

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6378183号
(P6378183)

(45) 発行日 平成30年8月22日 (2018. 8. 22)

(24) 登録日 平成30年8月3日 (2018. 8. 3)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 5/071 (2010. 01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 5/074 (2010. 01)	C 1 2 N 5/074
C 1 2 N 5/0735 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 14 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2015-530933 (P2015-530933)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成26年8月6日 (2014. 8. 6)		国立大学法人京都大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/070787		京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(87) 国際公開番号	W02015/020113	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成27年2月12日 (2015. 2. 12)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成29年8月4日 (2017. 8. 4)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	特願2013-164137 (P2013-164137)		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成25年8月7日 (2013. 8. 7)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	長船 健二
			京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
			国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臍ホルモン産生細胞の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

臍前駆細胞をクロモグリク酸ナトリウムを含む培地で培養する工程を含む、臍ホルモン産生細胞の製造方法。

【請求項 2】

前記培地が、（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、c A M P ホスホジエステラーゼ阻害剤、および c A M P 類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイドおよび（d）TGF β 阻害剤から成るからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記培地が、（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、c A M P ホスホジエステラーゼ阻害剤、および c A M P 類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイドおよび（d）TGF β 阻害剤をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アデニル酸シクラーゼ活性化剤、c A M P ホスホジエステラーゼ阻害剤、および c A M P 類縁体からなる群より選択される少なくとも一種が、フォルスコリンである、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ステロイドがデキサメタゾンである、請求項 2 から 4 いずれか 1 項に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記 (d) TGF β 阻害剤が、2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジンである、請求項 2 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記臍前駆細胞が、以下の工程 (1) および (2) を特徴とする工程によって、多能性幹細胞から製造された細胞である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法：

(1) 多能性幹細胞を、アクチビン受容体様キナーゼ 4, 7 の活性化剤、および GSK 3 阻害剤を含む培地で培養する工程、および

(2) 前記工程 (1) で得られた細胞を、(a) レチノイン酸受容体アゴニスト、(b) BMP 阻害剤、および (c) TGF β 阻害剤を含む培地で培養する工程。 10

【請求項 8】

前記アクチビン受容体様キナーゼ 4, 7 の活性化剤がアクチビンである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 GSK 3 阻害剤が、CHIR99021 である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記工程 (2) で用いられる TGF β 阻害剤が、SB431542 である、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 BMP 阻害剤が、ドーソモルフィン (Dorsomorphin) である、請求項 7 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 12】

臍ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、グルカゴン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞、および臍ポリペプチド産生細胞からなる群より選択されるいずれかである請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

臍ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、および/またはグルカゴン産生細胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記臍ホルモン産生細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、臍ホルモン産生細胞の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

膵臓は、膵リパーゼ、トリプシン、エラスターゼ、膵アミラーゼなどの消化酵素を分泌する外分泌腺および、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド (PP) 等の膵ホルモンを分泌する内分泌腺として機能している。近年、胃分泌ホルモンであるグレリンが膵臓の内分泌細胞からも分泌されることが報告されている。この膵ホルモンは、膵臓の中の α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞および PP 細胞の 4 種の細胞からなる膵島と呼ばれる細胞塊により産生されている。 40

【0003】

ここで、インスリンは、ブドウ糖の利用、蛋白の合成、中性脂肪の形成および貯蔵を促進し、血糖値を低下させ、血糖を正しい濃度に保つ重要な役割を果たす。グルカゴンは、肝糖原分解、糖新生作用などを介する血糖上昇ホルモンとしてインスリンと並び糖代謝調節機構において重要な役割を担っている。ソマトスタチンは、ソマトスタチンレセプターへの結合を介して作用を発現し、膵臓でのグルカゴン、インスリン等の種々のホルモン分泌 50

を抑制する。PPは、食事に対応してランゲルハンス島の細胞から分泌されるホルモンであり、飽食因子として知られ、食物摂取や体重増加を低減させる働きがある。グレリンは食物摂取を刺激し、脂肪酸化を低下させることによって体重を増加させることが知られている。

【0004】

糖尿病は、インスリンが不足したりその働きが失われたりすることによって発症する疾患であり、一度発症すると根治させることが難しい疾患である。糖尿病は、1型糖尿病（インスリン依存性糖尿病）と2型糖尿病（インスリン非依存性糖尿病）の大きく2つのタイプに分類することができる。

【0005】

2型糖尿病は、インスリンに対する抵抗性を獲得することで発症する慢性疾患であり、食べ過ぎや運動不足によっておこる肥満やストレス等、生活習慣が発症メカニズムと考えられている糖尿病である。2型糖尿病は中高年で発病することが多く、糖尿病患者の多くは2型糖尿病を罹患している。

【0006】

一方、1型糖尿病は、自己免疫疾患やウイルス感染等によってβ細胞（インスリン産生細胞）が破壊され、インスリンが体内に分泌されないことによっておこる疾患である。インスリンの投与による対症療法が主に行われているが、体内で常に変化する血糖値を自動的にコントロールして、患者の負担を軽くできる治療法として、膵臓移植又は膵島移植も行われている。この治療法によって正常な血糖値を達成することは可能であるが、移植可能な膵臓又は膵島が不足しているのが現状である。また、移植片に対する免疫拒絶反応を回避するために、患者は免疫抑制剤を一生服用し続ける必要があり、感染症の危険性や免疫抑制剤による副作用等の問題が残る。

【0007】

1型糖尿病について試みられている治療法の一つに、体外で患者由来の細胞からインスリン産生細胞自体を誘導し、誘導した該インスリン産生細胞を患者の生体内に移植する方法が検討されている。例えば、患者の膵臓の組織幹細胞を分化させる、患者の膵管上皮由来細胞を体外に取り出して分化させる等の方法が知られている。これらの方法によって患者由来の細胞からインスリン産生細胞を誘導した場合には、患者由来の細胞であることから免疫拒絶反応の問題が解消される等、安全性の面で有利である。

【0008】

インスリン産生細胞を得る方法としては、胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞を分化させる方法、膵臓の組織幹細胞を分化させる方法、膵管上皮由来細胞を体外に取り出して分化させる方法等が知られている。

【0009】

多能性幹細胞からインスリンを誘導させる方法として、アクチビン（Activin）やレチノイン酸（RA）を用いて分化誘導する方法などが例示される（特許文献1、非特許文献1から5）。この他にも、多能性幹細胞へPDX1を導入して培養する方法（特許文献2から3）、低分子化合物を適宜組み合わせ多能性幹細胞に作用させてインスリン産生細胞を製造する方法（特許文献4、非特許文献6）が知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2009-225661号公報

【特許文献2】米国特許7534608号公報

【特許文献3】特開2006-075022号公報

【特許文献4】WO2011/081222

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】E. Kroon et al., Nature Biotechnol

10

20

30

40

50

ogy (2008) Vol. 26, No. 4: 443-452

【非特許文献2】K. A. D'Amour et al., Nature Biotechnology (2006) Vol. 24, No. 11: 1392-1401

【非特許文献3】W. Jiang, Cell Research (2007) 17: 333-344

【非特許文献4】J. H. Shim et al., Diabetologia (2007) 50: 1228-1238

【非特許文献5】R. Maehra et al., PNAS (2009), vol. 106, No. 37: 15768-15773

【非特許文献6】Kunisada Y et al., Stem Cell Res. (2012) vol. 8, No. 2: 274-284. (上記特許文献並びに非文献は引用により本願の一部を構成する) 10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、インビトロで膵ホルモン産生細胞をより効率的に製造する方法を提供することである。具体的には、多能性幹細胞をより効率的に膵ホルモン産生細胞へと分化誘導することによって膵ホルモン産生細胞を多量に安定して製造することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、既存のインスリン産生細胞を製造する方法（非特許文献6）において、さらにクロモグリク酸ナトリウムを添加することでさらに効率的に多能性幹細胞から膵ホルモン産生細胞へと分化誘導させることが可能なことを見出して本発明を完成するに至った。 20

【0014】

即ち、本発明は、以下を提供する。

〔1〕膵前駆細胞をクロモグリク酸ナトリウムを含む培地で培養する工程を含む、膵ホルモン産生細胞の製造方法。

〔2〕前記培地が、（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイドおよび（d）TGFβ阻害剤から成るからなる群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含む、〔1〕に記載の方法。 30

〔3〕前記培地が、（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイドおよび（d）TGFβ阻害剤をさらに含む、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種が、フォルスコリンである、〔2〕または〔3〕に記載の方法。

〔5〕前記ステロイドがデキサメタゾンである、〔2〕から〔4〕いずれか1項に記載の方法。 40

〔6〕前記（d）TGFβ阻害剤が、2-（3-（6-メチルピリジン-2-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）-1,5-ナフチリジンである、〔2〕から〔4〕のいずれか1項に記載の方法。

〔7〕前記膵前駆細胞が、以下の工程（1）および（2）を特徴とする工程によって、多能性幹細胞から製造された細胞である、〔1〕から〔6〕のいずれか1項に記載の方法：

（1）多能性幹細胞を、アクチビン受容体様キナーゼ-4,7の活性化剤、およびGSK3阻害剤を含む培地で培養する工程、および

（2）前記工程（1）で得られた細胞を、（a）レチノイン酸受容体アゴニスト、（b）BMP阻害剤、および（c）TGFβ阻害剤を含む培地で培養する工程。 50

〔 8 〕 前記アクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤がアクチビンである、〔 7 〕に記載の方法。

〔 9 〕 前記 G S K 3 阻害剤が、CHIR99021である、〔 7 〕または〔 8 〕に記載の方法。

〔 1 0 〕 前記工程（ 2 ）で用いられる TGF β 阻害剤が、SB431542である、〔 7 〕から〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 1 1 〕 前記 BMP 阻害剤が、ドーソモルフィン（Dorsomorphin）である、〔 7 〕から〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 1 2 〕 膵ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、グルカゴン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞、および膵ポリペプチド産生細胞からなる群より選択されるいずれかである〔 1 〕から〔 1 1 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

10

〔 1 3 〕 膵ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、および/またはグルカゴン産生細胞である、〔 1 2 〕に記載の方法。

〔 1 4 〕 前記膵ホルモン産生細胞が、ヒト細胞である、〔 1 〕から〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 5 〕

本発明によれば、効率的に膵前駆細胞から膵ホルモン産生細胞を製造することができる。本発明により製造された膵ホルモン産生細胞は、糖尿病等の膵ホルモン産生細胞の異常に起因する疾患の予防又は治療に有用な化合物のスクリーニングに用いることができる。さらに、本発明の製造方法により得られる膵ホルモン産生細胞は、そのような疾患を治療するための細胞医療に用いることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 6 〕

【図 1 A】各濃度のクロモグリク酸ナトリウムを添加してヒト iPS 細胞株 201B7 を分化誘導した場合の誘導 23 日目（クロモグリク酸ナトリウム添加後 12 日目）におけるインスリン陽性細胞の含有率を示す。

【図 1 B】0.001mM または 10mM のクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合の抗インスリン抗体による免疫染色像を示す。

【図 1 C】各濃度のクロモグリク酸ナトリウムを添加してヒト iPS 細胞 201B7 株を分化誘導した場合の誘導 23 日目におけるインスリン（上図）および C-ペプチド（下図）の陽性細胞の含有率をフローサイトメーターで測定した結果を示す。

30

【図 2 A】10mM のクロモグリク酸ナトリウムを添加または非添加（対照）により各ヒト iPS 細胞株（409B2、418C1 および 201B7）を分化誘導した場合の誘導 23 日目におけるインスリン陽性細胞の含有率を示す。

【図 2 B】10mM クロモグリク酸ナトリウムを各期間（4日間、8日間、12日間、16日間および 20日間）添加した後のインスリン陽性細胞の含有率を示す。

【図 3】クロモグリク酸ナトリウムを添加または非添加（対照）により iPS 細胞株を分化誘導した場合での誘導 23 日目における抗 Ki67 抗体による免疫染色像を示す。

【図 4】クロモグリク酸ナトリウムを添加または非添加（対照）により iPS 細胞株を分化誘導した場合の誘導 23 日目における抗インスリン抗体（INS）および抗グルカゴン抗体（GCG）による免疫染色像を示す。

40

【図 5 A】多能性幹細胞から β 細胞を製造する工程の模式図を示す。

【図 5 B】各誘導日数後（Day 0、Day 5、Day 11、Day 19）の細胞におけるマーカー遺伝子（SOX17、PDX1、NGN3、ISL-1、INS、GCG、SST、GHRE、MAFA）の発現を測定した結果を示す。

【図 5 C】誘導 5 日目における SOX17 または FOXA2、培養 11 日目における PDX1、培養 15 日目における NEUROG3、培養 19 日目における INSULIN または C-peptide の染色像を示す。

【図 5 D】4F（フォルスコリン（10 μ M）、ニコチンアミド（10mM）、デキサメタゾン（10 μ M）、ALK5 阻害剤 I I（5 μ M））のみ、または 4F とクロモグリク

50

酸ナトリウムを添加した培地で培養した誘導19日目における1細胞あたりのインスリン濃度を測定した結果を示す。

【図6A】誘導19日目におけるINSULIN、GLUCAGON、GHRE (GHR ELIN), SST(SOMATOSTATIN)、AMY (AMYLASE) およびCK 19の染色像を示す。

【図6B】誘導19日目におけるINS (INSULIN)、GCG (GLUCAGON), SST、GHRE、AMYおよびCK 19の陽性細胞率を測定した結果を示す。

【図7A】マウス胎児の膵原基からインスリン産生細胞を誘導する工程の模式図を示す。

【図7B】E12.5、E14.5およびE16.5の膵原基にそれぞれクロモグリク酸ナトリウムを添加して培養（黒色）または添加せず培養（白色）したときのGFP (INSULIN) 陽性細胞率を測定した結果を示す。

【図7C】E12.5、E14.5およびE16.5の膵原基を基本培地中で培養 (medium only)、4F (フォルスコリン (10 μM)、ニコチンアミド (10 mM)、デキサメタゾン (10 μM)、ALK5阻害剤II (5 μM)) を添加した基本培地で培養、または4Fおよびクロモグリク酸ナトリウムを添加した基本培地で培養した後のInsulinまたはNeurog3の発現を測定した結果を示す。図中、PCは陽性対照を意味し、マウス成体膵臓細胞における発現量を示す。

【図8A】多能性幹細胞からβ細胞を製造する工程の模式図を示す。

【図8B】クロモグリク酸ナトリウムを添加して培養（黒色）または添加せず培養（白色）したときのβACTINの発現量に対するINSULINの発現量の割合を測定した結果を示す。

【図8C】クロモグリク酸ナトリウムを添加して培養 (Sodium Cromogliccateと示す) または添加せず培養 (Medium onlyと示す) したときのINSULINおよび核の染色像を示す。

【図8D】クロモグリク酸ナトリウムのみ (X)、ニコチンアミドのみ (N)、ニコチンアミドおよびクロモグリク酸ナトリウム (NX)、デキサメタゾンのみ (D)、デキサメタゾンおよびクロモグリク酸ナトリウム (DX)、フォルスコリンのみ (F)、フォルスコリンおよびクロモグリク酸ナトリウム (FX)、ALK5阻害剤IIのみ (A)、ALK5阻害剤IIおよびクロモグリク酸ナトリウム (AX)、4F、4Fおよびクロモグリク酸ナトリウム (4FX) を加えた条件で培養した後の細胞におけるβACTINの発現量に対するINSULINの発現量の割合を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、膵前駆細胞をクロモグリク酸ナトリウムを含む培地で培養する工程を含む、膵ホルモン産生細胞の製造方法を提供する。

【0018】

当該膵ホルモン産生細胞を製造する培地には、クロモグリク酸ナトリウムの他に、(a) アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、(b) ニコチンアミド、(c) ステロイドおよび(d) TGFβ阻害剤、(f) KGF、(g) EGFおよび(h) BMP阻害剤から成る群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含んでもよく、好ましくは、(a) アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、(b) ニコチンアミド、(c) ステロイドおよび(d) TGFβ阻害剤をさらに含む。

【0019】

本発明において用いられる培地は、基礎培地に適宜物質を添加して作成される。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Improved MEM (invitrogen)、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ)、StemPro34 (invitrogen) およびこれらの混合培地などが包含

10

20

30

40

50

される。基礎培地としては、血清含有培地であっても、無血清培地でもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、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、1-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ビルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。

【0020】

クロモグリク酸ナトリウムを含む培地で培養する工程は、臍前駆細胞を浮遊培養または接着培養のいずれの培養方法を採用してもよい。培地は、上述した基礎培地へクロモグリク酸ナトリウムを添加することによって作製される。好ましい基礎培地は、B-27サプリメントを含む Improved MEM培地である。

10

【0021】

クロモグリク酸ナトリウムは、1,3-ビス(2-カルボキシクロモン-5-イルオキシ)-2-ヒドロキシプロパンのナトリウム塩であり、例えば、Sigma社、和光純薬工業等から入手可能である。工程3で用いるクロモグリク酸ナトリウムの培地中の濃度は、通常0.001から100mM、好ましくは0.01から50mM、より好ましくは、0.01から20mMである。特に好ましくは、10mMである。

【0022】

本発明において、浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態で培養する態様である。特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させるための処理（例えば、細胞外マトリックスなどによるコーティング処理）されていない培養皿、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸 (poly-HEMA) によるコーティング処理）した培養皿を使用して行うことができる。

20

【0023】

接着培養を行う場合、フィーダー細胞上で、またはコーティング処理された培養皿にて培養してもよい。ここで、フィーダー細胞とは、目的の細胞の培養条件を整えるために用いる補助的役割を果たす他の細胞を意味するものであり、例えば、線維芽細胞（マウス胎仔線維芽細胞 (MEF)、マウス線維芽細胞 (STO、SNL) 等）が挙げられる。フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線（ガンマ線等）照射や抗癌剤（マイトマイシンC等）処理等で不活化されていることが好ましい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、これらの断片、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

30

【0024】

アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される物質の例としては、アデニル酸シクラーゼ活性を有する化合物、cAMPホスホジエステラーゼ阻害活性を有する化合物、およびアデニル酸シクラーゼ活性とcAMPホスホジエステラーゼ阻害活性とを併せ持つ化合物等が挙げられる。より具体的には、フォルスコリン、ジブチルcAMP、PACAP27 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 27)、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) 等が挙げられる。好ましくは、フォルスコリンである。

40

【0025】

アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される物質としてフォルスコリンを用いる場合の培地中の濃度は、通常0.1から50μM、好ましくは2から50μMである。

【0026】

ニコチンアミドの培地中の濃度は、0.1から20mM、好ましくは5から20mMである。

【0027】

50

ステロイドは、例えば、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン、ベクロメタゾン等が挙げられる。なかでもデキサメタゾンが好適に用いられる。ステロイドとしてデキサメタゾンを使用する場合の培地中の濃度は、通常0.1から50 μ M、好ましくは2から50 μ Mである。ステロイドとしてヒドロコルチゾンを使用する場合の培地中の濃度は、通常0.1から100 μ M、好ましくは1から50 μ Mである。ステロイドとしてベタメタゾンを使用する場合の培地中の濃度は、通常0.1から50 μ M、好ましくは0.5から20 μ Mである。ステロイドとしてベクロメタゾンを使用する場合の培地中の濃度は、通常0.1から50 μ M、好ましくは0.2から20 μ Mである。

【0028】

TGF β 阻害剤は、TGF β の受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、またはALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質である限り特に限定されず、例えば、Lefty-1 (NCBI Accession No.として、マウス：NM_010094、ヒト：NM_020997が例示される)、SB431542 (4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド)、SB202190 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]フェノール) (以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01(WO 2009146408) ALK5阻害剤II (2-[3-[6-メチルピリジン-2-イル]-1H-ピラゾル-4-イル]-1,5-ナフチリジン)、TGF β RIキナーゼ阻害剤VIII (6-[2-tert-ブチル-5-[6-メチル-ピリジン-2-イル]-1H-イミダゾル-4-イル]-キノキサリン) およびこれらの誘導体などが例示される。クロモグリク酸ナトリウムを含む培地へ添加される好ましいTGF β 阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。TGF β 阻害剤として、ALK5阻害剤IIを使用する場合の培地中の濃度は、通常0.5から100 μ M、好ましくは1から50 μ M、より好ましくは、1から10 μ Mである。

【0029】

KGFは、Keratinocyte Growth Factorと呼ばれるタンパク質であり、FGF-7と呼ばれることもある。本発明で用いるKGFの濃度は、1 ng/mlから1 μ g/ml、好ましくは、5 ng/mlから500 ng/ml、より好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlである。

【0030】

EGFは、上皮成長因子またはEpidermal Growth Factorと呼ばれるタンパク質である。本発明で用いるEGFの濃度は、1 ng/mlから1 μ g/ml、好ましくは、5 ng/mlから500 ng/ml、より好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlである。

【0031】

BMP阻害剤は、Chordin、Noggin、Follistatin、などのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin (すなわち、6-[4-(2-ペピリジン-1-イル-エトキシ)フェニル]-3-ピリジン-4-イル-ピラゾロ [1,5-a] ピリミジン)、その誘導体 (P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116:II_60; P.B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4:33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8):e2904) およびLDN-193189 (すなわち、4-(6-(4-(ピペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ [1,5-a] ピリミジン-3-イル)キノリン) が例示される。DorsomorphinおよびLDN-193189は市販されており、それぞれSigma-Aldrich社およびStemgent社から入手可能である。

【0032】

培養日数は、例えば、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上の培養であり、好ましくは、4日以上20日未満であり、より好ましくは、8日以上16日以下である。

【0033】

本発明における膵前駆細胞とは、膵ホルモン産生細胞へと誘導される能力を有する細胞を意味する。このような細胞は、PDX1を発現し、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン

10

20

30

40

50

、腓ポリペプチド、グレリンが発現していない細胞として特徴づけることもできる。本発明において、腓前駆細胞は、生体内から単離することによって得られても良く、多能性幹細胞から誘導することによって得ても良い。

【0034】

多能性幹細胞から腓前駆細胞を得る場合、次の(1)から(2)の工程を含む方法が例示される。

(1) 多能性幹細胞を、アクチビン受容体様キナーゼ4, 7の活性化剤、およびGSK3阻害剤を含む培地で培養する工程、および

(2) 前記工程(1)で得られた細胞を、(a) レチノイン酸受容体アゴニスト、(b) BMP阻害剤、および(c) TGF β 阻害剤からなる群より選択される1種を含む培地で培養する工程。

10

【0035】

すなわち本発明は、次の(1)から(3)の工程を含む、多能性幹細胞から腓ホルモン産生細胞を製造する方法も提供する。

(1) 多能性幹細胞を、アクチビン受容体様キナーゼ4, 7の活性化剤、およびGSK3阻害剤を含む培地で培養する工程

(2) 前記工程(1)で得られた細胞を、(a) レチノイン酸受容体アゴニスト、(b) BMP阻害剤、および(c) TGF β 阻害剤からなる群より選択される1種を含む培地で培養する工程

(3) 前記工程(2)で得られた細胞を、(クロモグリク酸ナトリウムを含む培地で培養する工程。

20

【0036】

多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、自己増殖能を併せもつ幹細胞である。多能性幹細胞には、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、精子幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)などが含まれる。多能性幹細胞として胚の破壊を行わずに得られるという観点から、iPS細胞またはMuse細胞を用いることが好ましい。多能性幹細胞は、好ましくは、哺乳動物の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。

【0037】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

30

【0038】

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M.J. Evans and M.H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165 (本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する))。

40

【0039】

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUS P5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848

50

; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

【0040】

ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37℃、5% CO₂/95% 空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(0. Fumitaka et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:215-224)。また、ES細胞は、3〜4日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

10

【0041】

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

20

【0042】

ヒトES細胞株は、種々の研究機関より入手可能である。例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Reserch Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

【0043】

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41〜46頁, 羊土社(東京、日本))。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

30

【0044】

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

40

【0045】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、体細胞に作用させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはE

50

S細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sal14、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

【0046】

初期化因子は、その形態に応じた公知の方法にて体細胞へ接触、または体細胞内へ導入すればよい。

【0047】

タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

【0048】

DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、βグルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞へ一旦導入して作用させた後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

【0049】

初期化因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良い。分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを初期化因子として用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

【0050】

iPS細胞誘導のための培養液は、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDM E培養液(これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液(霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが例示される。

10

【0051】

iPS細胞誘導の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養することによって、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

20

【0052】

あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液(これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)で体細胞と初期化因子を接触させて培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる(Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質(例えば、Laminin-5 (W02009/123349)、Laminin-10 (US2008/0213885)、その断片(W02011/043405)およびマトリゲル(BD社))を用いる方法が例示される。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

30

【0053】

この他にも、血清を含有しない培地を用いてiPS細胞を樹立する方法も例示される(Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件(0.1%以上、15%以下の酸素濃度)によりiPS細胞を樹立しても良い(Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845)。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

【0054】

iPS細胞の樹立効率を高めるための成分として、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤[例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA(例、HDAC1 siRNA Smartpool・(Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤(例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤(例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤またはALK5阻害剤(例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤(例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤(例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302な

40

50

どのmiRNA、Wnt Signaling（例えばsoluble Wnt3a）、神経ペプチドY、プロスタグランジン類（例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2）、hTERT、SV40LT、UTFI、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等が知られている。iPS細胞の樹立の際にはかかる樹立効率の改善目的にて用いられる成分を添加した培養液を用いてもよい。

【0055】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³～約5×10⁶細胞の範囲である。

【0056】

iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入し、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

【0057】

本明細書ならびに請求の範囲で使用する「体細胞」なる用語は、精子、精母細胞、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化多能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全個体の体細胞もしくは疾患を有する個体の体細胞のいずれも包含される。また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は分化した細胞、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等が例示される。

【0058】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646）とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 47～52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

【0059】

(F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、W02011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞である。詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞である。Muse細胞はSSEA-3およびCD105が陽性である。

【0060】

膵ホルモン産生細胞とは、膵ホルモンを産生する能力を有する細胞を意味する。ここで、膵ホルモンとは、例えば、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド、グレリンが挙げられる。膵ホルモン産生細胞は常に膵ホルモンを産生している必要はなく、膵ホルモンの産生能力を有していればよい。また、産生される膵ホルモン量は特に限定されない。膵ホルモン産生細胞としては、例えば、インスリン産生細胞、グルカゴン産生

細胞、ソマトスタチン産生細胞および膵ポリペプチド（PP）産生細胞が挙げられる。

【0061】

多能性幹細胞から膵前駆細胞を誘導する方法は、以下の工程1および工程2を含む工程によって行い得る。

【0062】

<工程1> 多能性幹細胞を、アクチビン受容体様キナーゼ4、7の活性化剤、およびGSK3阻害剤を含む培地で培養する工程

多能性幹細胞は通常接着培養にて培養された形態にて提供される。工程1において、多能性幹細胞を任意の方法で分離して浮遊培養を行っても、あるいはフィーダー細胞上やコーティング処理された培養皿を用いて接着培養を行ってもよい。

10

【0063】

ヒト多能性幹細胞の分離方法としては、従来公知の接着培養細胞の分離方法を適宜採用すればよく、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)など）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（特に好ましくは、Accutase(TM)）を用いてヒト多能性幹細胞を解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法が用いられる。工程1に供されるヒト多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%以上コンフルエントになるまで培養されたコロニーであることが好ましい。

【0064】

20

工程1において接着培養を行う場合、フィーダー細胞上で、またはコーティング処理された培養皿にて培養してもよい。ここで、フィーダー細胞とは、目的の細胞の培養条件を整えるために用いる補助的役割を果たす他の細胞を意味するものであり、例えば、線維芽細胞（マウス胎仔線維芽細胞（MEF）、マウス線維芽細胞（STO、SNL）等）が挙げられる。フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線（ガンマ線等）照射や抗癌剤（マイトマイシンC等）処理等で不活化されていることが好ましい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル（BD）、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

【0065】

工程1は、培養中の多能性幹細胞の培地を交換する、または多能性幹細胞を分離して、所定の培地を投入した接着培養用もしくは浮遊培養用培養皿へ移すことによって開始される。培地は、上述した基礎培地へアクチビン受容体様キナーゼ4、7の活性化剤、およびGSK3阻害剤を添加することによって作製される。好ましい基礎培地は、B27サプリメントを含むRPMI 1640培地または血清を含むRPMI 1640培地である。

30

【0066】

アクチビン受容体様キナーゼ4、7の活性化剤とは、ALK-4および／又はALK-7に対し活性化作用を有する物質であり、例えば、アクチビン、Nodal、Myostatinが挙げられる。好ましくは、アクチビンである。アクチビンには、アクチビンA、B、C、DおよびABが知られているが、工程1においてはアクチビンA、B、C、D、ABのいずれのアクチビンも使用することができる。工程1に用いるアクチビンとしては特にアクチビンAが好適に用いられる。また、アクチビンとしてはヒト、マウス等いずれの哺乳動物由来のアクチビンをも使用することができる。工程1に使用するアクチビンとしては、分化に用いる多能性幹細胞と同一の動物種由来のアクチビンを用いることが好ましく、例えばヒト由来の多能性幹細胞を出発原料とする場合、ヒト由来のアクチビンを用いることが好ましい。これらのアクチビンは商業的に入手可能である。

40

【0067】

工程1において、アクチビンを用いる場合、培地中の濃度は、通常0.1から200 ng/ml、好ましくは5から150 ng/ml、特に好ましくは10から100 ng/mlである。

【0068】

50

GSK-3 阻害剤とは、GSK-3 β タンパク質のキナーゼ活性（例えば、 β カテニンに対するリン酸化能）を阻害する物質として定義され、既に多数のものが知られているが、例えば、インジルビン誘導体であるBIO（別名、GSK-3 β 阻害剤IX；6-ブロモインジルビン3'-オキシム）、マレイミド誘導体であるSB216763（3-（2,4-ジクロロフェニル）-4-（1-メチル-1H-インドール-3-イル）-1H-ピロール-2,5-ジオン）、SB415286（3-〔（3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル）アミノ〕-4-（2-ニトロフェニル）-1H-ピロール-2,5-ジオン）、フェニル α ブロモメチルケトン化合物であるGSK-3 β 阻害剤VII（4-ジブロモアセトフェノン）、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts（別名、GSK-3 β ペプチド阻害剤；Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂）および高い選択性を有するCHIR99021（6-〔〔2-〔〔4-（2,4-ジクロロフェニル）-5-（4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル）-2-ピリミジニル〕アミノ〕エチル〕アミノ〕ニコチノニトリル）が挙げられる。これらの化合物は、例えばCalbiochem社やBiomol社等から市販されており容易に利用することが可能である。他の入手先から入手しても、あるいは自ら作製してもよい。工程1で使用されるGSK-3 β 阻害剤は、好ましくは、CHIR99021であり得る。

10

【0069】

工程1において、CHIR99021を用いる場合、培地中の濃度は、通常0.01 μ Mから100 μ M、好ましくは0.1 μ Mから10 μ M、特に好ましくは1 μ Mから5 μ Mである。

【0070】

20

工程1において、さらにROCK阻害剤を含んでもよい。ROCK阻害剤は、Rho-キナーゼ（ROCK）の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632（例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000)；Narumiya et al., Methods Enzymol. 325,273-284 (2000)参照）、Fasudil/HA1077（例、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照）、H-1152（例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照）、Wf-536（例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照）およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使用できる（例えば、米国特許出願公開第2005/0209261号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照）。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。本工程で用いる好ましいROCK阻害剤としては、Y-27632が挙げられる。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

30

【0071】

本発明において、ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合の培地中の濃度は、0.1 μ Mから100 μ M、好ましくは、1 μ Mから50 μ M、さらに好ましくは、5 μ Mから20 μ Mである。ROCK阻害剤は、培養開始時の細胞死を防ぐためとの意図、より詳細には、多能性幹細胞を分離時の細胞死を防ぐためとの意図から、培養期間を通して添加されている必要はなく、培養開始時の1日間または2日間に添加されることで良い。

40

【0072】

工程1での培養日数は、例えば、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上の培養である。培養が長期にわたることによる特段の不都合は無く、培養日数の上限は特に無い。培養日数は例えば5日以上12日以下であり、好ましくは、5日である。

【0073】

<工程2>レチノイン酸受容体アゴニスト、BMP阻害剤、およびTGF β 阻害剤からなる群より選択される1種を含む培地で培養する工程

工程2は、前記工程1に続いて行われる。工程1にて得られた細胞を別の培養容器に移

50

して培養しても、同じ培養容器にて培地を交換して培養してもよい。工程2においては浮遊培養、接着培養のいずれの培養方法を採用してもよい。工程1にて接着培養を行い、工程2を別の培養容器にて行う場合は、工程1で得られた細胞を任意の方法で分離して移せばよい。工程2の培地は、上述した基礎培地へレチノイン酸受容体アゴニスト、BMP阻害剤、およびTGF β 阻害剤を添加することによって作製される。好ましい基本培地は、B-27サプリメントを含むImproved MEM培地である。

【0074】

工程2において用いられるレチノイン酸受容体(RAR)アゴニストは、天然に存在するレチノイドであっても、化学的に合成されたレチノイド、レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニスト化合物やレチノイン酸受容体アゴニスト活性を有する天然物
10
であってもよい。RARアゴニストとしての活性をもつ天然レチノイドの例としては、レチノイン酸(立体異性体の全トランス-レチノイン酸(全トランスRA)と9-シス-レチノイン酸(9-シスRA)が知られている)が挙げられる。化学的に合成されたレチノイドは当技術分野で公知である(米国特許第5,234,926号、米国特許第4,326,055号等)。レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニスト化合物の例
20
としては、Am80、AM580、TTNPB、AC55649が挙げられる。レチノイン酸受容体アゴニスト活性を有する天然物の例としては、ホノキオール、マグノロールが挙げられる(生物機能開発研究所紀要9:55-61、2009年)。工程2で用いるRARアゴニストは、好ましくはレチノイン酸、AM580(4-[[5,6,7,8-
テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル]カルボキシアミド]
ベンゾイックアシッド)、TTNPB(4-[[E]-2-[5,6,7,8-テトラヒ
ドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル]-1-プロペニル]ベンゾイ
ックアシッド)、AC55649(4'-オクチル-[1,1'-ビフェニル]-4-カル
ボキシリックアシッド)であり、さらに好ましくはレチノイン酸である。

【0075】

工程2において、RARアゴニストとしてレチノイン酸を用いる場合の培地中の濃度は、通常0.1から100 μ M、好ましくは0.5から10 μ Mである。RARアゴニストとしてTTNPBを用いる場合の培地中の濃度は、通常0.02から20 μ M、好ましくは0.05から10 μ Mである。RARアゴニストとしてAM580を用いる場合の培地中の濃度は、通常0.02から20 μ M、好ましくは0.05から10 μ Mである。RAR
30
アゴニストとしてAC55649を用いる場合の培地中の濃度は、通常0.02から20 μ M、好ましくは0.1から10 μ Mである。

【0076】

工程2において用いられ得るBMP阻害剤は、上述したBMP阻害剤が例示され、好ましくはDorsomorphinであり得る。

【0077】

工程2において、BMP阻害剤としてDorsomorphinを用いる場合の培地中の濃度は、0.01 μ Mから100 μ M、好ましくは0.1から10 μ M、さらに好ましくは、0.5 μ Mから5 μ Mである。

【0078】

工程2において用いられ得るTGF β 阻害剤は、上述したTGF β 阻害剤が例示され、好ましくは、SB431542であり得る。

【0079】

工程2において、TGF β 阻害剤としてSB431542を用いる場合の培地中の濃度は、0.01 μ Mから100 μ M、好ましくは0.1から50 μ M、さらに好ましくは、1 μ Mから20 μ Mである。

【0080】

工程2において、TGF β 阻害剤の代わりにKGFを用いることができる。工程2でKGFを用いる場合であっても、上述と同様に濃度は、1 ng/mlから1 μ g/ml、好ましくは、5 ng/mlから500 ng/ml、より好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlである。

【0081】

工程2での培養日数は、例えば、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上の培養である。培養が長期にわたることによる特段の不都合は無く、培養日数の上限は特に無い。培養日数は例えば6日以上12日以下であり、特に好ましくは、6日である。

【0082】

本発明で得られる膵ホルモン産生細胞は、例えば、インスリン産生細胞、グルカゴン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞、および膵ポリペプチド産生細胞からなる群より選択され、各細胞は産出される膵ホルモンを確認することによって同定され得る。得られた膵ホルモン産生細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてよい。あるいは、G6PC2をコードする表面タグに特異的に結合する抗体（WO2010/037784、本文献は引用により本願の一部を構成する）を用いて、沈降させる方法、磁気ビーズを用いて磁性により細胞を選別する方法（例えば、MACS）、蛍光標識を用いてセルソーターを用いる方法、または抗体等が固定化された担体（例えば、細胞濃縮カラム）を用いる方法等により純化された集団を作成して用いてもよい。

10

【0083】

膵ホルモンの発現としては、膵ホルモンタンパク質、膵ホルモンタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例、mRNAなど）の発現を確認することによって確認できる。膵ホルモンタンパク質の分泌は、公知の方法、例えば、膵ホルモンタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中や培地中などに存在する前記膵ホルモンタンパク質を、ウエスタンブロッティング解析、ELISA法などの方法又はそれに準じる方法等により測定することができる。

20

【0084】

膵ホルモンの発現量としては、膵ホルモンタンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えばmRNAの発現量を調べることによって確認可能である。mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、ノザンハイブリダイゼーション、S1マッピング法、PCR法、定量RT-PCR法、DNAチップあるいはアレイ法又はそれに準じる方法に従って行われる。

【0085】

本発明では、さらに、膵ホルモン産生細胞の誘導効率を高める薬剤をスクリーニングする以下の方法を提供する。

30

（1）膵前駆細胞を、クロモグリク酸ナトリウムおよび候補薬剤を含む培地で培養する工程、

（2）前記（1）で得られた細胞と、候補薬剤を含まない以外は同じ培地で培養した細胞の膵ホルモン発現量を測定する工程、および

（3）候補薬剤を含まない培地で培養して得た細胞と比べて、候補薬剤を含む培地で培養して得た細胞の膵ホルモン産生細胞数または膵ホルモンの発現量が上昇した場合、当該候補薬剤を膵ホルモン産生細胞の誘導効率を高める薬剤として選択する工程。

【0086】

工程（1）において、さらに（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイド、および（d）TGFβ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種をさらに含む培地で培養しても良く、より好ましくは、（a）アデニル酸シクラーゼ活性化剤、cAMPホスホジエステラーゼ阻害剤、およびcAMP類縁体からなる群より選択される少なくとも一種、（b）ニコチンアミド、（c）ステロイド、および（d）TGFβ阻害剤をさらに含む培地で培養する工程である。

40

【0087】

候補薬剤としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿が挙げられる。ここで試験化合物は塩を形成していてもよい。該塩としては、生理学的に許容される酸（例、

50

無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アルミニウム塩)などとの塩が用いられ、この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、又は有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アルミニウム塩が用いられる。

【0088】

本発明では、さらに、膵ホルモン分泌促進剤をスクリーニングする以下の方法を提供する。

- (1) 本発明の方法で膵ホルモン産生細胞を候補薬剤を含む培地で培養する工程、
- (2) 前記工程(1)で得られた細胞と、候補薬剤を含まない以外は同じ培地で培養した細胞の膵ホルモン発現量を測定する工程、および
- (3) 候補薬剤を含まない培地で培養した細胞と比較して、候補薬剤を含む培地で培養して得た細胞の膵ホルモンの発現量が上昇した場合、当該候補薬剤を膵ホルモン分泌促進剤として選択する工程。

10

【0089】

膵ホルモン分泌促進剤のスクリーニング方法において、候補薬剤、膵ホルモンの発現量の測定は、上記と同様の物質または方法を用いることができる。

【0090】

本発明では、さらに、上記の工程を用いて得られた膵ホルモン産生細胞を患者に移植することによって膵臓疾患の治療に用いることができる。よって本発明の方法により得られた膵ホルモン産生細胞を含有する、膵臓疾患の治療のための組成物も本願発明に含まれる。当該細胞は、移植前に、放射線を照射する、または、マイトマイシンCなどの細胞増殖を抑止する薬剤によって処理されても良い。

20

【0091】

膵臓疾患の治療は得られた膵ホルモン産生細胞を含む細胞群を生理食塩水等に懸濁させた細胞懸濁液を、患者の膵臓、腸間膜、脾臓および肝臓へ直接移植することによって行い得る。移植の際、当該細胞は、ポリエチレングリコール、ゼラチン、またはコラーゲン等の足場材と共に投与しても良い。投与する細胞数は、例えば、 1×10^8 から 1×10^{10} 細胞/個体、好ましくは、 5×10^8 から 1×10^{10} 細胞/個体、さらに好ましくは、 1×10^9 から 1×10^{10} 細胞/個体である。

30

【0092】

iPS細胞は移植用膵ホルモン産生細胞の材料として特に好適に用いられる。得られた膵ホルモン産生細胞を移植する場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型と同一もしくは実質的に同一である体細胞から得たiPS細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

40

【実施例】

【0093】

以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0094】

クロモグリク酸ナトリウムの効果の検討

ヒトES細胞株KhES3は、京都大学より受領し、従来の方法で培養した(H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932、本文献は引用により本願の一部を構成する)。KhES3を次の工程に従ってインスリン産生細胞へと誘導した。分化誘導にあたり、ヒトES細胞株は、培養皿に対しておおよそ70%コンフルエントに増殖した細

50

胞をCTK溶液（リプロセル）を用いて剥離させ、続いてAccutaseを用いて個々の細胞へと分離し、24well plate（greiner）に 2.0×10^5 /wellにて播種して用いた。

【0095】

（第1工程）2%のFBSを含むRPMI培地にアクチビンA（ 100 ng/ml ）とCHIR99021（ $3 \mu\text{M}$ ）を添加して5日間培養した。この時、同じ培地で3日目と4日目に培地交換した。

【0096】

（第2工程）1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)にDorsomorphin（ $1 \mu\text{M}$ ）、レチノイン酸（ $2 \mu\text{M}$ ）、SB431542（ $10 \mu\text{M}$ ）を添加して6日間培養した。この時、同じ培地で2日おきに培地交換した。

10

【0097】

（第3工程）1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)にフォルスコリン（ $10 \mu\text{M}$ ）、ニコチンアミド（ 10 mM ）、デキサメタゾン（ $10 \mu\text{M}$ ）、ALK5阻害剤I I（2-（3-（6-メチルピリジン-2-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）-1, 5-ナフチリジン）（ $5 \mu\text{M}$ ）およびクロモグリク酸ナトリウム（ 0 mM 、 0.1 mM 、 1 mM 、 5 mM 、 10 mM または 20 mM ）を添加してさらに12日間培養した。この時、同じ培地で4日おきに培地交換した。

【0098】

得られた細胞をBD Cytofix/Cytoperm™ Kitを用いて処理した後、抗ブタ インスリン・モルモットポリクローナル抗体/抗血清（Dako）を用いて染色しフローサイトメーターにてインスリン産生細胞数を検出したところ、クロモグリク酸ナトリウムを添加した場合、濃度依存的にインスリン陽性細胞の含有率が増加することが確認された。

20

【実施例2】

【0099】

iPS細胞株での検討

ヒトiPS細胞201B7（京都大学iPS細胞研究所より入手可能（Takahashi K et al, Cell. 2007 131:861-72.、本文献は引用により本願の一部を構成する））を用いて、次の工程に従ってインスリン産生細胞へと誘導した。分化誘導にあたり、ヒトiPS細胞株は、培養皿に対しておおよそ70%コンフルエントに増殖した細胞をCTK溶液を用いて剥離させ、続いてAccutaseを用いて個々の細胞へと分離し、24well plateに 2.0×10^5 /wellにて播種して用いた。

30

【0100】

（第1工程）2%のFBSを含むRPMI培地にアクチビンA（ 100 ng/ml ）とCHIR99021（ $3 \mu\text{M}$ ）を添加して5日間培養した。この時、同じ培地で3日目と4日目に培地交換した。

【0101】

（第2工程）1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地にDorsomorphin（ $1 \mu\text{M}$ ）、レチノイン酸（ $2 \mu\text{M}$ ）、SB431542（ $10 \mu\text{M}$ ）を添加して6日間培養した。この時、同じ培地で2日おきに培地交換した。

【0102】

40

（第3工程）1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)にフォルスコリン（ $10 \mu\text{M}$ ）、ニコチンアミド（ 10 mM ）、デキサメタゾン（ $10 \mu\text{M}$ ）、ALK5阻害剤I I（2-（3-（6-メチルピリジン-2-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）-1, 5-ナフチリジン）（ $5 \mu\text{M}$ ）およびクロモグリク酸ナトリウム（ 0.001 mM 、 0.01 mM 、 0.1 mM 、 1 mM 、 5 mM 、 10 mM または 20 mM ）を用いてさらに12日間培養した。この時、同じ培地で4日おきに培地交換した。

【0103】

上述と同様の方法でインスリン陽性細胞の含有率をフローサイトメーターを用いて測定したところ、クロモグリク酸ナトリウムの濃度が、 1 mM 以上において、含有率が高くなることが確認され、 10 mM において含有率が最大になった（図1A）。このとき、免疫

50

染色像によりインスリンの産生が確認された（図1B）。さらに、プロインスリンからプロセシングにより得られるCペプチドについても同様に、Anti C-Peptid, human (PENINSULA LABORATORIES LLC.) を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて測定したところ、クロモグリク酸ナトリウムの濃度依存的に上昇することが確認された（図1C）。

【実施例3】

【0104】

各条件検討

3種の繊維芽細胞由来のiPS細胞株（418C1および409B2（Okita K, et al, Nat Methods. 2011 8:409-412）および201B7）は、京都大学iPS細胞研究所より入手可能である。京都大学より入手したこれらのiPS細胞株を用いて、上記と同様の工程（ただし、工程3におけるクロモグリク酸ナトリウムの濃度は、10mMとした）により、インスリン陽性細胞へと分化誘導した。

10

【0105】

その結果、3種のiPS細胞株いずれから出発した場合においても、（第3工程）にてクロモグリク酸ナトリウムを添加によりインスリン陽性細胞の含有率が高くなった（図2A）。

【0106】

また、201B7を用いて、（第3工程）の期間を4日、8日、12日、16日および20日間行ったところ、8日間、12日間および16日間行った場合にインスリン陽性細胞への分化誘導効率が高くなった。このとき12日間行った場合が最も効率が高かった。一方、4日間行った場合においても、効率は低い、クロモグリク酸ナトリウムの効果が少し見られた（図2B）。

20

【0107】

同様に、201B7を用いて、（第3工程）を12日間行った後の細胞をKi67で染色を行い、細胞の増殖能を評価した。その結果、細胞増殖マーカーであるKi67陽性細胞数に差が見られないことから、クロモグリク酸ナトリウムの添加によりインスリン陽性細胞の増殖能が高くなっている所見は見られなかった（図3）。また、この時の得られた細胞をBD Cytotfix/Cytoperm™ Kitを用いて処理した後、monoclonal anti-glucagon cloneK79bB10（SIGMA）を用いてフローサイトメーターでグルカゴン陽性細胞数を調べたところ、クロモグリク酸ナトリウム添加によりインスリン陽性細胞およびグルカゴン陽性細胞の含有率が高くなっていることが確認された（図4）。

30

【0108】

以上より、上記工程によるクロモグリク酸ナトリウムの添加により、インスリン産生細胞のみならずグルカゴン産生細胞の分化誘導も促進し、この効果はインスリン産生細胞の増殖によりもたらされる効果ではないことが確認された。

【実施例4】

【0109】

別工程での検討

ヒトiPS細胞201B7を用いて、次の工程に従ってインスリン産生細胞へと誘導した。分化誘導にあたり、ヒトiPS細胞株は、培養皿に対しておおよそ80-90%コンフルエントに増殖した細胞をCTK溶液を用いて剥離させ、続いてAccutaseを用いて個々の細胞へと分離し、マトリゲルをコートした24well plateに 2.0×10^5 /wellにて播種して用いた。

40

【0110】

（第1工程）1%のB-27を含むRPMI培地にアクチビンA（100ng/ml）とCHIR99021（1μM）、Y-27632（10μM）を添加して2日間培養した。その後、1%のB-27を含むRPMI培地にアクチビンA（100ng/ml）とCHIR99021（1μM）を添加した培地にてさらに3日間培養した（Day5）。この時、同じ培地で3日目（Day3）と4日目（Day4）に培地交換した。

【0111】

（第2工程）1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地にDorsomorphin（1μ

50

M)、レチノイン酸 (2 μ M)、SB431542 (10 μ M) を添加して6日間培養した (Day 11)。この時、同じ培地で2日おきに培地交換した。

【0112】

(第3工程) 1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)にフォルスコリン (10 μ M)、ニコチンアミド (10 mM)、デキサメタゾン (10 μ M)、ALK5阻害剤 II (2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン) (5 μ M) およびクロモグリク酸ナトリウム (10 mM) を添加した培地を用いてさらに8日間培養した (Day 19)。この時、同じ培地で4日おきに培地交換した。これらの工程を図5Aに示す。

【0113】

各工程 (Day 0、Day 5、Day 11、Day 19) で得られた細胞を回収し、PCRを用いて各マーカー遺伝子の発現を確認した (図5B)。第3工程でクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合には、NGN3およびGHRH (グレリン) の発現が確認された。また、SST (ソマトスタチン) の発現は、第3工程でクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合において添加しなかった場合と比べて発現が高いことが確認された。

【0114】

さらに、免疫染色により各マーカー遺伝子のタンパク質の産生を確認した (図5C)。また、第3工程でクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合としなかった場合におけるインスリン産生量を比較したところ、クロモグリク酸ナトリウムを添加した方がその産生量が高いことが確認された (図5D)。

【0115】

免疫染色により膵ホルモンの発現を確認した (図6AおよびB)。その結果、第3工程でクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンの発現がより高くなることが確認された。

【0116】

以上より、第3工程を8日間行った工程によっても、膵ホルモン産生細胞への誘導ができることが確認された。

【実施例5】

【0117】

胎児細胞からのインスリン産生細胞への誘導への影響の検討

Insulinのプロモーター下にGFPを発現するマウスの胎児E12.5、E14.5およびE16.5の膵原基を抽出し、それぞれを1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地にフォルスコリン (10 μ M)、ニコチンアミド (10 mM)、デキサメタゾン (10 μ M)、ALK5阻害剤 II (5 μ M) およびクロモグリク酸ナトリウム (10 mM) を添加した培地中で、4日間浮遊培養した。その模式図を図7Aに示す。

【0118】

その結果、いずれの胎児膵原基においてもクロモグリク酸ナトリウムを添加した場合において、GFPの陽性細胞率が高くなることが確認された (図7B)。さらに、得られた細胞をPCRにより Insulin および Neurog3 の発現量を確認したところ、クロモグリク酸ナトリウムを添加した場合において発現量が高くなることが確認された (図7C)。

【0119】

以上より、クロモグリク酸ナトリウムは、生体内の膵原基細胞からインスリン産生細胞への誘導を促進させる効果を有することが確認された。

【実施例6】

【0120】

クロモグリク酸ナトリウム単剤での効果の検討

ヒトiPS細胞201B7を用いて、次の工程に従ってインスリン産生細胞へと誘導した。分化誘導にあたり、ヒトiPS細胞株は、培養皿に対しておおよそ80-90%コンフルエントに増殖した細胞をCTK溶液を用いて剥離させ、続いてAccutaseを用いて個々の細胞へと

10

20

30

40

50

分離し、マトリゲルをコートした24well plateに 2.0×10^5 /wellにて播種して用いた。

【0121】

(第1工程) 1%のB-27を含むRPMI培地にアクチビンA (100 ng/ml) とCHIR99021 (1 μ M)、Y-27632 (10 μ M) を添加して2日間培養した。その後、1%のB-27を含むRPMI培地にアクチビンA (100 ng/ml) とCHIR99021 (1 μ M) を添加して、さらに3日間培養した(Day 5)。この時、同じ培地で3日目(Day 3)と4日目(Day 4)に培地交換した。

【0122】

(第2工程) 1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地にDorsomorphin (1 μ M)、レチノイン酸 (2 μ M)、SB431542 (10 μ M) を添加して6日間培養した(Day 11)。この時、同じ培地で2日おきに培地交換した。

10

【0123】

(第3工程) 1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)にクロモグリク酸ナトリウム (10 mM) を添加した培地を用いてさらに8日間培養した(Day 19)。この時、同じ培地で4日おきに培地交換した。これらの工程を図8Aに示す。

【0124】

得られた細胞を定量PCRを用いて β ACTINに対するINSULINの発現量を測定したところ、クロモグリク酸ナトリウムを添加した方がその発現量が高いことが確認された(図8B)。さらに、免疫染色においてもINSULINの陽性細胞が多いことが確認された(図8C)。

20

【0125】

続いて、実施例4の第3工程で用いた4つの添加剤(フォルスコリン (10 μ M)、ニコチンアミド (10 mM)、デキサメタゾン (10 μ M)、ALK5阻害剤II (5 μ M))のうち1つの添加剤と組み合わせた場合の効果を確認したところ、発現量は少ないが、いずれの組み合わせにおいてもINSULINの発現が確認された。4つ全ての添加剤に対して添加した場合において、クロモグリク酸ナトリウムによるインスリン産生細胞への誘導効果がより高くなることが確認された。

【0126】

以上より、クロモグリク酸ナトリウムは単剤で用いることでもインスリン産生細胞への誘導効率を高めることができると確認された。

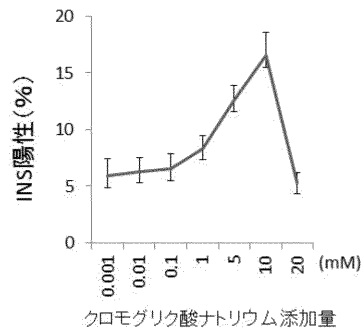
30

【産業上の利用可能性】

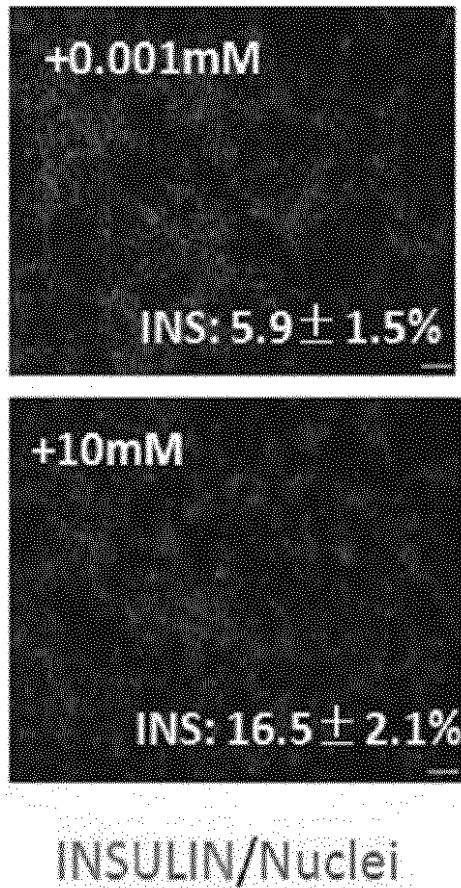
【0127】

以上詳述したように、本出願は、多能性幹細胞から膵ホルモン産生細胞を分化誘導する方法を提供する。本方法で製造された膵ホルモン産生細胞は、膵臓疾患、特に1型糖尿病の再生医療に使用され得る。

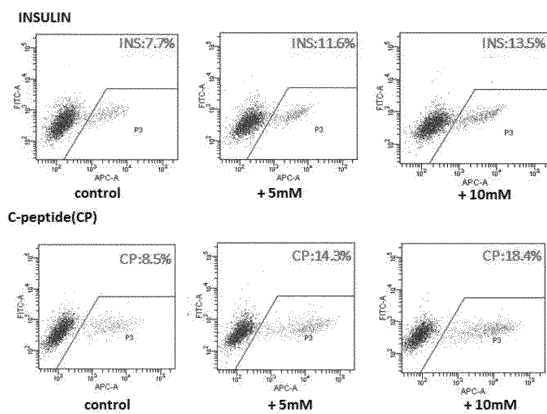
【図 1 A】



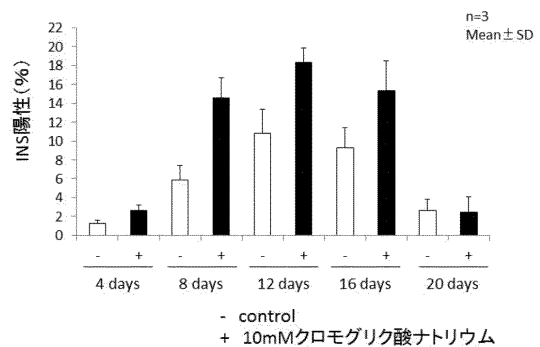
【図 1 B】



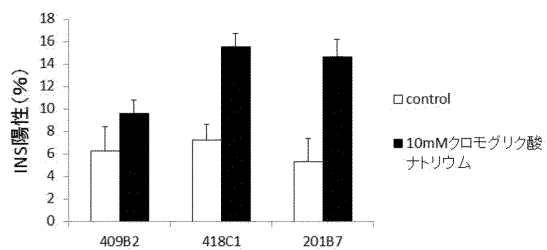
【図 1 C】



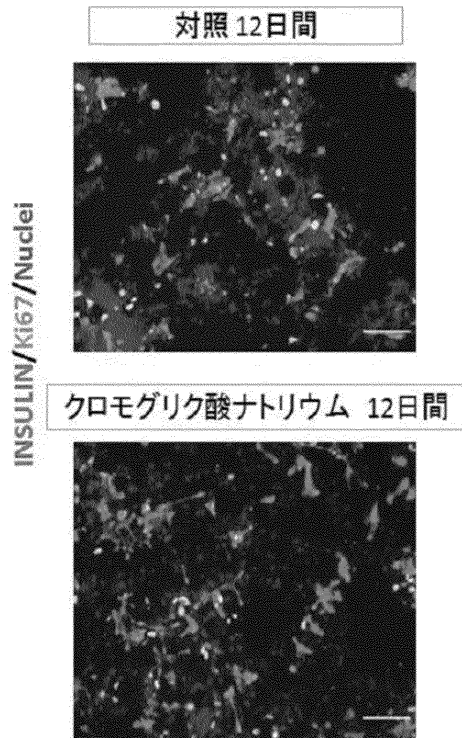
【図 2 B】



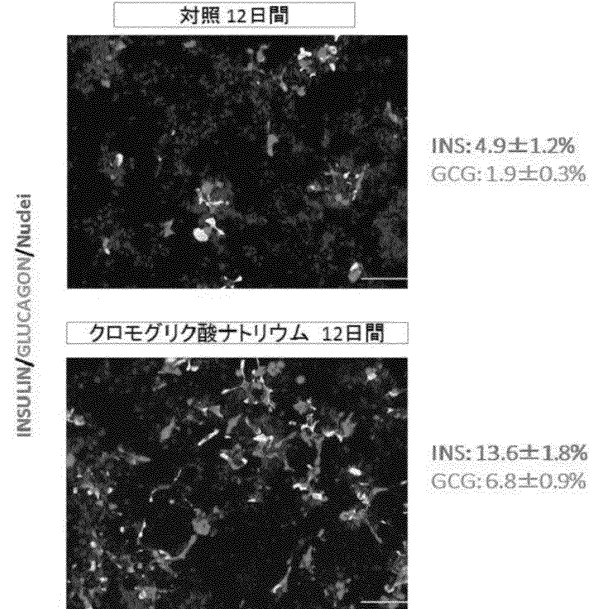
【図 2 A】



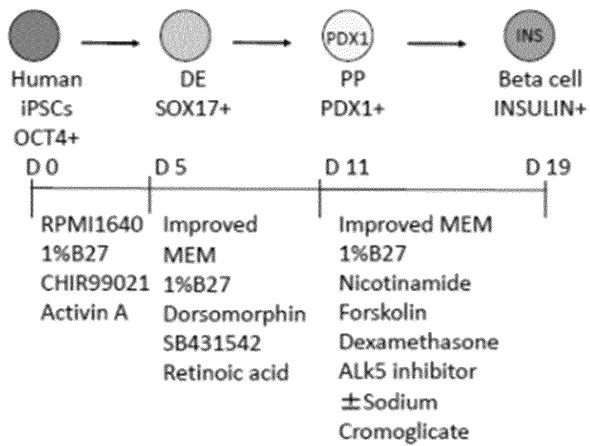
【図 3】



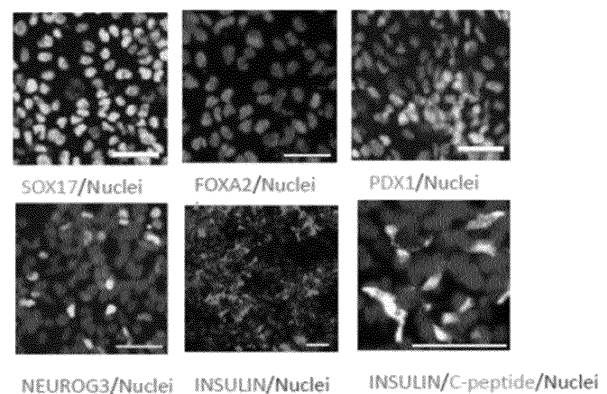
【図 4】



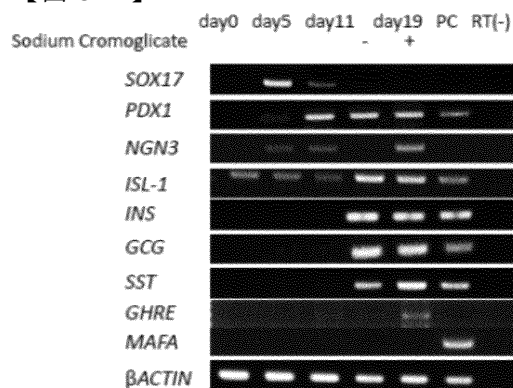
【図 5 A】



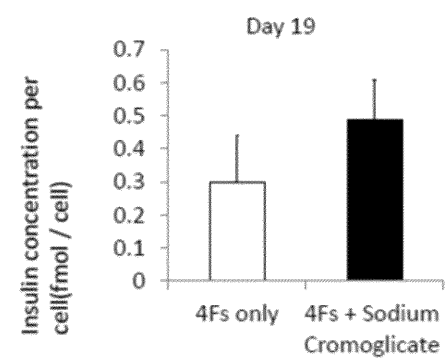
【図 5 C】



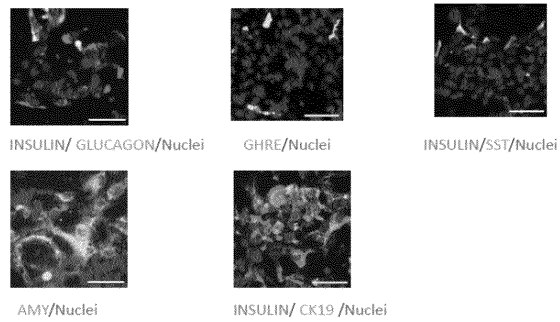
【図 5 B】



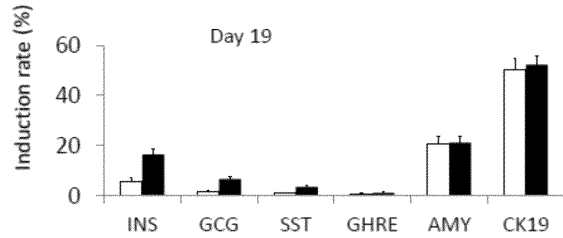
【図 5 D】



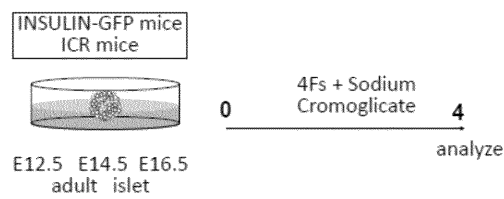
【図 6 A】



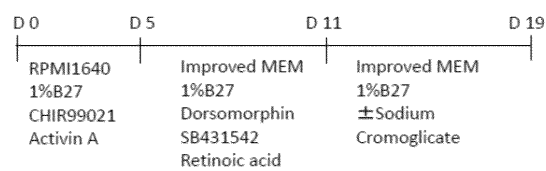
【図 6 B】



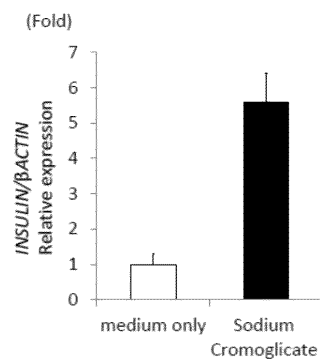
【図 7 A】



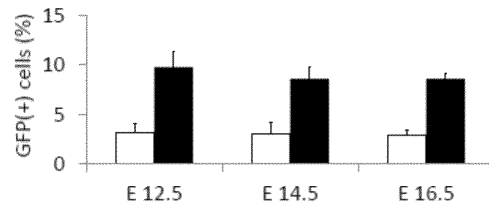
【図 8 A】



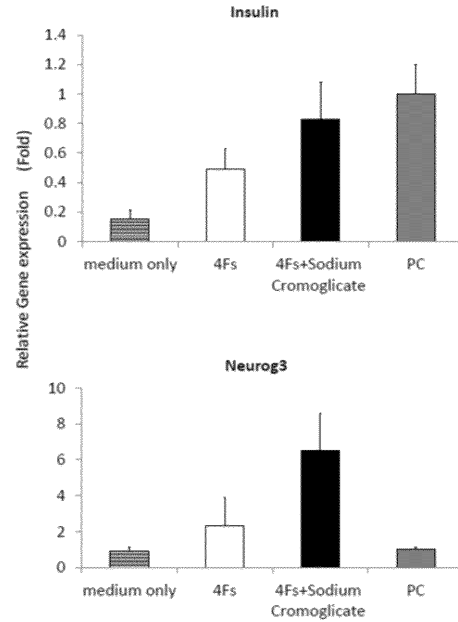
【図 8 B】



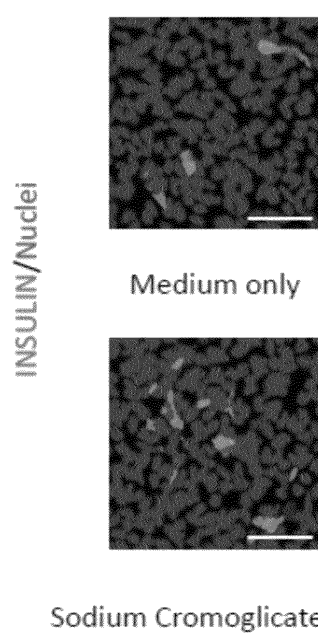
【図 7 B】



【図 7 C】

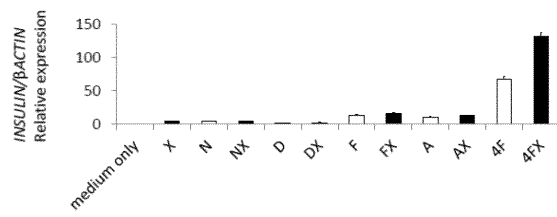


【図 8 C】



【図 8 D】

(Fold)



フロントページの続き

- (72)発明者 稲垣 暢也
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 豊田 太郎
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 近藤 恭士
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2011/081222 (WO, A1)
国際公開第2012/020845 (WO, A1)
国際公開第2009/048675 (WO, A1)
国際公開第2008/144690 (WO, A1)
細川吉弥 他, 糖尿病の病態と治療における進歩 iPS細胞を用いた糖尿病に対する再生医療,
腎と透析, 2013年 8月25日, Vol.75, No.2, p.268-273

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)