

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2017年3月23日(23.03.2017)

(10) 国際公開番号

WO 2017/047797 A1

(51) 国際特許分類:  
*C12N 5/0735* (2010.01)    *C12N 5/10* (2006.01)田阪急ビルオフィススタワー青山特許事務所  
Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/077564

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

(22) 国際出願日: 2016年9月16日(16.09.2016)

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:

(26) 国際公開の言語: 日本語

— 國際調査報告(条約第21条(3))

(30) 優先権データ:  
特願 2015-185662 2015年9月18日(18.09.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 長船 健二(OSAFUNE, Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 豊田 太郎(TOYODA, Taro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 木村 東(KIMURA, Azuma); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 鮫島 瞳, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅



(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PANCREATIC BUD CELLS

(54) 発明の名称: 腺芽細胞の製造方法

(57) Abstract: Provided is a method for producing pancreatic bud cells, including a step for culturing PDX1-positive NKX6.1-negative cells in a medium including a KGF, EGF, and BMP inhibitor and an Akt inhibitor. This culturing step may be performed by adhesion culturing. The PDX1-positive NKX6.1-negative cells can be induced *in vitro* from pluripotent stem cells, and the method according to the present application makes it possible to produce pancreatic bud cells from pluripotent stem cells.

(57) 要約: PDX1陽性NKX6.1陰性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、腺芽細胞の製造方法を提供する。当該培養工程は、接着培養によって行われても良い。PDX1陽性NKX6.1陰性細胞は多能性幹細胞からインビトロで誘導することができ、本願方法によって多能性幹細胞から腺芽細胞の製造が可能となる。

## 明 細 書

### 発明の名称：臍芽細胞の製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、臍芽細胞の製造方法および同方法によって製造された臍芽細胞を含む臍疾患治療剤に関する。本願はさらに、当該臍芽細胞を用いる臍疾患の治療法に関する。

#### 背景技術

[0002] 脇臓は、脇リパーゼ、トリプシン、エラスターーゼ、脇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、脇ポリペプチド（PP）等の脇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脇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。この脇ホルモンは、脇臓の中の $\alpha$ 細胞、 $\beta$ 細胞、 $\delta$ 細胞およびPP細胞の4種の細胞からなる脇島と呼ばれる細胞塊により產生されている。

[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、脇臓でのグルカゴン、インスリン等の種々のホルモン分泌を抑制する。PPは、食物摂取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、食物摂取を抑制し、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 型糖尿病に罹患している。
- [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  $\beta$  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、臍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、移植可能な臍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 型糖尿病の治療法として、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、誘導したインスリン産生細胞を患者の生体内に移植することが検討されている。インスリン産生細胞は例えば、患者の臍管上皮由来細胞を体外に取り出して分化させる等により得ることができる。
- [0008] インスリン産生細胞を得る他の方法としては、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が例示される（特許文献 1、非特許文献 1 から 5）。さらに、多能性幹細胞へ PDX1 を導入して培養する方法（特許文献 2 および特許文献 3）、低分子化合物を適宜組み合わせて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 および非特許文献 6）が知られている。しかしながらこのように *in vitro* で得られたインスリン産生細胞を生体内に投与して、グルコース応答能を獲得したという報告は無い。一方、臍前駆細胞を製造し、生体内に投与した場合において、投与した細胞からグルコース濃度に応じてインスリンが分泌され

たとの報告がある（非特許文献7および非特許文献8）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0009] 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

[0010] 非特許文献1：E.Kroon et al., Nature Biotechnology(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.Maehr 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

非特許文献7：Kroon E et al., Nat Biotechnol. (2008) vol. 26, No. 4:443-452

非特許文献8：Rezania A et al., Diabetes. (2012) vol. 61, No. 8:2016-2029.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 一の態様において、本願はPDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞を分化誘導する方法を提供することを目的とする。より具体的には、多能性幹細胞から誘導したPDX1陽性NKX6.1陰性細胞をさらに分化する工程を含み、臍芽細胞を分化誘導する方法を提供することを目的とする。

他の態様において、臍臓疾患治療剤、並びに臍臓疾患治疗方法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

[0012] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、PDX1陽性NKX6.1陰性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地中で培養することで臍芽細胞を効率よく分化誘導できることを初めて見出した。さらに、Akt阻害剤は、PDX1陽性細胞を特異的に増殖する機能を有することを初めて見出した。本発明はそのような知見を基にして完成されたものである。

[0013] すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

[1] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、臍芽細胞の製造方法。

[2] 前記培養が、接着培養条件下で行われる、[1]に記載の方法。

[3] 前記Akt阻害剤が、AT7867である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記PDX1陽性NKX6.1陰性細胞が、次の2つの工程を含む方法で多能性幹細胞より製造された細胞である、[1]から[3]のいずれか1項に記載の方法：

- (1) 多能性幹細胞を、アクチビンを含む培地で培養する工程、および
- (2) 工程(1)で得られた細胞を、KGFを含む培地で培養する工程。

[5] 前記工程(1)が、アクチビンおよびGSK3阻害剤を含む培地で培養した後、GSK3阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する工程である、[4]に記載の方法。

[6] 前記工程(2)が、さらに、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、[4]または[5]に記載の方法。

[7] 前記工程(2)が、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養した後、細胞を解離し、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で接着培養する工程を含む、[6]に記載の方法。

[8] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、[1]から[7]のいずれか

1 項に記載の方法。

[9] 前記GSK3阻害剤が、CHIR99021である、[5]から[8]のいずれか1項に記載の方法。

[10] 前記レチノイン酸誘導体が、TTNPBである、[6]から[9]のいずれか1項に記載の方法。

[11] 前記ヘッジホッグ経路阻害剤が、KAAD-シクロパミンである、[6]から[10]のいずれか1項に記載の方法。

[12] 前記臍芽細胞がPDX1陽性およびNKX6.1陽性である[1]から[1]のいずれか1項に記載の方法。

[13] 前記臍芽細胞が、ヒト細胞である、[1]から[12]のいずれか1項に記載の方法。

[14] 以下の工程(i)から(iii)を含む、多能性幹細胞から臍芽細胞を製造する方法：

(i) 多能性幹細胞を、アクチビンを含む培地で培養する工程、

(ii) 工程(i)で得られた細胞を、KGFを含む培地で培養する工程、

(iii) 工程(ii)で得られた細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程。

[15] 前記培養が、接着培養条件下で行われる、[14]に記載の方法

。

[16] 前記工程(i)が、アクチビンおよびGSK3阻害剤を含む培地で培養した後、GSK3阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する工程である、[14]または[15]に記載の方法。

[17] 前記工程(ii)が、さらに、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、[14]または[16]のいずれか1項に記載の方法。

[18] 前記工程(ii)が、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養した後、細胞を解離し、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で接

着培養する工程を含む、[17]に記載の方法。

[19] 前記Akt阻害剤が、AT7867である、[14]から[18]のいずれか1項に記載の方法。

[20] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、[14]から[19]のいずれか1項に記載の方法。

[21] 前記GSK3阻害剤が、CHIR99021である、[16]から[20]のいずれか1項に記載の方法。

[22] 前記レチノイン酸誘導体が、TTNPBである、[17]から[21]のいずれか1項に記載の方法。

[23] 前記ヘッジホッグ経路阻害剤が、KAAD-シクロパミンである、[17]から[22]のいずれか1項に記載の方法。

[24] 前記臍芽細胞が、PDX1陽性およびNKX6.1陽性である[14]から[23]のいずれか1項に記載の方法。

[25] 前記臍芽細胞が、ヒト細胞である、[14]から[24]のいずれか1項に記載の方法。

[26] PDX1陽性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、PDX1陽性細胞の増殖方法。

[27] 前記培養が、接着培養条件下で行われる、[26]に記載の方法。

[28] 前記Akt阻害剤が、AT7867である、[26]または[27]に記載の方法。

[29] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、[26]から[28]のいずれか1項に記載の方法。

## 発明の効果

[0014] 本発明によってPDX1陽性NKX6.1陰性細胞から効率良く臍芽細胞へ誘導することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、多能性幹細胞から臍芽細胞を製造するプロトコールの概略図を

示す。

[図2]図2は、各濃度のAT7867を第3工程（stage 3）にて添加した場合に得られた細胞数を計測した結果を示す。

[図3]図3は、第3工程（stage 3）の各日数におけるPDX1陽性細胞（左図）、PDX1陽性Ki67陽性細胞（中央図）およびPDX1陰性Ki67陽性細胞（右図）の含有率を示す。

[図4A]図4Aは、第3工程（stage 3）後のNKX6.1抗体の免疫染色像（上図）および核染色像（下図）を示す。白色が染色部分を示す。

[図4B]図4Bは、各濃度のAT7867を用いた場合のNKX6.1陽性細胞の含有率を示す。

[図5]図5Aは、第3工程（stage 3）後のPDX1抗体およびNKX6.1抗体を用いて染色した細胞群のフローサイトメトリーの結果を示す。図5Bは、当該フローサイトメトリーの結果から得られたPDX1陽性NKX6.1陰性細胞およびPDX1陽性NKX6.1陽性細胞の含有率を示す。

[図6]図6は、第3工程（stage 3）開始から終了までの期間（0-4日目）において、毎日定量PCRを行い、PDX1、PTF1AおよびNKX6.1の発現量を測定した結果を示す。実線はAT7867、点線は対照群であるDMSOを添加した場合の遺伝子発現量の推移を表す。

### 発明を実施するための形態

[0016] 本願の一つの態様として、PDX1陽性NKX6.1陰性細胞をKGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、臍芽細胞を製造する方法を提供する。

[0017] 臍芽細胞とは、内分泌細胞、臍管細胞および外分泌細胞などの臍臓を形成する細胞へと分化誘導できる細胞であり、少なくともPDX1およびNKX6.1が発現している細胞が例示される。このほかにも、SOX9、またはGATA4などの遺伝子マーカーが発現している細胞であっても良い。

[0018] 本態様によって製造される臍芽細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された集団であってもよい。好ましくは、30

%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上または80%以上の臍芽細胞が含まれる細胞集団である。

- [0019] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞を製造するにあたり、当該PDX1陽性NKX6.1陰性細胞は、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で接着培養しても良い。
- [0020] 本願明細書及び請求の範囲において接着培養とは、コーティング処理された培養皿にて培養することである。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD Biosciences)、Synthemax (Corning)、ゼラチン、細胞外タンパク質（例えば、コラーゲン、ラミニン（例えば、ラミニン111、411または511）、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン等）、または当該細胞外タンパク質の断片、およびこれらの組み合わせが挙げられる。
- [0021] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞を製造するにあたり、取扱いの簡便さから接着培養にて行なうことが好ましいが、細胞凝集塊を形成した浮遊培養を行ってもよい。
- [0022] 浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態で培養することである。特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、または、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) または2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体 (Lipidure) によるコーティング処理）したものを使用して行なうことができる。
- [0023] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞の培養工程に使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へKGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を適宜添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、MEM Zinc Option培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's

培地、およびこれらの混合培地などが含まれる。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清（FBS））が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、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、3'-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 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。1つの実施形態において、基礎培地は、B27サプリメントを含むIMEM Zinc Option培地である。

[0024] Akt阻害剤は、Aktの活性を抑制する薬物であればよく、例えば、Merck Millipore社のAkt Inhibitor (Akt Inhibitor、Akt Inhibitor II～XIII)、MK-2206、Perifosine (KRX-0401)、GSK690693、AT7867、Ipatasertib (GDC-068)、AZD5363、SC79、Afuresertib (GSK2110183)、AT13148、TIC10、Triciribine、CCT128930、PHT-427、Palomid 529、PF-04691502、Honokiol、Miltefosine、Deguelin、A-674563、sc-221226、抗Akt抗体、Aktのドミナントネガティブ変異体等が挙げられる。これらの薬物は市販されているか、公知の技術に基づいて適宜製造することができる。

[0025] Akt阻害剤としてAT7867を用いる場合、その濃度は、0.01 μMから4 μM、好ましくは、0.1 μMから1 μM、より好ましくは、0.5 μMである。

[0026] KGFは、Keratinocyte Growth Factorと呼ばれるタンパク質であり、FGF-7と呼ばれることがある。KGFは、R&D systems社等の市販されているものを使用することができる。KGFの濃度は、1 ng/mlから1 μg/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200 ng/mlである。

[0027] 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。EGFは、R&D systems社等の市販されているものを使用することが

できる。EGFの濃度は、1 ng/mlから1 μg/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。

- [0028] 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-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)、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-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline) が例示される。好ましくは、Nogginである。Nogginは、Protech社等の市販されているものを使用することができる。
- [0029] BMP阻害剤としてLDN-193189を用いる場合、その濃度は、0.01 μMから5 μM、好ましくは、0.1 μMから1 μM、より好ましくは、0.2 μMである。
- [0030] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞の培養工程に使用される培地は、さらにROCK阻害剤、非筋ミオシンII阻害剤およびTGF $\beta$ 阻害剤から成る群より選択される少なくとも一つの化合物を含んでいてもよい。
- [0031] 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) 、SR3677 (例、Feng Y et al., J Med Chem. 51: 6642-6645 (2008) 参照) 、GSK269962 (例、Stavenger RA et al., J Med Chem. 50: 2-5 (2007) またはWO2005/037197 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2004/001475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、Fasudil/HA1077、SR3677、GSK269962およびH-1152が挙げられる。

- [0032] ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合の培地中の濃度は、 $0.1\text{ }\mu\text{M}$ から $100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $1\text{ }\mu\text{M}$ から $500\text{ }\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $10\text{ }\mu\text{M}$ から $200\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0033] ROCK阻害剤としてFasudil/HA1077を用いる場合の培地中の濃度は、 $1\text{ }\mu\text{M}$ から $100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $10\text{ }\mu\text{M}$ から $100\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0034] ROCK阻害剤としてSR3677を用いる場合の培地中の濃度は、 $0.1\text{ }\mu\text{M}$ から $50\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ から $50\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0035] ROCK阻害剤としてGSK269962を用いる場合の培地中の濃度は、 $0.001\text{ }\mu\text{M}$ から $100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $0.005\text{ }\mu\text{M}$ から $50\text{ }\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $0.05\text{ }\mu\text{M}$ から $1\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0036] ROCK阻害剤としてH-1152を用いる場合の培地中の濃度は、 $5\text{ }\mu\text{M}$ から $100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $10\text{ }\mu\text{M}$ から $50\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0037] 非筋ミオシンII阻害剤は、非筋ミオシンIIの重鎖アイソフォームの一つである非筋ミオシンIIAまたは非筋ミオシンIIBの重鎖サブユニットのATPase活性の阻害剤、ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤が例示される。このような薬剤として、例えば、ブレビスタチン (Blebbistatin) A3、Calphostin C、Goe6976、Goe7874、Fasudil/HA1077、Hypericin、K-252a、KT5823、ML-7、ML-9、Pic eatanol、Staurosporine、W-5、W-7、W-12、W-13、Wortmannin等が挙げられるがこれらに限定されない。本工程で用いる好ましい非筋ミオシンII阻害剤としては、ブレビスタチンおよびFasudil/HA1077が挙げられる。
- [0038] 本発明において、非筋ミオシンII阻害剤としてブレビスタチンを用いる場

合の培地中の濃度は、 $1\mu\text{M}$ から $200\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $10\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ である。

[0039] TGF  $\beta$  阻害剤は、TGF  $\beta$  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、SB202190(以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NP C30345、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  $\beta$  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-イミダゾール-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。好ましくは、ALK5阻害剤IIであり得る。

[0040] TGF  $\beta$  阻害剤としてALK5阻害剤IIを用いる場合の培地中の濃度は、 $0.01\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1$ から $50\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $1\mu\text{M}$ から $20\mu\text{M}$ である。

[0041] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞の培養工程の日数は、長期間培養することで臍芽細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、例えば、2日以上、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、11日以上、12日以上、13日以上または14日以上が挙げられる。好ましくは、3日以上20日以下であり、より好ましくは、4日以上20日以下、例えば4日である。

[0042] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞の培養工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40°C、好ましくは約37°Cであり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2～5%である。

[0043] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞とは、PDX1を発現しているが、NKX6.1を発現して

いない細胞であれば、特に限定されない。PDX1を発現しているとは、公知の方法にて、PDX1遺伝子または遺伝子産物を検出できることを意味し、NKX6.1を発現していないとは、NKX6.1遺伝子または遺伝子産物を検出できないことを意味し、当該検出方法として、例えば、免疫染色法などが例示される。

[0044] 本願の他の態様として、PDX1陽性細胞をKGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、PDX1陽性細胞を増殖する方法を提供する。PDX1陽性細胞とは、PDX1が陽性である細胞を意味し、他のマーカー遺伝子、特に、NKX6.1の発現については、特に限定されないが、好ましくは、NKX6.1陰性細胞である。PDX1陽性細胞を増殖するとは、少なくともPDX1陽性細胞が細胞分裂によって増えることを意味し、例えば、Ki67抗体で染色される細胞数が増加することを確認することによっても当該増殖を確認することができる。PDX1陽性細胞の増殖の条件は、上述したPDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞の培養工程と同じ条件を用いることによって行い得る。

[0045] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞は、生体内から単離されていてもよく、既知の方法にて、多能性幹細胞等の他の細胞種から製造されてもよい。ある態様においてPDX1陽性NKX6.1陰性細胞は、次の工程を含む方法で多能性幹細胞より製造された細胞であっても良い：

- (工程1) 多能性幹細胞を、アクチビンを含む培地で培養する工程、および
- (工程2) 工程1で得られた細胞を、KGFを含む培地で培養する工程。

従って、上述のPDX1陽性NKX6.1陰性細胞から臍芽細胞誘導する方法を工程3として適用することで、次の工程を含む、多能性幹細胞から臍芽細胞を製造する方法も提供する：

- (工程1) 多能性幹細胞を、アクチビンを含む培地で培養する工程、
- (工程2) 工程1で得られた細胞を、KGFを含む培地で培養する工程、

(工程3) 工程2で得られた細胞（PDX1陽性NKX6.1陰性細胞）を単一細胞へ分離後、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程。

[0046] これらの態様の多能性幹細胞をアクチビンを含む培地で培養する工程（工

程1)で使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へアクチビンを適宜添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、MEM Zinc Option培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$  MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが含まれる。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清 (FBS)）が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、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、3' -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 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。1つの実施形態において、基礎培地は、B27サプリメントを含むRPMI 1640培地である。

[0047] 本態様の工程1において、多能性幹細胞は、任意の方法で実質的に分離（または解離）することで単一細胞の状態として培養してもよく、または、細胞同士が接着した細胞凝集塊の状態で培養してもよい。より好ましくは、単一細胞の状態に分離して培養する。分離の方法としては、例えば、力学的分離や、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、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液Accutase(TM)およびAccumax(TM) (Innovative Cell Technologies, Inc) が挙げられる）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が挙げられる。多能性幹細胞は、コーティング処理された培養皿を用いて接着培養することができる。

[0048] 多能性幹細胞を単一細胞の状態に分離した際のアポトーシスを抑制する目的でROCK阻害剤を基礎培地へ添加しても良い。ROCK阻害剤は、上述したものと

同様のものを用いることができ、好ましくは、Y-27632である。本目的で、ROCK阻害剤を添加する場合、添加期間は特に限定されないが、1日以上、または2日以上が例示され、好ましくは1日である。

[0049] 本態様の工程1における接着培養は、前述の条件と同じ方法によって行い得る。

[0050] アクチビンは、アクチビンA、B、C、D、ABのいずれのアクチビンもよいが、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。本発明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。

[0051] アクチビンを用いる場合、培地中の濃度は、通常0.1から200ng/ml、好ましくは5から150ng/ml、特に好ましくは10から100ng/mlである。

[0052] 工程1は、アクチビンおよびGSK3阻害剤を含む培地で培養した後、GSK3阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する工程であっても良い。

[0053] GSK3阻害剤とは、GSK-3β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BI0（別名、GSK-3β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-3β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-3β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-Dichlorophenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)pyrimidin-2-ylamino]ethylamino]pyridine-3-carbonitrile)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。本発明で使用されるGSK-3 $\beta$ 阻害剤は、好ましくは、CHIR99021であり得る。

- [0054] CHIR99021を用いる場合、培地中の濃度は、通常0.01  $\mu$ Mから100  $\mu$ M、好ましくは0.1  $\mu$ Mから10  $\mu$ M、より好ましくは1  $\mu$ Mから5  $\mu$ Mである。濃度は、適宜変更しても良く、例えば、3  $\mu$ Mの後、1  $\mu$ Mと変更しても良い。
- [0055] アクチビンおよびGSK3阻害剤を含む培地で培養する場合、多能性幹細胞の培養開始時に添加することが望ましい。GSK阻害剤の添加期間は特に限定されないが、1日以上、2日以上または3日以上が例示され、好ましくは1日から3日である。その後、GSK3阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する。
- [0056] 工程1の日数は、例えば、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、または7日以上が挙げられる。長期間培養することで臍芽細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、効率の観点からは10日以下、好ましくは8日以下とするのがよい。より好ましい工程1の日数は、4日である。
- [0057] 例えば多能性細胞をアクチビンAに加えてGSK3阻害剤とROCK阻害剤を添加した培地で1日培養し、次いでアクチビンAとGSK3阻害剤を含み、ROCK阻害剤を含まない培地で2日培養し、次いでアクチビンAを含むがGSK3阻害剤およびROCK阻害剤は含まない培地でさらに1日培養する態様が例示される。
- [0058] 工程1において、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40°C、好ましくは約37°Cであり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2~5%である。
- [0059] 工程1で得られた細胞をKGFを含む培地で培養する工程（工程2）で使用さ

れる培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へKGFを適宜添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、MEM Zinc Option培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium ( $\alpha$ MEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが含まれる。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清(FBS)）が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、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、3'-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 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。1つの実施形態において、基礎培地は、B27サプリメントを含むIMEM Zinc Option培地である。

- [0060] 工程2で用いるKGFは、上述と同様のものを用いることができ、KGFの濃度は、上述より低濃度を用いることが好ましく、例えば、1 ng/mlから500 ng/ml、好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlである。
- [0061] 工程2は、さらに、KGFに加えて、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する工程を含んでもよい。
- [0062] 工程2で用いるBMP阻害剤は、上述と同様の条件で用いることができる。
- [0063] 工程2に用いるレチノイン酸誘導体は、天然のレチノイン酸が有する機能を保持する人工的に修飾されたレチノイン酸を意味し、例えば、4-[[5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl]carbonyl]amino]-Benzoic acid (AM580) (Tamura K, et al., Cell Differ. Dev. 32: 17-26 (1990))、4-[(1E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propen-1-yl]-Benzoic acid (TTNPB) (Strickland S, et al., Cancer R

es. 43: 5268-5272 (1983))、パルミチン酸レチノール、レチノール、レチナール、3-デヒドロレチノイン酸、3-デヒドロレチノール、3-デヒドロレチナール、または、Abe, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 4990-4994 (1981)、Schwartz, E. L. et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 18 (1983)、および Tanenaga, K. et al., Cancer Res. 40: 914-919 (1980)に記載されている化合物が挙げられる。本工程で用いる好ましいレチノイン酸誘導体としては、TTNPBが挙げられる。本工程で用いるレチノイン酸誘導体の濃度は、使用するレチノイン酸誘導体に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、レチノイン酸誘導体としてTTNPBを用いる場合、1 nMから100 nM、好ましくは、5 nMから50 nM、さらに好ましくは、5 nMから10 nMである。

[0064] 工程2に用いるヘッジホッグ経路阻害剤は、ソニック・ヘッジホッグ、インディアン・ヘッジホッグ、およびデザート・ヘッジホッグのいずれかが膜受容体であるPatchedに結合して起こるシグナル、例えば、Smoothenedの活性を阻害する化合物を意味し、ヘッジホッグが受容体に結合して起こるシグナルを阻害すれば、特に限定されないが、例えば、シクロパミン、ジェルビン、3-Keto-N-(aminoethyl-aminocaproyl-dihydro-cinnamoyl) (KAAD)-シクロパミン、CUR-61414、SANT-1、SANT-2、SANT-3、SANT-4、IPI-926、IPI-269 609、GDC-0449およびNVP-LDE-225が挙げられる。好ましくは、KAAD-シクロパミンである。工程2で用いるヘッジホッグ経路阻害剤の濃度は、使用するヘッジホッグ経路阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、ヘッジホッグ経路阻害剤としてKAAD-シクロパミンを用いる場合、0.1 nMから1 μM、好ましくは、1 nMから500 nMである。

[0065] 工程2において、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で接着培養する場合、培養の途中で、任意の方法で実質的に分離（または解離）することで単一細胞の状態とし、再度、同条件で培養を継続しても良い。このとき、単一細胞の状態に分離した際のアポトーシスを抑制する目的でROCK阻害剤を基礎培地へ添加しても良い。ROCK阻害

剤は、上述したものと同様のものを用いることができ、好ましくは、Y-27632である。本目的で、ROCK阻害剤を添加する場合、添加期間は特に限定されないが、1日以上、または2日以上が例示され、好ましくは1日である。

[0066] 工程2の日数は、例えば、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、または8日以上が挙げられる。長期間培養することで臍芽細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、効率の観点からは10日以下、または9日以下とすることが好ましい。より好ましい日数は、7日である。KGFを含む培地で培養後、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する場合、KGFを含む培地での培養日数は、例えば、3日以上、または4日以上であり、より好ましくは、4日である。

[0067] 一例として、工程1における接着培養にて得られた細胞の培地を、工程2においてまずKGFを含有する培地に交換して4日間培養し、次いでKGFに加えてBMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ阻害剤を含有する培地に交換して2日間培養する。その後細胞を培養容器の壁面から分離して単一細胞の状態とし、さらにROCK阻害剤を含む培地にて1日培養する態様が挙げられる。

[0068] 工程2において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2～5%である。工程2終了時に得られる細胞はPDX1陽性NKX6.1陰性細胞となる。工程2終了時に得られる細胞は、PDX1陽性NKX6.1陰性細胞以外の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化された集団であってもよい。好ましくは、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上または70%以上のPDX1陽性NKX6.1陰性細胞が含まれる細胞集団である。

[0069] 本願明細書および請求の範囲において多能性幹細胞とは、生体に存在する全ての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、例えば胚性幹(ES)細胞(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)、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞 (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)、精子幹細胞 (「GS細胞」) (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1 001-1012)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」) (Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)、人工多能性幹(iPS)細胞 (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) ; WO2007/069666)、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞 (Muse細胞) (WO2011/007900) などが含まれる。より好ましくは、多能性幹細胞はヒト多能性幹細胞である。

[0070] iPS細胞は移植用臍芽細胞の材料として特に好適に用いられる。得られた臍芽細胞を医薬として用いる場合、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。

[0071] 他の態様においては、上記の工程を用いて得られた臍芽細胞を医薬（特に細胞医療の為の医薬）として利用することができる。当該細胞は、投与前に、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。

[0072] 得られた臍芽細胞を生理食塩水等に懸濁させ細胞懸濁液を医薬として用い、患者の肺臓、腸間膜、脾臓、肝臓および腎臓（特に、腎被膜化）へ直接投

与もしくはポリビニルアルコール (PVA) (Qi Z et al., Cell Transplant. 21: 525-534 (2012)) またはアルギン酸 (Dufrane D, et al., Transplantation 90: 1054-1062 (2010)) でカプセル化して投与することによって行い得る。投与の際、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、体躯の大きさに合わせて適宜増減して用いても良く、例えば、 $1 \times 10^8$ から $1 \times 10^{10}$ 細胞／個体、好ましくは、 $5 \times 10^8$ から $1 \times 10^{10}$ 細胞／個体、さらに好ましくは、 $1 \times 10^9$ から $1 \times 10^{10}$ 細胞／個体である。

[0073] 当該臍芽細胞を含む医薬は、臍疾患の治療に用いても良く、臍疾患には、急性臍炎、慢性臍炎、糖尿病、臍癌、ランゲルハンス島腫瘍などが例示される。本発明の臍芽細胞は、体内で、グルコース濃度に対応して、インスリンを分泌するインスリン産生細胞へと誘導されることから、糖尿病に対して有効である。特に、インスリン産生細胞が死滅する、1型糖尿病に有効である。

[0074] 本明細書中に記載される「細胞」の由来は、ヒト及び非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ、トリなど）であり、特に限定はされないが、ヒト由来の細胞が特に好ましい。

[0075] 以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

## 実施例

[0076] iPS細胞株

末梢血単核球由来のiPS細胞株 (585A1) (Okita K, et al, Stem Cells. 2013 31:458-466) 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585A1株を用いて、次の工程により、臍芽細胞へと分化誘導した。

[0077] 分化誘導工程（図1）

(Stage 1)

iPS細胞株 (585A1) をMatrigelをコートした24 well plateに $2.0 \times 10^5$ /wellで

播種し、2%のB27 (Life Technologies) を含むRPMI1640培地（ナカライトスク）に100 ng/ml アクチビンA (R&D systems) 、3 μM CHIR99021 (Axon Medchem) および10 μM Y-27632 (WaKo) を添加して1日間培養した。培地を100 ng/ml アクチビンA、1 μM CHIR99021および2%のB27 (Life Technologies) を含むRPMI1640培地に交換し、2日間培養した。さらに、培地を100ng/ml アクチビンAおよび2%のB27 (Life Technologies) を含むRPMI1640培地に交換し、1日間培養した。

[0078] (Stage 2-1)

第1工程で得られた細胞の培地を50 ng/ml KGF (R&D systems) および1%のB-27 (Life Technologies) を含むImproved MEM Zinc Option培地(Invitrogen社)に交換して4日間培養した。

[0079] (Stage 2-2)

第2-1工程で得られた細胞の培地を50 ng/ml KGF、0.2 μM LDN193189 (Axon Medchem) 、10nM TTNPB (Santa Cruz Biotechnology) 、0.5 μM 3-Keto-N-aminoethyl-N'-aminocaproyldihydrocinnamoyl Cyclopamine (KAAD - シクロパミンまたはK-CYC) (Toronto Research Chemicals) および1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地に交換して2日間培養した。

[0080] (Stage 2-3)

続いて、得られた細胞をTrypsinを用いて単一細胞へと分離し、Matrigelをコートした24 well plateに $1.2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ にて播種した。50 ng/ml KGF、0.2 μM LDN193189、10nM TTNPB、0.5 μM KAAD - シクロパミン、10 μM Y-27632 および1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地を加え、1日間培養した。

[0081] 第2工程終了時に得られた細胞をBD Cytofix/Cytoperm™ Kitを用いて処理した後、抗PDX1抗体 (R&D systems) および抗NKX6.1抗体 (University of Iowa) を用いて染色しフローサイトメーターにて調べたところ、得られた細胞の約60%がPDX1陽性NKX6.1陰性の細胞であることが確認された。

[0082] (Stage 3)

第2-3工程で得られた細胞の培地を100 ng/ml KGF、0.2 μM LDN193189、50ng/ml EGF (R&D systems)、各濃度 (0.01 μM~50 μM) のAT7867 (Selleck Chemicals) (陰性対照としてDMSO) および1%のB-27を含むImproved MEM Zinc Option培地 ( $15 \times 10^4$ /ml) を添加してさらに4日間培養した。

[0083] 細胞解析

Stage 3で得られた細胞を計数したところ、陰性対照であるDMSOと比較してAT7867の添加濃度依存的に得られる細胞数が増加することが確認された（図2）。さらに、Stage 3で1 μMのAT7867を添加して1から4日後に得られた細胞をPDX1抗体 (R&D Systems) およびKi67抗体 (Novocastra) にて免疫染色したところ、増殖する細胞は少なくともPDX 1が陽性である細胞であることが確認された（図3）。

[0084] Stage 3で得られた細胞をNKX6.1抗体 (DSHB) にて免疫染色したところ（図4A）、AT7867の添加濃度依存的に、少なくともNKX6.1が陽性細胞の含有率が増加することが確認された（図4B）。同様に、PDX1抗体およびNKX6.1抗体で二重染色したところ、AT7867の添加によりPDX1陽性NKX6.1陽性細胞が増加することが確認された（図5AおよびB）。

[0085] Stage 3で1 μMのAT7867を添加して培養した。Stage 3の0日目から4日目まで毎日細胞を採取し、定量PCRを行ってPDX1、PTF1A およびNKX6.1それぞれの遺伝子発現量を測定した。細胞からのRNAの抽出はRNeasy kit (Qiagen) を使用し、逆転写反応はReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) およびoligo (dT)20 primerを使用して行った。定量PCRはSYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用い、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して行った。遺伝子発現はGAPDHの発現により標準化し、遺伝子発現量の相対比を相対標準曲線を元に算出した（図6）。AT7867の添加により、経時にPDX1および、臍芽細胞への分化の指標となる転写因子であるPTF1A およびNKX6.1の発現量が上昇することが確認された。

[0086] 以上のように、AT7867は、PDX 1陽性細胞を特異的に増加させることで、NKX6.1+細胞への分化誘導を行うことができる事が示唆された。

## 請求の範囲

- [請求項1] PDX1陽性NKX6.1陰性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、臍芽細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記培養が、接着培養条件下で行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記Akt阻害剤が、AT7867である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記PDX1陽性NKX6.1陰性細胞が、次の2つの工程を含む方法で多能性幹細胞より製造された細胞である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法：
- (1) 多能性幹細胞を、アクチビンを含む培地で培養する工程、および
- (2) 工程(1)で得られた細胞を、KGFを含む培地で培養する工程。
- [請求項5] 前記工程(1)が、アクチビンおよびGSK3阻害剤を含む培地で培養した後、GSK3阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する工程である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程(2)が、さらに、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、請求項4または5に記載の方法。
- [請求項7] 前記工程(2)が、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養した後、細胞を解離し、KGF、BMP阻害剤、レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で接着培養する工程を含む、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記GSK3阻害剤が、CHIR99021である、請求項5から8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記レチノイン酸誘導体が、TTNPBである、請求項6から9のいず

れか 1 項に記載の方法。

- [請求項11] 前記ヘッジホッグ経路阻害剤が、 KAAD - シクロパミンである、 請求項 6 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項12] 前記臍芽細胞が PDX1 陽性および NKX6.1 陽性である請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項13] 前記臍芽細胞が、 ヒト細胞である、 請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項14] 以下の工程 (i) から (iii) を含む、 多能性幹細胞から臍芽細胞を製造する方法：  
(i) 多能性幹細胞を、 アクチビンを含む培地で培養する工程、  
(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、 KGF を含む培地で培養する工程、  
(iii) 工程 (ii) で得られた細胞を、 KGF、 EGF、 BMP 阻害剤および Akt 阻害剤を含む培地で培養する工程。
- [請求項15] 前記培養が、 接着培養条件下で行われる、 請求項 14 に記載の方法。
- [請求項16] 前記工程 (i) が、 アクチビンおよび GSK3 阻害剤を含む培地で培養した後、 GSK3 阻害剤を含まずアクチビンを含む培地で培養する工程である、 請求項 14 または 15 に記載の方法。
- [請求項17] 前記工程 (ii) が、 さらに、 KGF、 BMP 阻害剤、 レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、 請求項 14 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項18] 前記工程 (ii) が、 KGF、 BMP 阻害剤、 レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で培養した後、 細胞を解離し、 KGF 、 BMP 阻害剤、 レチノイン酸誘導体およびヘッジホッグ経路阻害剤を含む培地で接着培養する工程を含む、 請求項 17 に記載の方法。
- [請求項19] 前記Akt阻害剤が、 AT7867 である、 請求項 14 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

- [請求項20] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、請求項14から19のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項21] 前記GSK3阻害剤が、CHIR99021である、請求項16から20のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項22] 前記レチノイン酸誘導体が、TTNPBである、請求項17から21のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項23] 前記ヘッジホッグ経路阻害剤が、KAAD-シクロパミンである、請求項17から22のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項24] 前記臍芽細胞が、PDX1陽性およびNKX6.1陽性である請求項14から23のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項25] 前記臍芽細胞が、ヒト細胞である、請求項14から24のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項26] PDX1陽性細胞を、KGF、EGF、BMP阻害剤およびAkt阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、PDX1陽性細胞の増殖方法。
- [請求項27] 前記培養が、接着培養条件下で行われる、請求項26に記載の方法。
- [請求項28] 前記Akt阻害剤が、AT7867である、請求項26または27に記載の方法。
- [請求項29] 前記BMP阻害剤が、LDN193189である、請求項26から28のいずれか1項に記載の方法。

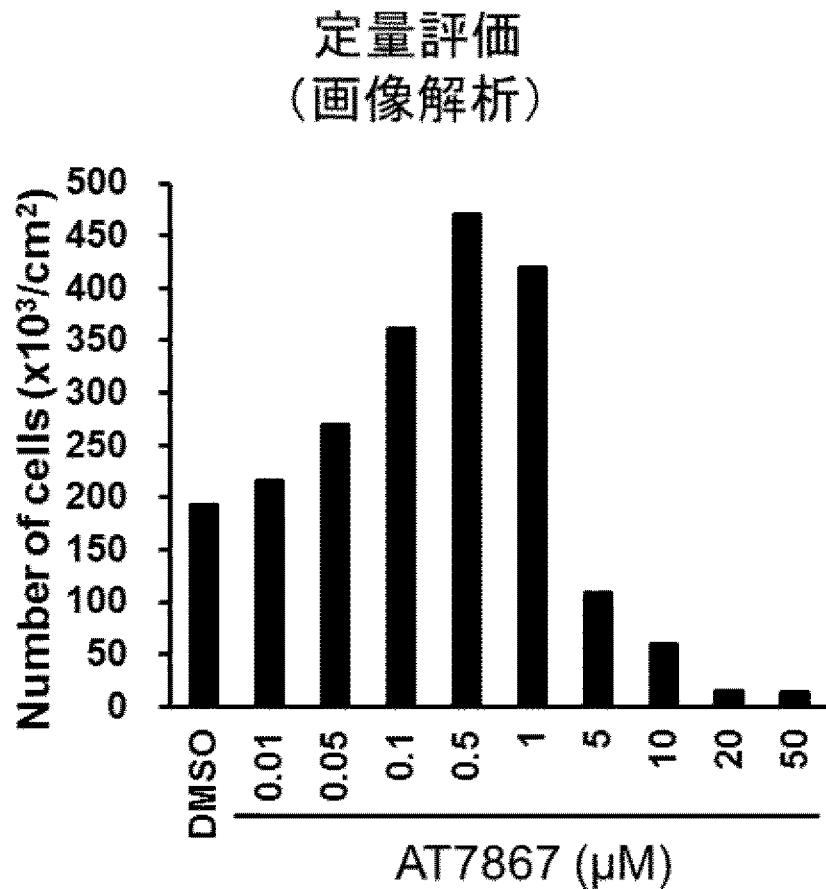
[図1]

Stage 1			Stage 2			Stage 3		
D0	1	3	4	8	10	11	15	
A 100 ng/ml	A 100 ng/ml	A 100 ng/ml	K 50 ng/ml	K 50 ng/ml	K 50 ng/ml	K 100 ng/ml		
C 3 μM	C 1 μM		L 0.2 μM	L 0.2 μM	L 0.2 μM	L 0.2 μM		
Y 10 μM			T 10 nM	T 10 nM	T 10 nM	E 50 ng/ml		
			Cyc 0.5 μM	Cyc 0.5 μM	Cyc 0.5 μM	AT7867		
			Y 10 μM					

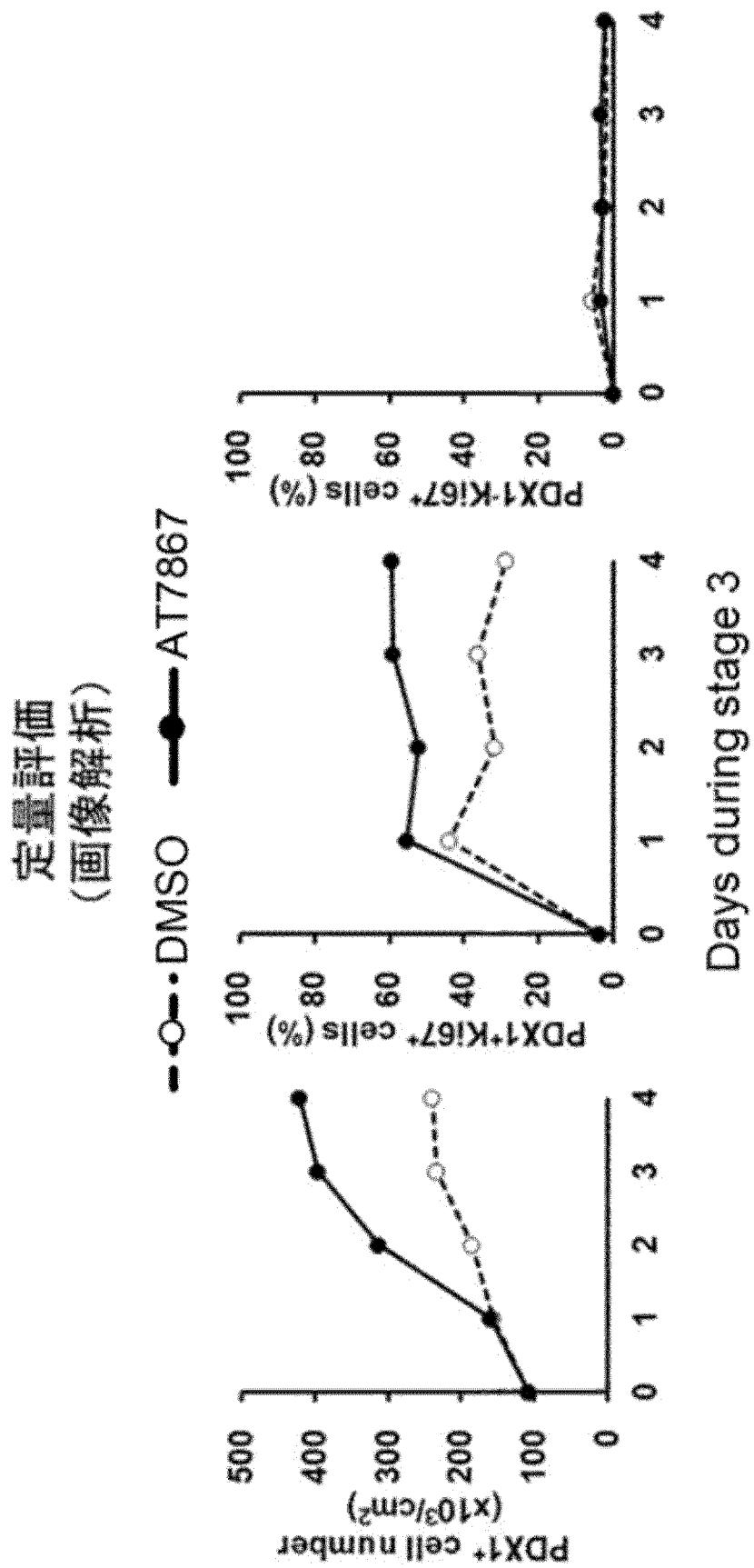
▲  
Reseed 1.2 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>

A = Activin A; C = CHIR99021; Y = Y-27632; K = KGF; L = LDN193189; T = TIMP8; Cyc = KAAD-cyclopamine; E = EGF

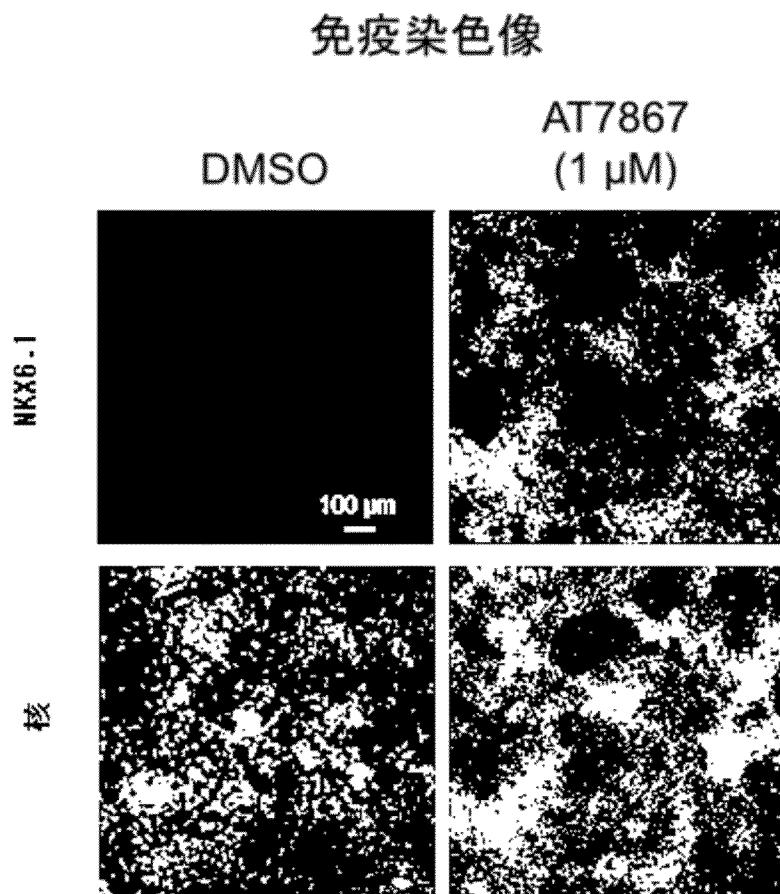
[図2]



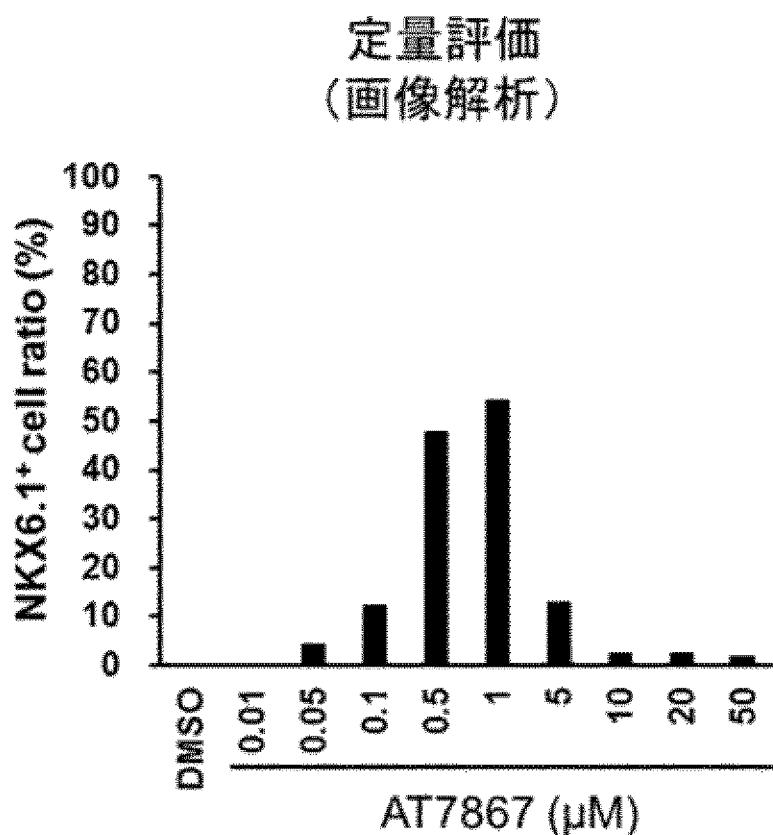
[図3]



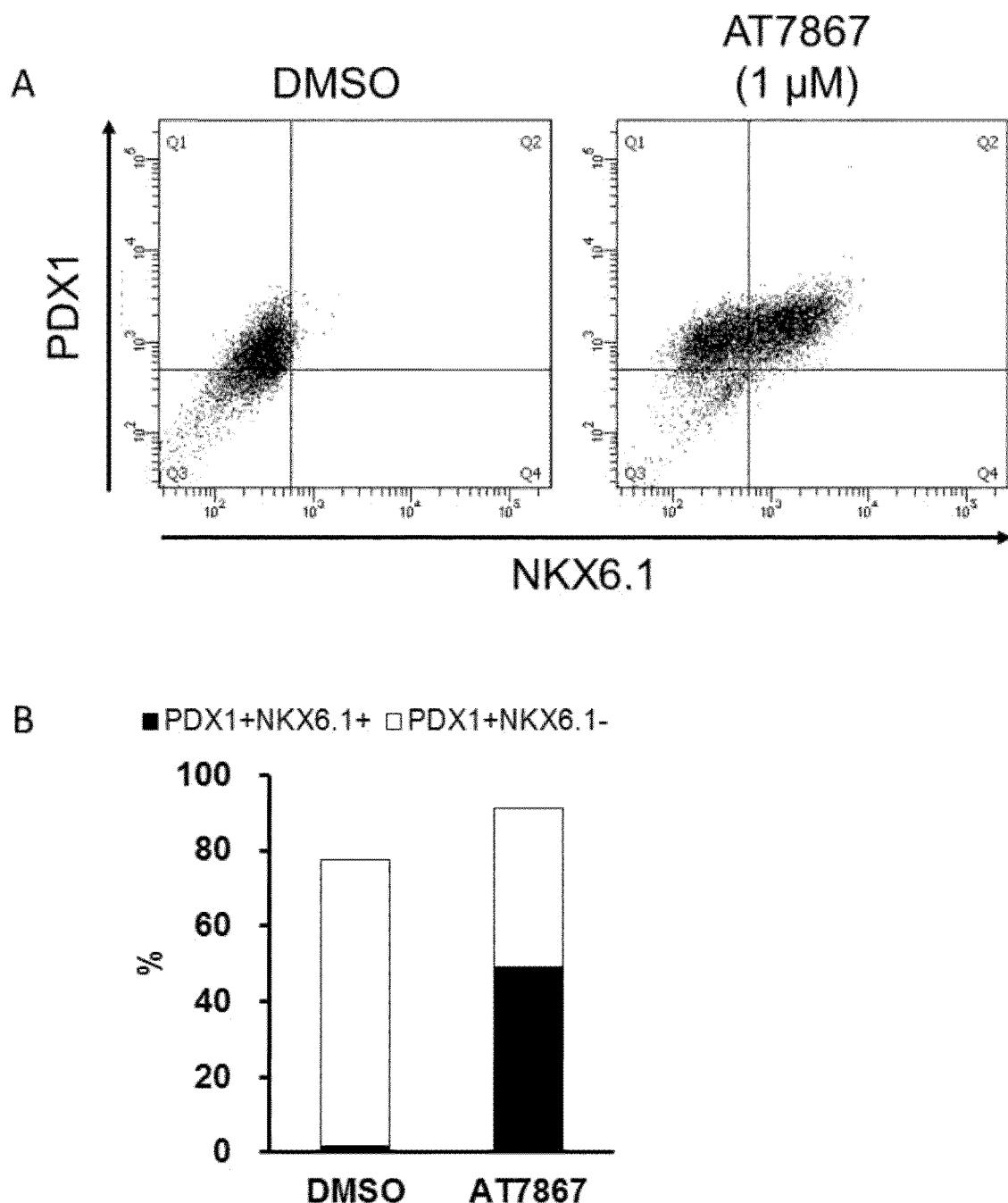
[図4A]



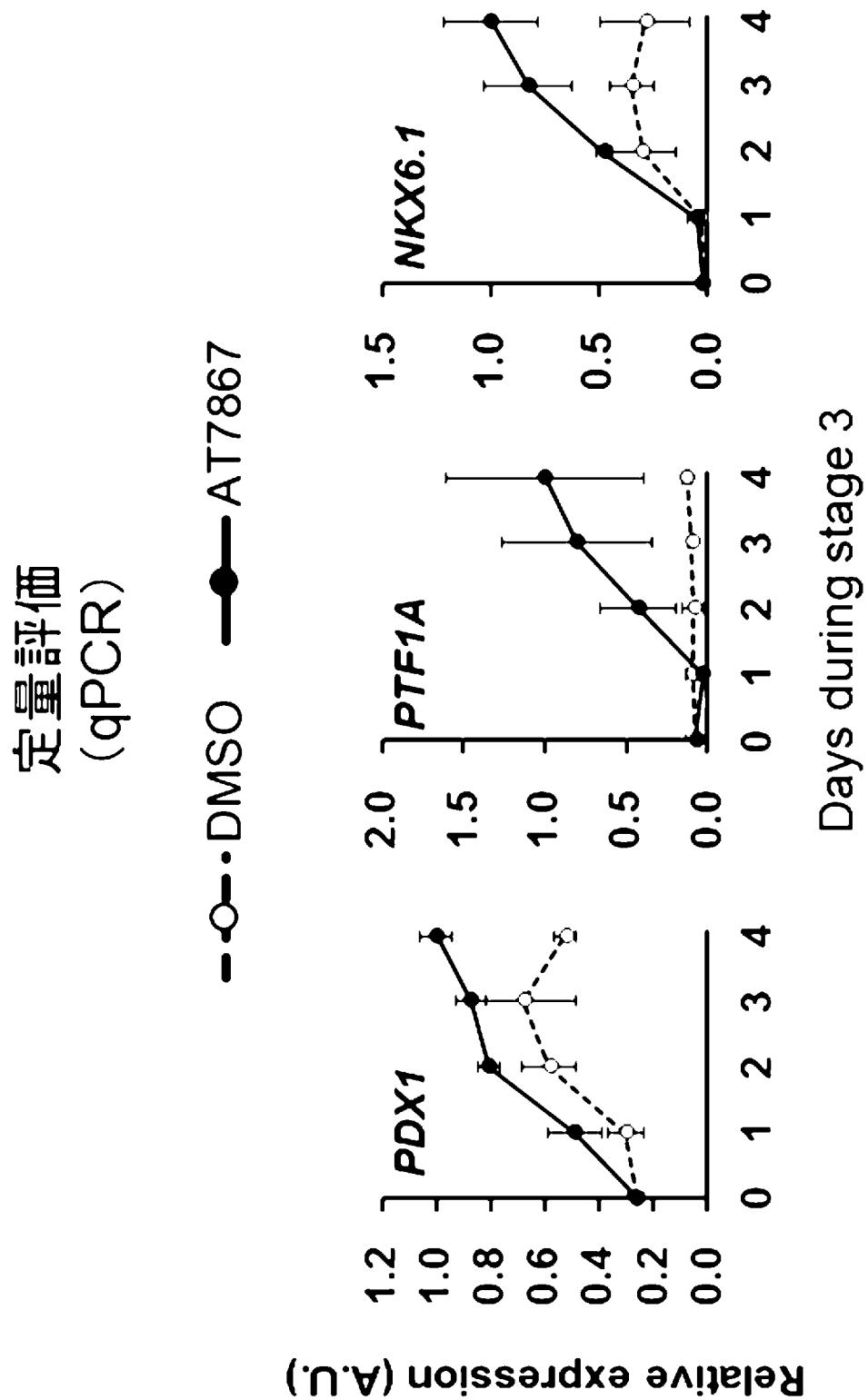
[図4B]



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/077564

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
*C12N5/0735 (2010.01)i, C12N5/10 (2006.01)i*

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
*C12N5/0735, C12N5/10*

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

*JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),  
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)*

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOYODA, T. et al, Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells, <i>Stem Cell Research</i> , 2015, Vol.14, pp.185-197	1-29
A	JP 2012-507281 A (Viacyte, Inc.), 29 March 2012 (29.03.2012), & WO 2010/053472 A1 & EP 2356213 A1	1-29
A	Nobuaki SHIRAKI et al., "Tanosei Kansaibo to reprogramming Gijutsu iPS Saibo no Naihaiyokei eno Yudo", <i>Japanese Journal of Clinical Medicine</i> , 20 June 2015 (20.06.2015), vol.73, special extra issue 5, pages 107 to 114	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 06 December 2016 (06.12.16)

Date of mailing of the international search report  
 20 December 2016 (20.12.16)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japan Patent Office  
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2016/077564
--

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOSOYA, M., Preparation of pancreatic $\beta$ -cells from human iPS cells with small molecules, Islets, 2012, Vol.4, No.3, pp.249-252	1-29
A	HORI, Y. et al., Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells, PNAS, 2002, Vol.99, No.25, pp.16105-16110	1-29
A	MATHEW, S. et al., Analysis of alternative signalling pathways of endoderm induction of human embryonic stem cells identifies context specific differences, BMC systems Biology, 2012, Vol.6, No.154, pp.1-13	1-29
A	JARAMILLO, M. et al., Potential for Pancreatic Maturation of Differentiating Human Embryonic Stem Cells is Sensitive to the Specific Pathway of Definitive Endoderm Commitment, PLOS ONE, 2014, Vol.9, No.4, e94307, pp.1-14	1-29
P,A	WO 2015/178431 A1 (Kyoto University), 26 November 2015 (26.11.2015), (Family: none)	1-29

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

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

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/0735, C12N5/10

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	TOYODA, T. et al, Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells, Stem Cell Research, 2015, Vol. 14, pp. 185-197	1-29
A	JP 2012-507281 A (バイアサイト インク) 2012.03.29 & WO 2010/053472 A1 & EP 2356213 A1	1-29
A	白木伸明他, 多能性幹細胞と reprogramming 技術 iPS 細胞の内胚葉系への誘導, 日本臨床, 2015.06.20, Vol. 73, 増刊号 5, pp. 107-114	1-29

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

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06.12.2016	国際調査報告の発送日 20.12.2016
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 平林 由利子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 3634

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	HOSOYA, M., Preparation of pancreatic $\beta$ -cells from human iPS cells with small molecules, Islets, 2012, Vol. 4, No. 3, pp. 249–252	1-29
A	HORI, Y. et al., Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells, PNAS, 2002, Vol. 99, No. 25, pp. 16105–16110	1-29
A	MATHEW, S. et al., Analysis of alternative signaling pathways of endoderm induction of human embryonic stem cells identifies context specific differences, BMC systems Biology, 2012, Vol. 6, No. 154, pp. 1–13	1-29
A	JARAMILLO, M. et al., Potential for Pancreatic Maturation of Differentiating Human Embryonic Stem Cells is Sensitive to the Specific Pathway of Definitive Endoderm Commitment, PLOS ONE, 2014, Vol. 9, No. 4, e94307, pp. 1–14	1-29
P, A	WO 2015/178431 A1 (国立大学法人京都大学) 2015. 11. 26 (ファミリ一なし)	1-29