

明細書

発明の名称

生体組織様構造体の製造方法

技術分野

[0001]

本発明は、多能性幹細胞由来の分化細胞より構成される生体組織様構造体、ならびに、その製造法及び用途に関する。

発明の背景

[0002]

人工多能性細胞や胚性幹細胞（ES細胞）等の多能性幹細胞から誘導される機能性分化細胞は、移植再生医療の細胞供給源として期待されている。今日では、組織工学を用いた移植治療に向け、そのような機能性分化細胞を利用して生体器官や組織と同等又は類似する機能を有する構造体（以下、「生体組織様構造体」と記載する）を構築する試みがなされている。しかしながら、厚みのある、3次元的な構造体を作製しようとした場合、全ての細胞に酸素や栄養分等を十分に供給することができない場合があり、構造体中の細胞を維持・管理することは *in vitro* 及び *in vivo* のいずれにおいても容易ではなかった。そのため、従来の構造体にはその厚みや大きさに制限があり、生体器官や組織と同等又は類似する機能を発揮するには十分ではない場合があった。当該分野においては依然として、厚みのある、3次元的な生体組織様構造体を簡便に作製することができる新たな手法が切望されていた。

[0003]

人工多能性細胞や胚性幹細胞等の多能性幹細胞から、膵β細胞や膵α細胞といったホルモン分泌を行う内分泌細胞を分化誘導し、糖尿病の治療に応用する研究が進められている。これまでに、多能性幹細胞から膵前駆細胞へと分化誘導し、それを生体内に移植し、成熟化させることで内分泌細胞を製造する手法が報告されている。例えば、非特許文献1には、多能性幹細胞から分化誘導された、膵前駆細胞をマウスに移植し、成熟化させることでインスリン陽性細胞及びグルカゴン陽性細胞を含む内分泌細胞を製造する方法が記載されている。しかしながら、これまでにインスリン陽性細胞やグルカゴン陽性細胞などの内分泌細胞を含み、厚みがあり、膵管（duct）や嚢胞（cyst）を含まない、3次元的な生体組織様構造体は製造されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0004]

[非特許文献1] Robert T et al, Stem Cell Reports. 2018 Mar 13; 10 (3): 739-750.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]

本発明は、多能性幹細胞から誘導される分化細胞を包含する生体組織様構造体の新規製造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

[0006]

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、生体適合性材料中に分散して配置された多能性幹細胞由来の細胞を含む組成物を、生体組織中に移植することにより、細胞は生着し、分化誘導され成熟し、ホスト由来の血管や結合組織と共に、生体組織様構造体を構築できることを見出した。

[0007]

本発明はこれらの知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

[1] 生体組織様構造体をホスト動物の生体組織内に作製する方法において使用される、生体適合性材料とヒト多能性幹細胞由来の細胞とを含む組成物であって、ヒト多能性幹細胞由来の細胞が生体適合性材料中に分散して配置されている、組成物。

[2] 生体適合性材料がフィブリンゲルである、[1]の組成物。

[3] フィブリンゲルが、前記組成物の使用の直前に、ヒト多能性幹細胞由来の細胞とフィブリノーゲンとトロンビンを混合してゲル化されたものである、[2]の組成物。

[4] ヒト多能性幹細胞由来の細胞が複数のスフェロイドの形態で存在する、[1]～[3]のいずれかの組成物。

[5] ヒト多能性幹細胞由来の細胞におけるKi67陽性細胞の割合が3%未満である、[1]～[4]のいずれかの組成物。

[6] ヒト多能性幹細胞由来の細胞がインスリン産生細胞である、[1]～[5]のいずれかの組成物。

[7] 前記方法が、前記組成物をホスト動物の生体組織中に移植して、生体適合性材料中に分散して配

置されたヒト多能性幹細胞由来の細胞を分化誘導することを含む、[1]～[6]のいずれかの組成物。

[8] ホスト動物の生体組織が皮下組織である、[7]の組成物。

[9] 生体組織様構造体が、ヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、ホスト動物由来の結合組織、ならびにホスト動物由来の血管を含み、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、[1]～[8]のいずれかの組成物。

[10] 前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、[9]の組成物。

[11] ヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、ホスト動物由来の結合組織、ならびにホスト動物由来の血管を含む生体組織様構造体であって、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、生体組織様構造体。

[12] 前記分化細胞が膵 β 細胞を含む、[11]の生体組織様構造体。

[12-A] 前記分化細胞が膵 β 細胞及び膵 α 細胞を含む、[11]の生体組織様構造体。

[13] 前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、[11]～[12-A]のいずれかの生体組織様構造体。

[14] 前記生体組織様構造体が移植された被検体の血糖値を正常値にコントロールするために用いられる、[11]～[14]のいずれかの生体組織様構造体。

[15] 生体組織様構造体の製造方法であって、

生体適合性材料とヒト多能性幹細胞由来の細胞とを含む組成物であって、ヒト多能性幹細胞由来の細胞が生体適合性材料中に分散して配置されている、組成物をホスト動物の生体組織中に移植して分化誘導することを含む、方法。

[16] 生体適合性材料がフィブリンゲルである、[15]の方法。

[17] フィブリンゲルが、前記組成物の使用の直前に、ヒト多能性幹細胞由来の細胞とフィブリノーゲンとトロンビンを混合してゲル化される、[16]の方法。

[18] ヒト多能性幹細胞由来の細胞が複数のスフェロイドの形態で存在する、[15]～[17]のいずれかの方法。

[19] ヒト多能性幹細胞由来の細胞におけるKi67陽性細胞の割合が3%未満である、[15]～[18]のいずれかの方法。

[20] ヒト多能性幹細胞由来の細胞がインスリン産生細胞である、[15]～[19]のいずれかの方法。

[21] ホスト動物の生体組織が皮下組織である、[15]～[20]のいずれかの方法。

[22] 生体組織様構造体が、分散したヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、ホスト動物由来の結合組織、ならびにホスト動物由来の血管を含み、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、[15]～[21]のいずれかの方法。

[23] 前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、[15]～[22]のいずれかの方法。

[0008]

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2019-075100号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

[0009]

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

発明の効果

[0010]

本発明によれば、多能性幹細胞から誘導される分化細胞を包含する生体組織様構造体の新規製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011]

[図1] 図1は移植前のインスリン産生細胞について、フローサイトメトリーによりタンパク質発現を解析した結果を示す。

[図2] 図2はインスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを移植したストレプトゾトシン(STZ)により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウスにおける血中ヒトC-ペプチド濃度(A)及び血糖値(B)を経時的に測定した結果を示す。

[図3] 図3はストレプトゾトシン(STZ)により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウスの生体内に形成されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のグルコース負荷に対する応答の解析結果を示す。グルコース負荷後の血中ヒトC-ペプチド濃度(A)および血漿中グルコース濃度(B)を経時的に測定した結果を示す。

[図4] 図4は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の写真図を示す。

[図5] 図5は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のH-E染色像を示す。

〔図6〕図6は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のマッソントリクローム染色像を示す。

〔図7〕図7は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のヒト核（HuN）及びPDX1の免疫組織染色像を示す。

〔図8〕図8は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のインスリン（INS）及びグルカゴン（GCG）の免疫組織染色像を示す。

〔図9〕図9は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のマウスCD31（mCD31）及びクロモグラニンA（CHGA）の免疫組織染色像を示す。

〔図10〕図10は移植から6ヶ月後に生体内より摘出されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体のヒト核（HuN）及びKi67の免疫組織染色像を示す。矢印：Ki67陽性細胞。

〔図11〕図11はストレプトゾトシン（STZ）により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウスに対してフィブリンゲルに分散させたインスリン産生細胞を移植し、移植後に経時的に測定した血中ヒトC-ペプチド、グルカゴンおよび血糖値を示す。

〔図12〕図12はストレプトゾトシン（STZ）により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウス及び非糖尿病のNOD/SCIDマウスに対してフィブリンゲルに分散させたインスリン産生細胞を移植し、移植から28週後に生体内より摘出したインスリン産生細胞由来生体組織様構造体におけるインスリンおよびグルカゴン含量の測定結果を示す。上段はインスリン含量の測定結果、下段はグルカゴン含量の測定結果を示し、また、各段において左は各マウスの膵臓における各ホルモン含量の測定結果（対照）を示し、右は摘出したインスリン産生細胞由来生体組織様構造体における各ホルモン含量の測定結果を示す。

〔図13〕図13はフィブリンゲルに分散させたインスリン産生細胞を移植して高血糖が完全に改善したAkita遺伝子変異を有するNOD/SCIDマウスに対し、グルコースを負荷した後に経時的に測定したグルカゴン及びグルカゴン様ペプチド-1を示す。

〔図14〕図14はフィブリンゲルに分散させたインスリン産生細胞を移植して高血糖が完全に改善したSTZ糖尿病NOD/SCIDマウスに対し、グルカゴン受容体アンタゴニストMK-0893を処置した後にグルコースを負荷し、その後経時的に測定した血糖値及び血中ヒトC-ペプチド濃度を示す。

〔図15〕図15はフィブリンゲルに分散させたインスリン産生細胞を移植して高血糖が完全に改善したAkita糖尿病NOD/SCIDマウスに対し、グルカゴン様ペプチド-1受容体アンタゴニストExendin-9を3日間処置し、処置前後に測定した飽食時血中ヒトC-ペプチド濃度を示す。

発明を実施するための形態

[0012]

1. 用語

本明細書において、「約」とは、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ25%、20%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%まで変動する値を示す。好ましくは、「約」又は「およそ」という用語は、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ15%、10%、5%、又は1%の範囲を示す。

[0013]

本明細書において、「～を含む (comprise (s) 又は comprising)」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。

[0014]

本明細書において、「～からなる (consist (s) of 又は consisting of)」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。

[0015]

本明細書において、「フィーダー細胞を使用」しないとは、基本的にフィーダー細胞を含まないこと、フィーダー細胞を培養することによってプレコンディショニングした培地などを使用しないことを意味する。したがって、培地中にはフィーダー細胞から分泌される成長因子及びサイトカインなどの物質は含まれない。

[0016]

なお、「フィーダー細胞」又は「フィーダー」とは、別な種類の細胞と共培養され、その細胞を支持し、成長することができる環境をもたらす細胞を意味する。フィーダー細胞は、それらが支持する細胞とは同じ種由来であっても、異なる種由来であってもよい。例えば、ヒト細胞のフィーダーとして、ヒト皮膚線維芽細胞又はヒト胚性幹細胞を使用してもよいし、マウス胚線維芽細胞の初代培養物、及び不死化マウス胚線維芽細胞を使用してもよい。フィーダー細胞は、放射線照射又はマイトマイシンC処理などによって不活性化することができる。

[0017]

本明細書において、「接着」とは、細胞が容器に付着していること、例えば、細胞が適切な培地の存在下で滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）の細胞培養ディッシュ又はフラスコに付着していることを指す。細胞のなかには、細胞培養容器に接着させなければ培養物中で維持できない、あるいは成長しないものもある。これに対し、非接着性細胞は、容器に接着させることなく培養物中で維持さ

れ、増殖できる。

[0018]

本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、成長させ、かつ／又は分化させることを指す。「培養する」とは、組織又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を持続させ、増殖させ（成長させ）、かつ／又は分化させることを意味する。培養には2次元培養（平面培養）や、3次元培養（浮遊培養）が含まれる。

[0019]

本明細書において、「富化する (enrich)」及び「富化すること (enrichment)」とは、細胞の組成物などの組成物中の特定の構成成分の量を増加させることを指し、「富化された (enriched)」とは、細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、特定の構成成分の量が、富化される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して増加している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して富化することができ、したがって、標的細胞型の割合は、富化される前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について富化することもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって富化することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を富化する方法により、細胞集団が標的細胞集団に関して少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%富化される。

[0020]

本明細書において、「枯渇する (deplete)」及び「枯渇すること (depletion)」とは、細胞もしくは細胞の組成物などの組成物中の特定の構成成分の量を減少させることを指し、「枯渇された (depleted)」とは、細胞もしくは細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、特定の構成成分の量が、枯渇される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して減少している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して枯渇させることができ、したがって、標的細胞型の割合は、枯渇される前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して減少する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について枯渇させることもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって枯渇させることもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を枯渇させる方法により、細胞集団は標的細胞集団に関して少なくとも50%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%減少（枯渇）している。

[0021]

本明細書において、「純化する (purify)」及び「純化すること (purification)」とは、細胞の組成物などの組成物中の不純物を取り除き、特定の構成成分について純粋なものにすることを

指し、「純化された (p u r i f i e d)」とは、細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、不純物の量が、純化される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して減少し、特定の構成成分の純度が向上している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して純化することができ、したがって、標的細胞型の割合は、純化する前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について純化させることもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって純化することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を純化する方法により、標的細胞集団の純度は、少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%になるか、不純物（夾雑細胞を含む）は検出できない程度になりうる。

[0022]

本明細書において、「CDK8/19阻害活性を有する因子」とは、CDK8/19の阻害活性を有するあらゆる物質を意味する。同じCDKファミリーの他のタンパク質とは対照的に、CDK8は、細胞増殖には必要とされず、CDK8の阻害は、通常の条件下では大きな効果はない。CDK19とCDK8は類似しており、CDK8阻害は通常CDK19の阻害も伴う。

[0023]

「増殖因子」は特定の細胞の分化及び／又は増殖を促す内因性タンパク質である。「増殖因子」としては、例えば、上皮成長因子 (EGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様増殖因子1 (IGF-1)、インスリン様増殖因子2 (IGF-2)、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、神経増殖因子 (NGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、形質転換増殖因子ベータ (TGF-β)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、トランスフェリン、種々のインターロイキン（例えば、IL-1～IL-18）、種々のコロニー刺激因子（例えば、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)）、種々のインターフェロン（例えば、IFN-γなど）及び幹細胞に対する効果を有する他のサイトカイン、例えば、幹細胞因子 (SCF) 及びエリスロポエチン (Epo) が挙げられる。

[0024]

本明細書において、「ROCK阻害剤」とは、Rhoキナーゼ (ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) を阻害する物質を意味し、ROCK IとROCK IIのいずれを阻害する物質であってもよい。ROCK阻害剤は、上記の機能を有する限り特に限定されず、例えば、N-(4-ピリジニル)-4β-[(R)-1-アミノエチル] シクロヘキサン-1α-カルボアミド (Y-27632と称することもある)、Fasudil (HA1077)、(2S)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル) スルホニル] ヘキサヒドロ-1H-1, 4-ジアゼピン (H-1152)、4β-[(1R)-1-アミノエチル]-N-(4-ピリジニル) ベンゼン-1ゼンカルボアミド (Wf-536)、N-(1H-ピロロ[2, 3-b]ピリジ

ン-4-イル)-4-PER(R)-1-アミノエチル] シクロヘキサン-1 α -カルボアミド (Y-30141)、N-(3-{[2-(4-アミノ-1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)-1-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]ピリジン-6-イル] オキシ} フェニル)-4-{[2-(4-モルホリニル) エチル]-オキシ} ベンズアミド (GSK269962A)、N-(6-フルオロ-1H-インダゾール-5-イル)-6-メチル-2-オキソ-4-[4-(トリフルオロメチル) フェニル]-3, 4-ジヒドロ-1H-ピリジン-5-カルボキサミド (GSK429286A) を挙げることができる。ROCK阻害剤はこれらに限定されるものではなく、ROCKのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、ROCKに結合する抗体、ドミナントネガティブROCK変異体等もROCK阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0025]

本明細書において、「GSK3 β 阻害剤」とは、GSK3 β (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β) に対する阻害活性を有する物質である。GSK3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3) は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に関与する。GSK3には α と β の2つのアイソフォームが存在する。本発明で用いられる「GSK3 β 阻害剤」は、GSK3 β 阻害活性を有すれば特に限定されず、GSK3 β 阻害活性と合わせてGSK3 α 阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。

[0026]

GSK3 β 阻害剤としては、CHIR98014 (2-[[2-[(5-ニトロ-6-アミノピリジン-2-イル) アミノ] エチル] アミノ]-4-(2, 4-ジクロロフェニル)-5-(1H-イミダゾール-1-イル) ピリミジン)、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)、TDZD-8 (4-ベンジル-2-メチル-1, 2, 4-チアジアゾリジン-3, 5-ジオン)、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)、TWS-119 (3-[6-(3-アミノフェニル)-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-イルオキシ] フェノール)、ケンパウロン (Kenpaulone)、1-アザケンパウロン (Azakenpaulone)、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) 及びAR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO-アセトキシム、ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム複合体、OTDZT、アルファ-4-ジプロモアセトフェノン、リチウム等が例示される。GSK3 β はこれらに限定されるものではなく、GSK3 β のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、GSK3 β に結合する抗体、ドミナントネガティブGSK3 β 変異体等もGSK3 β 阻害剤とし

て使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0027]

本明細書において「血清代替物」とは、例えば、Knockout Serum Replacement (KSR: Invitrogen)、StemSure Serum Replacement (Wako)、B-27サプリメント、N2-サプリメント、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、インスリン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン（例えば、亜セレン酸ナトリウム））、2-メルカプトエタノール、3' チオールグリセロール又はこれらの混合物（例えば、ITS-G）が挙げられる。血清代替物としては、B-27サプリメント、KSR、StemSure Serum Replacement、ITS-Gが好ましい。培地に血清代替物を添加する場合の培地中の濃度は0.01~10重量%、好ましくは0.1~2重量%である。本発明においては、血清に代えて「血清代替物」を使用することが好ましい。

[0028]

本明細書において「FGFR1阻害剤」とは、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）1に対する阻害活性を有する物質である。FGFR1は、成長因子であるFGF1~FGF17に対して高い親和性を有する受容体として、4回膜貫通型チロシンキナーゼのファミリー（FGFR1, 2, 3, 4）のメンバーである。FGFR1阻害剤は、FGFR1阻害活性を有すれば特に限定されず、FGFR1阻害活性と合わせてその他のFGFRの阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。本明細書において「FGFR1阻害剤」とは、FGFR1阻害活性を少しでも有している物質が含まれるが、好ましくは、FGFR1を50%以上阻害する物質を指し、より好ましくはFGFR1の50%阻害濃度（IC₅₀）が1 μM以下、さらに好ましくは100 nM以下である物質を指す。FGFR1阻害活性の判定方法としては、公知の方法から選択すればよく、例えばEnzyChrom Kinase Assay Kit（BioAssay Systems社）を使った判定方法などが挙げられる。FGFR1阻害剤は従来公知のものを利用することが可能であり、特許文献又は非特許文献から見つけることができる。

[0029]

具体的には、本発明において利用可能なFGFR1阻害剤としては、PD-166866（1-[2-アミノ-6-(3, 5-ジメトキシフェニル)-ピリド(2, 3-d)ピリミジン-7-イル]-3-tert-ブチルウレア: CAS No.: 192705-79-6）、E-3810（CAS No.: 1058137-23-7）、PD-173074（CAS No.: 219580-11-7）、FGFR4-IN-1（CAS No.: 1708971-72-5）、FGFR-IN-1（CAS No.: 1448169-71-8）、FIIN-2（CAS No.: 1633044-56-0）、AZD4547（CAS No.: 1035270-39-3）、FIIN-3（CAS No.: 1637735-84-2）、NVP-BGJ398（CAS No.: 1310746-10-1）、NVP-BGJ398（CAS No.: 872511-34-7）、CH5183284（CAS No.: 1265229-25

-1)、Derazantinib (CAS No.: 1234356-69-4)、Derazantinib Racemate、Ferulic acid (CAS No.: 1135-24-6)、SSR128129E (CAS No.: 848318-25-2)、SSR128129E free acid (CAS No.: 848463-13-8)、Erdafitinib (CAS No.: 1346242-81-6)、BLU9931 (CAS No.: 1538604-68-0)、PRN1371 (CAS No.: 1802929-43-6)、S49076 (CAS No.: 1265965-22-7)、LY2874455 (CAS No.: 1254473-64-7)、Linsitinib (CAS No.: 867160-71-2)、Dovitinib (CAS No.: 405169-16-6)、Anlotinib (CAS No.: 1058156-90-3)、Brivanib (CAS No.: 649735-46-6)、Derazantinib (CAS No.: 1234356-69-4)、Anlotinib Dihydrochloride (CAS No.: 1360460-82-7)、ACTB-1003 (CAS No.: 939805-30-8)、BLU-554 (CAS No.: 1707289-21-1)、Rogaratinib (CAS No.: 1443530-05-9)、BIBF 1120 esylate (CAS No.: 656247-18-6)、TG 100572 Hydrochloride (CAS No.: 867331-64-4)、ENMD-2076 (CAS No.: 934353-76-1)、Brivanib alaninate (CAS No.: 649735-63-7)、TG 100572 (CAS No.: 867334-05-2)、BIBF 1120 (CAS No.: 656247-17-5)、ENMD-2076 Tartrate (CAS No.: 1291074-87-7)、TSU-68 (CAS No.: 252916-29-3)、Ponatinib (CAS No.: 943319-70-8)、Sulfatinib (CAS No.: 1308672-74-3)、LY2784544 (CAS No.: 1229236-86-5)、Dovitinib lactate (CAS No.: 692737-80-7)、SU 5402 (CAS No.: 215543-92-3)、FGF-401 (CAS No.: 1708971-55-4)、Tyrosine kinase-IN-1 (CAS No.: 705946-27-6)、PP58 (CAS No.: 212391-58-7)、TG 100801 Hydrochloride (CAS No.: 1018069-81-2)、Crenolanib (CAS No.: 670220-88-9)、TG 100801 (CAS No.: 867331-82-6)、Pazopanib Hydrochloride (CAS No.: 635702-64-6)、Pazopanib (CAS No.: 444731-52-6)、PD168393 (CAS No.: 194423-15-9)、Apatinib (CAS No.: 1218779-75-9)、Palbociclib isethionate (CAS No.: 827022-33-3)、Foretinib (CAS No.: 849217-64-7)、Lenvatinib (CAS No.: 417716-92-8)、Tandutinib (CAS No.: 387867-13-2)、等又はその塩（これらの化合

物を、化合物群Dとする)が例示される。また、これらの化合物は、FGFR1阻害活性を有する限り、好ましくはFGFR1の50%阻害濃度(IC₅₀)が100nM以下である限り、上記より選択される一又は複数の置換基を有していてもよい。

また、これらの化合物は、FGFR1阻害活性を有する限り、好ましくはFGFR1の50%阻害濃度(IC₅₀)が100nM以下である限り、一部の部分構造(置換基、環等)が変換されていてもよい。

[0030]

好ましくは、本発明においてFGFR1阻害剤は、CAS192705-79-6(1-[2-アミノ-6-(3,5-ジメトキシフェニル)-ピリド(2,3-d)ピリミジン-7-イル]-3-tert-ブチルウレア: CAS No.: 192705-79-6)、E-3810(CAS No.: 1058137-23-7)、PD173074(CAS No.: 219580-11-7)である。

[0031]

FGFR1阻害剤は上記に示した化合物に限定されるものではなく、FGFR1のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、FGFR1に結合する抗体、ドミナントネガティブFGFR1変異体等もFGFR1阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0032]

本明細書において、「マーカー」とは、「マーカータンパク質」、「マーカー遺伝子」など、所定の細胞型により特異的に発現される細胞抗原又はその遺伝子を意味する。好ましくは、マーカーは細胞表面マーカーであり、その場合、生存細胞の濃縮、単離、及び/又は検出が実施可能となる。マーカーは、陽性選択マーカー、又は陰性選択マーカーでありうる。

[0033]

マーカータンパク質の検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。マーカー遺伝子の検出は、当該分野で公知の核酸増幅方法及び/又は核酸検出方法、例えば、RT-PCR、マイクロアレイ、バイオチップ等を利用して行うことができる。本明細書中において、マーカータンパク質が「陽性」であるとは、フローサイトメトリーで陽性と検出されることを意味し、「陰性」とは、フローサイトメトリーで検出限界以下であることを意味する。また、マーカー遺伝子が「陽性」であるとは、RT-PCRにより検出されることを意味し、「陰性」とはRT-PCRで検出限界以下であることを意味する。

[0034]

本明細書において、「発現(expression)」とは、細胞内のプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写及び/又は翻訳として定義される。

[0035]

本明細書において、「細胞」とは特記しない限り、細胞の組成物、すなわち細胞集団を意味する。したが

って、「細胞」には特定の細胞だけでなく、一又は複数の別の細胞も含まれ得る。「細胞」における特定の細胞は、富化又は純化することによって、あるいは一又は複数の別の細胞を枯渇することによって高めることができる。

また、本明細書において、「細胞」とは、ヒト細胞が好ましい。

[0036]

2. 多能性幹細胞由来の細胞と生体適合性材料を含む組成物

2-1. 多能性幹細胞由来の細胞

本明細書において、「多能性 (pluripotency)」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、3胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性 (pluripotency)」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる「全能性 (totipotency)」とは区別される。

[0037]

本明細書において「多能性 (multipotency)」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞はmultipotentだが、pluripotentではない。

[0038]

本明細書において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、胚性幹細胞 (ES細胞) 及びこれと同様の分化多能性、すなわち生体の様々な組織 (内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て) に分化する能力を潜在的に有する細胞を指す。ES細胞と同様の分化多能性を有する細胞としては、「人工多能性幹細胞」(本明細書中、「iPS細胞」と称することもある) が挙げられる。好ましくは、本発明において、多能性幹細胞とはヒト多能性幹細胞である。

[0039]

「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、inGenious社、理研等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞であれば、NIH、理研、京都大学、Cellartis社が樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。たとえばES細胞株としては、NIHのCHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株等、WisCell ResearchのH1株、H9株、理研のKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。

[0040]

「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子 (核初期化因子) を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPS細胞 (Takahashi K, Yamanaka S.,

Cell, (2006) 126:663-676)のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPS細胞(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131:861-872.)、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞(Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106))、ウイルスフリーで6因子を導入して樹立されたiPS細胞(Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.)も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞(Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318:1917-1920.)、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451:141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞(特開2008-307007号)等も用いることができる。

[0041]

このほか、公開されているすべての論文(例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574.; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、あるいは特許(例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008/2336610、US2009/047263、WO2007/069666、WO2008/118220、WO2008/124133、WO2008/151058、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852)に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0042]

人工多能性細胞株としては、NIH、理化学研究所(理研)、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学のFf-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJI01s01株、QHJI01s04株、QHJI14s03株、QHJI14s04株、RWMH15s02株、Ff-MH15s02株、253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、CDI

社のMyCell iPS Cells (21525.102.10A) 株、MyCell iPS Cells (21526.101.10A) 株、等が挙げられる。

[0043]

本明細書において、「多能性幹細胞由来の細胞」とは、多能性幹細胞より分化誘導して得られた細胞を意味し、このような細胞としては、多能性幹細胞より分化誘導された外胚葉系統の細胞、中胚葉系統の細胞、もしくは内胚葉系統の細胞、またはそれらの組み合わせからなる細胞が挙げられる。より詳細には、多能性幹細胞より分化誘導された、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、膵臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓等（これらに限定はされない）の器官や組織を構成する細胞やその前駆細胞と同等又は類似する機能を有する細胞を意味する。

[0044]

好ましくは本発明において「多能性幹細胞由来の細胞」は、細胞同士が集合・凝集化した細胞集合体の状態、すなわちスフェロイドの形態を有する。多能性幹細胞由来の細胞のスフェロイドは浮遊培養等の従来公知の手法により作製することが可能であり、あるいは、培養底面に微細空間が配置されたスフェロイド形成用の培養プレート（例えば、商品名：エルプラシア（株式会社クラレ）、商品名：EZSPHERE（AGCテクノグラス株式会社）、商品名：Corningスフェロイドマイクロプレート（コーニングインターナショナル株式会社）を使用してもよい。スフェロイドは直径が約 $10\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ 、より好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $200\mu\text{m}$ 程度の大きさを有する。ならびに／あるいは、スフェロイドは約100～約1000個、好ましくは約200～約800個、より好ましくは約300個～約500個程度の細胞からなる。

[0045]

本発明の一実施形態において「多能性幹細胞由来の細胞」は、多能性幹細胞から膵 β 細胞へと分化する過程において出現する、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞であり、特に好ましくはインスリン産生細胞である。

[0046]

多能性幹細胞から膵 β 細胞へと分化する過程においては、分化段階に応じて異なる特徴を有する細胞が出現することが知られている（WO2009/012428、WO2016/021734）。例えば、この分化段階は比較的未分化な順に、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞、膵 β 細胞に大きく分類することができる。

[0047]

「胚体内胚葉細胞」とは、SOX17、FOXA2、BMP2、CER、及びCXCR4の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0048]

「原腸管細胞」とは、HNF1B、及びHNF4Aの少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付

けられる細胞を意味する。

[0049]

「後方前腸細胞」とは、PDX-1、HNF 6、及びHLXB 9の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0050]

「膵前駆細胞」とは、PDX-1、NKX 6. 1、PTF-1 α 、GATA 4及びSOX 9の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0051]

「内分泌前駆細胞」とは、クロモグラニンA、NeuroD及びNGN 3の少なくとも一つのマーカーの発現、及び膵関連のホルモン系（例えば、インスリン等）のマーカーが発現していないことによって特徴付けられる細胞を意味する。内分泌前駆細胞は、PAX-4、NKX 2-2、Islet-1、PDX-1、PTF-1 α などのマーカーが発現していてもよい。

[0052]

「インスリン産生細胞」は、インスリンのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。より詳細には、「インスリン産生細胞」は、インスリン及びNKX 6. 1の両方のマーカーを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつNKX 6. 1陽性の細胞以下、「Ins+NKX+細胞」と記載する）を約30%以上の割合で含み、かつマーカーとしてインスリン及びNKX 6. 1のうちインスリンのみを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつNKX 6. 1陰性の細胞、以下、「Ins+NKX-細胞」と記載する）を約15%超の割合で含むことによって特徴付けられる。インスリン産生細胞における、Ins+NKX+細胞の割合の上限は特に限定されないが、好ましくは約50%以下とすることができる。

[0053]

インスリン産生細胞における、Ins+NKX-細胞の割合は好ましくは約20%以上、より好ましくは約25%以上、さらに好ましくは約30%以上とすることができる。また、インスリン産生細胞における、Ins+NKX-細胞の割合の上限は特に限定されないが、好ましくは約40%以下とすることができる。

[0054]

例えば、インスリン産生細胞は、Ins+NKX+細胞を約30%以上、約50%以下の割合で含み、かつIns+NKX-細胞を約15%超、約40%以下の割合、好ましくは、約20%以上、約40%以下の割合、より好ましくは約25%以上、約40%以下の割合、さらに好ましくは約30%以上、約40%以下の割合で含む。

[0055]

なお、本明細書中、インスリン産生細胞における所定の細胞の割合とは、インスリン産生細胞に含まれる全細胞数に対する割合を意味する。また、各細胞の割合は、膵島様細胞への分化誘導に付される（すな

わち、生体内への移植に付される) インスリン産生細胞における値を示す。

[0056]

I n s + N K X -細胞は、成熟していない(分化段階の早い) インスリン産生細胞に多く見られることから、I n s + N K X -細胞の割合が高いほど、より成熟していない(分化段階の早い) インスリン産生細胞であることを示す。

[0057]

インスリン産生細胞はさらに、以下のa. ～f.:

- a. M A F A遺伝子又はそのタンパク質の発現量が低いこと、
- b. K i 6 7陽性細胞の割合が低いこと、
- c. グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと、
- d. グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと、
- e. クロモグラニンA陽性細胞の割合が高いこと、
- f. アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと、

から選択される一又は複数により特徴付けることができる。ここで「複数」とは、2, 3, 4, 5又は6を意味する。

[0058]

- a. M A F A遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が低いこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、M A F A遺伝子又はそのタンパク質の発現量が、膵島におけるM A F A遺伝子又はそのタンパク質の発現量と比べて低いことを特徴とする。

[0059]

「膵島」とは、インスリン産生細胞よりも分化段階が進んだ細胞を意味し、成熟した膵β細胞を含み、成熟した膵β細胞のマーカーであるM A F A、U C N 3、及びI A P Pの少なくとも一つの発現により特徴付けられる細胞である。膵島は、健常人より単離されたものを用いることができる。

[0060]

インスリン産生細胞と膵島間のM A F A遺伝子又はそのタンパク質の発現量の比較は、当該分野で公知の手法を用いて行うことができ、例えば、R T - P C R、マイクロアレイ、バイオチップ、ウェスタンブロット、E L I S A、免疫染色、フローサイトメトリー等の手法を用いて検出・定量されたM A F A遺伝子又はそのタンパク質の発現量を、内部標準遺伝子又はそのタンパク質の発現量で補正して得られた相対値を比較することにより行うことができる。「内部標準遺伝子」は特に限定されないが、例えば、G A P D H (g l y c e r a l d e h y d r e - 3 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e)、β-アクトチン、β2-ミクログロブリン、H P R T 1 (h y p o x a n t h i n e p h o s p h o r i b o s y l t r a n s f e r a s e 1) 等を利用することができる。

[0061]

インスリン産生細胞におけるMAFA遺伝子又はそのタンパク質の発現量は、膵島におけるMAFA遺伝子又はそのタンパク質の発現量の約20%以下、好ましくは約15%以下、より好ましくは約10%以下、さらに好ましくは約5%以下、とりわけ好ましくは約1%以下である。

[0062]

MAFA遺伝子又はそのタンパク質は成熟した膵β細胞のマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、成熟した膵β細胞をほとんど含まないか、低い割合で含む程度の分化段階にあることを示す。

[0063]

b. Ki67陽性細胞の割合が低いこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、Ki67陽性細胞を3%未満の割合で含むことを特徴とする。

[0064]

「Ki67陽性細胞」とは、多能性幹細胞から分化誘導されたインスリン産生細胞中に混在する、マーカーとしてKi67の発現によって特徴付けられる増殖性の高い細胞を意味する。「Ki67」は細胞周期関連核タンパク質として公知であり、増殖中の細胞のG1期、S期、G2期、M期において発現が認められ、増殖を休止しているG0期においては発現が認められないため、細胞増殖と細胞周期のマーカーとしても知られている。

[0065]

以下、本明細書中において「Ki67陽性」を「Ki67+」と記載する場合がある。また、「Ki67陽性細胞」を「Ki67+細胞」と記載する場合がある。

[0066]

インスリン産生細胞におけるKi67+細胞の割合は、約3%未満、好ましくは約1%未満、より好ましくは約0.8%未満、さらに好ましくは約0.5%未満である。

[0067]

本特徴はインスリン産生細胞において、Ki67+細胞の混入・残存がほとんどないか、低い割合であることを示す。Ki67+細胞はその増殖性の高さから、最終的に得られる生体組織様構造体への悪影響や生着に影響を及ぼす虞があり、その混入・残存は好ましくない場合がある。

[0068]

c. グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、グルカゴン陽性かつIns-細胞を3%未満の割合で含むことを特徴とする。以下、本明細書中において「グルカゴン陽性」を「Gcg+」と記載する場合がある。また、「グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞」を「Gcg+Ins-細胞」と記載する場合がある。

[0069]

インスリン産生細胞におけるGcg+Ins-細胞の割合は、約2.5%以下、好ましくは約2%以下、より好ましくは約1%以下、さらに好ましくは約0.5%以下である。

[0070]

Gcg+Ins-は成熟した膵 α 細胞のマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、成熟した膵 α 細胞をほとんど含まないか、低い割合で含む程度の分化段階にあることを示す。

[0071]

d. グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、グルコース刺激性インスリン分泌(GSIS:Glucose Stimulated Insulin Secretion) 応答を示す。

インスリン産生細胞におけるGSIS応答は、従来公知の手法(例えば、米国出願第11/773,944号)に準じて行うことができ、例えば、培地中に分泌されるC-ペプチドの量を測定することにより評価することができる。C-ペプチドは、プロインスリンの成熟化の間に、インスリンに対して等モル量にて産生される分解産物である。C-ペプチドの量を測定は、例えば、抗C-ペプチドモノクローナル抗体を用いたELISAにより行うことができる。

[0072]

e. クロモグラニンA陽性細胞の割合が高いこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、クロモグラニンA陽性細胞を約45%超の割合で含むことを特徴とする。

[0073]

以下、本明細書中において「クロモグラニンA陽性」を「Chga+と記載する場合がある。また、「クロモグラニンA陽性細胞」を「Chga+細胞」と記載する場合がある。

[0074]

インスリン産生細胞における、Chga+細胞の割合は好ましくは約50%以上(例えば、約55%以上)、より好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、よりさらに好ましくは約80%以上、とりわけ好ましくは約90%以上とすることができる。インスリン産生細胞におけるChga+細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約99%以下とすることができる。

[0075]

Chga+細胞にはインスリン等のホルモンを分泌する細胞(内分泌細胞)が含まれ、これには上記Ins+NKX+細胞やIns+NKX-細胞も含まれる。したがって、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、内分泌細胞を高い割合で含むことを示す。

[0076]

f. アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと

本発明におけるインスリン産生細胞は、アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を約0.01%未満の割合で含むことを特徴とする。

[0077]

インスリン産生細胞における、アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合は好ましくは約0.008%以下、より好ましくは約0.005%以下、さらに好ましくは約0.001%以下とすることができる。

[0078]

アルカリフォスファターゼは多能性幹細胞の未分化状態を示すマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、分化誘導されていない目的外の多能性幹細胞をほとんど含まないか、低い割合で含むことを示す。

[0079]

アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞は、多能性を示す他のマーカーをさらに発現していてもよい。多能性幹細胞の多能性を示す他のマーカーとしては、NANOG、SOX2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81等から選択される少なくとも一つを利用することができる。

[0080]

多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、腭前駆細胞、内分泌前駆細胞、及びインスリン産生細胞への分化誘導は、以下の分化誘導工程を利用して行うことができる：

- 工程1) 多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞へと分化誘導する；
- 工程2) 胚体内胚葉細胞から原腸管細胞へと分化誘導する；
- 工程3) 原腸管細胞から後方前腸細胞へと分化誘導する；
- 工程4) 後方前腸細胞から腭前駆細胞へと分化誘導する；
- 工程5) 腭前駆細胞から内分泌前駆細胞へと分化誘導する；
- 工程6) 内分泌前駆細胞からインスリン産生細胞へと分化誘導する。

以下、各工程を説明するが、各細胞への分化誘導はこれらの手法に限定されない。

[0081]

工程1) 胚体内胚葉細胞への分化

多能性幹細胞は、低用量のアクチビンAを含む培地中で培養して、胚体内胚葉細胞に分化させる。

[0082]

本工程で用いる培地としては、RPMI培地、MEM培地、iMEM培地、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）培地、Improved MEM Zinc Option培地、Improved MEM/1%B-27サプリメント/Penicillin Streptomycin培地、MCDB131/10mM Glucose/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-

X/Glutamax/アスコルビン酸/Penicillin Streptomycin培地など、哺乳類細胞の培養に使用される基本培地を使用することができる。

[0083]

アクチビンAは培地中に低用量にて、例えば、 $5 \sim 10 \text{ ng/mL}$ の量にて含めることができる。

別の態様として、アクチビンAの培地中の濃度は、約 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは約 $3 \sim 10 \text{ ng/mL}$ である。

[0084]

培地にはさらに、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤を添加することができる。

[0085]

GSK3 β 阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常 $2 \sim 5 \mu\text{M}$ 、好ましくは $2 \sim 4 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $3 \mu\text{M}$ である。

[0086]

ROCK阻害剤の培地中の濃度は、用いるROCK阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばROCK阻害剤としてY27632を使用する場合の濃度は、通常 $5 \sim 20 \mu\text{M}$ 、好ましくは $5 \sim 15 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $10 \mu\text{M}$ である。

[0087]

培地にはさらに、インスリンを添加することができる。インスリンは培地中に $0.01 \sim 20 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $0.5 \sim 5 \mu\text{M}$ の量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したB-27サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0088]

培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、2次元培養であれば、約 $5 \text{ 万} \sim 100 \text{ 万細胞個/cm}^2$ 、好ましくは約 $10 \text{ 万} \sim 80 \text{ 万細胞個/cm}^2$ 、より好ましくは約 $10 \sim 30 \text{ 万細胞個/cm}^2$ とすることができる。また、培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、3次元培養であれば、約 $1 \text{ 万} \sim 100 \text{ 万細胞個/mL}$ 、好ましくは約 $10 \text{ 万} \sim 80 \text{ 万細胞個/mL}$ 、より好ましくは約 $30 \text{ 万} \sim 60 \text{ 万細胞個/mL}$ とすることができる。培養期間は1日～4日、好ましくは1日～3日、特に好ましくは3日である。

[0089]

培養温度は、特に限定されないが、 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ （例えば、 37°C ）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0090]

あるいは、本発明において胚体内胚葉細胞は、低用量のアクチビンAの存在下、多能性幹細胞を、イン

スリンが作用する条件下の培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第2の培養を行うことにより製造することができる。

[0091]

(1) 第1の培養

「インスリンが作用する条件」とは、インスリンによって細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる条件を意味する。通常、インスリンは、細胞膜表面上に存在するインスリンレセプターと結合し、レセプターに内在するチロシンキナーゼを活性化させ、インスリンレセプター基質タンパクファミリー（IRS：IRS-1，2，3）をチロシンリン酸化する。本明細書においては、インスリンとインスリンレセプターとの結合により開始されるこれら一連の反応が生じることを、「インスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる」という。

[0092]

インスリンが作用する条件としては、例えば、培地中にインスリンを含む場合が挙げられる。インスリンは、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路を活性化できるものであればよく、組換え法で製造したものであっても、固相合成法で合成して製造したものであってもよい。インスリンは、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット等由来するものを利用することができるが、好ましくはヒトインスリンである。

[0093]

本発明においては、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる限り、インスリン変異体、インスリン誘導体又はインスリンアゴニストも、「インスリン」として用いることができる。「インスリン変異体」とは、インスリンのアミノ酸配列において1～20個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドや、インスリンのアミノ酸配列と80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドを有するものが挙げられる。アミノ酸配列の比較は公知の手法によって行うことができ、例えば、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等を例えば、デフォルトの設定で用いて実施できる。「インスリン誘導体」とは、インスリン又はインスリン変異体のアミノ酸残基の一部の基が化学的に置換（例えば、 α -メチル化、 α -ヒドロキシル化）、欠失（例えば、脱アミノ化）、又は修飾（例えば、N-メチル化）されたアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドまたは同様の作用を有する物質を意味する。「インスリンアゴニスト」とは、インスリンの構造に関係なく、インスリンレセプターと結合してインスリンシグナル伝達経

路の活性化を生じることが可能なポリペプチドまたは同様の作用を有する物質を意味する。

[0094]

第1の培養の培地には、インスリンを0.01~20 μ M、好ましくは0.1~10 μ M、より好ましくは0.5~5 μ Mの量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したB-27サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0095]

培地にはさらに、ROCK阻害剤、及び／又はGSK3 β 阻害剤を含めることができる。ROCK阻害剤の培地中の濃度は、用いるROCK阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばROCK阻害剤としてY-27632を使用する場合の濃度は、通常5~20 μ M、好ましくは5~15 μ M、特に好ましくは約10 μ Mとすることができる。GSK3 β 阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常2~5 μ M、好ましくは2~4 μ M、特に好ましくは約3 μ Mとすることができる。

[0096]

培地にはさらに、ピルビン酸塩（ナトリウム塩等）、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。ピルビン酸塩は培地中に、10~1000 mg/L、好ましくは30~500 mg/L、より好ましくは50~200 mg/L、特に好ましくは約110 mg/Lの量で含めることができる。L-アラニルL-グルタミンは培地中に、50~2000 mg/L、好ましくは100~1500 mg/L、より好ましくは500~1000 mg/L、特に好ましくは約860 mg/Lの量で含めることができる。グルコースは培地中に、15 mM以上、好ましくは15~30 mM、より好ましくは15~25、特に好ましくは約25 mMの量で含めることができる。培地中のピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン及びグルコースの濃度は、DMEM培地（DMEM, high glucose, GlutaMAXTM, pyruvate (Thermo Fisher Scientific)) またはその他のDMEM培地に含まれるピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン及びグルコースの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0097]

培地は、上記基本培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものをを用いることができる。基本培地としては、好ましくはDMEM培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むDMEM培地である。

[0098]

第1の培養の培養期間は6時間~48時間、好ましくは12~24時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、30~40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、2次元培養であれば、約5万~100万細胞個/cm²、

好ましくは約10万～80万細胞個/cm²、より好ましくは約10～30万細胞個/cm²とすることができる。また、培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、3次元培養であれば、約1万～100万細胞個/mL、好ましくは約10万～80万細胞個/mL、より好ましくは約30万～60万細胞個/mLとすることができる。

[0099]

(2) 第2の培養

「インスリンが作用しない条件」とは、インスリンによる細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない条件を意味する。「細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じない」とは、当該インスリンシグナル伝達経路の活性化が全く生じないことを意味するだけでなく、インスリン非存在下における当該インスリンシグナル伝達経路の活性化と比べて有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない場合も意味するものである。したがって、「インスリンが作用しない条件」とは、例えば、培地中にインスリンが含まれないこと、あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、その量が前記有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない量で含まれる条件が挙げられる。あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、一緒にインスリンシグナル阻害剤を含むことによって、前記インスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない場合も意味する。「インスリンシグナル阻害剤」は、インスリンシグナル伝達経路をいずれかの位置で遮断することが可能な成分を意味する。このようなインスリンシグナル阻害剤としては、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質等に結合して又は競合し、これら因子が関与する分子間の相互作用を阻害するポリペプチドや化合物等が挙げられる。例えば、このようなインスリンシグナル阻害剤としては、P I 3キナーゼの触媒サブユニットへのATP結合を競合阻害するLY294002[2-(4-モルホリニル)-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン]等が挙げられる。インスリンシグナル阻害剤はこれらに限定されるものではなく、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質に結合する抗体やそれらのドミナントネガティブ型変異体、ならびにインスリンレセプターやシグナル伝達物質として作用する各種タンパク質のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA等もインスリンシグナル阻害剤として使用することができる。インスリンシグナル阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0100]

培地にはさらに、ROCK阻害剤、及び/又はGSK3β阻害剤を含めることができる。培地中のROCK阻害剤、及び/又はGSK3β阻害剤の量は上記第1の培養において記載した範囲より選択することができ、第1の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0101]

培地にはさらに、ピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。培地中のピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコー

スの量は上記第1の培養において記載した範囲より選択することができ、第1の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0102]

第2の培養で用いる培地培地は、哺乳類細胞の培養に使用される基本培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものをを用いることができる。基本培地としては、上記第1の培養において記載したものをを用いることができ、第1の培養にて用いられるものと同じ基本培地であってもよいし、異なってもよい。好ましくは、DMEM培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むDMEM培地である。

[0103]

第2の培養の培養期間は少なくとも6時間、好ましくは6〜72時間、さらに好ましくは24時間〜72時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、30〜40℃（例えば、37℃）で行う。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0104]

第1の培養及び第2の培養の培地には、アクチビンAを上記低用量にて含めることができる。第1の培養及び第2の培養の培地に含まれるアクチビンAの量は同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0105]

第1の培養及び第2の培養の培地にはさらに、ジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0106]

多能性幹細胞を、低用量のアクチビンAの存在下にて培養を行うことによって、あるいは、多能性幹細胞を、低用量のアクチビンAの存在下、インスリンが作用する条件下の培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第2の培養を行うことによって、工程6)以降にて、得られる内分泌細胞の割合を高めることができる。

[0107]

工程2) 原腸管細胞への分化

工程1) で得られた胚体内胚葉細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して原腸管細胞に分化誘導する。培養期間は2日〜8日、好ましくは約4日である。

培養温度は、特に限定されないが、30〜40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0108]

培地は、上記工程1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0109]

増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、EGF及び／又はKGFがより好ましく、KGFがさらに好ましい。

[0110]

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 μM、好ましくは約0.1 nM～100 μMである。EGFの場合、その濃度は、約5～2000 ng/ml（すなわち、約0.8～320 nM）、好ましくは約5～1000 ng/ml（すなわち、約0.8～160 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/ml（すなわち、約1.6～160 nM）である。FGF10の場合、その濃度は、約5～2000 ng/ml（すなわち、約0.3～116 nM）、好ましくは約10～1000 ng/ml（すなわち、約0.6～58 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/ml（すなわち、約0.6～58 nM）である。例えば増殖因子としてKGFを使用する場合の濃度は、通常5～150 ng/mL、好ましくは30～100 ng/mL、特に好ましくは約50 ng/mLである。

[0111]

工程3) 後方前腸細胞への分化

工程2) で得られた原腸管細胞を、さらに増殖因子、シクロパミン、ノギン等を含む培地で培養し、後方前腸細胞に分化誘導する。培養期間は1日～5日、好ましくは約2日程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。

[0112]

培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0113]

培地は、上記工程1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0114]

増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、EGF及び／又はKGFがより好ましく、KGFがさらに好ましい。

[0115]

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 μM、好ましくは約0.1 nM～100 μMである。EGFの場合、その濃度は、約5～2000 ng/ml（すなわち、約0.8～320 nM）、好ましくは約5～1000 ng/ml（すなわち、約0.8～160 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/ml（すなわち、約1.6～160 nM）である。FGF10の場合、その濃度は、約5～2000 ng/ml（すなわち、約0.3～116 nM）、

好ましくは約 $10 \sim 1000 \text{ ng/ml}$ （すなわち、約 $0.6 \sim 58 \text{ nM}$ ）、より好ましくは約 $10 \sim 1000 \text{ ng/ml}$ （すなわち、約 $0.6 \sim 58 \text{ nM}$ ）である。例えば増殖因子としてKGFを使用する場合の濃度は、通常 $5 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは $30 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、特に好ましくは約 50 ng/mL である。

[0116]

シクロパミンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.3 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $0.5 \mu\text{M}$ である。

[0117]

ノギンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常 $10 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは $50 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、特に好ましくは約 100 ng/mL である。

また培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0118]

工程4) 腭前駆細胞への分化

工程3)で得られた後方前腸細胞を、さらにCDK8/19阻害活性を有する因子を含む培地、好ましくはCDK8/19阻害活性を有する因子と増殖因子を含む培地で培養し、腭前駆細胞に分化誘導してもよい。培養期間は2日～10日、好ましくは約5日程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。2次元培養の場合には、工程3)で得られた後方前腸細胞を、既報(Toyoda et al., Stem cell Research (2015) 14, 185-197)に従い、0.25%トリプシン-EDTAで処理後にピペッティングすることにより分散し、0.25%トリプシン-EDTAを遠心分離して懸濁した後、工程4)の新しい培地に再播種する。

[0119]

培地は、工程1)と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

[0120]

CDK8/19阻害活性を有する因子としては、前述した各種化合物又はその塩を用いることができ、用いる化合物又はその塩に応じて、培地への添加量は適宜決定されるが、通常約 $0.00001 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.00001 \mu\text{M} \sim 1 \mu\text{M}$ である。CDK8/19阻害活性を有する因子の培地中の濃度としては、CDK8/19に対して50%以上の阻害活性に達する濃度が好ましい。

[0121]

増殖因子としては、EGF、KGF、FGF10が好ましく、KGF及び／又はEGFがより好ましく、KGF及びEGFがさらに好ましい。

[0122]

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約 $0.1 \text{ nM} \sim 1$

000 μ M、好ましくは約0.1 nM~100 μ Mである。EGFの場合、その濃度は、約5~2000 ng/ml (すなわち、約0.8~320 nM)、好ましくは約5~1000 ng/ml (すなわち、約0.8~160 nM)、より好ましくは約10~1000 ng/ml (すなわち、約1.6~160 nM)である。FGF10の場合、その濃度は、約5~2000 ng/ml (すなわち、約0.3~116 nM)、好ましくは約10~1000 ng/ml (すなわち、約0.6~58 nM)、より好ましくは約10~1000 ng/ml (すなわち、約0.6~58 nM)である。例えば増殖因子としてKGF及びEGFを使用する場合の濃度は、EGFは通常通常5~150 ng/mL、好ましくは30~100 ng/mL、特に好ましくは約50 ng/mL、KGFは通常10~200 ng/mL、好ましくは50~150 ng/mL、特に好ましくは約100 ng/mLである。

[0123]

工程4)における培養の最初の1日はROCK阻害剤の存在下で行い、以後はROCK阻害剤を含まない培地で培養してもよい。

[0124]

また、培地にはPKC活性化剤を含めても良い。PKC活性化剤としては、Pdbu (PKC activator II)、TPB (PKC activator V) などを使用するが、その限りでない。PKC活性化剤の濃度は約0.1~100 ng/ml、好ましくは約1~50 ng/ml、より好ましくは約3~10 ng/mlで添加する。

また、培地にはジメチルスルホキシド、アクチビン (1~50 ng/ml) を添加してもよい。

[0125]

いずれの工程においても、培地には、上記した成分のほか、血清代替物 (例えば、B-27サプリメント、ITS-G) を添加してもよい。また、必要に応じて、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (製品名)、非必須アミノ酸、ビタミン、ニコチンアミド、抗生物質 (例えば、Antibiotic-Antimycotic (本明細書中、AAと称することがある)、ペニシリン、ストレプトマイシン、又はこれらの混合物)、抗菌剤 (例えば、アンホテリシンB)、抗酸化剤、ビルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を添加してもよい。培地に抗生物質を添加する場合には、その培地中の濃度は通常0.01~20重量%、好ましくは0.1~10重量%である。

培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養温度は、特に限定されないが、30~40℃ (例えば、37℃) で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0126]

工程5) 内分泌前駆細胞への分化

工程4) で得られた膵前駆細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して内分泌前駆細胞に分化誘導する。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。2次元培養の場合には、工程4) で得られた膵前駆細胞を、0.25%トリプシン-EDTAで処理後にピペッティングすることにより分散し、

0. 25%トリプシン-EDTAを遠心分離して懸濁した後、工程5)の新しい培地に再播種する。培養期間は2日～3日、好ましくは約2日である。

[0127]

培地は、上記工程1)にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報 (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、SANT1、レチノイン酸、ALK5インヒビターII、T3、LDNを添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF (好ましくはFGF2)、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。また、培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0128]

培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート (Nunc社) 等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。

培養温度は、特に限定されないが、30～40℃ (例えば、37℃) で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0129]

工程6) インスリン産生細胞への分化

工程5) で得られた内分泌前駆細胞を、さらにFGFR1阻害剤を含む培地で培養してインスリン産生細胞に分化誘導する。培養期間は10日～30日、好ましくは約10～20日である。

[0130]

培地は、上記工程1)にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報 (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、ALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤XX、 γ -secretase阻害剤RO、N-システイン、AXLインヒビター、アスコルビン酸を添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF (好ましくはFGF2)、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。例えば、培地にはALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいはT3、ALK5インヒビターII、ZnSO₄、ヘパリン、N-アセチルシステイン、Trolox、及びR428を添加してもよい。

[0131]

培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。好ましくは、培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート (Nunc社) 等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。

[0132]

培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0133]

培地には、FGFR1阻害剤を、FGFR1活性を阻害することが可能な任意の量にて含めることができ、例えば、10 μ M以下、又は5 μ M以下の量にて、好ましくは5 μ M未満、4 μ M未満、3 μ M未満、2 μ M未満の量にて含めることができる。FGFR1阻害剤の添加量の下限は、特に限定されないが、0.1 μ M以上、好ましくは0.5 μ M以上とすることができる。FGFR1阻害剤の添加量は、好ましくは、5 μ M未満0.1 μ M以上であり、より好ましくは5 μ M未満0.5 μ M以上である。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、少なくとも12時間、好ましくは24時間以上、2日以上、4日以上、8日以上、10日以上、又は15日以上行うことができる。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、4日以上行うことが好ましい。例えば、工程6)の最後の約4～15日、好ましくは最後の約4～7日間について、FGFR1阻害剤の存在下における培養を行うことができる。FGFR1阻害剤による処理期間中も培地の交換は可能であり、培養スケジュールにしたがって、FGFR1阻害剤が添加された交換前と同じ組成を有する培地又は異なる組成を有する培地と交換することができる。

FGFR1阻害剤を含む培地中で、細胞を培養することによって、得られるインスリン産生細胞におけるKi67陽性細胞の増殖を抑制することができる。

[0134]

工程6)で得られたインスリン産生細胞は、トリプシン等の酵素を用いて解離し回収することができる。回収されたインスリン産生細胞は使用するまで凍結保存することができる。次いで、回収されたインスリン産生細胞を上記培地中に、1培養器または1ウェルあたり、約50万～500万個、好ましくは約100万～400万個、より好ましくは約200万～300万個の量で播種して3次元培養を行い、インスリン産生細胞をスフェロイドの形態で得ることができる。各スフェロイドは約100～約1000個、好ましくは約200～約800個、より好ましくは約300個～約500個程度の細胞からなる。

[0135]

2-2. 生体適合性材料

本明細書において「生体適合性材料」とは生体内に移植し、短期又は長期留置した場合に、顕著な免疫応答や有害な生体反応（例えば、毒性反応、凝血等）を誘導しない任意の材料を意味する。好ましくは、「生体適合性材料」は移植後、ホストの血管新生、結合組織の産生を促すものである。また、「生体適合性材料」は生分解性材料であることが好ましい。このような材料としては、ポリ乳酸（PLA）、ポリプロラクトン（PCL）、ポリウレタン（PU）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸- α -グリコール酸（PLGA）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート- α -ヒドロキシバリレート）（PHBV）、ポリ（エチレン- α -ビニルアセテ

ート) (PEVA) ポリアクリルアミド、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンアミン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリビニルアルコール、ポリフマル酸プロピレン、ポリアクリル酸、ポリε-カプロラクトン、ポリメタクリル酸、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)、ペクチン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ヘパリン、キチン、キトサン、キサンタン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルキトサン、アルギン酸、アルギン酸エステル、コラーゲン、セルロース、シルクフィブロイン、ケラチン、ゼラチン、フィブリン、プルラン、ラミニン、ゲラン、シリコン、ウレタン、エラスチン等及びそれらの修飾体、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。「生体適合性材料」の表面は必要に応じて、細胞の接着を可能とする表面修飾(例えば、細胞接着用基質(コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、ビトロネクチン等)によるコーティング)や、細胞の増殖、分化や機能を制御することが知られている官能基(例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、メタクリル酸基、アクリル酸基等)での改変、が施されていてもよい。「生体適合性材料」は、ブロック状、ビーズ状、ペレット状、球状、シート状、ゲル状、等の任意の形態を有することができ、中実又は多孔性とすることができる。「生体適合性材料」の形状としては、立体形状が好ましく、例えば、球体、四面体、六面体等の多面体、円柱、角柱、円錐、円錐台、角錐、角錐台、トラス体、円盤体、楕円体それらの変形立体などであってもよく、細胞が生体適合性材料内に分散できる形状であればよい。「生体適合性材料」は生体内への移植及び留置が可能な大きさであればよく、例えば、辺の長さが最も長いところで(円であれば直径)約0.1~3.0cm、好ましくは約0.5~2.0cmであり、厚さが約0.1~2.0cm、好ましくは約0.3~1.5cmとすることができる。生体適合性材料中に含まれる細胞は約50万個~500万個、好ましくは約100万個~300万個程度からなる。

[0136]

別の態様としては、例えば、「生体適合性材料」の大きさは、辺の長さが最も長いところで(円であれば直径)約1~30cm、好ましくは約1~15cm、より好ましくは約2~10cmとすることができる。

[0137]

「生体適合性材料」は、複数移植及び留置してもよい。

[0138]

本発明において、好ましくは「生体適合性材料」はゲル(ハイドロゲル)状である。生体適合性材料のゲル化は各生体適合性材に応じた公知の手段に従って行うことができ、例えば、生体適合性材料の水溶液に架橋剤(例えば、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ストロンチウムイオン、バリウムイオン等の金属カチオンやその塩形態)を添加することによって、あるいは、水中にてフィブリノーゲンとトロンビンとを作用させることによって行うことができる。本発明において、特に好ましくは「生体適合性材料」はフィブリンゲルである。ゲルは適当な溶媒(例えば、水、生理食塩水、培地等)中に生体適合性材料を

約0.01～10重量%程度の任意の量で含めることができる。

[0139]

本発明において、多能性幹細胞由来の細胞は生体適合性材料中に分散して配置される。「分散して配置」とは、多能性幹細胞由来の細胞をいずれかの部位に局限させることなく、生体適合性材料中に広く分布させて配置することを意味する。例えば、多能性幹細胞由来の細胞がスフェロイドの形態を有する場合、隣接するスフェロイドが生体適合性材料を介在させて存在することを意味する。例えば、多能性幹細胞由来の細胞がスフェロイドの形態を有する場合、隣接するスフェロイドとが約1 μm 以上、好ましくは約5 μm 以上の間隔を有して配置されることを意味する。

[0140]

別の態様としては、「分散して配置」とは、多能性幹細胞由来の細胞がスフェロイドの形態を有する場合、生体適合性材料の中のスフェロイドの一定の割合以上（30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上）が互いに接触しないように配置され、好ましくは生体適合性材料の中のスフェロイドの95%以上が互いに接触しないように配置されることを意味する。

[0141]

別の態様としては、「分散して配置」とは、多能性幹細胞由来の細胞がスフェロイドの形態を有する場合、生体適合性材料の中のスフェロイドが、一定の割合以上（30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上）が直径50～500 μm のスフェロイドであり（互いに接触して大きなスフェロイドとなっていないことを意味する）、好ましくは生体適合性材料の中のスフェロイドの95%以上が直径50～500 μm のスフェロイドであることを意味する。

[0142]

別の態様としては、「分散して配置」とは、多能性幹細胞由来の細胞がスフェロイドの形態を有する場合、生体適合性材料の中にスフェロイドが水玉状（pin dot）に三次元的に配置されていることを意味する。「水玉状（pin dot）に三次元的に配置」とは、各スフェロイドが周囲のスフェロイドと間隔を開けて三次元的に存在するだけでなく、周囲のスフェロイドと接触して存在する場合も意味する。各スフェロイドはそれぞれ同じ大きさであってもよいし、異なる大きさであってもよい。ここで「分散して配置」とは、各スフェロイドが生体適合性材料の中に配置された後、凝集・融合してより大きなスフェロイドを形成することを意味するものではない。

[0143]

「分散して配置」は任意の手段により達成することが可能であるが、多能性幹細胞由来の細胞液を十分に攪拌混合して生体適合性材料に播種することにより、ならびに／あるいは、生体適合性材料に播種する多能性幹細胞由来の細胞の濃度を調整することにより、ならびに／あるいは、生体適合性材料の溶液に多能性幹細胞由来の細胞を添加し十分に攪拌混合することにより、行うことができる。例えば、生体適合性

材料がゲル状である場合、ゲル化させる前の生体適合性材料の溶液に、多能性幹細胞由来の細胞を50～200 μ Lあたり、100～600万細胞個、好ましくは200～500万細胞個の量となるように混合して攪拌し、細胞が沈降する前にゲル化することにより、多能性幹細胞由来の細胞は生体適合性材料中に分散して配置することができる。

[0144]

別の態様としては、例えば、生体適合性材料がゲル状である場合、ゲル化させる前の生体適合性材料の溶液に、多能性幹細胞由来の細胞を15～50 mLあたり、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞個、好ましくは $3 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 細胞個の量となるように混合して攪拌し、細胞が沈降する前にゲル化することにより、多能性幹細胞由来の細胞は生体適合性材料中に分散して配置することができる。

[0145]

3. 生体組織様構造体

本明細書において「生体組織様構造体」とは、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、膵臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓等（これらに限定はされない）の生体器官や組織と同等又は類似する機能を有する構造体を意味する。生体組織様構造体は、多能性幹細胞由来の細胞が生体適合性材料中に分散して配置されてなる組成物を動物生体内に移植し、留置して、多能性幹細胞由来の細胞を分化誘導することにより得ることができる。

[0146]

「動物」は哺乳動物が好ましく、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット等が挙げられるが、好ましくはヒトである。

[0147]

移植は、前記組成物を一定の位置で固定できる生体内領域に行うことが好ましく、例えば、動物の皮下、腹腔内、腹膜上皮、大網、脂肪組織、筋肉組織や膵臓、腎臓等の各臓器の被膜下などに行うことができる。

[0148]

移植後、組成物内の多能性幹細胞由来の細胞は生体内環境において分化誘導され分化・成熟し、用いた「多能性幹細胞由来の細胞」に応じて、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、膵臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓等（これらに限定はされない）の器官や組織と同等又は類似する機能を有する構造体を得ることができる。

[0149]

得られた生体組織様構造体は、その後、回収されてもよいし、そのまま生体内に留置してもよい。

[0150]

生体組織様構造体は、多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、ホスト動物由来の結合組織、ならびにホスト動物由来の血管を含んでいてもよい。

[0151]

多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞は複数のクラスターを形成して、生体組織様構造体中に分散して存在する。各クラスターは、直径が約 $10\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ 程度、より好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ 程度の大きさを有する。ならびに／あるいは、各クラスターは約100～約1000個、好ましくは約200～約800個、より好ましくは約300個～約500個程度の細胞からなる。生体組織様構造体中には、クラスターが約50個～2000個、好ましくは約100個～500個程度分散して存在し得るが、この数は生体適合性材料中に分散して配置された多能性幹細胞由来の細胞数に応じて変化し得る。「分散して存在」とは、分化細胞の各クラスターがいずれかの部位に局限することなく、生体組織様構造体中に広く分布して存在することを意味する。また、「分散して存在」とは隣接するクラスターが宿主動物由来の結合組織を介在させて存在することを意味する。

[0152]

「宿主動物由来の結合組織」とは、前記組成物が移植された動物由来の細胞が産生する細胞外マトリックスを意味し、エラスチン、フィブリリン、I型コラーゲン、III型コラーゲン等が含まれる。宿主動物由来の結合組織は、分化細胞は複数のクラスターの周囲を取り囲むように存在し、生体組織様構造体における各クラスターの間を埋める。

[0153]

「宿主動物由来の血管」とは、前記組成物が移植された動物由来の細胞で形成され、生体組織様構造体外の宿主動物の血管とつながる血管を意味する。宿主動物由来の血管は、生体組織様構造体における各クラスターへと侵入しており、各クラスターへと血液を循環し、酸素や栄養分等の供給や老廃物の排出を行う。

[0154]

本発明の一実施形態として、多能性幹細胞由来の細胞として、多能性幹細胞から膵 β 細胞へと分化する過程において出現する、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、又はインスリン産生細胞、好ましくはインスリン産生細胞を用いた場合、生体内に移植された前述の組成物内でこれらの細胞は分化誘導され成熟し、膵島と同等又は類似する機能を有する分化細胞（以下、「膵島様細胞」と記載する）を含む生体組織様構造体を得ることができる。

[0155]

このようにして得られた生体組織様構造体において、膵島様細胞は、以下の(a)～(g)：

- (a) MAFA、UCN3、及びIAPPの少なくとも一つのマーカーを発現すること、
- (b) クロモグラニンA陽性細胞(C h g a +細胞)の割合が高いこと、
- (c) K i 6 7陽性細胞(K i 6 7 +細胞)の割合が低いこと、
- (d) グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞(G c g + I n s -細胞)の割合が高いこと、

- (e) 低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること、
 - (f) 外分泌細胞を含まないこと、
 - (g) インスリン陽性かつグルカゴン陰性細胞 (Ins + Gcg-細胞) の割合が高いこと、
- から選択される一又は複数により特徴付けることができる。ここで「複数」とは、2, 3, 4, 5, 6又は7を意味する。

[0156]

(a) ~ (g) の特徴の有無は、インスリン産生細胞を分化誘導してから（すなわち、前述の組成物を生体内に移植してから）、4週間以降、好ましくは8週間以降に評価することができる。また、膵島様細胞における所定の細胞の割合とは、移植片に由来する細胞塊の全細胞数に対する割合を意味する。

[0157]

(a) MAFA、UCN3、及びIAPPの少なくとも一つのマーカーを発現すること

膵島様細胞には、膵β細胞が含まれる。膵β細胞は成熟マーカーであるMAFA、UCN3、及びIAPPの少なくとも一つのマーカーを発現する。また、膵β細胞はグルコース刺激によるインスリン分泌上昇反応によっても特徴付けることができる。

[0158]

(b) Chga+細胞の割合が高いこと

膵島様細胞は、Chga+細胞を約50%以上の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Chga+細胞の割合は約60%以上であり、より好ましくは約70%以上、よりさらに好ましくは約90%以上、とりわけ好ましくは約95%以上（例えば、約97%以上、約98%以上）である。

[0159]

Chga+細胞にはインスリンやグルカゴン等のホルモンを分泌する細胞（内分泌細胞）が含まれ、本特徴は膵島様細胞が、内分泌細胞を高い割合で含むことを示す。

[0160]

(c) Ki67+細胞の割合が低いこと

膵島様細胞は、Ki67陽性細胞を約3%未満の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Ki67陽性細胞の割合は約1%未満、より好ましくは約0.8%未満、さらに好ましくは約0.5%未満である。

[0161]

本特徴は膵島様細胞において、その混入・残存が好ましくない場合があるKi67+細胞はほとんどないか、非常に低い割合であることを示す。

[0162]

(d) Gcg + Ins-細胞の割合が高いこと

膵島様細胞は、Gcg+Ins-細胞を約10%以上の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Gcg+Ins-細胞の割合は約15%以上であり、より好ましくは約20%以上、よりさらに好ましくは約25%以上である。膵島様細胞におけるGcg+Ins-細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約50%以下、好ましくは約45%以下、より好ましくは約40%以下とすることができる。

[0163]

Gcg+Ins-は成熟した膵 α 細胞のマーカーであることから、膵島様細胞が、成熟した膵 α 細胞をインスリン産生細胞よりも高い割合で含むことを示す。膵島様細胞が、インスリン産生細胞よりも成熟した分化段階にあることを示す。

[0164]

(e) 低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること

膵島様細胞は、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有することを特徴とする。「低血糖に応答したインスリン分泌作用」とは、低血糖時から1時間以内、2時間以内、3時間以内、4時間以内、又は5時間以内にインスリン分泌量が増加することを意味する。「低血糖」とは血中又は培地中のグルコース濃度が、約70mg/dL以下である場合を意味する。インスリン分泌量の測定は従来公知の任意の手段で行うことができ、特に限定はされないが、血中又は培地中のC-ペプチド量を測定することにより行うことができる。

[0165]

通常、生体内では低血糖になると、グルカゴン等の分泌により血糖値の上昇が促されると共に、グルカゴンに拮抗してインスリンが分泌され、血糖値レベルがコントロールされる。本発明の膵島様細胞は同様に、低血糖に対する血糖値レベルのコントロールを可能とするものであり、低血糖に応答して血糖値の上昇を促すと共に、これに拮抗してインスリンを分泌する作用を有する。

[0166]

(f) 外分泌細胞を含まないこと

膵島様細胞は、外分泌細胞を含まないことを特徴とする。すなわち、動物生体内の膵島において通常その大部分(約95%)を構成する、アミラーゼやリパーゼなどの消化酵素を含む膵液を分泌する外分泌細胞は、膵島様細胞には含まれない。「外分泌細胞を含まない」との用語には、膵島様細胞において外分泌細胞が全く含まれない場合だけでなく、膵島様細胞において5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、又は0.5%以下の低い割合で外分泌細胞が含まれる場合も包含し得る。

[0167]

(g) Ins+Gcg-細胞の割合が高いこと

膵島様細胞は、Ins+Gcg-細胞の割合が高いことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Ins+Gcg-細胞の割合は約20%以上であり、より好ましくは約30%以上、よりさらに好ま

しくは約40%以上である。膵島様細胞におけるIns+Gcg-細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約80%以下、好ましくは約70%以下、より好ましくは約60%以下とすることができる。

[0168]

Ins+Gcg-は成熟した膵β細胞のマーカーであることから、膵島様細胞が、成熟した膵β細胞をインスリン産生細胞よりも高い割合で含むことを示す。膵島様細胞が、インスリン産生細胞よりも成熟した分化段階にあることを示す。

[0169]

また、生体組織様構造体が膵島様細胞を含む場合、膵島様細胞はインスリン陽性細胞が内側に、グルカゴン陽性細胞が外側に配置されたクラスターを形成し得る。

[0170]

5. 用途

本手法により得られた生体組織様構造体は、用いた「多能性幹細胞由来の細胞」に応じて、表皮、神経、脳、脊髄、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、尿道、肺、甲状腺、膵臓、肝臓、筋肉、骨格、心臓、血管、脾臓、腎臓等（これらに限定はされない）の器官や組織と同等又は類似する機能を有し、それら器官や組織の機能を増強又は維持するために、あるいは、疾患や障害等の原因により低減又は消失したそれら器官や組織の機能を補助又は補充するために利用することができる。

本発明の一実施形態として、生体組織様構造体が前述の膵島様細胞を含む場合、当該生体組織様構造体は膵島様細胞の分泌するインスリンやグルカゴンの働きにより患者における血糖値（グルコース）のレベルを改善及び／又は維持することができ、血糖値を正常値にコントロールすることができる。

[0171]

したがって、当該生体組織様構造体は、血糖値のレベルを改善及び／又は維持することが必要とされる疾患、障害、又は症状を治療又は予防するために用いることができる。このような疾患、障害、又は症状としては、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、空腹時及び食後グルコースレベルの変調、低血糖症（例えば、糖尿病患者におけるインスリン投与による低血糖症）等が挙げられるが、これらに限定はされない。なお、「治療」とは、疾患、障害、又は症状の治療、治癒、防止もしくは、寛解の改善、又は、疾患、障害、又は症状の進行速度の低減を意味する。また、「予防」とは、疾患、障害、又は症状の発症の可能性、危険性を低下させる、又は疾患、障害、又は症状の発症を遅らせることを意味する。

[0172]

患者は哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）であり、好ましくはヒトである。

[0173]

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0174]

実施例1：インスリン産生細胞の作製、移植、機能・形態評価（STZ-Nod-scidマウス）

1. 方法

(1) インスリン産生細胞の作製

Ff-I14s04 iPS細胞株からインスリン産生細胞への分化誘導は、上記工程1)～6)や既報(Nature Biotechnology 2014; 32:1121-1133)に従い、バイオリアクターを用いた3次元培養法により実施した。

すなわち、iPS細胞をインスリンが作用する条件下で分化誘導因子(GSK3 β 阻害剤、ROCK阻害剤及び低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1%B27/Penisilin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下で分化誘導因子(低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1%B27/Penisilin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第2の培養を行い胚体内胚葉細胞を得た。

[0175]

その胚体内胚葉細胞から分化誘導して得られた内分泌前駆細胞集団を分化誘導因子(ALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、アスコルビン酸)とFGF受容体1阻害剤(PD-166866)を含む培地(Improved MEM/1%B27/Penisilin Streptomycin)で8日間培養した。さらに、一部異なる分化誘導因子(ALK5インヒビターII、T3、ZnSO₄、ヘパリン、N-アセチルシステイン、Trolox、R428、Y-27632)とFGF受容体1阻害剤(PD-166866)を含む培地(MCDB/ITS-X/2%BSA/20mM glucose/NaHCO₃/Glutamax/Penisilin Streptomycin)で4日間培養し、スフェロイドの形態でインスリン産生細胞を得た。

[0176]

(2) 移植前のインスリン産生細胞のタンパク質発現評価

(1)で作製したインスリン産生細胞のタンパク質発現(インスリン、NKX6.1、クロモグラニン、Ki67)をフローサイトメトリーにより測定した。

[0177]

(3) インスリン産生細胞のフィブリンゲルへの分散・ゲル化

フィブリンゲル作製のフィブリノーゲン(メルクミリポア、341576-100MG)を、事前に基礎培地(MCDB)に10mg/mLとなるように溶解し、使用まで-80℃にて保存した。トロンビン(シグマ、10602400001)を、PBS(-)に50U/mLとなるように溶解し、使用まで-80℃にて保存した。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液は、使用直前に溶解して使用した。

(1)で作製したインスリン産生細胞のスフェロイド(直径50～500 μ m程度の大きさを有し、総

数としては300万cellsを含む)を1.5mLチューブに集め沈降させる。沈降後、培養液をできるだけ除き、100 μ Lのフィブリノーゲン溶液を加え、良く攪拌した。次いで、凝集塊が沈降しないうちに、フィブリノーゲン溶液に対し1/2量(50 μ L)のトロンビン溶液を加えた。トロンビン溶液を加えてから5分以上、室温で放置し、ゲル化させた。

[0178]

(4) 生体内へのインスリン産生細胞の移植と生体組織様構造体形成過程の機能評価

(3)で作製したインスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを、ストレプトゾトシン(STZ)により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウスの皮下に移植した(iPIC群)。移植後、血液中のヒトC-ペプチド(インスリン産生細胞由来インスリンの指標)の濃度及び血糖値を測定し、インスリン産生細胞の生着および機能を評価した。対照として非移植個体(sham群)および非糖尿病NOD/SCIDマウス(control群)を設け、同様の指標を測定、評価した。

[0179]

(5) インスリン産生細胞由来生体組織様構造体のグルコース負荷に対する応答評価

インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを皮下移植し、6ヶ月経過した時点で、一過的に血糖値を上昇させるためにグルコース強制経口投与を行い、その後のインスリン産生細胞の応答を血漿中グルコース濃度および血中ヒトC-ペプチド濃度を測定して評価した。

[0180]

(6) インスリン産生細胞由来生体組織様構造体の一般染色およびタンパク質発現の評価

移植から6ヶ月後に摘出したインスリン産生細胞由来生体組織様構造体をパラホルムアルデヒドにて固定した。固定した生体組織様構造体から、パラフィン切片および凍結切片を作製した。パラフィン切片を用いて、HE染色およびマッソントリクローム染色を行った。また、凍結切片を用いて、目的タンパク質発現(ヒト核(HuN)、PDX1、インスリン(INS)、グルカゴン(GCG)、マウスCD31(mCD31)、クロモグラニンA(CHGA)、Ki67)を免疫組織染色により評価した。

[0181]

2. 結果

(1) 移植前のインスリン産生細胞のタンパク質発現評価

移植前のインスリン産生細胞について、フローサイトメトリーによる測定結果を図1に、また、インスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率、クロモグラニンA陽性細胞率、Ki67陽性細胞率を表1に示す。移植前のインスリン産生細胞は、95%以上がクロモグラニンA陽性の内分泌細胞であり、移植後 β 細胞に成熟するインスリン陽性/NKX6.1陽性細胞が42.6%、 α 細胞に成熟するインスリン陽性/NKX6.1陰性細胞が30.3%の細胞集団であった。また、増殖マーカーであるKi67陽性細胞は0.4%と極僅かであった。

[0182]

[表1]

	工程 6 day12
インスリン陽性/NKX6.1 陽性細胞率	42.6 %
クロモグラニン A 陽性細胞率	97.3 %
インスリン陽性/NKX6.1 陰性細胞率	30.3 %
Ki67 陽性細胞率	0.4 %

[0183]

(2) 生体内に移植したインスリン産生細胞が生体組織様構造体を形成する過程の機能評価

移植後の血中ヒトC-ペプチド濃度及び血糖値の測定結果を図2および表2に示す。インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを移植した動物では、移植から3ヶ月後には血液中に高濃度のヒトC-ペプチドが検出され、それに伴い高血糖が改善した。血糖値は6ヶ月後まで正常レベルを維持した。以上より、移植したインスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルが皮下においてホスト細胞と混ざり合いながら分化、成熟し、機能する生体組織様構造体を形成することが示唆された。

[0184]

[表2]

群	血中ヒトC-ペプチド濃度(pM)		血糖値(mg/dL)		
	移植3ヶ月後	6ヶ月後	移植時点	3ヶ月後	6ヶ月後
sham	0±0 (N=4)	0, 0 (N=2)	448±54 (N=4)	556±30 (N=4)	483, 442 (N=2)
iPIC	1884±463 (N=5)	1935±104 (N=3)	455±36 (N=5)	79±21 (N=5)	65±19 (N=3)
control	15±26 (N=3)	0±0 (N=3)	114±10 (N=4)	119±10 (N=3)	110±4 (N=3)

N=3 以上は平均値±標準偏差、N=2 は個別データ

[0185]

(3) インスリン産生細胞由来生体組織様構造体のグルコース負荷に対する応答評価

グルコース負荷後の血中ヒトC-ペプチド濃度および血漿中グルコース濃度を図3に示す。インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルの移植により形成された生体組織様構造体は、移植から6ヶ月の時点で、鋭敏なグルコース応答性の血中ヒトC-ペプチドを分泌を示した。移植部位が皮下にも関わらず、グルコース付加15分後から明確な血中ヒトC-ペプチド上昇が認められており、豊富な血流を介した実際の膵島さながらの生体応答が確認された。また、血糖低下に伴い血中ヒトC-ペプチドも低下しており、

低血糖の懸念も少ないと推察される。

[0186]

(4) インスリン産生細胞由来生体組織様構造体の一般染色およびタンパク質発現の評価

移植から6ヶ月時点のインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の肉眼所見を図4に、摘出した生体組織様構造体のHE染色像を図5に、マッソントリクローム染色像を図6に、目的タンパク質発現をそれぞれ免疫組織染色した結果を図7-10に示す。

インスリン産生細胞由来生体組織様構造体の肉眼所見(図4)は、目立った肥大もなく、米粒大の生体組織様構造体であり、容易に皮下から単離可能であった。同時期に計4匹解剖しているが、すべて同様の肉眼所見であった。組織学的評価から、生体組織様構造体は、1) 直径50~500 μm のインスリン産生細胞由来の膵島様細胞クラスター、2) それを取り囲むように配置された宿主由来の線維性組織、3) ホスト由来の血管構造により構成されていることが示された(図5-10)。

[0187]

3) の宿主由来の血管構造(=マウスCD31陽性、図9)は主に、1) の内分泌細胞クラスターに入り込んでおり、1) の膵島様細胞クラスター内には多数の赤血球が認められた(図5、6)。したがって、本生体組織様構造体は、実際の膵島と同様に、豊富な血流と、血流を介した鋭敏な生体反応を実現していることが強く示唆される。また、線維性組織を多く含むため(図6)、物理的な強度も高い。実際にインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の切断を試みた際には、軟骨のような強度があり、容易には切断できなかった。

[0188]

HuN陽性のインスリン産生細胞由来の細胞は、大部分が膵島様細胞(図7-10)であり、目的外細胞の増殖も認められない。増殖マーカーであるKi67とHuN両陽性の細胞も0.5%以下と軽微であった(図10)。インスリン陽性細胞は1) の膵島様細胞クラスターの内側に、グルカゴン陽性細胞は1) の膵島様細胞クラスターの外側に分布しており、このような配置は出生前の胎児ヒト膵臓、もしくはげっ歯類の膵臓において観察される。したがって、本生体組織様構造体も、胎児ヒト膵臓と同様に数十年単位で機能し得ることが示唆される。

[0189]

以上の結果から、インスリン産生細胞はフィブリンゲルに分散させて生体内に移植することで、皮下という血流や栄養の乏しい部位に長期生着し、さらにはホストの細胞と混ざり合いながら成熟して、新しい生体組織様構造体を形成することが示された。形成された皮下生体組織様構造体は、実際に生体内にある膵臓と同様に、生理的かつ鋭敏なインスリン分泌調節に伴う血糖値制御機能を有することが示された。

[0190]

実施例2：糖尿病病態を有する生体内におけるインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の形成と機能評価

1. 方法

上記実施例1の(3)で作製したインスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを、ストレプトゾトシン(STZ)により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウス、又は非糖尿病のNOD/SCIDマウスの皮下にそれぞれ移植した。移植28週後まで、飽食時の血中ヒトC-ペプチド、グルカゴンおよび血糖値を測定した。

28週後に全個体についてインスリン産生細胞由来生体組織様構造体を摘出した。摘出した移植片生体組織様構造体の重量を測定し、破碎、酸エタノール処理した後に移植片生体組織様構造体中のインスリンおよびグルカゴン含量を測定した。対照として各移植マウスの膵臓および非移植の非糖尿病NOD/SCIDマウスの膵臓を採取し、同様にホルモン含量を測定した。

[0191]

2. 結果

血液中のヒトC-ペプチドおよびグルカゴンの濃度ならびに血糖値の推移を図11に示す。インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルの移植28週後まで持続的に血中にヒトC-ペプチドを検出した。血中グルカゴン濃度も上昇しており、糖尿病および非糖尿病の非移植マウスに比べて高値であった。インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルは皮下環境で長期生着し、そして形成された生体組織様構造体は複数の膵島ホルモンを放出することが示唆された。糖尿病マウスの高血糖は移植12週後までに改善し、血糖値は28週後まで正常域を維持した。生体組織様構造体を摘出すると移植前の高血糖状態に完全に戻ったため、持続的かつ安定した高血糖改善作用は生体組織様構造体由来することが示された。

移植片生体組織様構造体中および膵臓中の各ホルモン含量を図12に示す。膵臓(左)と比較して、移植片生体組織様構造体(右)は単位重量当たりのインスリンおよびグルカゴンの含量が多かった。移植片生体組織様構造体は、膵臓中の膵島のように膵内分泌細胞を高密度に含んでいることが示された。

[0192]

実施例3：インスリン産生細胞由来生体組織様構造体の血糖制御機能

1. 方法

上記実施例1の(3)で作製したインスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルを、STZにより糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウス、または糖尿病を自然発症するAkita遺伝子変異を有するNOD/SCIDマウスの皮下に移植した。移植14週後以降、高血糖が完全に改善したマウスを用いて以下の試験を実施した。

[0193]

試験（１）：一過的に血糖値を上昇させるためにグルコース強制経口投与し、その後のインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の応答を血中ヒトC-ペプチド、グルカゴンおよびグルカゴン様ペプチド-1濃度を測定して評価した。対照として非移植・非糖尿病NOD/SCIDマウスを用い、内因性の各ホルモンの血中濃度を測定した。

[0194]

試験（２）：上記インスリン産生細胞由来生体組織様構造体の応答に対するグルカゴンの関与を評価するため、グルコース強制投与前にグルカゴン受容体アンタゴニストMK-0893を強制経口投与し、試験（１）と同様の試験を実施した。MK-0893は、マウスよりもヒトのグルカゴン受容体に対して強いアンタゴニスト活性を示す（J Med Chem. 2012 Jul 12; 55(13): 6137-48）。

[0195]

試験（３）：インスリン産生細胞由来生体組織様構造体によるインスリン放出に対するグルカゴン様ペプチド-1の関与を評価するため、グルカゴン様ペプチド-1受容体アンタゴニストExendin-9を浸透圧ポンプにより3日間皮下持続投与し、投与前後の血中ヒトC-ペプチド濃度を測定した。

[0196]

試験（４）：低血糖を誘発するためにインスリン製剤グラルギンを皮下投与し、その後のインスリン産生細胞由来生体組織様構造体の応答を血中ヒトC-ペプチドを測定して評価した。対照として非移植・非糖尿病NOD/SCIDマウスを用い、内因性膵島由来のマウスC-ペプチドの血中濃度を測定した。

[0197]

2. 結果

試験（１）：グルコース負荷後の血中グルカゴンおよびグルカゴン様ペプチド-1濃度を図13に示す。グルコース負荷により血中ヒトC-ペプチドおよびグルカゴン様ペプチド-1濃度は一過的に上昇し、血中グルカゴン濃度は低下傾向を示した。移植マウスでは非移植・非糖尿病マウスに比べて血中グルカゴン様ペプチド-1およびグルカゴンの血中濃度が高値を示し、生体組織様構造体がこれらのホルモンを放出していることが示唆された。

[0198]

試験（２）：グルコース負荷後の血糖値および血中ヒトC-ペプチド濃度を図14に示す。MK-0893を前処置すると、グルコース負荷後の一過的な血糖値の上昇が減弱し、血中ヒトC-ペプチド濃度の上昇も減弱した。一方でMK-0893は、非移植・非糖尿病マウスにおいて血糖値および内因性マウスC-ペプチドの血中濃度に影響を与えなかった。これらより、生体組織様構造体による血糖制御作用にグルカゴンが寄与していることが示された。

[0199]

試験(3): Exendin-9の3日間投与前後の飽食時血中ヒトC-ペプチド濃度を図15に示す。血中ヒトC-ペプチド濃度はExendin-9の持続投与により低下し、投与を止めると投与前のレベルに戻った。生体組織様構造体によるヒトC-ペプチドの放出はグルカゴン様ペプチド-1による制御を受けることが示された。

[0200]

試験(4): 血中ヒトC-ペプチド濃度はグラルギン投与により低血糖を誘発すると大きく低下した。この変化は非移植・非糖尿病マウスにおける内因性マウスC-ペプチドの血中濃度推移と同様だった。低血糖誘発時に生体組織様構造体が内因性膵島に類似したインスリン分泌調節機能を示すことが示された。

[0201]

以上より、インスリン産生細胞が分散されたフィブリンゲルの移植により形成されたインスリン産生細胞由来生体組織様構造体は、内因性膵島に類似した、複数の膵島ホルモンが寄与する生理的な血糖制御機能を発揮することが示された。

請求の範囲

[請求項 1]

生体組織様構造体をホスト動物の生体組織内に作製する方法において使用される、生体適合性材料とヒト多能性幹細胞由来の細胞とを含む組成物であって、ヒト多能性幹細胞由来の細胞が生体適合性材料中に分散して配置されている、組成物。

[請求項 2]

生体適合性材料がフィブリンゲルである、請求項 1 に記載の組成物。

[請求項 3]

フィブリンゲルが、前記組成物の使用の直前に、ヒト多能性幹細胞由来の細胞とフィブリノーゲンとロニン进行を混合してゲル化されたものである、請求項 2 に記載の組成物。

[請求項 4]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞が複数のスフェロイドの形態で存在する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項 5]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞における K i 6 7 陽性細胞の割合が 3 % 未満である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項 6]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞がインスリン産生細胞である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項 7]

前記方法が、前記組成物をホスト動物の生体組織中に移植して、生体適合性材料中に分散して配置されたヒト多能性幹細胞由来の細胞を分化誘導することを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項 8]

ホスト動物の生体組織が皮下組織である、請求項 7 に記載の組成物。

[請求項 9]

生体組織様構造体が、ヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、ホスト動物由来の結合組織、ならびにホスト動物由来の血管を含み、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項 10]

前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、請求項 9 に記載の組成物。

[請求項 1 1]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、宿主動物由来の結合組織、ならびに宿主動物由来の血管を含む生体組織様構造体であって、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、生体組織様構造体。

[請求項 1 2]

前記分化細胞が膵β細胞を含む、請求項 1 1 に記載の生体組織様構造体。

[請求項 1 3]

前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の生体組織様構造体。

[請求項 1 4]

前記生体組織様構造体が移植された被検体の血糖値を正常値にコントロールするために用いられる、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の生体組織様構造体。

[請求項 1 5]

生体組織様構造体の製造方法であって、

生体適合性材料とヒト多能性幹細胞由来の細胞とを含む組成物であって、ヒト多能性幹細胞由来の細胞が生体適合性材料中に分散して配置されている、組成物を宿主動物の生体組織中に移植して分化誘導することを含む、方法。

[請求項 1 6]

生体適合性材料がフィブリンゲルである、請求項 1 5 に記載の方法。

[請求項 1 7]

フィブリンゲルが、前記組成物の使用の直前に、ヒト多能性幹細胞由来の細胞とフィブリノーゲンとロンビンとを混合してゲル化される、請求項 1 6 に記載の方法。

[請求項 1 8]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞が複数のスフェロイドの形態で存在する、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 1 9]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞におけるK i 6 7 陽性細胞の割合が3%未満である、請求項 1 5 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 2 0]

ヒト多能性幹細胞由来の細胞がインスリン産生細胞である、請求項 1 5 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 2 1]

宿主動物の生体組織が皮下組織である、請求項 1 5 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 2 2]

生体組織様構造体が、分散したヒト多能性幹細胞由来の細胞より分化誘導して得られた分化細胞からなる複数のクラスター、宿主動物由来の結合組織、ならびに宿主動物由来の血管を含み、該分化細胞からなる複数のクラスターが生体組織様構造体中に分散して存在し、該結合組織が該分化細胞からなる複数のクラスターの周囲を取り囲み、該血管が該分化細胞からなる複数のクラスターへと侵入している、請求項 1 5 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 2 3]

前記分化細胞が外分泌細胞を含まない、請求項 1 5 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。