまま増殖する。次に、MEFを除去するため、ゼラチン上にiPS細胞+MEF細胞を撒いて2日間培養する。
- (4) 再度、(3)の培養液をゼラチン上に撒いて1日間培養し、それによって、さらにMEFを除去し、iPS細胞の純度を上げていく。
- (5) iPS細胞の培養開始から約5日間で純度の高いiPS細胞のみを培養することが可能となり、この純化iPS細胞を用いて胚様体(EB)の作製を行う。

腸管の分化誘導に必要な条件として、EB作製の段階で、iPS細胞の至適濃度が非常に重要であることが明らかになり、具体的には、EB作製のための培養液(表2)に500個/15 μ lの濃度にした状態で、懸垂培養系でEBを作製した。

[表2]

胚様体用培養培地

DMEM	432.5ml
non-essential amino acids	0.1 mM
2-mercaptoethanol	0.1 mM
sodium pyruvate	1 mM
Penicillin/Streptomycin	50U/ml
FCS	50ml

[実施例2]

<腸管の分化誘導>

胚様体の状態で6日間培養したのち、二次元付着培養 (outgrowth culture) を行うと、約14日目に蠕動運動する腸管が分化誘導されてきた。このときの培養液は表2と同じである。5日間培養された胚様体を使用したときには、腸管の分化誘導効率は低下した。このため、6日間の胚様体培養が望ましいことが分かった。

人工腸管を図1に示す。管腔構造 (tubular formation (管状)) を有する臓器の形状が明確である。ES細胞から分化誘導された人工腸管は、dome-like formation (ドーム状) タイプが多いが、iPS細胞から分化誘導された人工腸管は、dome-like formation (ドーム状) (図2) よりもこの tubular formation (管状) のほうが多い傾向にあった。また、作製された人工腸管では、収縮および弛緩を繰り返しており、図3に示すように、この蠕動運動に伴って腸管内容物 (黒; 電顕で確認したところ、上皮系細胞であったので、おそらく再生に伴い脱落した上皮細胞と考えられる。) が次第に移動する様子が観察された。また、組織・細胞学的検査によって、腸管を構成する細胞群が、微絨毛を有する Goblet 細胞などの粘膜上皮細胞、結合組織、平滑筋細胞、漿膜、カハール間質細胞、神経細胞などを含まることが示された。神経細胞については、抗ニューロフィラメント抗体を使用した神経染色によって、人工腸管には、神経細胞体、神経節、神経線維のネットワークが構築されていることが判明した (図4)。

このように、蠕動運動、腸管構成細胞群などの特性から、iPS細胞から分化誘導された臓器は、管腔構造を有しかつ神経ネットワークを有する、成熟したマウス腸管と同様の形態学的特徴を有する人工腸管であり、その蠕動運動および運搬機能には、神経細胞の分化誘導、神経節、神経線維ネットワークの形成の関与が示された。

上記のような単純な培養条件で、iPS細胞から出発して、単なる体性細胞や体性組織ではない、蠕動する人工腸管なる臓器が作製されたことは意外であった。

産業上の利用可能性

本発明は、患者の体細胞から誘導された iPS 細胞を用いて人工腸管を作製する方法を提供するものであり、この方法で作製された拒絶反応のない人工腸管は、

再生医療やテーラーメイド医療のために有用である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 人工多能性幹(iPS)細胞から人工腸管を作製する方法であって、三次元立体培養系を用いて純化 iPS 細胞から胚様体を形成及び培養し、その後、二次元付着培養系を用いて該胚様体を培養し、これによって腸管を分化誘導することを含む、前記方法。
2. 前記三次元立体培養系が懸垂培養系である、請求項 1 に記載の方法。
3. 前記 iPS 細胞が哺乳動物体細胞由来である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
4. 前記二次元付着培養の前に、前記胚様体の形成及び培養を 5～7 日間、好ましくは 6 日間行う、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。
5. 前記懸垂培養系において、1 滴(約 15～30 μ l)あたりの細胞数が約 400～3,000、好ましくは約 500～2,000 である、請求項 2～4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 前記腸管が神経ネットワークを有する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。
7. 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法で作製された人工腸管。
8. 患者の腸疾患に起因した再生医療のための治療剤の製造への、請求項 7 に記載の人工腸管の使用。

図 1



図 2

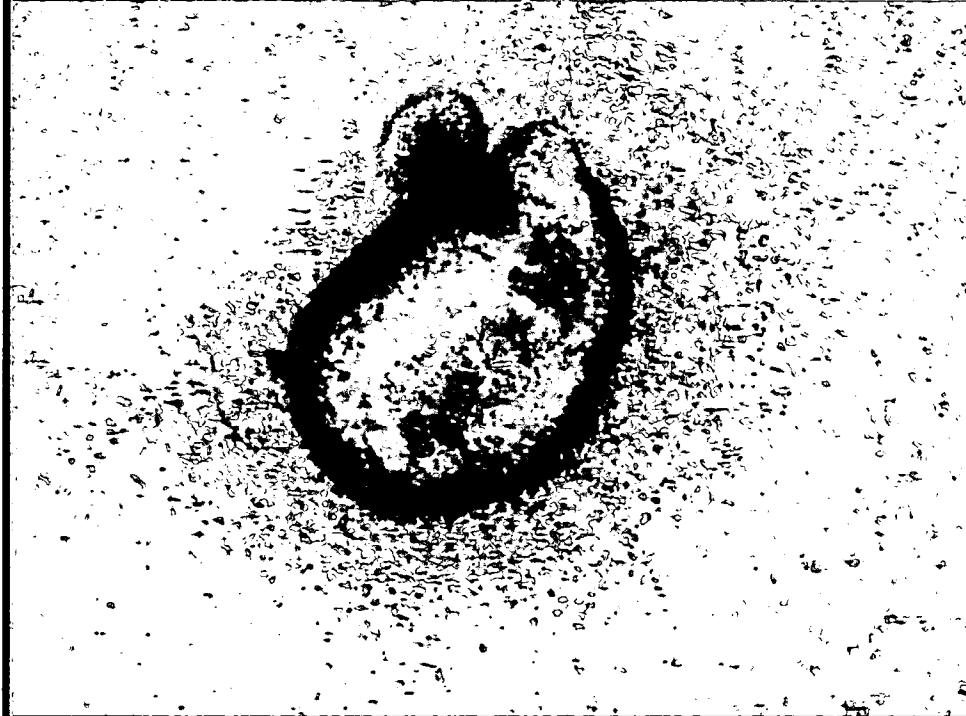


図 3

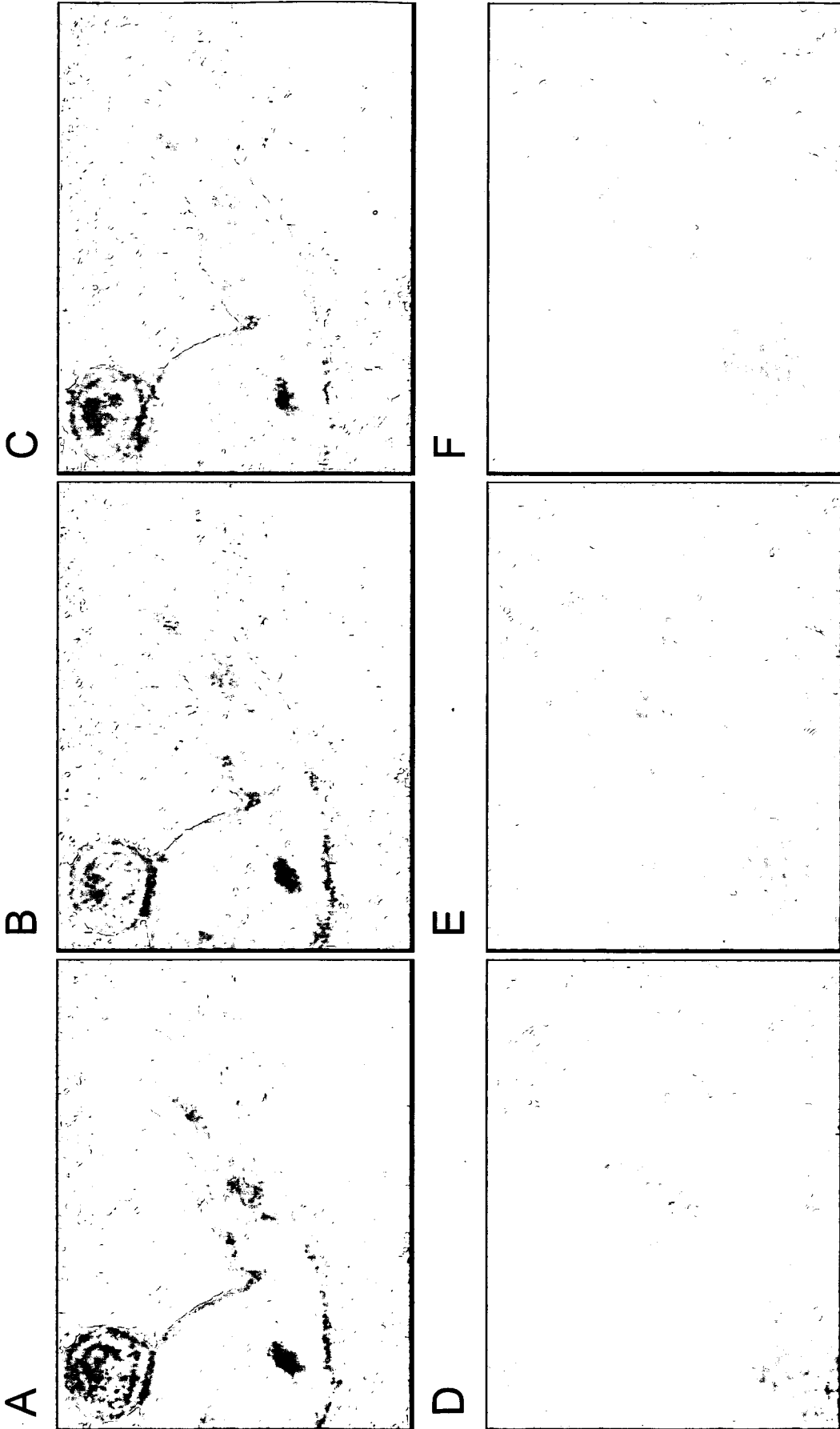
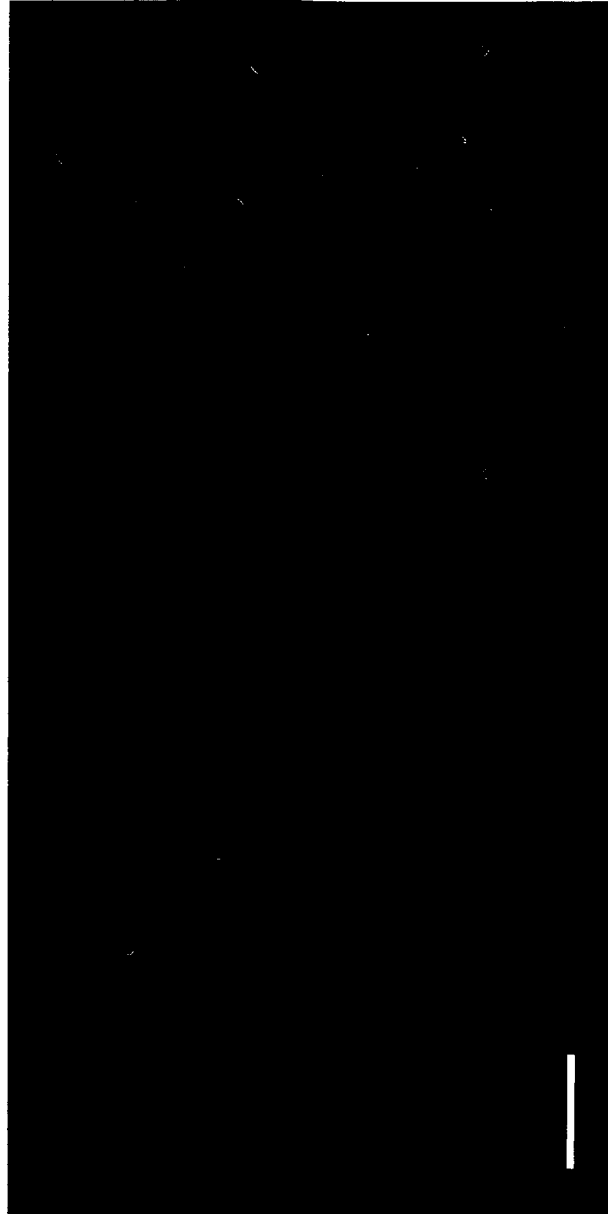


図 4

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01) i, A61L27/00(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)

C12N5/10, A61L27/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

PubMed, Science Direct, Wiley InterScience, CiNii, 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.
Y	Takashi YAMADA et al., "Saisei Igaku Kenkyu no Genjo to Shorai Tenbo Dai 9 Kai Zendo suru Chokan no Sakusei", Front. Gastroenterol., 2005, vol.10, no.3, pages 66 to 74	1-8
Y	Yamada T. et al., In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells., Stem Cells, 2002, Vol.20, No.1, p.41-49	1-8
Y	Taura D. et al., Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells., FEBS Lett., 2009-03-18, Vol.583, No.6, p.1029-1033	1-8

 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
01 September, 2010 (01.09.10)Date of mailing of the international search report
14 September, 2010 (14.09.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Karumbayaram S. et al., Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons., Stem Cells, 2009-04, Vol.27, No.4, p.806-811	1-8
Y	Furth M.E. et al., Stem cell sources to treat diabetes., J Cell Biochem., 2009-03-01, Vol.106, No.4, p.507-511	1-8
Y	Tateishi K. et al., Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts., J.Biol.Chem., 2008, Vol.283, No.46, p.31601-31607	1-8
P,X	Ueda T. et al., Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells., Biochem.Biophys.Res.Comm., 2010-01, Vol.391, No.1, p.38-42	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61L27/00(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. C12N5/10, A61L27/00

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	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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)
 PubMed, Science Direct, Wiley InterScience, CiNii, 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 請求項の番号
Y	山田高嗣 他, 再生医学研究の現状と将来展望 第9回 ぜん動する腸管の作成, Front. Gastroenterol., 2005, Vol.10, No.3, p.66-74	1-8
Y	Yamada T. et al., In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells., Stem Cells, 2002, Vol.20, No.1, p.41-49	1-8

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 01.09.2010	国際調査報告の発送日 14.09.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 上條 肇 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	Taura D. et al., Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells., FEBS Lett., 2009-03-18, Vol.583, No.6, p.1029-1033	1-8
Y	Karumbayaram S. et al., Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons., Stem Cells, 2009-04, Vol.27, No.4, p.806-811	1-8
Y	Furth M.E. et al., Stem cell sources to treat diabetes., J Cell Biochem., 2009-03-01, Vol.106, No.4, p.507-511	1-8
Y	Tateishi K. et al., Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts., J.Biol.Chem., 2008, Vol.283, No.46, p.31601-31607	1-8
P, X	Ueda T. et al., Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells., Biochem.Biophys.Res.Comm., 2010-01, Vol.391, No.1, p.38-42	1-8