

明 細 書

発明の名称：

My c l の一過性発現による増殖可能な膵島前駆細胞様細胞の誘導とインスリン陽性細胞への分化誘導

技術分野

[0001] 本発明は、My c l 遺伝子、又は該My c l 遺伝子を導入した膵島様細胞を含むインスリン産生促進剤に関する。また、My c l 遺伝子若しくはその遺伝子産物、又は該My c l 遺伝子を導入した膵島様細胞を含む、糖尿病を予防／治療するための医薬組成物に関する。さらに、本発明は、My c l 遺伝子の一過性発現によって増殖可能な膵島前駆細胞様細胞を誘導し、インスリン産生細胞へ分化誘導する方法に関する。

背景技術

[0002] マウス個体内で細胞初期化因子の短時間発現を繰り返すと、膵島細胞が増殖し、耐糖能が改善することが示されている（非特許文献1）。

[0003] 膵島移植は糖尿病疾患に対して膵島組織を移植することで血糖を安定に保たせることを可能とする医療であるが、特に日本においてはドナー不足が深刻な問題となっており、様々なアプローチによる膵島機能再生方法の開発が早急に求められている。近年では、ES／iPS細胞を分化誘導させることにより膵島様インスリン産生細胞の樹立が報告されているが、機能的かつ大量の膵島インスリン陽性細胞の作製技術確立には至っておらず、また拒絶反応や自己免疫反応等の問題も懸念されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Cell, 2016, 167, 1719-1733, e12. doi: 10/1016/j. cell. 2016. 11. 052

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] MycI 遺伝子の一過性発現による膵島インスリン産生細胞の増殖技術は、少数のドナー由来の膵島から機能的かつ大量の膵島インスリン産生細胞を樹立できることが期待される。さらに、ES/iPS細胞から膵島インスリン細胞の誘導過程において本技術を適応すれば、幹細胞からのインスリン陽性細胞の効率的な作製が期待できる。本発明は、膵島細胞を対象から取り出し、インビトロで増殖可能な膵島前駆細胞様細胞を誘導した後に、膵島細胞を対象に戻すことを含む、糖尿病を治療するための手段を提供することを目的とする。さらに、本発明は、体内の膵島細胞にMycI 遺伝子を一過的に過剰発現させることによる、糖尿病を治療するための手段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、膵島細胞にMycI 遺伝子を導入し、該遺伝子を発現させることによって、増殖可能な膵島前駆細胞様細胞を誘導させ得ることを見出した。増殖細胞は、MycI 遺伝子存在下では胎生期の膵島前駆細胞で発現するFev遺伝子、Pax4遺伝子、及びCck遺伝子を発現しながら、同時にソマトスタチンを発現し増殖しているが、MycI 遺伝子発現を停止させると、増殖の停止とともにインスリン陽性細胞に分化する。すなわち、一過的にMycI 遺伝子を発現誘導させることにより、増殖可能な膵島前駆細胞様細胞を誘導可能であり、増殖させた膵島前駆細胞様細胞はインスリン陽性細胞に分化させる得ることを見出し、本願発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち本発明は、以下の態様を有する。

[1] MycI 遺伝子又はその遺伝子産物を含む、インスリン産生促進剤。

[2] MycI 遺伝子が、

(1) 配列番号1又は3で表される塩基配列を含む核酸；又は

(2) 配列番号1又は3で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつMycI 遺伝子が発現誘導された場合

に、インスリン産生を促進する活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む、[1]に記載のインスリン産生促進剤。

[3]

My c l 遺伝子産物が、

(1) 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；又は

(2) 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有し、並びに膵島様細胞を増殖させる効果及び／又はインスリン産生を促進する活性を有するポリペプチド

を含む、[1]に記載のインスリン産生促進剤。

[4] My c l 遺伝子又はその遺伝子産物が膵島細胞に導入されている、インスリン産生促進剤。

[5] My c l 遺伝子が一過的に発現する、[1]～[4]のいずれかに記載のインスリン産生促進剤。

[6] 膵島細胞が、膵臓から単離された初代膵島細胞、培養膵島細胞、又は幹細胞由来である、[4]又は[5]に記載のインスリン産生促進剤。

[7] 幹細胞が、i P S細胞、E S細胞、及び体性幹細胞からなる群から選択される、[6]に記載のインスリン産生促進剤。

[8] 糖尿病及びそれに関連する疾患を予防及び／又は治療するための医薬組成物であって、

(i) My c l 遺伝子若しくはその遺伝子産物；My c l 遺伝子が組み込まれたベクター；及び／又はMy c l 遺伝子若しくはその遺伝子産物が導入された又は発現誘導された、膵島細胞；並びに

(i i) 薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体を含む、前記医薬組成物。

[9] 糖尿病及びそれに関連する疾患が、I型糖尿病、II型糖尿病、耐糖能障害、高血糖症、異脂肪血症、肥満症又は代謝症候群に関連する疾患、

障害又は症状から選択される、〔８〕に記載の医薬組成物。

〔１０〕 My c l 遺伝子が、

（１）配列番号１又は３で表される塩基配列を含む核酸；又は

（２）配列番号１又は３で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ My c l 遺伝子が発現誘導された場合に、インスリン産生を促進する活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む、〔８〕又は〔９〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１１〕 My c l 遺伝子産物が、

（１）配列番号２又は４で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；又は

（２）配列番号２又は３で表されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有し、並びに膵島様細胞を増殖させる効果及び／又はインスリン産生を促進する効果を有するポリペプチド

を含む、〔８〕又は〔９〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１２〕 〔１〕～〔７〕のいずれかに記載のインスリン産生促進剤、又は〔８〕～〔１１〕のいずれかに記載の医薬組成物を含むキット。

〔１３〕 My c l 遺伝子を活性化させるための活性剤をさらに含むキット。

〔１４〕 My c l 遺伝子を活性化させるための活性剤が、プロモーター、エンハンサー、プロモーターを活性化する酵素又は因子、エンハンサーを活性化する酵素又は因子、核酸タンパク質複合体、及び低分子化合物からなる群から選択される、〔１３〕に記載のキット。

〔１５〕 My c l 遺伝子又はその遺伝子産物が導入された膵島細胞。

〔１６〕 膵島細胞が、膵臓から単離された初代膵島細胞、培養膵島細胞、又は幹細胞由来である、〔１５〕に記載の膵島様細胞。

〔１７〕 〔１６〕に記載の膵島様細胞を調製する方法であって、

(a) 組換えプラスミド、組換えウイルスベクター、ミニサークル、又はエピソードベクターにMycI遺伝子を組み込む工程；及び

(b) 工程(a)で得られた組換えプラスミド、組換えウイルスベクター、ミニサークル、又はエピソードベクターを膵島細胞に導入する工程を含む方法。

[18] [16]に記載の膵島様細胞を調製する方法であって、MycI遺伝子をコードするRNA、又はMycIタンパク質を膵島細胞に導入する工程を含む方法。

[19] MycI遺伝子を発現させる工程を含む、[15]若しくは[16]に記載の膵島様細胞、又は[17]若しくは[18]に記載の方法によって調製された膵島様細胞を増殖させる方法。

[20] MycI遺伝子の発現が一過的であることを特徴とする、[19]に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、外因性又は内因性のMycI遺伝子の発現を制御することによって、インスリン産生が望まれる糖尿病又はその関連疾患を治療することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]MycI発現を誘導可能なマウスES細胞の樹立を示す。

[図2]MycI過剰発現による膵島の増大を示す。

[図3]MycI過剰発現によるソマトスタチン陽性の膵島細胞様細胞の増生を示す。

[図4]MycI過剰発現によるソマトスタチン陽性の膵島細胞様細胞の増生を示す。

[図5]MycI過剰発現によるソマトスタチン陽性の膵島細胞様細胞の増生を示す。

[図6]MycI過剰発現により増生したソマトスタチン陽性の膵島細胞様細胞は胎生期の膵島前駆細胞に類似する。

[図7]MycI 過剰発現による膵島前駆細胞様細胞の増殖誘導とMycI 過剰発現停止による増殖停止を示す。

[図8]MycI 発現停止による膵島前駆細胞様細胞のインスリン陽性細胞への分化を示す。

[図9]MycI 一過性過剰発現による耐糖能の亢進を示す。

[図10]単離した膵島における試験管内でのMycI 発現の誘導および膵島の増大を示す。

[図11]単離した膵島から分散させた細胞における試験管内でのMycI 発現誘導と膵島細胞の増殖を示す。

[図12]c-Myc 遺伝子又はMycn 遺伝子発現を誘導可能なマウスES細胞の樹立を示す。

[図13]単離した膵島における試験管内でのc-Myc 遺伝子又はMycn 遺伝子発現による細胞死を示す。

[図14]糖尿病マウスモデルにおける治療効果を示す。

[図15]MycI は膵島以外に異常増殖を誘導しないことを示す。

[図16]老齢マウスにおける膵島増生を示す。

[図17]ヒト膵島前駆細胞におけるMycI の発現を示す。

[図18]ヒトにおける膵島増生を確認した図を示す。

[図19]シングルセル解析によりヒトにおける膵島増生を確認した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、MycI 遺伝子若しくはその遺伝子産物、又は該MycI 遺伝子を導入した膵島様細胞を含むインスリン産生促進剤に関する。これらインスリン産生促進剤を含む、糖尿病を予防／治療するための医薬組成物に関する。本発明を以下に詳細に説明する。

[0011] 1. 膵島様細胞及びその調製法

(1) 膵島様細胞

本明細書において使用するとき、「膵島様細胞」とは、本明細書において

使用するとき、Myc I 遺伝子又はその遺伝子産物が導入された、膵島細胞指す。なお、本明細書では、Myc I 遺伝子の強制発現により、増殖期に移行した膵島様細胞を特に「膵島前駆細胞様細胞」と称することがある。さらに、該遺伝子の発現を停止させることによって、インスリン産生能を有する細胞（以下、「インスリン産生細胞」ともいう）に分化させることができる。すなわち、本発明によれば、Myc I 遺伝子の一過性発現により、膵島様細胞の数を増やし、インスリンを産生させる細胞に分化させることができる。ここで、各細胞に発現したマーカーに着目すると、「膵島前駆細胞様細胞」は、例えば、Fev、Pax4、Cck、CDK4、及びKi67から選択される遺伝子のうち少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つ以上が陽性である。また、発現されるタンパク質に着目すると、特にインスリン及びグルカゴン産生が通常の膵島で認められる場合に比べ低下しているか、又はソマトスタチン産生が顕著であることによっても特徴付けられる。

[0012] (2) 膵島細胞

「膵島細胞」とは、一般的に、ランゲルハンス島とも言われ、膵臓の内分泌機能を司る膵島と呼ばれる細胞集合体であって、膵臓の全細胞の約1～2%を占める内分泌細胞を指す。また、膵島細胞は、主に α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、及びPP細胞の5種類の細胞から構成される。細胞集合体を構成する主要な細胞は、 β 細胞であり、膵臓の中心部を占めている。 β 細胞は、細胞集合体の約60～80%を占め、体内のほとんどの細胞へのグルコース移行を可能にするインスリンを分泌する。一方、 α 細胞は、膵島の約10～30%を占め、正常の血糖を維持するためにグルコースの肝臓からの放出を可能にする、飢餓の間に放出されるグルカゴンを分泌する。 δ 細胞は、膵島細胞の約5～10%を占め、グルコース濃度をさらに調節するソマトスタチンを分泌する。また、 ϵ 細胞及びPP細胞は、それぞれ、グレリン及び膵ポリペプチドを分泌する。膵ポリペプチド産生細胞（膵島細胞の約5～10%）は、外分泌機能と胃腸機能を変化させるホルモンを放出する。内皮

細胞、神経細胞、及び前駆細胞などといった、その他の膵島細胞タイプもある。

[0013] 本明細書において使用される場合、膵島細胞には、上記した膵島細胞、膵島細胞の前駆細胞である膵島前駆細胞が含まれ、膵島細胞への発生の過程又は体性幹細胞／多能性幹細胞からの分化誘導の過程で生じる膵島細胞又は膵島前駆細胞に至るまでに生じる、中間体の細胞であってもよい。ここで、「中間体の細胞」とは、好ましくは膵島細胞へ分化することが運命決定されている細胞である。さらに、膵島細胞とは、本発明において、My c l 遺伝子又はその遺伝子産物が導入された膵島様細胞又は膵島前駆細胞様細胞から作製されたものであってもよい。

[0014] I 型糖尿病では、発症から間もない時期にリンパ球を主体とする細胞浸潤が認められる。やがて β 細胞が選択的に消失するとともに、膵島はその容積が減少し、 α 細胞が主体となる。膵島のインスリン分泌には予備能があり、90～95%の β 細胞が消失した場合にI型糖尿病が発症する。II型糖尿病では膵島に形態学的な変化は基本的には認められず、ただ膵島によるインスリン分泌能が低下する。

[0015] 本発明において、My c l 遺伝子又はその遺伝子産物が導入される膵島細胞の由来又は供給源は限定されないが、個体の膵臓から単離された初代膵島細胞、又は公知の培養方法によって培養された膵島細胞であってもよい。培養された膵島細胞には、限定されないが、株化された膵島細胞、幹細胞（例えば、i P S細胞、E S細胞、体性幹細胞）由来の膵島細胞（例えば、Kimura, A., et al., Cell Chemical Biology, 2020, doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.08.018参照）が含まれ得る。さらに、本発明において、My c l 遺伝子又はその遺伝子産物が導入される膵島細胞は、膵島様細胞及び／又は膵島前駆細胞様細胞から得られた膵島細胞でもよく、すでにMy c l 遺伝子が導入されている膵島様細胞及び／又は膵島前駆細胞様細胞に、繰り返しMy c l 遺伝子又はその遺伝子産物を導入してもよい。特に、糖尿病を治療する目的の場合、ドナーから採取された膵島細胞又は幹細胞由来膵島細胞のいずれ

をも好ましく使用することができる。使用されるドナーからの膵島細胞は、レシピエントに対して、自家又は他家のいずれであってもよい。本発明によれば、このような膵島細胞にMycI遺伝子を導入することにより、インビトロで膵島前駆細胞様細胞を増殖させ、患者に戻す（移植する）ことによって、糖尿病を治療することが可能である。この場合、膵島細胞が、患者に対して他家である症例では、患者に、適宜、免疫抑制剤を投与することができる。また、患者への移植には、上述した膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、若しくはインスリン産生能を有する細胞、又はそれらの任意の組み合わせを用いることができる。

[0016] 上記に関連して、これまでに、少なくともマウスでは β 細胞が脱落した場合に、 α 細胞が増殖し、その後 α 細胞の一部が β 細胞に分化転換するということが報告されている。したがって、MycI遺伝子が導入される前の膵島細胞の原料としての膵島は、通常の β 細胞を多数含む膵島以外にも、大半の β 細胞が脱落した膵島であってもよい。このような観点から、本発明は、MycI遺伝子導入した膵島様細胞等の使用により、 β 細胞が脱落した1型糖尿病患者の遺伝子治療にも使用できる。

[0017] (3) 多能性幹細胞

本明細書において使用するとき、「多能性幹細胞」とは、自己複製能と多分化能を有する細胞であり、生体を構成するあらゆる細胞を形成する能力を備える細胞をいう。「自己複製能」とは、1つの細胞から自分と同じ未分化な細胞を作る能力のことをいう。「分化能」とは、細胞が分化する能力をいう。多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)、Muse細胞(Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell)、精子幹細胞(germline stem cell: GS細胞)、胚性生殖細胞(embryonic germ cell: EG細胞)などが含まれるが、これらに限定されない。本

発明に用いる多能性幹細胞は、好ましくは、ES細胞である。なお、多能性幹細胞の由来は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類及び両生類のいずれでもよく、特に限定されない。哺乳動物は、霊長類（ヒト、サルなど）、げっ歯類（マウス、ラット、モルモットなど）、ネコ、イヌ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレットなどを含む。

[0018] 本明細書において使用するとき、「ES細胞」とは、発生初期に存在する個体を構成するすべての組織細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞を取り出し、インビトロで培養できるように株化したものを意味する。ES細胞は、初期胚中の多能性幹細胞と同様に個体を構成するすべての細胞に分化する能力を保持したまま事実上無制限に増やすことができる。具体的には、ES細胞はマウスのものが1981年に初めて記載された（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7634-7638, 1981; Nature 292, 154-156, 1981）。ES細胞は多分化能を有し、個体を構成するすべての組織及び細胞タイプを発生させ得る。ラット（Iannacconns et al., Dev. Biol. 163, 288-292, 1994）、ハムスター（Dev. Biol. 127, 224-227, 1988）、ウサギ（Mol. Reprod. Dev. 36, 424-433, 1993）、鳥類、魚類、ブタ（Reprod. Fert. Dev. 6, 563-568, 1994）、ウシ（Reprod. Fert. Dev. 6, 553-562, 1994）、並びに霊長類（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7844-7848, 1995）を包含する多種多様な種から多分化能胚性幹細胞が単離されている。なお、本発明において使用可能なES細胞としては、限定されないが、KH2細胞、RF8細胞、J1細胞、CGR8細胞、MG1.19細胞、129SV細胞、C57/BL6細胞、DBA-1細胞などが挙げられる。

[0019] 胚性ヒト組織からのES細胞及びES細胞様幹細胞の単離についてもいくつかの研究チームが、成功している。初期の成功例は以下のようなものである。（Science 282, 1145-1147, 1998; Proc

. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13726-13731, 1998; Nature Biotech., 18, 399-404, 2000)。これらのES細胞株は、胚盤胞から分離したICMをフィーダー細胞上で培養することで樹立されている。他の最近の研究は、胚及び成熟哺乳動物細胞由来の核を脱核卵母細胞中に移植することにより胚及び胚性細胞を得ることが可能であることを示している。

[0020] 本発明においては、任意の樹立されたES細胞株を使用可能である。あるいは、本発明の方法によって作製されたES細胞を個体に適用した場合の免疫拒絶反応を防ぐためには、個体の体細胞を用いてクローン胚を作成し、そこからES細胞株を樹立する方法が有効である。この方法を用いれば個体と同一の遺伝的要素をもったES細胞を樹立することが可能である。

[0021] あるいは、体細胞クローンの作成では卵子に導入された体細胞の核が受精卵の核と同じような状態に変化する、「初期化」と呼ばれる現象が起きると考えられている。卵子のもつこのような活性に類似した活性をES細胞ももつことが報告されている(Curr. Biol., 11, 1553-1558, 2001)。つまり、個体の体細胞とES細胞を融合することで、体細胞をES細胞のような細胞に変換できることが期待される。ES細胞はインビトロで遺伝子操作を行うことができるので、MHC遺伝子群などの免疫拒絶に関与する因子をあらかじめ操作したES細胞でこれを行うことで、体細胞クローン胚作成などの手法を用いることなく拒絶反応を回避できることが期待される。

[0022] 本明細書において使用するとき、「人工多能性幹(iPS)細胞」とは、体細胞へOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycなどの転写因子の遺伝子を導入することにより得られた、ES細胞に似た分化多能性を有する細胞を意味する。iPS細胞もまた、ES細胞と同様に、分化多能性を保持したまま無制限に増やすことができる。

[0023] iPS細胞を作製するための基本的な手法は、転写因子であるOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細

胞へ導入する方法である (Takahashi K, Yamanaka S : Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al : Cell 131 (5), 861-72, 2007) 。また、iPS細胞の作製に利用可能な細胞、即ち、iPS細胞の由来である細胞の例として、リンパ球 (T細胞、B細胞)、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、粘膜上皮細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、脂肪幹細胞、歯髄幹細胞、神経幹細胞を挙げることができる。

[0024] iPS細胞の初期化は、当業者に周知の方法で行うことができ、例えば、Addgene's Blog/Post, "Delivery Methods for Generating iPSCs" (<https://blog.addgene.org/delivery-methods-for-generating-ipscs>) に概説されている。MycI 遺伝子の iPS細胞への導入方法としては、限定されないが、組換えウイルス (例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなど)、組換えプラスミド、ミニサークル、またはエピソーム (例えば、oriP/Epstein-Barr 核抗原-1 (EBNA1) 系エピソーマルベクター) を用いた導入方法、あるいは、MycI 遺伝子をコードする RNA (mRNAを含む) や MycI タンパク質自体を直接細胞に導入する方法が挙げられる。

[0025] 本明細書において使用するとき、「EG細胞」は始原生殖細胞から作製される任意の胚性生殖幹細胞を意味し、その起原等は特に限定されない。また、本明細書において使用するとき、「GS細胞」は、精巢の生殖細胞より作製される生殖幹細胞で、精原幹細胞 (精子幹細胞) を体外で培養できるようにした細胞株である (Cell. 119, 1001-1012, 2004) 。GS細胞のうち特にES細胞と同様の性質を有し、分化多能性も有する、mGS細胞 (multipotent germline stem cell) が好ましい。

[0026] (4) MycI 遺伝子及びその遺伝子産物

MycI (「L-Myc」とも呼ばれる) 遺伝子は、c-Myc 遺伝子及

びMy c n (「N-My c」遺伝子)を含むMy c 遺伝子のファミリーに属するメンバーの1つである。My c l 遺伝子は、c-My c 遺伝子と同様に癌遺伝子であって、初期化遺伝子としても知られている。また、My c l 遺伝子は、c-My c 遺伝子と異なり、形質転換能がほとんどないことが分かっている (Nakagawa, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 107, p.14152-14157, 2010)。なお、My c l のマウス及びヒトのcDNA配列情報は、それぞれNCBIアクセッション番号のNM_008506及びNM_001033081を参照することにより取得することができ、当業者は容易にcDNAを単離することができる。

[0027] 本発明によれば、単離されたMy c l 遺伝子及びその遺伝子産物を使用することが好ましい。My c l 遺伝子は、上記の通り、NCBIアクセッション番号によりその塩基配列を特定することができるが、使用可能なMy c l 遺伝子としては、一本鎖又は二本鎖型DNA、及びそのRNA相補体も含まれる。DNAには、例えば、天然由来のDNA、組換えDNA、化学合成したDNA、PCRによって増幅されたDNA、及びそれらの組み合わせが含まれる。本発明で使用される核酸としてはDNAが好ましい。なお、周知の通り、コドンには縮重があり、1つのアミノ酸をコードする塩基配列が複数存在するアミノ酸もあるが、My c l 遺伝子が導入された膵島細胞（すなわち、膵島様細胞）が、My c l 遺伝子の発現により、細胞増殖し、その発現の停止によりインスリン産生を促す作用を有するものであれば、特に限定されない。

[0028] 一実施形態において、My c l 遺伝子は、

(1) 配列番号1又は3で表される塩基配列を含む若しくはそれからなる核酸；又は

(2) 配列番号1又は3で表される塩基配列を含む若しくはそれからなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、並びにMy c l 遺伝子が導入された膵島様細胞を増殖させる活性を有するポリペプチドをコードする核酸；又は

(3) 配列番号1又は3で表される塩基配列を含む若しくはそれからなる核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、並びにMycI遺伝子が導入された膵島様細胞を増殖させた結果、インスリン産生細胞を増殖させる効果、ひいてはインスリン産生を促進させる効果を有するポリペプチドをコードする核酸を含む／それからなるものであり得る。

[0029] 本明細書において使用するとき、「ストリンジントな条件下」とは、中程度又は高程度なストリンジントな条件においてハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 7.42-7.45 (2001) に示されるが、ニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) の前洗浄溶液、約40～50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC～6×SSC (又は約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液) のハイブリダイゼーション条件、及び約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジントな条件もまた、例えばDNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及び約68℃、0.2×SSC、0.1% SDSの洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度及び洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識する。

[0030] 上記のような核酸増幅反応又はハイブリダイゼーション等を使用してクローニングされる相同な核酸は、配列番号1又は3に記載の塩基配列に対して

、それぞれ、少なくとも30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらにより好ましくは90%以上、さらになお好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する。なお、同一性パーセントは、視覚的検査及び数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら、Nucleic Acids Res., 12, 387 (1984)に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ(UWGCG)より入手可能なGAPコンピュータープログラム(GCG Wisconsin Package、バージョン10.3)を用いて、配列情報を比較することによって決定することができる。

[0031] 一実施形態において、MycI遺伝子の遺伝子産物は、上記されるMycI遺伝子から発現されたポリペプチドである。典型的には、該ポリペプチドは、

(1) 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列を含む若しくはそれからなるポリペプチド；又は

(2) 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有し、並びに膵島様細胞を増殖させる効果及び／又はインスリン産生を促進させる効果を有するポリペプチドであり得る。

[0032] 一実施形態において、MycI遺伝子の遺伝子産物は、上記で定義されるポリペプチドの変異体であってもよく、配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列であり得る。置換は、保存的置換であってもよく、これは、特定のアミノ酸残基を類似の物理化学的特徴を有する残基で置き換えることである。保存的置換の非限定的な例には、Ile、Val、LeuまたはAla相互の置換のような脂肪族基含有アミノ酸残基の間の置換、Lys及びArg、Glu及びAsp、Gln及びAsn相互の置換のような極性残基の間での置換などが含まれる。

- [0033] アミノ酸の欠失、置換、挿入および／または付加による変異体は、Myc I 遺伝子に、例えば、周知技術である部位特異的変異誘発（例えば、Nucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p. 6487-6500, 1982）を施すことにより作成することができる。本明細書において、「1又は複数のアミノ酸」とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換、挿入及び／又は付加できる程度のアミノ酸を意味する。また、本明細書において「1又は複数のアミノ酸」とは、場合により、1又は数個のアミノ酸を意味してもよい。
- [0034] なお、ポリペプチドのアミノ酸配列にその活性を保持しつつ1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入及び／又は付加を施す方法としては、上記の部位特異的変異誘発の他にも、遺伝子を変異源で処理する方法、及び遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去、置換、挿入又は付加し、次いで連結する方法もある。限定されるものではないが、本発明におけるMyc I 遺伝子の遺伝子産物は、配列番号2又は4において1～10個、好ましくは9個以下、7個以下、5個以下、3個以下、2個以下、より好ましくは1個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、インスリン産生を促進する活性を有するポリペプチドであり得る。
- [0035] 変異体はさらに、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であって、膵島様細胞を増殖させる効果及び／又はインスリン産生を促進する効果を有するポリペプチドである。
- [0036] 2つのアミノ酸配列の同一性%は、視覚的検査および数学的計算によって決定してもよい。あるいは、2つのタンパク質配列の同一性パーセントは、Needleman, S. B. 及びWunsch, C. D. (J. Mol. Biol., 48:443-453, 1970) のアルゴリズムに基づき、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWCGC) よ

り入手可能なGAPコンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：(1) Henikoff, S. 及びHenikoff, J. G. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, 1992) に記載されるような、スコアリング・マトリックス、blosum62；(2) 12のギャップ加重；(3) 4のギャップ長加重；及び(4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。

[0037] (5) MycI 遺伝子の導入

本発明によれば、MycI 遺伝子を初代脾臓細胞、培養脾臓細胞、又は幹細胞（例えば、iPS細胞、ES細胞、体性幹細胞）に導入する方法は特に限定されず、当業者に公知の方法を用いることができる。遺伝子導入手段として、「形質転換」又は「トランスフェクション」が一般的であり、これは、外因性の核酸（例えば、宿主細胞に対して外来DNA又はRNA）の取込み後に細胞に誘導される一過的又は安定的な遺伝的変化を意味する。通常、遺伝的変化は、外因性の核酸を宿主細胞のゲノムに取り込むことによって、又はエピソーム成分として、若しくは独立して外因性の核酸を一過的又は安定的に維持することにより達成され得る。本発明によれば、導入されたMycI 遺伝子は、該遺伝子の発現のオン／オフを制御することができれば、宿主細胞のゲノムに組み込まれた状態であってもよく、又はエピソーム成分として存在してもよく、又は該遺伝子を含むプラスミド若しくはベクターのまま細胞質に存在してもよい。

[0038] 通常、宿主細胞への外因性の核酸（好ましくはDNA）の導入には、「ベクター」が使用される。一般的に、ベクターとしては、ウイルス、特に弱毒化ウイルス及び／又は複製不能ウイルスが含まれる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが例示される。また、ベクターは、外因性の核酸の発現が可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデ

ニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、蛍光タンパク質、 β グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。ここで、「プロモーター」はまた、細胞種特異的に制御可能な、組織特異的に制御可能な、又は外部のシグナルもしくは薬剤で誘導可能な、プロモーター依存性遺伝子発現に十分なプロモーター成分を含むことが意図される。そのような成分は、天然遺伝子の5' 領域又は3' 領域に位置している可能性がある。また、「機能的に結合された」とは、適切な分子（例えば、転写活性化タンパク質）が制御配列に結合されたときに発現が可能になるように、DNA配列と制御配列が結合していることを意味する。

[0039] また、宿主細胞へのベクターの導入は、限定されないが、エレクトロポレーション法（Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14041-14046 (1996) など）、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、遺伝子導入用リピッド（リポフェクタミン、リポフェクチンなど）を用いる方法により行われる。その後、ベクターが導入された細胞を、マーカー遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子）の特性に基づき選択することができる。選択された細胞において正しく相同組換えが起こっていることは対象とする外因性の核酸の一部をプローブとして用いたサザンブロット等により確認することができる。このようにして、対象とする遺伝子、具体的には、MycI 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する細胞を作製することができる。

[0040] ES細胞としては、Col a1 遺伝子座の下流にFrt配列を有し、内在性のRosa26プロモーターの制御下でリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子であるM2-rtTAを発現するKH2株を用いることができる（Beard C, et al., Genesis, vol. 44, p. 23-28 (2006)）。該ES細胞へのMycI 遺伝子の導入は

、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば、MycI 遺伝子を TA クローニングにより、エントリーベクターである pCR8-GW-TOPO ベクター (Invitrogen Life Technologies 社製) に挿入後、該ベクターと、例えば、Col1a1-TetOP-AttR1-ccdB-AttR2-ires-mCherry ベクター間で LR 反応を行って、TetOP-MycI-ires-mCherry ベクターを遺伝子導入用ベクターとして使用することができる。ここで、ベクター中の「TetOP (オペロン)」配列は、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子が結合する配列 (テトラサイクリン応答因子: TRE) であり、細胞に添加されたドキシサイクリン (Dox) などのリバーステトラサイクリンに依存して宿主細胞から発現したリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子が結合し、その下流に連結された遺伝子の発現が誘導される。また、「ires」(internal ribosome entry site) はリボソーム内部認識配列であり、「mCherry」は、赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子 (レポーター遺伝子) である。該ベクターを flipase をコードする核酸とともに KH2-ES 細胞に導入することにより、MycI 遺伝子を ES 細胞の染色体に組み込むことができる。また、上記のような「ires-mCherry」を含むベクターの他に、耐性遺伝子を含有させた「ires- β geo (β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) カセット」(Mountford P. et al., Proc. Natl. Sci. USA, 91: 4303-4307 (1994)) を含有する pBSSK(-)-IRES- β geo、IRES-Hygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) カセットを含有する同様のベクターなどを使用してもよい。

[0041] 本発明は、MycI 遺伝子の一過性発現を制御することにより、膵島様細胞の増殖、及びインスリン産生細胞へと分化させることができる。このように、本発明は、MycI 遺伝子の一過性発現を特徴とするが、MycI 遺伝子を一過性に発現させた場合、膵島様細胞の細胞分裂に伴って、MycI 遺

伝子が導入されている細胞数が相対的に減少するため、時間とともにMyc I 遺伝子の発現量を自然と減少又は停止させることができる。すなわち、一実施形態では、本発明は、Myc I 遺伝子の発現の「オン」制御により、本発明の目的が達成される。また、別の実施形態では、Myc I 遺伝子の発現を強制的に「オフ」にすることも可能である（以下、「オン／オフ」制御という）。

[0042] 上記のようにリバーステトラサイクリンを用いることにより、宿主細胞に導入されたMyc I 遺伝子の発現をオン／オフ制御することができる。すなわち、リバーステトラサイクリンの存在下では、Myc I 遺伝子は細胞内で発現し続け、膵島様細胞を増殖させることができ、一方、リバーステトラサイクリンを除くことによって、膵島様細胞の増殖を停止させ、インスリン産生細胞へと分化を誘導させることができる。本発明においては、膵島様細胞に導入されたMyc I 遺伝子の一過的な発現（オン状態）は、細胞培養開始から少なくとも2日から最大100日、例えば、90日、80日、70日、60日の期間であることが好ましい。一方で、Myc I 遺伝子が導入された膵島様細胞は、上記の期間で増殖することが好ましい。

[0043] Myc I 遺伝子の発現をオン／オフ制御する代替の手段として、ウイルスベクターの遺伝子発現及び細胞増殖を光照射で精度よくスイッチオン／オフできる「光制御性ウイルスベクター」（Tahara, M., et al., PNAS, vol.116, 11587-11589, 2019）を用いることができる。これは、マグネットと呼ばれる光スイッチタンパク質をコードする遺伝子がウイルスベクターに導入されたものであり、同ベクターに組み込んだ標的遺伝子の発現を青色光を使用して制御することができるものである。

[0044] Myc I 遺伝子の発現をオン／オフ制御する代替の別の例としては、エピソードベクター（Okita K., et al., Nat Methods 2011 May 8 (5) : 409-412）、センダイウイルス、RNAベクター（Warren L., et al., Cell Stem Cell 2010 Nov 7 (5) : 618-630）が挙げられ

る。これらに限定されず、上記したiPS細胞の初期化（樹立）に使用した方法（すなわち、一時的に遺伝子を誘導する方法）を用いることができる。

[0045] 本発明によれば、単離された外来性Mycl遺伝子を導入する他に、細胞に内在するMycl遺伝子を強制的に発現させることによって、本発明の目的を達成することができる。内因性のMycl遺伝子を発現させる手段としては、限定されないが、野生型のプロモーターやエンハンサーを、Mycl遺伝子を操作可能に発現誘導させるための強力なプロモーターやエンハンサーで置換し、強制的に遺伝子発現させる方法であってもよい。置換に使用されるプロモーターの例としては、強力なプロモーターであるサイトメトリー（CMV）プロモーター、インデューサーの存在下で機能する誘導性プロモーターなどが挙げられる。一方、置換に使用されるエンハンサーの例としては、SV40エンハンサー、ヘルペスBウイルスエンハンサー、サイトメガロウイルスエンハンサー、 α -フェトプロテインエンハンサーなどが挙げられる。別の実施形態では、CRISPR Type II（CRISPR-dCas9を含む）の他、CRISPR-type I、TALEN、ZFNのゲノム認識配列にプロモーター及び／又エンハンサーを活性化させることができる脱メチル化酵素、ヒストン修飾酵素、転写活性化因子、具体的にはVP64、p65、Rta等を付加した分子を利用することができる。本明細書においては、上記されるプロモーター、エンハンサー、これらを活性化する酵素及び因子、又は核酸タンパク質複合体若しくは低分子化合物を、Mycl遺伝子を活性化させるための「活性剤」と呼ぶことがある。

[0046] （6）Mycl遺伝子の遺伝子産物の導入

Mycl遺伝子産物の細胞への導入は、外来遺伝子やタンパク質を細胞に導入する一般的な方法により行うことができる。例えば、このような方法には、限定されないが、トランスフェクション試薬を用いる方法、ウイルスを用いる方法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ソノポレーション法、リポソーム融合法、及びマイクロマニピュレーター、レーザー光照射によって細胞膜に細孔を形成させることによる導入法などが挙げられる。

。

[0047] (7) キメラ哺乳動物の作製

ES細胞を哺乳動物に導入して、キメラ哺乳動物を作製する方法は、当業者に周知の方法を用いて行うことができる。まず、上記のMycI遺伝子が導入されたES細胞の培養には、当業者に知られた如何なる培地を用いることができる。例えば、該ES細胞をフィーダー細胞上で培養する場合、フィーダー細胞（例えば、MEF（マウス胎児繊維芽細胞））を用いることができ、このフィーダー細胞上で該ES細胞をES細胞用培地（例えば、15% FBS、50U/mLのペニシリン／ストレプトマイシン、レーグルタミン、非必須アミノ酸を含むノックアウトDMEM（GIBCO）に、2-メルカプトエタノール（2ME、GIBCO）及びLIF（SIGMA）を添加した培地）を使用することができる。

[0048] 次に、上記ES細胞を哺乳動物に導入してノックアウト動物（MycI遺伝子ノックイン動物）を作製する。ここでは、哺乳動物としてマウスを例にして説明するが、ノックインマウスの作製方法は当業者に周知である。具体的には、上記ES細胞をマウス（例えばC57BL/6等）の胚盤胞にインジェクトし、偽妊娠させたメスのマウス（ICR等）の子宮内に移植することによりキメラマウスを作製することができる。その後、キメラマウスと通常のマウス（C57BL/6等）とを交配させ、MycI遺伝子がヘテロでノックインされたヘテロ変異マウスを作製することができる。ヘテロ変異マウス同士を交配させることにより、MycI遺伝子がホモでノックインされたホモ変異マウスを得ることができる。以上のノックインマウスの作製については、ECAT3ノックインマウス（Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8):2699-2708 (2003)）、ECAT4ノックインマウス（Mitsui, K., et al., Cell, 113:631-642 (2003)）、ECAT5ノックインマウス（Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Nature,

423 (6939) : p541-545 (2003)、特開2003-265166号公報)等を参考にされたい。

[0049] また、キメラ哺乳動物は、上記のES細胞に限らず、iPS細胞を用いても作製することができる。例えば、胚盤胞補完作法を用いて、非ヒト哺乳動物内でヒトiPS細胞から臓器(器官)を作製することができる。例えば、中内らは、無臍性クローンブタの生体内で、ヒトiPSから誘導したヒト臍臓を発生させている(Nakauch, H., et al., PNAS, Vol. 110, No. 1, 4557-4562 (2013)を参照されたい)。

[0050] 2. 膵島様細胞の増殖及び分化の制御

本発明によれば、インビトロ及びインビボにおいて、上記で作製した膵島様細胞の増殖及び分化を制御することができる。MycI遺伝子の誘導方法は、該遺伝子を細胞に導入するために用いた上述の方法に準じて選択可能である。例えば、上述したようなTetOP-MycI-ires-mCherryベクターを遺伝子導入用ベクターとして使用して細胞にMycI遺伝子を導入した場合、ドキシサイクリン(Dox)などのリバーステトラサイクリンに依存して宿主細胞から発現したリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子が結合し、その下流に連結されたMycI遺伝子を発現させて、膵島様細胞の増殖を誘導することができる。細胞培養系にDoxの添加する濃度は、適宜調整され得る。例えば、1~100mg/mLなどであってもよい。Doxの添加によって膵島様細胞を増殖させた後、例えば、Dox不含の培地に置換することによって増殖を停止し、インスリン産生などの細胞分化を誘導することができる。

[0051] インビボでは、キメラ非ヒト哺乳動物に、例えば、Dox含有の水を与えることによって、膵臓内で膵島様細胞の増殖を誘導することができる。水に添加した場合のDoxの濃度は、例えば、例えば、1~100mg/mLなどであってもよく、好ましくは2.0mg/mLである。キメラ非マウスを用いる場合、生後8週齢までは、膵臓が日齢の増加とともに成長するため、

成長が停止した時期、例えば、生後8週齢以降にDoxを投与することが挙げられるが、増殖さえ誘導することができれば、週齢は限定されない。

[0052] 3. インスリン産生能を有する膵島細胞又はその前駆細胞の製造方法

本発明によれば、インスリン産生能を有する膵島細胞又はその前駆細胞を製造する方法が提供される。このような製造方法は、限定されないが、初代膵島細胞、培養膵島細胞、又は幹細胞由来である膵島細胞を原料として、Mycl遺伝子を該膵島細胞に導入し、Mycl遺伝子の強制発現により細胞を増殖させた後、該遺伝子の発現を停止させることによって、インスリン産生能を有する膵島細胞又はその前駆細胞を得ることを含む。なお、Mycl遺伝子の強制発現及び停止は、上述したように、例えば、該遺伝子の発現をオン／オフ制御する代替の手段（例えば、光制御性ウイルスベクターの使用）、又はドキシサイクリン感受性のリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子を利用することができる。本明細書において使用する場合、「膵島細胞の前駆細胞」又は「膵島前駆細胞」は、Mycl遺伝子の発現停止後、インスリン産生能を有する膵島細胞へと分化していく途中の細胞（又は細胞群）を指し、例えば、PDx1陽性、PTF1a陽性、NKX6.1陽性、Fev陽性、Pax4陽性、及びCck遺伝子からなる群から1つ以上選択されるマーカーを指標として同定され得る。

[0053] 4. 医薬用途

本発明によれば、導入されたMycl遺伝子の発現を制御することにより、膵島様細胞を増殖させ、インスリン産生を促進させることができる。したがって、一態様では、Mycl遺伝子又はその遺伝子産物を有効成分として含む膵島細胞増幅促進剤、膵島機能改善剤、インスリン産生促進剤；上記有効成分及び薬学的に許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有する医薬組成物；上記膵島細胞増幅促進剤、膵島機能改善剤、インスリン産生促進剤又は医薬組成物を用いた糖尿病患者の予防及び／又は治療法；並びに上記膵島細胞増幅促進剤、膵島機能改善剤、インスリン産生

促進剤又は医薬組成物を製造するためのMycI遺伝子の使用が提供される。別の態様では、糖尿病の予防及び／又は治療目的で、MycI遺伝子又はその遺伝子産物を対象に投与する方法（インビボ法）；及びインビトロでMycI遺伝子又はその遺伝子産物を導入した膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、若しくはインスリン産生細胞（以下、単に「膵島様細胞等」という場合がある）又はそれらの任意の組み合わせを対象に移植する方法（エクスビボ法）が提供される。

[0054] なお、本発明のエクスビボ法は、使用される細胞により、異なる態様が意図される。例えば、（i）成体の膵島由来の細胞へ遺伝子導入して得られる膵島様細胞を他家インビトロ又は自家インビトロで製造する態様（いずれも含む狭義のエクスビボ法）；（ii）分化誘導して得られる膵島様細胞、即ち、幹細胞（iPS細胞、ES細胞、体性幹細胞など）由来の膵島細胞のMycI遺伝子を導入して得られる膵島様細胞を他家インビトロ又は自家インビトロでの製造する態様（広義のエクスビボ法）；（iii）上記（i）及び（ii）においてMycI遺伝子が機能発現して、増殖中の膵島前駆細胞様細胞であり得る態様；（iv）上記（i）～（iii）から分化して生成されるインスリン産生細胞又は膵島細胞（MycI遺伝子を含まない）である態様が挙げられる。

[0055] 本発明の一態様として、細胞が、患者に対して自家であるか他家であるかを問わず、公知の方法、具体的にはNature Medicine volume 22, pages 306–311 (2016)., doi: 10.1038/nm.4030、Nature Biomedical Engineering volume 2, pages 810–821 (2018)., DOI: 10.1038/s41551-018-0275-1、EBioMedicine 12 (2016) 255?262., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.034>等に記載の方法により、移植する膵島をカプセル化して投与してもよい。移植する膵島をカプセル化することによ

り、免疫抑制剤を使用しない、又は免疫抑制剤の投与量を低減することが可能である。

[0056] 本明細書の一態様として、単離した膵島について適宜遺伝子編集することができる。遺伝子編集としては特に限定されないが、具体的には、ゲノム編集による膵島細胞に含まれる変異遺伝子の修正、HLAやGADタンパク質等の表面抗原等、免疫反応を引き起こす分子の改変、Beta-2 MicroglobulinやRFX5、RFXANK、RFXAP、CITA遺伝子の欠失により免疫寛容を誘導する等、治療において好ましい特徴を付加することができる。遺伝子編集の方法は特に限定されないが、例えば、CRISPR-Cas9、TALEN、ZFN、CRISPR-Cas3、CRISPR-Type I-D及びこれらの改変体や、機能分子を発現させるためのpiggyBAC等のトランスポゾンベクターが具体的に挙げられる

[0057] (1) 適応疾患

MycI遺伝子又はその遺伝子産物を上記の態様に基づいて適用され得る疾患は、生体においてインスリンが十分に機能していない状態（典型的には、インスリン抵抗性、インスリン分泌低下）にある疾患である。本発明によれば、MycI遺伝子又はその遺伝子産物によりインスリン産生を促進することができ、例えば、糖尿病患者に対して血糖を低下させる作用を有する。適応疾患としては、典型的には、糖尿病であるが、より詳細には、重症低血糖症、I型糖尿病（緩徐進行1型糖尿病又は1.5型糖尿病を含む）、II型糖尿病、耐糖能障害、高血糖症、異脂肪血症、肥満症又は代謝症候群に関連する疾患、障害又は症状、その他の特定の機序や疾患によるものであって、例えば、膵β細胞機能に関与する遺伝子異常、インスリン作用の伝達機構に関与する遺伝子異常、他の疾患や条件に伴うものとして膵外分泌疾患、内分泌疾患、肝疾患、薬剤や化学物質によるもの、感染症、免疫機序による希少な病態など、あるいは妊娠糖尿病などが挙げられる。さらに、糖尿病に起因した糖尿病性合併症（例えば、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害など）も適応疾患に含めることができる。また、膵炎や膵臓癌に伴う膵臓全摘出手

術又は膵臓部分切除の結果引き起こされるインスリン分泌不全状態も適応疾患に含めることができる。

[0058] さらに、本明細書に記載される方法により治療し得る糖尿病の種類としては特に限定されないが、本方法により、血糖値に依存して生理的なインスリンを分泌する、低血糖症を生じにくい治療を提供することができる。例えば、重症低血糖症の治療に用いる場合には、限定されないが、重症低血糖症に対してドナー膵島が著明な効果を示すことが当業者に知られていることから、一態様として公知の文献に記載の方法を用いることができる。ここでいう公知の文献に記載の方法とは、限定されないが、例えば、*Diabetes Care* 2016 Jul; 39 (7) : 1230-1240. , DOI : 10.2337/dc15-1988、*The New England Journal of Medicine*. 343 (4) : 230?238. , DOI : 10.1056/NEJM200007273430401、*The New England Journal of Medicine*. 355 (13) : 1318?1330. , DOI : 10.1056/NEJMoa061267等が具体的に挙げられる。あるいは、公知の文献に記載された細胞移植ではなく、公知の文献に記載された膵島細胞の移植量と同程度、好ましくはそれ以上の膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞を増幅させることのできる、*Myc* I 遺伝子又はその遺伝子産物を対象に投与する方法（インビボ法）を選択することができる。

[0059] また、Ⅰ型糖尿病の治療に用いる場合、特に限定はないが、Ⅰ型糖尿病に対する治療の一態様として、例えば、Ⅰ型糖尿病患者の随時、空腹時、糖負荷後及び／又はグルカゴン刺激後のインスリン、血糖値及び／又はCペプチド量に応じて、含有する膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞の数を調整してもよく、本明細書中に記載の方法により、インビボ治療を行うための剤の投与量を決定してもよい。インスリン枯渇状態であるⅠ型糖尿病患者は、低血糖症状を呈するリスクが高く、本明細書

に記載される方法を用いた治療が好ましいという観点からは、例えば、空腹時及び／又はグルカゴン刺激時の血中Cペプチド量が 0.5 ng/mL 以下、好ましくは 0.2 ng/mL 以下、より好ましくは 0.1 ng/mL 以下のⅠ型糖尿病患者を対象として治療することができる。具体的な剤の投与量は、例えば、通常重症低血糖症を適応として移植されるドナー膵島の移植量を参考にして調整すればよい。具体的には、例えば、 500 IEQ/kg 相当以上、好ましくは 1000 IEQ/kg 相当以上、より好ましくは 2000 IEQ/kg 相当以上、さらにより好ましくは 5000 IEQ/kg 相当以上の膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞である。あるいは、同程度の膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞を増幅させることのできるMyc遺伝子又はその遺伝子産物を対象に投与する方法（インビボ法）を選択することができる。

[0060] また、ⅠⅠ型糖尿病の治療に用いる場合、特に限定はないが、例えば一態様として、体内に分泌されるインスリン量が不足する、インスリン依存状態のⅠⅠ型糖尿病の治療剤として使用することができる。具体的には、例えば、ⅠⅠ型糖尿病患者の随時、空腹時、糖負荷後及び／又はグルカゴン刺激後のインスリン、血糖値及び／又はCペプチド量に応じて含有する膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞の数を調整してもよく、本明細書に記載される方法により、インビボ治療を行うための剤の投与量を決定してもよい。インスリンが不足している病態で好ましい効果が得られるという観点からは、例えば、空腹時及び／又はグルカゴン刺激時の血中Cペプチド量が 0.5 ng/mL 以下、好ましくは 0.2 ng/mL 以下、より好ましくは 0.1 ng/mL 以下のⅠⅠ型糖尿病患者を対象として治療することができる。具体的な剤の投与量は、例えば、通常、重症低血糖症を適応として移植されるドナー膵島の移植量を参考にして調整すればよい。具体的には、例えば、 500 IEQ/kg 相当以上、好ましくは 1000 IEQ/kg 相当以上、より好ましくは 2000 IEQ/kg 相当以上、さらにより好ましくは 5000 IEQ/kg 相当以上の膵島細胞、膵島様細胞

、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞である。あるいは、同程度の膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞を増幅させることのできるMyc遺伝子又はその遺伝子産物を対象に投与する方法（インビボ法）を選択することができる。

[0061] また、緩徐進行Ⅰ型糖尿病の治療剤として使用する場合、限定されないが、Ⅰ型糖尿病及び又はⅡ型糖尿病と同様にして体内のインスリン、血糖値及び／又はCペプチド量に応じて含有する剤の量を調整することができる。この場合、本明細書の方法により増幅させる膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞は、好ましくは患者自身の細胞を由来とする。例えば、緩徐進行Ⅰ型糖尿病の治療の一態様として、好ましくは、血中の膵島細胞に対する自己抗体やHLAのタイプを事前に調べておき、インスリン依存状態及び／又はインスリン枯渇状態に陥る前又は陥った後に自己の膵島細胞を本明細書の方法により増幅してやることができれば、免疫抑制剤が不要な治療が可能となり、インスリン依存状態及び／又はインスリン枯渇状態への移行を予防することができる、又はインスリン依存状態及び／又はインスリン枯渇状態を治療することができる。緩徐進行Ⅰ型糖尿病であるかどうかを判別するためには、血中の膵島細胞に対する自己抗体やHLAのタイプが緩徐進行Ⅰ型糖尿病に関与していれば、特に限定されないが、例えば、膵島細胞抗体（ICA）、GAD抗体、インスリン自己抗体（IIA）、IA-2抗体などの膵島関連自己抗体が重複もしくは単独で陽性を示すかどうかを確認するといった、公知の方法が挙げられる。さらに、HLAとしてHLA-DR4-DQA1*0301-B1*0401等の緩徐進行Ⅰ型糖尿病と関連するHLAを保有するかどうかといった、公知の方法により確認してもよい。

[0062] また、ドナー膵島により治療効果が認められるという観点からは、重症低血糖症の治療はエクスピボ法が好ましいが、本明細書に記載の方法により体内で（インビボで）膵島細胞を増幅させることができる。このようにして増幅させた膵島細胞により、エクスピボ法と同様の効果が認められるため、イ

ンビボで膵島を増幅させる治療方法もエキスビボ法と同様に重症低血糖症の治療方法として好ましく選択することができる。さらに、Ⅰ型糖尿病、ⅠⅠ型糖尿病、緩徐進行Ⅰ型糖尿病の治療についても、エキスビボ法と同様に、対象の性別、年齢、体重、患部の状態、使用する細胞の状態等を考慮して、体内で（インビボで）膵島細胞を増幅させる方法を選択することができる。この時、体内で（インビボで）膵島細胞を増幅させる方法とエキスビボ法を組み合わせることもできる。

[0063] 本発明によれば、このような疾患を予防及び／又は治療することができる。本明細書で使用する場合、用語「予防（する）」とは、上記の疾患又はその症状の発症／発現を防止若しくは遅延すること、又は発症／発現の危険性を低下させることをいう。

「治療」とは、標的疾患に特徴的な症状又は随伴症状を緩和すること（軽症化）、症状の悪化を阻止ないし遅延することなどが含まれ、治療の中には疾患の改善も含まれる。「予防」とは、

[0064] （２）インスリン産生促進剤及び医薬組成物

本発明のMy c l遺伝子又はその遺伝子産物は、膵島細胞増幅促進剤、膵島機能改善剤、インスリン産生促進剤又は医薬品組成物として上記適応疾患に対する予防及び治療に提供され得る。ここで、膵島細胞増幅促進剤の一態様としては、膵島に含まれる α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ε 細胞、PP細胞のうちいずれか一つ、好ましくは任意の二つ以上の膵島細胞を増殖させる剤をいう。また、膵島機能改善剤の一態様としては、投与することにより、生体における膵島が担う機能の一部または全部を改善させる剤のことをいい、膵島の機能の一部とは例えば、膵島細胞による血糖調節作用、インスリンによる血糖降下作用、グルカゴンによるグルコース産生・放出作用、ソマトスタチンによるガストリン、セクレチン、インスリン及び／又はグルカゴンの分泌抑制作用若しくは消化管における栄養吸収抑制作用等、グレリンによる食欲調節作用、膵ポリペプチドによる胆嚢収縮調節作用や食欲調節作用が具体的に挙げられる。また、インスリン産生促進剤の一態様としては、例えば、生

体内で膵島が担う機能の一つである、血糖値に応じた生理的なインスリン分泌を促進する剤が挙げられる。また、医薬組成物として提供される場合、上記の態様で使用されるMycI遺伝子又はその遺伝子産物の有効成分の他に、薬学的に許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。さらに、場合により、MycI遺伝子を活性化させるための活性剤を含めてもよい。

[0065] MycI遺伝子又はその遺伝子産物が導入される生体由来の膵島細胞は、健常者の膵島細胞であってもよく、又は一部若しくは大部分の β 細胞が消失したI型糖尿病患者若しくは終末期II型糖尿病患者由来の膵島細胞であり得る。この場合、膵島細胞は、レシピエントに対して、自家又は他家であってもよい。

[0066] 本発明の細胞製剤及び医薬組成物は、限定されないが、上記で得られた膵島様細胞を生理食塩水や適切な緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）に懸濁させることによって得られる。なお、治療に必要とする細胞数は、MycI遺伝子を強制発現させ、適宜細胞を増殖させることにより得ることができる。

[0067] また、膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞の細胞製剤及び医薬組成物への使用においては、該細胞を保護するためにジメチルスルフォキシド（DMSO）や血清アルブミン等を、細菌の混入及び増殖を防ぐために抗生物質等を細胞製剤及び医薬組成物に含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を細胞製剤及び医薬組成物に含有させてもよい。当業者は、これら因子及び薬剤を適切な濃度で細胞製剤及び医薬組成物に添加することができる。

[0068] 上記で調製される細胞製剤及び医薬組成物中に含有する膵島細胞、膵島様細胞、膵島前駆細胞様細胞、又はインスリン産生細胞の数は、糖尿病及びそ

れに関連する疾患の予防及び／又は治療において所望の効果（例えば、血糖値の低下）が得られるように、対象の性別、年齢、体重、患部の状態、使用する細胞の状態等を考慮して、適宜、調整することができる。

- [0069] 本発明のインスリン産生促進及び医薬組成物は、様々な対象に投与することができ、例えば、霊長類、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなどの哺乳動物が意図され、好ましくはヒトである。また、対象への投与経路としては、限定されないが、非経口投与、例えば、注射又は注入により体内のグルコースに応答し得る任意の場所へ投与することができる。具体的には、例えば、膵臓内、腎被膜下、好ましくは皮下、腹腔内、より好ましくは血管内、静脈内、さらにより好ましくは門脈内に移植又は投与することができる。
- [0070] 投与された *My c l* 遺伝子を生体内で活性化させる方法は、限定されないが、上述した *My c l* 遺伝子発現の「オン」制御、又は「オン及び／又はオフ」制御のシステムを利用することができる。例えば、上述した「光制御性ウイルスベクター」（Tahara, M., et al., PNAS, vol.116, 11587-11589, 2019）を用いてもよい。
- [0071] また、*My c l* 遺伝子の膵臓へのターゲティングを目的とした場合、膵島細胞に特異的に発現しているマーカー（例えば、*P D X 1*、*C-ペプチド*、*インスリン*、*M a f A*、*M n x 1*、*P a x 4*、*P a x 6*、*N e r u r o D 1*、*I s l 1*、*N k x 2. 2*、*N g n 3*、*H N F 1 a*、*F o x a 2*、*N k x 6. 1*、*グルカゴン*、*A r x*、*M a f B*、*R F X 6*、*I R X 1*、*I R X 2*、*ソマトスタチン*）を標的として遺伝子導入することができる。体内で（インビボで）膵島細胞を増幅させる方法を選択する場合の対象への投与経路としては、限定されないが、例えば、膵臓内、皮下、腹腔内、好ましくは血管内、静脈内、さらにより好ましくは腹腔動脈内、膵管内在が具体的に挙げられる。
- [0072] （３）治療方法

本発明によれば、*My c l* 遺伝子若しくはその遺伝子産物、膵島様細胞等、又はそれらのいずれかの組み合わせを用いて、糖尿病又はそれに関連する

疾患を有する対象を予防及び／又は治療する方法が提供される。さらに、本発明によれば、上記治療方法において、MycI 遺伝子を活性化させるための活性剤を投与することができ、インスリン産生促進剤又は医薬組成物の投与前に、同時に、又は後に投与してもよい。

[0073] (4) キット

本発明によれば、インスリン産生促進剤又は医薬組成物を含む、糖尿病又はそれに関連する疾患を予防及び／又は治療するために使用されるキットが提供される。このようなキットには、上記インスリン産生促進剤又は医薬組成物を対象に投与又は移植するための使用説明書を含むことができる。また、キットには、MycI 遺伝子を活性化させるための活性剤をさらに含み得る。

実施例

[0074] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

[0075] 方法

(i) Dox 依存的にMyc、Mycn、MycI 発現誘導可能なES細胞の樹立

ES細胞由来のcDNAからMyc、Mycn、及びMycIのcDNAのクローニングを行い、このクローニング断片をpCR8-GW-TOPOベクター (Invitrogen社) へ挿入した。各Myc遺伝子が挿入されたpCR8-MycI-TOPOベクターとTetOP-AttR1-ccdB-AttR2-ires-mCherryベクター間でLR反応を行い作製したCol1a1-TetOP-MycI-ires-mCherryベクター (以下、「ターゲティングベクター」と呼ぶ) をflip-inリコンビネーションシステム (Beard et al., 2006) を用いることでKH2-ES細胞のCol1a1遺伝子座に挿入した。Flip-inリコンビネーションを行う際には、各Myc遺伝子が挿入されたターゲティングベクター50 µgとpFlapaseベクター25 µg及び2

5 mM HEPES 緩衝液 (Gibco 社) を含む高グルコース DMEM (Nacalai Tesque 社) 培地で懸濁した細胞懸濁液を Gene pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (BIO-RAD) を用いて KH2-ES 細胞にエレクトロポレーション (Voltage: 550 V, Capacitance: 25 μ F, Resistance: ∞ , Cuvette: 4 mm 以上の条件で 2 回パルス供給) した。エレクトロポレーションを行なった 24 時間後、ハイグロマイシン B (Roche 社) 150 μ g/mL で選択し、形成されたコロニーを拾い、Dox 依存的に各 Myc 遺伝子を発現誘導可能な ES 細胞株を樹立した。

[0076] (ii) 細胞の培養方法

フィーダー細胞 (MEF; マウス胎仔繊維芽細胞) の培養には、10% FBS (GIBCO 社)、50 U/mL Penicillin-Streptomycin (P/S; Nacalai Tesque 社)、L-グルタミン (GIBCO 社)、NEAA (Nacalai Tesque 社) を含む DMEM (Nacalai Tesque 社) 培地を用いた。

[0077] ES 細胞の培養には、15% FBS、50 U/mL P/S、L-グルタミン、NEAA を含む knock out-DMEM (GIBCO) に、2-メルカプトエタノール (2ME: GIBCO 社) 及び LIF (SIGMA 社) を添加した培地を用いて、ゼラチンコート (SIGMA) し、フィーダー細胞を播種したディッシュで培養した。ES 細胞の継代の際は、0.25% トリプシン/1 mM EDTA (GIBCO) で 37°C にて約 3 分間処理し、1/10 量程度の細胞懸濁液を新たなディッシュに播種した。

[0078] (iii) 生体内 MycI 発現誘導可能なマウスの作製

ドキシサイクリン (Sigma-Aldrich 社、以下、「Dox」と記載することがある) 依存的に MycI の発現を誘導可能な ES 細胞をマウス胚盤胞 (ICR, E3.5) にインジェクションし、偽妊娠 2 日目マウス (Sic: ICR, 清水実験材料) の子宮内に移植することにより、Dox 依存的に MycI 発現を誘導可能な細胞を有したキメラマウスを作製した。

[0079] (i v) ドキシサイクリンの投与

8週齢のマウスを使用し、2.0 mg/mLのDoxを含む溶液を飲水投与した。培養細胞においては、終濃度2.0 µg/mLとなるよう培地に添加した。

[0080] (v) マウス諸臓器における病理標本の作製

マウスを解剖後、各臓器を4%PFA（和光純薬社）内において1日振とうした翌日に70%EtOH（和光純薬100%EtOHを希釈して使用）に移し、さらに1日振とうした。翌日、スピンティッシュプロセッサSTR120（Thermo Scientific社）を使用し、推奨プロトコルに従いブロックを作製した。病理標本の作製はバイオゲート株式会社に委託した。

[0081] (v i) 免疫染色

組織切片をキシレン（和光純薬社）、その後、100%EtOH（和光純薬社）に各30分以上浸した。水道水で約10分間洗浄し、沸騰させた抗原賦活化液pH9（ニチレイバイオサイエンス社、10倍希釈で使用）内に移し、10分間抗原賦活化処理を行った。ブロッキング溶液（2%BSA + 1×PBS）により各倍率で希釈した1次抗体溶液を組織切片上に200 µL添加し、30分～1時間静置した。1×PBSで2回洗浄した後、2次抗体溶液を組織切片上に2滴添加し、30分間静置した。1×PBSで2回洗浄した後、DAB染色の場合はDAB溶液（ニチレイバイオサイエンス社、DAB基質キット使用、1 mLのElix水に試薬A及びBを各1滴ずつ添加・混合後、試薬Cを1滴添加・混合したもの）を組織切片上に150 µL添加し、抗原抗体反応を行った後、顕微鏡下で観察を行った。蛍光染色の場合は、組織切片上に封入材を1滴添加し、カバーガラスをかけた後、顕微鏡下で観察を行った。

[0082] <使用した1次抗体（希釈倍率）－2次抗体>

・抗mCherry抗体（abcam社、1/500）－抗ウサギIgG抗体（ニチレイバイオサイエンス社）

- ・抗Synaptophysin抗体 (abcam社、1/500) - 抗ウサギIgG抗体 (ニチレイバイオサイエンス社)
- ・抗Chromogranin A抗体 (DAKO社、1/500) - 抗ウサギIgG抗体 (ニチレイバイオサイエンス社)
- ・抗Ki67抗体 (abcam社、1/200) - 抗ウサギIgG抗体 (ニチレイバイオサイエンス社)
- ・抗Insulin抗体 (DAKO社) - 抗モルモットIgG抗体 (BIOTIUM社)
- ・抗Somatostatin抗体 (Santa cruz社、1/300) - 抗マウスIgG抗体 (BIOTIUM社)
- ・抗Glucagon抗体 (Santa cruz社、1/300) - 抗マウスIgG抗体 (BIOTIUM社)

[0083] (vii) RNA回収、RNA抽出、及びcDNA合成

RNA回収においては、培養細胞をPBS (-) (Nakalai Tesque) で洗浄後、350 μ LのLBP緩衝液で細胞を溶解した。RNA抽出にはNuc reoSpin (登録商標) RNA Plus (TAKARA社) を用いて、推奨プロトコールに従った。cDNAの合成には、Primescript 一本鎖cDNA合成キット (TAKARA社) を用いて推奨プロトコールに従った。

[0084] (viii) qRT-PCR

GoTaq qPCRマスターミックス (Promega) を用いて、推奨プロトコールに従った。Stepone Plusシステム (Life technologies社) により解析を行った。プライマー及びPCR反応条件は以下のものを使用した。

[0085]

[表1]

表 1.
(a) プライマー

標的遺伝子	Fw/Rv	長さ (mer)	配列 (5' → 3')
β アクチン	Fw	20	GCCAACCGTGAAAAGATGAC (配列番号 5)
	Rv	19	TCCGGAGTCCATCACAATG (配列番号 6)
Myc	Fw	18	CACCAGCAGCGACTCTGA (配列番号 7)
	Rv	18	GGGGTTTGCCTCTTCTCC (配列番号 8)
Mycn	Fw	20	CTCCGGAGAGGATACCTTGA (配列番号 9)
	Rv	20	TCTCTACGGTGACCACATCG (配列番号 10)
Mycl	Fw	20	ACGGCACTCCTAGTCTGGAA (配列番号 11)
	Rv	21	CCACGTCAATCTCTTCACCTT (配列番号 12)
Fev	Fw	19	CCGTCCGAGATGGTCTTTT (配列番号 13)
	Rv	20	CCAGGAGAACTGCCACAAC (配列番号 14)
Cck	Fw	20	ACTGCTAGCGGATACATCC (配列番号 15)
	Rv	20	TATTCTATGGCTGGGGTCCA (配列番号 16)
Pax4	Fw	20	GTACTTCGGGCACTTCAGGA (配列番号 17)
	Rv	20	TTACTGTGGGGACTGGGAAG (配列番号 18)

[0086] (b) PCR 反応条件

- ・ 95℃、2 分間
- ・ 95℃ (15 秒)、60℃ (1 分) [40 サイクル]
- ・ 95℃ (15 秒)、60℃ (1 分)、95℃ (15 秒)

[0087] (ix) 脾臓単離

8 週齢のマウスにソムノペンチル (共立製薬株式会社) を腹腔内注射することで麻酔した。開腹後、十二指腸総胆管開口部を同定したのち、総胆管上部及び腸管をブルドック鉗子で止めた。総胆管を十二指腸との境目で切れ目を入れ、Collagenase P (Roche 社) (2 mg/mL) を含む M199 培地 (Gibco 社) 2 mL を注入した。その後、脾臓を摘出し、37℃ の湯浴槽で 11 分 30 秒消化処理を行った。10% FBS を含む M199 培地 25 mL で懸濁し、遠心分離 (1000 rpm、4℃、2 分) を 2 回行った。上清を捨て、Histopaque (SIGMA 社) 10 mL で懸濁させた後、その上から 10% FBS を含む M199 培地 10 mL を注ぎ、遠心分離 (1000 rpm、4℃、30 分) を行った。上清を別の 5

0 mL チューブに移し、さらに 10% FBS を含む M199 培地 25 mL を加えた後、遠心分離 (1000 rpm、4℃、2分) を行った。

[0088] (ix) 脾島の分散

単離した脾島を 1.5 mL シリコンチューブに採取し、分散緩衝液 (以下表 2 参照) 100 μ L を添加した。37℃にて 15 分で静置後、ピペティングすることで分散させた。

[0089] [表2]

表 2. 分散緩衝液

溶液1	10 mL
溶液2	10 mL
0.1M EGTA	4 mL
Hepes	0.1909 g
BSA	0.04 g
H ₂ O	20 mL

(pH 7.4 に調整した)

[0090] [表3]

表 3.

溶液1	0.64M NaCl
溶液2	20 mM KCl
	40 mM NaHCO ₃
	10 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O

[0091] (x) 脾島培養 (ゲルを用いた三次元培養法)

96 ウェルプレート (CORNING 社) に単離した脾島を含むマトリゲル (CORNING 社) 20 μ L を添加後、37℃にて 15 分間、インキュベートすることでマトリゲルをゲル化させた。その後、成長因子を含む培地 (以下表参照) 140 μ L を添加し、37℃にて 5% CO₂ で培養を行った。

[0092]

[表4]

表 4.

Feeding media		Splitting media	
A83-01	5 uL	DMEM-F12 advanced	50 mL
mEGF	25 uL	HEPES Buffer	0.5 mL
FGF-10	10 uL	Penicillin/Streptomycin	0.5 mL
Gastrin I	5 uL	Glutamax	0.5 mL
mNoggin	5 uL		
N-acetylcystein	10 uL		
Nicotineamide	50 uL		
R-Spondin	50 uL		
B27 supplyment	100 uL		
Splitting media	5 mL		

[0093] (x i) 臍島培養（浮遊培養）

6 ウェルプレートに培地を 2 mL 添加し、培地上にセルカルチャーインサート（Millipore 社）を浮遊させた。セルカルチャーインサート上に単離した臍島、及び培地 20 μ L を添加し、37℃、5%CO₂で培養を行った。

[0094] (x i i) 腹腔内ブドウ糖負荷試験（IPGTT）

MycI 発現群及び対照群を 12～16 時間絶食した。その後、各マウスの体重を計測し、D-glucose 2 g/kg（マウス）になるように D-glucose 溶液をマウスの腹腔内に注射した。15、30、60、120 分後に各マウスの血液を尻尾から採血し、アントセンス台（Horiba 社）を用いて血糖値を測定した。

[0095] (x i i i) 糖尿病マウスの作製

8～12 週齢の免疫不全マウス（NOD/SCID）の体重を測定し、ストレプトゾシン（STZ）（Sigma-Aldrich 社）150 mg/kg になるようにストレプトゾシン溶液をマウスの腹腔内に注射した。1 週間後にアントセンス台（Horiba 社）を用いて血糖値を測定し、随時血糖が 250 mg/dL 以上のマウスを糖尿病マウスとして用いた。

[0096] (x i v) 臍島移植（腎被膜下移植）

糖尿病マウスにソムノペンチル（共立製薬株式会社）を腹腔内注射するこ

とで麻酔した。開腹後、注射針を用いて腎被膜を切開した。シリコンチューブを腎被膜下に挿入し、ハミルトンシリンジを用いて脾島を腎被膜下へ移植した。移植後、シリコンチューブを抜き、腹膜・皮膜を縫合した。

[0097] (xv) 腎臓摘出

脾島を移植したマウスにソムノペンチル（共立製薬株式会社）を腹腔内注射することで麻酔した。開腹後、脾島を移植した腎臓を摘出し腎静脈・腎動脈を結紮糸にて結紮した。腎臓摘出後、腹膜・皮膜を縫合した。

[0098] (xvi) シングルセル解析

GEOデータベースに公開されている解析データ（GSE101099；Byrnes LE et al., Nat Commun. 2018 Sep 25; 9(1): 3922）を用いて再解析を行った。t-SNE解析には、Seurat v2.2およびv2.3を使用した（Satija R., et al., Nat Biotechnol. 2015 33: 495-502）。

[0099] 実施例1：MycI発現誘導可能マウスES細胞の樹立

上記で作製したMycI遺伝子が組み込まれたES細胞株が、Dox依存的に発現可能かどうかを検討した。MycI遺伝子の発現は、その遺伝子の下流に組み込んだmCherry遺伝子の発現により確認することができる。mCherry遺伝子は、赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子であり、該遺伝子の発現により、細胞は赤色に発色する。図1に示されるように、Dox添加前と添加後の遺伝子発現を比較すると、MycI遺伝子発現が顕著に増加していることから、MycI発現誘導可能マウスES細胞が樹立できたことが判明した。

[0100] また、Myc遺伝子及びMycn遺伝子をそれぞれを組み込んだES細胞株についても同様にDox依存的に遺伝子発現が誘導されるかどうかを検討したところ、図12に示されるように、MycI発現誘導と同じく、それぞれの遺伝子発現が観察された。

[0101] 一方、細胞増殖の指標としてKi67タンパク質の発現を観察すると、D

o x 投与の期間が長くなるとともに増殖細胞（K i 6 7 陽性細胞）が増加し、D o x 投与を停止後の2週間では、K i 6 7 陽性細胞の数が顕著に減少し、細胞増殖が停止した（図7）。上記の結果から、M y c l 遺伝子が導入されたE S細胞は、D o x によって遺伝子発現が誘導され、細胞増殖することが判明した。

[0102] 実施例2：M y c l 過剰発現による膵島細胞の増殖（神経内分泌腫瘍の形成）

上記で作製したM y c l 遺伝子を発現する8週齢のキメラマウスにD o x を8週間投与した。D o x 投与から8週後にマウスを屠殺し、膵臓を摘出し、膵臓切片を組織化学的に評価した。図2において矢印で示されるように、D o x による誘導によりM y c l を過剰発現させた膵臓組織では、正常の膵臓組織と比較して、膵島細胞が増殖し、膵島が肥大していることが分かる。

[0103] 実施例3：M y c l 過剰発現による膵島前駆細胞様細胞の増生

キメラマウスにD o x を投与してから4週間後に、ソマトスタチン陽性細胞の増生について検討した。実施例2で示したように、膵島細胞にM y c l 遺伝子を発現させることで、膵島細胞の増殖の誘導が可能である。図3から図6に示されるように、増殖細胞はM y c l 遺伝子存在下では膵島前駆細胞に類似した遺伝子発現を示し、同時にソマトスタチンを発現し増殖しているが、これに対して、インスリン陽性細胞が減少した。

[0104] 実施例4：M y c l 過剰発現によるソマトスタチン陽性の膵島細胞様細胞の増生

実施例2と同様の実験系において、D o x 投与から8週間後にソマトスタチン陽性細胞及びインスリン陽性細胞の増殖を検討した。図4及び図5に示されるように、インスリン陽性細胞は減少し、ソマトスタチン陽性細胞が顕著に増加した。

[0105] 実施例5：M y c l 過剰発現による膵島前駆細胞様細胞への脱分化

実施例2と同様の実験系において、D o x 投与から8週間後の肥大した膵島における遺伝子発現解析を行った。膵島はN g n 3 をマーカーとする膵島

前駆細胞からF e vをマーカーとする膵島前駆細胞を経て、各膵島細胞へと分化すると考えられている（図6）。M y c lの過剰発現によって増殖した膵島細胞における遺伝子発現を解析したところ、前駆細胞のマーカーであるF e vや同時期に発現するP a x 4、C c kの発現上昇が観察された（図13）。この結果から、M y c l過剰発現によって増殖可能な膵島前駆細胞様細胞を誘導可能であることが示唆された。

[0106] 実施例6：M y c l発現停止によるインスリン陽性細胞誘導

実施例2で使用した実験系において、D o x投与を8週間後に停止させ、それから2週間後及び4週間後にインスリン陽性細胞及びソマトスタチン陽性細胞の増減を観察した。図5に示されるように、D o x投与を停止してから2週間後及び4週間後には、一度は減少したインスリン陽性細胞が増加し、これとは対照的に、一度は増加したソマトスタチン陽性細胞が減少した（図8）。この結果から、M y c l過剰発現によって増殖した膵島前駆細胞様細胞は、M y c l発現を停止させたことにより、インスリン陽性細胞に変化したことが示唆された。

[0107] また、細胞増殖能の標的タンパク質として公知であるK i 6 7の発現を観察すると、D o x投与の期間が長くなるとともに増殖細胞（K i陽性細胞）が増加し、D o x投与を停止後の2週間では、K i陽性細胞の数が顕著に減少し、細胞増殖が停止した（図7）。

[0108] 実施例7：M y c l一過性過剰発現による耐糖能の亢進

キメラマウスにおいて、D o x投与を停止した場合の耐糖能を評価した。図9左に示されるように、対照（「c o n t .」）と比較して、D o x投与を停止したマウスでは、耐糖能が亢進していることが分かる。また、空腹時における血糖値は一貫して維持されており、生体内において増大した膵島は機能性を持った膵島であることが示唆された（図9右）。

[0109] 実施例8：M y c l過剰発現による試験管内での膵島細胞の増殖誘導

（1）単離した膵島におけるM y c l発現誘導

キメラマウスから膵臓を摘出し、その後、単離した膵島についてM y c l

の発現誘導を検討した。Doxの添加開始時を0日として、Mycl発現を経時的に観察して結果を図10に示す。対照と比較して、Doxを添加された系では、Mycl遺伝子の発現とともに、経時的に膵島が増大する傾向にあった。

[0110] (2) 単離した膵島から分散させた細胞におけるMycl発現誘導

単離した膵島から分散させた細胞について、上記(1)と同様にMycl遺伝子の発現を検討した。Doxを添加してから14日目の細胞においてMycl遺伝子を観察すると、添加1日目と比較して、各細胞においてMycl遺伝子が発現していることがわかった(図11)。

[0111] (3) 単離した膵島における試験管内でのc-Mycl、Myclnの発現誘導

上記で作製したc-Mycl及びMyclnが組み込まれたES細胞がドキシサイクリン依存的に発現誘導可能であることを確認した。このES細胞を用いてキメラマウスを作製した。作製したキメラマウスから単離した膵島細胞において、インビトロでドキシサイクリンを1週間添加することでc-Mycl及びMyclnの発現誘導を行った。その結果、c-MyclおよびMyclnの発現誘導により、増殖は促進するものの、Myclとは異なり細胞死が誘導されることがわかった(図12) (Pelengaris S, Khan M, Evan GI., Cell 2002; 109(3):321-334参照)。

[0112] 実施例9：試験管内で増殖誘導した膵島細胞の機能性評価

試験管内でMycl過剰発現により増殖誘導を行った膵島細胞を糖尿病マウスに移植することで、増殖した膵島細胞の機能性を検討した。単離した30個の膵島を分散させ、1週間Doxを添加することで膵島細胞の増殖誘導を行った。この膵島細胞を回収し、糖尿病マウスの腎被膜下に移植したところ、随時血糖の改善が認められた。また、2週間後に膵島細胞を移植した腎臓を摘出したところ、糖尿病マウスが再び高血糖に戻った。一般的に糖尿病マウスの血糖値を低下させるためには300個以上の膵島移植が必要である。60個の膵島から増殖させた膵島様細胞で糖尿病マウスの血糖値を低下させることに成功した。

[0113] 実施例 10 : MycI 発現誘導による糖尿病マウスモデルにおける治療効果の検証

糖尿病マウスモデルを作製し、MycI の発現誘導による治療効果を検証した。8 週齢の MycI 発現誘導可能なマウス (KH2-MycI) に 150 mg/kg となるようにストレプトゾシン (STZ) (膵β細胞に毒性を有する) を腹腔内に投与することにより糖尿病マウスモデルを作製した。その 2 週間後から 8 週間、Dox 投与による MycI の発現誘導を行った。さらに 2 週間、Dox 投与を停止することにより MycI の発現を停止させた。この時点で糖応答性試験 (IPGTT) 及び組織学的解析を行った。

[0114] 結果を図 14 に示す。対照群 (STZ のみ投与) では STZ 投与後から血糖が増加した一方で、Dox による MycI の発現誘導を行った群 (STZ + MycI) では Dox 投与後から血糖の減少が見られ、また Dox 投与を停止した後も正常血糖を示した (図 14 左上)。さらに、糖応答性試験を行った結果、MycI の発現誘導を行った群で速やかな血糖値の減少が観察された (図 14 左下)。

[0115] さらに、インスリン (「Ins」)、グルカゴン (「Gog」)、及びソマトスタチン (「Sst」) の発現について組織学的解析を行ったところ、対照群 (STZ のみ投与) ではインスリン陽性細胞の割合が減少していた。一方、MycI を発現誘導した群 (STZ + MycI) では、膵島細胞の増大とインスリン産生細胞の割合の増加が観察された。以上の結果から、MycI の発現誘導により、糖尿病疾患の治療効果が期待される。

[0116] 実施例 11 : MycI は膵島以外に異常増殖を誘導しない

MYC ファミリー遺伝子 (「Myc」、「Mycn」、及び「MycI」) をそれぞれ生体内で Dox 依存的に発現誘導させるため、最初にこれらの遺伝子を発現誘導可能な ES 細胞を樹立した (図 15 上段)。この ES 細胞を胚盤胞にインジェクションすることによりキメラマウスを作製した。このキメラマウスが 4 週齢となった時点から 4 週間、Dox を添加することにより MYC ファミリー遺伝子の発現誘導を行った。

[0117] *Myc* の発現誘導は肝臓において、*Mycn* の発現誘導は肝臓及び腸管において腫瘍の形成を認めた一方で、*Mycl* の発現誘導は少なくとも肝臓及び小腸において異常な増殖を認めなかった（図15下段）。このことから、*Mycl* は膵島に特異的に増殖することが示唆された。

[0118] 実施例12：老齢マウスにおける膵島増生

老齢マウス（115週齢）から膵島細胞を単離し、*Dox* 依存的に *Mycl* 及び *pZsGreenDR* ベクター（Takara、cat #632428）（対照群）を発現誘導可能なレンチウイルスを感染させた。使用した *z sGreenDR* は、*z sGreen* のC末端にタンパク質分解シグナルを融合させた短寿命型の緑色蛍光タンパク質である。

[0119] 感染の翌日、この膵島細胞をマトリゲルを用いた三次元培養に移行し、同時に *Dox* を投与することにより *Mycl* 及び *z sGreenDR* をそれぞれ発現誘導した。*z sGreenDR* を発現誘導した膵島細胞は、7日間経過しても形態に変化を認めなかった（図16右）。一方、*Mycl* を発現誘導することで、膵島細胞の増大が観察された（図16左）。この結果から、非常に老齢なマウスにおいても *Mycl* の発現誘導による膵島増生が可能であることが判明した。

[0120] 実施例13：ヒト膵島前駆細胞における *Mycl* の発現

2020年に投稿された論文（JR Alvarez-Dominguez, et al., *Circadian Entrainment Triggers Maturation of Human In Vitro Islets*, *Cell Stem Cell*, 26(1), 108-122, 2020）では、ヒトiPS細胞から段階的にヒト膵β細胞を分化誘導させたときの分子プロファイルを観察した。そこで、このデータセットを用いて、MYCファミリー（上述）の遺伝子発現及びH3K27ac（一般的に転写活性化を示すクロマチンマーク）を観察した（図17）。

[0121] *Myc* ファミリー遺伝子の発現は多能性幹細胞（「hPSC」）で高く、分化と共に減少する傾向があったが、*Mycl* に関しては、「EN」（内分

泌前駆細胞、すなわち膵島前駆細胞)において一過性に発現上昇が認められた。このことから、マウスと同様にヒト膵島細胞においてもMycIが膵島細胞の増殖に寄与している可能性が示唆された。

[0122] 実施例14：ヒトにおける膵島増生の確認

ヒト膵島細胞において、Dox依存的にMycI及びzsGreenDR(対照群)を発現誘導可能なレンチウイルスを感染させた。翌日、この膵島細胞をマトリゲルを用いた三次元培養に移行し、同時にDoxを投与することによりMycI及びzsGreenDRをそれぞれ発現誘導した。

[0123] zsGreenDRを発現誘導した膵島細胞は7日間経過しても形態に変化を認めなかったが、MYCLを発現誘導させた場合には膵島細胞の増大が観察された(図18左下)。さらに、免疫染色を行った結果、MYCLを過剰発現させた群は、mCherryの発現が認められた細胞(MYCLが発現したことと同義である)においてKi67(細胞増殖マーカー)が検出された(図18右下)。

[0124] 実施例15：シングルセル解析によりヒトにおける膵島増生の確認

ヒト膵島細胞において、Dox依存的にMycI、MYCL、及びzsGreenDR(対照群)をそれぞれ発現誘導可能なレンチウイルスを感染させた。翌日、細胞培養インサートを用いた浮遊培養に移行し、同時にDoxを投与することによりMycI及びzsGreenDRをそれぞれ発現誘導した。7日後、死細胞を除去後、常法に従ってシングルセルRNA-seqを行った。

[0125] シングルセルRNA-seqの結果、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、膵管細胞(「PP」)、間葉系細胞、血管内皮細胞、及び星細胞が検出された(図19左)。このうち、 β 細胞にのみ着目し、細胞増殖のマーカーであるCDK4の発現を解析した結果、zsGreenDRの発現誘導ではCDK4に影響を与えなかったが、一方、MycI、MYCLの発現誘導においてはCDK4の発現を誘導した。このことから、ヒト膵島細胞においてもMycIの発現誘導により細胞増殖し得ることが判明した。

産業上の利用可能性

- [0126] ドナーから単離された膵島に本発明技術を応用すれば、試験管内で膵島インスリン陽性細胞数を増殖させることが可能であり、本発明における膵島ドナーの不足が解消できる可能性がある。ES/iPS細胞からの膵島インスリン陽性細胞の分化誘導系に本技術を用いることで、多能性幹細胞からの効率的な膵島インスリン陽性細胞の分化誘導が可能となる。さらに、胚盤胞補完法による多能性幹細胞からの膵島作製技術に応用することで、作製臓器中でのインスリン陽性再増数を増加させることが可能である。本発明はドナー由来の膵島細胞や多能性幹細胞由来膵島細胞に対して一過性的にMycIを発現させる必要があるが、エピソーマルベクターやRNA等を導入することで遺伝子改変なしに大量に膵島細胞を樹立することも可能と考えられる。またこの技術を用いて増殖させた膵島細胞は、膵島ストック細胞株として増殖維持できることが期待される。膵島ストック細胞株により、長期的、安定的に、かつ大量にインスリン陽性細胞を供給できる可能性がある。将来的に多くの糖尿病患者に対して安価かつ高品質な膵島を提供できることが期待される。
- [0127] 本明細書に引用する全ての刊行物及び特許文献は、参照により全体として本明細書中に援用される。なお、例示を目的として、本発明の特定の実施形態を本明細書において説明したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変が行われる場合があることは、当業者に容易に理解されるであろう。