

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5068901号
(P5068901)

(45) 発行日 平成24年11月7日(2012.11.7)

(24) 登録日 平成24年8月24日(2012.8.24)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 O 2 A	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 O 2 D	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	

請求項の数 7 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-594906 (P2000-594906)
 (86) (22) 出願日 平成12年1月19日(2000.1.19)
 (65) 公表番号 特表2002-534974 (P2002-534974A)
 (43) 公表日 平成14年10月22日(2002.10.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/001116
 (87) 国際公開番号 W02000/043498
 (87) 国際公開日 平成12年7月27日(2000.7.27)
 審査請求日 平成19年1月19日(2007.1.19)
 (31) 優先権主張番号 60/116,331
 (32) 優先日 平成11年1月19日(1999.1.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501288237
 ユニバーシティ オブ ノース カロライ
 ナ アット チャペル ヒル
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チ
 ャペル ヒル バイナム ホール 308
 キャンパス ボックス 4105 オフ
 イス オブ テクノロジー ディベロッ
 プメント
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (72) 発明者 レイド ローラ エム.
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チ
 ャペル ヒル スウィーテン クリーク
 3621

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト肝前駆細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト肝前駆細胞の濃縮集団を含む混合物である、ヒト肝組織に由来する細胞の混合物を含む組成物を提供する方法であって、

(a) 未熟細胞および成熟細胞を含む種々のサイズの細胞の混合物を含む、成体ヒト肝組織の単一の細胞懸濁液を得る段階；

(b) 成熟細胞を除去し、同時に未熟細胞を保持するために、細胞サイズ、浮遊密度、またはその組み合わせに基づき懸濁液のデバルキング (debulking) を行う段階；ならびに

(c) デバルキングされた懸濁液を、CD14、CD34、CD38、またはその組み合わせを発現する細胞を選択することを含ま陽性免疫選択、および、CD45、グリコホリンA、またはその組み合わせを発現する細胞を除去することを含ま陰性免疫選択にかけ、-フェトプロテイン、CD14、CD34及びCD38を発現するヒト肝前駆細胞の濃縮集団を含む細胞の混合物を提供する段階、を含む方法。

【請求項2】

未熟細胞の直径が15 μ以下である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

濃縮集団がヒト二倍体肝細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

デバルキングの段階が、遠心水簸、密度勾配遠心、パニング、アフィニティークロマトグラフィー、蛍光標識付加、対向液体流、連続流遠心法、ゾーン遠心法、磁気ビーズの使用、またはその組み合わせを含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

成熟細胞の選択的溶解をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

未熟細胞の直径が5 μ よりも大きい、請求項2記載の方法。

【請求項7】

未熟細胞の直径が8 μ よりも大きい、請求項2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

発明の分野

本発明は、肝細胞および胆管細胞を生じる多分化能細胞であるヒト肝幹細胞、および造血細胞、間葉細胞または肝細胞の系譜を含む1つまたは複数の肝臓細胞系譜へと増殖または分化する能力を持つその他の肝前駆細胞亜集団に関する。特に、本発明は、ヒト肝前駆細胞の同定に用いられるマーカーおよび特性、それらの精製および凍結保存の方法、肝細胞亜集団を造血細胞亜集団から区別できるようにする新規アプローチ、ならびに肝前駆細胞が胎児から成人に至るまでのヒト肝臓に存在することを立証する証拠に関する。本発明は、細胞療法および遺伝子療法への、ならびに生物人工臓器の確立への基盤となる。

【0002】

20

背景

成熟肝臓の主な構造的および機能的な単位は小葉であり、横断面では周辺部に3~7組の門脈三分枝（それぞれ門脈細静脈、肝細静脈、および胆管を有する）があり、中心部に中心静脈があるという2種類の異なる血管床の周りにある車輪に似た構成をとる。肝臓の細胞は、門脈および中心血管構造と隣接した一連のシヌソイドを規定する有窓内皮が両側に並んだ細胞板として構成される。最近のデータからは、門脈三分枝のそれぞれの周囲に位置する細管であるヘリング管から小導管が生じて、肝プレート内に区域1（zone 1）の全体にわたって拡張および接続し、瓶洗浄ブラシに類似したパターンを形成することが示されている（Theise, N. 1999 Hepatology. 30 : 1425 ~ 1433）。

【0003】

30

肝細胞はシヌソイドの全体に沿ってディッセ腔という狭い空間によって内皮と隔てられている。この構成の結果として、肝細胞はそれぞれがシヌソイドに面した2つの基底ドメイン、および隣接した肝細胞間の接触領域によって規定される1つの頂側（apical）ドメインを有する。基底ドメインは血液と接触し、血漿成分の吸収および分泌に関与するが、一方、頂側ドメインは胆汁酸塩の分泌に特化した毛細胆管を形成し、胆管との相互接続ネットワークを通じて連絡している。血液は門脈細静脈および肝細動脈からシヌソイドを通過して末端の肝細静脈および中心静脈へと流れる。

【0004】

小葉はこの微小循環パターンに基づいて、門脈周囲領域である区域1、小葉中央領域である区域2、および中心周囲領域である区域3という3つの区域に分けられる。増殖能、形態学的基準、倍数性、および大部分の肝特異的遺伝子は、区域の部位と相関している（Gebhardt, R.ら 1988. FEBS Lett. 241 : 89 ~ 93 ; Gumucio, J. J. 1989, Vol. 19. Springer International, Madrid ; Traber, P.ら 1988. Gastroenterology. 95 : 1130 ~ 43）。小葉の幅方向および門脈三分枝から中心静脈への血流の方向に従って生じる酸素を含む血液成分の濃度勾配が、この区域構造の一部、例えば解糖および糖新生の相互区画化の原因となっている。しかし、2つのみを例に挙げると、ギャップ結合蛋白質コネキシン26の門脈周囲区域分布およびグルタミンシンターゼの中心周囲区域分布はこのような勾配の影響を受けず、ほとんどの組織特異的遺伝子をより代表するものであり、細胞に固有の、または微小循環における血流以外の変数に固有の要因によって決定されるように思われる。

40

【0005】

50

肝細胞、胆管上皮細胞（胆管細胞）、および内皮細胞に加えて、門脈域と中心路との間の領域には、伊東細胞およびクッパー細胞などの他の種類の細胞も含まれる。これらは肝臓の病的状態、特に炎症および線維化には大きな役割を果たすが、正常臓器の主な恒常性機能への直接的な寄与はわずかであるように思われる。

【0006】

肝臓は、前腸尾部および横中隔（臍側間充織の一部）から形成される肝側室の収束の結果として発生する。肝細胞の形成は、内胚葉上皮が心臓形成性中胚葉と、おそらくは繊維芽細胞増殖因子を介して、相互作用した後始まる。その後、特化した肝細胞が増殖し、横中隔間充織の内部に索状に貫入して肝原基を形成する。肝臓のこれらの初期発生段階には上皮-間充織の直接相互作用が極めて重要であり、これによってどの細胞が、それぞれ肝細胞または胆管細胞、および有窓内皮になるかが指令される。間充織特異的遺伝子である *h1x* および *jumonji* の変異によって肝臓の発生が阻止されることから、この組織からの寄与の重要性が示される。発生初期の肝臓は、基底膜のない連続した内皮を境界とする始原肝細胞の塊、および多くの造血細胞からなる。内皮が変形して不連続的な有窓内皮になるのに伴い、脈管構造、特に門脈脈管構造が基底膜の形成を伴って発達する。門脈間質は胆管の発生に対する誘因になると思われ、それが門脈細静脈、肝細動脈、および胆管を取り囲むことによって門脈三分枝が形成される。未熟肝細胞が急速に増殖して実質プレートが形成されるが、これはおそらく、造血細胞の大部分（すべてではない）の骨髄への移動と同時に起こる、C-CAM 105、Agp110、E-カドヘリンおよびコネキシンなどの組織形成性分子の量および分布の変化に応じたものと思われる。最近の研究からは造血前駆細胞の一部が静止状態の成体齧歯類肝臓に存続している可能性が示唆されており、ヒトおよびマウスの成体肝のいずれからも造血幹細胞が単離されている（Crosbie, O.M.ら 1999. *Hepatology* . 29: 1193~8）。成熟型の身体的組織化は、齧歯類では生後数週間以内に起こり、ヒトでは生後数年以内に起こる。代謝区域分布は、種々の酵素に対して幾分異なるスケジュールに従って確立されるが、出生後の時期には明らかとなる。

【0007】

幹細胞および分化能が拘束された（committed）前駆細胞

幹細胞とは、自己複製性であって、多分化能であり（すなわち、複数の運命を有する娘細胞を生じる）、盛んに増殖し、1つまたは複数の組織を再構成しうる始原細胞と定義される。幹細胞に関する文献のほとんどは、胚に関する文献、または造血組織、表皮組織もしくは腸組織に関する文献のいずれかに由来するものである。

【0008】

より最近になって、この定義は、特定のクラスの幹細胞を含むように修正された。生殖細胞を含むすべての細胞種の発生に関与する可能性を持つ幹細胞は、全能性幹細胞と呼ばれ、これには接合子および8細胞期（桑実胚）までの正常胚細胞が含まれる。胚性幹細胞は「ES」細胞とも呼ばれ、胚盤胞の全能性正常細胞に由来する永久細胞集団からなり、1980年代初期に初めて報告された。ES細胞系は全能性を保ったままインビトロ培養が可能である。ES細胞は、免疫不全宿主の子宮内以外の何らかの部位に導入された場合には腫瘍原性であり、奇形癌を形成する。しかし、正常胚盤胞に注入して戻してやると胚発生を再開することができ、正常であるがキメラ性のマウスの形成にかかわる。ES細胞系は、多くの種（マウス、ラット、ブタなど）から樹立されているが、培養物からの改変ES細胞を胚盤胞と融合させた後に胚盤胞を偽妊娠宿主に移植することにより、新たな表現型を備えた動物（ノックアウト体、トランスジェニック体）を作製するためにルーチンに用いられているのはマウス系のみである。ES細胞の特徴の多くを示す胚性生殖（EG）細胞系は、始原生殖細胞集団からインビトロで直接単離することができる。ES細胞と同じく、EG細胞を免疫不全マウスに注入すると奇形癌を形成し、胚盤胞に注入すると生殖細胞を含むキメラが生じる。

【0009】

運命が決定された（determined）幹細胞とは、限定された数の細胞種に遺伝的可能性が制限された、盛んな増殖能を持つ多分化能細胞のことである。テロメラーゼの分野などで増

10

20

30

40

50

加しつつある知見からは、運命が決定された幹細胞は自己複製を行わず、その子孫は親細胞よりも増殖能が低い可能性があることが示唆される。運命が決定された幹細胞からは遺伝的可能性が単一の運命、例えば幹細胞に限定されることによって多分化能を失った娘細胞が生じ、これらは分化能が拘束された前駆細胞と呼ばれる。肝臓細胞系譜には、分化能が拘束された幹細胞前駆細胞および分化能が拘束された胆管前駆細胞がある。

【0010】

最近、広く取り上げられた実験により、ヒトES細胞培養物をヒト胚から樹立しうることが報告された。これらのヒトES細胞を組織に注入することにより、損傷した臓器および組織を再構成させられるのではないかと提唱されている。ES細胞およびEG細胞を子宮以外の部位に注入すると腫瘍を形成するという所見から考えて（上記参照）、ヒトES細胞を患者に接種するという計画は現実的でなく、その患者に腫瘍を発生させるという重大なおそれがある。この難題を克服するために、いくつかのグループは、規定の微小環境条件下でES細胞を分化させて、患者に安全に接種しうると運命が決定された幹細胞にする計画に取り組んでいる。例えば、造血前駆細胞の作製については一定の成果が得られている。しかし、培養物を患者に接種した場合に、培養物中の残ったES細胞が腫瘍発生のリスクをもたらすという懸念は残る。以上のことから考えると、胚発生時の細胞の運命を司る無数の制御過程が発生生物学の研究によって明らかにされない限り、ES細胞は実験的ツールにとどまり、細胞療法または遺伝子療法の臨床プログラムにつながる望みは乏しいと考えられる。細胞療法または遺伝子療法の臨床プログラムにつながる唯一の現実的な選択肢は、限定された数の細胞種に遺伝的可能性が制限された、運命が決定された幹細胞を用いることである。これに対して、既知の条件下でES細胞によって産生される種類の組織（例えば、造血細胞）については、ES細胞には生物人工臓器につながる見込みが大きいと思われる。

【0011】

肝臓幹細胞をめぐる議論

幹細胞が成体正常肝に存在するかどうかは肝臓細胞生物学の分野では大きな議論のテーマとなっている。この分野で主流となっている、競合するいくつかのモデルの概要を以下にまとめた。イタリック体の部分は各モデルの中心的な概念を示している。

【0012】

この分野の一部の専門家は、肝幹細胞は胚組織のみに存在し、成体肝には幹細胞は存在せず、すべての成熟肝細胞は肝臓の再生過程に等しく関与すると考えている（Farber, E. 1992、肝臓癌形成における細胞種の役割（Role of Cell Types in Hepatocarcinogenesis）、S.A.E.編、Academic Press、New York）。ファーバー（Farber）のモデルでは、すべての成熟実質細胞は表現型の点で同等であり、肝臓における増殖能および遺伝子発現の既知の不均一性は微小環境のみに起因すると考える。ファーバー（Farber）は、発癌条件下では成体実質細胞が逆分化して腫瘍細胞になると提唱している。このモデルは肝臓癌発生の分野で数十年にわたって有力であり、現在も肝再生の研究で強い影響力を持つ。

【0013】

すべての肝細胞は幹細胞であると考える専門家もいる（Kennedy, S.ら 1995. Hepatology. 22: 160~8; Michalopoulos, G.K.ら 1997, Science. 276: 60~6）。これらの研究者は、すべての実質細胞は同等であり、可塑性が高く、遺伝子発現が微小環境のみによって指令されると考えている。適度な発癌条件下では成熟実質細胞は幹細胞となり、続いて腫瘍細胞に変換されうると仮定されている。

【0014】

静止幹細胞モデルは、ウィルソン（Wilson）およびルデュック（Leduc）（Wilson, J. W.ら 1958. J. Pathol. Bacteriol. 76: 441~449）の研究に基づく。造血の分野と同じく、この考え方は肝臓癌形成に関する幅広い研究によって主な信頼を得た（Marceau, N. 1994. Gut. 35: 294~6）。これらの研究者は、二分化能前駆細胞を含む前駆細胞は成体組織に存続しうると考えているが、それらは胚発生からの細胞集団の稀な残存物または遺残物であると提唱している。彼らは、前駆細胞は肝臓の正常または再生機能には何ら役割を果たさず、病的状態のみに役割を果たすと仮定している（Overturf K,ら 1999. American J

10

20

30

40

50

ournal of Pathology. 155 : 2135 ~ 2143)。すなわち、それらは筋肉内の衛星細胞と同じように「静止状態」にあると仮定されている。これらの細胞は、細胞核の特徴的な形状から「卵形細胞」と記載されている。それらは小型(ほぼ9 μ m)であり、細胞表面に特徴的な抗原プロファイルを発現する。すべての成熟肝細胞は増殖および遺伝子発現に関して同等であり、遺伝子発現の不均一性のすべての様相は細胞微小環境のみによって指令されるとみなされる。静止幹細胞モデルの支持者は実質細胞が門脈周囲から中心周囲領域に移動するという考え方を強く否定している。幹細胞および他の肝前駆細胞の重要性は病的状態のみに、特に発癌に関係したものであると考えられている。このため、これらの研究者の取り組みの対象は、種々の発癌性傷害による処理を受けた動物における前駆細胞の候補に絞られている。これらの研究から、「卵形細胞」は再生条件または軽度から中等度の損傷条件下では急速に増殖する細胞の認識しうる集団を形成しないことが示されている。意味のある数の増殖性卵形細胞集団は、極めて高度の肝損傷の後には観察されていない(Grisham, J. W.ら 1997. 幹細胞(幹細胞s)、C.S. Potter編、Academic Press、London. 233 ~ 282)。

10

【0015】

肝細胞の流動に基づくモデル(Arber, N.ら 1988. Liver. 8 : 80 ~ 7 ; Zajicek, G.ら 1991. Liver. 11 : 347 ~ 51)は厳しい批判を受けており、主として無視されている(Jirtle, R.L. 1995. 肝再生および発癌：分子的小および細胞的機序(Liver Regeneration and Carcinogenesis : Molecular and Cellular Mechanisms)、Academic Press、New York)。この仮説では、幹細胞区画が門脈三分枝のそれぞれで、中心静脈へと「流れる」成体実質細胞を生じると仮定している。流動過程によって娘細胞は異なる微小環境と接触し、細胞の表現型が変化する。さらに、微小環境は表現型の極めて重要な決定因子であると仮定される。大半の研究者は、標識したドナー細胞が移動して肝臓に再び導入されることはないことを示した研究と矛盾することから、このモデルに反対している(Kennedy, S.ら 1995. Hepatology. 22 : 160 ~ 8)。しかし、流動モデルに批判的な最も決定的な証拠を提示した研究においても、微小環境または細胞系譜上の位置がドナー細胞に用いたマーカーの発現に影響を及ぼすか否かは不明である。さらに、肝臓流動仮説は、肝前駆細胞に関係があると長い間考えられてきたヘリング管から小導管が生じて、肝プレート内の少なくとも区域1(zone 1)の全体にわたって拡張するというティース(Thiese)らの最近の所見からみて、再検討を要すると考えられる(Theise, N. 1999. Hepatology. 30 : 1425 ~ 1433)。

20

30

【0016】

リード(Reid)らは、肝臓が、幹細胞および成熟系譜の系であると提唱している(Sigal, S. H.ら 1992. Am J Physiol. 263 : G139 ~ 48)。彼らは、組織は幹細胞または初期前駆細胞集団によって泉のように栄養分を受ける成熟系譜として組織されると仮定している(Brill, S.ら 1993. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine. 204 : 261 ~ 9)。組織は「若齢から中年、高齢の細胞」へと進行するものと定義される。成熟過程は、細胞サイズ、形態、抗原プロファイル、増殖能および遺伝子発現の系譜位置依存的な変化によって生じる。これらの変化は、微小環境および微小環境によって誘導される変化とは関係なく、自律的な細胞変化の組み合わせによるものと仮定される；微小環境には栄養素、ガス交換(酸素、CO₂)、pH、ホルモン、細胞間相互作用および細胞外基質の化学的性質が含まれる。

40

【0017】

【表1】

区域	1	2	3
倍数性	二倍体細胞	四倍体細胞	四倍体細胞と八倍体細胞の混合物
平均サイズ	7-20 μ	20-30 μ	30-50 μ
増殖	最大	中間	後期
細胞外基質	ディッセ腔に位置する基質の化学組成における勾配であり、門脈周囲領域ではラミニンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンと混合したIV型コラーゲンからなり、中心周囲領域では繊維性コラーゲン、フィブロネクチン、およびヘパリンプロテオグリカンに変化する		
遺伝子発現	初期	中期	後期

10

【0018】

増殖性は幹細胞および初期前駆細胞で最大であって系譜を進行するにつれて低下すると仮定される。このモデルは、成体肝組織のほとんどの細胞が倍数体、大半は四倍体または八倍体であり、3分の1未満が二倍体であることを考慮に入れている。最近のデータから、再生能力の大半が二倍体細胞集団に由来し、古い細胞は倍数性に伴う肥大性応答を介した細胞量の増加によって再生に寄与するというこの考え方が裏づけられている (Sigal, S.H. 1999. American Journal of Physiology. 276 : G1260 ~ 72)。このため、これらの研究者は、細胞増殖のために最も有望なのは、細胞療法もしくは遺伝子療法または人工臓器の別にかかわらず、組織の二倍体細胞集団であると提唱している。

20

【0019】

幹細胞および成熟系譜モデルは、肝悪性腫瘍が発癌性傷害の直接的ではなく間接的な結果である可能性が高いことを示唆する点で、他の肝細胞発生モデルと食い違う。発癌性傷害は、肝臓のほとんどの細胞、特に系譜における成熟細胞を死滅させ、再生応答を強く誘導すると提唱されている。この結果生じる前駆細胞の増殖により、急速に増殖する細胞である前駆細胞における二次的変異イベントのリスクが高まり、それが悪性腫瘍をもたらすおそれがある。このため、癌では分化がブロックされる、または癌は幹細胞を標的とする発癌性傷害に起因するという古い仮説は正しいものと受け入れられるが、上記に提示した修正を必要とする。

30

【0020】

現在、成熟系譜モデルが広く受け入れられつつある背景には、肝臓にアポトーシス過程または終末分化過程を示す特徴が豊富にみられ (Sigal, S.H. 1995. Differentiation. 59 : 35 ~ 42)、成体肝に存在する肝細胞の特定の亜集団のみが盛んに細胞分裂を行いうる (Overturf K.ら 1999. American Journal of Pathology. 155 : 2135 ~ 2143 ; Tateno, Cら 2000. Hepatology. 31 : 65 ~ 74) というデータがある。このモデルでは、前駆細胞および成体細胞の亜集団 (二倍体亜集団と推定される) は、インビボに再注入した際に肝組織を再構成することができ、クローン増殖を含む盛んな増殖を行うことが可能である。

【0021】

ノートン (Naughton) に対する米国特許第5,559,022号は、肝臓からの細胞の単離、および勾配遠心の使用によるさらなる精製を開示している。しかし、単離される細胞集団は「好酸性実質細胞集団」であり、これは請求する本発明の肝前駆細胞ではない。

40

【0022】

肝前駆細胞の前臨床的および臨床的適用性

肝臓からの未熟前駆細胞の単離および同定には、この種の細胞集団が肝疾患の治療において有することから、大きな臨床的および商業的関心が寄せられている。米国では毎年約250,000人が肝不全で入院している。肝臓移植は肝不全のいくつかの病型に対する治療法であり、米国では1年に約4100件の移植が行われている。肝臓移植における制限要因の一つはドナー肝臓の入手可能性であり、これには特に臓器移植用のドナー肝臓は脳死を来したものの心停止は起こしていない患者から得たものでなければならないという前提条件があ

50

る。死体ドナーからの肝臓は成功していないが、このようなドナーの使用に関する最近の検討からは、肝臓を死後1時間以内に入手すれば、それをを用いることができる可能性が裏づけられている。

【0023】

肝臓内への細胞移植は、ほとんどの肝疾患に対する興味深い代替的療法である。細胞移植のための外科的処置は全臓器移植に必要なものと比べて規模が小さいため、高齢または虚弱などの種々の手術リスクがある患者にも用いることができる。ヒト肝細胞を用いることは他の哺乳動物に由来する細胞よりも優れており、これは病原体が仮に存在したとしてもヒト由来のものであり、患者の忍容性が優れる上に使用前のスクリーニングも容易であると考えられるためである。

10

【0024】

肝細胞移植の実施のための試みには未分画成熟肝細胞が用いられ、一定の有効性が示されている (Fox, I.J.ら 1998. *New England Journal of Medicine*. 338 : 1422 ~ 1426)。しかし、この細胞はインピボで増殖しないため、成功するには多数 (100億 ~ 200億) の細胞の注入が必要である。さらに、かなりの数の大きな成熟肝細胞 (平均細胞径30 ~ 50 μ) の導入には、注入後に大きな凝集物が形成されて致命的な塞栓を生じる傾向があることが障害となる。さらに、これらの細胞は著明な免疫拒絶反応を誘発するため、患者は人生の残りの期間を通じて免疫抑制薬による維持を余儀なくされる。その上、成熟肝細胞の凍結保存は成功しておらず、適した肝組織の入手、細胞懸濁液の調製、および臨床治療のための細胞の即時配達に関する連携のためには複雑な物流システムが必要である。

20

【0025】

肝前駆細胞の単離における進歩

肝臓からの肝前駆細胞の単離は、肝臓の細胞の陽性選択のためのマーカーが不足しているため、極めて困難な作業であることが知られている。肝前駆細胞の候補に対して用いる唯一の抗体は、発癌性傷害への曝露によって増殖するように誘導した肝前駆細胞の亜集団 (卵形細胞) に対して調製したモノクローン抗体である。しかし、これらの抗体は、造血細胞内に存在する抗体と交差反応する。

【0026】

肝臓の細胞療法および遺伝子療法のために最も用途の広い集団と推定される肝前駆細胞集団を入手するためにこれまで数々の試みがなされてきた。リード (Reid) らに対する米国特許第5,576,207号 ; 第5,789,246号では、肝臓内の規定の亜集団を提供するために細胞表面マーカーおよび側方散乱フローサイトメトリーを用いている。細胞系譜に分化能が拘束された (lineage-committed) 細胞を除去した後に、細胞マーカーに関してOC.3 (卵形細胞抗原マーカー) 陽性、AFP陽性、アルブミン陽性およびCK19陰性 (サイトケラチン19) の無顆粒細胞として検出される未熟肝前駆細胞を選択することにより、ラット肝細胞の亜集団が単離されている。前記のラット肝臓亜集団は、齧歯類肝臓から濃縮肝前駆細胞を単離および同定する上で重要な特定の特徴を示している。

30

【0027】

本明細書で開示する成体ヒト肝臓からの肝前駆細胞の単離は新規かつ予想外のものであるが、これは一部には、成体における肝前駆細胞の存在自体に関して議論があり、ヒト肝前駆細胞は存在しないか、または胚形成時から生理的に静止状態として存続していると推定されていたためである。このため、病的状態の場合を除き、それらを単離または研究しようという試みはなされなかった。

40

【0028】

これに対して、発生中の肝臓における細胞質蛋白質 α -フェトプロテイン (AFP) およびアルブミンの存在は、前駆細胞の強力な陽性指標として認識されている。肝発生の最も初期には、これらの細胞は胆管細胞系譜および肝細胞系譜の両方に進める子孫細胞を産生する。これらの娘細胞が胆管細胞系譜への分化に拘束されると α -フェトプロテイン発現は消失する。しかし、肝細胞系譜では α -フェトプロテイン発現が周産期まで続き、その時点で抑制されて、アルブミン発現が成体肝細胞の主な特徴の一つとして残される。

50

【0029】

しかし、 α -フェトプロテインは細胞内蛋白質であり、細胞の固定および透過化処理後を行わないと可視化されないため、生きた肝前駆細胞を同定するためのマーカーとしては適切でない。

【0030】

発明の概要

本発明は、ヒト肝前駆細胞の濃縮集団を含む混合物である、ヒト肝組織に由来する細胞の混合物を含む組成物を提供する方法であって、未熟細胞および成熟細胞を含む種々のサイズの細胞の混合物を含むヒト肝組織の実質的に単一の細胞懸濁液を提供すること；ならびにヒト肝前駆細胞それ自体、その子孫細胞、またはそのより成熟した型が α -フェトプロテイン、アルブミンまたはその両方の発現を示す1つまたは複数のマーカーを呈するような、ヒト肝前駆細胞の濃縮集団を含む細胞の混合物が提供されるように、成熟細胞および比較的大きなサイズの細胞の除去を許容し、同時に未熟細胞および比較的小きなサイズの細胞が保持される条件下で懸濁液のデバルキング (debulking) を行うこと、を含む方法に関する。 α -フェトプロテインおよびアルブミンは完全長でも変異型でもよい。デバルキングの工程は、細胞サイズ、浮遊密度またはその両方による分離を含みうる。デバルキングは沈降速度、流体半径、および沈降と平均密度との対比に基づくこともできる。または、分離を表面マーカーの抗体またはレクチンなどの結合成分との相対的接着性によって行うこともできる。単離される前駆細胞は二倍体でよく、直径は約15 μ 未満でよい。さらに、前駆細胞またはその子孫細胞は、 α -フェトプロテインおよびアルブミンを非制限的に含む、前駆細胞に特徴的な高分子を合成することができる。好ましくは、 α -フェトプロテインはエクソン1 (aFP) によってコードされるペプチド配列を含む。このため、この α -フェトプロテインはサイズが2Kbを上回るmRNAである完全長aFP mRNAから転写される。同様に、アルブミンは好ましくはエクソン1 (ALB) によってコードされるペプチド配列を含む。このため、このアルブミンは完全長mRNAから転写される。

【0031】

もう1つの態様において、本発明は、ヒト肝臓からの前駆細胞の単離、凍結保存および使用の方法であって、ヒト肝臓に認められる1つまたは複数の細胞系譜の前駆細胞および非前駆細胞を含む実質的に単一の細胞懸濁液を提供するためにヒト肝臓を処理する段階；細胞系譜の少なくとも1つに関連した1つまたは複数のマーカーを呈する前駆細胞が濃縮されたデバルキング済みの懸濁液を提供するために、懸濁液を懸濁液中の非前駆細胞の数を実質的に減少させるデバルキングの段階にかける段階；選択的にはデバルキング済みの懸濁液から、細胞それ自体、その子孫細胞、またはそのより成熟した型が少なくとも1つの肝細胞系譜に関連した少なくとも1つのマーカーを発現するような細胞を選択する段階；選択的には、凍結保存に最適な条件下で細胞を懸濁化する段階；ならびに選択的には増殖因子の生産および患者における治療法のために用いる段階を含む方法に関する。好ましくは、 α -フェトプロテインなどの細胞質蛋白質を発現する肝前駆細胞を選択する。本発明の処理またはデバルキングの段階は好ましくは、浮遊密度が低いおよび/またはサイズが小さい1つもしくは複数の勾配画分に関連して、細胞をその浮遊密度および/またはサイズに従って分離するための肝臓細胞懸濁液の密度勾配遠心または遠心水簸を含む。この密度勾配法にはゾーン遠心法および連続流遠心法を含めることができる。

【0032】

本発明の1つの態様は、コネキシンなどの成熟肝細胞に関連したマーカー、グリコホリンAおよびCD45などの造血細胞に関連したマーカー、ならびに/またはレチノイドおよびフォン・ビルブランド因子などの成熟間葉細胞に関連したマーカーの使用による、成熟肝細胞、造血細胞および間葉細胞を含む非前駆細胞の陰性選択である。

【0033】

本発明者らは、肝前駆細胞の使用によって成熟肝細胞の使用に伴う短所の多くを克服することができ、それらが細胞療法および遺伝子療法ならびに人工臓器における使用に理想的な細胞であることを見いだした。本細胞は小型であるため(7~15 μ)、大きな塞栓の形

10

20

30

40

50

成は極めてわずかである。また、本細胞は高い増殖能を有し、このことは患者における肝組織の再構成に必要な細胞が少なくてもよいことを意味する。さらに、本前駆細胞は免疫拒絶を誘発するおそれのある抗原性マーカーを極めてわずかしか有しておらず、必要になる免疫抑制薬はわずかまたは全くないと考えられる。肝細胞による治療法には体外治療または肝細胞の移植が含まれる。細胞、好ましくは前駆細胞を含むものは、非経口的および腹腔内を含む種々の方法のうち任意のものによって供給される。有効量の細胞が必要であり、これは好ましくは 10^3 個から 10^{10} 個までの範囲である。より好ましくは 10^5 個から 10^8 個までの範囲の細胞、最適には約 10^6 個の細胞を移植する。

【0034】

本発明のもう1つの態様において、肝前駆細胞は増殖因子および他の蛋白質の生産のために極めて有用である。これらの因子は肝臓におけるそれら自身または他の前駆細胞（例えば、造血性または間葉性前駆細胞）の増殖に関連があり、肝前駆細胞の特定の細胞系譜への特化における初期段階に関連した因子である。これらの新規増殖因子は肝疾患の治療のため、または肝前駆細胞の形質転換体である癌の抑制のために用いることができる。さらに、肝前駆細胞は、挿入された遺伝的に形質転換を生じたまたは正常な肝前駆細胞が、このような肝前駆細胞を移植された個体の健康を増進させるような、遺伝子療法のための重要な標的である。

【0035】

本発明のもう1つの局面は、細胞内部の α -フェトプロテインの発現と相関する細胞表面のユニークな抗原プロフィールの決定である。 α -フェトプロテイン含有細胞の特徴をこのようにして明らかにすることにより、その後、肝臓全体または肝葉から調製した単一の生きた細胞懸濁液からフローサイトメトリー法によって生きた肝前駆細胞を濃縮することが可能となる。さらに、本明細書に述べるヒト肝前駆細胞の単離および同定は、本発明のユニークな細胞集団を得るために本発明者らが初めて用いたユニークな方法、マーカーおよびパラメーターの組み合わせを適用することによって得られた。

【0036】

本発明の1つのさらなる局面は、肝臓、造血細胞または間葉由来の肝細胞前駆細胞を提供する。これらの細胞系譜、その子孫細胞、またはそのより成熟した型は、CD14、CD34、CD38、CD45、CD117、ICAM、グリコホリンAからなる群より選択される抗原マーカー、および/または α -フェトプロテイン様免疫反応性、アルブミン様免疫反応性もしくはその両方などの細胞質マーカーによって選択される。 α -フェトプロテインは完全長mRNA（2Kbを上回る、この型は肝前駆細胞で通常発現される）または変異型（2Kb未満、すなわち約0.5、0.8、1、1.5または2Kbであり、この型は造血前駆細胞で通常発現される）。本発明の肝前駆細胞は、胎児、新生児、乳児、小児、若年期または成体の肝臓から単離可能である。

【0037】

本発明のさらにもう1つの面によれば、単離されるヒト肝臓前駆細胞は実質的に純粋な形態へと高度に濃縮されて単離される。このような肝臓前駆細胞には肝前駆細胞、造血前駆細胞および間葉前駆細胞が含まれる。肝前駆細胞は肝細胞、胆管細胞またはその組み合わせへの発生能があり、造血前駆細胞はマクロファージ、好中球、顆粒球、リンパ球、血小板、好中球、好酸球、好塩基球またはその組み合わせへの発生能がある。間葉前駆細胞は内皮細胞、間質細胞、肝臓星細胞（伊東細胞）、軟骨細胞、骨細胞またはその組み合わせへの発生能がある。本発明の方法は、 α -フェトプロテイン様免疫反応性、CD45、アルブミン様反応性、CD34、オステオポンチン、骨シアロ蛋白質、コラーゲン（I型、II型、III型もしくはIV型）またはその組み合わせを発現する間葉前駆細胞を選択するために用いることができる。

【0038】

本発明のさらにもう1つの局面は、外因性核酸を有する肝前駆細胞を提供する。このような外因性核酸は少なくとも1つの対象となるポリペプチドをコードしうる、または少なくとも1つの対象となるポリペプチドの発現を促すことができる。

【0039】

10

20

30

40

50

本発明のさらにもう1つの局面によれば、1つまたは複数のヒト障害または機能不全による負の効果を軽減する方法であって、このような負の効果を被っている個体に対して単離されたヒト肝前駆細胞の有効量を投与することによる方法が提供される。前駆細胞は腹腔内に、もしくは脈管を介して非経口的に投与することもでき、または肝臓内に直接投与することもできる。直接投与は門脈、腸間膜静脈、肝動脈、肝胆管またはその組み合わせを介して外科的に行ってもよい。または、肝前駆細胞を個体の異所性部位、例えば脾臓または腹膜などに投与することもできる。

【0040】

本発明の方法によって軽減されうるヒト障害または機能不全には、肝胆管炎、肝軟化症、肝巨大症、肝硬変、線維症、肝炎、急性肝不全、慢性肝不全または先天代謝異常、および肝細胞癌もしくは肝芽腫などの肝臓癌が含まれる。肝臓の癌は癌の原発部位でもよく、肝臓に転移したものでもよい。転移性腫瘍は、腸、前立腺、乳房、腎臓、膵臓、皮膚、脳、肺またはその組み合わせを含む、任意の数の原発部位に由来するものでよい。

10

【0041】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、ヒト肝臓から単離された前駆細胞、その子孫細胞、その成熟性もしくは分化した子孫またはその組み合わせを含む生体物質を含むバイオリアクター；および基礎培養液などの培養液；生体物質を保持する1つもしくは複数の区画、または生体物質を含む区画；ならびに選択的には1つまたは複数の接続ポート、が提供される。さらに、バイオリアクターは選択的に、細胞外基質、ホルモン、増殖因子、栄養素またはその組み合わせ、および血清、血漿またはリンパ液などの体液も含みうる。

20

【0042】

バイオリアクターは前記の前駆細胞を生きた機能的状態に維持するために適合化され、肝前駆細胞を約1週間から約55週間までの範囲の期間にわたって維持することが可能である。特に、バイオリアクターは、産物の製造、毒性試験、またはシトクロムP450活性もしくは他の種類の薬物代謝活性に関する試験を含む代謝試験を目的とする人工肝臓としての使用のために適合化される。

【0043】

本発明のさらにもう1つの局面によれば、単離されたヒト肝前駆細胞の組成物、またはヒト肝臓から得られた前駆細胞が濃縮された懸濁液が提供される。細胞懸濁液は薬学的に許容される担体または希釈剤中にある形で提供され、治療を必要とする被験者に投与される。本発明の組成物は、ヒト肝臓に認められる1つまたは複数の細胞系譜の少なくとも1つに関連した1つまたは複数のマーカーを呈する肝前駆細胞を含み、成熟細胞を実質的に含まない。より詳細には、単離された肝前駆細胞は、CD14、CD34、CD38、CD90もしくはCD117、CD45、グリコホリンAなどの少なくとも1つまたは複数の抗原マーカー、およびフェトプロテイン様免疫反応性、アルブミン様免疫反応性またはその両方などの細胞質マーカーを発現する肝細胞、造血細胞または間葉細胞系譜およびそれ自体、その子孫細胞、またはその前駆細胞のより成熟した型を含む、1つまたは複数の肝臓細胞系譜に由来する。さらなる1つの態様において、未熟細胞、その子孫細胞、またはより成熟した型は、オステオポンチン、骨シアロ蛋白質、コラーゲンI、コラーゲンIII、コラーゲンIVまたはその組み合わせを発現する。

30

40

【0044】

本発明のさらにもう1つの態様によれば、ヒト肝臓から単離された前駆細胞、その子孫細胞、その成熟性もしくは分化した子孫またはその組み合わせを含む、肝前駆細胞の細胞培養系が提供される。細胞培養系はさらに、1つもしくは複数のコラーゲン、1つもしくは複数の接着蛋白質（ラミニン、フィブロネクチン）、および他の成分プロテオグリカン（ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど）を含む細胞外基質、または個々の基質成分を含む。この基質成分には、基質成分の断片、細胞外基質の1つのクラスからの1つまたは複数の因子がコーティングされた合成性および生分解性の材料（すなわち、マイクロスフェア）でありうる基質模倣物が含まれる。細胞培養系はさらに基本培養液または強化培地および他の栄養素、ホルモン、増殖因子を含むことができ、選択的には血清、血漿またはリンパ液な

50

どの体液を含みうる。さらに、細胞培養系は、培養皿、プレート、フラスコ、回転瓶、トランスウェルまたはこの種の他の容器などの、生体物質を保持する1つまたは複数の区画を有することができる。

【0045】

本発明の培養物またはバイオリアクターは、第I相または第II相生体内変化酵素系の活性に関する試験を含む1つまたは複数の代謝試験、肝シヌソイドおよび毛細胆管輸送系の発現、調節および活性、薬物代謝の様相、中でもシトクロムP450の活性に関する試験を含む1つまたは複数の輸送試験に用いることができる。

【0046】

本発明のさらにもう1つの態様では、付着細胞の凍結保存の方法が提供される。付着細胞の凍結保存のための方法は、(a)付着細胞および基質または粘度増強剤を提供すること、(b)培養液、氷晶防止剤、糖質調節因子、鉄供与体、リポ蛋白質および脂質を含む凍結保存混合液中に細胞を懸濁化する段階、ならびに(c)懸濁液を細胞の凝固点以下に冷却する段階を含む。ここで凝固点とは、細胞が過冷液体もしくはガラス、微晶質または巨大結晶塊などの固形塊になる温度を意味する。さらに、培養液、氷晶防止剤、糖質調節因子、鉄供与体、リポ蛋白質および脂質を含む凍結保存用の混合液も開示する。凍結保存混合液にアスコルビン酸、グリセロール(10%v/v)またはジメチルスルホキシド(DMSO、10%v/v)などの抗酸化剤を含めることもでき、ここで後者の2つの薬剤は氷晶形成防止剤として作用しうる。糖質調節因子はインスリンまたはインスリン様増殖因子でありうる。鉄供与体、リポ蛋白質および脂質はそれぞれトランスフェリン、高密度リポ蛋白質および遊離脂肪酸であってよい。遊離脂肪酸は選択的にはアルブミンとの複合体とされる。凍結保存混合液はコラーゲン、コラーゲン様物質、アガロース、メチルセルロースまたはゼラチンを含むことができ、ここでコラーゲンはコラーゲンI、コラーゲンIIIまたはコラーゲンIVでありうる。凍結保存混合液の成分はピアスパン(Viaspan)またはウイスコンシン大学(University of Wisconsin)の凍結保存溶液中にて調製しうる。

【0047】

本発明の1つのさらなる態様は、凍結保存した複数の肝前駆細胞および/またはその子孫細胞を有する収集物、細胞バンク、カタログまたは生物標本貯蔵所である。前駆細胞は上記の方法によって単離可能であるが、完全長 α -フェトプロテイン、アルブミンまたはその両方を発現する肝前駆細胞が得られる任意の許容される方法によって単離された肝前駆細胞でもよい。同様に、前駆細胞は完全長 α -フェトプロテイン、アルブミンまたはその両方の発現の指標となるマーカーを発現することもできる。貯蔵所は細胞マーカーの指標付けの体系を含みうる。解凍することにより、貯蔵所の細胞を細胞培養の開始のためにバイオリアクターに接種すること、または患者の治療のために用いることができる。

【0048】

本発明のさらにもう1つの態様は、以下に定義するエクソン1を欠く遺伝子またはmRNAの遺伝子産物である変異型 α -フェトプロテインを含む。本発明で開示する通り、変異型 α -フェトプロテインはしばしば造血前駆細胞およびその子孫細胞に伴ってみられ、肝前駆細胞には付随しない。本発明のさらにもう1つの態様は、 α -フェトプロテインのエクソン1によってコードされる配列から得た3~10アミノ酸のペプチドを含む。

【0049】

本発明のもう1つの態様は、高分子と、ペプチド α -フェトプロテインのエクソン1によってコードされる配列に由来する3~10アミノ酸を含み、抗原としての使用に適したペプチドとの結合物を含む。高分子はアルブミン、ヘモシアニン、カゼイン、オプアルブミン、ポリリジン、例えばポリ-L-リジンまたはポリ-D-リジン、および当技術分野で知られた任意の他の適した高分子でありうる。抗原は、その発現が肝前駆細胞の指標であって造血前駆細胞およびその子孫の指標ではない、 α -フェトプロテインに対して特異的な抗体を作製するために用いうる。抗体はアジュバントの存在下または非存在下で動物に抗原を接種することによって、または当技術分野で知られた通りに、脾細胞を抗原に曝露した後に脾細胞の融合によってハイブリドーマを作製することによって産生させることができる。

【 0 0 5 0 】

本発明のもう1つの態様では、ヒト肝臓から前駆細胞を単離するための方法であって、ヒト肝臓に認められる1つまたは複数の細胞系譜の前駆細胞および非前駆細胞を含む実質的に単一の細胞懸濁液を提供するためにヒト肝臓を処理すること、細胞系譜の少なくとも1つに関連した1つまたは複数のマーカーを呈する前駆細胞が濃縮されたデバルキング済みの懸濁液を提供するために、懸濁液を懸濁液中の非前駆細胞の数を実質的に減少させるデバルキングの段階にかけること、およびデバルキング済みの懸濁液から、細胞それ自体、その子孫細胞、またはそのより成熟した型が少なくとも1つの肝細胞系譜に関連した少なくとも1つのマーカーを発現するような細胞を選択すること、を含む方法が開示される。

【 0 0 5 1 】

好ましい態様の詳細な説明

I. 定義

以下の記述において、多くの用語は本発明を説明するために広く用いられる。そのような用語に与えられる範囲を含む明細書および特許請求の範囲の明白で一貫した理解を提供するために、以下の定義を提供する。

【 0 0 5 2 】

フェトプロテイン様免疫反応性： フェトプロテインによって引き起こされた任意の免疫反応。 フェトプロテインは、 フェトプロテインの異性体およびスプライシング変異体を含む、完全長または切断型となりうる。

【 0 0 5 3 】

単分化前駆細胞： 肝細胞単分化前駆細胞（肝細胞を生じる）、または胆管単分化前駆細胞（胆管を生じる）のような単一の運命を有する未成熟細胞。単分化過程は分子レベルでは理解されていない。むしろこれは、細胞の運命が先祖の細胞の運命から狭められた場合に限って経験的に起こったと認識されている。

【 0 0 5 4 】

肝細胞： 肝細胞と胆管細胞とを含む肝臓の細胞の亜集団。

【 0 0 5 5 】

肝臓の細胞： 本明細書において用いられるように、「肝臓の細胞」という用語は、その起源または運命にかかわらず、正常な肝臓に存在する全てのタイプの細胞を意味する。

【 0 0 5 6 】

幹細胞： 本明細書において用いられるように、「幹細胞」という用語は、1つより多い運命を有する娘細胞を生じうる未成熟な細胞、すなわちそれらが多能性であることを意味する。胚幹細胞（ES細胞）または哺乳類胚の8細胞期までの胚細胞のような全能性幹細胞は、幹細胞がそれと同一な娘細胞を生じる自己再生（自己維持）能を有する。対照的に、造血幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞または肝幹細胞のような規定された幹細胞は、多能性であり、十分な増殖能を有するが、自己再生能は疑わしい。全能性幹細胞の場合、いくつかの娘細胞は親と同一であり得るが、中には親より低い遺伝能となるように遺伝能を制限する特定の運命（複数）になるように「分化する」ものもある。規定された幹細胞の場合、いくつかの娘細胞は多能性を保持しているが、多能性を失って、単一の特定の運命に決定された細胞もある。

【 0 0 5 7 】

肝前駆細胞： これらの細胞は、幹細胞と胆管細胞を生じる。肝前駆細胞には3つの亜集団が含まれる：「肝幹細胞」、「単分化幹細胞前駆細胞」、および単分化胆管前駆細胞であり、最後の2つは肝幹細胞の子孫であって、単一の運命を有する、すなわち肝細胞または胆管細胞のいずれかとなるが両方にはならない未成熟な細胞である。

【 0 0 5 8 】

肝幹細胞： 肝前駆細胞の亜集団。

【 0 0 5 9 】

肝臓の前駆細胞： 肝前駆細胞、造血前駆細胞、および間葉前駆細胞を含む肝臓からの細胞集団。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

造血： リンパ球（BおよびT）、血小板、マクロファージ、好中球および顆粒球となる細胞運命を有する血球を生成すること。

【 0 0 6 1 】

間葉形成： 内皮細胞、脂肪細胞、間質細胞、軟骨細胞およびさらには骨となる細胞運命を有する間葉由来細胞を生成すること（最後の2つは肝臓において疾患状態に限って起こる）。

【 0 0 6 2 】

細胞治療： 本明細書において用いられるように、「細胞治療」という用語は、自家または同種異系材料として用いられ、患者の特異的標的細胞またはその近傍に移植される、定義された細胞集団のインピボまたはエクスピボ移入を意味する。細胞は、適した如何なる培地、担体、もしくは希釈剤、または微小担体、ビーズ、マイクロソーム、ミクロスフェア、小胞等を含む如何なるタイプの薬剤輸送系において移植してもよい。

10

【 0 0 6 3 】

遺伝子治療： 本明細書において用いられるように、「遺伝子治療」とは、患者の特異的標的細胞への定義された遺伝子材料のインピボまたはエクスピボ移入、それによって遺伝子型を変化させること、そしてほとんどの場合、特定の疾患状態を予防または変化させる最終目的のためにそれら標的細胞の表現型を変化させることを意味する。これは、標的細胞をエクスピボで改変して、患者に細胞を導入することを含みうる。または、外因性遺伝子材料を輸送して前駆細胞をトランスフェクトするために、ベクターをインピボで肝臓の前駆細胞にターゲティングしうる。さらに、遺伝子改変した前駆細胞は、患者の治療として、または生物産物源としてバイオリクターにおいて用いることができる。定義するように、基礎となる前提は、これらの治療的遺伝子技法は、顕性または不顕性の病的状態を最終的に予防、治療または変化させるようにデザインされることである。ほとんどの状況において、遺伝子治療技法の最終的な目標は、特異的標的細胞集団の表現型を変化させることである。

20

【 0 0 6 4 】

CD： 本明細書において用いられる「分化集団」、または「共通決定因子」は、モノクローナル抗体によって認識される細胞表面分子を意味する。いくつかのCDの発現は、特定の細胞系統または成熟経路の細胞にとって特異的であるが、その他の発現は、同じ細胞の活性化の状態、位置、または分化の状態に従って変化する。

30

【 0 0 6 5 】

「1つ(one)」、「1つ(a)」、または「1つ(an)」という用語が本開示において用いられる場合、それらは特に明記していない限り「少なくとも1つ」または「1つもしくはそれ以上」であることを意味する。

【 0 0 6 6 】

II. 肝細胞系統の診断マーカーとしての フェトプロテインとアルブミン
いずれも細胞質蛋白質である フェトプロテイン(AFP)とアルブミンは、肝細胞系統の特に信頼できるマーカーである。これらの蛋白質の発現は、肝臓における他の細胞タイプから肝亜集団を同定するための基礎である。

40

【 0 0 6 7 】

ヒト白血病細胞株とインピトロ刺激後の正常なTリンパ球もAFPを発現しうる。しかし、データは、白血病細胞株および活性化Tリンパ球におけるAFP mRNAが、肝細胞における真正のAFP mRNAと同一の型であるか否かを扱っていない。RT-PCRは特定のRNA鋳型を同定する場合の既知の最も感度のよい方法であるため、AFPまたはアルブミンmRNAの発現が、免疫蛍光、ウェスタンブロット等のようなルーチンの蛋白質アッセイによって測定できるか否かを決定しなければならない。

【 0 0 6 8 】

本明細書に記載の研究の前に、ヒトの造血細胞におけるAFPまたはアルブミンmRNAの型を詳細に調べた研究者はなかった。本発明は、造血細胞におけるAFPおよびアルブミンの変

50

種型の発現を証明する。

【 0 0 6 9 】

図 1 は、フェトプロテイン mRNA のいくつかのエクソンに対するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による肝臓および肝臓以外の細胞の分析を示す。PCR 分析によって、造血細胞に切断型 AFP が存在することが判明する。hAFP1、hAFP2、hAFP3、および hAFP4 のプライマー組合せを用いた RT-PCR を実施した。M = 分子量マーカー、レーン 1 ~ 3 = Hep3B ; レーン 10 ~ 12 = STO 繊維芽細胞 ; レーン 13 ~ 15 = RNA なし。注意、レーン 2、4 および 8 には、重なり合ったバンド、切断型の AFP イソ型が存在する。レーン 1 および 4 において認められる肝臓の細胞に独自の変種 AFP イソ型が存在する。完全な AFP 種はレーン 3 および 6 に認められる。本発明者らは、実施例 1 に例示するように、hAFP mRNA の変種型の特徴を調べるために、PCR プライマー 9 個をデザインした。AFP のコード配列はエクソン 1 からエクソン 14 に伸長する。AFP mRNA のエクソン 1 に対するプライマー以外のプライマーの組合せは全て、ヒト赤白血病細胞株 K562 における AFP mRNA の一部を増幅するが、全ての組合せはヒト肝細胞株 HepG2 および HepG3 において AFP mRNA を検出した。このことは、AFP mRNA の変種型が K562 において発現されたように、エクソン 2 ~ エクソン 14 を含むが、AFP の全コード配列に及んでいないことを証明している。結果は、肝細胞を同定するために唯一の有用なプライマーは、その発現が証明可能に組織特異的に制限される AFP のエクソン 1 の部分を検出するプライマーであることを示唆している。エクソン 1 は肝前駆細胞亜集団にとって独自であるという事実により、これを造血前駆細胞タイプに対して肝細胞を同定するためのプローブとして用いることができる。

【 0 0 7 0 】

AFP の切断型は、造血細胞のいくつかの亜集団に認められることから、肝細胞および造血細胞の双方においてアルブミンも分析する。アルブミンに対するプライマーを AFP (上記参照) の場合と類似のように作製して、これを用いて肝細胞株対造血幹細胞株におけるアルブミン発現を評価する。AFP に関して、切断型は造血細胞株である K562 に認められ、転写物はエクソン 12 ~ 14 に対するプライマーによって検出される。

【 0 0 7 1 】

本発明は、肝細胞集団対造血細胞集団における AFP とアルブミン mRNA の変種型の発現パターンを決定するために、RT-PCR の特異的プライマーのデザインおよび調製を開示する。本明細書に開示の発明は、AFP およびアルブミン mRNA の双方の変種型を造血細胞前駆体に認めうることを証明している。このことは、そのような感度のよいアッセイを用いる場合、造血細胞集団から肝細胞集団を定義するためには、AFP に対するエクソン 1 プローブを用いることのような、さらなる基準を用いなければならないことを意味する。

【 0 0 7 2 】

図 2 は、アルブミンのいくつかのエクソンに対する PCR による肝臓および肝臓以外の細胞の分析を示す。AFP mRNA の切断型は、造血細胞のいくつかの亜集団に認められることから、アルブミンも肝細胞および造血細胞の双方において分析する。アルブミンに対するプライマーは、AFP に対するプライマー (上記参照) と類似のように作製して、これを用いて肝細胞株対造血細胞株におけるアルブミンの発現を評価する。AFP に関して、切断型は造血細胞株である K562 において認められ、転写物はエクソン 12 ~ 14 に対するプライマーによって検出される。

【 0 0 7 3 】

肝臓の発達研究から、胎児肝臓は子宮内発育の際に造肝および造血臓器の両者であることが証明されている。肝臓発達の様々な段階において、胎児肝臓は多数の造血細胞、特に赤血球細胞系統を含む。さらに、肝臓形成および造血系は密接に相互関連していること、そしてこの相互作用には、AFP およびアルブミンまたはおそらくこの蛋白質のイソ型の合同発現が含まれる可能性があることはますます理解されている。AFP のエクソン 1 が肝前駆細胞亜集団に対して独自であるという事実により、本発明の肝臓の前駆細胞の特異的亜集団を同定することができる。

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

PCR分析によって、造血前駆細胞はAFPおよびアルブミンmRNA種の双方を発現しうることが判明するが、mRNA発現レベルは非常に低い。実際にAFPとアルブミンとをフローサイトメトリー分析によって測定すると、検出可能なAFPまたはアルブミンはK562において認められない。AFPおよびアルブミンはいずれも肝細胞の同定における重要なガイドであるが、AFPは、それが肝前駆細胞において強度に発現されていることから、フローサイトメトリーによる精製後に肝前駆細胞を特に診断する。AFPはまた、如何なる種類の分画方法を行った後でも肝前駆細胞の純度を推定するためにも用いられる。

【0075】

III. ヒト肝臓の前駆細胞のプロセッシング

本発明者らは、胎児または成人肝から解離したヒト肝臓前駆細胞を最適に生成する方法を確立した。成熟肝細胞の単離は通常、組織を単細胞懸濁液に酵素的および機械的解離した後、密度勾配遠心、遠心エラトリエーション、示差酵素消化プロトコール（すなわち、肝星細胞）、および/または細胞培養を用いた選択による分画を含む（フレッシュネイ（Freshney）、「動物細胞の培養、基礎技術マニュアル（Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique）」、1983、アランRリスリンク、ニューヨーク州において論評されている）。密度勾配遠心は、全ての分画を捨てて、最終的な沈降物のみを保持することによって、細胞破片および死細胞と思われるものを除去するために、ほとんどの研究者によって一般的に用いられている。

【0076】

他の全ての研究者は密度勾配分画の最終的な沈降物を用いるが、本明細書に開示のプロトコールは、密度勾配の上の分画を利用して沈降物を除外するという点で独自である。本明細書に開示のように、密度勾配遠心の新規変法は、沈降物を捨てて、より低い浮遊密度を有する細胞（すなわち、勾配の上部または上部付近で採取する細胞）を保持する点である。本発明者らは、より若く（すなわち二倍体）凍結保存により耐える細胞は、沈降物よりむしろパーコール密度勾配の上部または勾配内に存在することを発見した。

【0077】

IV. デバルキング

デバルキングは肝臓の前駆細胞の濃縮プロセスである。前駆細胞は、肝、造血、および間葉細胞系統を含むいくつかの細胞システムのいずれであってもよい。肝臓は四倍体または多倍体となりうる多様な成熟細胞を有するため、前駆細胞の濃縮された集団を調製するために、一部または全ての成熟細胞を除去することは有用である。デバルキング段階は4で行うことが都合がよいが、これは必須ではない。

【0078】

肝臓の細胞の単細胞懸濁液を調製した後、細胞サイズ、浮遊密度、またはその両者の組合せに従って、細胞を多数の分画に分離する。本発明によれば、肝臓の前駆細胞は直径が15ミクロン未満である。培養培地における沈降速度（基礎培地または栄養に富む培地となりうる）、とりわけ、勾配沈降、より大きい孔サイズの分離ビーズを用いたクロマトグラフィーを含む、そのような小さい細胞をより大きい細胞から、そして細胞破片から分離する如何なる分離方法も適している。勾配材料は、ポリビニルピロリドンコーティングシリカ（パーコール）、クロスリンクした蔗糖（フィコール）、デキストランまたは当業者に既知の如何なる材料ともなり得、細胞溶解を防止するために等張となるように、例えば燐酸緩衝生理食塩液またはイーグル基本培地（BME）において調製される。解離した細胞の懸濁液は典型的に、勾配材料の層の上部に適用され、4で維持しながら遠心を行う。または、細胞懸濁液を、血液成分の単離に用いられるような、すなわちプラズマフェレーシスのようなアフレーシスユニットに適用してもよい。成熟実質細胞および四倍体細胞を含む大きい細胞は、小さい前駆細胞および二倍体細胞より速く沈降して、除去される。遠心プロトコールのデザインは、低い酸素圧に対する細胞の感受性を考慮して、細胞濃縮に要する時間を最小限にする。細胞懸濁液はこれらの方法によって肝前駆細胞を濃縮することができる。さらに、デバルキング段階は遠心エラトリエーション、細胞表面接着蛋白質に基づく選別、アフィニティクロマトグラフィーもしくはバッチプロセッシング、蛍光標識

10

20

30

40

50

によるタギング、ゾーン遠心、連続流遠心、磁気ビーズとのインキュベーション後の磁気ソーティング、例えば抗体と複合体を形成した磁気ビーズ、またはこれらの方法の組合せを含みうる。密度勾配遠心は不連続または連続勾配となりうる。パーコール分画は、直ちに使用する場合、凍結保存、培養の確立、またはさらに濃縮する場合に適している。さらなる濃縮は、選別、親和性選択、FACSソーティングまたは当技術分野で既知であって上記の如何なる技術によっても行うことができる。ネガティブセレクションは、CD45、グリコフォリンAに関するマーカー、または下記のような他のマーカーを発現する細胞を除去することによって行う。ポジティブセレクションは、CD14、CD34、CD38、ICAMまたは完全長のフェトプロテイン、アルブミン、または双方の発現を示す他のマーカーを発現する細胞を選択することによって行う。

10

【0079】

デバルキングのもう一つの態様において、非前駆細胞は選択的溶解によって選択的に除去する。赤血球は、細胞懸濁液を塩化アンモニウムの等張溶液に短く暴露した後、培養培地で希釈して、赤血球「ゴースト」および遊離のヘモグロビンを除去するために遠心を行うことによって溶解する。同様に、非前駆細胞は、下記の凍結保存混合液を用いて凍結することによって選択的にそして加水分解的に溶解する。デバルキングの様々な方法は、多倍体細胞、成熟造血細胞に関連したマーカーを発現する細胞、成熟肝細胞に関連したマーカーを発現する細胞、成熟間葉細胞に関連したマーカーを発現する細胞、およびこれらの細胞の組合せを除去する。

【0080】

20

V. ヒト肝前駆細胞およびその子孫の凍結保存

本発明の凍結保存方法論は独自であり、先行技術において用いられる方法とは異なっている。大きい違いは、異なる緩衝液を用いることと、密度が低く、それゆえ勾配遠心において浮遊性である肝前駆細胞集団の凍結保存を用いることである。肝前駆細胞はサイズが小さい二倍体である。

【0081】

成熟ヒト肝臓細胞の凍結保存の成功が非常に望ましいが、当技術分野においてこれまで達成されていない。一般的に、凍結保存の成功は液体窒素温度（ $-160 \sim -180$ ）で細胞を凍結して、それらを融解した場合に $>75\%$ の生存率を認めうること、そして培養皿への接着能を有することとして定義される。より古い方法を用いた場合、齧歯類またはヒト起源の成熟肝細胞の上記の条件で凍結後の生存率は $30 \sim 40\%$ であり、接着能を有しない（例えば、トレド・ペレヤ（Toledo-Pereya）ら、米国特許第4,242,883号；ファイー（Fahy）ら、米国特許第5,217,860号；ミュロン（Mullon）ら、米国特許第5,795,711号；およびファイー（Fahy）ら、米国特許第5,472,876号を参照のこと）。これらの特許の開示では、細胞の生存率が非常に悪く（ $<50\%$ ）、主に細胞培養を扱っており（細胞懸濁液における個々の細胞ではない）、凍結前に緩衝液に細胞を持続的に暴露する必要がある。

30

【0082】

図3は、本発明の方法に従って低温保存した肝臓細胞の優れた生存率を示す。データは処理時対融解時に測定した生存率の百分率変化として表記する。これらのデータは、凍結保存が細胞の生存率に有意な影響を及ぼさなかったことを示している。保存550日までの期間で生存率に有意な変化を認めなかった。本発明の特殊な凍結保存方法論は、新規緩衝液、新規細胞集団、および選択的に細胞外マトリクスの形での細胞の抱埋を用いることを含む。この方法論によって、細胞の分散直後であって凍結前に測定した生存率とは異ならない融解時の生存率が初めて得られる。実際の生存率は、到着時の組織の状態、ならびに酵素および機械的解離を用いた細胞懸濁液の調製の影響によって変化し、本研究では胎児肝臓細胞の生存率は平均で 77% である。この凍結保存方法論によって、凍結プロセスによる生存率の有意な喪失は起こらず、そして融解後のエクスピボにおける接着および増殖する細胞の有意な喪失は起こらなかった。

40

【0083】

VI. ヒト肝臓前駆細胞の免疫選択

50

本発明は、ヒト肝臓組織の実質的な単細胞懸濁液を提供する段階、および懸濁液に正または負の免疫選択を行う段階を含む、ヒト肝臓から前駆細胞を単離する方法を教示する。免疫選択の方法は、それ自身、その子孫またはそのより成熟型が細胞系統の少なくとも1つに関連した少なくとも1つのマーカーを発現するそれらの細胞を懸濁液から選択する段階を含む。これらの細胞系統は造血細胞、間葉細胞、肝細胞、またはこれらの細胞系統のいくつかの組合せとなりうる。細胞選択段階はグリコフォリンA、CD45、成人肝臓細胞特異的マーカー、コネキシン32、またはこれらの組合せを発現する細胞を除去する段階を含む。その上、選択方法は、多倍体細胞、成熟造血細胞に関連したマーカーを発現する細胞、成熟肝細胞に関連したマーカーを発現する細胞、成熟間葉細胞に関連したマーカーを発現する細胞、またはその組合せを除去する段階を含みうる。細胞の選択は、CD14、CD34、CD38、ICAMまたはその組合せを発現する細胞を選択する段階を含みうる。さらに、方法は、グリコフォリンA、CD45、またはこれらの組合せを発現する成熟造血細胞を同定して選択することができる。その上、選択方法は、レチノイド、フォン・ウィルブランド因子、第VIII因子、またはその組合せを発現する成熟間葉細胞を選択することができる。

10

【0084】

免疫選択方法は、細胞サイズ、浮遊密度、またはその組合せに基づいてデバルキングと組みあわせて行うことができる。選択方法は、造血細胞、肝細胞、または間葉細胞であってもよい少なくとも1つの細胞系統に関連した少なくとも1つのマーカーを発現する細胞を選択することができる。細胞の選択、その子孫、またはそのより成熟型の選択は、少なくとも1つの肝細胞系統に関連した少なくとも1つのマーカーを発現することができる。その細胞系統は実質細胞または肝細胞または胆管細胞となりうる。このように、細胞によって発現されるマーカーは、CD14、CD34、CD38、CD117、ICAMまたはその組合せとなりうる。

20

【0085】

VI. 細胞マーカーおよびフローサイトメトリー

フェトプロテインを発現するがアルブミンの発現を伴うまたは伴わない未成熟細胞集団としてのわれわれの現在の肝臓前駆細胞の定義を用いて、われわれは、免疫選択技術を用いてこれらの細胞に関する特異性を選択するマーカーを評価した。驚くような発見は、造血前駆細胞の古典的マーカーであるマーカー（すなわちCD34）の多くが、肝細胞前駆細胞亜集団も同様に同定することであった。このように、CD34の単色ソーティングによって、AFPを発現する細胞の有意な濃縮が得られた（少なくとも9倍）。しかし、これらのAFP陽性細胞の必ずしも全てが肝前駆細胞であると確認できない。アルブミン陽性である割合に基づいて、われわれは、細胞の80~90%が肝前駆細胞であること、そして他は未成熟すぎてまだアルブミンを発現できない肝前駆細胞であるか、またはおそらくフェトプロテインを発現する造血細胞亜集団のいずれかであると推定する。

30

【0086】

本発明は、独自のフローサイトメトリーソーティング方法を用いている。肝前駆細胞に関して独自に定義する2つの特徴としてAFPとアルブミン発現の組合せを用いて、われわれは、肝前駆細胞を定義する抗原マーカーと他のフローサイトメトリーパラメータとを同定した。今日までのソーティング方法は、二倍体である（ヘキスト色素33342からの蛍光を用いて）、側方散乱によって無顆粒である、特定の造血細胞抗原に関して陰性である（すなわち、グリコフォリンA、赤血球抗原およびCD45）小さい細胞（前方散乱の測定により $< 15 \mu$ ）のソーティングを行った後、肝細胞亜集団と造血細胞亜集団のあいだで共有される陽性マーカー（すなわちCD14および/またはCD38）に関するソーティングを含む。

40

【0087】

本明細書に記述した実験において、本発明者らはフェトプロテインを強く発現し、アルブミンを弱く発現し、そしてCD14、CD34、CD38、CD117、またはその組合せを発現する細胞のソーティングによって肝前駆細胞を同定する。また、造血細胞も同様に、切断型であるにもかかわらず、AFPを発現する証拠を本明細書に記述する。本発明者らは新規細胞集団および単離、同定、培養のプロセス、ならびにそのような細胞集団を用いる方法を記

50

述する。本発明の特定の細胞集団の単離、同定および培養の成功は、進化した単離方法、親和性デバルキング、高速蛍光活性化細胞ソーティング、より大きい速度と精度、ならびに改変した凍結保存および培養技術によって部分的に達成される。

【0088】

出願人は、新しく単離した細胞懸濁液から、および/または融解した凍結保存肝臓細胞から肝臓前駆細胞を精製するための、フローサイトメトリーソーティング戦略および方法を示す。これらの方法は、1) 細胞を、特異的細胞表面マーカーに対するいくつかの蛍光プローブ標識抗体によって染色する、および2) 多パラメータフローサイトメトリー技術において、負および正のソーティング方法の組合せを用いる、ことを含む。ヒト肝細胞集団からの特定の細胞系統期の細胞の精製方法は、マーカーが細胞系統の位置特異的であるように思われるため、如何なる年齢のドナーからの肝臓についても用いることができる。

10

【0089】

細胞を標識する改善された方法と、過去に用いられたフローサイトメーター(1秒間に細胞2000~6000個をソーティングし、2~4色のソーティングを行うベクトン・ディッキンソン社のFACSTAR PLUS)と比較して劇的に改善されたフローサイトメーター(1秒間に40,000個の割合で細胞をソーティングして、8色のソーティングを行うサイトメーション社の「ア・モフロ」フローサイトメーター)は、この新規細胞集団の単離および同定の成功に役立つ。

【0090】

図4は、1価FACSソーティングを図示する。細胞懸濁液を、赤色素、Cy5に結合した抗体を用いるフェトプロテイン(AFP)、および青色色素(AMCA)に結合した抗体を用いるアルブミンの免疫蛍光分析のために調製する。細胞30,000個を赤色(AFP)および青色(アルブミン)蛍光に関してスクリーニングする。結果はそれぞれの蛋白質に対する陽性細胞の明確な群を示す。さらなる分析によって、それぞれの蛋白質の陽性集団の約80%が同じ細胞によって示されること(すなわち2つの蛋白質の同時発現)が示される。AFPおよびアルブミン様免疫反応性の発現は、細胞懸濁液においてよく定義され、明確な群の細胞が、バックグラウンドのシグナルとの明確な差を示す。フェトプロテインは、未分画の細胞懸濁液における細胞の6.9±0.86%において発現され、アルブミンは7.7±1.1%に存在する。AFP陽性細胞において、75.6±4.9%がアルブミンを同時発現し、アルブミン陽性細胞の80±5.5%がAFPも発現した。このように、フェトプロテインを発現する細胞の約25%がアルブミンを発現せず、アルブミンを発現する細胞の20%がフェトプロテインを発現しない。

20

30

【0091】

本研究において用いられる主な表面マーカーを有する細胞の比率を、表2において完全な細胞懸濁液(すなわち、赤血球を含む)について示す(GA=グリコフォリンA、すなわち赤血球上の表面マーカー)。

【0092】

【表2】

当初の肝臓細胞懸濁液におけるCD陽性細胞の割合およびAFP陽性であるこれらの割合

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
未分画					
集団での%	3.7±0.8 (8)	2.8±0.5	2.2±0.4	2.6±0.5	36.8±5
AFP陽性%	81.7±2.2	72.6±4.2	57.6±4.6	22.2±4.4	2.3±0.6

40

【0093】

図5は、未分画の肝臓細胞懸濁液における表面マーカーCD14、CD34、CD38、CD45、およびグリコフォリンA(GA)を発現する細胞の割合を示す。GAデータは同じ尺度で右の軸にプロットする。図6は、フェトプロテインおよび他の抗原マーカーを発現する当初の細胞懸濁液における細胞の割合を示す。フェトプロテイン(AFP)および特異的細胞表面マ

50

ーカー (CD14、34、38、45、およびグリコフォリンA) に関して陽性である細胞の割合の平均値 ± SEM。明らかに、グリコフォリンA (GA) 陽性細胞 (すなわち、赤血球) は、細胞塊の主な成分を表すが、AFP陽性細胞では有意でない分画である。

【0094】

図7 (上部) は、フェトプロテインおよびアルブミンの同時発現を示す。パーコール分画を用いて赤血球の選択的枯渇を行った、または行わない、胎児肝臓細胞の懸濁液におけるフェトプロテイン (左のパネル) およびアルブミン (右のパネル) の発現。アルブミンを同時発現するAFP陽性細胞の割合も80.5 ± 8.2%に増加し、AFPを同時発現するアルブミン陽性細胞の割合は89 ± 3.1%に増加したが、いずれの変化も統計学的に有意ではなかった。

10

【0095】

図7 (下部) は、フェトプロテインおよびアルブミンの同時発現に及ぼすパーコール分画によるデバルキングの影響を示す。フェトプロテインおよびアルブミンの双方を発現する細胞の割合は、AFPまたはアルブミン陽性細胞の割合として表記する。パーコール分画を用いて、赤血球枯渇した細胞および枯渇しない細胞に関するデータを示す。このように、細胞懸濁液をパーコール分画によって赤血球を枯渇すると、AFPを発現する細胞の割合は、12.9 ± 1.9%に有意に増加し、アルブミンを発現する細胞の割合は12.1 ± 2.3%に増加する。

【0096】

表面マーカーを有する細胞の割合に関するこの技法の結果を、AFP染色陽性を示すそれぞれのサブグループの割合と共に表3に示す。

20

【0097】

【表3】

赤血球枯渇後の肝臓細胞懸濁液におけるCD陽性集団の割合とAFP陽性であるこれらの割合

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
赤血球枯渇					
集団での%	7.4 ± 1.3	3.4 ± 0.5	4.8 ± 0.9	8.2 ± 0.3	27.5 ± 4.7
AFP陽性%	89.8 ± 1.3	77.1 ± 2.9	53.5 ± 7.2	32.5 ± 1.3	1.8 ± 0.9

30

【0098】

図8は、CD14、CD38およびAFPを同時発現する胎児肝臓細胞懸濁液のFACS分析を図示する。二変数のスキャッターグラムは、CD14に関するトリカラー染色 (縦座標) 対CD38に対するFITC染色 (横座標) の分布を示す。CD14およびCD38シグナルに従って特異的細胞を類を選択するためにゲートを作製する。次にこれらを用いてこれらのサブグループのそれぞれにおけるAFP染色の強度を示す。AFPの結果は、CD38またはCD14のいずれかに関して陽性の細胞を選択することによって、AFPの高レベル濃縮が得られることを示している。細胞懸濁液全体 (細胞30,000個) から生成したAFPシグナルを左下に示す。ほとんどの場合、細胞表面マーカーによって選択したサブグループにおけるAFPの存在は連続的に分布しており、明らかに多くの細胞が陽性範囲における染色強度を示している。しかし、AFPの同時発現に関してCD38陽性細胞の分布は特異であった。CD38陽性細胞において、AFP同時発現の二相性分布が明らかになり、細胞の2つの明確な群が明らかに存在し、1つの群はAFP陽性であり、もう一つは陰性である。

40

【0099】

結果は、フェトプロテイン (AFP) が胎児肝臓組織 (すなわち、当初の細胞懸濁液) の単細胞懸濁液において細胞の7%に存在することを示している。グリコフォリンA (赤血球上の抗原) に対する抗体は、AFPを発現しない細胞の亜集団を同定することが判明する。このように、この抗原 (すなわち、赤血球) を発現する細胞は、肝前駆細胞の特徴付けを意図する細胞から除外する。CD38抗原は、AFP陽性細胞の割合における有意な増強を示

50

す細胞の集団を同定する（すなわち、未分画試料における比率の7倍より大きい）。いずれの抗原も、スプライシング変種によってコードされる分子の部分が存在するか否かによって、多くのイソ型を示す。様々なイソ型を同定する抗体を利用できる。

【0100】

造血前駆細胞に関する古典的なマーカーであるCD34は、AFPを同様に発現する多くの細胞上に存在することが判明している。CD34陽性細胞のソーティングの結果、AFP陽性細胞は当初の細胞懸濁液に認められる場合より少なくとも9倍濃縮される（CD34陽性細胞において67%対当初の細胞懸濁液において7%）。しかし、AFP陽性細胞の濃縮に関して最も有効な単一の抗体はCD14であり、これは当初の集団と比較してこれらの細胞の比率を11倍より多く増加させる（81%対7%）。

10

【0101】

AFP陽性細胞の収率は表面マーカーの組合せを用いることによって改善しうるように思われる。このように、表面マーカーの選択した組合せとAFPの同時発現の程度は、細胞内マーカーの選択が増加しうる程度を確立するように決定される。データは表面マーカーを発現するAFP陽性細胞の比率として（AFP陽性細胞の「収率」と呼ぶ）、および表面マーカーによって定義される集団において出現する全てのAFP陽性細胞の比率（AFP陽性細胞に関して「濃縮」因子と呼ぶ）として表記する。CD14、CD34、およびCD38の組合せに関する結果を、比較のために個々のマーカーからの結果と共に表4に示す。

【0102】

【表4】

20

	CD14	CD34	CD38	CD14+CD38	CD14+CD34
濃縮	80.6±2.6	66.7±4.7	53.8±4.5	66.9±3.5	68.2±3.9
収率	39.8±2.6	26.9±4.4	22.0±2.7	50.6±2.7	52.2±5.5

濃縮 AFP陽性でもある表面マーカーのいずれか（または両方）を発現する細胞の割合。
収率 表面マーカーの組合せの一つまたは双方をも発現する全てのAFP陽性細胞の割合。

【0103】

図9は、CD14およびCD38に関する選択がどのようにしてAFP陽性細胞を濃縮するかを図示する。胎児肝臓から調製した細胞懸濁液中のAFP陽性細胞の割合は、マーカーCD38およびCD14に関する陽性表面標識を有する細胞を選択することによって劇的に増加する。2つのマーカーを組合せると、いずれかのマーカー単独の場合に得られる細胞よりAFP含有細胞のより有意な濃縮を生じる。

30

【0104】

図10は、ヒト肝前駆細胞の蛍光顕微鏡を図示する。胎児肝臓からの代表的な肝前駆細胞をAFP含有量に関して染色した。細胞サイズは、初期前駆細胞とより進行した肝前駆細胞の双方が存在することを示している。AFPに関して染色陽性の細胞の形態は多様であり、胎児肝臓からの細胞懸濁液では全範囲の細胞のサイズと形状を含むが成人肝臓ではそうではない。AFP陽性細胞の最大のもは約12~15 μであり、これは成熟肝細胞よりかなり小さい（20~50 μの範囲）。

40

【0105】

図11は、AFPの発現によって選択される代表的な細胞を図示する。CD14染色陽性細胞（右側）は、肝芽球の特徴である。表面マーカー染色陰性の細胞はより小さく、初期肝前駆細胞のサイズおよび形態と一致する。全ての場合について、AFP陽性細胞の特定の割合は、本研究において用いられた如何なる表面抗体の発現も示さない。これらのAFP陽性「ヌル(null)」細胞の出現を図11に示し、それらを、同じ懸濁液からソーティングしたCD14陽性 / AFP陽性細胞の出現と比較することができる。双方の細胞タイプがAFP陽性であること、表面抗原染色陰性の細胞は、CD14陽性細胞より一貫して小さく、複雑でないことは明白である。

【0106】

50

このように、肝前駆細胞をソーティングするための考えられるマーカーは：グリコフォリンA⁻、CD45⁻、ICAM⁺、および1つまたはそれ以上のCD14⁺、CD34、CD38⁺、CD117、二倍体、無顆粒（側方散乱による）、15 μ未満（前方散乱による）である。ソーティングしたこれらの細胞の表現型は、細胞質が小さく（高い核/細胞質比）、アルブミン⁺および/またはAFP⁺⁺⁺である小さい細胞（<15 μ）である。

【0107】

VII. 胎児および成人ヒト肝臓における フェトプロテイン発現細胞の共焦点による特徴付け

共焦点顕微鏡を用いて、フェトプロテインを発現するヒト胎児および成人細胞からの画像が得られている。この方法論によって、これらの細胞の形態学および大きさを観察することができ、AFPおよびALBのような細胞内蛋白質の位置、ならびにCD34およびCD38のような膜表面マーカーの位置を直接示すことができる。

10

【0108】

図12は、成人ヒト肝臓における フェトプロテイン発現細胞、すなわち肝前駆細胞の共焦点顕微鏡写真を示す。図は、1つの視野の3つの像を示し、この視野にはAFP陽性細胞2個が存在する。パネル（A）およびパネル（B）を重ねたものをパネル（C）に示し、これは肝臓細胞の群におけるAFP陽性細胞（ピンク色、オリジナル）の形態を示す。

【0109】

図13は、全ての細胞タイプを示すためにカルセイン（A）によって標識した細胞を図示する。図13(B)は、AFPを同時発現する同じ細胞からなり、AFP陽性であるのは細胞2個に過ぎないことを示している。細胞のサイズはAFP陽性の要因ではない。

20

【0110】

AFP発現細胞は、胎児および成人肝臓の双方において認められる。胎児肝臓は、予想通り、最高の割合（6～7%）を有するのに対し、成人肝臓は小さい割合（<1%）を示し、この数値はドナーの年齢と共に減少する。成人肝臓において認められたいくつかの肝前駆細胞は、パーコール分画プロセスによって、成人肝臓からのパーコール分画1および2において細胞の2%までを生じるように有意に濃縮することができる（表5）。AFP発現細胞は年齢が71歳よりも大きいドナーからの肝臓では認めない。

【0111】

表5は、成人肝臓細胞のパーコール単離分画からの細胞の大きさおよび生存率を示す。より小さい細胞（分画1～3）は、同じ凍結保存条件で凍結保存後、より大きい細胞（分画4）より生存率が高い。

30

パーコール

分画	生存率 (%)	細胞サイズ (μm)	% AFP+ 細胞
分画 1	82	> 12	0.5-1 %
分画 2	84	10-15	2 %
分画 3	85	15-25	<0.2 %
分画 4	56	25-50	<0.01%

40

【0112】

これらの結果は、臓器移植のみならず肝細胞治療にとって有用なドナー臓器が若いドナー（年齢約45歳まで）からの細胞で構成されることを示唆している。さらに、老人患者（年齢>65歳）からの肝臓は、それらが肝前駆細胞からの再生能がたとえあるとしてもわずかであり、成熟細胞から得られることが知られている中間または最小の再生能に過ぎないことから、細胞治療にとって不適當で、おそらく臓器全体の移植にとっても、特に子供に対しては不適當なドナーであろう。

【0113】

VIII. 成熟細胞系統

50

したがって、成人肝臓は、正常および疾患状態の双方において肝細胞および胆管細胞に増殖および分化することができる肝前駆細胞集団を含む。本発明は、肝臓細胞系統におけるあらゆる位置が明確な成熟段階であること、そして肝臓に多数の幹細胞集団が存在するという立場をとる。

【0114】

意外にも、本発明の胚肝臓は、異なる3つの成熟細胞系統に関して前駆細胞を生じる：細胞の運命が肝細胞および胆管細胞である肝形成；細胞の運命がリンパ球（BおよびT）、血小板、マクロファージ、好中球、および顆粒球である造血；ならびに細胞の運命が内皮細胞、脂肪細胞、間質細胞、軟骨、およびさらには骨である（最後の2つは疾患状態に限って肝臓で起こる）間葉形成。

10

【0115】

一般的に、幹細胞は、1つより多い運命を有する娘細胞を生じうる未成熟細胞である。幹細胞は娘細胞を生じ、そのいくつかは親と同一であるが、中には特定の運命となるように「分化する」細胞もある。単分化プロセスは分子レベルでは理解されていない。むしろ、これは細胞の運命が先祖の運命から狭められた場合に限って経験的に起こると認識される。「単分化前駆細胞」は、肝細胞分化前駆細胞（肝細胞を生じる）、または胆管分化前駆細胞（胆管を生じる）のような単一の運命を有する未成熟細胞として定義される。

【0116】

幹細胞から成人細胞への移行は、細胞の大きさ、形態、増殖能および遺伝子発現が細胞系統に拘束される段階的プロセスにおいて起こる。加齢の隠喩は、プロセスの定義において有用である。「若い」細胞は、初期細胞発現を有し、最大の増殖能を有する；細胞系統における後期の細胞は、「後期」遺伝子発現を有し、通常それらの増殖は限られており、または全く増殖しない。後期細胞は「年老いている」と見なすことができ、または生物学的な用語ではアポトーシスであり、最終的に脱落する。成熟細胞系統プロセスによって、組織の自然の代謝回転が起こり、損傷後の再生が可能となる。組織は成熟プロセスの速度論が異なる。消化管の成熟細胞系統は、全サイクルが1週間未満に起こり、非常に迅速であるが、肝臓の成熟細胞系統はゆっくり起こり、ラット肝臓では約1年である。

20

【0117】

ラット肝臓は約10日目の胚生命において形成され、これを「10日胚」またはE10と呼び、胚の中腸領域に存在する内胚葉による心間葉の陥入が起こる（ザレ（Zaret, K.）、1998、Current Opinion in Genetics & Development 8: 526~31）。胚において肝臓細胞が最も初期に認識されるのは、フェトプロテイン（AFP）をコードするmRNAに関するインサイチュールハイブリダイゼーション試験を用いて行われている（ザレ（Zaret, K.）、1998、Current Opinion in Genetics & Development 8: 526~31；ザレ（Zaret, K.）、1999、Developmental Biology (Orlando) 209: 1~10）。AFP発現細胞は、アッセイした全てのラットおよびマウス肝臓において9~10日目に心臓を生じる間葉付近の胚の中腸領域に認められる。肝臓は、E12までに肉眼で見えるようになり、E13までに直径約1 mmとなる。

30

【0118】

これと平行して、造血はE15~E16（齧歯類）、および3~4ヶ月（ヒト）までに最初の同定可能な造血細胞が出現して起こり、赤血球形成（赤血球の形成）のピークはE18（齧歯類）および5~6ヶ月（ヒト）までに起こる。赤血球形成のピークでは、これらの赤血球数は肝臓において多数を占め、肝臓における細胞数の70%より多くを占める。妊娠期間の終了は齧歯類では21日であり、ヒトでは9ヶ月である。出産後数時間以内に、造血細胞数は劇的に減少し、生後2日（齧歯類）そして1、2週間以内（ヒト）に、造血細胞の大多数が骨髓に移動して消失した。造血細胞の移動の原因はわかっていない。しかし、最も有力な2つの推測がある。

40

【0119】

第一に、造血前駆細胞は比較的嫌気性条件を好み、肺の活性化によって肝臓での酸素レベルが上昇すると骨髓（比較的嫌気性である）に逃れる；そして第二に、妊娠ホルモンの喪

50

失が移動の原因である。生後、造血前駆細胞の肝臓からの喪失は、肝前駆細胞数の劇的な減少に関連し、これに平行して肝細胞および胆管細胞の数および成熟度が増加する。肝臓の完全な成熟は生後2～3週間（齧歯類）および数ヶ月（ヒト）以内に終了する。それによって、残っている肝前駆細胞は、それぞれの肝腺房の末梢における門脈3分岐の領域に移動する。

【0120】

その後、肝腺房の古典的な構造が確立され、各腺房は門脈3分岐の6個のセットの周囲に境界が定められ、それぞれが胆管、肝動脈および冠静脈を有し、中心部に大静脈に結合する中心静脈を有する。肝細胞のプレートは車輪のスポークのように周辺部から中心に伸びる。慣例によって、プレートは3つのゾーンに分けられる：ゾーン1は、門脈3分岐の近傍であり、ゾーン2は腺房中部；そしてゾーン3は中心静脈近傍である。肝臓の二倍体細胞のみがゾーン1に存在する；四倍体細胞はゾーン2に存在する；そして四倍体、八倍体、および多核細胞はゾーン3に存在する。パターンは、アポトーシスプロセスで終わる成熟細胞系統を非常に示唆している（シガル（Sigal, S.H.S.）ら、1995、Differentiation 59：35～42）。

10

【0121】

IX. 肝臓生物学の前臨床および臨床試験における細胞系統概念の意味

本発明の細胞集団のインビトロおよびインビボ増殖ならびに分化特徴は、肝臓における細胞系統位置細胞系統モデルの考え方および意味と一致する。例えば、インビトロ実質細胞の培養では、実質細胞の分裂能および細胞分裂回数は厳密に細胞系統の位置依存的であると予測される。したがって、門脈周辺の実質細胞は、中心周辺の細胞より分裂能が高いはずである。これは、生体における最も有名な再生組織である肝臓の初代培養が、培養でそのような限られた細胞分裂を示す理由に関する長期間の不思議を説明する。

20

【0122】

幹細胞およびその形質転換した細胞である肝腫は、フェトプロテインおよびインスリン様増殖因子IIのような初期遺伝子を発現するが、細胞系統の後期に発現される遺伝子を発現しないと予想される。成熟細胞系統モデルでは、細胞系統が完全に進行するためには、分化、増殖、および細胞周期の調節が乱されないことが必要であるため、肝腫は後期遺伝子を発現しないはずである。これは実際に、本発明の細胞集団において認められた。胎児対成人組織における肝臓特異的遺伝子発現を比較する分子生物学研究によって、いくつかのクラスの遺伝子が定義される：区画（幹細胞、増幅、分化）を診断する遺伝子；带状に、そしておそらく区画境界を超えて発現される遺伝子；および細胞系統の初期、中期、または後期に発現されるが、細胞によっては別々に発現される遺伝子。

30

【0123】

原発性肝腫瘍の様々な形態学および遺伝子発現パターンは、本発明の細胞集団を調べることによって理解される可能性がある。腫瘍が、分化能が異なる形質転換幹細胞の増殖を表す場合、肝腫におけるフェトプロテインの一般的な発現は、誘導型腫瘍マーカーではなくて、通常フェトプロテインを発現する増殖した未成熟細胞集団の指標である。

【0124】

本発明の単離された細胞集団は、肝臓指向細胞および/または遺伝子治療の成功に大きい影響を及ぼす。実施例に記載するように、本発明は、ヒト以外の霊長類およびヒト肝前駆細胞を首尾よく凍結保存しうる重要な条件を同定した。

40

【0125】

インビトロでの有意な増殖能のため、本発明の細胞集団は、造血細胞系統の細胞と同様に、エクスピボ増殖のための細胞の種子を提供する「穿孔生検材料」として用いることができる。これによって、患者の肝臓の主な侵襲的外科切除の必要はなくなるであろう。

【0126】

ヒト肝前駆細胞が培養において確立された後、遺伝子移入を行う。これは、異なる多くの遺伝子輸送ベクター系によって行うことができる。この点での重要な検討は、遺伝子移入の成功には、急速に増殖する培養を必要とする点であり、本発明のヒト肝前駆細胞は通常

50

の生理的条件で有意に分裂するため、これらの細胞は、肝臓への遺伝子移入の理想的な候補であるという点である。同様に、本発明の細胞集団の増殖特徴によって、有効な遺伝子挿入および発現のために細胞増殖を必要とする特定の遺伝子輸送ベクター（すなわちレトロウイルスベクター）を用いたエクスピボ遺伝子移入での使用が可能となる。

【0127】

遺伝子治療のもう一つのアプローチは、前駆細胞を特異的に標的とするベクターをデザインして、これを関係する遺伝子と組み合わせてベクターに注入し、患者に直接注入することである。ベクターは、内因性前駆細胞集団を標的としてこれを改変するであろう。

【0128】

本発明の前駆細胞集団は、自家または同種異系肝臓指向細胞または遺伝子治療に用いることができる。明らかに、自家肝前駆細胞を用いることによって、移植した細胞の拒絶に関する重要な懸念はなくなるであろう。本発明の細胞集団は、その抗原性プロファイルから免疫拒絶現象が最小であることが示唆されるため、同種異系細胞移入にとって特に魅力的である。その上、非常に免疫原性が高いことが知られている血球、内皮細胞、クッパー細胞、のような他の細胞エレメントは、精製プロセスの際に実質的に消失する。

【0129】

自家または同種異系肝前駆細胞を単離、精製、および培養した後、それらは遺伝子改変しうる、または無傷のまま残すことができ、インビトロで増殖させ、その後宿主に移植することができる。遺伝子改変が望ましい場合、遺伝子改変後であって移植前に、優位を占める選択マーカーの組み入れおよび発現に基づいて、遺伝子改変細胞を増殖および/または選択してもよい。移植は、肝臓の区画または異所（ectopic）もしくは異所性（heterotopic）の部位に戻すことができる。肝臓の部位に移植するためには、門脈注入または脾臓内注入を用いることができる。脾臓内注入は、脾臓内注射によって移植された肝前駆細胞が肝臓の区画に移動するため、選択される投与経路であるかも知れない。

【0130】

さらなる医学的技法は、移植した肝前駆細胞の肝定着効率に役立つ可能性がある。動物モデルは、部分的肝切除において、血管新生因子および他の増殖因子の投与は移植した肝細胞の定着および生存を促進することを証明した。もう一つのアプローチは、遺伝子改変された肝細胞を異所部位に移植することである。

【0131】

今日まで、細胞治療アプローチは肝臓に関してほとんど有効性を示さなかった。これは、用いられたドナー細胞が主に成人肝細胞であり、単離および再注入後に短命であるという事実による可能性がある。さらに、成人細胞を使用すれば、強い免疫学的拒絶が起こる。本発明の肝前駆細胞は、それらが免疫拒絶現象の誘発能が限られていること、そして十分な再生能を有することから、より大きい有効性を提供する。

【0132】

遺伝子治療に関して、現行の努力は、開発中の最も一般的な臨床治療経路である「ターゲティングした注射可能ベクター」を利用することである。これらのアプローチは、免疫学的問題とベクターの一過性の発現の双方により有効性が限られている。利点があることが証明された遺伝子治療の唯一の経路は、エクスピボ遺伝子治療であり、ほぼ造血前駆細胞に限って行われている。われわれは、前駆細胞の精製された亜集団にベクターをエクスピボで導入することができ、改変された細胞をインビボで選択して再導入できることから、前駆細胞によるエクスピボ遺伝子治療（またはそれらの前駆細胞集団にターゲティングされた注射可能なベクターの使用）は、より有効であることが証明されると予想する。前駆細胞の長所はその膨大な増殖能、免疫応答の誘導はあるとしても最小であること、そしてそれらが完全な成熟細胞システムを生じるように分化できることである。

【0133】

X. 共通または相互依存する細胞系統

改善された方法論によって、本発明者らは、より厳密に肝前駆細胞を調べて特徴を調べることができた。これらの試験によって、肝前駆細胞と、造血前駆細胞との特に密接な関連

10

20

30

40

50

が明らかになり、これらの2つの細胞系統における密接な関係を示唆している。実際に、これらの試験は、肝細胞系統および造血細胞系統の前駆細胞が多数の抗原マーカー（CD14、CD34、CD38、CD117、またはckit、卵細胞抗原）を共有し、生化学的特性（すなわち、トランスフェリン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびフェトプロテインの切断イソ型）を共有し、そしてエクスピボでの増殖のための培養要件（細胞外マトリクスの形および特異的ホルモン要件）が広く重なっていることを示している。双方の細胞系統の前駆細胞は、肝臓の同じ部位に存在する。最後に、隣接シグナル伝達は、2つの成熟細胞系統の細胞全体に存在する；すなわち、細胞系統のそれぞれによって生成されるシグナルは他の細胞系統の細胞を調節する。実際に、肝細胞と造血細胞とのあいだには、共通する細胞系統または相互依存が非常に少ない細胞系統が存在する可能性がある」と結論して

10

【0134】

本明細書に記載の細胞集団は、細胞が単離および培養される条件に応じて骨髓造血細胞または肝誘導体のいずれかを生じるように精製および利用される。したがって、肝前駆細胞と造血前駆細胞の双方を定義する一連の抗原（例えば、CD38⁺、ckit⁺、CD45⁺）に関してソーティングした細胞集団を接種したバイオリクター系は、多数の運命を有する細胞集団となりうる。運命は細胞がインスピボでどのように再導入されるか、またはどのような培養条件に細胞が置かれるかに依存する。

【0135】

本発明の細胞集団のもう一つの重要な局面は、それらが特異的造血幹細胞表面抗原CD34を示す点である。骨髓のCD34陽性細胞は、造血幹細胞に関する簡便な陽性選択マーカーとして用いられてきた。しかし、造血幹細胞に対するCD34抗原マーカーの特異性に疑いを呈する報告が増加している（ナカウチ（Nakauchi H.）、Nature Medicine 4: 1009~1010（1998））。実験的証拠によって、ヒト骨髓および臍帯血のCD34陰性集団において、免疫欠損マウスの骨髓を再定着することができる細胞が存在することが証明されている。

20

【0136】

本明細書に開示するように、本発明は、肝細胞と造血細胞との密接な関連を利用して、後に臨床および前臨床プログラムにおいて用いられる造血前駆細胞と肝前駆細胞集団の双方を精製する方法を開示する。

【0137】

ヒト肝前駆細胞の用途は多く、多様である。それらには；1）ヒト細胞に関する研究；2）ワクチンまたは抗ウイルス剤の産生；3）毒性試験；4）薬剤の開発；5）蛋白質の製造（様々なヒト特異的因子を産生するための宿主として細胞を用いる）；6）肝臓の細胞治療；7）肝臓の遺伝子治療；8）研究、毒性試験および抗菌試験、蛋白質製造、または肝臓補助系として臨床的に用いることができる生体人工肝臓、が含まれる。本発明の発明者らによって進歩したように、造血と肝臓形成とのあいだに共通する細胞系統の可能性を検討すると、それらが置かれる微小環境に応じて肝細胞または造血細胞運命の双方に同じ細胞を用いることができる。

30

【0138】

非常に精製されたヒト肝前駆細胞を利用できることによって、ヒト細胞に関してより十分な多くの研究を行うことができ、成功した肝臓の細胞治療および遺伝子治療の型の開発が促進され、そして研究においておよび臨床補助装置として用いられるヒト生体人工肝臓の開発が可能となるはずである。現在のところ、健康なヒト組織の供給には限りがあることから、肝臓の細胞治療およびヒト生体人工肝における臨床プログラムは行うことができない。前駆細胞集団は、その限られた供給を克服できるほど、または少なくとも大きく改善できるほどの十分な増殖能を有するはずである。

40

【0139】

実施例

以下の実施例は、説明するためであり、制限すると解釈されない。

【0140】

50

実施例 1

肝細胞タイプ対他の細胞タイプにおいて発現されたAFPとアルブミンの変種型の分析。

【0141】

細胞株：2つのヒト肝腫、Hep3BとHepG2を、1 mMピルビン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、50 U/mlペニシリン、50 µg/mlストレプトマイシン、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、5 µg/mlインスリンおよび10%FBSを添加したイーグルMEMにおいて維持した。ヒト赤白血病細胞株K562、およびマウス胚繊維芽細胞株STOは、2 mM L-グルタミン、50 U/mlペニシリン、50 µg/mlストレプトマイシン、 5×10^{-5} M 2-MEおよび10%FBSを加えたDME M/F12培地で維持する。

【0142】

RT-PCR：コムクツンスキ & サッキ (Chomczynski and Sacchi, N., Anal. Biochem. 162 : 156 ~ 159 (1987)) の方法によって、総RNAをHep3B、HepG2、およびSTOから抽出する。cDNAをオリゴ-dTプライミングによって合成して、本発明者らがデザインしてヒトAFPまたはアルブミンに関して調製したプライマーセットを用いてPCR増幅を行う。プライマー配列は以下の通りである。

AFPに関して、

- | | | | |
|--------|-------------------------|----------------------------------|-----|
| 配列番号：1 | hAFP1: | 5'-ACCATGAAGTGGGTGGAATC-3', | |
| 配列番号：2 | hAFP2: | 5'-CCTGAAGACTGTTCATCTCC-3', | |
| 配列番号：3 | hAFP3: | 5'-TAAACCCTGGTGTGGCCAG-3', | 20 |
| 配列番号：4 | hAFP4: | 5'-ATTTAAACTCCCAAAGCAGCAC-3', | |
| 配列番号：5 | hAFP _{エキソン2} : | 5'-CTTCCATATTGGATTCTTACCAATG-3'. | |
| 配列番号：6 | hAFP _{エキソン3} : | 5'-GGCTACCATATTTTTTGCCCAG', | |
| 配列番号：7 | hAFP _{エキソン4} : | 5'-CTACCTGCCTTTCTGGAAGAAC-3', | |
| 配列番号：8 | hAFP _{エキソン5} : | 5'-GAGATAGCAAGAAGGCATCCC-3', | および |
| 配列番号：9 | hAFP _{エキソン6} : | 5'-AAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTG-3', | |

アルブミンに関して、

- | | | | |
|---------|--------|--------------------------------|--|
| 配列番号：10 | hALB1: | 5'-GGCACAATGAAGTGGGTAAACC-3', | |
| 配列番号：11 | hALB2: | 5'-CCATAGGTTTCACGAAGAGTTG-3', | |
| 配列番号：12 | hALB3: | 5'-GCCAGTAAGTGACAGAGTCAC-3', | |
| 配列番号：13 | hALB4: | 5'-TTATAAGCCTAAGGCAGCTTGAC-3', | |

プライマーの組み合わせは以下の通りである：

AFPに関して： hAFP1およびhAFP2,
 hAFP3およびhAFP4,
 hAFP1およびhAFP4,
 hAFP エクソン2およびhAFP4,
 hAFP エクソン3およびhAFP4,
 hAFP エクソン4およびhAFP4,
 hAFP エクソン5およびhAFP4,および
 hAFP エクソン6およびhAFP4.

10

アルブミンに関して：hALB1およびhALB2,
 hALB3およびhALB4,
 hALB1およびhALB4,

【 0 1 4 3 】

PCRは、1 μM各プライマー、200 μM各dNTP、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、10 mM トリスHCl、pH 8.3、および1.25 Uアンブリタックポリメラーゼ(シータス・コーポレーション)からなる全量50 μlで実施する。試料を94 で3分加熱した後、94 で2分、62 で2分、そして72 で3分を30サイクル繰り返した。最後のサイクルの後、最終的な伸長段階を72 で7分間実施する。次に、それぞれのPCR反応5 μlを、5 μg/mlエチジウムブロマイドのトリス酢酸EDTA緩衝溶液を含む2%アガロースゲルにおいて行う。

20

【 0 1 4 4 】

AFPに関するRT-PCR：ヒトAFP遺伝子はエクソン15個(ギブス(Gibbs)ら、Biochemistry, 26: 1332~1343)からなる。切断型転写物を機能的な完全なAFP mRNAと区別するために、AFP cDNA配列の異なる2つの部分をRT-PCRの標的分子として選択する。hAFP1およびhAFP2のプライマー組合せを用いて、開始METを含むエクソン1からエクソン3を増幅するが、hAFP3およびhAFP4の組合せはエクソン12から停止コドンを含むエクソン14を増幅する。PCRの結果を図1に示す。プライマーの両組合せの結果、Hep3BおよびHepG2からのRNAにおいて増幅バンドが強く検出される(レーン1、2、4および5)。対照的に、K562からのRNAではプライマーセットhAFP3およびhAFP4によってC-末端部分の特異的バンドのみが検出される(レーン7および8)。この結果は、赤白血病細胞株であるK562は、N-末端を有しないAFPの切断型のみを発現することを示唆している。この仮説を支持して、hAFP1およびhAFP4プライマーを用いたAFPの全コード領域に関するPCRを実施する。予想されるように、Hep3BおよびHepG2 cDNAのPCRは1.8 kbの単一の顕著なバンドを示す(レーン3および6)のに対し、K562ではバンドを認めない(レーン9)。対照はRNAを含まない試料およびマウス胚繊維芽細胞株(STO)に由来する試料である。いずれも如何なる検出可能なバンドも示さない。

30

【 0 1 4 5 】

次に、hAFP mRNAの真正および変種型の差を調べるために、エクソン2からエクソン6の一連の5'プライマーを構築する。図1において、結果は、エクソン1を除く全てのコード領域がK562におけるhAFPの変種型において共有されることを示している(レーン1、3、5、7、9、および11)。

40

【 0 1 4 6 】

アルブミンに関するRT-PCR：ヒトアルブミン遺伝子も同様にエクソン15個(ミンゲッティ(Minghetti)ら、J. Biol. Chem. 261: 6747~6757)からなる。AFPに関して、hALB1とhALB2のプライマー組合せを開始METを含むエクソン1からエクソン4の増幅に用いるのに対し、hALB3とhALB4の組合せはエクソン12から停止コドンを含むエクソン14を増幅する。PCRの結果を図17に示す。プライマーの両組合せによって、Hep3BおよびHepG2からのRNAに

50

において増幅バンドが強く検出される（レーン 1、2、4、および 5）。対照的に、K562からのRNAではhALB3およびhALB4のプライマーセットによってC-末端部分の特異的バンドのみが検出される（レーン 7 および 8）。hALB1およびhALB4プライマーを用いたアルブミンの全コード領域のPCRはK562においてバンドを示さない（レーン 9）。対照はRNAを含まない試料であって、マウス胚繊維芽細胞株（STO）に由来する試料である。いずれも如何なる検出可能なバンドも示さない。

【 0 1 4 7 】

試薬の購入先：

シグマケミカル社（セントルイス、ミズーリ州）

ギブコBRLプロダクツ（ガイサースバーグ、メリーランド州）

ワーシントンバイオケミカルコーポレーション（フレホールド、ニュージャージー州）

デュボンファーマシューティカルズ（ウィルミントン、デラウェア州）

ファルコン社 - ベクトン・ディッキンソン・ラブウェアの子会社（フランクリンレークス、ニュージャージー州）

【 0 1 4 8 】

組織の購入先：

アナトミカルギフトファウンデーション（アトランタ、ジョージア州）

アドバンスドバイオサイエンシズリサーチ、ABR（サンフランシスコ、カリフォルニア州）

UNC病院の地域移植外科医

【 0 1 4 9 】

実施例 2

ヒト肝臓のプロセッシング

胎児肝臓： 胎児肝臓は、アドバンスドバイオサイエンシズリサーチ（ABR）と提携した全てカリフォルニア州にある多くの診療所から、または南部（すなわち、ジョージア州、バージニア州）、北東部（ペンシルバニア州）、または中西部（カンサス州、コロラド州）の診療所によってアナトミカルギフトファウンデーション（AGF）から得る。胎児は診療所で採取する；組織を胎児から離断して、インスリン（シグマ社、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、トランスフェリン（シグマ社、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、セレン（ 10^{-9} M、および 5 % ウシ胎児血清（ギブコ社））を添加したRPMI1640（ギブコ）中に入れる。次に、試料を氷中に入れて、われわれの研究室に向けて急送便で発送し、このプロセスは10～16時間を要する。このように、われわれは、術後約24時間で試料を受領する。試料は、受領順に年代順に接頭辞RENをつけた数字を割り付け（REN1、2、3等）、RENはルネッサンスの略語である。

【 0 1 5 0 】

成人肝臓： 成人の肝臓は、アナトミカルギフトファウンデーションまたは地域の外科医（UNC）から得て、拒絶された肝組織、移植レシピエントの外植体、または臓器移植のために提供されたが、病原体以外の理由から拒絶された肝臓からなる。外植組織または拒絶されたドナー組織を提供する患者は、一連の疾患に関してスクリーニングして、これらの試験によって安全であると判明した組織のみを細胞の処理に利用する。患者から採取した後、肝臓をウイスコンシン大学溶液（ピアスパンとも呼ばれる）に入れて、氷中で研究室に輸送する。臓器を脳死患者から摘出した時間（クランプ時間）と研究室に到着までの時間は極めて多様である。標本は、その時点で肝臓をドナーから摘出した「クランプ時間」の24時間未満で到着する。

【 0 1 5 1 】

死体肝臓：死後少なくとも30時間以内に得られた肝臓は、地域の臓器調達協会（例えば、カリリナ臓器調達協会、またはCOPA）を通じて得られる。肝臓は成人肝臓と同様に処理する。

【 0 1 5 2 】

試験者の安全性に関してチェックすべき項目のリストは：HIV 1およびII、HTLV 1およびII、B型およびC型肝炎、結核である。臨床使用のリストは、HIV 1およびII、HTLV 1およびII

10

20

30

40

50

II、A、B、C、およびG型肝炎；EBV、CMV；結核、梅毒、ならびにマイコプラズマである。

【0153】

胎児および成人肝臓は、酵素消化および機械的解離の組合せを用いて処理し、胎児肝は主に機械的解離によって調製するが、成人肝は主に酵素的消化によって調製する。それぞれの詳細を下記に示す。胎児および成人肝は、酵素溶液中で様々な長さの時間消化し、これは組織において細胞に共に結合している細胞外マトリクスを解離する役に立つ。肝臓細胞の単離に用いられるコラゲナーゼ酵素混合液は、ベーリンガー・マンハイム社が製造した高純度の「リベラーゼ」酵素調製液であり、精製コラゲナーゼとエラスターゼの混合液からなる。この酵素混合液は、かなり低い濃度で用いることができ、有害な「副作用」は少ない。

10

【0154】

酵素溶液： コラゲナーゼ溶液：60～70 mg/緩衝液100 ml（シグマ社タイプIVコラゲナーゼ、カタログ番号C5138、またはワーシントン社のタイプB、カタログ番号LS005273；いずれもコラゲナーゼを濃縮した細菌調製物であるが、多くの酵素不純物を含む）、またはP2緩衝液（下記参照）に調製して、0.23 mg/mlで用いるリベラーゼ：（ベーリンガー・マンハイム社による精製コラゲナーゼ/エラスターゼ調製物、カタログ番号1814184）。

【0155】

細胞洗浄液： インスリン（5 μg/ml）、トランスフェリン（5 μg/ml）、モル比1：1で精製ウシまたはヒト血清アルブミンに結合した遊離の脂肪酸混合液（下記参照）を添加したRPMI 1640（ギブコ社）。

20

【0156】

遊離脂肪酸混合液： 未成熟細胞集団、および損傷したより高齢の肝細胞は、その膜を維持して合成するために脂質を必要とする。完全に成熟した肝細胞は、単一の脂肪酸源（リノレン酸）から膜を合成することができるが、より若い実質細胞は合成することができず、このため、その脂質要件を満たすために多くの異なる脂肪酸の混合液を必要とする。われわれは、高度精製アルブミンと1：1モル比で結合する複合体混合物を提供する。その脂肪酸調製物を調製する方法についての詳細な説明を下記に示す。

【0157】

保存液は以下のように調製し、合わせて全体で100 mM遊離脂肪酸とする：

パルミチン酸	31.0 mM	オレイン酸	13.4 mM
パルミトレイン酸	2.8 mM	リノール酸	35.6 mM
ステアリン酸	11.6 mM	リノレン酸	5.6 mM

30

【0158】

最終濃度7.6 μM/Lを得るために、76 μl/Lを加える。[REF：チェッセバウフ&パデュー（Chessebauf and Padieu）、In vitro 20(10)：780、1984。上記の引用に従って、遊離脂肪酸混合液は細胞培養培地における最終濃度7.6 μ等量/L（7.6 μM）で用いられる。]

【0159】

個々の脂肪酸成分の調製：

それぞれの個々の成分は以下のように100%EtOHに溶解する：

パルミチン酸	1 M保存液、温EtOHに溶解
パルミトレイン酸	1 M保存液、EtOHに容易に溶解
ステアリン酸	151 mM保存液、1 g/21 mlで加熱したEtOHに溶解
オレイン酸	1 M保存液、EtOHに容易に溶解
リノール酸	1 M保存液、EtOHに容易に溶解
リノレン酸	1 M保存液、EtOHに容易に溶解

40

【0160】

次に、これらの個々の保存液を混合して、100 mM FFA混合液を得る。個々のFFAとFFA混合

50

液の少量に窒素を通気して、酸化を減少させて安定化を増加させる。保存液は -20 で凍結する。

【0161】

P1還流緩衝液 - 以下の成分のそれぞれについて明記する最終濃度のカルシウムおよびマグネシウム不含還流緩衝液 (pH 7.2) : 118 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM KPO_4 、pH 7.4、2.5 mM $NaHCO_3$ 、0.5 mM EDTA、5.5 mMグルコース、0.5% ウシまたはヒト血清アルブミン (BSA)、アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g/ml}$)、インスリン (4 $\mu\text{g/ml}$)、デキサメタゾン (1 μM)。

【0162】

P2還流緩衝液 - 0.5% BSA、アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g/ml}$)、インスリン (4 $\mu\text{g/ml}$)、およびデキサメタゾン (1 μM) を添加したダルベッコ改変イーグル培地またはRPMI 1640。

10

【0163】

DMEM - グルコース、ピルビン酸ナトリウム、およびL-グルタミンを含み、さらに5% ウシ胎児血清、インスリン (4 $\mu\text{g/ml}$)、およびデキサメタゾン (1 μM) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (ギブコ社)。

【0164】

チー培地 登録商標ITS⁺培養添加物 (5 ml/500 ml) およびデキサメタゾン (0.1 μM) を添加。

【0165】

パーコール (ファルマシア、カタログ番号17089102) は、ダルベッコ燐酸緩衝生理食塩液 10倍液によって9:1に希釈する。

20

【0166】

実施例3

胎児肝臓組織研究

胎児肝臓は輸送緩衝液 (上記) において氷中で到着する。それらを、インスリン (シグマ社; 5 $\mu\text{g/ml}$)、トランスフェリン (シグマ社; 5 $\mu\text{g/ml}$)、セレン (ジョンソンマシーズ質量分析微量元素: 10^{-9} M) およびウシ血清アルブミンとモル比1:1で結合した遊離脂肪酸混合液を添加したRPMI 1640 (ギブコ社) からなる「細胞洗浄緩衝液」によってすすぐ。次に、胎児肝臓をコラゲナーゼ緩衝液に15~20分入れて、800メッシュグリッドを備えた「回収装置」(シグマ社) に軽く押しつけて、細胞の小さい凝集塊を得る; 「細胞洗浄緩衝液」を用いて解離プロセスを容易にする。次に、プロセスを容易にするために「細胞洗浄緩衝液」を用いて70ミクロンフィルター (ファルコン細胞濾過器、70 μm ナイロン、カタログ番号2350) に押しつけて細胞の凝集塊を完全に解離する。70ミクロンフィルターを通過した細胞を、そうでない細胞と区別する。両試料を凍結保存して、トリパンブルー色素排除アッセイを用いて生存率百分率をチェックする。

30

【0167】

実施例4

成人肝臓組織試験

肝臓を門脈、大静脈またはその双方から挿管し、緩衝液を還流して、血液を消失させる; 次にコラゲナーゼ/プロテアーゼを含む緩衝液を還流して、細胞を酵素的に解離する。消化後、肝臓のサイズに応じて通常15~30分を要するが、細胞の解離プロセスを機械的に完全にするために、組織をチーズクロスまたはナイロンフィルターに押しつけるか、またはくしでかき集める。解離した細胞を血清を含む緩衝液ですすいで、還流プロセスにおいて用いたコラゲナーゼおよび他の酵素を不活化する。

40

【0168】

還流緩衝液、P1およびP2を37 の水浴に入れる。還流はミラー型還流箱の中で実施し、還流のあいだ37 に維持する。緩衝液は還流のあいだ酸素飽和する。箱の中のチューブは全て70%エタノールですすいだ後蒸留水ですすいで、PIによってすすぎ、空気がシステムから除去されていることを確認する。肝臓を、60 ml シリンジを取り付けた16ゲージ針からテフロンカニューレを用いて挿管し、大きい肝臓片 (100~300 g) に関して肝臓の切断表面

50

上で利用可能な様々な血管を用いて肝臓に氷冷P1緩衝液を流す。肝臓全体の小葉が利用できるまれな場合には、大静脈の残留物を挿管することができる。どれが組織の最適な還流を提供するかを知るために、肝臓の塊における様々な血管を調べる。この技法はまた、過剰な血液を肝臓から除去する。選択した血管に挿管して、医療用粘着テープ（医療用「スーパーグラー」）を用いてその場で固定する。他の全ての大きい血管および表面開口部は医療用絆創膏を用いて閉鎖し、必要であれば、開口部の閉鎖に役立てるために粘着面を有するQチップを用いる。粘着剤が乾燥すれば、肝臓を適当な大きさのガラスボウル内でナイロンメッシュ上に載せる。P1緩衝液をボウルに加えて、肝臓を緩衝液の中に浸す。肝臓を含むボウルを還流箱の内部に置いて、カニユーレの出口チューブを取り付ける。P1緩衝液を約24 ml/分の低速で15分間循環させ、許容される逆圧で流速を最適にするために58 ml/分から90 ml/分のあいだで徐々に増加させる。肝臓から還流液の過剰な漏出がないようにチェックしなければならない。15分後、P1緩衝液をボウルから除去して、コラゲナーゼを含むP2緩衝液に交換する。P2緩衝液は、肝臓が十分に消化されるまで（暗い赤みがあった茶色から暗い茶色への肝臓の色の変化と、軟らかいきめが得られることによって評価する）再循環させる。P2緩衝液は20～25分以内再循環させる。還流が終了すると、P2緩衝液をボウルから排水して、肝臓を生物用フード内でボウルに移す。

10

【0169】

細胞培養培地（DMEM）をボウルに加えて、カニユーレと粘着テープを、肝臓の未消化領域と共に除去する。組織鉗子およびはさみを用いて肝臓の被膜（グリソン被膜）を破る。これによって、消化した組織が培地中に放出されて、結合組織と未消化の材料を残す。消化した材料をDMEMの中に入れて、一連の異なるサイズのフィルターによって濾過する。濾過を助けるためにフィルターを大きい漏斗の中に入れる。消化した材料をまず、チーズクロス1枚によって濾過し、その後、400 μmナイロンフィルター、そして最後に70 μmテフロンフィルターによって濾過する。濾液を等分して、遠心管に入れて、70 gで4分間遠心する。

20

【0170】

遠心後、パーコールを加える前の上清を分画1（F1）と呼ぶ。細胞の沈降物に、DMEMおよび等張パーコールを加えて最終的な比率をそれぞれ3：1とする。例えば、容積5 mlの小さい細胞沈降物をDMEM 30 mlと等張パーコール10 mlに浮遊させる。試料を100 gで5分間遠心する。上清を得る；上層を分画2（F2）と呼ぶ。パーコールの中間層を分画3（F3）と呼ぶ。残っている細胞沈降物が分画4（F4）である。異なる分画の細胞を浮遊させて、トリパンブルー色素排除アッセイを用いて生存率を評価する。これらの異なる分画の生存率を凍結保存後の生存率と共に表3に示す。

30

【0171】

肝環流後の肝臓組織の血管または胆管枝に結合して残っている細胞を保持する。これらの細胞は、酵素環流後に得られた細胞の当初の懸濁液に認められ、典型的に懸濁液を通過した後に、ふるい（例えばチーズクロス）の上部に残っている。これらの血管および胆管枝の残留物を再度酵素処理して得られた細胞を他の細胞と共にプールする。

【0172】

パーコール分画は、細胞破片および死細胞と思われるものを除去するためにほとんどの研究者によってルーチンとして用いられており、最終的な沈降物のみが保存される。還流のルーチンの新規変法は、本明細書に開示のように、沈降物を捨てて、低い浮遊密度の細胞（すなわち、勾配の上部で回収される細胞）を保持してさらなる試験に用いる点である。これらの細胞は若い実質細胞であり、凍結はかなり容易である（凍結保存の章を参照）。

40

【0173】

実施例5

凍結保存実験。凍結保存方法論のために用いられる肝臓は胎児肝と同じ若さのドナー（妊娠12週から25週）および年齢77歳のドナーに由来する。

【0174】

「新規凍結保存緩衝液」

50

- ・ 2%ヒト血清（ギブコ社）またはウシ胎児血清（バイオウィッタッカー社）を添加したピアスパン（デュボン社、カタログ番号1000-46-06）。
- ・ 10%凍結保存剤[成熟実質細胞のみに用いられるジメチルスルホキシド（シグマ社、カタログ番号D5879もしくはD8779）、または前駆細胞に用いられるジメチルスルホキシドもしくはグリセロール（シグマ社、カタログ番号G6279）]。
- ・ 緩衝液に、さらに抗生物質（ペニシリン200 U/ml；ストレプトマイシン100 µg/ml）を添加する。
- ・ 緩衝液に、さらにホルモンおよび増殖因子を加える：インスリン（5 µg/ml）、トランスフェリン（5 µg/ml）、上皮細胞増殖因子（50 µg/ml）、FGF（10 ng/ml）、IGF II（10 ng/ml）。
- ・ 緩衝液にさらに脂質を添加する：ウシ血清アルブミン（BSA）またはヒト血清アルブミン（HSA）に結合した遊離脂肪酸（7.6 µM/l）、および高密度リポ蛋白質（10 µg/ml）。
- ・ 緩衝液に、さらに微量元素（セレン（ 10^{-9} M）、銅（ 10^{-7} M）、亜鉛（ 5×10^{-11} M）、および抗酸化剤（例えば、スーパーオキシドジスムターゼ模倣薬であるポルフォリン、10 µg/mlで用いられる；約0.1 mg/mlで用いられるアスコルビン酸；または当技術分野で既知の抗酸化剤）を添加する。

【0175】

本明細書に開示のように、組成物の変化は、重要な栄養素、脂質、ホルモンおよび増殖因子を組み合わせることであり、これらは肝細胞のために作製された血清不含ホルモン規定培地の一部として同定される。新規緩衝液によって、F4分画の肝細胞の生存率は、50%（非常に悪い試料に関して）もの低さの生存率から80%もの高い生存率となる（良好な試料に関して）。F1～F3分画の生存率は一貫して80%以上であり、われわれが疑っている事実は、これらの分画は倍数性の状態と、細胞外マトリクス成分および/または生存率と増殖に必要な他の細胞因子の合成に対してより伝導性の代謝活性を有するより若い細胞を有するためである。このように、それらは容易に凍結できる可能性がある。スーパーオキシドジスムターゼ模倣薬を緩衝液中に使用すると、細胞の生存率は5～10%増加した。

【0176】

上記の代わりに方法は：

- ・ ピアスパンをなくして、基礎培地（RPMI 1640のような）にインスリン（5 µg/ml）、トランスフェリン（5 µg/ml）、BSAに結合した遊離脂肪酸（7.6 µM/l）、高密度リポ蛋白質（10 µg/ml）、微量元素（セレン（ 10^{-9} M）、銅（ 10^{-7} M）、亜鉛（ 5×10^{-11} M）、および抗酸化剤を添加する改変緩衝液を用いる。
- ・ 細胞を、ラミニンと混合したタイプIVコラーゲン、またはフィブロネクチンと混合したタイプIもしくはタイプIIIコラーゲンのような細胞外マトリクスの形でコーティングする。

【0177】

上記のように処理した胎児肝臓細胞を、凍結保存緩衝液（上記）に浮遊させて、3ml凍結用バイアルに $5 \sim 10 \times 10^6$ 個/mlで分注し、その条件で1～2時間維持する。次に細胞を、コンピューター制御速度フリーザー（フォーマ・クリオムド）を用いて液体窒素温度 -100～-180、好ましくは-160で凍結し、大きい蒸気相において、液体窒素（-160）貯蔵タンクで保存する。細胞はこのプロセスを十分に生存し、生存率の有意な喪失は、50～270日の範囲の貯蔵期間に起こらない（図3参照）。

【0178】

成人肝細胞の分画（F1～F4）は、明確な細胞集団を含むことが判明した：F1は細胞破片、赤血球、肝星細胞、およびおそらく前駆細胞集団である小さい肝細胞（ $< 10 \mu$ ）（肝細胞系統または造血細胞系統のいずれか）を含む；パーコール溶液の上部であるF2分画は、二倍体であるより大きい肝細胞（ $10 \sim 15 \mu$ ）、すなわち小さい実質細胞を含む；パーコールの下段のF3分画は、二倍体と四倍体細胞の混合物からなるさらに大きい実質細胞（ $15 \sim 25 \mu$ ）を含む；ならびにF4分画（他の全ての研究者によって用いられている分画）は

、最大の実質細胞（25～50 μ）と完全な多倍体（四倍体および八倍体）からなる。一般的に、F1～F3分画の実質細胞は、凍結後の生存率が85～95%であり、F4分画の実質細胞は凍結後の生存率が50～80%である（到着時の肝臓の状態に依存する）。F4分画における実質細胞の生存率に影響を及ぼす同定された変数は：1）ドナーの年齢（ドナーの年齢が高くなれば細胞の予後は悪化する）；2）「クランプ時間」と研究室に輸送されるまでの時間（短いほどよい）；3）除去前の肝組織の健康状態（すなわち、重度の虚血疾患は悪い予後を与える）。これらの要因は相互作用するため、高齢ドナーからの組織の迅速な輸送は、輸送に時間がかかりすぎる若い患者からの組織より魅力的である可能性がある。

【0179】

【表5】

凍結保存による胎児および成人肝の平均生存率および接着効率ならびに細胞懸濁液における肝前駆細胞（AFP+細胞）の百分率

細胞集団	凍結保存剤	処理後の生存率	融解後の生存率	平均細胞サイズ (in um)	培地での増殖	% AFP+細胞
胎児肝	グリセロール	76%	77% (即ち、回収率100%)	7-15	良好	6-7%
成人肝, F1	グリセロール/DMSO	80%	82-85%	>12	良好	0.5-1%
成人肝, F2	グリセロール/DMSO	85%	84%	12-15	良好	2%
成人肝, F3	DMSO	85%	85%	15-25	良好	0.2%
成人肝, F4	DMSO	50-75%	56%	25-50	不良	0.01%

10

20

【0180】

処理後と凍結後の双方のF4分画の生存率の極限的範囲は、「クランプ時間」と研究室で試料を受領した時間の長さが様々であるためと、肝臓の状態が様々であるため（繊維症、虚血等）である。一般的に、F4分画は、肝臓の多様な処置および組織の全般的健康に対して最も感受性が高い。F2およびF3分画は一般的に生存率が高く、不良な肝標本から得られた場合でも容易に凍結保存される。F1分画はより変動が大きく、大量の細胞破片、脂肪滴と共に小さい実質細胞（肝前駆細胞を含むと想定される）および様々な造血細胞亜集団（すなわち、赤血球）の双方を含む多数の小さい細胞を含む。

30

【0181】

【表6】

凍結保存：胎児肝

- 処理 > 200
- 収率
- 受けた組織
- ◆ ~10⁸個/g
- (ドナーの年齢による)
- ◆ 12週：沈降細胞 ~ 1 ml
- 生存率
- ◆ 16週：~15~20 ml
- ◆ 処理：75~85%
- 沈降細胞 = 0.5~1 g組織
- ◆ 融解：>95%
- ◆ 24週：~4~5 g
- ◆ ソーティング：>90%
- ◆ 培養：>90%

40

【0182】

【表7】

凍結保存：成人肝

- 処理 > 80
- 受けた100~200
 - ・ 肝臓あたり重量
(2.5~3 kg/肝臓)
 - ・ 収率：
10⁷~10⁸個/g組織
- 生存率 (処理)
 - ◆ F1 : > 75% (> 12 μ)
 - ◆ F2 : > 90% (12~15 μ)
 - ◆ F3 : > 90% (15~25 μ)
 - ◆ F4 : 75~80% (25~50 μ)
- 生存率 (凍結)
 - ◆ F1~F3 : > 80%
⇒ 接着良好
 - ◆ F4 : 56%
⇒ 接着不良

10

【 0 1 8 3 】

実施例 6

フローサイトメトリー

細胞はそれらがレーザー光に暴露されるフローセルの中を一列で通過する。各細胞のおおよその体積は、「前方散乱」またはビームとして屈折された光の量が交差する。核、小胞体、ゴルジ体、小胞等のような内部細胞構造からの散乱光である「側方散乱」は、内部複雑度(すなわち、静止期の細胞、またはより若い細胞より内部成分をより多く含む活性化細胞およびより成熟した細胞)の量を決定するために用いられる。細胞の特徴に関するより選択的な情報は、非常に特異的な特徴的な抗原を細胞表面上の細胞複合体に結合させることによって得られる。これらの抗体は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(PE)およびPEとチトクロームの直列結合体のような蛍光分子に共有結合させることができ、それぞれの蛍光体に関して特定の波長での放出光を生成する。特定の抗体に結合した明確な発色団のパネルを選択することによって、関係する細胞集団を選択する。

20

30

【 0 1 8 4 】

細胞はそのパラメータ入力に基づいて分析する。エッペンドルフ管および遠心管、ならびに1秒間に40,000イベントまでの速度で如何なるサイズの多数のウェルのプレートを含む多様な回収装置を用いて、所望の細胞を採取する。

【 0 1 8 5 】

染色技法において用いられる抗体と試薬

抗体	供給元、カタログ番号、ロット番号	
ヤキ`抗ヒトAFP	ケミコン, AB635, C4P168	
モノクローナルマウスXヒトThy	ケミコン, MAB1294, 293CCD	
モノクローナルマウス抗ヒトAFP-PE結合体	クロマフ`ローブ`, P41020, A45P7	
ヒ`オチン結合ウサギ`抗ヤキ`	ベ`クターラホ`ラトリース`, BA-5000, J0313	
ヒ`オチン結合ウサギ`抗ヤキ`	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 200-152-096, 25985	10
ストレプ`トアヒ`ジ`ン/AMCA結合体	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 016-150-084, 40001	
ロハ`抗ヒツジ`AMCA結合体	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 713-156-4732202	
ロハ`抗ヤキ`CY5結合体	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 705-156-147, 38756	
ヤキ`IgG	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 005-000-002, 38837	
ヒツジ`IgG	ジ`ヤクソンイムノケミカルズ`, 013-000-002, 39945	
ヒツジ`抗ヒトアルブ`ミン	セロテック, ABP102, 210498	20

【 0 1 8 6 】

マウスモノクローナル抗ヒト抗体 :

CD14/トリカラー結合体	ファーミンゲン		
ICAM	ファーミンゲン		
CD34/FITC結合体	ファーミンゲン	34374X	
CD38/PE結合体	ファーミンゲン	31015X	
CD38/FITC結合体	ファーミンゲン	31014X	30
グリコフォリンA PE結合体	ファーミンゲン	32591A	
CD45/PE結合体	ファーミンゲン	31255X	
CD45/FITC結合体	ファーミンゲン	31254X	
アイソタイプ対照IgG1 PE	ファーミンゲン	33815X	
IgG2 FITC	ファーミンゲン	33814X	
c-Kit PE結合体	カルタグ	MHCK04	
ウサギXヒトAFP-FITC結合体	アキュレート	YNRH AFPP	記載なし
ヤギ抗ヒトAFP非結合体	"	AXL625	061
7アミノアクチノマイシンD	モルブローブス	A-1310, 4981-1	

(7AAD)

【 0 1 8 7 】

フローサイトメトリーのための細胞調製物において用いられる主な溶液 :

BSA : ウシ血清アルブミン (ペンテックスV)

PBS = 燐酸緩衝生理食塩液

FBS = ウシ胎児血清

AFP = フェトプロテイン

【 0 1 8 8 】

ホルモン添加ダルベッコ改変イーグル培地 : HC_DMED

DMEM、フェノールレッド不含高グルコース 500 mL

ウシ胎児血清 (FBS) 25 mL

5 mM EGTA 20 mL

インスリン (5 μ g/ml)、トランスフェリン (5 μ g/ml)

微量元素 [セレン (10^{-9} M)、銅 (10^{-7} M)、亜鉛 (5×10^{-11} M)]

抗生物質 (ペニシリン- 100 μ g/ml、ストレプトマイシン-100 μ g/ml)

ウシ血清アルブミン (BSA) 500 mg DNアーゼ 30 mg

BSAに結合した遊離脂肪酸混合液 38 μ l

孔径0.2 μ mのナルゲン濾過ユニットを通して滅菌濾過

ハンクス緩衝生理食塩液溶液 - 改変板 : HBSS-mod

10 \times HBSS 50 ml

1 M Hepes 10 mL

ペニシリン-100 μ g/ml/ストレプトマイシン-100 μ g/ml

BSA 500 mg

DNアーゼ 30 mg

全量を400 mlにする

pHを7.3にする

500 mlにする

0.2 μ mで濾過滅菌

免疫化学用ブロッキング緩衝液

HBSS_mod 100 ml

45%硬骨類魚のゲル 2.2 mL

BSA 0.8 g

1%サポニンのHBSS溶液 0.5 mL

免疫蛍光顕微鏡用調製培地

2 \times PBS 0.5 mL

n-プロピルガレート 0.25 g

グリセロール 5.7 g

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

実施例 7

フローサイトメトリーのための凍結肝臓組織の調製手順

凍結肝臓組織を37℃で急速に融解する。それぞれの肝凍結バイアル（それぞれ5～10×10⁶個/mlを含む緩衝液約3 mlを含む）を氷中でHC-DMEMを1 ml/分の速度で加えて10 mlにする。次に試料を1200 rpmで4℃で5分間遠心する。上清を捨てて、細胞沈降物をHC-DMEM 5 mlに再浮遊させる。上清が透明になるまで細胞の洗浄を繰り返す。次に細胞を計数して、トリパンブルー色素排除アッセイを用いて血球計算盤によって生存率を評価する。細胞を実験プロトコールに従って分画に分ける。標準試験管を1～2×10⁶個のあいだを含む対照データに関して調製し、通常、5～10×10⁶個/mlの細胞懸濁液からそれぞれについて200 μLを採取することによって行う。以下の標準試験管が必要である：

- 1) OCS：未染色の対照細胞からなる当初の細胞懸濁液。
- 2) 代償補正のためのFITC単独。FITC標識抗グリコフォリンA 5 μlを細胞懸濁液200 μLに加える。これに代わるものは、FITC-標識CD34、CD38、およびCD45の混合液であり、それぞれ7 μLを細胞200 μLに加える。
- 3) 代償補正のためのPE単独。グリコフォリン-PE（HC-DMEM 1 mlに対して2 μL、そして細胞200 μLに対してこれを30 μL加える）を用いる。
- 4) 代償のための7AAD単独。細胞懸濁液200 μLを2%パラホルムアルデヒドで固定し、次に100 μM 7AAD 5 μLおよび洗浄剤（1%サポニン）5 μLをこれらの細胞のHBSS_mod懸濁液 1 mlに加えることによって良好なシグナルが生成される。透過した細胞は、7AADによって強く染色される。
- 5) 代償のためのCy5。固定細胞200 μL（2%パラホルムアルデヒド）を2%ヤギ血清と共に40分間インキュベートして、細胞表面をヒツジIgGによって標識する。次に、細胞をCy5結合ロバ抗ヤギIgG（1:800）と共に40分間インキュベートする。
- 6) 代償のためのAMCA単独。7AADに関しては、代償補正のために人工的に強いシグナルが生成される。固定細胞200 μL（2%パラホルムアルデヒド）を2%ヒツジ血清と共に40分間インキュベートして、細胞表面をヒツジIgGによって標識する。次に、細胞をAMCA結合ロバ抗ヒツジIgG（1:800）と共に90分間インキュベートする。
- 7) AMCA/Cy5対照。固定（2%パラホルムアルデヒド）および透過（0.05%サポニン）細胞をAMCA結合ヤギ抗ヒツジIgGおよびCy5結合ロバ抗ヤギIgGと共に90分間インキュベートする。
- 8) モノクローナルアイソタイプ対照。マウスIgG1 PE結合体およびマウスIgG2 FITC結合体と共に細胞をインキュベートする。濃度は分析用のソーティング管を標識するために用いられる濃度と一致しなければならない。
- 9) 細胞内アイソタイプ対照。固定（2%パラホルムアルデヒド）および透過（0.05%サポニン）細胞を、アルブミンおよびフェトプロテインの同定のために用いられる抗体の対照として、非免疫ヒツジIgGおよびヤギIgGと共に90分間インキュベートする。Cy5-結合ロバ抗ヤギIgGおよびAMCA結合ロバ抗ヒツジIgGと共にインキュベーションを90分間継続する。

【0190】

ソーティング管は、CDマーカーの特定の組合せを発現する選択された細胞集団を獲得するために調製する。通常、これらの試験管は、細胞50～70×10⁶個を含む。細胞をHC-DMEM + 1%BSA + 500 pM 7AAD（100 μM保存液の5 μL）を含む染色緩衝液 1 mlに再浮遊させる。CD34 FITC、CD38 PE、またはCD45 PEそれぞれ15～25 μLを、細胞数に従って染色緩衝液に加える（通常、細胞10×10⁶個に対してファーミンゲン抗体3 μL）。c-kitに対する抗体は60倍希釈で加え、グリコフォリンAは500倍希釈で用いる。氷中の暗所で40分間染色する。染色後、細胞をHBSS-modによって2回洗浄し、2%パラホルムアルデヒドのPBS溶液によって氷中で30分間固定する。

【0191】

実施例 8

細胞ソーティングのための細胞内染色

フローサイトメトリーによる フェトプロテイン (AFP) の分析のための細胞の細胞内染色に関して、細胞懸濁液を0.05%サポニン (シグマ社、S4521) のHBSS_mod溶液によって水中で10分間透過性にする。次に細胞を、1%硬骨魚ゲルおよび0.8%BS、および0.005%サポニンを含むHBSS_modの混合液によって20分間ブロッキングした後、ヤギ抗ヒトAFPおよびヒツジ抗ヒトアルブミン (いずれもブロッキング緩衝液で800倍希釈) と共に室温の暗所で90分間インキュベートする。細胞を、0.01%サポニンを含むHBSS_modによって2回洗浄した後、Cy5-結合ロバ抗ヤギIgGおよびAMCA結合ロバ抗ヒツジIgGと共に90分間インキュベートする。

【0192】

または一次抗体の後、細胞をビオチン結合ウサギ抗ヤギIgG (2%ヒト血清および0.01%サポニンを含むブロッキング緩衝液で500倍希釈液) と共に室温の暗所で90分間インキュベートする。この後0.01%サポニンを含むHBSS_modによって2回洗浄し、9 μg/ml ストレプトアビジン/Cy5結合体の0.01%サポニンHBSS_mod溶液と共に室温の暗所で90分間インキュベートする。最後に、細胞をHBSS_modによって2回洗浄して、HBSS_modに再浮遊させて、50 μmのふるいを通して濾過し、分析のために細胞の塊を除去して、フローサイトメーターでソーティングする。

【0193】

肝前駆細胞を選択することを意図している場合、免疫選択は、多倍体である細胞および/または赤血球上のグリコフォリンAのような、肝臓からの成熟造血細胞に関連したマーカーを発現する細胞を除去する段階を含む。さらに、全ての成熟造血細胞上に発現されるCD45を示す細胞; 全ての肝細胞および胆管細胞に認められるコネキシン32のような成熟肝細胞に関連したマーカーを示す細胞; ならびに肝星細胞におけるレチノイドまたは内皮におけるフォンウィルブランド因子もしくは第VIII因子のような成熟間葉細胞に関連したマーカーを示す細胞は全て除去する。

【0194】

実施例9

ソーティングした細胞集団の免疫組織化学染色

細胞を分析後 フェトプロテインに関して染色し、フローサイトメーターによるソーティングを行う。ソーティングした細胞分画を1%BSAを含む0.3%HBSS-modに回収する。研究室に戻って、採取した試料の容積を 0.5×10^6 個/mLとなるように調整して、その200 μLをシャンドンサイトスピン装置によって顕微鏡用スライドガラス上に遠心する。サイトスピンスライド調製物を風乾させて、フェトプロテインおよび/またはアルブミンに関して後に染色するために保存する。顕微鏡用スライドガラス上に接着した「円板状の」細胞を免疫組織化学試薬を適用するための「ウェル」を形成するように、ラバーダムによって環状にする。スライドガラスを、0.3%トライトンXを含むトリス緩衝液 (0.9%NaClを加えた「低塩」10 mMトリス、pH 7.4) で10分間すすぎ、その後低塩トリスのみで10分間すすぐ。

【0195】

次に細胞を上記の硬骨魚ゲルブロッキング溶液に含まれる10%ウサギ血清中で室温で90分間ブロッキングする。低塩トリスで2回洗浄した後、細胞を、2%ウサギ血清を含むブロッキング緩衝液で100倍希釈したヤギ抗ヒトAFP抗体と共に4℃で一晩インキュベートする。トリス緩衝液によって2回洗浄した後、ビオチン結合ウサギ抗ヤギIgG (200倍希釈) のブロッキング緩衝液溶液と共に室温で90分間インキュベートする。ストレプトアビジン/AMCA複合体 (9 μg/ml低塩トリス緩衝液溶液) との最終的なインキュベーションを用いて、AMCA蛍光色素とビオチン結合ウサギ抗体との結合を通じてAFP様免疫反応性を特定する。トリス緩衝液によって2回洗浄した後、細胞調製物をほぼ乾燥させてから、退色防止剤含有培地 (n-プロピルガレート0.25 gの5.7 gグリセロールとPBS溶液1 mL) を加えてカバーガラスを載せる。適当であれば、アルブミンに対するテキサスレッド結合ウサギ抗ヒト抗体を一次抗フェトプロテイン抗体と共に含めることによって、細胞をアルブミンに関して二重染色する。

10

20

30

40

50

【0196】

抗 蛋白質抗体またはビオチン結合二次抗体のいずれかが存在しない場合には細胞のAMCA標識はないことを証明するために、一次または二次抗体を省略することによって対照スライドガラスを調製する。青色(450 nm)領域で光を放出するAMCA色素のUV励起を用いて、スライドガラスをエピ蛍光顕微鏡によって調べる。

【0197】

実施例10

細胞治療および/または遺伝子治療

ヒトウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)は種を超えてプラスミノゲンを活性化しうるため、RSV-LTRプロモーターからのヒトウロキナーゼを発現する組換え型アデノウイルスベクターであるAd-RSV-uPAを、肝再生を誘導する目的で構築する。組換え型アデノウイルスベクターの構築および産生に関しては、ヒトuPAのcDNAを以下のように調製する。蛋白質コード配列を含む1.326 kb HindIII/Asp718 uPA断片を、ラウス肉腫ウイルスLTR(RSV)プロモーターの転写制御下でpXCJL.1のHindIII/Asp718部位で、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルの上流に挿入する。ウイルスはpJM17とAd-RSV-uPAと呼ばれるベクターとの同時トランスフェクション後に調製する。Ad-RSV-uPAのスクリーニングは、293細胞における個々のブランクの増幅によって行われる。感染の3日後、ELISAによる免疫反応性uPAおよびフィブリンブランクアッセイによる繊維素溶解活性に関して上清を試験して、Ad-RSV-uPA感染の際にuPAの触媒活性が産生されたことを証明する。精製ウイルスを-80℃でアリコットとして保存し、HGD MEM培地によって新しく希釈してから注入する。ウイルス力価はOD測定および標準的なブランクアッセイによって決定する。ベクターの構築は、本質的に米国特許第5,980,886号に記載通りに実施する。ウイルス力価は208F細胞によって測定する。

【0198】

5~6週齢のC57BL/6雌性マウス(ジャクソンラボラトリーズ、バーハーバー、メイン州)を特定病原体不含環境で収容する。様々な時間での虚血性肝試料を安楽死マウスから得て、肝臓の前駆細胞を先に開示のように単離する。門脈に挿管するために、レシピエントマウスを20 mg/ml 2,2,2-トリプロモメタノール0.5 mlの腹腔内投与によって麻酔する。正中腹部切開を行って、皮膚を腹膜から分離して皮下ポケットを作製する。腹膜を開いて門脈を暴露する。シリコンチューブ(内径0.02"、外径0.037"、S/P医療用、バクスター、111.)を門脈に挿入して、ヘパリン加生理食塩液によって還流する。その後カニユーレを腹膜の中にトンネルのように進めて4.0絹縫合糸によって縫合する。長さ3 cmのカニユーレを遠位末端で結び、先に作製したポケット内の皮下に留置する。マウスに24時間以降にウイルス感染前駆細胞を投与する。マウスによっては、門脈挿管は2/3肝切除と共に実施する。次に部分的肝切除を実施する。門脈を還流するために、マウスを麻酔して、既に存在する腹部切開部の近位部位で皮膚を切開する。カニユーレを露出して、シリンジポンプに結合する。ウイルス注入のため、DMEMにおけるアデノウイルス調製物をカニユーレを通じて門脈の中に5~10分かけて注入する。

【0199】

全ての生化学および組織学的分析は、カニユーレを通じて門脈の中にアデノウイルス感染肝前駆細胞の注入後に実施する。uPAに関するELISAアッセイは、uPAの触媒および受容体結合ドメインに対して作製された異なる2つのモノクローナル抗体に基づいている。モノクローナル抗体の一つはペルオキシダーゼで標識する。血清総蛋白質およびアルブミンは、臨床病理研究室におけるルーチンの自動方法によって分析する。C57BL/6マウスの門脈へのアデノウイルスの注入は、細胞1個あたりアデノウイルスDNA1コピー以上を有する肝細胞を100%形質導入することが知られている。同じ用量のAd-RSV-uPAを用いると、死亡率は90%となる、少なくとも一部は出血に関連した。Ad-RSV-uPAのより低い用量を用いると、死亡率は5%未満であり、この用量を肝再生実験のために選択する。Ad-RSV-uPAの注入によって、4日後に約350 ng/ml(内因性レベルより70~100倍より高い)のピーク値に達する血清ウロキナーゼの一過性の上昇が起こり、この後12日までにバックグラウンド

10

20

30

40

50

濃度に低下する。uPAの上昇は、血清SGPT濃度の増加にも関連する。アデノウイルス注入後様々な時間において、動物に³Hチミジンを注入し、細胞増殖を定量する手段として肝DNAに取り込まれた放射活性の量を測定する。Ad-RSV-uPAによって処理した動物は、3日目に始まって8日間持続するチミジン取り込みの期間が増加した。このように、Ad-RSV-uPA/oval細胞処置による肝³H-チミジン取り込みの期間は、部分肝切除によって得られた場合よりかなり大きい。陰性対照アデノウイルスのレシピエントは4日目に肝³H-チミジン取り込みのピークを示し、これは24時間後に基準値レベルに戻り、11日目に³Hチミジンの取り込みのわずかな上昇を認めた。要約すると、SGPTレベルによって測定した肝損傷と高い割合の³Hチミジン取り込みは肝臓内ウロキナーゼ産生に帰因し、有意な肝生合成的再生が起こっていることを示している。uPAなしで注入した肝前駆細胞は、uPAインサートを有しないアデノウイルスより良好である。

10

【0200】

心臓死体ドナーに由来する組換え型アデノウイルス/前駆細胞によって処置した動物からの顕微鏡組織学的知見から、3日までに処置マウスがマクロファージと好中球を含む中等度の炎症性浸潤物を有したことが示される。肝細胞における変性的変化には、液胞化、核濃縮、およびいくつかの分裂核が含まれた。Ad-RSV-uPA/oval細胞投与の8~10日後、多数の巣状再生、様々なサイズの核、および少数の変性肝細胞による大きく減少した炎症反応を含む、肝臓回復の証拠を認める。3~4週間までに浸潤物は寛解して、肝臓は正常に見える。

【0201】

全体的に、これらの試験によって、肝前駆細胞と組み合わせたウロキナーゼ発現が有意な肝実質細胞再生を誘導することが証明される。

20

【0202】

実施例11

パーコール遠心分離による非バルク化

本実施例は、肝幹細胞、非前駆細胞および前駆細胞を含む肝前駆細胞の濃縮の方法を提供する。これらの技術の変種は、当業者に公知であり、かつこれらが前駆細胞の濃縮された集団を提供するための肝細胞懸濁液の非バルク化の目的に合致している限りは同程度に適している。

【0203】

例えばイーグルの基本培地(BME)のような培地中の肝細胞の実質的に単一の細胞懸濁液を、BME中に調製した15%パーコール層の一番上に載せる。Sorvall RT7遠心分離機及び14cmローター、または他の同等のローターと遠心機の組合せを用い、前述の勾配を、600~1200rpm、好ましくは750~1000rpmで10分間遠心する。上清を回収し、かつ1200~2000rpm、好ましくは約1500rpmで再遠心する。上清画分は、前駆細胞が濃縮され、かつ沈殿物(F3画分)は少なくとも1回の細胞周期が可能な細胞を含む。上清の細胞を個別に回収し、かつ2000~3000rpm、好ましくは約2500rpmで再び遠心する。後の遠心分離において、前駆細胞は、パーコールの上部に沈殿することが多く、この上部には細胞破砕片が残留しており、かつペレットには数回の有糸分裂サイクルが可能であるような細胞を含んでいる。パーコール画分は、即座に使用すること、凍結保存、培養の確立、または更なる濃縮に適している。更なる濃縮は、パンニング法、親和性による選択、FACSソーティングまたは当該技術分野において公知でありかつ先に説明された技術のいずれかにより達成することができる。ネガティブ選択は、CD45、グリコホリンAのためのマーカー、または以下に説明する他のマーカー類を発現している細胞の除去により達成される。ポジティブ選択は、CD14、CD34、CD38、ICAM、または他の完全長 - フェト蛋白質、アルブミンまたはこれら両方の発現を示すマーカーを発現している細胞の選択により達成される。

30

【0204】

実施例12

溶出による前駆細胞の調製

本実施例は、肝前駆細胞および肝非前駆細胞を単離する段階を提供する。様々な技術が当

50

該技術分野において公知であるが、好ましい態様のひとつは、詳細に明らかにされているが、他の調製技術も所望の目的に合致する限りは同程度に適していることが理解される。例えば、好ましい限定的でない技術は、例として本明細書に参照として組入れられている、米国特許第5,807,686号、第5,916,743号、第5,672,346号、第5,681,559号、第5,665,557号、第5,672,346号および第5,663,051号を参照のこと。

【0205】

多能性または肝臓の小肝前駆細胞は、パーコール、またはヒストパク (Histopaque) などの他の適当な密度勾配のいずれかを用いて予備的に単離し、かつ遠心後、培地で2回洗浄し、かつ溶出培地10ml中に再懸濁することができる。向流溶出については、洗浄した小さい単核細胞を、JE-5ローターおよび標準チャンバーを装備したBeckman社 J6M/E遠心機の流入入口へと、試料採取部位連結器を介して注入する。しかし、任意の多くの市販の連続的流出遠心機および密度に基づいた分離を促進するための手段であるチャンバーを含む使い捨てプラスチック製流入入口を使用することが好ましい溶出装置で、例えばBaxter International社 (ディアフィールド、IL) から販売されている「Fenwal Models CS 3000」および「Autopheresis C」；またはCobe 製造工業 (レイクウッド、CO) により販売されているSpectra Apherisis v 7/6などを使用することができる。装置の選択は当業者によって決まる。蠕動ポンプ (Cole Palmer Instruments社、シカゴ、IL) で、100mg/dl D-グルコース、0.3mM エチレンジアミン四酢酸ジナトリウム (EDTA) および50mg/dl ウシ血清アルブミンを含む0.9%通常の生理食塩水でpH7.2に調節したものである溶出用媒体である緩衝液を連続的に流すことができる。この緩衝液は使用前に滅菌する。細胞を、総流速15ml/分、ローター速度900gおよび室温で流す。100mlの溶出液を回収した後、流速を25ml/分まで上げる。ローター速度は一定に維持しつつ、流速は29ml/分、33ml/分、及び37ml/分と順次上げていき、各々の増加した流速において200mlを回収する。チャンバー内に残っている細胞を、ローターを逆さまにし、かつ溶出緩衝液100mlでチャンバーを洗い流して回収する。各細胞画分を洗浄し、かつ300gで10分間遠心する。適当な画分を回収し、トリパンブルー色素排除試験により生存力を決定し、かつ細胞回収率を、細胞カウンター (Coulter Electronics社、ハイアレア、FL) により決定する。

【0206】

あるいは肝細胞は、密度勾配分離により分離せずに、かつ5%ウシ胎仔血清、0.01% (w/v) EDTA、および1.0g/l D-グルコースを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH7.4中に懸濁し、かつ10 で、ローター速度1,950rpmで、JA-17ローターおよび標準分離チャンバー (Beckman Instruments社) を使用するBeckman向流遠心溶出システムに注入し、かつ試料を流速12~14ml/分の間で溶出する。

【0207】

適当な画分で得られた細胞は、一般に細胞直径5~15 μ m、好ましくは8.0~9.4 μ mを有し；細胞の大半は直径が8.3~9.2 μ mの範囲に収まる。これらの直径は、当該技術分野において公知の技術に従い測定される。必要に応じて、更に細胞マーカを基にポジティブまたはネガティブのいずれかの選択を行う。

【0208】

当業者に公知のその他の様々な抗体を、単独でまたは肝前駆細胞マーカーと組合せて用いることができる。この選択は、単離または濃縮されることが望ましい細胞の種類によって決まり、かつ造血系およびリンパ系の抗原に特異的な抗体であるような以下のものを含むが、これらに限定されるものではない：T細胞に特異的な抗CD2、抗CD2R、抗CD3、抗CD4、抗CD5および抗CD8；T細胞サブセットおよびB細胞サブセットに特異的な抗CD6；主要T細胞サブセットに特異的な抗CD7；B細胞に特異的な抗CD12、抗CD19および抗CD20、抗CD72、抗CDw78；単球に特異的な抗CD13および抗CD14；ナチュラルキラー細胞に特異的な抗CD16および抗CD56；血小板に特異的な抗CD41；胸腺皮質細胞およびランゲルハンス島に特異的な抗CD1a、抗CD1b、および抗CD1c；プレB細胞、単球および血小板に特異的な抗CD9；リンパ系前駆細胞、C-III及び顆粒球に特異的な抗CD10；白血球に特異的な抗CD11a；顆粒球、単球及びナチュラルキラー細胞に特異的な抗CD11b；単球、顆粒球、ナチュラルキラー細

10

20

30

40

50

胞および毛様細胞性白血病に特異的な抗CD11c；顆粒球に特異的な抗CD15；顆粒球、単球
 及び血小板に特異的な抗CDw17；白血球に特異的な抗CD18；成熟B細胞に特異的な抗CD21；
 B細胞細胞質および成熟B細胞に特異的な抗CD22；活性化されたB細胞に特異的な抗CD23；B
 細胞および顆粒球に特異的な抗CD24；活性化されたTおよびB細胞及び活性化されたマクロ
 ファージに特異的な抗CD25および抗CD26；主要T細胞サブセットに特異的な抗CD27および
 抗CD28；活性化されたTおよびB細胞ならびにステンベルグ-リード細胞に特異的な抗CD30
 ；血小板、単球/マクロファージ、顆粒球およびB細胞に特異的な抗CD31；マクロファージ、
 顆粒球、B細胞および好酸球に特異的な抗CDw32；単球、骨髓前駆細胞および骨髓性白
 血病に特異的な抗CD33；造血前駆細胞に特異的な抗CD34；顆粒球、単球、B細胞、一部のN
 K細胞および赤血球に特異的な抗CD35；単球/マクロファージおよび血小板に特異的な抗C
 D36；成熟B細胞に特異的な抗CD37；形質細胞、胸腺細胞および活性化されたT細胞に特異
 的な抗CD38；成熟B細胞に特異的な抗CD39；B細胞および癌腫に特異的な抗CD40；血小板お
 よび巨核球に特異的な抗CD42および抗42b；循環B細胞以外の白血球に特異的な抗CD43；白
 血球および赤血球に特異的な抗CD44；白血球に特異的な抗CD45；T細胞、B細胞サブセット
 、単球及びマクロファージに特異的な抗CD45RO；B細胞、単球およびT細胞サブセットに特
 異的な抗CD45RA；B細胞、T細胞サブセット、単球、マクロファージおよび顆粒球に特異的
 な抗CD45RB；造血系および非造血系細胞に特異的な抗CD46、CD55、CD58およびCD59；全て
 の種類の細胞に特異的な抗CD47；白血球および好中球に特異的な抗CD48；血小板、活性化
 されかつ長期培養されたT細胞に特異的な抗CDw49b；単球、T細胞およびB細胞に特異的な
 抗CDw49d；血小板および巨核球に特異的な抗CDw49f；白血球に特異的な抗CDw50およびCDw
 52；血小板に特異的な抗CD51；正常な新生物形質細胞を含む白血球に特異的な抗CD53；上
 皮細胞に特異的な抗CD54；T細胞サブセットおよび血小板に特異的な抗CDw60；血小板およ
 び巨核球に特異的な抗CD61；活性化された血小板に特異的な抗CD62；活性化された血小板
 、単球/マクロファージに特異的な抗CD63；単球に特異的な抗CD64(アップレギュレート
 されたインターフェロン)；顆粒球および単球についての異質性反応に特異的な抗CDw65
 ；顆粒球と特異的な抗CD66および抗67；単球およびマクロファージに特異的な抗CD68；活
 性化されたBおよびT細胞、活性化されたマクロファージ、およびナチュラルキラー細胞に
 特異的な抗CD69；活性化されたTおよびB細胞、ステンベルグ-リード細胞、および未分化
 の大細胞性リンパ腫に特異的な抗CDw70；活性化されたTおよびB細胞、マクロファージ、
 増殖細胞に特異的な抗CD71；B細胞サブセットおよびT細胞サブセットに特異的な抗CD73；
 B細胞および単球/マクロファージに特異的な抗CD74；成熟B細胞に特異的な抗CDw75；成
 熟B細胞およびT細胞サブセットに特異的な抗CD76；濾胞性中心B細胞に特異的な抗CD77；
 サイトカイン及び増殖因子(例えばIL-1~IL-13、EGF、IGF IおよびII、TGF- および 、
 TNF- および 、FGF、NGF、CIF、IFN- および 、CSF'sなど)に特異的な抗体；ウイル
 ス抗原(例えば、B型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白質またはHIVエンベロープ蛋白質)、ホ
 ルモン、細胞または腫瘍関連抗原またはマーカー、接着分子、止血分子、ならびに内皮細
 胞である。参照として組入れられた米国特許第5,840,502号に開示されているようなその
 他のマーカーおよび濃縮法も、同程度に適している。

【0209】

実施例13

バイオリアクター

高性能バイオリアクター(HPBR)を用いて、ヒト肝細胞の前駆細胞およびそれらの後代細胞
 を培養する。この方法は、更なる医療目的に有用な大量の細胞を提供するか、またはバイ
 オリアクターそれだけで、生物学的に有用な細胞分泌蛋白質、ならびに因子を製造ユニッ
 トとして供給する。これらの蛋白質と因子は、当該技術分野で公知の多くの因子の中でも
 とりわけ肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子-Iおよび-II(IGF-IおよびII)、上
 皮増殖因子(EGF)、a型およびb型トランスフォーミング増殖因子(TGF- およびTGF-)、
 神経増殖因子(NGF)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、肉腫増殖因
 子(SGF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、血管内皮細胞増殖因子(VE
 GF)、プロラクチンおよび成長ホルモン放出因子(GHRF)、ならびにインターロイキン(IL)I

10

20

30

40

50

L-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11のような様々な造血系増殖因子、赤芽球分化誘導因子(EDF)または濾胞刺激ホルモン放出蛋白質(FRP)、インヒビン、幹細胞増殖因子(SCPF)、ならびにこれらの蛋白質の活性断片、サブユニット、誘導体および組合せを含むが、これらに限定されるものではない。一般に、本明細書において使用されるこれらの細胞因子は、サイトカイン、リンホカイン、インターロイキン、コロニー刺激因子、ホルモン、走化性因子、抗走化性因子、凝血因子、血栓溶解蛋白質、補体蛋白質、酵素、免疫グロブリン、および抗原からなる群から選択される分泌蛋白質を意味する。このような生物活性を持つ蛋白質の中で、当業者は、第VIII因子、第IX因子、第VII因子、エリストポイエチン、 α -1-抗トリプシン、カルシトニン、成長ホルモン、インスリン、低密度リポ蛋白質、アポリポ蛋白質E、IL-2受容体およびそのアンタゴニスト、スーパーオキシドジスムターゼ、免疫反応緩和剤、副甲状腺ホルモン、インターフェロン(IFN、および)、神経増殖因子、グルコセレブロシダーゼ、コロニー刺激因子、インターロイキン(IL)1~15、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、アデノシンデアミナーゼ、インスリン様増殖因子(IGF-1およびIGF-2)、巨核球促進リガンド(MPL)、トロンボポイエチン、またはそれらの組合せを選択することができる。

【0210】

この特定のバイオリクターにおける細胞増殖プロトコールに制限されるものではなく、他の当該技術分野において周知のプロトコールも同程度に適し、かつ本明細書に参照として組入れられている公開された米国特許第6,001,585号；第5,998,184号；第5,846,817号；第5,622,857号；第5,571,720号；第5,563,068号；第5,512,474号；第5,443,985号；第5,342,781号；第5,330,915号；第5,320,963号；第5,202,254号；第4,833,083号；および第4,760,028号から容易に採用することができる。

【0211】

本装置は、450 10kDセルロース線維540ポリプロピレン線維を含み、かつ他のパラメータの詳細は、例えば本明細書に参照として組入れられている米国特許第5,622,857号に開示されている。細胞は、先に説明されたように単離される。全ての必要な材料は、Sigma Chemical社またはLife Technologies社から入手する。長期培養用培地のための付着培地は以下のようなものである：RPMI 1640(500mL)；50mL(10%)FBS；4mL L-グルタミン；1xペニシリン/ストレプトマイシン；ゲンタマイシン；15mM HEPES；10mU/mLインスリン；10mU/mLトランスフェリン；セレン。HPBRシステムは、付着培地を適用する前日、1日かけて培地で洗い流す。予め膨潤させたCytodex 3マイクロキャリヤ500mgを、HPBRの内側の輪状スペースに植込む。酸素供給器ファイバーはマイクロキャリヤを優しく支え、かつこれらがECSを通じて分配されることを防ぐ。生存能力のあるヒト肝前駆細胞も、内側の輪状スペースに植込まれ、かつこの装置はロックされ、細胞およびマイクロキャリヤを均一に混合するために手動で回転される。前駆細胞および後代細胞が直径10~20 μ mであると推定される場合には、細胞対マイクロキャリヤの植込比は約500である。細胞およびマイクロキャリヤの見かけの粘度は急激に上昇し、このことは、細胞対マイクロキャリヤおよび細胞対細胞の付着が、迅速かつ正常に進行していることを示している。本混合の2~3分以内に、細胞およびマイクロキャリヤの分離したゲルが、内側の輪状スペースに形成される。付着培地上で37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした後(定常期)、培地を長期培養用培地(2L)と交換する。これらの容量は、当業者が産物を所望のレベルに合わせて容易に調製することができるので、どのようにも制限されることはない。肝細胞は、このシステムに新鮮な培地を毎週加えながら、5週間培養する。細胞の代謝機能は、毎日試料を試験することにより、モニターする。5週間後、生育能力のある細胞およびマイクロキャリヤの>90%の回収が、下記の手順で達成される：PBSを溶媒とする0.1%コラゲナーゼと0.44mL(0.23M)EDTAの混合液を用い、ECSを洗い流し、かつHPBRを10分間インキュベーションする；ECSの内容物を、注射器から滅菌空気と共に噴出する；この方法は、長期培養用培地を使って繰返し、かつ材料を回収し、洗浄しかつ分離する。

【0212】

HPBRは、細胞の培養および遺伝子形質転換(例えばHGF遺伝子発現)において同等に適している。以下は、足場依存性細胞(例えばSW 480 P3; ATCC #CCL228)に関する遺伝的非ウイルスプロトコルであり、これは当業者は、培養ウェルおよび培養皿を使用する公開された手順から、適宜改変および最適化することができる。10kDの中膜線維の性質がHPBRにおいて好ましい。このバイオリアクターは、前述の方法とほぼ同様に操作する。Cytodes 1 ミクロキャリア(Pharmacia社、Sigma Chemical社から市販)は、足場依存性細胞の培養に広範に使用される。細胞密度が広範囲、つまり $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{15}$ 個の細胞または所望の場合はそれ以上の範囲で、HPBRのECSに植込むことができる。推奨される細胞対ミクロキャリアの植込比は約10の範囲であるが、当業者は、所望の場合は変更することができる。該装置は、実験期間中は約10cpm(またはそれ以上)で緩やかに回転される。ほぼ1日(またはそれ以上、特定の細胞によって決まる)細胞を培養した後、最適な集密度に達し、有効なトランスフェクションを得る。細胞対ミクロキャリアの植込比は、積極的にこの治療の時間枠および経済効率に影響を及ぼすように調節される。トランスフェクションの当日に、DNAプラスミド溶液(例えばpCMV)、および陽イオン性脂質溶液(例えばLIPOFECTIN試薬、Life Technologies社)は調製する。これらの試薬は、全工程が血清の存在を必要とする場合であっても、血清非含有でなければならない。DNAおよび脂質溶液の適量を混合し、その後この混合液を装置のECSに注入する。トランスフェクションの2、3時間後(または数時間後であることも)、適切である場合には血清の使用を再開し、かつ前述のように細胞培養をほぼ2、3日間継続する。永続的に形質転換された細胞を増殖する場合、より長い期間で行う。前述の方法と同様の方法で細胞を回収する。

10

20

【0213】

実施例14

人工肝

前述の実施例の拡張として、当業者は、体外肝維持システムとして、バイオリアクターを容易に採用することができる。異種移植(種間の臓器移植)は、動物臓器を用いることにより、ドナー肝の欠陥の軽減を補助することができる。しかし動物臓器においてヒトへの臓器移植の起こりうる危険は、ドナー動物に感染しているウイルスがレシピエントに感染するかもしれないことである。臓器移植レシピエントは、免疫システムを抑制しかつ臓器の拒絶反応を防止するために薬物を摂取するので、これらは感染している動物ウイルスと戦うことができないことがある。更により恐ろしいシナリオは、動物ウイルスが、感染した宿主において正常な免疫システムを有する保菌者に感染することができる形に突然変異することである。その結果、新たな病原性ヒトウイルスが生じ得る。ヒト臓器移植に好ましい動物種は、ブタであり、更に霊長類である。それにもかかわらず、ヒト細胞を基にした人工肝が利用できる場合には、これは動物肝よりも好ましいことは明らかである。

30

【0214】

所望の培養時間が経過した後、肝前駆細胞において濃縮された集団に由来した成熟肝細胞および/または胆管細胞が得られる。通常20~50億個の生存力の高い(80%以上)細胞が得られる。一般に、使用される培地は、ホルモンを添加したWaymouth培地である。20~50億個の細胞を収容するために、該バイオリアクターを、各々内径40mmおよび高さ100mmの最大2個の閉じ込め容器に規模拡大する。この特定の状況において、1個の閉じ込め容器当たり直径およそ2mmおよび総容量250mlのガラスビーズを用いる。培地は、再循環速度360ml/分で供給する。肝細胞の高い生存力は、安定した酸素消費速度により証明される。その後バイオリアクターを、完全な肝不全のために手術により肝摘出した無肝のヒトレシピエントに装着する。同様に、バイオリアクターを肝機能不全のヒト対象に装着する。当業者は、体外肝維持システムとしてのバイオリアクターを装着する手順を知っているか、または例えば本明細書に参照として組入れられている米国特許第6,008,049号;第5,981,211号;第5,976,870号;第5,891,713号;第5,827,729号;第5,643,794号;第5,622,857号;第5,605,835号;第5,270,192号に開示されているような当該技術分野において公知の代用手段を知っていると思われる。ドナー人工肝細胞は必ずしもヒトに限られるものではなく、か

40

50

つこのような細胞の種を越えての利用が現在可能であることは、このような参考文献から明らかである。例えば、ブタまたは霊長類から得た肝細胞は、ヒトでの使用に同程度に適している。本発明の方法および組成物は、細胞療法または体外肝療法における使用のためのヒト肝細胞の調製を可能にすることも、それに付随する多くのあらゆる利点と共に明らかである。

【0215】

左大腿動脈からの血液は、Minntech社 血液濃縮装置へ送られる。A12フリンジエレカスカニューレを大腿動脈に挿入し、かつ血液濃縮装置に対する1/4" PVCチューブへ連結した。血液濃縮装置は、血液を、細胞非含有限外濾過濾液画分、および血球画分に分離する。血球画分は、同様のチューブを使って大腿静脈に戻す。限外濾過濾液は、1/4" PVCチューブを介して血液濃縮装置から排出され、かつ回転ポンプを用いて調節された流速40ml/分で肝細胞バイオリアクターシステムに送入される。バイオリアクターを通過して灌流した後、限外濾過濾液は、左頸静脈を介して患者に戻される。体外肝代謝の供給量を明らかにするために、肝で代謝されることが分かっている2種の異なる化学物質、7-エトキシクマリンおよびリドカインを、バイオリアクターの送入口から限外濾過濾液に投与する。各々の代謝物である7-OHクマリンおよびモノエチルグリシンキシリジド(MEGX)を、限外濾過濾液を患者に戻す前に、バイオリアクターの排出口で測定する。7-エトキシクマリンおよびリドカインの両方の有意な代謝量が認められる。従ってこれらの結果は、体外肝代謝を提供する、維持システムとしてのバイオリアクターの適用を示している。血漿からの血球の分離は、外来肝細胞に対するレシピエントの免疫反応を最小にする。従って肝前駆細胞およびそれらの後代細胞は、体外肝維持を提供するためのバイオリアクターにおいて有用である。

10

20

【0216】

実施例15

エクソン1でコードされたペプチドおよび抗原としての使用

-フェト蛋白質のエクソン1に対応する短いペプチドを用いて、特異的抗体を用いて発現を評価することにより、様々な細胞系譜において -フェト蛋白質を明白に区別する。エクソン1でコードされたペプチド配列は以下のものである：

配列番号：14 MKWVESIFLIFLLNFTESTRHRNEYGI。

これらのアミノ酸は、ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZのようなアルファベットの文字列でも表すことができ、ここでこの文字列の文字Aは該ペプチドのM、K、W、V、E、S、I、F、L、I、F、L、LまたはNから始まる。エクソン1でコードされた配列で長さが4~12個のアミノ酸残基であるペプチドが、巨大分子と結合し、抗原を作成する。このペプチドは任意に、長さ2~8個の炭素原子のスペーサーにより、巨大分子と連結することができる。巨大分子は、アルブミン、ヘモシアニン、カゼイン、オボアルブミン、またはポリリシンである。適当なペプチドは、表のペプチドおよび相同性が少なくとも80%または標準のアミノ酸置換であるようなその類似体を含む。下記は、当業者が所望のペプチド配列を得るために解釈する例であり、長さは特定な要求に従っている：

30

A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,
A--B--C--D--E--F--G--H--I--J,
A--B--C--D--E--F--G--H--I,
A--B--C--D--E--F--G--H,
A--B--C--D--E--F--G,
A--B--C--D--E--F,
A--B--C--D--E,
A--B--C--D,

B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
 B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
 B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
 B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,
 B--C--D--E--F--G--H--I--J,
 B--C--D--E--F--G--H--I,
 B--C--D--E--F--G--H, 10
 B--C--D--E--F--G,
 B--C--D--E--F,
 B--C--D--E,
 C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
 C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
 C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
 C--D--E--F--G--H--I--J--K, 20
 C--D--E--F--G--H--I--J,
 C--D--E--F--G--H--I,
 C--D--E--F--G--H,
 C--D--E--F--G,
 C--D--E--F,
 D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
 D--E--F--G--H--I--J--K--L--M, 30
 D--E--F--G--H--I--J--K--L,
 D--E--F--G--H--I--J--K,
 D--E--F--G--H--I--J,
 D--E--F--G--H--I,
 D--E--F--G--H,
 D--E--F--G,
 E--F--G--H--I--J--K--L--M--N, 40
 E--F--G--H--I--J--K--L--M,
 E--F--G--H--I--J--K--L,
 E--F--G--H--I--J--K,
 E--F--G--H--I--J,
 E--F--G--H--I,
 E--F--G--H--I,

E--F--G--H,	
F--G--H--I--J--K--L--M--N,	
F--G--H--I--J--K--L--M,	
F--G--H--I--J--K--L,	
F--G--H--I--J--K,	
F--G--H--I--J,	
F--G--H--I,	
G--H--I--J--K--L--M--N,	10
G--H--I--J--K--L--M,	
G--H--I--J--K--L,	
G--H--I--J--K,	
G--H--I--J,	
H--I--J--K--L--M--N,	
H--I--J--K--L--M,	
H--I--J--K--L,	
H--I--J--K,	20
I--J--K--L--M--N,	
I--J--K--L--M,	
I--J--K--L,	
J--K--L--M--N,	
J--K--L--M,	
K--L--M--N など	
ここでA--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--またはNのいずれかは、	30
例えばグリシン Gly G、	
アラニン Ala A、	
バリン Val V、	
ロイシン Leu L、	
イソロイシン Ile I、	
メチオニン Met M、	
フェニルアラニン Phe F、	
トリプトファン Trp W、	
プロリン Pro P、	
または極性(親水性)	40
セリン Ser S、	
トレオニン Thr T、	
システイン Cys C、	
チロシン Tyr Y、	
アスパラギン Asn N、	
グルタミン Gln Q、	
または、(負)帯電した	
アスパラギン酸 Asn D、	
グルタミン酸 Glu E、	
または、(正)帯電した	50

リシン Lys K、
アルギニン Arg R、
ヒスチジン His H、

のような非極性アミノ酸(疎水性)であるか、またはこれらのアミノ酸ではないこともある。この文字列は、それらの許容されるアミノ酸置換または塩で構成することもできる。最も頻出するアミノ酸置換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly、またはその逆である。

【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 -フェトプロテインmRNAのPCR分析。 10
- 【図 2】 アルブミンmRNAのPCR分析。
- 【図 3】 胎児肝細胞の生存性に対する凍結保存の影響。
- 【図 4】 左図、FACSによる -フェトプロテインの免疫蛍光ヒストグラム。右図、FACSによるアルブミンの免疫蛍光ヒストグラム。
- 【図 5】 未分画肝細胞懸濁液における、表面マーカーCD14、CD34、CD38、CD45およびグリコホリンA (GA) を発現する細胞の比率。
- 【図 6】 胎児肝細胞による細胞表面マーカーおよび -フェトプロテインの共発現。
- 【図 7】 左上、 -フェトプロテイン陽性細胞の比率。右上、アルブミン陽性細胞の比率。下、 -フェトプロテインおよびアルブミン共発現に関するパーコール分画。
- 【図 8】 CD14、CD38および -フェトプロテインの共発現に関する胎児肝細胞懸濁液のFACS分析。 20
- 【図 9】 CD14および/またはCD38による選択を用いた -フェトプロテイン陽性細胞の収率。
- 【図 10】 -フェトプロテインに関して染色した胎児肝前駆細胞の4つの代表的な免疫蛍光図。
- 【図 11】 CD14に関する選択の効果(右)：微分干渉コントラスト(上)および免疫蛍光図(下)。
- 【図 12 A】 位相差顕微鏡による肝細胞の塊。
- 【図 12 B】 -フェトプロテイン抗体を用いた免疫蛍光法による肝細胞の同じ塊。
- 【図 12 C】 AおよびBを重ねたもの。 30
- 【図 13 A】 カルセインで染色した肝細胞。
- 【図 13 B】 -フェトプロテインで染色した肝細胞、図面Aと同じ画像。
- 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Reid, Lola

<120> Human Liver Progenitors

<130> 113918.101

<140> New 40

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

accatgaagt ggggtggaatc

<110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918.101 Sequence 2
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1 10
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 cctgaagact gttcatctcc 20
 <110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918.101 Sequence 3 20
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 30
 <400> 1
 taaaccctgg tgttggccag 20
 <110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918-101 Sequence 4
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1 40
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atttaaactc ccaaagcagc ac 22

<110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918.101 Sequence 5
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1 10
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 cttccatatt ggattcttac caatg 25
 <110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918.101 Sequence 6 20
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 30
 <400> 1
 ggctaccata ttttttgccc ag 22
 <110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918.101 Sequence 7
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1 40
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ctacctgcct ttctggaaga ac 22

<110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918-101 Sequence 8
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1 10
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 gagatagcaa gaaggcatcc c 21
 <110> Reid, Lola
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> 113918-101 Sequence 9 20
 <140> New
 <141> 2000-01-19
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 30
 <400> 1
 aaagaattaa gagaaagcag cttg 24
 <110> Reid
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> Sequence 10
 <140>
 <141>
 <160> 1 40
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ggcacaatga aqtgggtaac c 21

<110> Reid
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> Sequence 11
 <140>
 <141>
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1 10
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ccataggttt cacgaagagt tg 22
 <110> Reid
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> Sequence 12 20
 <140>
 <141>
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 30
 <400> 1
 gccagtaagt gacagagtca c 21
 <110> Reid
 <120> Human Liver Progenitors
 <130> Sequence 13
 <140>
 <141>
 <160> 1 40
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ttataagcct aagccagctt gac 23

<110> Reid

<120> Human Liver Progenitors

<130> Sequence 14

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

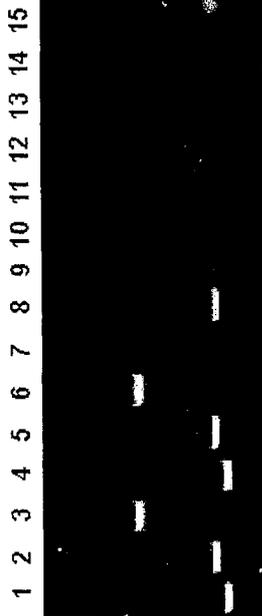
<400> 1

Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr
 1 5 10 15

Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile
 20 25

10

【 図 1 】



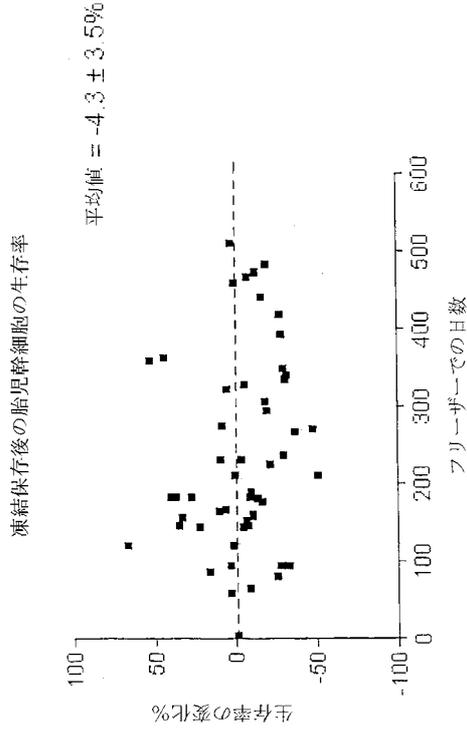
5'プライマー	hAFP1	hAFP3	hAFP1
3'プライマー	hAFP2	hAFP4	hAFP4
標的エクソン (DNAの長さ)	1~3 (257bp)	12~14 (355bp)	1~14 (1836bp)
Hep3B	1	2	3
HepG2	4	5	6
K562	7	8	9
STO	10	11	12
cDNAなし	13	14	15

【 図 2 】

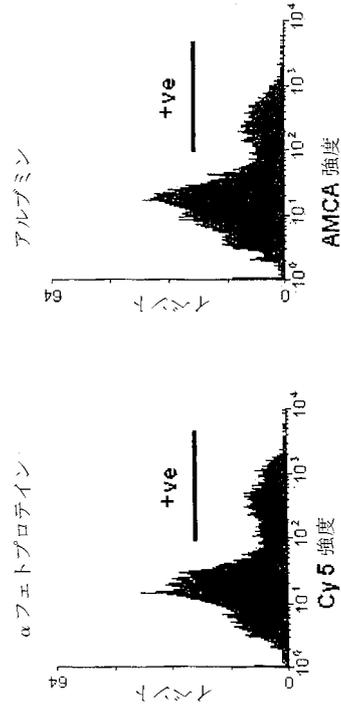


5'プライマー	hALB1	hALB3	hALB1
3'プライマー	hALB2	hALB4	hALB4
標的エクソン (DNAの長さ)	1~4 (333bp)	12~14 (358bp)	1~14 (1836bp)
HepG2	1	2	3
Hep3B	4	5	6
K562	7	8	9
STO	10	11	12
cDNAなし	13	14	15

【図3】

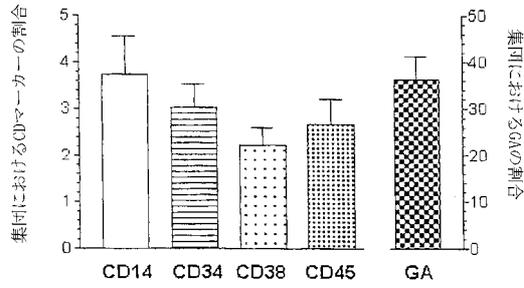


【図4】



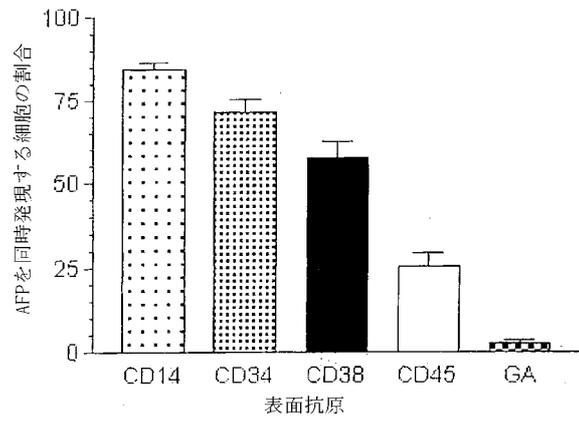
【図5】

肝細胞懸濁液における表面マーカーの発現

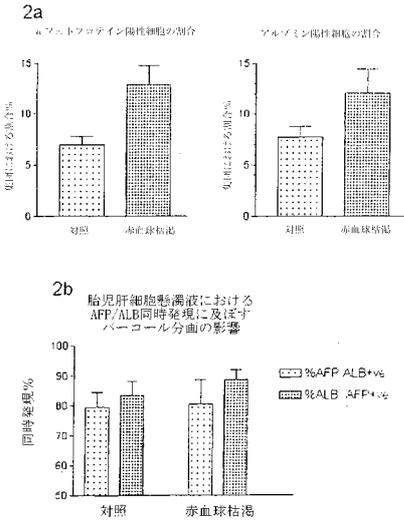


【図6】

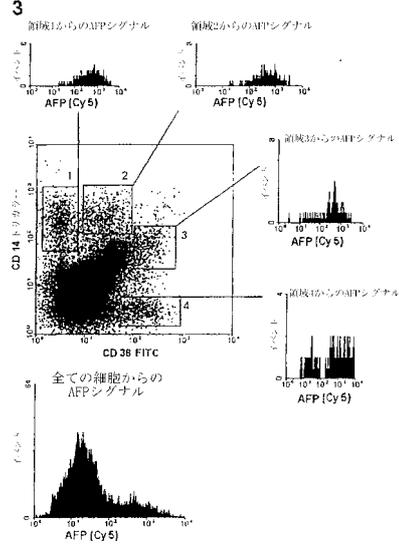
胎児肝細胞による細胞表面抗原とαフェトプロテインの同時発現



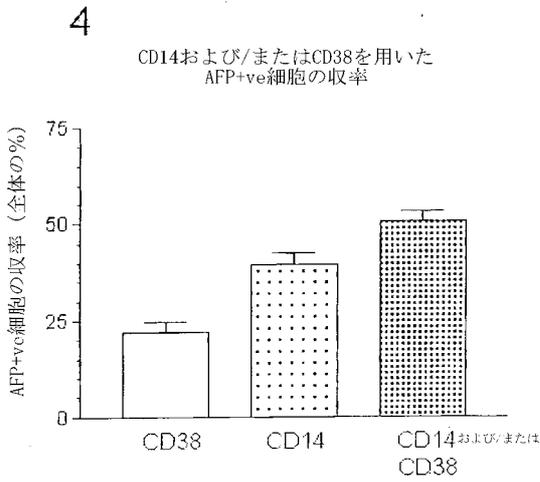
【 図 7 】



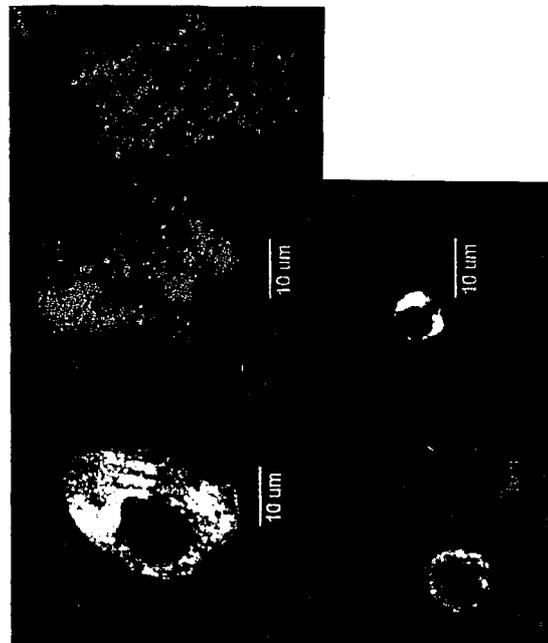
【 図 8 】



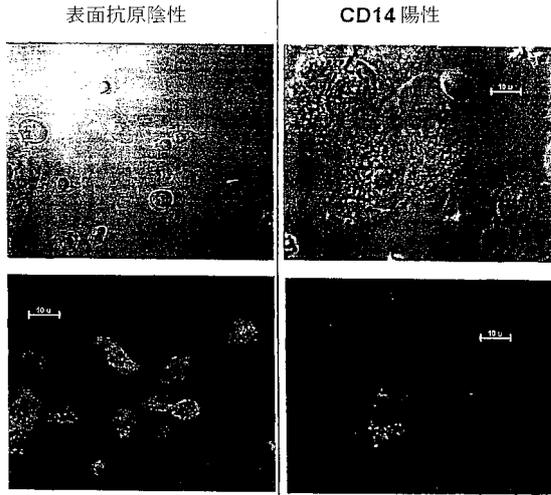
【 図 9 】



【 図 10 】

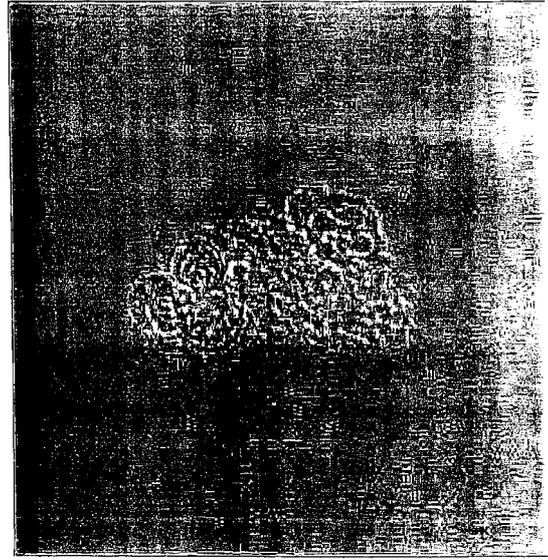


【図 1 1】

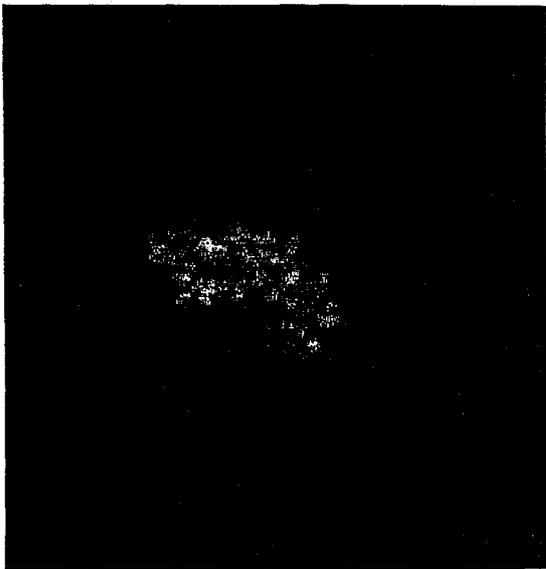


上段 : 細胞のDIC画像
下段 : AFP 免疫蛍光

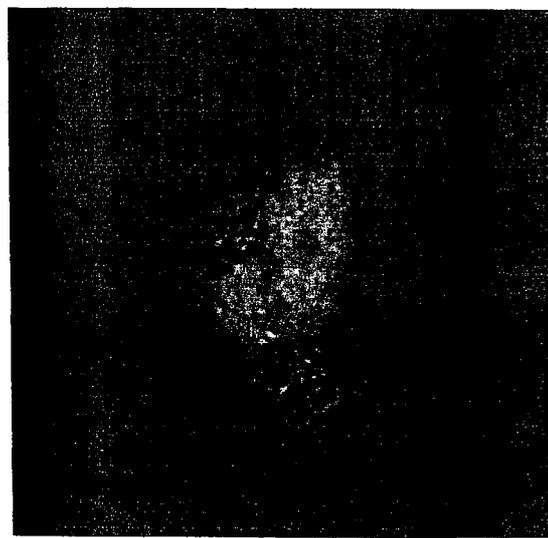
【図 1 2 A】



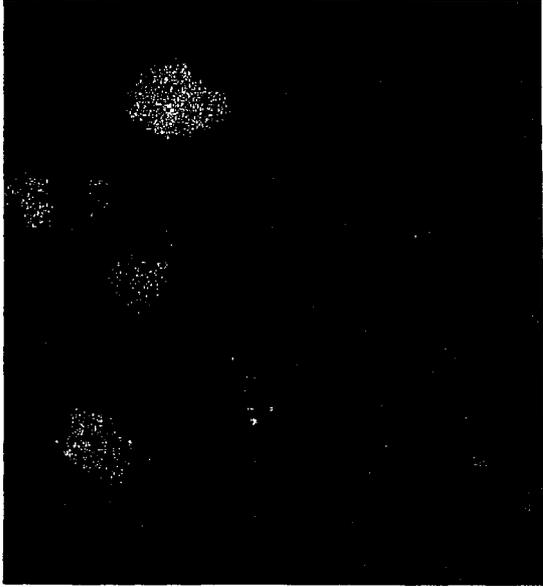
【図 1 2 B】



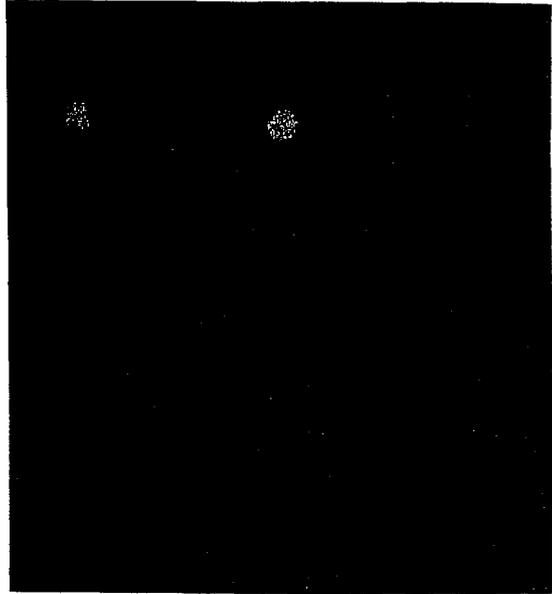
【図 1 2 C】



【 1 3 A】



【 1 3 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 Y

(72)発明者 久保田 浩司
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル サマーウォーク サークル 273

(72)発明者 モス ニコラス
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 カルボロ カイル ルースト ドライブ 104

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 特表平07-501206(JP,A)
 特開平10-179148(JP,A)
 特開平08-112092(JP,A)
 特開平09-313172(JP,A)
 Blood, 1994年, Vol.83, No.11, p.3170-3181
 Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1993年, Vol.204, No.3, p.261-269
 科学技術振興事業団 創造科学技術振興事業 吉里再生機構プロジェクト 成果報告集, 1997年, pp.285-298
 Am. J. Pathol., 1996年, Vol.149, No.5, pp.1593-1605
 第10回バイオエンジニアリング講演会講演要旨集, 1998年, No.97-72, pp.11-12
 第125回日本獣医学会講演要旨集, 1998年, p.42, B-S14
 Differentiation, 1995年, Vol.59, p.35-42
 Blood, 1985年, Vol.65, p.1518-1525

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08
 C12Q 1/00-1/68
 G01N 33/53
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	人肝祖細胞		
公开(公告)号	JP5068901B2	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	JP2000594906	申请日	2000-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
当前申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
[标]发明人	レイドローラエム 久保田浩司 モスニコラス		
发明人	レイドローラエム. 久保田浩司 モスニコラス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/071 C12N5/074 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 A61K35/12 A61K35/407 A61K48/00 A61P1/16 A61P7/00 A61P35/00 C12N5/00		
CPC分类号	A61K35/12 A61K2039/55594 A61P1/00 A61P1/16 C12N5/0672 C12N2500/20 C12N2500/22 C12N2500/25 C12N2500/36 C12N2503/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.202.A C12N5/00.202.D C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	水落NoboriNoriko		
优先权	60/116331 1999-01-19 US		
其他公开文献	JP2002534974A5 JP2002534974A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了从人肝脏中分离和冷冻保存祖细胞的方法，其包括处理人肝脏组织以提供基本上单细胞悬浮液，其包含在人肝脏中发现的一种或多种细胞谱系的祖细胞和非祖细胞，使悬浮液经历减灭步骤，基本上减少了悬浮液中非祖细胞的数量，并且其提供了富含祖细胞的减压悬浮液，所述祖细胞显示出与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志物；从所述去除的悬浮液中选择那些细胞，它们自身，它们的后代或其更成熟的形式表达与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标记。这些标记中有CD14，CD34，CD38，CD45和ICAM。肝脏祖细胞的特征是直径6-15μ，二倍体，血型糖蛋白A-，CD45-，AFP+++，ALB+，ICAM+，并且CD14+，CD34++，CD38++的表达不同，亚群CD117+。这些祖细胞亚群具有特别适用于肝细胞和基因治疗以及用于产生生物人工器官的细胞的特征。

区域	1	2	3
倍數性	二倍体細胞	四倍体細胞	四倍体細胞と八倍体細胞の混合物
平均サイズ	7-20 μ	20-30 μ	30-50 μ
増殖	最大	中間	後期
細胞外基質	ディッセ腔に位置する基質の化学組成における勾配であり、門脈周囲領域ではラミニンおよびヘパリン硫酸プロテオグリカンと混合したIV型コラーゲンからなり、中心周囲領域では繊維性コラーゲン、フィブロネクチン、およびヘパリンプロテオグリカンに変化する		
遺伝子発現	初期	中期	後期