

(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2021-112185

(P2021-112185A)

(43) 公開日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071 Z N A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 C	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2021-5958 (P2021-5958)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(22) 出願日 令和3年1月18日(2021.1.18)	
(31) 優先権主張番号 62/962,186	(74) 代理人 100106909 弁理士 棚井 澄雄
(32) 優先日 令和2年1月17日(2020.1.17)	(74) 代理人 100188558 弁理士 飯田 雅人
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100181722 弁理士 春田 洋孝
(出願人による申告)平成29年度、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構、「再生医療実現拠点ネットワー クプログラム 技術開発個別課題」、「iPS細胞を用 いた新規糖尿病治療法開発」委託研究開発、産業技術力 強化法第17条の適用を受ける特許出願	(74) 代理人 100154852 弁理士 酒井 太一
	(74) 代理人 100140774 弁理士 大浪 一徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臍内胚葉細胞の増殖を促進する方法及びキット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性臍内胚葉細胞の増殖を促進する技術を提供する。

【解決手段】 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性臍内胚葉細胞の増殖を促進する方法であって、前記 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞に、 F O X O 1 阻害剤、及び/又は、 W n t シグナル活性化剤を接触させる工程を含む方法；及び、 F O X O 1 阻害剤、及び/又は、 W n t シグナル活性化剤を有効成分とする、 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞増殖促進剤。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性 臍内胚葉細胞の増殖を促進する方法であって、  
前記 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞に、F O X O 1 阻害剤、及び/又は、W n t  
シグナル活性化剤を接触させる工程 1  
を含む方法。

## 【請求項 2】

前記工程 1 において、F O X O 1 阻害剤、及び/又は、W n t シグナル活性化剤を 1  
2 ~ 3 6 時間接触させる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 F O X O 1 阻害剤は、A S 1 8 4 2 8 5 6 である、請求項 1 又は 2 に記載の方法  
。

## 【請求項 4】

前記 W n t シグナル活性化剤は、C H I R 9 9 0 2 1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれ  
か一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性 臍内胚葉細胞が多能性幹細胞に由来する、請求項  
1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

N G N 3 陽性 臍内分泌前駆細胞の製造方法であって、  
請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法により増殖させた P D X 1 陽性 N K X 6 .  
1 陽性細胞を培養する工程 2  
を含む製造方法。

## 【請求項 7】

前記工程 2 において、前記 P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞に、N o t c h シグナ  
ル阻害剤を接触させる、請求項 6 に記載の製造方法。

## 【請求項 8】

前記 N o t c h シグナル阻害剤は、D A P T である、請求項 7 に記載の製造方法。

## 【請求項 9】

F O X O 1 阻害剤、及び/又は、W n t シグナル活性化剤を有効成分とする、P D X  
1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞増殖促進剤。

## 【請求項 10】

前記 F O X O 1 阻害剤は、A S 1 8 4 2 8 5 6 である、請求項 9 に記載の P D X 1 陽  
性 N K X 6 . 1 陽性細胞増殖促進剤。

## 【請求項 11】

前記 W n t シグナル活性化剤は、C H I R 9 9 0 2 1 である、請求項 9 又は 10 に記  
載の P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞増殖促進剤。

## 【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性細胞増殖促進  
剤、及び、N o t c h シグナル阻害剤、を含む、臍内分泌前駆細胞製造用キット。

## 【請求項 13】

前記 N o t c h シグナル阻害剤は、D A P T である、請求項 12 に記載の臍内分泌前  
駆細胞製造用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、臍内胚葉細胞の増殖を促進する方法及びキットに関する。より具体的には  
、本発明は、P D X 1 陽性 N K X 6 . 1 陽性（以下、「P D X 1<sup>+</sup> N K X 6 . 1<sup>+</sup>」と表  
記する場合がある。）臍内胚葉細胞の増殖を促進する方法、N G N 3 陽性（以下、「N G

10

20

30

40

50

N3<sup>+</sup>」と表記する場合がある。) 膵内分泌前駆細胞の製造方法、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞増殖促進剤、及び、膵内分泌前駆細胞製造用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

インスリン分泌細胞等の膵内分泌細胞は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞に由来する。PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞は、発生過程で枝分かれ構造をとる膵管構造の幹部分(Trunk region)に存在する。PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞は、膵管構造から遊走し、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を経て、膵島を形成する膵内分泌細胞を生じる。

【0003】

これまでに、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞への分化にNotchシグナルが抑制的に機能することが知られている。このため、多能性幹細胞をNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞に分化させる従来のプロトコールにおいても、Notchシグナルの阻害が行われている(例えば、非特許文献1、2を参照。)

【0004】

また、膵臓の発生過程では、成熟細胞の数が、前駆細胞の数に規定されることが知られている。そして、内分泌系においても、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の数を調整することにより、最終的に膵島細胞の数が制御されていると考えられている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Pagliuca, F. W., et al., Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro, Cell, 159 (2), 428-439, 2014.

【非特許文献2】Rezania, A., et al., Reversal of diabetes with insulin producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nature Biotechnol, 32 (11), 1121-1133, 2014.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、多能性幹細胞からの分化誘導において、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の数を増やすことができれば、インスリン分泌細胞等の膵内分泌細胞をより効率よく製造できると考えられている。このためには、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の前駆段階であるPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の数を増やすことが効果的だが、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の数を増やす技術は未だ知られていない。

【0007】

そこで、本発明は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進する技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は以下の態様を含む。

[1] PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞の増殖を促進する方法であって、前記PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させる工程1を含む方法。

[2] 前記工程1において、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を12~36時間接触させる、[1]に記載の方法。

[3] 前記FOXO1阻害剤は、AS1842856である、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 前記Wntシグナル活性化剤は、CHIR99021である、[1]~[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記PDX1陽性NKX6.1陽性膵内胚葉細胞が多能性幹細胞に由来する、[

10

20

30

40

50

1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] NGN3<sup>+</sup> 膵内分泌前駆細胞の製造方法であって、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法により増殖させた PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞を培養する工程2を含む製造方法。

[7] 前記工程2において、前記 PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞に、Notchシグナル阻害剤を接触させる、[6] に記載の製造方法。

[8] 前記 Notchシグナル阻害剤は、DAPTである、[7] に記載の製造方法。

[9] FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を有効成分とする、PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞増殖促進剤。

[10] 前記 FOXO1阻害剤は、AS1842856である、[9] に記載の PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞増殖促進剤。

[11] 前記 Wntシグナル活性化剤は、CHIR99021である、[9] 又は [10] に記載の PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞増殖促進剤。

[12] [9] ~ [11] のいずれかに記載の PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞増殖促進剤、及び、Notchシグナル阻害剤、を含む、膵内分泌前駆細胞製造用キット。

[13] 前記 Notchシグナル阻害剤は、DAPTである、[12] に記載の膵内分泌前駆細胞製造用キット。

#### 【0009】

本発明は以下の態様を含むということもできる。

[P1] 少なくとも PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞（膵内胚葉細胞）を含む細胞集団を、*in vitro* で FoxO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤に接触させて、前記 PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞を増殖させる得る工程1と、前記 PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞を Notchシグナル阻害剤に接触させて、NGN3<sup>+</sup> 内分泌前駆細胞を得る工程2と、を含む膵内分泌前駆細胞の製造方法。

[P2] 前記工程1において、少なくとも PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞（膵内胚葉細胞）を含む細胞集団を、*in vitro* で FoxO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤に、前記工程2の前15時間~30時間接触させる、[P1] に記載の製造方法。

[P3] 前記 FoxO1シグナル阻害剤は、AS1842856である、[P1] 又は [P2] に記載の製造方法。

[P4] 前記 Wntシグナル活性化剤は、CHIR99021である、[P1] ~ [P3] のいずれかに記載の製造方法。

[P5] 前記 Notch阻害剤は、DAPTである、[P1] ~ [P4] のいずれかに記載の製造方法。

[P6] FoxO1シグナル阻害剤、及び Notch阻害剤を含む、膵内分泌前駆細胞製造キット。

[P7] 前記 FoxO1シグナル阻害剤は、AS1842856である、[P6] に記載の膵内分泌前駆細胞製造キット。

[P8] 前記 Notch阻害剤は、DAPTである、[P6] 又は [P7] に記載の膵内分泌前駆細胞製造キット。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明によれば、PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 細胞の増殖を促進する技術を提供することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

図9~18、21~25、27~36、39中、「AS」はAS1842856処理を行ったことを示し、「DMSO」は陰性対照としてのジメチルスルホキシド処理を行ったことを示す。

【図1】多能性幹細胞を膵オルガノイドに分化誘導する、多段階分化誘導法の概略を示す

10

20

30

40

50

図である。

【図2】実験例1における、ステージ1の終了時の代表的なFACS解析の結果である。

【図3】実験例1における、ステージ2の終了時の代表的なFACS解析の結果である。

【図4】実験例1の各分化段階の細胞の顕微鏡写真である。

【図5】実験例1における、ステージ4の2日目(S4D2、以下、ステージmのn日目を「SmDn」と表記する場合がある。)の代表的なFACS解析の結果である。

【図6】実験例1における、ステージ4の5日目(S4D5)の膵オルガノイドの顕微鏡写真である。

【図7】実験例1における、ステージ4の5日目(S4D5)の代表的なFACS解析の結果である。

【図8】実験例1における、ステージ4の5日目(S4D5)のFACS解析の結果を示すグラフである。

【図9】実験例2における、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。

【図10】実験例2における、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。

【図11】実験例2における、ステージ5の3日目(S5D3)の膵オルガノイドの顕微鏡写真である。

【図12】実験例2における、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。横軸のグレーの期間(S4D5~S4D6)は、AS1842856が培地に添加されていた期間を示す。

【図13】実験例2における、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。

【図14】実験例2における、ステージ5の3日目(S5D3)のFACS解析の結果を示すグラフである。

【図15】実験例2における、ステージ5の3日目(S5D3)のFACS解析の結果を示すグラフである。

【図16】実験例2における、ステージ5の3日目(S5D3)の膵オルガノイドの顕微鏡写真である。

【図17】実験例2において、NGN3-EGFPレポーター細胞を分化誘導し、AS1842856処理した結果を示す顕微鏡写真である。

【図18】実験例2において、EGFP<sup>+</sup>細胞1個当たりのNGN3 mRNAの量を示すグラフである。

【図19】実験例2において、ステージ4の5日目(S4D5)のGP2<sup>+</sup>細胞の割合を示すFACS解析の結果である。

【図20】実験例2において、ステージ4の5日目(S4D5)のPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合を示すFACS解析の結果である。

【図21】実験例2において、ステージ4の6日目(S4D6)のGP2<sup>+</sup>細胞及びGP2<sup>-</sup>細胞の各細胞塊の顕微鏡写真である。

【図22】実験例2において、ステージ5の3日目(S5D3)の各膵オルガノイドにおけるNGN3遺伝子の発現量を測定した定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。

【図23】実験例2において、ステージ5の3日目(S5D3)の各膵オルガノイドにおけるEGFP<sup>+</sup>細胞を観察した顕微鏡写真及びFACS解析の結果である。

【図24】実験例2において、ステージ5の3日目(S5D3)の各膵オルガノイドにおけるEGFP<sup>+</sup>細胞の割合を示すグラフである。

【図25】実験例3において、EGFP<sup>+</sup>細胞の割合の変化を示すグラフである。横軸のグレーの期間(S4D5~S4D6)は、AS1842856又はジメチルスルホキシドが培地に添加されていた期間を示す。

【図26】実験例3において、NGN3を免疫染色し、FACS解析した結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図27】実験例3におけるFACS解析の結果を示すグラフである。

【図28】実験例3におけるFACS解析の結果を示すグラフである。

【図29】実験例4における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【図30】実験例4における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【図31】実験例4における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【図32】実験例4において、NGN3-EGFレポーター細胞を分化誘導し、ステージ5の3日目(S5D3)にFACS解析によりEGFP<sup>+</sup>細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。

【図33】実験例4における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【図34】実験例4において、胎生11.5日のマウス胚由来の膵組織の体外培養し、定量的リアルタイムPCRで解析した結果を示すグラフである。 10

【図35】実験例4において、FACS解析によりEdU<sup>+</sup>細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。

【図36】実験例5において、膵オルガノイドのFACS解析により、Insulin(INS)<sup>+</sup>Glucagon(GCG)<sup>-</sup>細胞、INS<sup>+</sup>GCG<sup>+</sup>細胞、INS<sup>-</sup>GCG<sup>+</sup>細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。

【図37】実験例5において、ステージ6(S6)オルガノイドをNRGマウスに移植してから2ヶ月後の免疫組織化学染色の結果を示す写真である。

【図38】実験例5において、ステージ6(S6)オルガノイドをNRGマウスに移植してから2ヶ月後の免疫組織化学染色の結果を示す写真である。 20

【図39】実験例6における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

[PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進する方法]

1実施形態において、本発明は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>である膵内胚葉細胞の増殖を促進する方法であって、前記PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させる工程1を含む方法を提供する。

【0013】

実施例において後述するように、発明者らは、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞にFOXO1阻害剤を作用させることにより、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進できることを明らかにした。FOXO1は、FOXO1(Forkhead box protein O1)遺伝子にコードされるタンパク質である。 30

【0014】

ここで、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進するとは、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の細胞分裂を促進し、細胞数を増加させることを意味する。より具体的には、FOXO1阻害剤を作用させない細胞群と比較して、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の細胞数が、1.2倍以上、好ましくは1.3倍以上、更に好ましくは1.4倍以上、最も好ましくは1.5倍以上に増えることを意味する。細胞の増殖は、従来公知の方法を用いて評価することができ、例えば、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を一定期間EdU(5-エチニル-2'-デオキシウリジン)存在下で培養し、該細胞又は該細胞から生じた細胞(例:NGN3<sup>+</sup>細胞)のうちEdUで標識された細胞の割合を解析し、陰性対象における前記割合と比較した場合の増加率として評価してもよい。 40

【0015】

発明者らは更に、FOXO1阻害剤はWntシグナルの活性化を起こすことを明らかにし、FOXO1阻害剤の代わりにWntシグナル活性化剤を使っても同等の効果が得られることを明らかにした。

【0016】

本実施形態の方法において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の調製方法は特に限定されず、例えば、実施例において後述する、多能性幹細胞の多段階分化誘導法により製造することができる。 50

## 【0017】

多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等が挙げられる。多能性幹細胞はヒトの細胞であることが好ましい。

## 【0018】

FOXO1阻害剤としては、AS1842856（CAS番号：836620-48-5）、AS1708727（CAS番号：1253226-93-5）等を用いることができる。これらは1種を単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。

## 【0019】

Wntシグナル活性化剤としては、CHIR99021（CAS番号：252917-06-9）、IQ-1（CAS番号：331001-62-8）、BML284（CAS番号：853220-52-7）等を用いることができる。これらは1種を単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。

10

## 【0020】

工程1では、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含む細胞集団に、FOXO1阻害剤を接触させてもよいし、Wntシグナル活性化剤を接触させてもよいし、FOXO1阻害剤及びWntシグナル活性化剤を接触させてもよい。前記細胞集団におけるPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合は、特に限定されず、例えば、5%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、更に好ましくは40%以上、最も好ましくは50%以上であってよい。PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合が高いほど、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤処理によって得られる細胞の絶対数が増えるため、前記剤と接触させる際の前記細胞集団におけるPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合は高い方が好ましい。

20

## 【0021】

FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤の細胞への接触は、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を培地に添加することにより行うことができる。培地中のFOXO1阻害剤の濃度は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に対する増殖促進効果が得られる程度であれば特に制限されず、例えば0.1μM~10μMであってよく、例えば約1μMであってよい。また、前記剤を接触させる細胞は、臍オルガノイドを形成していてもよく、単なる細胞塊を形成していてもよく、単一細胞に分散した状態であってよい。

30

## 【0022】

培地中のWntシグナル活性化剤の濃度は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖促進効果が得られる程度であれば特に制限されず、例えば0.1μM~10μMであってよく、例えば約5μMであってよい。

## 【0023】

工程1において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含む細胞集団を、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤に、12~36時間接触させることが好ましく、18~30時間接触させることがより好ましく、20~28時間接触させることが更に好ましく、22~26時間接触させるとより一層好ましく、約24時間接触させることが特に好ましい。FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させる時間が上記の範囲であると、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖促進作用により該細胞の数が増えて、より多くのNGN3<sup>+</sup>臍内分泌前駆細胞を得ることができる。

40

## 【0024】

実施例において後述するように、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤処理は、PDX1、NKX6.1の発現量を減少させる（すなわち、臍内分泌細胞への分化を阻害する）作用をも併せ持つため、36時間を超える長期処理は好ましくない。臍内分泌細胞に向かう細胞数が却って減少してしまい、得られるNGN3<sup>+</sup>臍内分泌前駆細胞数が減少してしまう場合がある。

## 【0025】

このように、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤による36時

50

間を超える長時間の継続処理は好ましくないが、短時間の処理を数回に分けて行ってもよい。この場合の短時間処理の目安は上記の通りである。例えば、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合が20～30%程度の段階で12～36時間の前記処理を行い、その後前記剤を含まない培地で培養し、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合が40～50%程度になった段階で再度前記処置を行ってもよい。

【0026】

[PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の製造方法]

1実施形態において、本発明は、上述したPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進する方法を含む、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の製造方法を提供する。

【0027】

本実施形態の製造方法は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させる工程を含む、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の製造方法ということもできる。あるいは、本実施形態の製造方法は、多能性幹細胞の多段階分化誘導法によりPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を得る工程と、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させる工程を含む、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の製造方法ということもできる。

【0028】

[NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の製造方法]

1実施形態において、本発明は、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の製造方法であって、上述した方法により増殖させたPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を培養する工程2を含む製造方法を提供する。

【0029】

実施例において後述するように、従来技術によりPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を培養するだけでPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞がNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞に分化する。また、工程2において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、Notchシグナル阻害剤を接触させることが好ましい。工程2でPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞にNotchシグナル阻害剤を接触させることにより、より多くのNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を得ることができる。

【0030】

本実施形態の製造方法は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させて、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進する工程1と、増殖したPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、Notchシグナル阻害剤を接触させる工程2を含む製造方法であるということもできる。

【0031】

あるいは、本実施形態の製造方法は、多能性幹細胞の多段階分化誘導法によりPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を得る工程と、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を接触させて、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進する工程と、増殖したPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に、Notchシグナル阻害剤を接触させる工程を含む製造方法であるということもできる。

【0032】

実施例において後述するように、発明者らは、膵内胚葉細胞を含む細胞集団にFOXO1阻害剤を作用させ、その後Notchシグナル阻害剤を作用させることにより、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を効率よく製造できることを明らかにした。FOXO1阻害剤を作用させない場合と比較して、得られるNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の数は2.8～6倍に増加した。

【0033】

また、発明者らは、FOXO1阻害剤の作用は、NotchシグナルによるNGN3転写調節とは独立しており、前駆細胞であるPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進することで、結果的にNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞数が増加することを明らかにした。

【0034】

10

20

30

40

50



したがって、本実施形態の製造方法により、多能性幹細胞から従来よりも多数のNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を製造することができ、ひいては、従来よりも多数の膵内分泌細胞を得ることが可能となる。

【0035】

Notchシグナル阻害剤としては、DAPT(CAS番号：208255-80-5)、 $\gamma$ -Secretase Inhibitor XXI(Compound E)(CAS番号：209986-17-4)、 $\gamma$ -Secretase Inhibitor I(CAS番号：133407-83-7)、Dibenzazepine(CAS番号：209984-56-5)、LY411575(CAS番号：209984-57-6)、RO4929097(CAS番号：847925-91-1)等を用いることができる。これらは1種を単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。

10

【0036】

Notchシグナル阻害剤の細胞への接触は、Notchシグナル阻害剤を培地に添加することにより行うことができる。培地中のNotchシグナル阻害剤の濃度は、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の誘導効果が得られる程度であれば特に制限されず、例えば0.1  $\mu$ M ~ 10  $\mu$ Mであってよく、例えば約10  $\mu$ Mであってよい。

【0037】

工程2において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞をNotchシグナル阻害剤に、1~7日間接触させることが好ましく、約3日間接触させることがより好ましい。以上の方法により、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を効率よく製造することができる。

20

【0038】

工程1は、工程2の前に実施することが好ましい。また、工程1の直後に工程2を実施してもよいし、工程1と工程2との間にインターバルが存在していてもよい。例えば、工程1で増殖させたPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を凍結保存しておき、任意の時期にこれを解凍して工程2を実施してもよい。あるいは、工程1で増殖させたPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の培地からFOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を除去し、任意の期間培養した後に工程2を実施してもよい。

【0039】

[PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞増殖促進剤]

1実施形態において、本発明は、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を有効成分とする、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞増殖促進剤を提供する。

30

【0040】

実施例において後述するように、発明者らは、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤をPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞に接触させることにより、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進できることを明らかにした。すなわち、FOXO1阻害剤、及び/又は、Wntシグナル活性化剤を、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の増殖を促進させる用途に用いることができる。

【0041】

本実施形態のPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞増殖促進剤において、FOXO1阻害剤、Wntシグナル活性化剤については上述したものと同様である。

40

【0042】

[膵内分泌前駆細胞製造用キット]

1実施形態において、本発明は、上述したPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞増殖促進剤、及び、Notchシグナル阻害剤、を含む、膵内分泌前駆細胞製造用キットを提供する。本実施形態のキットは、上述した膵内分泌前駆細胞の製造方法に好適に用いることができる。

【0043】

本実施形態のキットは、FOXO1阻害剤の代わりにWntシグナル活性化剤を含んでいてもよい。あるいは、本実施形態のキットは、FOXO1阻害剤、Wntシグナル活性化剤及びNotchシグナル阻害剤を含んでいてもよい。

50

## 【0044】

FOXO1阻害剤、Wntシグナル活性化剤、Notchシグナル阻害剤については上述したものと同様である。

## 【実施例】

## 【0045】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【0046】

## [材料及び方法]

## (iPSCの増殖及び分化誘導プロトコール)

ヒトiPSC細胞(hiPSC)株である585A1、604B1及び604B1から作製したNGN3-EGFPレポーター細胞は、マイトマイシンC処理したSNL細胞のフィーダー層上で培養した。培地としては、Primate ES Cell Medium(リプロセル社)に500U/mLペニシリン/ストレプトマイシン(サーモフィッシュサイエンティフィック社)、4ng/mLリコンビナントヒトbFGF(富士フィルム和光純薬)を添加した培地を使用した。継代は、hiPSCコロニーをCTK溶液で解離させ、1:4~1:10に分割することにより行った。hiPSCを用いた実験は、京都大学大学院医学研究科・医学部倫理委員会の承認を得て行った。

10

## 【0047】

分化培地の組成を下記表1に示す。ステージ3及び4は5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>環境下で培養し、それ以外は5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>環境下で培養した。

20

## 【0048】

【表 1】

日	基本培地	添加物
S1D0	RPMI1640 with GlutaMAX, 2%B27	100ng/mL activin A, 3 $\mu$ M CHIR99021, 100mM wortmannin, 10 $\mu$ M Y-27632
S1D1	RPMI1640 with GlutaMAX, 2%B27	100ng/mL activin A, 1 $\mu$ M CHIR99021
S1D2~D4	RPMI1640 with GlutaMAX, 2%B27	100ng/mL activin A
S2D0~D4	RPMI1640 with GlutaMAX, 1.5%B27	50ng/mL KGF, 2 $\mu$ M CHIR99021, 100nM LDN193189
S3D0~D3	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	50ng/mL KGF, 2 $\mu$ M retinoic acid, 100nM LDN193189, 250nM SANT1, 250 $\mu$ M ascorbic acid, 10 $\mu$ M Y-27632, 2.5% Matrigel
S4D0	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	25ng/mL KGF, 100nM retinoic acid, 100nM LDN193189, 250nM SANT1, 250 $\mu$ M ascorbic acid, 200nM((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-2, 4-pentadienylamino)benzyl)acetamide (TPB); PKC activator, Calbiochem)
S4D1	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	S4D0培地+10 $\mu$ M Y-27632
S4D2~D6	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	50ng/mL KGF, 1mM nicotinamide, 100nM retinoic acid, 100nM LDN193189, 250nM SANT1, 250 $\mu$ M ascorbic acid, 200nM TPB, 10 $\mu$ M Y-27632
S5D0~D3	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	1mM nicotinamide, 100nM retinoic acid, 100nM LDN193189, 250nM SANT1, 200nM TPB, 10 $\mu$ M DAPT(Notch inhibitor), 10 $\mu$ M ALK5 inhibitor, 10 $\mu$ g/mL heparin
S6D0~D1	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	1mM nicotinamide, 100nM retinoic acid, 100nM LDN193189, 250nM SANT1, 200nM TPB, 10 $\mu$ M ALK5 inhibitor, 10 $\mu$ g/mL heparin, 1 $\mu$ M 3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt(T3; Sigma)
S6D2~D17	DMEM/F12 with GlutaMAX, 1%B27	1mM nicotinamide, 10 $\mu$ M ALK5 inhibitor, 10 $\mu$ g/mL heparin, 1 $\mu$ M T3

## 《ステージ1》

CTK溶液でフィーダー細胞を除去し、アキュターゼ (Innovative Cell Technologies社) を用いて多能性細胞を単一細胞に解離して単一層として1:30に希釈したマトリゲル (登録商標、コーニング社) で予めコートした12ウェルプレートに播種した。5.0 × 10<sup>5</sup> 個/ウェルの細胞をS1D0 (ステージ1、0日目) 培地で1日間培養した。続いて、細胞をS1D1培地で1日間、S1D2培地で2日間培養した。

## 【0050】

## 《ステージ2及び3》

培地をS2培地に交換し、4日間培養した。S2D4に、アキュターゼを用いて細胞を単一細胞に解離し、60mmディッシュに播種し、S3培地で3日間培養した。

10

## 【0051】

## 《ステージ4》

培地をS4D0培地に交換した。D4D1に、分化した細胞を掻きとり、ピペッティングにより細胞塊に解離させ、S4D1培地で懸濁し、超低吸着6ウェルプレートに播種して1日間培養した。続いて、S4D2培地で4日間培養した。S4D5に、ジメチルスルホキシド (DMSO) 又はFOXO1阻害剤であるAS1842856 1 μM (CAS番号: 836620-48-5、FOXO1阻害剤) を培地に添加し24時間培養した。

## 【0052】

## 《ステージ5及び6》

オルガノイドをDMEMでリンスし、S5培地で3日間培養した。続いて、S6D0培地で2日間培養した。続いて、S6D2培地で培養した。S6D2培地は5日ごとに交換した。

20

## 【0053】

(免疫細胞化学染色及び免疫組織化学染色)

下記表2～表5に使用した抗体及び反応条件を示す。2D培養された細胞は、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で20分間固定し、2.5%ウマ血清 (Vector Laboratories) 中でインキュベートし、1次抗体と共に4で一晚インキュベートした。3DオルガノイドはiPGel (GenoStaff社) に包埋し、腎移植片は4%PFA中、4で一晚固定した。

30

## 【0054】

パラフィン切片は、固定された試料をアルコール中で脱水し、Histo-Clear (National Diagnostics社) に浸漬し、パラフィン包埋し、3 μmの厚さにスライスした。脱パラフィン及び水和後、Target Retrieval Solution pH 6.0 (ダコ社) を用いて抗原賦活化を行った。切片は2.5%ウマ血清中、室温で30分間ブロッキングした後、1次抗体と共に4で一晚インキュベートした。

## 【0055】

2D培養された細胞及びパラフィン包埋切片は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、2次抗体と共に1時間インキュベートした。染色画像は、HS All-in-one Fluorescence Microscope (カタログ番号「BZ-9000E」、キーエンス社) を用いて撮影した。

40

## 【0056】

【表 2】

1次抗体	入手先	カタログ番号	免疫化学染色	フローサイトメトリー
NKX6.1	DSHB	F55A12	1/100	1/50
NKX6.1	R&D	AF5857	不使用	1/50
NGN3	R&D	AF3444	1/250	1/50
INSULIN	CST	3014	1/400	1/50
GULCAGON	Sigma	G2654	1/1000	1/250
SYNAPTOPHYSIN	NovusBiologicals	NBP1-22901	1/200	不使用
TRYPsin	R&D	AF3586	1/200	不使用
CK19	Dako	M088	1/200	不使用

【 0 0 5 7 】

【表 3】

2次抗体	入手先	カタログ番号	免疫化学染色	フローサイトメトリー
Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat	Invitrogen	A11055	1/500	1/500
Alexa Fluor 488 Donkey anti-sheep	Invitrogen	A11015	1/500	1/500
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit	Invitrogen	A21206	1/500	1/500
Alexa Fluor 568 Donkey anti-mouse	Invitrogen	A10037	1/500	1/500
Alexa Fluor 647 Donkey anti-mouse	Millipore	AP192SA6	1/500	1/500
Alexa Fluor 647 Donkey anti-goat	Millipore	AP180SA6	1/500	1/500
DAPI(4',6-Diamidino- 2-Phenylindole, Dihydrochloride)	ThermoFisher	D1306	1/500	1/500

【 0 0 5 8 】

【表 4】

標識抗体	入手先	カタログ番号	条件	フローサイトメトリー
mouse IgG1-PE (for isotype control)	MBL	M075-5	室温 30分間	2 $\mu$ L/1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> 細胞
GP2-PE	MBL	D277-5	室温 30分間	2 $\mu$ L/1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> 細胞

【 0 0 5 9 】

【表 5】

アイソタイプ コントロールIgG	入手先	カタログ番号	免疫化学染色	フローサイトメトリー
goat IgG	R&D	AB-108-C	1次抗体と同濃度	1次抗体と同濃度
rabbit IgG	R&D	AB-105-C	1次抗体と同濃度	1次抗体と同濃度
sheep IgG	R&D	5-001-A	1次抗体と同濃度	1次抗体と同濃度
mouse IgG1	R&D	MAB002	1次抗体と同濃度	1次抗体と同濃度

## 【0060】

(定量的リアルタイムPCR解析)

RNeasy micro kit (キアゲン社) を用いて細胞からRNAを抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡社) を用いてcDNAを合成した。

## 【0061】

定量的リアルタイムPCR解析は、FastStart Universal SYBR Green Master with Rox (ロシュ社) を用いてStepOne (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を使用して行った。

20

## 【0062】

標的遺伝子の発現は、 $\beta$ -ミクログロブリンの発現量を用いて正規化した。相対的発現量はDMSOコントロール群との比較により算出した。使用したプライマーの配列を下記表6及び7に示す。

## 【0063】

【表 6】

ヒト遺伝子	Forward(配列番号)	Reverse(配列番号)
PDX1	CCTTCCCATGGATGAAGTC(1)	CGTCCGCTTGTCTCCTC(2)
NKX6.1	ATTCGTTGGGGATGACAGAG(3)	TGGGATCCAGAGGCTTATTG(4)
SOX9	GAAGCTCGCGGACCAGTAC(5)	GCTTCTCGCTCTCGTTCAGAAG(6)
NGN3	CGCTGCTCATCGCTCTCTATT(7)	TCTCACGGGTCACCTGGAC(8)
GP2	GCACTCCCTGGTGTAATCTGA(9)	CTGAGGCTGCAAAGTGGGA(10)
HES1	TCAACACGACACCGGATAAA(11)	TCAGCTGGCTCAGACTTTCA(12)
AXIN2	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC(13)	TGGCTGGTGCAAAGACATAG(14)
TCF-1	GGTGTCCCCAACTCTCTCT(15)	GCCTGAGGTCAGGGAGTAGA(16)
LEF-1	GACGAGATGATCCCCTTCAA(17)	ACAAACCTCTCAGGAGCCCT(18)
PDK4	TGAGACTCGCCAACATTCTG(19)	TCTGGTCATCTGGGCTTTTC(20)
HBP1	GGACAAGAGAGCCTCAGGAA(21)	CATGCCAGATTGGGTAGGAT(22)
NKX2.2	TCTACGACAGCAGCGACAAC(23)	TTGTCATTGTCCGGTACTC(24)
B2M	GTGCTCGGCTACTCTCTCT(25)	TCAATGTCGGATGGATGAAA(26)

## 【0064】

【表 7】

マウス遺伝子	Forward(配列番号)	Reverse(配列番号)
Pdx1	GAAATCCACCAAAGCTCACG(27)	ACGGGTCCTCTTGTTCCT(28)
Nkx6.1	CCCGGAGTGATGCAGAGT(29)	TTTGCTGTCCAGAGAACGTG(30)
Sox9	AGGAAGCTGGCAGACCAGTA(31)	TGTAATCGGGGTGGTCTTTC(32)
Axin2	TGTGAGATCCACGGAAACAG(33)	TGGATAACTCGCTGTCGTTG(34)
Hbp1	CCTGTGATGAGCACATGGAG(35)	AGCCAGTCCACCTCATCTTC(36)
B2m	TGGTAAAGCAAAGAGGCCTAA(37)	AGAAGTAGCCACAGGGTTGG(38)

## 【0065】

(Wnt活性化/阻害実験及びマウス臓器培養)

Wntシグナルの活性化には5  $\mu$ M CHIR99021 (CAS番号: 252917-06-9)を使用した。Wntシグナルの阻害には、20  $\mu$ M XAV939 (CAS番号: 284028-89-3)及び500 nM PKF118-310 (CAS番号: 84-82-2)を使用した。これらは、S4D5オルガノイド又はマウス膵臓原基の培地に24時間添加した。

## 【0066】

マウス膵臓の体外培養では、胎生11.5日胚の背側膵芽を摘出し、Millicell culture plate inserts (メルクミリポア社)を使用し、10%ウシ胎児血清及び500 U/mLペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEM/F12培地を用いて、空気-培地界面で培養した。細胞は37、5%CO<sub>2</sub>、湿潤環境下で培養した。

## 【0067】

(CRISPR/Cas9システムを用いたNGN3-EGFPレポーター細胞の樹立)

CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>)を使用してgRNA (GAGGAGCCGGGAGCCGTAGAGG、配列番号39)を設計し、pX330-U6-Chimeric\_\_BB-CBh-hSpCas9ベクターにクローニングした。hiPSCs (604B1)からゲノムDNAを単離し、これを鋳型にして、標的部から882 bp上流及び914 bp下流の相同DNAをPCRにより増幅した。

## 【0068】

In-Fusion kit (クロンテック社)を用いて、2つの相同DNA断片、自己切断2Aペプチド及びEGFP、ジェネティシン選択カセットを、線形化したpENTR-Donor-MCS2ベクターにサブクローニングした。

## 【0069】

標的iPSC (604B1)を10  $\mu$ M Y-27623で1時間前処理した。細胞をPBSで洗浄し、CTK溶液中37で1分間処理してフィーダー細胞を除去し、再度PBSで洗浄した。続いて、iPSCをアキュターゼで37、5分処理して単一細胞に解離した。

## 【0070】

10  $\mu$ gのpX330-U6-Chimeric\_\_BB-CBh-hSpCas9ベクター及び10  $\mu$ gのpENTR-Donor-MCS2ベクターを、NEPA21エレクトロポレーター (ネッパジーン社)を用いて1  $\times$  10<sup>6</sup>個の細胞にエレクトロポレーションした。パルス条件は、パルス電圧: 125 V、パルス幅: 5 ms、パルスの数: 2であった。

## 【0071】

細胞をフィーダー細胞と共に6ウェルプレートのウェルに播種し、10  $\mu$ M Y-2

20

30

40

50

7623で2日間処理した。iPSCコロニーが回復した後に、100 µg/mL ジェネティシンで選択した。続いて、ジェネティシン耐性コロニーを単一細胞に解離し、1000個の細胞をフィーダー細胞と共に10cmディッシュに播種した。続いて、ゲノムPCRにより各サブクローンをスクリーニングし、自己切断2Aペプチド及びEGFP及びジェネティシン選択カセットがNGN3遺伝子座にホモ接合性に導入されたクローン#19を選択した。

【0072】

続いて、ジェネティシン選択カセットを、10 µgのpCXW-Cre-puroベクターを、NEPA21エレクトロポレーターを用いてエレクトロポレーションすることにより除去した。ジェネティシン選択カセットの除去は、PCRスクリーニングにより確認した。使用したプライマーの配列を下記表8及び9に示す。全てのDNAシーケンスはApplied Biosystems 3500xL (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を使用して確認した。

10

【0073】

【表8】

遺伝子	Forward(配列番号)	Reverse(配列番号)
PGK	ATAGCAGCTTTGCTCCTTCG(40)	CGGAGATGAGGAAGAGGAGA(41)
DLX5	CCCCGTAGGGCTGTAGTAGT(42)	TTCCAAGCTCCGTTCCAGAC(43)

【0074】

【表9】

ジェノタイプングプライマー	塩基配列(配列番号)
P1	CTGAACCTGGCGACCAGAAG(44)
P2	CTTGCTCACCATAGGTCCAG(45)
P3	GGACTCTGGGGTTCGAATAA(46)
P4	CAGAAGTGCTCTTCCTCAGC(47)
P5	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA(48)

【0075】

(フローサイトメトリー)

アキュマックス(Innovative Cell Technologies社)を37、30分作用させてオルガノイドを単一細胞に解離した。続いて、細胞をFACSバッファー(10 µM Y-27632、0.2% FBSを含むPBS(-))で2回洗浄した。

【0076】

続いて、細胞をLIVE/DEAD Fixable Blue dead cell stain kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)で4、15分間処理し、解析中に生細胞であるか死細胞であるかの判別を行った。

40

【0077】

GP2染色においては、標識1次抗体を細胞に添加しインキュベートした。染色された細胞をFACSバッファーで2回洗浄し、BD FACS Aria II(BDバイオサイエンシス社)で解析した。標識抗体の反応条件を上記表4に示す。

【0078】

細胞内タンパク質の染色においては、細胞を350 µLのCytifix/Cytoperm Buffer(BDバイオサイエンシス社)で4、30分間固定した後、Perm/Wash Buffer Solution(BDバイオサイエンシス社)で

50



2回洗浄した。続いて、細胞を2.5%ウマ血清に懸濁し、室温で10分間インキュベートした。続いて、細胞を1次抗体又はアイソタイプコントロールIgG抗体と共に1時間室温でインキュベートし、Perm/Wash Buffer Solution (BD バイオサイエンシス社)で2回洗浄した。続いて、細胞を2次抗体と共に30分間室温でインキュベートし、2回洗浄した後にBD FACS Aria II (BD バイオサイエンシス社)で解析した。1次抗体及び2次抗体の濃度を上記表2~5に示す。

【0079】

少なくとも10,000イベントのデータを取得した後にBD FACS Diva ソフトウェア (BD バイオサイエンシス社)で解析した。

【0080】

(EdUの取り込み)

細胞を10 $\mu$ MのEdU (5-エチニル-2'-デオキシウリジン)を含む培地中で12時間インキュベートした後、Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (サーモフィッシュサイエンティフィック社)で処理した。標識された細胞は、BD FACS Aria II (BD バイオサイエンシス社)を使用して、少なくとも10,000イベントのデータを取得した後にBD FACS Diva ソフトウェア (BD バイオサイエンシス社)で解析した。

【0081】

(移植実験)

全ての動物実験は、京都大学の動物実験ガイドラインにしたがって行った。15~28週齢のメスの正常血糖NOD.Cg-Rag1<sup>tm1M<sup>o</sup>m</sup>Il2rg<sup>tm1Wj1</sup>/SzJマウス (NRG、チャールズリバー社)は、12時間明期/暗期サイクル下、標準的な滅菌食への自由なアクセスで飼育した。マウスは、イソフルラン吸入により麻酔した。それぞれ約3.0 $\times$ 10<sup>6</sup>個の細胞を含むステージ6オルガノイドを、左腎被膜下に移植した。2ヶ月後、マウスを安楽死させ、移植片の連続切片を免疫染色により解析した。

【0082】

(統計解析)

全ての結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。2群間のデータはスチューデントのt検定で解析し、多群間の結果はOne-way ANOVA及びテューキーの検定で解析した。P<0.05を統計学的に有意であると判断した。統計解析はJMP Pro 14 ソフトウェア (SAS Institute社)を用いて行った。

【0083】

[実験例1]

(ヒトiPSCのPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞含有膵オルガノイドへの分化誘導)

6ステージからなる多段階分化誘導法により、ヒトiPSC株である585A1及び604B1をPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含む膵オルガノイドに分化誘導した。

【0084】

図1に多段階分化誘導法の概略を示す。図1中、「iPSC」はiPS細胞を示し、「DE」は胚体内胚葉を示し、「PGT」は原始的な腸管細胞を示し、「PFG」は後前腸を示し、「PP」は膵前駆細胞を示し、「EP」は膵内分泌前駆細胞を示し、「EN」は膵内分泌細胞を示す。

【0085】

ステージ1の終了時には、約70%の細胞がSOX17<sup>+</sup>FOX A2<sup>+</sup>胚体内胚葉細胞に分化した。図2は代表的なFACS解析の結果である。図2に示すように、585A1細胞では71.1 $\pm$ 0.9%がSOX17<sup>+</sup>FOX A2<sup>+</sup>であり、604B1細胞では72.4 $\pm$ 1.9%がSOX17<sup>+</sup>FOX A2<sup>+</sup>であった。

【0086】

ステージ2の終了時には、約80%の細胞がHNF1B<sup>+</sup>FOX A2<sup>+</sup>の原始的な腸管細胞に分化した。図3は代表的なFACS解析の結果である。図3に示すように、585A1細胞では75.6 $\pm$ 3.2%がHNF1B<sup>+</sup>FOX A2<sup>+</sup>であり、604B1細胞

10

20

30

40

50

では  $81.8 \pm 0.9\%$  が  $\text{HNF1B}^+ \text{FOXA2}^+$  であった。

【0087】

続いて、細胞を単一細胞に解離し、新しいディッシュに播種した。図4は、各段階の細胞の顕微鏡写真である。スケールバーは  $200 \mu\text{m}$  を示す。約24時間後（ステージ3の1日目：S3D1）、図4に示すように、細胞は小さな塊を形成した。

【0088】

ステージ4の1日目（D4D1）に細胞塊を掻き取り、穏やかなピペッティングにより分散させ、低接着性プレートに移した。以降の分化誘導は3次元培養により行った。図4に示すように、S4D2には、細胞塊は3次元細胞塊を形成した。

【0089】

図5は代表的なFACS解析の結果である。図5に示すように、この段階において、細胞塊は主に  $\text{PDX1}^+$  細胞により構成されていた。585A1細胞では  $53.3 \pm 8.0\%$  が  $\text{PDX1}^+$  であり、604B1細胞では  $87.1\%$  が  $\text{PDX1}^+$  であった。しかしながら、 $\text{NKX6.1}^+$  細胞はほとんど存在しなかった。585A1細胞では  $1.2 \pm 0.3\%$  が  $\text{NKX6.1}^+$  であり、604B1細胞では  $0.9\%$  が  $\text{NKX6.1}^+$  であった。

【0090】

図6はS4D5における膵オルガノイドの顕微鏡写真である。スケールバーは  $200 \mu\text{m}$  である。図6に示すように、S4D5には、細胞塊は外見及びサイズがほとんど均一になった。

【0091】

免疫組織化学染色及びFACS解析の結果、ほぼ90%の細胞が  $\text{PDX1}$  を発現しており、50~60%が  $\text{NKX6.1}$  を共発現していた。図7は代表的なFACS解析の結果であり、585A1細胞では  $89.0 \pm 0.65\%$  が  $\text{PDX1}^+$  であり、604B1細胞では  $97.2 \pm 1.3\%$  が  $\text{PDX1}^+$  であった。また、図8は、FACS解析の結果を示すグラフであり、585A1細胞では  $48.9 \pm 3.1\%$  が  $\text{PDX1}^+ \text{NKX6.1}^+$  であり、604B1細胞では  $60.2 \pm 6.3\%$  が  $\text{PDX1}^+ \text{NKX6.1}^+$  であった。

【0092】

よって、ヒト  $\text{iPSC}$  から、 $\text{PDX1}^+ \text{NKX6.1}^+$  膵内胚葉細胞を約半分以上含む膵オルガノイドが得られた。

【0093】

[実験例2]

(FOXO1の一過性阻害による、 $\text{NGN3}^+$  膵内分泌前駆細胞の増加)

《FOXO1の長期間阻害》

実験例1で得たS4D5の膵オルガノイドの培地に、FOXO1阻害剤であるAS1842856 (CAS番号: 836620-48-5) を添加した。

【0094】

24時間後、培地に - セクレターゼ阻害剤であるDAPT (CAS番号: 208255-80-5) を更に添加して  $\text{NGN3}$  遺伝子の発現を刺激し、3日間細胞を培養した。なお、DAPT (CAS番号: 208255-80-5) は  $\text{Notch}$  シグナル阻害剤でもある。

【0095】

図9、図10は、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。図9、図10中、「\*」は、スチューデントの  $t$  検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

【0096】

その結果、図9に示すように、 $\text{NGN3}$  遺伝子の  $\text{mRNA}$  の発現量が減少したことが明らかとなった。更に、図10に示すように、膵臓で発現される遺伝子である、 $\text{PDX1}$ 、 $\text{NKX6.1}$ 、 $\text{SOX9}$  の  $\text{mRNA}$  の発現量も顕著に減少したことが明らかとなった。

【0097】

10

20

30

40

50

図11は、膵オルガノイドの顕微鏡写真である。図11中、「AS」はAS1842856処理した結果であることを示し、「DMSO」は対照としてジメチルスルホキシドで処理した結果であることを示す。スケールバーは100 $\mu$ mである。図11に示すように、AS1842856で4日間処理した膵オルガノイドは、S5D3において、対照より大きいことが明らかとなった。この結果は、FOXO1の阻害が細胞増殖を誘導することを示す。

#### 【0098】

よって、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含むステージでFOXO1を4日間阻害すると、非処理群と比べて細胞総数は増えるが、NGN3の発現量は却って減少してしまうことが示された。

#### 【0099】

##### 《FOXO1の一過性阻害》

続いて、実験例1で得たS4D5の膵オルガノイドの培地に、FOXO1阻害剤であるAS1842856(CAS番号:836620-48-5)を1日間のみ添加した後、DAPT(CAS番号:208255-80-5)を添加して3日間培養した。

#### 【0100】

図12は、PDX1、NKX6.1、SOX9の発現量(mRNA)を定量的リアルタイムPCR法で解析した結果を示すグラフである。図12中、横軸のグレーの期間(S4D5~S4D6)は、AS1842856が培地に添加されていた期間を示す。また、「\*\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。その結果、AS1842856を添加して1日後(S4D6)には、PDX1、NKX6.1、SOX9のmRNAの発現量が大幅に減少するが、その後AS1842856を培地から除去して3日後(S5D3)には、これらの発現量が回復することが明らかとなった。同様の結果が胎生11.5日のマウス胚由来の膵組織の体外培養においても観察された。この結果は、AS1842856等のFOXO1阻害剤には、PDX1、NKX6.1、SOX9等の膵細胞としてのidentity維持に必須の遺伝子の発現量を下げることがあるが、当該阻害剤が除去されればこれらの発現は自然に回復することを示す。

#### 【0101】

図13は、S5D3におけるNGN3の発現量(mRNA)を定量的リアルタイムPCR法で解析した結果を示すグラフである。図13中、「\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。その結果、驚くべきことに、FOXO1阻害剤で1日間だけ処理した群(AS)では、陰性コントロール群(DMSO)と比べて、NGN3の発現量が約4~11倍にも増加することが明らかとなった。具体的には、585A1細胞では $3.9 \pm 1.2$ 倍、604B1細胞では $10.7 \pm 4.2$ 倍に増加していた。

#### 【0102】

続いて、上記のS5D3の膵オルガノイドに対し、FACS解析を行ってNGN3<sup>+</sup>細胞の割合を解析した。FACS解析の結果と定量化したグラフをそれぞれ図14、図15に示す。図15中、「\*\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。その結果、585A1細胞では、陰性対照群におけるNGN3<sup>+</sup>細胞の割合が $3.1 \pm 0.25\%$ であったのに対し、AS1842856処理群では $8.8 \pm 0.74\%$ となっており、NGN3<sup>+</sup>細胞の割合が2.8倍増加していた。また、604B1細胞では、陰性対照におけるNGN3<sup>+</sup>細胞の割合が $2.9 \pm 0.37\%$ であったのに対し、AS1842856処理群では $16.3 \pm 2.6\%$ となっており、NGN3<sup>+</sup>細胞の割合が5.8倍増加していた。

#### 【0103】

よって、膵内分泌細胞への分化工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞が生じた段階でAS1842856等のFOXO1阻害剤で一過性に処理すると、非処理群と比べてNGN3<sup>+</sup>細胞の割合が大幅に増加することが明らかとなった。

## 【0104】

図16は、S5D3における膵オルガノイドの顕微鏡写真である。図16中、「DMSO」はDMSO処理した対照細胞の結果であることを示し、「Transient AS」は一過性にAS1842856処理した結果であることを示す。スケールバーは100 $\mu$ mを示す。その結果、対照と、AS1842856を1日間のみ添加した場合で、細胞塊の大きさに顕著な差異は認められなかった。また、死細胞の割合にも差異は認められなかった。

## 【0105】

よって、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞が生じたステージでFOXO1を一過性に阻害すると、その後得られるNGN3<sup>+</sup>細胞の数が大幅に増加することが示唆された。

10

## 【0106】

続いて、AS1842856処理がNGN3の発現を刺激したか否かを検討するために、604B1細胞からNGN3-EGFPレポーター細胞を作製し、検討した。図17は、NGN3-EGFPレポーター細胞を分化誘導し、AS1842856処理した結果を示す顕微鏡写真である。

## 【0107】

その結果、一過性のFOXO1の阻害により、S5D3においてEGFP<sup>+</sup>細胞の数が顕著に増加したことが明らかとなった。FACSでソートしたEGFP<sup>+</sup>細胞1個当たりのNGN3 mRNAの量は、DMSO処理した対照細胞と、AS1842856処理した細胞との間で同一であった。図18は、EGFP<sup>+</sup>細胞1個当たりのNGN3 mRNAの量を示すグラフである。この結果は、FOXO1の阻害がNGN3の転写を促進しないことを示す。

20

## 【0108】

よって、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含むステージにおけるFOXO1一過性阻害は、NGN3<sup>+</sup>細胞数の増加を引き起こすことが確認された。

## 【0109】

NGN3遺伝子は、膵内分泌前駆細胞だけでなく、腸内分泌前駆細胞においても発現することが知られている。そこで、FOXO1一過性阻害によって増加したNGN3<sup>+</sup>細胞が、膵内分泌前駆細胞、腸内分泌前駆細胞のいずれであるかを検討することとした。

30

## 【0110】

585A1細胞由来のS4D5膵オルガノイドを、ソーティングによりglycoprotein 2(GP2)<sup>+</sup>膵内胚葉細胞とGP2<sup>-</sup>非膵細胞に分離した。図19は、S4D5におけるGP2<sup>+</sup>細胞の割合を示すFACS解析の結果である。図20は、S4D5におけるPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合を示すFACS解析の結果である。その結果、GP2<sup>+</sup>細胞の割合は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の割合と同程度であった。

## 【0111】

GP2<sup>+</sup>細胞及びGP2<sup>-</sup>細胞をソーティングで分離した後、各細胞を低吸着性のV底ウェルプレートに播種し、DMSO又はAS1842856で24時間処理した。翌日、GP2<sup>+</sup>細胞及びGP2<sup>-</sup>細胞はいずれも細胞塊を形成した。図21は各細胞塊の顕微鏡写真である。その結果、GP2<sup>+</sup>細胞、GP2<sup>-</sup>細胞のいずれにおいても、AS1842856処理群の方が、DMSO処理群と比べて細胞塊が大きかった(図21上段)。よって、AS1842856刺激により、GP2<sup>+</sup>細胞及びGP2<sup>-</sup>細胞の双方の増殖が促進されることが明らかとなった。

40

## 【0112】

しかしながら、EGFP<sup>+</sup>細胞の数及びNGN3遺伝子の発現量の上方制御は、S5D3のGP2<sup>+</sup>細胞塊のみで観察され、非膵細胞塊であるGP2<sup>-</sup>細胞塊では観察されなかった(図21下段)。

50

## 【0113】

図22は、各膵オルガノイドにおけるNGN3遺伝子の発現量を測定した定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。図22中、「\*」は、One-way ANOVA及びチューキーの検定の結果、 $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。グラフより、GP2<sup>-</sup>細胞と異なり、GP2<sup>+</sup>細胞では、AS1842856の一過性処理によりNGN3発現量が大幅に増加したことがわかる。

## 【0114】

さらに、FACS解析を行って、NGN3<sup>+</sup>細胞の数を計測した。図23は、各膵オルガノイドにおけるEGFP<sup>+</sup>細胞を観察した顕微鏡写真及びFACS解析の結果である。スケールバーは100µmである。図24は、各膵オルガノイドにおけるEGFP<sup>+</sup>細胞の割合を示すグラフである。図24中、「\*\*」は、One-way ANOVA及びチューキーの検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。グラフより、GP2<sup>+</sup>細胞をAS1842856で一過性処理すると、生じるNGN3<sup>+</sup>の数が大幅に増えることが明らかになった。一方で、GP2<sup>-</sup>細胞をAS1842856で一過性処理しても、生じるNGN3<sup>+</sup>細胞の数はほとんど増えないことも示された。

## 【0115】

この結果より、FOXO1の一過性阻害によって増加するNGN3<sup>+</sup>細胞は、腸内分泌前駆細胞ではなく、膵内分泌前駆細胞であることが示された。

## 【0116】

したがって、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含むステージにおけるFOXO1一過性阻害は、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞数の増加を引き起こすことが示された。

## 【0117】

## [実験例3]

(FOXO1の一過性阻害による、NGN3発現前の細胞(PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞細胞)の増殖促進)

多能性幹細胞から膵オルガノイドへの分化工程において、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の数が増える理由としては、(1)NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞自身の増殖促進、又は(2)NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞になる前の段階の細胞の増殖促進、のいずれかが考えられる。そこで、このいずれであるかを明らかにするために、まず、FOXO1一過性阻害が(1)NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の増殖に及ぼす影響を解析した。

## 【0118】

《NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞の増殖活性》

上記解析を行うために、まず、NGN3-EGFPレポーター細胞を分化誘導し、S4D6からS5D3まで、24時間ごとにFACS解析を行い、NGN3<sup>+</sup>細胞出現のタイムコースを解析した。図25は、EGFP<sup>+</sup>細胞の割合の変化を示すグラフである。図25中、「\*\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。グラフより、AS1842856処理群及び非処理群のいずれにおいても、EGFP<sup>+</sup>細胞は、S5D1の時点ではほとんど検出されず、S5D1以降S5D2にかけて出現し、その後S5D3に向かって増加することがわかった。AS1842856処理群におけるEGFP<sup>+</sup>細胞の割合は、S4D6、S5D1、S5D2、S5D3において、それぞれ $0.1 \pm 0.04\%$ 、 $0.3 \pm 0.08\%$ 、 $10.6 \pm 1.6\%$ 、 $25.3 \pm 4.2\%$ であった。

## 【0119】

図26は、NGN3を免疫染色し、FACS解析した結果を示すグラフである。その結果、EGFP<sup>+</sup>細胞中のNGN3<sup>+</sup>細胞の割合が、S5D2では $76.3 \pm 3.2\%$ であったものの、S5D3では $56.2 \pm 6.2\%$ に減少したことが明らかとなった。この結果は、EGFPの半減期がNGN3のそれよりも長いことと一致した。

## 【0120】

このように、EGFP<sup>+</sup>細胞はS5D1とS5D2の間で有意に増加したことから、NGN3<sup>+</sup>細胞自身の増殖能を評価するには、S5D1の後半の12時間細胞をEdUで標識し、S5D2にEdUを取り込んだ細胞（増殖期にあった細胞）を定量化すればよいことが明らかになった。図27は、EGFP<sup>+</sup>細胞のうち、EdUで標識された細胞の割合を解析したFACS解析の結果を示すグラフである。その結果、膵オルガノイド中のEGFP<sup>+</sup>細胞のうち、EdUで標識されたものは、AS1842856処理群、非処理群のいずれにおいても非常に少なく（約5%未満）、両者には統計的有意差がないことが明らかとなった。この結果は、NGN3<sup>+</sup>細胞は増殖活性が低く、FOXO1阻害剤で一過性処理しても当該増殖能に有意な変化は生じないことを示す。

【0121】

したがって、FOXO1の一過性阻害によるNGN3<sup>+</sup>細胞の細胞増殖促進効果はないことが示された。

【0122】

《NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞になる前の段階の細胞の増殖活性》

そこで、次に、S4D5の後半の12時間、細胞をEdUで標識し、S5D2に解析した。図28は、FACS解析の結果を示すグラフである。「\*\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。その結果、膵オルガノイド中のEGFP<sup>+</sup>細胞のうち、EdUで標識されたものは、AS1842856非処理群では $35.4 \pm 2.4\%$ だが、AS1842856一過性処理群では $61.1 \pm 11.1\%$ にまで増加することが明らかになった。よって、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞を生じる細胞であって、S4D5の後半に存在する細胞の増殖活性が、FOXO1一過性阻害によって顕著に促進されることが明らかになった。

【0123】

膵内分泌細胞分化系譜において、NGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞は、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞に由来する。また、実施例で使用した6ステージからなる多段階分化誘導法では、ステージ4はPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞を生じる工程である。さらに、ステージ4におけるGP2<sup>+</sup>細胞集団はPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞集団とほぼ同一であり、実験例2では、GP2<sup>+</sup>細胞の増殖がAS1842856の一過性処理によって促進されることが確認された（図21上段、図22）。

【0124】

これらのことから、AS1842856一過性処理によってNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞数が増えたのは、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞の増殖が促進されて該細胞の数が増えたためと考えられる。

【0125】

以上の結果より、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を含むステージでFOXO1を一過性に阻害すると、該細胞の増殖が顕著に促進されるため、得られるNGN3<sup>+</sup>膵内分泌前駆細胞数が大幅に増加することが明らかになった。

【0126】

[実験例4]

（FOXO1の阻害による、Wntシグナル伝達の活性化（Notch活性には影響なし））

HES1の発現がMyoD及びNGN3の発現を抑制し、筋及び膵内分泌細胞の分化を阻害することが知られている。筋分化においては、FOXO1及びNotch-ICが協調してHES1の発現を上昇させることが知られている。

【0127】

しかしながら、AS1842856による24時間処理は、S4D6におけるHES1の発現を変化させないことが明らかとなった。一方、AS1842856処理に続く3日間のDAPT処理が、S5D3におけるHES1の発現を有意に減少させることが明らかとなった。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 8 】

図 29 は、定量的リアルタイム PCR の結果を示すグラフである。図 29 中、「\*\*」は、One - way ANOVA 及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示し、「NS」は、有意差がないことを示す。

## 【 0 1 2 9 】

図 30 は、S4D5 から 24 時間、各試薬で処理した後、Wnt が標的とする遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR で解析した結果を示すグラフである。Wnt が標的とする遺伝子として、AXIN2、TCF - 1、LEF - 1 の発現を検討した。図 30 中、「DMSO」は DMSO で処理した結果であることを示し、「AS」は AS1842856 で処理した結果であることを示し、「AS + Wnt inhibitor」は AS1842856 及び Wnt シグナル阻害剤で処理した結果であることを示し、「CHIR」は Wnt シグナル活性化剤である CHIR99021 (CAS 番号：252917 - 06 - 9) で処理した結果であることを示す。Wnt シグナル阻害剤としては、XAV939 (CAS 番号：284028 - 89 - 3) を PKF118 - 310 (CAS 番号：84 - 82 - 2) と混合して使用した。また、「\*」は、One - way ANOVA 及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

## 【 0 1 3 0 】

その結果、AXIN2 及び LEF - 1 の発現の増加は、Wnt シグナル阻害剤である XAV939 及び PKF118 - 310 の培地への添加により抑制された。しかしながら、Wnt シグナル阻害剤を培地に添加しても、TCF - 1 の発現の増加は抑制されなかった。

## 【 0 1 3 1 】

図 31 は、S4D5 から 24 時間、各試薬で処理した後、S5D3 に NGN3 遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR で解析した結果を示すグラフである。図 31 中、「DMSO」、「AS」、「AS + Wnt inhibitor」、「CHIR」は図 30 におけるものと同様である。また、「\*」は、One - way ANOVA 及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

## 【 0 1 3 2 】

また、図 32 は、NGN3 - EGFP レポーター細胞を分化誘導し、S4D5 から 24 時間、各試薬で処理した後、S5D3 に FACS 解析により EGFP<sup>+</sup> 細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。図 32 中、「DMSO」、「AS」、「AS + Wnt inhibitor」、「CHIR」は図 30 におけるものと同様である。また、「\*」は、One - way ANOVA 及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

## 【 0 1 3 3 】

その結果、特筆すべきことに、NGN3 の発現の増加は Wnt シグナル阻害剤により有意に抑制された。この結果は、AS1842856 の効果が Wnt シグナルの活性化により媒介されていることを示す。このことは、図 30、図 31 に示すように、CHIR99021 により一過性に Wnt シグナルを活性化し、それに続いて DAPT 処理することにより、S4D6 で Wnt が標的とする遺伝子の発現を上方制御し、S5D3 で NGN3 の発現を上方制御したことによっても裏付けられた。これらの結果は、FOXO タンパク質及び TCF / LEF 転写因子が、競合的な - カテニン結合タンパク質であることと一致する。

## 【 0 1 3 4 】

図 33 は、FOXO1 が標的とする遺伝子である PDK4 及び HBP1 の発現を、定量的リアルタイム PCR で解析した結果を示すグラフである。図 33 中、「DMSO」、「AS」、「AS + Wnt inhibitor」、「CHIR」は図 30 におけるものと同様である。また、「\*\*」は、One - way ANOVA 及びテューキーの検定の

結果、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

【0135】

その結果、FOXO1が標的とする遺伝子であるPDK4及びHBP1の発現は、S4D6において、AS1842856によってもCHIR99021によっても有意に減少した。

【0136】

更に発明者らは、上記と同様のFOXO1及びWntの反対の効果が、マウスの膵臓の器官形成においても認められることを見出した。図34は、胎生11.5日のマウス胚由来の膵組織の体外培養において、AXIN2及びHBP1の発現を、定量的リアルタイムPCRで解析した結果を示すグラフである。図34中、「DMSO」、「AS」、「AS+Wnt inhibitor」、「CHIR」は図30におけるものと同様である。また、「\*」は、One-way ANOVA及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

10

【0137】

その結果、AS1842856処理によりAXIN2の発現が上昇し、この上昇がXAV939及びPKF118-310処理により抑制された。更に、CHIR99021によりWntシグナルを活性化するとHBP1の発現が抑制された。

【0138】

続いて、AS1842856処理による細胞増殖効果が、Wntシグナル活性化に媒介されていることを確認するために、S4D5細胞をEdUで12時間標識し、解析した。図35は、FACS解析によりEdU<sup>+</sup>細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。図35中、「DMSO」、「AS」、「AS+Wnt inhibitor」、「CHIR」は図30におけるものと同様である。また、「\*」は、One-way ANOVA及びテューキーの検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

20

【0139】

その結果、CHIR99021処理によっても、AS1842856処理と同程度にEdU標識された細胞が増加したことが明らかとなった。EdU<sup>+</sup>細胞の割合は、対照細胞で $37.5 \pm 1.7\%$ であり、AS1842856処理した細胞で $51.3 \pm 2.5\%$ であり、CHIR99021処理した細胞で $59.4 \pm 5.9\%$ であった。また、XAV939及びPKF118-310処理によりWntシグナルを阻害すると、細胞増殖に関するAS1842856処理の効果が阻害され、EdU<sup>+</sup>細胞の割合は、 $24.1 \pm 7.7\%$ となった。

30

【0140】

[実験例5]

(FOXO1の一過性阻害を経て製造された膵オルガノイドの性状解析)

FOXO1を一過性に阻害して得られた、最終的な膵オルガノイドの性状解析を行った。

【0141】

免疫染色の結果、AS1842856処理により得られた膵オルガノイドは、主にSynaptophysin<sup>+</sup>膵内分泌細胞及びCK19<sup>+</sup>管細胞であり、Trypsin<sup>+</sup>膵外分泌細胞はほとんど認められなかった。

40

【0142】

期待される通り、FOXO1の一過性の阻害は、膵内分泌細胞の数を顕著に増加させた。図36は、各膵オルガノイドのFACS解析により、Insulin(INN)<sup>+</sup>Glucagon(GCG)<sup>+</sup>細胞、INS<sup>+</sup>GCG<sup>+</sup>細胞、INS<sup>-</sup>GCG<sup>+</sup>細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。図36中、「\*」は、スチューデントのt検定の結果、 $p < 0.05$  で有意差が存在することを示し、「\*\*」は、 $p < 0.01$  で有意差が存在することを示す。

50



## 【 0 1 4 3 】

図 3 6 に示されるように、 $INS^+$ 細胞の割合は、5 8 5 A 1 細胞で  $4.3 \pm 1.8\%$  であり、6 0 4 B 1 細胞で  $12.5 \pm 2.5\%$  にも増加していた。また、 $GCG^+$ 細胞の割合は、5 8 5 A 1 細胞で  $8.8 \pm 2.7\%$  であり、6 0 4 B 1 細胞で  $25.3 \pm 7.3\%$  であった。よって、 $FOXO1$  の一過性阻害により、 $INS^+GCG^-$ 細胞、 $INS^+GCG^+$ 細胞、 $INS^-GCG^+$ 細胞の全ての内分泌細胞サブポピュレーションが有意に増加したことが明らかとなった。

## 【 0 1 4 4 】

続いて、AS 1 8 4 2 8 5 6 処理により得られた膵オルガノイドをNRGマウスの腎被膜下に移植した。図 3 7、図 3 8 は、S 6 オルガノイドを移植してから2ヶ月後の免疫組織化学染色の結果を示す写真である。スケールバーは  $100 \mu m$  である。「\*」はマウス腎実質を示す。

10

## 【 0 1 4 5 】

その結果、膵オルガノイドは主に  $GCG^+$ 細胞となり、ヒト膵発生と同様に単ホルモン細胞になったことが明らかとなった。

## 【 0 1 4 6 】

また、図 3 8 に示すように、 $CK19$  を発現する管構造とトリプシン<sup>+</sup>原始腺房細胞が観察された。この結果は、AS 1 8 4 2 8 5 6 処理により得られた膵オルガノイドに膵上皮前駆細胞が含まれていることを示す。

20

## 【 0 1 4 7 】

よって、膵内分泌細胞への分化誘導工程において、 $PDX1^+NKX6.1^+$ 細胞を含むステージで  $FOXO1$  を一過性に阻害しても、正常な膵発生で生じる膵内分泌細胞と同様の分化能力を有する膵内分泌細胞が得られることが示された。

## 【 0 1 4 8 】

## [ 実験例 6 ]

(  $FOXO1$  の一過性阻害と  $Notch$  シグナル阻害による効果の比較 )

実験例 1 で得た S 4 D 5 の膵オルガノイドの培地 ( 上記表 1 の S 4 D 2 ~ 6 の培地 ) に、 $FOXO1$  阻害剤である AS 1 8 4 2 8 5 6 ( CAS 番号 : 8 3 6 6 2 0 - 4 8 - 5 ) 又はジメチルスルホキシド ( DMSO ) を添加し、S 4 D 6 までの1日間培養した。

## 【 0 1 4 9 】

その後、DAPT ( CAS 番号 : 2 0 8 2 5 5 - 8 0 - 5 ) を含む、又は含まない培地 ( 上記表 1 の S 5 D 0 ~ 3 の培地 ) で2日間培養し、定量的リアルタイムPCR解析により  $NGN3$  の発現量を解析した。

30

## 【 0 1 5 0 】

図 3 9 は、定量的リアルタイムPCR解析の結果を示すグラフである。図 3 9 中、「AS DAPT」はAS処理後DAPT処理した群の結果であることを示し、「AS DMSO」はAS処理したがDAPT処理しなかった群の結果であることを示し、「DMSO DAPT」はAS処理せずにDAPT処理した群の結果であることを示し、「DMSO DMSO」はAS処理もDAPT処理も行わなかった群の結果であることを示す。

## 【 0 1 5 1 】

その結果、 $NGN3$  の発現量は、AS・DAPT処理を両方行った群 ( AS DAPT ) で最も高かったが、AS処理のみを行った群 ( AS DMSO ) においても非常に高く、AS・DAPT非処理群 ( DMSO DMSO ) と比べて約8倍にも増加していた。さらに、AS処理のみを行った群は、DAPT処理のみ行った群 ( DMSO DAPT ) と比較しても、 $NGN3$  の発現量が約3倍に増加していた。すなわち、ステージ5でDAPT処理するよりも、ステージ4で一過性にAS処理した方が、 $NGN3$  の発現量が大幅に増加することが示された。

40

## 【 0 1 5 2 】

多段階分化誘導法では、ステージ5においてDAPT処理することが一般的に行われているが、それに先立って  $FOXO1$  阻害剤で一過性に処理することにより、 $NGN3$  の

50

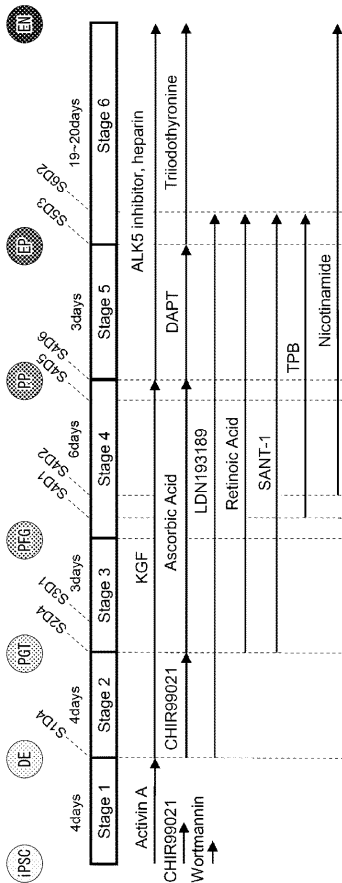
発現量がこれほどまでに顕著に増加することは驚くべき結果である。

【産業上の利用可能性】

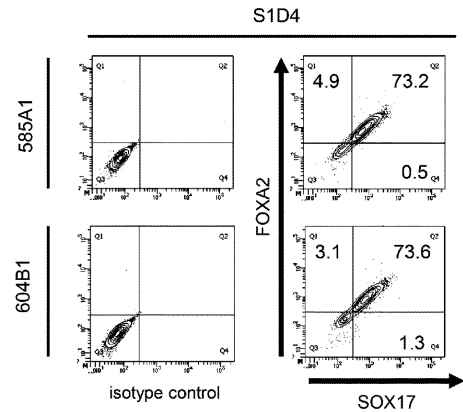
【0153】

本発明によれば、非常に簡単な操作でPDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>膵内胚葉細胞を大幅に増殖させる技術を提供することができ、ひいては、従来よりも多くの膵内分泌細胞を簡便に得る技術を提供する。

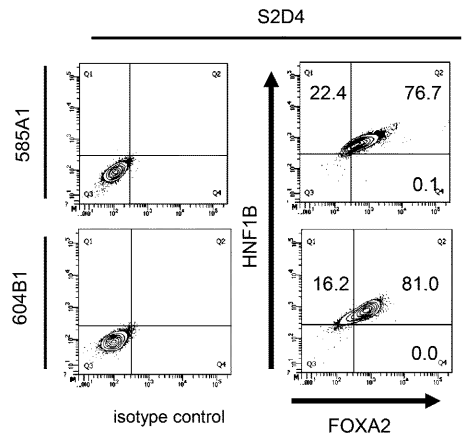
【図1】



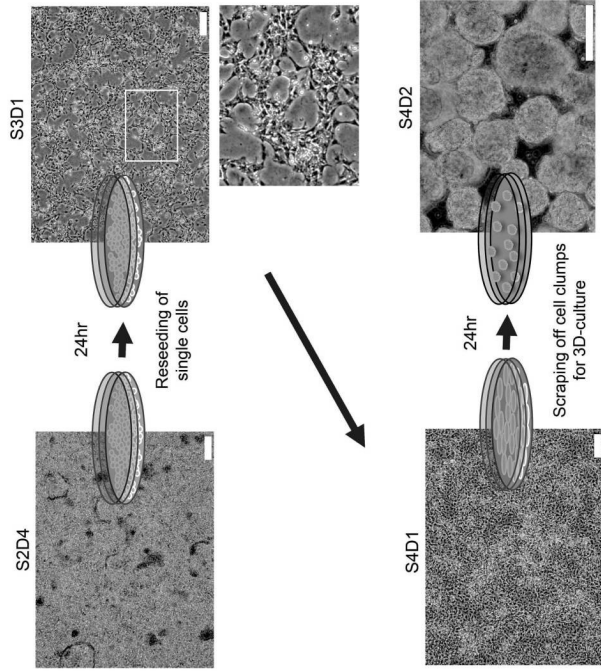
【図2】



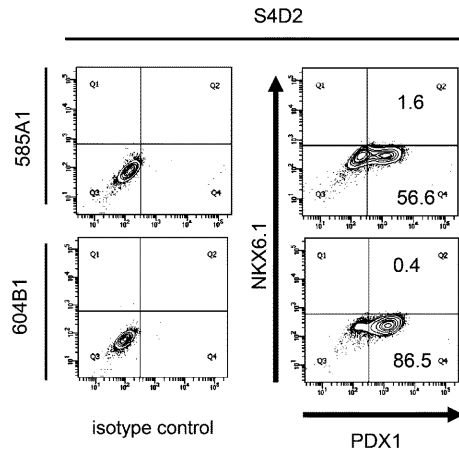
【図3】



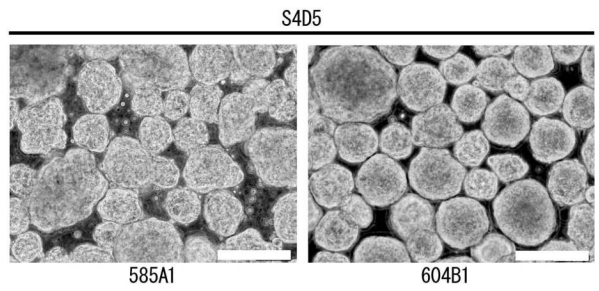
【 図 4 】



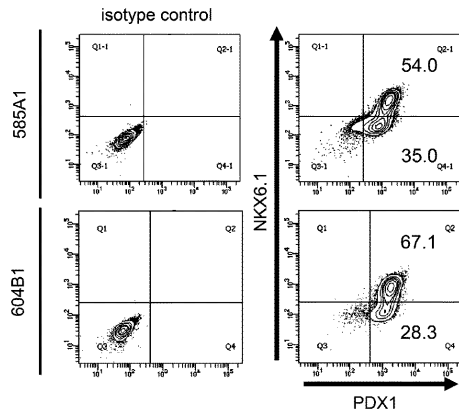
【 図 5 】



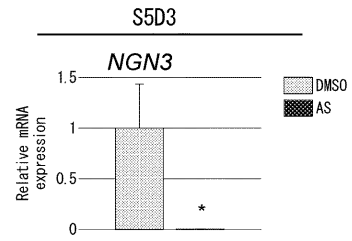
【 図 6 】



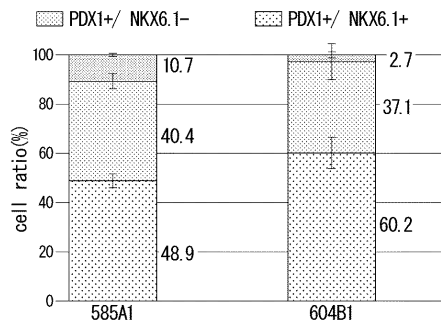
【 図 7 】



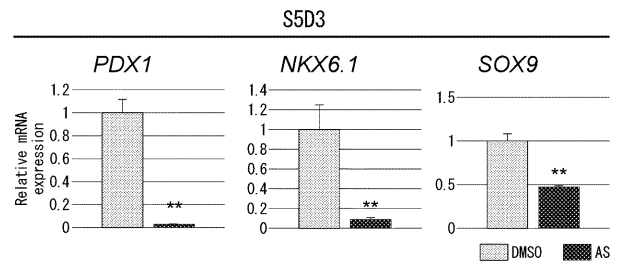
【 図 9 】



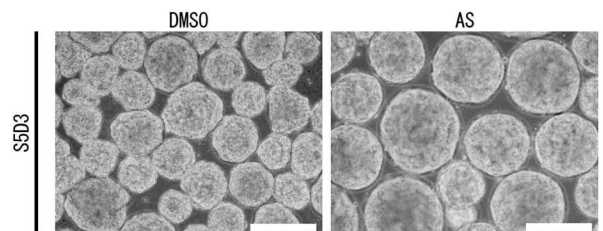
【 図 8 】



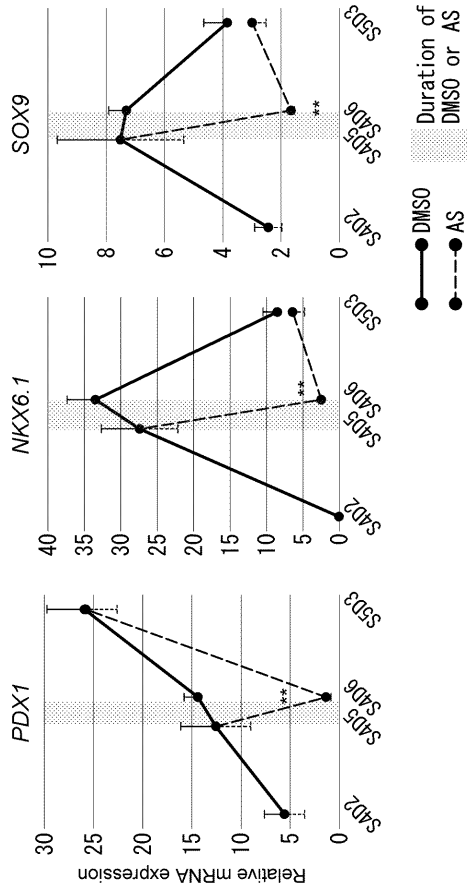
【 図 10 】



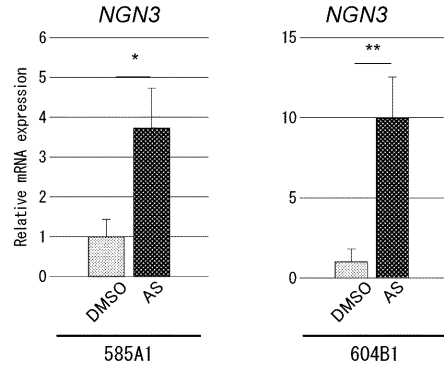
【 図 11 】



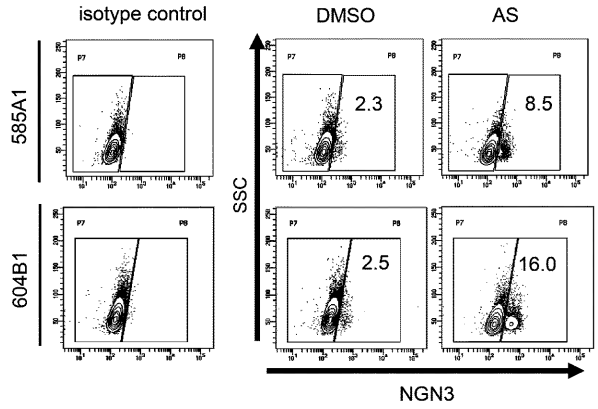
【 1 2 】



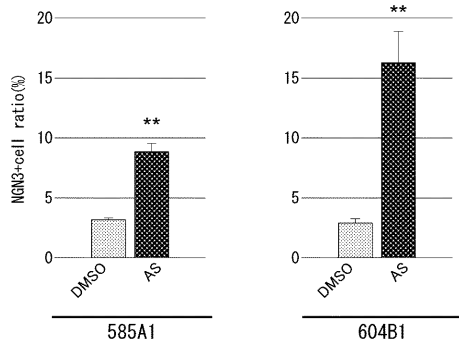
【 1 3 】



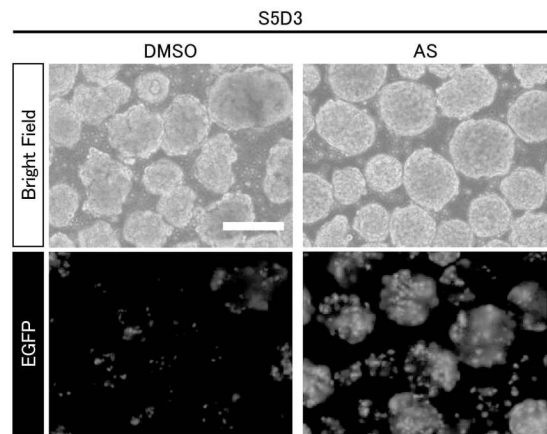
【 1 4 】



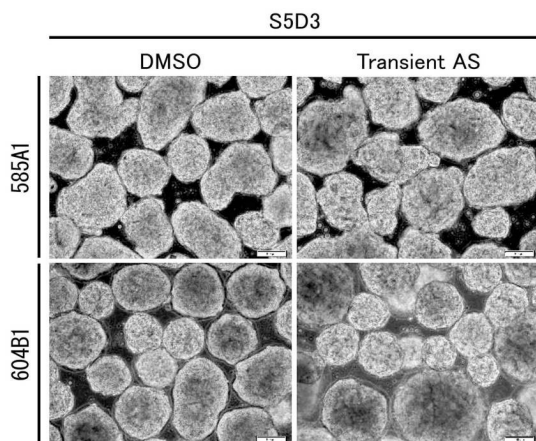
【 1 5 】



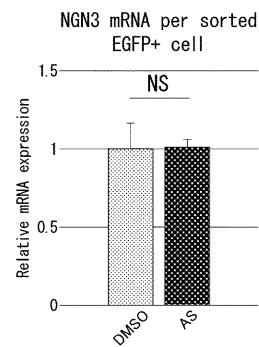
【 1 7 】



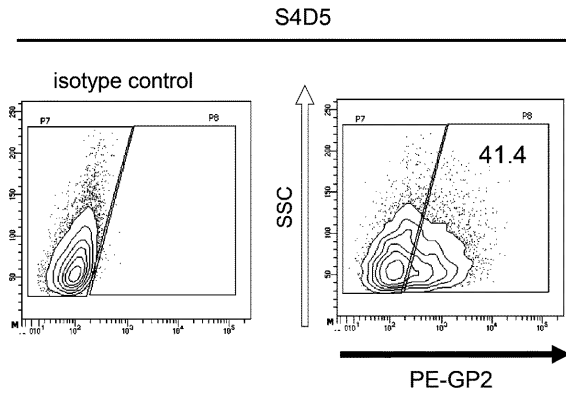
【 1 6 】



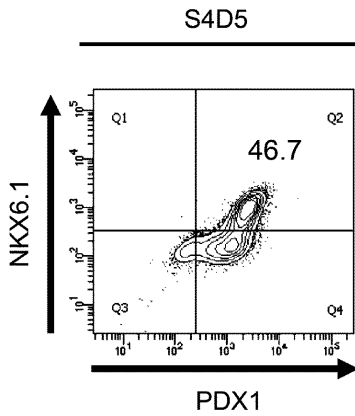
【 1 8 】



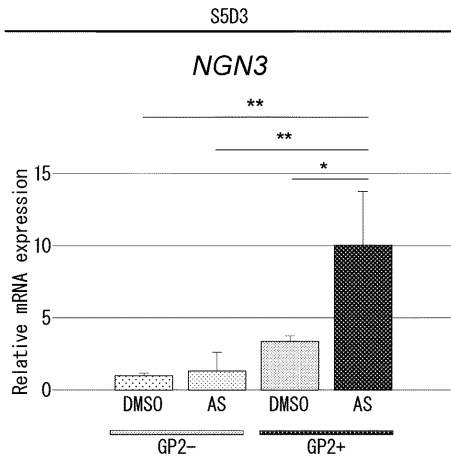
【 図 1 9 】



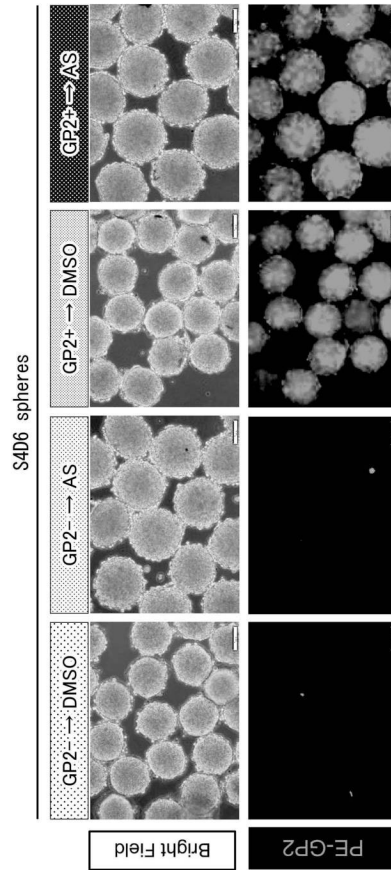
【 図 2 0 】



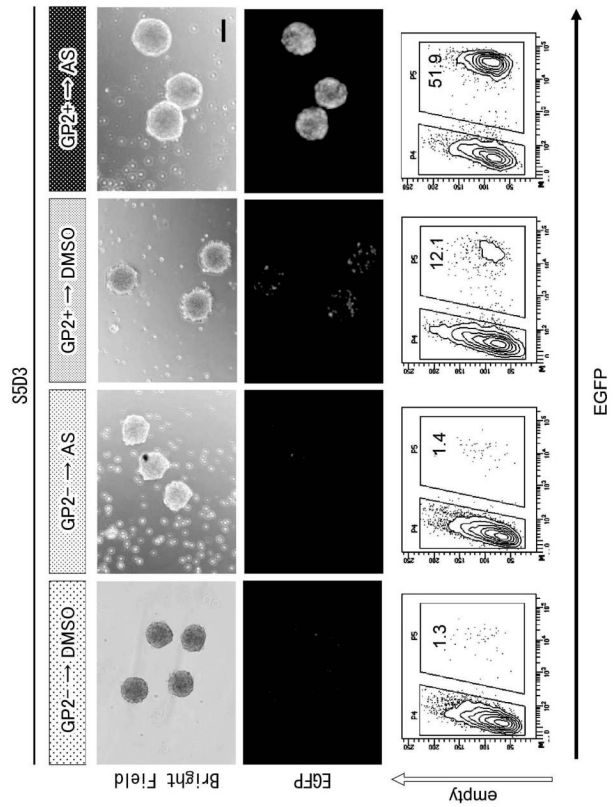
【 図 2 2 】



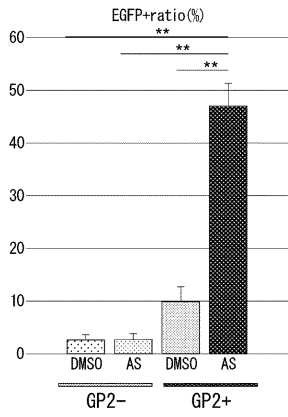
【 図 2 1 】



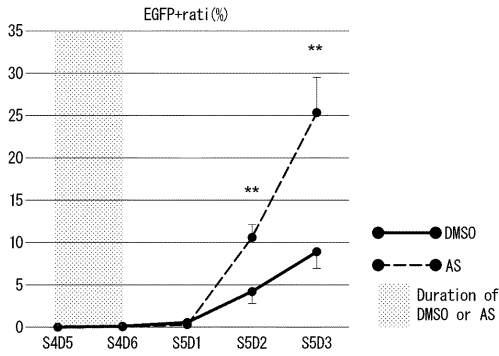
【 図 2 3 】



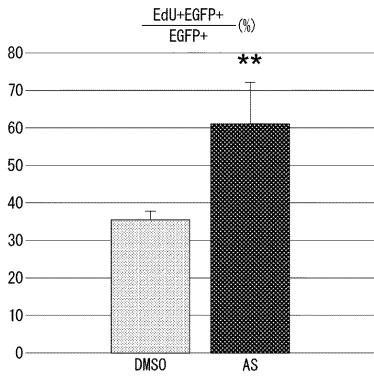
【 図 2 4 】



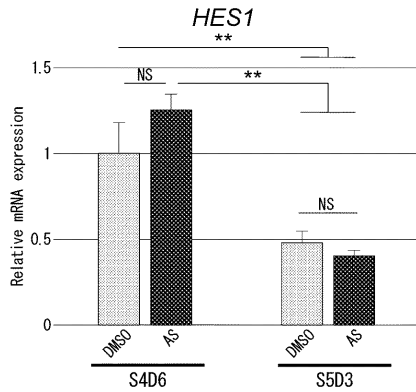
【 図 2 5 】



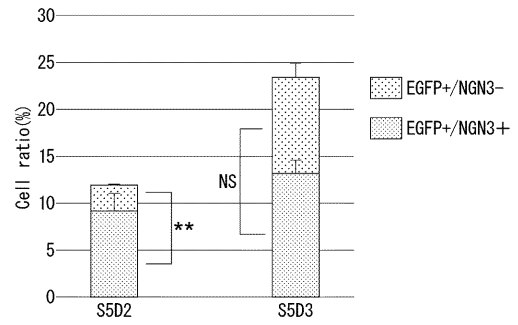
【 図 2 8 】



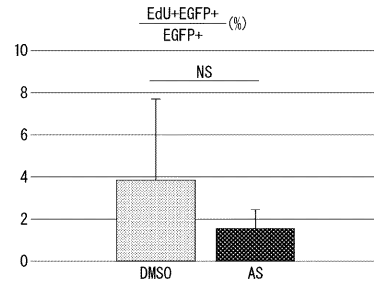
【 図 2 9 】



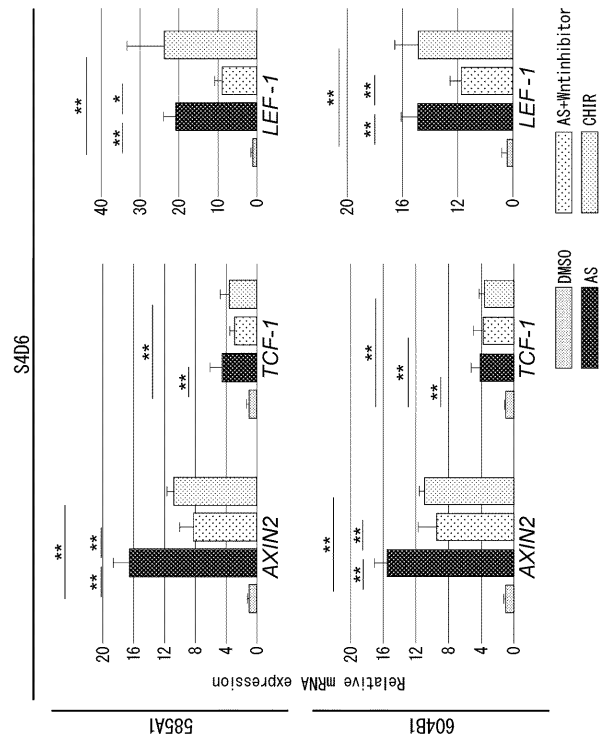
【 図 2 6 】



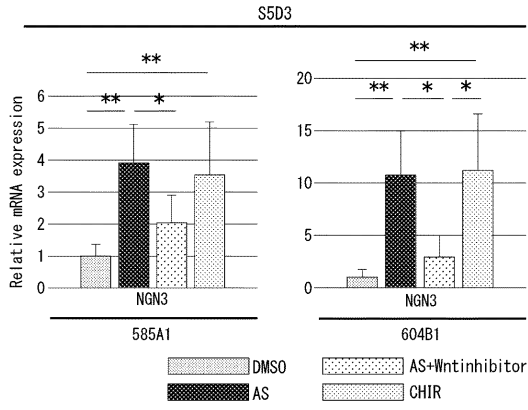
【 図 2 7 】



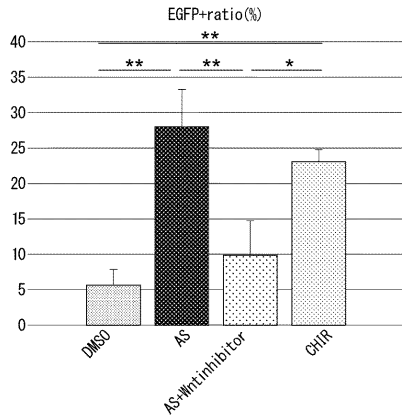
【 図 3 0 】



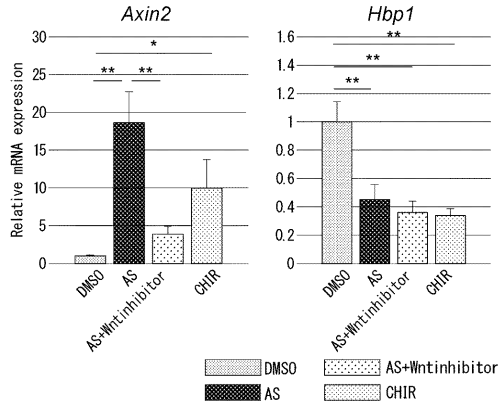
【 3 1 】



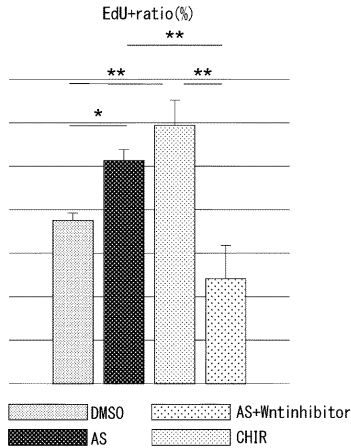
【 3 2 】



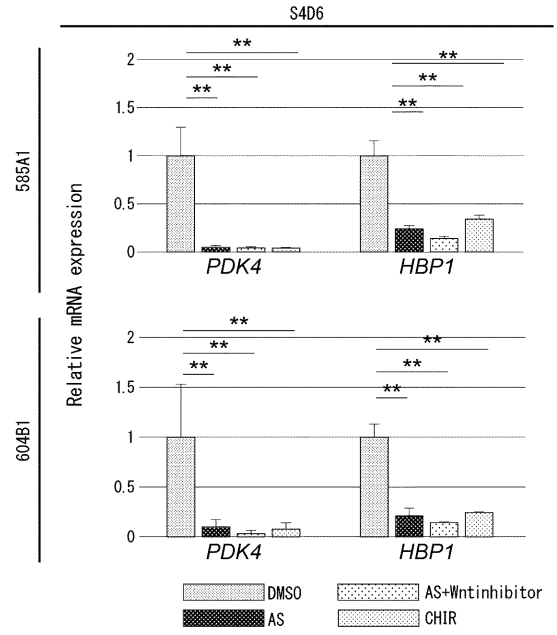
【 3 4 】



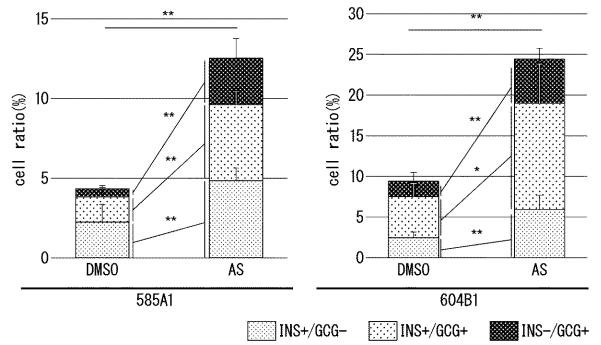
【 3 5 】



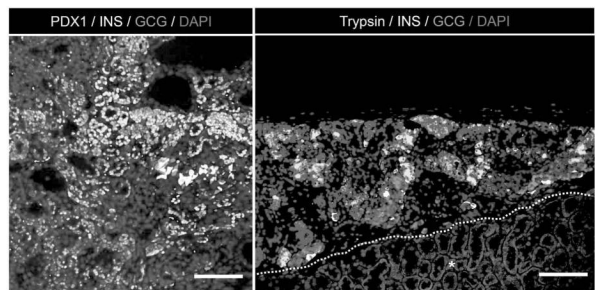
【 3 3 】



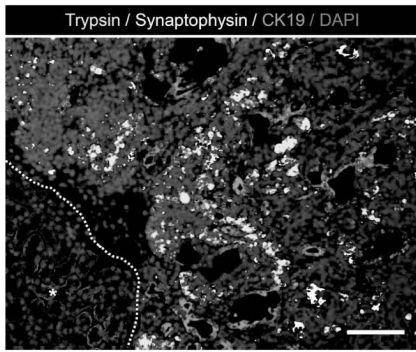
【 3 6 】



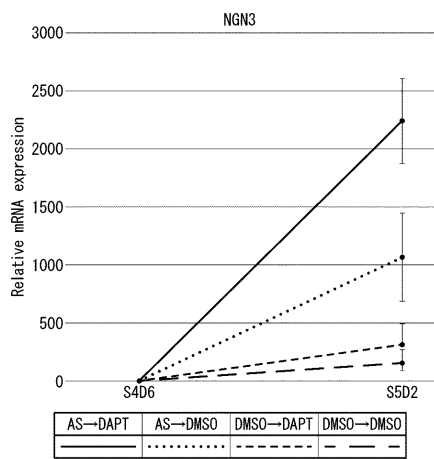
【 3 7 】



【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



【 配列表 】

202111218500001.app



---

フロントページの続き

(72)発明者 川口 義弥

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 佐々木 勉

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

Fターム(参考) 4B029 AA02 AA14 BB11 CC02

4B065 AA93X AB01 AC12 BA02 BB13 CA46