

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6150108号
(P6150108)

(45) 発行日 平成29年6月21日(2017.6.21)

(24) 登録日 平成29年6月2日(2017.6.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/10
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
A 61 K 35/12	(2015.01)	A 61 K 35/12
A 61 K 35/407	(2015.01)	A 61 K 35/407
A 61 P 1/16	(2006.01)	A 61 P 1/16

請求項の数 10 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2013-58148 (P2013-58148)
(22) 出願日	平成25年3月21日 (2013.3.21)
(65) 公開番号	特開2013-226127 (P2013-226127A)
(43) 公開日	平成25年11月7日 (2013.11.7)
審査請求日	平成28年3月18日 (2016.3.18)
(31) 優先権主張番号	特願2012-80708 (P2012-80708)
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012.3.30)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稻毛区弥生町1番33号
(74) 代理人	100080089 弁理士 牛木 譲
(74) 代理人	100121153 弁理士 守屋 嘉高
(74) 代理人	100161665 弁理士 高橋 知之
(74) 代理人	100178445 弁理士 田中 淳二
(72) 発明者	富澤 稔 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト多能性幹細胞から肝前駆細胞への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法であって、分化用培地中で基質に接着して単層培養される前記ヒト多能性幹細胞に分化誘導用転写因子の組合せとして、FOXA2と、GATA4と、HEXと、C/EBPの組合せを発現させるステップを含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記方法は、さらに、前記分化用培地に増殖促進剤の組合せとして、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンからなる群から選択される1または2以上の前記増殖促進剤の組合せを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記ヒト多能性幹細胞に請求項1に記載された前記分化誘導用遺伝子産物の組合せを発現させるステップにおいて、前記分化誘導用遺伝子産物の組合せは繰り返し前記ヒト多能性幹細胞内で一過性発現をさせられることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞であることを特徴とする、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法で得られるヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用細胞組成物。

【請求項 6】

ヒト人工多能性幹細胞（ヒト i P S 細胞）から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法であって、ヒト i P S 細胞に転写因子 F O X A 2 、 G A T A 4 、 H E X および C / E B P の各遺伝子を 3 日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチン M 、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリンとトランスフェリントと亜セレン酸イオンとを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後 8 日目に、ヒト i P S 細胞から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法。

【請求項 7】

10

ヒト人工多能性幹細胞（ヒト i P S 細胞）から分化を誘導されて得られるヒト肝前駆細胞であって、ヒト i P S 細胞に転写因子 F O X A 2 、 G A T A 4 、 H E X および C / E B P の各遺伝子を 3 日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチン M 、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾンと、インシュリンおよびトランスフェリントを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後 8 日目に得られることを特徴とするヒト肝前駆細胞。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のヒト肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用細胞組成物。

【請求項 9】

20

F O X A 2 と、 G A T A 4 と、 H E X と、 C / E B P との遺伝子産物の、ヒト多能性幹細胞に発現させるシステムの、請求項 7 に記載のヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用。

【請求項 10】

前記ヒト多能性幹細胞に発現させるシステムと、オンコスタチン M 、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリン、トランスフェリントおよび亜セレン酸イオンとを含む培養液の、請求項 9 に記載のヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は、ヒト・人工（誘導）多能性幹（ i P S ）細胞を肝前駆細胞に分化誘導する方法、該方法により誘導された肝前駆細胞、および該肝前駆細胞を含む肝臓への移植用細胞組成物に関する。より詳しくは、本発明は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法に関する。具体的には、分化用培地中で基質に接着して単層培養される前記ヒト多能性幹細胞に分化誘導用遺伝子産物の組合せを発現させるステップを含む、方法に関する。さらに、該方法にて得られた肝前駆細胞を含む肝臓への移植用途に用いることができる細胞組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

40

肝臓は、主に肝実質細胞である肝細胞と、胆管上皮細胞などの肝非実質細胞などにより構成される。肝臓は、胆汁の分泌、吸収栄養分の濾過と解毒、薬物代謝、糖分の貯蔵と血糖の調節を行う他に、フィブリノーゲン、ヘパリンおよび貧血阻止物質などの生成器官であり生命必須のものである。現在、我が国において、肝硬変の死亡者数は年間 2 万人を超え、肝臓病は、死亡原因の第 5 位を占める。慢性肝炎例は約 1 3 0 万人と推定され、その約半数を占める慢性活動性肝炎は年間約 3 % の割合で肝硬変に進む。

【0 0 0 3】

一方、胚性幹細胞（ E S 細胞）および i P S 細胞のような多能性幹細胞から肝臓の細胞へ分化させる技術は、肝臓病の治療、創薬等に応用が期待される。例えば、肝不全は機能する肝細胞が極度に減少する致命的な病態で、肝細胞を移植することができれば根本的な

50

治療法になりうる。肝不全の症例では、極度の凝固因子の不足による出血傾向、肝性昏睡などの大変重篤な状態となるので、一刻も早く治療することが望まれる。

【0004】

そこで、肝細胞を移植することができれば根本的な治療法になり得る。ヒトにおいて、幹細胞から肝細胞への分化誘導方法を確立し、その分化誘導された肝細胞の移植が期待されている。よって、ヒト*iPS*細胞から大量の肝細胞を短期間で調製する方法を開発することが急務である。しかしひ多能性幹細胞では肝細胞へ分化誘導する方法は確立されていない。

【0005】

マウスではES細胞(embryonic stem cell; ESと略す)から肝細胞へ分化誘導させる方法(非特許文献2)や、混在する他の細胞から分離する方法(非特許文献3)も開発されている。しかし、従来の方法による胚性幹細胞から肝細胞へ分化誘導する方法は、ハンギングドロップ法によっており、胚様体を形成する必要があり、このため目的とする分化誘導されて得られる肝細胞はわずかであり、例えば、劇症の肝不全への対応として大量の細胞の供給には向かず、かつ大量の肝細胞の製造は不可能である。さらに、従来の方法ではマウスES細胞から肝細胞の分化誘導に最低3週間を要し、緊急の場合の治療対応もまた不可能である。例えば、大量の肝細胞を調製するには、肝細胞を培養容器の底面に伸展させて単層培養させる必要がある。

10

【0006】

加えるに、ヒトへの適用に関して、ヒト胚性幹細胞の使用は、他人由来の胚性幹細胞を使用するため免疫拒絶や倫理的な問題も存在する。

20

【0007】

一方、ヒト線維芽細胞より人工(誘導)多能性幹細胞(induced pluripotent stem、*iPS*細胞)が開発され、再生医学への応用が期待されている(非特許文献4)。しかし、臓器不全に対する臨床応用には、目的の細胞に分化誘導する方法の確立が必要である。

【0008】

そこで、自己の細胞から作製可能で免疫拒絶等の問題が少ない*iPS*細胞から肝細胞への誘導方法の確立が望まれる。しかし、肝細胞は生体内で多種の細胞と相互作用しつつ分化するので複雑な過程を経ることが推察されるため、培養細胞では多種の細胞との相互作用を再現することは不可能である。

30

【0009】

また、マウスES細胞では胚様体を形成しブドウ糖、アルギニンを欠失した培地で培養するのみで肝細胞への分化誘導が可能であった(非特許文献5)。しかし、ヒト*iPS*細胞では胚様体を形成し、マウスES細胞では内胚葉への分化を誘導するアクチビンを添加したところ、驚くべきことに未分化能は維持される(非特許文献1)。したがって、マウスES細胞から肝細胞を調製する方法は、ヒト*iPS*細胞から肝細胞を製造しようとする試みには、全く無効である。

【0010】

さらに、培養ディッシュで*iPS*細胞をオンコスタチンMおよびレチノイン酸の存在下で培養して肝細胞への分化を誘導する試みはある(非特許文献6)が、分化誘導の効率は不十分であり、短期間に大量の細胞を分化誘導して得るには、不十分である。なぜなら、肝細胞で発現しているGATA4、HEX、HNF3(FoxA2)の発現がみられないでの、この試みでは、肝細胞への分化誘導は不十分と考えられる。発明者は、そのためシート状に培養した*iPS*細胞を大量に扱うことはできても、肝細胞への分化誘導は不可能と考えている。

40

【0011】

一方、肝前駆細胞(hepatic progenitor cell)と称される細胞は、胎生期にみられる活発に増殖し、肝細胞と胆管上皮に分化する能力を有する細胞とする報告(非特許文献7)と、肝臓が再生する過程で生じる小型で円形の細胞(oval

50

c e l l) (非特許文献 8) があり、増殖能、肝細胞と胆管上皮細胞に分化する能力を有する。肝前駆細胞は成熟した肝細胞よりも増殖能が高く、胆管上皮も形成するので肝臓に移植した場合速やかに既存の肝構築を形成し、肝細胞のみを移植するよりも効果的に失われた肝臓を再現することが可能と期待される (非特許文献 8) 。

【 0 0 1 2 】

最近、ヒト E S 細胞および i P S 細胞に H H E X (以下、「 H E X 」という。) 遺伝子を強制発現させると肝細胞への分化が誘導されるとの報告がされた (非特許文献 9) 。しかしながら、この方法では、 H E X 遺伝子強制発現の 6 日前に継代培養用培地から第 1 の分化培地に換え、さらに 1 日前に第 1 の分化培地から第 2 の分化培地に換える必要がある。分化誘導の指標となる - フェトプロテイン (A F P) の発現は、第 1 の分化培地に移してから 1 5 日目で、アルブミンの発現は 1 8 日目であった。つまり、この報告方法を行っても分化誘導に要する期間は先に述べたマウス E S 細胞から肝細胞を分化誘導させる方法とあまり変わらないこととなる。
10

【 0 0 1 3 】

肝前駆細胞は肝細胞だけでなく、胆管上皮へ分化する能力をも併せ持つので、肝臓に移植した場合、肝細胞と胆管上皮とが形成されることが期待される (非特許文献 10) 。したがって肝細胞のみを移植するよりも効果的に失われた肝臓を再現することが可能と考えられる。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

20

【 0 0 1 4 】

【 非特許文献 1 】 Tomizawa ら、 Exp Therap Med 2 : 4 0 5 (2 0 1 1)

【 非特許文献 2 】 Yamamoto ら、 Hepatology 3 7 : 9 8 3 (2 0 0 3)

【 非特許文献 3 】 Tomizawa ら、 Cell Tissue RES 3 3 3 : 1 7 (2 0 0 8)

【 非特許文献 4 】 Takahashi ら、 Cell 1 3 1 : 8 6 1 (2 0 0 7)

【 非特許文献 5 】 Zhou ら、 J. Cell Biochem. 1 0 9 : 6 0 6 (2 0 1 0)
30

【 非特許文献 6 】 富澤稔ら、肝臓 5 2 (Suppl 2) : A 6 8 0 (2 0 1 1)

【 非特許文献 7 】 Kakinuma ら、 J Hepatol 5 1 : 1 2 7 (2 0 0 9)

【 非特許文献 8 】 Sangani ら、 Cell Tissue Res 3 4 2 : 1 3 1 (2 0 1 0)

【 非特許文献 9 】 Inamura ら、 Molecular Therapy 1 9 : 4 0 0 (2 0 1 1)

【 非特許文献 1 0 】 Tomizawa ら、 Biochem Biophys Res Commun 2 4 9 : 1 (1 9 9 8)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

40

【 0 0 1 5 】

ヒト多能性幹細胞を分化誘導し、大量の肝前駆細胞を短期間で製造する方法を開発する必要が、急務である。しかし、これに応える方法、つまり効率よく大量にヒト肝前駆細胞へヒト i P S 細胞から分化誘導する方法は確立されていない。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

本発明者は、胎児や成人の肝細胞において発現が認められ、ヒト i P S 細胞においては発現が認められない転写因子に係る遺伝子発現を検討し、その遺伝子を決めた。該転写因子遺伝子を組合せてヒト多能性幹細胞へ導入し、さらに、該遺伝子導入幹細胞を増殖、分化させるための増殖促進剤の組合せを検討し、分化用培地中で基質に接着して単層培
50

養することにより、ヒトiPS細胞から肝前駆細胞への分化誘導法を確立し、本発明を完成させた。

【0017】

本発明は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法であって、分化用培地中で基質に接着して単層培養される前記ヒト多能性幹細胞に分化誘導用転写因子の組合せを発現させるステップを含む方法に関する。

【0018】

また、本発明は、前記分化誘導用転写因子がFOXA2と、GATA4と、HEXと、C/EBPとであることを特徴とする前記の方法に関する。

【0019】

さらに本発明は、前記方法に関わり、さらに、前記分化用培地に増殖促進剤の組合せを含むことを特徴とする、前記の方法に関する。

10

【0020】

また、本発明における、前記増殖促進剤の組合せは、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンからなる群から選択される1または2以上の前記増殖促進剤であることを特徴とする前記の方法に関する。

【0021】

さらに本発明は、前記ヒト多能性幹細胞に先に記載された前記分化誘導用遺伝子産物の組合せを発現させるステップにおいて、前記分化誘導用遺伝子産物の組合せは繰り返し前記ヒト多能性幹細胞内で一過性発現をさせられることを特徴とする、前記の方法に関する。

20

【0022】

さらに本発明は、前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞であることを特徴とする、前記のいずれかの方法に関する。

【0023】

また、本発明は、先に記載されたいずれかに記載の方法で得られるヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用細胞組成物に関する。

【0024】

さらにまた、本発明は、ヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法であって、ヒトiPS細胞に転写因子FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBPの各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチンM、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリンとトランスフェリンと亜セレン酸イオンとを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後8日目に、ヒトiPS細胞から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法に関する。

30

【0025】

また、本発明は、ヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）から分化を誘導されて得られるヒト肝前駆細胞であって、ヒトiPS細胞に転写因子FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBPの各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチンM、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリンおよびトランスフェリンを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後8日目に得されることを特徴とするヒト肝前駆細胞に関する。

40

【0026】

さらに本発明は、前記のヒト肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用細胞組成物に関する。

【0027】

また、本発明は、FOXA2と、GATA4と、HEXと、C/EBPとの遺伝子産物の、ヒト多能性幹細胞に発現させるシステムのヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用に関する。

50

【0028】

さらに本発明は、オンコスタチンM、上皮成長因子、レチノイン酸、デキサメタゾン、インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸イオンを含む培養液の、ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用に關わる。

【0029】

具体的には、本発明は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法であって、分化用培地中で基質に接着して単層培養される前記ヒトiPS細胞に分化誘導用転写因子の組合せを発現させるステップを含む方法を提供する。

【0030】

前記方法において、分化誘導用転写因子の組合せがFOXA2と、GATA4と、HE 10 Xと、C/EBP とである場合がある。

【0031】

前記方法において、さらに、分化用培地として、増殖促進剤の組合せを含む培地である場合がある。

【0032】

本発明の前記方法において、前記増殖促進剤はオンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンからなる群より選択される1または2以上の増殖促進剤である場合がある。

【0033】

また、本発明は、ヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法であって、分化用培地中で基質に接着して単層培養される前記ヒト多能性幹細胞に以下に示される分化誘導用遺伝子産物の組合せを発現させるステップを含み、前記分化用培地は、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンとを含み、前記分化誘導用遺伝子産物の組合せは、FOXA2と、GATA4と、HEXと、C/EBP とを含むことを特徴とする、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し肝前駆細胞を得る方法を提供する。 20

【0034】

本発明の前記ヒト多能性幹細胞に前記分化誘導用遺伝子産物の組合せを発現させるステップにおいて、前記分化誘導用遺伝子産物の組合せは繰り返し前記ヒト多能性幹細胞内で一過性発現をさせることを特徴とする場合がある。 30

【0035】

本発明は、前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞または胚性多能性幹細胞の場合がある。

【0036】

本発明は、前記本方法で得られるヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用細胞組成物の場合がある。

【0037】

さらに、本発明は、ヒト人工多能性肝細胞（ヒトイPS細胞）から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法であって、ヒトイPS細胞に転写因子FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBP の各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、さらに増殖促進剤の組合せとして、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンとを含む培地中で分化誘導を行い、トランスフェクション後8日目に、ヒトイPS細胞から分化を誘導しヒト肝前駆細胞を得る方法を提供する。 40

【0038】

また、本発明は、ヒト人工多能性肝細胞（ヒトイPS細胞）から分化を誘導されて得られるヒト肝前駆細胞であって、ヒトイPS細胞に転写因子であるFOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBP の各遺伝子を3日毎にトランスフェクションし、増殖促進剤の組合せとしてオンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンとを含む培地中で分化誘導 50

を行い、トランスフェクション後8日目に得られることを特徴とする、ヒト肝前駆細胞を提供する。

【0039】

本発明は、前記ヒト肝前駆細胞を含むことを特徴とする、肝臓への移植用組成物を提供する。

【0040】

本発明は、FOXA2と、GATA4と、HEXと、C/EBPとの遺伝子産物をヒト多能性幹細胞に発現させるシステムのヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用をも提供する。

【0041】

本発明は、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、インシュリンと、トランスフェリンと、亜セレン酸イオンとを含む培養液のヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞を調製するための使用をも提供する。

【0042】

多能性幹細胞は、所定の培養条件下において長期に自己複製能を有し、所定の分化誘導条件下において多種の細胞への多分化能を有する幹細胞であり、これに限定されない、公知の方法により製造できる(Takahashিら、Cell 131:861(2007))。

【0043】

本発明の多能性幹細胞から肝前駆細胞への分化誘導において、胎児または成人肝の細胞において遺伝子の発現が認められ、多能性幹細胞においては発現が認められない転写因子の遺伝子を多能性幹細胞へ導入するステップが含まれる。

【0044】

本発明において、転写因子とはDNAに特異的に結合するタンパク質の一群をいう。DNA上のプロモーターやエンハンサーと呼ばれる転写を制御する領域に結合し、DNAの遺伝情報をRNAに転写する過程を促進、あるいは逆に抑制する。転写因子はこの機能を単独で、または他のタンパク質と複合体を形成することによって発揮する。

【0045】

前記胎児または成人肝の細胞において遺伝子が発現し、多能性幹細胞においては発現していない転写因子として、FOXA2、GATA4、HEXおよびC/EBPが含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

本明細書において、FOXA2とはヒトORKHEADボックスA2遺伝子をいう。FOXA2タンパク質のアミノ酸配列は配列番号27に示される。

【0047】

本発明において、FOXA2タンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号27に示されるアミノ酸配列に1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換または挿入を含んでもかまわない。あるいは、前記FOXA2タンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号27に示されるアミノ酸配列との同一性が、80%またはこれ以上か、90%またはこれ以上か、95%またはこれ以上かであってもかまわない。前記FOXA2のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号27に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に1個ないし数個のヌクレオチドの欠失、置換または挿入を含むヌクレオチド配列でもかまわない。前記FOXA2のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号27に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とストリンジメントな条件でハイブリダイゼーションできるヌクレオチド配列でもかまわない。

【0048】

10

20

30

40

50

本明細書において、GATA4とはヒトGATA結合タンパク4遺伝子をいう。GATA4タンパク質のアミノ酸配列は配列番号28に示される。

【0049】

本発明において、GATA4タンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号28に示されるアミノ酸配列に1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換または挿入を含んでもかまわない。あるいは、前記GATA4タンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号28に示されるアミノ酸配列との同一性が、80%またはこれ以上か、90%またはこれ以上か、95%またはこれ以上かであってもかまわない。前記GATA4のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号28に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に1個ないし数個のヌクレオチドの欠失、置換または挿入を含むヌクレオチド配列でもかまわない。前記GATA4のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号28に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションできるヌクレオチド配列でもかまわない。10

【0050】

本明細書において、HEXとは、HHEXすなわちヒト造血系で発現するホメオボックス(HEMATOPOIETICALLY EXPRESSED HOMEobox)遺伝子をいう。HEXタンパク質のアミノ酸配列は配列番号29に示される。20

【0051】

本発明において、HEXタンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号29に示されるアミノ酸配列に1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換または挿入を含んでもかまわない。あるいは、前記HEXタンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号29に示されるアミノ酸配列との同一性が、80%またはこれ以上か、90%またはこれ以上か、95%またはこれ以上かであってもかまわない。前記HEXのポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号29に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に1個ないし数個のヌクレオチドの欠失、置換または挿入を含むヌクレオチド配列でもかまわない。前記HEXのポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号29に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションできるヌクレオチド配列でもかまわない。30

【0052】

本明細書において、CEBPAとはヒトCCATTエンハンサー結合タンパク質アルファ遺伝子をいう。CEBPAタンパク質のアミノ酸配列は配列番号30に示される。

【0053】

本発明において、CEBPAタンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号30に示されるアミノ酸配列に1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換または挿入を含んでもかまわない。あるいは、前記CEBPAタンパク質は、未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号30に示されるアミノ酸配列との同一性が、80%またはこれ以上か、90%またはこれ以上か、95%またはこれ以上かであってもかまわない。前記CEBPAのポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号30に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に1個ないし数個のヌクレオチドの欠失、置換または挿入を含むヌクレオチド配列でもかまわない。4050

前記 C E B P A のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドにエンコードされるタンパク質が未分化のヒト多能性幹細胞から分化を誘導し、肝前駆細胞を得られることを条件として、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とストリンジエントな条件でハイブリダイゼーションできるヌクレオチド配列でもかまわない。

【 0 0 5 4 】

本発明において、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の相同性は、当業者に周知の配列整列プログラム CLUSTAL W を使用することにより算出することができる。

【 0 0 5 5 】

本明細書において、「ストリンジエントな条件」とは、Sambrook, J. および Russell, D.W., Molecular Cloning A Laboratory Manual 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) に説明されるサザンプロット法で以下の実験条件で行うことを指す。比較対象のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをアガロース電気泳動によりバンドを形成させた上で毛管現象または電気泳動によりニトロセルロースフィルターその他の固相に不動化する。6 × SSC および 0.2% SDS からなる溶液で前洗浄する。本発明のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを放射性同位元素その他の標識物質で標識したプローブと前記固相に不動化された比較対象のポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション反応を 6 × SSC および 0.2% SDS からなる溶液中で 65 °C で、終夜行う。その後前記固相を 1 × SSC および 0.1% SDS からなる溶液中で 65 °C で、各 30 分間ずつ 2 回洗浄し、0.2 × SSC および 0.1% SDS からなる溶液中で 65 °C で、各 30 分間ずつ 2 回洗浄する。最後に前記固相に残存するプローブの量を前記標識物質の定量により決定する。本明細書において「ストリンジエントな条件」でハイブリダイゼーションをするとは、比較対象のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを不動化した固相に残存するプローブの量が、本発明のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを不動化した陽性対照実験の固相に残存するプローブの量の少なくとも 25%、好ましくは少なくとも 50%、より好ましくは少なくとも 75% 以上であることを指す。
10
20

【 0 0 5 6 】

本明細書において、FOXA2 と、GATA4 と、HEX と、CEBPA との遺伝子産物をヒト多能性幹細胞に発現させるシステムとは、前記遺伝子産物をヒト多能性幹細胞に発現させるいざれかのシステムをいう。前記システムには、前記遺伝子産物をヒト多能性幹細胞に発現させる発現ベクターであってもかまわない。前記発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、その他の周知のベクターであってもかまわない。前記発現ベクターには、未分化ヒト多能性幹細胞から肝前駆細胞に至る細胞系譜の細胞タイプで前記遺伝子産物を発現させる遺伝子発現制御配列、すなわち、プロモーターおよび / またはエンハンサーが含まれることが好ましい。前記システムにはかかる発現ベクターをヒト多能性幹細胞にトランسفエクションするための試薬、例えばリポフェクションのための試薬またはエレクトロポレーション用の装置が含まれる場合がある。あるいは、ヒト多能性幹細胞の細胞内に取り込まれて細胞内で機能できるタンパク質、例えば細胞膜透過ペプチドと連結した融合タンパク質、が前記システムに含まれてもかまわない。かかるタンパク質は培地に添加するだけでヒト多能性幹細胞の細胞内に取り込まれるため、分化した肝前駆細胞に恒久的に残存する点で、発現ベクターより好ましい。
30
40

【 0 0 5 7 】

本明細書において、細胞膜透過ペプチドとは、他のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質との融合タンパク質を細胞外に添加すると、細胞膜を透過して前記融合タンパク質を細胞内に移行させることができるペプチドをいい、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の Tat タンパク質 RNA 結合領域 (48 - 60 位) 由来のアルギニンに富む塩基性ペプチド (TAT ペプチド)、アルギニン残基が 6 ないし 12 個連続したオリゴホモペプチド、ショウジョウバエ由来の転写因子 Antennapedia タンパク質の DNA 結合領域由来の塩基性両親媒性ヘリックス構造を有するペプチド (penetrat
50

i n) が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

本発明において、前記胎児または成人肝の細胞においては発現し多能性幹細胞においては発現しない転写因子の遺伝子の多能性幹細胞への導入は、公知の方法で発現ベクターを調製し、リポフェクション法または電気穿孔法等の当該技術分野において公知の方法により多能性幹細胞へトランスフェクション可能である。

【 0 0 5 9 】

本発明において、哺乳動物体内における特定の細胞の増殖や分化を促進する内因性タンパク質を増殖因子と呼び、なお限定されないが、オンコスタチンMと上皮成長因子、および、細胞増殖促進作用を有する増殖因子補助剤としてデキサメタゾンや、インシュリンとトランスフェリンと亜セレン酸イオンとを含み、これら増殖因子と増殖因子補助剤とを総称して増殖促進剤という。本発明においては、前期増殖促進剤含む培地内で培養することによりヒト多能性幹細胞を肝前駆細胞へ分化誘導できた。

【 0 0 6 0 】

マウスES細胞では胚様体を形成すると胎生期の内胚葉に類似の構造が形成される (Abeら、Exp Cell Res 229:27 (1996))。しかし、三次元の環境で各細胞が互いに影響しあうため様々な細胞に分化してしまい、目的の細胞以外の細胞が混在するという問題がある。そこで、本発明においては、ヒト多能性幹細胞から肝前駆細胞への分化誘導は細胞の胚様体形成を行わない若しくは回避し、基質に接着した単層形成により分化誘導を行った。

10
20
20

【 0 0 6 1 】

基質に接着して単層培養する方が、より簡便な操作で大量の細胞を同一の環境で扱うことができる。また、実験系が二次元的で単純なため増殖促進剤添加や転写因子遺伝子導入などを簡単に行なうことが可能となり、目的の細胞を大量に、他の細胞の混在がより少ない状態で得ることが可能となった。

【 0 0 6 2 】

また、他の分化誘導法が全て多工程を必要とするのに対して本発明の方法は単工程であり、本発明の方法におけるiPS細胞からの誘導方法への単工程の適用は新規である。

【 0 0 6 3 】

多能性幹細胞から肝前駆細胞への分化誘導の確認は、分化誘導細胞での、未分化な肝細胞のマーカーである フェトプロテイン (AFP) の產生亢進、幹細胞や前駆細胞など未熟な細胞の増殖・分化を制御し肝細胞への分化を示唆する Delta like - 1 (DLK - 1) の発現亢進、および / または、胆管上皮のマーカーである - GTP の発現の亢進、並びに、肝細胞としての薬物代謝の反映するインドシアニングリーン (ICG) の取り込みを指標として行なうことができる (Tomizawaら、Biochem Biophys Res Commun 249:1 (1998)、Inamuraら、Molecular Therapy 19:400 (2011))。しかし、これらに限定されない。

30

【 0 0 6 4 】

DLK - 1 は胎児肝の肝細胞に発現がみられ、成人肝では発現が消失し (Tanimizuら、J Cell Sci., 116:1775 - 1786, 2003)、肝前駆細胞のマーカーとして用いられる (Tanimizuら、Gene Expr. Patterns 5:209 - 218, 2004)。

40

【 0 0 6 5 】

iPS細胞における未分化能の最も正確な指標として、細胞の形態、アルカリホスファターゼ染色陽性、およびNANOGの発現保持が含まれる。NANOGの発現低下を測定することにより細胞の分化を評価できる。NANOGの発現はPCR等の公知の方法で測定し、評価することができる。これらに限定されない。

【 0 0 6 6 】

前記、分化誘導された肝前駆細胞、および分化誘導のマーカーであるNANOGは、細

50

胞内の対象タンパク質のmRNAを逆転写後、ポリメラーゼ連鎖反応(RT - PCR)、またはリアルタイム - ポリメラーゼ連鎖反応などの公知の方法によって測定するか、さらに、被験タンパク質に対する抗体を用いるELISA法や免疫染色法によっても確認できる。これらの方法に限定されない。

【 0 0 6 7 】

本発明の肝前駆細胞は成熟した肝細胞よりも増殖能が高く、胆管上皮も形成するので肝臓に移植した場合、速やかに既存の肝構築を形成すると考えられている。本発明の多能性幹細胞から分化誘導された肝前駆細胞は、肝不全症の患者へ投与または移植できる。

【 0 0 6 8 】

肝不全症としては、急性肝炎、慢性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、または肝臓がんなどが含まれるが、これらに限定されない。特に、劇症肝炎は入院時より重症感があり、1 - 2週間程度で肝不全に至り、多臓器不全を発症すると救命が極めて困難であり、可及的速やかな移植等の治療を必要とする。現在、生体肝移植が一部の医療機関で実施されている。この場合、一般的にドナーは家族である。ドナーへの大きな侵襲を伴う等の問題があり、細胞治療、人工臓器等の開発が必要である。

【 0 0 6 9 】

本発明の医薬組成物は、本発明の肝前駆細胞に加えて、薬学的に許容可能な医薬品添加物を含んでいてもよい。前記医薬品添加物は、等張化剤、緩衝剤、pH調整剤、安定化剤、キレート剤、防腐剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 0 】

等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等が例示できる。緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、およびそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等が例示できる。pH調整剤は、塩酸、硫酸、リン酸、ポリリン酸、ホウ酸、またはホウ砂などの無機酸類；酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、グルコン酸、フマル酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸などの有機酸類；水酸化カリウム、または水酸化ナトリウムなどの無機塩基；モノエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン、またはトリイソプロパノールアミンなどの有機塩基；酢酸アンモニウム、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、乳酸カルシウムなどが例示できる。安定化剤は、ヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等が例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組み合せて使用できる。上記L-アミノ酸は、グリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよいが、これらに限定されない。糖類は、グルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスター、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等、およびそれらの誘導体等のいずれでもよく、これらに限定されるものではない。セルロース誘導体は、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよいが、これらに限定されない。キレート剤は、エデト酸ナトリウム、クエン酸等が例示できる。

【 0 0 7 1 】

前記等張化剤、pH調整剤、緩衝剤、溶解剤、安定化剤、防腐剤などの医薬品添加物は、上記例示された医薬品添加物以外の公知の化合物を、公知の用法および用量（例えば、医薬品添加物辞典2007（日本医薬品添加剤協会編、薬事日報社、東京、2007）に記載）で使用できるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 2 】

また、本発明における多能性幹細胞から分化誘導された肝前駆細胞は、ヒトの体外で培養、維持されることにより人工肝臓としても使用できる。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0073】

本発明により、ヒト多能性幹細胞より胚様体を形成せず基質に接着して単層培養することにより培養皿で8日間で、肝前駆細胞へ分化誘導が可能となり、肝前駆細胞を短期間で大量培養が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1は、胎児肝および成人肝で発現を認め、iPS細胞で発現を認めない転写因子を調べるため、各転写因子mRNAをPCR法で増幅後、電気泳動法で検討した結果を表す。各レーンは、1：水、2：iPS細胞、3：胎児肝、4：成人肝を示す。

10

【図2】図2は、各種増殖促進剤を添加した培地で、iPS細胞を培養した場合のiPS細胞の転写因子の発現に及ぼす影響をPCR法および電気泳動法で検討した結果を表す。転写因子としてSOX-17、GATA6、FOXA2、GATA4、HEX、TTR、C/EBPの発現を検討、評価した。各レーンの増殖促進剤は、レーン1：水（ブランク）、2：ReprotoFF培地、3：iPSm（-）培地、4：bFGF、5：BMP4、6：オンコスタチンM、7：EGF、8：NGF、9：TGF-1、10：レチノイン酸、11：HGFを示す。

【図3-1】図3-1は、増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を表す。肝前駆細胞の指標タンパク質であるフェトプロテインのmRNAの発現亢進に及ぼす増殖促進剤との組合せの影響を解析した。内部標準としてRPL19を合わせて測定し、フェトプロテイン/RPL19の比を求めた。各レーンの増殖促進剤は、それぞれ、1：ReprotoFF培地、2：オンコスタチンM、3：上皮成長因子、4：レチノイン酸、5：デキサメタゾン、6：ITS、7：オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸とを共添加した試料、8：オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸とデキサメタゾンとITSとを共添加した試料を示す。

20

【図3-2】図3-2は、増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を表す。肝前駆細胞の指標タンパク質であるDLK-1のmRNAの発現亢進に及ぼす増殖促進剤との組合せの影響を解析した。内部標準としてRPL19を合わせて測定し、DLK-1/RPL19の比を求めた。各レーンの増殖促進剤は、それぞれ、1：ReprotoFF培地、2：オンコスタチンM、3：上皮成長因子、4：レチノイン酸、5：デキサメタゾン、6：ITS、7：オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸とを共添加した試料、8：オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸とデキサメタゾンとITSとを共添加した試料を示す。

30

【図4-1】図4-1は、AFPの発現量をRPL19の発現量に対する比を求め、転写因子FOXA2、GATA4、HEX、C/EBPをトランスフェクションしたiPS細胞に対して各種の増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を示す。横軸の各実験群の数値は、1：ReprotoFF培地、2：GHA、3：FHA、4：FGA、5：FGH、6：FGHA、7：胎児肝を表し、FはFOXA2、GはGATA4、HはHEX、AはC/EBPを示す。

【図4-2】図4-2は、DLK-1の発現量をRPL19の発現量に対する比を求め、転写因子FOXA2、GATA4、HEX、C/EBPをトランスフェクションしたiPS細胞に対して各種の増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を示す。横軸の各実験群の数値は、1：ReprotoFF培地、2：GHA、3：FHA、4：FGA、5：FGH、6：FGHA、7：胎児肝を表し、FはFOXA2、GはGATA4、HはHEX、AはC/EBPを示す。

40

【図4-3】図4-3は、G-GTPの発現量をRPL19の発現量に対する比を求め、転写因子FOXA2、GATA4、HEX、C/EBPをトランスフェクションしたiPS細胞に対して各種の増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を示す。横軸の各実験群の数値は、1：ReprotoFF培地、2：GHA、3：FHA、4：FGA、5：FGH、6：FGHA、7：胎児肝を表し、FはFOXA2、GはGATA4、HはHEX、AはC/EBPを示す。

50

T A 4、HはH E X、AはC / E B P を示す。

【図4-4】図4-4は、NANO Gの発現量をR P L 1 9の発現量に対する比を求め、転写因子F O X A 2、G A T A 4、H E X、C / E B P をトランスフェクションしたi P S細胞に対して各種の増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析結果を示す。横軸の各実験群の数値は、1：ReprotoFF培地、2：G H A、3：F H A、4：F G A、5：F G H、6：F G H A、7：胎児肝を表し、Fは、F O X A 2、GはG A T A 4、HはH E X、AはC / E B P を示す。

【図5-1】図5-1は、本発明により人工多能性幹細胞より肝前駆細胞へ分化誘導された細胞のインドシアニングリーン（I C G）の取り込みを検討した顕微鏡写真を示す。図5-1は、本発明の方法によって未分化のヒトi P S細胞から分化が誘導された肝前駆細胞の培養の位相差顕微鏡写真からの作図である。図5-1の写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは25μmを表す。
10

【図5-2】図5-2は、本発明により人工多能性幹細胞より肝前駆細胞へ分化誘導された細胞のインドシアニングリーンの取り込みを検討した顕微鏡写真を示す。図5-2は、本発明の方法によって未分化のヒトi P S細胞から分化誘導された肝前駆細胞にインドシアニングリーンが添加された培養の位相差顕微鏡写真からの作図である。図5-2の写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは25μmを表す。

【図5-3】図5-3は、本発明により人工多能性幹細胞より肝前駆細胞へ分化誘導された細胞のインドシアニングリーンの取り込みを検討した顕微鏡写真を示す。図5-3は、図5-1の原図（カラー）でインドシアニンの蛍光色である緑色部分を白色として変換強調された写真からの作図である。矢印は原図で緑色の部分を指し示す。図5-3の写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは25μmを表す。
20

【図5-4】図5-4は、本発明により人工多能性幹細胞より肝前駆細胞へ分化誘導された細胞のインドシアニングリーン（I C G）の取り込みを検討した顕微鏡写真を示す。図5-4は、図5-2の原図（カラー）でインドシアニンの蛍光色である緑色の部分を白色に変換強調された写真からの作図である。矢印は原図で緑色の部分を指し示す。図5-4の写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは25μmを表す。

【発明を実施するための形態】

【0075】

以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除および置換を行うことができる。
30

【実施例1】

【0076】

胎児および成人肝細胞で発現し、i P S細胞で未発現の転写因子の検索

1.1 実験材料および方法

3 μgのRNAより逆転写酵素（ライフテクノロジージャパン株式会社）を用いてi P S細胞、胎児肝細胞、および成人肝細胞のcDNAを合成した。cDNAを用いて、それぞれ、G A T A 4、F O X A 2、H E X、C / E B P 、C / E B P に対する下記プライマーを用い、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R；polymerase chain reaction）を行い、2%低融点アガロース（Lonza社）、1×TAEにて電気泳動を行うことにより、i P S細胞、胎児肝細胞、および成人肝細胞におけるG A T A 4、F O X A 2、H E X、C / E B P 、およびC / E B P の発現を検討した
40

電気泳動後2%低融点アガロースをUVトランスイルミネーター（U V P社、N L M S - 2 0 E）より254nmの紫外線を照射してゲルカメラ（フナコシD S - 3 0 0）を用いてポラロイド写真（富士フィルム株式会社、F P - 3 0 0 0 B）を撮影して電気泳動パターンを解析した。

【0077】

P C Rサイクルは、熱変性：94°C、1分、アニーリング1分、伸長反応：72°C
50

で1分、30サイクルで実施した。

【0078】

GATA4のプライマー塩基配列：

フォワード；5' - G A A A A C G G A A G C C C A A G A A C C - 3' (配列番号1)

リバース；5' - A G A C A T C G C A C T G A C T G A G A A C G - 3' (配列番号2)
)

アニーリング温度は、55.9°Cで実施した。

【0079】

FOXA2のプライマー塩基配列：

フォワード；5' - C C A C C A C C A A C C C C A C A A A A T G - 3' (配列番号3 10)
)

リバース；5' - T G C A A C A C C G T C T C C C C A A A G T - 3' (配列番号4)

アニーリング温度は、60°Cで実施した。

【0080】

HEXのプライマー塩基配列：

フォワード；5' - T T C T C C A A C G A C C A G A C C A T C G - 3' (配列番号5)
)

リバース；5' - T T T T A T C G C C C T C A A T G T C C A C - 3' (配列番号6)

アニーリング温度は、56.2°Cで実施した。

【0081】

C/EBP のプライマー塩基配列：

フォワード；5' - T G G A G A C G C A G C A G A A G G T G - 3' (配列番号7)

リバース；5' - T C G G G A A G G A G G C A G G A A A C - 3' (配列番号8)

アニーリング温度は、69.1°Cで実施した。

【0082】

C/EBP のプライマー塩基配列：

フォワード；5' - C C A A G A A G A C C G T G G A C A A G C - 3' (配列番号9)

リバース；5' - A A G T T C C G C A G G G T G C T G A G - 3' (配列番号10)

アニーリング温度は、59.5°Cで実施した。

【0083】

1.2 実験結果

電気泳動の結果を図1に示した。各レーンは、レーン1：水、2：iPS細胞、3：胎児肝、4：成人肝を表す。

【実施例2】

【0085】

増殖促進剤のみによっては非発現の転写因子の検討

2.1 実験材料および方法

ヒトiPS細胞(201B7、理研細胞バンク)をマトリゲルコーティングした6孔プレートに播種し、フィーダー細胞を用いることなく幹細胞の未分化維持培養のためのフィーダーレス培地ReproFF(商標、株式会社リプロセル)を培地とし37°C、5%炭酸ガスの定法の条件下培養した。

【0086】

D-MEM/F12培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 medium、シグマアルドリッヂ・ジャパン株式会社)に20%のノックアウト血清代替物(ライフテクノロジージャパン株式会社)、10%Minimum Essential Amino Acids(ライフテクノロジージャパン株

20

30

40

50

式会社)、2 mMのL-グルタミン(ライフテクノロジージャパン株式会社)、および、1 mMの2-メルカプトエタノールを添加した培地をiPSm(-)培地とした。

【0087】

iPSm(-)培地に、下記の増殖促進剤を添加し、SOX-17、GATA6、FOXA2、GATA4、HEX、TTR、およびC/EBPの発現を実験1と同様の方法で行った。

【0088】

添加した増殖促進剤は、bFGF(塩基性線維芽細胞成長因子、和光純薬工業株式会社)、BMP(bone morphogenetic protein)-4(和光純薬工業株式会社)、オンコスタチンM(和光純薬工業株式会社)、上皮成長因子(EGF)、和光純薬工業株式会社)、神経成長因子(NGF、R&D SYSTEMS社)、TGF-(transform growth factor-、R&D SYSTEMS社)、レチノイン酸(シグマアルドリッヂジャパン株式会社)、肝細胞成長因子(HGF、シグマアルドリッヂジャパン株式会社)を使用した。

【0089】

なお、SOX-17、GATA6、およびTTRに対するRT-PCRは下記の条件で実施した。

【0090】

SOX-17のプライマー塩基配列：

フォワード；5'-CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACG-3'(配列番号11)

リバース；5'-TAGTTGGGGTGGTCCTGCATG TGCTG-3'(配列番号12)

アニーリング温度は、63°Cで実施した。

【0091】

GATA6のプライマー塩基配列：

フォワード；5'-TTCATCACGGCGGCTTGGATTGTC-3'(配列番号13)

リバース；5'-GTGTTGTGGGGAGTATTGGC-3'(配列番号14)

アニーリング温度は、55.9°Cで実施した。

【0092】

TTRのプライマー塩基配列：

フォワード；5'-GGTGAAATCCAAGTGTCCCTCTGAT-3'(配列番号15)

リバース；5'-GTGACGACAGCCGTTGGTGGAA-3'(配列番号16)

アニーリング温度は、61°Cで実施した。

【0093】

2.2 実験結果

電気泳動の結果を図2に示した。各レーンは、レーン1：水、2：ReprotoFF、3:iPSm(-)、4:bFGF、5:BMP-4、6:オンコスタチンM、7:EGF、8:NGF、9:TGF-1、10:レチノイン酸、11:HGFを表す。

【0094】

SOX-17はオンコスタチンM、GATA6はEGF、TGF-、レチノイン酸によってそれぞれ発現が認められた。C/EBPはオンコスタチンMでわずかに発現がみられた。しかし、これらの増殖促進剤によって、FOXA2、GATA4、HEX、およびC/EBPの発現は認められなかった。

【実施例3】

【0095】

10

20

30

40

50

増殖促進剤の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析

実施例2の結果に基づき、増殖促進剤の添加で発現が認められない転写因子FOXA2、GATA4、HEX、およびC/EBPについて、各発現ベクターをヒト人工多能性幹細胞へ導入して肝前駆細胞への分化誘導を試みた。

【0096】

3.1 実験材料および方法

ヒトiPS細胞(201B7、理研細胞バンク)をマトリゲルコーティングした6孔プレートに播種し、ReprotoFFを培地として37°C、5%炭酸ガスの条件下、定法により培養した。リポフェクション用試薬Lipofectamine LTX(登録商標、ライフテクノロジージャパン株式会社)を用いてFOXA2、GATA4、HEX、およびC/EBPの発現プラスミドを各0.5μgづつトランスクレクションした。
10

【0097】

転写因子の発現ベクターは、ヒトFOXA2、GATA4、HEX、およびCEBPAの完全長cDNAがそれぞれサイトメガロウイルス由来の強力なプロモーターの下流に組み込まれた発現ベクター(ヒトTrueClone、Origene Technologies, Inc.、コスモ・バイオ株式会社)が用いられた。ヒトFOXA2発現ベクター(カタログ番号sc122913)はヒトFoxA2タンパク質をコード化する完全長cDNAがpCMV6-XL5のEcoR1およびSal1切断部位の間に挿入された。ヒトGATA4発現ベクター(カタログ番号sc124037)はヒトGATA4タンパク質をコード化する完全長cDNAがpCMV6-XL4のEcoR1およびSal1切断部位の間に挿入された。ヒトHEX発現ベクター(カタログ番号sc321626)はヒトHHEXタンパク質をコード化する完全長cDNAがpCMV6-ACのSgf1およびMlu1切断部位の間に挿入された。ヒトCEBPA発現ベクター(カタログ番号sc303472)はヒトCEBPAタンパク質をコード化する完全長cDNAがpCMV6-XL5のEcoR1およびSal1切断部位の間に挿入された。
20

【0098】

トランスクレクション直前に前記iPSm(-)培地にオンコスタチンM(和光純薬工業株式会社)、EGF(和光純薬工業株式会社)、レチノイン酸(和光純薬工業株式会社)を添加した培地に変更した。ここでiPSm(-)培地とは京都大学CiRAが推奨するヒトiPS細胞のフィーダー細胞用の培地から塩基性線維芽細胞成長因子を除いたものである。具体的には、20%ノックアウト血清代替物(KSR、ライフテクノロジージャパン株式会社)、10%Minimum Essential Amino Acids(ライフテクノロジージャパン株式会社)、2 mM L-グルタミン(ライフテクノロジージャパン株式会社)および0.1 mM 2-メルカプトエタノール(シグマアルドリッヂジャパン株式会社)を添加したD-MEM/F12培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 medium、シグマアルドリッヂジャパン株式会社)を使用した。
30

【0099】

転写因子は3日ごとにトランスクレクションを3回繰り返し8日目にIsogen(株式会社ニッポンジーン)を用いてRNAを抽出した。このRNAよりスーパースクリプトIIIファーストストランドシステム(ライフテクノロジージャパン株式会社)を用いてcDNAを合成した。cDNAを20倍希釈し、リアルタイムPCR解析試薬Fast SYBR Green Master Mix(登録商標、ライフテクノロジージャパン株式会社)を用いてリアルタイム定量PCR法にて肝前駆細胞の指標であるフェトプロテイン(AFP)の発現量を解析した。なお、解析にはリアルタイムPCR検出装置MiniOpticon(Bio-Rad)を用いた。肝前駆細胞の指標としてフェトプロテイン(AFP)、Delta-like(DLK)-1の発現量をリボゾーム関連タンパク質(RLP19)を内部標準として定量した(各群n=3)。
40

【0100】

リアルタイム定量PCRは、下記のプライマーを用い、PCRサイクルは95°Cで5
50

秒、60°Cで20秒、30サイクルで実施した。

【0101】

A F P のプライマーの塩基配列：(147 bp)

フォワード；5' - A C A C A A A A G C C C A C T C C A G - 3' (配列番号17)

リバース；5' - G G T G C A T A C A G G A A G G G A T G - 3' (配列番号18)

D L K - 1 のプライマー塩基配列：(121 bp)

フォワード；5' - G G A T G A G T G C G T C A T A G C A A - 3' (配列番号19)

リバース；5' - C C T C C T C T T C A G C A G C A T T C - 3' (配列番号20)

R L P 19 のプライマー塩基配列：(157 bp)

フォワード；5' - C G A A T G C C A G A G A A G G T C A C - 3' (配列番号21) 10

リバース；5' - C C A T G A G A A T C C G C T T G T T T - 3' (配列番号22)

3.2 実験結果

各増殖促進剤の添加による フェトプロテインの発現の亢進を検討した結果を図3-1及び図3-2に示した。図3-1及び図3-2の棒グラフの横軸の数値は、以下の増殖促進剤を培地に添加した場合を表す。誤差棒は、標準誤差を表す。1:R e p r o F F、2:オンコスタチンM、3:上皮成長因子、4:レチノイン酸、5:デキサメタゾン、6:ITS、7:オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸との共添加、8:オンコスタチンMと上皮成長因子とレチノイン酸とデキサメタゾンと(インシュリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸イオン、以下ITSと記載)との共添加群を表す。

【0102】

20

図3-1に示すとおり、フェトプロテインの発現は、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、ITSとを共添加した培地で培養した群で最も亢進し、次に、オンコスタチンM添加群であった。

【0103】

図3-2に示すとおり、一方、D L K - 1 に対しては、オンコスタチンM添加群が最も発現亢進し、次に、オコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、ITSとを共添加した群の順序であった。

【0104】

図3-1に示した各レーンの数値は、レーン 1 : 100 ± 11 , 2 : 172 ± 11 , 3 : 139 ± 13 , 4 : 133 ± 58 , 5 : 50 . 1 ± 5 , 6 : 49 ± 7 , 7 : 125 ± 13 , 8 : 359 ± 26 である。また図3-2に示した各レーンの数値は、レーン 1 : 100 ± 25 , 2 : 623 ± 86 , 3 : 59 ± 7 , 4 : 79 ± 40 , 5 : 208 ± 54 , 6 : 106 ± 19 , 7 : 346 ± 31 , 8 : 449 ± 66 である。

30

【0105】

以上の結果より、オンコスタチンMと、上皮成長因子と、レチノイン酸と、デキサメタゾンと、ITSとを共添加した群が フェトプロテインおよびD L K - 1 の両方の発現の亢進に対して最も効果的であることが示された。

【実施例4】

40

【0106】

転写因子の組合せによる肝前駆細胞への分化誘導の解析

4.1 実験材料および方法

転写因子FOXA2(以下Fと記載)、GATA4(以下Gと記載)、HEX(以下Hと記載)、およびC/EBP(以下Aと記載)を3日毎に3回、Lipofectamine LTXを用いてトランスフェクションした。増殖促進剤は、EGFと、レチノイン酸と、オンコスタチンMと、デキサメタゾンと、ITSとを添加した。8日目に実施例3と同様の方法で、リアルタイム定量RT-PCRを行った。

【0107】

A F P 、 D L K - 1 は肝前駆細胞の指標、G-GTPは胆管上皮細胞への分化能の指標

50

として、NANOGを未分化能の指標として解析した。

【0108】

リアルタイム定量RT-PCRは、下記の条件で実施した。PCRサイクル：95°Cで5秒、60°Cで20秒、30サイクルで実施した。

【0109】

G-GTPのプライマー塩基配列：

フォワード；5'-CCTCATCCCTCAACATCCTCAAAGG-3'（配列番号23）

リバース；5'-CACCTCAGTCACATCCACAAACTTG-3'（配列番号24）

10

NANOGのプライマー塩基配列：

フォワード；5'-CCGTTTTGGCTCTGTTTG-3'（配列番号25）

リバース；5'-TCATCGAAACACTCGG TGAA-3'（配列番号26）

4.2 実験結果

結果を図4-1、図4-2、図4-3及び図4-4に示した。各レーンは、レーン1：ReproFF、2：GHC(GATA4とHEXとC/EBP)の組合せ、3：FHA(FOXA2とHEXとC/EBP)の組合せ、4：FGA(FOXA2とGATA4とC/EBP)の組合せ、5：FGH(FOXA2とGATA4とHEX)の組合せ、6：FGHA(FOXA2とGATA4とHEXとC/EBP)の組合せ、7：胎児肝を表す。

20

【0110】

FOXA2、GATA4、HEX、およびC/EBPの4種の発現ベクターを同時にトランスフェクションした実験群は、AFP（図4-1）、DLK-1（図4-2）、およびG-GTP（図4-3）を発現し、NANOG（図4-4）の発現が低下した。特に、FOXA2とGATA4とHEXとC/EBPとの4種の発現ベクターをトランスフェクションしたレーンは、このうちの3種の発現ベクターをトランスフェクションするよりもG-GTPの発現がもっとも強いとの結果を得た。

【0111】

30

本結果より、FOXA2とGATA4とHEXとC/EBPの転写因子の組合せ、およびEGFと、レチノイン酸と、オンコスタチンMと、デキサメタゾンと、ITSとの増殖促進剤の組合せはiPS細胞から肝前駆細胞へ最も効率よく分化誘導することが明らかになった。

【0112】

図4-1に示した各レーンの数値は、レーン1：100±18，2：75±93，3：98±13，4：359±29，5：544±20，6：378±45，7：629±54である。図4-2に示した各レーンの数値は、レーン1：100±17，2：339±48，3：226±14，4：153±10，5：39±3，6：215±41，7：175±22である。図4-3に示した各レーンの数値は、レーン1：100±15，2：20±3，3：31±6，4：47±6，5：75±7，6：83±4，7：408±36である。図4-4に示した各レーンの数値は、レーン1：100±14，2：0.55±0.3，3：1.16±0.4，4：1.0±0.2，5：1.2±0.4，6：0.45±0.05，7：0.17±0.05である。

40

【実施例5】

【0113】

肝前駆細胞へ分化誘導された細胞のインドシアニングリーン(ICG)の取り込み機能の解析

50

5.1 実験材料および方法

実施例3および4の結果に基づき、同様の方法で、人工多能性幹細胞に対してFOXA2、GATA4、HEX、C/EBP α を3日毎に3回、Lipofectamine LTXを用いてトランスフェクションを繰り返し、増殖促進剤としてEGFと、レチノイン酸と、オヌコスタチンMと、デキサメタゾンと、ITSとを添加した培地で培養した。成人では肝細胞のみが能動的に取り込むICGを実施例3に基づいて分化誘導8日目に、培地にICG(参天製薬株式会社)を1mg/mLの濃度で添加した。添加15分後に光学顕微鏡CKX41N-31PHP(オリンパス株式会社)にて、ICGの細胞への取り込みを観察した。

【0114】

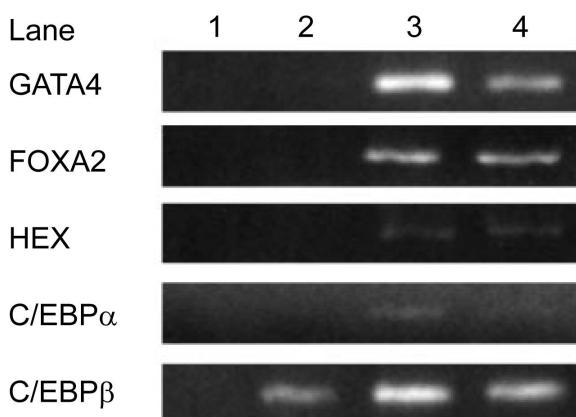
10

5.2 実験結果

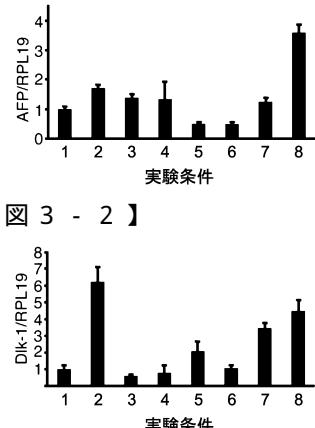
図5-1及び図5-2は、前記5種類の分化誘導剤の存在下で前記4種類の転写因子が3回リポフェクションされた第8日の201B7細胞の200倍の位相差顕微鏡写真である。スケールバーは25μmを表す。図5-1はインドシアニングリーン処理が施されない細胞の写真で、図5-2はインドシアニングリーン処理が施された細胞の写真である。図5-3及び図5-4は、それぞれ図5-1及び図5-2の原図(カラー)で緑色の部分が白色に変換されて強調された写真である。図5-4では、矢印は原図で緑色の部分を指示示す。図5-4に示されるとおり、前記5種類の分化誘導剤の存在下で前記4種類の転写因子が3回リポフェクションされた第8日の201B7細胞の培養には、インドシアニングリーンが取り込まれて緑色に染色された細胞が観察された。インドシアニングリーンは肝細胞でのみ血液循環から細胞内に取り込まれることが知られている。そこで本発明の方法によって未分化のヒトIPS細胞から8日間で分化が誘導された肝前駆細胞は肝細胞の機能を発現していることが示された。

20

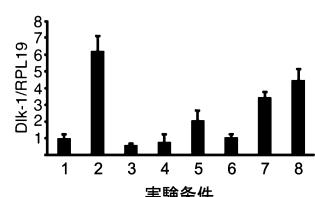
【図1】



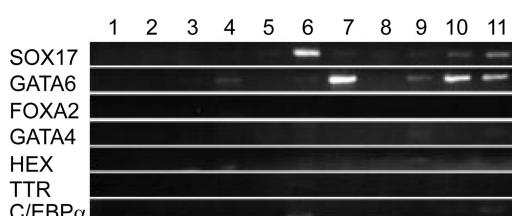
【図3-1】



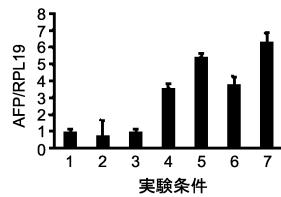
【図3-2】



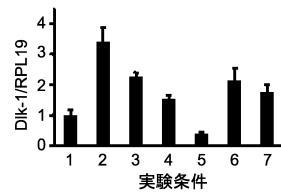
【図2】



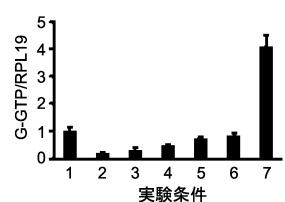
【図4-1】



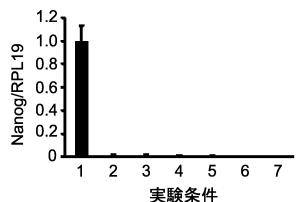
【図4-2】



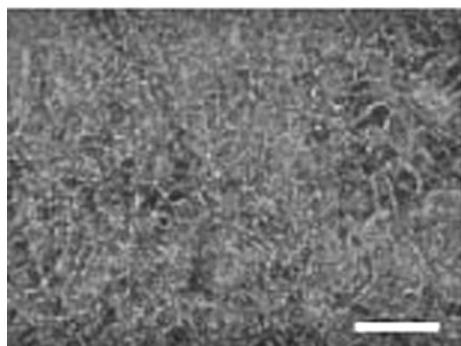
【図4-3】



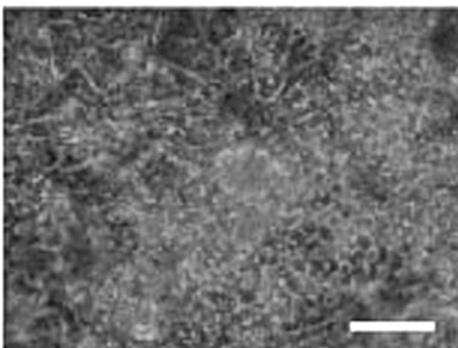
【図4-4】



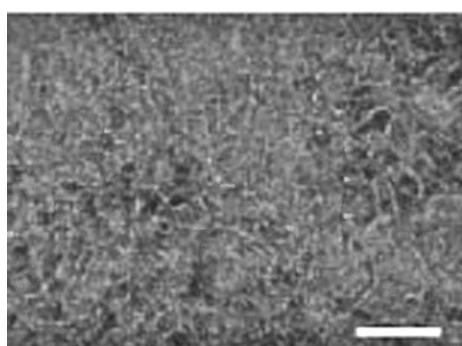
【図5-1】



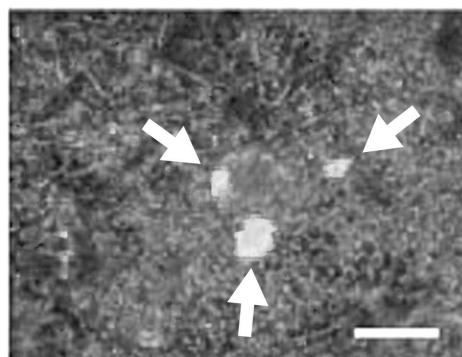
【図5-2】



【図5-3】



【図5-4】



【配列表】

0006150108000001.app

フロントページの続き

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 日本消化器病学会雑誌 , 2012 , 第109巻臨時増刊号 , p.A156 , W4-3
肝臓 , 2011 , 52巻 , suppl.(2) , A680 , 肝P-394
Hepatology Research , 2003, Vol.26, p.225-231 (abstract), BIOSIS [online], Accession No
.2003:4328756
Molecular Cell , 2002, Vol.9, p.279-289
Molecular Therapy , 2011, Vol.19, p.400-407
Int.J.Dev.Biol., 2004, Vol.48, p.23-29

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)