(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 5 月 3 日(03.05.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/056997 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/074206

(22) 国際出願日: 2011 年 10 月 20 日(20.10.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-242774 2010 年 10 月 28 日(28.10.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人熊本大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目３９番１号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 粂昭苑(**KUME Shoen**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘二丁目２番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 遠藤 文夫(**ENDO Fumio**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘一丁目１番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 白木 伸明(**SHIRAKI Nobuaki**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘二丁目２番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 白木 恭子(**SHIRAKI Yasuko**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘一丁目１番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 粂 和彦(**KUME Kazuhiko**) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市本荘二丁目２番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 大澤 健一(**OSAWA Kenichi**); 〒1620065 東京都新宿区住吉町１－１１ ＯＳＫビル６０５号 大澤国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

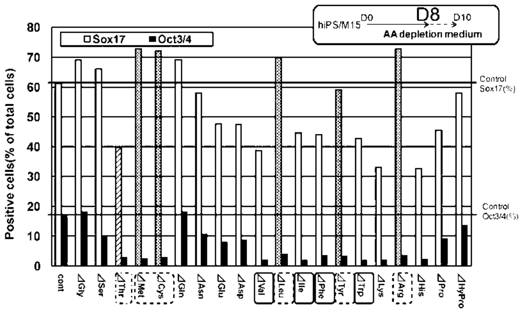
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND CULTURE MEDIUM FOR IMPROVING PLURIPOTENT STEM CELL DIFFERENTIATION INDUCING EFFICIENCY

(54) 発明の名称 : 多能性幹細胞の分化誘導効率を改善するための方法及び培地

[図5]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method and a culture medium which are capable of efficiently inducing the differentiation of pluripotent stem cells such as ES cells and iPS cells into desired cells by a simple means. The differentiation of pluripotent stem cells can be induced by culturing mammal-derived pluripotent stem cells in a differentiation culture medium that does not contain at least one amino acid selected from the group consisting of methionine, leucine, cysteine, tyrosine and arginine. Also provided is a differentiation-inducing culture medium which does not contain at least one amino acid selected from the group consisting of methionine, leucine, cysteine, tyrosine and arginine.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/056997 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

本発明の目的は、簡便な手段で、多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を、効率よく目的の細胞に分化誘導できる方法及び培地を提供する。　メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン、及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することにより、多能性幹細胞を分化誘導できる。また、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン、及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化誘導培地が提供される。

明 細 書

発明の名称 ：

多能性幹細胞の分化誘導効率を改善するための方法及び培地

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞の分化誘導の技術に関する。より詳細には、本発明は、多能性幹細胞、例えば、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞の分化誘導効率を改善するための方法及び培地に関する。

背景技術

[0002] 個体のすべての細胞に分化しうる分化多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ）を保ちつつ、無限に増殖できる自己複製能を併せ持つ胚性幹細胞（ＥＳ細胞）がヒトにおいて樹立されて以来、ＥＳ細胞を、インビトロで主要臓器細胞へと分化誘導する研究が盛んに行われている。

また、体細胞へ特定の遺伝子を導入することにより、ＥＳ細胞のように分化多能性と自己複製能を併せ持つヒト人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）が作られてからは、ＥＳ細胞に加え、ｉＰＳ細胞を用いて、インビトロで主要臓器細胞へと分化誘導する研究が盛んに行われている。

[0003] 例えば、マウスＥＳ細胞は、白血病阻害因子（Ｌｅｕｋｅｍｉａ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｆａｃｔｏｒ：ＬＩＦ）存在下、マウス胎児繊維芽細胞（Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ：ＭＥＦ）等のフィーダー細胞上で共培養することにより未分化性を維持することができ、維持培地よりＬＩＦを除去すると、ＥＳ細胞の分化が誘導されることが知られている（非特許文献１）。

一方、ヒトＥＳ細胞やヒトｉＰＳ細胞も、ＭＥＦ等のフィーダー細胞と共培養することにより未分化のまま維持でき、分化培地に移すことにより分化が誘導されることが報告されている（非特許文献２）。

また、マウスＥＳ細胞においては、スレオニンデヒドロゲナーゼ遺伝子が多量に発現されているため、その増殖は、アミノ酸の一つであるスレオニン

代謝に依存していることが報告されている（非特許文献３）。

[0004] ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞は、その分化多能性のため、発生期の遺伝子機能の研究に有用なモデルであるとともに、医療用の移植可能な細胞源となる可能性があるため再生医療への応用が期待されている。しかし、例えば、糖尿病などの疾患において細胞補充療法や組織移植にＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を用いるためには、分化を制御する必要がある。

そこで、近年、未分化細胞から組織細胞への分化を制御する研究が盛んに行われている。例えば、インビトロで、マウスやヒトのＥＳ細胞からの、内胚葉細胞やインスリン産生細胞の作成が報告されている（非特許文献４、非特許文献５）。

さらに、マウス胎仔由来中腎細胞株（ｍｏｕｓｅ　ｍｅｓｏｎｅｐｈｒｉｃ　ｃｅｌｌ　ｌｉｎｅ）Ｍ１５細胞を支持細胞として用いて、かつアクチビン・ＦＧＦ（ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）・レチノイン酸を培地に加えることにより、ＥＳ細胞から膵前駆細胞を効率よく分化誘導する方法（特許文献１、非特許文献６）や、ｍｍｃＭ１５細胞を支持細胞として用いて、特定の分泌成長因子（ＦＧＦやＢＭＰ（Ｂｏｎｅ　Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｔｉｃ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ））を加除する培養条件により、マウス及びヒトのＥＳ細胞から肝臓細胞を効率よく分化誘導する方法（特許文献２、非特許文献７）が報告されている。

しかしながら、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞から様々な細胞を分化誘導した場合には、一部に未分化な幹細胞が残存・混入してしまう。再生医療においては、このような細胞が癌化する可能性が指摘されるなどその安全性に関する懸念がある。そのため、分化細胞中の未分化細胞を除去する又は分化誘導効率を上げて未分化細胞の混入を防ぐ技術が必要とされている。

[0005] 未分化細胞の混入の確認や選別のために、種々の方法が提案されている。

例えば、未分化特異的マーカーである、Ｓｔｍ１のプロモーターを利用して、分化誘導後に残る未分化ＥＳ細胞を選択することを容易にし、除去することによって、分化誘導後に残る未分化ＥＳ細胞の除去を行う方法がある（

特許文献３）。

さらには、ポドカリキシン様タンパク質を表面上に発現する細胞を同定することにより、未分化型ヒト胚性幹細胞を同定し、それら細胞を単離することによる、未分化型ヒト胚性幹細胞を除去する方法がある（特許文献４）。

[0006] 最近、ヒトＥＳ細胞やヒトｉＰＳ細胞では、細胞株間で分化能に顕著な違いがあり、細胞株毎に特定の系譜に分化する傾向、分化指向性が異なることが報告されている（非特許文献８）。

今後、再生医療分野において、患者由来のｉＰＳ細胞株のバンク化が進むと考えられ、多くの種類のｉＰＳ細胞株を用いて目的の細胞を分化誘導することになると予想される。その際に、株毎の分化指向性のために、株間において分化抵抗性が存在すると、同一条件で分化誘導した場合、分化誘導効率が低下し、未分化細胞が多く混入するなど、最終産物の性質に影響を与えることが予想される。そのため、株間の分化抵抗性を回避して、目的の組織へと効率よく分化誘導できる方法が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：ＷＯ２００６／１２６５７４号公報

特許文献2：ＷＯ２００８／１４９８０７号公報

特許文献3：特開２００５－０９５０２７号公報

特許文献4：特表２００９－５２８８３８号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Smith et al., Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature, 336: 688-90, 1988.

非特許文献2：Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. and Yamanaka S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131: 861-872, 2007.

非特許文献3：Wang et al., Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. Science, 325: 435-439, 2009.

非特許文献4：Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. Development, 131: 1651-1662, 2004.

非特許文献5：D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S et al. Production of pancreatic hormone expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 24: 1392-1401, 2006.

非特許文献6：Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa A., Higuchi, Y., Goto H., Kume, K., and Kume, S. Guided differentiation of ES cells into Pdx1-expressing regional specific definitive endoderm. Stem Cells, 26: 874-885, 2008.

非特許文献7：Yoshida T., Shiraki N., Baba, H., Goto , M., Fujiwara, S., Kume K. and Kume S. The expression patterns of Epiplakin1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. Genes Cells, 13: 667-678, 2008.

非特許文献8：Osafune K., Caron L., Borowiak M., Martinez RJ., Fitz-Gerald CS., Sato Y., Cowan CA., Chien KR. and Melton DA. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. Nat Biotechnol., 26: 313-315, 2008.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 未分化の多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を、インビトロで、特定の組織細胞に分化誘導する場合、癌化しやすいなどの指摘がある未分化細胞が残るという問題がある。さらに、ヒトＥＳ細胞やヒトｉＰＳ細胞では、細胞株毎の分化指向性が異なるため、未分化細胞が残りやすいという問題がある。

本発明の目的は、簡便な手段で、多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ

細胞を、効率よく目的の細胞に分化誘導できる方法及び培地を提供することである。

本発明のさらなる目的は、簡便な手段で、多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を分化誘導する際に、未分化細胞を除去する又は分化誘導効率を上げることにより、未分化細胞の混入を防ぐことができる方法及び培地を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、多能性幹細胞を分化誘導する際に、分化培地中から特定のアミノ酸を除くことにより、効率よく分化誘導できることを見いだし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

（１）培地中に、必須アミノ酸であるメチオニン、ロイシン、及び準必須アミノ酸であるシステイン、チロシン、アルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（２）必須アミノ酸であるメチオニン又はロイシン或いはその両者を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、（１）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（３）メチオニンを含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、（２）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（４）準必須アミノ酸であるシステイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、（１）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（５）哺乳動物由来の多能性幹細胞が、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である、（１）～（４）のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（６）哺乳動物が、ヒト又はマウスである、（５）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（７）哺乳動物由来の多能性幹細胞が、ヒトＥＳ細胞又はヒトｉＰＳ細胞である、（６）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（８）（１）～（４）のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記分化培地で、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を、少なくとも５時間、好ましくは1日間、さらに好ましくは２日間培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（９）（１）～（４）のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記分化培地が、内胚葉分化培地である、多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（１０）（１）～（４）のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記多能性幹細胞を、前もって、必須アミノ酸（スレオニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミン）及び準必須アミノ酸（システイン、チロシン及びアルギニン）を含む分化誘導培地で培養することを含む多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（１１）哺乳動物由来の多能性幹細胞を内胚葉まで分化誘導させる、（１０）に記載の方法、

（１２）さらに、分化した内胚葉を、肝臓分化培地で培養することにより、多能性幹細胞を肝臓細胞まで分化させる、（１１）に記載の方法、

（１３）さらに、分化した内胚葉を、膵臓分化培地で培養することにより、多能性幹細胞を膵臓細胞まで分化させる、（１１）に記載の方法、

（１４）前記肝臓分化培地又は膵臓分化培地が、プロリンを１mM以上１０mM以下の濃度で添加した分化培地である、（１２）又は（１３）に記載の方法、

（１５）多能性幹細胞が、ヒトＥＳ細胞又はヒトｉＰＳ細胞である、（１０）～（１４）のいずれか一つに記載の方法、

（１６）培地中に、必須アミノ酸であるメチオニン、ロイシン、及び準必須アミノ酸であるシステイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれ

る少なくとも一つのアミノ酸を含まない、多能性幹細胞を分化誘導するための培地、

（１７）多能性幹細胞が、ヒト又はマウス由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である、（１６）に記載の培地、及び

（１８）前記分化誘導するための培地が、マウス又はヒト由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を内胚葉に分化誘導するための内胚葉分化培地である、（１６）に記載の培地、

（１９）培地中に、アミノ酸として、必須アミノ酸であるスレオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミンを含み、かつメチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（２０）前記分化培地でＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を少なくとも５時間、好ましくは１日間、更に好ましくは２日間培養することを、前記多能性幹細胞から分化誘導された内胚葉の成形の直前又は形成が確認できる時期に行う、前記（８）に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法、

（２１）培地中に、アミノ酸として少なくとも必須アミノ酸であるスレオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミンを含み、かつメチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない、前記（１６）に記載の多能性幹細胞を分化誘導するための分化誘導培地、

（２２）多能性幹細胞を分化誘導するための、培地中に、メチオニン、ロイシンシステイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない培地の使用、

である。

発明の効果

[0011] 本発明の方法又は培地を用いることにより、多能性幹細胞、例えばＥＳ細

胞やｉＰＳ細胞を、効率よく分化誘導でき、未分化細胞の混入を軽減又は除去できる。また、本発明の方法又は培地を用いることにより、分化誘導効率の向上が達成できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、ヒトＥＳ細胞及びヒトｉＰＳ細胞を内胚葉への分化過程における、Ｓｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の発現を、免疫蛍光染色及びＲＴ－ＰＣＲにより確認したものである。上段は、ヒトＥＳ細胞の、培養６日目（Ｄａｙ６）、８日目（Ｄａｙ８）及び１０日目（Ｄａｙ１０）におけるＳｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の発現を、免疫蛍光染色（Ｓｏｘ１７の発現（赤色）及びＯｃｔ３／４の発現（緑色）、左写真）、及びＲＴ－ＰＣＲ（Ｓｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の発現、右写真）で確認を行った結果である。下段は、ヒトｉＰＳ細胞の、培養４日目（Ｄａｙ４）、６日目（Ｄａｙ６）、８日目（Ｄａｙ８）及び１０日目（Ｄａｙ１０）におけるＳｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の発現を、免疫蛍光染色（Ｓｏｘ１７の発現（赤色）およびＯｃｔ３／４の発現（緑色）、左写真）、及び培養１０日目（Ｄａｙ１０）におけるＳｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の発現をＲＴ－ＰＣＲ（右写真）で確認したものである。

[図2]図２は、ヒトＥＳ細胞及びヒトｉＰＳ細胞の肝臓への分化過程における、ＡＦＰ（α－フェトプロテイン）及びアルブミンの発現を、ＲＴ－ＰＣＲにより確認したものである。左図は、ＡＦＰの発現を見たものであり、右図は、アルブミンの発現を見たものである。

[図3]図３は、ヒトｉＰＳ細胞を用いた内胚葉への分化におけるアミノ酸の影響を調べた結果である。図３Ａは、培養のスケジュールを表した図である。図３Ｂは、コントロール培地での結果を示す（培養４日目（Ｄａｙ４）、６日目（Ｄａｙ６）、８日目（Ｄａｙ８）及び１０日目（Ｄａｙ１０）におけるＳｏｘ１７（赤色）およびＯｃｔ３／４（緑色）の発現）。

[図4]図４は、ヒトｉＰＳ細胞を用いた内胚葉への分化におけるアミノ酸の影響を調べた結果である。培養６日目（Ｄａｙ６）に、アミノ酸除去培地に変

更し、１０日目（Ｄａｙ１０）まで培養したヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行い、内胚葉分化マーカー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の陽性細胞の割合を定量解析した結果である（ＤＡＰＩで染色されたものに対するそれぞれの陽性細胞の割合を算出した）。Ｘ軸は除去したアミノ酸の種類、Ｙ軸は陽性細胞率（％）を示している。

[図5]図５は、ヒトｉＰＳ細胞を用いた内胚葉への分化におけるアミノ酸の影響を調べた結果である。培養８日目（Ｄａｙ８）に、アミノ酸除去培地に変更し、１０日目（Ｄａｙ１０）まで培養したヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行い、内胚葉分化マーカー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の陽性細胞の割合を定量解析した結果である（ＤＡＰＩで染色されたものに対するそれぞれの陽性細胞の割合を算出した）。Ｘ軸は除去したアミノ酸の種類、Ｙ軸は陽性細胞率（％）を示している。

[図6]図６は、メチオニン除去培地（δＭｅｔ培地）を用いて内胚葉へ分化させたヒトｉＰＳ細胞を、抗Ｓｏｘ１７抗体（赤色）及び抗Ｏｃｔ３／４抗体（緑色）を用いて免疫蛍光染色した結果である。

[図7]図７は、ヒトｉＰＳ細胞を用いた肝臓への分化における、メチオニンを除去した内胚葉分化培地の影響を調べた結果である。図７Ａは、培養のスケジュールを示した図である。図７Ｂは、メチオニン除去培地及び種々の濃度のメチオニン添加培地を用いて培養後、肝臓分化培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞のＯｃｔ３／４陽性細胞およびＡＦＰ陽性細胞の割合を表した図である。Ｘ軸にメチオニン添加濃度、Ｙ軸にＯｃｔ３／４またはＡＦＰ陽性細胞の割合を示す（ＤＡＰＩで染色されたものに対するそれぞれの陽性細胞の割合を算出した）。黒色バーはＯｃｔ３／４陽性細胞、白色バーはＡＦＰ陽性細胞を示す。図７Ｃは、メチオニン除去培地及び種々の濃度のメチオニン添加培地を用いて培養後、肝臓分化培地を用いて培養した２０日目（Ｄａｙ２０）のヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色像である。上段が、抗ＡＦＰ抗体を用いて染色した結果であり、ＡＦＰ陽性細胞（緑色）を示しており、下段が、抗Ｏｃｔ３／４抗体で染色した結果であり、Ｏｃｔ３／４陽性細胞（赤

色）を示している。

[図8]図８は、メチオニン除去培地で肝臓へと分化させたヒトｉＰＳ細胞における、各種肝臓マーカーを調べた結果である。図８Ａは、２０日間培養したヒトｉＰＳ細胞を、抗ＡＦＰ抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った結果である。緑色がＡＦＰ陽性細胞、赤色がＯｃｔ３／４陽性細胞である。図８Ｂは、３０日間培養したヒトｉＰＳ細胞を、抗ＡＦＰ抗体及び抗アルブミン抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った結果である。緑色がＡＦＰ陽性細胞、赤色が分泌されたアルブミンである。図８Ｃは、３０日目における、インドシアニングリーン（ＩＣＧ）の取り込みー排泄試験を行った結果である。図８Ｄは、２０日目及び３０日目における、アルブミン分泌量の測定を行った結果である。図８Ｅは、３０日におけるＣＹＰ３Ａ４活性を調べた結果である。図８Ｆは、３０日間培養したヒトｉＰＳ細胞に対してＰＡＳ染色を行った結果である。

[図9]図９は、ヒトｉＰＳ細胞の膵臓細胞への分化における、８日目～１０日目のメチオニン除去の影響を調べた結果である。図９Ａは、上段が、１０日目（Ｄａｙ１０）のヒトｉＰＳ細胞を、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗Ｓｏｘ１７抗体を用いて免疫蛍光染色（赤色がＳｏｘ１７陽性細胞、緑色がＯｃｔ３／４陽性細胞）を行った結果であり、下段が、１３日目（Ｄａｙ１３）のヒトｉＰＳ細胞を、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗Ｐｄｘ１抗体を用いて免疫蛍光染色（赤色がＰｄｘ１陽性細胞、緑色がＯｃｔ３／４陽性細胞）を行った結果である。図９Ｂは、Ｓｏｘ１７、Ｏｃｔ３／４、Ｐｄｘ１のそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った結果を示している（コントロールとして、ＧＡＰＤＨの発現を確認した）。

[図10]図１０は、フィーダーフリーの分化誘導系における、メチオニン除去の影響を調べた結果である。図１０Ａは、培養スケジュールを示している。図１０Ｂは、培養１０日目（Ｄａｙ１０）の細胞を、抗Ｓｏｘ１７抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果を示している。赤色はＳｏｘ１７陽性細胞、緑色はＯｃｔ３／４陽性細胞を示している。図１０Ｃ

は、培養１８日目（Ｄａｙ１８）の細胞を、Ｏｃｔ３／４、アルブミン、ＡＦＰのそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った結果を示している（コントロールとして、ＧＡＰＤＨの発現を確認した）。図１０Ｄは、１７日目（Ｄａｙ１７）、２５日目（Ｄａｙ２５）及び２７日目（Ｄａｙ２７）における、アルブミン分泌量の測定を行った結果である。

[図11]図１１は、ヒトｉＰＳ細胞の肝臓分化におけるプロリン添加の影響を調べた結果である。それぞれの分化培地を用い、２０日間培養した細胞を、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗ＡＦＰ抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った結果を示している。上段はコントロール群、下段はプロリン添加群である。左列はコントロール群、右列はメチオニン除去群である。緑色はＡＦＰ陽性細胞、赤色はＯｃｔ３／４陽性細胞を示す。

[図12]図１２は、ヒトＥＳ細胞を用いた内胚葉への分化におけるアミノ酸除去の影響を調べた結果である。培養８日目（Ｄａｙ８）にアミノ酸除去培地に変更し、１０日目（Ｄａｙ１０）まで培養したヒトＥＳ細胞の内胚葉分化マーカー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の遺伝子発現を、リアルタイムＰＣＲ法を用いて定量解析した結果である。

[図13]図１３は、ヒトｉＰＳ細胞（Ｔｏｅ細胞株）を用いた内胚葉への分化における、４日目～６日目及び８日目～１０日目の、メチオニン除去培地での培養の影響を調べた結果である。図１２Ａは、培養のスケジュールを示した図である。図１２Ｂは、４日目～６日目（Ｄａｙ６）にメチオニン除去培地で培養したヒトｉＰＳ細胞（Ｔｏｅ細胞株）を、図１３Ｃは、８日目～１０日目（Ｄａｙ１０）にメチオニン除去培地で培養したヒトｉＰＳ細胞（Ｔｏｅ細胞株）を、抗Ｓｏｘ１７抗体（赤色）及び抗Ｏｃｔ３／４抗体（緑色）を用いて免疫蛍光染色した結果である。

[図14]図１４は、ヒトｉＰＳ細胞の維持培養過程におけるメチオニン除去が、ヒトｉＰＳ細胞の生育に及ぼす影響を調べた結果である。図１４Ａは、細胞コロニーの明視野像を、図１４Ｂは、定量化した細胞数を示している。

[図15]図１５は、メチオニン除去培地での各処理時間後の細胞増殖及びアポ

トーシスを評価した結果である。図１５Ａは、細胞増殖をＣｌｉｃｋ－ｉＴ　ＥｄＵ細胞増殖アッセイキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて評価した結果であり、図１５Ｂは、アポトーシスをＩｎ　Ｓｉｔｕ細胞死検出キット（ロシュ社）を用いて評価した結果である。

[図16]図１６は、種々のメチオニン除去期間（Ｘ軸）で培養したヒトｉＰＳ細胞を抗Ｓｏｘ１７抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて免疫蛍光染色し、その割合をグラフとして表した結果である。

[図17]図１７は、メチオニンの生体内での代謝経路を示している。

[図18]図１８は、ヒトｉＰＳ細胞の内胚葉分化におけるメチオニン及び／又はメチルドナー除去培地の影響を調べた結果である。図１８Ａは、抗Ｓｏｘ１７抗体（赤色）及び抗Ｏｃｔ３／４抗体（緑色）を用いて免疫蛍光染色した結果である。図１８Ｂは、その定量結果を表したグラフである。

発明を実施するための形態

[0013]　本発明で用いる「多能性幹細胞」とは、自己複製能を有しインビトロにおいて培養することが可能で、かつ、個体を構成する細胞に分化しうる多分化能を有する細胞をいう。具体的には、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞（ＧＳ細胞）、体細胞由来の人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）等をあげることができるが、本発明で特に好ましく用いられるのはｉＰＳ細胞又はＥＳ細胞であり、特に好ましくは、ヒトｉＰＳ細胞及びヒトＥＳ細胞である。

[0014]　本発明で用いるＥＳ細胞は、哺乳類動物由来のＥＳ細胞であればよく、その種類や取得方法などは特に限定されない。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル又はヒト等をあげることができ、好ましくは、マウス又はヒトであり、さらに好ましくはヒトである。

ＥＳ細胞は、一般的には、胚盤胞期の受精卵をフィーダー細胞と一緒に培養し、増殖した内部細胞塊由来の細胞をばらばらにして、さらに、植え継ぐ操作を繰り返し、最終的に細胞株として樹立することができる。このように

、ＥＳ細胞は、受精卵から取得することが多いが、受精卵以外、例えば、脂肪組織、胎盤、精巣細胞から取得することもでき、いずれのＥＳ細胞も本発明の対象である。

[0015] また、ｉＰＳ細胞（人工多能性幹細胞）とは、分化多能性を獲得した細胞のことで、体細胞（例えば、線維芽細胞など）へ分化多能性を付与する数種類の転写因子（分化多能性因子）遺伝子を導入することにより、ＥＳ細胞と同等の分化多能性を獲得した細胞のことである。「分化多能性因子」としては、多くの因子が報告されており、特に限定しないが、例えば、Ｏｃｔファミリー（例えば、Ｏｃｔ３／４）、Ｓｏｘファミリー（例えば、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ１、Ｓｏｘ３、Ｓｏｘ１５及びＳｏｘ１７など）、Ｋｌｆファミリー（例えば、Ｋｌｆ４、Ｋｌｆ２など）、Ｍｙｃファミリー（例えば、ｃ－Ｍｙｃ、Ｎ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃなど）、Ｎａｎｏｇ、ＬＩＮ２８などを挙げることができる。ｉＰＳ細胞の樹立方法については、多くの報告がなされており、それらを参考にすることができる（例えば、Ｔａｋａｈａｓｈｉら，Ｃｅｌｌ ２００６，１２６：６６３－６７６；Ｏｋｉｔａら，Ｎａｔｕｒｅ ２００７，４４８：３１３－３１７；Ｗｅｒｎｉｇら，Ｎａｔｕｒｅ ２００７，４４８：３１８－３２４；Ｍａｈｅｒａｌｉら，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２００７，１：５５－７０；Ｐａｒｋら，Ｎａｔｕｒｅ ２００７，４５１：１４１－１４６；Ｎａｋａｇａｗａら，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００８，２６：１０１－１０６；Ｗｅｒｎｉｇら，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２００８，１０：１０－１２；Ｙｕら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００７，３１８：１９１７－１９２０；Ｔａｋａｈａｓｈｉら，Ｃｅｌｌ ２００７，１３１：８６１－８７２；Ｓｔａｄｔｆｅｌｄら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００８ ３２２：９４５－９４９など）。

[0016] 本発明で用いる「未分化細胞」とは、多分化能を有する細胞を意味し、また、文脈においては、多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を分化誘導処理した後も、分化誘導が起こらず、引き続き多分化能を有している細胞を意味する。

[0017] 哺乳動物由来のＥＳ細胞の培養方法は常法により行うことができる。例えば、フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（ＭＥＦ細胞）を用い、白血病阻害因子、ＫＳＲ（ノックアウト血清代替物）、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、非必須アミノ酸、L-グルタミン、ピルビン酸、ペニシリン、ストレプトマイシン、β－メルカプトエタノールを加えた培地、例えばＤＭＥＭ培地を用いて維持することができる。

ｉＰＳ細胞の培養も定法により行うことができる。例えば、フィーダー細胞としてＭＥＦ細胞を用いて、ｂＦＧＦ、ＫＳＲ（ノックアウト血清代替物）、非必須アミノ酸、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、β－メルカプトエタノールを加えた培地、例えばＤＭＥＭ/Ｆ１２培地を用いて維持することができる。

[0018] 本発明における多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞の分化誘導は、フィーダー細胞を含む培養系、フィーダーフリーの培養系のいずれも含む。フィーダー細胞としては、例えば、ｍｍｃＭ１５細胞をあげることができるが、これに限定されるものではない。また、フィーダーフリーの培養系としては、例えば、擬似基底膜ｓＢＭ（ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｄ　Ｂａｓｅｍｅｎｔ　Ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｓｕｂｓｔｒａｔｕｍ）をあげることができるが、これに限定されるものではない。

本発明で言う多能性幹細胞の「分化」又は「分化誘導」とは、多能性幹細胞が、内胚葉、中胚葉又は外胚葉のいずれかに分化誘導されることを含む意味で用いられ、更にはまた、それらが、いずれかの生体を構成する臓器又は器官細胞へと分化することを含む意味でも用いられる。

[0019] 本発明の培養方法で用いられる培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、ＢＭＥ培地、ＢＧｊＢ培地、ＣＭＲＬ　１０６６培地、Ｇｌａｓｇｏｗ　ＭＥＭ培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ培地、ＩＭＤＭ培地、Ｍｅｄｉｕｍ　１９９培地、Ｅａｇｌｅｓ　ＭＥＭ培地、αＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ培地、ハム培地、ＲＰＭＩ　１６４０培地、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ、およびこれらの混合培

地等をあげることができるが、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。

本発明の培養方法で用いられる培地は、血清含有培地、無血清培地であり得るが、異種成分の排除による細胞移植の安全性の確保という観点からは、無血清培地が好ましい。ここで、無血清培地とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地は無血清培地に該当するものとする。かかる無血清培地としては、例えば、市販のＫＳＲを適量（例えば、１－２０％）添加した無血清培地、インスリンおよびトランスフェリンを添加した無血清培地、細胞由来の因子を添加した培地等をあげることができるが、これらに限定されない。

[0020] 本発明の培地はまた、血清代替物を含んでいても、また含んでいなくともよい。血清代替物は、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、２－メルカプトエタノール又は３’－チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものが可能である。かかる血清代替物は、例えば、国際公開第９３／３０６７９号公報に記載の方法により調製することができるが、市販のものを利用することもできる。かかる市販の血清代替物としては、例えば、上記ＫＳＲがあげられる。

本発明の培地はまた、脂肪酸又は脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、２－メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等、任意の成分を含有できる。ただし、本発明に従って、特定のアミノ酸を培地から除く場合は、この限りではない。

[0021] 本発明においては、多能性幹細胞、例えば、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を分化する際に、特定のアミノ酸を培地より除くことにより、未分化細胞の減少や除去を行うことができ、その結果、分化誘導効率を向上させることができる。

アミノ酸は、一般に、必須アミノ酸（Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ，Ｈｉｓ)及び非必須アミノ酸（Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｔｙｒ、Ａｒｇ、Ｐｒｏ）に分けられる。しかし、非必須アミノ酸の内、Ｃｙｓ及びＴｙｒはそれぞれ、前駆アミノ酸として必須アミノ酸であるＭｅｔ及びＰｈｅが必要であるため、準必須アミノ酸と定義されている。また、Ａｒｇは、未分化細胞（胎児・新生児）においては、アルギニン合成酵素の活性が低いため、未分化細胞においては、準必須アミノ酸と定義できる。

本発明及び本明細書においては、Ｃｙｓ、Ｔｙｒ及びＡｒｇを準必須アミノ酸と呼ぶ。

[0022] 本発明でいう「アミノ酸除去培地（以下、「δ（除去したアミノ酸）培地」と表記する場合がある）」とは、未分化多能性幹細胞の減少又は分化誘導効率を上げることができる、特定のアミノ酸を含有しない分化培地を意味する。分化培地としては、特に限定されないが、例えば消化管、肝臓、膵臓等への分化を望む場合は、特定のアミノ酸を含有しない内胚葉分化培地が該当し、例えば体腔、血管、心臓等への分化を望む場合は、特定のアミノ酸を含有しない中胚葉分化培地、例えば表皮や神経への分化を望む場合は、特定のアミノ酸を含有しない外胚葉分化培地が該当する。その他、特定の器官細胞への分化誘導を行う培地、例えば、肝臓分化培地や膵臓分化培地も、特定のアミノ酸を含有せずかつ未分化多能性幹細胞の減少又は分化誘導効率を上げることができる限り、本発明で言う「アミノ酸除去培地」に該当する。本発明で言う「アミノ酸除去培地」は、特定のアミノ酸を含まない内胚葉分化培地、中胚葉分化培地、及び外胚葉分化培地を含むが、好ましくは、特定のアミノ酸を含有しない内胚葉分化培地である。

[0023] 本発明の「アミノ酸除去培地」において含まれない特定のアミノ酸とは、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンのいずれか一つ、又は、それらの２以上の組み合わせ、或いは、それらのすべての組合せであるアミノ酸（群）である。上記アミノ酸の少なくとも一つが含まれてい

ない分化培地であれば、未分化多能性幹細胞の減少又は分化誘導効率を上げることができるが、特に好ましくは、少なくともメチオニンを含有しない分化培地である。

言い換えれば、分化培地は一般に、アラニンを除くすべての必須アミノ酸、及び非必須アミノ酸を含有するが、本発明の「アミノ酸除去培地」は、必須アミノ酸であるメチオニン、ロイシン、及び準必須アミノ酸であるシステイン、チロシン、アルギニン、からなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含有しない分化培地である。

本明細書においては、「分化培地」又は「分化誘導培地」は、互いに同じ意味を表すものであり、相互に交換して使用できる。

[0024] 「培地中に、アミノ酸として少なくとも必須アミノ酸であるスレオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミンを含み、かつメチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない」とは、培地中に、少なくとも上記８種の必須アミン酸を含み、更にそれ以外の任意のアミノ酸を含むことができるが、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸又はそれらの２以上の組合せのアミノ酸群を培地中に含まないことを意味する。例えば、メチオニン以外の上記１１種類のアミノ酸を含むがメチオニンを含まない培地、それに更に非必須アミノ酸を含む培地をあげることができる。

[0025] 本発明の「アミノ酸除去培地におけるアミノ酸を含まない」とは、特定のアミノ酸を、全く含まない場合に加えて微量に含有する場合を含む。微量に含有する場合とは、特定のアミノ酸を低濃度でしか含有しないために、分化において未分化多能性幹細胞の減少又は除去或いは分化誘導効率を上げることができる場合を含む。より具体的には、本発明の「アミノ酸除去培地におけるアミノ酸を含まない」とは、特定のアミノ酸のいずれかを分化培地中に、全く含まない場合の他、２０μＭ以下、好ましくは１０μＭ以下、さらに

好ましくは1μM以下、最も好ましくは0．1μM以下含有することを意味する。

[0026] 本発明においては、多能性幹細胞を、本発明の「アミノ酸除去培地」において、少なくとも5時間、好ましくは少なくとも1日、更に好ましくは少なくとも2日培養する。また、本発明の「アミノ酸除去培地」で培養する期間は、好ましくは4日以下、特に好ましくは2日以下である。すべての培養期間、例えば、分化誘導初期の0～10日間のすべてにおいて、本発明の「アミノ酸除去培地」で多能性幹細胞を培養すると、細胞の成長が妨げられ細胞が成育できない。

本発明においては、多能性幹細胞を必須アミノ酸及び準必須アミノ酸を含む分化培地で培養した後、本発明の「アミノ酸除去培地」で培養することが好ましい。

[0027] 多能性幹細胞の分化誘導において、本発明の「アミノ酸除去培地」中で多能性幹細胞を培養する時期は、特に制限はなく、未分化多能性幹細胞の減少又は除去或いは分化誘導効率を上げることができる限り、分化誘導の初期（内胚葉、中胚葉又は外胚葉への分化の時期）であっても又は後期（内胚葉、中胚葉又は外胚葉から各種細胞への分化の時期）であってよいが、好ましくは、内胚葉、中胚葉又は外胚葉への分化の時期であり、さらに好ましくは、多能性幹細胞を内胚葉、中胚葉又は外胚葉に分化させる培養期間の後半の時期、言い換えれば、内胚葉、中胚葉又は外胚葉の形成の直前又は形成が確認できる時期である。

ヒトＥＳ細胞やヒトｉＰＳ細胞から肝臓細胞又は膵臓細胞への分化を例とした場合は、好ましくは、ＥＳ細胞／ｉＰＳ細胞から内胚葉へと分化する分化誘導の初期の時期であり、さらに好ましくは内胚葉への分化誘導の終期、例えば、培養4日目から10日目までの間の数日間、例えば、培養4日目～6日目又は培養8日目～10日目までの時期であり、最も好ましくは培養8日目～10日目までの時期である。

また、分化させた細胞を移植する場合は、移植直前において本発明の「ア

ミノ酸除去培地」で培養することにより、移植細胞より、未分化多能性幹細胞を減少又は除去することが可能である。

[0028] 本発明における多能性幹細胞の肝臓細胞又は膵臓細胞への分化誘導においては、本発明の「アミノ酸除去培地」で多能性幹細胞を培養した後に、プロリンを添加した分化培地で培養することができ、それにより、さらに分化誘導効率の改善が期待できる。

分化培地に添加するプロリンの量は、１．０mM以上１００mM以下、好ましくは、１．０mM以上５０mM以下、さらに好ましくは、１．０mM以上１０mM以下である。

実施例

[0029] 以下、実施例により、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0030] （Ａ）材料と方法

（１）ヒトＥＳ細胞の維持・培養

ヒトＥＳ細胞（ｋｈＥＳ３）（Biochem Biophys Res Commun. 2006, 345(3), 926-32）は、中辻博士と末盛博士（京都大学）より分与されたものを、ヒトＥＳ細胞の使用に関する指針（文部科学省発行）に従って使用した。

未分化ヒトＥＳ細胞は、２０％　ＫＳＲ（ノックアウト血清代替物；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、１００μＭ　非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ；ＧＩＢＣＯ社）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ナカライテスク社）、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌ　ペニシリン及び５０μｇ／ｍｌ　ストレプトマイシン（ナカライテスク社）、１００μＭ　β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ社)及び５ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ（ｂｏｖｉｎｅ　ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）を添加したＫｎｏｃｋｏｕｔ　Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）中にて、支持細胞であるマウス胎児線維芽細胞（ＭＥＦ）のフィーダー層上で、３７℃、５％CO_2条件下で培養した。ヒトＥＳ細胞の継代には、２０％　ＫＳＲおよび１ｍＭ　$CaCl_2$を含むＰＢＳ内で、３７℃、５分間

、０．２５％トリプシンと０．１ｍｇ／ｍｌ　コラゲナーゼＩＶで処理することによりヒトＥＳ細胞コロニーを支持細胞層から分離し、その後、培養液を加え、ピペットで優しく数回吸引することでＥＳ細胞塊を小片にした（５～２０細胞）。継代は１：２の分割比で実施した。

[0031] （２）ヒトｉＰＳ細胞の維持・培養

ヒトｉＰＳ細胞株（２０１Ｂ７）は、高橋博士（Takahashi K et al. Cell. 131(5): 861-72, 2007）より分与されたものを使用した。また、ヒトｉＰＳ細胞（Ｔｏｅ細胞株）（ＪＣＲＢ１３３８）は、梅澤明弘博士（国立成育医療センター研究所）らが独立行政法人 医薬基盤研究所に寄託したものの分譲を受けて使用した。ただし、以下の実施例の記載において、特に断りのない限りは、用いたヒトｉＰＳ細胞は、２０１Ｂ７である。

未分化のヒトｉＰＳ細胞も、ヒトＥＳ細胞と同様にして、維持・培養を行った。

[0032] （３）フィーダー細胞（ｍｍｃＭ１５細胞）の調整

ｍｍｃＭ１５細胞（ｍｏｕｓｅ　ｍｅｓｏｎｅｐｈｒｏｓ）は、登録番号ＥＣＡＣＣ９５１０２５１７として、細胞バンク（ＣＡＭＲ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　（ＥＣＡＣＣ，　Ｓａｌｉｓｂｕｒｙ，　Ｗｉｌｔｓｈｉｒｅ））に登録されている。Ｍ１５細胞は文献（Larsson, S. H., Charlieu, J. P., Miyagawa, K., et al. (1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. Cell 81, 391-401）の記載に従って入手可能である。

[0033] （４）免疫細胞化学検査（免疫蛍光染色）

全マウント免疫組織化学検査を行う際、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞をＮｕｎｃ　Ｔｈｅｒａｎｏｘ　Ｃｏｌｅｒｓｌｉｐｓ　２４ウェルタイプ（Ｎｕｎｃ社）上に置いた。細胞を、４％　パラホルムアルデヒド中、室温で２０分間固定し、０．１％　Ｔｗｅｅｎ含有リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ－Ｔ）で充分に洗浄した。１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含有するＰＢＳ中、室

温で１０分間浸透させ、ブロッキング溶液（×５ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｏｎｅ、ナカライタスク社）で１時間インキュベートした後、ブロッキング溶液中の一次抗体を試料に添加し、４℃で一夜インキュベートした。試料をＰＢＳ－Ｔで充分に洗浄し、ＰｅｒｍａＦｌｕｏｒ Ａｑｕｅｏｕｓ Ｍｏｕｎｔｉｎｇ培地（ＩＭＭＵＮＯＮ社）でマウントした。共焦点画像をＬｅｉｃａ Ｓｐｅｃｔｒａｌ Ｃｏｎｆｏｃａｌ Ｓｃａｎｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ、ＴＣＳ－ＳＰ２（Ｌｅｉｃａ社）を用いて取得した。

検出に用いた抗体は以下の通りである。ウサギ抗α－フェトプロテイン（ＡＦＰ、Ｄａｋｏ社）、ヤギ抗アルブミン（Ｓｉｇｍａ社）、ウサギ抗Ｐｄｘ１（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ社）、マウス抗Ｏｃｔ３／４（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ社）、ヤギ抗Ｓｏｘ１７（Ｒ＆Ｄ社）。二次抗体はＡｌｅｘａ５６８標識ヤギ抗ウサギ抗体とロバ抗ヤギ抗体、及びＡｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗マウス抗体とヤギ抗ウサギ抗体、ロバ抗ヤギ抗体（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ社）を用いた。細胞はＤＡＰＩ（Ｒｏｃｈｅ社）で対比染色した。また、Ｓｏｘ１７およびＯｃｔ３／４陽性細胞数については、ＩｍａｇｅＸｐｒｅｓｓ（モレキュラーデバイス社）を用いて定量化した。

[0034] （５）インドシアニングリーンテスト

インドシアニングリーン（ＩＣＧ；第一三共株式会社）を培地で希釈し、最終濃度を１ｍｇ／ｍｌとした。ＩＣＧテスト溶液を、分化したｉＰＳ細胞に加え、３７℃、５％CO_2下で３０分間インキュベートした。その後、ＩＣＧ含有培地を除去し、ＨＢＳＳで３回洗浄した。ＩＣＧ処理後２４時間の間、ＩＣＧの細胞取り込みを、電子顕微鏡により観察した。

[0035] （６）アルブミン分泌テスト

培地を新鮮な培地に交換し、２４時間もしくは４８時間培養した後、培養上清を回収した。培養上清中へ分泌されたヒトアルブミンを、ＥＬＩＳＡ Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｂｅｔｈｙｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）で測定した。

[0036] （７）ＣＹＰ活性測定

チトクロームＰ４５０活性を確認するために、Ｐ４５０－Ｇｒｏ（商標） ＣＹＰ３Ａ４ Ａｓｓａｙ ｗｉｔｈ Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ－ＩＰＡ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を用いた。分化誘導３０日目に、適当な発光ＣＹＰ基質を含む培地に交換した。製造者使用説明書に従って、細胞を、３７℃で３時間培養した後、培養上清を同量の検出試薬と混合した。

[0037] （８）ＰＡＳ染色（過ヨウ素酸シッフ染色）

分化した細胞中でのグリコーゲン貯蔵の検出のために、ＰＡＳ染色キット（武藤化学株式会社）を用いた。３０日間培養した細胞を、３．３％ ホルマリン中で１０分間固定した後、製造者使用説明書に従って染色を行った。

[0038] （９）リアルタイムＰＣＲ分析

ＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ－ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いてＥＳ細胞からＲＮＡを抽出した後、ＲＮＡをＤＮＡ分解酵素（Ｑｉａｇｅｎ社）で処理した。ＲＴ反応を調べるため、ＭＭＬＶ逆転写酵素（東洋紡株式会社）とｏｌｉｇｏ ｄＴ ｐｒｉｍｅｒ（東洋紡株式会社）を用いて３μｇのＲＮＡを逆転写した。５倍に希釈したｃＤＮＡ（ＲＴプロダクトの１％）の１μｌをＰＣＲ分析に使用した。定量ＲＴ－ＰＣＲを用いて、各アミノ酸培地の肝臓分化マーカー（ＡＦＰ、Ａｌｂｕｍｉｎ）の発現を定量し、経時的に比較した。

[0039] （Ｂ）実施例

実施例１：ヒトＥＳ細胞及びヒトｉＰＳ細胞の内胚葉への分化

材料と方法（１）に従って維持・培養したヒトＥＳ細胞（ＫｈＥＳ３株）及びヒトｉＰＳ細胞（２０１Ｂ７）を内胚葉に分化させた。

ヒトＥＳ細胞／ｉＰＳ細胞を播種する前日に、ｍｍｃＭ１５細胞を５．０×１０^{4}細胞／ウェルの細胞密度で、ゼラチンコート済の９６ウェルプレートに事前に播種しておいた（ｍｍｃＭ１５プレート）。

ヒトＥＳ細胞／ｉＰＳ細胞は、分化誘導に先立ち、ＲｅｐｒｏＳｔｅｍ培地（ＲｅｐｒｏＣｅｌｌ社）にＲｏｃｋ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｙ２７６３２；１０μＭ、和光純薬工業株式会社）及び５ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦを添加

した培地中で１日培養した。

分化誘導のため、ヒトＥＳ細胞／ｉＰＳ細胞を、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて培養皿から剥離し、マイトマイシンＣ処理をしたｍｍｃＭ１５細胞プレートに、１ｘ１０^{4}細胞／ウェルの細胞濃度にて播種した。

[0040] ＥＳ／ｉＰＳ細胞は、播種の翌日、ＰＢＳで１回洗浄した後、分化培地に移した。内胚葉分化のための分化培地は、１００ｎｇ／ｍｌアクチビン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、Ｂ２７培地添加物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン（ナカライテスク社）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ナカライテスク社）、及び１００μＭ　β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ社)を含んだＰＲＭＩ１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いた。培地は、一日おきに、新しい培地と交換した。

[0041] ヒトＥＳ細胞／ｉＰＳ細胞を、分化培地で１０日間培養した。ヒトＥＳ細胞については、分化培地に移してから、培養６日目（Ｄａｙ６）、８日目（Ｄａｙ８）及び１０日目（Ｄａｙ１０）のそれぞれについて、抗Ｓｏｘ１７抗体及びＯｃｔ３／４抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。また、ヒトｉＰＳ細胞については、培養４日目（Ｄａｙ４）、 培養６日目（Ｄａｙ６）、８日目（Ｄａｙ８）及び１０日目（Ｄａｙ１０）について、Ｓｏｘ１７及びＯｃｔ３／４の免疫蛍光染色を行った。

結果を図１に示す。免疫蛍光染色の結果、ヒトＥＳ細胞及びヒトｉＰＳ細胞ともに、培養１０日目にはＳｏｘ１７（赤色）陽性の内胚葉細胞が確認できた。

[0042] また、材料と方法（９）に従い、Ｓｏｘ１７、Ｏｃｔ３／４のそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った（コントロールとして、ＧＡＰＤＨの発現を確認した）。結果を図１に示す。ＲＴ－ＰＣＲの結果、培養１０日目（Ｄａｙ１０）のヒトＥＳ細胞では未分化細胞マーカーのＯｃｔ３／４の発現が消失しているが、ヒトｉＰＳ細胞の場合は依然として発現が残っていた

。このことから、ヒトｉＰＳ細胞株（２０１Ｂ７）はヒトＥＳ細胞株（ＫｈＥＳ３株）と比べて、内胚葉への分化に対して抵抗性があることが示唆された。

[0043] 実施例２：ヒトＥＳ細胞及びヒトｉＰＳ細胞の肝臓への分化

実施例１と同様にして、内胚葉分化培地で１０日間培養した後、培地を肝臓分化培地に変更した。肝臓分化培地は、１μＭ　デキサメタゾン（Ｓｉｇｍａ社）、１０μ／ｍｌ　ヒト組換えＨＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社）、０．５％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ社）、０．５ｍＭ　ニコチンアミド（Ｓｉｇｍａ社）、０．２ｍＭ　アスコルビン酸（Ｓｉｇｍａ社）、１０％　ＫＳＲ、２０００ｍｇ／ｌ　グルコース、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン（ナカライテスク社）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ナカライテスク社）、及び１００μＭ　β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ社)を含んだＤＭＥＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いた。培地は、２９日目まで、一日おきに新しい培地に交換した。

[0044] 材料と方法（９）に従い、未熟肝臓細胞マーカーであるＡＦＰ及び成熟肝臓細胞マーカーであるアルブミンのそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った。結果を図２に示す。黒色バーがヒトＥＳ細胞であり、白色バーがヒトｉＰＳ細胞である。

その結果、ＡＦＰはすべての培養期間において、ｉＰＳ細胞株の方がＥＳ細胞株よりも発現量が低かった。 さらに、アルブミンに関しては、ｉＰＳ細胞ではＥＳ細胞と比較して顕著な低発現を示した。これらの結果から、ヒトｉＰＳ細胞株（２０１Ｂ７）はヒトＥＳ細胞株（ＫｈＥＳ３株）と比べて、内胚葉のみならず肝臓への分化に対しても抵抗性があることが示唆された。

[0045] 実施例３：ヒトｉＰＳ細胞を用いた、内胚葉への分化におけるアミノ酸の影響

アミノ酸を１種類ずつ除去した内胚葉分化培地を用いてヒトｉＰＳ細胞を内胚葉に分化誘導した。内胚葉への分化誘導は、ｍｍｃＭ１５細胞を用いた内胚葉分化誘導法を用いた（非特許文献６参照）。

培地は、培養時期に応じて以下の培地を用いた。内胚葉分化培地として、培養開始（Ｄａｙ０）から培養６日目（Ｄａｙ６）又は８日目（Ｄａｙ８）までは、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン（ＧＩＢＣＯ社）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ＧＩＢＣＯ社）、１００μＭ　β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ社)、非必須アミノ酸（ＧＩＢＣＯ社）、１００ｎｇ／ｍｌ　アクチビン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、及びＢ２７培地添加物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を添加したＰＲＭＩ１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いた。

内胚葉分化培地として、培養６日目（Ｄａｙ６）又は８日目（Ｄａｙ８）から培養１０日（Ｄａｙ１０）までは、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００μＭ　β－メルカプトエタノール、１００ｎｇ／ｍｌ　アクチビン、及びＢ２７培地添加物を添加したＰＲＭＩ　１６４０培地から１種類ずつアミノ酸を除去したアミノ酸除去培地又はアミノ酸を除去していない培地（コントロール培地）を用いた。

[0046]　具体的には、ゼラチンコートした９６ウェルプレートに、支持細胞としてｍｍｃＭ１５細胞を播種した。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μＭ）で処理し、０．２５％　トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞を、ｍｍｃＭ１５細胞上に1×10^4個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞を１０μＭ　Ｙ２７６３２、５ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦを添加したＥＳ培地（ＲｅｐｒｏＳｔｅｍ、ＲｅｐｒｏＣｅｌｌ社）で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後にＰＢＳで一回洗浄後に、内胚葉分化培地に培地を変更した（Ｄａｙ０)。培養６日目又は培養８日目まで内胚葉分化培地を１日おきに交換し、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。培養６日目又は培養８日目に、アミノ酸除去培地又はコントロール培地に培地を変更した。アミノ酸除去培地又はコントロール培地を用いて培養１０日目までヒトｉＰＳ細胞を培養した。培養１０日目に、ヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行い、内胚葉分化マーカ

ー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の陽性細胞の割合を定量解析した。ＤＡＰＩで染色されたものに対するそれぞれの陽性細胞の割合を算出した。

[0047] 図３Ａに、培養のスケジュールを示す。コントロール培地における、免疫蛍光染色の結果を図３Ｂに示す。

また、内胚葉分化マーカー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の陽性細胞の割合を定量解析した結果を図４に示す。各陽性細胞の割合を、各アミノ酸除去培地とコントロールとの間で比較した。Ｘ軸は除去したアミノ酸の種類、Ｙ軸は陽性細胞率（％）を示している。黒色バーはＯｃｔ３／４陽性細胞、白色バーはＳｏｘ１７陽性細胞を示す。

６日目〜１０日目の間のアミノ酸除去は、Ｏｃｔ３／４陽性細胞、Ｓｏｘ１７陽性細胞の割合に影響した。各必須アミノ酸（Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ，Ｈｉｓ)及び準必須アミノ酸（Ｃｙｓ、Ｔｙｒ、Ａｒｇ））の除去はＯｃｔ３／４陽性細胞率を減少させた。Ｓｅｒを除くいずれのアミノ酸除去においてＳＯＸ１７陽性細胞率は増加しなかった

[0048] 実施例４：ヒトｉＰＳ細胞の内胚葉への分化における、８日目〜１０日目の間のアミノ酸除去の影響

実施例３と同様にして、ヒトｉＰＳ細胞を用いて、内胚葉分化における、８日目〜１０日目の間のアミノ酸除去の影響を確認した。ただし、ｍｍｃＭ１５細胞を用いた内胚葉分化誘導法を用いて８日目（Ｄａｙ０〜Ｄａｙ８）まで通常培地で培養した後、８日目〜１０日目（Ｄａｙ８〜Ｄａｙ１０）までアミノ酸除去培地又はコントロール培地に変更し、ヒトｉＰＳ細胞を培養した。

１０日目（Ｄａｙ１０）に、ヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行い、Ｓｏｘ１７陽性細胞とＯｃｔ３／４陽性細胞の割合を定量した。各陽性細胞の割合を、各アミノ酸除去培地とコントロール培地との間で比較した。結果を、図５に示す。Ｘ軸は各除去アミノ酸、Ｙ軸は陽性細胞率（％）を示す。黒色

バーはＯｃｔ３／４陽性細胞、白色バーはＳｏｘ１７陽性細胞を示す。

８日目～１０日目の間のアミノ酸除去は、Ｏｃｔ３／４陽性細胞、Ｓｏｘ１７陽性細胞の割合に影響した。非特許文献２において、マウスＥＳ細胞の生存に必須だと報告があったＴｈｒを除去した培地では、Ｏｃｔ３／４陽性細胞とともにＳｏｘ１７陽性細胞数も減少するため、選択培地としては不向きであった(斜線バー)。各必須アミノ酸（Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ，Ｈｉｓ)及び準必須アミノ酸（Ｃｙｓ、Ｔｙｒ、Ａｒｇ）の除去はＯｃｔ３／４陽性細胞率を顕著に減少させた。Ｇｌｙ，Ｓｅｒ，Ｍｅｔ，Ｃｙｓ，Ｇｌｎ，Ｌｅｕ又はＡｒｇの除去はＳｏｘ１７陽性細胞率を増加させた。Ｏｃｔ３／４の減少とＳｏｘ１７の増加の両方を示したのは、Ｍｅｔ、Ｃｙｓ、Ｌｅｕ、Ａｒｇを除去した培地（ドッドバー)であり、Ｓｏｘ１７の変化なくＯｃｔ３／４の減少を示したのがＴｙｒを除去した培地（ドッドバー)であった。

[0049] ８日目（Ｄａｙ８）～１０日目（Ｄａｙ１０）の間、メチオニン除去培地（δＭｅｔ培地）で培養して内胚葉へ分化させたヒトｉＰＳ細胞を免疫蛍光染色したものを図６に示す。コントロール培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞には、Ｏｃｔ３／４陽性細胞が残存し、Ｓｏｘ１７陽性細胞と混在している。一方、メチオニン除去培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞にはＯｃｔ３／４陽性細胞の残存を認めず、Ｓｏｘ１７陽性細胞が均一に存在している。

[0050] 実施例５：ヒトｉＰＳ細胞の肝臓細胞への分化における、８日目～１０日目の間のメチオニン除去の影響

ヒトｉＰＳ細胞の内胚葉分化過程におけるメチオニン濃度変化のヒトｉＰＳ細胞の肝臓への分化に対する影響を調べるために、メチオニン除去培地及び任意の濃度のメチオニン含有培地で８日目（Ｄａｙ８）～１０日目（Ｄａｙ１０）まで処理した後、肝臓分化培地で培養した場合の、肝臓マーカーであるＡＦＰの発現変化を調べた。８日目～１０日目の期間のメチオニン添加濃度は、それぞれ1、０．１、１．０、５．０、１０．０、２０．０、５０

．０、１００、２００及び５００μＭとした。

実施例４と同様にして、ｍｍｃＭ１５細胞を用いて、８日目までヒトｉＰＳ細胞を内胚葉に分化誘導し、８日目（Ｄａｙ８）～１０日目（Ｄａｙ１０）まで、メチオニン除去培地及び任意の濃度のメチオニン含有培地に培地を変更し、３７℃、５％ＣＯ$_2$下で１０日目（Ｄａｙ１０）まで培養した。

[0051]　１０日目（Ｄａｙ１０）に肝臓分化培地（１０％　ＫＳＲ、２０００ｍｇ／ｌ　Ｄ－グルコース、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００μＭ　β－メルカプトエタノール、１０μ／ｍｌ　ヒト組換えＨＧＦ、及び１μＭ　デキサメタゾンを含んだＭＥＭＥ培地（以下「２０００ＫＳＲ－ＤＭＥＭ培地」という。）に培地を変更し、３７℃、５％ＣＯ$_2$下で２０日目（Ｄａｙ２０）まで培養した。１０日目（Ｄａｙ１０）～２０日目（Ｄａｙ２０）の期間、培地を1日おきに交換した。２０日目で（Ｄａｙ２０）で、ヒトｉＰＳ細の免疫蛍光染色を行い、それぞれのメチオニン濃度毎にＯｃｔ３／４陽性細胞およびＡＦＰ陽性細胞の割合を比較した。結果を図７に示す。

図７Ｂの結果より、以下のことがわかった。メチオニン濃度に依存して、２０日目におけるＯｃｔ３／４陽性細胞の割合が増加していた。また、ＡＦＰ陽性細胞の割合は５０μＭ以上のメチオニン添加で減少していた。

また、図７Ｃより、以下のことが確認された。メチオニン濃度に依存して、２０日目（Ｄａｙ２０）におけるＯｃｔ３／４陽性細胞数が増加している。メチオニン濃度０μＭ～０．１μＭではＯｃｔ３／４陽性細胞の残存はわずかで、ＡＦＰ陽性細胞が均一に存在している。メチオニン濃度１μＭ～２０μＭでは、Ｏｃｔ３／４陽性細胞数が軽度の増加を示すが、ＡＦＰ陽性細胞数の減少を認めない。５０μＭ 以上のメチオニン添加ではＯｃｔ３／４陽性細胞の顕著な増加とＳｏｘ１７陽性細胞の顕著な減少を認める。

[0052] 実施例６：ヒトｉＰＳ細胞の肝臓細胞への分化における、メチオニン除去の影響

実施例４と同様にして、ｍｍｃＭ１５細胞を用いて、８日目までヒトｉＰ

Ｓ細胞を内胚葉に分化誘導し、８日目～１０日目までは、メチオニン除去培地（δＭｅｔ培地）又はコントロール培地に培地を変更し、３７℃、５％CO_2下で培養した。

１０日目（Ｄａｙ１０）に肝臓分化培地（２０００ＫＳＲ－ＤＭＥＭ培地）に培地を変更し、３７℃、５％CO_2下で３０日目（Ｄａｙ３０）まで培養した。１０日目（Ｄａｙ１０）～３０日目（Ｄａｙ３０）の期間、培地を1日おきに交換した。

[0053] （実施例６－１）

２０日間培養したヒトｉＰＳ細胞を、抗ＡＦＰ抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った。結果を図８Ａ示す。コントロール培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞では、２０日目（Ｄａｙ２０）においてＯｃｔ３／４陽性細胞の残存を認めたが、これに対して、δＭｅｔ培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞では、２０日目にけるＯｃｔ３／４陽性細胞の残存を認めなかった。

（実施例６－２）

３０日間培養したヒトｉＰＳ細胞を、抗ＡＦＰ抗体及び抗アルブミン抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った。結果を図８Ｂに示す。コントロール培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞のものと同様にδＭｅｔ培地を用いて培養したヒトｉＰＳ細胞においても、３０日目（Ｄａｙ３０）においてアルブミン陽性細胞が確認できた。

[0054] （実施例６－３）

材料と方法（５）に従い、３０日目（Ｄａｙ３０）における、インドシアニングリーン（ＩＣG）の取り込み－排泄試験を行った。結果を図８Ｃに示す。

上段はコントロール培地で培養後、肝臓分化培地で培養したヒトｉＰＳ細胞（Ｄａｙ３０）、下段はδＭｅｔ培地で培養後、肝臓分化培地で培養したヒトｉＰＳ細胞（Ｄａｙ３０)である。左欄は、ＩＣＧ処理後０時間、右欄は、ＩＣＧ処理後２４時間である。

コントロール培地で培養したヒトｉＰＳ細胞及びδＭｅｔ培地で培養したヒトｉＰＳ細胞の両方で、ＩＣＧの取り込みと、２４時間後の排泄を認めた。

（実施例６－４）

材料と方法（６）に従い、２０日目（Ｄａｙ２０）及び３０日目（Ｄａｙ３０）における、アルブミン分泌量の測定を行った。２０日目及び３０日目で、培地交換４８時間後の培養液中のアルブミン量を測定し、２日間に分泌されるアルブミン量を定量した（ｎ＝４）。結果を図８Ｄに示す。δＭｅｔ培地で培養したヒトｉＰＳ細胞では、コントロールに比較して顕著に高いアルブミン分泌活性を示した。

[0055] （実施例６－５）

材料と方法（７）に従い、３０日目（Ｄａｙ３０）におけるＣＹＰ３Ａ４活性を調べた。結果を図８Ｅに示す。δＭｅｔ培地で培養したヒトｉＰＳ細胞では、コントロール培地（ｃｔ）に比較して高いＣＹＰ３Ａ４活性を示した。

（実施例６－６）

材料と方法（８）に従い、３０日間（Ｄａｙ３０）培養したヒトｉＰＳ細胞に対してＰＡＳ染色を行った。結果を図８Ｆに示す。δＭｅｔ培地で培養したものは、ＰＡＳ陽性細胞が存在し、一部は、二核細胞（ｂｉｎｕｃｌｅａｒ ｃｅｌｌ）であった（矢印）。

[0056] 実施例７：ヒトｉＰＳ細胞の膵臓細胞への分化における、８日目～１０日目の間のメチオニン除去の影響

ヒトｉＰＳ細胞の内胚葉分化過程におけるメチオニン除去がヒトｉＰＳ細胞の膵臓への分化に対する影響を調べるために、コントロール培地又はメチオニン除去培地で８日目～１０日目まで処理した後、膵臓分化培地で１３日目まで培養し、機能性膵β細胞マーカーであるＰｄｘ１の発現を調べた。

実施例４と同様にして、ｍｍｃＭ１５細胞を用いて、８日目までヒトｉＰＳ細胞を内胚葉に分化誘導し、８日目～１０日目まで、コントロール培地又

はメチオニン除去培地に培地を変更し、３７℃、５％CO_2下で１０日目まで培養した。

[0057] １０日目に膵臓分化培地（２０００ｍｇ／ｌ Ｄ－グルコース、５０ｕｎｉｔｓ／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン（ＧＩＢＣＯ社）、２ｍＭ Ｌ－グルタミン（ＧＩＢＣＯ社）、１００μＭ β－メルカプトエタノール（ＳＩＧＭＡ社）、非必須アミノ酸（ＧＩＢＣＯ社）、１μＭレチノイン酸、５０ｎｇ／ｍｌ Ｆｇｆ１０（Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－１０）、０．２５μＭ ＫＡＡＤ－シクロパミン、及びＢ２７培地添加物を添加したＤＭＥＭ培地）に移した。１０日目～１３日目の間、毎日新しい培地と交換した。

[0058] １０日目（Ｄａｙ１０）のヒトｉＰＳ細胞を、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗Ｓｏｘ１７抗体を用いて、１３日目（Ｄａｙ１３）のヒトｉＰＳ細胞を、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗Ｐｄｘ１抗体を用いて、免疫蛍光染色をした。結果を、図９Ａ示す。

また、材料と方法（９）に従い、Ｓｏｘ１７、Ｏｃｔ３／４、Ｐｄｘ１のそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った（コントロールとして、ＧＡＰＤＨの発現を確認した）。結果を図９Ｂ（Ｄａｙ１０）及び図９Ｃ（Ｄａｙ１３）に示す。

免疫蛍光染色の結果より、メチオニン除去群では、Ｏｃｔ３／４陽性細胞が顕著に減少していた。また、ＲＴ－ＰＣＴ解析でも同様の結果が得られた。

[0059] 実施例８：フィーダーフリーの分化誘導系における、メチオニン除去の影響

フィーダー細胞（ｍｍｃＭ１５細胞）を用いないヒトｉＰＳ細胞の内胚葉分化過程におけるメチオニン除去がヒトｉＰＳ細胞の肝臓分化に及ぼす影響を調べた。具体的には、ＲＰＭＩ１６４０培地で４０倍希釈したマトリゲル（ＢＤ）で一晩コートした９６ウェルプレートを培養に用いた。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μＭ）で処理し、０．２５％ トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞を、マトリゲル

コートプレートに１×１０^{5}個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞を１０μＭ　Ｙ２７６３２、５ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦを添加したＥＳ培地（ＲｅｐｒｏＳｔｅｍ、ＲｅｐｒｏＣｅｌｌ社）で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後にＰＢＳで一回洗浄後に、内胚葉分化培地に培地を変更した（Ｄａｙ０）。培養８日目まで内胚葉分化培地を１日おきに交換し、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。培養８日目に、メチオニン除去培地（δＭｅｔ培地）又はコントロール培地に培地を変更した。メチオニン除去培地又はコントロール培地を用いて培養１０日目までヒトｉＰＳ細胞を培養した。培養１０日目に、ヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行い、内胚葉分化マーカー（Ｓｏｘ１７)と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４)の陽性細胞を解析した。培養１０日目に肝臓分化培地（２０００ＫＳＲ－ＤＭＥＭ培地）に交換し、それ以降は１日おきに培地交換した。

[0060]　培養１０日目（Ｄａｙ１０）の細胞を、抗Ｓｏｘ１７抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。結果を図１０Ｂに示す。Ｍ１５細胞を用いた分化誘導方法と同様に、フィーダーフリーの培養系においても８日目～１０日目までのメチオニン除去は未分化細胞の除去効果があることが確認された。

　また、培養１８日目（Ｄａｙ１８）の細胞を、Ｏｃｔ３／４、アルブミン、ＡＦＰのそれぞれの発現について、ＲＴ－ＰＣＲを行った（コントロールとして、ＧＡＰＤＨの発現を確認した）。結果を図１０Ｃに示す。メチオニン除去群において、未分化細胞マーカーのＯｃｔ３／４の発現が顕著に減少している一方、肝臓マーカーであるアルブミンの発現が高くなっていることが確認された。また、１７日目（Ｄａｙ１７）、２５日目（Ｄａｙ２５）及び２７日目（Ｄａｙ２７）における、アルブミン分泌量の測定を行った。１７，２５および２７日目で、培地交換２４時間後の培養液中のアルブミン量を測定し、１日間に分泌されるアルブミン量を定量した。結果を図１０Ｄに示す。メチオニン除去培地で培養したヒトｉＰＳ細胞（黒色バー）では、コントロール（白色バー）に比較して顕著に高いアルブミン分泌活性を示した

。

[0061] 実施例９：ヒトｉＰＳ細胞の肝臓分化におけるプロリン添加の影響

（実施例９－１）

肝臓分化におけるプロリン添加分化培地の影響を調べるために、プロリンを１ｍＭの濃度に添加した肝臓分化培地を用いてヒトｉＰＳ細胞を肝臓前駆細胞に分化誘導した。

ゼラチンコートした９６ウェルプレートに支持細胞としてｍｍｃＭ１５細胞を播種した。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μM）で処理し、０．２５％トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞をｍｍｃＭ１５細胞上に１×１０^{4}個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞をＹ２７６３２及びｂＦＧＦを添加したＥＳ培地で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後に内胚葉分化培地に培地を変更した（Ｄａｙ０）。

実施例３と同様にして、培養開始日（Ｄａｙ０）～８日目（Ｄａｙ８）まで内胚葉分化培地を１日おきに交換し、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。８日目（Ｄａｙ８）にメチオニン除去培地又はコントロール培地に培地を変更した。メチオニン除去培地またはコントロール培地を用いて１０日目（Ｄａｙ１０）までヒトｉＰＳ細胞を培養した。

[0062] １０日目（Ｄａｙ１０）に、肝臓分化培地（２０００ＫＳＲ－DMEM培地、コントロール培地）又はコントロール培地にさらにプロリン１ｍＭを添加したＰｒｏ含有２０００ＫＳＲ－ＤＭＥＭ培地に培地を変更し、３７℃、５％CO_2下で１９日目（Ｄａｙ１９）まで培養した。１０日目～１９日目の期間、培地を1日おきに交換した。１９日目（Ｄａｙ１９）において、抗Ｏｃｔ３／４抗体及び抗ＡＦＰ抗体を用いて、ヒトｉＰＳ細胞の免疫蛍光染色を行った。結果を図１１に示す。

メチオニン除去群では、コントロール群に比較して、ＡＦＰ陽性細胞が均一に存在し、Ｏｃｔ３／４陽性細胞が減少していた。プロリン添加群では、コントロール群に比較してＡＦＰ陽性細胞が多く、Ｏｃｔ３／４陽性細胞が

減少していた。メチオニン除去とプロリン添加を行った群ではＡＦＰ陽性細胞の増加とＯｃｔ３／４陽性細胞の顕著な減少を認めた。

[0063] （実施例９－２）

プロリンの添加量を１ｍＭから１０ｍＭに変えた他は、実施例９－１と同様にして実験を行った。プロリンを１０ｍＭした場合も、１ｍＭ添加の場合と、同様の結果が得られた。

[0064] 実施例１０：ヒトＥＳ細胞を用いた、内胚葉への分化におけるアミノ酸の影響

実施例１と同様にして、ヒトＥＳ細胞（ｋｈＥＳ３）を内胚葉へと分化させた。ただし、培養８日目～１０日目は、ヒトｉＰＳ細胞の場合と同様に、メチオニンを除去したメチオニン除去培地で培養した。培養１０日目（Ｄａｙ１０）に、内胚葉未分化マーカー（Ｓｏｘ１７）と未分化マーカー（Ｏｃｔ３／４）の遺伝子発現を、リアルタイムＰＣＲ法を用いて定量解析した。結果を図１２に示す。培養８日目～１０日目にメチオニン除去培地で培養することにより、未分化マーカーであるＯｃｔ３／４の発現が顕著に減少して、内胚葉マーカーであるＳｏｘ１７の発現が顕著に増加していた。

このことから、アミノ酸除去培地の効果は、ヒトＥＳ細胞にも有効であることが示された。

[0065] 実施例１１：フィーダーフリー系でのヒトｉＰＳ細胞の分化における、４日目～６日目の間のメチオニン除去培地の効果

実施例８と同様にして、フィーダー細胞を用いない系において、ｉＰＳ細胞（Ｔｏｅ細胞株）を内胚葉へと分化させた。ただし、メチオニン除去培地での培養は、８日目～１０日目及び４日目～６日目に行い、それぞれ１０日目（Ｄａｙ１０）及び６日目（Ｄａｙ６）における細胞を、抗Ｓｏｘ１７抗体及び抗Ｏｃｔ３／４抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った。結果を図１３に示す。

その結果、４日目～６日目までのメチオニン除去培地での培養においても、８日目～１０日目と同様に、未分化細胞の除去効果があることが確認され

た。

[0066] 実施例１２：ヒトｉＰＳ細胞の維持培養過程におけるメチオニン除去の影響

ヒトｉＰＳ細胞の維持培養過程におけるメチオニン除去が、ヒトｉＰＳ細胞の生育に及ぼす影響を調べた。具体的には、ＲＰＭＩ１６４０培地で４０倍希釈したマトリゲル（ＢＤ）で一晩コートした９６ウェルプレートを培養に用いた。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μＭ）で処理し、０．２５％　トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞を、マトリゲルコートプレートに5×１０^{4}個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞を１０μＭ　Ｙ２７６３２、５ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦを添加したＥＳ培地（ＣＳＴＩ－７，細胞科学研究所）で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後にＰＢＳで一回洗浄後に、ＣＳＴＩ－７培地（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ）、ＣＳＴＩ－７からメチオニンを除去した培地（ΔＭｅｔ）およびΔＭｅｔに様々な濃度のメチオニンを添加した培地（ΔＭｅｔ＋Ｍｅｔ）に変更した（Ｄａｙ０)。培養２日目まで、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。培養２日目に、ヒトｉＰＳ細胞の細胞数を、ＰｒｅｓｔＢｌｕｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて定量した。

[0067] 結果を図１４に示す。図１４Ａは、培養２日後の各条件の明視野像を示している。メチオニン除去することにより、ヒトｉＰＳ細胞のコロニーは減少した。図４Ｂはメチオニン除去後の細胞数を定量化した結果である。メチオニンの除去により、（未分化の）ｉＰＳ細胞の生育が妨げられていることが確認された。

[0068] 実施例１３：メチオニン除去培地での処理時間の影響

内胚葉分化におけるメチオニン除去培地の処理時間の影響を調べるために、分化８日目にメチオニン除去培地に培地交換し、５、２４及び４８時間後の細胞増殖及びアポトーシスについて評価した。具体的には、ゼラチンコートした９６ウェルプレートに支持細胞としてｍｍｃＭ１５細胞を播種した。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μＭ）で処理し

、０．２５％トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞をｍｍｃＭ１５細胞上に１×１０^{4}個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞をＹ２７６３２及びｂＦＧＦを添加したＥＳ培地で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後に内胚葉分化培地に培地を変更した（Ｄａｙ０）。

培養開始日（Ｄａｙ０）～８日目（Ｄａｙ８）まで内胚葉分化培地を１日おきに交換し、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。８日目（Ｄａｙ８）にメチオニン除去培地又はコントロール培地に培地を変更した。メチオニン除去培地またはコントロール培地を用いて１０日目（Ｄａｙ１０）までヒトｉＰＳ細胞を培養した。８日目の培地交換の５、２４及び４８時間後の細胞増殖をＣｌｉｃｋ－ｉＴ　ＥｄＵ細胞増殖アッセイキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて評価し、アポトーシスをＩｎ　Ｓｉｔｕ細胞死検出キット（ロシュ社）を用いて評価した。さらに、メチオニン除去の期間について検討するために除去期間をＤ６－１０、Ｄ７－１０、Ｄ８－１０、及びＤ９－１０として、培養１０日目のＯｃｔ３／４およびＳｏｘ１７陽性細胞をカウントした。結果を図１５及び図１６に示す。

[0069] 図１５Ａは、Ｏｃｔ３／４およびＳｏｘ１７陽性細胞におけるＥｄＵ取り込みを抗体染色で評価した結果を示し、Ｂに定量結果をグラフで示した。メチオニン除去５時間後には、細胞増殖は著しく阻害され、その効果は、Ｏｃｔ３／４陽性細胞で顕著であった。Ｃは、Ｏｃｔ３／４およびＳｏｘ１７陽性細胞におけるアポトーシスをＴｕｎｅｌ染色で評価した結果を示し、Ｄに定量結果をグラフで示した。メチオニン除去５時間後には、Ｏｃｔ３／４陽性細胞において特異的にアポトーシスが誘導されている。

また、メチオニン除去の期間について検討するために除去期間をＤ６－１０、Ｄ７－１０、Ｄ８－１０、及びＤ９－１０として、培養１０日目のＯｃｔ３／４およびＳｏｘ１７陽性細胞をカウントした。結果を図１６に示す。培養６日目からの除去ではＳｏｘ１７陽性細胞の減少が確認された。

[0070] 実施例１４：メチルドナー除去培地の影響

内胚葉分化におけるメチオニンおよびメチルドナー除去培地の影響を調べるために、分化８日目に培地中よりメチオニンおよびメチルドナーを除去し、１０日目まで培養しＯｃｔ３／４及びＳｏｘ１７陽性細胞数を抗体染色で評価した。具体的には、ゼラチンコートした９６ウェルプレートに支持細胞としてｍｍｃＭ１５細胞を播種した。ヒトｉＰＳ細胞は、播種２４時間前からＹ２７６３２（１０μＭ）で処理し、０．２５％トリプシンを用いて剥離した。剥離したヒトｉＰＳ細胞をｍｍｃＭ１５細胞上に１×１０^{4}個／ウェルの細胞濃度で播種した。播種したヒトｉＰＳ細胞をＹ２７６３２及びｂＦＧＦを添加したＥＳ培地で３７℃、５％CO_2下で２４時間培養した。２４時間後に内胚葉分化培地に培地を変更した（Ｄａｙ０）。培養開始日（Ｄａｙ０）～８日目（Ｄａｙ８）まで内胚葉分化培地を１日おきに交換し、３７℃、５％CO_2下でヒトｉＰＳ細胞を培養した。８日目（Ｄａｙ８）に各種培地に培地を変更した。培地中からメチオニン・葉酸・ビタミンＢ１２・ベタイン・コリンを除去したものをメチルドナー除去培地とした。各種培地を用いて１０日目（Ｄａｙ１０）までヒトｉＰＳ細胞を培養し、Ｏｃｔ３／４およびＳｏｘ１７陽性細胞をカウントした。

[0071] 図１７に示すように、メチオニンは生体内でビタミンＢ１２（ＶＢ１２）・葉酸（Ｆｏｌｉｃ　Ａｃｉｄ）・コリン・ベタインを利用して、Ｓ－アデノシルメチオニン（ＳＡＭ）・Ｓ－アデノシルホモシステイン（ＳＡＨ）・ホモシステイン（Ｈｃｙ）から生合成される。また、メチオニンは代謝されてシステイン（Ｃｙｓ）になることが知られている。そこで、メチオニン除去培地（△Ｍｅｔ）又はメチルドナー除去培地（△ＭＤ）に、Ｍｅｔ，ＳＡＭ，Ｈｃｙ，ＳＡＨ，Ｃｙｓを添加して、メチオニン除去によるＯｃｔ３／４陽性細胞の減少作用を阻害できるかを試した。結果を図１８に示した。図中、△ＭＤは、メチルドナーである、メチオニン、葉酸、ビタミンＢ１２、ベタイン及びコリンを含まない培地を意味する。図１８Ａは、Ｏｃｔ３／４及びＳｏｘ１７陽性細胞の染色像を示し、図１８Ｂに定量結果をグラフで示した。Ｂに示すように、Ｍｅｔ，ＳＡＭ，Ｈｃｙ，ＳＡＨ添加により、Ｏｃ

ｔ３／４陽性細胞の減少効果は阻害され、Ｃｙｓ添加は影響がなかった。

[0072] さらに、メチルドナー除去培地を用いてメチオニン生合成が行われない系で同様の検討を行ったところＭｅｔ，ＳＡＭの添加は、Ｏｃｔ３／４陽性細胞の減少効果を阻害したが、Ｈｃｙ，ＳＡＨの添加は影響がなかった。このことからメチオニン除去による未分化細胞の減少は、細胞中のＳＡＭがなくなることに起因することが示唆された。

[0073] 上記の詳細な記載は、本発明の目的及び対象を単に説明するものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。添付の特許請求の範囲から離れることなしに、記載された実施態様に対しての、種々の変更及び置換は、本明細書に記載された教示より当業者にとって明らかである。

産業上の利用可能性

[0074] 本発明によれば、多能性幹細胞、例えばＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を効率よく分化誘導できる。また、本発明により分化誘導されたＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞は、未分化細胞の混入が少なく又は無いので、未分化細胞の混入に伴うリスクを回避することができる。

従って、本発明により分化誘導された細胞は、各種組織細胞の分析や再生医療において有用なものである。

請求の範囲

[請求項1] 培地中に、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン、及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項2] 培地中に、アミノ酸として少なくとも必須アミノ酸であるスレオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミンを含み、かつメチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、請求項１に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項3] メチオニンを含まない分化培地で、哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、請求項１又は２に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項4] 哺乳動物由来の多能性幹細胞が、ヒト又はマウス由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である、請求項１～３のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項5] 請求項１～４のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記分化培地で、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を、少なくとも５時間培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項6] 請求項１～４のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記分化培地で、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を、少なくとも１日間培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項7] 前記分化培地でＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を培養することを、前記多能性幹細胞から分化誘導された内胚葉の成形の直前又は形成が確認できる時期に行う、請求項５又は６に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか一つに記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法であって、前記分化培地が、内胚葉分化培地である、多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項9] 多能性幹細胞を、必須アミノ酸（スレオニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミン）及び準必須アミノ酸（システイン、チロシン及びアルギニン）を含む分化誘導培地で培養した後、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない分化培地で哺乳動物由来の多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を分化誘導する方法。

[請求項10] 哺乳動物由来の多能性幹細胞が、ヒト又はマウス由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である、請求項９に記載の多能性幹細胞を分化誘導する方法

[請求項11] 哺乳動物由来の多能性幹細胞を内胚葉まで分化誘導させる、請求項９又は１０に記載の方法。

[請求項12] さらに、分化した内胚葉を、肝臓分化培地で培養することにより、多能性幹細胞を肝臓細胞まで分化させる、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] さらに、分化した内胚葉を、膵臓分化培地で培養することにより、多能性幹細胞を膵臓細胞まで分化させる、請求項１１に記載の方法。

[請求項14] 前記肝臓分化培地又は膵臓分化培地がプロリンを１．０mM以上１０mM以下の濃度で添加した培地である、請求項１２又は１３に記載の方法。

[請求項15] 培地中に、メチオニン、ロイシン、システイン、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない、多能性幹細胞を分化誘導するための培地。

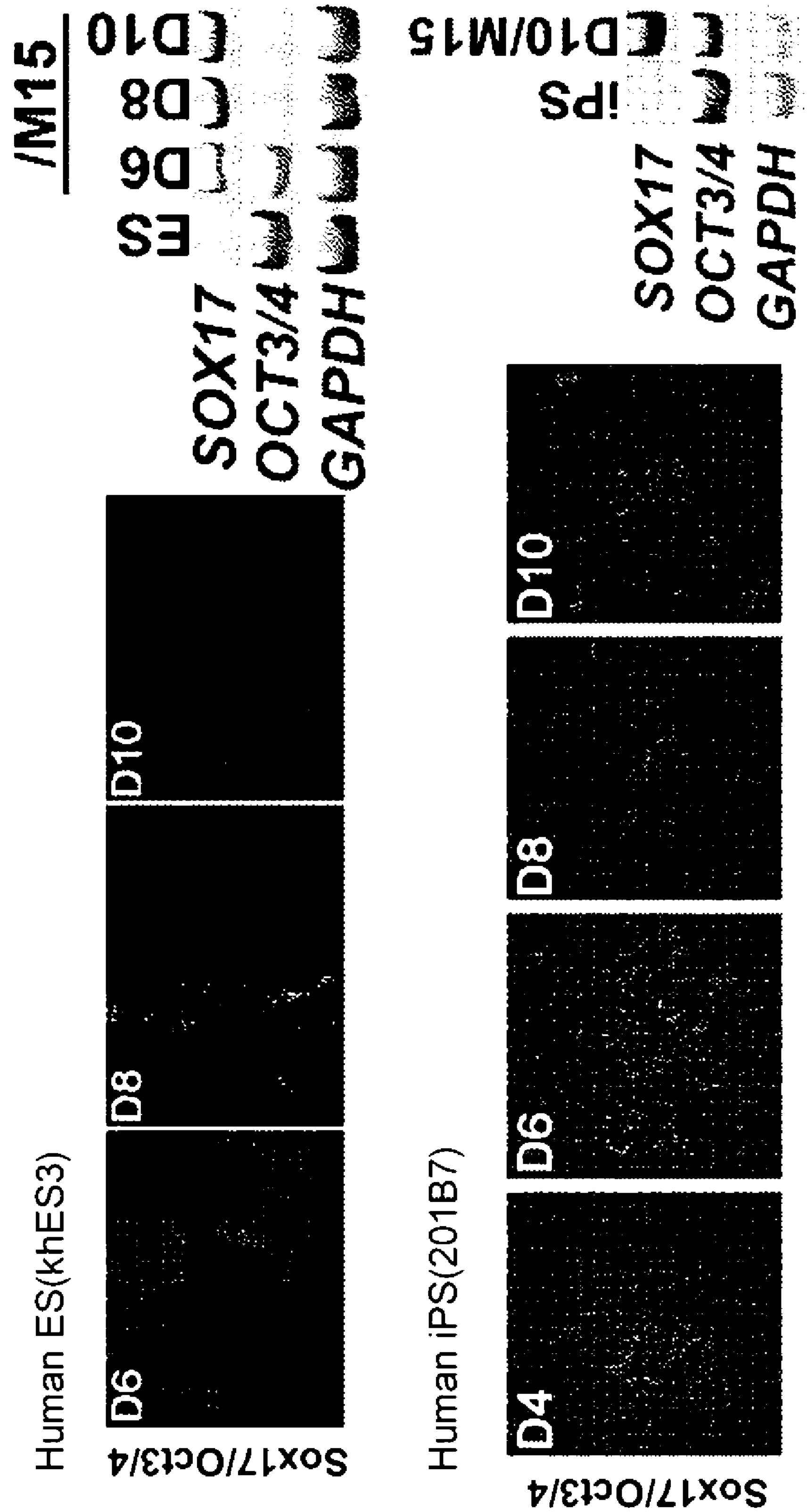
[請求項16] 培地中に、アミノ酸として少なくとも必須アミノ酸であるスレオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン及びヒスタミンを含み、かつメチオニン、ロイシン、システイン

、チロシン及びアルギニンからなる群より選ばれる少なくとも一つのアミノ酸を含まない、請求項１５に記載の多能性幹細胞を分化誘導するための分化誘導培地。

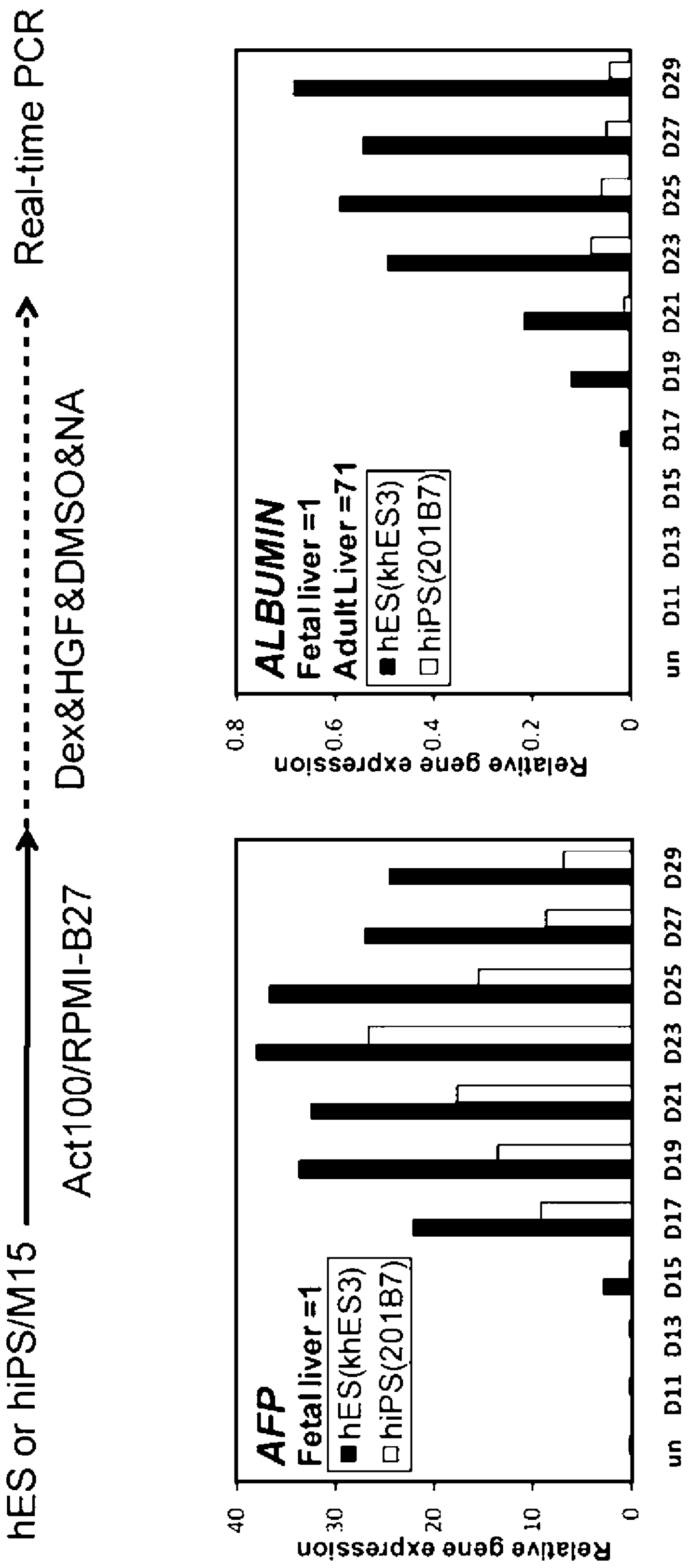
[請求項17] 多能性幹細胞が、ヒト又はマウス由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞である、請求項１５又は１６に記載の培地。

[請求項18] 前記分化誘導するための培地が、マウス又はヒト由来のＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を内胚葉に分化誘導するための内胚葉分化培地である、請求項１５又は１６に記載の培地。

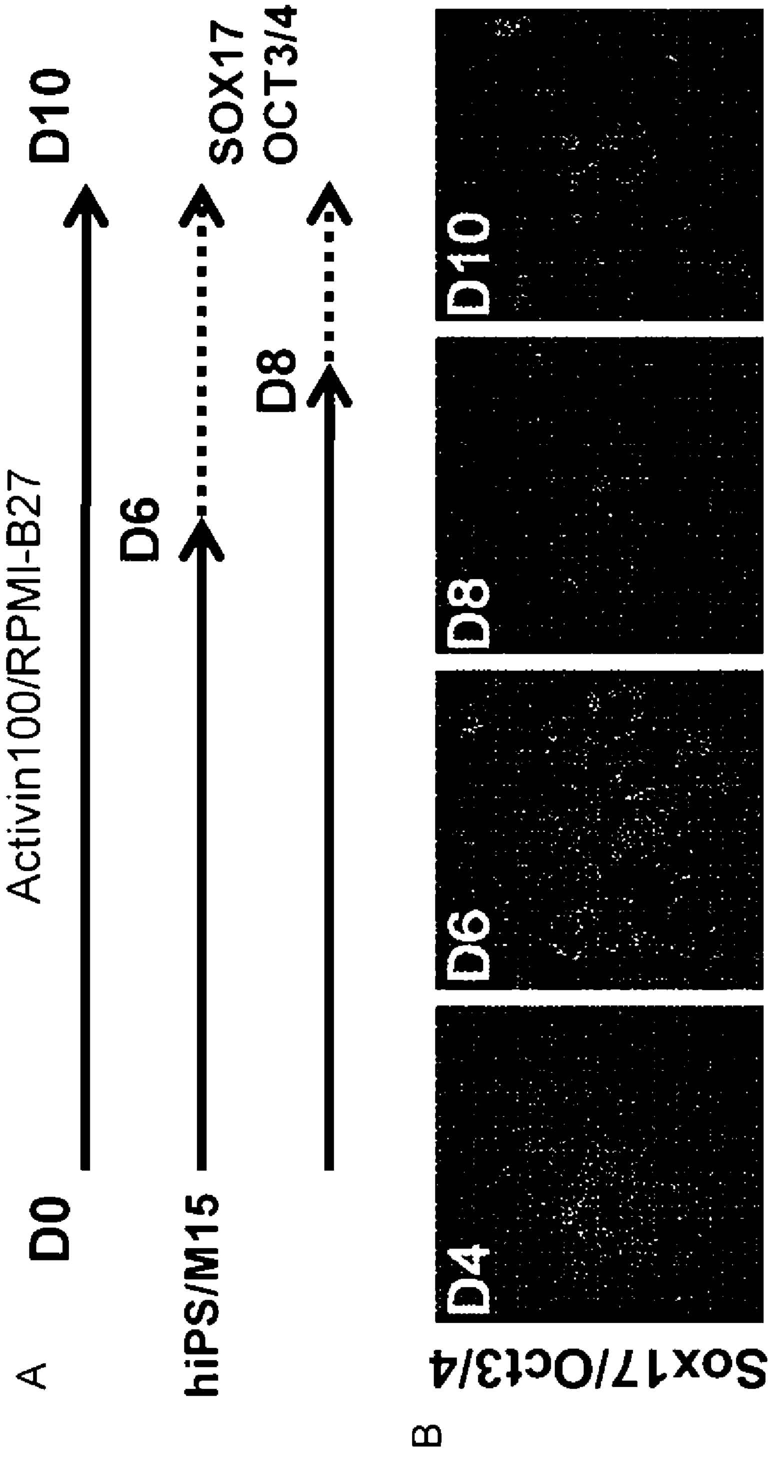
[図1]


Human ES(khES3)
Sox17/Oct3/4
D6
D8
D10
SOX17
OCT3/4
GAPDH
ES
D6
D8
D10
/M15
Human iPS(201B7)
Sox17/Oct3/4
D4
D6
D8
D10
SOX17
OCT3/4
GAPDH
iPS
D10/M15

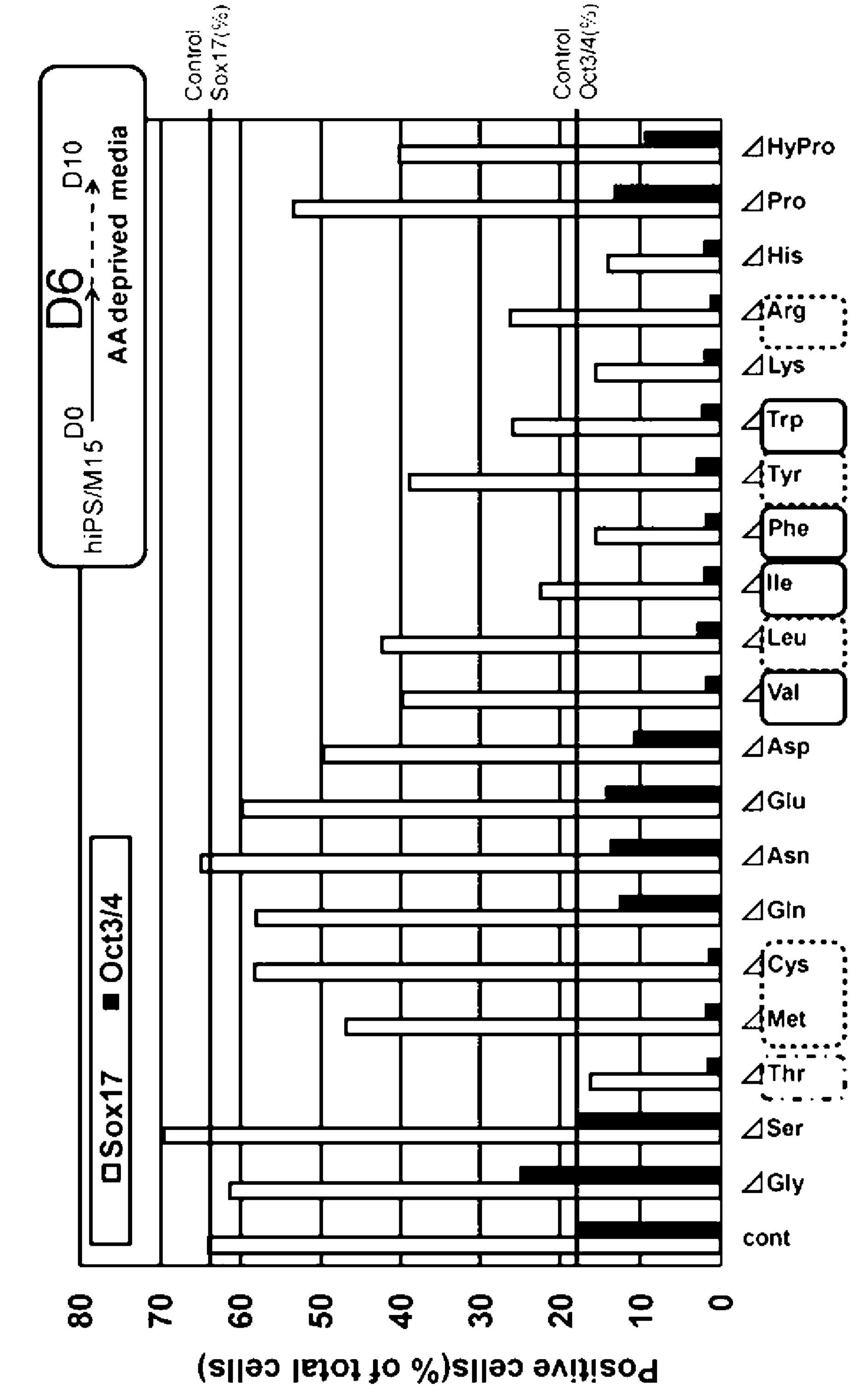
[図2]


hES or hiPS/M15
D10
D29
Real-time PCR
Act100/RPMI-B27
Dex&HGF&DMSO&NA
AFP
Fetal liver =1
hES(khES3)
hiPS(201B7)
Relative gene expression
40
30
20
10
0
un D11 D13 D15 D17 D19 D21 D23 D25 D27 D29
ALBUMIN
Fetal liver =1
Adult Liver =71
hES(khES3)
hiPS(201B7)
Relative gene expression
0.8
0.6
0.4
0.2
0
un D11 D13 D15 D17 D19 D21 D23 D25 D27 D29

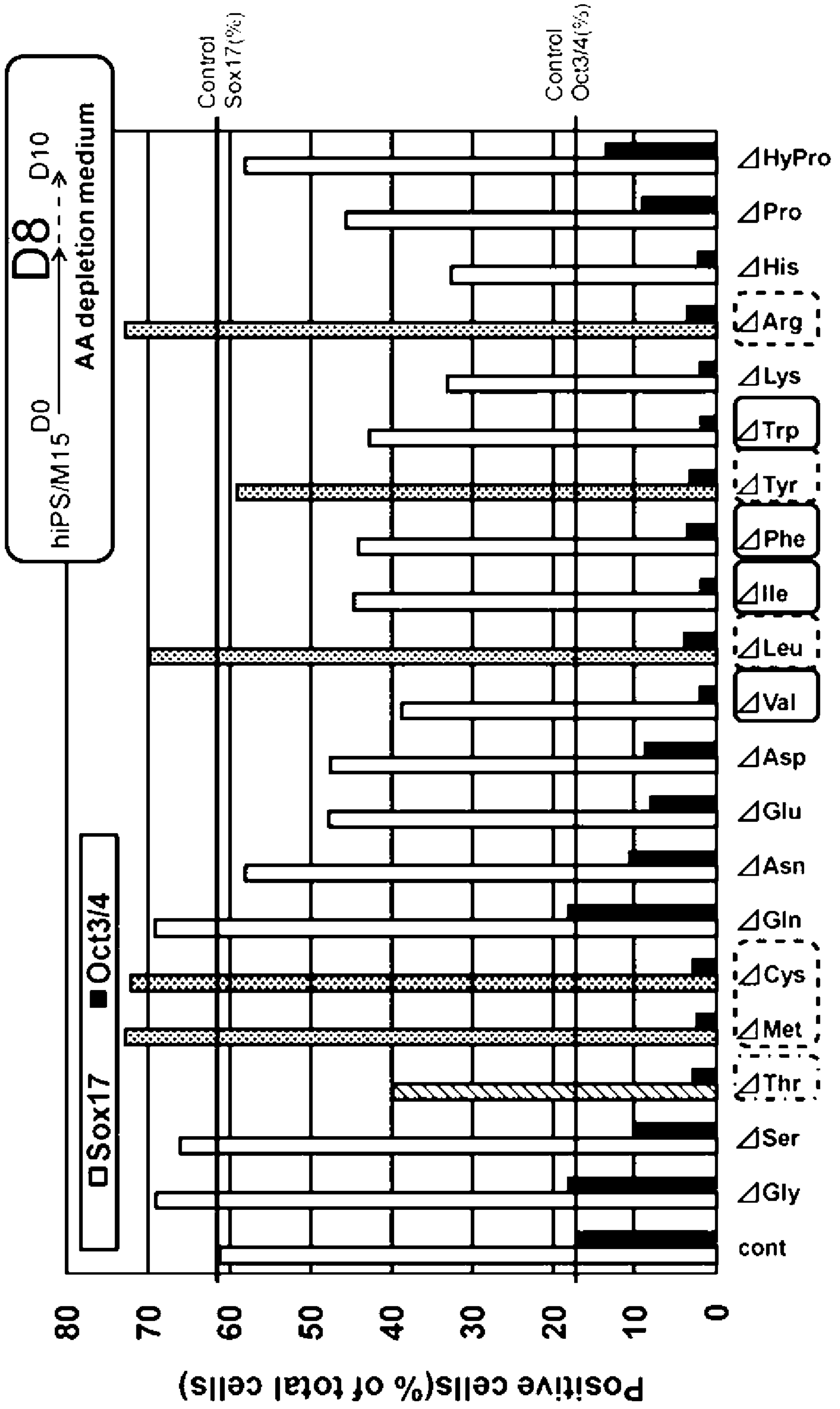
[図3]


A
D0
D10
Activin100/RPMI-B27
hiPS/M15
D6
SOX17
D8
OCT3/4
B
Sox17/Oct3/4
D4
D6
D8
D10

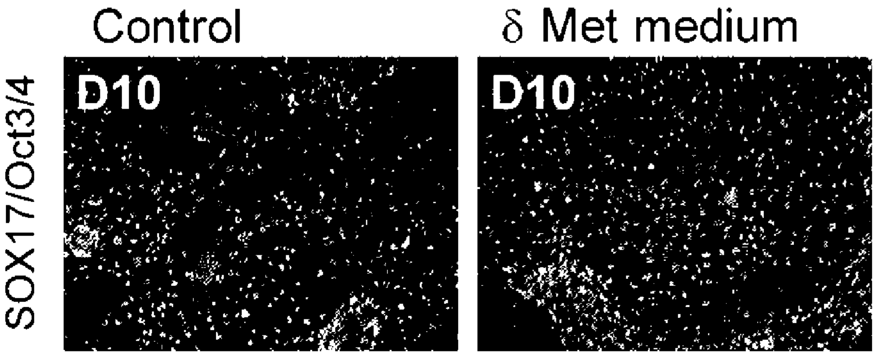
[図4]


Control Sox17(%)
Control Oct3/4(%)
hiPS/M15
D0
D6
D10
AA deprived media
□Sox17 ■Oct3/4
⊿HyPro
⊿Pro
⊿His
⊿Arg
⊿Lys
⊿Trp
⊿Tyr
⊿Phe
⊿Ile
⊿Leu
⊿Val
⊿Asp
⊿Glu
⊿Asn
⊿Gln
⊿Cys
⊿Met
⊿Thr
⊿Ser
⊿Gly
cont
80 70 60 50 40 30 20 10 0
Positive cells(% of total cells)

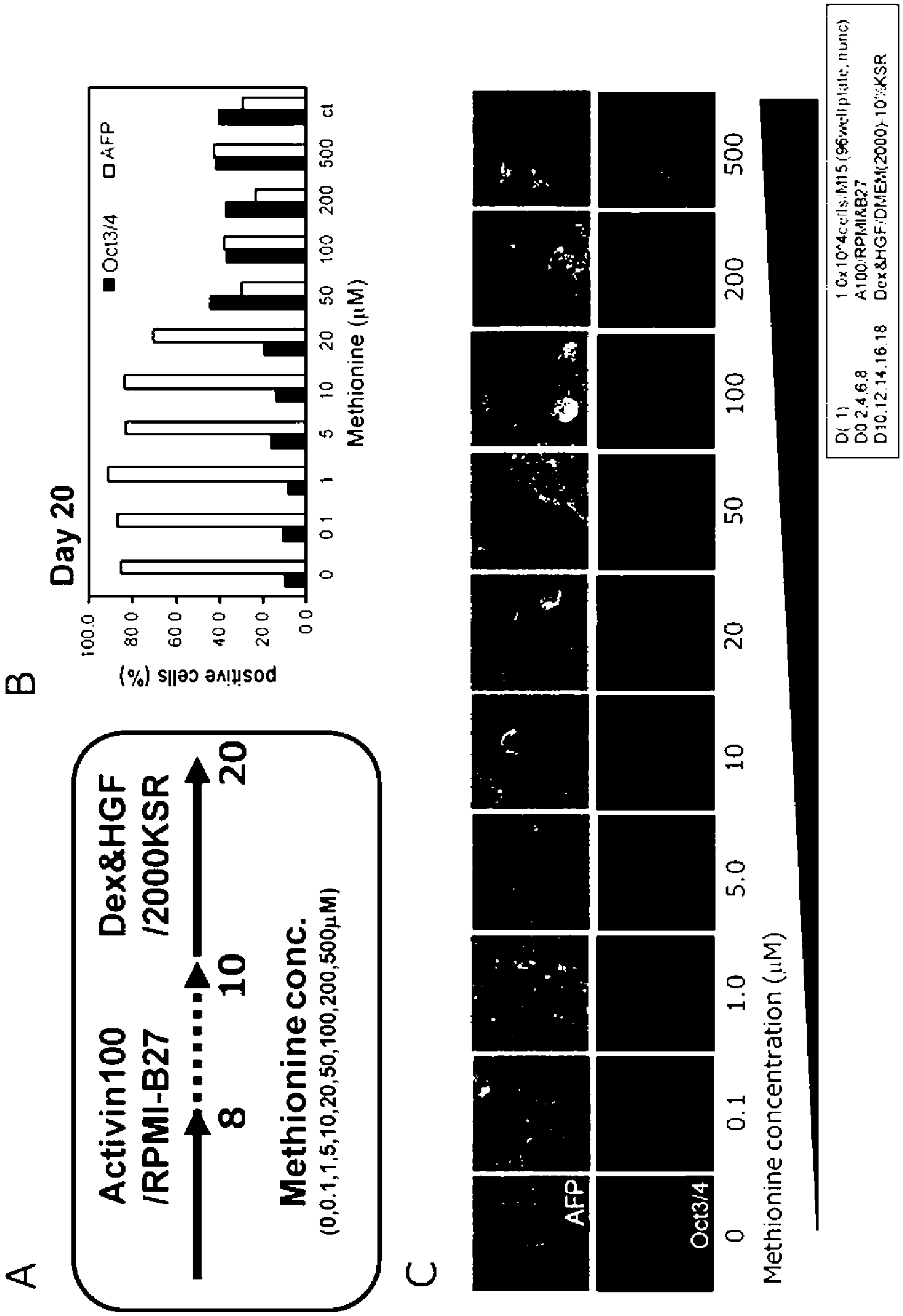
[図5]


hiPS/M15
D0
D8
D10
AA depletion medium
Control Sox17(%)
Control Oct3/4(%)
□Sox17
■Oct3/4
⊿HyPro
⊿Pro
⊿His
⊿Arg
⊿Lys
⊿Trp
⊿Tyr
⊿Phe
⊿Ile
⊿Leu
⊿Val
⊿Asp
⊿Glu
⊿Asn
⊿Gln
⊿Cys
⊿Met
⊿Thr
⊿Ser
⊿Gly
cont
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Positive cells(% of total cells)

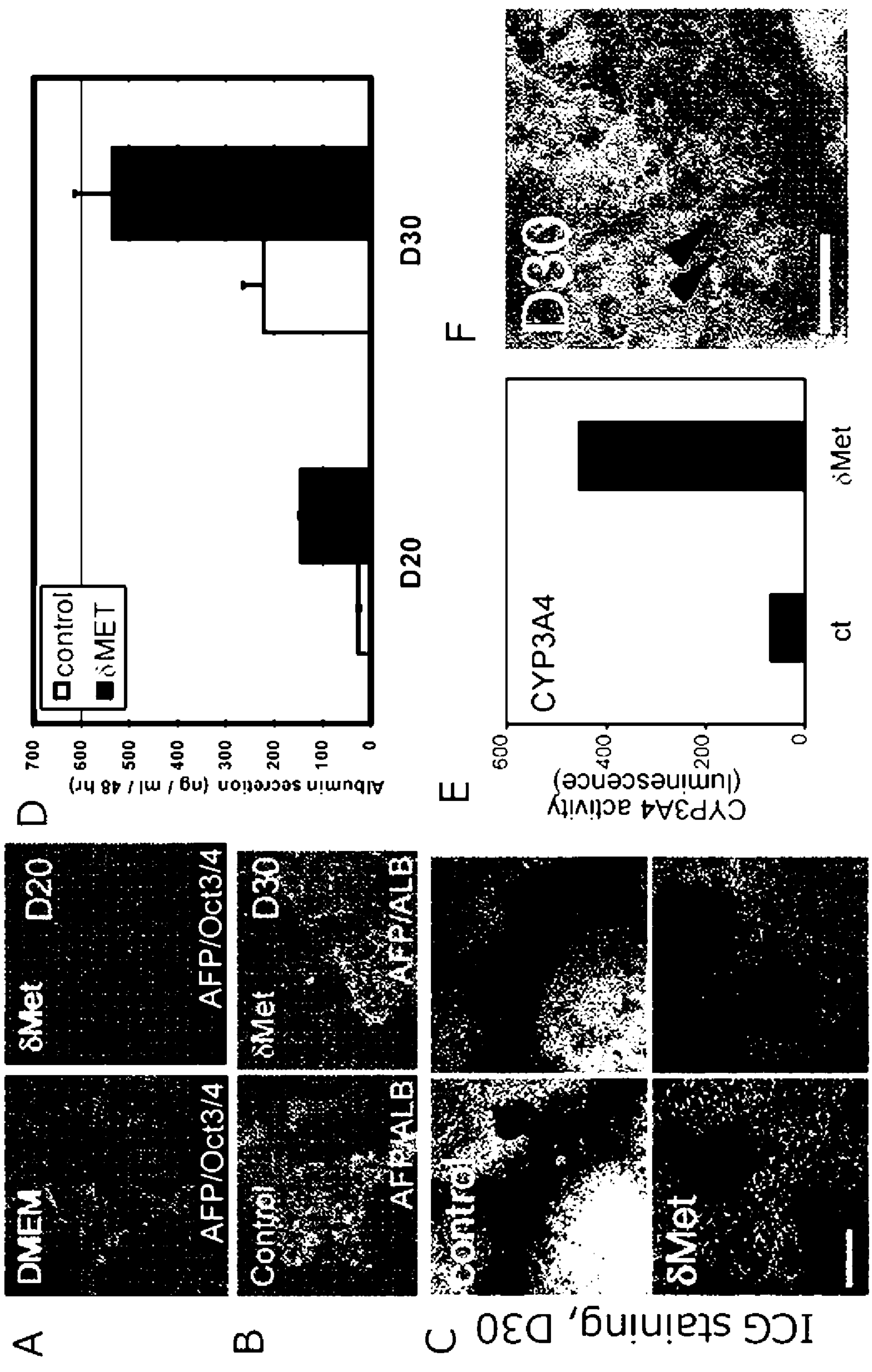
[図6]



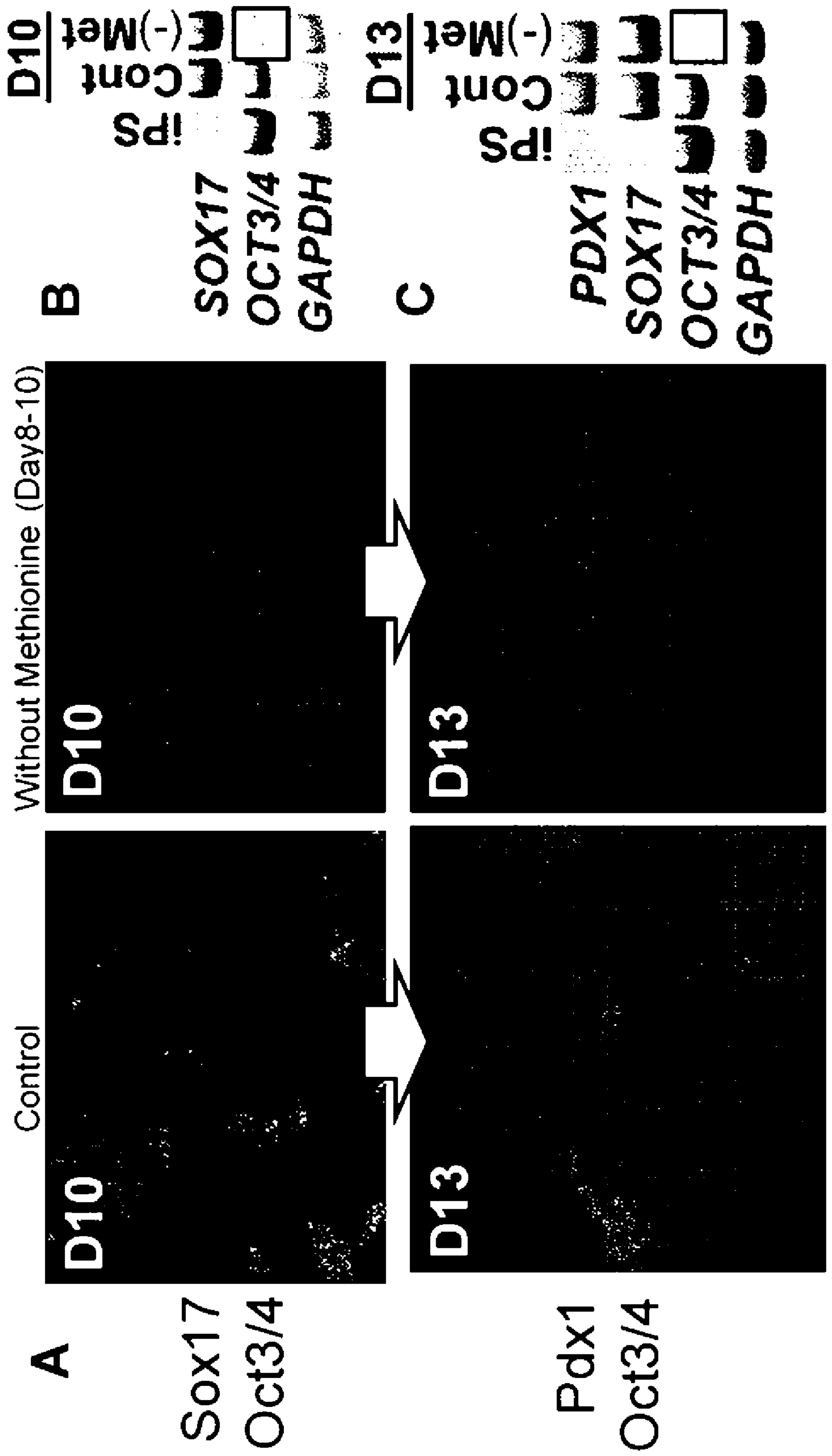
[図7]


A
Activin100
/RPMI-B27
Dex&HGF
/2000KSR
8
10
20
Methionine conc.
(0,0.1,1,5,10,20,50,100,200,500μM)
B
Day 20
Oct3/4
AFP
positive cells (%)
Methionine (μM)
C
AFP
Oct3/4
0
0.1
1.0
5.0
10
20
50
100
200
500
Methionine concentration (μM)

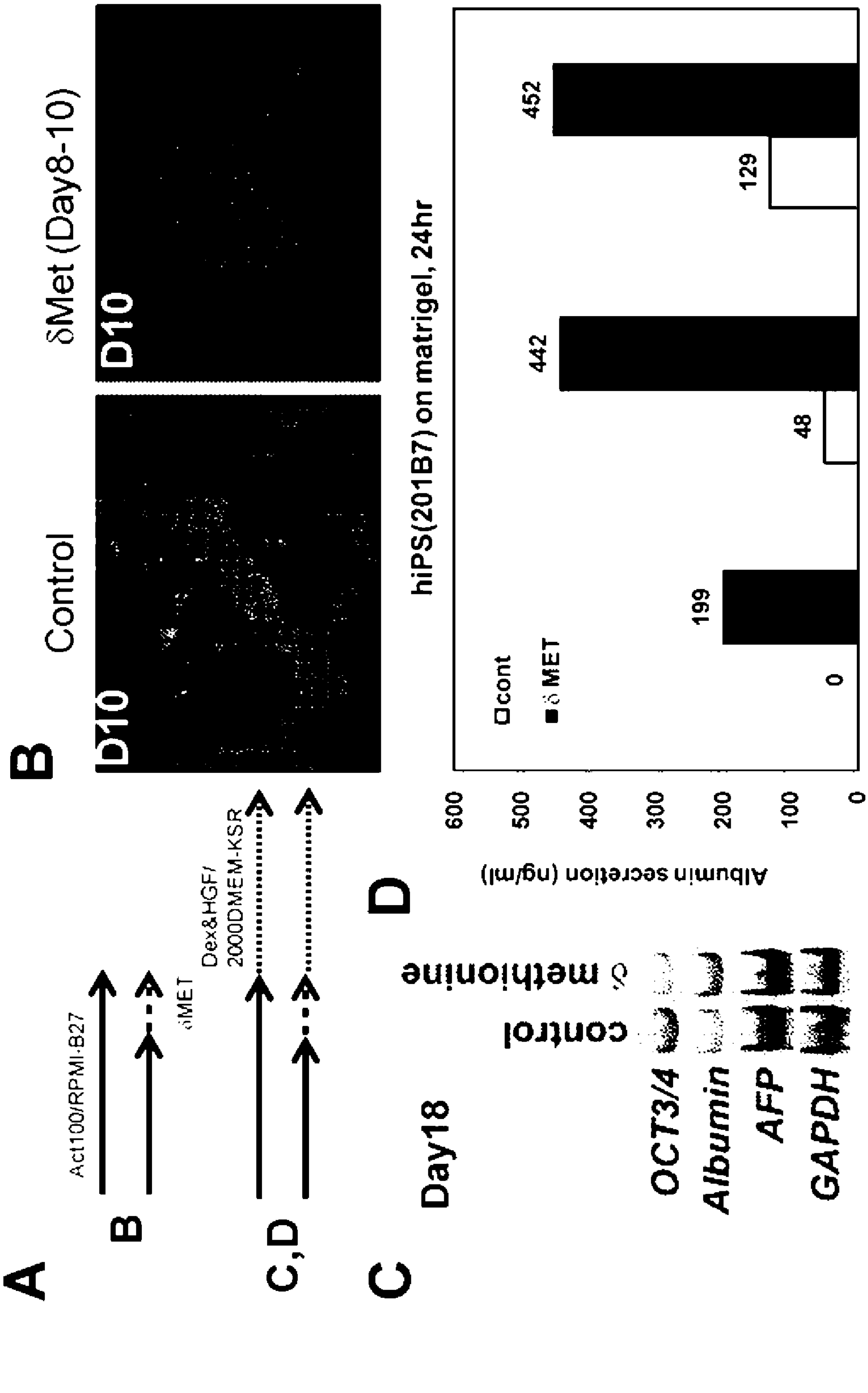
[図8]


A
DMEM
AFP/Oct3/4
δMet
D20
AFP/Oct3/4
B
Control
AFP/ALB
δMet
D30
AFP/ALB
C
ICG staining, D30
Control
δMet
D
Albumin secretion (ng / ml / 48 hr)
control
δMET
D20
D30
E
CYP3A4 activity (luminescence)
CYP3A4
ct
δMet
F
D30

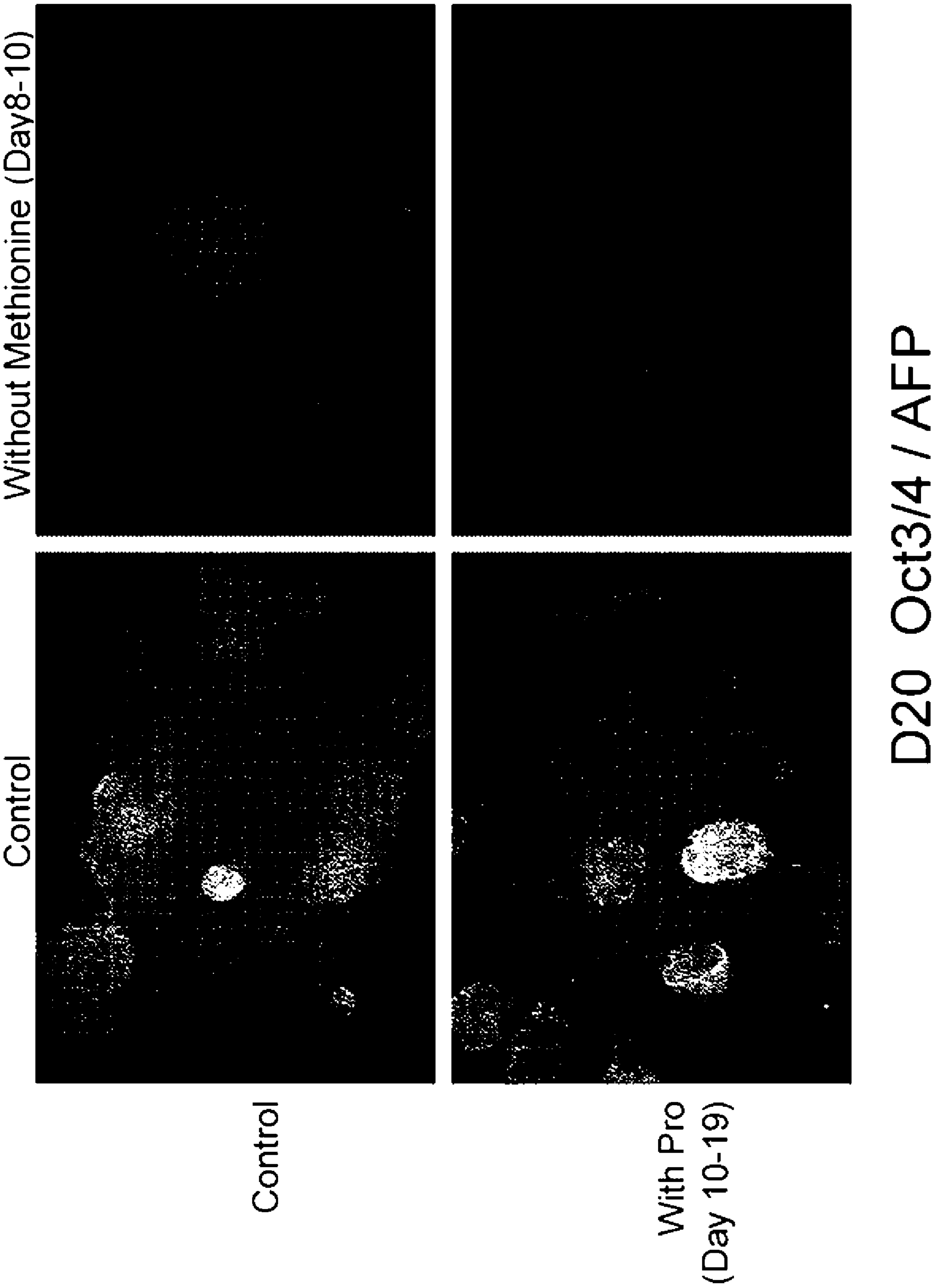
[図9]


A
Sox17
Oct3/4
Control
Without Methionine (Day8-10)
D10
D10
D13
D13
Pdx1
Oct3/4
B
D10
iPS
Cont
(-)Met
SOX17
OCT3/4
GAPDH
C
D13
iPS
Cont
(-)Met
PDX1
SOX17
OCT3/4
GAPDH

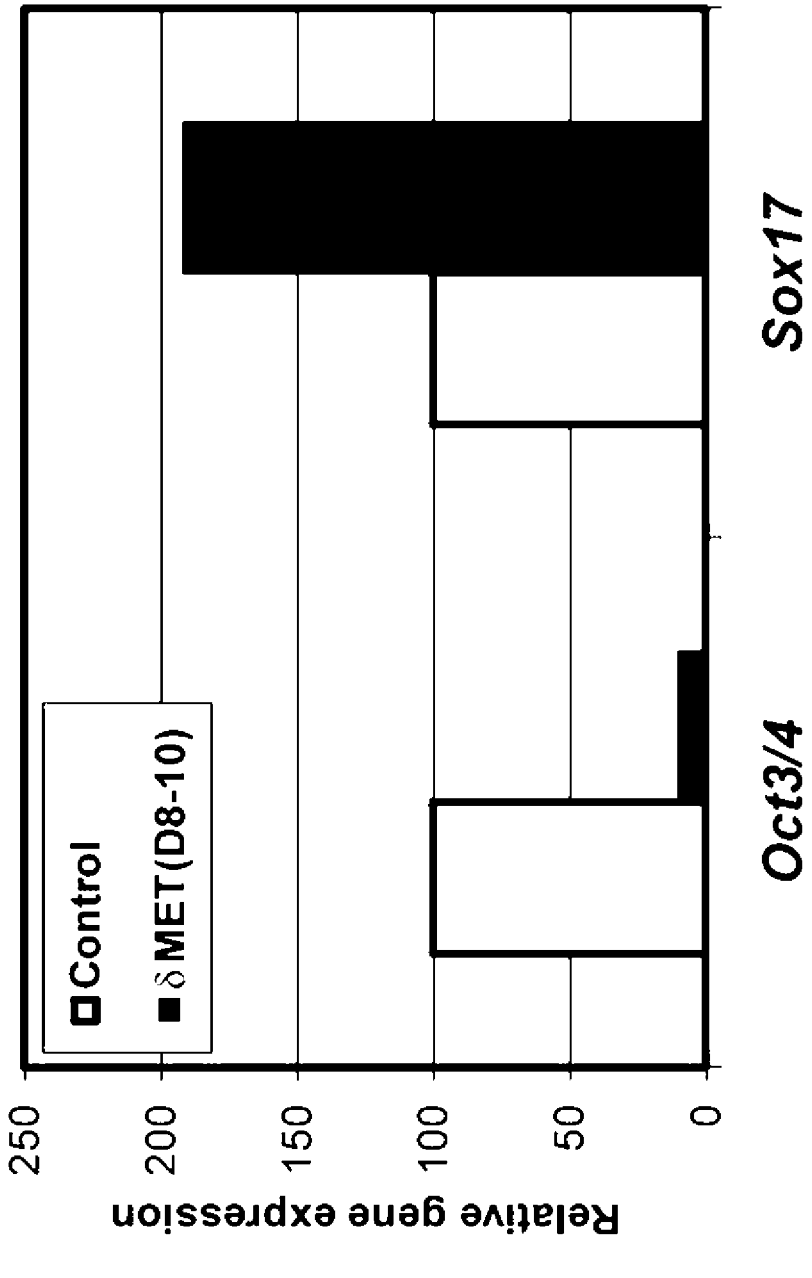
[図10]


A
Act100/RPMI-B27
B
δMET
C,D
Dex&HGF/
2000DMEM-KSR
B
Control
δMet (Day8-10)
D10
D10
C
Day18
control
δ methionine
OCT3/4
Albumin
AFP
GAPDH
D
hiPS(201B7) on matrigel, 24hr
Albumin secretion (ng/ml)
cont
δ MET
0
199
48
442
129
452
d17
d25
d27
600
500
400
300
200
100
0

[図11]

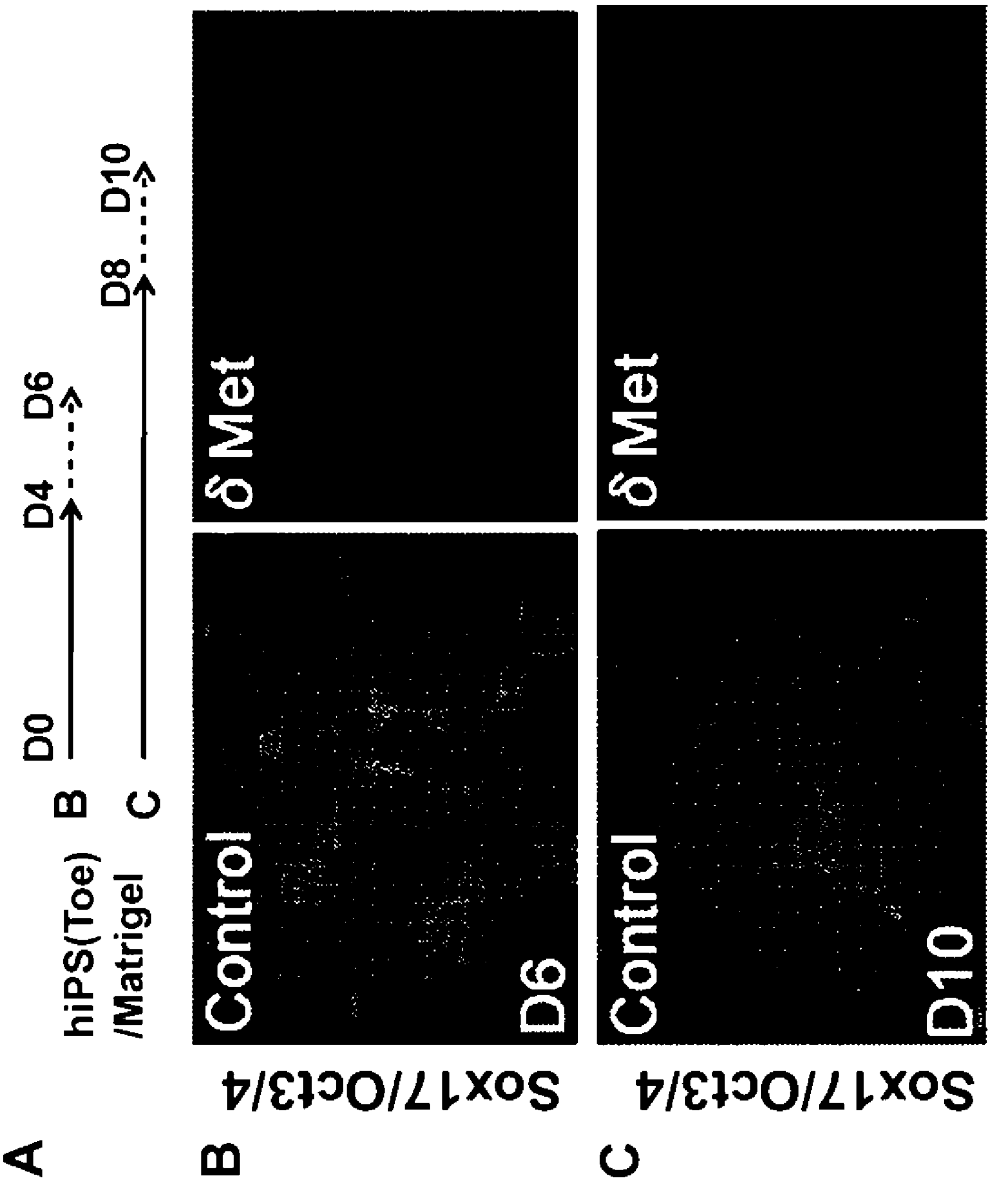

Control
Without Methionine (Day8-10)
Control
With Pro
(Day 10-19)
D20 Oct3/4 / AFP

[図12]

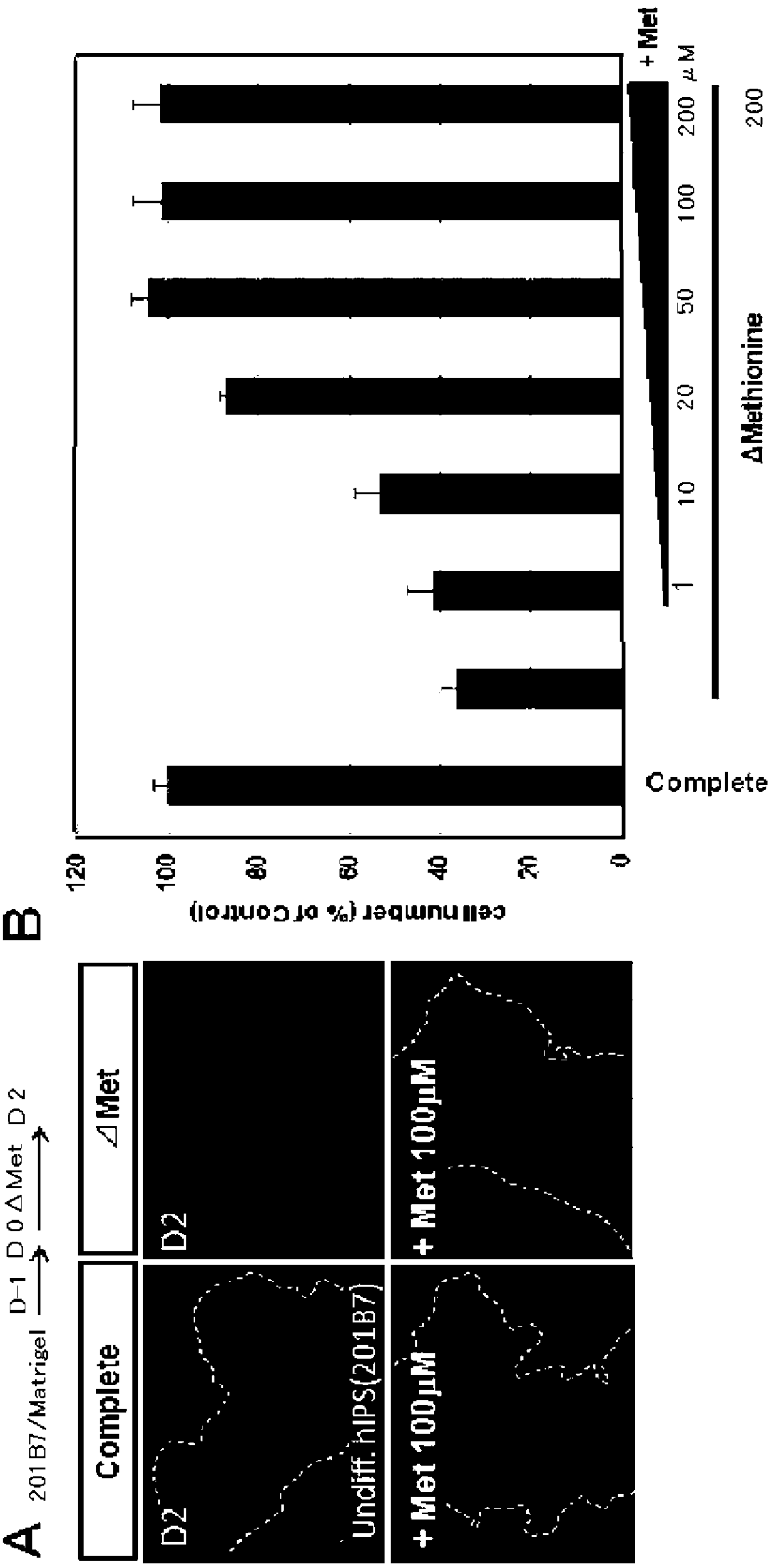


Relative gene expression
250
200
150
100
50
0
Control
δMET(D8-10)
Oct3/4
Sox17

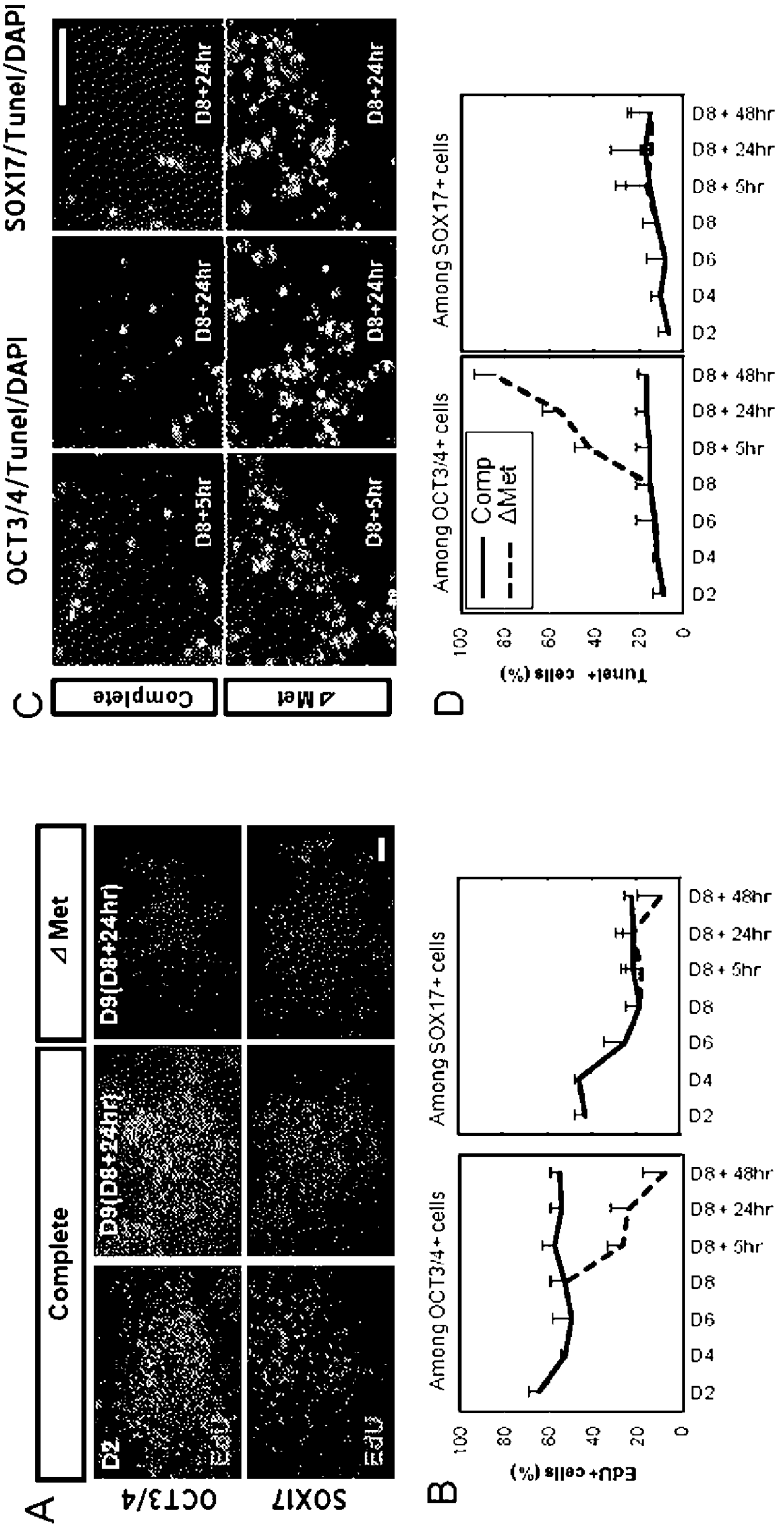
[図13]


A
hiPS(Toe)
/Matrigel
B
C
D0
D4
D6
D8
D10
B
Sox17/Oct3/4
Control
D6
δ Met
C
Sox17/Oct3/4
Control
D10
δ Met

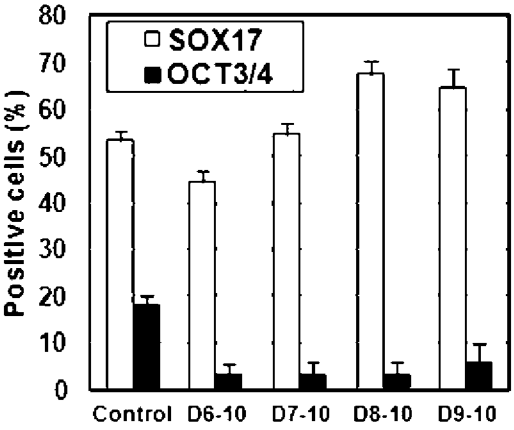
[図14]


A
201B7/Matrigel
D-1 D0 ΔMet D2
Complete
⊿Met
D2
Undiff. hIPS(201B7)
D2
+ Met 100µM
+ Met 100µM
B
cell number (% of Control)
120
100
80
60
40
20
0
Complete
1
10
20
50
100
200 µM
+ Met
ΔMethionine
200

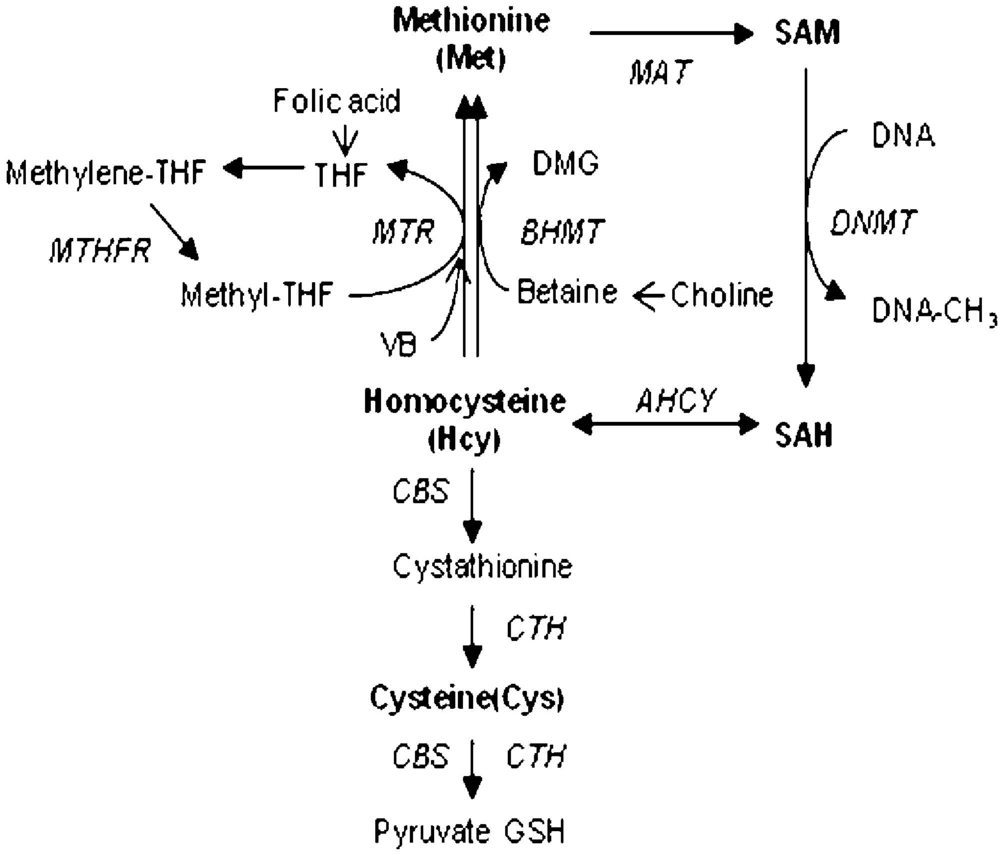
[図15]


A
Complete
⊿Met
OCT3/4
SOX17
D2
D9(D8+24hr)
EdU
B
EdU+ cells (%)
Among OCT3/4+ cells
Among SOX17+ cells
D2
D4
D6
D8
D8 + 5hr
D8 + 24hr
D8 + 48hr
C
OCT3/4/Tunel/DAPI
SOX17/Tunel/DAPI
Complete
⊿Met
D8+5hr
D8+24hr
D
Tunel+ cells (%)
Comp
ΔMet

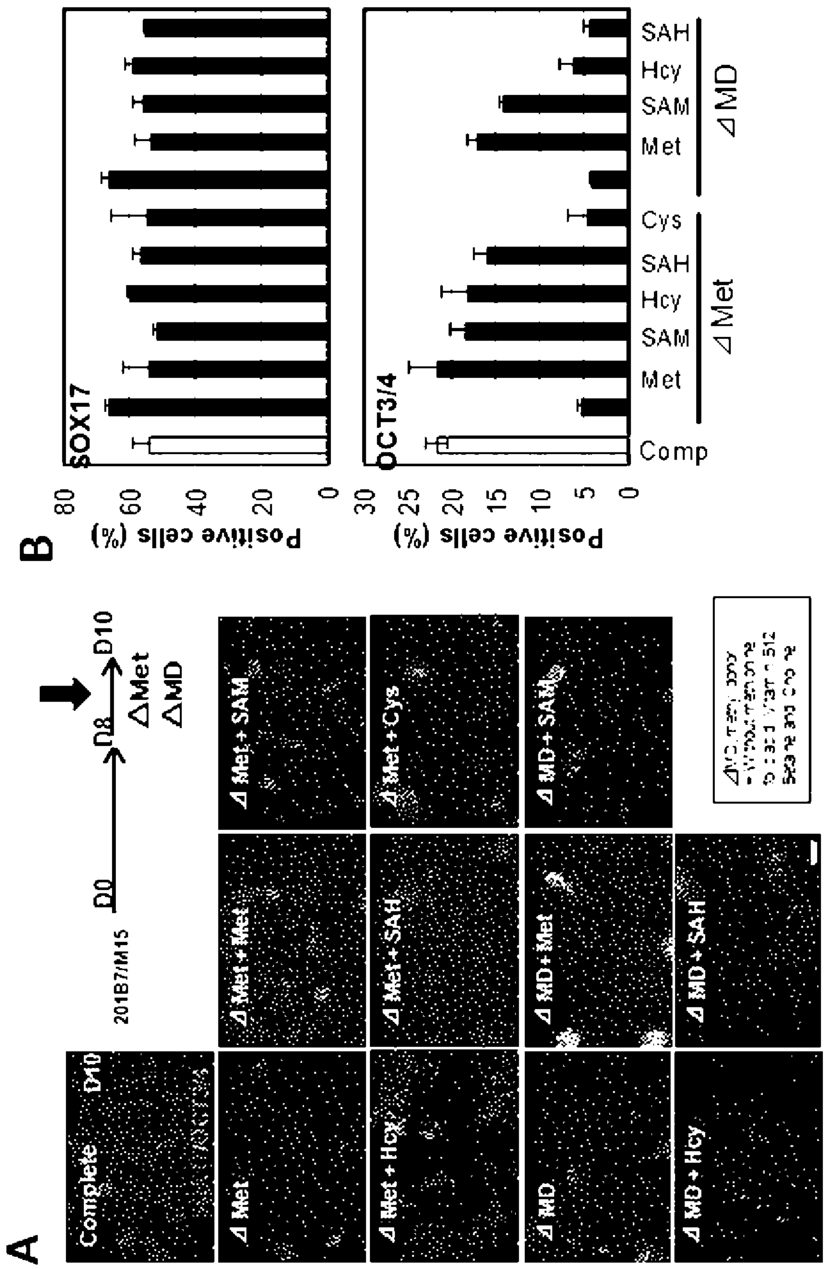
[図16]


80
70
60
50
40
30
20
10
0
Positive cells (%)
SOX17
OCT3/4
Control
D6-10
D7-10
D8-10
D9-10

[図17]


Methionine (Met)
SAM
MAT
Folic acid
THF
Methylene-THF
MTHFR
Methyl-THF
MTR
VB
DMG
BHMT
Betaine
Choline
DNA
DNMT
DNA-CH$_3$
Homocysteine (Hcy)
AHCY
SAH
CBS
Cystathionine
CTH
Cysteine(Cys)
CBS
CTH
Pyruvate GSH

[図18]


A
Complete
D10
201B7/M15
D0
D8
D10
ΔMet
ΔMD
⊿Met
⊿Met + Met
⊿Met + SAM
⊿Met + Hcy
⊿Met + SAH
⊿Met + Cys
⊿MD
⊿MD + Met
⊿MD + SAM
⊿MD + Hcy
⊿MD + SAH
B
SOX17
OCT3/4
Positive cells (%)
Comp
Met
SAM
Hcy
SAH
Cys
⊿Met
⊿MD

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2011/074206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, *C12N5/071*(2010.01)i, *C12N5/0735*(2010.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-535058 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 01 October 2009 (01.10.2009), & US 2007/0259423 A1 & US 2011/0081720 A1 & EP 2027258 A2 & WO 2007/130474 A2	1-18
A	WATAYA, T et al., Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 19, vol.105(33), pp.11796-11801	1-18
A	SHIRAKI, N et al., Guiding ES cell differentiation into the definitive endoderm lineages. Inflammation and Regeneration. 2010 Mar, vol.30(2), pp.109-114	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search: 11 January, 2012 (11.01.12)	Date of mailing of the international search report: 24 January, 2012 (24.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/074206

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIGUCHI, Y et al., Synthesized basement membranes direct the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages. J Cell Sci. 2010 Aug 15, vol.123(Pt 16), pp. 2733-2742	1-18
A	SHIRAKI, N et al., Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 17, vol.381(4), pp.694-699	1-18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０７４２０６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/00, C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2009-535058 A(ウイスコンシン　アラムニ　リサーチ　ファンデーション)2009.10.01 & US 2007/0259423 A1 & US 2011/0081720 A1 & EP 2027258 A2 & WO 2007/130474 A2	1-18
A	WATAYA,T et al., Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 19, vol.105(33), pp.11796-11801	1-18

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １１．０１．２０１２	国際調査報告の発送日 ２４．０１．２０１２
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９１２３ 長井　啓子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	SHIRAKI,N et al., Guiding ES cell differentiation into the definitive endoderm lineages. Inflammation and Regeneration. 2010 Mar, vol.30(2), pp.109-114	1-18
A	HIGUCHI,Y et al., Synthesized basement membranes direct the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages. J Cell Sci. 2010 Aug 15, vol.123(Pt 16), pp.2733-2742	1-18
A	SHIRAKI,N et al., Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 17, vol.381(4), pp.694-699	1-18