

(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2011-72231

(P2011-72231A)

(43) 公開日 平成23年4月14日(2011.4.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2009-225758 (P2009-225758)	(71) 出願人	504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号
(22) 出願日	平成21年9月30日 (2009. 9. 30)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	糸 昭苑 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内
		(72) 発明者	原田 聖子 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内
		(72) 発明者	白木 伸明 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大 学法人熊本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞の検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞のマーカー分子を同定し、それを利用した内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出する方法及び内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞分離する方法を提供する。

【解決手段】崩壊促進因子(DAF,CD55)遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を検出することを含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出、及び分離方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子、Tmem184a 遺伝子、Akr1c19 遺伝子、3300001A09Rik 遺伝子、Aebp2 遺伝子、Al464131 遺伝子、Foxp4 遺伝子、Hipk2 遺伝子、Lass4 遺伝子、Pbxip1 遺伝子、Pcbd1 遺伝子、及びPcdh1 遺伝子から選択される少なくとも 1 種の遺伝子の発現を検出することを含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を検出する方法。

【請求項 2】

対象細胞における崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子、Tmem184a 遺伝子、Akr1c19 遺伝子、3300001A09Rik 遺伝子、Aebp2 遺伝子、Al464131 遺伝子、Foxp4 遺伝子、Hipk2 遺伝子、Lass4 遺伝子、Pbxip1 遺伝子、Pcbd1 遺伝子、及びPcdh1 遺伝子から選択される少なくとも 1 種の遺伝子の発現を検出し、上記少なくとも 1 種の遺伝子を発現している細胞を内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞として同定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

少なくとも崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出することを含む、請求項 1 又は 2 に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を検出する方法。

【請求項 4】

崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を用いて崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

E-cadherin 遺伝子の発現を検出することを更に含む、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を選択することを含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を分離する方法。

【請求項 7】

(a) 内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を含む細胞試料を調製する工程、(b) 該細胞試料に崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を添加する工程、及び(c) 該抗体が結合した細胞を分離する工程を含む、請求項 6 に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を分離する方法。

30

【請求項 8】

崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子に加えてE-cadherin 遺伝子を発現する細胞を選択する、請求項 6 又は 7 に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を分離する方法。

【請求項 9】

崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を検出又は分離するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出及び分離方法に関する。より詳細には、本発明は、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の新規マーカー分子の発現を指標とした内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出及び分離方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

生命維持に不可欠である膵臓、肝臓、胃、腸、そして肺といった消化器や呼吸器は、胚性内胚葉を起源として発生する。予定運命追跡実験では、胚性内胚葉(Definitive endoderm:DE)の運命はマウス胚において、胎生6-6.5日目に決定し始めることが分かっている。現在マウスで知られている最も初期の膵臓マーカー遺伝子Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox gene 1) は、胎生8.5日目に腸の腹側内胚葉において発現し始める(非特許

50

文献 1)。しかし、Pdx1ノックアウトマウスでは、成長や分化をしない未発達な膵芽だけが形成される。前腸内胚葉の特定の領域での膵芽の誘導シグナルは、膵臓発生を理解する上で重要であるにもかかわらず、多くの分子メカニズムは解明されていない。

【 0 0 0 3 】

ES細胞から特定の細胞を分化誘導するためには、他の領域には発現せず、目的の領域のみに発現するマーカー遺伝子の同定が非常に重要である。しかし、現実的には複数のマーカー遺伝子を組み合わせることで分化細胞を評価することが多い。内胚葉に関しては、E-cadherinとケモカインレセプターであるCxcr4の2つを用いることで胚性内胚葉を同定する方法が報告された(非特許文献2)。しかし、本発明者らは、膵臓においては発生が進むにつれ、Cxcr4の発現が低下することを確認しており、内胚葉の領域化を研究するためには分化後期まで発現するマーカー遺伝子が必要となっている。また、前腸内胚葉の予定膵臓領域においてPdx1よりも早い時期に働く遺伝子に関する報告はない。さらに、内胚葉の領域化が起こる時期において膵臓領域特異的に発現する細胞表面マーカーは見つかっておらず、膵臓分化研究においてフローサイトメーターを用いた解析の障害となっている。一方、発生初期の膵芽で発現する遺伝子は多く知られておらず、新規な遺伝子を同定することは大変有用である。

10

【 0 0 0 4 】

本発明者らは、既にin vitroでマウス胎仔中腎由来の支持細胞上で、ES細胞からPdx1陽性細胞を分化誘導することに成功している(非特許文献3)。さらに、液性因子や分化条件を変えることにより内胚葉だけでなく、外胚葉や中胚葉を効率的に分化誘導させることにも成功している(非特許文献4)。また、網羅的遺伝子発現解析としてマイクロアレイを用いた研究も行っている(非特許文献5及び6)。

20

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996;122:983-995.

【非特許文献2】Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, et al. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1542-1550.

30

【非特許文献3】Shiraki N, Yoshida T, Araki K, et al. Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells*. 2008;26:874-885.

【非特許文献4】Shiraki N, Higuchi Y, Harada S, et al. Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;381:694-699.

【非特許文献5】Yoshida T, Murata K, Shiraki N, et al. Analysis of gene expressions of embryonic stem-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. *Dev Growth Differ*. 2009;51:463-472.

40

【非特許文献6】Yoshida T, Shiraki N, Baba H, et al. Expression patterns of epipalakin1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. *Genes Cells*. 2008;13:667-678.

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

従来の内胚葉、腸管のマーカー遺伝子としてCxcr4が使われているが、発生が進むと、腸管におけるCxcr4遺伝子発現が低下し、Cxcr4陰性の細胞の分画の中では、胎生9.5日目のPdx1陽性細胞が存在することが観察された。従って、より発生後期の内胚葉、腸管の分子マーカーの同定が望まれている。本発明は、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞のマ

50

一カー分子を同定し、それを利用した内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出する方法及び内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞分離する方法を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、*in vitro*でES細胞からPdx1陽性細胞を分化誘導することに成功している。本発明においては、ES細胞由来の胚性内胚葉や膀胱の分化細胞についてマイクロアレイ解析を行い、胚性内胚葉や膀胱に特異的に発現する候補遺伝子の検索を行った。マイクロアレイ解析の結果より、新たな胚性内胚葉、腸管および膀胱の表層マーカーとして崩壊促進因子 (decay accelerating factor ; DAF又はCD55とも称する)を同定することに成功した。さらに、同じ方法により、いくつかの発生初期の膀胱において発現する遺伝子を見いだした。これらの遺伝子は膀胱前駆細胞の同定において、非常に有用なマーカーとして使用できる。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

10

【0008】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を検出することを含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出する方法。

(2) 対象細胞における崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を検出し、上記少なくとも1種の遺伝子を発現している細胞を内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞として同定することを特徴とする、(1)に記載の方法。

20

(3) 少なくとも崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出することを含む、(1)又は(2)に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出する方法。

(4) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を用いて崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出する、(3)に記載の方法。

(5) E-cadherin遺伝子の発現を検出することを更に含む、(3)又は(4)に記載の方法。

30

【0009】

(6) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を選択することを含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を分離する方法。

(7) (a) 内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を含む細胞試料を調製する工程、(b) 該細胞試料に崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を添加する工程、及び(c) 該抗体が結合した細胞を分離する工程を含む、(6)に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を分離する方法。

(8) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子に加えてE-cadherin遺伝子を発現する細胞を選択する、(6)又は(7)に記載の内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を分離する方法。

(9) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出又は分離するための試薬。

40

【発明の効果】

【0010】

崩壊促進因子 (Decay accelerating factor) (DAF, CD55) はマウス正常胚では胚性内胚葉と中胚葉領域に発現している。フローサイトメーターによる解析から、CD55はCxcr4に比べてより狭い範囲で発現していること、ES細胞を用いた分化誘導実験では培養後期まで発現レベルが低下しないことが分かった。さらにPdx1/GFPマウス胚を用いたフローサイトメーターによる解析から、E-cadherin(+)/Cxcr4(-)の分画にはPdx1陽性細胞が存在するが、CD55はすべてのPdx1陽性膀胱前駆細胞で発現しており、膀胱内胚葉マーカーとしても有用であることがわかった。これらの結果より、CD55は胚性内胚葉、腸管と膀胱を

50

同定するためのマーカーとして、E-cadherinと組み合わせて使用することで非常に有用である。CD55は、Cxcr4よりも後期まで発現が検出されるので、後期の腸管マーカーとして使用できる。また、CD55は、膵臓の前駆細胞でも発現されるので、ES細胞を遺伝子改変せずに、表層マーカーの発現により、膵臓へ分化した細胞を純化出来ると言う点で優れている。このCD55を認識する抗体は、腸管及び膵臓の細胞の研究用の試薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は分化誘導方法を示す。Aは、分化誘導条件を示す。ES細胞から三胚葉への分化誘導条件について示している。すべての分化誘導は、マウス中腎由来の支持細胞M15細胞を用いて行った。中内胚葉(Mesendoderm)、内胚葉(Endoderm)の分化誘導にはアクチビンとbFGFを添加した。外胚葉(Ectoderm)の分化誘導にはSB203580を添加し、5日間培養した。中胚葉(Mesoderm)の分化誘導にはBMP7を添加し、5日間培養した。Bは、マイクロアレイ解析に使用したサンプルの模式図を示す。模式図中のdは分化誘導開始からの日数を示している。図1Aに示した液性因子を加え各胚葉に誘導したサンプルを、フローサイトメーターを用いて分取した。左下に分取をする際に使用したマーカーについて示した。

【図2】図2はCD55の発現パターンを示す。Aは、CD55のマイクロアレイ解析での発現量を示す。マイクロアレイ解析によって得られたCD55の各胚葉での発現パターンを示している。赤線で示されているのがCD55に対するものであり、線の本数はアレイにセットされているプローブの数に一致している。このグラフより、CD55が内胚葉領域で高発現し、また分化誘導開始後8日目まで一定の発現量を保っていることがわかる。Bは、CD55のリアルタイムPCRを示す。リアルタイムPCR解析によって得られたCD55の各胚葉での発現パターンを示している。マイクロアレイ解析で用いたサンプルと同様のものを使用した。この結果より、内胚葉領域で高発現している遺伝子であることが再確認された。

【図3】図3は、in situ hybridization法による解析を示す。Aは、胎生8.5日目マウス胚での発現パターン(Whole-mount)を示す。CD55に対するRNAプローブを作成し、正常胚での発現パターンをWhole-mount in situ hybridization法を用いて調べた。A-1,3,4) 前腸門(AIP)に特異的なシグナルが得られた写真を示した。これまでの本発明者らのDiIを用いた細胞運命追跡の検討から、腹側膵臓前駆細胞は前腸門の領域に由来していることが強く示唆されており、CD55が膵臓の非常に初期のマーカーになりうる可能性が示唆された。A-2) 後腸にもシグナルを確認した。Bは、胎生9.5日目マウス胚での発現パターン(Whole-mount)を示す。図3Aと同様に解析を行った。B-1) 矢頭で示すように、腸管でシグナルが確認できた。B-2,3,4) B-1の胚を切片化し、観察することにより、腸管でのシグナルの発現を確認することができた。Cは、胎生8.5日目マウス胚での発現パターン(切片)を示す。さらに詳細な発現位置解析のために、切片上でのin situ hybridization法を行った。C-a,b,c,dの写真は同一胚のものである。C-a,bの写真より、後腸領域に加え羊膜でも発現を確認した。C-c,dの写真から、前腸領域での発現が確認された。Dは、胎生9.5日目マウス胚での発現パターン(切片)を示す。D-a,b,c,d,eの写真は同一胚のものである。D-bより、肺原基に発現を確認した。またD-eの写真より、後腸付近の間充織での発現を確認した。

【図4】図4は、フローサイトメーターによる解析を示す。Aは、ES細胞でのCD55の発現解析を示す。A-1) 分化誘導開始後5日目の細胞を用いた解析図を示す。上段は、E-cadherinとCxcr4で展開した後、CD55で再展開した図、下段はE-cadherinとCD55で展開した後、Cxcr4で再展開した図である。A-2) 縦軸にE-cadherinを横軸にそれぞれCxcr4とCD55をとった場合の、分化誘導期間によって変化する二重陽性細胞の推移を示したものである。A-3) E-cadherinとCD55二重陽性分画をフローサイトメーターを用いて分取し、M15細胞上で再培養を行った。再培養開始4日目よりGFPの蛍光を確認し、5日目には更に強いGFPの蛍光を観察した。Bは、正常胚でのCD55の発現解析を示す。胎生9.5日目のPdx1/GFPマウスの全胚を用いて解析を行った。E-cadherinとGFPで展開した後、二重陽性分画をそれぞれCxcr4とCD55で再展開した。上段のCxcr4で再展開した分画にはCxcr4陰性細胞が含まれるの

10

20

30

40

50

に対し、下段のCD55ではそのような陰性分画は観察されなかった。

【図5】図5は、E-cadherinとCD55二重陽性細胞を用いたマイクロアレイ解析を示す。Aは、Scattered plotを示す。E-cadherin/CD55とE-cadherin/Cxcr4二重陽性分画で上昇している遺伝子を調べるためにマイクロアレイ解析を行い、図に示した。この図から、E-cadherin/CD55とE-cadherin/Cxcr4二重陽性細胞が非常に似た発現プロファイルを示すことがわかった。Bは、Clusteringを示す。図にはAで示した二つの分画以外に、未分化なES細胞(ES)、中内胚葉(Mes)、外胚葉(Ect)、沿軸中胚葉(PAM)のデータを追加して、クラスタリング解析を行った結果を示した。この結果からも、他の胚葉と比較してE-cadherin/CD55とE-cadherin/Cxcr4二重陽性細胞は、発現プロファイルが非常に似ていることがわかった。

10

【図6】図6は、マイクロアレイ解析のまとめを示す。図4で示したマイクロアレイ解析の結果をベン図で模式的に表した。遺伝子の抽出条件は、胚性内胚葉細胞でのシグナル強度が50以上で、ノーマライズ値が5以上のものとした。二つの分画で共通して発現上昇している遺伝子は207個あった。百分率にすると、E-cadherin/CD55二重陽性分画全体で約70%、E-cadherin/Cxcr4二重陽性分画全体で約80%に上った。また、207遺伝子の中で、既に内胚葉で発現上昇することが報告されている遺伝子を水色の四角内に示した。

【図7】図7は、胚日数(E) 8.5及びE9.5のマウス胚における候補遺伝子の発現パターンを示す。Tmem184aの発現を、E8.5(A,B)及びE9.5(C)の胚において全マウントin situハイブリダイゼーションにより調べた。Tmem184aは、前腸門(anterior intestinal portal (AIP)) (A,B, 矢頭)及び腸管上皮(C, 矢頭)で検出された。

20

【図8】図8は、胚日数(E) 9.5及びE12.5のマウス胚における候補遺伝子の発現パターンを示す。Tmem184aの発現を、E 9.5(A,B及びC)及びE12.5(D, E)において切片in situハイブリダイゼーションにより調べた。Tmem184aは腸管上皮(A,B,C)及びE12.5腭芽(D, E)において検出された。

【図9】図9は、胚日数(E) 8.5及びE9.5のマウス胚における候補遺伝子の発現パターンを示す。Akr1c19の発現を、E8.5(A,B及びC)及びE9.5(D)の胚において全マウントin situハイブリダイゼーションにより調べた。Akr1c19は、前腸門(anterior intestinal portal (AIP)) (A 矢頭)で検出された。

【図10】図10は、胚日数(E) 9.5、12.5及びE14.5のマウス胚における候補遺伝子の発現パターンを示す。Akr1c19の発現を、E 9.5(A,B,C及びD)、E12.5(E)及びE14.5(F)において切片in situハイブリダイゼーションにより調べた。Akr1c19は腸管上皮(A,B,C,D)及びE12.5及びE14.5の腭(E,F)において検出された。

30

【図11】図11は、E14.5マウス腭における候補遺伝子の発現パターンを示す。これらの遺伝子の発現は、切片in situハイブリダイゼーションにより調べた。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

(略語一覧)

Pdx1:Pancreas duodenum homeobox 1

Cxcr4:Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

40

ES cell:Embryonic stem cell

Ect:Ectoderm

LPM:Lateral plate mesoderm

PAM:Paraxial mesoderm

MES:Mesendoderm

DE:Definitive endoderm

MEF:Mouse embryonic fibroblasts

FGF:Fibroblast growth factor

LIF:Leukemia inhibitory factor

AIP:Anterior intestinal portal

50

【 0 0 1 3 】

本発明では、ES細胞分化誘導系とマイクロアレイにより同定した内胚葉に特異的に発現するCD55遺伝子について、初期胚および分化ES細胞における発現パターンについて詳細に解析した。CD55遺伝子は内胚葉での発現は分かっていたが、細胞表面マーカーとして報告され、抗体も市販されている。そこで、ES細胞分化誘導系と胎生9.5日目のPdx1/GFPマウス胚を用いて、フローサイトメーターでの解析を行った。また、CD55陽性細胞においてどのような遺伝子の発現が上昇しているかを見るために、従来のE-cadherin(+)/Cxcr4(+))によって定義される内胚葉分画と本遺伝子によって定義される内胚葉分画E-cadherin(+)/CD55(+))分画をそれぞれ分取し、マイクロアレイ解析を行ない、比較解析した。その結果、胚性内胚葉を同定するための新規マーカー遺伝子としてCD55遺伝子を単離することができた。しかし、発現解析の結果から、内胚葉での発現に加え、中胚葉での発現を確認したため、既存の方法と同様に複数のマーカーを組み合わせ、胚性内胚葉を同定する必要があることが明らかになった。ただし、既存のマーカーであるCxcr4と同様に胚性内胚葉分画を濃縮することができること、更により内胚葉発生の後期まで発現していることを示すことができた。さらに、ES細胞由来のPdx1陽性細胞で発現する遺伝子の中で、発生初期の胚芽で発現しているかどうかについて、切片上およびwhole mount in situ hybridization法で検索したところ、いくつか新規な遺伝子を同定した。

10

【 0 0 1 4 】

本発明による内胚葉細胞、腸管細胞又は膀胱細胞を検出する方法においては、崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を指標とする。崩壊促進因子(DAF, CD55)は、それが存在している細胞上のC3/C5転換酵素のみに作用し、C3/C5転換酵素を阻害することにより、補体の活性化を抑制する補体調節蛋白質である。

20

【 0 0 1 5 】

本発明における崩壊促進因子(DAF, CD55)は、特にその由来を記載しない限り、脊椎動物由来であり、好ましくは哺乳動物由来である。例えばヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、NCBI GenBank (NM_000574.3)に示されており、ラット崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、NCBI GenBank (NM_0022269.2)に示されており、マウス崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、NCBI GenBank (NM_010016.2)に示されている。

30

【 0 0 1 6 】

本発明におけるヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子としては、例えば(a)上記に示したヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質をコードする塩基配列を含む核酸、(b)ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加したアミノ酸配列をコードする核酸、(c)ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質をコードする塩基配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有する塩基配列を含む核酸、(d)ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、または(e)ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質をコードする核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸などが含まれる。上記(b)において、改変されるアミノ酸数は、通常1から15個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、より好ましくは1から5個である。また、上記の(e)の核酸は、ヒトなどのヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の蛋白質コード配列を含む核酸、または対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。例えば、ヒトなどのヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の蛋白質コード配列中の任意の連続する部分配列または全長からなる核酸

40

50

(DNAまたはRNA)とストリンジントな条件でハイブリダイズする核酸を含むものでもよい。あるいはヒトなどのヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の蛋白質コード配列からなる核酸とストリンジントな条件でハイブリダイズする核酸を含むものであってもよい。ストリンジントなハイブリダイゼーションの条件としては、例えば例えば5×SSC、7%(W/V)SDS、100μg/ml変性サケ精子DNA、5×デンハルト液を含む溶液中、48から52程度の温度でハイブリダイゼーションを行い、その後、48から68で2×SSC(又は1×SSC中、又は0.5×SSC中、又は0.1×SSC)中で、1時間洗浄する条件などを挙げることができる。なお、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子についても、ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の場合と同様である。

10

【0017】

「内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出」としては、例えば、細胞画分に内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞が含まれているかを検出したり、その割合を定量することなどが含まれる。また内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出には、該細胞の「同定」も含まれる。また、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を「分離する」とは、細胞集団中を、該細胞または該細胞を含む細胞集団とそれ以外の細胞集団とに分離することを言う。本発明において内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の分離は、細胞集団中の該細胞の割合を高めることでありよい。

【0018】

内胚葉細胞とは、外胚葉または中胚葉から産生される組織に分化するのではなく、膵臓、肝臓、肺、胃、腸および甲状腺などの内胚葉由来組織に分化できる細胞、又は内胚葉由来組織に分化した細胞である。

腸管細胞とは、小腸および大腸などの腸管上皮細胞に分化できる細胞、又は腸管上皮細胞に分化した細胞である。

膵細胞とは、内分泌細胞、外分泌細胞および膵管細胞などの成熟膵細胞に分化できる細胞、又は成熟膵細胞に分化した細胞である。

【0019】

本発明は、ヒト崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を指標とする、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出方法および分離方法を提供する。本発明者らは、崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子、Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子が内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞のマーカーであることを見出した。崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子を発現する細胞(崩壊促進因子(DAF, CD55)陽性細胞)を検出または選択することにより、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を検出・同定したり、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を特異的に分離することができる。本発明において崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の発現は、崩壊促進因子(DAF, CD55)mRNAの産生および/または崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質の産生でありよい。すなわち、崩壊促進因子(DAF, CD55)mRNAまたは崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質を検出することにより、崩壊促進因子(DAF, CD55)遺伝子の発現を検出することができる。例えば、崩壊促進因子(DAF, CD55)mRNAの検出は、崩壊促進因子(DAF, CD55)cDNA断片またはオリゴヌクレオチドを用いたノーザンハイブリダイゼーション、RNAプロテクションアッセイ、またはRT-PCRなどの公知の方法により実施することが可能である。崩壊促進因子(DAF, CD55)蛋白質の検出は、抗崩壊促進因子(DAF, CD55)抗体等を用いたウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA、免疫組織化学、FACS(fluorescence activated cell sorting; 蛍光活性化細胞分離)を用いる方法等の公知の方法により検出することができる。Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、

20

30

40

50

3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子についてもヒト崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の場合と同様である。

【0020】

本発明の検出方法および分離方法においては、崩壊促進因子 (DAF, CD55) 蛋白質を検出することにより崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出することが好ましい。また、FACS等のセルソーターを用いることで、効率的に細胞を検出または分画することもできる。

【0021】

本発明の検出または分離に用いる細胞としては特に制限はなく、内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞が含まれると予想される組織または細胞などを用いることができる。細胞は脊椎動物由来の細胞であり、好ましくは哺乳動物細胞 (例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類、サル、ヒトなどの霊長類等の細胞) である。ヒトへの応用を考えた場合には、ヒト細胞が好ましい。

10

【0022】

細胞試料の調製は公知の方法に従って行うことができる。例えば組織から内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を含む試料を調製するには、組織などを回収してリンス後、コラゲナーゼ、ディスパーゼを含む酵素溶液で処理し細胞を分散させる。このようにして調製した細胞から内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を検出・分離することができる。

【0023】

また、本発明の方法は株化細胞に適用することもできる。哺乳動物胎児もしくは新生児の腸管又は脾臓から調製した細胞を不死化し、本発明の方法により例えば内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を選択することもできる。ES細胞由来の細胞を用いて崩壊促進因子 (DAF, CD55) 陽性細胞を単離することも可能である。

20

【0024】

内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を検出する本発明の方法は、具体的には、(a) 細胞における崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出する工程、および (b) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞であると同定する工程により実施することができる。例えば、崩壊促進因子 (DAF, CD55) 陽性細胞の存在または割合を測定する工程により、それぞれ内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞の存在または割合を知ることができる。崩壊促進因子 (DAF, CD55) 陽性細胞を高い割合で含む細胞集団には、内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞が高い割合で含まれていると判断される。従って、崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を選択する工程により、内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を選択することができる。例えば、(a) 細胞における崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出する工程、および (b) 崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を分離する工程、により内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を分離することができる。あるいは予め細胞を分画しておき、分画された細胞において崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の発現を検出し、崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子を発現する細胞を選択することにより内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を分離・選択することができる。Tmem184a遺伝子、Akr1c19遺伝子、3300001A09Rik遺伝子、Aebp2遺伝子、Al464131遺伝子、Foxp4遺伝子、Hipk2遺伝子、Lass4遺伝子、Pbxip1遺伝子、Pcbd1遺伝子、及びPcdh1遺伝子についてもヒト崩壊促進因子 (DAF, CD55) 遺伝子の場合と同様である。

30

40

【0025】

内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞の分離は、好ましくは細胞表面に発現する崩壊促進因子 (DAF, CD55) 蛋白質に結合する抗体を用いて、(a) 内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を含む細胞試料を調製する工程、(b) 該細胞試料に崩壊促進因子 (DAF, CD55) に対する抗体を添加する工程、及び (c) 該抗体が結合した細胞を分離する工程により行うことができる。

【0026】

分離した細胞を回収することにより、内胚葉細胞、腸管細胞又は脾細胞を回収すること

50

ができる。例えば、ビーズやマトリックス等の水不溶性担体に抗崩壊促進因子 (DAF, CD 55)抗体または崩壊促進因子 (DAF, CD55)蛋白質に結合するリガンドを固定化し、これに細胞を直接的または間接的に結合させる方法、免疫吸着カラムによる分離、蛍光抗体標識細胞分離法、免疫磁気ビーズによる分離法などがある。また、上記の工程(c)は、FACSなどのセルソーターを用いて行うことができる。セルソーターを用いた細胞の分離は公知の方法により行うことができる。

【0027】

本発明において調製された細胞は、適当な培地を用いて培養したり保存したりすることができる。培地は、血清や増殖・分化因子などを補うことができる。培地としては、例えば、約10%ウシ胎仔血清(FCS)またはこれと同等の補剤を含むDMEMなどが挙げられるがこれに限定されない。例えば、アクチビン20ng/mlとbFGF 50 ng/ml (in 10%FBS/DMEM, 又は15%KSR/DMEM)の存在下で培養でき、あるいは下記の培地で培養できる。

10

【0028】

細胞の培養としては、細胞の維持、インキュベート、増殖、または保存などであってよく、例えば *in vitro* であれば、適当な培地中、37℃、5%CO₂、湿環境下でインキュベートすることが挙げられる。

【0029】

また、崩壊促進因子 (DAF, CD55)が、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞のマーカーとなることから、崩壊促進因子 (DAF, CD55)遺伝子の発現を指標として内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞をモニターすることが可能である。これを基に、例えば様々な薬剤や遺伝子の発現、その他の刺激などが細胞の分化誘導に及ぼす影響を評価することができる。例えば、被検試料が崩壊促進因子 (DAF, CD55)の発現に及ぼす効果を検出することにより、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞に作用する様々な薬剤をアッセイすることも可能である。

20

【0030】

本発明はさらに、崩壊促進因子 (DAF, CD55)に対する抗体を含む、内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞を検出又は分離するための試薬に関する。崩壊促進因子 (DAF, CD55)に対する抗体は、崩壊促進因子 (DAF, CD55)蛋白質またはその部分ペプチドを免疫原として用いたり、あるいは崩壊促進因子 (DAF, CD55)蛋白質を発現する細胞を免疫原として用いることによって製造することができる。

【0031】

免疫原としての崩壊促進因子 (DAF, CD55)蛋白質が由来する動物の種類に特に制限はなく、ヒト、サル、マウス、ラット、ウシ、ウサギ、その他の脊椎動物由来の崩壊促進因子 (DAF, CD55)蛋白質を用いることができる。抗体は、公知の方法に従って作製することが可能である。例えば、モノクローナル抗体であれば、公知の細胞融合法により製造することができる。

30

【0032】

上記抗体は、適宜生理食塩水、緩衝液、塩、安定剤などと組み合わせて内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の検出用試薬または分離用試薬とすることができる。例えばこの抗体を用いて組織中の内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の分布や量を検査したり、細胞試料中の内胚葉細胞、腸管細胞又は膵細胞の濃度を測定したりすることができる。抗体は蛍光標識されていてもよい。

40

【0033】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0034】

(1) 方法

(細胞培養)

(1) ES細胞の培養

Pdx1/GFP ES細胞 (SK7 ES細胞) は、Pdx1プロモーター下にGFPを導入した組み換え遺

50

伝子をホモでもつ遺伝子組み換えマウスの胚盤胞から樹立した。ES細胞は、マウス線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast ; MEF) 依存性で、ES細胞維持培地を用いて培養した。

【 0 0 3 5 】

(ES細胞維持培地 SK7 ES細胞用)

Glasgow minimum essential medium (GMEM)	(Invitrogen)	
15 % Knock-out Serum Replacement (KSR)	(Invitrogen)	
1 % FBS	(Hyclone)	
100 μM nonessential amino acids	(Invitrogen)	
2 mM L-glutamine	(Nacalai tesque)	10
1 mM sodium pyruvate	(Invitrogen)	
50 units/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin	(Nacalai tesque)	
100 μM β-mercaptoethanol	(Sigma)	
1000 units/ml LIF	(Chemicon)	

【 0 0 3 6 】

(2) 支持細胞の培養

M15細胞は野瀬俊明先生 (三菱化学生命科学研究所) およびDr. M. Rassoulzadegan (University of Nice-Sophia Antipolis) より供与された(Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. Cell. 1995;81:391-401)。細胞は下記の培地で培養した。M15細胞はコンフルエントになるまで培養し、マイトマイシンC(Sigma)処理(200 μg/ml 37℃ 2.5時間)したものを分化誘導実験に用いた。分化誘導前日に4 x 10⁵ cells/mlの濃度でゼラチンコートした24 well plateに0.5 ml、6 well plateに2 ml量で播いた。

【 0 0 3 7 】

(M15用培地)

DMEM	(Invitrogen)	
10 % FBS	(Hyclone)	
2 mM L-glutamine	(Nacalai tesque)	
50 units/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin	(Nacalai tesque)	30
100 μM β-mercaptoethanol	(Sigma)	

【 0 0 3 8 】

(3) 分化誘導方法

支持細胞との共培養

分化誘導を行う際には、MEFの持ち込みを減らすために一度ゼラチンコートしたdish上で培養したES細胞を用いた。この際にはES細胞維持培地を使用した。ES細胞を0.25 %トリプシン・EDTA液で剥離後、4℃ 1000 rpmで遠心して細胞を回収した。細胞は分化誘導培地で10000 cells/mlの濃度になるように再溶解した。あらかじめ支持細胞がコンフルエントになるまで培養しておいた24 wellおよび6 well plateに、用意したES細胞溶解液を24 well plateには0.5 ml、6 well plateには2 ml量で播いた。分化誘導培地は2日毎に交換した。分化誘導培地の組成を下に示す。

【 0 0 3 9 】

(分化誘導培地)

DMEM	(Invitrogen)	
10 % FBS	(Hyclone)	
100 μM nonessential amino acids	(Invitrogen)	
2 mM L-glutamine	(Nacalai tesque)	
50 units/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin	(Nacalai tesque)	
100 μM β-mercaptoethanol	(Sigma)	

【 0 0 4 0 】

(4) 液性因子および阻害因子

各種液性因子および阻害因子は、下記の濃度で使用した。

Recombinant human Activin A (R&D)	20 ng/ml
human bFGF (PEPROTECH)	50 ng/ml
Recombinant human BMP 7 (R&D)	25 ng/ml
SB203580 (CALBIOCHEM)	1 μ M;

【0041】

(フローサイトメーターを用いた解析)

細胞はCell Dissociation Buffer(Invitrogen)で37 20分間インキュベートし、プレートから剥がし、 1×10^6 cells/サンプル (50 μ l) の濃度に調製し、下記抗体を用いて染色した。染色した細胞は、1% FBSおよびpropidium iodideを含むHank's buffered salt solution (Sigma)に再溶解した後、40 μ mメッシュを用いて濾過し、解析用のサンプルとした。サンプルはFACS Canto(Becton Dickinson)を用いて解析し、データはBD FACS Diva Software(Becton Dickinson)を用いて取得した。胎生9.5日目のマウス正常胚においても、上記と同様の手順で解析を行った。得られたデータの解析にはFlowjo program (Tree Star)を使用した。また、マイクロアレイ解析用には、FACS AriaまたはAriaII(Becton Dickinson)を用いて、細胞を分取した。

10

【0042】

使用した抗体を以下に挙げる。

biotin-conjugated anti-E-cadherin monoclonal antibody (mAb) ECCD2, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Cxcr4 mAb 2B11 (BD Biosciences Pharmingen), PE-conjugated anti-FLK1 mAb AVAS12 (BD Biosciences Pharmingen), biotin-conjugated anti-PDGFR mAb APA5. Streptavidin-Allophycocyanin (BD Biosciences Pharmingen).

20

【0043】

(再培養)

M15細胞上で5日間分化誘導した細胞から、E-cadherinとCD55二重陽性分画をFACS Ariaを用いて分取した。分取した細胞は、あらかじめM15細胞を播いておいた24 well plateに 2.0×10^5 cells/wellの密度で播種した。再培養は、4500 mg/l グルコース、10%FBS, Activin, bFGF (細胞培養4の項参照) nicotinic acidを添加した条件で行った。また、培地の交換は再培養開始より毎日行った。

30

【0044】

(マイクロアレイ解析)

フローサイトメーターを用いて回収した細胞からtotal RNAを抽出し、Affymetrix社のプロトコルに従って、解析用サンプルを調製した。最終的に得られたサンプルの品質をBioanalyzer 2100(Agilent)で確認した後に、Affymetrix MOE430 2.0へサンプルを注入して45 で16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後はFluidics Station 450を用いて、洗いおよび抗体反応を行い、その後GeneChip scanner 3000を用いてアレイのスキャンを行った。得られたデータは、GeneSpring GX(Agilent)を用いて解析した。

【0045】

(細胞からのRNA抽出とcDNAの合成)

分化誘導後の細胞集団からFACSを用いて支持細胞を除去したものをサンプルとして、RNeasy mini kit(Qiagen)を用いて、total RNA抽出をした。RNA 3 μ gからoligo dT primers(Toyobo) 10 pmolを用いて、20 μ lの系でcDNAを合成した。得られたcDNAを5倍希釈後、その1 μ lをテンプレートとしてリアルタイムPCRに用いた。

40

【0046】

(リアルタイムPCR)

プライマーの設計については、Perfect Real Time Primerサポートシステム(タカラバイオ株式会社、<http://www.takara-bio.co.jp/prt/intro.htm>)とPrimer3 (<http://frododo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>)を参考にして行った。目的の遺伝子

50

のプライマーセットの他、サンプル間のRNA量を補正するための内部標準マーカーとして、 β -actinを使用した。手順としては、まずプライマーごとに検量線用のcDNA希釈液を作成した。検量線用のサンプルには、分化誘導開始後8日目のPdx1陽性胚性内胚葉細胞(D8 DE GFP(+))から抽出したRNAが合成したcDNA 5倍希釈液を、さらに3, 10, 30, 100倍に希釈して用いた。ネガティブコントロールとしては、滅菌水を用いた。サンプルには、ES細胞、外胚葉、中胚葉(側板および沿軸中胚葉の混合)、中内胚葉、分化誘導開始後5日目の胚性内胚葉、分化誘導開始後7日目の胚性内胚葉、分化誘導開始後8日目のPdx1陽性および陰性胚性内胚葉細胞より抽出したRNAから合成したcDNAの5倍希釈液を用いた。試薬はFast SYBR Green Master Mix、装置は7500 Fast Real-time PCR system(いずれもABI社)を用いて行った。いずれのサンプルもN=2で行った。解析終了後のデータを、エクセルにて解析し、D8 DE GFP(+)を100としたときの相対値を補正し算出した。

10

【0047】

相対値の補正方法

検量線より、相対量(Qty)が算出されているので、N=2以上の場合、Mean Qtyの値を使用した。

Mean Qty(相対量)/各胚葉での β -actinの値 \times 100 (1)

(1)で算出された値/D8 DE GFP(+)分画での値 補正值

【0048】

(Whole-mount in situ hybridization)

サンプルには胎生9.5日目、胎生8.5日目のマウス正常胚を用いた。サンプルを4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、メタノールにより脱水した。10 μ g/mlのProteinase K(nacalai tesque, #29442-85)で10分間処理した後、0.2%グルタルアルデヒド/4%パラホルムアルデヒドで30分程度固定した。PBST(1xPBS(-), 0.1%Tween20)で洗浄した後、70 $^{\circ}$ Cないし60 $^{\circ}$ Cでプレハイブリダイゼーションを約6時間行い、Digoxigenin (DIG) ラベルしたアンチセンスRNAプローブ(Roche, #11-277-073-910)1 μ g/mlを70 $^{\circ}$ Cないし60 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションバッファーは50%ホルムアミド(nacalai tesque, #16345-65), 0.5M NaCl, 1xPE, 50 μ g/ml Yeast torula RNA(Roche, #109-495), 500 μ g/ml heparin(Sigma, #H-3393-250KU), 2.5% 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.1% Tween20を使用した。その後、Wash1(0.3M NaCl, 1xPE(10 mM Piperazine-1, 4-bis(2-ethanesulfonic Acid) (PIPES) (pH 6.8), 1 mM EDTA), 0.1%Tween20), Wash2(0.05M NaCl, 1xPE, 0.1%Tween20), Wash3(50%ホルムアミド, 0.3M NaCl, 1xPE, 0.1%Tween20), Wash4(50%ホルムアミド, 0.15M NaCl, 1xPE, 0.1%Tween20), Wash5(0.5M NaCl, 1xPE, 0.1% Tween20)で70 $^{\circ}$ C 30分ずつ洗浄後、室温のMABT(1xMAB (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl (pH 7.5)), 0.1%Tween20)で洗浄した。2%Blocking溶液(Roche, #1-096-176, sheep serum (Sigma, #S-2263), MABT中に溶解)で約6時間ブロッキングを行い、4 $^{\circ}$ Cで一晩抗DIG抗体(Anti Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, #11-093-274-910)を反応させた。再度、MABTで洗浄し、NTMT(0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl(pH9.5), 0.05M MgCl₂, 0.1% Tween20)で1時間震盪後、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド(NBT)(Roche, #1-383-213)、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸(BCIP)(Roche, #1-383-221)で発色した。RNAプローブ作成に使用したプラスミドは、Open Biosystems社と独立行政法人理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンターより購入した。

20

30

40

【0049】

(パラフィン切片作成)

Whole-mount in situ hybridization法によって特異的なシグナルが得られたマウス胚に対し、パラフィン切片作成を行った。置換、包埋操作の間、マウス胚はユニ・カセットバイオプシーシックス(サクラファインテックジャパン)内で処理を行った。Whole-mount in situ hybridization後、100%メタノール置換したサンプルを、50%エタノール/PBS、70%エタノール/PBS、90%エタノール/PBSに一回ずつ30分ごと、100%エタノー

50

ル、100%キシレン槽に二回ずつ二時間～一晩置換し、その後キシレン/パラフィン(2:1)に一回、一晩、パラフィン槽に二回、一晩ずつ置換し、包埋を行った。包埋を行ったサンプルは、シグナルの強さにより10-20 μ mの厚さで切片の作成を行った。作成したパラフィン切片については、37 $^{\circ}$ C一晩乾燥させた後、100%キシレン槽に二回、100%エタノール槽に二回5分、90%エタノール、70%エタノール、50%エタノール槽、ミリQ水に一回ずつ5分通し、その後50%エタノール、70%エタノール、90%エタノール槽に一回ずつ5分、100%エタノール槽に二回ずつ5分通した後、100%キシレン槽に二回通した後、封入を行った。

【0050】

(凍結切片作成)

サンプルを4%パラホルムアルデヒドで4 $^{\circ}$ C一晩固定し、15%スクロース、30%スクロース内でそれぞれ4 $^{\circ}$ C一晩振とうした。その後、O.C.Tコンパウンド(Tissue-Tec)で包埋、10 μ mの厚さで切片を作成し、37 $^{\circ}$ C一晩乾燥させた。

【0051】

(切片上でのin situ hybridization(凍結切片))

スライドガラスをPBSTに浸し、O.C.Tコンパウンドを水和し、1 μ g/mlのProteinase Kで5分間処理した後、0.2%グルタルアルデヒド/4%パラホルムアルデヒドで30分程度固定した。PBSTで洗浄した後、70 $^{\circ}$ Cないし60 $^{\circ}$ Cで5-6時間プレハイブリダイゼーションを行い、DIGラベルしたアンチセンスRNAプローブ1 μ g/mlを70 $^{\circ}$ Cないし60 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションバッファーは50%ホルムアミド、5xSSC(クエン酸緩衝液 pH7.0)、1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、50 μ g/ml Yeast torula RNA、50 μ g/ml heparinを使用した。50%ホルムアミド 5xSSC(pH7.0)、1%SDS、50%ホルムアミド、2xSSCで70 $^{\circ}$ Cないし60 $^{\circ}$ Cで30分ずつ洗浄し、室温のMABTで洗浄した。Blocking溶液で約6時間ブロッキングを行い、4 $^{\circ}$ Cで一晩抗DIG抗体を反応させた。再度、MABTで洗浄し、NTMTで30分間震盪後、NBT、BCIPで発色した。

【0052】

(2)結果

(2-1)マイクロアレイ解析および候補遺伝子の抽出

本発明者らは、これまで支持細胞の使用と液性因子添加とを組み合わせることでES細胞から効率的に内胚葉細胞を分化誘導できる方法を報告している(Shiraki N, Yoshida T, Araki K, et al. Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. Stem Cells. 2008;26:874-885; 及びShiraki N, Umeda K, Sakashita N, et al. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. Genes Cells. 2008;13:731-746)。また、上記分化誘導方法を構築する過程で、ES細胞の分化には様々なシグナルが関与することを見いだしてきた。これらの知見を参考にして、図1Aに示すように添加する液性因子の組み合わせを換えることにより、内胚葉のみならず中胚葉および外胚葉を効率よく分化誘導することに成功している(Shiraki N, Higuchi Y, Harada S, et al. Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. Biochem Biophys Res Commun. 2009;381:694-699)。

【0053】

本発明では、図1Aの分化誘導方法を用いて、図1Bに示すような各種分化細胞の発現プロファイルを作成して、それを比較することにより新規内胚葉マーカーの探索を行った。まず、それぞれの系譜へ分化させた細胞から特定の細胞集団をフローサイトメーターで回収した。分取するために使用した抗体の組み合わせについては、図1Bに記載した。それぞれの細胞集団について、約 1.0×10^6 個の細胞を分取して、マイクロアレイ解析用のサンプル作成を行った。解析には、マウスのすべての遺伝子セットが集積されているAffymetrix社のGeneChip MOE430 2.0を用いた。

【0054】

分化誘導開始から5日目の初期の胚性内胚葉細胞(D5 DE)において、シグナル強度 > 5

10

20

30

40

50

0、Flag=Presenceのもので、ES、初期の未分化な外胚葉、側板中胚葉、沿軸中胚葉、中内胚葉における発現と比較して、D5 DEで発現量が5倍以上の既知遺伝子を中心に、解析を行った。

【0055】

これら遺伝子の中で、特に転写因子やドメイン構造を持つもの27遺伝子について、内胚葉での発現を解析するために、マウス正常胚での発現解析を行う候補遺伝子とした。

【0056】

(2-2) Whole-mount in situ hybridizationによる解析結果

(2-1) で選んだ候補遺伝子の正常胚での発現を調べる為に、マウス胎生8.5および9.5日目の胚を用いて、Whole-mount in situ hybridizationを行った。

胎生9.5日目と胎生8.5日目の両ステージで内胚葉において特異的な発現を確認した新規の候補CD55遺伝子(以下の文献を参照)を見出した。

【0057】

Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:35-58.

Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:445-459.

Miwa T, Sun X, Ohta R, et al. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored decay accelerating factor (GPI-DAF) and transmembrane DAF gene expression in wild-type and GPI-DAF gene knockout mice using polyclonal and monoclonal antibodies with dual or single specificity. *Immunology.* 2001;104:207-214.

Song WC, Deng C, Raszmann K, et al. Mouse decay-accelerating factor: selective and tissue-specific induction by estrogen of the gene encoding the glycosylphosphatidylinositol-anchored form. *J Immunol.* 1996;157:4166-4172.

Spicer AP, Seldin MF, Gendler SJ. Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse decay-accelerating factor genes. Duplicated genes encode glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms. *J Immunol.* 1995;155:3079-3091

【0058】

以下の実験では、このCD55について詳細な解析を進めた。マイクロアレイ解析の結果より、CD55は分化誘導5日目以降の胚性内胚葉分画で高い発現量を示していることが確認された(図2A)。また、発現量を確認するために行ったリアルタイムPCR解析においても同様の結果を示した(図2B)。これらの結果から、CD55は、分化誘導開始後5日目の胚性内胚葉分画より発現が上昇し、以降分化誘導開始後8日目まで、一定の発現量が保たれていることを確認した。さらに、Whole-mount in situ hybridizationによる解析により、胎生8.5日目のマウス正常胚では前腸門領域に、胎生9.5日目のマウス正常胚では腸管領域に特異的な発現を確認することができた(図3A及びB)。続いて、上記のサンプルに対し、パラフィン切片を作成し、CD55が発現する領域を確認した。シグナルは、胎生8.5日目のマウス正常胚では前腸内胚葉領域に、胎生9.5日目のマウス正常胚では後腸内胚葉領域に確認することができた(図3A及びB)。さらに詳しい解析を行うために、凍結切片を作成し、切片でのin situ hybridizationによる解析を行った。その結果、胎生8.5日目のマウス正常胚では前腸、後腸内胚葉領域に加え、羊膜領域でも発現を確認し、胎生9.5日目では肺原基と間充織にシグナルを確認した(図3C及びD)。以上の結果から、CD55は初期内胚葉領域で発現するが、中胚葉でも発現するということが明らかになった。

【0059】

(2-3) フローサイトメトリー解析(培養細胞)

CD55は既知遺伝子であり、細胞表面で発現することが報告されている。さらに、抗体が市販されているため、次にフローサイトメーターによる解析を行った。胚性内胚葉として同定する方法としては、E-cadherinとケモカインレセプターCxcr4の二つのマーカー

遺伝子を用い、二重陽性部分を胚性内胚葉分画と規定するという報告がなされ、本発明者らも現在その方法を用いている。当初の目的としては胚性内胚葉を同定するための単一マーカーの探索であったが、Whole-mount in situ hybridizationと切片でのin situ hybridizationでの解析結果より、CD55は内胚葉のみではなく中胚葉でも発現する事が分かったため、中胚葉分画を除く目的でE-cadherinをCD55と併用してフローサイトメトリ解析を行った。解析には、図1Aに示した分化誘導方法で内胚葉へ分化誘導した細胞(D5 DE)を用いた。まずFSCとSSCで展開し支持細胞M15細胞を除き、次にPI陰性分画を同定し、さらにその分画をE-cadherinとCxcr4およびCD55陽性分画で展開した。まず、現行のマーカー遺伝子であるE-cadherinとCxcr4で展開した後、二重陽性分画をCD55で再展開した。もう一方は、E-cadherinとCD55で展開した後、二重陽性分画をCxcr4で再展開した(図4A)。この結果より、E-cadherinとCxcr4で展開した後、CD55で再展開した分画にはCD55陰性細胞が含まれている事が分かった。一方、E-cadherinとCD55で展開した後Cxcr4で再展開した分画には、Cxcr4陰性細胞が含まれていない事が分かった。以上の結果から、E-cadherinとCD55の両陽性細胞は、E-cadherinおよびCxcr4両陽性の胚性内胚葉よりも狭い範囲を規定する細胞集団であることが示唆された(図4A)。

10

【0060】

また、M15細胞上で5日間分化誘導した細胞からE-cadherinとCD55の二重陽性分画についてフローサイトメーターを用いて分取し、M15細胞上で再培養を行った。再培養開始4日目(分化誘導開始9日目)に、GFPの蛍光が観察され始め、5日目(分化誘導開始10日目)には更に強いGFPの蛍光を確認した。この結果からも、E-cadherinとCD55の二重陽性分画は胚性内胚葉を規定していることが強く示唆された。

20

【0061】

さらに、本発明者らは以前の実験により、内胚葉分化が進むにつれてCxcr4の発現量が低下することを確認していたため、次に分化誘導開始後8日目、10日目、12日目における、E-cadherinとCxcr4二重陽性分画とE-cadherinとCD55二重陽性分画の時間経過における推移を調べた(図4A)。分化誘導開始後8日目の胚性内胚葉分画においては、いずれのマーカー遺伝子でも高い発現が見られた。しかし、10日目においてはE-cadherinとCD55二重陽性分画の細胞数には変化が見られないのに対し、E-cadherinとCxcr4二重陽性分画の細胞数が減少していることを確認した。さらに、12日目にはE-cadherinとCD55二重陽性分画の細胞数には依然として変化が見られないのに対し、E-cadherinとCxcr4二重陽性分画の細胞数は非常に減少していることを確認した。このことから、CD55は分化が進んだ内胚葉のマーカーとしても利用可能であることが示唆された。

30

【0062】

(2-4) フローサイトメトリ解析(正常胚)

次に胎生9.5日目のPdx1/GFPマウス胚を用い、正常胚でのCD55の発現についてフローサイトメーターによる解析を行った(図4B)。解析方法としては、E-cadherinとGFPで展開し、二重陽性分画をCxcr4またはCD55で再展開した。この解析より、Pdx1陽性細胞ではCxcr4で展開した場合にCxcr4陽性、陰性の両細胞を含むが、CD55で展開した場合には、マーカーCD55に対して完全に陰性である細胞を含まないことが分かった。このことから、胎生9.5日目のPdx1陽性前駆細胞は、CD55陽性であることがわかった。

40

【0063】

(2-5) マイクロアレイ解析

以上の実験の結果を踏まえ、E-cadherinとCxcr4二重陽性分画またはE-cadherinとCD55二重陽性分画において、どのような遺伝子について発現が上昇しているかを調べるために、それぞれの分画を分取し、マイクロアレイ解析を行った(図5)。図5Aに示すように、E-cadherinとCxcr4二重陽性細胞とE-cadherinとCD55二重陽性細胞は非常に似た発現プロファイルを示すことが明らかになった。また、他の胚葉と比較したクラスタリング解析でも同様の結果が得られた(図5B)。さらに、それぞれの分画で発現上昇している遺伝子についても、詳細に解析した(図6)。E-cadherinとCxcr4二重陽性分画とE-cadherinとCD55二重陽性分画の両方において、他の胚葉に比べて発現が上昇している遺伝子は2

50

07個存在していたが、その中には内胚葉で上昇することが既に報告されている遺伝子が多く含まれ、さらに中には内胚葉特異的または膵臓特異的な発現をする候補遺伝子として、マウス正常胚での発現解析を行ったもののうち、14遺伝子が含まれていた。207遺伝子のなかの一例を図6に示す。これらの遺伝子には、Foxa2, Sox17など内胚葉マーカーはすべて含まれており、CD55が内胚葉マーカーとして利用可能であることが示された。また、重複していない部分にもLefty1やSfrp1といった既報の内胚葉マーカーが含まれていた。

【0064】

(2-6) 発生初期の膵芽で発現する新規遺伝子の同定

さらに、ES細胞由来のPdx1陽性細胞で発現する遺伝子の中で、発生初期の膵芽で発現しているかどうかについて、マウスの胎仔を用いて、切片上およびwhole mount in situ hybridization法で検索したところ、いくつか新規な遺伝子を同定した(図7、8、9及び10)。

10

【0065】

図7は、Tmem184a遺伝子のWhole mount in situ hybridization解析を示す。E8.5マウス胎仔において、前腸門(anterior intestinal portal (AIP))のところで発現が見られた(A, B, 矢頭)。そしてE9.5では膵芽をふくむ腸管上皮で発現が見られた(C, 矢頭)。

図8は、Tmem184a遺伝子の腸管上皮での発現パターンを示す。E9.5では腸管上皮において、発現が見られた。E12.5においては、膵芽で発現が見られた。

20

【0066】

図9は、Akr1c19遺伝子のWhole mount in situ hybridization解析を示す。E8.5マウス胎仔において、前腸門(anterior intestinal portal (AIP))で発現が見られた(A 矢頭)。そしてE9.5では膵芽(D, 矢頭)をふくむ腸管上皮で発現が見られた。

図10は、Akr1c19遺伝子のE9.5の腸管上皮、およびE12.5, E14.5胎仔膵上皮での発現パターンを示す。E9.5, においては、Akr1c19遺伝子は腸管上皮で発現がみられた。E12.5, E14.5において、Akr1c19遺伝子は膵上皮で発現が見られた。その発現パターンはPdx1遺伝子とよく似ている。

【0067】

表1は、上記以外にE14.5の膵臓で発現が見られた遺伝子のリストを示す。これらの遺伝子について、膵臓での発現がまったく知られていなかったものは、3300001A09Rik、Aebp2、Al464131、Akr1c19、Foxp4、Lass4、及びPbxip1の7つであり、また、膵臓で発現についてGene Paintにのみ載っている遺伝子はPcbd1、及びPcdh1の2つである。

30

【0068】

【表 1】

Gene Symbol	Description	Genbank
3300001A09Rik	RIKEN cDNA 3300001A09 gene	AK014341
Aebp2	AE binding protein 2	BB667191
AI464131	expressed sequence AI464131	BG063189
Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19	BG073853
Apoe	apolipoprotein E	AK019319
Foxp4	forkhead box P4	BQ286886
Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2	NM_010433
Lass4	longevity assurance homolog 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	BB006809
Pbxip1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	AV220340
Pcbd1	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	NM_025273
Pcdh1	protocadherin 1	AK008111
Tmem184a (BC019731)	transmembrane protein 184a	NM_001161548

10

【 0 0 6 9 】

20

図 1 1 は、E14.5 の腭臓で発現が見られた遺伝子の腭上皮における発現パターンを示す。切片での *in situ hybridization* の像を示す。

【 0 0 7 0 】

(3) 考察

今までに胚性内胚葉特異的な新規マーカー遺伝子の探索に関する報告が成されてきた (Hou J, Charters AM, Lee SC, et al. A systematic screen for genes expressed in definitive endoderm by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *BMC Dev Biol.* 2007;7:92. ; 及び Sherwood RI, Jitianu C, Cleaver O, et al. Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm. *Dev Biol.* 2007;304:541-555)。しかし、いずれの論文においても、胚性内胚葉特異的に発現する新規遺伝子は示されなかった。上記の報告を踏まえて、本発明は、胚性内胚葉特異的または腭臓特異的な新規のマーカー遺伝子を単離することを目的として行った。本発明では、胚性内胚葉特異的または腭臓特異的な新規候補遺伝子として、CD55 に注目した。上記の結果より、マウス正常胚において CD55 は胚性内胚葉と中胚葉領域に発現していることが分かった (図 3)。これより、CD55 は胚性内胚葉を同定するための単一マーカーとして使用するよりも、中胚葉以外の細胞を認識する E-cadherin と組み合わせることで使用するにより、胚性内胚葉を同定できることが明らかとなった。E-cadherin と Cxcr4 または CD55 を組み合わせ、フローサイトメーターによる解析を行った結果より、CD55 は Cxcr4 に比べてより狭い範囲で発現していること、そして培養後期まで高い発現を保っていることが示唆された (図 4A)。また、E-cadherin と CD55 二重陽性分画を分取し、再培養することにより GFP の蛍光が観察された。

30

40

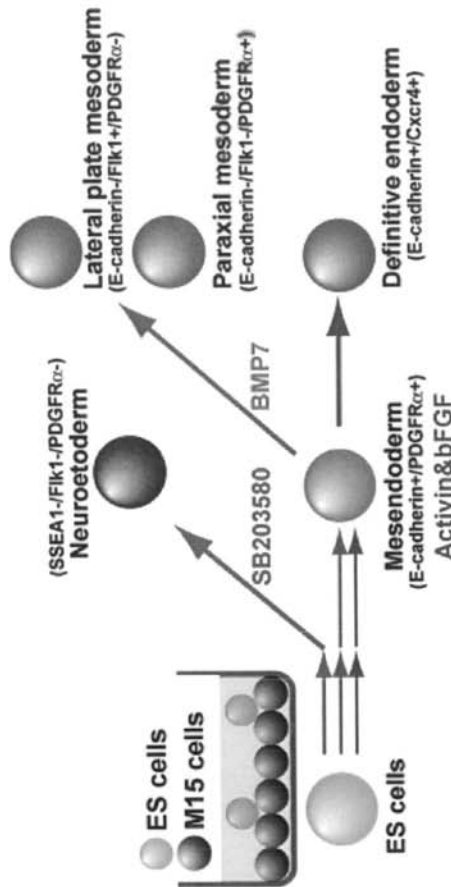
【 0 0 7 1 】

さらに胎生 9.5 日目の Pdx1/GFP マウス正常胚を用いたフローサイトメーターによる解析結果からは、胎生 9.5 日目の Pdx1 陽性細胞には Cxcr4 陰性細胞が存在するため、E-cadherin と Cxcr4 で抽出した場合取りこぼしがあるが、E-cadherin と CD55 で抽出した場合は取りこぼし無く Pdx1 陽性細胞を同定できることが分かった (図 4 B)。最後に E-cadherin と Cxcr4、E-cadherin と CD55 二重陽性細胞をそれぞれ分取し、マイクロアレイ解析を行った結果より、CD55 は胚性内胚葉を同定するマーカーとして、有用であることが示された。

【 図 1 】

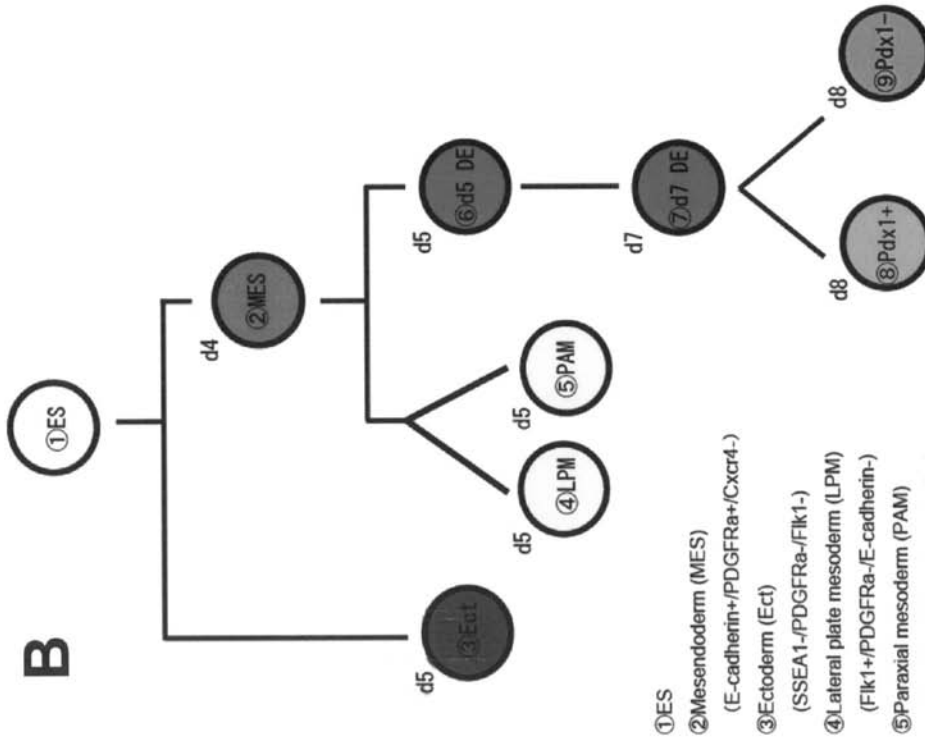
Figure.1 分化誘導方法

A



- 中内胚葉と内胚葉→アクチビンとbFGFを添加し、4日～8日間培養
- 外胚葉→SB203580を添加し、5日間培養
- 中胚葉→BMP7を添加し、5日間培養

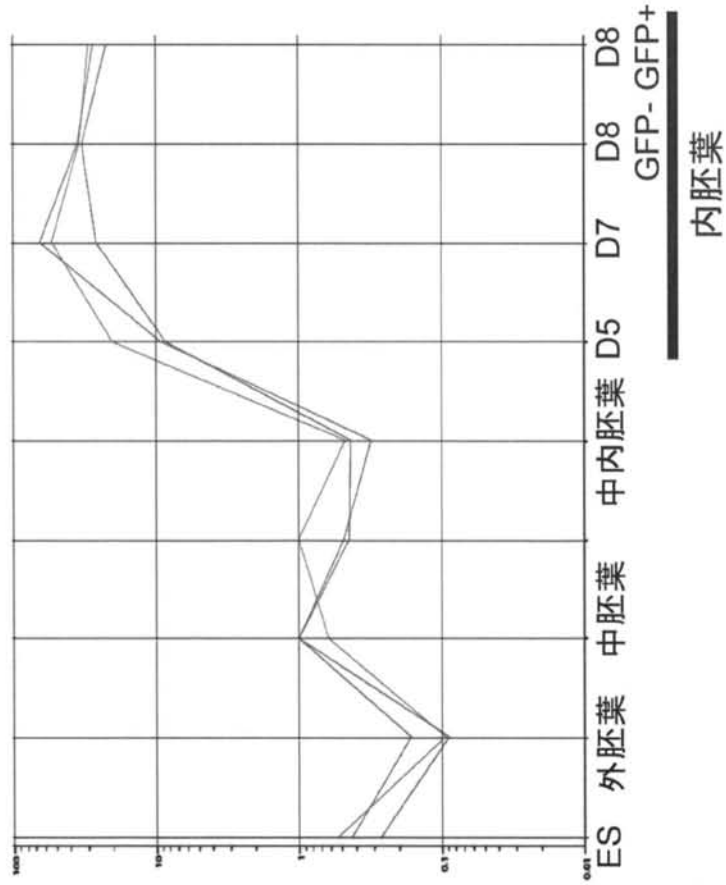
B



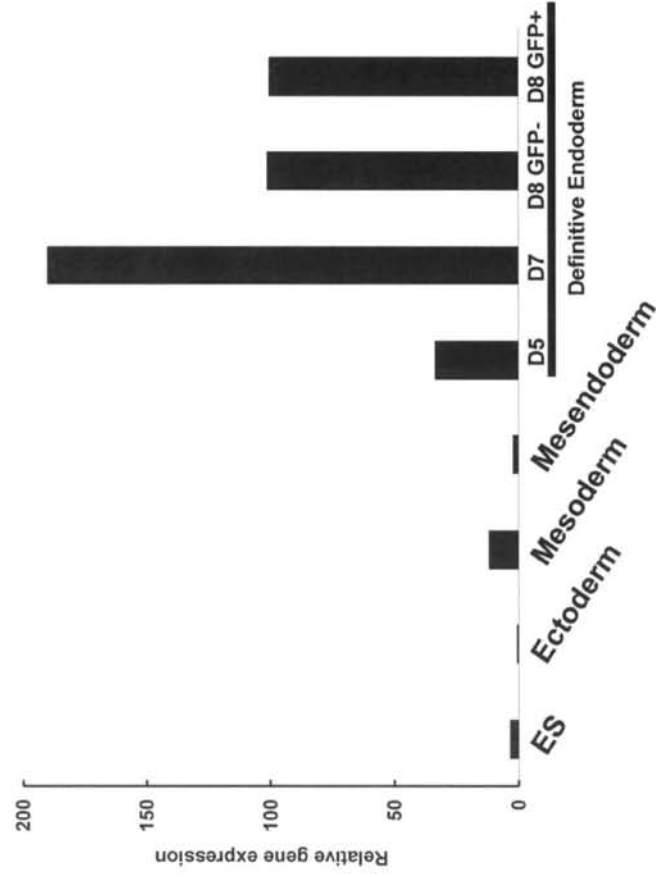
- ①ES
- ② Mesoderm (MES)
(E-cadherin+/PDGFR α + /Cxcr4-)
- ③ Ectoderm (Ect)
(SSEA1-/PDGFR α - /Flk1-)
- ④ Lateral plate mesoderm (LPM)
(Flk1+/PDGFR α - /E-cadherin-)
- ⑤ Paraxial mesoderm (PAM)
(Flk1-/PDGFR α + /E-cadherin-)
- ⑥ d5 Definitive endoderm (d5 DE)
(E-cadherin+/Cxcr4+ /PDGFR α -)
- ⑦ d7 Definitive endoderm (d7 DE)
(E-cadherin+/Cxcr4+)
- ⑧ d8 Definitive endoderm Pdx1/GFP+ (d8 Pdx1+)
(GFP+/E-cadherin+/Cxcr4+)
- ⑨ d8 Definitive endoderm Pdx1/GFP- (d8 Pdx1-)
(GFP-/E-cadherin+/Cxcr4+)

Figure.2 CD55の発現パターン

A マイクロアレイ解析



B Real-time PCR



【 図 3 】

Figure.3 CD55のマウス正常胚における発現パターン

Whole-mount *in situ* hybridization

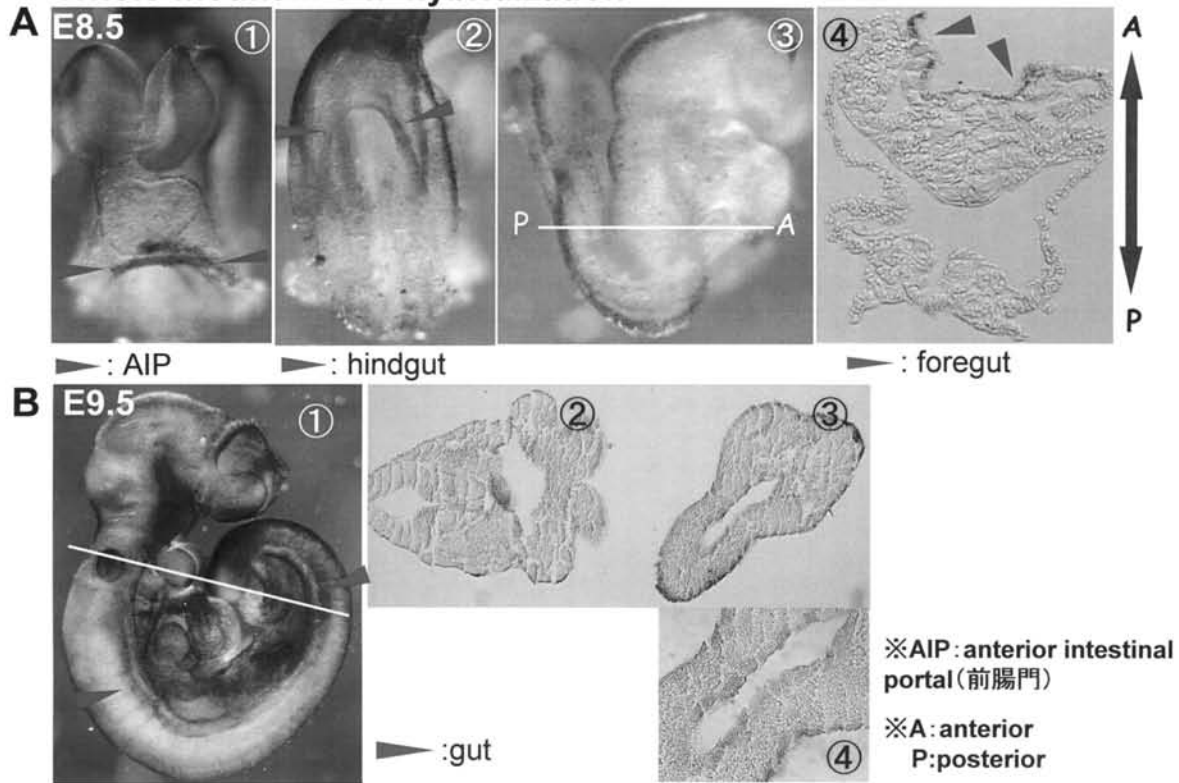


Figure.3 CD55のマウス正常胚における発現パターン

section *in situ* hybridization

C: E8.5

D: E9.5

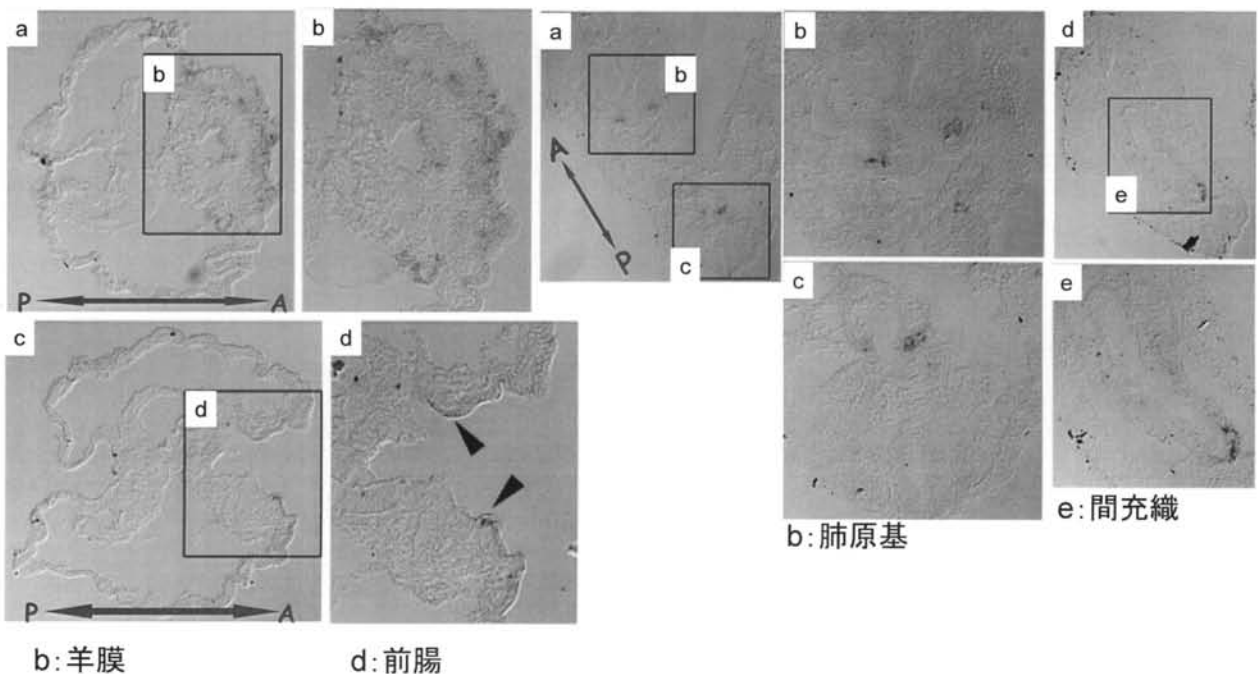
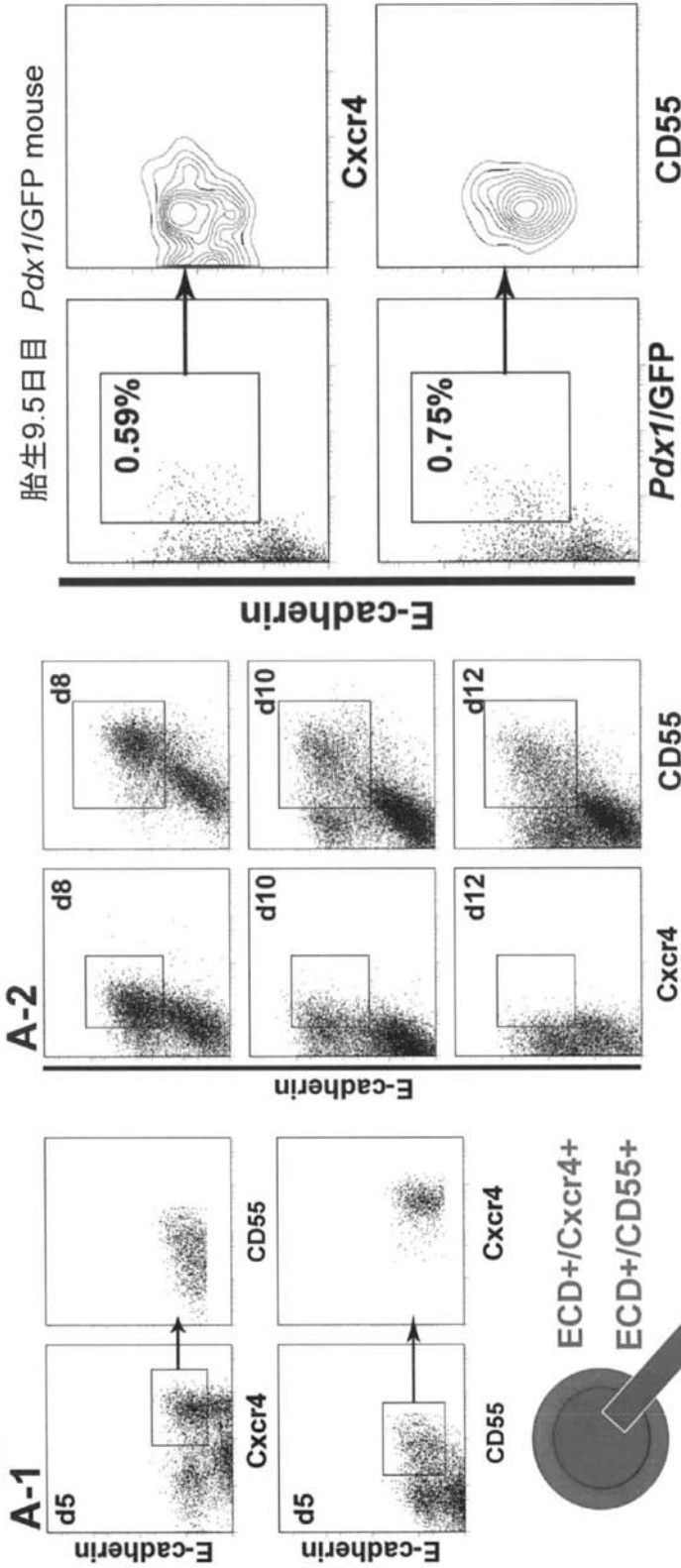


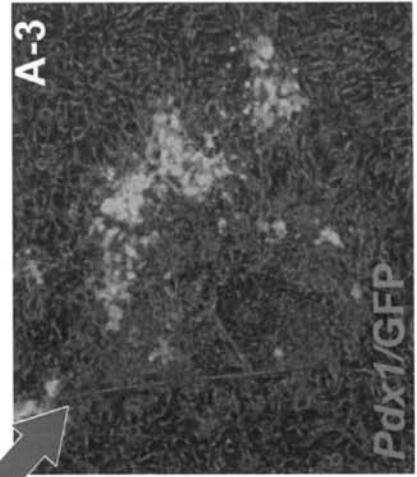
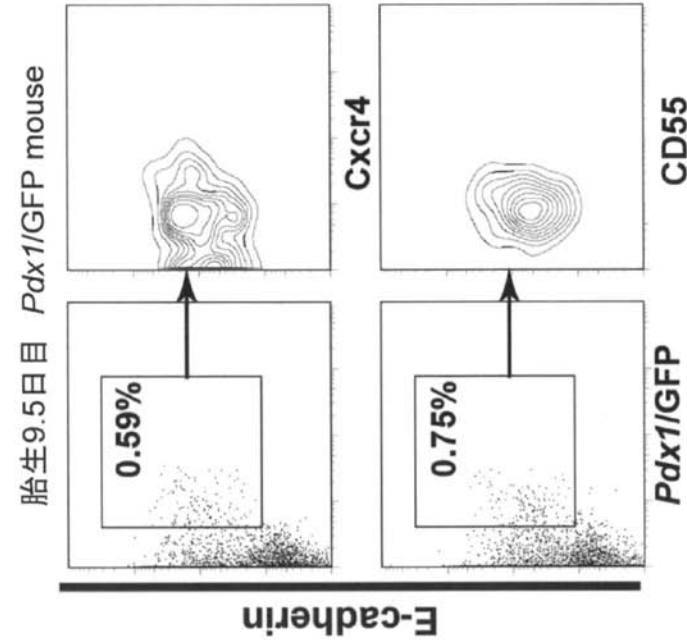
Figure.4 フローサイトメーターによる解析

【 図 4 】

A ES細胞でのCD55の発現(FACS)



B 正常胚でのCD55の発現(FACS)

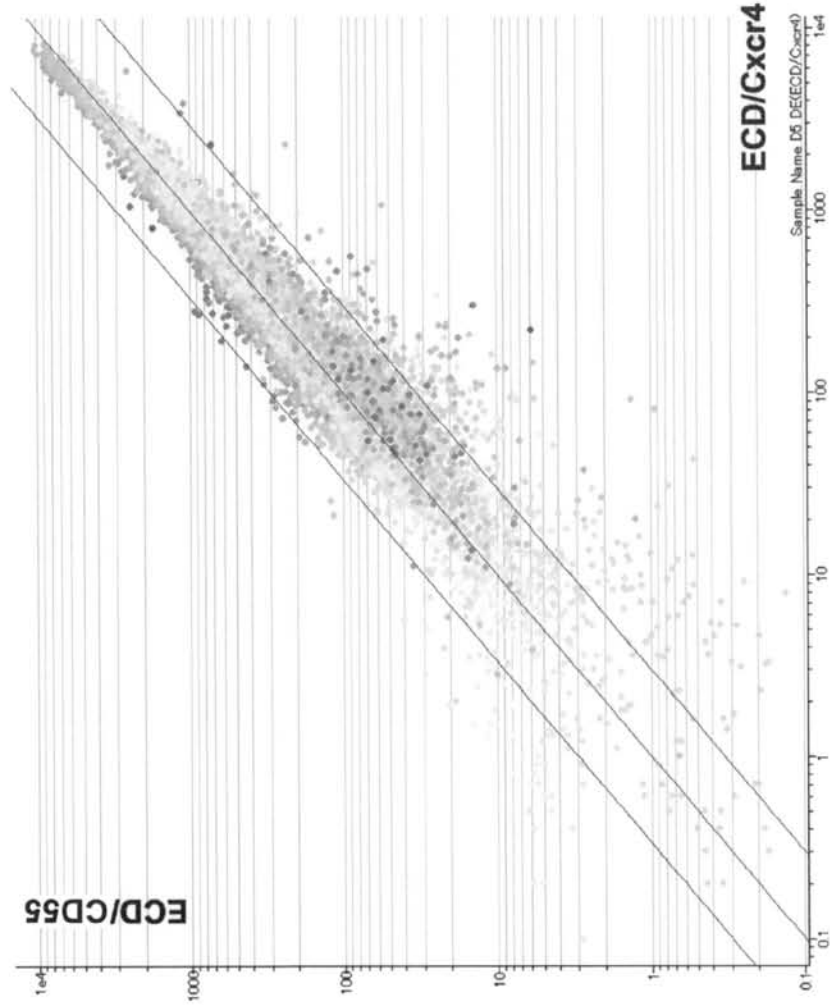


再培養5日目(d10)

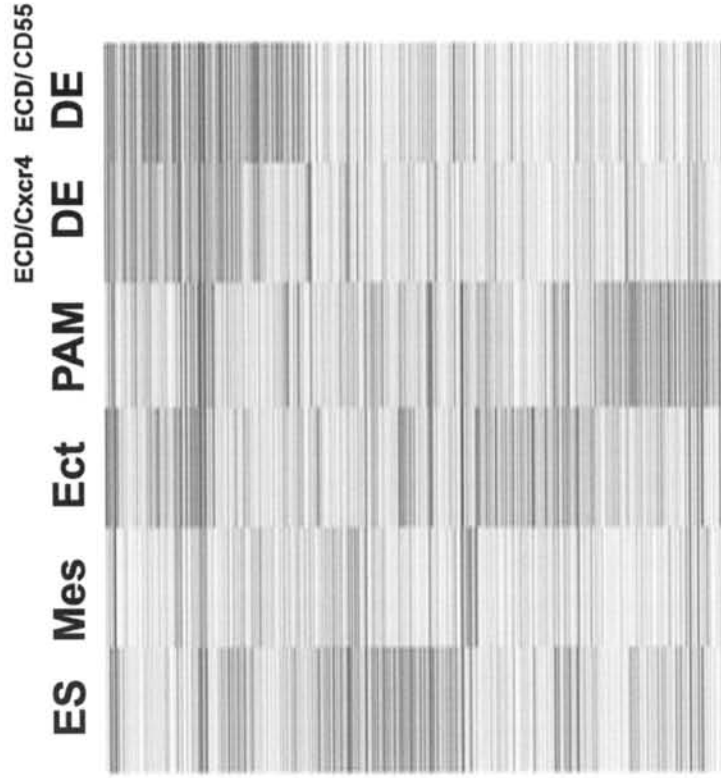
【 図 5 】

Figure.5 マイクロアレイ解析

A Scattered plot

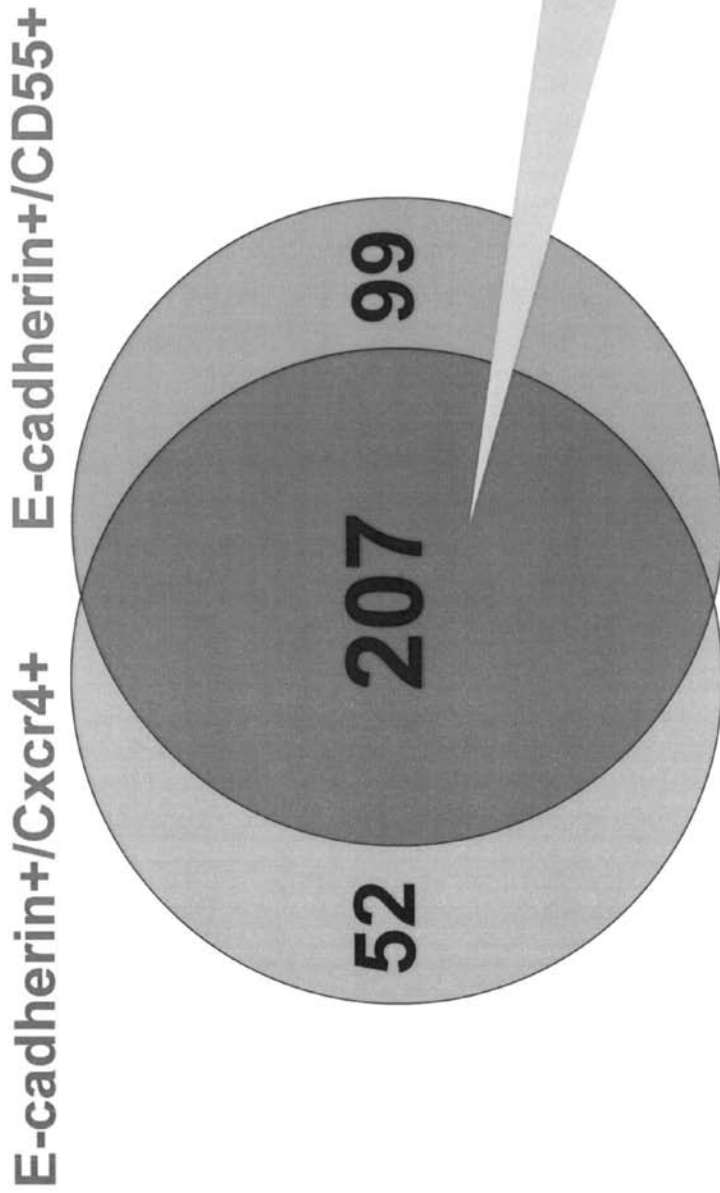


B Clustering



【 図 6 】

Figure.6 マイクロアレイ解析



The number of genes enriched in definitive endoderm cells

Sample

ES, Ectoderm, Mesendoderm, Paraxial mesoderm, Definitive endoderm (ECD+/Cxcr4+ or ECD+/GeneA+)

Purification condition

#1 Signal intensity in definitive endoderm cells is more than 50

#2 Normalized value in definitive endoderm cells is more than 5

【 図 7 】

Tmem184a(BC019731)

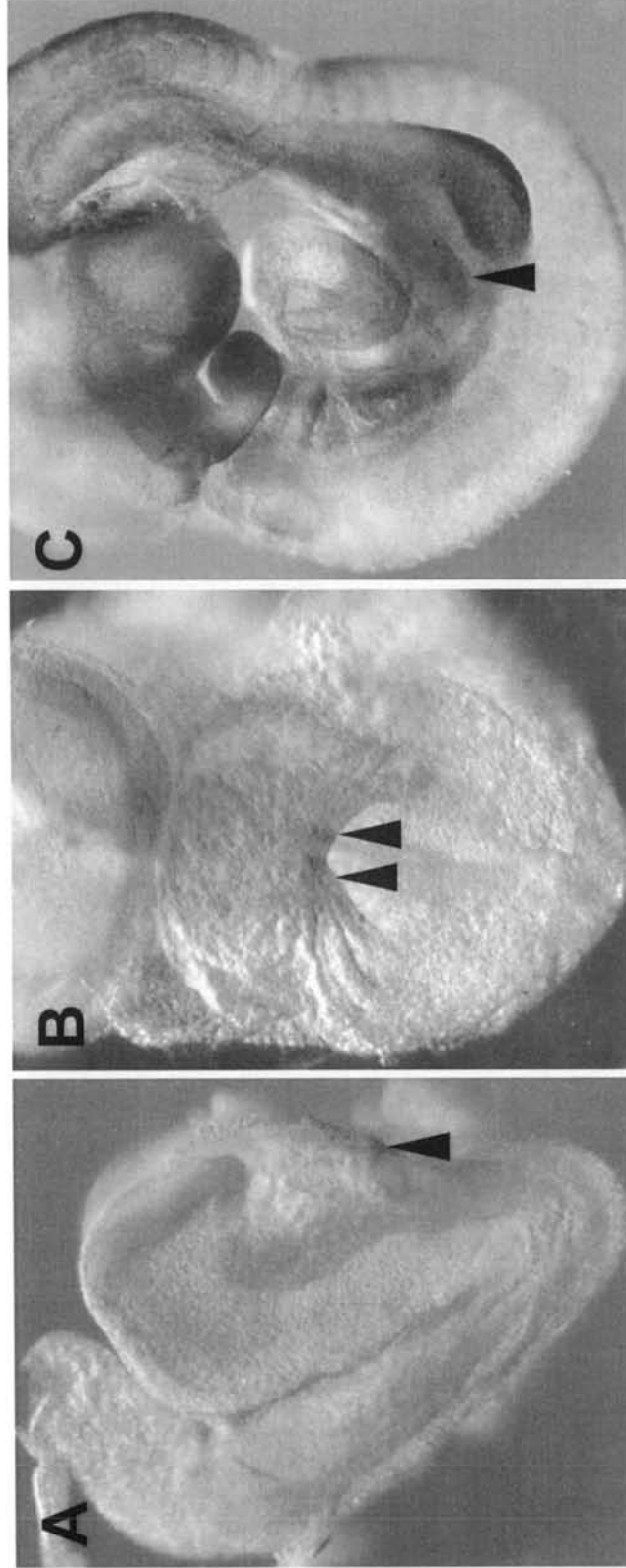
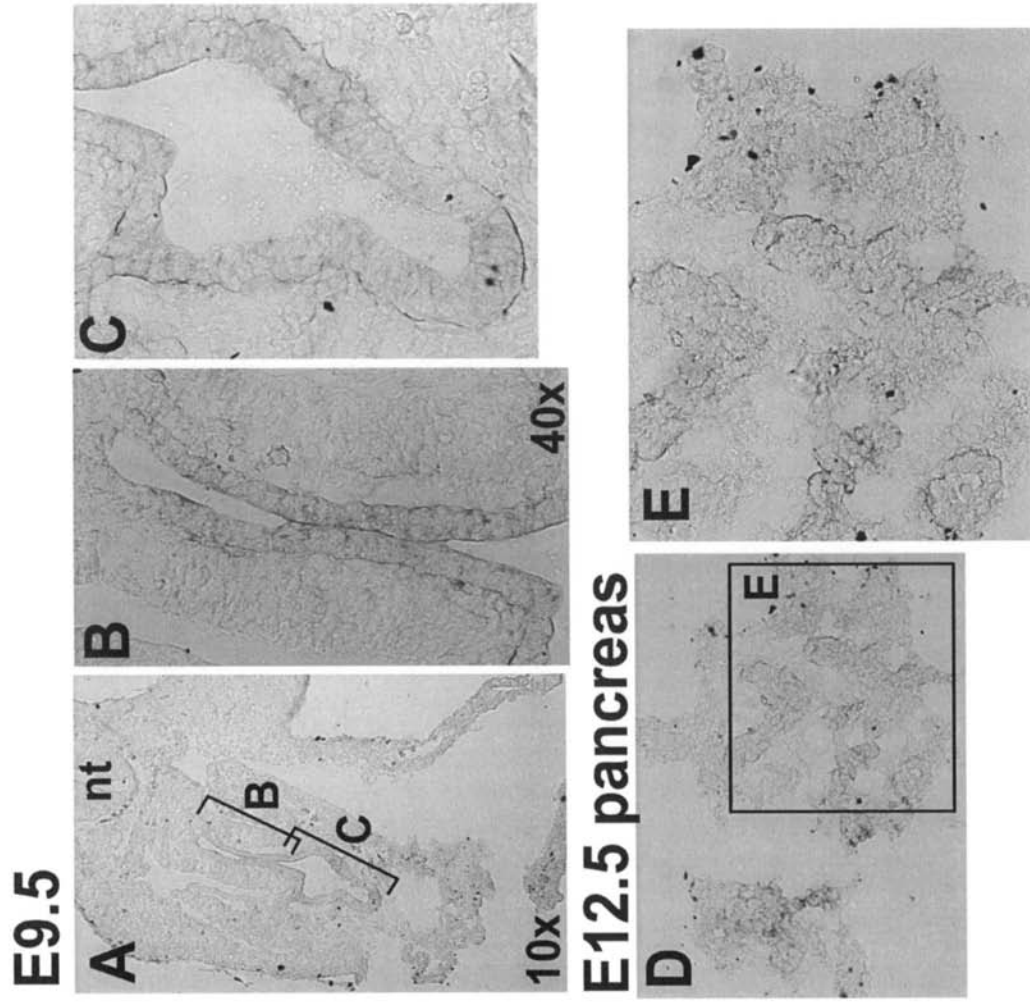


Fig 7

【 8 】

Fig 8 *Tmem184a*(BC019731)



【 図 9 】

Akr1c19

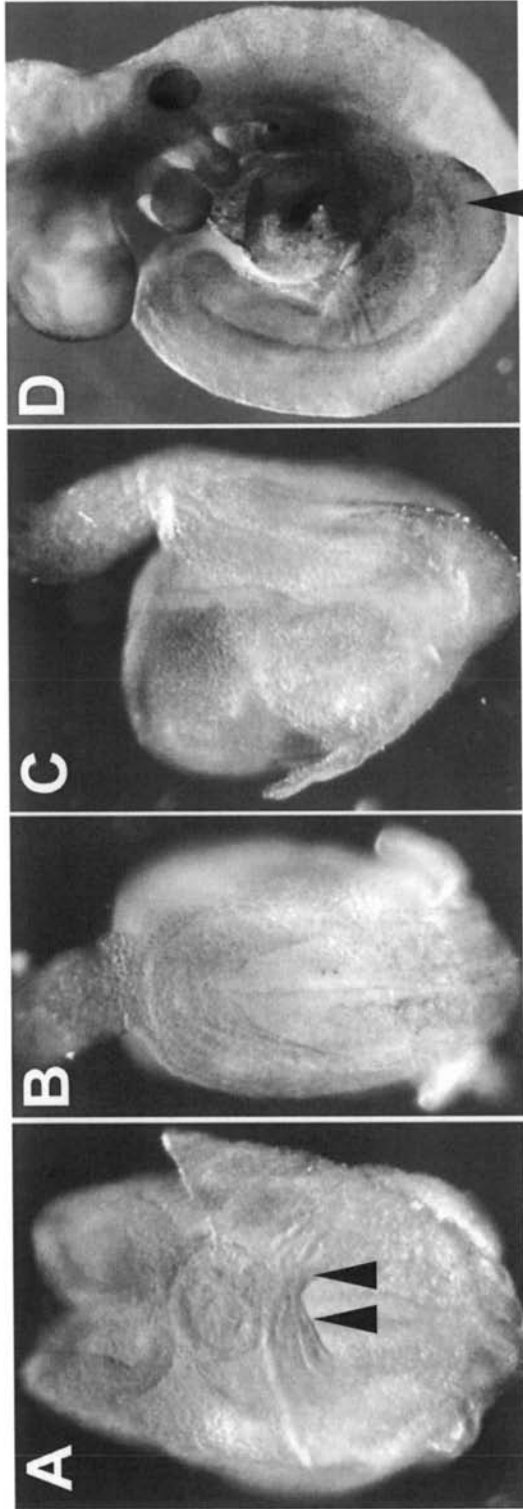


Fig 9

【 図 1 0 】

Akr1c19

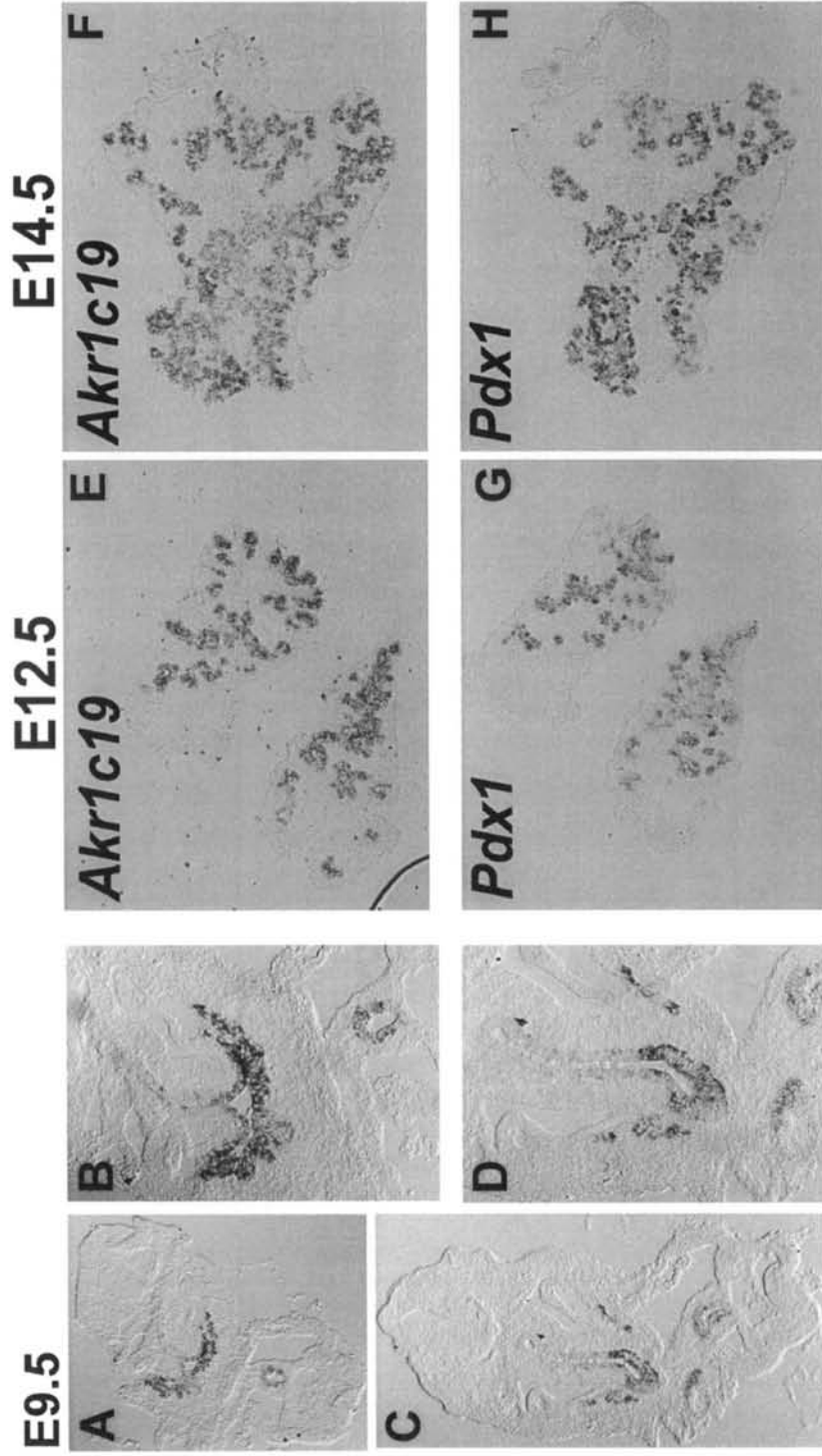
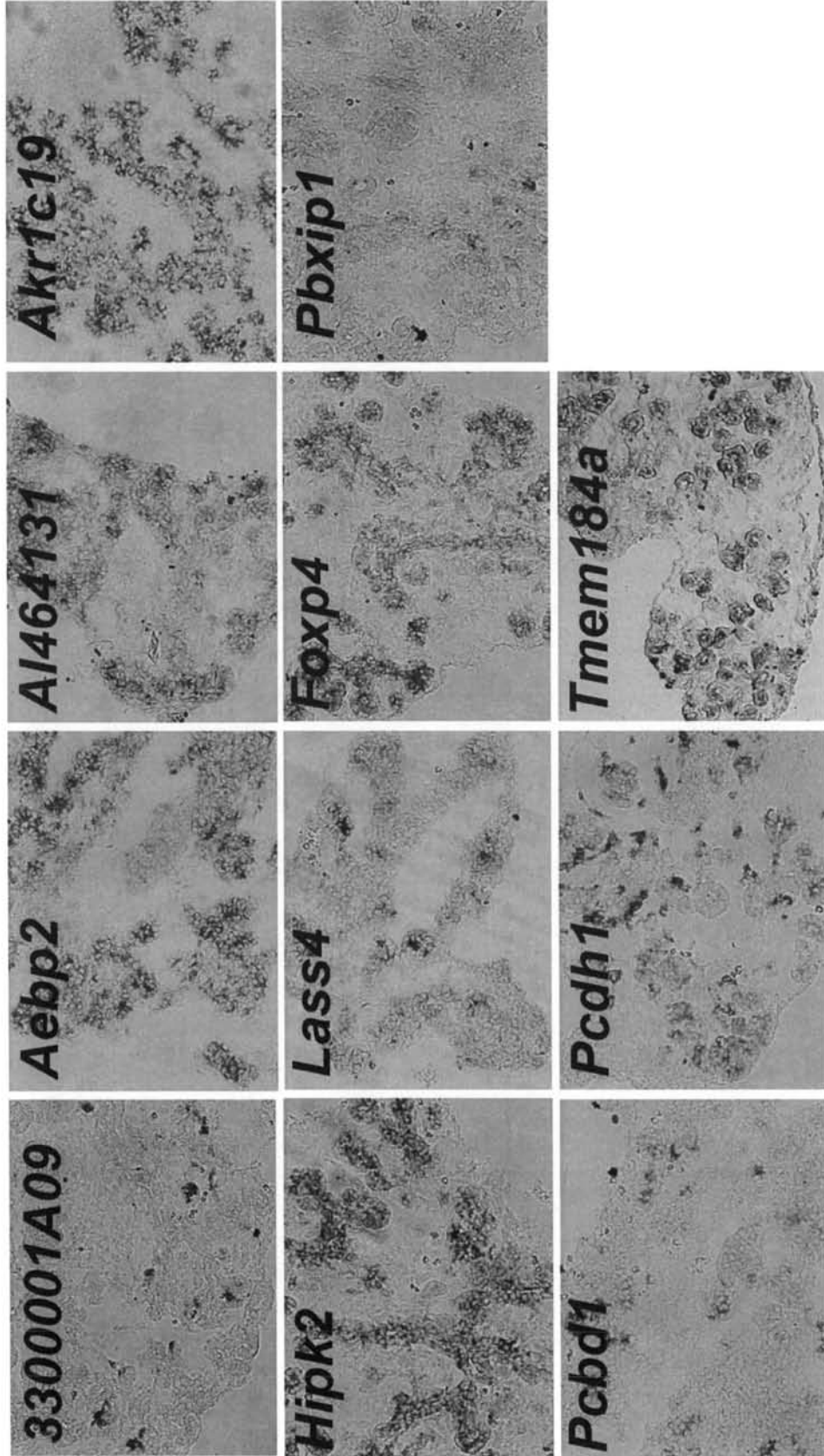


Fig 10

【 図 1 1 】

Fig 11

E14.5臍臓で発現が見られた遺伝子



フロントページの続き

(72)発明者 条 和彦

熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ13 QQ53 QQ79 QR36 QR40 QR55 QR62 QR77

QS25 QS34

4B065 AA91X AB01 BA02 BA25 BD39 CA46