

明 細 書

発明の名称：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産生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内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物で処理することを特徴とする、インスリン産生細胞集団の製造方法に関する。

[0002] [発明の背景]

i P S細胞やE S細胞などの多能性幹細胞から、インスリン産生細胞や膵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産生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産生細胞集団には、インスリン産生細胞等の目的細胞以外にも、様々な細胞が含まれている。インスリン産生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、目的外細胞の混入を低減することが可能な新たなインスリン産生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 8 5 - 1 9 7

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、多能性幹細胞からインスリン産生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

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、多能性幹細胞から分化誘導して得られたインスリン産生細胞集団を、基礎培地を用いた延長培養に付すことによって、当該細胞集団中に僅かに残存する目的外細胞（増殖性の非内分泌系細胞）でも、高感度に検出できることを見出した。

[0007] また、本発明者らは、多能性幹細胞からインスリン産生細胞集団を誘導する過程において、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団をチューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物（以下、「微小管阻害剤」と記載する場合がある）を含む培地中で培養することによって、得られるインスリン産生細胞集団中に存在する前記目的外細胞を低減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] インスリン産生細胞集団を製造する方法であって、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を処理対象とし、チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物を含む培地中で培養することを含む、方法。

[2] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物が、タキソイド系抗がん剤より選択される化合物又はその薬理学的に許容される塩である、[1]の方法。

[3] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物が、ドセタキセル又はその薬理学的に許容される塩である、[1]又は[2]の方法。

[4] 製造されたインスリン産生細胞集団が、CHGA陽性細胞を95%以上含む、[1]～[3]のいずれかの方法。

[5] 製造されたインスリン産生細胞集団が、CHGA陰性かつKi67陽性細胞を0.1%以下含む、[1]～[3]のいずれかの方法。

[6] 処理対象である膵内分泌前駆細胞集団及び／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〕～〔５〕のいずれかの方法。

〔７〕 チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物を含む、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の培養培地。

〔８〕 チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物が、タキソイド系抗がん剤より選択される化合物又はその薬理学的に許容される塩である、〔７〕の培養培地。

〔９〕 チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物が、ドセタキセル又はその薬理学的に許容される塩である、〔７〕又は〔８〕の培養培地。

〔１０〕 CHGA陽性細胞の割合を増大させるため、ならびに／あるいは、インスリン陽性かつNKX6.1陽性細胞の割合を増大させるために使用される、〔７〕～〔９〕のいずれかの培養培地。

〔１０－１〕 インスリン産生細胞集団を増殖因子を含む培地中で培養することを含む、前記インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出する方法。

〔１０－２〕 インスリン産生細胞集団を上皮成長因子（Epidermal Growth Factor；EGF）又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を含む培地中で培養することを含む、前記インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出する方法。

〔１１〕 インスリン産生細胞集団を上皮成長因子（EGF）を含む培地中で培養することを含む、前記インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出する方法。

〔１２〕 非内分泌系細胞が、CHGA陰性かつPDX1陽性細胞及び／又はCHGA陰性かつPDX1陰性細胞である、〔１１〕の方法。

〔１３〕 非内分泌系細胞を除去する方法であって、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を処理

対象とし、チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物を含む培地中で培養することを含む、方法。

[13-1] インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出するために使用される、増殖因子を含むインスリン産生細胞集団の培養培地。

[13-2] インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出するために使用される、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) 又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を含むインスリン産生細胞集団の培養培地。

[14] インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出するために使用される、EGFを含むインスリン産生細胞集団の培養培地。

本明細書は本願の優先権の基礎である2021年2月9日に出願された日本国特許出願2021-019120号の明細書等に記載される内容を含む。

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いれるものとする。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、多能性幹細胞からインスリン産生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。本発明によれば、目的外細胞の混入が低減されたインスリン産生細胞集団を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、上皮成長因子 (EGF) を含む基礎培地で延長培養したインスリン産生細胞集団におけるマーカータンパク質 (PDX1 及びCHGA) の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

[図2]図2は、Cisplatin又はDocetaxelで処理して得られたインスリン産生細胞集団を、EGFを含む基礎培地で延長培養した後、当該各細胞集団におけるマーカータンパク質 (PDX1 及びCHGA) の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果、ならびに延長培養後の当該各細胞集団の写真図を示す。control細胞集団は、Cisplatin

及びDocetaxelのいずれも用いずに得られたインスリン産生細胞集団であり、同様に延長培養した。

[図3]図3は、Cisplatin又はDocetaxelで処理して得られたインスリン産生細胞集団を、EGFを含む基礎培地で延長培養した後、当該各細胞集団におけるマーカータンパク質（PDX1及びKi67）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。control細胞集団は、Cisplatin及びDocetaxelのいずれも用いずに得られたインスリン産生細胞集団であり、同様に延長培養した。

[図4]図4は、Docetaxelで処理して得られたインスリン産生細胞集団におけるマーカータンパク質（INS及びNKX6.1、ならびに、CHGA及びKi67）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。control細胞集団は、Docetaxelを用いずに得られたインスリン産生細胞集団である。

[図5]図5は、（A）工程6）開始後7日目にて得られた細胞集団におけるマーカータンパク質（NKX6.1、C-ペプチド（インスリン）、PDX1、CHGA）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果、ならびに、（B）工程6）開始後4日目から7日間、又は工程6）開始後7日目から4日間、Docetaxelで処理して得られたインスリン産生細胞集団を、EGFを含む基礎培地で延長培養した後、当該各細胞集団におけるマーカータンパク質（PDX1及びCHGA）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。controlの細胞集団は、Docetaxelを用いずに得られたインスリン産生細胞集団であり、同様に延長培養した。

[図6]図6は、Docetaxelで処理して得られたインスリン産生細胞集団（Docetaxel（+））又はDocetaxelを添加せず作製したインスリン産生細胞集団（Docetaxel（-））が皮下移植された、インスリン欠乏性の糖尿病を誘発させた免疫不全NOD/SCIDマウスにおける血漿中のヒトC-ペプチド濃度（A）、ならびに、移植6か月後の時点で摘出された当該移植片の重量（B）の測定結果を示す。

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

フィーダー細胞は、放射線照射又はマイトマイシンC処理などによって不活性化することができる。

[0017] 本明細書において、「接着」とは、細胞が容器に付着していること、例えば、細胞が適切な培地の存在下で滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）の細胞培養ディッシュ又はフラスコに付着していることを指す。細胞のなかには、細胞培養容器に接着させなければ培養物中で維持できない、あるいは成長しないものもある。これに対し、非接着性細胞は、容器に接着させることなく培養物中で維持され、増殖できる。

[0018] 本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、成長させ、かつ／又は分化させることを指す。「培養する」とは、組織又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を持続させ、増殖させ、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、「CDK8／19阻害活性を有する因子」とは、CDK8／19の阻害活性を有するあらゆる物質を意味する。同じCDKファミリーの他のタンパク質とは対照的に、CDK8は、細胞増殖には必要とされず、CDK8の阻害は、通常の条件下では大きな効果はない。CDK19とCDK8は類似しており、CDK8の阻害は通常CDK19の阻害も伴う。本発明において、CDK8／19阻害活性を有する因子は、従来公知のものを使用することができ、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）が挙げられる。より具体的には、CDK8／19阻害活性を有する因子としては、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、（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、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、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、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、3－（3－（ベンジルオキシ）フェニル）－1H－ピロロ[2，3－b]ピリジン、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、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、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-カルボキサミド又はそれらの塩等が挙げられる。

[0026] CDK8/19阻害活性を有する因子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。CDK8/19阻害活性を有する因子又は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。

[0027] 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- γ など)及び幹細胞に対する効果を有する他のサイトカイン、例えば、幹細胞因子(SCF)及びエリスロポエチン(Epo)が挙げられる。

[0028] 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)、Fa

s u d i l (H A 1 0 7 7)、(2 S) - 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 - 1 H - 1, 4 - ジアゼピン (H - 1 1 5 2)、4 β - [(1 R) - 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 (W f - 5 3 6)、N - (1 H - ピロロ [2, 3 - b] ピリジン - 4 - イル) - 4 P E R (R) - 1 - アミノエチル] シクロヘキサノ - 1 α - カルボアミド (Y - 3 0 1 4 1)、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 - 1 H - 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 (G S K 2 6 9 9 6 2 A)、N - (6 - フルオロ - 1 H - 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 - 1 H - ピリジン - 5 - カルボキサミド (G S K 4 2 9 2 8 6 A) を挙げることができる。R O C K 阻害剤はこれらに限定されるものではなく、R O C K の m R N A 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、R O C K に結合する抗体、ドミナントネガティブ R O C K 変異体等も R O C K 阻害剤として使用することができる。R O C K 阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0029] 本明細書において、「G S K 3 β 阻害剤」とは、G S K 3 β (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β) に対する阻害活性を有する物質である。G S K 3 (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。G S K 3 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「G S K 3 β 阻害剤」は、G S K 3 β 阻害活性を有すれば特に限定されず、G S K 3 β 阻害活性と合わせて G S K 3 α 阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。

[0030] G S K 3 β 阻害剤としては、C H I R 9 8 0 1 4 (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(Azakempaulone)、SB216763(3-(2, 4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン)、SB415286(3-[3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル]アミノ]-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン)及びAR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO-アセトキシム、ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム複合体、OTDZT、アルファ-4-ジブromoアセトフェノン、リチウム等が例示される。GSK3 β 阻害剤はこれらに限定されるものではなく、GSK3 β のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、GSK3 β に結合する抗体、ドミナントネガティブGSK3 β 変異体等もGSK3 β 阻害剤として使用することができる。GSK3 β 阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0031] 本明細書において、「FGFR1阻害剤」とは、少なくとも線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)1に対する阻害活性を有する物質である。FGFR1は、成長因子であるFGF1~FGF17に対して高い親和性を有する受容体として、4回膜貫通型チロシンキナーゼのファミリー(FGFR1, 2, 3, 4)のメンバーである。本明細書において、「FGFR1阻害剤」

とは、少なくともFGFR1阻害活性を有していればよく、他のFGFRに対する阻害活性を有していてもよい。例えば、本明細書において、「FGFR1阻害剤」とはFGFR1阻害活性を有する限り、FGFR2阻害剤、FGFR3阻害剤、FGFR4阻害剤等であってもよい。本発明において、FGFR1阻害剤は、従来公知のものを使用することができる。より具体的には、FGFR1阻害剤としては、PD-166866 (1-[2-アミノ-6-(3,5-ジメトキシフェニル)-ピリド(2,3-d)ピリミジン-7-イル]-3-tert-ブチルウレア: CAS No. : 192705-79-6)、E-3810 (CAS No. : 1058137-23-7)、PD-173074 (CAS No. : 219580-11-7)、FGFR4-IN-1 (CAS No. : 1708971-72-5)、FGFR-IN-1 (CAS No. : 1448169-71-8)、FIIN-2 (CAS No. : 1633044-56-0)、AZD4547 (CAS No. : 1035270-39-3)、FIIN-3 (CAS No. : 1637735-84-2)、NVP-BGJ398 (CAS No. : 1310746-10-1)、NVP-BGJ398 (CAS No. : 872511-34-7)、CH5183284 (CAS No. : 1265229-25-1)、Derazantinib (CAS No. : 1234356-69-4)、Derazantinib Racemate、Ferulic acid (CAS No. : 1135-24-6)、SSR128129E (CAS No. : 848318-25-2)、SSR128129E free acid (CAS No. : 848463-13-8)、Erdafitinib (CAS No. : 1346242-81-6)、BLU9931 (CAS No. : 1538604-68-0)、PRN1371 (CAS No. : 1802929-43-6)、S49076 (CAS No. : 1265965-22-7)、LY2874455 (CAS No. : 1254473-64-7)、Linsitinib (CAS No. : 867160-71-2)、Dovitinib (CAS

No. : 405169-16-6)、Anlotinib (CAS No. : 1058156-90-3)、Brivanib (CAS No. : 649735-46-6)、Derazantinib (CAS No. : 1234356-69-4)、Anlotinib Dihydrochloride (CAS No. : 1360460-82-7)、ACTB-1003 (CAS No. : 939805-30-8)、BLU-554 (CAS No. : 1707289-21-1)、Rogaratinib (CAS No. : 1443530-05-9)、BIBF 1120 esylate (CAS No. : 656247-18-6)、TG 100572 Hydrochloride (CAS No. : 867331-64-4)、ENMD-2076 (CAS No. : 934353-76-1)、Brivanib alaninate (CAS No. : 649735-63-7)、TG 100572 (CAS No. : 867334-05-2)、BIBF 1120 (CAS No. : 656247-17-5)、ENMD-2076 Tartrate (CAS No. : 1291074-87-7)、TSU-68 (CAS No. : 252916-29-3)、Ponatinib (CAS No. : 943319-70-8)、Sulfatinib (CAS No. : 1308672-74-3)、LY2784544 (CAS No. : 1229236-86-5)、Dovitinib lactate (CAS No. : 692737-80-7)、SU 5402 (CAS No. : 215543-92-3)、FGF-401 (CAS No. : 1708971-55-4)、Tyrosine kinase-IN-1 (CAS No. : 705946-27-6)、PP58 (CAS No. : 212391-58-7)、TG 100801 Hydrochloride (CAS No. : 1018069-81-2)、Crenolanib (CAS No. : 670220-88-9)、TG 100801 (CAS No. : 867331-82-6)、Pazopanib Hydrochloride (CAS No. : 63570

2-64-6)、Pazopanib (CAS No. : 444731-52-6)、PD168393 (CAS No. : 194423-15-9)、Apatinib (CAS No. : 1218779-75-9)、Palbociclib isethionate (CAS No. : 827022-33-3)、Foretinib (CAS No. : 849217-64-7)、Lenvatinib (CAS No. : 417716-92-8)、Tandutinib (CAS No. : 387867-13-2)、等又はそれらの塩が例示される。

[0032] FGF R1 阻害剤は上記に示した化合物に限定されるものではなく、FGFR1 の mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA、FGFR1 に結合する抗体、ドミナントネガティブ FGF R1 変異体等も FGF R1 阻害剤として使用することができる。FGFR1 阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0033] 本明細書において「血清代替物」とは、例えば、KnockOut™ 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。

[0034] 2. インスリン産生細胞集団の製造方法、及びそれによって製造されたインスリン産生細胞集団

本発明は、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団をインスリン産生細胞集団に分化誘導する工程において、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を微小管阻害剤で処理することを含む、インスリン産生細胞集団を製造する方法、ならびにそれによって作製されたインスリン産生細胞集団を提供する。

[0035] 本発明において、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団をインスリン産生細胞集団に分化誘導する工程において、微小管阻害剤は膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団に作用して、内在する非内分泌系細胞が低減されたインスリン産生細胞集団を生じる。

[0036] 本発明において、「多能性 (pluripotency)」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、3胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性 (pluripotency)」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる「全能性 (totipotency)」とは区別される。

[0037] 本発明において「多能性 (multipotency)」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞はmultipotentだが、pluripotentではない。

[0038] 本発明において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、胚性幹細胞 (ES細胞) 及びこれと同様の分化多能性、すなわち生体の様々な組織 (内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て) に分化する能力を潜在的に有する細胞を指す。ES細胞と同様の分化多能性を有する細胞としては、「人工多能性幹細胞」 (本明細書中、「iPS細胞」と称することもある) が挙げられる。好ましくは、本発明において、多能性幹細胞とはヒト多能性幹細胞である。

[0039] 「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、i n G e n i o u s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、C e l l a r t i s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、W i C e l l R e s e a r c h I n s t i t u t eのH1株、H9株、理研のKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。

[0040] 「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にO c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4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（T a k a h a s h i K, Y a m a n a k a S., C e l l, (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（T a k a h a s h i K, Y a m a n a k a S., e t a l. C e l l, (2007) 131: 861-872.）、上記4因子導入後、N a n o gの発現を指標として選別し、樹立したN a n o g-iPS細胞（O k i t a, K., I c h i s a k a, T., a n d Y a m a n a k a, S. (2007). N a t u r e 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞（N a k a g a w a M, Y a m a n a k a S., e t a l. N a t u r e B i o t e c h n o l o g y, (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（O k i t a K e t a l. N a t. M e t h o d s 2011 M a y ; 8 (5) : 409-12, O k i t a K e t a l. S t e m C e l l s. 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 J.A., 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 I.H., Daley G.Q. et al., Nature (2007) 451:141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞(特開2008-307007号)等も用いることができる。

[0041] このほか、公開されているすべての論文(例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol.3, Issue 5, 568-574; Kim J.B., Scholer H.R., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, D.A., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No. 7, 795-797)、あるいは特許(例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008/2336610、US2009/047263、WO2007/069666、WO2008/118220、WO2008/124133、WO2008/151058、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852)に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0042] 人工多能性細胞株としては、NIH、理化学研究所(理研)、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学のFf-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJ-I01s01株、QHJ-I01s04株、QHJ-I

14s03株、QHJ114s04株253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、CD1社のMyCell iPS Cells (21525.102.10A)株、MyCell iPS Cells (21526.101.10A)株、等が挙げられる。

[0043] 本発明において「膵内分泌前駆細胞集団」とは、膵内分泌前駆細胞を含む細胞集団を意味する。本発明において、膵内分泌前駆細胞は、クロモグラニンA (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。膵内分泌前駆細胞は、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。

[0044] 一実施形態において、本発明における「膵内分泌前駆細胞集団」は、下記に詳述する多能性幹細胞をインスリン産生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。

[0045] 本発明における「膵内分泌前駆細胞集団」には、膵内分泌前駆細胞が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。当該割合の上限は特に限定されないが、90%以下、80%以下、70%以下、又は60%以下である。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は30%～90%、好ましくは40%～80%、より好ましくは50%～80%、さらに好ましくは60%～70%である。膵内分泌前駆細胞集団には、膵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、インスリン産生細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0046] 本発明において「それ以降の分化段階にある細胞集団」とは、膵内分泌前駆細胞よりも分化段階が進んだ細胞を、膵内分泌前駆細胞集団よりも多く含

む細胞集団を意味する。「膵内分泌前駆細胞よりも分化段階が進んだ細胞」としては、インスリン産生細胞が挙げられる。本発明において、インスリン産生細胞は、インスリン及びNKX6.1の少なくとも一つのマーカーの発現、好ましくはインスリン及びNKX6.1の両マーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。インスリン産生細胞は好ましくは、NGN3の発現量が膵内分泌前駆細胞にて確認される最大発現時の3分の1未満の割合である。

[0047] 本発明における「それ以降の分化段階にある細胞集団」には、インスリン産生細胞が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。当該割合の上限は特に限定されないが、90%以下、80%以下、70%以下、又は60%以下である。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は30%～90%、好ましくは40%～80%、より好ましくは50%～80%、さらに好ましくは60%～70%である。「それ以降の分化段階にある細胞集団」には、インスリン産生細胞に加えて、その他の細胞（例えば、膵内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0048] 一実施形態において、本発明における「それ以降の分化段階にある細胞集団」は、下記に詳述する多能性幹細胞をインスリン産生細胞へと分化誘導する工程において、工程6)終了までの3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、又はそれ以上の期間の培養物、あるいは工程6)終了後の培養物の細胞集団に該当する。

[0049] 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。

[0050] 多能性幹細胞からインスリン産生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、WO2016/021734)。例えば、この分化段階は比較的未分化な順に、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、腭前駆細胞、腭内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞に大きく分類することができる。

[0051] 腭内分泌前駆細胞集団は、多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、腭前駆細胞、腭内分泌前駆細胞、及びインスリン産生細胞へと分化誘導する、以下の公知の分化誘導工程を利用して得ることができる：

- 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) 腭前駆細胞から腭内分泌前駆細胞へと分化誘導する；
- 工程6) 腭内分泌前駆細胞からインスリン産生細胞へと分化誘導する。

以下、各工程を説明するが、各細胞への分化誘導はこれらの手法に限定されない。

[0052] 工程1) 胚体内胚葉細胞への分化

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

[0053] 本工程で用いる培地としては、RPMI培地、MEM培地、iMEM培地、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）培地、Improved MEM Zinc Option培地、Improved MEM/1%B-27サプリメント/Penisilin Streptomycin培地、MCDB131/10mM Glucose/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/アスコルビン酸/Penisilin Streptomycin培地など、哺乳類細胞の培養に使用される基礎培地を使用することができる。

[0054] アクチビンAは培地中に低用量にて、例えば、5~100ng/mL、好

ましくは $5 \sim 50 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは $5 \sim 10 \text{ ng/mL}$ の量にて含めることができる。

[0055] 別の態様として、アクチビンAの培地中の濃度は、約 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ ng/mL}$ 、より好ましくは約 $3 \sim 10 \text{ ng/mL}$ である。

[0056] 培地にはさらに、ROCK阻害剤、及び／又はGSK3 β 阻害剤を添加することができる。

[0057] GSK3 β 阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常 $2 \sim 5 \mu\text{M}$ 、好ましくは $2 \sim 4 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $3 \mu\text{M}$ である。

[0058] ROCK阻害剤の培地中の濃度は、用いるROCK阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばROCK阻害剤としてY27632を使用する場合の濃度は、通常 $5 \sim 20 \mu\text{M}$ 、好ましくは $5 \sim 15 \mu\text{M}$ 、特に好ましくは約 $10 \mu\text{M}$ である。

[0059] 培地にはさらに、インスリンを添加することができる。インスリンは培地中に $0.01 \sim 20 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $0.5 \sim 5 \mu\text{M}$ の量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したB-27サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0060] 培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、2次元培養であれば、約5万 ~ 100 万細胞個/ cm^2 、好ましくは約10万 ~ 80 万細胞個/ cm^2 、より好ましくは約10 ~ 30 万細胞個/ cm^2 とすることができる。また、培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、3次元培養であれば、約1万 ~ 100 万細胞個/ mL 、好ましくは約10万 ~ 80 万細胞個/ mL 、より好ましくは約30万 ~ 60 万細胞個/ mL とすることができる。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。

[0061] 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。

[0062] あるいは、本発明において胚体内胚葉細胞は、低用量のアクチビンAの存在下、多能性幹細胞を、インスリンが作用する条件下の培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第2の培養を行うことにより製造することができる。

[0063] (1) 第1の培養

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

[0064] インスリンが作用する条件としては、例えば、培地中にインスリンを含む場合が挙げられる。インスリンは、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路を活性化できるものであればよく、組換え法で製造したものであっても、固相合成法で合成して製造したものであってもよい。インスリンは、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット等に由来するものを利用することができるが、好ましくはヒトインスリンである。

[0065] 本発明においては、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる限り、インスリン変異体、インスリン誘導体又はインスリンアゴニストも、「インスリン」として用いることができる。「インスリン変異体」とは、インスリンのアミノ酸配列において1～20個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活

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

[0066] 第1の培養の培地には、インスリンを0.01~20 μ M、好ましくは0.1~10 μ M、より好ましくは0.5~5 μ Mの量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したB-27サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。なお、本明細書中、インスリンを含むB-27サプリメントを「B-27 (INS+)」と記載し、インスリンを含まないB-27サプリメントを「B-27 (INS-)」と記載する場合がある。

[0067] 培地にはさらに、ROCK阻害剤、及び／又はGSK3 β 阻害剤を含めることができる。ROCK阻害剤の培地中の濃度は、用いるROCK阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばROCK阻害剤としてY-2763

2を使用する場合の濃度は、通常5～20 μ M、好ましくは5～15 μ M、特に好ましくは約10 μ Mとすることができる。GSK3 β 阻害剤の培地中の濃度は、用いるGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばGSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を使用する場合の濃度は、通常2～5 μ M、好ましくは2～4 μ M、特に好ましくは約3 μ Mとすることができる。

[0068] 培地にはさらに、ピルビン酸塩（ナトリウム塩等）、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。ピルビン酸塩は培地中に、10～1000 mg/L、好ましくは30～500 mg/L、より好ましくは50～200 mg/L、特に好ましくは約110 mg/Lの量で含めることができる。L-アラニルL-グルタミンは培地中に、50～2000 mg/L、好ましくは100～1500 mg/L、より好ましくは500～1000 mg/L、特に好ましくは約860 mg/Lの量で含めることができる。グルコースは培地中に、15 mM以上、好ましくは15～30 mM、より好ましくは15～25 mM、特に好ましくは約25 mMの量で含めることができる。培地中のピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン及びグルコースの濃度は、DMEM培地（DMEM, high glucose, GlutaMAX™, pyruvate (Thermo Fisher Scientific)）またはその他のDMEM培地に含まれるピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン及びグルコースの濃度であってもよいが、これに限定されない。

[0069] 培地は、上記基礎培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものをを用いることができる。基礎培地としては、好ましくはDMEM培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むDMEM培地である。

[0070] 第1の培養の培養期間は6時間～48時間、好ましくは12～24時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃

度は例えば5%程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、2次元培養であれば、約5万～100万細胞個/cm²、好ましくは約10万～80万細胞個/cm²、より好ましくは約10～30万細胞個/cm²とすることができる。また、培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、3次元培養であれば、約1万～100万細胞個/mL、好ましくは約10万～80万細胞個/mL、より好ましくは約30万～60万細胞個/mLとすることができる。

[0071] (2) 第2の培養

「インスリンが作用しない条件」とは、インスリンによる細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない条件を意味する。「細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じない」とは、当該インスリンシグナル伝達経路の活性化が全く生じないことを意味するだけでなく、インスリン非存在下における当該インスリンシグナル伝達経路の活性化と比べて有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない場合も意味するものである。したがって、「インスリンが作用しない条件」とは、例えば、培地中にインスリンが含まれないこと、あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、その量が前記有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない量で含まれる条件が挙げられる。あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、一緒にインスリンシグナル阻害剤を含むことによって、前記インスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない場合も意味する。「インスリンシグナル阻害剤」は、インスリンシグナル伝達経路をいずれかの位置で遮断することが可能な成分を意味する。このようなインスリンシグナル阻害剤としては、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質等に結合して又は競合し、これら因子が関与する分子間の相互作用を阻害するポリペプチドや化合物等が挙げられる。例えば、このようなインスリンシグナル阻害剤としては、P13キナーゼの触媒サブユニットへのATP結合を競合阻害するLY294002 [2-(4-モルホリニル)-8-フェニル-4H-1-ベンゾピ

ランー４－オン]等が挙げられる。インスリンシグナル阻害剤はこれらに限定されるものではなく、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質に結合する抗体やそれらのドミナントネガティブ型変異体、ならびにインスリンレセプターやシグナル伝達物質として作用する各種タンパク質のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA等もインスリンシグナル阻害剤として使用することができる。インスリンシグナル阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

[0072] 培地にはさらに、ROCK阻害剤、及び／又はGSK3 β 阻害剤を含めることができる。培地中のROCK阻害剤、及び／又はGSK3 β 阻害剤の量は上記第1の培養において記載した範囲より選択することができ、第1の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0073] 培地にはさらに、ピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。培地中のピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースの量は上記第1の培養において記載した範囲より選択することができ、第1の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0074] 第2の培養で用いる培地は、哺乳類細胞の培養に使用される基礎培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものをを用いることができる。基礎培地としては、上記第1の培養において記載したものをを用いることができ、第1の培養にて用いられるものと同じ基礎培地であってもよいし、異なってもよい。好ましくは、DMEM培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、L-アラニルL-グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むDMEM培地である。

[0075] 第2の培養の培養期間は少なくとも6時間、好ましくは6～72時間、さらに好ましくは24時間～72時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。また、培養

容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度である。

[0076] 第1の培養及び第2の培養の培地には、アクチビンAを上記低用量にて含めることができる。第1の培養及び第2の培養の培地に含まれるアクチビンAの量は同じ量であってもよいし、異なってもよい。

[0077] 第1の培養及び第2の培養の培地にはさらに、ジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0078] 多能性幹細胞を、低用量のアクチビンAの存在下にて培養を行うことによって、あるいは、多能性幹細胞を、低用量のアクチビンAの存在下、インスリンが作用する条件下の培地中で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第2の培養を行うことによって、工程6)以降にて、得られる内分泌細胞の割合を高めることができる。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 培地は、上記工程1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基礎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。

[0082] 増殖因子としては、EGF、KGF、及び／又は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。

[0083] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 μM、好ましくは約0.1 nM～100 μMである。EGFの場合、その濃度は、約5～2000 ng/mL（すなわち、約0.8～320 nM）、好ましくは約5～1000 ng/mL（すなわち、約0.8～160 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/

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

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 培地は、上記工程1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基礎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。

[0087] 増殖因子としては、EGF、KGF、及び／又は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。

[0088] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 μM、好ましくは約0.1 nM～100 μMである。EGFの場合、その濃度は、約5～2000 ng/mL（すなわち、約0.8～320 nM）、好ましくは約5～1000 ng/mL（すなわち、約0.8～160 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約1.6～160 nM）である。FGF10の場合、その濃度は、約5～2000 ng/mL（すなわち、約0.3～116 nM）、好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約0.6～58 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約0.6～58

nM)である。例えば増殖因子としてKGFを使用する場合の濃度は、通常5～150 ng/mL、好ましくは30～100 ng/mL、特に好ましくは約50 ng/mLである。

[0089] 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 μ M、好ましくは0.3～1.0 μ M、特に好ましくは約0.5 μ Mである。

[0090] 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10～200 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。

また培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0091] 工程4) 臍前駆細胞への分化

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、臍前駆細胞に分化誘導してもよい。培養期間は2日～10日、好ましくは約5日程度である。培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。2次元培養の場合には、工程3) で得られた後方前腸細胞を、既報(Toyoda et al., Stem cell Research (2015) 14, 185-197)に従い、0.25%トリプシン-EDTAで処理後にピペティングすることにより分散させ、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を工程4) の新しい培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を新しい2次元培養容器に再播種する。

[0092] 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礎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。

[0093] 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。

[0094] 増殖因子としては、EGF、KGF、及び／又は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。

[0095] 増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約0.1 nM～1000 µM、好ましくは約0.1 nM～100 µMである。EGFの場合、その濃度は、約5～2000 ng/mL（すなわち、約0.8～320 nM）、好ましくは約5～1000 ng/mL（すなわち、約0.8～160 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約1.6～160 nM）である。FGF10の場合、その濃度は、約5～2000 ng/mL（すなわち、約0.3～116 nM）、好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約0.6～58 nM）、より好ましくは約10～1000 ng/mL（すなわち、約0.6～58 nM）である。例えば増殖因子としてKGF及びEGFを使用する場合の濃度は、EGF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、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。

[0096] 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。

[0097] また、培地にはPKC活性化剤を含めても良い。PKC活性化剤としては、Pdbu (PKC activator II)、TPB (PKC activator V) などを使用するが、その限りでない。PKC活性化剤の濃度は約0.1～100 ng/mL、好ましくは約1～50 ng/mL、より好ましくは約3～10 ng/mLで添加する。

[0098] 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。

[0099] いずれの工程においても、培地には、上記した成分のほか、血清代替物（例えば、B-27サプリメント、ITS-G）を添加してもよい。また、必要に応じて、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX（製品名）、非必須アミノ酸、ビタミン、ニコチンアミド、抗生物質（例えば、Antibiotic-Antimycotic（本明細書中、AAと称することがある）、ペニシリン、ストレプトマイシン、又はこれらの混合物）、抗菌剤（例えば、アンホテリシンB）、抗酸化剤、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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 工程5）膵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膵内分泌前駆細胞に分化誘導する。培養は２次元培養及び３次元培養のいずれで行ってもよい。２次元培養の場合には、工程４）で得られた膵前駆細胞を、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡで処理後にピペッティングすることにより分散させ、得られた分散液を遠心分離に付し、回収した細胞を工程５）の新しい培地に再懸濁し、その細胞懸濁液を新しい２次元培養容器に再播種する。培養期間は２日～３日、好ましくは約２日である。

[0104] 培地は、上記工程１）にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基礎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１、T3、LDNを添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF（好ましくはFGF2）、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。また、培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 工程５）で得られた膵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。

[0108] 工程６）インスリン産生細胞への分化

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

- [0109] 培地は、上記工程1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基礎培地を用いることができる。培地には、既報 (Nature Biotechnology 2014 ; 32 : 1121-1133) に従い、ALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤XX、 γ -secretase阻害剤RO、N-システイン、AXLインヒビター、アスコルビン酸を添加し、さらに、Wnt阻害薬、ROCK阻害剤、FGF (好ましくはFGF2)、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。例えば、培地にはALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいはT3、ALK5インヒビターII、 $ZnSO_4$ 、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。
- [0110] 培養は2次元培養及び3次元培養のいずれで行ってもよい。好ましくは、培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート (Nunc社) 等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。
- [0111] 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。
- [0112] 培地には、FGFR1阻害剤を、FGFR1活性を阻害することが可能な任意の量にて含めることができ、例えば、10 μ M以下、又は5 μ M以下の量にて、好ましくは5 μ M未満、4 μ M未満、3 μ M未満、2 μ M未満の量にて含めることができる。FGFR1阻害剤の添加量の下限は、特に限定されないが、0.1 μ M以上、好ましくは0.5 μ M以上とすることができる。FGFR1阻害剤の添加量は、好ましくは、5 μ M未満0.1 μ M以上であり、より好ましくは5 μ M未満0.5 μ M以上である。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、少なくとも12時間、好ましくは24時間以上、2日以上、4日以上、8日以上、10日以上、又は15日以上行うことができる。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、4日以上行うことが好ま

しい。例えば、工程6)の最後の約4～15日、好ましくは最後の約4～7日間について、FGFR1阻害剤の存在下における培養を行うことができる。FGFR1阻害剤による処理期間中も培地の交換は可能であり、培養スケジュールにしたがって、FGFR1阻害剤が添加された交換前と同じ組成を有する培地又は異なる組成を有する培地と交換することができる。

[0113] FGFR1阻害剤を含む培地中で、細胞を培養することによって、得られるインスリン産生細胞におけるK α 6陽性細胞の増殖を抑制することができる。

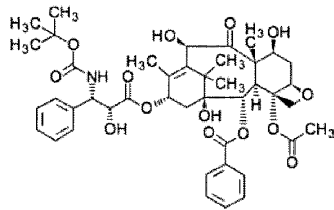
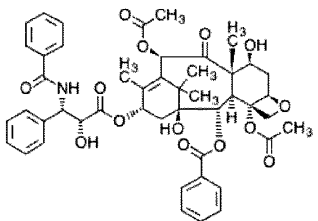
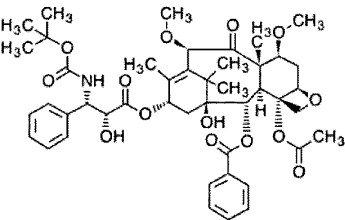
[0114] 工程6)で得られたインスリン産生細胞は、トリプシン等の酵素を用いて解離し回収することができる。回収されたインスリン産生細胞は使用するまで凍結保存することができる。次いで、回収されたインスリン産生細胞を上記培地中に、1培養器または1ウェルあたり、約50万～500万個、好ましくは約100万～400万個、より好ましくは約200万～300万個の量で播種して3次元培養を行い、インスリン産生細胞をスフェロイドの形態で得ることができる。各スフェロイドは約100～約1000個、好ましくは約200～約800個、より好ましくは約300個～約500個程度の細胞からなる。

[0115] 本発明で使用する「チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害性を有する化合物」又は「微小管阻害剤」とは、微小管を形成するチューブリンの重合を促進して微小管を過剰形成・安定化させる活性、及び／又は、微小管を形成するチューブリンの脱重合を抑制する活性を有する化合物を意味する。当該化合物は、当該活性により細胞分裂を阻害する効果を有することが好ましい。なお、本明細書中、用語「チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害性を有する化合物」と「微小管阻害剤」は、相互互換的に用いられる。

[0116] 本発明において利用可能な「チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害性を有する化合物」又は「微小管阻害剤」は、上記活性を有する限り特に限定されないが、例えば、下記化合物又はその薬理学的に許容される

塩や溶媒和物が挙げられる。また、これらの化合物はチューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する限り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。溶媒和物としては、水和物やアセトン付加物等が挙げられるが、これらに限定はされない。

[0117] [表1]

化合物	一般名：化学名	構造
1	Docetaxel: (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,7S,8S,10R,13S)- 4-アセトキシ-2-ベンゾイルオキシ-5,20-エポキシ- 1,7,10-トリヒドロキシ-9-オキソタキサ-11-エン- 13-イル(2R,3S)-3-tert-ブトキシカルボニルアミ ド-2-ヒドロキシ-3-フェニルプロピオネート	
2	Paclitaxel: (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,7S,8S,10R,13S)- 4,10-ジアセトキシ-2-ベンゾイルオキシ-5,20-エ ポキシ-1,7-ジヒドロキシ-9-オキソタキサ-11-エ ン-13-イル(2R,3S)-3-ベンゾイルアミノ-2-ヒド ロキシ-3-フェニルプロピオネート	
3	Cabazitaxel: (1S,2S,3R,4S,5R,7S,8S,10R,13S)-4-アセ トキシ-2-ベンゾイルオキシ-5,20-エポキシ-1-ヒ ドロキシ-7,10-ジメトキシ-9-オキソタキサ-11-エ ン-13-イル(2R,3S)-3-(1,1-ジメチルエチル) オ キシカルボニルアミノ-2-ヒドロキシ-3-フェニルプロ ピオネート	

[0118] 本発明において、「チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物」又は「微小管阻害剤」としては、タキソイド系抗がん剤の有効成分として利用される化合物又はその薬理学的に許容される塩や溶媒和物が好ましく、より好ましくはドセタキセル（Docetaxel）又はその薬理学的に許容される塩や溶媒和物である。

- [0119] 上記の「チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物」又は「微小管阻害剤」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。
- [0120] 本発明において、微小管阻害剤による、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の処理は、当該細胞集団を微小管阻害剤と接触させることにより行うことができる。例えば、微小管阻害剤による処理は、微小管阻害剤を添加した培地で当該細胞集団を培養することにより行うことができる。微小管阻害剤は培地に、最終的に得られるインスリン産生細胞集団に内在する非内分泌系細胞を低減することが可能な任意の量にて含めることができ、例えば、 $10\text{ }\mu\text{M}$ 、 $5\text{ }\mu\text{M}$ 、 $4\text{ }\mu\text{M}$ 、 $3\text{ }\mu\text{M}$ 、 $2\text{ }\mu\text{M}$ 、又はそれ以下の量にて含めることができる。微小管阻害剤の培地への添加量の下限は、特に限定されないが、 0 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.2\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.3\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.4\text{ }\mu\text{M}$ 又、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、又はそれ以上とすることができる。微小管阻害剤の培地への添加量の範囲は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、 $0.1\text{ }\mu\text{M}\sim 10\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{M}\sim 5\text{ }\mu\text{M}$ 、より好ましくは $1\text{ }\mu\text{M}\sim 3\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0121] また、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の微小管阻害剤の存在下における培養は、最終的に得られるインスリン産生細胞集団に内在する非内分泌系細胞を低減することが可能な任意の期間行うことができ、例えば、少なくとも12時間、好ましくは24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、10日間、11日間、12日間、15日間、又はそれ以上行うことができる。好ましくは、微小管阻害剤の存在下における膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の培養期間は、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間又、8日間、又はそれ以上である。微小管阻害剤による処理期間中も培地の交換は可能であり、培養スケジュールにしたがって、微小管阻害剤が添加された交換前と同じ組成を有する培地又は異なる組成を有する培地と交換す

ることができる。培地は、上記哺乳類細胞の培養に使用される基礎培地、又は上記インスリン産生細胞への分化誘導培地を用いることができる。

[0122] 本発明において、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団は、微小管阻害剤で処理すると共に、インスリン産生細胞へと分化させる工程に付すことができる。ここで「微小管阻害剤で処理すると共に」とは、微小管阻害剤で処理する工程と分化させる工程とを同時に行う場合、微小管阻害剤で処理した後に分化させる工程に付す場合、ならびに、分化させる工程に付した後に微小管阻害剤で処理する工程に付す場合も含む。したがって、微小管阻害剤で処理するのに用いる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微小管阻害剤がさらに添加されてもよい。

[0123] 本発明の一実施形態において、微小管阻害剤は、多能性幹細胞からインスリン産生細胞を分化誘導する工程において、上記工程 6 の培地に含めて、細胞に作用させる。好ましくは、工程 6 終了までの 3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、又はそれ以上の期間にわたって、微小管阻害剤を工程 6 の培地に含めて、細胞に作用させる。

[0124] 本発明の別の実施形態において、微小管阻害剤は、多能性幹細胞からインスリン産生細胞を分化誘導する工程において、上記工程 6 終了後の細胞に培地に含めて作用させてもよい。培地は、上記工程 1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基礎培地を用いることができる。培地には、ALK5 インヒビター I I、T 3、LDN、 γ -secretase 阻害剤 X X、 γ -secretase 阻害剤 R O、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 FGF 2）、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 I I、T 3、LDN、 γ -secretase 阻害剤 R O、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいは T 3、ALK5 インヒビター I I、ZnSO₄、ヘパリン、N

ーアセチルシステイン、Trolox、及びR428を添加してもよい。好ましくは、工程6終了後、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、又はそれ以上の期間にわたって、微小管阻害剤を上記培地に含めて、細胞に作用させる。

[0125] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、インスリン産生細胞、好ましくはインスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞の割合は、従来法（例えば、上記工程1）～6）やNature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133等）により作製されたインスリン産生細胞集団におけるその割合と比べて5%以上、好ましくは10%以上高いものである。より詳細には、本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、インスリン産生細胞、より詳細には、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞の割合は、35%以上、好ましくは36%以上、より好ましくは37%以上、さらに好ましくは38%以上、よりさらに好ましくは39%以上、特に好ましくは40%以上、とりわけ好ましくは41%以上である。当該割合の上限は特に限定されないが、70%以下、60%以下、又は50%以下である。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は35%～50%、好ましくは36%～50%、より好ましくは37%～50%、さらに好ましくは38%～50%、よりさらに好ましくは39%～50%、特に好ましくは40%～50%、とりわけ好ましくは41%～50%である。

[0126] また、本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、クロモグラニンA（CHGA）陽性の内分泌系細胞の割合は、従来法（例えば、上記工程1）～6）やNature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133等）により作製されたインスリン産生細胞集団におけるその割合と比べて3%以上、好ましくは4%以上、より好ましくは5%以上高いものである。より詳細には、本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、クロモグラニンA（CHGA）陽性、例えばCHGA陽性かつPDX1陽性、の内分泌系細胞の割合は、95%以上、好ましくは

96%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上である。当該割合の上限は特に限定されないが、99%以下である。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は95%～99%、好ましくは96%～99%、より好ましくは97%～99%、さらに好ましくは98%～99%である。

[0127] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団には、上記インスリン産生細胞や内分泌細胞に加えて、その他の細胞（例えば、膵内分泌前駆細胞；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ーを発現する他の膵ホルモン産生細胞；Ki67陽性細胞；CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0128] また、本発明方法により得られたインスリン産生細胞集団は、従来法（例えば、上記工程1）～6）やNature Biotechnology 2014；32：1121－1133等）により作製されたインスリン産生細胞集団と比べて、内在する非内分泌系細胞が低減、好ましくは除去されたインスリン産生細胞集団である。ここで「非内分泌系細胞」とは、クロモグラニンA（CHGA）陰性のマーカー発現様式により特徴付けられる細胞である。非内分泌系細胞はさらに、PDX1陰性、及び／又はKi67陽性により特徴付けることができる。好ましくは、「非内分泌系細胞」は、CHGA陰性かつPDX1陽性細胞、CHGA陰性かつPDX1陰性細胞、及び／又は、CHGA陰性かつKi67陽性細胞である。

[0129] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、非内分泌系細胞の割合は、従来法（例えば、上記工程1）～6）やNature Biotechnology 2014；32：1121－1133等）により作製されたインスリン産生細胞集団におけるその割合と比べて2%以上、3%以上、4%以上、又は5%以上、低いものである。より詳細には、本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、非内分泌系細胞の割合は、5%以下、好ましくは4%以下、より好ましくは3%以下、さらに好ましくは

2%以下、よりさらに好ましくは1%以下、特に好ましくは0.5%以下である。当該割合の下限は特に限定されないが、例えば、0%以上、0.01%以上、又は0.05%以上である。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は0%~5%、好ましくは0.01%~4%、より好ましくは0.01%~3%、さらに好ましくは0.01%~2%、よりさらに好ましくは0.01%~1%、特に好ましくは0.01%~0.5%である。より詳細には、本発明により得られたインスリン産生細胞集団における、CHGA陰性かつKi67陽性細胞の割合は、0.1%以下、好ましくは0.05%以下であり、当該割合の下限は特に限定されないが、例えば、0%以上、0.01%以上ある。当該割合は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該割合は0%~0.1%、又は0.01%~0.1%である。

[0130] 本発明はまた、多能性幹細胞から分化誘導して得られたインスリン産生細胞集団中に存在する非内分泌系細胞を検出する方法を提供する。

[0131] 本発明において、インスリン産生細胞集団中に存在する非内分泌系細胞は、インスリン産生細胞集団をさらなる培養（本明細書中、「延長培養」と記載する場合がある）に付すことにより増殖させ、検出を容易にすることができる。延長培養は、上記哺乳類細胞の培養に使用される基礎培地を用いて行うことができ、好ましくは、MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penicillin Streptomycin培地を基礎培地として使用する。

[0132] 好ましくは、延長培養の培地はさらに、上皮成長因子（Epidermal Growth Factor; EGF）又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を含む。EGFと「同等もしくは類似の活性を有する物質」としては、EGFのシグナル伝達経路を活性化し得る物質（例えば、Betacellulin等）や、EGFと類似の機能を有する増殖因子（例えば、線維芽細胞増殖因子（FGF; Fibroblast Growth

Factor)、血小板由来増殖因子(PDGF; Platelet-Derived Growth Factor)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor)等)が挙げられるが、これらに限定はされない。EGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質は培地中に、非内分泌系細胞が増殖するのに十分な任意の量で含めることができる。例えば、EGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質は培地中に、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、又はそれ以上の範囲より選択される量にて含めることができ、その上限は特に限定されないが、250 ng/mL、200 ng/mL、150 ng/mL、100 ng/mL、又はそれ以下の範囲より選択される量とすることができる。当該含有量は前記上限及び下限の数値よりそれぞれ選択される2つの数値を用いて表すことができ、例えば、当該含有量は50 ng/mL~250 ng/mL、50 ng/mL~200 ng/mL、50 ng/mL~150 ng/mL、又は50 ng/mL~100 ng/mLの範囲より選択される量である。

[0133] 延長培養の期間は、非内分泌系細胞が増殖するのに十分な期間行えばよく、少なくとも12時間、好ましくは24時間以上、例えば、2日、3日、4日、5日、7日、10日、14日、21日、27日、28日、29日、30日、又はそれ以上である。延長培養の期間中も培地の交換は可能であり、1~7日、好ましくは2~5日、より好ましくは3~4日に1回の頻度で培地交換を行うことができる。

[0134] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団を上記延長培養に付した場合、延長培養後に確認される当該集団中の非内分泌系細胞の割合は、従来法(例えば、上記工程1)~6)やNature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133等)により作製されたインスリン産生細胞集団を延長培養に付した場合のその割合と比べて、50%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは75%

以上低減され、本発明により得られたインスリン産生細胞集団中に内在する非内分泌系細胞が低減、好ましくは除去されていることが確認できる。

[0135] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団は、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、「インスリン産生細胞」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、インスリン産生細胞、Ki67陽性細胞、CHGA陰性細胞等）が含まれていてもよい。

[0136] 膵 β 細胞集団は、インスリン産生細胞集団を分化・成熟させることによって、好ましくは動物生体内で分化・成熟させることによって得ることができる。

[0137] 「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。

[0138] 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、 1.0×10^4 細胞個～ 1.0×10^{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。

[0139] 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。

[0140] 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臍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。

[0141] 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、ポリエチレンオキッド、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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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、 $M < G$ 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。

[0145] 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（WO2010/032242、WO2011/154941）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。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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 - α -グリコリド）（PLGA）、ポリ（3-ヒドロキシブチレート- ϵ - α -ヒドロキシバリレート）（PHBV）、ポリ（エチレン- α -ビニルアセテート）（PEVA）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。

[0149] 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。

[0150] 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 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞/mL、好ましくは 1×10^4 細胞 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLから選択される量にて含めることができる。

[0151] 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 $\sim$ 5重量%、例えば、0.1 $\sim$ 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。

[0152] あるいは、公知の手法（WO 2 0 1 0 / 0 1 0 9 0 2）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。

[0153] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団は、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。

[0154] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団は、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。

[0155] また、本発明により得られたインスリン産生細胞集団は、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に分化し、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。

[0156] 本発明により得られたインスリン産生細胞集団は、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。

[0157] 3. 培養培地

本発明は、微小管阻害剤を含む、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以

降の分化段階にある細胞集団の培養培地を提供する。

- [0158] 本発明の培養培地は、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/Penisilin Streptomycin培地、MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glu taMAX™/アスコルビン酸/Penisilin Streptomycin培地など、哺乳類細胞の培養に使用される基礎培地に、上記微小管阻害剤が上記の量で添加されてなる。
- [0159] 本発明の培養培地は、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団をインスリン産生細胞集団へと分化誘導するため分化培地とすることができる。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6)にて使用することができる。
- [0160] 本発明の分化培地は微小管阻害剤に加えてさらに、工程6)にて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6)にて使用される分化培地には、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、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、FGFR1阻害剤等を所定の量にて添加することができる。
- [0161] 本発明の培養培地は、上記「それ以降の分化段階にある細胞集団」を培養するための培養培地とすることができる。一実施形態において、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6)終了までの3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、又はそれ以上

の期間、あるいは工程6)の終了後に使用することができる。当該培養培地は微小管阻害剤に加えてさらに、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く、例えば、ALK5インヒビターII、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいはT3、ALK5インヒビターII、ZnSO₄、ヘパリン、N-アセチルシステイン、Trolox、及びR428を添加してもよい。

[0162] 本発明はまた、EGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を含む、インスリン産生細胞集団の培養培地を提供する。

[0163] 本発明の培養培地は、上記基礎培地に、上記EGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を非内分泌系細胞の増殖を促すことが可能な任意の量にて含んでなる。基礎培地は、好ましくは、MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penicillin Streptomycin培地である。培地に含まれるEGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質の量は上記のとおりである。

[0164] EGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質を含む当該培養培地は、インスリン産生細胞集団中に存在する非内分泌系細胞を検出するための培養培地であり、上述のインスリン産生細胞集団の延長培養にて使用することができる。

[0165] 本発明の培養培地はいずれも、基礎培地、微小管阻害剤又はEGF又はそれと同等もしくは類似の活性を有する物質、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。

[0166] 4. 非内分泌系細胞の除去方法

本発明はまた、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を、微小管障害剤で処理することを含む、非内分泌系細胞の除去方法に関するものである。

微小管障害剤による、多能性幹細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団の処理は、上記定義のとおり行うことができる。

[0167] 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

[0168] 実施例 1 : インスリン産生細胞集団を EGF を含む基礎培地で延長培養した場合の非内分泌系細胞の増殖評価

1. 方法

(1) インスリン産生細胞集団の作製

Ff-114s04 iPS 細胞株からインスリン産生細胞集団への分化誘導は、上記工程 1) ~ 6) や既報 (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、バイオリアクター及び多孔プレートを用いた 3 次元培養法により実施した。すなわち、iPS 細胞をインスリンが作用する条件下で分化誘導因子 (GSK3 β 阻害剤、ROCK 阻害剤及び低用量のアクチビン A) を含む培地 (DMEM/1% B-27 (INS+)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド) で第 1 の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下で分化誘導因子 (低用量のアクチビン A) を含む培地 (DMEM/1% B-27 (INS-)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド) で第 2 の培養を行い、胚体内胚葉細胞集団を得た。さらに、その胚体内胚葉細胞集団から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団を分化誘導因子 (ALK5 インヒビター II、T3、LDN、 γ -secretase 阻害剤 RO、アスコルビン酸) と FGF 受容体 1 阻害剤 (PD-166866) を含む培地 (Improved MEM/1% B-

27 (INS+) / Penicillin Streptomycin) で培養して、インスリン産生細胞集団を得た。バイオリアクターから多孔プレートへの切り替えは工程6) にて実施した。

[0169] (2) EGFを含む基礎培地による延長培養

インスリン産生細胞集団を、基礎培地 (MCDB131 / 20mM Glucose / NaHCO₃ / FAF-BSA / ITS-X / Glutamax / Penicillin Streptomycin) にて4週間延長培養を行った。目的外細胞の増殖を促す目的でEGFを添加する場合は、終濃度が50ng/mLとなるように基礎培地に添加して培養を行った。

[0170] (3) マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

延長培養開始前及び終了後のインスリン産生細胞集団のマーカータンパク質発現 (PDX1、CHGA) をフローサイトメトリーにより測定した。各サンプルは、別々の培養容器からサンプリングを行った。細胞数については、フローサイトメトリー用のサンプル調整時に自動セルカウンターにて測定し、多孔プレート 1wellあたりの総細胞数を算出した。また、得られた総細胞数及びフローサイトメトリーの結果より、CHGA陽性細胞数、PDX1陽性かつCHGA陰性細胞数、PDX1陰性かつCHGA陰性細胞数を算出した。

[0171] 2. 結果

(1) マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

フローサイトメトリーによる測定結果及び細胞数を図1及び表2に示す。延長培養前は大部分がCHGA陽性の内分泌細胞であった。EGFを含まない基礎培地で4週間延長培養を行っても大部分がCHGA陽性細胞であることに変化はなかった。しかし、EGFを含む基礎培地で延長培養を行ったところ、PDX1陽性かつCHGA陰性 (PDX1+ / CHGA-) ならびにPDX1陰性かつCHGA陰性 (PDX1- / CHGA-) の非内分泌系細胞の割合が顕著に増加した。また、これら非内分泌系細胞は割合だけでなく、細胞数としても増加が確認された。非内分泌系細胞の増加に伴い、EGF

を含む基礎培地中での延長培養後の総細胞数も増加した。一方で、CHGA陽性の内分泌系細胞の細胞数には大きな変化はなかった。

[0172] [表2]

細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)	s6d11	延長培養後				
		EGFなし		EGFあり		
総細胞数	99	113	114	198	222	281
CHGA+	96	109	109	128	123	123
PDX+/CHGA-	3.3	1.7	1.6	27	32	32
PDX-/CHGA-	0.1	2.7	3.3	43	67	126

EGFを含む延長培養により
顕著に増加したpopulation

[0173] 実施例2：タキソイド系抗がん剤Docetaxelを添加し作製したインスリン産生細胞集団をEGFを含む基礎培地で延長培養した場合の非内分泌系細胞の増殖評価

1. 方法

(1) Cisplatin又はDocetaxel処理を誘導工程を含むインスリン産生細胞集団の作製

QHJ1-114s04 iPS細胞株からインスリン産生細胞集団への分化誘導は、上記工程1)～6)や既報(Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133)に従い、バイオリアクターを用いた3次元培養法により実施した。すなわち、iPS細胞をインスリンが作用する条件下で分化誘導因子(GSK3 β 阻害剤、ROCK阻害剤及び低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1% B-27 (INS+)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下で分化誘導因子(低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1% B-27 (INS-)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第2の培養を行い胚体内胚葉細胞集団を得た。さらに、その胚体内胚葉細胞集団から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団を分化

誘導因子（ALK5インヒビター11、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、アスコルビン酸）とFGF受容体1阻害剤（PD-166866）を含む培地（Improved MEM/1%B-27（INS+）/Penicillin Streptomycin）で培養して、インスリン産生細胞集団を得た。Cisplatin又はDocetaxelを処理する場合は、工程6）開始後4日目から培養終了（11日目）までの7日間、終濃度3 μ M Cisplatin又は終濃度1 μ M Docetaxelとなるように培地に添加して誘導を行った。

[0174] （2）EGFを含む基礎培地による延長培養

Cisplatin又はDocetaxel添加して得られたインスリン産生細胞集団を、終濃度50 ng/mLのEGFを含む基礎培地（MCDB 131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penicillin Streptomycin）にて4週間延長培養を行った。Cisplatin及びDocetaxelを添加せず得られたインスリン産生細胞集団をcontrol細胞集団とし、同様に延長培養を行った。

[0175] （3）マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

延長培養開始前及び終了後の各インスリン産生細胞集団のマーカータンパク質発現（PDX1、CHGA、Ki67）をフローサイトメトリーにより測定した。延長培養終了後のサンプルについては、同じ培養容器から3回サンプリングを行った。細胞数については、フローサイトメトリー用のサンプル調整時に自動セルカウンターにて測定し、バイオリアクター 1 mLあたりの総細胞数を算出した。また、得られた総細胞数及びフローサイトメトリーの結果より、CHGA陽性細胞数、PDX1陽性かつCHGA陰性細胞数、PDX1陰性かつCHGA陰性細胞数を算出した。

[0176] 2. 結果

（1）マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

フローサイトメトリーによる測定結果及び細胞数を図2、図3及び表3、

4、5に示す。Control細胞集団は、延長培養前は大部分がCHGA陽性の内分泌細胞であったが、EGFを含む基礎培地で延長培養を行ったところ、PDX1陽性かつCHGA陰性（PDX1+/CHGA-）ならびにPDX1陰性/CHGA陰性（PDX1-/CHGA-）の非内分泌系細胞の割合が顕著に増加した。

Cisplatin添加細胞集団（+Cisplatin）は、control細胞集団（Control）に対して、EGFを含む延長培養後のPDX1陽性かつCHGA陰性（PDX1+/CHGA-）細胞の割合に大きな変化は認められなかったが、PDX1陰性かつCHGA陰性（PDX1-/CHGA-）細胞の割合が大幅に減少した。

Docetaxel添加細胞集団（+Docetaxel）は、control細胞集団に対して、EGFを含む延長培養後のPDX1陽性かつCHGA陰性（PDX1+/CHGA-）ならびにPDX1陰性かつCHGA陰性（PDX1-/CHGA-）の割合がどちらも大幅に減少した。

[0177] EGFを含む延長培養後の総細胞数は、control細胞集団やCisplatin添加細胞集団において、非内分泌系細胞の増加に伴い増加した。Docetaxel添加細胞集団では、非内分泌系細胞の増加が認められなかったため、延長培養後の総細胞数は減少した。一方で、延長培養後のCHGA陽性の内分泌細胞数はcontrol細胞集団に対してCisplatin添加細胞集団やDocetaxel添加細胞集団において変化は認められなかった。以上より、CisplatinやDocetaxel処理は非内分泌系細胞の増加を抑制する一方で、内分泌細胞の細胞数には影響しないと考えられる。

[0178] 延長培養により増加するPDX1陽性かつCHGA陰性ならびにPDX1陰性かつCHGA陰性の非内分泌系細胞は、増殖マーカーであるKi67陽性の細胞を多数含んでいた。したがって、これらの非内分泌系細胞は増殖性であると考えられる。

[0179]

[表3]

c o n t r o l

細胞数 (x10 ⁴ cells/mL)	s6d11	延長培養後			
		EGFあり			average
総細胞数	95	176	206	219	200
CHGA+	90	20	29	24	24
PDX+/CHGA-	3.9	124	155	136	138
PDX-/CHGA-	1.2	32	22	60	38

EGFを含む延長培養により
顕著に増加したpopulation

[0180] [表4]

+ C i s p l a t i n

細胞数 (x10 ⁴ cells/mL)	s6d11	延長培養後			
		EGFあり			average
総細胞数	91	125	109	141	125
CHGA+	88	24	21	24	23
PDX+/CHGA-	2.7	97	84	110	97
PDX-/CHGA-	0.3	4.5	4.4	7.2	5.4

EGFを含む延長培養により
顕著に増加したpopulation

[0181] [表5]

+ D o c e t a x e l

細胞数 (x10 ⁴ cells/mL)	s6d11	延長培養後			
		EGFあり			average
総細胞数	74	26	26	28	27
CHGA+	73	21	22	24	22
PDX+/CHGA-	1.3	2.0	1.5	1.5	1.7
PDX-/CHGA-	0.1	3.1	2.7	2.7	2.8

延長培養により顕著に増加したpopulationはない

[0182] 実施例3 : Docetaxel を添加し作製したインスリン産生細胞集団の
マーカータンパク質発現評価

1. 方法

(1) Docetaxel 処理を誘導工程に含むインスリン産生細胞集団の
作製

QHJ1-114s04 iPS細胞株からインスリン産生細胞への分化
誘導は、上記工程1)～6)や既報(Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133)に従い、バイオリアクター
および多孔プレートを用いた3次元培養法により実施した。すなわち、iP
S細胞をインスリンが作用する条件下で分化誘導因子(GSK3 β 阻害剤、
ROCK阻害剤及び低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1%B
-27 (INS+)/Penicillin Streptomycin/ジ
メチルスルホキシド)で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しな
い条件下で分化誘導因子(低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/
1%B-27 (INS-)/Penicillin Streptomycin
/ジメチルスルホキシド)で第2の培養を行い胚体内胚葉細胞を得た。さ
らに、その胚体内胚葉細胞から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団
を分化誘導因子(ALK5インヒビター11、T3、LDN、 γ -secr
etase阻害剤RO、アスコルビン酸)とFGF受容体1阻害剤(PD-
166866)を含む培地(MCDB131/20mM Glucose/
NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penis
illin Streptomycin)で培養して、インスリン産生細胞集
団を得た。バイオリアクターから多孔プレートへの切り替えは工程6)にて
実施した。Docetaxelを処理する場合は、工程6)開始後4日目か
ら培養終了(11日目)までの7日間、終濃度が1、3又は10 μ Mとなる
ように培地に添加して誘導を行った。

[0183] (2) マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

培養終了後の各インスリン産生細胞集団のマーカータンパク質発現(NK

X6. 1、C-peptide (Insulin)、CHGA、及びKi67)をフローサイトメトリーにより測定した。各サンプルは、別々の培養容器からサンプリングを行った。細胞数については、フローサイトメトリー用のサンプル調整時に自動セルカウンターにて測定し、多孔プレート 1 wellあたりの総細胞数を算出した。

[0184] 2. 結果

(1) マーカータンパク質発現および細胞数の評価

フローサイトメトリーによる測定結果および細胞数を図4に示す。control細胞集団に対して、1 μ MのDocetaxelを処理した細胞集団(+Docetaxel)は、膵 β 細胞への成熟が予想されるINS陽性かつNKX6. 1陽性細胞の割合が10%程度増加した。この作用は、Docetaxelの濃度を10 μ Mまで上げてても変化しなかった。また、総細胞数についてはDocetaxel処理による変化は認められなかった。

[0185] 加えて、FGF受容体1阻害剤(PD-166866)を添加した培地を用いて分化誘導された細胞集団においては、目的外細胞であるCHGA陰性かつKi67陽性(CHGA-/Ki67+)細胞の存在量が大幅に低減されていることもあり(WO2019/208505参照)、その存在量はDocetaxel処理の有無にかかわらず0.1%以下であった。本実施例のように延長培養を行わずに評価を行う場合、僅かに残存する目的外細胞の差を検出することは難しい場合がある。一方、上記のとおりEGFを含む基礎培地で延長培養を行うことで、僅かに残存する目的外細胞を増幅し検出することが可能となるため、細胞集団に含まれる細胞の種類や量を厳密に把握することが可能となる。

[0186] 実施例4：インスリン産生細胞を含む細胞集団をDocetaxelで処理したのちEGFを含む基礎培地で延長培養した場合の非内分泌系細胞の増殖評価

1. 方法

(1) インスリン産生細胞を含む細胞集団にDocetaxel処理を施し

たインスリン産生細胞集団の作製

QHJ1-114s04 iPS細胞株からインスリン産生細胞集団への分化誘導は、上記工程1)～6)や既報(Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133)に従い、バイオリアクターを用いた3次元培養法により実施した。すなわち、iPS細胞をインスリンが作用する条件下で分化誘導因子(GSK3 β 阻害剤、ROCK阻害剤及び低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1%B-27(INS+)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第1の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下で分化誘導因子(低用量のアクチビンA)を含む培地(DMEM/1%B-27(INS-)/Penicillin Streptomycin/ジメチルスルホキシド)で第2の培養を行い胚体内胚葉細胞集団を得た。さらに、その胚体内胚葉細胞集団から分化誘導して得られた膵内分泌前駆細胞集団を分化誘導因子(ALK5インヒビター11、T3、LDN、 γ -secretase阻害剤RO、アスコルビン酸)とFGF受容体1阻害剤(PD-166866)を含む培地(Improved MEM/1%B-27(INS+)/Penicillin Streptomycin)で7日間培養して得られた(工程6開始後7日目に得られた)細胞集団に対し、工程6)の培養終了(11日目)までの4日間、終濃度1 μ M Docetaxelとなるよう培地に添加して引き続き誘導を行った。バイオリアクターから多孔プレートへの切り替えを工程6)にて実施した。

[0187] (2) EGFを含む基礎培地による延長培養

上記の手法により得られた細胞集団(+Docetaxel 7日目から4日間)を、終濃度50ng/mLのEGFを含む基礎培地(MCDB131/20mM Glucose/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/Penicillin Streptomycin)にて4週間延長培養を行った。Docetaxelを添加せず得られたインスリン産生細胞集団(Control)、また、Docetaxelの処理を

工程6) 開始後4日目から培養終了(11日目)までの7日間とした以外は同様に作製された細胞集団(+Docetaxel 4日目から7日間)についても、それぞれ同様に延長培養を行った。

[0188] (3) マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

延長培養開始前及び終了後の各細胞集団のマーカータンパク質発現(PDX1、CHGA)をフローサイトメトリーにより測定した。工程6) 開始後7日目に得られた細胞集団のマーカータンパク質発現(NKX6.1、C-peptide (Insulin)、PDX1、及びCHGA)についてもフローサイトメトリーにより測定した。各サンプルは、別々の培養容器からサンプリングを行った。細胞数については、フローサイトメトリー用のサンプル調整時に自動セルカウンターにて測定し、多孔プレート1wellあたりの総細胞数を算出した。

[0189] 2. 結果

(1) マーカータンパク質発現及び細胞数の評価

フローサイトメトリーによる測定結果及び細胞数を図5及び表6、7、8に示す。

工程6) 開始後7日目に得られた細胞集団におけるマーカータンパク質発現の測定結果を、図5(A)に示す。当該細胞集団においては、インスリン、NKX6.1、PDX1、CHGAについて陽性の細胞が多く含まれることが確認された(インスリン及びNKX6.1の両マーカーを発現するインスリン産生細胞は30%を超える割合で存在し、また、CHGA及びPDX1の両マーカーを発現する細胞はおよそ90%の割合で存在した)。

Controlの細胞集団は、延長培養前は大部分がCHGA陽性の内分泌細胞であったが、EGFを含む基礎培地で延長培養を行ったところ、PDX1陽性かつCHGA陰性(PDX1+/CHGA-)ならびにPDX1陰性/CHGA陰性(PDX1-/CHGA-)の非内分泌系細胞の割合が顕著に増加した。

Docetaxel添加細胞集団は、「+Docetaxel 7日目か

ら4日間」及び「+Docetaxel 4日目から7日間」のいずれの細胞集団においてもControlの細胞集団に対して、EGFを含む延長培養後のPDX1陽性かつCHGA陰性（PDX1+/CHGA-）ならびにPDX1陰性かつCHGA陰性（PDX1-/CHGA-）の割合がどちらも大幅に減少した。

[0190] [表6]

control

細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)	s6d11	延長培養後			
		EGFなし	EGFあり		
総細胞数	190	138	293	314	327
CHGA+	186	129	156	160	163
PDX+/CHGA-	1.7	4.0	67	77	89
PDX-/CHGA-	1.9	5.4	70	78	76

EGF を含む延長培養により
顕著に増加した population

[0191] [表7]

+Docetaxel 4日目から7日間

細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)	s6d11	延長培養後			
		EGFなし	EGFあり		
総細胞数	210	132	138	131	165
CHGA+	209	126	132	127	159
PDX+/CHGA-	0.4	1.5	0.8	0.8	1.5
PDX-/CHGA-	0.8	5.0	4.7	2.9	4.8

EGF を含む延長培養により
顕著に増加した populationはない

[0192]

[表8]

+D o c e t a x e l 7日目から4日間

細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)	s6d11	延長培養後			
		EGFなし	EGFあり		
総細胞数	178	140	151	141	154
CHGA+	177	132	144	133	147
PDX+/CHGA-	0.7	1.5	1.1	1.3	1.2
PDX-/CHGA-	0.9	6.3	5.6	6.6	5.9

EGFを含む延長培養により
顕著に増加した populationはない

[0193] 以上より、インスリン産生細胞集団をEGFを含む基礎培地で延長培養することにより、当該細胞集団中に混入している増殖性の非内分泌系細胞を検出できることが確認された。

また、インスリン産生細胞集団を分化誘導する過程において、膵内分泌前駆細胞集団及びそれ以降の分化段階にある細胞集団を、D o c e t a x e l といったタキソイド系抗がん剤で処理することによって、非内分泌系細胞を低減し、内分泌細胞やインスリン産生細胞を高い割合で含むインスリン産生細胞集団を製造できることが明らかとなった。

[0194] 実施例5：D o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団の生体内移植による有効性および安全性評価

1. 方法

(1) D o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団の生体内移植

ストレプトゾトシンによりインスリン欠乏性の糖尿病を誘発させた免疫不全NOD／SCIDマウスを準備し、上記実施例2に記載の方法によりD o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団をF i b r i n ゲルに分散させ、それを当該マウスに皮下移植した。移植後、経時的に血漿中ヒトC-ペプチド濃度を測定した。移植6か月後の時点で移植片を摘出し、

重量を測定した。対照として、D o c e t a x e l を添加せず作製したインスリン産生細胞集団を当該マウスに皮下移植し、経時的に血漿中ヒトC－ペプチド濃度を、ならびに移植6か月後の時点で摘出された移植片の重量を、それぞれ同様に測定した。

[0195] (2) 移植片中の非内分泌細胞およびタンパク質発現の評価

摘出した移植片を固定、脱水後にパラフィン切片を作製し、H E 染色および目的タンパク質発現（インスリン、グルカゴン、K i 6 7、ヒト核、P D X 1、C K 1 9）のための免疫組織染色を実施し、その形態や染色像を元に非内分泌細胞の有無を確認した。移植片中の非内分泌細胞の出現数や出現頻度は、同一処理の複数バッチ由来の細胞で4試験実施した際の合計数として集計した。

[0196] 2. 結果

(1) D o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団の生体内

移植後の経過観察として測定した血漿中ヒトC－ペプチド濃度および移植片重量の結果を図6に示す。皮下移植されたD o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団は、D o c e t a x e l を添加せず作製したインスリン産生細胞集団と同程度の血漿中ヒトC－ペプチド分泌が認められ、それは移植後6ヶ月後まで継続的に確認された。6か月時点での移植片重量は、D o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団において低い傾向が観察された。

[0197] (2) 移植片中の非内分泌細胞およびタンパク質発現の評価

移植6か月後の移植片の免疫組織染色の結果において、D o c e t a x e l を添加し作製したインスリン産生細胞集団の移植片においては、インスリン陽性、グルカゴン陽性の細胞が移植片の全体にわたって多く確認された一方、K i 6 7 陽性の細胞はわずかに点在する程度であった。それに対して、D o c e t a x e l を添加せず作製したインスリン産生細胞集団の移植片においては、インスリン陽性、グルカゴン陽性細胞の存在とともに、多くのK

i 6 7 陽性細胞が出現することが確認された。

[0198] 上記 Docetaxel を添加し作製したインスリン産生細胞集団を用いて実施した4つの移植試験結果について、集計した非内分泌細胞集団の出現数および出現頻度を表9に示す。Docetaxel を添加せず作製したインスリン産生細胞集団の移植群 (Docetaxel (-)) については、Outgrowth および Cyst の出現率 (出現数割合) は、各々 73% (16/22) および 100% (22/22) であったのに対し、Docetaxel を添加し作製したインスリン産生細胞集団の移植群 (Docetaxel (+)) においては、各々 0% (0/21) および 10% (2/21) と、移植片における非内分泌細胞出現率の明確な低下が確認された。

[0199] このことから、培養工程に Docetaxel を添加することは、移植後生体内での目的外非内分泌細胞の出現を抑制するために有効であることが示唆された。なお表9に示す Outgrowth とは、ヒト核陽性かつ PD X 1 陰性かつ Ki 6 7 陽性の非内分泌細胞の集団を指し、HE 染色による形態とともに免疫組織染色によりその存在を判断した。表9に示す Cyst とは、ヒト核陽性かつ PD X 1 陽性かつ CK 1 9 陽性の非内分泌性導管細胞を指し、HE 染色による管状形態とともに免疫組織染色によりその存在を判断した。

[0200] [表9]

細胞種	試験数	総数 (匹)	出現数 (匹)		出現頻度 (%)	
			Outgrowth	Cyst	Outgrowth	Cyst
Docetaxel (-)	4	22	16	22	73	100
Docetaxel (+)	4	21	0	2	0	10

[0201] 以上より、Docetaxel を添加し作製したインスリン産生細胞集団は、移植された生体内においても、非内分泌系細胞の増殖が抑えられ、内分泌細胞やインスリン産生細胞を高い割合で産生できることが示され、その有効性と安全性が確認された。

請求の範囲

- [請求項1] インスリン産生細胞集団を製造する方法であって、
膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団
を処理対象とし、チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害
活性を有する化合物を含む培地中で培養することを含む、方法。
- [請求項2] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化
合物が、タキソイド系抗がん剤より選択される化合物又はその薬理学的
的に許容される塩である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化
合物が、ドセタキセル又はその薬理学的に許容される塩である、請求
項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 製造されたインスリン産生細胞集団が、C H G A陽性細胞を95%
以上含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 製造されたインスリン産生細胞集団が、C H G A陰性かつK i 6 7
陽性細胞を0.1%以下含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の
方法。
- [請求項6] 処理対象である膵内分泌前駆細胞集団及び／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1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化
合物を含む、膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階に
ある細胞集団の培養培地。
- [請求項8] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化
合物が、タキソイド系抗がん剤より選択される化合物又はその薬理学的
的に許容される塩である、請求項7に記載の培養培地。
- [請求項9] チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化
合物が、ドセタキセル又はその薬理学的に許容される塩である、請求
項7又は8に記載の培養培地。

- [請求項10] C H G A陽性細胞の割合を増大させるため、ならびに／あるいは、インスリン陽性かつN K X 6. 1陽性細胞の割合を増大させるために使用される、請求項7～9のいずれか一項に記載の培養培地。
- [請求項11] インスリン産生細胞集団を上皮成長因子（E G F）を含む培地中で培養することを含む、前記インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出する方法。
- [請求項12] 非内分泌系細胞が、C H G A陰性かつP D X 1陽性細胞及び／又はC H G A陰性かつP D X 1陰性細胞である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 非内分泌系細胞を除去する方法であって、
膵内分泌前駆細胞集団及び／又はそれ以降の分化段階にある細胞集団を処理対象とし、チューブリンの重合促進活性及び／又は脱重合阻害活性を有する化合物を含む培地中で培養することを含む、方法。
- [請求項14] インスリン産生細胞集団における非内分泌系細胞を検出するために使用される、E G Fを含むインスリン産生細胞集団の培養培地。