

明 細 書

発明の名称：

A L K 5 阻害活性と C D K 8 / 1 9 阻害活性とを有する成熟化剤

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞からのインスリン陽性細胞集団の製造方法に関する。より詳細には、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、サイクリン依存キナーゼ 8 及び／又はサイクリン依存キナーゼ 1 9（以下、「C D K 8 / 1 9」と記載する場合がある）に対する阻害活性及び A L K 5 に対する阻害活性を有する因子と作用させることを特徴とするインスリン陽性細胞集団の製造方法に関する。

[発明の背景]

[0002] i P S 細胞や E S 細胞などの多能性幹細胞から、インスリン陽性細胞や膵 β 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。

[0003] これまでに、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団へと分化誘導するために様々な手法が、開発・報告されている（非特許文献 1）。しかしながら、分化誘導して得られるインスリン陽性細胞集団には、目的とするインスリン陽性細胞（特に、インスリン陽性かつ N K X 6. 1 陽性の細胞等）以外にも、残存する比較的未分化な細胞や悪性化した形質転換細胞等といった様々な細胞が含まれ得る。インスリン陽性細胞集団を糖尿病治療に応用しようとした場合、細胞集団に含まれる細胞の種類を厳密に制御することは、安全性の観点から極めて重要である。そのため、目的外の細胞が多く含まれないことを可能とする新たなインスリン陽性細胞集団の分化誘導方法が切望されていた。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献 1 : S t e m C e l l R e s e a r c h (2 0 1 5) 1 4、1

85-197

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明者らは、従来、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団を分化誘導する過程において、より詳細には、膵前駆細胞から内分泌前駆細胞及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞を分化誘導する過程において培地に添加して用いられていたALK5阻害剤2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン(「transforming growth factor- β type 1 receptor kinase」、「activin receptor-like kinase 5 inhibitor 1」、「ALK5i1」)、「E616452」、「RepSox」又は「SJN2511」とも称される。以下、本明細書中、単に「ALK5i1」と記載する場合がある)が、生物の遺伝情報に不可逆的な変化又は突然変異を生じる(すなわち、変異原性を有する)可能性があることを見出した。そのため、上記分化誘導の過程においてALK5i1を使用することは回避するのが好ましいところ、ALK5i1に変えて他のALK5阻害剤を用いた場合には、目的とする細胞集団への分化誘導効率が低下し、ALK5i1と同じようにはインスリン陽性細胞集団を製造できないことを見出した。

[0006] そこで本発明は、ALK5i1に代えて、上述の分化誘導を効率的に行うことができ、かつ変異原性の低いもしくは無い、新たな分化誘導因子を見出すこと、ならびにそれを用いた多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団を分化誘導するための新規な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

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団を誘導する過程において、膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、ALK5i1に代えて、ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を作用させることによっ

て、インスリン陽性細胞、特に、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞、を効率的に分化誘導することができ、ALK5 inhibitorを使用する従来法と比べても遜色のない分化誘導を達成できることを見出した。

[0008] 本発明は、これらの新規知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

[1] インスリン陽性細胞集団を製造する方法であって、
膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を含む培地中で培養し、分化させることを含み、
前記培地が2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジンを実質的に含まない、方法。

[2] 前記ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子がALK5阻害剤とCDK8/19阻害剤とを含む、[1]の方法。

[3] 前記CDK8/19阻害剤が、ジエチル(E)-(4-(3-(5-(4-フルオロフェニル)-1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)アクリルアミド)ベンジル)ホスホネート、2-(4-(4-(イソキノリン-4-イル)フェニル)-1H-ピラゾール-1-イル)-N,N-ジメチルアセトアミド、4-((2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キナゾリン-6-カルボニトリル、4-(4-(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)-1H-ピラゾール-3-イル)ベンゼン-1,3-ジオール、3-(2-(イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-6-イルチオ)エチル)-4-(ナフタレン-1-イルスルホニル)-3,4-ジヒドロキノキサリン-2(1H)-オン、及び(E)-3-(4-(1-シクロプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)ピリジン-3-イル)-N-(4-(モルホリノメチル)フェニル)アクリルアミド、からなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、[2]の方法。

[4] 前記ALK5阻害剤が、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール

－5－イル）－5－（2－ピリジニル）－1 H－イミダゾール－2－イル]
－ベンズアミド、6－[2－tert－ブチル－5－（6－メチルピリジン
－2－イル）－1 H－イミダゾール－4－イル] キノキサリン、3－[[5
－（6－メチル－2－ピリジニル）－4－（6－キノキサリニル）－1 H－
イミダゾール－2－イル] メチル] ベンズアミド、2－フルオロ－N－[[
5－（6－メチルピリジン－2－イル）－4－（[1, 2, 4] トリアゾロ
[1, 5－a] ピリジン－6－イル）－1 H－イミダゾール－2－イル] メ
チル] アニリンからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩で
ある、[2]の方法。

[5] 前記CDK8/19阻害剤が、4－（（2－（6－（4－メチルピ
ペラジン－1－カルボニル）ナフタレン－2－イル）エチル）アミノ）キナ
ゾリン－6－カルボニトリルもしくは2－（4－（4－（イソキノリン－4
－イル）フェニル）－1 H－ピラゾール－1－イル）－N，N－ジメチルア
セトアミド又はその塩であり、前記ALK5阻害剤が、4－[4－（1，3
－ベンゾジオキソール－5－イル）－5－（2－ピリジニル）－1 H－イミ
ダゾール－2－イル]－ベンズアミド又はその塩である、[2]の方法。

[6] 前記腭前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団が、
多能性幹細胞を分化誘導して製造されたものである、[1]の方法。

[7] ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を含み
、2－（3－（6－メチルピリジン－2－イル）－1 H－ピラゾール－4
－イル）－1，5－ナフチリジンを実質的に含まない、腭前駆細胞集団、又は
それ以降の分化段階にある細胞集団の分化培地。

[8] 前記ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子が
、ALK5阻害剤とCDK8/19阻害剤とを含む、[7]の培地。

[9] 前記CDK8/19阻害剤が、ジエチル（E）－（4－（3－（5
－（4－フルオロフェニル）－1－メチル－1 H－ピラゾール－4－イル）
アクリルアミド）ベンジル）ホスホネート、2－（4－（4－（イソキノリ
ン－4－イル）フェニル）－1 H－ピラゾール－1－イル）－N，N－ジメ

チルアセトアミド、4-((2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キナゾリン-6-カルボニトリル、4-(4-(2,3-ジヒドロベンゾ[*b*][1,4]ジオキシン-6-イル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)ベンゼン-1,3-ジオール、3-(2-(イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン-6-イルチオ)エチル)-4-(ナフタレン-1-イルスルホニル)-3,4-ジヒドロキノキサリン-2(1*H*)-オン、及び(E)-3-(4-(1-シクロプロピル-1*H*-ピラゾール-4-イル)ピリジン-3-イル)-*N*-(4-(モルホリノメチル)フェニル)アクリルアミドからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、[8]の培地。

[10] 前記ALK5阻害剤が、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1*H*-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド、6-[2-*tert*-ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1*H*-イミダゾール-4-イル]キノキサリン、3-[[5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-(6-キノキサニル)-1*H*-イミダゾール-2-イル]メチル]ベンズアミド、2-フルオロ-*N*-[[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-([1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-6-イル)-1*H*-イミダゾール-2-イル]メチル]アニリンからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、[8]の培地。

[11] 前記CDK8/19阻害剤が、4-((2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キナゾリン-6-カルボニトリルもしくは2-(4-(4-(イソキノリン-4-イル)フェニル)-1*H*-ピラゾール-1-イル)-*N*,*N*-ジメチルアセトアミド又はその塩であり、前記ALK5阻害剤が、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1*H*-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド又はその塩である、[8]の培地。

[12] 前記脾前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団が

、多能性幹細胞を分化誘導して製造されたものである、[7]の培地。

本明細書は本願の優先権の基礎である2022年4月25日に出願された日本国特許出願2022-071507号の明細書等に記載される内容を包含する。

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

[0009] 本発明によれば、ALK5 i i i に代えて利用することができ、変異原性が低いもしくは無く、かつ、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団への分化誘導を効率的に行うことを可能とする新たな分化誘導因子を提供することができ、ならびにそれを用いた多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団を分化誘導するための新規な方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、ALK5 i i i、ならびに、ALK5 i i iの構造類似体（2-（3-（ピリジン-3-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）キノキサリン）と他の代表的なALK5阻害剤（SB525334とSB431542）についての、化学構造式、ALK5阻害活性、ならびに変異原性の各種評価結果を示す。

[図2]図2は、臍前駆細胞集団を、ALK5インヒビター i i、又は非変異原性のALK5阻害剤（SB525334、SB431542、IN1130、EW-7197）を含む分化誘導培地で処理して得られたインスリン陽性細胞集団の、（A）インスリン陽性かつNKX6.1陽性（INSULIN+NKX6.1+）の細胞率、及び（B）CHGA陽性（CHGA+）の細胞率、をそれぞれ示すフローサイトメトリーの結果、ならびにグラフ図である。

[図3]図3は、ALK5 i i iならびに非変異原性のALK5阻害剤（SB525334、SB431542、IN1130、EW-7197）についての、11種のキナーゼに対する阻害活性の解析結果を示すグラフ図である。結果は、キナーゼ阻害剤の結合評価試験においてキナーゼとトレーサーの結

合を阻害剤が完全阻害した場合を100%とする相対値にて示す。

[図4]図4は、膵前駆細胞集団を、(1) ALK5 inhibitor、(2) 非変異原性のALK5阻害剤(SB431542)、(3) CDK8/19阻害剤(Senexin B)、(4) SB431542とSenexin Bとの組み合わせ(SB/Sen)を含む分化誘導培地で処理して得られた各インスリン陽性細胞集団の、(A) インスリン陽性かつNKX6.1陽性(INSULIN⁺NKX6.1⁺)の細胞率を示すフローサイトメトリーの結果及びグラフ図、ならびに(B) 全細胞収量のグラフ図を示す。

[図5]図5は、膵前駆細胞集団を、(1) ALK5 inhibitor、(2) 非変異原性のALK5阻害剤(SB431542)、(3) CDK8/19阻害剤(Senexin B)、(4) SB431542とSenexin Bとの組み合わせ(SB/Sen)を含む分化誘導培地で処理して得られた各インスリン陽性細胞集団における、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞亜集団におけるクラスター#1、3、6、12についての割合を示す円グラフである。

[図6]図6は、膵前駆細胞集団を、(1) ALK5 inhibitor、(2) 非変異原性のALK5阻害剤(SB431542)、(3) CDK8/19阻害剤(Senexin B)、(4) SB431542とsenexin Bとの組み合わせ(SB/Sen)を含む分化誘導培地で処理して得られた各インスリン陽性細胞集団のクラスター#1及び#2について、2つのサンプル間の差別的発現遺伝子(DEG)の解析結果を示す。

[図7]図7は、膵前駆細胞集団を、(1) ALK5 inhibitor、(4) SB431542とsenexin Bとの組み合わせ(SB/Sen)を含む分化誘導培地で処理して得られたインスリン陽性細胞集団が移植された1型糖尿病モデルマウスにおける血漿中の(A) グルコース量、(B) ヒトC-ペプチド量の測定結果、ならびに経口ブドウ糖負荷試験における血漿中の(C) グルコース量、(D) ヒトC-ペプチド量の測定結果を示すグラフ図である。対照には偽手術群(Sham)の1型糖尿病モデルマウスを用いた。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 用語

以下、本明細書において記載される用語について説明する。

[0012] 本明細書において、「約」又は「およそ」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、別の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、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 (purified)」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、「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、陽性選択マーカー或いは陰性選択マーカーでありうる。

[0023] 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、本明細書において、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。

[0024] 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。

[0025] 本明細書において、「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 β (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、 $IFN-\gamma$ 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。

[0026] 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)-4 β -[(R)-1-アミノエチル]シクロヘキサン-1 α -カルボアミド (本明細書中、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)、4 β -[(1R)-1-アミノエチル]-N-(4-ピリジル)ベンゼン-1 α -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。

[0027] 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 3β)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。

[0028] 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-A0144-18、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-ジブromo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 si

RNA、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。

[0029] 本明細書において「血清代替物」とは、例えば、Knock Out™ Serum Replacement (KSR: Thermo Fisher Scientific)、StemSure (登録商標) 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 (登録商標) 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。

[0030] 2. インスリン陽性細胞集団の製造方法

本発明は、前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団をALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を含み、かつALK5i11を実質的に含まない培地中で培養し、分化させることを含む、インスリン陽性細胞集団を製造する方法を提供する。

[0031] 本発明において、培地はALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を含んでいればよく、当該因子はALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性を共に有する一種の (又は単独の) 阻害剤であっても良い、あるいは、当該因子はALK5阻害活性を有する因子 (ALK5阻害剤) とCDK8/19阻害活性を有する因子 (CDK8/19阻害剤) とからなる複数の因子の組み合わせであってもよい。好ましくは、本発明において、培地はALK5阻害剤とCDK8/19阻害剤との組み合わせを含む。

- [0032] 本発明の培地について、「ALK5 i i iを実質的に含まない」とは、培地中においてALK5 i i iがALK5阻害活性を含む任意の活性を発揮する態様で含まれないことを意味し、ALK5 i i iが一切含まれないことを必ずしも意味するものではない。好ましくは、本発明の培地には、ALK5 i i iが一切含まれないことを意味する。なお、本発明において「ALK5 i i i」には、変異原性を有する限り、ALK5 i i iの塩や溶媒和物の形態が含まれる。
- [0033] 本明細書において、「CDK8／19阻害活性を有する因子」又は「CDK8／19阻害剤」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。
- [0034] 本発明で使用する「CDK8／19阻害剤」は、CDK8／19の阻害活性を有するものであれば特に限定されず、CDK8／19の機能を直接的又は間接的に阻害するあらゆる因子を使用することができる。
- [0035] 本発明において「CDK8／19阻害剤」は従来公知のものを使用することができ、このようなCDK8／19阻害剤は、特許文献又は非特許文献から見つけることができる。例えば、US2012／0071477、WO2015／159937、WO2015／159938、WO2013／116786、WO2014／0038958、WO2014／134169、JP2015／506376、US2015／0274726、US2016／0000787、WO2016／009076、WO2016／0016951、WO2016／018511、WO2016／100782及びWO2016／182904に記載される化合物のうち、CDK8／19阻害活性を有する化合物又はその塩を、本発明における「CDK8／19阻害剤」として利用することができる。特に、上記化合物のうち、CDK8／19に選択的に阻害活性を有する化合物又はその塩を好適に利用することがで

きる。

[0036] より具体的には、本発明において利用可能なCDK8／19阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、下記の化合物又はその塩が挙げられる。また、これらの化合物はCDK8／19阻害活性を有する限り一又は複数の置換基を有していてもよいし、一部の部分構造（置換基、環等）が変換されていてもよい。

[0037]

[表1]

化合物	IUPAC 名	構造式
1	シ ⁺ エチル(<i>E</i>)-(4-(3-(5-(4-フルオロフェニル)-1-メチル-1 <i>H</i> -ピラゾール-4-イル)アクリルアミド)ベンジ ⁺ ル)ホスホネート	
2	2-(4-(4-(イソキノリン-4-イル)フェニル)-1 <i>H</i> -ピラゾール-1-イル)- <i>N,N</i> -ジメチルアセトアミド	
3	4-((2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キノザリン-6-カルボニトリル	
4	4-(4-(2,3-ジヒドロベンゾ[<i>b</i>][1,4]ジオキシシン-6-イル)-1 <i>H</i> -ピラゾール-3-イル)ベンゼン-1,3-ジオール	
5	3-(2-(イミダゾ[1,2- <i>b</i>]ピリダジン-6-イルチオ)エチル)-4-(ナフタレン-1-イルスルホニル)-3,4-ジヒドロキノキサリン-2(1 <i>H</i>)-オン	
6	(<i>E</i>)-3-(4-(1-シクロプロピル-1 <i>H</i> -ピラゾール-4-イル)ピリジン-3-イル)- <i>N</i> -(4-(モルホリノメチル)フェニル)アクリルアミド	

[0038] また、本発明において利用可能なCDK 8 / 19 阻害剤としては、特に限定されないが、たとえば、下記に記載の化合物 7 ~ 13 又はその塩を使用することができる。化合物 7 ~ 11 はフリー体が好ましく、化合物 12 及び 1

3はトリフルオロ酢酸塩が好ましい。

[0039] [表2]

化合物	IUPAC 名	構造式	塩	MS
7	8-(2,4-ジフルオロフェノキシ)-1-メチル-4,5-ジヒドロ-1H-チエノ[3,4-g]インダゾール-6-カルボキサミド			
8	4-((4-フルオロフェニル)スルホニル)-3-(2-(イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-6-イルスルファニル)エチル)-3,4-ジヒドロキノキサリン-2(1H)-オン			
9	2-(ベンジルアミノ)-4-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)ベンズアミド			343.2
10	3-(3-(ベンジルオキシ)フェニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン			
11	4-(4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシン-6-イル)-1H-ピラゾール-3-イル)ベンゼン-1,3-ジオール			
12	N-ブチル-8-(4-メトキシフェニル)-1,6-ナフチリジン-2-カルボキサミド		CF ₃ COOH	
13	8-(4-メチルフェニル)-N,N-ジプロピル-1,6-ナフチリジン-2-カルボキサミド		CF ₃ COOH	

[0040] また、本発明において利用可能なCDK8/19阻害剤としては、特に限定されないが、たとえば、下記に記載の化合物又はその塩を使用することができる: Senexin A (Cas. No. 1780390-76-2)、UNC10112785 (N-(4-isopropylphenyl)-4-(pyrazolo[1,5-b]pyridazin-3-yl)pyrimidin-2-amine)、SEL120-34A (Cas. No. 1609452-30-3)、MSC2530818 (Cas. No.

. 1883423-59-3)、Cortistatin A (Cas. No. 882976-95-6)、CDK8/19-IN-1 (Cas. No. 1818427-07-4)、CDK8-IN-I (4-(4-Methylnaphthalen-1-yl)-2-((3-morpholinophenyl)sulfonamido)benzoic acid)、CDK8-IN-II (Cas. No. 1613638-82-6)、CDK8-IN-3 (Cas. No. 1884500-15-5)、CDK8-IN-III (Cas. No. 1814891-79-6)、CDK8-IN-4 (Cas. No. 1613638-82-6)、CDK8-IN-V ((Z)-16-chloro-11, 21, 25, 61-tetramethyl-11H, 21H, 61H-10-oxa-4, 8-dithia-1(7, 3)-indola-2(4, 3), 6(3, 5)-dipyrazola-9(3, 1)-naphthalenacyclotridecaphane-12-carboxylic acid)、CDK8/19-IN-4k (Cas. No. 1818410-84-2)、CDK8/19-IN-18 (Cas. No. 1879980-97-8)、CDK8/19-IN-32 (7-Amino-4-(4-chlorophenoxy)thieno[2, 3-c]pyridine-2-carboxamide)、BRD6989 (Cas. No. 642008-81-9)、CCT251921 (Cas. No. 1607837-31-9)、CCT251545 (Cas. No. 1661839-45-7)、Wogonin (Cas. No. 632-85-9)、JH-XVI-178 (Cas. No. 2648453-53-4)、LY2857785 (Cas. No. 1619903-54-6)、AS2863619 (Cas. No. 2241300-51-4)、3MB-PP1 (Cas. No. 956025-83-5)、CDK8/19i (Cas. No. 923596-52-5)、H-8 (hydrochloride) (Cas. No. 294646-77-8)、JH-VIII-49 ((3S, 8S, 10R, 13S, 14

S, 17S) - 17 - (isoquinolin-7-yl) - N, N, 10, 13-tetramethyl-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-amine)、JH-XI-10-02 (Cas. No. 2209085-22-1)、SNX2-1-108 (Cas. No. 1366002-73-4)、W-34 (1 - (3, 4-Dichloro-phenyl) - 3 - {1 - [5 - (4-fluoro-benzyl) - [1, 2, 4]thiadiazol-3-yl] - piperidin-4-ylmethyl} - urea)。

[0041] 好ましくは、本発明において利用可能なCDK8／19阻害剤としては、2 - (4 - (4 - (イソキノリン-4-イル) フェニル) - 1H-ピラゾール-1-イル) - N, N-ジメチルアセトアミド (「BI-1347」、又は「1H-ピラゾール-1-アセトアミド, 4 - [4 - (4-イソキノリニル) フェニル] - N, N-ジメチル」とも称される)、4 - ((2 - (6 - (4-メチルピペラジーン-1-カルボニル) ナフタレン-2-イル) エチル) アミノ) キナゾリン-6-カルボニトリル (「Senexin B」又は「SNX-2-1-165」とも称される) 又はそれらの塩である。

[0042] 本発明において、上記のCDK8／19阻害剤及びその塩は、無溶媒和物であっても、溶媒和物であってもよい。溶媒和物は、エタノールや水などの溶媒により形成され得る。取り込まれる溶媒が水である溶媒和物は、水和物である。水和物には、化学量論的な水和物に加えて、様々な量の水を含むものが包含される。

[0043] また、本発明において「塩」としては、例えば、無機塩基との塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ

土類金属塩；アルミニウム塩などが挙げられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' -ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

無機酸との塩の好適な例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。

有機酸との塩の好適な例としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられる。

酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

これらの塩のなかでも、薬学的に許容し得る塩が好ましい。

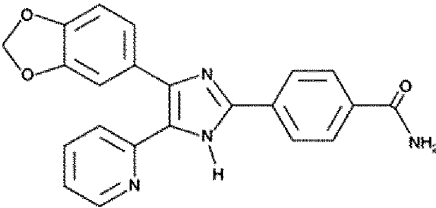
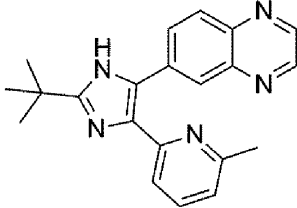
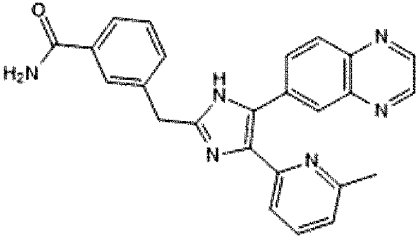
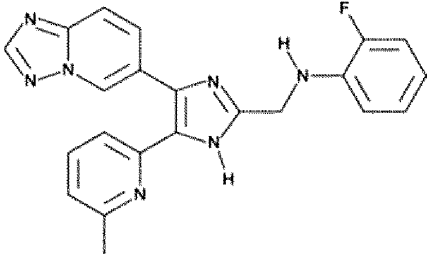
[0044] 本発明におけるCDK8／19阻害剤は上記した化合物に限定されるものではなく、CDK8／19のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、CDK8／19に結合する抗体、ドミナントネガティブCDK8／19変異体等もCDK8／19阻害剤として使用することができる。

[0045] 上記のCDK8／19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されたものを利用することができる。

[0046] 本発明で使用する「ALK5阻害剤」は、変異原性を有さず、ALK5 (activin receptor-like kinase 5) の阻害活性を有するものであれば特に限定されず、ALK5 i l lを除いて、ALK5の機能を直接的又は間接的に阻害するあらゆる因子を使用することができる。

[0047] 本発明において「ALK5阻害剤」は従来公知のものを使用することができ、より具体的には、特に限定されないが、例えば、下記の化合物又はその塩が挙げられる。また、これらの化合物はALK5阻害活性を有する限りー又は複数の置換基を有していてもよいし、一部の部分構造（置換基、環等）が変換されていてもよい。

[0048] [表3]

化合物名	IUPAC 名	構造式
SB431542	4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1 <i>H</i> -イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド	
SB525334	6-[2- <i>tert</i> -ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1 <i>H</i> -イミダゾール-4-イル]キノキサリン	
IN1130	3-[[5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-(6-キノキサリニル)-1 <i>H</i> -イミダゾール-2-イル]メチル]ベンズアミド	
EW-7197	2-フルオロ-N-[[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-([1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル)-1 <i>H</i> -イミダゾール-2-イル]メチル]アニリン	

[0049] また、本発明において利用可能なALK5阻害剤としては、特に限定されないが、たとえば、下記に記載の化合物又はその塩を使用することができる：
Galunisertib (LY2157299) (Cas. No. 700874-72-2)、SB505124 (Cas. No. 694433-59-5)、LY364947 (Cas. No. 396129-53-6)、K02288 (Cas. No. 1431985-92-0)、LDN-214117 (Cas. No. 1627503-67-6)、SD-208 (Cas. No. 627536-09-8)、ML347 (LDN193719) (Cas. No. 1062368-49-3)、LDN-212854 (Cas. No. 1432597-26-6)、DMH1 (Cas. No. 1206711-16-1)、Pirfenidone (Cas. No. 53179-13-8)、LY 3200882 (Cas. No. 1898283-02-7)、Alantolactone (Cas. No. 546-43-0)、SIS3 (Cas. No. 1009104-85-1)、Hesperetin (Cas. No. 520-33-2)、Dorsomorphin (BML-275) (Cas. No. 866405-64-3)、ALK2-IN-2 (Cas. No. 2254409-25-9)、San78-130 (Cas. No. 66018-45-9)、TGF β RI-IN-1 (Cas. No. 1950628-94-0)、Crizotinib-d5 (Cas. No. 1395950-48-7)、ALK-IN-1 (Cas. No. 1197958-12-5)、A-77-01 (Cas. No. 607737-87-1)、TAE-684 (Cas. No. 761439-42-3)、D 4476 (Cas. No. 301836-43-1)、Galunisertib (Cas. No. 700874-72-2)、SM16 (Cas. No. 614749-78-9)、N-Acetylpuromycin (Cas. No. 22852-13-7)、TGF- β RI Kinase Inhibitor IX (Cas. No. 301836-41-9)、TGF- β RI Kinase Inhibit

or VII (Cas. No. 666729-57-3)、IM-412 (3-(2-chlorobenzyl)-1,7-dimethyl-1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione)、TSP-1 (LSKL, Inhibitor of Thrombospondin) (Cas. No. 283609-79-0)、R268712 (Cas. No. 879487-87-3)、LY2109761 (Cas. No. 700874-71-1)、GW788388 (Cas. No. 452342-67-5)、LDN-193189 (Cas. No. 1062368-24-4)、A-83-01 (Cas. No. 909910-43-6)、ITD1 (Cas. No. 1099644-42-4)、IWR1 (Cas. No. 1127442-82-3)、YN968D1 (Cas. No. 811803-05-1)、BFH-772 (Cas. No. 890128-81-1)、Regorafenib (Cas. No. 755037-03-7)。

[0050] 好ましくは、本発明において利用可能なALK5阻害剤としては、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド、6-[2-tert-ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル]キノキサリン、3-[5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-(6-キノキサリニル)-1H-イミダゾール-2-イル]メチル]ベンズアミド、2-フルオロ-N-[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(1,2,4-トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル)-1H-イミダゾール-2-イル]メチル]アニリン又はそれらの塩である。

[0051] 本発明において、上記のALK5阻害剤及びその塩は、無溶媒和物であっても、溶媒和物であってもよい。「溶媒和物」及び「塩」としては、上記定義のものが挙げられる。

[0052] 本発明におけるALK5阻害剤は上記した化合物に限定されるものではなく、ALK5やその受容体のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオ

チドや s i R N A、A L K 5 やその受容体に結合する抗体、ドミナントネガティブ A L K 5 変異体やドミナントネガティブ A L K 5 受容体変異体等も A L K 5 阻害剤として使用することができる。

[0053] 上記の A L K 5 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されたものを利用することができる。

[0054] 好ましくは、本発明において培地は、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド、6-[2-tert-ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル]キノキサリン、3-[5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-(6-キノキサリニル)-1H-イミダゾール-2-イル]メチル]ベンズアミド、2-フルオロ-N-[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(1,2,4)トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル]-1H-イミダゾール-2-イル]メチル]アニリン、及びそれらの塩より選択される一又は複数の A L K 5 阻害剤と、2-(4-(4-(イソキノリン-4-イル)フェニル)-1H-ピラゾール-1-イル)-N,N-ジメチルアセトアミド、4-(2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キナゾリン-6-カルボニトリル及びそれらの塩より選択される一又は複数の C D K 8 / 1 9 阻害剤との組み合わせを含む。より好ましくは、本発明において培地は、A L K 5 阻害剤として4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド又はその塩と C D K 8 / 1 9 阻害剤として4-(2-(6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)ナフタレン-2-イル)エチル)アミノ)キナゾリン-6-カルボニトリルもしくは2-(4-(4-(イソキノリン-4-イル)フェニル)-1H-ピラゾール-1-イル)-N,N-ジメチルアセトアミド又はその塩との組み合わせを含む。

[0055] 本発明における「インスリン陽性細胞集団」は、多能性幹細胞から分化誘

導して得られる、インスリン陽性細胞を含む細胞集団を意味する。「インスリン陽性細胞」は、インスリンのマーカの発現が認められることによって特徴付けられる細胞を意味する。「インスリン陽性細胞」は、NK6ホメオボックス1 (NKX6.1) のマーカを発現していてもよく、好ましくは、インスリン及びNKX6.1の両方のマーカが発現している細胞（すなわち、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞）である。インスリン陽性細胞には、 β 細胞が含まれていてもよい。

[0056] 本発明における「インスリン陽性細胞集団」は、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、ALK5 inhibitor を含まず、ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子を含む培地中で培養し、分化させることにより得ることができる。インスリン陽性細胞集団には、インスリン陽性細胞に加えて、その他の細胞（例えば、内分泌前駆細胞；グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドの少なくとも一つのマーカを発現する他の膵ホルモン産生細胞（ α 細胞や δ 細胞など）；CHGA陽性細胞；Ki67陽性細胞；CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0057] 本発明において「膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団」とは、膵前駆細胞集団、内分泌前駆細胞集団、又はインスリン陽性細胞集団であるか、あるいは、膵前駆細胞集団、内分泌前駆細胞集団、及びインスリン陽性細胞集団より選択される二以上の細胞集団を意味する。好ましくは、本発明において「膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団」とは、膵前駆細胞集団、又は内分泌前駆細胞集団、あるいは膵前駆細胞集団、及び内分泌前駆細胞集団の両細胞集団を意味する。

[0058] 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 (totip

otency)」とは区別される。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、inGenious社、理化学研究所 (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、米国国立衛生研究所 (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、WiCell Research Institute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。

[0062] 「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及び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。

[0063] 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、US2

009/047263、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。

[0064] 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、QHJ-I01s01株、QHJ-I01s04株、QHJ-I14s03株、QHJ-I14s04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。

[0065] 本明細書において「腭前駆細胞集団」とは、腭前駆細胞を含む細胞集団を意味する。本明細書において、腭前駆細胞は、マーカーであるNKX6.1の発現によって特徴付けられる（すなわち、NKX6.1陽性である）。腭前駆細胞は、さらに、PDX-1、PTF-1 α 、GATA4およびSOX9の少なくとも一つのマーカーが発現していてもよい。好ましくは、腭前駆細胞は、NKX6.1及びPDX-1の発現によって特徴付けられる（すなわち、NKX6.1陽性かつPDX-1陽性である）。

[0066] 一実施形態において、本発明における「腭前駆細胞集団」は、下記に詳述する多能性幹細胞を腭 β 細胞へと分化誘導する工程において、工程4)終了後の培養物、又は工程5)における培養物に該当する細胞集団である。

[0067] 本発明における「腭前駆細胞集団」には、腭前駆細胞が30%以上、好ま

しくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上、よりさらに好ましくは70%以上の割合で含まれる。膵前駆細胞集団には、膵前駆細胞に加えて、その他の細胞（例えば、内分泌前駆細胞、インスリン陽性細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0068] なお、本明細書中に記載する細胞集団中の特定の細胞の割合は、フローサイトメトリーのような細胞数を算出可能な公知の手法に基づいて求めることができる。

[0069] 本明細書において「内分泌前駆細胞集団」とは、内分泌前駆細胞を含む細胞集団を意味する。本明細書において、内分泌前駆細胞は、CHGA、NeuroD及びNGN3の少なくとも一つのマーカーの発現、およ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、NKX2.2、Islet-1、PDX-1などのマーカーが発現していてもよい。

[0070] 一実施形態において、本発明における「内分泌前駆細胞集団」は、下記に詳述する多能性幹細胞を膵β細胞へと分化誘導する工程において、工程5）終了後の培養物、又は工程6）における培養物に該当する細胞集団である。

[0071] 本発明における「内分泌前駆細胞集団」には、内分泌前駆細胞が30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上、よりさらに好ましくは70%以上の割合で含まれる。内分泌前駆細胞集団には、内分泌前駆細胞に加えて、その他の細胞（例えば、膵前駆細胞、インスリン陽性細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0072] 多能性幹細胞からインスリン陽性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（WO 2009/012428、WO 2016/021734）。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、腭前駆細胞、内分泌前駆細胞、インスリン陽性細胞に大きく分類することができる。

[0073] 腭前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団は、多能性幹細胞をインスリン陽性細胞へと分化誘導する公知の手法を用いて得ることができる。すなわち、以下の分化誘導工程を利用して各目的の分化段階にある細胞集団を得ることができる：

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陽性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。

[0074] 工程 1) 胚体内胚葉細胞への分化

多能性幹細胞は、まず胚体内胚葉細胞に分化させる。多能性幹細胞から胚体内胚葉を誘導する方法は既に公知であり、そのいずれの方法を用いてもよい。好ましくは、多能性幹細胞は、アクチビン A を含む培地、より好ましくはアクチビン A、ROCK 阻害剤、GSK3 β 阻害剤を含む培地で培養して、胚体内胚葉細胞に分化させる。培養開始時の細胞数としては、特に限定されず、22000～150000細胞/cm²、好ましくは22000～100000細胞/cm²、より好ましくは22000～80000細胞/cm²である。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。

[0075] 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。

[0076] 本工程で用いる培地としては、RPMI 1640培地、MEM培地、i

MEM培地、DMEM/F12培地、Improved MEM Zinc Option培地、Improved MEM/1%B-27/Penicillin Streptomycin培地、MCDB131/20mM 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。

[0077] アクチビンAの培地中の濃度は、通常30~200 ng/mL、好ましくは50~150 ng/mL、より好ましくは70~120 ng/mL、特に好ましくは約100 ng/mLである。

別の態様として、アクチビンAは培地中に低用量にて、例えば、5~100 ng/mL、好ましくは5~50 ng/mL、より好ましくは5~10 ng/mLの量にて含めることができる。

さらに別の態様として、アクチビンAの培地中の濃度は、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である。

[0078] GSK3β阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3β阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3β阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常2~5 μM、好ましくは2~4 μM、特に好ましくは約3 μMである。

[0079] 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、例えばROCK阻害剤としてY27632を使用する場合の濃度は、通常5~20 μM、好ましくは5~15 μM、特に好ましくは約10 μMである。

[0080] 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0.01~20 μM、好ましくは0.1~10 μM、より好ましくは0.5~5 μM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。

[0081] 特定の態様では、アクチビンA、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤を含む培地で1日培養した後、アクチビンAのみを含む培地で1日毎に培地を交換しながらさらに2日培養する。あるいは、低用量のアクチビンAの存在下、多能性幹細胞を、インスリンを0.01~20 μ M含む培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンを含まない培地中で第2の培養を行うことにより製造することができる。

[0082] 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。

[0083] 培養温度は、特に限定されないが、30~40 $^{\circ}$ C (例えば、37 $^{\circ}$ 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。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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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0.1nM~1000 μ M、好ましくは約0.1nM~100 μ Mである。EGFの場合、その濃度は、約5~2000ng/mL (すなわち、約0.8~320nM)、好ましくは約5~1000ng/mL (すなわち、約0.8~160nM)、より好ましくは約10~1000ng/mL (すなわち、約1.6~160nM) である。FGF10の場合、その濃度は、約5~2000ng/mL (すなわち、約0.3~116nM)、好ましくは約10~1000ng/mL (すなわち、約0.6~58nM) 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5~150ng/mL、好ましくは30~100ng/mL、特に好ましくは約5

0 ng/mLである。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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）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。

[0092] 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0.5～1.5 μM、好ましくは0.3～1.0 μM、特に好ましくは約0.5 μMである。

[0093] 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10～20

0 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。

[0094] 工程4) 膵前駆細胞への分化

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、膵前駆細胞に分化誘導する。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。

[0095] 2次元培養の場合には、既報(Toyoda et al., Stem Cell Research (2015) 14, 185-197)に従い、工程3) で得られた後方前腸細胞を0.25%トリプシン-EDTA溶液で処理し、ピペティングにより当該液中に分散させて細胞分散液を得、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を少量の新たな培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を工程4) の新しい培地に再播種する。

[0096] 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。

[0097] 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 μ M~5 μ M、好ましくは0.00001 μ M~1 μ 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。

[0098] 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。

[0099] 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 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)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。

[0100] 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。

[0101] また、培地にはプロテインキナーゼC (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。

[0102] また、培地にはジメチルスルホキシド、及び／又はアクチビン (1～50 ng/mL)を添加してもよい。

[0103] 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、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、ピルビン酸、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。

[0104] また細胞培養は、2次元培養の場合は、フィーダー細胞を使用せず、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、OptiCell（製品名）（Nunc社）等の細胞培養シートなどの培養容器が使用される。培養容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、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（例：BDマトリゲル（日本ベクトン・デッキンソン社））、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていることが好ましい。培養容器としては、I型コラーゲン、マトリゲル、フィブロネクチン、ビトロネクチン又はポリ-D-リジンなどでコートされた培養容器が好ましく、マトリゲル又はポリ-D-リジンでコートされた培養容器がより好ましい。

[0105] 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。

[0106] 工程4）で得られた膵前駆細胞は公知の表面マーカーである糖タンパク質2（GP2）などを利用して、さらに純化することができる。上記純化は自体公知の方法、例えば、抗GP2抗体を固定化したビーズを用いて行うことができる。

[0107] 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溶液で処理し、ピペッティングすることにより当該液中に分散させて細胞分散液を得、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を少量の新たな培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を工程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。

- [0108] 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、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。なお、本発明においては、工程５）にて上述のALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を培地を含めることにより、工程５）にて従来利用されていたALK5インヒビターIIは実質的に含めない、好ましくは使用しない。
- [0109] 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。
- [0110] 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。
- [0111] 工程５）で得られた内分泌前駆細胞は公知の表面マーカーである糖タンパク質2（GP2）などを利用して、さらに純化することができる。上記純化は自体公知の方法、例えば、抗GP2抗体を固定化したビーズを用いて行うことができる。
- [0112] 工程６）インスリン陽性細胞への分化
工程５）で得られた内分泌前駆細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養してインスリン陽性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。
- [0113] 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、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11、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11、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。なお、本発明においては、工程6）にて上述のALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を培地に含めることにより、工程6）にて従来利用されていたALK5インヒビター11は実質的に含めない、好ましくは使用しない。

[0114] 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。培養は、フィーダー細胞を使用しない。3次元培養の場合、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。

[0115] 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。

[0116] 本発明において、「ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含む培地」には、ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を、ALK5活性及びCDK8／19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る。当該因子が、ALK5阻害剤とCDK8／19阻害剤とからなる複数の因子の組み合わせである場合には、ALK5阻害剤及びCDK8／19阻害剤は、各標的の活性を阻害することが可能な任意の量にてそれぞれ含めることができる。

[0117] 例えば、ALK5阻害剤は培地に、10 μ M以下、5 μ M以下、4 μ M以下、3 μ M以下、2 μ M以下、又は1 μ M以下の量にて含めることができ、添加量の下限は、特に限定されないが、0.1 nM以上、0.2 nM以上、0.3 nM以上、0.4 nM以上、又は0.5 nM以上とすることができる。例えば、ALK5阻害剤の添加量は、10 μ M以下0.1 nM以上であり

、好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下 $0.1\ \text{nM}$ 以上、より好ましくは $1\ \mu\text{M}$ 以下 $0.1\ \text{nM}$ 以上、例えば、 $4\ \mu\text{M}$ 未満 $0.1\ \text{nM}$ 以上、 $3\ \mu\text{M}$ 以下 $0.3\ \text{nM}$ 以上である。

[0118] また、例えば、CDK8／19阻害剤は培地に、 $10\ \mu\text{M}$ 以下、 $5\ \mu\text{M}$ 以下、 $4\ \mu\text{M}$ 以下、 $3\ \mu\text{M}$ 以下、 $2\ \mu\text{M}$ 以下、又は $1\ \mu\text{M}$ 以下の量にて含めることができ、添加量の下限は、特に限定されないが、 $0.1\ \text{nM}$ 以上、 $0.2\ \text{nM}$ 以上、 $0.3\ \text{nM}$ 以上、 $0.4\ \text{nM}$ 以上、又は $0.5\ \text{nM}$ 以上とすることができる。例えば、CDK8／19阻害剤の添加量は、 $10\ \mu\text{M}$ 以下 $0.1\ \text{nM}$ 以上であり、好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下 $0.1\ \text{nM}$ 以上、より好ましくは $1\ \mu\text{M}$ 以下 $0.1\ \text{nM}$ 以上、例えば、 $1\ \mu\text{M}$ 未満 $0.1\ \text{nM}$ 以上、である。

[0119] また、多能性幹細胞から分化誘導して得られた臍前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の、ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含む培地中における培養は、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。当該因子を含む培地中における培養は、4日以上行うことが好ましい。当該因子を含む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、当該因子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。

[0120] 多能性幹細胞から分化誘導して得られた臍前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団は、ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含む培地中にて培養し、分化させる工程に付すことができる。ここで「ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含む培地中にて培養し、分化させる」とは、当該因子を含む培地中にて培養する工程と目的の細胞集団へと分化させる工程とを同時に行う場合、当該因子を含む培地中にて培養を行った後に目的の細胞集団へと分化させる工程に付す場合、ならびに、目的の細胞集団へと分化させる工程に付した後に当該因子を含む培地中にて培養する工程に付す場合も含む。したがって、ALK5

阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含む培地と細胞集団を分化させるのに用いる培地とは別々のものであってもよいし、分化させる工程に用いる培地にALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子がさらに添加されてもよい。

[0121] 本発明の一実施形態において、ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子は、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞を分化誘導する工程において、工程5以降の培地、すなわち、工程5の培地、又は工程6の培地、あるいは、工程5の培地及び工程6の培地に含めて、細胞に作用させる。

[0122] 本発明により得られたインスリン陽性細胞集団は、膵β細胞を含む細胞集団（以下、「膵β細胞集団」と記載する）に分化誘導又は成熟することができる。本明細書において「膵β細胞」は、「インスリン陽性細胞」より成熟した細胞を意味しており、具体的には、膵β細胞の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、あるい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特徴付けられる細胞を意味する。膵β細胞集団には、膵β細胞に加えて、その他の細胞（例えば、インスリン陽性細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0123] 膵β細胞集団は、インスリン陽性細胞集団を分化・成熟させることによって得ることができる。好ましくは、膵β細胞集団は、インスリン陽性細胞集団を動物生体内で分化・成熟させることによって得ることができる。

[0124] 「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。

[0125] 移植は、細胞集団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。移植される細胞数は、移植される細胞の分化段階や、移植対象の、年齢、体重、移植部位の大

きさ、疾患の重篤度等の要因により変化し得、特に限定されないが、例えば、 10×10^4 細胞個～ 10×10^{11} 細胞個程度とすることができる。移植された細胞集団は、生体内環境において分化誘導され、目的の細胞集団、好ましくは膵β細胞集団へと分化することができ、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。

[0126] 移植に際して、細胞集団は、生体適合性材料を含むゲル中に包埋して移植してもよく、例えば、生体適合性材料を含むゲル中に包埋された細胞集団をカプセル、バッグ、チャンバーなどのデバイスに封入して生体内に移植することもできる。

[0127] 本明細書において「包埋」とは、生体適合性材料を含むゲル中に内分泌前駆細胞集団又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、散在させ収容することを意味する。

[0128] 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。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）、ポリカプロラクトン（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-ε-グリコール酸（PLGA）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-ε-ヒドロキシバリレート）（PHBV）、ポリ（エチレン-ε-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、アルギン酸塩、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。特定の態様において、「生体適合性材料」として、アルギン酸塩又はアルギン酸エステルを好適に用いることができる。

- [0129] アルギン酸塩は水溶性の塩であればよく、金属塩、アンモニウム塩等を利用することができる。例えば、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カルシウム、アルギン酸アンモニウム等を好適に用いることができる。
- [0130] アルギン酸エステル（アルギン酸プロピレングリコールとも称される）はアルギン酸のカルボキシル基にプロピレングリコールがエステル結合した誘導体である。
- [0131] アルギン酸塩に含まれるマンヌロン酸とグルロン酸の割合（M/G比）は任意であり、一般的に、 $M > G$ である場合には柔軟性に富んだゲルを形成することができる、 $M < G$ である場合には強固なゲルを形成することができる。本発明においては、グルロン酸を10～90%、20～80%、30～70%、又は、40～60%の割合で含むものを利用することができる。
- [0132] アルギン酸塩又はアルギン酸エステルを用いたゲルの作製は、公知の手法（WO 2010/032242、WO 2011/154941）に準じて作製することができ、アルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液に架橋剤を添加してゲル化させることにより得ることができる。
- [0133] アルギン酸塩又はアルギン酸エステルは溶媒中に、0.05～10重量%、好ましくは、0.1～5重量%、より好ましくは0.5～3重量%の量で

含めることができる。溶媒はアルギン酸塩又はアルギン酸エステルを溶解可能なものであればよく、水、生理食塩水等を利用することができる。

[0134] 架橋剤はアルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液をゲル化できるものであればよく、特に限定されないが、多価の金属カチオンを利用することができる。多価の金属カチオンとしては、2価の金属カチオンが好ましく、より好ましくは、カルシウムイオン、ストロンチウムイオン、バリウムイオンである。架橋剤は塩の形態で利用することができ、本発明においては、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化バリウムから選択される少なくとも一つを架橋剤として利用することができる。

[0135] アルギン酸塩又はアルギン酸エステルを含むゲルにはナノファイバーを含めることができる。ナノファイバーは、ナノメートル領域の直径を有する天然又は合成ファイバーである。天然ナノファイバーとしては、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、キトサンなどの多糖類の一又は複数を含むものが挙げられる。合成ナノファイバーとしては、ポリ乳酸（PLA）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリウレタン（PU）、ポリ（ラクチド-ε-グリコリド）（PLGA）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-ε-ヒドロキシバリレート）（PHBV）、ポリ（エチレン-ε-ビニルアセテート）（PEVA）などが挙げられる。ナノファイバーはアルギン酸を含むゲル中に1重量%未満、例えば、0.9重量%、0.8重量%、0.7重量%、0.6重量%、0.5重量%、又はそれ未満の量にて含めることができる。アルギン酸塩又はアルギン酸エステルを含むゲル中に含めるナノファイバーの量の下限は特に限定されないが、0.05重量%以上、好ましくは0.1重量%以上とすることができる。

[0136] アルギン酸塩又はアルギン酸エステルを含むゲルへの細胞集団の包埋は任意の手段で行うことができ、特に限定されるものではないが例えば、アルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液中に細胞集団を混合し、ゲル化させることにより行うことができる。

[0137] 細胞集団はアルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液中に 1×10^4 細胞

～ 1×10^6 細胞/mL、好ましくは 1×10^7 細胞～ 1×10^8 細胞/mLから選択される量にて含めることができる。

[0138] 細胞集団を含むアルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液のゲル化は、当該溶液に架橋剤を添加して行うことができる。添加する架橋剤の量は、当該溶液に対し0.1～5重量%、例えば、0.1～1重量%、から選択される量とすることができる。ゲル化は、細胞培養や細胞移植に用いられる所定の構成及び／又は形状を有する容器内にて、あるいは当該容器に適合するゲルが得られるように設計された鋳型内で行うことができる。

[0139] あるいは、公知の手法（WO 2010/010902）に準じてアルギン酸を含むゲルカプセルを形成することにより行われてもよい。すなわち、架橋剤の溶液に対し、細胞集団を含むアルギン酸塩又はアルギン酸エステルの溶液を滴下して行ってもよい。滴下する際のノズルの形状や滴下方法に応じて、液滴のサイズを調整することができ、ひいてはアルギン酸を含むゲルカプセルの大きさを規定することができる。滴下方法は特に限定されないが、エアスプレー法、エアレススプレー方式、静電スプレー法等の手法により行うことができる。アルギン酸を含むゲルカプセルの大きさは特に限定されないが、直径が5 mm以下、1 mm以下、500 μ m以下とすることができる。架橋剤溶液には、0.1～10重量%、例えば、0.1～5重量%、から選択される量の架橋剤を含めることができる。

[0140] 本発明により得られたインスリン陽性細胞集団は、動物生体内に移植して、動物生体内で分化させた場合にはそのまま留置して、インスリンを産生・分泌する細胞として利用することが可能である。

[0141] 本発明により得られたインスリン陽性細胞集団は、そのままあるいはカプセル化して患部に移植することで、糖尿病、特に1型糖尿病を治療するための細胞医薬として有用である。

[0142] また、本発明により得られたインスリン陽性細胞集団は、プロドラッグであってもよい。本明細書において、プロドラッグとは、生体内に移植した後、分化し、疾患を治療する機能を有する細胞に変化する細胞集団をいう。

[0143] 本発明により得られたインスリン陽性細胞集団は、毒性（例、急性毒性、慢性毒性、遺伝毒性、生殖毒性、心毒性、癌原性）が低く、そのまま、または薬理学的に許容される担体等と混合して医薬組成物とすることにより、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）に対して、安全に投与することができる。

[0144] 3. 分化培地

本発明は、ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含み、ALK5i11を実質的に含まない、膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の分化培地、を提供する。

[0145] 本発明の分化培地は、膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の分化誘導に用いることができる。本発明の分化培地は、上述の多能性幹細胞をインスリン陽性細胞へと分化誘導する方法における、工程5）、又は工程6）にて使用することができる。

[0146] 本発明の分化培地は、RPMI 1640培地、MEM培地、iMEM培地、DMEM／F12培地、Improved MEM Zinc Option培地、Improved MEM／1%B-27／Penicillin Streptomycin培地、MCDB131／20mM 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に、上記ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子をALK5活性及びCDK8／19活性を阻害することが可能な任意の量にて含んでなる。当該因子が、ALK5阻害剤とCDK8／19阻害剤とからなる複数の因子の組み合わせである場合には、培地に含まれるALK5阻害剤及びCDK8／19阻害剤の各量は上記定義のとおりである。

[0147] 本発明の分化培地はALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子に加えてさらに、工程5）、及び工程6）にてそれぞれ要求される増殖因子、各種阻害剤、血清代替物、抗生物質、ビタミン等のその他の因子を

含む。既報 (Nature Biotechnology 2014; 32 : 1121-1133) に従い、例えば、工程5) にて使用される培地には、SANT1、レチノイン酸、T3、LDN、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF (好ましくはFGF2)、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を所定の量にて添加することができる。また、工程6) にて使用される培地には、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、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、ZnSO₄、ヘパリン、N-アセチルシステイン、Trolox、R428等を所定の量にて添加することができる。

[0148] 本発明の分化培地は、ALK5i11を実質的に含まないものである。「ALK5i11を実質的に含まない」とは、培地中にてALK5i11がALK5阻害活性を含む任意の活性を発揮する態様で含まれないことを意味し、ALK5i11が一切含まれないことを必ずしも意味するものではないが、好ましくは、培地中に、ALK5i11が一切含まれないことを意味する。

[0149] 本発明の分化培地は、基本培地、ALK5阻害活性とCDK8/19阻害活性とを有する因子及び上記その他の因子は全て混合され一つの形態で提供されてもよいし、あるいは任意の組み合わせで、又はそれぞれ別々に複数の形態で提供され用事調製されてもよい。

[0150] 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

[0151] 実施例1 : ALK5i11の変異原性の評価

従来、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞集団への分化誘導の各過程において分化培地に添加して用いられていた、ALK5i11を含む14種の化合物について、定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship; (Q)S

AR)に基づく細菌に対する変異原性予測プログラム(Derek及びCASE Ultra)を用いて、各化合物の変異原性について解析した。

[0152] その結果、ALK5111を含む5種の化合物について変異原性の構造アラートが確認された。構造アラートが確認されたこの5種の化合物についてさらに、Ames試験を行い、その変異原性の有無について評価した。

[0153] Ames試験は従来公知の手法に従い、すなわち、Salmonella typhimurium TA100株、TA1535株、TA98株、及びTA1537株、ならびにEscherichia coli WP2 uvrA株の各菌株を、7つの濃度(78.1~5,000 µg/plate)の各化合物と混合し、試験管内で20分間プレインキュベートした後、半流動寒天を加えて一緒に、最少グルコース寒天培地に播種して固め、37℃にて48時間インキュベートした。なお、本実験は、細胞培養系における各化合物の変異原性について評価することを目的とするものであり、肝酵素により代謝された後の代謝物について評価を行うものではないため、ラット肝臓のS9画分は含めなかった。陽性対照には、強力な変異原である9-aminoacridine hydrochloride monohydrate(9-AA, Sigma-Aldrich)及びICR 191を用い、陰性対照には、ジメチルスルホキシドを用いた。陽性の判定は、いずれかの菌株において、復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の平均値の少なくとも2倍以上である場合とした。

[0154] Ames試験の結果、5種の化合物のうちALK5111についてのみ、TA1537株(S9画分なし)において陽性の判定が示され、その変異原性が確認された(下記表4)。

[0155]

[表4]

TA1537, -S9		
	ALK5 i II	2-(3-(ピリジン-3- イル)-1H-ピラゾール -4-イル)キノキサリン
μ g/プレート	# コロニー	# コロニー
0 (DMSO)	8	9
78.1	8	5
156	7	9
313	8	21
625	26	45
1250	74	82
2500	672	128
5000	2049	194
陽性対照		
9-AA, 80 μ g	169	
ICR 191, 1.0 μ g		1804

[0156] ALK5 i II は、市販のALK5阻害剤であり、ナフチリジンの誘導体である（図1）。TA1537株は、変異原性の懸念が示唆されるインターカレーターに感受性があることが知られている。そこで、ALK5 i IIの変異原性が、その平面構造に由来するものであるのか、あるいはALK5阻害能に関連するものであるのかを明らかにするために、ALK5 i IIの構

造類似体（2-（3-（ピリジン-3-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）キノキサリン）と他の代表的なALK5阻害剤の2種（SB525334とSB431542）を用いて同様に試験・評価した。

[0157] その結果、2-（3-（ピリジン-3-イル）-1H-ピラゾール-4-イル）キノキサリンはALK5阻害活性を示さなかったが、ALK5i11と同じくAmes試験で陽性の判定を示した（図1、表4）。一方、他の代表的なALK5阻害剤であるSB525334とSB431542は、変異原性を示さなかった（図1）。これらの結果から、ALK5i11の変異原性は、ALK5阻害能ではなく、ナフチリジンに由来する平面構造に起因している可能性が高いことが示された。

[0158] 実施例2：ALK5i11のオフターゲット効果の評価

変異原性を有することが確認されたALK5i11に代えて使用することが可能な非変異原性のALK5阻害剤を同定するため、市販の化合物や発明者らが構築したライブラリより合計30種のALK5阻害剤を選択し、これらについて上記と同じく、細菌に対する変異原性予測プログラム（Derek及びCASE Ultra）を用いてその変異原性を解析した。

[0159] その結果、30種のうち、20種の化合物について、既知の変異原性に関連する構造的特徴は有さないことが明らかとなった。次に、これら非変異原性のALK5阻害剤について、インスリン産生細胞に富むインスリン陽性細胞集団を製造できるか否かを検証した。

[0160] 本検証方法において、ヒトiPS細胞（Ff-114-s04株）から膵前駆細胞集団への分化誘導は、上記工程1）-4）、既報（Stem Cell Research（2015）14、185-197）等に従い実施した。インスリン陽性細胞への分化誘導は、上記工程5）、6）等に従い実施した。

[0161] iPS細胞から分化誘導して得られた膵前駆細胞集団を分化因子（SANT1、レチノイン酸、T3、LDN、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF2）と共に、ALK5i11（10μM）、又は非変異原性のALK5阻

害剤（代表的なSB525334（10 μ M）、SB431542（10 μ M）、IN1130（1 μ M）、EW-7197（1 μ M））を含む分化誘導培地（Improved MEM／1%B-27／Penicillin Streptomycin培地）で2日間培養して内分泌前駆細胞集団に分化誘導した。

[0162] 次いで、分化因子（T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、FGF受容体1阻害剤PD-166866）と共に、ALK5i11（10 μ M）、又は非変異原性のALK5阻害剤（SB525334（10 μ M）、SB431542（10 μ M）、IN1130（1 μ M）、もしくはEW-7197（1 μ M））をそれぞれ含む分化誘導培地（Improved MEM／1%B-27／Penicillin Streptomycin培地）で7日間培養後、既報（Nature Biotechnology 2014；32：1121-1133）に従い、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、N-アセチルシステイン、AXL阻害剤R428、アスコルビン酸、ROCK阻害剤、ZnSO₄、ヘパリン、Troloxと共に、ALK5i11（10 μ M）、又は非変異原性のALK5阻害剤（SB525334（10 μ M）、SB431542（10 μ M）、IN1130（1 μ M）、もしくはEW-7197（1 μ M））をそれぞれ含む分化誘導培地（MCDB131／20mM Glucose／NaHCO₃／FAF-BSA／ITS-X／Glutamax／Penicillin Streptomycin培地）で4日間培養してインスリン陽性細胞集団に分化誘導した。

[0163] 上記方法で得られたインスリン陽性細胞集団中のインスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞数、ならびにCHGA陽性かつPDX1陽性の細胞数をフローサイトメトリーにより計数し、各細胞集団におけるそれぞれの細胞率を求めた。なお、対照の培地には、ALK5i11、及び非変異原性のALK5阻害剤のいずれも含まないものを用いた。

[0164] ALK5i11、又は非変異原性のALK5阻害剤（SB525334、

SB431542、IN1130、EW-7197)を含む分化誘導培地で処理して得られたインスリン陽性細胞集団の、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞率、及びCHGA陽性かつPDX1陽性の細胞率を図2に示す。ALK5 inhibitorと異なり、非変異原性のALK5阻害剤(SB525334、SB431542、IN1130、EW-7197)を用いた場合には、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞率ならびにCHGA陽性かつPDX1陽性の細胞率はいずれも、対照(−)と同程度であり、ALK5 inhibitorと異なり、非変異原性のALK5阻害剤の添加によっては、目的とするインスリン陽性細胞への分化が促進されないことが確認された。

[0165] キナーゼ阻害剤は一般的に多様なターゲットと相互作用することから、ALK5 inhibitorのオフターゲット効果を確認するために、そのキナーゼ阻害プロファイルを解析した。本試験は、BODIPY-FL、又はCy5-FLを結合させたスタウロスポリン誘導体を蛍光プローブとして用い、0.1 μ M、及び1 μ MのALK5 inhibitorを適用し、約350種類のリコンビナントキナーゼに対する競合結合アッセイを実施した。本試験では、0.1 μ M、及び1 μ Mの2濃度の阻害活性値から pIC_{50} 値を推定するものであり、8.0超え＝振り切れている(強い阻害活性がある)、6.0～8.0＝阻害活性がある、6.0以下＝阻害活性が1 μ Mの濃度まででは全く検出されない、と評価される。結果を下記表5に示す。ALK5 inhibitorは、CDK8及びCDK19を含む11種のキナーゼに対し、推定 pIC_{50} 値が6を超える阻害活性が確認された。なお、表中ALK5、ALK4の 8.00 ± 0.00 とは測定値の外挿から実際の pIC_{50} 値は8を超えると推定されたことを示す。

[0166]

[表5]

キナーゼ	推定 pIC ₅₀ 値		
	ALK5iII		
ALK5	8.00	±	0.00
ALK4	8.00	±	0.00
KDR	7.22	±	0.10
CDK19	7.18	±	0.50
TGFBR2	6.97	±	0.12
RIPK2	6.82	±	0.05
CDK8	6.80	±	0.40
PKD3	6.51	±	0.06
PKD2	6.40	±	0.08
PKD1	6.38	±	0.19
TNIK	6.18	±	0.14

[0167] 次に、非変異原性のALK5阻害剤（SB431542、SB525334、IN1130、EW-7197）についても、上記11種のキナーゼに対する阻害活性を評価した。その結果、興味深いことに、CDK8とCDK19（CDK8／19）に対する阻害活性はALK5iIIに特有のものであることが判明した（図3）。これらの結果は、CDK8／19の阻害がインスリン陽性細胞への分化促進に寄与する可能性を示すものである。

[0168] 実施例3：ALK5 inhibitorの効果を模倣するALK5阻害とCDK8/19阻害の組み合わせ

上記「実施例2」に記載のインスリン陽性細胞集団の製造方法において、培地に添加するALK5 inhibitor、又は非変異原性のALK5阻害剤として、以下(1)～(4)のいずれかをを用いた以外は同様にして、インスリン陽性細胞集団を製造した：

- (1) ALK5 inhibitor 10 μ M、
- (2) 非変異原性のALK5阻害剤SB431542 3 μ M、
- (3) CDK8/19阻害剤Senexin B 0.3 μ M、
- (4) SB431542 3 μ MとSenexin B 0.3 μ Mとの組み合わせ。

なお、これらの阻害剤は、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動法 (TR-FRET) 無細胞用量反応アッセイにおいて、完全阻害を引き起こす濃度で使用した。

[0169] 上記方法で得られたインスリン陽性細胞集団中のインスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞数をフローサイトメトリーにより計数し、各細胞集団におけるそれぞれの細胞率を求めた。

[0170] その結果、(4) SB431542とSenexin Bとの組み合わせ (SB/Sen) を用いた場合のインスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞率は、(1) ALK5 inhibitorを用いた場合のそれと比べて高い割合を示し (図4A)、また両者の全細胞収量は同程度であった (図4B)。

[0171] 一方、(2) ALK5阻害剤SB431542のみを用いた場合には、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞率及び全細胞収量が(1) ALK5 inhibitorを用いた場合のそれらと比べて低い値を示した (図4A、B)。

[0172] また、(3) CDK8/19阻害剤Senexin Bのみを用いた場合には、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞率は(1) ALK5 inhibitorを用いた場合のそれと比べて高い割合を示したが (図4A)、全細胞収量は(1) ALK5 inhibitorを用いた場合と比べて低い値を示した (図4B)。

[0173] 次いで、上記（１）～（４）の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団における細胞組成を比較するために、シングルセルRNA-seq (scRNA-seq) 解析を行った。scRNA-seq解析用ライブラリ作成は10x Genomics社のChromium controllerと調製キットChromium Next GEM Single Cell 3' kits v3.1を用いて行い、シーケンスはイルミナ社のHi-seqプラットフォームを用いて実施した。得られたUMIカウントに対するデータ解析は10X Genomics社Cell RangerとRパッケージSeuratを用いて行い、PCA, UMAPで次元削減・可視化を行った。次元削減結果に基づく細胞のクラスタリングはSeuratのshared nearest neighbor法をベースにしたクラスタリングにより実施した。

[0174] その結果、上記（１）～（４）の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団において#1～#17の細胞クラスタが同定された。インスリンやグルカゴン等の細胞識別マーカーの発現パターンと、一般に公開されているデータベースPanglaoDB (<https://panglaoDB.se/>) (O. Franzen, L. M. Gan, J. L. M. Björkegren, PanglaoDB: a web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. Database (Oxford) 2019 (2019).) に基づく解析より、クラスタ#1、2、9はそれぞれ β 細胞、 α 細胞、膵腺房細胞／膵管細胞に近いことがわかった。また、クラスタ#3と6の細胞は腸クロム親和性細胞に特異的な特徴を有していた。クラスタ#12の細胞は、インスリン及びNKX6.1の発現レベルが高い一方、MAFA及びG6PC2等の β 細胞の成熟マーカーを発現せず、これにより隣接するクラスタ#1の細胞と区別できることから、比較的未熟な β 細胞であると考えられる。なお、 β 細胞の一部は、 α 細胞、 δ 細胞、及び γ 細胞とともにクラスタ#0に統合されている可

能性が考えられる。クラスタ#11の細胞は肝細胞と膵 α 細胞の中間的な性質を示し、クラスタ#7と15は神経様細胞に最も類似していた。

[0175] 上記(1)～(4)の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団における各細胞クラスタを比較すると、推定 β 細胞、推定 α 細胞、推定腸クロム親和性細胞(クラスタ#0、1、2、3、6)等の典型的な内分泌細胞は、(1)ALK5i11、(3)Senexin B、(4)SB431542とSenexin Bとの組み合わせ、の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団においてほぼ例外なく認められたのに対し、(2)ALK5阻害剤SB431542を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団では殆ど認められない一方で、他のいくつかのクラスタ(#5、9、10、12、13)は(2)ALK5阻害剤SB431542を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団に特化していた。

[0176] また、上記(1)～(4)の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団におけるインスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞亜集団における各クラスタ(#1、3、6、12)の割合を図5に示す。(1)ALK5i11、及び(4)SB431542とSenexin Bとの組み合わせ(SB/Sen)の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団は、ほぼ同等の割合で各クラスタを含むものであり、(2)ALK5阻害剤SB431542、(3)CDK8/19阻害剤Senexin Bの各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団におけるその割合とは異なるものであった。

[0177] また、クラスタ#1および#2(推定 β 細胞および推定 α 細胞)における遺伝子発現について、(1)ALK5i11を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団と、その他の各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団とをそれぞれ比較したところ、2つのサンプル間の差次的発現遺伝子(DEG)の数は、(1)ALK5i11、及び(4)SB431542とSenexin Bとの組み合わせの各阻害剤を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団の間でいずれのクラスタにおいても最も低い値が得られた(図

6)。これらの結果は、(1) ALK5 i l l を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団と、(4) ALK5 阻害剤とCDK8／19 阻害剤との組み合わせを用いて製造されたインスリン陽性細胞集団とが近い *in v i t r o* プロファイルを有することを示唆している。

[0178] 実施例4：ALK5 i l l を使用せずに得られたインスリン陽性細胞集団の *in v i v o* 有効性の評価

ALK5 i l l を用いず、ALK5 阻害剤とCDK8／19 阻害剤との組み合わせ (SB／Sen) を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団を用いて、糖尿病に対する効果を *in v i v o* にて評価した。

[0179] 雄のNOD．CB17－Prkdcscid／J (NOD－scid) マウスに、低用量のストレプトゾトシン (STZ、50mg／kg／日、5日間、Sigma－Aldrich) を複数回腹腔内投与し、1型糖尿病を誘発させた。上記実施例3にて得られた、(1) ALK5 i l l を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団、及び(4) ALK5 阻害剤とCDK8／19 阻害剤との組み合わせ (SB／Sen) を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団をそれぞれ、10mg／mL fibrinogen (Merck Millipore) と50IU／mL thrombin solution (Sigma－Aldrich) を混合して得たフィブリンゲルに埋め込み、前述のモデルマウスの皮下に移植した (3×10^6 cells／mouse)。各モデルマウスにおける、血漿中のグルコース及びヒトC－ペプチドの量は、ACCU－CHEK Aviva (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 及びUltrasensitive C－peptide ELISA (Merckodia AB, Uppsala, Sweden) を用いて、製造元の指示書に従い、2又は4週間毎に測定した。

[0180] モデルマウスに移植された、(1) ALK5 i l l を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団、及び(4) ALK5 阻害剤とCDK8／19 阻害剤との組み合わせ (SB／Sen) を用いて製造されたインスリン陽性細胞集

団は、同程度の血中グルコース低下作用ならびにヒトC-ペプチド分泌作用を示し（図7AおよびB）、いずれを移植したマウスにおいても8週間以内に正常血糖レベルに達した。

[0181] また、移植後21週目に、各モデルマウスを経口ブドウ糖負荷試験に供したところ、いずれにおいても15分をピークにグルコース負荷に応答した（図7CおよびD）。

[0182] また、モデルマウスに移植された、（1）ALK5i11を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団、及び（4）ALK5阻害剤とCDK8/19阻害剤との組み合わせ（SB/Sen）を用いて製造されたインスリン陽性細胞集団を移植してから6か月経過後に摘出し、インスリン陽性細胞の各種マーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、いずれの細胞集団においても、移植時よりも多くのグルカゴン陽性 α 細胞の出現が確認された。

[0183] 以上の結果より、膵前駆細胞集団よりインスリン陽性細胞集団を分化誘導する過程にある細胞集団を、変異原性を示すALK5i11に代えて、非変異原性のALK5阻害剤とCDK8/19阻害剤の組み合わせで処理することによって、ALK5i11を利用した従来法にて得られるインスリン陽性細胞集団と同等の*in vitro*及び*in vivo*プロファイルを有するインスリン陽性細胞集団を製造できることが明らかとなった。

請求の範囲

- [請求項1] インスリン陽性細胞集団を製造する方法であって、
膵前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、A L K
5 阻害活性とC D K 8 / 1 9 阻害活性とを有する因子を含む培地中で
培養し、分化させることを含み、
前記培地が2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピ
ラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジンを実質的に含まない、
方法。
- [請求項2] 前記A L K 5 阻害活性とC D K 8 / 1 9 阻害活性とを有する因子が
A L K 5 阻害剤とC D K 8 / 1 9 阻害剤とを含む、請求項1 に記載の
方法。
- [請求項3] 前記C D K 8 / 1 9 阻害剤が、ジエチル (E) - (4 - (3 - (5
- (4 - フルオロフェニル) - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 4 -
イル) アクリルアミド) ベンジル) ホスホネート、2 - (4 - (4 -
(イソキノリン - 4 - イル) フェニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - イ
ル) - N, N - ジメチルアセトアミド、4 - ((2 - (6 - (4 - メ
チルピペラジン - 1 - カルボニル) ナフタレン - 2 - イル) エチル)
アミノ) キナゾリン - 6 - カルボニトリル、4 - (4 - (2, 3 - ジ
ヒドロベンゾ [b] [1, 4] ジオキシ - 6 - イル) - 1 H - ピラ
ゾール - 3 - イル) ベンゼン - 1, 3 - ジオール、3 - (2 - (イミ
ダゾ [1, 2 - b] ピリダジン - 6 - イルチオ) エチル) - 4 - (ナ
フタレン - 1 - イルスルホニル) - 3, 4 - ジヒドロキノキサリン -
2 (1 H) - オン、及び (E) - 3 - (4 - (1 - シクロプロピル -
1 H - ピラゾール - 4 - イル) ピリジン - 3 - イル) - N - (4 - (モ
ルホリノメチル) フェニル) アクリルアミド、からなる群より選択
される一又は複数の化合物又はその塩である、請求項2 に記載の方法
。
- [請求項4] 前記A L K 5 阻害剤が、4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール

－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル】－ベンズアミド、６－〔２－tert－ブチル－５－（６－メチルピリジン－２－イル）－１Ｈ－イミダゾール－４－イル〕キノキサリン、３－〔〔５－（６－メチル－２－ピリジニル）－４－（６－キノキサリニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル〕メチル〕ベンズアミド、２－フルオロ－Ｎ－〔〔５－（６－メチルピリジン－２－イル）－４－（〔１，２，４〕トリアゾロ〔１，５－a〕ピリジン－６－イル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル〕メチル〕アニリンからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、請求項２に記載の方法。

〔請求項５〕 前記CDK8／19阻害剤が、４－（（２－（６－（４－メチルピペラジン－１－カルボニル）ナフタレン－２－イル）エチル）アミノ）キナゾリン－６－カルボニトリルもしくは２－（４－（４－（イソキノリン－４－イル）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－イル）－N，N－ジメチルアセトアミド又はその塩であり、前記ALK5阻害剤が、４－〔４－（１，３－ベンゾジオキサール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル】－ベンズアミド又はその塩である、請求項２に記載の方法。

〔請求項６〕 前記臍前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団が、多能性幹細胞を分化誘導して製造されたものである、請求項１に記載の方法。

〔請求項７〕 ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子を含み、２－（３－（６－メチルピリジン－２－イル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イル）－１，５－ナフチリジンを実質的に含まない、臍前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の分化培地。

〔請求項８〕 前記ALK5阻害活性とCDK8／19阻害活性とを有する因子が、ALK5阻害剤とCDK8／19阻害剤とを含む、請求項７に記載の培地。

- [請求項9] 前記CDK8／19阻害剤が、ジエチル(E)－(4－(3－(5－(4－フルオロフェニル)－1－メチル－1H－ピラゾール－4－イル)アクリルアミド)ベンジル)ホスホネート、2－(4－(4－(イソキノリン－4－イル)フェニル)－1H－ピラゾール－1－イル)－N,N－ジメチルアセトアミド、4－((2－(6－(4－メチルピペラジン－1－カルボニル)ナフタレン－2－イル)エチル)アミノ)キナゾリン－6－カルボニトリル、4－(4－(2,3－ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン－6－イル)－1H－ピラゾール－3－イル)ベンゼン－1,3－ジオール、3－(2－(イミダゾ[1,2-b]ピリダジン－6－イルチオ)エチル)－4－(ナフタレン－1－イルスルホニル)－3,4－ジヒドロキノキサリン－2(1H)－オン、及び(E)－3－(4－(1－シクロプロピル－1H－ピラゾール－4－イル)ピリジン－3－イル)－N－(4－(モルホリノメチル)フェニル)アクリルアミドからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、請求項8に記載の培地。
- [請求項10] 前記ALK5阻害剤が、4－[4－(1,3－ベンゾジオキソール－5－イル)－5－(2－ピリジニル)－1H－イミダゾール－2－イル]－ベンズアミド、6－[2-tert-ブチル－5－(6－メチルピリジン－2－イル)－1H－イミダゾール－4－イル]キノキサリン、3－[[5－(6－メチル－2－ピリジニル)－4－(6－キノキサリニル)－1H－イミダゾール－2－イル]メチル]ベンズアミド、2－フルオロ－N－[[5－(6－メチルピリジン－2－イル)－4－([1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリジン－6－イル)－1H－イミダゾール－2－イル]メチル]アニリンからなる群より選択される一又は複数の化合物又はその塩である、請求項8に記載の培地。
- [請求項11] 前記CDK8／19阻害剤が、4－((2－(6－(4－メチルピペラジン－1－カルボニル)ナフタレン－2－イル)エチル)アミノ

）キナゾリン-6-カルボニトリルもしくは2-（4-（4-（イソキノリン-4-イル）フェニル）-1H-ピラゾール-1-イル）-N，N-ジメチルアセトアミド又はその塩であり、前記ALK5阻害剤が、4-〔4-（1，3-ベンゾジオキサール-5-イル）-5-（2-ピリジニル）-1H-イミダゾール-2-イル〕-ベンズアミド又はその塩である、請求項8に記載の培地。

[請求項12] 前記前駆細胞集団、又はそれ以降の分化段階にある細胞集団が、多能性幹細胞を分化誘導して製造されたものである、請求項7に記載の培地。