

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-339227

(P2004-339227A)

(43) 公開日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/407	A 6 1 K 35/407	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2004-186968 (P2004-186968)	(71) 出願人	591054174
(22) 出願日	平成16年6月24日 (2004. 6. 24)		イエシバ・ユニバーシティ
(62) 分割の表示	特願平7-514579の分割		YESHIVA UNIVERSITY
原出願日	平成6年11月16日 (1994. 11. 16)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、モリス・パーク・アベニュー 1300
(31) 優先権主張番号	08/155, 939	(74) 代理人	100057874
(32) 優先日	平成5年11月19日 (1993. 11. 19)		弁理士 曾我 道照
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084010
			弁理士 古川 秀利
		(74) 代理人	100094695
			弁理士 鈴木 憲七

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓機能不全治療剤および人工肝臓の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 肝芽細胞を含む肝臓機能不全治療剤および前記肝芽細胞を利用した人工肝臓の製造方法を提供する。

【解決手段】 成人の肝臓の単細胞懸濁液を調整し、成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞及び肝葉細胞に対し特異的な抗体を利用し懸濁液をパンニングし、上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を利用して単離した肝芽細胞を血管を介して肝臓内に注入する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝芽細胞を包含する肝臓機能不全治療剤。

【請求項 2】

血管を介して肝臓内に前記肝芽細胞を注入するための請求項 1 記載の肝臓機能不全治療剤。

【請求項 3】

肝臓外の部位に前記肝芽細胞を注入するための請求項 1 に記載の肝臓機能不全治療剤。

【請求項 4】

肝臓外の部位である脾臓に前記肝芽細胞を注入するための請求項 1 に記載の肝臓機能不全治療剤。 10

【請求項 5】

前記肝芽細胞が、

(a) 胚または新生児の肝細胞の単細胞懸濁液を調製する工程、

(b) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、赤血球、内皮細胞または他の肝葉細胞を含む造血細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および

(c) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体の少なくとも 1 種類、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、胚または新生児の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である請求項 1 記載の肝臓機能不全治療剤。 20

【請求項 6】

前記肝芽細胞が、

(a) 成人の肝臓の単細胞懸濁液を調製する工程、

(b) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように、成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および

(c) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、成人の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である請求項 1 記載の肝臓機能不全治療剤。 30

【請求項 7】

バイオリクターを備える肝芽細胞の利用を包含する、人工肝臓を製造する方法。

【請求項 8】

前記肝芽細胞が

(a) 胚または新生児の肝細胞の単細胞懸濁液を調製する工程、 40

(b) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、赤血球、内皮細胞または他の肝葉細胞を含む造血細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および

(c) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体の少なくとも 1 種類、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、胚または新生児の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記肝芽細胞が

- (a) 成人の肝臓の単細胞懸濁液を調製する工程、
- (b) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように、成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および
- (c) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、成人の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である、請求項7に記載の方法。

10

【請求項10】

培養設備内の肝芽細胞の利用を包含する人工肝臓を製造する方法。

【請求項11】

前記肝芽細胞が

- (a) 胚または新生児の肝細胞の単細胞懸濁液を調製する工程、
- (b) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、赤血球、内皮細胞または他の肝葉細胞を含む造血細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および
- (c) 赤血球、内皮細胞および他の肝葉細胞を含む造血細胞が上記懸濁液から除去されるように、上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体の少なくとも1種類、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、胚または新生児の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である、請求項10に記載の方法。

20

【請求項12】

前記肝芽細胞が

- (a) 成人の肝臓の単細胞懸濁液を調製する工程、
- (b) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように、成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞に対して特異的な抗体を利用して上記懸濁液をパンニングする工程、および
- (c) 成熟肝細胞、成熟胆管細胞、内皮細胞および肝葉細胞が上記懸濁液から除去されるように上記抗体を利用した蛍光励起細胞分離捕集を行い、そしてこの懸濁液に対し、肝細胞マーカーに対する抗体、側面散乱、正面散乱および/または自己蛍光を利用した多変数の蛍光励起細胞分離捕集を行うことにより、上記懸濁液中に残る細胞を単離された肝芽細胞とする工程を包含する、成人の肝臓から肝芽細胞を単離する方法によって単離された肝芽細胞である、請求項10に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本出願は、1991年8月7日に「肝細胞前駆細胞の増殖」と題して出願された米国特許出願第07/741,128号の一部継続出願である。

【0002】

本発明は肝芽細胞を単離するための方法および単離肝芽細胞に関する。本発明の単離肝芽細胞は、肝幹細胞（多分化能性前駆細胞）および、肝細胞または胆管細胞のいずれか一方に分化が決定付けられている始原細胞（committed progenitors; 1つの分化可能性（fate）のみを有する前駆細胞）を包含する。本発明の単離肝芽細胞は、肝機能不全の治療、人工肝臓、遺伝子治療、薬剤検定およびワクチン製造に使用されることができる。さらに、本発明の単離肝芽細胞は、機能性肝臓細胞集団の使用を必要とする、研究、治療および商業目的のために使用されることができる。

50

【0003】

成熟肝細胞と異なり、本発明の肝芽細胞は、肝臓系列 (liver lineage) 全てに成熟可能である娘細胞を産生し、かつ多くが系列上の位置 (lineage-position) に特異的である全ての範囲の肝機能を提供する。さらに、本発明の肝芽細胞は成熟肝細胞よりも優れた増殖能および長期生存能力を有している。その結果として、本発明の肝芽細胞は、成熟肝細胞よりも研究、治療および商業に適している。

【背景技術】

【0004】

幹細胞および初期始原細胞が、骨髄、腸および表皮等の急速に増殖する成人組織中に存在することは古くから知られていたが、近年になって、長期の細胞寿命によって特徴付けられる器官である成人肝臓のような静止組織中にも存在すると考えられるようになった。自己複製し、かつ種々の分化可能性を有する娘細胞を産生する幹細胞の能力は、分化の決定付けられた始原細胞から幹細胞を明瞭に区別する。対照的に、分化の決定付けられた始原細胞は、細胞タイプに関しては単一の分化可能性を有する娘細胞を産生し、それらの娘細胞は緩やかな成熟過程をたどるが、その過程において、系列上の位置に依存した過程に、分化した機能が出現する。

【0005】

成人器官において、体組織中の幹細胞は、単一の方向性を有する最終分化過程をたどる娘細胞系列を産生する。造血、腸および表皮等の良く特徴付けられた系列系において、幹細胞は経験的なアッセイ法により同定されてきたが、そのようなアッセイ法において幹細胞が全ての範囲の子孫を産生し得ることが示されている。現在までのところ、細胞の一般的な分類として幹細胞を択一的に同定する分子マーカーは知られておらず、そして、自己増殖および多分化する能力を有する細胞を、単一の分化可能性および分化が決定付けられた細胞へと変換する結果をもたらす分子メカニズムも知られていない。

【0006】

肝実質の構造および機能上の単位は、2つに分かれた血管ベッドの周りの車輪のように組織された細葉である。それぞれが門細静脈、肝細動脈および胆管を有する6組の門脈三連構造が周辺部を形成し、そして中央血管が中枢 (ハブ) を形成している。車輪の「スポーク」を含む実質は、有窓洞様内皮 (fenestrated sinusoidal endothelium) の両側に列をなす細胞のプレートからなる。血液は、門脈三連構造の門細静脈および肝細動脈から、実質のプレートを並べた洞様毛細血管を通り、最後の肝臓血管である中央血管へと流れる。肝細胞は、それらの細葉上の位置によって、著しい、形態学的、生化学的および機能的不均質性を示す (Gebhardt, *Pharmac. Ther.*, Vol. 53, pp. 275-354 (1990) 参照)。

【0007】

比較してみると、門脈周囲の実質細胞は大きさが小さく、細葉内の細胞は大きさが中位であり、そして中央血管周囲の細胞は大きさが最も大きい。ミトコンドリア、小胞体およびグリコーゲン顆粒の形態には、細葉上の位置に依存する変異が存在する。極めて重要なことは、二倍体実質細胞および最も高い生長能力を有するものが門脈の周囲に配置されていることである。同様にして、組織特異的遺伝子発現も細葉上の位置に依存しているということは、遺伝子の発現は成熟に依存するという仮説を導く (Sigal et al., *Amer. J. Physiol.*, Vol. 263, pp. G139-G148 (1993) 参照)。

【0008】

肝臓は、種々の点で腸系、皮膚系および造血系と類似した系列系と幹細胞を有していると、現時点では信じられている (Sigal et al., *Amer. J. Physiol.*, Vol. 263, pp. G139-G148 (1993); Sigal et al. *In Extracellular Matrix*, Zern and Reed, eds, Marcel Dekker, NY., pp. 507-537 (1993); および Brill et al., *Liver Biology and Pathobiology*, Arias et al., 3d eds, Raven Press, NY (1994年、印刷中) 参照)。従って、動物の全てまたは多くの年齢の肝臓内に始原細胞集団が存在することが期待される。肝臓の系列モデルは次のことを明らかにし得る。それは、培養において僅かな分裂回数以上に亘って成人の成熟肝臓細胞を生長させることが研究者に不可能であるのはなぜか、肝臓または肝

10

20

30

40

50

臓外の部位 (ectopic site) の生体内に注入した場合にも成熟した成人肝臓細胞の分裂は僅かしか研究者に観察されないのはなぜか、および成人肝臓細胞を用いた人工肝臓の確立において研究者に限られた成功しか納めていないのはなぜか、ということである。これらの行詰りは、肝臓移植、人工肝臓、遺伝子治療ならびにその他の治療および商業利用のための単離肝臓細胞と非常に関係がある。

【0009】

上記した行為の成功は、初期胚肝臓中の肝細胞に高い割合で見出され、かつ成人肝臓中に門脈周辺で少数見出される肝始原細胞 (肝芽細胞) の使用を必要とする。そのような肝芽細胞を単離することが望ましいので、該肝芽細胞を成功裏に単離する方法を開発する必要性が生じていた。本発明者らは、マーカーを同定し、そして全ての年齢の動物の肝臓から肝芽細胞を単離するための方法を開発した。本発明の方法はラット由来の胚肝臓および新生児肝臓を用いて開発されたが、本発明の方法は全ての年齢の全ての動物種から肝芽細胞を単離するための体系的なアプローチを提供する。

10

【0010】

本発明の方法は、十分な数の多分化能肝臓細胞 (肝幹細胞) および分化の決定付けられた始原細胞 (肝細胞または胆管のいずれか一方となる1つだけの分化可能性を有する細胞) が存在する胚性肝臓を用いて開発された。ラットの肝実質細胞の分化の開始は、妊娠10日目までに生じる。この段階まで、実質細胞 (上皮細胞または類上皮細胞) は形態学的に均質であり、小さな細胞からなるが、そのような細胞は細胞質に乏しいので細胞質に対する核の割合が高く、そして未分化の淡い (pale) 核と僅かな細胞間接着を有している。この段階における肝実質細胞の多くは胆管細胞と肝細胞の2種類の分化の可能性があると考えられている。

20

【0011】

これらの細胞は、アルブミンおよび α -フェト蛋白質 (AFP) 等の発達の極初期に活性化されることが知られている幾つかの肝臓に特異的な機能を、通常は僅かに発現するが、グリコーゲン、尿素回路酵素または主要尿蛋白質 (MUP) 等の成人に特異的なマーカーは発現しない。胎児細胞の僅かな島だけが、胆管細胞に特異的なマーカーである $BD S_7$ に対して陽性であり、そして肝細胞に特異的なマーカーである $HE S_6$ に対して陽性なものはない (Germain et al., *Cancer Research*, Vol. 48, pp. 4909-4918 (1988) 参照)。乏しい細胞質を有し、しばしば卵形の核を有する肝芽細胞は、それぞれ単肝細胞または肝細胞のいずれか一方への単一の分化可能性を有する、分化の決定付けられた始原細胞および多分化能性肝幹細胞を含む数種類の細胞集団を包含する。

30

【0012】

妊娠15日目までに、肝芽細胞は、胆管または肝細胞系列のどちらか一方に沿って分化してゆく、分化の決定付けられた始原細胞を漸増して含むようになる。それらの細胞の成熟は形態学的変化 (大きさの増大、細胞質小器官および小胞の数の増加、不均質な核の形態および色素顆粒の増加) により示されるが、そのような変化は流動細胞測定法の変数により容易に区別され得る。「正面散乱」が細胞の大きさを測定する。「側面散乱」が、細胞器官の数に影響される細胞の複雑さまたは顆粒度 (granularity) を測定する。自己蛍光はリポフスチン類および成熟に伴い増加するその他の色素に依存している。

40

【0013】

形態学的変化に伴うのは、サイトケラチン (cytokeratins) のタイプ、種々の表面抗原および組織特異遺伝子の発現の、段階的または連続的な変化である。肝幹細胞を含む初期肝芽細胞はAFPを強く発現しアルブミンを弱く発現するが、肝細胞になると決まった分化の決定付けられた始原細胞はAFP発現をやめた細胞の索を形成し、高レベルのアルブミンを漸増して発現し、そしてグリコーゲンおよび尿素回路酵素等の肝細胞に特異的なマーカーを徐々に獲得する。胆管細胞になると決まった細胞は、表面上は同一の肝芽細胞から生じ、AFPの発現を保持し、アルブミン発現をやめ、そしてサイトケラチン19 (CK19) を獲得する。最初、真珠様細胞のストリングが肝臓の門に近接した大きな血管分枝の周りに存在する。それに続く日々をかけて同様の構造が肝臓中に出現する。 $BD S_7$

50

- 陽性の細胞が急速に大きくなり、そして発達齢の増加に伴いより多くなる。徐々に構造内に管腔を形成し、妊娠18日目までに、胆管状の構造が形態学的に同定可能となる。

【0014】

肝臓の発達および成熟に伴う肝臓に特異的な遺伝子の発現を理解するためには、直接肝芽細胞を研究する必要がある。しかし、肝芽細胞の研究は、肝芽細胞が胚、新生児および成人の肝臓の細胞タイプの中で小さな割合(10%以下)しか構成しておらず、且つその単離が困難であるために妨げられている。胚においては、肝臓は造肝細胞(肝細胞の形成)および造血(血液細胞の形成)の両方のための部位である。造血細胞は妊娠の12日目の間に卵黄嚢から肝臓内に移住する。続いて、造血、特に造赤血球が急速に、肝臓重量の50%あるいはそれ以上の造血細胞を含む胎児肝臓の、最も顕著な機能の一つとなる。新生児においては、肝細胞の過半数は造血細胞または成熟肝細胞(肝細胞または胆管細胞)のどちらか一方である。その結果、無傷肝臓中の実質の機能における連続的な変化を明らかにすることは困難であるが、それは変化する造血の影響によりデータが混乱させられるからである。例えば、妊娠18日目における実質の機能の移行的減少は、肝細胞における減少またはそれらの遺伝子の発現の減少に起因するものではないが、そのときに肝臓の多くが赤血球細胞からなり、造赤血球のピークであるために生じるものである。肝臓における造血は、誕生後にこの機能が成人における造血の場である骨髓に移行されるに連れて急速に減衰する。しかし、成人肝臓における肝芽細胞の単離には依然として問題があるが、それは成人肝臓が非常に小さな割合でしか肝細胞を含んでいないからである。

10

【0015】

肝芽細胞は肝臓細胞の全ての発達段階を生じることができ、従って、肝芽細胞は分化の初期から後期の段階までにおいて活性化および発現される遺伝子によりコードされた肝臓に特異的な機能を全ての範囲に亘って提供し、成熟肝細胞よりも優れた生長能力を有し、より優れた増殖能を有し、そして適当な遺伝子による形質移入に際してのより優れた能力(即ちより優れた遺伝子治療受入れ能力)を提供するので、(成熟肝臓細胞ではなく)肝芽細胞を単離することが望ましい。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

肝芽細胞の単離のために現在適用可能な方法は、造肝細胞前駆細胞から造血細胞を分離するには適さない、細胞の大きさおよび細胞の密度による分画法の使用を必要とするか、(肝細胞小集団も殺すことが証明されている)プロナーゼ分解等の特定の酵素による処理を生き抜く細胞の使用を必要とするか、あるいは対象細胞の濃縮が基層に対する接触性の違いまたは特定の培養培地における生長の違いに依存する培養における選択プロトコルの使用を必要とする。従って、現在適用可能な単離方法は非常に非効率的であると証明されている。さらに、実質細胞前駆細胞の同定は、実質細胞に特異的な機能によるアッセイに依存している。そして、肝芽細胞は多くの培養条件下に脱分化し、それにより、検出不能となるか、あるいは混入細胞集団の機能により対象細胞の機能が侵されてしまう程に非有効細胞(例えば間葉細胞)の割合が高くなる。加えて、解離した肝細胞はカルシウムおよび温度に依存し、糖蛋白質に仲介される過程により、急速に大きな凝集体を形成する。肝細胞を脱凝集させるためには、乱暴なピペティングおよびシリンジによる吸い上げを含む機械的方法を利用することが必要であるが、これらの方法は単細胞懸濁液を得るには通常不十分であり、かつ劇的に減少した細胞生存度という結果をもたらす。従って、胎児肝芽細胞を単離する方法であって、肝芽細胞を単細胞懸濁液として維持し、細胞凝集の結果をもたらさず、そして全ての年齢に対して適用可能な方法を開発することが望ましい。

30

40

【0017】

従って、本発明の目的は、肝芽細胞を単離する方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、単離肝芽細胞の提供である。本発明の別の目的は、単離肝芽細胞を肝臓機能不全を治療するために利用する方法を提供することである。本発明のさらに別の目的は、単離肝芽細胞を利用した人工肝臓を形成する方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、単離肝芽細胞、および肝細胞の細胞懸濁液に対するパンニング技法 (panning techniques) および細胞光度測定 (蛍光励起細胞分離捕集) を利用して肝芽細胞を単離する方法に関する。解離肝細胞がパンニングされ、そして蛍光励起細胞が抗体を利用して分離捕集されて、混入細胞タイプの数的大幅に減少させる。混入細胞タイプは、例えば、胚肝臓では造血細胞であり、そして成人では成熟肝細胞である。パンニング皿に接着しない細胞が混入細胞タイプに対する複数の抗体を用いて陰性に (negatively) 分離捕集されるが、これにより未成熟肝細胞タイプに非常に富んだ細胞集団となる。次に、多変数蛍光励起細胞分離捕集により、細胞は未成熟肝細胞タイプの別々の亜分類に分けられる。さら

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は、単離肝芽細胞、およびパンニング技法および蛍光励起細胞分離捕集を利用して解離した肝細胞から肝芽細胞を単離する方法に関する。本発明の単離肝芽細胞は、肝臓機能不全を治療すること、人工肝臓を製造すること、肝機能の研究、遺伝子治療、薬剤検定およびワクチン製造に使用されることができる。

【0020】

肝臓は酵素的分解により解離させられ、肝芽細胞に不利益に影響するプロナーゼのような酵素を破棄し、次いで、EGTAのようなキレート剤を含有し、冷却されている溶液中に維持され、この結果、単細胞として維持され得る細胞となる。解離された肝細胞は、次に、混入細胞タイプ (胚肝臓および新生児肝臓では、赤血球、内皮細胞およびその他の肝葉細胞であり、成人肝臓では、成熟肝細胞、胆管細胞内皮細胞およびその他の肝葉細胞である) の数を大幅に減少させるために抗体と共にパンニングされる。パンニングだけであると素早くはあるが十分ではなく、高度に純粋な細胞集団を産しない。しかし、これは非肝芽細胞の数を素早く減少させるために用いられることができる。パンニング皿に接着しない細胞は、次いで、蛍光励起細胞分離捕集により分別されるが、この技法は非常に高い正確性および効率を備えている。素早いパンニング方法論と蛍光励起細胞分離捕集の正確さは、良好な生存度を有する高度に純化された細胞集団という結果をもたらす。

20

30

【0021】

胚肝臓および新生児肝臓において、パンニングプロトコルにより減少する混入細胞タイプは、赤血球系細胞、骨髄系細胞および他の造血細胞タイプおよび内皮細胞 (肝葉細胞タイプ) である。パンニング工程により細胞集団は未成熟細胞タイプに富むものとなる。成人肝臓においては、混入細胞タイプは成熟肝細胞、胆管細胞、内皮細胞および幾つかの造血細胞集団である。

【0022】

パンニングされた細胞は、また、肝前駆細胞集団の別々のさらに細かい分類を区別する種々のマーカーにより分離捕集される。同定されたマーカーは、(a) 蛍光励起細胞分離捕集における側面散乱により測定される顆粒化度の程度 (より未成熟な細胞集団はより無顆粒状であり、顆粒化度の上昇は成熟度の上昇と相関する)、(b) 自己蛍光の程度 (自己蛍光の上昇は成熟度の上昇と相関する)、および/または (c) 肝細胞マーカーの発現 (例えば、モノクローナル抗体 374.3 により検出される、門脈域介在部の細胞のマーカー OC.3) 等である。(骨髄系細胞および内皮細胞を認識する) モノクローナル抗体 OX-43 および/または OX-44 により認識される造血細胞または内皮細胞の抗原を発現せず、かつ赤血球抗原に対するモノクローナル抗体により認識される抗原を発現しない肝臓細胞は、本発明の肝芽細胞を包含している。本発明の肝芽細胞は未成熟肝細胞の下記の3つの分類を包含している。

40

【0023】

(1) より顆粒状の細胞、OC.3⁺であり、胆管前駆細胞に分化が決定付けられてい

50

る。また、これらの細胞は、AFP⁺、アルブミン⁺かつCK19⁺である。

(2)より顆粒状の細胞、OC.3⁻であり、肝細胞前駆細胞に分化が決定付けられている。また、これらの細胞は、AFP⁺、アルブミン⁺⁺⁺かつCK19⁻である。

(3)無顆粒状の細胞、OC.3⁻であり、非常に未成熟な肝臓の前駆細胞である。また、これらの細胞は、AFP⁺⁺⁺、アルブミン⁺かつCK19⁻である。

【0024】

本発明はさらに、本発明の方法により単離された肝芽細胞の使用をも意図している。本発明の単離肝芽細胞は、肝臓機能不全を治療するために使用されることができる。例えば、肝芽細胞は、肝臓または肝臓以外の部位等の体内に注入されることができる。非常に費用が掛かりかつ危険な大手術である全肝移植は、門脈を介して肝臓内に入れるか、あるいは脾臓等の肝臓以外の部位内に入れるか、それらのどちらかにより肝芽細胞を生体内に導入する小手術に取って代わられることができる。また、肝芽細胞は人工肝臓を製造するためのバイオリクターまたは培養装置において使用されることができる。さらに、肝芽細胞は、遺伝子治療、薬剤検定、ワクチン製造ならびに、種々の成熟度の肝細胞を必要とする全ての研究、商業および治療目的において使用されることができる。

10

【実施例】

【0025】

実施例 I 妊娠の持続期間が既知のフィッシャー344ラットをハーラン(Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN.)から取得し、そして標準ラット食餌および12時間昼サイクルで、本学(Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)の飼育施設にて維持した。慣習通り、妊娠の最初の日を妊娠0日目とした。動物の使用は実験動物の飼育と使用に関するNIHの指針に従って行い、本学の動物の飼育および使用に関する委員会により承認された。

20

【0026】

胎児肝細胞を単離するために、妊娠14日目のラットをエーテルにて安楽死させ、胚を無傷で除去し、CA⁺²を含有せず、0.04%デオキシリボヌクレアーゼ(DNAse)、0.8mM MgCl₂および20mM HEPESを含有した氷冷ハンクス溶液(Hank's Balanced Salt Solution, pH 7.3; HBSS)内に入れた。次いで、肝臓を胎児から切り出して新鮮な氷冷HBSS内に入れた。全ての組織を収集し、非肝臓組織を除去した後、HBSS-5mM EGTAを添加して最終EGTA濃度を1mMとした。肝臓をピペットにより50ml容円錐形遠心管に移し、穏やかに6~8回磨砕して組織を部分的に脱凝集させ、その後、4、400gにて5分間の遠心に供した。今後の遠心も全てこの条件にて行った。上澄みおよび細胞のペレットを除去し、そして組織を50mlの1mM CaCl₂含有HBSS内の0.6%コラゲナーゼDに再懸濁させた。穏やかに磨砕した後、エレンマイヤーフラスコ内で37にて15分間攪拌した。分散した細胞をプールし、1mM EGTA含有HBSSに懸濁し、そして46μm組織収集器(Bellico Glass, Inc., Vineland, NY)を通して濾過した。細胞懸濁液を遠心し、そして、MEMアミノ酸、MEMビタミン、MEM非必須アミノ酸、インシュリン(10μl/ml)、鉄飽和トランスフェリン(10μl/ml)、遊離脂肪酸(7.6mEq/l、チェスベフら(Chessbeuf et al., 1984)に記載の通り、Nu-Chek-Prep, Elvsiian, MN)を添加し、さらに微量成分として、アルブミン(0.1%画分V、脂肪酸含有せず、Miles Inc., Kankakee, IL)、ミオイノシトール(0.5mM)およびゲンタマイシン(10μg/ml、Gibco BRL, Grand Island, NY)を補給したHBSS(HBSS-MEM)に、細胞を再懸濁した。細胞の数および生存度を血球計算板およびトリパンブルーの排出により測定した。

30

40

【0027】

赤血球を除去するために、ウサギ抗ラットRBC IgG(Rockland Inc., Gilbertsville, PA)を用いるウソキとサト(Wysocki and Sato, 1978)の方法に従いパンニング皿を調製した。9mMの0.05Mトリス(pH 9.5)で希釈した抗体(0.5mg/皿)を100mm²微生物学用ポリスチレンペトリ皿(Falcon, Lincoln Park, NJ)上に注いだ。皿をぐるぐる回して表面を均一に被覆し、室温で40分間インキュベーションした。使

50

用に先立って、被覆した皿をPBSで4回、および0.1%BSA含有HBSSで1回、洗淨した。

【0028】

3 × 10⁷までの細胞を含有する細胞懸濁液を3mlに分け、これをウサギの抗ラットRBC IgGで被覆した皿に入れて4で10分間インキュベーションした。接着しなかった細胞を吸い取って除去し、そしてHBSS - 0.1%BSA - 0.2mM EGTAで3回、皿を洗淨した後、遠心に供した。細胞のペレットをHBSS - MEMに再懸濁し、RBCパンニングを繰り返した。2回目のRBCパンニングの後、細胞の数および生存度を再度測定した。

【0029】

RBCパンニングの後再収集した細胞を、次に、マウスのモノクローナル抗体OX-43 (1/200 = 15 μg/ml、MCA276、Bioproducts for Science, Indianapolis, IN) およびモノクローナル抗体374.3 (1/500 ~ 1/750、ファリスおよびヒクソン (R. Faris and D. Hixon, Brown University, Providence, In) からの贈り物) と共に、同時に4で40分間インキュベーションすることにより懸濁液内で標識した。OX-43は、マクロファージおよび赤血球細胞の亜集団である内皮細胞上の抗原を認識し(Barclay, *Immunology*, Vol. 42, pp. 593-600 (1981) およびRobinson et al., *Immunology*, Vol. 57, pp. 231-237 (1986) 参照)、そして374.3は胆管細胞および造血細胞である、門脈域介在部の卵形細胞を認識する(Hixon et al., *Pathology: Liver Carcinogenesis*, pp. 65-77 (1990) 参照)。第二の抗体は、長鎖 (heavy chain) に特異的なPE結合抗マウスIgG (Southern Biotechnology Inc., AL) および長鎖に特異的なFITC結合抗マウスIgM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) であった。陰性対照は、標識を有しない細胞およびマウスイソタイプ対照の標識を有する細胞を包含していた。

【0030】

分離捕集前後の細胞は、4でHBSS内に維持した。抗体標識の完了後、最終濃度10 μg/mlのプロピオジウムイオジドをそれぞれの試料の管に添加した。出力60mW および100 μmのノズルを備え、4Wアルゴンレーザーを用いた機械 (Becton Dickinson FACSTAR^{PLUS}, San Jose, CA) にて蛍光励起細胞分離捕集を行った。488nm励起での蛍光放出は、FITCに関しては530/30nmバンド通過フィルターを通過した後、そしてPEに関しては583/42nmバンド通過フィルターを通過した後に収集した。蛍光測定は、FL1 (FITC) 対FL2 (PE) の2変数プロットに対する対数増幅を用いて行った。蛍光が陰性対照細胞の95%を越えた場合に、細胞が陽性であるとした。

【0031】

細胞の物理的性質の測定のために、FACSTAR^{PLUS}変数をFSCゲイン8 (FSC gain 8) およびSSCゲイン8とした。これらの設定は、この尺度で全ての細胞を視覚化させることを可能にした。HBSSをシース (sheath) 液として利用した。分析のために、少なくとも10,000の事象を測定した。リスト形式のデータを獲得し、そしてライシスII (LysisII) ソフトウェアを用いて分析した。死んだ細胞は、未標識細胞に対するプロピジウムイオジド蛍光ヒストグラムを用いて排除した。

【0032】

1つの抗体に対する陽性さ (positivity) の測定のために、蛍光対側面散乱のドットプロットを使用した。FL1対FL2の密度プロットを、両方の抗体の発現に関して選択集団に対して使用した。非方形排除 (non-rectangular gating) および対象の選択集団に対する他変数排除の使用のために、分離捕集濃縮モジュールを利用した。

【0033】

全ての集団の妊娠14日目のものに由来するショートテッド細胞 (shorted cells) を、MEMを添加した、血清を含有せずホルモン既知の培地内に入れたが、この培地には次の成分が添加されていた。即ち、インシュリン (10 μU/ml)、EGF (0.01 μg/ml、Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、成長ホルモン (10 μU/ml)、プロラク

10

20

30

40

50

チン(20 mU/ml)、トリオドチロニン(10^{-7} M)、デキサメタゾン(10^{-7} M)、鉄飽和トランスフェリン(10 µg/ml)、フォリニン酸(10^{-8} M、Gibco BRL, Grand Island, NY)、遊離脂肪酸混合物(7.6 meq/L、チェスベフら(Chessbeuf et al., 1984)に記載の通り、Nu-Chek-Prep, Elvsiian, MN)、プトレッシン(0.02 µg/ml)、ヒポキサンチン(0.24 µg/ml)、チミジン(0.07 µl/ml)、ウシアルブミン(0.1%画分V、脂肪酸含有せず、Miles Inc., Kankakee, IL)であり、これに微量成分として、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0000025 mg/l)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.8 mg/l)、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0000024 mg/l)、 $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0012 mg/l)、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.000012 mg/l)、 NH_4VO_3 (0.000058 mg/l)、 H_2SeO_3 (0.00039 mg/l)を添加し、さらにヘペス(Hepes、31 mM)およびゲンタマイシン(10 µg/ml、Gibco BRL, Grand Island, NY)を添加した。試薬は特に断らない限り、シグマ(Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo)から供給された。微量成分混合物は、レミスカ博士(Dr. I. Lemishka, Princeton University, NJ)からの贈り物であった。

10

【0034】

培養皿および種々の細胞懸濁液のサイトスピン(cytospins)を氷冷エタノールまたはアセトンで固定した。室温下に30分間かけて1%BSA含有PBSでブロックした後、固定細胞を下記の第一の抗体を用いた間接免疫蛍光により研究した。使用した抗体は、ポリクローナルウサギ抗ラットアルブミン(United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH)、ウサギ抗マウスAFP抗血清(ICN Biomedical, Inc., Costa Mesa, CA)、モノクローナルマウス抗ヒトサイトケラチン19(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)、ポリクローナルウサギ抗ヒトIGFII受容体(ゼチ博士(Dr. Micheal Czech, University of Worcester, MA)の贈り物)、マウスモノクローナル抗ラット-Thy-1(OX-7, Bioproducts for Science, Indianapolis, IN)、モノクローナルマウス抗デスマイン(desmin)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)および生後の肝細胞および幾つかの胎児肝実質細胞を同定するモノクローナルマウス抗ラット抗体である258.26(ファリスおよびヒクソン両博士(Drs. R. Faris and D. Hixon, Brown University, Providence, In)からの贈り物)であった。第二の抗体は、第一の抗体に対応する、種特異的ローダミン結合抗体を包含していた。陰性対照は、マウスまたはラットのIgGで染色した細胞もしくはマウスのイソタイプ対照からなっていた。単離直後の成人肝細胞をアルブミン染色の対照として使用した。ルテンバーグらの文献(Rutenberg et al., J. Hist. Cyt., Vol. 17, pp. 517-526, 1969)に記載の方法を用いたエタノール固定細胞に対する免疫化学により、ガンマ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)をアッセイした。

20

30

【0035】

特定のmRNAの存在に関してノーザンブロット分析を行うために、コンチェンスキらの文献(Chomczynski et al., Anal. Biochem., Vol. 162, pp. 156-159, 1987)に記載の方法通り、グアニジウムイソチオシアネート法を用いて分離捕集細胞から全てのRNAを抽出した。RNA試料を、1%アガロースホルムアルデヒドゲルを通した電気泳動法により3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸緩衝液中に再度溶解させた。次いで、RNAをジーンスクリーン(Gene Screen, New England Nuclear, Boston, MA)に移し、フィルターを予備ハイブリダイゼーションさせ、そして適切なプローブとハイブリダイゼーションさせた。特定のmRNAと相補的なcDNAクローンを、フェインバーグらの文献(Feinberg et al., Anal. Biochem., Vol. 137, pp. 266-267, 1984)に記載の通り、³²P dCTPを用いたプライマー伸長により放射標識した。ハイブリダイゼーションに用いたcDNAは、ラットアルブミン(ゼーン博士(Dr. Zern, Jefferson University, Philadelphia, PA)の贈り物)、およびマウス-フェト蛋白質(Dr. Tighlman, Princeton, NJ)、GGT(マンソン博士(Dr. Manson, MRC Medical Research Council, Surrey, UK)から得た)ならびにPG19であった。オートラジオグラムは線密度測定器(Model 920: Manufacturer's Cambridge Instrument)を用いてスキャンした。それぞれの遺伝子に

40

50

関するデータは慣用の遺伝子18Sのデータ(J. Darnell, Rockefeller University, New York, NY)に対して正規化した。

【0036】

ウエスタンブロット分析を行うために、種々の分離捕集細胞からの全ての蛋白質試料を10%ポリアクリルアミドミニゲルに供した。スロット当たり100,000細胞の等しい細胞数とすることで負荷を標準化した。電気泳動およびそれに引き続くニトロセルロース膜(Scheicher and Schuell, Keene, NH)への電氣的プロットングを行った。4にて2%ドライミルク溶液内でプロットを一晩でブロックし、ブロック溶液内で1:50に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)と共に1時間インキュベーションした後、ブロック溶液内で1:800に希釈したウサギ抗ラットアルブミン抗血清を用い、室温下に1時間かけてアルブミンに関するアッセイを行った。検出は、プロットをECL-ケミルミネッセンスキット試薬(ECL-chemiluminescence kit reagents, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)と共に1分間インキュベーションし、続いてオートラジオグラフを撮影して行った。

10

【0037】

レイドの文献(Reid, Methods in Molecular Biology, The human Press, Inc., Vol. 5, pp. 237-276, 1990)に記載の通り、ラット尾部の鍵から抽出したタイプIコラーゲンを用いて48ウエルプレートが被覆した。50,000~100,000細胞/cm²の間の密度の分離捕集細胞をウエル毎に入れた。接着させるために一晩おいた後、接着していない細胞を有する培地を穏やかに除去し、新鮮な培地で置換した。24時間毎に完全に培地を交換した。細胞を、37°Cで、5%二酸化炭素を含有する、完全に飽和した湿度を有する空気中で培養し、毎日観察した。4日間の培養後、細胞を氷冷エタノールで固定し、そして後述の通り、アルブミン、AFP、CK19およびIGF1I受容体に対しては免疫蛍光により、かつGGTに対しては免疫化学により、その場で染色した。

20

【0038】

妊娠14日目の胚由来肝臓をEGTA-コラーゲナーゼ分解により単離し、単細胞懸濁液と無視できる数の細胞凝集を得た。細胞の生存度は、トリパンプルーの排出により測定して95%より大きかった。細胞収量は、肝臓当たり $2.62 \pm 0.31 \times 10^6$ 細胞であった。取得した細胞懸濁液を、ウサギの抗ラットRBC IgG被覆したポリスチレン皿を用いた免疫接着(「パンニング」)の2つの工程に供した。2つのパンニング工程の完了後の細胞の回収は、51%(±8%)であったが、異なる抗体ロットにより変化した。

30

【0039】

RBC-パンニング後に回収された細胞を、2つの抗体の混合物を用いて懸濁液中で染色した。用いた抗体は、「門脈域介在部の卵形細胞」に対して生起された抗体(モノクローナル抗体374.3)およびラットにおいて上皮細胞ならびに幾つかの赤血球細胞および骨髓細胞を認識することが知られている商業的に入手可能な抗体(モノクローナル抗体OX-43)であった適切なFITCおよびPE標識抗体と共にインキュベーションした後、細胞をその蛍光パターンに関して分析した。図1、パネルAに示す如く、両方の抗体に関する蛍光強度を互いに対してプロットしたときに、R1~R5として示した5つの異なる集団が観察された。それぞれの集団毎にその割合に若干の差はあるが、5つの集団を形成する細胞の分布は極めて再現性が高かった。この小さな差異は、RBCパンニング後の細胞の回収割合の変動により説明することができる。

40

【0040】

免疫蛍光による分離捕集細胞の最初の分析は、OX-43陽性細胞集団の1つ(R2)においてアルブミンおよびAFPに対して陽性な細胞の存在を明らかにした。より大きくかつより複雑なこれらの細胞は、このゲート(gate: 分別基準)内に細胞の約5~10%を含んでいた。しかし、分離捕集直後の細胞をエピ蛍光顕微鏡下で見ると、より大きなこれらの細胞はOX-43に対して陰性であるように思われた(PE未標識)。肝臓内の実質細胞は有意な程度の自己蛍光を有しており、この自己蛍光は、肝臓の成熟に連れて、FAC

50

Sでの側面散乱により測定された細胞の複雑性と平行して増大した。従って、幾つかの実質細胞がOX-43陽性細胞の領域に出現するが抗原を発現しないという現象によるものと仮定することができる。この仮説を確かめるために、OX-43に対する陽性を、FL2スケールで測定した(図1、パネルB)如く、側面散乱(細胞の顆粒度)対PE蛍光について正確に測定し、そしてOX-43陽性細胞および陰性細胞を分離捕集して特性付けた。分離捕集の正確性を測定するために、同様の現在の設定を用いて、分離捕集細胞から再度分離捕集後獲得物を得た。典型的な分離捕集後の純度(即ち、再度の分離捕集後に分析したときに、同一の領域に出現した少数化した集団(shorted population)からの細胞の割合)は>90%であった。

【0041】

10

OX-43陽性および陰性の両方のゲートからの分離捕集細胞を、ウエスタンブロットおよび間接免疫蛍光による肝臓に特異的な遺伝子の発現に関してアッセイした。図2のパネルBに示したとおり、OX-43陰性細胞と比較して、ウエスタンブロットによる検出で、OX-43陽性細胞画分内に最小限の量のアルブミンが存在した。分離捕集されたOX-43陽性細胞のサイトスピンに対する間接免疫蛍光ではAFP陽性細胞は示されなかったが、これは30%のOX-43陰性細胞が胎児肝臓マーカーを発現していたのと同対照的である。妊娠14日目においては全ての胎児肝実質細胞がOX-43陰性であると結論された。従って、「より明確な」ゲートを達成するために、OX-43陽性および陰性細胞がSSC対FL2プロットにより分けられ、そして別々に染色された。

【0042】

20

OX-43陽性細胞を電氣的に閉め出して、残りの細胞をFL1対FL2プロット上で見てみると、閉め出されていない細胞懸濁液におけるR3~R5に相当する3つの別々の集団を容易に検出された。R3内の細胞は全て374.3陽性であり、R4内の細胞の30%がそのマーカーに対して陽性であった。R5細胞はOC.3を発現しなかった。種々の肝臓に特異的な遺伝子およびその他の遺伝子の発現をR3~5から分離捕集された細胞について研究した。その結果を下記表1にまとめて示す。

【0043】

【表1】

表 1

30

免疫蛍光および組織化学による分離捕集細胞の特性付け

	R1	R2	R3	R4	R5
アルブミン	陰性	陰性	1%陽性	75~80%陽性	陰性
AFP	陰性	陰性	2%陽性	70%陽性	陰性
GGT	陰性	陰性	1%陽性	75%	陰性
IGF-II受容体	20%	1%	2%	85%	陰性
CK19	陰性	陰性	2~3%	陰性	陰性
デスミン	<1%+	1~2%+++	陰性	陰性	<1%+
258.26	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Thy-1	2%	10%	75%	10%	5%

40

50

【0044】

R3細胞の約2～3%（未分別細胞全体の0.2%未満）が、アルブミンおよびAFPに関して強く染色された。また、これらは胆管系列のマーカーであるGGTおよびCK19も発現した。しかし細胞の過半数は小さい芽細胞様細胞に見え、肝臓に特異的な遺伝子を発現していなかったが、Thy-1およびセログリシン等の古典的造血細胞マーカーを発現していた（表1および図の3と4参照）。肝実質細胞の多くは、R4ゲート内に認められた（表1および図3参照）。かなり多くの細胞が、全て胎児肝実質細胞のマーカーであるアルブミン、AFPおよびGGTを発現していた。このゲート内には造血細胞および脂肪貯蔵細胞のマーカーは検出されなかった。R5として表された細胞集団は、主として2つ細胞タイプを含む不均質な集団である（図4参照）が、その細胞タイプは（1）形態学的に正赤芽球のように思われる細胞と（2）実質細胞肝臓遺伝子（parenchymal liver genes）を発現しない簡素で小さな細胞である。これらの2つの細胞タイプ間の比率は幾らか変動し、RBCパニングの効率に依存していた。

10

【0045】

全てのOX-43陰性細胞を閉め出した場合には、FL1/FL2プロット上に2つの別々の集団が観察される。期待通り、これらの細胞内には実質細胞肝臓マーカーは検出されなかった。僅かなR2細胞が、脂肪貯蔵細胞内に通常発現される中位のフィラメントであるデスミンに対する抗体により染色された。形態学的にはR2細胞の多くは初期赤血球前駆体であるように思われた（図4参照）が、それらの細胞の10%がThy-1を発現した。過半数の細胞は小さく芽細胞様であり、そして試験したどのマーカーも発現していなかった。その他の、このゲート内の細胞の20%は、薄い細胞質を有するより大きな細胞であり、IGF-IIに対する受容体を発現していた。R1からの非常に僅かな細胞がThy-1に関して染色された。

20

【0046】

5つの集団全てから分離捕集した細胞を4日間培養して生体外での分化可能性を測定した。既述のような条件下に高密度で蒔いたときに、R4細胞は非常に僅かの分散した間質細胞に取り囲まれた上皮細胞の集塊を作った（図5Aおよび下記表2参照）。

【0047】

【表2】

表 2

30

培養4日後におけるR4細胞の特性付け

マーカー	上皮細胞	間質細胞
アルブミン	+	陰性
AFP	±	陰性
GGT	++	陰性
CK19	+(30%)	陰性
258.26	陰性	陰性
IGF-II受容体	+(核周縁染色)	+(核周縁染色)

40

【0048】

細胞分裂は、培養体の上皮および間質成分の双方において明白に起こった。培養2日目

50

、プロモデオキシウリジン (BrdU) を含有する培地と共に1時間インキュベーションした後に、上皮細胞の25%はBrdUの取り込みを示した。RBCパンニングを行ったが分離捕集は行わなかった妊娠14日目の細胞を同様の条件下に置いたところ、これらの細胞は少なくとも10日間生存した(データ示さず)。しかし、分離捕集したR4細胞の集塊は急速に変敗した。上皮細胞は、血清の存在下に成人肝細胞の初期培養中に見られると同様に、古典的な多角形状を失って伸展した。さらに、アルブミン、AFPおよびGGTに関してその場で染色したときに、集塊したR4細胞はこれらの肝臓に特異的な遺伝子の緩やかな減衰を示したが、RBCパンニングした妊娠14日目の細胞は同様の条件下に遺伝子発現を維持した(データ示さず)。IGF-Ⅰ受容体は残り、そして集塊した上皮細胞および間質細胞のゴルジ体内に検出された。集塊したR4細胞の約30%が、胆管細胞内に存在し成人肝細胞内には存在しないサイトケラチンであるCK19に関して染色されることを示した。

10

【0049】

その他の4つの集団全てからの細胞を同様の条件下に置いたときには、光を散乱させる繊維芽細胞様細胞(しかし上皮細胞コロニーではない)が僅かだけ観察された。R3細胞の肝実質的な性質にも関わらず、類似の培養条件下ではこれらの細胞由来の上皮細胞コロニーを得ることができなかった。これは、このゲート内における上皮細胞の低い密度のためである可能性がある。これらの細胞は懸濁液中で凝集して約48時間生存し、そして死んだ。タイプⅠまたはタイプⅠⅠコラーゲン、フィブロネクチンあるいはラミニンを、単独で、または組合わせて用いて皿を被覆することは、これらの細胞の接着または生存を改善しなかった(データ示さず)。

20

【0050】

実施例 ⅠⅠ 妊娠の持続期間が既知のフィッシャー344ラットをハーラン(Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN.)から取得し、そして標準ラット食餌および12時間昼サイクルで、本学(Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)の飼育施設にて維持した。慣習通り、妊娠の最初の日を妊娠0日目とした。動物の使用は実験動物の飼育と使用に関するNIHの指針に従って行い、本学の動物の飼育および使用に関する委員会により承認された。

【0051】

妊娠15日目の妊娠ラットをエーテルにて安楽死させ、胚を調達した。次いで、胎児から肝臓を切り出して計量し、 Ca^{+2} を含有せず、0.8 mM $MgCl_2$ および20 mM HEPESを含有した氷冷ハンクス溶液(Hank's Balanced Salt Solution, pH7.3; HBSS)内に入れ、そして室温下に1分間、穏やかに攪拌した。非肝臓組織を除去した後、肝臓を穏やかに磨砕し、次いで、1 mM $CaCl_2$ 含有HBSS中の0.6%タイプⅠⅤコラゲナーゼ(Sigma Chemical Co., Lot 11H6830, St. Louis, MO)、および0.06% DNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)と共に、エーレンマイヤーフラスコ内で37にて10~15分間攪拌した。5分間放置した後、組織断片を1gで沈殿させた。上澄みを回収し、新鮮なコラゲナーゼ溶液を添加した。分散した細胞をプールし、5 mM EGTA含有HBSSに懸濁し、そして46 μm 組織収集器(Bellico Glass, Inc., Vineland, NY)を通して濾過した。得られた細胞懸濁液を4にて5分間、450gにて遠心した。細胞ペレットを、0.2 mM EGTAおよび0.5% BSAを含有したHBSS(HBSS-EGTA-0.5% BSA)に再懸濁し、そしてコールター計測器(Coulter Counter, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL)を用いて細胞数を評価した。0.04%トリプブルーの排出により細胞生存度をアッセイし、そして懸濁液の一定部分を風袋用マイクロ遠心管に入れ、450gにて5分間遠心した。

30

40

【0052】

造血細胞および内皮細胞を抗体被覆したポリスチレン皿に免疫接着させるために、ウイソキとサト(Wysocki and Sato)の方法に従いパンニング皿を調製した。採用した抗体は、ウサギ抗ラットRBC IgG(Inter-cell Technologies, Inc., Hopewell, NJ)およびマウスの全IgG分子に対するヤギIgG(M-3014, Sigma, St. Louis, MO)を包含してい

50

た。10 mlの0.05 M トリス (pH 9.5 で希釈した抗体 (0.5 mg / 皿) を 100 m² 微生物学用ポリスチレンベトリ皿に注ぎ入れてその表面を均等に被覆し、室温下に40分間インキュベーションした。使用に先だって被覆した皿をPBSで4回洗浄し、そして0.1% BSA含有HBSSで1回洗浄した。

【0053】

3 × 10⁷ までの細胞を含有する細胞懸濁液を3 mlに分け、これをウサギの抗ラットRBC IgGで被覆した皿に入れて4で10分間インキュベーションした。接着しなかった細胞を含有する上澄みを穏やかに吸い取って除去し、そして皿を傾けたりぐるぐる回したりしながら7 mlのHBSS - EGTA - 0.1% BSAで3回洗浄した後、4で5分間、450 gの遠心に供した。2つの皿からの細胞をプールし、そしてウサギ抗ラットRBC IgGで被覆した新鮮な皿を用いて再度パニングした。上記と同様にして非接着細胞を除去して、1 × 10⁷ / mlの濃度となるようにHBSS - EGTA - 0.1% BSAを用いて再懸濁した。次いで、濃縮された肝芽細胞をマウスモノクローナル抗体OX-43 (15 μg/ml, MCA276, Serotec, Indianapolis, IN) およびモノクローナル抗体OX-44 (18 μg/ml, MCA371, Serotec, Indianapolis, IN) と共に、同時に4で40分間インキュベーションした。OX-43はマクロファージ、内皮細胞および赤血球細胞上の抗原を認識し、そしてOX-44は、全てのラット骨髄細胞および末梢リンパ細胞上に存在し且つヒト白血球抗原CD37と関係がある膜-糖蛋白質であるCD53を認識する。洗浄して過剰な抗体を除去した後、ヤギ抗マウス全IgG抗体で被覆した皿内で4にて10分間、細胞をパニングし、そして上記の通りにして非接着細胞を除去した。

10

20

【0054】

種々の細胞懸濁液のサイトスピンを氷冷エタノールまたはアルコール、アセトンおよびカルボワックス1540 (Fix-Rite, Richard-Allan Medical Industries, Richland, MI) を用いて固定した。反応をブロックした後、 α -ガラクトシダーゼ (BioGenex, San Roman, CA) と共にウサギ抗のラットアルブミンIgG (USB Corp., Cleveland, OH) またはウサギ抗マウスAFP抗血清 (ICN ImmunoBiologicals, Lisle, IL) を第一の抗体として用いたビオチン/ストレプトアビジン法または間接免疫蛍光により、固定した細胞を免疫染色した。陰性対照は、第一の抗体を除いたものを用いて染色した細胞からなっていた。アルブミン染色のための陽性対照には単離直後の成人肝細胞を充てた。

30

【0055】

ノーザンブロット分析を行うために、パニング前後の細胞およびパニング皿に接着した細胞からグアニジウムイソチオシアネート法を用いて全てのRNAを抽出した。RNA試料を、1%アガロースホルムアルデヒドゲルを通した電気泳動法により、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸緩衝液中に再度溶解させた。次いで、RNAを、予備ハイブリダイゼーションさせてあったジーンスクリーン (Gene Screen, New England Nuclear, Boston, MA) に移した後、適切なプローブとハイブリダイゼーションさせた。特定のmRNAと相補的なcDNAクローンを、³²P dCTPを用いたプライマー伸長により放射標識した。使用したcDNAは、ラットアルブミン、マウスAFPおよびマウス18S (J. Daenell, Rockefeller University, NY) であった。オートラジオグラムは線密度測定器 (Model 920: Manufacturer's Cambridge Instrument) を用いてスキャンした。それぞれの遺伝子に関するデータは慣用の遺伝子18Sのデータに対して正規化した。

40

【0056】

妊娠15日目における造血細胞および内皮細胞のマーカーに関する分離捕集およびFACS分析を行うために、種々の段階の濃縮物の細胞懸濁液を、本学 (The Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) のFACS設備内で流動細胞計測法により分析した。細胞を1 × 10⁷ 細胞/mlとなるように再懸濁し、OX-43およびOX-44と共に、またはOX-43のみと、4で40分間インキュベーションした後、引き続き、FITCと結合した抗マウスIgGと4で40分間インキュベーションした。FITCと結合した抗マウスIgGによってだけ染色された細胞を陰性対照として供した。

50

【0057】

流動細胞計測法は15 mWの空冷アルゴンレーザーを備えた機械 (Becton-Dickinson FACSscan, San Jose, CA) にて行った。細胞の分離捕集は出力60 mWおよび100 μmのノズルを備え、4 Wアルゴンレーザーを用いた機械 (Becton Dickinson FACSTAR^{PLUS}, San Jose, CA) にて行った。双方の測定において、488 nm励起での蛍光放出を、FITCに関して、530/30 nmバンド通過フィルターを通過した後収集した。蛍光測定は対数増幅を用いて行った。蛍光が陰性対照細胞の95%を越えた場合に、細胞が陽性であるとした。

【0058】

細胞の物理的性質の測定のために、正面散乱 (FSC) に関しては、検出器値 (detect or value) を中範囲増幅したE-1とした。側面散乱 (SSC) に関しては、検出器値は1の増幅を有する中範囲であった。FACSTAR^{PLUS}変数の等量 (equivalent) はFSCゲイン4およびSSCゲイン8であった。これらの設定は、スケール上で全ての細胞を視覚化させることを可能にした。FSCおよびSSCによる閉め出しは、線形増幅を用い、両変数を256の任意の単位 (A.U.) に分割して行った。分析のために、少なくとも10,000の事象を測定した。リスト形式のデータを獲得し、そしてライシスII (Lysis II) ソフトウェアを用いて分析した。分離捕集前後の細胞は、HDM添加補給物に関して詳述した通り、インシュリン、トランスフェリン、遊離脂肪酸、微量成分、アルブミンおよびゲンタマイシンを補給したHBS S内にて、4 で維持した。

【0059】

次に、造血細胞および内皮細胞のマーカーの多変数流動細胞計測法を、門脈域介在部位の卵形細胞抗原OC.3に関して行った。単離した細胞を、OX-43およびOX-44 (マウスIgG)、ならびにモノクローナル抗体374.3 (マウスIgG、Hixson and Ferris, Brown University, Providence, RI) の組合せを用い、引き続いてFITCと結合したヤギ抗マウスIgG (長鎖特異性、So Biotech, Birmingham, AL) およびPEと結合したヤギ抗マウスIgM (長鎖特異性、So Biotech, Birmingham, AL) を用いて標識した。FITC結合抗マウスIgGおよびPE結合抗マウスIgMだけを用いて染色した細胞を陰性対照として供した。プローブの1つに対する蛍光の度合いおよび側面散乱による細胞の複雑性の測定 (細胞質小器官の度合い) の両方について、細胞を評価した。

【0060】

妊娠15日目の肝臓からの細胞をラット赤血球細胞抗体に対してパンニングし、外皮細胞に富む細胞懸濁液を、基本培地としてMEMを含有し、血清を含有せずホルモン既知の培地に蒔いた。この培地には下記の成分、即ち、インシュリン(10 μg/ml)、EGF(0.01 μg/ml、Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、生長ホルモン(10 μU/ml)、プロラクチン(20 mU/ml)、グルカゴン(10 μU/ml)、トリイオドチロニン(10⁻⁷ M)、デキサメタゾン(10⁻⁷ M)、鉄飽和トランスフェリン(10 μg/ml)、フォリン酸(10⁻⁸ M、Gibco BRL, Grand Island, NY)、遊離脂肪酸混合物(0.76 mg/ml、Chessbeuf et al., 1984) に記載の方法の変形、Nu-Chek-Prep, Elvian, MN)、プトレッシン(0.02 μg/ml)、ヒポキサンチン(0.24 μg/ml)、チミジン(0.07 μg/ml)、ウシアルブミン(0.1%画分V、脂肪酸含有せず、Miles Inc., Kankakee, IL) と、微量成分としてCuSO₄·5H₂O(0.0000025 mg/l)、FeSO₄·7H₂O(0.8 mg/l)、MnSO₄·7H₂O(0.0000024 mg/l)、(NH₄)₆Mo₂₄·H₂O(0.0012 mg/l)、NiCl₂·6H₂O(0.000012 mg/l)、NH₄VO₃(0.000058 mg/l)、H₂SeO₃(0.00039 mg/l)を添加し、さらにヘベス(Hepes、31 mM) およびゲンタマイシン(10 μg/ml、Gibco BRL, Grand Island, NY) を添加した。試薬は、特に断らない限り、シグマ(Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) から供給された。微量成分混合物は、レミスカ博士(Dr. I. Lemishka, Princeton University, NJ) からの贈り物であった。

【0061】

EHS腫瘍から抽出したタイプIVコラーゲンを用いて24ウエルプレートを被覆した

10

20

30

40

50

。パンニングされた細胞を、 1.25×10^4 および 2.5×10^4 細胞/cm² の間の密度でウエル毎に蒔き、4～5時間に亘って細胞がプレートに接着することを可能にした。その後、非接着細胞を含有する培地を穏やかに除去し、新鮮な培地で置き換えた。細胞を5%二酸化炭素を含有し、完全な飽和湿度を有する空地中で37℃にて培養し、5～16日の間、毎日観察した。48時間毎に完全に培地を交換した。

【0062】

培養開始後、種々の時点で、細胞を氷冷エタノールにて固定し、免疫化学またはアルブミンおよびAFPに関する免疫蛍光によりその場で染色した。

【0063】

妊娠15日目における肝臓の重量は 9.1 ± 1.3 mgであった。コラゲナーゼ処理は肝臓を完全に分解し、そして最小限の粒状のものだけが組織篩いによって排除された。この工程で得られた細胞の数は 1.07×10^7 /肝臓であり、解離した細胞の重量は、この器官の全重量の95%にあたる 8.6 ± 1.1 mg/肝臓であった。懸濁液はほぼ完全に単離細胞からなり、僅かに小さな凝集体があったが、この凝集体は、EGTAの不在および4℃以上の温度の下で、その大きさおよび数を増加させた。トリパンブルー排出による生存度は90%を越えていた。

【0064】

それぞれのパンニングの後、位相顕微鏡観察は接着細胞が赤血球細胞形態を呈することを示した。極僅かの細胞だけが、免疫化学法による測定でアルブミンに関して陽性であった。赤血球を除去するためにウサギ抗ラット赤血球細胞抗体で被覆した皿を用いてパンニングした後、および次いでOX43/OX44⁺細胞の数を減少させるためにヤギ抗マウス全分子IgG抗体で被覆した皿を用いてパンニングした後、非接着細胞はそれぞれ、分散直後の胎児肝臓(最初の懸濁)の細胞数の29±5%、および16±4%であった。パンニングは肝臓組織に対して、全ての胎児および誕生直後の年齢において成功したことが証明されたが、発達に伴う造血成分の変動が濃縮の度合いを相違させるという結果をもたらした(データ示さず)。また、RBCパンニング手法の効率は抗体のロットにより変動した。しかし、直接パンニングには貧弱な効率の抗体を用いて、懸濁液中で細胞を標識し、その後抗ウサギIgG被覆ペトリ皿を用いたパンニングが続く間接免疫接着は成功した。

【0065】

肝臓分散に続く位相顕微鏡観察では、優占細胞タイプは小さな赤色細胞であり、この細胞は初期赤血球細胞の形態と一致する形態を有していた。また、より大きな空胞化した細胞も存在した。免疫細胞化学は、この空胞化した細胞および数の少ないより小さな卵形細胞の大部分がアルブミンおよびAFPに対して強い陽性であることを示した(図7参照)。濃縮物の種々の段階におけるアルブミンおよびAFP陽性細胞の割合を下記表3に示す(表3および図6参照)。

【0066】

10

20

30

【表 3】

種々の濃縮段階における E 1 5 肝細胞懸濁液の特性

マーカー	最初の懸濁液中の陽性細胞の割合 (%)	RBCパンニング後の陽性細胞の割合 (%)	IgGパンニング後の陽性細胞の割合 (%)
アルブミン ¹	3.2 ± 1.3	9.5 ± 1.2	14.8 ± 3.6
α-フェト蛋白質	2.5 ± 0.7	9.8 ± 0.9	14.9 ± 2.5
モノクローナル抗体 OX-43 ²	76.6 ± 5.8	70.5 ± 6.1	ND
モノクローナル抗体 OX-43/44 ²	87.9 ± 2.5	80.4 ± 3.9	69.0 ± 10.0
最初の懸濁液から残っている細胞の割合 (%)	100	29 ± 5	16 ± 4

ND = 実施せず

¹: 第一の抗体を使用しなかったものを陰性対照とし、β-ガラクトシダーゼ (BioGenex, San Ramon, CA) を使用したピオチン/ストレプトアビジン法による免疫細胞化学による。

²: FACS分析による蛍光が陰性対照細胞の95%を越えた場合に、細胞が陽性であるとした。

【0067】

肝臓に特異的な遺伝子 (アルブミンおよび AFP) に関するノーザンブロット分析を、パンニング前後の細胞に対して行った。それを図 8 に示す。パンニング後の細胞は、AFP mRNA に関しては 5 倍まで、およびアルブミン mRNA に関しては 2 倍まで濃縮されていた。この知見は、パンニング手法および (成熟肝細胞とは反対に) 高濃度の肝芽細胞の成功の両方を示すものである。無視できるレベルのアルブミンおよび AFP の mRNA が、パンニング皿に接着した細胞内に認められた。

【0068】

造血細胞および内皮細胞を除去する効率を測定するために、種々の段階の濃縮物の細胞を、マクロファージ、内皮細胞および赤血球を認識する OX-43 の存在ならびに骨髓細胞および末梢リンパ細胞を認識する OX-44 の存在に関して、流動細胞計測法により分析した。その結果を図 6 および表 3 に示す。最初の細胞懸濁液における OX-43/OX-44 に対して陽性な細胞の割合は、87.9 ± 2.5% であった。抗ラット RBC IgG と抗マウス全 IgG 抗体とを組み合わせたパンニング手法は細胞の 84% を除去した。非

接着性細胞の $69 \pm 10.0\%$ が依然として OX - 43 / 44 マーカーに対して陽性であったが、肝芽細胞の割合は劇的に (5 倍に) 高められた。付加的なパンニングは OX - 43 / 44⁺ 細胞集団をさらに減少させ得るが、すでにパンニングにより、OX - 43 / 44⁺ 細胞を排除する過程を完了させるための F A C 分離捕集を可能にするには十分な位に細胞の数が減少させられていることが判明した。

【0069】

流動細胞計測法により測定したところ、胎児肝細胞は、細胞の大きさの測定である F S C に関して、そして細胞質の複雑さの測定である S S C に関して、不均質な集団から構成されていた。細胞学的には、細胞の大きさは広大な範囲に亘っている (コーター計測器による測定で $5 \sim 15 \mu$ 、データ示さず) が、細胞の大きさが肝細胞を実質細胞前駆細胞から分けることに有用であるとは認められなかった。むしろ、集団同士は、S S C を用いることにより最も良く分離された。顆粒状細胞対無顆粒状細胞の定義は、蛍光対側面散乱の 2 変数プロットを用いた側面散乱に関する線形尺度に基づき決定した。集団のプロフィールに基づいて、通常は、 50 A.U. を無顆粒状細胞として顆粒状細胞と区別した。

10

【0070】

S S C 対蛍光を用いることで、胎児肝細胞を 3 つの集団に分けることができる。それは、内皮細胞および / または骨髄細胞のマーカーに対して陽性な無顆粒状細胞 (R 1 集団) ならびに OX 43 / OX 44 マーカーに対して陰性で無顆粒状の細胞 (R 2) および顆粒状の細胞 (R 3) である (図 9 参照)。陽性と陰性との間の分画は、顆粒状細胞のより強い自己蛍光のために、より顆粒状の集団においてはより無顆粒状の集団よりも高かった。分離捕集された F A C S 集団の分析は、それぞれ、R 1 集団内の細胞の 1% 未満および R 2 集団内の細胞の $3.0 \pm 0.7\%$ が A F P に対して陽性であったことを明らかにした。しかし、上記マーカーに対して陰性な顆粒状細胞 (R 3) の $75.1 \pm 4.7\%$ は、免疫細胞化学による測定で、A F P に対して陽性であった (下記表 4 参照)。

20

【0071】

【表 4】

表 4

FACSにおける細胞分画の特性

	R 1	R 2	R 3
276および/または371に関する蛍光 ¹	陽性	陰性	陰性
顆粒度 (A.U.) ²	無顆粒状	無顆粒状	顆粒状
A F P陽性の割合 (%) ³	< 1%	3.0 ± 0.7%	75.1 ± 4.7%

¹: FACS分析による蛍光が陰性対照細胞の95%を越えた場合に、細胞が陽性であるとした。

²: FSCゲイン4およびSSCゲイン8のFACS変数を使用して、顆粒状細胞と無顆粒状細胞の境界を50 A.U.とした。

³: 第一の抗体を使用しなかったものを陰性対照とし、β-ガラクトシダーゼ (BioGenex, San Ramon, CA) を使用したピオチン/ストレプトアビジン法による免疫細胞化学による。

10

20

30

【0072】

O X - 4 3 / O X 4 4⁺細胞を有する集団の中で分析された唯一の集団であるR 1細胞集団の複像分析 (double image analysis) は、O X - 4 3 / 4 4 陽性とO C . 3との広範な重複を明らかにした。O X - 4 3 / O X - 4 4に関するFACSパターンは、肝臓における赤血球産生の増加に起因した、妊娠齢の加算に伴うR 1での微妙な増加(およびR 3集団での減少)を除けば、全ての妊娠齢において類似していた。O X - 4 3 / 4 4に対して陽性である分離捕集細胞集団の分析は、O C . 3または顆粒性の発現に関わりなく、形態学的に多いのは造血細胞前駆細胞であり、それらはA F Pに対して陰性であるということ

を明らかにした。顆粒状でO X - 4 3 / 4 4⁻である細胞(R 3細胞集団)は多くがA F P⁺であり、集団の約30%がO C . 3⁺であった。O X 4 3 / 4 4⁻で無顆粒状かつA F P⁺である細胞の小集団(表4中のR 2)は、O C . 3発現に対しては評価しなかった。

40

【0073】

肝芽細胞に関してパンニングにより濃縮された妊娠15日目からの細胞調製物をタイプI Vコラーゲンで被覆した皿上の、既述の如く血清を含有せずホルモン既知の培地中に蒔

50

いた。その次の日、上皮細胞が再凝集して小細胞集塊となってマトリックスに接着した。60%までのコロニー形成率が得られた(データ示さず)。細胞は、上皮細胞ではない繊維芽細胞様の細胞に取り囲まれ、細胞同士の密接な接触および胆細管を形成する、典型的な実質細胞の島に組織化された(図10参照)。培養4~5日後には、実質細胞成分は徐々に非実質細胞によって覆われ始めていた。しかし、肝芽細胞の残余集塊は、免疫化学または免疫蛍光によるその場でのアッセイで、培養16日目までアルブミンおよびAFPに対して陽性を保っていた(図11参照)。培養培地からグルカゴンを排除した少数の実験において、目立たない形態学的な相違が観察され、そして免疫蛍光または免疫化学によりその場で染色したところ、細胞はアルブミンおよびAFPを発現していた(データ示さず)。この観察は、胎児肝芽細胞の相対的なグルカゴン耐性によるものと考えられる。

10

【0074】

本発明者らは、肝実質細胞前駆細胞に関して高度に濃縮された細胞集団を単離する、パンニング技法および多変数FAC分離捕集を組み込んだ方法を開発した。本発明の方法は、妊娠13日目から誕生直後までに亘る期間の肝臓から肝細胞前駆細胞の単離に適用し得るものとして本発明者らにより見出された。本明細書に記載された肝臓分散手法は、90%を越える生存度を有する単細胞が優占的な集団をもたらす、そして妊娠15日目では、器官全体の重量の95%が回収される。パンニング技法は細胞総数の84%までを除去し、同時に肝が細胞集団を5倍に濃縮する。実質細胞に特異的な遺伝子発現であるアルブミンおよびAFPの増加はパンニング前後の細胞のノーザンブロット分析によって説明され、そしてこの手法の特異性はパンニング皿に対する細胞接着の分析により示された。同様にして、濃縮されていることは、最初の懸濁液と比較して、パンニング後にアルブミンおよびAFPを発現するコロニーの細胞数の劇的な増加が存在することを示す生体外でのデータにより確認された。さらに、パンニング後のコロニー形成率は、従来報告されていた値である6~10%と比較して有意に高かった(60%まで)。パンニング手法後にも肝芽細胞は依然として少数集団のままであるが、標準的なその場での肝細胞灌流プロトコールが平均して37.7%の肝細胞を含有する集団をもたらすことを勘案することが重要である。

20

【0075】

培養皿への分散肝細胞の付着、低速分画遠心分離およびアルギニン欠乏培地での培養を包含する従来の方法と比較した本プロトコールの利点は数点ある。孤立した肝細胞は、生体外で急速に組織に特異的な遺伝子の制御を失う。結果として、マトリックスへの細胞付着を必要とする手法において、蛋白質またはmRNAの含量等の実質細胞に特異的な機能の測定は生体内におけるレベルを反映することができない。解離した胎児肝芽細胞も、カルシウムおよび温度依存性で糖蛋白質に仲介される過程を経て、大きな凝集体を急速に形成する。妊娠14日目と同じくらい早くに、ウボモルリン(E-カドヘリン)と考えられる細胞膜蛋白質の高いレベルが肝芽細胞に存在していた。凝集に関するこの傾向は、特にCa²⁺の存在下に4よりも高い温度で、比較的大きな(E19)肝芽細胞を濃縮するための低速分画遠心分離の能力を説明する。肝芽細胞を解離させるために、乱暴なピペッティングおよびシリンジを通した吸い上げを包含する機械的方法が採用されてきたが、そのような方法は不十分であり、FACSのような単細胞懸濁液を必要とするさらなる分析を困難にすることが判明している。

30

40

【0076】

細胞が凝集しようとする傾向は、細胞を4に保ち、EGTAでカルシウムを除去し、CAMにより仲介される凝集を妨害することにより、防止される。細胞を単細胞懸濁液として維持することの利点は2つある。第一に、実質細胞に特異的な機能の測定が、造血細胞集団の生理学的に不等価な変化に邪魔されずに、細胞に基づいて測定されることが可能となる。第二に、単細胞懸濁液を要求するFACSのような手法が容易に実施されることが可能となる。

【0077】

妊娠15日目に肝芽細胞は非実質細胞よりも大きく見えるが、FACSにおいて正面散

50

乱よりもむしろ側面散乱が、種々の集団を分けることに関してより良い識別子であることを証明したが、恐らくは、それは、妊娠12日目にさえ、肝芽細胞は液胞、ミトコンドリアおよび廃小胞体を含んでおり、比較的複雑であるからであろう。さらに、側面散乱は細胞成熟の合理的な指標であると証明した。一般的に、より顆粒度の高い肝芽細胞は形態学および生化学的により成熟していた(データ示さず)。

【0078】

そこで、肝幹細胞を同定するために提案されていた、門脈域介在部に存在する卵形細胞のマーカーであるOC.3の発現を試験するために、FACSが採用された。顆粒度の特定レベルの細胞に関する閉め出しと組み合わせたOC.3またはOX-43/44の発現に関する多変数FACS分析を用いて、本発明者らは、非実質細胞(造血細胞、内皮細胞および間質細胞)と、AFP⁺であった実質細胞前駆細胞とに、集団をさらに細かく分けることを可能とした。さらに、本発明者らは種々の亜集団におけるOC.3抗原の発現を評価することを可能とした。妊娠15日目に無顆粒状であるOX43/44⁺細胞が造血細胞であり、より大きな赤血球細胞集団であることを証明した。AFP⁺細胞が優占的であった顆粒状のOX43/44⁻細胞集団の細胞の約30%はOC.3⁺であった。そしてそれは恐らく胆管細胞前駆細胞に該当し、一方、OC.3⁻細胞は肝細胞前駆細胞であったのだろう。しかし、無顆粒状のOX43/44⁻細胞の少ない割合はAFP⁺であった。

10

【0079】

造血の分野と比較すると、肝幹細胞の分野はいまだその幼年期にある。しかし、これらの変数を用いたFACS分離捕集により特定集団を単離する能力およびそれに続く生体外および生体内での研究は、肝幹細胞を同定する上で大きな助けとなる。さらに、この技術は、胆管上皮細胞、発癌、再生、加齢および組織に特異的な遺伝子発現を包含する、肝幹細胞生物学の全ての範囲に亘る研究に適用されることができる。

20

【0080】

ここまで、本発明を特定の実施態様に言及して記述してきたが、これらの実施態様は本発明の種々の主題を単に説明するためだけのものであることをご理解戴きたい。従って、本発明の精神および範囲から離れることなく、前記説明のための実施態様に種々の変更をなし得ること、およびその他の改変をなし得ることをご理解戴きたい。

【図面の簡単な説明】

【0081】

上記の簡単な記述ならびに本発明の目的および特徴は、添付図面と共に、本発明の現時点で好ましい単なる説明のための実施態様の下記の詳細な記載を参照することにより、よりよく理解されるであろう。

30

【図1-1】図1は、妊娠14日目の肝臓からの細胞を示しているが、細胞はモノクローナル抗体374.3およびOX-43で染色され、次いでFITCおよびPE標識した第二の抗体で処理されている。パネルAは2色密度プロットであり、閉め出されていない(ungated)試料中の、R1~5として表した5集団を示している。R1およびR2はOX-43に対して陽性な細胞集団であり、一方、R3~5は、このマーカーに対して陰性である。パネルBはFL2対SSCの2変数ドットプロットであり、OX-43⁺細胞とOX-43⁻細胞とを分離するために使用した閉め出し変数(gating parameters)を示している。挿入してあるものは、陰性対照を示している。

40

【図1-2】パネルCはOX-43⁻細胞のFL1対FL2の3次元プロットであり、3つの別々の細胞集団であるR3~5を示している。

【図2-1】図2において、パネルAは分離捕集された細胞からの全ての蛋白質のウエスタンブロットであり、もっぱらOX-43⁻集団内にアルブミンを含有する細胞が存在することを示している。

【図2-2】パネルBおよびCは、OX-43⁻(B)およびOX-43⁺(C)に対するAFPのための間接免疫蛍光を示している。

【図3】図3は、全てのOX-43⁺細胞を閉め出した後で分離捕集された、R3~5からの細胞、およびグアニジニウムイソチオシアネート法により調製された総RNAを表し

50

ている。ノーザンプロットは、R 4においてアルブミンの発現を示し、一方、セログリシン (serglycin) は R 3 細胞により発現された。

【図 4 - 1】図 4 は、OX - 4 3 に対して陽性の集団と陰性の集団に分けるために分別され、次いで蛍光および FL 1 対 FL 2 の 2 変数密度プロットに基づき 5 つの集団にさらに分けられた細胞を示している。直前に分離捕集されたサイトスパン (cytospun) 細胞はディフ - クイック (Diff-Quik) 染色キットで形態学的に染色された。倍率 1 0 0 倍。

【図 4 - 2】図 4 は、OX - 4 3 に対して陽性の集団と陰性の集団に分けるために分別され、次いで蛍光および FL 1 対 FL 2 の 2 変数密度プロットに基づき 5 つの集団にさらに分けられた細胞を示している。直前に分離捕集されたサイトスパン (cytospun) 細胞はディフ - クイック (Diff-Quik) 染色キットで形態学的に染色された。倍率 1 0 0 倍。

10

【図 4 - 3】図 4 は、OX - 4 3 に対して陽性の集団と陰性の集団に分けるために分別され、次いで蛍光および FL 1 対 FL 2 の 2 変数密度プロットに基づき 5 つの集団にさらに分けられた細胞を示している。直前に分離捕集されたサイトスパン (cytospun) 細胞はディフ - クイック (Diff-Quik) 染色キットで形態学的に染色された。倍率 1 0 0 倍。

【図 4 - 4】図 4 は、OX - 4 3 に対して陽性の集団と陰性の集団に分けるために分別され、次いで蛍光および FL 1 対 FL 2 の 2 変数密度プロットに基づき 5 つの集団にさらに分けられた細胞を示している。直前に分離捕集されたサイトスパン (cytospun) 細胞はディフ - クイック (Diff-Quik) 染色キットで形態学的に染色された。倍率 1 0 0 倍。

【図 5 - 1】図 5 は、胎児肝臓実質細胞に非常に富んだ集団を表しているが、これらの細胞は F A C S により得られたものであり (全ての O X - 4 3 の閉め出し後の R 4 細胞)、血清を含まないホルモン既知の培地中、タイプ I コラーゲンで被覆した皿の上に 5×10^4 細胞 / cm^2 として蒔いたものである。パネル A は、培養 4 日後の典型的な上皮細胞コロニーおよび極僅かの肝葉細胞を示す位相差顕微鏡写真である (倍率 5 0 倍)。パネル B は、生体内における間接免疫蛍光であり、培養 2 4 時間後の培養実質細胞の約 2 5 % の核内への B r d U の取り込みを示している (倍率 5 0 倍)。

20

【図 5 - 2】パネル C はパネル B の位相差顕微鏡写真である。

【図 6】図 6 は、本発明の方法を利用した肝芽細胞濃縮のフローダイアグラムを表している。

【図 7】図 7 において、パネル A は位相差顕微鏡写真を表しており、そして妊娠 1 5 日における肝芽細胞の A F P に対する免疫蛍光を表している。A F P 陽性細胞は、卵形核と造血細胞よりも僅かに多い貧弱な細胞質とを有する小さな細胞から、大量の空胞化細胞質を有する細胞までの形態学的範囲に亘っていた。陰性対照は第一の抗体としてウサギ I g G を付着させた細胞からなっていた。

30

【図 8】図 8 は、パンニング前後に胎児肝細胞から単離された直後に、 α -フェト蛋白質およびアルブミンをコードする c D N A とハイブリダイゼーションさせた総 R N A ($5 \mu\text{g}$ / レーン) のノーザンプロット分析を表している。レーン 1 は、単離直後の胎児肝細胞を示している。レーン 2 は、抗ラット R B C 抗体を用いて 2 回パンニングした後の細胞調製物を示している。また、1 8 S に対して示したプロットは、総 R N A 量に対する内標準として用いたものである。

【図 9 - 1】図 9 は、細胞質の複雑さの測定を側面散乱とし、これに対して O X - 4 3 および O X - 4 4 に対する蛍光の対数をプロットした 2 変数分析を表している。パネル A は未染色細胞を示し、パネル B は単離直後 (最初の懸濁液) の細胞を示し、そしてパネル C は最終パンニング後の細胞を示している。単離直後の細胞の殆どは無顆粒状であり、かつマーカーに対して陽性であった (R 1 細胞集団)。濃縮に伴い、O X 4 3 / O X 4 4 マーカーに対して陰性な顆粒状 (S S C > 5 0 A . U .) の細胞集団が増加した (R 3 細胞集団)。この集団に対する分離捕集は 7 5 % が A F P に対して陽性であることを明らかにした。顆粒状細胞の自己蛍光がより高いために、無顆粒状集団よりも顆粒状集団の方において、陽性と陰性との間の分画はより高くなる。

40

【図 9 - 2】図 9 は、細胞質の複雑さの測定を側面散乱とし、これに対して O X - 4 3 および O X - 4 4 に対する蛍光の対数をプロットした 2 変数分析を表している。パネル A は

50

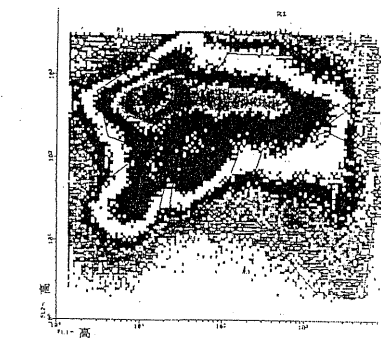
未染色細胞を示し、パネル B は単離直後（最初の懸濁液）の細胞を示し、そしてパネル C は最終パンニング後の細胞を示している。単離直後の細胞の殆どは無顆粒状であり、かつマーカーに対して陽性であった（R1細胞集団）。濃縮に伴い、OX43/OX44マーカーに対して陰性な顆粒状（SSC > 50 A.U.）の細胞集団が増加した（R3細胞集団）。この集団に対する分離捕集は75%がAFPに対して陽性であることを明らかにした。顆粒状細胞の自己蛍光がより高いために、無顆粒状集団よりも顆粒状集団の方において、陽性と陰性との間の分画はより高くなる。

【図10】図10は、血清を含まずホルモン既知の培地中、タイプIVコラーゲン上で5日間培養され、RBC類をパンニングして除去してすることにより肝芽細胞が濃縮された妊娠15日目の細胞を表している。細胞は胆細管の形成を含む典型的な上皮細胞形態を示した。周りを取り囲む上皮細胞は繊維芽細胞様細胞である。図中の棒線は25μを表す。

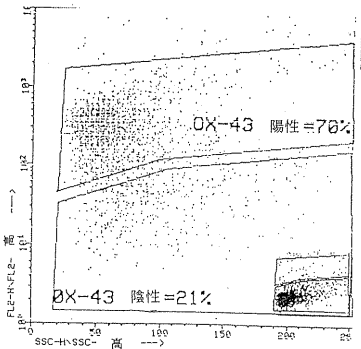
【図11】図11は、培養16日目にその場での免疫蛍光によりアルブミンに対する陽性染色を示した上皮細胞の小さな島を表している。その周りを取り囲む繊維芽細胞様細胞はアルブミンの存在に対して陰性であった。図中の棒線は100μを表している。

10

【図1-1】

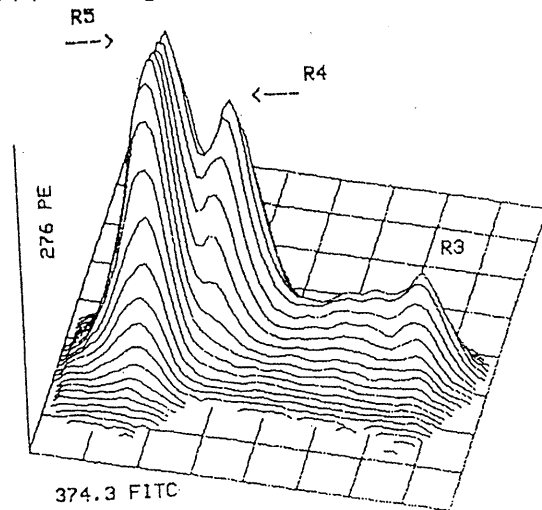


A



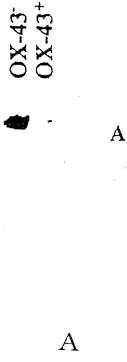
B

【図1-2】

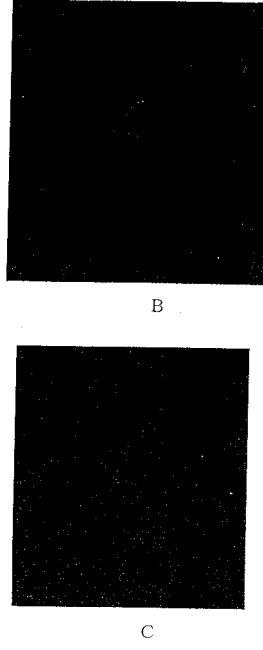


C

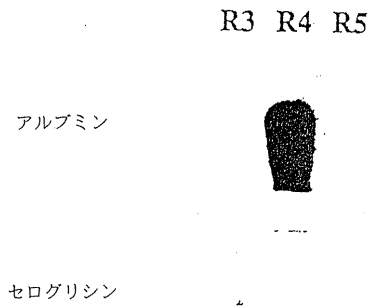
【 図 2 - 1 】



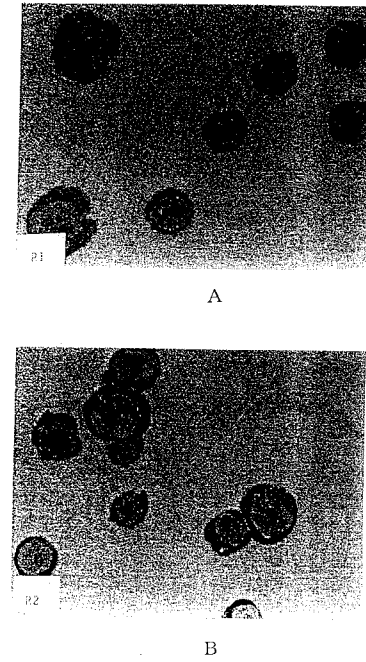
【 図 2 - 2 】



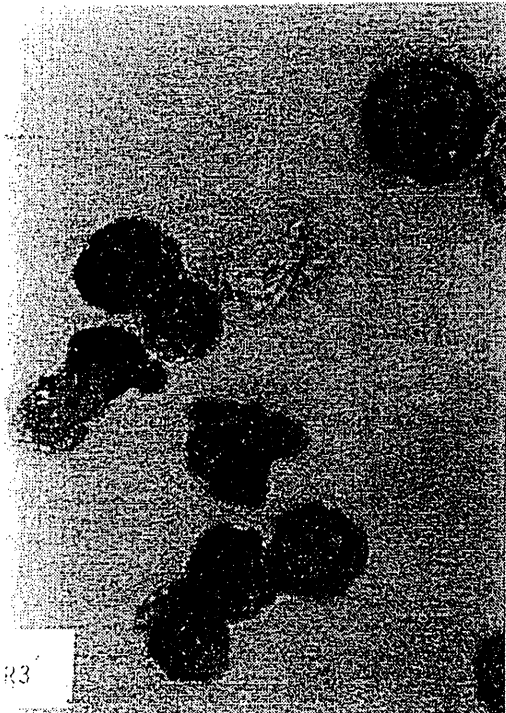
【 図 3 】



【 図 4 - 1 】

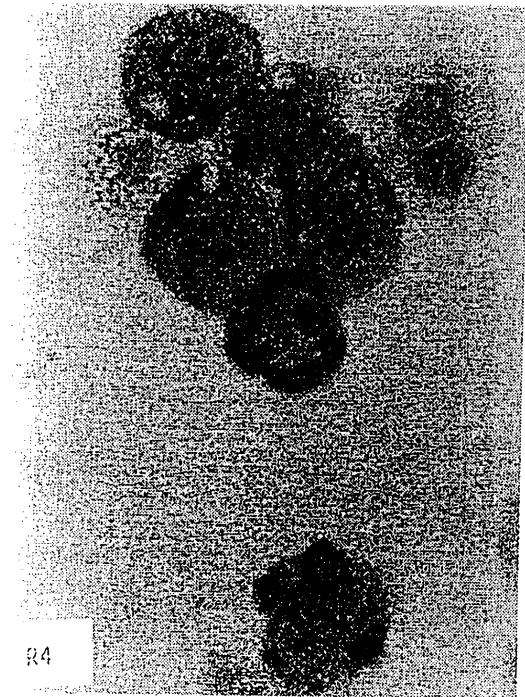


【 図 4 - 2 】



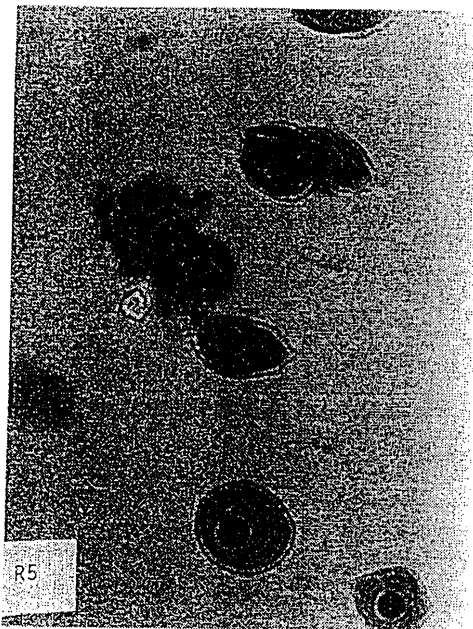
C

【 図 4 - 3 】



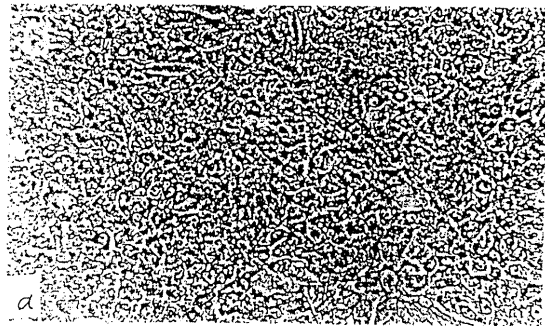
D

【 図 4 - 4 】

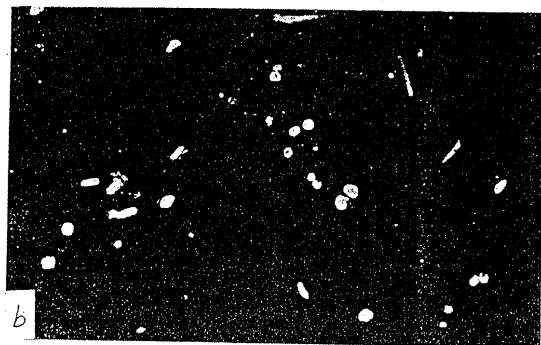


E

【 図 5 - 1 】

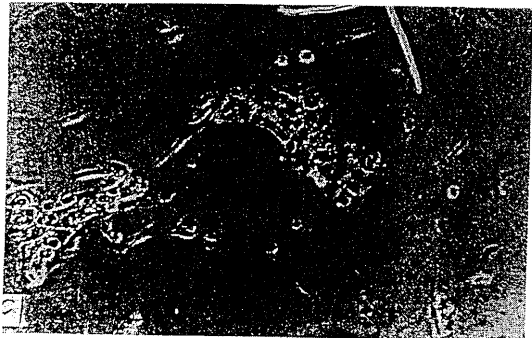


A



B

【 図 5 - 2 】



C

【 図 6 】

肝芽細胞濃縮のフローダイアグラム

肝臓 (8~9 mg)
 ↓EGTAおよび次にコラゲナーゼで分散
 単細胞懸濁液調製: コラゲナーゼ、EGTA、4℃
 ↓肝臓 8 mg 当たり 1.0^7 細胞
 ↓ $3.2 \pm 1.3\%$ がアルブミン⁺
 ↓ $2.5 \pm 0.7\%$ がAFP⁺
 ↓ $87.9 \pm 2.5\%$ がOX43/44⁺

パンニング

赤血球パンニング (2回)

↓ $2.9 \pm 5\%$ の細胞が残った
 ↓ $9.5 \pm 1.2\%$ がアルブミン⁺
 ↓ $9.8 \pm 0.9\%$ がAFP⁺
 ↓ $80.4 \pm 3.9\%$ がOX43/44⁺

OX-43/OX-44パンニング (骨髄細胞および内皮細胞)

↓ $1.6 \pm 4\%$ の細胞が残った
 ↓ $14.8 \pm 3.6\%$ がアルブミン⁺
 ↓ $14.9 \pm 2.5\%$ がAFP⁺
 ↓ $6.9 \pm 1.0\%$ がOX43/44⁺

蛍光励起細胞分離捕集

混入細胞集団に関して拒否的に分離捕集:

OX-43(CD)OX-44(CD37)⁺細胞は、前駆細胞および成熟細胞の形態の造血細胞 (骨髄系および赤血球系細胞) および内皮細胞である。

残っている細胞 (OX-43およびOX-44に対して陰性な細胞) を、OC.3発現および顆粒度の違う細胞に分離捕集。

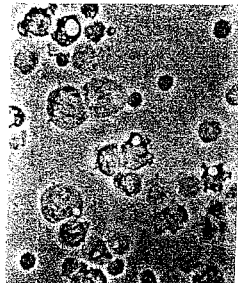
OX-43(CD)OX-44(CD37)⁻細胞は、主として肝細胞前駆細胞であり、そして幾らかの造血細胞混入物、および間質細胞である。

OC.3⁺、顆粒状細胞は、胆管前駆細胞に分化が決定付けられた細胞である (AFP⁺、アルブミン)。

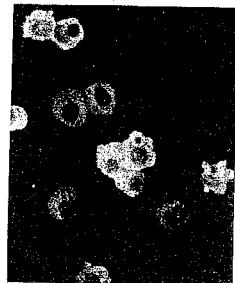
OC.3⁺、顆粒状細胞は、肝細胞前駆細胞に分化が決定付けられた細胞である (AFP⁺、アルブミン⁺⁺⁺)。

OC.3⁺、無顆粒状細胞は、初期肝芽細胞である (AFP⁺⁺⁺、アルブミン⁺およびCK19⁻)。

【 図 7 】

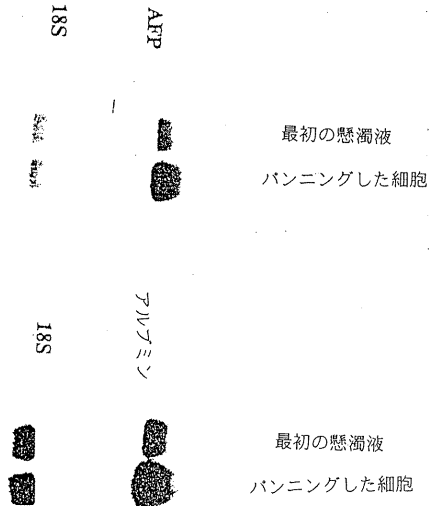


A

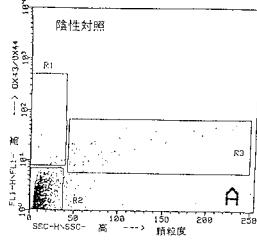


B

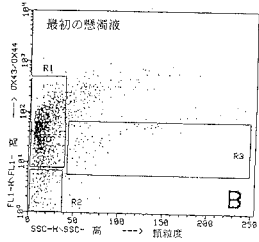
【 図 8 】



【図 9 - 1】

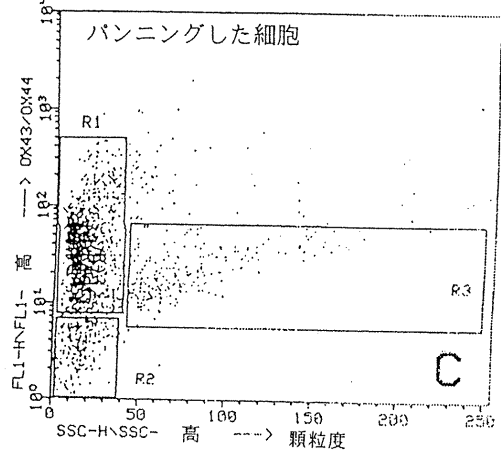


A



B

【図 9 - 2】



C

【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

- (72)発明者 リード、ローラ・エム
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 27514、チャペル・ヒル、スーテン・クリーク・ロ
ード 3621
- (72)発明者 シガル、サミュエル・エイチ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10463、リヴァーデイル、ネザーランド・アベニュー 3
215、アパートメント 5エイ
- (72)発明者 ブリル、シュロモ
アメリカ合衆国、イリノイ州、ラマツト - ガン、ハロー・ストリート 134
- (72)発明者 ホルスト、パトリシア・エイ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10562、オシミング、キチャワン・ロード 1301
- Fターム(参考) 4B065 AA91X CA44 CA60
4C087 AA01 AA02 BB52 CA04 MA66 MA70 NA14 ZA75

专利名称(译)	肝功能不全治疗剂和人工肝的制作方法		
公开(公告)号	JP2004339227A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2004186968	申请日	2004-06-24
申请(专利权)人(译)	Ieshiba大学		
[标]发明人	リードローラエム シガルサミュエルエイチ ブリルシュロモ ホルストパトリシアエイ		
发明人	リード、ローラ・エム シガル、サミュエル・エイチ ブリル、シュロモ ホルスト、パトリシア・エイ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K35/407 A61P1/16 C12N5/074 C12P21/08 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/577 C12N5/06		
CPC分类号	A61K35/12 A61P1/16 C12N5/0672 C12N2510/00 G01N33/5017 G01N33/5067 G01N33/57438		
FI分类号	A61K35/407 A61P1/16 C12N5/00.E C12N5/00.202.A C12N5/071		
F-TERM分类号	4B065/AA91X 4B065/CA44 4B065/CA60 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB52 4C087/CA04 4C087/MA66 4C087/MA70 4C087/NA14 4C087/ZA75		
代理人(译)	英年古河		
优先权	08/155939 1993-11-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 解决的问题：提供一种包含成肝细胞的肝功能不全的治疗剂，以及使用该成肝细胞生产人造肝脏的方法。 解决方案：制备成年肝的单细胞悬液，使用成熟肝细胞，成熟胆管细胞，内皮细胞和肝叶细胞特异的抗体淘洗悬液，并使用上述抗体。 使用荧光激发的细胞分离和收集方法分离出的成肝细胞通过血管注入肝脏。 [选择图]无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2004-3392 (P2004-339227)
	(43) 公開日	平成16年12月2日(2004.12)
(51) Int. Cl. ⁷ A61K 35/407 A61P 1/16 C12N 5/06	FI A61K 35/407 A61P 1/16 C12N 5/00	テーマコード(参考) 4B065 4C087
審査請求 有 請求項の数 12 OL (全 29 頁)		
(21) 出願番号 (22) 出願日 (62) 分割の表示 原出願日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2004-186968(P2004-186968) 平成16年6月24日(2004.6.24) 特願平7-514579の分割 平成6年11月16日(1994.11.16) 08/155,939 平成5年11月19日(1993.11.19) 米国(US)	(71) 出願人 591054174 イエシバ・ユニバーシティ YESHIVA UNIVERSITY アメリカ合衆国、ニューヨーク州、プロ クス、モリス・パーク・アベニュー 1 00 (74) 代理人 100057874 弁理士 曾我 達照 (74) 代理人 100084010 弁理士 古川 秀利 (74) 代理人 100094695 弁理士 鈴木 憲七