

(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

2018年2月1日(01.02.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/021293 A1

(51) 国際特許分類:

CI2N 5/071 (2010.01) *CI2N 5/10* (2006.01)
CI2N 5/0735 (2010.01)

(21) 国際出願番号 : PCT/JP2017/026837

(22) 国際出願日 : 2017年7月25日(25.07.2017)

(25) 国際出願の言語 : 日本語

(26) 国際公開の言語 : 日本語

(30) 優先権データ :
特願 2016-146415 2016年7月26日(26.07.2016) 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: 川口 義弥 (KAWAGUCHI, Yoshiya); 〒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). 佐々木 勉 (SASAKI, Ben); 〒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号梅田阪急ビルオフィススタワー青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CELLS POSITIVE FOR PTF1A

(54) 発明の名称 : P T F 1 A陽性細胞の製造方法

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a method for producing cells positive for PTF1A, which is considered to be a fate-determining gene for pancreatic development and the expression of which is considered to be important for differentiation into pancreatic cells. In this application, the method for producing cells positive for PTF1A comprises a step for providing cells positive for PDX1 and a step for culturing on a medium containing at least one substance selected from the group consisting of (a) at least one selection from the group consisting of adenylate cyclase activators, cAMP phosphodiesterase inhibitors, and cAMP analogs, (b) steroids, and (c) nicotinamide. The cells positive for PDX1 can be derived from, for example, pluripotent stem cells.

(57) 要約 : 膵発生の運命決定遺伝子であり、その発現が膵臓細胞への分化に重要であると考えられるPTF1A陽性細胞を製造する方法を提供することを目的とする。本願は、PDX1陽性細胞を提供する工程、および (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) ステロイドおよび(c) ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程を含む、PTF1A陽性細胞の製造方法を提供する。PDX1陽性細胞は、例えば多能性幹細胞より誘導することができる。

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, 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.

(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).

添付公開書類 :

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：PTF1A陽性細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本願はPTF1A陽性細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 多能性幹細胞から膵臓細胞への分化は、多能性幹細胞→内胚葉細胞→原腸細胞→膵前駆細胞→膵臓細胞の順に誘導される。ヒト及びマウスにおいて、膵前駆細胞にはPDX1の発現が認められていることが知られている。一方でPDX1は、膵前駆細胞だけでなく、他の臓器へ分化する細胞にも認められる。

[0003] マウス発生学において、膵原基にPdx1が発現したあと引き続きPtflaを発現した細胞は、最終的にはほぼすべて膵臓細胞に分化することが確認されており、Ptflaのノックアウトマウスでは膵臓低形成が認められる（非特許文献1）。Ptfla低発現マウスは膵臓低形成と耐糖能異常が認められる（非特許文献2）。ヒトにおいてもPTF1A遺伝子の突然変異（非特許文献3）あるいはそのエンハンサーの突然変異（非特許文献4）による膵臓低形成が報告されている。

[0004] これらの知見より、PTF1A遺伝子はマウスのみならずヒトにおいても膵発生の運命決定遺伝子であり、PTF1A遺伝子の発現が膵臓細胞への分化に重要であることが推測される。

[0005] 多能性幹細胞から膵臓細胞を誘導する方法としては、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などが例示される（特許文献1、非特許文献5から9）。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および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、非特許文献10）が知られている。これら多能性幹細胞から膵臓細胞を誘導する方法において、膵前駆細胞のPDX1発現が重視されてきたが、PTF1Aの発現に焦点をあてて評価したものは少なく、その発現

制御は不明な点が多い。

先行技術文献

特許文献

[0006] 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号公報

特許文献5：WO2015/020113号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Kawaguchi Y et al., Nat Genet 32: 128-134, 2002

非特許文献2：Fukuda A et al., Diabetes 57: 2421-2431, 2008

非特許文献3：Gabrielle SS et al., Nat Genet 36: 1301-1305, 2004

非特許文献4：Michael NW et al., Nat Genet 46: 61-66, 2014

非特許文献5：E. Kroon et al., Nature Biotechnology(2008) Vol.26, No. 4
: 443-452

非特許文献6：K. A. D'Amour et al., Nature Biotechnology(2006) Vol. 24, N
o. 11: 1392-1401

非特許文献7：W. Jiang, Cell Research(2007) 17: 333-344

非特許文献8：J. H. Shim et al., Diabetologia (2007) 50: 1228-1238

非特許文献9：R. Maehra et al., PNAS(2009), vol. 106, No. 37: 15768-15773

非特許文献10：Kunisada Y et al., Stem Cell Res. (2012) vol. 8, No. 2: 2
74-284.

[0008] 上記先行技術文献はいずれも引用により本願の一部を構成する。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本願はPTF1A陽性細胞をインビトロで製造する方法を提供することを目的と
する。特に多能性幹細胞、例えばiPS細胞からPDX1陽性細胞を経てPTF1A陽性

細胞を誘導する方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本願は、

PDX1陽性細胞を提供する工程、および

PDX1陽性細胞を (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) ステロイドおよび(c) ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程を含む、PTF1A陽性細胞の製造方法を提供する。

[0011] 好適な態様としては、(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) ステロイドおよび(c) ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する前に、PDX1陽性細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程を含む方法が提供される。

[0012] 本願において、PDX1陽性細胞は、多能性幹細胞から誘導された細胞であつてよい。多能性幹細胞からPDX1陽性細胞を得る方法は種々報告されており、公知のいずれの方法を用いてもよい。

発明の効果

[0013] 本願発明の方法により、低分子物質を用いて効率的にPDX1陽性細胞におけるPTF1Aの発現を誘導することが可能となった。本願発明の方法により、多能性幹細胞から効率的にPTF1A発現細胞を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本願実施例の概略図である。

[図2]本願方法により誘導された細胞におけるPTF1Aの発現量の経時変化を示す。

[図3]本願方法により誘導された細胞における、インスリン遺伝子およびアミラーゼ遺伝子の発現を示す。

発明を実施するための形態

- [0015] 本願発明は、PDX1陽性細胞を（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）ステロイドおよび（c）ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程を含むPTF1A陽性細胞の製造方法を提供する。
- [0016] 本願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、 α MEM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、例えばDMEM/F12培地 (DMEMとHam's F12の1：1混合培地) などが含まれる。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、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。
- [0017] 本願において用いられるPDX1陽性細胞としては、多能性幹細胞から誘導された細胞培養物が好適に用いられる。PDX1遺伝子陽性細胞の培養物としては、立体構造を有する細胞塊状態で培養されているものを用いるのが好ましい。
- [0018] 本願の方法の一態様において、（a）、（b）、および（c）からなる群から選択される1以上を含有する培地においてPDX1陽性細胞を培養する工程は

、好ましくはPDX1陽性細胞を予め下記に述べる第1工程および第2工程にて培養した後の第3工程として行う。

[0019] [PDX1陽性細胞からPTF1A陽性細胞誘導の第1工程]

PDX1陽性細胞からPTF1A陽性細胞誘導の第1工程ではPDX1陽性細胞を成長因子、レチノイン酸受容体（RAR）アゴニスト、ヘッジホッグ経路阻害剤、プロテインキナーゼC活性化剤およびALK5受容体阻害剤を含む培地にて培養する。各成分の培地中の濃度は適宜定めれば良い。

[0020] PDX1陽性細胞からPTF1A細胞誘導の第1工程において、好ましくはヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤を培地に添加する。

ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤としては例えば、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（例えばHDAC1 siRNA Smartpool（登録商標）（Millipore）、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1（Origene））等の核酸性発現阻害剤、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）が例示される。

[0021] HDAC阻害剤としては酪酸ナトリウムが好適に用いられる。HDAC阻害剤として酪酸ナトリウムを用いる場合、培地中の濃度は通常 $50\text{ }\mu\text{M}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは $200\text{ }\mu\text{M}$ ～ $800\text{ }\mu\text{M}$ 、例えば約 $500\text{ }\mu\text{M}$ である。第1工程においては1日～3日、好ましくは1日培養する。

[0022] [PDX1陽性細胞からPTF1A陽性細胞誘導の第2工程]

第2工程以降において、培養は浮遊培養で、低接着プレートを用いて行うのが好ましい。第2工程において、培地は基礎培地に成長因子、レチノイン酸受容体（RAR）アゴニスト、ヘッジホッグ経路阻害剤、ROCK阻害剤、プ

ロteinキナーゼC活性化剤およびALK5受容体阻害剤を含有するものが好適に用いられる。各成分の培地中の濃度は適宜定めれば良い。第2工程においては、第1工程で得た細胞を新たなプレートに満たした第2工程用培地中へ移してから1日～3日、好ましくは1日培養する。

[0023] [PDX1陽性細胞からPTF1A陽性細胞誘導の第3工程]

PDX1陽性細胞を（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）ステロイドおよび（c）ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する。

[0024] 培地は、上述した基礎培地へ（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）ステロイドおよび（c）ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を添加することによって作成される。好ましい基礎培地は、B-27サプリメントを添加したDMEM/F12である。

[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、ホルスコリン、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、ホルスコリンである。ホルスコリンの培地中の濃度は通常0.1から50μM、好ましくは2から50μMであり、例えば約10μMである。

[0026] ステロイドとしては、デキサメサゾン、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。なかでもデキサメサゾンが好適に用いられる。ステロイドとしてデキサメサゾンを使用す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、例えば約10μMである。

[0027] ニコチニアミドの培地中の濃度は、0.01から20mM、好ましくは0.1から5mMであり、例えば約1mMである。

[0028] 本願の方法において、成分(a)、(b)、および(c)はそれぞれを単独で添加しても、任意の2種類を組み合わせて添加しても、(a)(b)(c)を全て添加してもよい。好ましくは、ホルスコリン、デキサメサゾンおよびニコチニアミドのいずれか1種、2種または3種全てを含む培地が挙げられる。

[0029] 本願の方法において、培地はさらに成長因子、レチノイン酸受容体(RAR)アゴニスト、ヘッジホッグ経路阻害剤、プロテインキナーゼC阻害剤およびALK5受容体阻害剤を含有するものであってもよい。各成分の培地中の濃度は適宜定めれば良い。

[0030] 成長因子としては好ましくはKGFが用いられる。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。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。

[0031] 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)。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-ナフタレンイル]カルボキシアミド]安息香酸)、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-ナフタレンイル]-1-プロペニル]安息香酸)、AC55649(4'-オクチル-[1,1' -ビフェニル]-4-カルボン酸)であり、さらに好ましくはレチノイン酸である。

[0032] 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-269609、GDC-0449およびNVP-LDE-225が挙げられる。好ましくは、シクロパミンである。

[0033] プロテインキナーゼC活性化剤としては、Alpha APP Modulator、例えば(2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペントジエノイルアミノ)ベンゾラクタムが例示される。

[0034] ALK5受容体阻害剤としては、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) が例示される。

第3工程において培養は浮遊培養で、低接着プレートを用いて行うのが好ましい。培養期間は特に限定的ではなく、第3工程開始時にそれまでの工程で得た細胞を新たなプレートに満たした上記培地中に移してから4日～14日、例えば8日以上、好ましくは約12日間培養する。

[0035] 培養条件は特に限定的ではないが、一つの態様においては37℃、5%CO₂、5%O₂の条件下で培養すればよい。

[0036] 本願の方法により、細胞におけるPTF1Aの発現が増加する。また、本願の方法にて培養された細胞は、インスリンおよびアミラーゼの両方を発現する。

[0037] 本願の方法の一態様において、PDX1陽性細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞から誘導されたものである。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る。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, 119:1001-1012)、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り、例えばヒトES細胞およびヒトイPS細胞である。更に好ましくはヒトイPS細胞である。

[0038] 多能性幹細胞は、公知の方法を用いて製造したもの用いても、市販の多能性幹細胞や、研究あるいは移植医療のためにその由来する個体の情報と共に保存された多能性幹細胞を用いてもよい。頻度の高いHLAハプロタイプをホモで有するひとをドナーとして用いることにより、汎用性の高いiPS細胞バンクを構築するプロジェクトが日本において現在進行中であり (CYRANOSKI, Nature vol. 488, 139(2012))、例えばかかるiPS細胞バンクから取得された多能性幹細胞を用いてもよい。

- [0039] 本願の方法において用いられる多能性幹細胞は、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、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。単一細胞の状態に分離して培養する場合の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。
- [0040] 多能性幹細胞からPDX1陽性細胞を誘導するには、まず、多能性幹細胞から内胚葉細胞を誘導し、内胚葉細胞から原腸細胞を誘導する。原腸細胞からさらに、PDX1陽性細胞を誘導する。
- [0041] 多能性幹細胞から内胚葉細胞を経て原腸細胞を得るには、従来から公知の方法を用いれば良い。一つの態様として、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、GSK3阻害剤、ROCK阻害剤およびP13キナーゼを含有する培地の中で1～4日、好ましくは2日間培養し、次いでアクチビン受容体様キナーゼ-4, -7の活性化剤のみを含有する培地中1～4日、好ましくは2日間培養し、さらにGSK3阻害剤および成長因子を含有する培地中にて3～8日、好ましくは4日間培養する。かかる操作により原腸細胞を得ることができる。
- [0042] 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、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。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。

[0043] GSK3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BI0（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。GSK-3 β 阻害剤は、好ましくは、CHIR99021であり得る。

[0044] 次いで原腸細胞からPDX1陽性細胞を誘導する。

原腸細胞からPDX1陽性細胞を誘導するには、原腸細胞をまず成長因子、例えばKGFおよびEGF、レチノイン酸受容体（RAR）アゴニスト、ヘッジホッグ経路阻害剤、およびROCK阻害剤を含有する培地にて培養する。培地としては、公知の基礎培地から適宜選択して用いれば良いが、例えばDMEM/F12培地にB27サプリメントを配合した培地が好適に用いられる。培地中への各添加物の含有量は適宜定めれば良い。

[0045] 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2004/002508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)。本願発明では、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。

[0046] 原腸細胞からPDX1陽性細胞への誘導に当たり、立体構造を有する細胞塊としてのPDX1陽性細胞を得るために、細胞は三次元支持体となる物質、例えばマトリゲルの存在下で培養してもよい。

[0047] 原腸細胞からPDX1陽性細胞誘導の工程は、培地を適宜新しいものに交換しながら4～14日、例えば約8日行う。本工程により、PDX1陽性細胞が誘導される。本願の一態様においては、本工程で得られた細胞を、PDX1陽性細胞として用いる。

実施例

[0048] 本願発明を実施例にて更に詳細に説明する。実施例の概略を図1に示した。ヒトiPS細胞 201B7株 (Cell 131:861-872, 2007) を使用した。未分化状態の維持には37°C、5%CO₂のもとに、フィーダー細胞としてマイトイシン処理をしたマウス纖維芽細胞株SNLを、培地として靈長類ES細胞用培

地（リプロセル）を用いた。同培地へは4ng/mL human recombinant bFGF (WA K0)、0.5% Penicillin-Streptomycin (GIBCO) を添加した。培地交換は継代の翌々日から毎日行い、6～7日ごとに継代をおこなった。

[0049] まず未分化iPS細胞を24穴プレートで内胚葉細胞へと分化させた。

未分化なiPS細胞のディッシュからフィーダー細胞を除去し、Accutase (Innovative Cell Technologies) で単一細胞になるまで解離させた。24穴プレートは前日から室温でマトリゲルコートしたものを用いた。各種分化誘導因子を含むRPMI培地 (GIBCO) に分散させたiPS細胞を24穴プレートに1穴あたり 2×10^4 個の密度で播種し、37°C、5%CO₂で2日間培養した。分化誘導因子として、アクチビンA (100ng/mL) とGSK3阻害剤CHIR99021 (3 μM)、Y-27632 (10 μM)、ワルトマニン (100nM)、2%B27サプリメント (GIBCO) を使用した。2日間の培養ののち、培地をアクチビンA (100ng/mL)、2%B27サプリメントを含むRPMI培地に交換して1日間培養した。さらに同様の培地に交換して1日間培養した。

[0050] 次に原腸細胞への分化誘導をおこなった。分化誘導因子として、KGF (50ng /mL)、CHIR99021 (2 μM) を含み、2%B27サプリメントを含むRPMI培地を1日ごとに交換し、計4日間培養した。

[0051] 原腸細胞をPDX1陽性細胞へ誘導した。

ここまで誘導した細胞をAccutaseで単一細胞にまで解離し、前日からマトリゲルコートしておいた6穴プレートに各種分化誘導因子および2.5%マトリゲルを含および2%B27サプリメントを含むDMEM/F12培地 (GIBCO) に懸濁して播種した。

[0052] 分化誘導因子として、KGF (50ng/mL)、EGF (100ng/mL)、レチノイン酸 (2 μM)、シクロパミン (250nM)、Y-27632 (10 μM) を添加した。37°C、5%CO₂、5%CO₂で8日間培養した。以後の培養はすべて同様のガス・温度設定でおこなった。培地交換は同様のものを4日目に1度おこなった。8日間の培養が終わつたサンプルを「D0」と表記する。得られた細胞塊を免疫染色および定量RT-PCRにて確認したところ、PDX1を発現していることが確認されたが、PTF1A発現

は確認されなかった。

[0053] <PDX1陽性細胞からPTF1A発現誘導の第1工程>

続いてPTF1A発現を誘導するために、マトリゲルを含まずに各種分化誘導因子を含むDMEM/F12培地で1日間培養した。分化誘導因子として、酪酸ナトリウム (500uM) 、KGF (50ng/mL) 、レチノイン酸 (100nM) 、シクロパミン (250 nM) 、PKC活性剤Alpha-APP Modulator (250nM) 、ALK5受容体阻害剤 (1 μM) 、2%B27サプリメントを用いた。陰性コントロール群では酪酸ナトリウムを添加しなかった。

[0054] <PDX1陽性細胞からPTF1A発現誘導の第2工程>

細胞をセルスクレイパーで接着細胞を剥がし、低接着6穴プレートに浮遊させた。培地は、KGF (50ng/mL) 、レチノイン酸 (100nM) 、シクロパミン (250nM) 、Alpha-APP Modulator (250nM) 、ALK5受容体阻害剤 (1 μM) 、2%B27サプリメントに加え、Y-27632 (10 μM) を添加したDMEM/F12培地とし、この条件で1日間培養し細胞塊を形成させた。（第2工程）

[0055] <PDX1陽性細胞からPTF1A発現誘導の第3工程>

次に得られた細胞塊をKGF (50ng/mL) 、レチノイン酸 (100nM) 、シクロパミン (250nM) 、Alpha-APP Modulator (250nM) 、ALK5受容体阻害剤 (1 μM) 、2%B27サプリメントに、新たな分化誘導因子として、ホルスコリン (10 μM) 、デキサメサゾン (10 μM) 、ニコチンアミド (1mM) を加えた培地へ培地交換した（添加群）。培養は以後12日間継続し、4日毎に同様の培地に交換した。6日目、10日目、14日にサンプリングを行った。それぞれ「D6」 「D10」 「D14」と表記する。浮遊培養の前に酪酸ナトリウムを添加しなかった陰性コントロール群では引き続きホルスコリン、デキサメサゾン、ニコチンアミドを添加せず、これを最終的な陰性コントロール（非添加群）とした。

添加群と非添加群のPTF1Aの発現量を、B2M遺伝子をインターナルコントロール、ヒト臍組織検体を陽性コントロールとして用いて、定量RT-PCRでPTF1Aの発現を評価した。結果を図2に示す。

[0056] また、14日目の細胞について定量RT-PCRでインスリンおよびアミラーゼの

発現を確認した。結果を図3に示す。

請求の範囲

- [請求項1] PDX1陽性細胞を提供する工程、および
PDX1陽性細胞を (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) ステロイドおよび(c) ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程を含む、PTF1A陽性細胞の製造方法。
- [請求項2] PDX1陽性細胞を提供する工程、
PDX1陽性細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程、および
当該PDX1陽性細胞を (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) ステロイドおよび(c) ニコチニアミドからなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が酪酸ナトリウムである、請求項2記載の方法。
- [請求項4] (b) 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類縁体からなる群から選択される物質がホルスコリンである、請求項1～3いずれかに記載の方法。
- [請求項5] (c) ステロイドがデキサメサゾンである、請求項1～4いずれかに記載の方法。
- [請求項6] PDX1陽性細胞をホルスコリン、デキサメサゾン、およびニコチニアミドを含む培地中で培養する工程を含む、請求項1～5何れかに記載の方法。
- [請求項7] PDX1陽性細胞を酪酸ナトリウムを含有する培地中で培養する工程、および当該PDX1陽性細胞をホルスコリン、デキサメサゾン、およびニコチニアミドを含む培地中で培養する工程を含む、請求項6記載の方

法。

[請求項8] さらに多能性幹細胞からPDX1陽性細胞を誘導する工程を含む、請求項1～7いずれかに記載の方法。

[請求項9] 多能性幹細胞が、ヒト由来の細胞である請求項8記載の方法。

[請求項10] 多能性幹細胞が、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞である請求項9記載の方法。

【図1】

PTF1A陽性細胞

PDX1陽性細胞

(D0) 第1工程

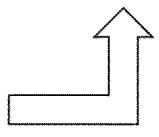
(D0)

第2工程

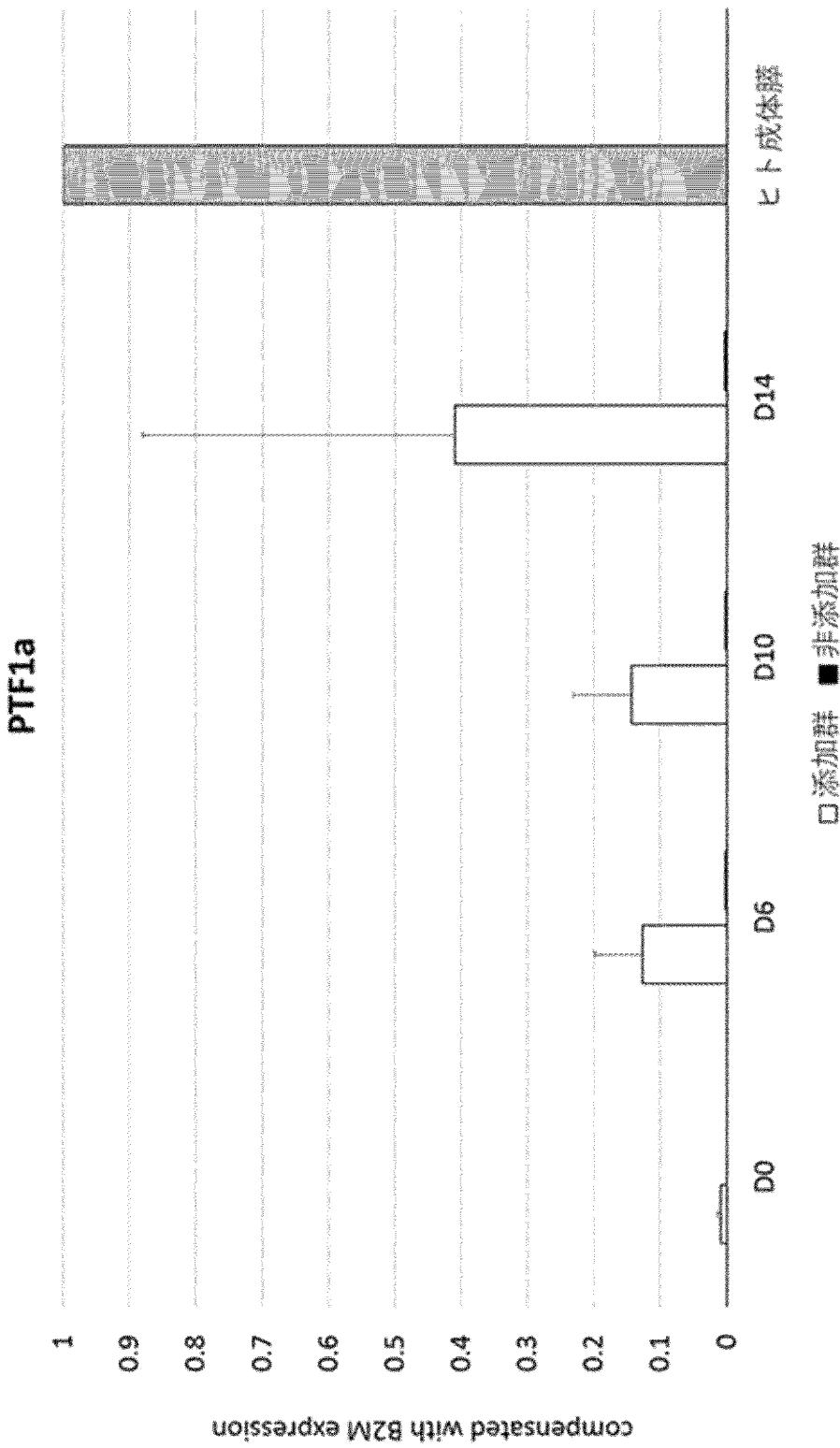
第3工程

iPS細胞 内胚葉細胞 原腸細胞

2日間	2日間	4日間	8日間	1日	1日	4~12日
RPMI培地	RPMI培地	DMEM/F12培地	DMEM/F12培地	DMEM/F12培地	DMEM/F12培地	DMEM/F12培地
2%B27サブリ	2%B27サブリ	2%B27サブリ	2%B27サブリ	2%B27サブリ	2%B27サブリ	2%B27サブリ
アクチビンA	アクチビンA	2.5%マトリケル	酪酸ナトリウム	KGF	KGF	KGF
CHIR99021		KGF	レチノイン酸	シクロパミン	レチノイン酸	レチノイン酸
Y27632		EGF	シクロパミン	シクロパミン	シクロパミン	シクロパミン
ワルトマニン		レチノイン酸	レチノイン酸	Alpha APP modulator	Alpha APP modulator	Alpha APP modulator
		シクロパミン	シクロパミン	ALK5受容体阻害剤	ALK5受容体阻害剤	ALK5受容体阻害剤
		Y27632	ALK5受容体阻害剤	Y27632	Y27632	Y27632
プレート	マトリゲルコート	マトリゲルコート	マトリゲルコート	マトリゲルコート	低接着プレート	低接着プレート
					DMEM/F12培地	DMEM/F12培地
					2%B27サブリ	2%B27サブリ
					KGF	KGF
					EGF	レチノイン酸
					レチノイン酸	シクロパミン
					シクロパミン	シクロパミン
					Alpha APP modulator	Alpha APP modulator
					ALK5受容体阻害剤	ALK5受容体阻害剤
					Y27632	Y27632



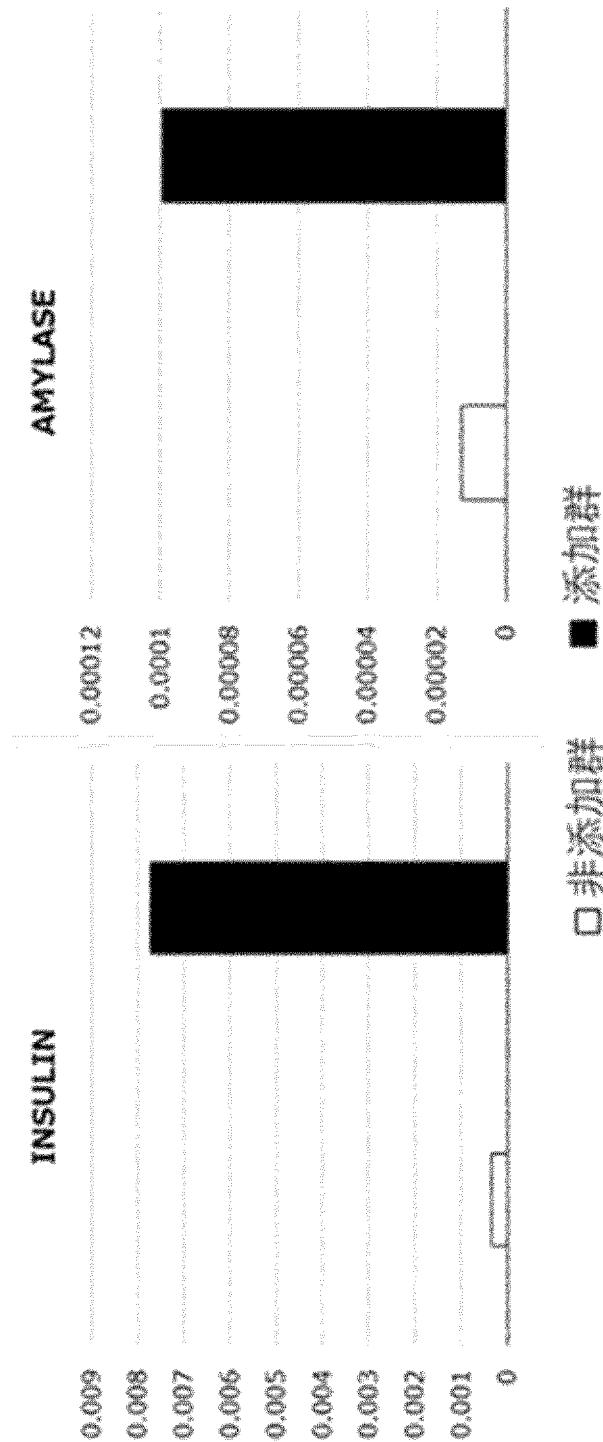
[图2]



WO 2018/021293

PCT/JP2017/026837

[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, C12N5/0735, C12N5/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922–1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996–2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971–2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994–2017

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 (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2011/081222 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 July 2011 (07.07.2011), entire text; particularly, examples 2 to 8, 17 to 31 & US 2013/0022986 A1 entire text; particularly, examples 2 to 8, 17 to 31 & EP 2505639 A1	1, 4–6, 8–10/ 2, 3, 7

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 October 2017 (13.10.17)

Date of mailing of the international search report
24 October 2017 (24.10.17)

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/JP2017/026837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2015/020113 A1 (Kyoto University), 12 February 2015 (12.02.2015), entire text; particularly, paragraph [0033]; fig. 5A; example 4; fig. 5D; example 5; fig. 7C & US 2016/0289642 A entire text; particularly, paragraph [0061]; fig. 5A; example 4; fig. 5D; example 5; fig. 7C & EP 3031905 A	1, 4-6, 8-10/ 2, 3, 7
Y	JP 2015-519048 A (University Health Network), 09 July 2015 (09.07.2015), entire text; particularly, claims; example 1; fig. 3, 4 & US 2015/0104430 A1 entire text; particularly, claims; example 1; fig. 3, 4 & WO 2013/163739 A1 & EP 2844739 A	2, 3, 7
A	JIANG J. et al., Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. <i>Stem Cells</i> , 2007, Vol.25, pp.1940-1953	1-10
A	HAUMAITRE C. et al., Histone Deacetylase Inhibitors Modify Pancreatic Cell Fate Determination and Amplify Endocrine Progenitors. <i>Molecular and Cellular Biology</i> , 2008, Vol.28, No.20, pp.6373-6383	1-10
A	REN M. et al., Sodium butyrate and dexamethasone promote exocrine pancreatic gene expression in mouse embryonic stem cells. <i>Acta Pharmacologica Sinica</i> , 2009, Vol.30, pp.1289-1296	1-10
A	KUMAR S.S. et al., Recent Developments in β -Cell Differentiation of Pluripotent Stem Cells Induced by Small and Large Molecules. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2014, Vol.15, pp.23418-23447	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

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

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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 (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
X/	WO 2011/081222 A1 (武田薬品工業株式会社) 2011.07.07	1, 4-6, 8-10/
Y	全文、特に、実施例2-8、実施例17-31 & US 2013/0022986 A1 全文、特に、実施例2-8、実施例17-31 & EP 2505639 A1	2, 3, 7

※ 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 13. 10. 2017	国際調査報告の発送日 24. 10. 2017
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） 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 3960

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
X/ Y	WO 2015/020113 A1 (国立大学法人京都大学) 2015.02.12 全文、特に、[0033]、図5A、実施例4、図5D、実施例5、図7C & US 2016/0289642 A 全文、特に、[0061]、図5A、実施例4、図5D、実施例5、図7C & EP 3031905 A	1, 4-6, 8-10/ 2, 3, 7
Y	JP 2015-519048 A (ユニバーシティ、ヘルス、ネットワーク) 2015.07.09 全文、特に、請求項、実施例1、図3、図4 & US 2015/0104430 A1 全文、特に、請求項、実施例1、図3、図4 & WO 2013/163739 A1 & EP 2844739 A	2, 3, 7
A	JIANG J. et al., Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells, 2007, Vol.25, pp.1940-1953	1-10
A	HAUMAITRE C. et al., Histone Deacetylase Inhibitors Modify Pancreatic Cell Fate Determination and Amplify Endocrine Progenitors. Molecular and Cellular Biology, 2008, Vol.28, No.20, pp.6373-6383	1-10
A	REN M. et al., Sodium butyrate and dexamethasone promote exocrine pancreatic gene expression in mouse embryonic stem cells. Acta Pharmacologica Sinica, 2009, Vol.30, pp.1289-1296	1-10
A	KUMAR S.S. et al., Recent Developments in β -Cell Differentiation of Pluripotent Stem Cells Induced by Small and Large Molecules. International Journal of Molecular Sciences, 2014, Vol.15, pp.23418-23447	1-10