

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6294571号
(P6294571)

(45) 発行日 平成30年3月14日(2018.3.14)

(24) 登録日 平成30年2月23日(2018.2.23)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		D
GO 1 N 33/536	(2006.01)	GO 1 N	33/536		D
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	GO 1 N	33/536		E
		C 1 2 Q	1/68	Z N A A	

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2017-526737 (P2017-526737)	(73) 特許権者	507232478
(86) (22) 出願日	平成27年8月4日(2015.8.4)		北京大学
(65) 公表番号	特表2017-530370 (P2017-530370A)		PEKING UNIVERSITY
(43) 公表日	平成29年10月12日(2017.10.12)		中華人民共和国北京市▲海▼淀区▲頤▼和▲園▼路5号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/085990		No. 5, Yiheyuan Road
(87) 国際公開番号	W02016/019842		, Haidian District,
(87) 国際公開日	平成28年2月11日(2016.2.11)		Beijing 100871, Ch
審査請求日	平成29年2月7日(2017.2.7)		ina
(31) 優先権主張番号	201410386506.0	(73) 特許権者	517041305
(32) 優先日	平成26年8月7日(2014.8.7)		北京大学深▲セン▼研究生院
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		中華人民共和国 カントン 518055
			シェンチェン ナンジャン ディストリ
			クト シーリー ユニバーシティ タウン
			ベキン ユニバーシティ キャンパス
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S U S D 2 タンパク質のマーカールとしての使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被測定細胞集団における膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞のソーティング又は補助ソーティングの方法であって、

被測定細胞集団における細胞で S U S D 2 遺伝子を発現させるか否かを検出し、いずれかの細胞が S U S D 2 遺伝子を発現させると、該当細胞を膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞とし、又はこれらの候補とし、いずれかの細胞が S U S D 2 遺伝子を発現させないと、該当細胞を膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞としなく、又はこれらの候補としないステップを含み、

前記 S U S D 2 遺伝子のヌクレオチド配列は、配列表における配列 2 である、ソーティング又は補助ソーティングの方法。

【請求項 2】

前記被測定細胞集団における細胞で S U S D 2 遺伝子を発現させるか否かは、被測定細胞集団における細胞に、 S U S D 2 遺伝子を発現させるタンパク質を含有するか否かを検出することにより行われ、前記被測定細胞集団における細胞に S U S D 2 遺伝子を発現させるタンパク質を含有するか否かを検出する方法は、

1) 抗 S U S D 2 モノクローナル抗体を抗体とした免疫蛍光抗体法、或いは

2) 抗 S U S D 2 モノクローナル抗体を抗体としたフローサイトメトリー法、或いは

3) 抗 S U S D 2 モノクローナル抗体を抗体とした磁気ビーズ分離である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記被測定細胞が膵臓内胚葉細胞である、ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記膵臓内胚葉細胞がヒト由来膵臓内胚葉細胞である、ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

マーカーとしての S U S D 2 タンパク質、そのコード遺伝子、又は前記 S U S D 2 タンパク質の前駆体タンパク質をコードする m R N A の膵臓内分泌前駆細胞及び / 又は新生膵臓内分泌細胞の同定、スクリーニング又はソーティングでの使用であって、

前記 S U S D 2 タンパク質のアミノ酸配列は、配列表における配列 1 に示され、

前記 S U S D 2 タンパク質のコード遺伝子のヌクレオチド配列は、配列表における配列 2 に示される、使用。

【請求項 6】

前記 S U S D 2 タンパク質に特異的に結合できる抗体の、膵臓内分泌前駆細胞及び / 又は新生膵臓内分泌細胞を同定、スクリーニング又はソーティングする試薬の調製での使用。

【請求項 7】

前記抗体は蛍光標識を有し、前記抗体はモノクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

前記使用は、膵臓内胚葉細胞から膵臓内分泌前駆細胞及び / 又は新生膵臓内分泌細胞をスクリーニング又はソーティングすることであり、

前記スクリーニング又はソーティングする方法は、免疫磁気ビーズ分離法及びフローサイトメトリー法であり、

前記同定方法は、免疫蛍光抗体法及びフローサイトメトリー分析法である、ことを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記 S U S D 2 タンパク質の前駆体タンパク質をコードできる m R N A に特異的に結合できるプライマー対、プローブ又はこれらの相補鎖の膵臓内分泌前駆細胞及び / 又は新生膵臓内分泌細胞の同定用試薬の調製での使用。

【請求項 10】

前記プライマー対は、配列表における配列 3 に示される一本鎖 D N A 分子と、配列表における配列 4 に示される一本鎖 D N A 分子からなる、ことを特徴とする請求項 9 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオ技術分野に関し、特に S U S D 2 タンパク質のマーカーとしての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト多能性幹細胞に由来する膵臓 b e t a 細胞は、糖尿病、特に I 型糖尿病に対する細胞置換療法のために十分なドナー膵島細胞源を提供できる。また、ヒト多能性幹細胞から膵臓 b e t a 細胞への指向性誘導分化は、ヒト膵臓の発達過程を研究するためにインビトロ研究モデルを提供できる。発達過程の i n v i v o シミュレーションによって、ヒト多能性幹細胞から膵臓 b e t a 細胞への指向性誘導分化は、主に、胚内内胚葉、腸管、前腸後部、膵臓内胚葉及び膵臓内分泌細胞という複数の段階を含む。その中、膵臓内胚葉段階にある細胞は、ハイブリッド細胞であり、一般的に膵臓前駆細胞、膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞等を含む。従来、主に膵臓発達に関連する遺伝子の発現によって

10

20

30

40

50

細胞の運命を決定する。膵臓前駆細胞は主に関連遺伝子、例えば PDX 1、HNF 1 B、SOX 9、NKX 6 . 1、HNF 6 等の遺伝子を発現させることにより決定される。膵臓内分泌前駆細胞の最も主なマーカー遺伝子の一つは NGN 3 であるが、NGN 3 は一時的に発現されるので、その下流遺伝子、例えば NKX 2 . 2、NEUROD 1 等の遺伝子の発現及び CHROMOGRANIN A、INSULIN、GLUCAGON 等の内分泌関連遺伝子の非発現と組み合わせることで膵臓内分泌前駆細胞の運命を決定するのが一般的である。これらマーカー遺伝子の発現によって特定細胞の運命を決定できるが、該当マーカー遺伝子はすべて転写因子又は分泌タンパク質等であり、細胞質又は細胞核内に位置するのが一般的であるため、これらタンパク質の発現によって特定の細胞群、特にヒト膵臓内分泌前駆細胞と新生膵臓内分泌細胞を分離して精製させることができないので、その分子的特徴を詳細に研究することができない。

10

【 0 0 0 3 】

現在、ヒト多能性幹細胞の指向性誘導分化を利用して膵臓前駆細胞が得られるが、該当細胞はインビトロで機能が成熟した膵臓 beta 細胞への分化効率が低い。ヒト多能性幹細胞に由来する膵臓前駆細胞を免疫不全マウスの体内に移植することで、機能が成熟した膵島細胞が得られるが、膵臓前駆細胞は一定の増殖能力を有するので、発癌性によって臨床使用への進展が制限されてしまう。膵臓前駆細胞に比べて、機能が成熟した膵臓 beta 細胞は、ドナー細胞源として好ましい。しかしながら、インビトロで膵臓前駆細胞を機能が成熟した膵臓 beta 細胞に誘導分化するという課題は、糖尿病の細胞置換療法の実現を大幅に制限し、膵臓前駆細胞が膵臓 beta 細胞へ分化する過程において、膵臓内分泌前駆細胞を正確且つ効率よく誘導分化することは肝心なことである。マウス等のモデル生物の研究により、膵臓 beta 細胞の発達過程に対する理解を大幅に促進し、これら研究は、膵臓 beta 細胞のインビトロ指向性分化を指導するのに決定的な役割を果たす。しかし、膵臓内分泌前駆細胞の運命特殊化、異なる内分泌細胞同士の運命選択についての研究は依然として少なく、また、ヒトとマウス等のモデル生物には一定の種差が存在するため、関連分子マーカーを使用して特定発達段階にある膵臓関連細胞を直接分離して研究することが実現されれば、機能が成熟した膵臓 beta 細胞のインビトロ増殖速度を大幅に高める。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

30

【 0 0 0 4 】

本発明は、被測定細胞集団における膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞のソーティング又は補助ソーティングの方法を提供することを目的の一つとする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 5 】

本発明に係る方法は、被測定細胞集団における細胞で SUS D 2 遺伝子を発現させるか否かを検出し、いずれかの細胞が SUS D 2 遺伝子を発現させると、該当細胞を膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞とし、又はこれらの候補とし、いずれかの細胞が SUS D 2 遺伝子を発現させないと、該当細胞を膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞としなく、又はこれらの候補としないステップを含む。

40

【 0 0 0 6 】

前記 SUS D 2 遺伝子のヌクレオチド配列が配列表における配列 2 である。

【 0 0 0 7 】

上記方法では、前記被測定細胞集団における細胞で SUS D 2 遺伝子を発現させるか否かを検出することは、被測定細胞集団における細胞に SUS D 2 遺伝子を発現させるタンパク質を含有するか否かを検出することにより行われ、前記被測定細胞集団における細胞に SUS D 2 遺伝子を発現させるタンパク質を含有するか否かを検出することは、下記の何れかの方法によって行われる。

- 1) 抗 SUS D 2 モノクローナル抗体を抗体とした免疫蛍光抗体法。
- 2) 抗 SUS D 2 モノクローナル抗体を抗体としたフローサイトメトリー法。

50

3) 抗SUSD2モノクローナル抗体を抗体とした磁気ビーズ分離。

【0008】

上記方法では、前記被測定細胞が膵臓内胚葉細胞である。

【0009】

上記方法では、前記膵臓内胚葉細胞がヒト由来膵臓内胚葉細胞である。

【0010】

また、本発明は、膵臓内胚葉細胞の遺伝子発現を分析することにより、SUSD2遺伝子が膵臓分泌前駆細胞及び新生分泌細胞で富化発現され、すなわち、該遺伝子を発現させるSUSD2タンパク質が両方の分子マーカーであることを見出すことを目的とする。

【0011】

上記事情に鑑み、本発明は、マーカーとしてのSUSD2タンパク質の膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生膵臓内分泌細胞の同定、スクリーニング又はソーティングでの使用を提供し、前記SUSD2タンパク質のアミノ酸配列は配列1に示される。

【0012】

前記SUSD2タンパク質のNCBIでの登録番号(NCBI Reference Sequence)が、NP_062547.1である。

【0013】

前記新生膵臓内分泌細胞は、ヒト多能性幹細胞が膵臓beta細胞へ指向性誘導分化する過程に生じた一群のホルモン(Insulin、Glucagon、Ghrelin、Pancreatic Polypeptide、Somatostatin等を含む)陽性細胞であり、該細胞は、複数のホルモンを共発現させることが一般であり、成熟した膵臓内分泌細胞に比べて機能が成熟していない。in vivoでの発達過程において、前記新生膵臓内分泌細胞は主に胚胎発達段階にある機能が成熟していない膵臓内分泌細胞を意味する。

【0014】

本発明は、前記SUSD2タンパク質に特異的に結合できる抗体の、膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生膵臓内分泌細胞を同定、スクリーニング又はソーティングする試薬の調製での使用を更に提供する。

【0015】

前記SUSD2タンパク質は、遺伝子SUSD2を発現させるタンパク質であり、細胞膜上に位置する受容体タンパク質であり、転写因子でも分泌タンパク質でもない。

【0016】

免疫蛍光抗体法によって被測定細胞にSUSD2タンパク質を含有するか否かを検出することにより、被測定細胞が膵臓分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞であるか否かを確定する。

【0017】

前記抗体は、完全な抗体分子、キメラ抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、重鎖と軽鎖のホモ二量体とヘテロ二量体、及び抗原結合断片と誘導体であってもよい。完全な抗体分子はポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0018】

前記のように、一般的に、対応した蛍光マーカーを有する抗体又は該抗体の二次抗体を用いる免疫蛍光抗体法によってSUSD2タンパク質を検出する。

【0019】

前記膵臓内分泌前駆細胞と新生膵臓内分泌細胞とは膵臓内胚葉細胞のうち一群の細胞であり、適切な条件下で機能が成熟した膵臓内分泌細胞を発生できるものである。

【0020】

前記ヒト膵臓内胚葉細胞とは、主にヒト多能性幹細胞が膵臓beta細胞へ指向性誘導分化する過程における膵臓内胚葉段階にある細胞、又は分離したばかり、及びインビトロ培養した対応発達段階にあるヒト胚膵臓組織細胞であり、主に膵臓前駆細胞、膵臓内分泌

10

20

30

40

50

前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞を含み、本発明の主な目的は膵臓内胚葉細胞集団から膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞をスクリーニング又はソーティングすることである。

【0021】

前記膵臓内胚葉細胞は、1、ヒト多能性幹細胞を指向性誘導分化することにより取得される細胞、2、分離したヒト胚膵臓組織細胞により取得される細胞、3、分離したヒト胚性膵臓内胚葉細胞をインビトロ培養する細胞を含む。

【0022】

前記スクリーニング又はソーティングする方法として、免疫磁気ビーズ分離法又はフローサイトメトリー法が一般的である。

10

【0023】

SUSD2遺伝子の発現過程では、先ずmRNAに転写し、次に翻訳してSUSD2タンパク質の前駆体タンパク質を得て、更に加工して成熟したSUSD2タンパク質を得る。

【0024】

以上の原因に鑑み、本発明は、マーカーとしての、前記SUSD2タンパク質の前駆体タンパク質をコードするmRNAの膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生膵臓内分泌細胞の同定での使用を更に提供する。

【0025】

本発明は、mRNAに特異的に結合できるプライマー、プローブ又はこれらの相補鎖の膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生膵臓内分泌細胞を同定する試薬の調製での使用を更に提供する。

20

【0026】

前記プライマーは、mRNA全体を増幅するプライマーであっても、mRNA特徴領域を増幅するプライマーであってもよく、前記プローブはmRNA特定領域を識別するヌクレオチドであり、一般的に標識を有する。

【0027】

実施例によれば、本発明は、具体的に前記mRNAを増幅する下記のプライマーを提供する。

【0028】

上流プライマー：GGCACCGCCAACACCTCA

30

【0029】

下流プライマー：GCGTGGGCAGCGACTTGA。

【0030】

前記同定方法として、蛍光定量的PCRが使用できる。

【発明の効果】

【0031】

本発明は、内胚葉細胞の遺伝子発現を分析することにより、SUSD2遺伝子が膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞で富化発現され、且つそのコードされるタンパク質が細胞膜上の受容体タンパク質であり、該タンパク質をマーカーとして膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞を同定、スクリーニング又はソーティングすることができることを見出し、各発達段階の膵臓関連細胞についての研究に対して重要な意義がある。

40

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】ヒト多能性幹細胞から膵臓内胚葉細胞への指向性分化を示す図。(a)ヒト多能性幹細胞が膵臓bet細胞へ指向性誘導分化する模式図である、(b)分化の第四段階後期での膵臓内胚葉に関連するタンパク質、及びNGN3遺伝子を標識する緑色蛍光タンパク質(EGFP)の発現を免疫蛍光染色により検出した染色図である。

【図2】膵臓内胚葉中のNGN3-EGFP+細胞が膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることをフローサイトメトリー法により同定した結果図である。(a)膵臓内胚

50

葉細胞中のNGN3-EGFP及びNGN3、NKX2.2、NEUROD1、CHROMOGRANINA(CHGA)等の膵臓内分泌関連タンパク質の発現をフローサイトメトリー法により検出する図である、(b)膵臓内胚葉細胞中のNGN3-EGFPと膵臓前駆細胞のマーカータンパク質PDX1の発現をフローサイトメトリー法により検出した結果、NGN3-EGFP+細胞で膵臓前駆体関連タンパク質PDX1を低発現させるか、発現させないことを表明する図である。

【図3】ソーティングしたNGN3-EGFP+細胞、NGN3-EGFP-細胞中の膵臓関連遺伝子の発現状況をmRNAシーケンシングにより分析した結果、NGN3-EGFP+の膵臓内分泌前駆細胞及び新生内分泌細胞集団には、膵臓内分泌関連遺伝子が比較的富化発現されていることを表明する図である。

10

【図4】SUSD2とNGN3-EGFPの共染色状況を免疫染色により検出した結果、SUSD2はヒト多能性幹細胞分化由来のNGN3-EGFP+細胞の標識に適用できることが説明される図である。

【図5】ヒト多能性幹細胞由来の膵臓内胚葉細胞中のSUSD2及び膵臓発達関連タンパク質の発現状況をフローサイトメトリーにより検出した分析図であり、SUSD2はインビトロ分化して得られた膵臓内分泌前駆細胞及び新生内分泌細胞の標識に適用できることが説明される図である。(a)膵臓内胚葉細胞中のSUSD2及び膵臓内分泌関連タンパク質NGN3、NKX2.2、NEUROD1、CHROMOGRANINA(CHGA)等の発現状況をフローサイトメトリーにより検出する図である、(b)膵臓内胚葉細胞中のSUSD2と膵臓前駆細胞関連タンパク質PDX1の発現をフローサイトメトリーにより検出する図である。

20

【図6】フローソーティングして得られたSUSD2+細胞、SUSD2-細胞及びソーティングしていない膵臓内胚葉細胞中の膵臓発達関連遺伝子の発現状況をRT-QPCRにより同定した結果、SUSD2+細胞で膵臓内分泌前駆細胞関連遺伝子及び膵臓内分泌細胞関連遺伝子を比較的富化発現させ、膵臓前駆細胞関連遺伝子を低発現させることを表明するので、SUSD2で標識したものは膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生内分泌細胞であることが証明される図である。

【図7】SUSD2抗体を磁気ビーズ分離に用いて膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞を富化させる図である。(a)SUSD2抗体を使用してインビトロ分化して得られた膵臓内胚葉細胞に対して磁気ビーズ分離を行って富化させるSUSD2+細胞、SUSD2-細胞中の膵臓内分泌前駆細胞及び膵臓内分泌細胞のマーカータンパク質NKX2.2の発現をフローサイトメトリーにより検出した結果、SUSD2抗体を磁気ビーズ分離に用いることによってNKX2.2+膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞を効果的に富化できることが説明される図である、(b)磁気ビーズ分離によって得られたSUSD2+細胞、SUSD2-細胞及びソーティングしていない膵臓内胚葉細胞に対して長期培養した後、膵臓前駆体及び膵臓内分泌関連タンパク質の発現を免疫組織化学により検出した結果、SUSD2+細胞は内分泌細胞を大量で発生できることを表明するので、内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることが証明される図である、(c)磁気ビーズ分離を行って得られたSUSD2+細胞、SUSD2-細胞を免疫不全マウスの体内に移植し、19週間後に移植体を免疫蛍光染色して膵臓内分泌関連タンパク質の発現を検出した結果、SUSD2+細胞は複数タイプの膵臓内分泌細胞を発生できるのに対して、SUSD2-細胞は主に導管細胞を発生させることを表明するので、SUSD2は膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞を富化させることが証明される図である。

30

40

【図8a】SUSD2はヒト胚由来の膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞の標識に適用できることを示す図である。(a)胚膵臓組織及び成体膵臓組織中のSUSD2と膵臓内分泌前駆細胞関連タンパク質、膵臓内分泌細胞関連タンパク質との共発現を免疫組織化学により検出した結果、SUSD2は胚膵臓組織中の膵臓内分泌前駆体又は内分泌細胞のみで発現されることを表明する図である。

【図8b】SUSD2はヒト胚由来の膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞の標識に適用できることを示す図である。(b)胚膵臓組織中のSUSD2と膵臓内分泌関連タ

50

ンパク質及び膵臓導管関連タンパク質の発現を免疫蛍光により検出する図である。

【図9】SUSD2はヒト胚由来の膵臓内分泌前駆細胞及び新生膵臓内分泌細胞の富化に適用できることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

特に断らない限り、以下の実施例に使用される実験方法は常法である。以下の実施例に使用される材料や試薬等は、特に断らない限り、市販品として入手できる。SUSD2遺伝子は配列2に示され、コードされるタンパク質のアミノ酸配列は配列1である。

【0034】

実施例1、SUSD2の膵臓内分泌前駆細胞のマーカー遺伝子としての発見及び使用

10

【0035】

1、SUSD2の、修飾されたヒト多能性幹細胞を分化して得られた膵臓内分泌前駆細胞のマーカー遺伝子としての使用

【0036】

1.1、膵臓内胚葉細胞の取得

【0037】

EGFP遺伝子(NC_013179.1(3313...4126))にインビトロのヒト多能性幹細胞系H1(WiCell Research Institute、NIH番号WA01)の相同的組み換え(Ngn3 contig番号:NT_030059.13、Chromosome 10に位置し、左相同アームのゲノムにおける位置は71325654-71332154、右相同アームのゲノムにおける位置は71332158-71467568である)を行って、修飾された細胞のヒト多能性幹細胞系NGN3-EGFPを得た。それを15%~20%の量で細胞培養液Iに接種して、1日間培養し、更に細胞培養液IIで1~2日間直接培養し、細胞培養液IIIで1日間直接培養し、次に、細胞培養液IVで2日間直接培養し、細胞培養液Vで1日間直接培養し、細胞培養液VIで3日間直接培養し、細胞培養液VIIで4日間直接培養し、細胞培養液VIIIで4~6日間直接培養し、細胞培養液IXで4~6日間直接培養して、膵臓内胚葉細胞を得た。

20

【0038】

該段階にある細胞集団中の膵臓内胚葉に関連する複数の標識転写因子の発現状況を免疫蛍光抗体法により検出する。

30

【0039】

NKX2.2検出用の抗体はマウス由来のモノクローナル抗体(該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号が74.5A5である)、PDX1検出用の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体(該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2419)であり、EGFP検出用の抗体は鶏由来のポリクローナル抗体(該抗体はAbcamから購入し、カタログ番号がAB13970である)であり、NGN3検出用の抗体はヒツジ由来のポリクローナル抗体である(該抗体はR&D Systemから購入し、カタログ番号がAF3444である)である。

【0040】

40

すべての抗体は非直接標識抗体であり、検出時に、それぞれJackson ImmunoResearch社から購入する抗体である、Alexa Fluor 488で標識したロバ由来の抗ヤギポリクローナル抗体(カタログ番号705-545-147)、Cyanine Cy3で標識したロバ由来の抗ヤギポリクローナル抗体(カタログ番号705-165-147)、Cyanine Cy3で標識したロバ由来の抗ヒツジポリクローナル抗体(カタログ番号715-165-147)、Alexa Fluor 488で標識したロバ由来の抗マウスポリクローナル抗体(カタログ番号715-545-151)、Cyanine Cy3で標識したロバ由来の抗マウスポリクローナル抗体(カタログ番号715-165-151)、Alexa Fluor 488で標識したロバ由来の抗鶏ポリクローナル抗体(カタログ番号703-545-155)で二重染色する。

50

【0041】

その結果、図1に示されるように、該段階で得られた細胞のうち、一部の細胞でPDX1である膵臓前駆体のマーカータンパク質(図1A)を発現させ、他の一部の細胞でNGN3-EGFPを発現させ、両方はほぼ共染しない(図1B)。NGN3-EGFP+細胞で、膵臓内分泌前駆細胞の標識転写因子NGN3又は早期段階にある内分泌細胞関連タンパク質NKX2.2、CHROMOGRANINA(CHGA)等が発現されている(図1Cと図1D)。それにより、得られた細胞は、膵臓内胚葉段階にある細胞であり、そのうち、NGN3-EGFPで標識した膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞が存在することが説明される。

【0042】

上記に使用される培養液の処方は以下のとおりである。

【0043】

細胞培養液Iは、Essential 8培地とY27632とを1ml:10 μ molの配合比率で混合して、細胞培養液Iを得る方法により調製される。

【0044】

細胞培養液IIはEssential 8培地である。

【0045】

細胞培養液IIIは、DMEM/F12培地、BSA、rmWnt3A及びActivinAを、1ml:0.1g:25ng:120ngの配合比率で混合して細胞培養液IIIを得る方法により調製される。

【0046】

細胞培養液IVは、DMEM/F12培地、BSA及びActivinAを1ml:0.1g:120ngの配合比率で混合して、細胞培養液IVを得る方法により調製される。

【0047】

細胞培養液Vは、DMEM/F12培地、BSA、ActivinA及びWnt-C59を1ml:0.1g:120ng:50nmolの配合比率で混合して、細胞培養液Vを得る方法により調製される。

【0048】

細胞培養液VIは、DMEM/F12培地、B27 supplement without VitaminA、KGF及びSB525334を1ml:10 μ l:50ng:1 μ molの配合比率で混合して、細胞培養液VIを得る方法により調製される。

【0049】

細胞培養液VIIは、DMEM-H培地、B27 supplement、all-trans retinoic acid、NOGGIN及びSANT-1を1ml:10 μ l:2 μ mol:250ng:0.25 μ molの配合比率で混合して、細胞培養液VIIを得る方法により調製される。

【0050】

細胞培養液VIIIは、DMEM-H培地、B27 supplement without VitaminA、NOGGIN及びTPB((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-2,4-pentadienoylamino)benzolactam)を1ml:10 μ l:250ng:50nmolの配合比率で混合して、細胞培養液VIIIを得る方法により調製される。

【0051】

細胞培養液IXは、DMEM-H培地、B27 supplement without VitaminA、NOGGIN、humanLIF及びAlk5 inhibitorIIを1ml:10 μ l:250ng:10ng:1 μ molの配合比率で混合して、細胞培養液IXを得る方法により調製される。

【0052】

10

20

30

40

50

1. 2、フローサイトメトリーによる、NGN3 - EGFP + 細胞が膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であるか否かについての同定

【0053】

上記のように得られた膵臓内胚葉細胞に対して、BD FACS Aria IIuでフローサイトメトリーを行って、NGN3 - EGFP + (膵臓内分泌前駆体由来する細胞集団を含む)、NGN3 - EGFP - (膵臓内分泌前駆体由来する細胞集団を含まない)の二群の細胞を得て、EGFPはFL1チャンネルである。

【0054】

NGN3 - EGFP + と NGN3 - EGFP - 集団に、膵臓内分泌前駆細胞の複数の標識転写因子又は分泌タンパク質を含有するか否かを細胞内フローサイトメトリーにより検出する。

10

【0055】

NKX2.2 検出用の抗体はマウス由来のモノクローナル抗体 (該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号が74.5A5である) であり、NGN3 検出用の抗体はヒツジ由来のポリクローナル抗体 (該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF3444である) とマウス由来のモノクローナル抗体 (該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号がF25A1B3である) であり、NEUROD1 検出用の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体 (該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2746である) であり、PDX1 検出用の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体 (該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2419である) であり、CHROMOGRANINA 検出用の抗体は兔由来のポリクローナル抗体 (該抗体は中杉金橋から購入し、カタログ番号がZA-0507である) である。

20

【0056】

すべての抗体は非直接標識抗体であり、検出時に、それぞれJackson Immuno Research社から購入する抗体である、AlexaFluor 488で標識したロバ由来の抗ヤギポリクローナル抗体 (カタログ番号705-545-147)、AlexaFluor 488で標識したロバ由来の抗マウスポリクローナル抗体 (カタログ番号715-545-151)、AlexaFluor 647で標識したロバ由来の抗マウスポリクローナル抗体 (カタログ番号715-605-151)、AlexaFluor 488で標識したヤギ由来の抗マウス抗原サブタイプ1ポリクローナル抗体 (カタログ番号115-545-205)、AlexaFluor 647で標識したヤギ由来の抗マウスポリクローナル抗体 (カタログ番号115-605-205)、AlexaFluor 488で標識したヤギ由来の抗マウス抗原サブタイプ2bポリクローナル抗体 (カタログ番号115-545-207)、AlexaFluor 647で標識したヤギ由来の抗マウス抗原サブタイプ2bポリクローナル抗体 (カタログ番号115-605-207)、AlexaFluor 488で標識したロバ由来の抗兔ポリクローナル抗体 (カタログ番号711-545-152) を使用して二重染色される。

30

【0057】

その結果、図2に示されるように、NGN3 - EGFP + (膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞を含む) 集団にNKX2.2、NGN3、CHROMOGRANINA (CHGA) を発現させるが、膵臓前駆体関連遺伝子PDX1を発現せず又は低発現させ、それにより、該細胞集団は主に膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることを表明する。

40

【0058】

NGN3 - EGFP - 集団には、NKX2.2、CHROMOGRANINA (CHGA)、GFPを発現させず、主に膵臓前駆体関連転写因子PDX1を富化発現させ、少量の細胞でNGN3又はNEUROD1を発現させ、それにより、該細胞集団は主に膵臓前駆細胞又は非膵臓細胞タイプの細胞であることを表明する。

【0059】

1. 3、NGN3 - EGFP + 細胞集団におけるSUSD2発現の富化

50

【0060】

1) RNAシーケンシングを行った結果、SUSD2はNGN3-EGFP+細胞集団に富化発現することが明らかになる。

【0061】

QIAGENのRNeasy Plus Mini Kitを使用して上記2で得られたNGN3-EGFP+細胞及びNGN3-EGFP-細胞を抽出し、それぞれ2µgの全mRNAを得た。得られたmRNAを精製した後に逆転写して一本鎖cDNAを得た。末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(terminal deoxynucleotidyl transferase)で得られた一本鎖cDNAの3'末端にpoly Aテールを付ける。cDNAを12PCRサイクル増幅した後、Illumina Paired-End DNA Sample Prep Kitを使用してcDNAライブラリーを構築した。次にIllumina HiSeq2000を使用してシーケンシングした。Tophatソフトウェアを使用してシーケンシング結果(raw reads)とヒト参照ゲノム(the human reference genome、NCBI Build 37、hg19)を比較し、マッピング配列(Mapping reads)とNCBIの参照データベース(RefSeq Genes hg19)を順方向又は逆方向マッチングしてトランスクリプトームを再構築した。すべての遺伝子の発現存在度を計算して、RPKMで標準化した後、下記標準に応じてNGN3-EGFP+とNGN3-EGFP-細胞間での遺伝子発現差異の有意性を判断する：1)発現倍数変化(fold change)が2より大きく又は0.5未満である。2)P値が0.05未満である。Rソフトウェアのヒートマップパッケージ(heatmap package)を使用して、RPKMに基づき、取得したデータに対して、log10でヒートマップ分析を行う。識別的遺伝子発現(Differential Gene Expression、DGE)によってGO分析を行う。

【0062】

その結果、図3に示されるように、NGN3-EGFP-細胞に比べて、NGN3-EGFP+細胞は、膵臓内分泌関連遺伝子NGN3、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、ARX等を富化発現させ、膵臓前駆細胞関連遺伝子PDX1、HNF1B、HNF6等を低発現させ、それにより、ソーティングしたNGN3-EGFP+細胞は膵臓内分泌前駆細胞及び新生内分泌細胞であることが説明される。

【0063】

NGN3-EGFP+細胞はSUSD2(NR02212)を富化発現させて、発現倍数変化が2.30であり、それにより、mRNAレベル上、SUSD2遺伝子(配列2)は被測定細胞が膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞であるか否かを同定するための標識とすることができることが説明される。次に、SUSD2遺伝子を発現させるタンパク質も同様であるか否かを同定する。

【0064】

2)SUSD2がNGN3-EGFP+細胞集団を標識できることの免疫蛍光抗体法による認証

【0065】

上記2で得られたNGN3-EGFP+細胞及びNGN3-EGFP-細胞に対して、免疫蛍光抗体法によりEGFPとSUSD2の発現を検出する。

【0066】

EGFP検出用の抗体は鶏由来のポリクローナル抗体(該抗体はAbcamから購入し、カタログ番号がAB13970である)であり、SUSD2検出用の抗体はマウス由来のモノクローナル抗体(該抗体はBioLegendから購入し、カタログ番号が327401である)である。

【0067】

すべての抗体は非直接標識抗体であり、検出時に、それぞれJackson ImmunoResearch社から購入する抗体である、Cyanine Cy3で標識した口

10

20

30

40

50

バ由来の抗マウスポリクローナル抗体（カタログ番号715-165-151）、Alexa Fluor 488で標識した口バ由来の抗鶏ポリクローナル抗体（カタログ番号703-545-155）抗体を使用して二重染色される。

【0068】

結果は図4に示され、免疫組織化学結果から明らかのように、SUSD2の発現はNGN3-EGFPと完全に一致し、更にNGN3-EGFP-細胞で発現されず、すなわち、NGN3-EGFP+細胞で富化発現される。SUSD2はNGN3-EGFP+細胞、すなわち膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞からなる混合細胞集団の同定又は標識に適用できることが説明される。

【0069】

2、SUSD2の、ヒト多能性幹細胞を分化して得られた膵臓内分泌前駆細胞のマーカ-遺伝子としての使用

【0070】

2.1、膵臓内胚葉細胞の取得

【0071】

インビトロのヒト多能性幹細胞系NGN3-EGFPを、1.1の方法により分化して膵臓内胚葉細胞を得る。

【0072】

2.2、フローサイトメトリーによる、SUSD2遺伝子の発現及び膵臓内分泌前駆細胞のマーカ-遺伝子NKX2.2、NEUROD1の発現の検出

【0073】

上記2.1で得られた膵臓内胚葉細胞に対して、SUSD2遺伝子でコードされるタンパク質の発現をフローサイトメトリー法により検出し、BD Biosciencesから購入する細胞固定/透明化キット（カタログ番号554714）に応じて行い、上記2.1で得られた膵臓内胚葉細胞を固定した後に、対応した抗体及びSUSD2直接標識抗体（マウス由来のPE標識抗SUSD2モノクローナル抗体（BioLegendから購入し、カタログ番号が327406である）及びマウス由来のAPC標識モノクローナル抗体（BioLegendから購入し、カタログ番号が327408である）。マウス由来の未標識モノクローナル抗体（BioLegendから購入し、カタログ番号が327401である））を使用して染色した後、蛍光二次抗体で二重染色する。フローソーターによって分析する。

【0074】

NKX2.2検出用の抗体はマウス由来のモノクローナル抗体（該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号が74.5A5である）であり、NGN3検出用の抗体はヒツジ由来のポリクローナル抗体（該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF3444である）とマウス由来のモノクローナル抗体（該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号がF25A1B3である）であり、NEUROD1検出用の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体（該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2746である）であり、PDX1検出の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体（該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2419である）であり、CHROMOGRANINA検出用の抗体は兎由来のポリクローナル抗体（該抗体は中杉金橋から購入し、カタログ番号がZA-0507である）である。

【0075】

二次抗体はJackson ImmunoResearchから購入する、Alexa Fluor 488で標識した口バ由来の抗ヤギポリクローナル抗体（カタログ番号705-545-147）であり、Alexa Fluor 488で標識したヤギ由来の抗マウス抗原サブタイプ2bポリクローナル抗体（カタログ番号115-545-207）、Alexa Fluor 647で標識したヤギ由来の抗マウス抗原サブタイプ2bポリクローナル抗体（カタログ番号115-605-207）、Alexa Fluor 488で標識した口バ由来の抗兎ポリクローナル抗体（カタログ番号711-545-

10

20

30

40

50

152)、Alexa Fluor 488で標識したロバ由来の抗鶏ポリクローナル抗体(カタログ番号703-545-155)である。

【0076】

図5に示す結果図のように、第四段階の0日目に、NGN3陽性又は弱陽性細胞は、SUSD2又はNEUROD1を発現させず、NKX2.2を低発現させる。第四段階の1日目に、それぞれ80%、93%及び88%のSUSD2+細胞は、NGN3、NKX2.2及びNEUROD1を発現させる。それにより、大部分のSUSD2+細胞はNGN3、NKX2.2及びNEUROD1を同時発現させることを表明し、該当群のSUSD2+細胞は内分泌前駆細胞の特徴を有することが説明される。第四段階の4日目に、大部分のSUSD2+細胞はNKX2.2又はCHROMOGRANINA(CHGA)を発現させるが、NGN3を発現させず、それにより、該時期にあるSUSD2+/NGN3-細胞は内分泌細胞の特徴を有することが説明される。また、SUSD2+細胞は、膵臓前駆体の標識PDX1を連続的に低発現させ又は発現させない。それにより、SUSD2は膵臓内分泌前駆細胞及びその後代内分泌細胞の標識に適用できることが説明される。

10

【0077】

全分化過程において、一部のSUSD2-細胞は膵臓内分泌関連タンパク質NGN3、NKX2.2等を発現させるが、大部分のSUSD2-細胞はこれら膵臓内分泌関連タンパク質を発現させず、膵臓前駆体関連タンパク質PDX1を発現させる。それにより、SUSD2-細胞は主に膵臓前駆細胞又は非膵臓細胞タイプの細胞を含むことが説明される(図5)。

20

【0078】

上記結果から明らかなように、SUSD2+細胞は膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞であるので、更にSUSD2遺伝子でコードされるタンパク質の発現により、細胞が標的細胞であるか否かを同定できることが証明される。

【0079】

2.3、フローソーティングによって得られたSUSD2-細胞とSUSD2+細胞をSUSD2+細胞のmRNAレベルで検出し、この二群の細胞及びソーティングしていない膵臓内胚葉細胞の遺伝子発現状況を定量的PCR技術により分析する。Power SYBR(登録商標) Master Mixキットを使用して定量的PCR(Life Technologiesから購入し、カタログ番号が4367659である)を行い、増幅プライマーは表1に示され、内部参照プライマーはGAPDHであり、具体的な操作は取扱い書を参照する。

30

【0080】

【表 1】

表 1 増幅プライマー

遺伝子	5' -プライマー	3' -プライマー
<i>HHEX</i>	ACCTCTACTCTGGAGCCCCTTCT	ATCTCACCTGGCCGCCTTT
<i>WNT3</i>	ACAAGCACAACAACGAGGCG	GAGGTGCATGTGGTCCAGCATAG
<i>MIXL1</i>	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA	CTCTGACGCCGAGACTTGG
<i>MEOX1</i>	GCGATGACTACGGGGTGCTT	TTCTCCGCCTGGATGATTTC
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCAATGAG
<i>OCT4</i>	CCGAAAGAGAAAGCGAACCAG	ATGTGGCTGATCTGCTGCAGT
<i>SOX17</i>	GCATGACTCCGGTGTGAATCT	TCACACGTCAGGATAGTTGCAGT
<i>T</i>	GATGATCGTGACCAAGAACGG	CCACGAAGTCCAGCAGGAA
<i>FOXA2</i>	CTGAGCGAGATCTACCAGTGGA	CAGTCGTTGAAGGAGAGCGAGT
<i>CXCR4</i>	CCATCGTCCACGCCACCAAC	ACGCCAACATAGACCACCTT
<i>CER1</i>	TGAAGTACATTGGGAGACCTGC	CACAGCCTTCGTGGGTTATAGT
<i>BRAX1</i>	CACGCCGACAGAAATAGATC	GGTACCACGCTTTCACCTGCAAC
<i>CDX2</i>	CTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTC	ATTTTAACCTGCCTCTCAGAGAGC
<i>AFP</i>	CCCGAACTTTCGAAGCCATA	TACATGGGCCACATCCAGG
<i>SOX2</i>	CCATGACCAGCTCGCAGAC	GGACTTGACCACCGAACCC
<i>HNF1B</i>	GCACCTCTCCAGCATCTCA	GTCGGAGGATCTCTCGTTGC
<i>HNF4A</i>	ACTACATCAACGACCGCCAGT	ATCTGCTCGATCATCTGCCAG
<i>HNF6</i>	TGTGGAAGTGGCTGCAGGA	TGTGAAGACCAACCTGGGCT
<i>HB9</i>	GCTCATGCTCACCGAGACCC	TTTGTGCGTTTCCATTTCATC
<i>NKX6.1</i>	GGGCTCGTTGGCCTATTCTGTT	CCACTGGTCCGGCGGTTCT
<i>PDX1</i>	CGGAACTTCTATTAGGATGTGG	AAGATGTGAAGGTCATACTGGCTC
<i>CAP1</i>	CTCGGAAGATTGGCACTGACTAT	CGTGGTGGGCATTGTGGAGATA
<i>PTF1A</i>	GAAGGTCATCATCTGCCATCG	GGCCATAATCAGGGTCGCT
<i>SOX9</i>	CTGAGCTCGGCGTTGTG	AAAGGCTACGACTGGACG
<i>NOD1</i>	ATTGCACCAGCCCTTCCTTTGAT	ACTCGGCGGACGGTTCGTGTTT
<i>NGN3</i>	GGCTGTGGGTGCTAAGGGTAAG	CAGGGAGAAGCAGAAGGAACAA
<i>NKX2.2</i>	TTCCAGAACCACCGTACAAG	GGGCGTCACCTCCATACCT
<i>PAX6</i>	CGAATTCTGCAGGTGTCCAA	ACAGACCCCTCGGACAGTAAT
<i>ARX</i>	GGAGGCAGAAAGGCACAAAGA	GGTGGGGTTAGATAGCGGGTT
<i>PAX4</i>	AGTGTCTCCTCCATCAACCG	TGGTGACCTGAGCCGTGT
<i>AMY</i>	AGGAGGTAATTGATCTGGGTGG	AAGTGCTCTGTCAGAAGGCATG
<i>GCG</i>	GAGATTTCCAGAAGAGGTCG	TGGCGCAAGATTATCAAGAA
<i>GCK</i>	CTTCCCTCAGTTTTTCGGTGG	TTGATTCCAGCGAGAAAGGTG
<i>INS</i>	GCAGCCTTTGTGAACCAACAC	CCCCGCACACTAGGTAGAGA
<i>ISL1</i>	ATTTCCCTATGTGTTGGTTGCG	CGTTCTTGCTGAAGCCGATG
<i>MAFB</i>	CCCGACCGAACAGAAGACA	ACTGGGTGCGAGCCGATGAG
<i>SST</i>	CGCTGTCCATCGTCTG	GGGCATCATTTCTCCGTCTG
<i>GRELIN</i>	GAGGCCCCAGCCGACAAGTG	AAGCAAGCGAAAAGCCAGAT
<i>PPY</i>	AGTGTACCCAGGGGACAATGC	CAGCATGTTGATGTATCTACGGA
<i>MAFA</i>	CAGAGCCAGGTGGAGCAGC	CGTATTTCTCCTTGTACAGGTCCC
<i>CELA2A</i>	CATCGTCAGCTTCCGGTCTCGC	GAAGACGGAGGGCTTGTGGTAG
<i>CTRB1</i>	CGCCATCCACCCTGTGCTCA	GACGGCGTCTCCCATTTCA
<i>CPA1V2</i>	CCTGGGCTGGGTGGCTATGG	GCGGCATCATTCATTTCTTTCA
<i>CHROMOG</i>		
<i>RANIN A</i> (<i>CHGA</i>)	CGCAAACCGCAGACCAGAGGA	AGCTCTGCTTCAATGGCCGACA
<i>SUSD2</i>	GGCACCCCAACACCTCA	GCGTGGGCAGCGACTTGA

10

20

30

40

【0081】

その結果、図 6 に示すように、SUSD2+細胞は膵臓内分泌前駆細胞及び内分泌細胞関連遺伝子であるNGN3、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、ARX等の発現を富化させる。それにより、それは膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることを表明する。SUSD2-細胞は膵臓前駆体関連遺伝子PDX1、HNF6、SOX9、P

50

T F 1 A の発現を富化させる。それにより、膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞ではないことを表明する。

【 0 0 8 2 】

3、S U S D 2 陽性細胞とS U S D 2 陽性細胞の磁気ビーズ分離

【 0 0 8 3 】

3.1、膵臓内胚葉細胞の取得

【 0 0 8 4 】

インビトロのヒト多能性幹細胞系H1を、1.1の方法により分化して膵臓内胚葉細胞を得る。

【 0 0 8 5 】

3.2、磁気ビーズ分離

【 0 0 8 6 】

膵臓内胚葉細胞に対して、要望の抗体であるS U S D 2 直接標識抗体(マウス由来のPEで標識した抗S U S D 2 モノクローナル抗体はBioLegendから購入し、カタログ番号が327406である)、Miltenyi Biotecから購入する磁気ビーズ分離に関連する試薬を使用して磁気ビーズ分離を行い、取扱い書に従ってS U S D 2 陽性細胞とS U S D 2 陰性細胞を得る。

【 0 0 8 7 】

3.3、検出

【 0 0 8 8 】

A、フローサイトメトリー

【 0 0 8 9 】

以上と同じ検出方法により、S U S D 2 + 細胞、S U S D 2 - 細胞及びソーティングしていない細胞に対してフローサイトメトリーを行う。

【 0 0 9 0 】

その結果、図7(a)に示すように、S U S D 2 + 細胞はN K X 2 . 2 + 細胞を高純度で富化させることができ、該細胞はN G N 3 + の内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞(図7(a))である。

【 0 0 9 1 】

B) S U S D 2 陽性細胞を使用して培養した子孫細胞に対する免疫蛍光同定

【 0 0 9 2 】

ソーティングして得られたS U S D 2 + 細胞、S U S D 2 - 細胞及びソーティングしていない膵臓内胚葉細胞に対してインビトロ長期培養を行う。標的細胞を細胞培養液Xに再懸濁させて、Matrigelで被覆された細胞培養板に敷いて1日間培養して付着させた。翌日、培地を除去した後に、PBSで一回洗浄し、細胞培養液XIで更に5日間培養する。培養条件は摂氏37度、5%の二酸化炭素である。

【 0 0 9 3 】

細胞培養液Xは、DMEM-H : B27 without Vitamin A : Y27632 = 1ml : 10µl : 10µMのように取得される。

【 0 0 9 4 】

細胞培養液XIは、DMEM-H : B27 without vitamin A : Noggin : human LIF : Alk5 inhibitor II = 1ml : 10µl : 250ng : 10ng : 100nMのように取得される。

【 0 0 9 5 】

免疫組織化学染色を行う。

【 0 0 9 6 】

その結果、図7(b)に示すように、S U S D 2 + を培養して得られた細胞は大量のINSULIN+、すなわち大量の内分泌細胞を発生でき、S U S D 2 - を培養して得られた細胞は主にPDX1+膵臓前駆細胞を富化させ、少量だけのINSULIN+細胞を発生させる。それにより、S U S D 2 が富化する細胞は膵臓内分泌前駆細胞であることが説

10

20

30

40

50

明される。

【0097】

それにより、SUSD2は膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞を富化させることが説明される。

【0098】

C)免疫不全マウスの腎嚢胞への移植

ソーティングして得られたSUSD2陽性細胞、SUSD2陰性細胞及びソーティングしていない膵臓内胚葉細胞を、免疫不全マウス(6-8週間)の腎嚢胞に移植する。移植19週間後、移植物を取って凍結切片に対する免疫組織化学染色を行う。

【0099】

その結果、図7(c)に示すように、MACSで得られたSUSD2+及びSUSD2-をマウスの体内に移植すると、SUSD2+細胞はすべての種類の内分泌細胞(INSULIN+のbeta細胞、Glucagon+のalpha細胞、SST+のdelta細胞、Ghrelin+のepsilon細胞及びPPY+のPPY細胞)を発生させるが、導管構造を発生させない。それにより、SUSD2+細胞は膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることが説明される。

【0100】

4、SUSD2を使用してin vivoでヒト胚由来の膵臓内分泌前駆細胞及び新生内分泌細胞をソーティングする。

【0101】

4.1、ヒト胚組織の凍結切片の免疫蛍光染色

【0102】

組織切片：4%のPFAを使用して、インビトロのヒト胚膵臓組織を4℃で2時間固定し、PBSを使用して4℃で三回洗浄する(時間はそれぞれ瞬時、10分間、2時間である)。次に、組織塊を30%の蔗糖溶液に入れて4℃で組織が沈降するまで一晩放置する。組織塊をOptimal Cutting Temperature Compound(O.C.T)(Tissue-Tek)で包埋した後、液体窒素で凍結し、凍結マイクロームCryostat(Leica)で10µmの切片に切る。

【0103】

上記切片を1.1の免疫蛍光抗体法により検出した結果、切片は膵臓内胚葉段階にある細胞であり、SUSD2で標識した細胞は膵臓内分泌前駆細胞及び/又は新生膵臓内分泌細胞である(図8)。

【0104】

4.2、磁気ビーズ分離による、ヒト胚由来の膵臓内分泌前駆細胞及び新生内分泌細胞の富化

【0105】

胚膵臓組織を冷たいPBSで二回洗浄した後、眼科はさみで1立方ミリメートルの小さなピースに切る。消化液(PRMI 1640、100-400U/ml Collagenase IV(Life Technologies)、1.2U/ml Dispase II(Roche)、DNase I(0.02%、(wt/vol)) and 0.5% fetal bovine serum(FBS、Hyclone))を使用して37℃で30分間消化し、5分間おきにピペットで軽くピペッティングして細胞を分散させる。消化した単細胞をPRMI 1640 with 0.5% FBSに移し替え、0.5%のBSAと2mMのEDTAを含有するPBSで二回洗浄する。残った組織塊を収集して、上記ステップにより再消化する。得られた細胞懸濁液を40µmのセルストレーナー(BD Biosciences)で濾過し、得られた単細胞懸濁液を0.5%のBSAと2mMのEDTAを含有するPBSに保存し、氷に置いて後続分析に用いる。

【0106】

要望の抗体であるSUSD2直接標識抗体(マウス由来のPEで標識した抗SUSD2

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体はBioLegendから購入し、カタログ番号が327406である)を使用して、上記単細胞懸濁液に対して磁気ビーズ分離を行い、SUSD2陽性細胞とSUSD2陰性細胞を得る。

【0107】

4.3、蛍光定量的PCRにより認証した結果、陽性細胞は膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であり、磁気ビーズ分離を行って得られたSUSD2陽性細胞、SUSD2陰性細胞及びソーティングしていない胚膵臓細胞に対して定量的PCRを行って、膵臓内胚葉細胞関連遺伝子の発現状況を検出する。具体的な操作は2.3に示される。

【0108】

その結果、図9に示されるように、SUSD2陽性細胞はSUSD2遺伝子の発現を富化させ、同時に膵臓内分泌前駆細胞及び早期段階にある内分泌細胞関連遺伝子NGN3、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、ARX等の発現を富化させ、膵臓前駆体関連遺伝子PDX1、HNF6、SOX9、PTF1A、後期段階にある内分泌細胞関連遺伝子INSULIN、GLUCAGON、PAX6、MAFB、MAFA、CHROMOGRANINA(CHGA)及び外分泌関連遺伝子CPA1等を低発現させる。それにより、SUSD2陽性細胞、即ちSUSD2+細胞は膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞であることが説明される。

【0109】

従って、SUSD2遺伝子を膵臓内分泌前駆細胞又は新生内分泌細胞の標識遺伝子として、その発現の有無によって被測定細胞集団における膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞をソーティング又は補助的にソーティングできることが分かる。具体的には、下記のとおりである。

【0110】

被測定細胞集団における細胞でSUSD2遺伝子を発現させるか否かを検出し、いずれかの細胞がSUSD2遺伝子を発現させると、該当細胞がヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞であり、又はこれらの候補であり、いずれかの細胞がSUSD2遺伝子を発現させないと、該当細胞がヒト膵臓内分泌前駆細胞又はその新生膵臓内分泌細胞でなく、又はこれらの候補でない。

【0111】

検出方法では、被測定細胞集団における細胞に、SUSD2遺伝子を発現させるタンパク質を含有するか否かを検出し、具体的には、SUSD2遺伝子のmRNAレベル発現を定量的に検出し、又はSUSD2遺伝子を発現させるタンパク質を免疫蛍光抗体法により検出し、又はSUSD2遺伝子を発現させるタンパク質をフローサイトメトリーにより検出し、又はSUSD2遺伝子を発現させるタンパク質に対して磁気ビーズ分離を行う。

【0112】

実施例2、SUSD2遺伝子の発現による、ヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞のソーティング。

【0113】

1、膵臓内胚葉細胞の取得

【0114】

インビトロのヒト多能性幹細胞系を、1.1の方法により分化して膵臓内胚葉細胞を得る。

【0115】

2、SUSD2遺伝子の発現をフローサイトメトリーにより検出することによる、ヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞のソーティング

【0116】

要望の抗体であるSUSD2直接標識抗体(マウス由来のPEで標識した抗SUSD2モノクローナル抗体はBioLegendから購入し、カタログ番号が327406である)を使用して、膵臓内胚葉細胞をフローサイトメトリーにより検出し、染色後に、蛍光二次抗体で二重染色する。

10

20

30

40

50

【0117】

いずれかの細胞がSUSD2遺伝子を発現させると、該当細胞がヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞であり、又はこれらの候補であり、いずれかの細胞がSUSD2遺伝子を発現させないと、該当細胞がヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞でなく、又はこれらの候補でない。

【0118】

SUSD2+細胞を選択して、ヒト膵臓内分泌前駆細胞又は新生膵臓内分泌細胞とする。

【0119】

その同時に、SUSD2+細胞に対して、膵臓内分泌前駆細胞のマーカー遺伝子NGN3、NKX2.2、NEUROD1の発現をフローサイトメトリーにより検出する。NKX2.2検出用の抗体はマウス由来のモノクローナル抗体(該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号が74.5A5である)であり、NGN3検出用の抗体はヒツジ由来のポリクローナル抗体(該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF3444である)とマウス由来のモノクローナル抗体(該抗体はDSHBから購入し、カタログ番号がF25A1B3である)であり、NEUROD1検出用の抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体(該抗体はR&D Systemsから購入し、カタログ番号がAF2746である)である。

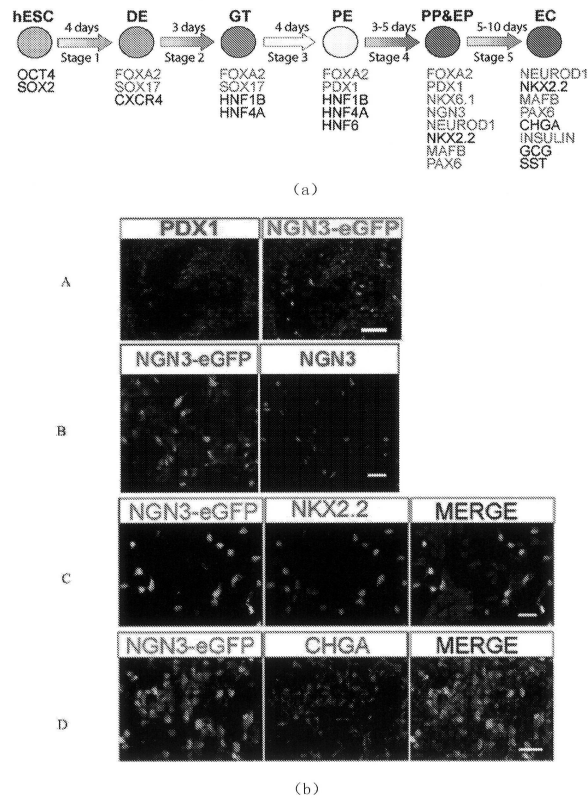
10

【0120】

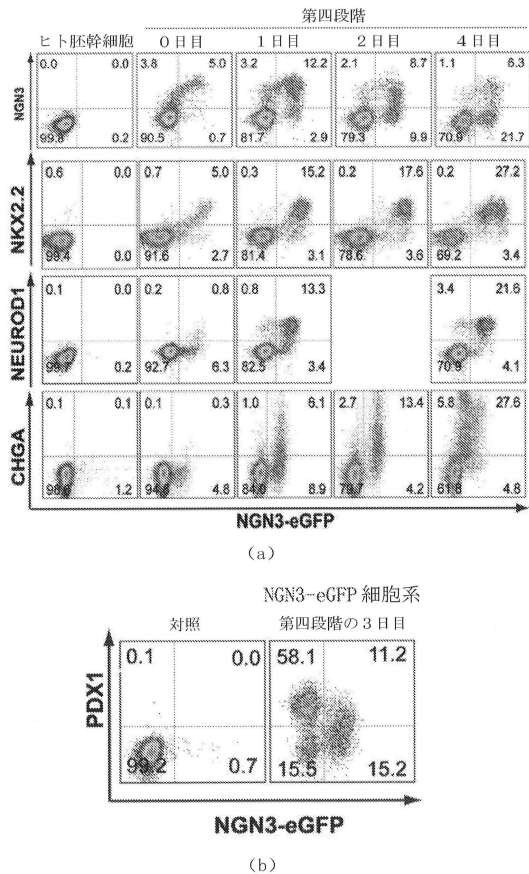
その結果、SUSD2+細胞は膵臓内分泌前駆細胞のマーカー遺伝子NGN3、NKX2.2、NEUROD1を発現させる。それにより、それはヒト膵臓内分泌前駆細胞又はホルモンを分泌しないその子孫細胞であることが証明される。更に、本発明の方法は正確であることが証明される。

20

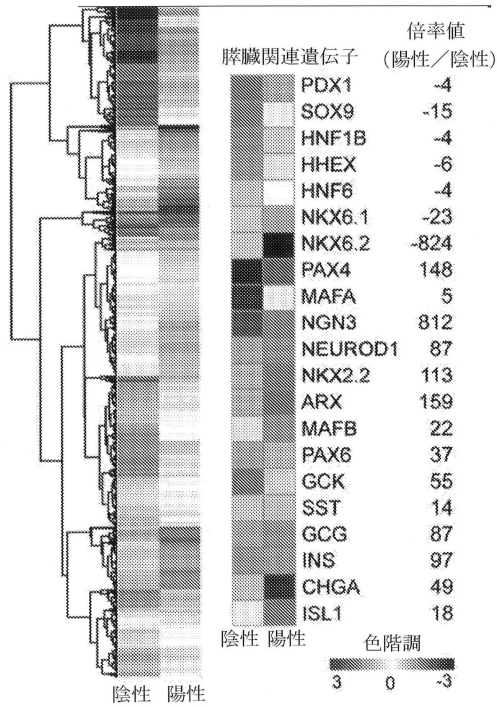
【図1】



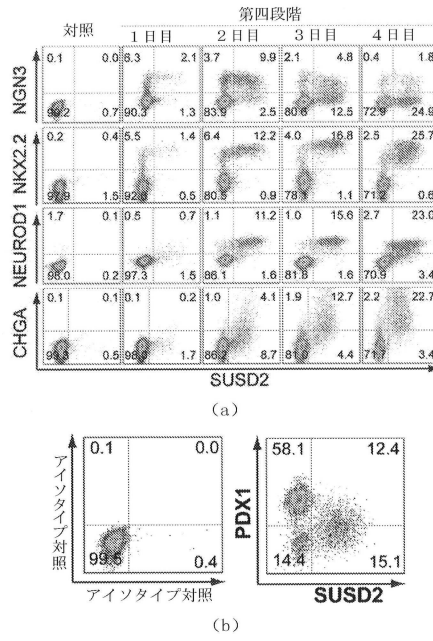
【図2】



【図3】



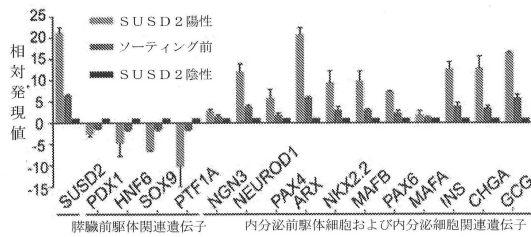
【図5】



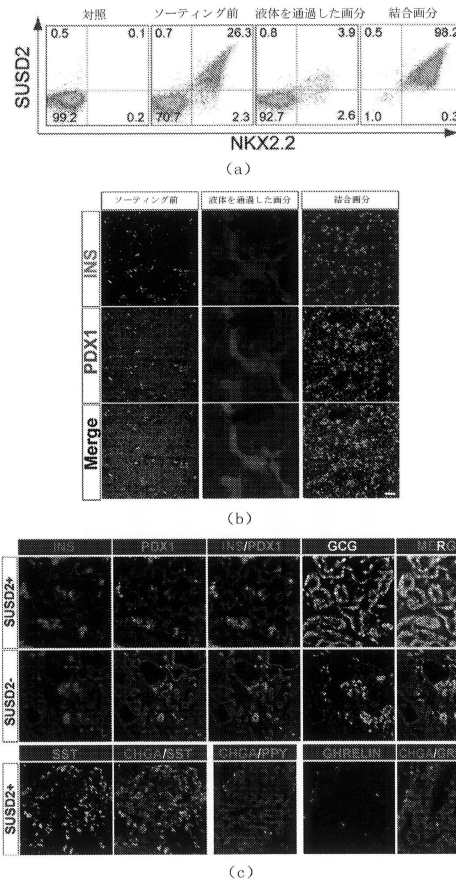
【図4】



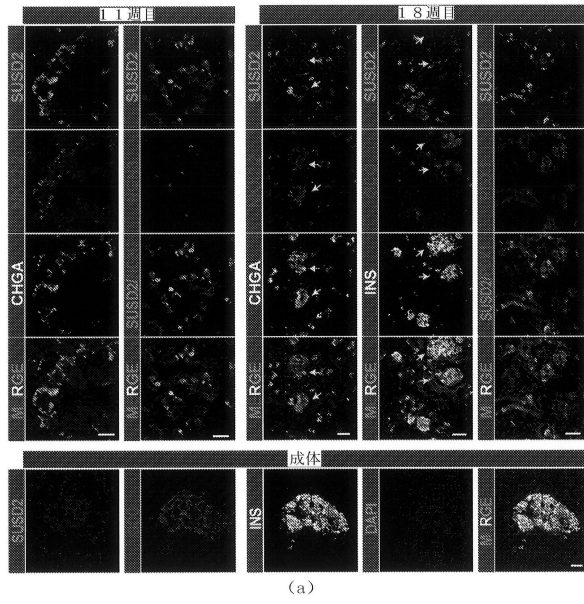
【図6】



【図7】

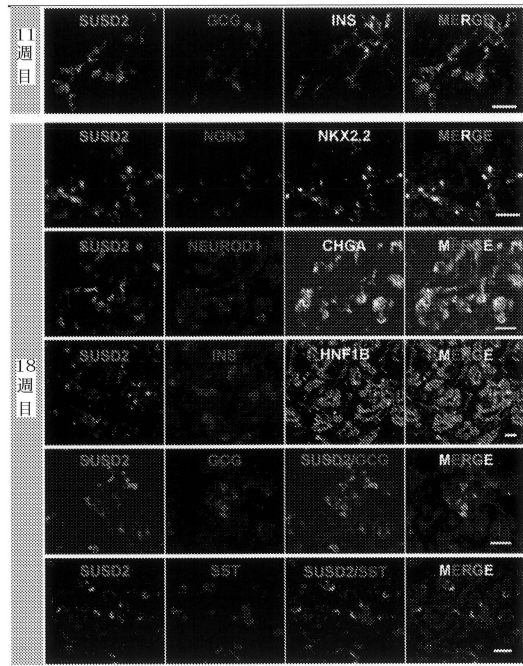


【 図 8 a 】



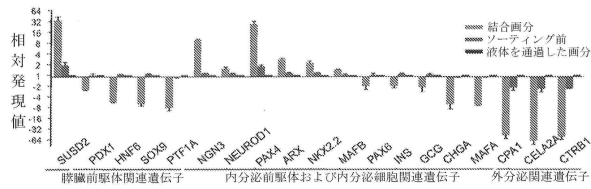
(a)

【 図 8 b 】



(b)

【 図 9 】



膵臓前駆体関連遺伝子 内分泌前駆体および内分泌細胞関連遺伝子 外分泌関連遺伝子

【配列表】

0006294571000001.xml

フロントページの続き

(73)特許権者 517041316

北京瑞普晨創科技有限公司

中華人民共和国 ペキン 100176 ディベロプメント エリア ペキン エコノミック - テ
クノロジカル サウス ロード オブ シーアン ナンバー26 ヤード ビルディング 15
ルーム 102

(74)代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74)代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72)発明者 デン, ホンクイ

中華人民共和国 ペキン 100871 ハイディアン ディストリクト ユィヒユアン ロード
ナンバー5

(72)発明者 リウ, ハイソン

中華人民共和国 ペキン 100871 ハイディアン ディストリクト ユィヒユアン ロード
ナンバー5

(72)発明者 ジュ, チコン

中華人民共和国 ペキン 100871 ハイディアン ディストリクト ユィヒユアン ロード
ナンバー5

(72)発明者 ヤン, ホワン

中華人民共和国 ペキン 100871 ハイディアン ディストリクト ユィヒユアン ロード
ナンバー5

(72)発明者 リアン, ジェン

中華人民共和国 ペキン 100871 ハイディアン ディストリクト ユィヒユアン ロード
ナンバー5

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2014-506457(JP, A)

米国特許出願公開第2015/0010516(US, A1)

LIU Haisong, Systematically labeling developmental stage-specific genes for the study
of pancreatic α -cell differentiation from human embryonic stem cells, Cell Research,
2014年, Vol.24, Page.1181-1200, Published Online 5 September 2014武部貴則, 多能性幹細胞を用いた膵 細胞分化誘導研究の最新動向, Organ Biology, 日本臓器
保存生物医学学会, 2014年 7月10日, Vol.21, No.2, Page.228-236安永正浩, ES細胞から内胚葉系の内蔵細胞をつくる, 蛋白質 核酸 酵素, 2007年 1月
1日, Vol.52, No.1, Page.57-66MATSUDA Hiroataka, A Novel Marker or Human Endometrial Mesenchymal Stem-Like Cells, Cel
l Transplantation, 2012年, Vol.21, Page.2201-2214, Online Prepub Date: March 27, 2
012

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

C12Q 1/68

G01N 33/536

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	用作SUSD2蛋白的标记物		
公开(公告)号	JP6294571B2	公开(公告)日	2018-03-14
申请号	JP2017526737	申请日	2015-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学 北京瑞普晨创科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	デンホンクイ リウハイソン ジュチコン ヤンホワン リアンジェン		
发明人	デン,ホンクイ リウ,ハイソン ジュ,チコン ヤン,ホワン リアン,ジェン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/507 G01N33/5073 G01N33/54326 G01N33/582 G01N2333/705 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/536.D G01N33/536.E C12Q1/68.ZNA.A		
审查员(译)	三木隆		
优先权	201410386506.0 2014-08-07 CN		
其他公开文献	JP2017530370A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过分析从人多能干细胞的诱导定向分化衍生的胰腺内胚层的细胞的基因表达，基因SUSD2富集胰腺内分泌祖细胞和肿瘤胰腺内分泌细胞中表达，这是和其编码蛋白质是在细胞膜上的受体蛋白，相应的蛋白质作为标记胰腺内分泌祖细胞和肿瘤胰腺内分泌细胞的鉴定，发现可应用于筛选或排序，胰腺癌相关细胞的研究在每个发育阶段还有一个重要的意义。用作SUSD2蛋白，具体而言，SUSD2蛋白作为标记物，胰腺内分泌祖细胞和/或肿瘤胰腺内分泌细胞的鉴定，用于筛选或分选使用的标记物，并且，作为标记，所述SUSD2蛋白在编码前体蛋白前体细胞和/或肿瘤的胰腺内分泌细胞的胰腺内分泌mRNA的鉴定使用。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6294571号 (P6294571)
(45) 発行日 平成30年3月14日(2018.3.14)	(24) 登録日 平成30年2月23日(2018.2.23)	
(51) Int. Cl.	F 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	GO 1 N 33/536 E	
	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	
請求項の数 10 (全 21 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-526737(P2017-526737)	(73) 特許権者 507232478	
(22) 出願日 平成27年8月4日(2015.8.4)	北京大学	
(65) 公表番号 特表2017-530370(P2017-530370A)	PEKING UNIVERSITY	
(43) 公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)	中華人民共和国北京市▲海▼淀区▲融▼和▲園▼路5号	
(86) 国際出願番号 PCT/CN2015/085990	No. 5, Yihheyuan Road	
(87) 国際公開日 W02016/019842	, Haidian District,	
(87) 国際公開日 平成28年2月11日(2016.2.11)	Beijing 100871, Ch	
(87) 国際公開日 平成29年2月7日(2017.2.7)	ina	
(31) 優先権主張番号 201410386506.0	(73) 特許権者 517041305	
(32) 優先日 平成26年8月7日(2014.8.7)	北京大学深▲セン▼研究生院	
(33) 優先権主張国 中国(CN)	中華人民共和国 カントン 518055	
	シェンチェン ナンシャン ティストリ	
	クト シーリー ユニバーシティ タウン	
	ベキン ユニバーシティ キャンパス	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 SUSD2タンパク質のマーカとしての使用