

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7556502号  
(P7556502)

(45)発行日 令和6年9月26日(2024.9.26)

(24)登録日 令和6年9月17日(2024.9.17)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/071(2010.01) C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

請求項の数 24 (全56頁)

(21)出願番号	特願2021-566542(P2021-566542)	(73)特許権者	510003830
(86)(22)出願日	令和2年5月11日(2020.5.11)		フジフィルム セルラー ダイナミクス ,
(65)公表番号	特表2022-534555(P2022-534555		インコーポレイテッド
	A)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7
(43)公表日	令和4年8月2日(2022.8.2)		1 1 , マディソン , サイエンス ドラ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/032332		イブ 5 2 5 , スイート 2 0 0 , ユニ
(87)国際公開番号	WO2020/227711		バーシティー リサーチ パーク
(87)国際公開日	令和2年11月12日(2020.11.12)	(73)特許権者	521488495
審査請求日	令和5年4月18日(2023.4.18)		フジフィルム ホールディングス アメリ
(31)優先権主張番号	62/845,623		カ コーポレーション
(32)優先日	令和1年5月9日(2019.5.9)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 5
(33)優先権主張国・地域又は機関			9 4 バルハラ サミット レイク ドライ
	米国(US)		ブ 2 0 0
(31)優先権主張番号	63/022,257	(74)代理人	110000109
(32)優先日	令和2年5月8日(2020.5.8)		弁理士法人特許事務所サイクス
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘパトサイトの作製方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘパトサイトを作製する方法であって、  
( a ) G S K 3 阻害薬の存在下で人工多能性幹細胞 ( i P S C ) を培養して、プレコンディショニングされた i P S C を提供することと ;  
( b ) 前記プレコンディショニングされた i P S C を胚体内胚葉 ( D E ) 細胞に分化させることであって、 D E 細胞に分化させることが、アクチビン A を含む第 1 の内胚葉誘導培地 ( E I M ) 、 B M P 4 、 V E G F 及び b F G F を含む第 2 の E I M 並びに V E G F 及び D M S O を含む第 3 の E I M で前記 i P S C を順次培養することを含むこと ;  
( c ) 前記 D E 細胞を培養して、ヘパトブラストの形成を誘導することと ;  
( d ) 前記ヘパトブラストをヘパトサイトに分化させることと  
を含む方法。

【請求項 2】

前記 i P S C は、 1 ~ 3 日間にわたってプレコンディショニングされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 G S K 3 阻害薬は、 C H I R 9 9 0 2 1 、 B I O 、 S B 2 1 6 7 6 3 、 C H I R 9 8 0 1 4 、 T W S 1 1 9 、 S B 4 1 5 2 8 6 及びチデグルシブである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 i P S C は、本質的にアスコルビン酸を含まない培地でプレコンディショニングされる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ ( a ) ~ ( d ) の 1 つ以上は、規定された無血清培地の条件、異種成分不含条件、フィーダー細胞不含条件及び / 又は馴化培地不含条件下で実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 D E 細胞は、C X C R 4、C D 1 1 7、F O X A 1、F O X A 2、E O M E S 及び / 又は H N F 4 について陽性である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ ( c ) は、H G F、B M P 4、F G F 1 0、F G F 2、V E G F、E G F、デキサメタゾン及び / 又は D M S O を含むヘパトサイト誘導培地 ( H I M ) で D E 細胞を培養することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ ( c ) とステップ ( d ) の間に、ヘパトブラストを誘導した後に凝集塊を形成させることを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ ( a ) 及び ( b ) において、本質的に凝集塊が形成されない、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 i P S C は、細胞外マトリックス上で培養される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞外マトリックスは、マウスエンゲルブレス・ホルム・スウォーム腫瘍から精製された基底膜抽出物 ( B M E ) である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞外マトリックスは、M A T R I G E L (登録商標)、G E L T R E X (商標)、コラーゲン又はラミニンである、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ヘパトブラストは、ステップ ( d ) 前に消化される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

ヘパトサイトへ分化させることは、b F G F、H G F、オンコスタチン M 及び D M S O を含むヘパトサイト分化培地 ( H D M ) で前記ヘパトブラストを培養することを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 H D M は、G S K 3 阻害薬を更に含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ ( a ) ~ ( c ) は、低酸素条件下で実施される、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ ( d ) は、第 1 の分化期間にわたって低酸素条件下において、且つ第 2 の分化期間にわたって正常酸素条件下において前記ヘパトブラストを培養することを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

デキサメタゾン及びオンコスタチン M を含む成熟培地で前記ヘパトサイトを培養することを更に含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヘパトサイトは、成熟中にコラーゲン上で培養される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記成熟培地は、S R Cキナーゼ阻害薬、E P O、T G F 阻害薬、M E K阻害薬、  
- セクレターゼ阻害薬、E P O、I G F 1、I G F 2 及び / 又は T G F を更に含む、請求項 1 8 又は 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ステップ ( d ) の後に、C D 1 3 3 陽性細胞を選択することを更に含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ヘパトサイトの少なくとも 7 0 %、8 0 % 又は 9 0 % は、アンチトリプシン ( A A T ) について陽性である、及び / または前記ヘパトサイトの少なくとも 4 0 %、5 0 % 又は 6 0 % は、アルブミンについて陽性である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 3】

間葉系幹細胞 ( M S C )、マクロファージ、内皮細胞又は M S C の馴化培地であって、  
1 つ以上の S r c キナーゼ阻害薬を補充された馴化培地の存在下で前記ヘパトサイトを培養することを更に含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ヘパトサイトを 3 D 凝集塊として凍結保存することを更に含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

本願は、2 0 1 9 年 5 月 9 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 8 4 5 , 6 2 3 号明細書及び 2 0 2 0 年 5 月 8 日に出願された同第 6 3 / 0 2 2 , 2 5 7 号明細書の利益を主張するものであり、これらの特許出願は、両方とも全体として参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

本発明は、概して、分子生物学及び医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、人工多能性幹細胞からヘパトサイトへの指向された分化誘導の方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

30

哺乳類において、肝臓は、タンパク質合成、代謝、解毒及び排泄を含む多様な機能の中心的役割を果たす。単離された肝細胞でこれらの機能の全て又は大部分を再現することは、大きい課題である。生存能力のある機能性のヘパトサイトが利用可能になれば、薬理学的及び毒性学的評価、疾患の病態生理学的分析のための細胞モデルの創出、パイオ人工肝臓支持体の作成並びに肝再生療法に極めて有益であろう。同所性肝移植は、事実上全ての肝機能を取り替えるものであり、急性及び慢性肝不全並びに単一遺伝子肝疾患、例えばクリグラー・ナジャー症候群 1 型、1 - アンチトリプシン欠乏症、原発性高シュウ酸尿症などを有する患者を救うことができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0 0 0 4】

肝移植は、厄介で高価な手技であり、肝臓が直ちに入手可能であるかどうか依存するため、これらの障害の多くに対する臓器移植に代わる最小侵襲性的手段としてヘパトサイト移植が模索されている。しかしながら、ドナー肝は、通常、臓器移植に優先されるが、それが深刻な不足状態にあるため、初代ヘパトサイトの単離に使用可能な肝臓の入手可能性は、極端に限られている。問題を更に複雑にしているのは、初代ヘパトサイトが、培養下で機能が急激に低下し、凍結保存後のその生存能力に極端な幅があるという事実である。従って、代替となる再生可能なヒトヘパトサイト供給源が大いに必要とされている。間葉系幹細胞及び造血幹細胞などの組織幹細胞、肝臓前駆細胞並びに多能性幹細胞は、ヒトヘパトサイト供給源としての評価が行われている。人工多能性幹細胞 ( i P S C ) をヘパ

50

トサイトに分化させる方法が必要とされているが、依然として対処されていない。

【課題を解決するための手段】

【0005】

第1の実施形態において、本開示は、ヘパトサイトを作製する方法であって、(a) GSK-3阻害薬の存在下で多能性幹細胞(PSC)を培養して、プレコンディショニングされたPSCを提供することと；(b)プレコンディショニングされたPSCを胚体内胚葉(DE)細胞に分化させることと；(c)DE細胞を培養して、ヘパトブラストの形成を誘導することと；(d)ヘパトブラストをヘパトサイトに分化させることとを含む方法を提供する。特定の態様において、PSCは、人工多能性幹細胞(iPSC)である。一部の態様において、本方法は、(a) iPSCをGSK-3阻害薬の存在下で培養して、

10

【0006】

特定の態様において、iPSCは、1、2又は3日間など、1～3日間にわたってプレコンディショニングされる。一部の態様において、GSK3阻害薬は、CHIR99021、BIO、SB216763、CHIR98014、TWS119、SB415286及びチデグルシブである。一部の態様において、GSK3阻害薬は、CHIR99021である。詳細な態様において、CHIR99021は、1、2、3、4又は5 µMなど、1～5 µMの濃度である。特定の態様において、iPSCは、本質的にアスコルビン酸を含まないか又はアスコルビン酸を含まない培地でプレコンディショニングされる。

20

【0007】

一部の態様において、ステップ(a)～(d)の1つ以上は、異種成分不含条件、フィーダー細胞不含条件又は馴化培地不含条件下で実施される。詳細な態様において、ステップ(a)～(d)の各々は、異種成分不含条件、フィーダー細胞不含条件又は馴化培地不含条件下で実施される。一部の態様において、異種成分不含条件は、規定された培地の使用を含む。

【0008】

一部の態様において、DE細胞に分化させることは、アクチビンAを含む第1の内胚葉誘導培地(EIM)、BMP4、VEGF及びbFGFを含む第2のEIM並びにVEGF及びDMSOを含む第3のEIMでiPSCを順次培養することを含む。一部の態様において、DE細胞に分化させることは、8、9又は10日間など、8～10日間にわたるものである。特定の態様において、DE細胞は、CXCR4、CD117、FOXA1、FOXA2、EOMES及び/又はHNF4について陽性である。

30

【0009】

特定の態様において、ステップ(c)は、HGF、BMP4、FGF10、FGF2、VEGF、EGF、デキサメタゾン及び/又はDMSOを含むヘパトサイト誘導培地(HIM)でDE細胞を培養することを含む。詳細な態様において、ステップ(c)は、BMP4、HGF及びFGF10を含むHIMでDE細胞を培養することを含む。一部の態様において、ステップ(c)は、HGF、BMP4、FGF10、FGF2、VEGF、EGF、デキサメタゾン及びDMSOを含むHIMでDE細胞を培養することを含む。具体的な態様において、HGFは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30 ng/mLなど、20～30 ng/mLの濃度である。一部の態様において、誘導は、5、6又は7日間など、5～7日間にわたるものである。

40

【0010】

一部の態様において、本方法は、ヘパトブラストを誘導した後に凝集塊を形成させることを含む。詳細な態様において、ステップ(a)及び(b)は、本質的に凝集塊を含まない。

【0011】

50



特定の態様において、細胞は、細胞外マトリックス上で培養される。一部の態様において、細胞外マトリックスは、M A T R I G E L（登録商標）、I型コラーゲン又はラミニンである。具体的な態様において、細胞外マトリックスは、M A T R I G E L（登録商標）である。一部の態様において、細胞外マトリックスは、マウスエンゲルプレス・ホルム・スウォーム腫瘍から精製された基底膜抽出物（B M E）である。特定の態様において、細胞外マトリックスは、G E L T R E X（商標）である。

【0012】

一部の態様において、ヘパト بلاストは、ステップ（d）前に消化される。特定の態様において、分化させることは、b F G F、H G F、オンコスタチンM及びD M S Oを含むヘパトサイト分化培地（H D M）でヘパト بلاストを培養することを含む。詳細な態様において、H D Mは、G S K 3阻害薬を更に含む。一部の態様において、H D Mは、本質的にV E G F及びE G Fを含まない。一部の態様において、ステップ（d）の分化させることは、8、9又は10日間など、8～10日間にわたるものである。

10

【0013】

詳細な態様において、ステップ（a）～（c）は、低酸素条件下で実施される。一部の態様において、ステップ（d）は、第1の分化期間にわたって低酸素条件下において、且つ第2の分化期間にわたって正常酸素条件下において細胞を培養することを含む。具体的な態様において、第1の分化期間及び第2の分化期間は、それぞれ3、4又は5日間などの3～5日間である。

【0014】

20

更なる態様において、本方法は、デキサメタゾン及びオンコスタチンMを含む成熟培地でヘパトサイトを培養することを更に含む。一部の態様において、ヘパトサイトは、成熟中にI型コラーゲン上で培養される。他の態様において、ヘパトサイトは、M A T R I G E L（登録商標）、I型コラーゲン、ラミニン、マウスエンゲルプレス・ホルム・スウォーム腫瘍から精製された基底膜抽出物（B M E）又はG E L T R E X（商標）上で培養される。

【0015】

一部の態様において、成熟培地は、S R Cキナーゼ阻害薬を更に含む。特定の態様において、S R Cキナーゼ阻害薬は、ボスチニブ、ダサチニブ、A 4 1 9 2 5 9、アルステルパウロン、A Z M 4 7 5 2 7 1、A Z M 4 7 5 2 7 1又はP P 1である。詳細な態様において、成熟培地は、E P Oを更に含む。一部の態様において、成熟培地は、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬を更に含む。例えば、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬は、D A P Tである。特定の態様において、成熟培地は、T G F 阻害薬を更に含む。一部の態様において、T G F 阻害薬は、S B 4 3 1 5 4 2、S B 5 2 5 3 3 4、S B 4 3 1 5 4 2～5 0 5 1 2 4、L e f t y、A 8 3 - 0 1、D 4 4 7 6、G W 7 8 8 3 8 8、L Y 3 6 4 8 4 7、R 2 6 8 7 1 2又はR e p S o xである。例えば、T G F 阻害薬は、S B 4 3 1 5 4 2である。詳細な態様において、成熟培地は、P D 0 3 2 5 9 0 1など、M E K阻害薬を更に含む。一部の態様において、M E K阻害薬は、P D 0 3 2 5 9 0 1、G S K 1 1 2 0 2 1 2、M E K 1 6 2、R D E A 1 1 9及びA Z D 6 2 4 4である。特定の態様において、成熟培地は、E P O、I G F 1、I G F 2及び/又はT G F を更に含む。一部の態様において、成熟培地は、抗アポトーシス化合物X M U - M P 1を更に含む。特定の態様において、成熟培地は、F H 1、F P H 1及び/又はメトキサミン（例えば、15  $\mu$ M F H 1、15 F P H 1及び1  $\mu$ Mメトキサミン）を更に含む。

30

40

【0016】

更なる態様において、本方法は、C D 1 3 3陽性細胞を選択することを更に含む。一部の態様において、成熟ヘパトサイトの少なくとも70%、80%又は90%は、アンチトリプシン（A A T）について陽性である。特定の態様において、成熟ヘパトサイトの少なくとも40%、50%又は60%は、アルブミンについて陽性である。一部の態様において、成熟ヘパトサイトの少なくとも70%、80%又は90%は、アルブミンについて陽性である。

50

## 【 0 0 1 7 】

一部の態様において、本方法は、1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬を補充された間葉系幹細胞(MSC)又はMSC馴化培地の存在下で成熟ヘパトサイトを共培養することを更に含む。一部の態様において、本方法は、1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬と共にマクロファージの存在下で成熟ヘパトサイトを共培養することを更に含む。一部の態様において、本方法は、1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬と共に内皮細胞の存在下で成熟ヘパトサイトを共培養することを更に含む。一部の態様において、本方法は、1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬と共にMSC、マクロファージ及び内皮細胞の存在下で成熟ヘパトサイトを共培養して、肝オルガノイドを作成することを更に含む。

## 【 0 0 1 8 】

更なる態様において、本方法は、成熟ヘパトサイトを凝集塊として凍結保存することを更に含む。

## 【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、少なくとも90%(例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)がAATについて陽性であり、及び/又は少なくとも80%がアルブミンについて陽性であるヘパトサイト細胞を含む組成物が提供される。一部の態様において、本組成物は、異種成分不含であり、フィーダー細胞不含であり、馴化培地不含であり、且つ限定されている。

## 【 0 0 2 0 】

更なる実施形態において、肝疾患を有する対象を処置する方法であって、有効量の、本実施形態によって作製されたヘパトサイトを対象に投与することを含む方法が提供される。一部の態様において、肝疾患は、急性肝疾患、慢性肝疾患又は遺伝性肝機能障害である。特定の態様において、投与することは、ヘパトサイト移植を含む。

## 【 0 0 2 1 】

更に、本実施形態の方法によって作製されたヘパトサイトを含む、予測毒性学のためのプラットフォームが本明細書で提供される。

## 【 0 0 2 2 】

更に、本実施形態の方法によって作製されたヘパトサイトを含む組成物が本明細書で提供される。対象の肝疾患の処置における使用のための、本実施形態の方法によって作製されたヘパトサイトを含む組成物も本明細書で提供される。更なる実施形態は、対象の肝疾患の処置における使用のための本ヘパトサイトの組成物を含む。追加の実施形態は、疾患モデリング又は創薬における使用のための組成物を含む。一部の態様において、肝疾患は、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)である。詳細な態様において、創薬は、NASH、急性肝疾患、慢性肝疾患又は遺伝性肝機能障害の標的を同定する。

## 【 0 0 2 3 】

別の実施形態は、疾患の処置のための候補薬剤を同定するためのメチル化ベースの解析を実施する方法であって、本実施形態の組成物に対してオミクスベースの解析を実施することを含む方法を提供する。一部の態様において、疾患は、NASH、急性肝疾患、慢性肝疾患又は遺伝性肝機能障害である。

## 【 0 0 2 4 】

更なる実施形態は、ハイスループットスクリーニングを実施して、治療用薬剤を同定する方法であって、本実施形態の方法によって誘導された成熟ヘパトサイトの3D凝集塊を複数の候補薬剤と接触させることと、前記成熟ヘパトサイトの機能を測定することとを含む方法を提供する。一部の態様において、成熟ヘパトサイトの3D凝集塊は、1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬を補充されたMSC、マクロファージ、内皮細胞又はMSC馴化培地と共培養される。他の態様において、成熟ヘパトサイトの3D凝集塊は、他の細胞型の非存在下で培養される。

## 【 0 0 2 5 】

更に別の実施形態において、本実施形態のとおり誘導された成熟ヘパトサイトを含む、肝疾患のインビトロモデルが提供される。一部の態様において、成熟ヘパトサイトは、

10

20

30

40

50

1つ以上のSrcキナーゼ阻害薬を補充されたMSC、マクロファージ、内皮細胞又はMSC馴化培地と共培養される。特定の態様において、成熟ヘパトサイトは、他の細胞型の非存在下で培養される。詳細な態様において、肝疾患は、急性肝疾患、慢性肝疾患、又は遺伝性肝機能障害、又は脂肪肝疾患である。具体的な態様において、脂肪肝疾患は、NASHである。一部の態様において、成熟ヘパトサイトは、脂肪酸による処理時に自然発症リピドーシスなどのリピドーシスを起こす。特定の態様において、脂肪酸は、オレイン酸及びノ又はリノール酸である。一部の態様において、肝疾患は、肝線維症である。

【0026】

以下の詳細な説明から、本発明の他の目的、特徴及び利点が明らかになるであろう。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の趣旨及び範囲内にある様々な変更形態及び修正形態が当業者に明らかになり得るため、詳細な説明及び具体的な例は、本発明の好ましい実施形態を示すものではあるが、例示として提供されるに過ぎないことが理解されなければならない。

10

【0027】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を更に実証するために含まれる。本発明は、本明細書で提供される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することによってよりよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】iPSCから胚体内胚葉に分化させるヘパトサイト分化プロセスの初期系統特異化を描く概略図である。

20

【0029】

【図2】ヘパトブラストを誘導するヘパトサイト分化の第1段階を図示する概略図である。

【0030】

【図3】ヘパトサイト分化プロセスの第2段階を図示する概略図である。

【0031】

【図4】ヘパトサイトを成熟させるヘパトサイト分化プロセスの第3段階を図示する概略図である。

【0032】

【図5】修正ヘパトサイト分化プロトコルの概略図である。MATRIGEL（登録商標）をコートしたプレートにiPSCを播種し、2日間増殖させ、続いてCHIR99021で2日間プレコンディショニングする。0日目（T0）培地に細胞を置くことにより胚体内胚葉（DE）細胞への変換を開始し、続いて1、2日目に培地を順次交換し（T1 - T2）、続いてプロセス10日目まで細胞をT3 - T6培地に置く。DE誘導の終了時、DEマーカーCXCR4及びCD117のために細胞をサンプリングする。細胞を第1段階に6日間置くことにより、細胞をヘパトブラスト段階に導く。第1段階の終了時、細胞は、凍結保存され得るか、又は更にヘパトサイトに変換され得る。三次元（3D）フォーマット又は二次元（2D）フォーマットのいずれかで、ヘパトサイトに分化させる第2段階を実施する。第1段階の細胞を回収し、凝集塊を形成させて、それらの細胞を、CHIR99021を補充された第2段階培地に8日間維持する。第2段階の終了時、1 - アンチトリプシン（AAT）純度のために細胞をサンプリングし、凍結保存するか、又は代わりにI型コラーゲンをコートしたプレートに直接播き、そこで第3段階中にヘパトサイト成熟が起こり、AAT及びアルブミン（ALB）の両方を発現する細胞が生じる。分化プロセス全体は、第2段階の途中まで低酸素条件下で行った後、細胞を正常酸素に移行させる。

30

40

【0033】

【図6】表1に記載される02E1及び01D1非アルコール性脂肪肝炎（NASH）iPSCでは、2日間のCHIRプレコンディショニング後、多能性状態から抜け出て、胚体内胚葉（DE）が誘導される：（左）DE誘導期の終了時におけるDEマーカーCXCR4（y軸）及びCD117（x軸）並びに多能性マーカーTRA1-81のFACS解

50

析；（右）各遺伝子に2つの異なるプローブを使用した、プロセス全体を通じた多能性遺伝子POU5F1及びNANOGに関するqPCR。

【0034】

【図7A - 7C】CHIR99021プレコンディショニングがある又はないときのCXCR4/CD117、AAT又はTRA181の発現によるヘパトサイト分化プロセス中の細胞の特徴付けである。ヘパトサイト分化プロセスの胚体内胚葉終了時及び第2段階終了時における正常（54A）及びNASH特異的iPSC株（02E1）で2又は4日間のCHIR99021プレコンディショニングの効果を評価する。正常及びNASH iPSC株における胚体内胚葉終了時のCXCR4/CD117（図7A）及びTRA181（図7B）純度の定量化。正常及びNASH iPSC株における第2段階ヘパトサイト分化終了時のAAT純度の定量化（図7C）。

10

【0035】

【図8A - 8D】CHIR99021プレコンディショニングがある又はないときの分化第3段階におけるAAT又はアルブミン発現陽性細胞の割合である。ヘパトサイト分化プロセスの生存第3段階（図17に記載されるとおり）の終了時における正常（54A）及びNASH特異的iPSC株（02E1）でCHIRプレコンディショニングの継続期間の効果を評価する。正常iPSC株における第3段階終了時のAAT（図8A）及びアルブミン純度（図8D）の定量化。正常（54A）及びNASH特異的（02E1）iPSCにおける第3段階終了時のAAT（図8A、図8B）及びアルブミン純度（図8C、図8D）の定量化。

20

【0036】

【図9】ヘパトサイト分化プロトコル中における様々な時点及び様々な継続期間のCHIR99021補充がAAT純度に及ぼす効果である。肝分化プロセスの第2段階におけるCHIR99021処理後のAAT陽性ヘパトサイトの出現動態。NASH（01D1及び02E1）特異的iPSCにおけるヘパトサイト分化第2段階でのCHIR99021補充に伴うAAT純度の増加：FACSプロットから、第1段階終了時（EOS1）及びヘパトサイト分化第2段階中の指示される時点（2日目、4日目、6日目及び8日目）におけるAAT発現培養物の純度が定量化される。

【0037】

【図10】ヘパトサイト分化プロトコル中における様々な時点及び様々な継続期間のCHIR99021補充がアジア糖タンパク質受容体1（ASGPR）純度に及ぼす効果である。肝分化プロセスの第2段階におけるCHIR99021処理後のASGPR陽性ヘパトサイトの出現動態。NASH特異的（01D1及び02E1）iPSCにおけるヘパトサイト分化第2段階でのCHIR99021補充に伴うASGPR純度の増加を定量化する。FACSプロットは、第1段階終了時（EOS1）及びヘパトサイト分化第2段階中の指示される時点（2日目、4日目、6日目及び8日目）で回収したASGPR発現の純度を図示する。

30

【0038】

【図11A - 11E】ヘパトサイト分化プロトコル中のCHIR99021補充は、種々の細胞株で有益である。分化第2段階中にCHIR99021を加えると、AAT純度に影響が及ぶことなく、細胞増殖及びAAT陽性細胞収量が増加する。正常（54A）及び2つのNASH特異的iPSC株（89F及び01D1）を3µM CHIR99021の存在下又は非存在下で分化させた。CHIR99021処理期間の始まりは、第1段階の4日目（S1 D4 CHIR）、第2段階の開始時（S2 D1 CHIR）又は第2段階の3日目（S2 D3 CHIR）であった。総生存細胞数及びAATの純度を定量化した。第2段階終了時（EOS2）における第1段階終了時ヘパトブラストからAAT陽性ヘパトサイトへの変換効率（図11A）、第2段階終了時（EOS2）の細胞数（図11B）及び第2段階終了時のAAT陽性細胞数（収量）（図11C）を、NASH（01D1）（図11D）及び正常（54A）（図11E）iPSCにおける出現したヘパトサイト培養物の形態学的外観と共に取得している。

40

50

## 【 0 0 3 9 】

【図 1 2】分化中の指示される時点で細胞から抽出した RNA を使用した q P C R 分析によるヘパトサイト分化プロセス中の H N F 4 a の分析である。プロモーター 1 ( P 1 ) 又はプロモーター 2 ( P 2 ) からの転写物を検出する T a q m a n プローブを使用した。N A S H 特異的 i P S C ( 0 2 E 1 及び 0 1 D 1 ) 由来のヘパトサイトからの H N F 4 A 転写プロファイルを成人ヒト肝由来の全 RNA ( I n v i t r o g e n ) と比較する。

## 【 0 0 4 0 】

【図 1 3】分化第 3 段階における細胞形態の画像である。2 0 倍対物レンズ下で撮影した、I 型コラーゲンプレートに播いた後 7 日目の第 2 段階終了時に撮影した N A S H 特異的 ( 0 1 D 1 ) ヘパトサイトの代表的な画像。鍵となるヘパトサイト特徴である二核細胞を丸で囲む。

10

## 【 0 0 4 1 】

【図 1 4】分化第 3 段階におけるヘパトサイトのカルボキシジクロロフルオレセイン二酢酸塩 ( C D F D A ) 取込みの画像である。1 0 倍対物レンズで撮影した、I 型コラーゲンプレートに播いて 7 日後の第 2 段階終了時に色素 C D F D A で染色した N A S H 特異的 ( 0 1 D 1 ) ヘパトサイトの代表的な画像。C D F D A は、無色であるが、それがヘパトサイトで切断されると、緑色蛍光代謝産物カルボキシジクロロフルオレセイン ( C D F ) が産生され、次にそれが毛細胆管中に輸送される。毛細胆管を C D F によって可視化する。

## 【 0 0 4 2 】

【図 1 5】アルブミン純度を指示するフローサイトメトリーによる第 3 段階ヘパトサイトの評価である。分化第 3 段階中の指示される時点で回収した N A S H 特異的 ( 0 2 E 1 ) ヘパトサイトにおける A A T ( 上 ) 及びアルブミン ( A L B 、下 ) 発現の F A C S 解析であり、各散布図上に陽性細胞の割合 ( 純度 ) を赤色で示す。

20

## 【 0 0 4 3 】

【図 1 6】成熟の指標となるアルブミン発現である。本プロセスの成熟期 - 第 3 段階 - 中の N A S H 特異的 ( 0 2 E 1 及び 0 1 D 1 ) ヘパトサイトにおけるアルブミン ( A L B ) 純度の増加。

## 【 0 0 4 4 】

【図 1 7】ヘパトサイト分化プロセスの第 3 段階で使用されるヘパトサイト成熟培地配合である。

30

## 【 0 0 4 5 】

【図 1 8】第 3 段階ヘパトサイトの A A T 及びアルブミン発現及び形態である。I 型コラーゲンをコートしたプレート上において、N A S H 特異的 i P S C 株 0 1 D 1 からのヘパトサイトを解凍し、C H I R 9 9 0 2 1 の存在下で第 2 段階分化培地に置き、S B 4 3 1 5 4 2 及び D A P T を含有する第 3 段階ヘパトサイト培地に 8 日間移した。分化第 3 段階の終了時に細胞を回収し、A A T 及びアルブミンの存在下で染色した。散布図は、A A T ( 左上 ) 及びアルブミン ( 左下 ) の定量化を示し、且つ第 3 段階終了時における細胞の形態が右側に示される。

## 【 0 0 4 6 】

【図 1 9】分化第 1 段階における凍結保存後のヘパトサイトの回収である。I 型コラーゲンをコートしたプレート上において、N A S H 特異的 i P S C 0 1 D 1 から誘導されたヘパトサイトを解凍し、第 2 段階ヘパトサイト分化培地に 8 日間置いた。細胞を種々の配合の第 3 段階培地に移した。対照培地は、S B 4 3 1 5 4 2 と D A P T との組み合わせ ( 対照 ) ( H e p 第 3 段階 B 培地 ) 又は成熟化合物と、ヘパトサイト機能及び分化促進剤 F H 1 及び F P H 1 ( F H 1 / F P H 1 、各 1 5  $\mu$  M ) 、 1 - アドレナリン受容体作動薬 メトキサミン ( M 、 1  $\mu$  M ) 又は F H 1 、 F P H 1 及びメトキサミン ( F H 1 / F P H 1 / M ) との組み合わせを含有した。第 2 段階終了時純度 ( E S 2 、白色のバー ) を比較として示す。細胞は、第 3 段階ヘパトサイト分化終了時に回収し、A A T 発現に関して染色した。

40

## 【 0 0 4 7 】

50

【図20A - 20F】分化第2段階における凍結保存後のヘパトサイトの回収である。I型コラーゲンをコートしたプレート上において、NASH特異的iPSC株01D1からのヘパトサイトを解凍し、(図20A~図20C)SB431542及びDAPTを含有する第3段階ヘパトサイトA培地(培地組成に関しては、図17を参照されたい)又は(図20D~図20F)5 $\mu$ M Srcキナーゼ阻害薬を含有する第3段階ヘパトサイトE培地(培地組成に関しては、図17を参照されたい)に10日間置いた。分化第3段階の終了時に細胞を回収し、AAT及びアルブミンの存在に関して染色した。散布図は、第3段階Hep A培地におけるAAT(図20A)及びアルブミン(図20B)の定量化を示す。散布図は、第3段階Hep E培地におけるAAT(図20E)及びアルブミン(図20F)の定量化を示す。第3段階Hep A培地(図20A)及び第3段階Hep E培地(図20D)における第3段階終了時の細胞の形態。

10

【0048】

【図21A - 21B】精製ステップが必要となり得る低分化度のヘパトサイト(例えば、疾患バックグラウンドが原因)の場合にヘパトサイトの精製を促進するAATの代用マーカーである。AAT及びASGPRは、細胞内タンパク質であるため、AATと共発現する表面タンパク質を探した。CD133がAATと部分的に共発現すると同定され、従って細胞分離戦略に好適な候補となり得た(図21A)。複数の正常(20D、54A及び1505)及びNASH(24D、42F及び45B)iPSCでのCD133とAATとの共発現を明らかにするフローサイトメトリプロット(図21B)。

【0049】

20

【図22】間葉系幹細胞(MSC)なし、即ち単独で培養した(左、MSCなし)又はヘパトサイト培地に順応させた01D1 MSCと一緒に培養した(右、+MSC)NASH特異的01D1ヘパトサイトの第3段階終了時の形態である:本プロセスの第1段階終了時に凍結保存したヘパトサイトを解凍し、第2段階を通して標準プロトコル下で培養した後、共培養を開始した。両方の条件とも、培地にSB431542/DAPTが含まれた(表2)。

【0050】

【図23】SB431542/DAPT又はPP1(Srcキナーゼ阻害薬)の存在下で成熟したヘパトサイトの第3段階終了時の形態である:本プロセスの第2段階終了時に凍結保存した正常(2.038又は54A)又はNASH特異的iPSC(02E1)からのヘパトサイトを解凍し、ヘパトサイト分化第3段階を通して成熟培地で10 $\mu$ M SB431542/2 $\mu$ M DAPT(SB/DAPT)又は5 $\mu$ M PP1(PP1)の存在下において培養した。出現した解凍後ヘパトサイトの形態を10倍の拡大倍率で取得した。

30

【0051】

【図24】SB431542/DAPT又はPP1(Srcキナーゼ阻害薬)の存在下で成熟したヘパトサイトの第3段階終了時純度の定量化である:正常(2.038、54A)及びNASH特異的iPSC(02E1)からの分化プロセス第2段階終了時に凍結保存したヘパトサイトを解凍し、分化プロセス第3段階を通して成熟培地で10 $\mu$ M SB431542/2 $\mu$ M DAPT(SB/DAPT)又はSrcキナーゼ阻害薬PP1(PP1)の存在下において培養し、AAT及びアルブミンの純度を定量化した。

40

【0052】

【図25】第3段階終了ヘパトサイトの機能性シトクロムP450(CYP)3A4活性である:見かけ上健常な正常iPSC(2.038)及び2つのNASH iPSC(01D1及び02E1)から分化した第3段階終了ヘパトサイトを、ヘパトサイト維持サプリメントカクテルBと、媒体(0.1%DMSO)又は50 $\mu$ Mリファンピシン(CYP3A4誘導剤)のいずれかと含有するウィリアムスE培地において、毎日培地を交換しながら3日間インキュベートした。3日経過後、細胞を解離して96ウェルプレートに分配し(25,000細胞/ウェル、各条件について4~6ウェル)、発光P450-Glo CYP3A4アッセイシステム(Promega)を製造者の推奨に従って使用してCYP3A4活性測定に供した。

50

## 【 0 0 5 3 】

【図 2 6 A - 2 6 D】q P C R による分化段階中の肝臓遺伝子の発現分析である。指示される段階において、見かけ上健常な正常 i P S C ( 2 . 0 3 8 ) 及び 2 つの N A S H i P S C ( 0 1 D 1 及び 0 2 E 1 ) からのヘパトサイト分化培養物の細胞ペレットを収集した。R N A を抽出して q P C R 分析に使用することにより、タンパク質 ( A A T ) をコードする遺伝子である S E R P I N A 1 ( 図 2 6 A ) 、アシアロ糖タンパク質受容体 1 をコードする遺伝子である A S G R 1 ( 図 2 6 B ) 、A L B ( 図 2 6 C ) 及び C Y P 3 A 4 ( 図 2 6 D ) の発現を定量化した。

## 【 0 0 5 4 】

【図 2 7】第 3 段階終了時のヘパトサイトにおける細胞内脂質蓄積である。I 型コラーゲンをコートした 9 6 ウェルプレートに、見かけ上健常な正常 i P S C ( 2 . 0 3 8 ) 及び 2 つの N A S H i P S C ( 0 1 D 1 及び 0 2 E 1 ) からの第 2 段階終了ヘパトサイトを播種し、第 3 段階培地 ( 表 2 ) に 5 日間、1 日おきに培地を交換しながら維持した。次に、第 3 段階培地 ( 表 2 ) に希釈した 0 、1 0 0 又は 3 0 0  $\mu$  M 脂肪酸 ( F A 、オレイン酸とリノール酸との組み合わせ ) で細胞を 2 4 時間処理し、固定し、B i o d i p y ( 緑色 ) で染色して脂肪滴を可視化し、且つ D A P I ( 青色 ) で染色して核を可視化した。共焦点 I m a g e E x p r e s s ハイコンテンツイメージャー ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) を使用して 2 0 倍対物レンズ下で細胞を画像化した。

## 【 0 0 5 5 】

【図 2 8 A - 2 8 D】肝オルガノイドの開発である：ヘパトサイトをマクロファージ、M S C 及び内皮細胞と共培養することにより、肝オルガノイド培養を模倣しようとした。正常 ( 2 . 0 3 8 ) 及び N A S H 特異的 i P S C ( 0 2 E 1 ) からの第 2 段階終了ヘパトサイト凝集塊を解離し、1 0  $\mu$  M S B 4 3 1 5 4 2 + 2  $\mu$  M D A P T ( S B / D A P T ) 又は 5  $\mu$  M P P 1 ( P P 1 ) のいずれかを含む第 3 段階培地で再凝集させた。細胞は、単独で凝集させるか、又は 2 . 0 3 8 ( 正常 ) についてマクロファージ、M S C 及び内皮細胞と組み合わせ若しくはヘパトサイト第 3 段階培地に順応させた 0 2 E 1 ( N A S H ) に由来するマクロファージ及び M S C と組み合わせ凝集させるかのいずれかとした。両方の細胞株とも、図 2 8 A に概説される各個別の細胞型並びにあらゆる組み合わせからなる凝集塊について試行した。正常 ( 2 . 0 3 8 ) ヘパトサイト ( H e p ) 、マクロファージ ( M A C ) 、M S C 及び内皮細胞 ( e n d o ) 並びに 4 つ全ての細胞型の共培養 ( H e p / M A C / M S C / E n d o ) の凝集塊の代表的な画像を図 2 8 B に示す。N A S H 特異的 0 2 E 1 ヘパトサイト ( H e p ) 、マクロファージ ( M A C ) 及び M S C 並びに 3 つ全ての細胞型の共培養 ( H e p / M A C / M S C ) の凝集塊の代表的な画像を図 2 8 C に概略的に示す。画像は、全て I n c u C y t e ハイコンテンツイメージャー ( E s s e n B i o S c i e n c e ) を使用して 4 倍対物レンズ下で撮影した。第 3 段階終了時共培養凝集塊におけるアルブミン分泌の定量化を ( 図 2 8 D ) に示す。正常 ( 2 . 0 3 8 ) 及び N A S H 特異的 ( 0 2 E 1 ) i P S C に由来する第 2 段階終了ヘパトサイト凝集塊を解離し、単独 ( ヘパトサイト ) で又は同じ細胞株に由来するマクロファージ、M S C 及び内皮細胞との組み合わせ ( 共培養 ) のいずれかで第 3 段階培地 ( 表 2 ) において再凝集させた。得られた凝集塊は、1 0  $\mu$  M S B 4 3 1 5 4 2 + 2  $\mu$  M D A P T ( S B / D A P T ) 又は 5  $\mu$  M P P 1 ( P P 1 ) のいずれかを補充された第 3 段階培地に 1 0 日間、培地全体を 1 日おきに交換しながら維持した。最後の交換時 ( 8 ~ 1 0 日目 ) の培地を収集し、ヒトアルブミン E L I S A を製造者の指示に従って用いて、分泌されたアルブミンを測定した。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 5 6 】

特定の実施形態において、本開示は、人工多能性幹細胞 ( i P S C ) からヘパトサイトを作製する方法を提供する。概して、本方法は、i P S C を内胚葉系統細胞に分化させた後、それを誘導してヘパトブラストを形成させて、次にヘパトサイトに分化させることを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

具体的には、本方法は、i P S CをG S K 3 阻害薬の存在下で培養して、細胞が多能性状態を抜け出すことを促進し、下流分化を改善することにより、細胞を胚体内胚葉（D E）細胞に分化するようにプレコンディショニングすることを含み得る。初めに、i P S Cは、内胚葉誘導培地でD E細胞に分化することができる。i P S Cは、M A T R I G E L（登録商標）など、二次元培養で培養され得、次にヘパトブラスト誘導の終了時にD E細胞が三次元凝集培養に移され得る。ヘパトブラストの誘導及びヘパトサイトへの分化を含む本プロセスの第2段階中、細胞は、G S K 3 阻害薬の存在下で培養され得る。第3段階において、ヘパトサイトは、細胞形態の向上のため、T G F 阻害薬及び - セクレターゼ阻害薬の存在下で成熟させることができる。

10

## 【 0 0 5 8 】

本方法によって作製されるヘパトサイトは、疾患モデリング、創薬及び再生医学に用いられ得る。従って、好ましい実施形態において、本開示の方法は、一連の肝疾患に対する新規処置を開発するためのモデルシステム、予測毒性学のためのプラットフォームの構築並びに線維症、脂肪症及びウイルス感染症などの疾患のインビトロモデルの創出を含む、広範囲にわたる適用のためのヘパトサイトを提供する。加えて、本明細書に記載される方法を用いて、ヘパトサイト移植の臨床応用に使用されるヘパトサイトを誘導することにより、恐らく急性、慢性又は遺伝性肝機能障害に起因するであろう、かかる治療法を必要としている対象に対してある程度の肝機能を回復させることができる。

20

## 【 0 0 5 9 】

## I . 定義

ここで、本明細書において使用されるとき、「1つの（a）」又は「1つの（a n）」は、1つ又は複数を意味し得る。ここで、特許請求の範囲において使用されるとき、語句「含む」と併せて使用される場合、語句「1つの（a）」又は「1つの（a n）」は、1つ又は2つ以上を意味し得る。

## 【 0 0 6 0 】

特許請求の範囲における用語「又は」の使用は、二者択一に限られるか、又はそれらの選択肢が相互排他的であることを指すと明示的に指示されない限り、「及び／又は」を意味して使用されるが、しかし、本開示は、二者択一のみ且つ「及び／又は」を指すという定義を支持する。ここで使用されるとき、「別の」は、少なくとも第2又はそれを超えるものを意味し得る。

30

## 【 0 0 6 1 】

用語「本質的に」は、方法又は組成物が、指定されるステップ又は材料並びにそれらの方法及び組成物の基本的な新規の特徴に実質的に影響を及ぼさないステップ又は材料のみを含むと理解されるべきである。

## 【 0 0 6 2 】

ここで使用されるとき、指定される物質又は材料を「実質的に含まない」組成物又は培地は、その物質又は材料を30%以下、20%以下、15%以下、より好ましくは10%以下、更により好ましくは5%以下又は最も好ましくは1%以下だけ含有する。

## 【 0 0 6 3 】

用語「実質的に」又は「近似的に」は、ここで使用されるとき、それが関係する基本的な機能に変化を生じさせることのない許容されるばらつきがあり得る任意の定量的な比較、値、測定値又は他の表現を修飾するために適用され得る。

40

## 【 0 0 6 4 】

用語「約」は、一般に、記載される値を測定するための標準的な分析技法を用いて決定されたとおりの記載される値の標準偏差の範囲内であることを意味する。こうした用語は、記載される値の $\pm 5\%$ を指すことによっても用いられ得る。

## 【 0 0 6 5 】

ここで使用されるとき、指定される成分に関して「本質的に含まない」とは、ここで、指定される成分のいずれも組成物中に意図的に配合されておらず、且つ／又は混入物とし

50



て若しくは微量に存在するに過ぎないことを意味して使用される。従って、組成物の何らかの意図されない混入によって生じる指定される成分の総量は、0.05%を十分に下回り、好ましくは0.01%を下回る。最も好ましくは、標準的な分析的方法でいかなる量の指定される成分も検出できない組成物である。

【0066】

「処置」又は「処置すること」には、(1)疾患の病変又は症候が現れているか又はそれを呈している対象又は患者の疾患を阻害すること(例えば、病変及び/又は症候の更なる発生を止めること)、(2)疾患の病変又は症候が現れているか又はそれを呈している対象又は患者の疾患を改善すること(例えば、病変及び/又は症候を好転させること)、及び/又は(3)疾患の病変又は症候が現れているか又はそれを呈している対象又は患者において疾患の任意の測定可能な低下を生じさせることが含まれる。

10

【0067】

「予防的に処置すること」には、(1)疾患のリスクがあり得、且つ/又はそれに罹り易い素因があり得るが、依然としてその疾患の病変又は症候の一部又は全部が現れていないか又はそれを呈していない対象又は患者において疾患が発症するリスクを低減又は緩和すること、及び/又は(2)疾患のリスクがあり得、且つ/又はそれに罹り易い素因があり得るが、依然としてその疾患の病変又は症候の一部又は全部が現れていないか又はそれを呈していない対象又は患者において疾患の病変又は症候の発症を遅延させることが含まれる。

【0068】

20

ここで使用されるとき、用語「患者」又は「対象」は、ヒト、サル、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモットなどの生きている哺乳類生物又はそのトランスジェニック種を指す。特定の実施形態において、患者又は対象は、霊長類である。ヒト患者の非限定的な例は、成人、若年者、乳児及び胎児である。

【0069】

用語「有効」は、この用語が本明細書及び/又は特許請求の範囲で使用されるとき、所望、期待又は意図される結果を達成するのに十分であることを意味する。「有効量」、「治療上有効な量」又は「薬学的に有効な量」は、患者又は対象を化合物で処置することに関連して使用されるとき、その化合物の量が、疾患の処置又は予防のため対象又は患者に投与されたとき、疾患のかかる処置又は予防に影響を与えるのに十分な量であることを意味する。

30

【0070】

ここで一般的に使用されるとき、「薬学的に許容可能」は、妥当な医学的判断の範囲内において、合理的なリスク対効果比に見合った、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応又は他の問題若しくは合併症のない、ヒト及び動物の組織、臓器及び/又は体液と接触させて使用するのに好適な化合物、材料、組成物及び/又は投与形態を指す。

【0071】

「人工多能性幹細胞(iPSC)」は、ある組み合わせの因子(本明細書では再プログラム化因子と称される)を発現させるか、又はその発現を誘導して体細胞を再プログラム化することにより作成される細胞である。iPSCは、胎児、出生後、新生児、若年又は成体体細胞を使用して作成することができる。特定の実施形態において、体細胞を多能性幹細胞に再プログラム化するために使用することのできる因子としては、例えば、Oct4(Oct3/4と称されることもある)、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog及びLin28が挙げられる。一部の実施形態において、体細胞は、少なくとも2つの再プログラム化因子、少なくとも3つの再プログラム化因子又は4つの再プログラム化因子を発現することにより再プログラム化され、それにより体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化される。

40

【0072】

ここで使用されるとき、用語「ヘパトサイト」には、形態、マーカー発現並びにインビトロ及びインビボ機能アッセイによって決定したとき、成熟ヘパトサイトの特徴の全てで

50

はないが一部を呈するヘパトサイト様細胞並びにヘパトサイトの全ての特徴を有する成熟した、完全に機能性のヘパトサイトが含まれることが意図される。ヘパトサイトは、成熟肝臓遺伝子発現を発現し、特定の胎児ヘパトサイト及び胚性内胚葉遺伝子の発現を欠き得る。ヘパトサイトは、肝機能の酵素的測定によって特徴付けられ得る。具体的な態様において、本幹細胞由来ヘパトサイトは、以下の1つ以上を含む、あらゆる成熟ヘパトサイト機能の能力を有する：成熟ヘパトサイト遺伝子発現の分析 - 遺伝子アレイ及びqPCR（例えば - 1 - アンチトリプシン、Cyp3a4）；胎児ヘパトサイト、臓側内胚葉及び非実質肝細胞遺伝子発現量 - （例えば、Afp、Sox7、Ck19、Cd24a）の定量的評価；生体異物及び内因性物質（ホルモン及びアンモニア）の代謝；アルブミン、凝固因子、補体、輸送タンパク質、胆汁、脂質及びリポタンパク質の合成及び分泌；グルコース（グリコーゲン）、脂溶性ビタミンA、B12、D、E、K、葉酸塩、銅及び鉄の貯蔵；UGT1A1の評価（臨床）によるグルクロン酸抱合経路の存在及び活性；グルコース-6-ホスファターゼ（G6P）及びPEPCKの存在による活性糖新生；活性尿素生成 - アンモニア解毒及び尿素回路遺伝子発現；及び/又はヘパトサイトが門脈/脾臓注射によってインビボで肝臓に再増殖できるかどうかを決定する。

#### 【0073】

用語「細胞外マトリックスタンパク質」は、周囲細胞に構造的及び生化学的支持を提供する分子を指す。細胞外マトリックスタンパク質は、組換えであり得、その断片又はペプチドも指す。例としては、コラーゲン及びヘパリン硫酸が挙げられる。

#### 【0074】

「三次元（3D）培養」は、生体細胞が3つ全ての次元で成長するか、又はその周囲と相互作用することを許容する人工的に作り出された環境を指す。3D培養物は、バイオリアクター、細胞がスフェロイドに成長することができる小型カプセル又は非接着性培養プレートなど、様々な細胞培養容器において成長させることができる。詳細な態様において、3D培養は、スキャフォールドフリーである。対照的に、「二次元（2D）」培養とは、接着表面上での単層培養などの細胞培養を指す。

#### 【0075】

ここで使用されるとき、「胚体内胚葉（DE）」及び胚体内胚葉細胞（DE細胞）とは、限定はされないが、胚体内胚葉の細胞に典型的なタンパク質又は遺伝子発現及び又は/又は形態などを呈する細胞又は胚体内胚葉の細胞に類似した細胞を多数含む組成物を指す。一部の態様において、作製される胚体内胚葉細胞又は細胞集団は、EOMES、FOXA1、FOA2、SOX17、CXCR4、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1及びCRIP1からなる群から選択されるマーカーの1つ以上を発現する。

#### 【0076】

#### II. ヘパトサイトの作製

特定の実施形態において、本開示は、iPSCなどの多能性幹細胞からのヘパトサイトの作製に関する。ヘパトサイトを作製するための分化プロセスは、iPSCからDE細胞への分化後、それを誘導してヘパトブラストを形成させて、次にヘパトサイトに分化させることを含む。

#### 【0077】

iPSCなどのPSCは、概して、細胞の生存能力を維持しつつ細胞接着を増進させるため、1つ以上の細胞接着タンパク質がコートされた培養プレート上で培養される。例えば、好ましい細胞接着タンパク質としては、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン及び/又はフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質が挙げられ、これらは、多能性細胞成長のための固体支持体を提供する手段としての培養表面のコーティングに使用され得る。用語「細胞外マトリックス（ECM）」は、当技術分野で認識されている。その成分としては、限定はされないが、以下のタンパク質：フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、トロンボスポンジン、エラスチン、ゼラチン、コラーゲン、フィブリリン、メロシン、アンコリン（anchorin）、コンドロ

10

20

30

40

50

ネクチン、リンクタンパク質、骨シアロタンパク質、オステオカルシン、オステオポンチン、エピネクチン (epinection)、ヒアルロネクチン、アンジュリン (undulin)、エビリグリン及びカリニンの1つ以上を挙げることができる。他のECM成分としては、接着のための合成ペプチド (例えば、RGD又はIKVAVモチーフ)、合成ヒドロゲル (例えば、PEG、PLGA等) 又はアルギン酸塩などの天然ヒドロゲルを挙げることができる。例示的方法において、PSCは、内胚葉誘導の終わりまでの間などでMATRIGEL (登録商標) をコートした培養プレート上において成長させるか、又は第2段階中などでコラーゲン上において成長させる。一部の実施形態において、細胞接着タンパク質は、ヒトタンパク質である。

#### 【0078】

iPSCをヘパトサイト又はヘパトサイト様細胞に分化させる一般的な段階的方法は、当技術分野において公知であり、本方法に適用され得る。例えば、Chen et al. は、内胚葉誘導のため細胞をアクチビンA、Wnt3a及びHGFと共に培養する方法を記載しており；次に、細胞をロックアウトDMEMで培養し、且つ次にオンコスタチンM及びデキサメタゾンで成熟させる (Chen et al., 2012)。別の方法では、アクチビンA、BMP4及びFGF2の存在下でiPSCをDEに分化させ；細胞をBMP4及びFGF2下で更に培養して肝臓内胚葉に特異化させ；且つ次にHGF下で培養して未熟ヘパトサイトを誘導し；且つ次にOSM下で培養すると、成熟ヘパトサイトが作製される (Mallanna and Duncan, 2013)。更なる方法は、iPSCをアクチビンAと培養してDEを誘導することを含み、次に細胞をKO血清代替物培地で培養し、且つ次にROCK阻害薬と培養すると、スフェロイドが形成される (Ramamy et al., 2013)。iPSCをアクチビンA、FGF及びBMPと培養してDEを誘導し、FGF2及びBMP4と培養して肝前駆細胞を誘導し、HGFと培養して未熟ヘパトサイトを誘導し、且つ次にOSMと培養して成熟ヘパトサイトを作製し得る (Cai et al., 2013)。

#### 【0079】

1つの詳細な方法では、iPSCは、ヘパトサイト分化に向けてプレコンディショニングされ得、これは、細胞をGSK3阻害薬の存在下で培養して、細胞が多能性状態を抜け出すことを促進し、下流分化を改善することにより、細胞を胚体内胚葉 (DE) 細胞に分化するようにプレコンディショニングすることによって行われる。初めに、iPSCを内胚葉誘導培地でDE細胞に分化させることができる。iPSCは、MATRIGEL (登録商標) など、二次元培養で培養され得、次に第1段階終了時にヘパトブラストが三次元凝集培養に移され得る。ヘパトブラストの誘導及びヘパトサイトへの分化を含む本プロセスの第2段階中、細胞は、GSK3阻害薬の存在下で培養され得る。第3段階において、細胞形態の向上のため、ヘパトサイトをTGF阻害薬及び - セクレターゼ阻害薬の存在下で成熟させることができる。代わりに、ヘパトサイトは、SRCキナーゼ阻害薬及び任意選択でEPOの存在下において成熟させることができる。SRCキナーゼ阻害薬は、ボスチニブ、ダサチニブ、A419259、アルステルパウロン、AZM475271又はAZM475271であり得る。

#### 【0080】

##### A. 分化培地

細胞外マトリックスタンパク質は、天然起源であり、且つヒト又は動物組織から精製され得るか、又は代わりに、ECMタンパク質は、遺伝子操作された組換えタンパク質又は合成的な性質のものであり得る。ECMタンパク質は、全タンパク質であるか又はペプチド断片の形態であり得、未変性であるか又は操作され得る。細胞培養のためのマトリックスに有用であり得るECMタンパク質の例としては、ラミニン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンが挙げられる。一部の実施形態において、マトリックス組成物は、異種成分不含である。例えば、ヒト細胞を培養するための異種成分不含マトリックスには、ヒト起源のマトリックス成分が使用され得、ここでは、あらゆる非ヒト動物成分が排除されたものであり得る。

10

20

30

40

50

## 【0081】

一部の態様において、マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は、約  $1 \text{ ng/mL}$  ~ 約  $1 \text{ mg/mL}$  であり得る。一部の好ましい実施形態において、マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は、約  $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$  ~ 約  $300 \text{ }\mu\text{g/mL}$  である。より好ましい実施形態において、マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は、約  $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$  ~ 約  $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$  である。

## 【0082】

細胞は、具体的な各細胞集団の成長を支えるのに必要な栄養素と共に培養され得る。一般に、細胞は、炭素源、窒素源及び pH を維持するための緩衝液を含む成長培地で培養される。培地は、脂肪酸又は脂質、アミノ酸（非必須アミノ酸など）、1つ又は複数のビタミン、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、ビルビン酸、緩衝剤、pH 指示薬及び無機塩類も含有し得る。例示的成長培地は、幹細胞成長を増強するために非必須アミノ酸及びビタミンなどの様々な栄養素が補充された、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）又は ESSENTIAL 8（商標）（E8（商標））培地などの最小必須培地を含有する。最小必須培地の例としては、限定はされないが、最小必須培地イーグル（MEM）アルファ培地、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）、RPMI-1640 培地、199 培地及び F12 培地が挙げられる。加えて、最小必須培地には、ウマ、子ウシ又はウシ胎仔血清などの添加剤が補充され得る。代わりに、培地は、無血清であり得る。他の場合、成長培地は、幹細胞などの未分化細胞の培養下での成長及び維持に最適化された、本明細書において無血清製剤と称される「ノックアウト血清代替物」を含有し得る。KNOCK OUT（商標）血清代替物について、例えば、米国特許出願公開第 2002/0076747 号明細書（これは、参照により本明細書に援用される）に開示されている。好ましくは、PSC は、完全に規定され及びフィーダー細胞不含の培地で培養される。

## 【0083】

一部の実施形態において、培地は、任意の血清の代用品を含有しても又はしなくてもよい。血清の代用品としては、アルブミン（高脂質アルブミン、組換えアルブミンなどのアルブミン置換液、植物デンプン、デキストラン類及びタンパク質加水分解物など）、トランスフェリン（又は他の鉄輸送体）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロール又はこれらの均等物を適宜含有する材料を挙げることができる。血清の代用品は、例えば、国際公開第 98/30679 号パンフレットに開示される方法によって調製することができる。代わりに、更に簡便には、任意の市販材料を使用することができる。市販材料としては、KNOCK OUT（商標）血清代替物（KSR）、化学的に規定された脂質濃縮液（Gibco）及び GLUTAMAX（商標）（Gibco）を挙げることができる。

## 【0084】

他の培養条件も適宜限定することができる。例えば、培養温度は、約  $30 \sim 40$ 、例えば少なくとも又は約  $31$ 、 $32$ 、 $33$ 、 $34$ 、 $35$ 、 $36$ 、 $37$ 、 $38$ 、 $39$  であり得るが、特にこれに限定されない。一実施形態において、細胞は、 $37$  で培養される。 $\text{CO}_2$  濃度は、約  $1 \sim 10\%$ 、例えば約  $2 \sim 5\%$  又はここで導き出せる任意の範囲であり得る。酸素分圧は、少なくとも、最大で若しくは約  $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $20\%$  又はここで導き出せる任意の範囲であり得る。

## 【0085】

## a. プレコンディショニング培地

i PSC などの PSC が E8 培地に約  $15,000 \sim 20,000$  細胞/ $\text{cm}^2$  の細胞密度で約  $1$ 、 $2$ 、 $3$  又は  $4$  日間維持された後、細胞がプレコンディショニング培地（PCM）で約  $1$ 、 $2$  又は  $3$  日間培養され得る。例示的 PCM は、約  $1 \sim 5 \text{ }\mu\text{M}$ 、例えば約  $2$ 、 $3$  又は  $4 \text{ }\mu\text{M}$  など、特に約  $3 \text{ }\mu\text{M}$  及びその間にある全ての範囲、例えば  $1 \sim 3$ 、 $1 \sim 2$ 、 $2 \sim 4$ 、 $2 \sim 5$ 、 $2 \sim 3$ 、 $3 \sim 4$  又は  $3 \sim 5 \text{ }\mu\text{M}$  の CHIR99021 などの GSK3 阻害薬を含む。PCM は、RPMI 1640、無血清分化（SFD）培地（例えば、約  $5 \sim 15\%$ 、特に約  $10\%$ ）、glutamax（例えば、約  $0.5 \sim 5\%$ 、特に約  $1\%$ ）、モ

10

20

30

40

50

ノチオグリセロール (MTG) (例えば、約 250 ~ 750  $\mu$ M、特に約 450  $\mu$ M) 及びペニシリンストレプトマイシン (例えば、0.5% ~ 5%、特に約 1%) を更に含み得る。プレコンディショニングは、低酸素条件で実施され得る。

#### 【0086】

##### b. 内胚葉誘導培地

プレコンディショニング後、次に、iPSCは、第1の内胚葉誘導培地 (EIM T0) で約1又は2日間培養され得る。例示的EIM T0は、RPMI、SFD培地 (例えば、約5 ~ 15%、特に約10%)、glutamax (例えば、約0.5 ~ 5%、特に約1%)、MTG (例えば、約250 ~ 750  $\mu$ M、特に約450  $\mu$ M)、ペニシリンストレプトマイシン (例えば、0.5% ~ 5%、特に約1%) 及びアクチビンA (例えば、10 ~ 50 ng/mL、特に約20 ng/mL) を含む。詳細な態様において、EIM T0は、本質的にアスコルビン酸を含まないか、又はアスコルビン酸を含まない。

10

#### 【0087】

次に、細胞は、第2のEIM (EIM T1 - 2) で約1又は2日間、特に約2日間培養される。例示的EIM T1 - 2は、アスコルビン酸 (例えば、25 ~ 100  $\mu$ g/mL、特に約50  $\mu$ g/mL)、BMP4 (例えば、約1 ~ 5 ng/mL、特に約2.5 ng/mL)、bFGF (例えば、約1 ~ 10 ng/mL、特に約5 ng/mL) 及びVEGF (例えば、約10 ~ 50 ng/mL、特に約10 ng/mL) 含有のEIM T0培地を含む。

#### 【0088】

20

最後に、細胞は、第3のEIM (EIM T3 - 6) で約4、5、6、7、8、9又は10日間培養され、DE細胞が作り出される。EIM T3 - 6は、SFD、BMP4 (例えば、約1 ~ 5 ng/mL、特に約2.5 ng/mL)、bFGF (例えば、約1 ~ 10 ng/mL、特に約5 ng/mL)、VEGF (例えば、約10 ~ 50 ng/mL、特に約10 ng/mL) 及びジメチルスルホキシド (DMSO) (例えば、約0.1% ~ 1%、特に約0.5%) を含み得る。DE細胞への分化は、低酸素条件で実施され得る。DE細胞は、フローサイトメトリー又はqPCRによってCXCR4及びCD117の陽性発現が特徴付けられ得る。

#### 【0089】

##### c. ヘパトブラスト誘導培地 (第1段階)

30

次に、DE細胞は、ヘパトブラストの誘導によってヘパトサイト分化の第1段階を経る。DE細胞が、凝集塊など、三次元培養で培養されるか、又は二次元培養として培養されると、ヘパトブラストが形成され得る。ヘパトブラスト誘導培地 (HIM又は第1段階培地) は、SFD、BMP4 (例えば、約25 ~ 75 ng/mL、特に約50 ng/mL)、bFGF (例えば、約5 ~ 20 ng/mL、特に約10 ng/mL)、HGF (例えば、約10 ~ 50 ng/mL、特に約25 ng/mL)、VEGF (例えば、約10 ~ 50 ng/mL、特に約10 ng/mL)、ジメチルスルホキシド (DMSO) (例えば、約0.1% ~ 2%、特に約1%) 及びFGF-10 (例えば、約40 ~ 100 ng/mL、特に約60 ng/mL) を含み得る。

#### 【0090】

40

##### d. ヘパトサイト分化培地 (第2段階)

本プロセスの第2段階は、ヘパトブラストからヘパトサイトへの分化を含む。ヘパトブラストは、本質的に単一細胞の懸濁液に消化されて、2D培養物として平板に播かれ得るか、又はこの細胞懸濁液を使用して3D凝集塊を作成することができる。このヘパトサイト分化ステップは、2D又は3Dフォーマットで実施することができる。ヘパトサイト分化培地 (HDM又は第2段階) は、SFD、bFGF (例えば、約1 ~ 20 ng/mL、特に約10 ng/mL)、HGF (例えば、約50 ~ 200 ng/mL、特に約100 ng/mL)、オンコスタチンM (OSM) (例えば、約10 ~ 30 ng/mL、特に約20 ng/mL)、デキサメタゾン (例えば、約0.01 ~ 1  $\mu$ M、特に約0.1  $\mu$ M)、DMSO (例えば、約0.1% ~ 2%、特に約1%) 及びCHIR99021などのGS

50

K 3 阻害薬（例えば、約 1 ~ 5  $\mu$ M、例えば約 2、3 又は 4  $\mu$ M など、特に約 3  $\mu$ M）を含み得る。HDM は、VEGF 及び EGF を含まないことができる。第 2 段階プロセスは、4 日間低酸素及び 4 日間正常酸素など、低酸素での培養と、続く正常酸素での培養を含み得る。

#### 【0091】

e . ヘパトサイト成熟培地（第 3 段階）

最後に、ヘパトサイトは、約 7 ~ 10 日など、本プロセスの第 3 段階中に成熟させることができる。ヘパトサイト成熟培地（HMM 又は第 3 段階培地）は、ウィリアムス E 培地、B27 + ビタミン A（例えば、約 1 % ~ 5 %、特に約 2 %）、OSM（例えば、約 10 ~ 30 ng/mL、特に約 20 ng/mL）、デキサメタゾン（例えば、約 0.01 ~ 1  $\mu$ M、特に約 0.1  $\mu$ M）及びペニシリンストレプトマイシン（例えば、0.5 % ~ 5 %、特に約 1 %）を含み得る。HMM は、SB431542 などの TGF 阻害薬及びセクレターゼ阻害薬（例えば、約 1 ~ 20  $\mu$ M、特に約 10  $\mu$ M）及び DAPT（例えば、約 1 ~ 5  $\mu$ M、特に約 2  $\mu$ M）を更に含み得る。代わりに、HMM は、SRCキナーゼ阻害薬及び EPO を更に含み得る。成熟は、I 型コラーゲン上など、二次元培養下で実施され得る。HMM は、TGF 阻害薬及び MEK 阻害薬を含み得る。代わりに、HMM は、FH1、FPH1 及び / 又は メトキサミンを含み得る（Shan et al., 2013）。

10

#### 【0092】

B . 阻害薬

20

a . GSK3 阻害薬

グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3（GSK3）は、セリン及びスレオニンアミノ酸残基へのリン酸塩分子の付加を媒介するセリン / スレオニンプロテインキナーゼである。例示的阻害薬としては、CHIR99021、BIO、SB216763、CHIR98014、TWS119、SB415286 及びチデグルシブが挙げられる。

#### 【0093】

b . TGF 経路阻害薬

形質転換成長因子（TGF）は、ほとんどの細胞の増殖、細胞分化及び他の機能を制御する分泌タンパク質である。これは、免疫、癌、気管支喘息、肺線維症、心疾患、糖尿病及び多発性硬化症において役割を果たす一種のサイトカインである。TGF- には、TGF-1、TGF-2 及び TGF-3 と呼ばれる少なくとも 3 つのアイソフォームがある。TGF- ファミリーは、インヒビン、アクチビン、抗ミュー管ホルモン、骨形成タンパク質、デカペンタプレジック及び Vg-1 が含まれる形質転換成長因子スーパーファミリーとして公知のタンパク質スーパーファミリーの一部である。

30

#### 【0094】

TGF 経路阻害薬（本明細書では TGF 阻害薬とも称される）には、任意の TGF シグナル伝達阻害薬全般が含まれ得る。例えば、TGF 阻害薬は、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド（SB431542）、6-[2-(1,1-ジメチルエチル)-5-(6-メチル-2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-4-イル]キノキサリン（SB525334）、2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-2-ieri-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジンヒドロクロリド水和物（SB431542 ~ 505124）、4-(5-ベンゾール[1,3]ジオキソール-5-イル-4-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)-ベンズアミド水和物、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド水和物、左右決定因子（Lefty）、3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド（A83-01）、4-[4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシン-6-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド（D4476）、4-[4-[3-(2-ピリジニル)-

40

50

ル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] - 2 - ピリジニル] - N - ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル) - ベンズアミド ( G W 7 8 8 3 8 8 )、4 - [ 3 - ( 2 - ピリジニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] - キノリン ( L Y 3 6 4 8 4 7 )、4 - [ 2 - フルオロ - 5 - [ 3 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] フェニル] - 1 H - ピラゾール - 1 - エタノール ( R 2 6 8 7 1 2 ) 又は 2 - ( 3 - ( 6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1 , 5 - ナフチリジン ( R e p S o x ) である。

【 0 0 9 5 】

#### c . M E K 阻害薬

M E K 阻害薬は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ酵素 M E K 1 又は M E K 2 を阻害する化学物質又は薬物である。これを用いて M A P K / E R K 経路に影響を及ぼすことができる。例えば、M E K 阻害薬としては、N - [ ( 2 R ) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロボキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [ ( 2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル) アミノ] - ベンズアミド ( P D 0 3 2 5 9 0 1 )、N - [ 3 - [ 3 - シクロプロピル - 5 - ( 2 - フルオロ - 4 - ヨードアニリノ) - 6 , 8 - ジメチル - 2 , 4 , 7 - トリオキソピリド [ 4 , 3 - d ] ピリミジン - 1 - イル] フェニル] アセトアミド ( G S K 1 1 2 0 2 1 2 )、6 - ( 4 - ブロモ - 2 - フルオロアニリノ) - 7 - フルオロ - N - ( 2 - ヒドロキシエトキシ) - 3 - メチルベンズイミダゾール - 5 - カルボキサミド ( M E K 1 6 2 )、N - [ 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - ( 2 - フルオロ - 4 - ヨードアニリノ) - 6 - メトキシフェニル] - 1 - ( 2 , 3 - ジヒドロキシプロピル) シクロプロパン - 1 - スルホンアミド ( R D E A 1 1 9 ) 及び 6 - ( 4 - ブロモ - 2 - クロロアニリノ) - 7 - フルオロ - N - ( 2 - ヒドロキシエトキシ) - 3 - メチルベンズイミダゾール - 5 - カルボキサミド ( A Z D 6 2 4 4 ) が挙げられる。

【 0 0 9 6 】

#### d . S r c キナーゼ阻害薬

非受容体型タンパク質チロシンキナーゼ S r c ファミリーは、種々の細胞シグナル伝達経路において重要な役割を果たし、細胞分裂、運動性、接着、血管新生及び生存といった多様なプロセスを調節する。強力な可逆的 A T P 競合剤である P P 1 は、タンパク質チロシンキナーゼ S r c ファミリーの選択的阻害薬である。これは、E G F R キナーゼ ( I C 5 0 = 2 5 0 n M )、J A K 2 ( I C 5 0 = 5 0 μ M ) 又は Z A P - 7 0 ( I C 5 0 = 0 . 6 μ M ) の活性に大きい影響を及ぼすことなく、p 5 6 l c k ( I C 5 0 = 5 n M )、p 5 9 f y n T ( I C 5 0 = 6 n M )、H c k ( I C 5 0 = 2 0 n M ) 及び S r c ( I C 5 0 = 1 7 0 n M ) を阻害する。P P 1 は、S r c シグナル伝達とは無関係に I 型 T G F - 受容体を直接阻害することにより ( I C 5 0 = 5 0 n M )、T G F - 媒介性細胞応答も遮断する。一部の態様において、第 3 段階成熟培地には、P P 2、K B S R C 4、1 - ナフチル P P 1、M N S、P D 1 8 0 9 7 0 及びボスチニブを含む 1 つ以上の S r c キナーゼ阻害薬が 5 μ M など補充され得る。

【 0 0 9 7 】

#### e . ガンマセクレターゼ阻害薬

ガンマセクレターゼは、それ自体が膜内在性タンパク質である、1 回膜貫通タンパク質を膜貫通ドメイン内にある残基で切断する多サブユニットプロテアーゼ複合体である。この種のプロテアーゼは、膜内プロテアーゼとして公知である。ガンマセクレターゼの最もよく知られた基質は、アミロイド前駆体タンパク質であり、これは、大型の膜内在性タンパク質であり、セクレターゼ及びセクレターゼの両方によって切断されると、アミロイドと呼ばれる短いアミノ酸ペプチドを産生する。アミロイドの異常に折り畳まれた線維状の形態は、アルツハイマー病患者の脳に見られるアミロイド斑の主要な成分である。

【 0 0 9 8 】

ガンマセクレターゼ阻害薬は、本明細書では、セクレターゼ阻害薬全般を指す。例えば、セクレターゼ阻害薬としては、限定はされないが、N - [ ( 3 , 5 - ジフルオロフェニル) アセチル] - L - アラニル - 2 - フェニル] グリシン - 1 , 1 - ジメチルエ

10

20

30

40

50

チルエステル (DAPT)、5 - クロロ - N - [ ( 1 S ) - 3 , 3 , 3 - トリフルオロ - 1 - ( ヒドロキシメチル ) - 2 - ( トリフルオロメチル ) プロピル ] - 2 - チオフェンスルホンアミド ( ベガセスタット )、MDL - 2 8 1 7 0、3 , 5 - ビス ( 4 - ニトロフェノキシ ) 安息香酸 ( コンパウンド W )、7 - アミノ - 4 - クロロ - 3 - メトキシ - 1 H - 2 - ベンゾピラン ( J L K 6 )、( 5 S ) - ( t e r t - ブトキシカルボニルアミノ ) - 6 - フェニル - ( 4 R ) - ヒドロキシ - ( 2 R ) - ベンジルヘキサノイル ) - L - ロイシル - L - フェニルアラニンアミド ( L - 6 8 5 , 4 8 5 )、( R ) - 2 - フルオロ - - メチル [ 1 , 1 ' - ビフェニル ] - 4 - 酢酸 ( ( R ) - フルルビプロフェン ; フルリザン ( F l u r i z a n ) )、N - [ ( 1 S ) - 2 - [ [ ( 7 S ) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 - メチル - 6 - オキソ - 5 H - ジベンズ [ b , d ] アゼピン - 7 - イル ] アミノ ] - 1 - メチル - 2 - オキソエチル ] - 3 , 5 - ジフルオロベンゼンアセトアミド ( ジベンザゼピン ; DBZ )、N - [ c i s - 4 - [ ( 4 - クロロフェニル ) スルホニル ] - 4 - ( 2 , 5 - ジフルオロフェニル ) シクロヘキシル ] - 1 , 1 , 1 - トリフルオロメタンスルホンアミド ( M R K 5 6 0 )、( 2 S ) - 2 - [ [ ( 2 S ) - 6 , 8 - ジフルオロ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレニル ] アミノ ] - N - [ 1 - [ 2 - [ ( 2 , 2 - ジメチルプロピル ) アミノ ] - 1 , 1 - ジメチルエチル ] - 1 H - イミダゾール - 4 - イル ] ペンタンアミド二臭化水素酸塩 ( P F 3 0 8 4 0 1 4 臭化水素酸塩 ) 及び 2 - [ ( 1 R ) - 1 - [ [ ( 4 - クロロフェニル ) スルホニル ] ( 2 , 5 - ジフルオロフェニル ) アミノ ] エチル - 5 - フルオロベンゼンブタン酸 ( B M S 2 9 9 8 9 7 ) が挙げられる。

【 0 0 9 9 】

#### C . 凍結保存

本明細書に開示される方法によって作製されるヘパトプラスト又はヘパトサイトは、第 1 段階、第 2 段階又は第 3 段階など、本プロセスの任意の段階で凍結保存することができ、例えば米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 1 4 9 4 8 4 A 2 号明細書 ( これは、参照により本明細書に援用される ) を参照されたい。細胞は、基質と共に又は基質なしに凍結保存することができる。幾つかの実施形態において、貯蔵温度は、約 - 5 0 ~ 約 - 6 0 、約 - 6 0 ~ 約 - 7 0 、約 - 7 0 ~ 約 - 8 0 、約 - 8 0 ~ 約 - 9 0 、約 - 9 0 ~ 約 - 1 0 0 の範囲及びこれらの重複する範囲である。一部の実施形態において、凍結保存細胞の貯蔵 ( 例えば、維持 ) には、更に低い温度が用いられる。幾つかの実施形態において、細胞の貯蔵には、液体窒素 ( 又は他の類似の液状冷却剤 ) が使用される。更なる実施形態において、細胞は、約 6 時間を超えて貯蔵される。更なる実施形態において、細胞は、約 7 2 時間貯蔵される。幾つかの実施形態において、細胞は、4 8 時間 ~ 約 1 週間貯蔵される。更に他の実施形態において、細胞は、約 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 週間貯蔵される。更なる実施形態において、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 ヶ月間貯蔵される。細胞は、更に長い時間にわたって貯蔵することもできる。細胞は、別々に又は本明細書に開示される基質のいずれかなどの基質上に凍結保存することができる。

【 0 1 0 0 】

一部の実施形態において、追加の凍結保護物質を使用することができる。例えば、細胞は、DMSO、ヒト又はウシ血清アルブミンなどの血清アルブミンなど、1 つ以上の凍結保護物質を含む凍結保存溶液中で凍結保存することができる。特定の実施形態において、溶液は、約 1 %、約 1 . 5 %、約 2 %、約 2 . 5 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 % 又は約 1 0 % の DMSO を含む。他の実施形態において、溶液は、約 1 % ~ 約 3 %、約 2 % ~ 約 4 %、約 3 % ~ 約 5 %、約 4 % ~ 約 6 %、約 5 % ~ 約 7 %、約 6 % ~ 約 8 %、約 7 % ~ 約 9 % 又は約 8 % ~ 約 1 0 % のジメチルスルホキシド ( DMSO ) 又はアルブミンを含む。具体的な実施形態において、溶液は、2 . 5 % の DMSO を含む。別の具体的な実施形態において、溶液は、1 0 % の DMSO を含む。

【 0 1 0 1 】

細胞は、凍結保存中、例えば約 1 / 分で冷却され得る。一部の実施形態において、凍結保存温度は、約 - 8 0 ~ 約 - 1 8 0 又は約 - 1 2 5 ~ 約 - 1 4 0 である。一部



の実施形態において、細胞は、4 に冷却されてから、約1 /分で冷却される。凍結保存細胞は、使用のために解凍されるまで液体窒素気相に移し替えることができる。一部の実施形態では、例えば細胞が約-80 に達したところで、細胞は、液体窒素貯蔵場所に移される。凍結保存は、速度制御型フリーザーを使用して行うこともできる。凍結保存細胞は、例えば、約25 ~ 約40 の温度、典型的には約37 の温度で解凍され得る。

#### 【0102】

##### D. ヘパトサイトの精製及び特徴付け

本方法によって作製されるヘパトサイトは、ヘパトサイト細胞マーカーの選択によるなどして、濃縮されたヘパトサイト集団にするために精製され得る。CD133陽性発現に関して細胞が選別され得る。従って、本開示は、濃縮されたヘパトサイト集団を提供する。例示的な細胞集団は、ヘパトサイトを少なくとも約50%；好ましくは少なくとも約60%；70%；80%；90%；95%；98%及び最も好ましくは99%又は100%含む。

#### 【0103】

ヘパトサイトは、肝臓マーカー アンチトリプシン (AAT) 及び/又はアルブミンによって特徴付けることができる。細胞はまた、HNF-1、サイトケラチン (CK) 18及びアルブミンなど、ヘパトサイトの後期段階マーカーが陽性であり；初期ヘパトサイトマーカー、例えばHNF-30、GATA4、CK19、-フェトプロテインが存在せず；シトクロムP450遺伝子、例えばCYP1A1、CYP2B1、CYP2C6、CYP2C11、CYP2C13、CYP3A2及びCYP4A1を発現し；及び分極構造を獲得し得る。ヘパトサイト前駆細胞は、初期ヘパトサイトマーカーの存在によって検出され得る。肝細胞についての他の目的のマーカーとしては、1-アンチトリプシン、グルコース-6-ホスファターゼ、トランスフェリン、アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGR又はASGPR又はASGPR1)、CK7、-グルタミルトランスフェラーゼ；HNF-10、HNF-3a、HNF-4、トランスサイレチン、CFTR、apoE、グルコキナーゼ、インスリン成長因子 (IGF) 1及び2、IGF-1受容体、インスリン受容体、レプチン、apoAII、apoB、apoCIII、apoCII、アルドラーゼB、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、L型脂肪酸結合タンパク質、トランスフェリン、レチノール結合タンパク質及びエリスロポエチン (EPO) が挙げられる。

#### 【0104】

ヘパトサイト分化には転写因子HNF-4 が必要であることが報告されている (Liet al., Genes Dev. 14: 464, 2000)。HNF-4 発現に依存しないマーカーとしては、1-アンチトリプシン、-フェトプロテイン、apoE、グルコキナーゼ、インスリン成長因子1及び2、IGF-1受容体、インスリン受容体及びレプチンが挙げられる。HNF-4 発現に依存するマーカーとしては、アルブミン、apoAI、apoAII、apoB、apoCIII、apoCII、アルドラーゼB、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、L型脂肪酸結合タンパク質、トランスフェリン、レチノール結合タンパク質及びエリスロポエチン (EPO) が挙げられる。

#### 【0105】

かかるマーカーの発現レベルの評価は、他の細胞との比較で決定することができる。成熟ヘパトサイトマーカーの陽性対照としては、目的の種の成体ヘパトサイト及び米国特許第5,290,684号明細書に報告される肝芽腫に由来するHepG2株など、樹立されたヘパトサイト細胞株が挙げられる。陰性対照としては、成体線維芽細胞株など、別系統の細胞又は網膜色素上皮 (RPE) 細胞が挙げられる。

#### 【0106】

本開示において挙げられる組織特異的タンパク質及びオリゴ糖決定基は、任意の好適な免疫学的技法 - 細胞表面マーカーに対するフロー免疫細胞化学、細胞内又は細胞表面マーカーに対する免疫組織化学 (例えば、固定された細胞又は組織切片のもの)、細胞抽出物のウェスタンブロット分析及び細胞抽出物又は培地中に分泌される産物に対する酵素結合免疫測定法などを用いて検出することができる。細胞による抗原の発現は、任意選択で

10

20

30

40

50

細胞の固定後且つ任意選択で標識二次抗体又は他のコンジュゲート（ビオチン - アビジンコンジュゲートなど）を用いて標識を増幅して、標準的な免疫細胞化学又はフローサイトメトリーアッセイで有意に検出可能な量の抗体が抗原に結合することになる場合、「抗体検出可能」とされる。

#### 【0107】

組織特異的マーカーの発現は、ノーザンブロット分析、ドットブロットハイブリダイゼーション分析又は標準的な増幅方法において配列特異的プライマーを使用する逆転写酵素開始ポリメラーゼ連鎖反応（RT - PCR）により、mRNAレベルで検出することもできる。更なる詳細については、米国特許第5,843,780号明細書を参照されたい。本開示において挙げられる特定のマーカーの配列データは、GenBankなどの公開データベースから入手することができる。mRNAレベルでの発現は、典型的な制御された実験で標準的手順に従い、細胞試料に対してアッセイを実施した結果、明確に識別可能なハイブリダイゼーション又は増幅産物が得られる場合、本開示に記載されるアッセイの1つにより「検出可能」とされる。タンパク質又はmRNAレベルで検出されるとおりの組織特異的マーカーの発現は、未分化iPS細胞、線維芽細胞又は他の無関係の細胞型など、対照細胞と比べてそのレベルが少なくとも2倍、好ましくは10倍又は50倍を超えて上回る場合に陽性で見なされる。

#### 【0108】

細胞は、それがヘパトサイト系統の細胞に特徴的な酵素活性を示すかどうかに基づいて特徴付けることもできる。例えば、グルコース - 6 - ホスファターゼ活性に関するアッセイは、Bublitz (Mol Cell Biochem. 108: 141, 1991) ; Yasmineh et al. (Clin. Biochem. 25: 109, 1992) ; 及びOckerman (Clin. Chim. Acta 17: 201, 1968) によって記載されている。肝細胞におけるアルカリホスファターゼ（ALP）及び5 - nukleotidase（5' - Nアーゼ）に関するアッセイは、Shiojiri (J. Embryol. Exp. Morph. 62: 139, 1981) によって記載されている。研究及び医療産業部門に携わる幾つもの研究所が、肝酵素に関するアッセイを商業サービスとして提供している。

#### 【0109】

シトクロムp450は、モノオキシゲナーゼ系の鍵となる触媒成分である。これは、生体異物（投与された薬物）及び多くの内因性化合物の酸化的代謝に関与するヘムタンパク質ファミリーを成す。異なるシトクロムが特徴的な重複する基質特異性を示す。生体内変換能力の大部分は、1A2、2A6、2B6、3A4、2C9 - 11、2D6及び2E1と命名されているシトクロムに帰することができる (Gomes - Lechon et al., pp 129 - 153 in "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997)。

#### 【0110】

当技術分野では、シトクロムp450酵素活性を測定するための幾つものアッセイが公知である。例えば、p450活性によって蛍光生成物に変換可能な非蛍光基質を細胞に接触させて、次に蛍光活性化細胞のカウントによって分析することができる（米国特許第5,869,243号明細書）。具体的には、細胞を洗浄し、次に10 µM/L 5,6 - metoxycarbonylfluorescein (Molecular Probes, Eugene OR) の溶液と共に暗所下37 °Cで15分間インキュベートする。次に、細胞を洗浄し、培養プレートからトリプシン処理し、蛍光発光に関して約520 ~ 560 nmで分析する。線維芽細胞などの対照細胞と比べて供試細胞の活性レベルが2倍を超えて上回る、好ましくは10倍又は100倍を超えて上回る場合、本開示における酵素のいずれかに関する活性のエビデンスがあると決定される。

#### 【0111】

シトクロムp450の発現は、タンパク質レベルにおいて、例えばウエスタンブロットにおいて特異的抗体を使用して測定することもできるか、又はmRNAレベルでノーザン

10

20

30

40

50

プロット又はRT-PCRにおいて特異的プローブ及びプライマーを使用して測定することもできる。Borlakoglu et al., Int. J. Biochem. 25: 1659, 1993を参照されたい。p450系の特定の活性: 7-エトキシマリンO-デエチラーゼ活性、アルコキシレゾルフィンO-デアルキラーゼ活性、クマリン7-ヒドロキシラーゼ活性、p-ニトロフェノールヒドロキシラーゼ活性、テストステロンヒドロキシ化、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性、グルタチオンS-トランスフェラーゼ活性などを測定することもできる(Gomes-Lechon et al., pp 411-431 in "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997にレビューされている)。次に、活性レベルを初代ヘパトサイトのレベルと比較することができる。

10

#### 【0112】

小分子薬物の抱合、代謝又は解毒に関わる酵素に関するアッセイも利用可能である。例えば、細胞は、尿路又は胆道を通した排泄に関して、ビリルビン、胆汁酸及び小分子薬物を抱合する能力によって特徴付けることができる。細胞を好適な基質と接触させて、好適な時間にわたってインキュベートし、次に培地を(GCMS又は他の好適な技法によって)分析することにより、抱合生成物が形成されたかどうかを決定する。薬物代謝酵素活性としては、脱エチル化、脱アルキル化、ヒドロキシ化、脱メチル化、酸化、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、グルタチオン抱合及びN-アセチルトランスフェラーゼ活性が挙げられる(A. Guillouzo, pp 411-431 in "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997)。アッセイは、フェナセチン脱エチル化、プロカインアミドN-アセチル化、パラセタモール硫酸抱合及びパラセタモールグルクロン酸抱合を含む(Chesne et al., pp 343-350 in "Liver Cells and Drugs", A. Guillouzo ed. John Libbey Eurotext, London, 1988)。

20

#### 【0113】

ヘパトサイト系統の細胞は、そのグリコーゲン貯蔵能力に関して評価することもできる。好適なアッセイは、過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色を用いるものであり、PASは、単糖類及び二糖類と反応しないが、グリコーゲン及びデキストランなどの長鎖ポリマーを染色する。PAS反応から、複合糖質並びに可溶性及び膜結合型糖質化合物の定量的推定値が得られる。Kirkeby et al. (Biochem. Biophys. Meth. 24: 225, 1992)は、糖質化合物及びデタージェントの定量的PASアッセイについて記載している。van der Laarse et al. (Biotech Histochem. 67: 303, 1992)は、PAS反応を用いたグリコーゲンに関するマイクロデンストメトリーによる組織化学アッセイについて記載している。線維芽細胞などの対照細胞と比べて細胞が少なくとも2倍、好ましくは10倍を超えて上回るレベルでPAS陽性である場合、グリコーゲン貯蔵のエビデンスがあると決定される。細胞は、標準方法による核型タイピングによって特徴付けることもできる。

30

#### 【0114】

##### III. 使用方法

40

本開示は、ヘパトサイト系統の細胞を多数作製し得る方法を提供する。こうした細胞集団は、幾つもの重要な研究、開発及び商業目的で使うことができる。それらとしては、限定はされないが、幾つか例を挙げれば、インビボでの細胞の移植又は植え込み; インビトロでの、抗ウイルス薬、細胞毒性化合物、発癌物質、突然変異原、成長/調節因子、医薬化合物等のスクリーニング; 肝疾患及び感染症の機序の解明; 薬物及び/又は成長因子が働く機序の研究; 患者の癌の診断及びモニタリング; 遺伝子療法; 及び生物学的活性のある製剤の生産が挙げられる。

#### 【0115】

ヘパトサイトは、代謝プロファイリングにも使用することができる。一実施形態では、細胞又はその画分、例えばミクロソーム画分を試験薬剤と場合により種々の濃度において

50

且つ種々の時間にわたって接触させ、培地を回収して分析することにより、代謝された形態の試験薬剤を検出する。任意選択で、ブフラロールなどの対照分子も使用する。代謝プロファイリングを用いると、例えば対象が特定の薬物を代謝するかどうか、代謝する場合にはその薬物がどのように代謝されるかを決定することができる。かかるアッセイには、使用されるヘパトサイトはその対象に由来することが好ましい。

#### 【0116】

この本開示は、恐らく急性、慢性又は遺伝性肝機能障害に起因するであろう、かかる療法を必要としている対象に対してある程度の肝機能を回復させるためのヘパトサイトの使用も提供する。

#### 【0117】

本開示は、カプセル化された又はバイオ人工肝臓装置の一部であるヘパトサイトを含む。様々な形態のカプセル化は、“Cell Encapsulation Technology and Therapeutics”, Kuhtreiber et al. eds., Birkhauser, Boston Mass., 1999に記載されている。本細胞は、インビトロ又はインビボのいずれでの使用向けにもかかる方法に従ってカプセル化することができる。

#### 【0118】

臨床使用向けのバイオ人工臓器は、肝機能障害を有する個体を支援するように - 長期療法の一部として支援するか、又は劇症肝不全と肝臓再構成若しくは肝移植との間の時間をつないで支援するかのいずれかで - 設計される。懸濁液タイプのバイオ人工肝臓は、透析プレート内にて懸濁されるか、又は好適な基材中にマイクロカプセル化されるか、又は細胞外マトリックスがコートされたマイクロキャリアビーズに取り付けられた細胞を含む。代わりに、ヘパトサイトは、充填床にある固体支持体上、多段式の平床、マイクロチャンネルスクリーン上又は周囲を囲む中空系キャピラリーに置くことができる。この装置は、対象の血液が通過する入口及び出口並びに場合により細胞に栄養素を供給するためのポートの別の組を有する。

#### 【0119】

本ヘパトサイトは、例えば、細胞の分化又は代謝に影響を及ぼす候補化合物又は環境条件のスクリーニングにも使用され得る。ヘパトサイトは、例えば、遺伝子発現パターンの研究のために又は医薬製剤中の活性成分として、細胞特異的抗体製剤及び細胞特異的 cDNA ライブラリを入手するために更に使用され得る。別の実施形態において、ヘパトサイトは、それを必要としている対象に投与される。細胞は、対象の肝臓に例えば組織の再構成又は再生のために投与することができる。細胞は、意図した組織部位への細胞のグラフト化及び機能欠損領域における再構成又は再生を可能にする方法で投与され得る。投与前、細胞は、対象から細胞への又はその逆の免疫反応（移植片対宿主病）を抑制するように、当技術分野において公知の方法に従って修飾され得る。

#### 【0120】

ヘパトサイトは、C型肝炎感染症によって起こるなど、完全な又は部分的な肝不全を有する対象に投与され得る。ヘパトサイトは、肝損傷を修復する能力に関して動物モデルで評価することができる。かかる1つの例は、D-ガラクトサミンの腹腔内注射によって引き起こされる損傷である。処置の有効性は、肝細胞マーカーに関する免疫細胞化学的染色、成長中の組織に毛細胆管構造が形成されるかどうかの顕微鏡的決定及びその処置が肝臓特異的タンパク質の合成を回復させる能力によって決定することができる。

#### 【0121】

##### A. 医薬組成物

ヘパトサイトと薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物及び製剤も本明細書で提供される。

#### 【0122】

従って、本発明における対象への投与のための細胞組成物は、医薬品として使用できる製剤にするための化合物の加工処理を促進する賦形剤及び助剤を含む1つ以上の生理学的

10

20

30

40

50

に許容可能な担体を使用した任意の従来方法で製剤化され得る。適切な製剤は、選択の投与経路に依存する。ヘパトサイトは、治療法において、直接的な投与によるか、又は劇症肝不全後に対象の肝組織が自己再生する間に一時的な肝機能を提供する生体支援装置の一部として使用することができる。医薬製剤における一般的原理については、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morsdyn ii W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; 及び Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000 が読者の参考となる。本組成物は、組織再生又は治療上重要な代謝機能の回復における細胞の使用に関する説明文書と共に包装され得る。

10

#### 【0123】

本明細書に記載されるとおりの医薬組成物及び製剤は、所望の程度の純度を有する活性成分（細胞など）を1つ以上の任意選択の薬学的に許容可能な担体と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製され得る（Remington's Pharmaceutical Sciences 22<sup>nd</sup> edition, 2012）。薬学的に許容可能な担体は、概して、用いられる投薬量及び濃度で被投与者にとって非毒性であり、限定はされないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメチルアンモニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン類；カテコール；レスルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリン類を含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体としては、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）などの組織内薬物分散剤、例えばrHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質が更に挙げられる。特定の例示的HASEGP及び使用方法については、rHuPH20を含めて、米国特許出願公開第2005/0260186号明細書及び同第2006/0104968号明細書に記載されている。一態様において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

20

30

#### 【0124】

##### B. 試験化合物スクリーニング

この本開示の細胞は、本明細書で提供される細胞の特徴に影響を及ぼす因子（溶媒、小分子薬物、ペプチド及びポリヌクレオチドなど）又は環境条件（培養条件又は操作など）のスクリーニングに使用することができる。

40

#### 【0125】

本開示の詳細なスクリーニング適用は、薬物研究における医薬化合物の試験に関する。概して、標準的なテキストであるIn vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997) が読者の参考となる。本開示の特定の態様において、薬剤処理を受けたヘパトサイトは、これまで短期培養下のヘパトサイト細胞株又は初代ヘパトサイトに対して実施されているとおりの標準的な薬物スクリーニング及び毒性アッセイの供試細胞の役割を果たす。候補医薬化合物の活性の評価には、概して、本開示の特定の態様において提供される細胞を候補化合

50

物と組み合わせること、化合物に起因し得る細胞の形態、マーカー表現型又は代謝活性の（未処理細胞又は不活性化化合物で処理した細胞と比較した）任意の変化を決定すること、次に化合物の効果を観察された変化と関連付けることが関わる。スクリーニングは、化合物が肝細胞に薬理効果を及ぼすように設計されるという理由又は他の部分に効果を及ぼすように設計された化合物が意図しない肝臓副作用を有し得るという理由のいずれかで行われ得る。2つ以上の薬物を組み合わせて試験すると（細胞と同時に又は順次のいずれかで組み合わせることにより）、可能性のある薬物間相互作用効果を検出し得る。

#### 【0126】

一部の適用では、化合物は、初めに、肝毒性の可能性に関してスクリーニングされる（Castell et al., 1997）。まず、細胞生存能力、生存、形態及び培養培地中への酵素の漏出に及ぼす効果によって細胞毒性を決定し得る。化合物が毒性を生じることなく細胞機能（糖新生、尿素生成及び血漿タンパク質合成など）に影響を及ぼすかどうかを決定するため、更に詳細な分析が行われる。肝アイソザイム（V型）は、培養条件下で安定しており、12～24時間のインキュベーション後、培養上清において再現性よく測定することが可能であるため、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）は、良好なマーカーである。ミトコンドリアグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼなどの酵素の漏出も用いることができる。Gomez - Lechon et al. (1996) は、グリコーゲンを測定するマイクロアッセイについて記載しており、これは、医薬化合物がヘパトサイト糖新生に及ぼす効果の測定に用いることができる。

#### 【0127】

肝毒性を判定するための現行の他の方法としては、アルブミン、コレステロール及びリポタンパク質の合成及び分泌；抱合胆汁酸及びビリルビンの輸送；尿素生成；シトクロムP450レベル及び活性；グルタチオンレベル； - グルタチオンS - トランスフェラーゼの放出；ATP、ADP及びAMP代謝；細胞内K<sup>+</sup>及びCa<sup>2+</sup>濃度；核マトリックスタンパク質又はオリゴヌクレオソームの放出；及びアポトーシスの誘導（細胞円形化、クロマチン凝縮及び核断片化が指標となる）の決定が挙げられる。DNA合成は、[<sup>3</sup>H] - チミジン又はBr d U取込み量として測定することができる。薬物がDNA合成又は構造に及ぼす効果は、DNA合成又は修復を測定することによって決定され得る。[<sup>3</sup>H] - チミジン又はBr d U取込み量、特に細胞周期中の予定外の時点におけるもの又は細胞複製に必要なレベルを上回るものは、薬物効果と一致する。望ましくない効果としては、中期の広がりによって決定される異常な姉妹染色分体交換率も挙げることができる。更なる詳細については、Vickers (1997) が読者の参考となる。

#### 【0128】

##### C. 肝臓療法及び移植

本開示は、恐らく急性、慢性又は遺伝性肝機能障害に起因するであろう、かかる療法を必要としている対象に対してある程度の肝機能を回復させるための、本明細書で提供されるヘパトサイトの使用も提供する。

#### 【0129】

本明細書で提供される細胞が治療適用に適合するかを決定するため、初めに、細胞を好適な動物モデルで試験することができる。1つのレベルでは、細胞は、生存し且つその表現型を維持するその能力に関してインビボで評価される。本明細書で提供される細胞は、免疫不全動物（SCIDマウス又は化学的に若しくは照射によって免疫不全にされた動物など）に対して、腎被膜下、脾臓内又は肝小葉内など、それ以降の観察に適した部位に投与される。数日～数週間又はそれを超える期間が経った後に組織が回収され、多能性幹細胞などの出発細胞型がなおも存在するかどうかの評価される。これは、被投与細胞に検出可能標識（緑色蛍光タンパク質又は - ガラクトシダーゼなど）を提供することによるか；又は被投与細胞に特異的な構成的マーカーを測定することにより実施され得る。本明細書で提供される細胞がげっ歯類モデルで試験されるものである場合、被投与細胞の存在及び表現型は、ヒト特異的抗体を用いた免疫組織化学又はELISAによるか、又はヒトポ

リヌクレオチド配列に特異的であるように増幅を生じさせるプライマー及びハイブリダイゼーション条件を用いたRT-PCR分析により評価することができる。mRNA又はタンパク質レベルでの遺伝子発現の評価に好適なマーカーは、本開示の他の部分に提供される。動物モデルでヘパトサイトの運命を決定することについての一般的な説明は、Grompe et al. (1999); Peeters et al. (1997); 及びOhashi et al. (2000) に提供される。

#### 【0130】

別のレベルでは、本明細書で提供される細胞は、全肝機能を欠いている動物で肝機能を回復させるその能力に関して評価される。Braun et al. (2000) は、HSV-tk 遺伝子に関してトランスジェニックのマウスにおける毒素誘導性肝疾患モデルを概説する。Rhim et al. (1995) 及びLieber et al. (1995) は、ウロキナーゼの発現による肝疾患モデルを概説する。Mignon et al. (1998) は、細胞表面マーカーFasに対する抗体によって誘導される肝疾患を概説する。Overturf et al. (1998) は、Fah 遺伝子の標的化した破壊によってマウスの遺伝性チロシン血症I型モデルを開発した。この動物は、2-(2-ニトロ-4-フルオロ-メチル-ベンゾイル)-1,3-シクロヘキサジオン(NTBC)の補給を与えることによって欠損からレスキューできるが、NTBCを休薬すると肝疾患を発症する。急性肝疾患は、90%の肝切除によってモデリングし得る(Kobayashi et al., 2000)。急性肝疾患は、ガラクトサミン、CCl<sub>4</sub>又はチオアセトアミドなどのヘパトトキシンで動物を処理することによってもモデリングされ得る。

#### 【0131】

肝硬変などの慢性肝疾患は、線維化を誘導するのに十分に長く亜致死量のヘパトトキシンで動物を処理することによってモデリングされ得る(Rudolph et al., 2000)。本明細書で提供される細胞が肝機能を再構成する能力の評価には、かかる動物に細胞を投与すること、次に病態の進行に関して動物をモニタしながら、1~8週間の期間又はそれを超えて生存を決定することが関わる。肝機能に及ぼす効果は、肝組織に発現するマーカー、シトクロムP450活性並びに血液指標、例えばアルカリホスファターゼ活性、ビリルビン抱合及びプロトロンビン時間など、並びに宿主の生存を判定することによって決定され得る。これらの判定基準のいずれかによるとき、生存、疾患進行又は肝機能の維持に改善があれば、それは、治療法の有効性に関係があり、更なる最適化につながり得る。

#### 【0132】

その代謝酵素プロファイルによって望ましい機能的特性を実証するか、又は動物モデルで有効性を実証する本開示の特定の態様に提供される細胞は、肝機能障害を有するヒト対象への直接的な投与にも好適であり得る。止血目的では、細胞は、循環に適切に到達できる任意の部位、典型的には腹腔内に投与することができる。一部の代謝及び解毒機能には、細胞が胆道に到達できることが有利である。従って、細胞は、肝臓(例えば、慢性肝疾患の処置において)又は脾臓(例えば、劇症肝不全の処置において)の近傍に投与される。1つの方法では、細胞は、留置カテーテルを通した注入によって肝動脈又は門脈のいずれかから肝循環中に投与される。門脈のカテーテルは、細胞が主に脾臓若しくは肝臓又は両方の組み合わせに流れ込むように操作することができる。別の方法では、細胞は、標的器官の近傍の腔に、典型的にはポータスとその場に保持し得る賦形剤又はマトリックスにポータスを置くことにより投与される。別の方法では、細胞は、肝葉内又は脾臓内に直接注射される。

#### 【0133】

本開示の特定の態様に提供される細胞は、肝機能を回復させるか又は補足する必要のある任意の対象の治療法に使用することができる。かかる治療法に適切であり得るヒト病態としては、任意の原因による劇症肝不全、ウイルス性肝炎、薬物性肝傷害、肝硬変、遺伝性肝機能不全(ウィルソン病、ジルベール症候群又は1-アンチトリプシン欠乏症など)、肝胆道癌、自己免疫性肝疾患(自己免疫性慢性肝炎又は原発性胆汁性肝硬変など)及

び肝機能障害を生じさせる任意の他の病態が挙げられる。ヒト療法について、用量は、概して、約  $10^9 \sim 10^{12}$  細胞、典型的には約  $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$  細胞であり、対象の体重、病気の性質及び重症度並びに被投与細胞の複製能に合わせて調整が行われる。処置様式及び適切な用量の決定に関する最終的な責任は、管理する臨床医にある。

#### 【0134】

##### D．肝臓支援装置における使用

本開示の特定の態様は、カプセル化されるか又はバイオ人工肝臓装置の一部である本明細書で提供される細胞を含む。様々な形態のカプセル化は、Cell Encapsulation Technology and Therapeutics, 1999に記載されている。本開示の特定の態様に提供されるヘパトサイトは、インビトロ又はインビボのいずれでの使用向けにもかかる方法に従ってカプセル化することができる。

10

#### 【0135】

臨床使用向けのバイオ人工臓器は、肝機能障害を有する個体を支援するように - 長期療法の一部として支援するか、又は劇症肝不全と肝臓再構成若しくは肝移植との間の時間をつないで支援するかのもので設計される。バイオ人工肝臓装置については、Macdonald et al. (1999)によってレビューされており、米国特許第5,290,684号明細書、同第5,624,840号明細書、同第5,837,234号明細書、同第5,853,717号明細書及び同第5,935,849号明細書に例示されている。懸濁液タイプのバイオ人工肝臓は、透析プレート内にて懸濁されるか、好適な基材中にマイクロカプセル化されるか、又は細胞外マトリックスがコートされたマイクロキャリアーズに取り付けられた細胞を含む。代わりに、ヘパトサイトは、充填床にある固体支持体上、多段式の平床、マイクロチャネルスクリーン上又は周囲を囲む中空系キャピラリーに置くことができる。この装置は、対象の血液が通過する入口及び出口並びに場合により細胞に栄養素を供給するためのポートの別の組を有する。

20

#### 【0136】

細胞は、先述の方法のとおり調製され、次に装置内のMATRIGEL（登録商標）又はコラーゲンのマトリックスなどの好適な基質上に播かれる。装置の有効性は、輸入管内の血液組成を輸出管内と - 輸入流から取り除かれた代謝産物及び輸出流中の新規に合成されたタンパク質の点で - 比較することにより評価され得る。

#### 【0137】

30

この種の装置を使用して、血液などの体液を解毒することができ、ここで、細胞が体液中の毒素を取り除く又は修飾することが許容される条件下において、本開示の特定の態様に提供されるヘパトサイトと体液を接触させる。解毒には、通常肝臓によって処理される少なくとも1つのリガンド、代謝産物又は他の化合物（天然又は合成のいずれも）を取り除くか又は改変することが関わることになる。かかる化合物としては、限定はされないが、ビリルビン、胆汁酸、尿素、ヘム、リポタンパク質、糖質、トランスフェリン、ヘモペキシン、アシアロ糖タンパク質、インスリン及びグルカゴンなどのホルモン並びに種々の小分子薬物が挙げられる。この装置を使用すると、アルブミン、急性期反応物質及び無負荷キャリアータンパク質などの合成タンパク質に関して輸出性体液を濃縮することもできる。この装置は、種々のこうした機能が果たされ、それによって必要とされるだけの数の肝機能が回復するように最適化することができる。治療的ケアのコンテキストでは、本装置は、肝細胞不全の患者から流れる血液を処理し、次にその血液が患者に戻される。

40

#### 【0138】

##### E．商業、治療及び研究目的での流通

一部の実施形態において、製造、流通又は使用における任意の時点で存在する、細胞を含む試薬システムが提供される。本キットは、本開示に記載される細胞の任意の組み合わせを、多くの場合に同じゲノムを共有する未分化多能性幹細胞又は他の分化細胞型との組み合わせで含み得る。各細胞型は、一緒に包装されるか、又は同じ施設で別個の容器に包装されるか、又は異なる場所で、同じ又は異なる時点で、同じ実体又はビジネス上の関係を共有する異なる実体の管理下で包装され得る。医薬組成物は、任意選択で、機構的毒性

50



学など、所望の目的に関する説明文書と共に好適な容器に包装され得る。

【0139】

一部の実施形態において、例えば、細胞の作製のための1つ以上の培地及び成分を含み得るキットが提供される。この試薬システムは、適切な場合、水性媒体中又は凍結乾燥形態のいずれでも包装され得る。本キットの容器手段としては、概して、成分を入れることのできる少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ又は他の容器手段が挙げられることになり、好ましくは好適にアリコートに分けられる。キットに2つ以上の成分がある場合、本キットは、概して、追加の成分が別個に入れられ得る第2、第3又は他の追加の容器も含むことになる。しかしながら、バイアルには、成分の様々な組み合わせが含まれ得る。キットの成分は、1つ又は複数の乾燥粉末として提供され得る。試薬及び/又は成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、好適な溶媒を加えることによって再構成され得る。溶媒も別の容器手段に提供され得ることが想定される。本開示のキットは、典型的には、市販用に1つ又は複数のキット成分を厳重に密封した状態で収容する手段も含むことになる。かかる容器としては、所望のバイアルを保持する射出成形又はブロー成形プラスチック容器を挙げることができる。本キットは、印刷された形式又は電子形式、例えばデジタル形式などの使用説明書も含むことができる。

10

【実施例】

【0140】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。当業者は、以下の実施例に開示される技法が、本発明の実施において良好に機能することが本発明者によって発見された技法に相当し、従ってその実施の好ましい態様を構成すると見なされ得ることを理解するはずである。しかしながら、当業者は、本開示を踏まえ、開示されている具体的な実施形態に対する多くの変更形態がなされ得、それらがなお本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく同様の又は類似した結果を達成し得ることを理解するはずである。

20

【0141】

実施例1 - ヘパトサイト分化プロセスの開発及び特徴付け

ヘパトサイト分化のプロセスにおける幾つかのステップを試験し、細胞マーカー及び細胞形態によって評価したときに成熟しているヘパトサイトの作製に最適化した。

【0142】

ヘパトサイトを作製するための分化プロセスは、iPSCからDE細胞への分化後、それを誘導してヘパトブラストを形成させて、次にヘパトサイトに分化させることを含む。

30

【0143】

iPSC細胞を低酸素条件下(5%O<sub>2</sub>)でE8培地中のMATRIGEL(登録商標)に維持し、0.5mM EDTAを用いて約4~5日毎に分割した。iPSC培養物を約10継代にわたって低酸素に順化させた後、ヘパトサイト分化を開始した。MATRIGEL(登録商標)をコートした6ウェルプレート又はT150フラスコに出発iPSC細胞培養物を15~20k/cm<sup>2</sup>で播種した。播種から2日後、培地をプレコンディショニング培地(PCM)に交換し、2~3日にわたって毎日補給した。アクチピンを含有する培地(DE 0日目培地、T0培地とも称される)に細胞を置くことにより、内胚葉誘導を実施した。1~2日目、アクチピンを含有するDE 1~2日目培地(T1-T2培地とも称される)に培地を交換し、その後、2日間にわたって低濃度のBMP4、VEGF及びFGF2を加えた。3~9日目、アクチピン、BMP4及びVEGFを補充された基本培地SFDを含むDE 3~9日目(T3-T6培地とも称される)に培地を交換した。10日目、培養物のサンプリングを実施して、染色により胚体内胚葉細胞の割合を見た。温かいTrypLEを使用して細胞を37℃で5~7分間個別化し、クエンチした。表面染色を実施して、Tra181、CXCR4、CD117のレベルをフローサイトメトリーによって定量化した。中内胚葉誘導因子BMP4、VEGF、FGFをデキサメタゾン、DMSO、肝細胞増殖因子及びFGFと共に含有するヘパトサイト誘導第1段階培地に培養物を移し、6日の期間にわたって胚体内胚葉細胞からヘパトブラストへの変換を促し

40

50

た。16日目まで、48時間毎に細胞に新鮮なヘパサイト誘導培地を補給した。17日目、TrypLEを使用して培養物全体を回収した。次に、回収された細胞を凍結保存した。凍結保存は、スピンの後に上清培地を吸引することにより実施し、細胞ペレットをBambanker溶液に500万～1000万細胞/mLで再懸濁し、コントロールレートフリーザーにおいて一定に冷却した後、続いて液体窒素に貯蔵した。

#### 【0144】

代わりに、細胞が個別化されている細胞懸濁液を凝集塊形成のための培地に置いた。細胞を第2段階ヘパサイト分化培地+プレビスタチンに置いた。凝集塊形成は、 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で開始した。細胞は、静止条件下でT75 ULAフラスコに入れるか、又は低酸素条件下でスピナーフラスコに入れた。18日目、第2段階+CHIR99021培地に培地を交換し、1日おきに24日目まで補給した。20日目、培養物を低酸素条件から正常酸素条件に移した。23日目、染色分析のために培養物のサンプリングを実施した。温かいTrypLEを使用して凝集塊を37℃で5～7分間消化させて、クエンチした。単一細胞をLive/Dead Redによって室温で15分間処理した後、4%PFA溶液によって室温で15分間固定した。細胞内染色によるAAT、ASGPR、アルブミン及び対応するアイソタイプのレベルの定量化をフローサイトメトリーで実施した。25日目、分化プロセスの第2段階終了時に培養物を回収し、凍結保存した。これがAAT陽性ヘパサイトの凍結保存を提供する。AATの細胞内発現は、CD133の表面発現と相関する。この特徴により、ヘパサイト分化の第2段階終了時にCD133陽性細胞を磁気選別して、純粋なAAT陽性ヘパサイト集団を凍結保存するという選択肢が可能になる。第2段階終了ヘパサイトの凍結保存は、消化後の細胞ペレットをBambanker溶液に500万～2000万細胞/mLで再懸濁することにより実施し、コントロールレートフリーザーにおいて一定に冷却した後、続いて液体窒素に貯蔵した。第2段階ヘパサイトの凍結保存には、プロテアーゼ阻害薬及びMATRIGEL（登録商標）のようなECMの添加を含めることができる。

#### 【0145】

第1段階終了時に凍結保存した細胞は、I型コラーゲンをコートしたプレート上で解凍することができる。第1段階細胞を第2段階、次に第3段階に16～18日間の培養で成熟させることにより、成熟ヘパサイトを生じさせた。第3段階の成熟では、I型コラーゲンをコートしたプレート上に第2段階終了細胞を置き、プレATING後8～10で、古典的な敷石状の多角形形態を有する成熟AAT/アルブミン陽性発現成熟ヘパサイトの存在を可視化することができる。

#### 【0146】

この最適化したヘパサイト分化プロセスを導き出すため、幾つかの実験を実施した。第一に、本ヘパサイト分化方法の種々の段階でGSK3阻害薬CHIR99021の効果を評価した。成長因子の非存在下及び基本非iPSC培地でCHIRプレコンディショニングを実施した。

#### 【0147】

このプレコンディショニングは、TRA1-81染色並びに多能性遺伝子POU5F1（転写因子OCT4をコードする遺伝子）及びNANOGの発現の劇的低下からも明らかとなり、細胞が多能性状態から抜け出すことを増進することにおいて特に価値があることが観察された。この低下に付随した良好なDE誘導レベルは、DEマーカーCXCR4及びCD117のフローサイトメトリー染色によって示された（図6）。

#### 【0148】

次のステップは、iPSCのCHIRプレコンディショニングの最適なタイミングを決定し、プレコンディショニングが分化の第2段階及び第3段階でDE、ヘパトブラスト及びヘパサイトの出現に及ぼす影響を確かめることであった。DE誘導前にCHIR99021を加えると、ヘパサイト増殖及び分化効率が増進することが観察された。第1段階中にCHIR99021を導入しても良い効果がないことが分かった一方、それを第2段階中に導入すると、細胞増殖に有益な効果があり、且つ細胞形態に悪影響がないことが

示された。

#### 【 0 1 4 9 】

ヘパトサイト分化の途中でC H I R 9 9 0 2 1を補充すると、分化プロセスの収量及び効率が増加するかを調べた。C H I Rの補充は、ヘパトプラストからヘパトサイトへの移行時の細胞増殖を増進するのに有効であると判明した。更に、細胞数が増加しても、A A T陽性細胞の出現によって特徴付けられるとおりの細胞の肝臓表現型に支障が出ることはなかった。C H I Rによるプレコンディショニングを経た細胞では、D Eから肝臓系統への円滑な移行が明らかとなり、第2段階終了(E o S 2)までに高純度の肝臓マーカー1アンチトリプシン(A A T)(図9)及びアシアロ糖タンパク質受容体(A S G P R 1)(図10)を呈した。

10

#### 【 0 1 5 0 】

##### 【表1】

表1. プロトコル修正の試験に使用したNASH患者株及び非疾患対照株のパネル。CHIRプレコンディショニングは、TRA181、POU5F1、NANOGなど、DE誘導時の多能性マーカーを下方制御する。

細胞株	名称	提供元	性別	状態
CW10020DD1	20D	CIRM	男性	NASH
CW10024DD1	24D	CIRM	女性	正常
CW10042FF1	42F	CIRM	女性	NASH
CW10045BB1	45B	CIRM	女性	NASH
CW10054AA1	54A	CIRM	女性	正常
01503.102	1503	CDI内部	女性	正常
01505.103	1505	CDI内部	女性	正常
CW10201DD1	01D1	CIRM	男性	NASH
CW10202EE1	02E1	CIRM	男性	NASH
CW10131AA1	31A1	CIRM	男性	NASH
CW10152EE1	52E1	CIRM	男性	NASH
CW10166DD1	66D1	CIRM	男性	NASH
CW10167BB1	67B1	CIRM	男性	NASH
CW10189FF1	89F1	CIRM	男性	NASH

NASH  
=非アルコール性脂肪性肝炎

20

30

#### 【 0 1 5 1 】

凝集塊形成の最適な時点を決定するため、分化成績の効果を評価した。第1段階終了時の凝集塊形成によって凝集タイミングをプロセス途中とすると、最も高いA A T純度の細胞集団が生じることが分かった。

#### 【 0 1 5 2 】

次に、成長因子濃度の効果を評価した。分化中に使用するH G F濃度を下げ、同時にE G Fを除き、V E G Fのタイミングを変えても、分化成績に悪影響はない。

#### 【 0 1 5 3 】

最後に、第3段階成熟培地にT G F及びN O T C H阻害薬を加えると、アルブミン発現が増進し、ヘパトサイト形態が現れることが分かった。

40

#### 【 0 1 5 4 】

H N F 4 Aレベルの定量化：ヘパトサイト分化中の核内受容体H N F 4 Aの遺伝子発現を調べた。この受容体は、多くの肝臓過程の鍵となる調節因子であり、肝発生にはその発現が必須である。H N F 4 Aをコードする遺伝子は、P 1及びP 2と呼ばれる2つの個別のプロモーターの転写制御下にある。P 1転写物は、成熟度の高いヘパトサイトに特徴的である一方、P 2転写物は、胎児ヘパトサイトに特徴的である。このプロトコルによって作製されるヘパトサイトでは、第1段階終了(E o S 1)までにP 1転写物が優勢となる。注目すべきことに、このH N F 4 A転写プロファイル - m R N Aレベル及びP 1 / P

50

2 転写物比 - は、成人ヒト肝と類似していた（図 1 2 ）。

【 0 1 5 5 】

生存最終段階ヘパトサイトの形態及び機能分析：第 2 段階終了時、コラーゲンをコートしたプレート上に播種すると、このプロトコルによって作製されるヘパトサイトは、顕著な核及び位相差像上明るい境界を伴う敷石形状によって特徴付けられる適切なヘパトサイト形態を呈した。ヘパトサイトの別の重要な形態学的特徴である二核細胞も観察された（図 1 3 ）。更に、細胞を色素 C D F D A で染色したところ（図 1 4 ）、それらの細胞は、ヘパトサイトのもう 1 つの鍵となる特徴である機能性の毛細胆管を形成したことが示された。

【 0 1 5 6 】

10

最終第 3 段階ヘパトサイト生存培養物の分析：最後に、分化したヘパトサイトは、その A A T 純度を保ちながら、高レベルのアルブミン純度（ 6 5 % 超 ）に達した。A A T 及びアルブミンの割合は、第 3 段階分化の 7 及び 1 4 日目に定量化した。

【 0 1 5 7 】

20

30

40

50

【表 2】

表2. ヘパトサイト分化プロトコルの全ステップの培地配合

プレコンディショニング培地 (PCM)	
成分	終濃度
RPMI 1640	88%
SFD	10%
GlutaMAX	1%
ペニシリン/ストレプトマイシン	1%
1-チオグリセロール (MTG)	405μM
CHIR99021	3μM

DE 0 日目培地 (EIM T0)	
成分	終濃度
RPMI 1640	88%
SFD	10%
GlutaMAX	1%
ペニシリン/ストレプトマイシン	1%
1-チオグリセロール (MTG)	405μM
アクチビン A	20ng/mL

DE 1〜2 日目培地 (EIM T1-2)	
成分	終濃度
RPMI 1640	88%
SFD	10%
GlutaMAX	1%
ペニシリン/ストレプトマイシン	1%
1-チオグリセロール (MTG)	405μM
アクチビン A	20ng/mL
BMP4	2.5ng/mL
bFGF	5ng/mL
VEGF	10ng/mL
アスコルビン酸	50ug/mL

DE 3〜9 日目培地 (EIM T3-6)	
成分	終濃度
SFD	100%
アクチビン A	20ng/mL
BMP4	2.5ng/mL
bFGF	5ng/mL
VEGF	10ng/mL

第 1 段階培地	
成分	終濃度
SFD	99%
BMP4	50ng/mL
bFGF	5ng/mL
VEGF	10ng/mL
HGF	25ng/mL

10

20

30

40

50

デキサメタゾン	0.1 $\mu$ M
FGF-10	60ng/mL
DMSO	1%

第 2 段階 + プレビスタチン培地	
成分	終濃度
SFD	99%
bFGF	5ng/mL
HGF	25ng/mL
OSM	20ng/mL
デキサメタゾン	0.1 $\mu$ M
DMSO	1%
プレビスタチン	10 $\mu$ M

10

第 2 段階 + CHIR99021 培地	
成分	終濃度
SFD	99%
bFGF	5ng/mL
HGF	25ng/mL
OSM	20ng/mL
デキサメタゾン	0.1 $\mu$ M
DMSO	1%
CHIR99021	3 $\mu$ M

20

第 3 段階培地	
成分	終濃度
ウィリアムス E	92%
BIT9500	5%
B27 + ビタミン A	2%
ペニシリン/ストレプトマイシン	1%
OSM	20ng/mL
デキサメタゾン	0.1 $\mu$ M
SB431542	10 $\mu$ M
DAPT	2 $\mu$ M

30

#### 【 0 1 5 8 】

C D 1 3 3 ( 別 名 プ ロ ミ ニ ン - 1 又 は A C 1 3 3 ) は、ペンタスパン膜タンパク質のプロミニンファミリーの中で最初に同定されたメンバーであった。C D 1 3 3 は、脳癌、腎癌、前立腺癌、膵癌、皮膚癌及び肝細胞癌を含むマウス又はヒト組織の造血前駆細胞並びに上皮及び非上皮前駆細胞に発現する。A A T は、ヘパトサイト精製のための細胞内マーカーであるため、ヘパトサイト培養物の濃縮及び続く精製に役立つであろう代用細胞表面マーカーに関してスクリーニングする研究を実施した。幾つかの異なる細胞株において、ヘパトサイト分化の第 2 段階終了時、C D 1 3 3 表面マーカーは、A A T + 細胞と共染色する ( 図 2 1 A、図 2 1 B )。A A T + 細胞が全て C D 1 3 3 + であったことから、従って C D 1 3 3 を使用して A A T 低発現の株を精製し、夾雑細胞をほぼ除去することができた。

40

#### 【 0 1 5 9 】

このように、i P S C をヘパトサイト分化に向けてプレコンディショニングし得ることが分かり、これは、細胞を G S K 3 阻害薬の存在下で培養して、細胞が多能性状態を抜け出すことを促進し、下流分化を改善することにより、細胞を胚体内胚葉 ( D E ) 細胞に分

50

化するようにプレコンディショニングすることによって行われた。初めに、i P S C は、内胚葉誘導培地で D E 細胞に分化することができる。i P S C は、M A T R I G E L（登録商標）など、二次元培養で培養され得、次に第 1 段階の終了時に D E 細胞が三次元凝集培養に移され得る。ヘパト بلاストの誘導及びヘパトサイトへの分化を含む本プロセスの第 2 段階中、細胞は、G S K 3 阻害薬の存在下で培養され得る。第 3 段階において、ヘパトサイトは、細胞形態の向上のため、T G F 阻害薬及び - セクレターゼ阻害薬の存在下で成熟させることができる。

#### 【 0 1 6 0 】

ヘパトサイト / M S C 共培養研究：パイロット実験を行い、ヘパトサイトと M S C とを共培養する効果を調べた。N A S H 株 0 1 D 1 から M S C バンクを作成した（表 1）。M S C をヘパトサイト培地に順応させることに成功し、次に 0 1 D 1 株からのヘパトサイト上に様々な密度で播いた。この実験は、第 3 段階培地 ± S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T で培養した細胞で行った。本発明者らは、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T の非存在下において、全ての培養物 - ヘパトサイト単独又はヘパトサイト / M S C 共培養 - が形態学的に損なわれており、対照と比較して A A T 及び A L B の純度が低下していることを見出した。これと一致して、E L I S A によって測定した上清中の A L B 分泌も減少した。しかしながら、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T の存在下では、ヘパトサイト / M S C 共培養は、適切な形態を維持したのみならず（図 6）、その高い A A T 純度も維持し、A L B 純度及び分泌の大幅ではないが顕著な増加を示したことが観察された。これは、M S C と共培養すると、ヘパトサイト成熟が促進され得ることを示唆している。この種の調査は、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T を補充された株対応 M S C 馴化培地を使用したヘパトサイトの成熟にまで広げ得る。

#### 【 0 1 6 1 】

分化第 2 段階における凍結保存ヘパトサイトの解凍及び解凍後の第 3 段階ヘパトサイトへの成熟：第 2 段階終了時の凍結保存ヘパトサイトを第 3 段階培地中で解凍した。I 型コラーゲンをコートしたプレート上に r o c k 阻害薬の存在下でスピンなしに細胞を播いた。プレーティング後 2 4 時間が経過したところで培地を穏やかに交換した。成熟培地は、S B / D A P T 又は S r c キナーゼ阻害薬を含有し、細胞を更に 8 ~ 1 0 日間、4 8 時間毎に培地を交換しながら分化させた。最終段階の細胞について、ヘパトサイト形態並びにフローサイトメトリーによって定量化される A A T 及びアルブミン発現の存在を分析した。

#### 【 0 1 6 2 】

予備的データから、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T の代わりに P P 1 を代用すると、ヘパトサイトの成熟が促進されることが明らかになった。図 2 3 は、形態を示し、図 2 4 は、解凍後の培養物の純度を示す。

#### 【 0 1 6 3 】

肝オルガノイドの作成：肝オルガノイド培養物を模倣するように設計した、ヘパトサイト及び他の肝臓関連細胞型 - 具体的にはマクロファージ、M S C 及び内皮細胞 - からなる凝集塊を構築し、5 ~ 1 0 日間維持した。凝集塊は、1  $\mu$  M の H 1 1 5 2 を補充されたヘパトサイト第 3 段階培地（表 2）中に構築し、ここで、ヘパトサイト以外の細胞は、共培養の開始前に第 3 段階培地への順応を経た。共培養開始のため、第 1 段階終了細胞ヘパトサイトを凍結保存から回復させて、1  $\mu$  M の r h o キナーゼ（r o c k）阻害薬 H 1 1 5 2 を補充された第 2 段階培地（表 2）に 5 0 0 , 0 0 0 細胞 / m L で凝集させた。2 4 時間後、3  $\mu$  M C H I R 9 9 0 2 1 を含有する第 2 段階培地に培地を交換した。細胞は、第 2 段階培地に合計 8 日間維持し、最初の 4 日間にわたって低酸素条件下、次の 4 日間にわたって正常酸素下とした。凍結保存されたマクロファージを低接着性プレート内の無血清の規定された（S F D）培地に約 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / c m<sup>2</sup> で播き、培養物に第 3 段階培地（1 日おきに 6 w p の 1 ウェル当たり 2 m L）を加えることにより、ヘパトサイト第 3 段階培地（S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T 又は P P 1 のいずれか不含）にゆっくりと順化させた。同様に、凍結保存された M S C を標準的な組織培養プレート上の M S C 培地（各 5 0 n g / m L の P D G F - B B 及び b F G F を含有する S F D）に 5 0 , 0 0 0

細胞 /  $\text{cm}^2$  で解凍した。細胞は、解凍後 1 日目から開始して M S C 培地に対する第 3 段階培地の比率を増加させることにより ( 1 日目 7 5 % M S C / 2 5 % 第 3 段階、2 日目 5 0 % M S C / 5 0 % 第 3 段階、3 日目 2 5 % M S C / 7 5 % 第 3 段階、4 ~ 7 日目 1 0 0 % 第 3 段階 )、ヘパトサイト第 3 段階培地 ( S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T 又は P P 1 のいずれか不含 ) に 7 日間順応させた。凍結保存された内皮細胞を解凍し、フィブロネクチン (  $2 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  ) をコートした組織培養プレート上の内皮細胞培地 ( 各  $50 \text{ ng} / \text{mL}$  の V E G F 及び b F G F を含有する S F D ) に約 2 5 , 0 0 0 細胞 /  $\text{cm}^2$  で播いた。細胞は、 $50 \text{ ng} / \text{mL}$  V E G F 及び  $50 \text{ ng} / \text{mL}$  F G F を含有する無血清の規定された ( S F D ) 内皮細胞培地に対する第 3 段階培地の比率を増加させることにより、ヘパトサイト第 3 段階ヘパトサイト培地に 7 日間順応させた。細胞は、解凍後 1 日目から開始して内皮培地に対する第 3 段階ヘパトサイト培地の比率を増加させることにより ( 1 日目 7 5 % 内皮細胞培地 / 2 5 % 第 3 段階、2 日目 5 0 % 内皮細胞培地 / 5 0 % 第 3 段階、3 日目 2 5 % 内皮細胞培地 / 7 5 % 第 3 段階、4 ~ 7 日目 1 0 0 % 第 3 段階 )、ヘパトサイト第 3 段階培地 ( S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T 又は P P 1 のいずれか不含 ) に 7 日間順応させた。ヘパトサイト凝集塊形成後 8 日目、ヘパトサイト凝集塊を 0 . 5 % トリプシン - E D T A によって 3 7 で 7 分間解離した。同時に、マクロファージ、M S C 及び内皮細胞を T r y p L E S e l e c t ( 3 7 で 5 ~ 7 分 ) によって解離した後、続いて洗浄し、細胞懸濁液をスピンし、生存細胞濃度を決定した。全ての細胞型をヘパトサイト第 3 段階培地 ( S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T 又は P P 1 不含 ) に 1 , 0 0 0 , 0 0 0 細胞 /  $\text{mL}$  となるように懸濁した。次に、細胞を 1 : 0 . 5 : 2 : 0 . 2 のヘパトサイト : マクロファージ : M S C : 内皮細胞比で超低付着性 ( U L A ) 丸底 9 6 ウェルプレートに播いた。全ての凝集塊条件において ( 図 2 8 A )、1 ウェル当たりの総細胞数は、一定に保たれた。次に、細胞を 2 0 0 g で 3 分間ペレット化し、 $2 \mu\text{M}$  H 1 1 5 2、 $0.6 \text{ mg} / \text{mL}$  M A T R I G E L ( 登録商標 ) 及び S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T ( それぞれ  $20 \mu\text{M} / 4 \mu\text{M}$  ) 又は P P 1 (  $10 \mu\text{M}$  ) のいずれかを含有する等容積の第 3 段階培地に、化合物の終濃度が  $1 \mu\text{M}$  H 1 1 5 2、 $0.3 \text{ mg} / \text{mL}$  M A T R I G E L ( 登録商標 ) 及び  $10 \mu\text{M}$  S B 4 3 1 5 4 2 /  $2 \mu\text{M}$  D A P T 又は  $5 \mu\text{M}$  P P 1 のいずれかとなるように重層した。次に、細胞を再び 2 0 0 g で 3 分間ペレット化し、正常酸素インキュベーターに置いた。1 日おきに、凝集塊を乱さないようにしながら培地の 5 0 % を取り除き、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T 又は P P 1 のいずれかを含有する等量の第 3 段階培地を補充することにより、培地を交換した。

#### 【 0 1 6 4 】

リピドーシスアッセイ : i P S C 由来のヘパトサイト : 第 3 段階終了時の 2 . 0 3 8、5 4 A ( 両方とも正常 )、0 1 D 1 及び 0 2 E 1 ( 両方とも N A S H ) 株を細胞内リピドーシス誘導アッセイに供した。ヘパトサイト分化の第 2 段階終了時、凝集塊を 0 . 5 % トリプシン - E D T A を使用して 3 7 で 7 分間解離し、1 0 % F B S を補充された I M D M 培地でクエンチした。次に、細胞を 2 0 0 g で 3 分間ペレット化し、I 型コラーゲンをコートしたプレートに 2 0 0 , 0 0 0 細胞 /  $\text{cm}^2$  で播種し、第 3 段階培地 ( 表 2 ) にリピドーシス誘導前の 4 ~ 5 日間、1 日おきに培地を交換しながら維持した。代わりに、細胞を第 1 段階終了時に T r y p L E S e l e c t によって 3 7 で 5 ~ 7 分間解離し、1 0 % F B S を補充された I M D M 培地でクエンチした。次に、細胞を 2 0 0 g で 3 分間ペレット化し、I 型コラーゲンをコートしたプレートに 1 0 0 , 0 0 0 細胞 /  $\text{cm}^2$  で播種し、低酸素条件下に置いた。細胞を第 2 段階 + C H I R 9 9 0 2 1 培地 ( 表 2 ) に 8 日間、1 日おきに培地を交換しながら維持した。第 2 段階分化の 4 日目、細胞を正常酸素条件下に置いた。8 日後、細胞を 2 D プレーティング条件で第 3 段階培地に切り替えた。リピドーシス誘導のため、第 3 段階培地で希釈した 5 0 ~ 6 0 0  $\mu\text{M}$  脂肪酸、リノール酸又はオレイン酸 - リノール酸混合物によって細胞を正常酸素条件下 3 7 で 2 4 時間処理した。細胞を D P B S で 2 回洗浄し、4 % P F A によって室温で 2 0 分固定した。D P B S で 3 回洗浄した後、0 . 1 % トリトン X 含有 D P B S 中に  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  B o d i p y 4 9 3 / 5 0 3、アクチン - 5 5 5 及び D A P I を含有する溶液によって細胞を暗所下室温で 2



0 分間染色し、続いて D P B S で 3 回洗浄した。脂肪滴、細胞マトリックス及び核を染色し、それぞれハイコンテント共焦点顕微鏡の F I T C (脂質)、テキサスレッド (アクチン - 5 5 5) 及び D A P I (核) フィルタによって取得した。画像は、20 倍の拡大倍率で取得し、続いて M e t a X p r e s s ソフトウェアを使用した定量化分析に供した。1 細胞当たりのリピドーシスは、1 細胞当たりのリピドーシス = F I T C の積分強度の合計 / 総核数によって計算した。

#### 【0165】

凍結保存した第 1 段階終了ヘパトブラスト又は胚体内胚葉 (D E) 細胞からの最終段階ヘパトサイトの作成：凍結保存したヘパトブラスト (第 1 段階終了細胞) を解凍し、低酸素条件下 r o c k 阻害薬 H 1 1 5 2 (1  $\mu$  M) の存在下で第 2 段階ヘパトサイト培地中に 500,000 細胞 / mL で凝集塊を形成させた。24 時間後、培地を第 2 段階 + C H I R 9 9 0 2 1 (表 2、第 2 段階培地 + 3  $\mu$  M C H I R 9 9 0 2 1) に交換した。凝集塊を第 2 段階 + 3  $\mu$  M C H I R 9 9 0 2 1 培地に 8 日間、1 日おきに培地を交換しながら維持した。4 日目、第 2 段階培地の存在下で凝集塊を正常酸素条件に置いた。8 日目、凝集塊を第 3 段階ヘパトサイト培地に切り替え、5 ~ 10 日間培養して成熟させて、様々な最終段階アッセイを実施するため凝集塊を回収した。代わりに、凝集塊は、第 2 段階終了時に 0.5% トリプシン - E D T A (37 で約 7 分) を使用して解離し、r o c k 阻害薬 (H 1 1 5 2、1  $\mu$  M) の存在下において、I 型コラーゲンをコートしたプレート上の第 3 段階培地 (表 2) に播くこともできる。24 時間後、細胞を 2 D フォーマットで第 3 段階ヘパトサイト培地 (表 2) において更に 7 ~ 10 日間、1 日おきに培地を交換しながら培養することができる。最終段階 2 D 細胞は、ヘパトサイトに関する様々なエンドポイントアッセイに使用することができる。

#### 【0166】

凍結保存した胚体内胚葉 (D E) 細胞からの第 3 段階終了ヘパトサイトの作成：凍結保存 D E 細胞を解凍し、r o c k 阻害薬 (H 1 1 5 2、1  $\mu$  M) の存在下、低酸素条件下において、M A T R I G E L (登録商標) をコートしたプレート上の T 3 - T 6 培地 (表 2) に 100,000 細胞 / cm<sup>2</sup> で播いた。24 時間後、培地を r o c k 阻害薬のない T 3 - T 6 に交換し、この培地に更に 1 ~ 2 日間維持した後、第 1 段階ヘパトサイト培地 (表 2) に交換した。細胞は、低酸素条件下で第 1 段階ヘパトサイト培地に 6 日間、1 日おきに培地を交換しながら維持した。6 日後、細胞を T r y p L E によって 37 で 5 ~ 7 分間解離し、クエンチし、洗浄し、超低接着性 (U L A) 静止ベッセル又はスピナーフラスコに置いて、3 D 凝集塊を 8 日間、1 日おきに培地を交換しながら生じさせた。4 日目、凝集塊を第 2 段階培地の存在下で正常酸素条件に置いた。8 日目、凝集塊を第 3 段階ヘパトサイト培地に切り替え、5 ~ 10 日間培養して成熟させて、様々な最終段階アッセイを実施するため凝集塊を回収した。最終段階 1 - アンチトリプシン (A A T) 及びアルブミン発現をフローサイトメトリーによって定量化した。典型的な結果を表 3 に示す。

#### 【0167】

#### 【表 3】

表 3. DE 誘導終了時又は第 1 段階終了時に凍結保存し、解凍し、第 3 段階終了まで分化させた細胞の典型的な AAT 及びアルブミン (ALB) 純度

株	凍結保存時点	AAT	ALB
2. 038 (健常)	DE 終了時	97	38
01D1 (NASH)	DE 終了時	89	45
02E1 (NASH)	DE 終了時	97	80
2. 038 (健常)	第 1 段階終了時	99	87
01D1 (NASH)	第 1 段階終了時	95	80

#### 【0168】

予備的データから、S B 4 3 1 5 4 2 / D A P T の代わりに P P 1 を代用すると、ヘパ

トサイトの成熟が促進されることが明らかになった。図 23 は、形態を示し、図 24 は、解凍後の培養物の純度を示す。PP1 は、MSC、マクロファージ及び内皮細胞の存在下でヘパトサイトの成熟も増強した。

【0169】

生存最終段階ヘパトサイトを使用したリピドーシスデータから、NASH 特異的ヘパトサイトにおける自然発症リピドーシスの症状発現が明らかになった（図 27）。この結果は、iPSC 由来ヘパトサイトを使用して脂肪肝表現型をモデリングする際の測定可能な表現型の見本となる。この特徴は、薬剤開発及びスクリーニング適用のための他のインビトロ NASH 特異的アッセイで補足することができる。

【0170】

3D 肝オルガノイドの開発のため、正常 iPSC 及び NASH 特異的 iPSC に由来する最終段階ヘパトサイトの共培養を間葉系幹細胞、同質遺伝子型マクロファージ、同質遺伝子型内皮細胞と組み合わせることができる（図 28A ~ 図 28C）。

【0171】

ヘパトサイトを補助的細胞型と併せる 3D 共培養は、ヘパトサイトの成熟及び機能（図 28D）、線維症の疾患モデリング、オミクススペースの分析及びハイスループットスクリーニング適用を増強し、且つ NASH のための薬剤開発に用いることができる。

【0172】

本明細書に開示及び特許請求される方法の全ては、本開示を踏まえれば、過度の実験を行うことなく作製及び実行することができる。本発明の組成物及び方法が、好ましい実施形態の観点で記載されているが、それらの方法に対して且つ本明細書に記載される方法のステップ又はステップの順序において、本発明の概念、趣旨及び範囲から逸脱することなく変形形態を適用し得ることが当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連性のある特定の薬剤は、同じ又は類似の結果を実現しつつ、本明細書に記載される薬剤を代替し得ることが明らかであろう。当業者に明らかなかかる類似の代替形態及び修正形態の全ては、添付の特許請求の範囲によって定義されたとおりの本発明の趣旨、範囲及び概念の範囲内にあると見なされる。

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に示されるものを補足する例示的手順又は他の詳細を提供する範囲内において、参照により本明細書に具体的に援用される。

Arcila et al., Clin Cancer Res 18:4910-8, 2012.

Arcila et al., Mol Cancer Ther 12(2):220-229, 2013.

Austin-Ward and Villaseca, Revista Medica de Chile, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 2003.

Bose et al., Cancer Discov 2013;3:224-37.

Bukowski et al., Clinical Cancer Res., 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho et al. J Clin Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Cai et al., Methods Mol Biol 997:141-7, 2013.

Cha et al. Int J Cancer 130:2445-54, 2012.

Chee et al., Science, 274:610-614, 1996.

Chen et al., Hepatology. 55(4):1193-1203, 2012.

Cho et al., Cancer Res 73:6770-9, 2013.

10

20

30

40

50

- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144 (Pt 11): 3027 - 3037, 1998.
- Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991 - 1995 (1988).
- Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4397 - 4401 (1985).
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21 (5): 389 - 398, 1998.
- Davies et al., *Plos One* 8, 2013.
- Del Tito et al., *Clinical Chemistry* 44: 731 - 739, 1998. 10
- Drmanac et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 54 - 58, 1998.
- Drmanac et al., *Science*, 260: 1649 - 1652, 1993.
- Flavell et al., *Cell* 15: 25 (1978).
- Fu et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 381 - 384, 1998 /
- Geever et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5081 (1981).
- Greulich et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 14476 - 81. 20
- Hainsworth et al., *J Clin Oncol* 2018; 36: 536 - 42.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78 (4): 480 - 485, 1998.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37 (4): 347 - 353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3: 3, 2012.
- Hong et al., *J Biol Chem* 282: 19781 - 7, 2007.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66 (11): 5329 - 5336, 1998. 30
- Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (17): 10067 - 10071, 1998.
- Hyman et al., *Nature* 2018; 554: 189 - 94.
- 国際公開第99/57318号パンフレット
- 国際公開第1995001994号パンフレット
- 国際公開第1998042752号パンフレット
- 国際公開第2000037504号パンフレット
- 国際公開第2001014424号パンフレット
- 国際公開第2009/101611号パンフレット
- 国際公開第2009/114335号パンフレット 40
- 国際公開第2010/027827号パンフレット
- 国際公開第2011/066342号パンフレット
- 国際公開第2015016718号パンフレット
- 国際公開第00/37504号パンフレット
- 国際公開第01/14424号パンフレット
- 国際公開第98/42752号パンフレット
- Kosaka et al., *Cancer Res* 2017.
- Kris et al., *Ann Oncol* 2015; 26: 1421 - 7.
- Leal, M., *Ann NY Acad Sci* 1321, 41 - 54, 2014.
- Li et al., *J Clin Oncol* 2018; 36: 2532 - 7. 50

- Lynch et al., N Engl J Med. 350 (21): 2129 - 2139, 2004.
- Maemondo et al., N Engl J Med 362: 2380 - 8, 2010.
- Mallanna and Duncan, Curr Protoc Stem Cell Biol 26, 2013.
- Mazieres et al., J Clin Oncol 2015; 33.
- Mitsudomi and Yatabe, Cancer Sci. 98 (12): 1817 - 1824, 2007.
- Mokyr et al. Cancer Res 58: 5301 - 5304, 1998. 10
- Nagano et al., Clin Cancer Res 2018.
- Oxnard et al., J Thorac Oncol. 8 (2): 179 - 184, 2013.
- Paez et al., Science 304 (5676): 1497 - 1500, 2004.
- Pao et al., Proc Natl Acad Sci USA 101 (36): 13306 - 13311, 2004.
- Pardoll, Nat Rev Cancer, 12 (4): 252 - 64, 2012.
- Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA 106: 474 - 9, 2009. 20
- Phillips et al., J Comput Chem 2005; 26: 1781 - 802.
- Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (24): 14411 - 14416, 1998.
- Raca et al., Genet Test 8 (4): 387 - 94, 2004.
- Ramasamy et al., Tissue Eng Part A. 19 (3 - 4): 360 - 7, 2013.
- Robichaux et al., Nat Med 2018; 24: 638 - 46.
- Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 - 5467, 1977. 30
- Sears et al., Biotechniques, 13: 626 - 633, 1992.
- Shan et al. Nat Chem Biol. 9 (8): 514 - 520, 2013.
- Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 232 - 236 (1989).
- Shen et al., J Recept Signal Transduct Res 36: 89 - 97, 2016.
- Thress et al., Nat Med 21: 560 - 2, 2015.
- 米国特許第4, 870, 287号明細書
- 米国特許第5, 288, 644号明細書 40
- 米国特許第5, 739, 169号明細書
- 米国特許第5, 760, 395号明細書
- 米国特許第5, 801, 005号明細書
- 米国特許第5, 824, 311号明細書
- 米国特許第5, 830, 880号明細書
- 米国特許第5, 844, 905号明細書
- 米国特許第5, 846, 945号明細書
- 米国特許第5, 869, 245号明細書
- 米国特許第5, 885, 796号明細書
- 米国特許第6, 207, 156号明細書 50

米国特許第 8 , 0 0 8 , 4 4 9 号明細書  
米国特許第 8 , 0 1 7 , 1 1 4 号明細書  
米国特許第 8 , 1 1 9 , 1 2 9 号明細書  
米国特許第 8 , 1 8 8 , 1 0 2 号明細書  
米国特許第 8 , 3 2 9 , 8 6 7 号明細書  
米国特許第 8 , 3 5 4 , 5 0 9 号明細書  
米国特許第 8 , 7 3 5 , 5 5 3 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 1 4 0 9 5 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 1 8 6 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 0 0 8 3 6 9 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 0 7 1 4 5 2 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 1 4 0 2 2 0 2 1 号明細書  
米国特許出願公開第 2 0 1 4 0 2 9 4 8 9 8 号明細書  
Underhill et al. , Genome Res . 7 : 9 9 6 - 1 0 0 5 ( 1 9 9 7 ) .  
Yang et al. , Int J Cancer 2 0 1 6 .  
Yasuda et al. , Sci Transl Med 5 ( 2 1 6 ) : 2 1 6 r a 1 7 7 , 2 0 1 3 .  
Zimmerman et al. , Methods Mol . Cell . Biol . , 3 : 3 9 - 4 2 , 1 9 9 2 .

【図面】

【図 1】

【図 2】

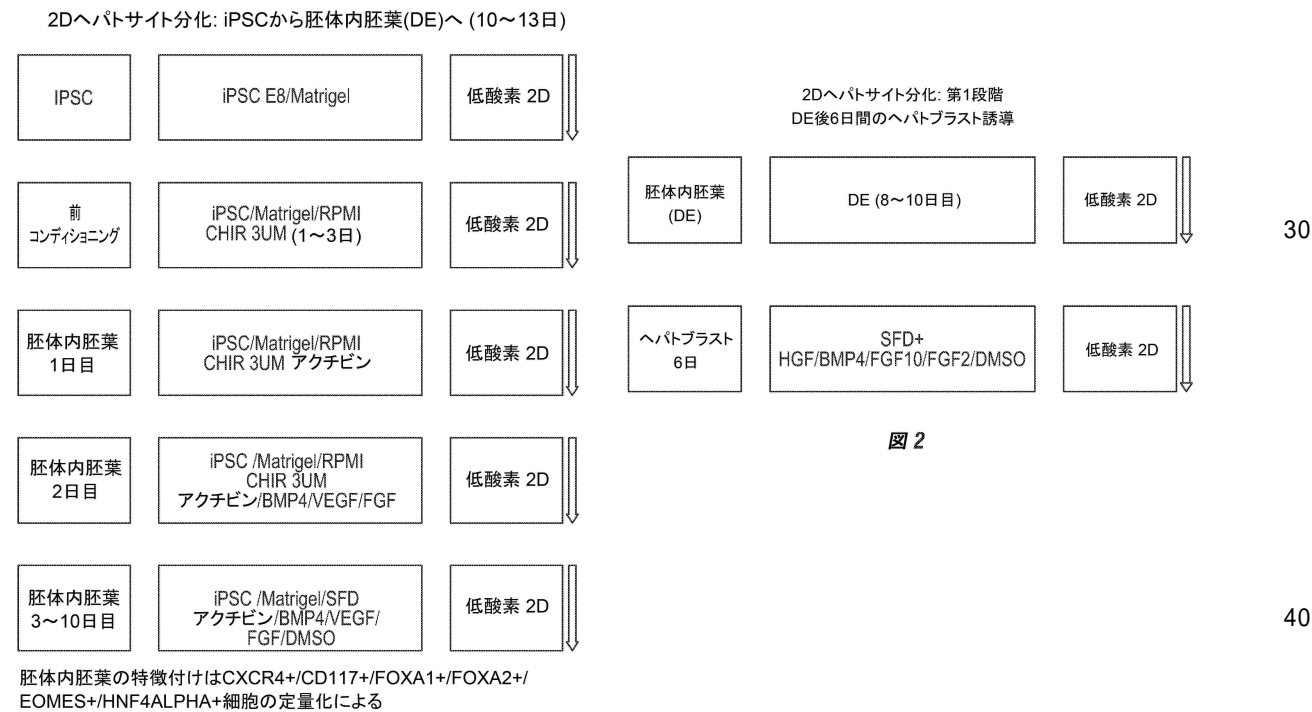


図 1

図 2

【 図 3 - 1 】

【 図 3 - 2 】

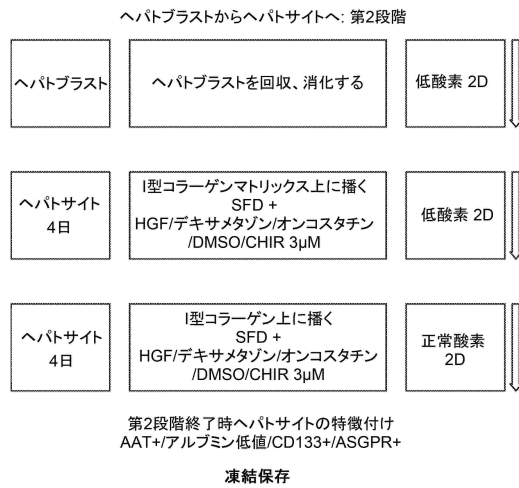


图 3

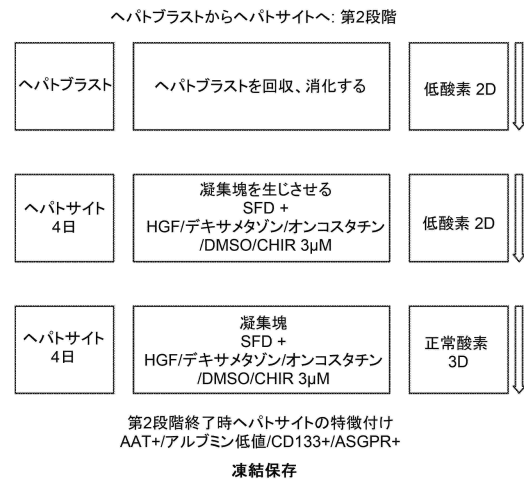


図3  
続き

10

20

【 図 4 】

【 図 5 】

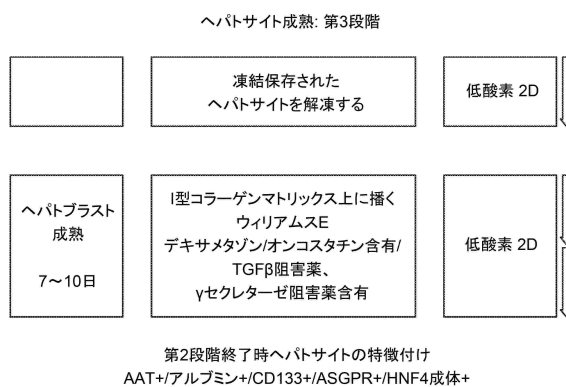


图 4

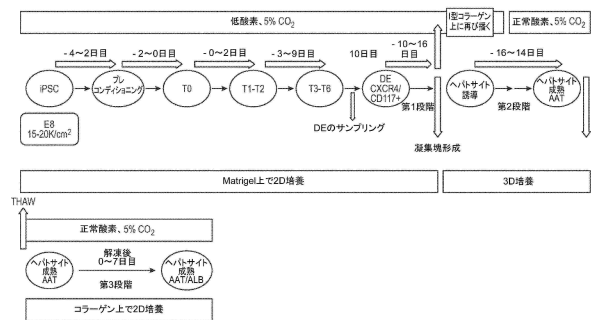


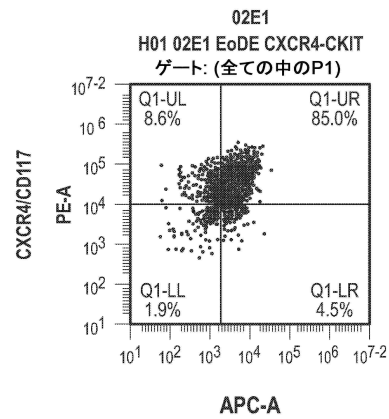
图 5

30

40

50

【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】

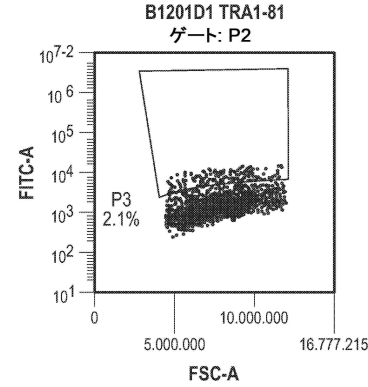
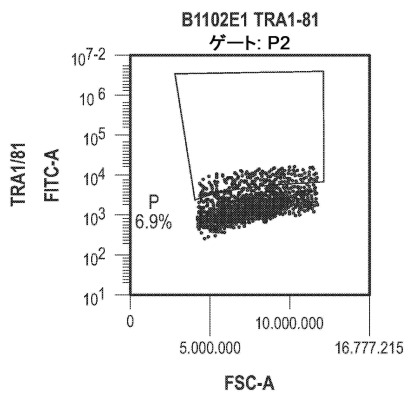
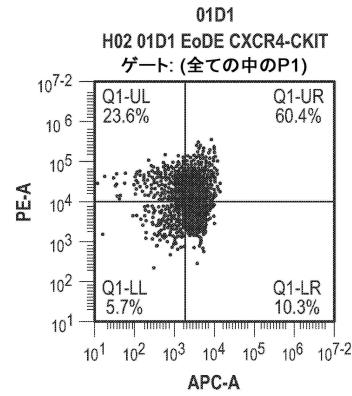


図 6

図 6

【 図 6 - 3 】

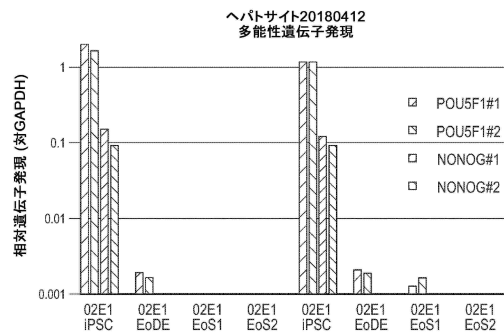


図 6  
続き

【 図 7 A 】

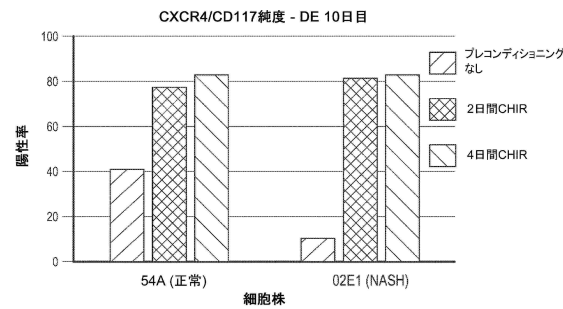


図 7A

10

20

30

40

50

【図 7 B】

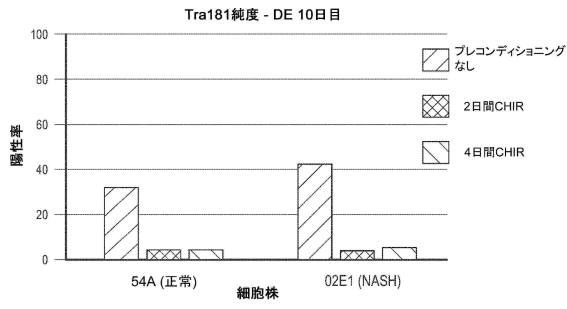


図 7B

【図 7 C】

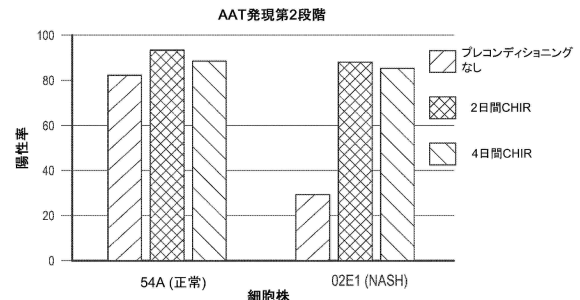


図 7C

10

【図 8 A - B】

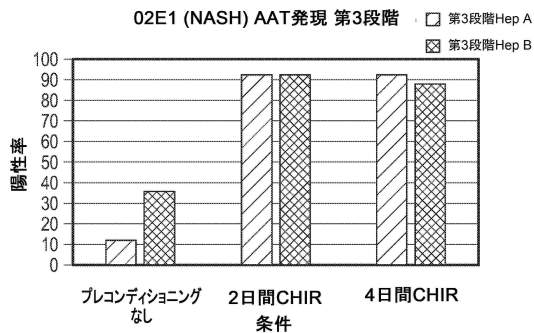


図 8A

【図 8 C - D】

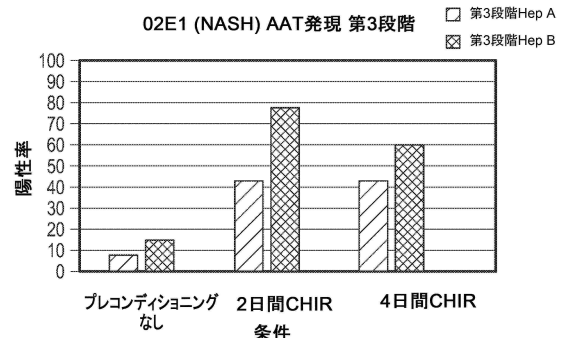


図 8C

20

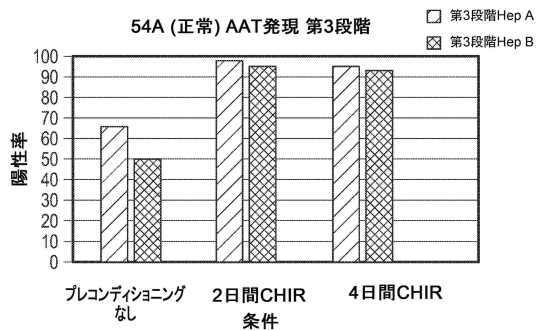


図 8B

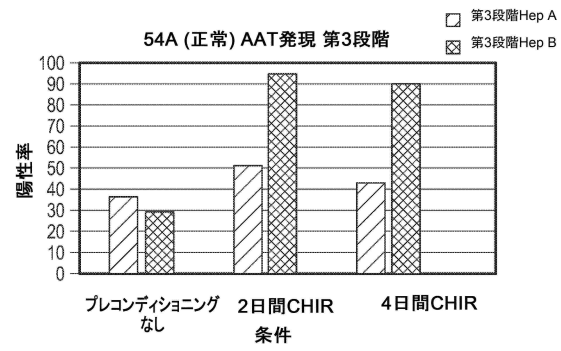


図 8D

30

40

50



【 図 9 - 1 】

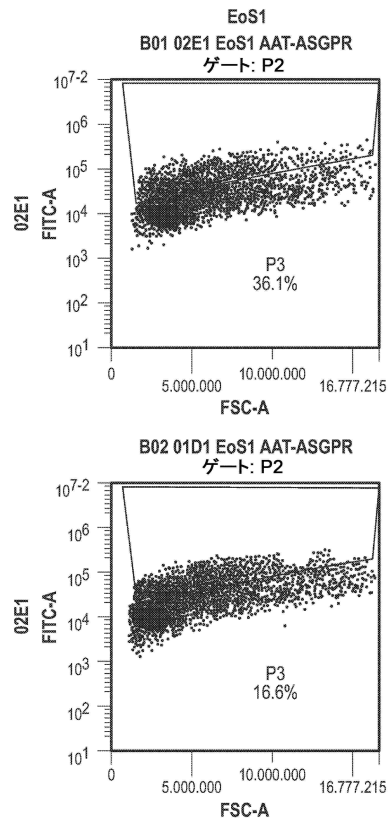


図 9

【 図 9 - 2 】

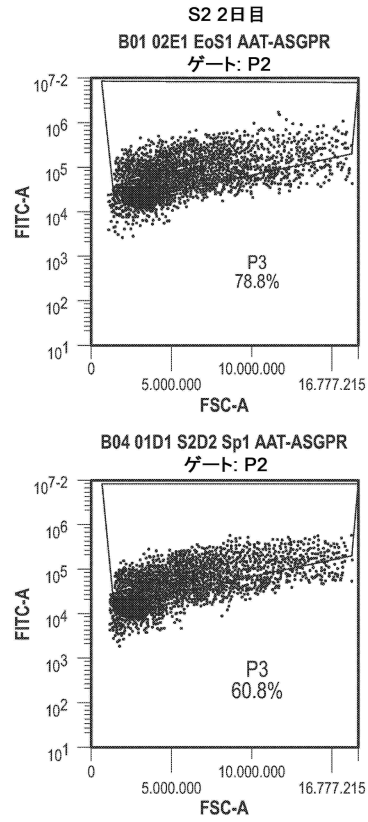


図 9

【 図 9 - 3 】

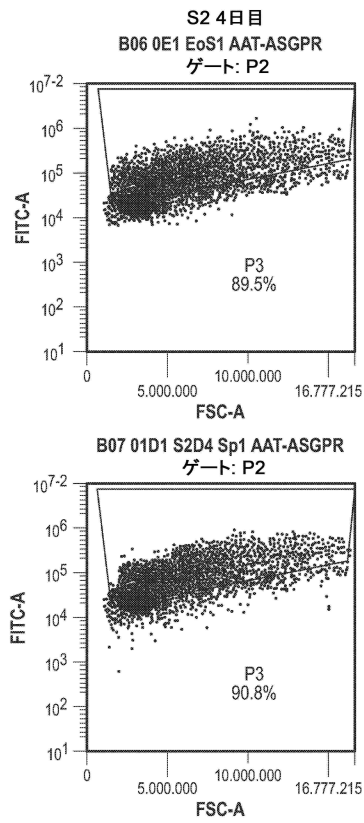


図 9

【 図 9 - 4 】

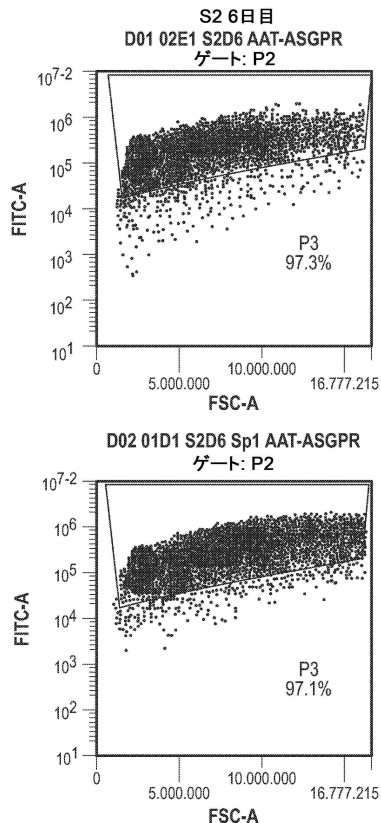
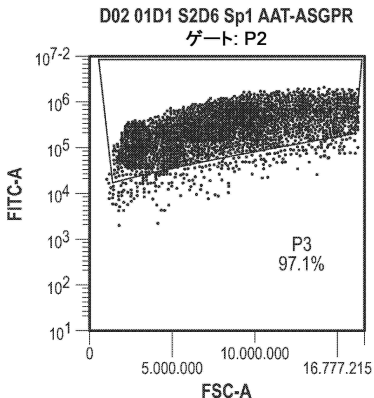
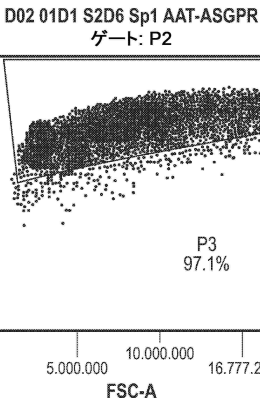


図 9



10

20

30

40

50

【 図 9 - 5 】

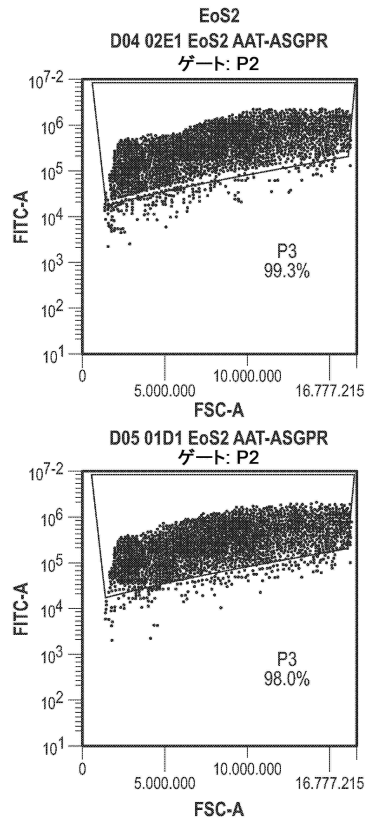


図 9  
続き

【 図 10 - 1 】

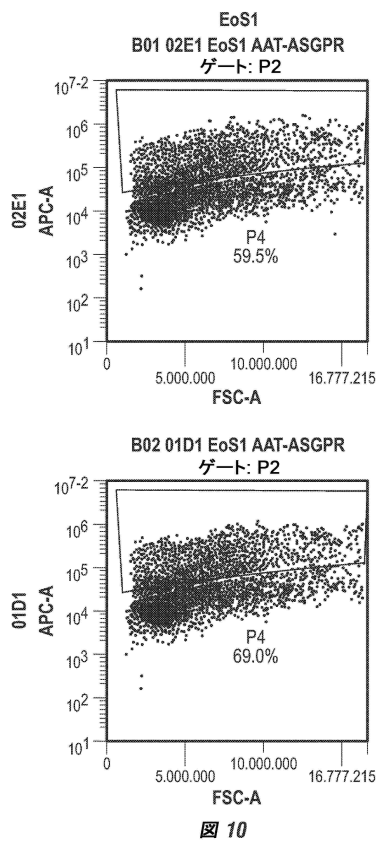


図 10

【 図 10 - 2 】

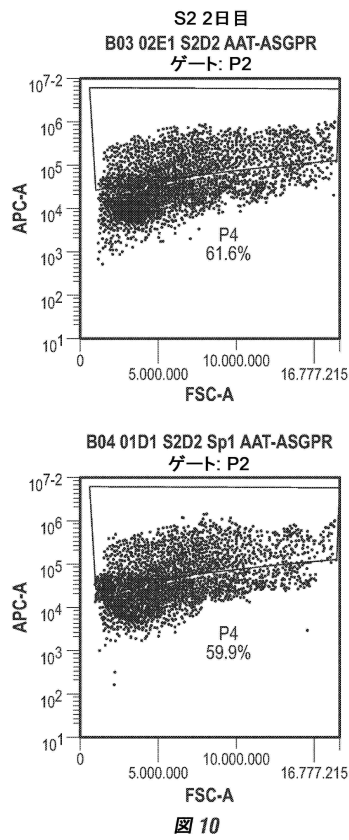


図 10

【 図 10 - 3 】

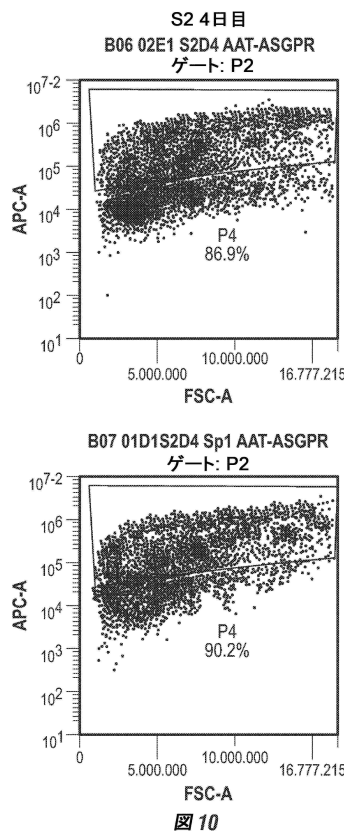


図 10

10

20

30

40

50

【図 10 - 4】

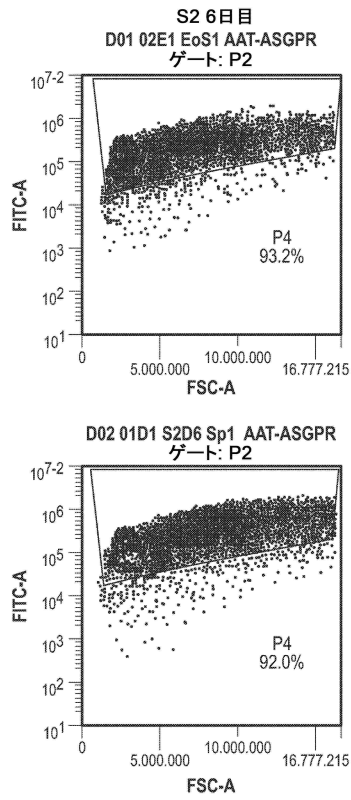


図 10

【図 10 - 5】

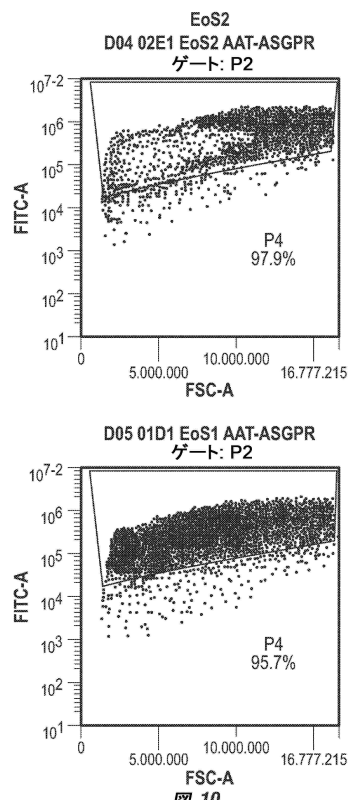


図 10

続き

【図 11 A - C】

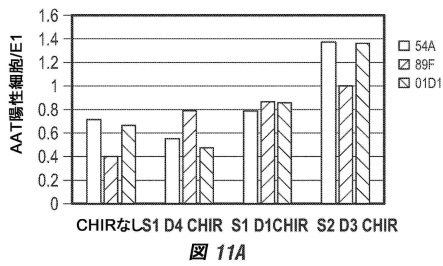


図 11A

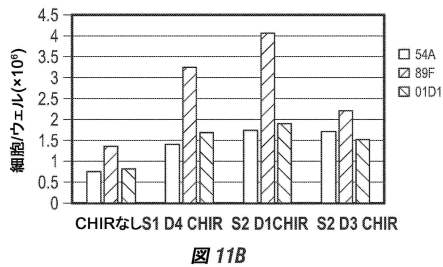


図 11B

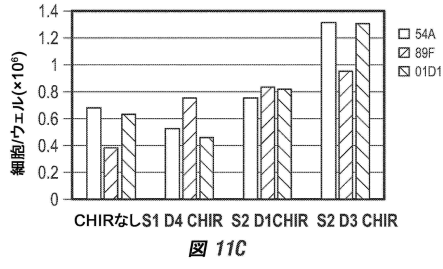


図 11C

【図 11 D - E】

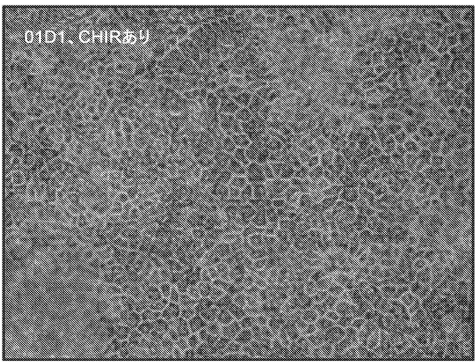


図 11D

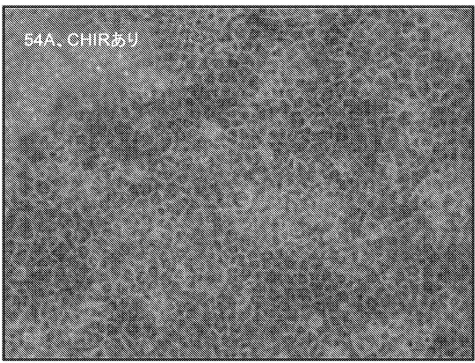


図 11E

10

20

30

40

50

【 図 1 2 】

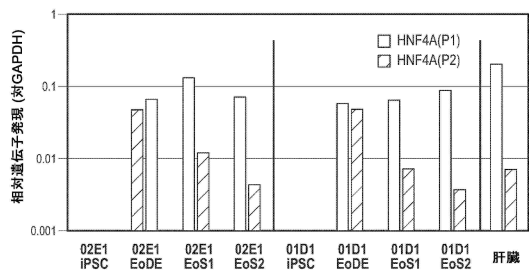


図 12

【 図 1 3 】

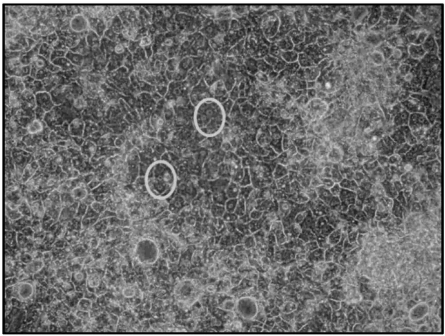


図 13

10

【 図 1 4 】

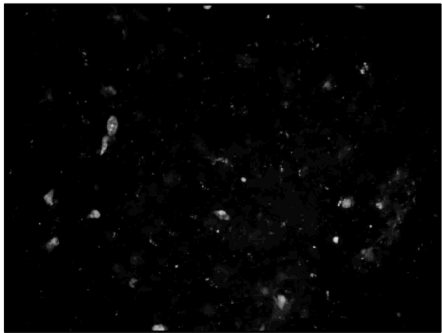


図 14

【 図 1 5 - 1 】

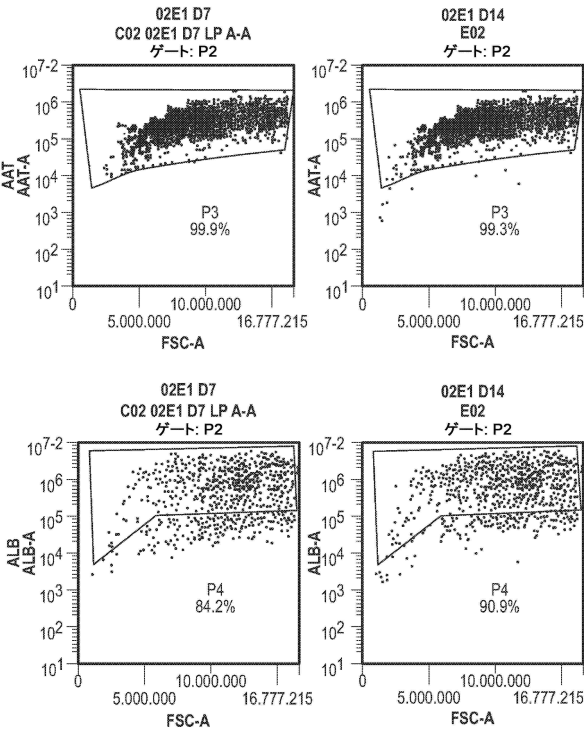


図 15

20

30

40

50

【図 15 - 2】

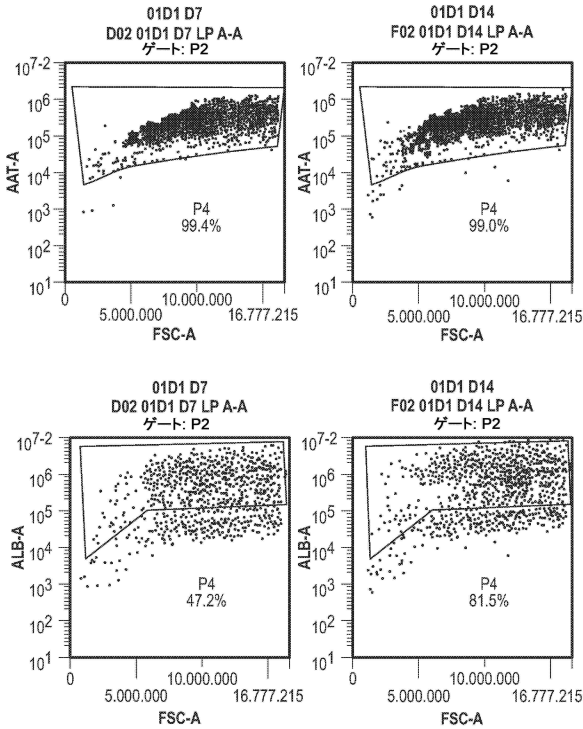


図 15  
続き

【図 16】

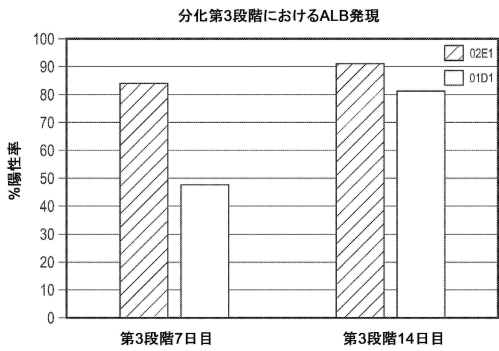


図 16

【図 17】

第3段階Hep E									
ウレタゼ									
B27 + RA	2%								
OSM	20ng/mL								
デキサメタゾン	0.2μM								
BIT9500	5%								
アスリル アルブミン	1%								
Srcキナーゼ 阻害薬	0.5-5μM								

第3段階Hep D									
ウレタゼ									
B27 + RA	2%								
OSM	20ng/mL								
デキサメタゾン	0.2μM								
BIT9500	5%								
アスリル アルブミン	1%								
EPO	2U/mL								
ICF-1/IGF-II ICFα	5-25ng/mL								

第3段階Hep C									
ウレタゼ									
B27 + RA	2%								
OSM	20ng/mL								
デキサメタゾン	0.2μM								
BIT9500	5%								
アスリル アルブミン	1%								
メチルサミン	5-10μM								

第3段階Hep B									
ウレタゼ									
B27 + RA	2%								
OSM	20ng/mL								
デキサメタゾン	0.2μM								
BIT9500	5%								
アスリル アルブミン	1%								
FH1及び FPH1	5-10μM								

第3段階Hep A									
ウレタゼ									
B27 + RA	2%								
OSM	20ng/mL								
デキサメタゾン	0.2μM								
BIT9500	5%								
アスリル アルブミン	1%								
SB431542	10μM								
DAPI	2μM								

図 17

【図 18 - 1】

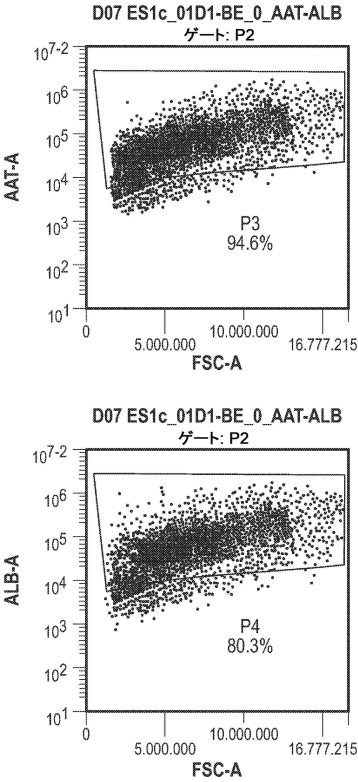


図 18

【図 18 - 2】

【図 19】

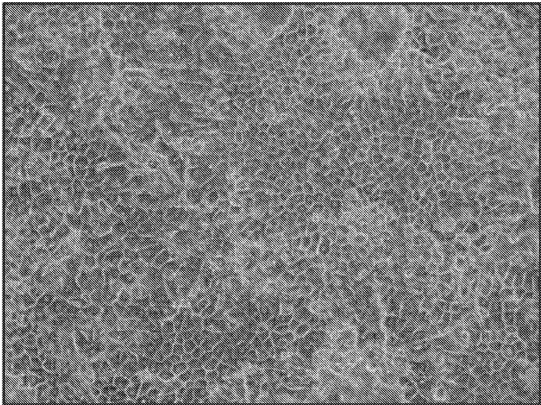


図 18  
続き

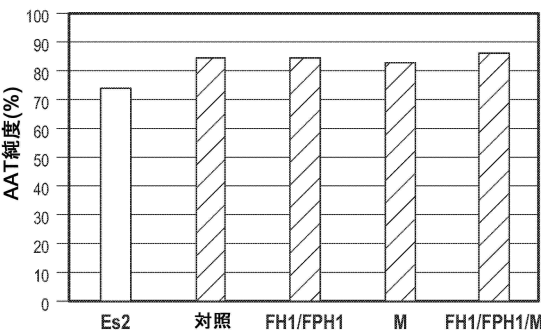


図 19

10

【図 20 A - B】

【図 20 C - D】

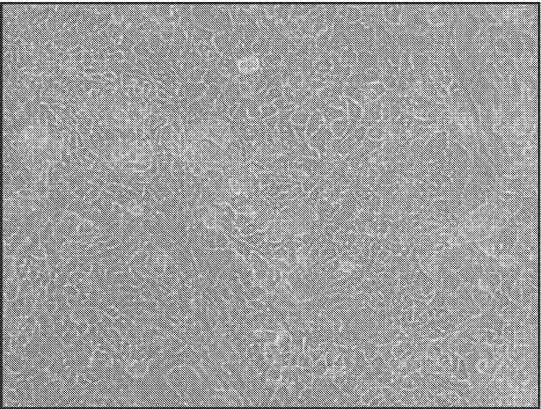


図 20A

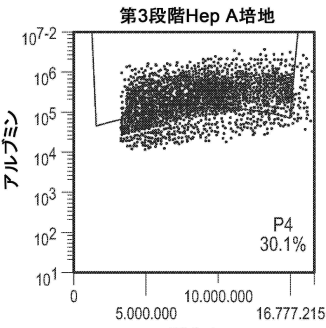


図 20C

30

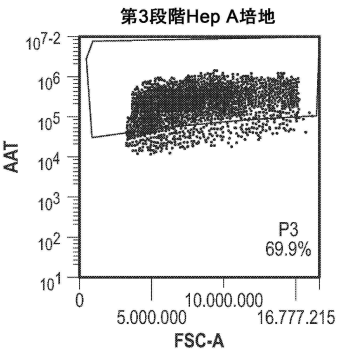


図 20B

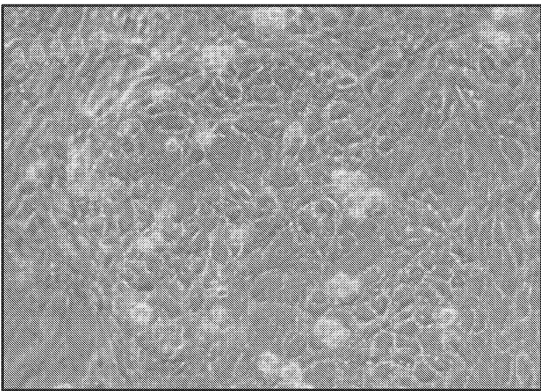


図 20D

40

50

【 図 2 0 E - F 】

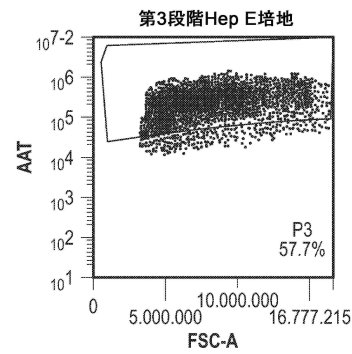


図 20E

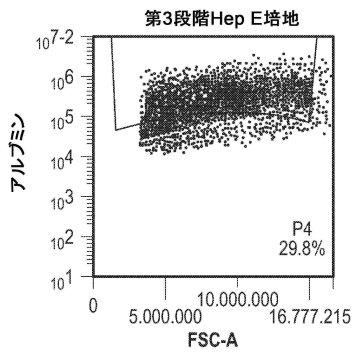


図 20F

【 図 2 1 A 】

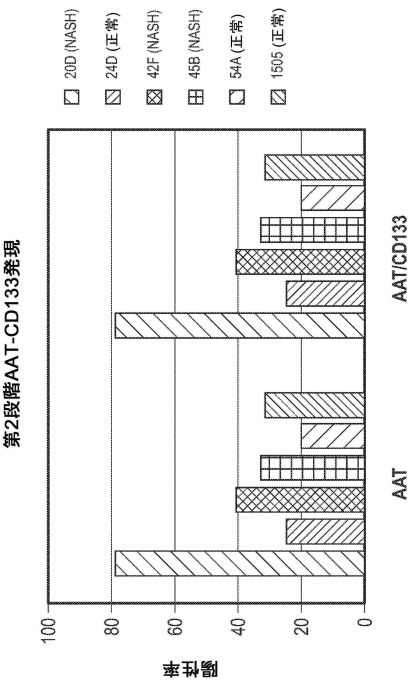


図 21A

【 図 2 1 B - 1 】

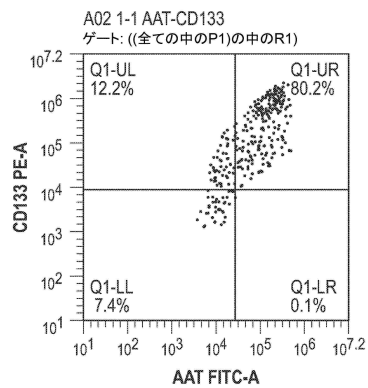
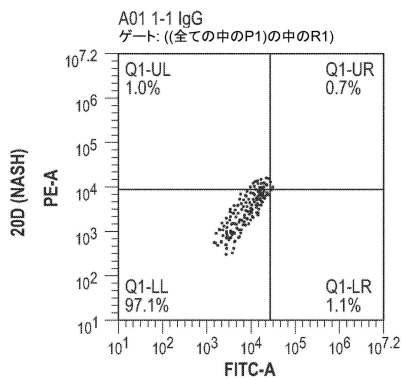


図 21B

【 図 2 1 B - 2 】

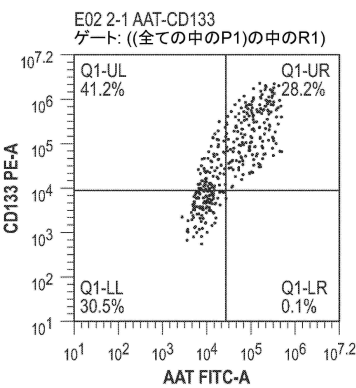
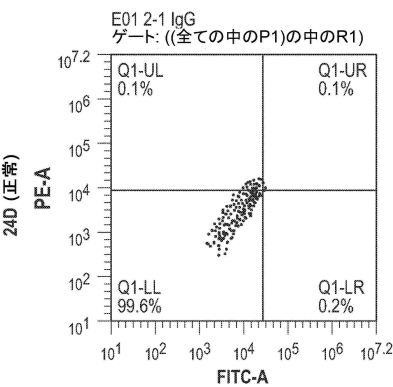


図 21B

10

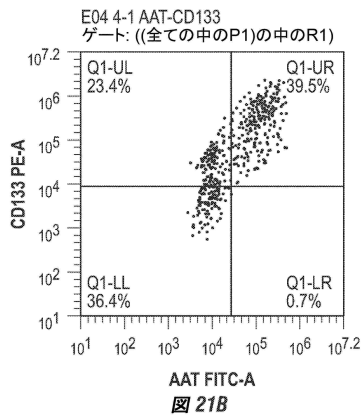
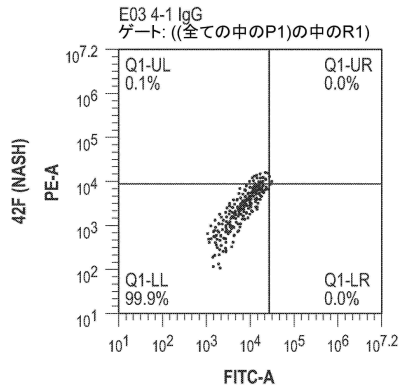
20

30

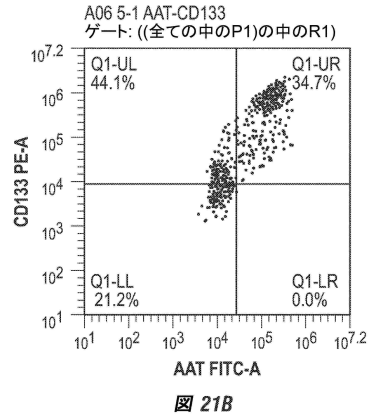
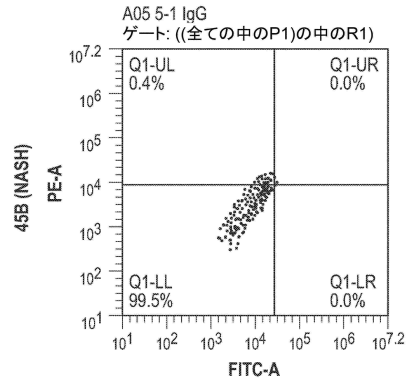
40

50

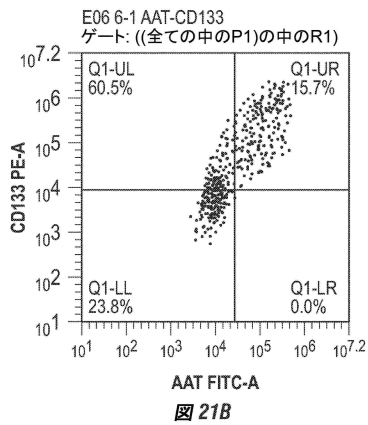
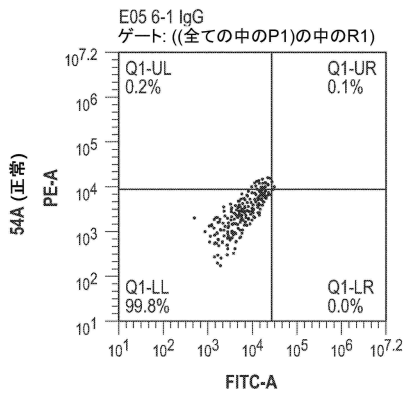
【図 2 1 B - 3】



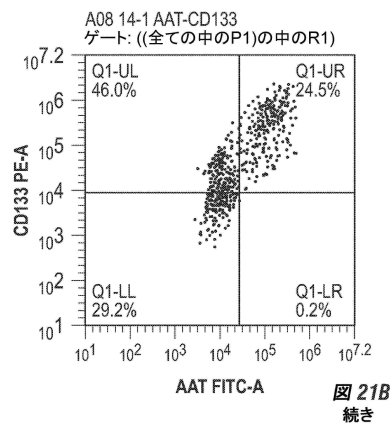
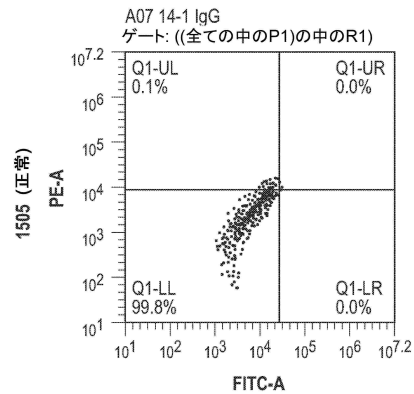
【図 2 1 B - 4】



【図 2 1 B - 5】



【図 2 1 B - 6】



10

20

30

40

50



【 図 2 2 】

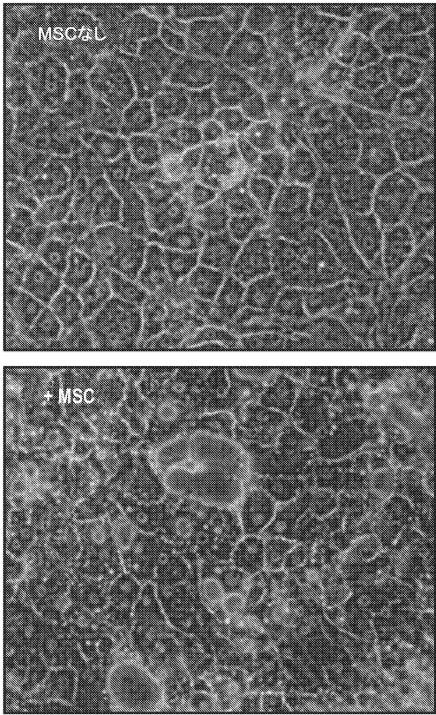


図 22

【 図 2 3 】

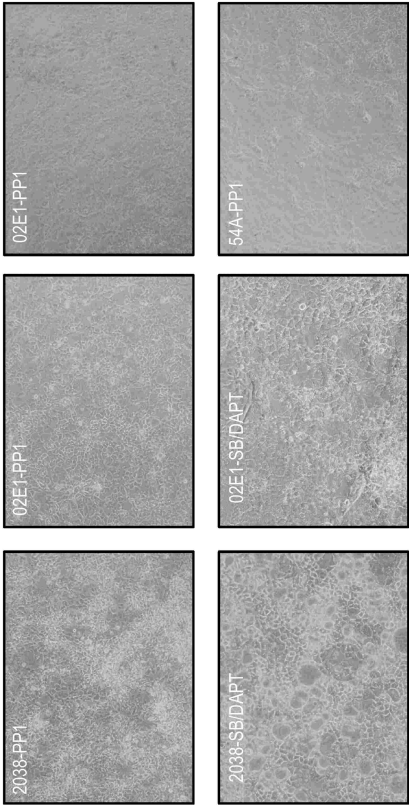


図 23

【 図 2 4 】

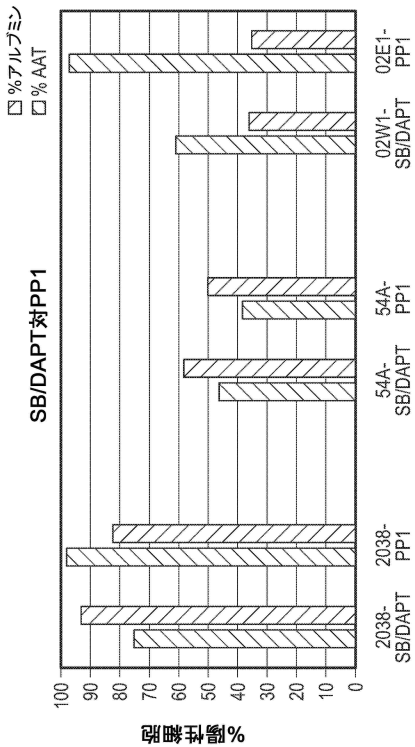


図 24

【 図 2 5 】

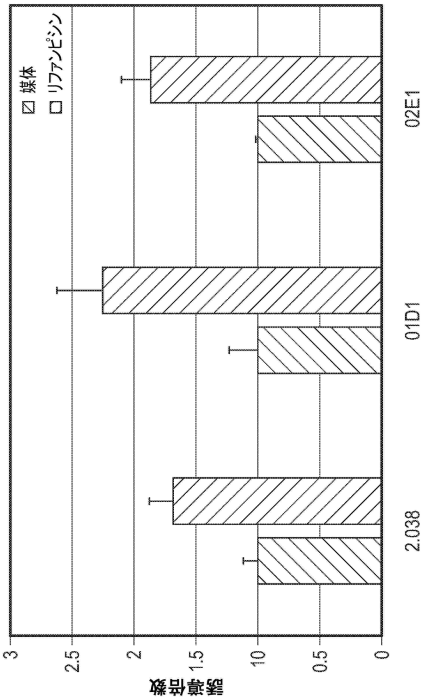


図 25

10

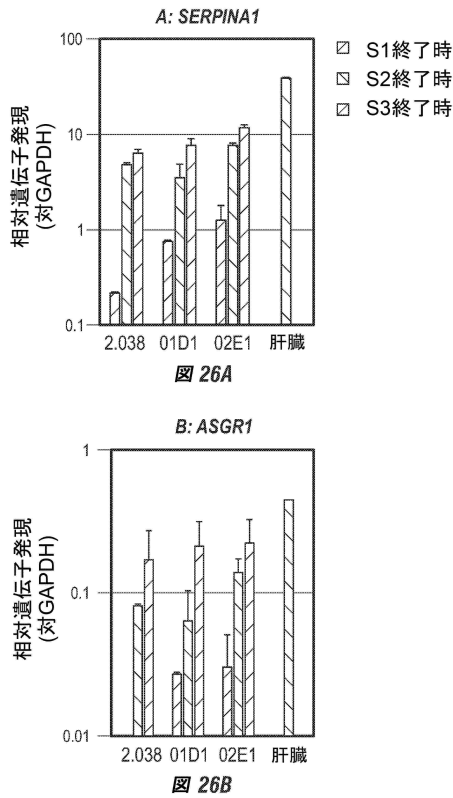
20

30

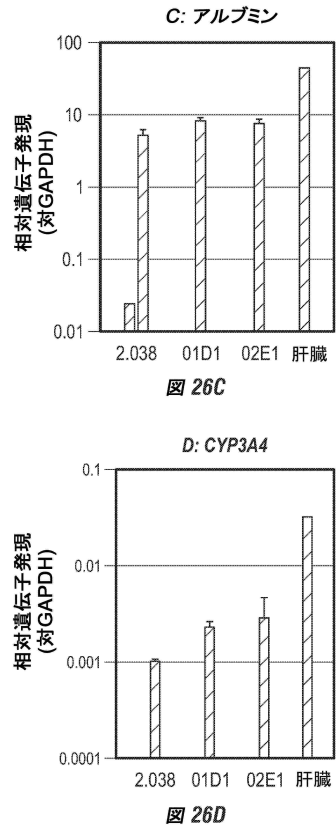
40

50

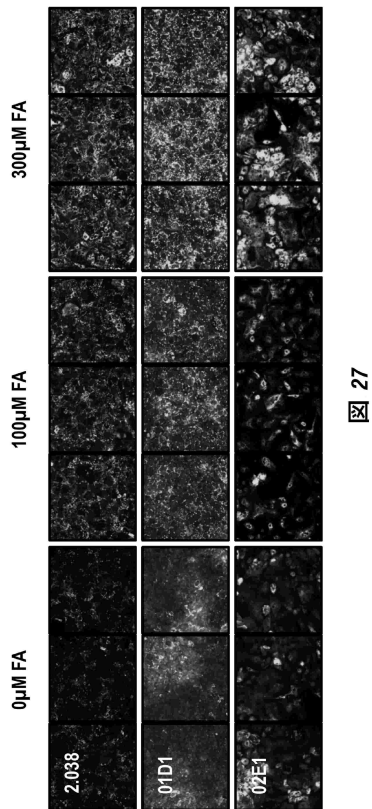
【図 26 A - B】



【図 26 C - D】



【図 27】



【図 28 A】

1	第3段階ヘパトサイト
2	iPSC由来マクロファージ (iPSC由来クッパー細胞)
3	MSC (iPSC由来星細胞)
4	内皮細胞
5	ヘパトサイト/マクロファージ
6	マクロファージ/間葉細胞
7	マクロファージ/内皮細胞
8	間葉細胞/内皮細胞
9	ヘパトサイト/内皮細胞
10	ヘパトサイト/間葉細胞
11	ヘパトサイト/マクロファージ/間葉細胞
12	マクロファージ/間葉細胞/内皮細胞
13	ヘパトサイト/マクロファージ/内皮細胞
14	ヘパトサイト/マクロファージ/間葉細胞/内皮細胞

図 28A

10

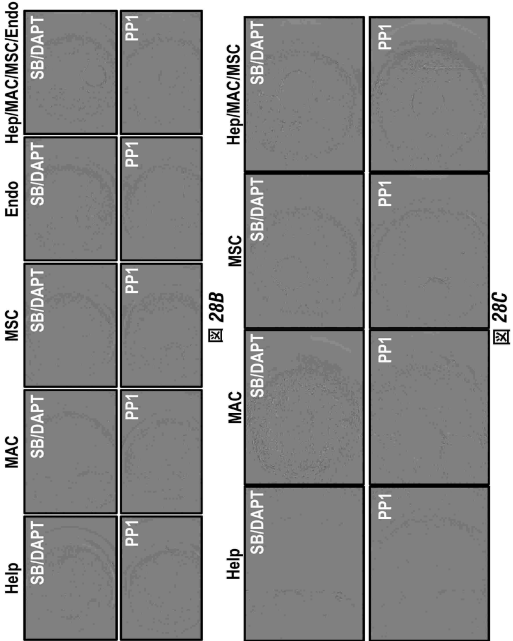
20

30

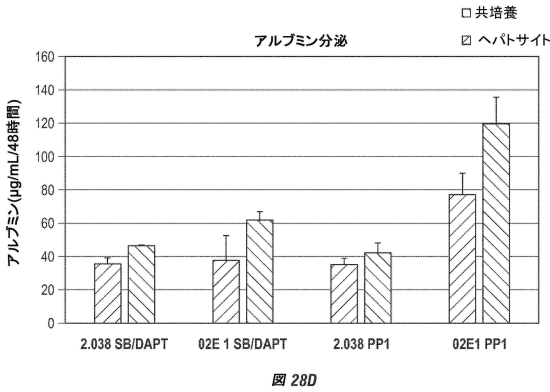
40

50

【 図 2 8 B - C 】



【 図 2 8 D 】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 グレーヴィッチ イーゴリ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 バートン サラ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 マン クリスティー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ゴードランド マデリン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 チシュ キャサリン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ラジェシュ ディーピカ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 大島 麻妃子

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711 マディソン サイエンス ドライブ 525 スイート  
200 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特表2009-520474(JP, A)

特表2016-503304(JP, A)

特表2016-517266(JP, A)

国際公開第2016/104717(WO, A1)

国際公開第2016/148216(WO, A1)

特表2014-519854(JP, A)

Toxicological Sciences, 2015年, Vol.147, No.1, pp.190-206

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 5/00-5/28

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)