

明細書

発明の名称

インスリン産生細胞

技術分野

[0001]

本発明は、膵 β 細胞や膵 α 細胞といったホルモン分泌を行う内分泌細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする、インスリン産生細胞、その製造法及び用途に関する。

発明の背景

[0002]

人工多能性細胞や胚性幹細胞（ES細胞）等の多能性幹細胞から、膵 β 細胞や膵 α 細胞といったホルモン分泌を行う内分泌細胞を分化誘導し、糖尿病の治療に応用する研究が進められている。多能性幹細胞を分化誘導すると、分化段階に応じて異なる特徴を有する細胞が出現することが知られている（WO2009/012428、WO2016/021734）。例えば、この分化段階は比較的未分化な順に、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞、膵 β 細胞に大きく分類することができる。

[0003]

これまでに、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞を含む内分泌細胞へと分化誘導する手法が開発、報告されている。例えば、非特許文献1－2には、多能性幹細胞から分化誘導された、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%以下の割合で含むインスリン産生細胞を製造する方法が記載されている。

[0004]

また、これまでに、多能性幹細胞から膵前駆細胞へと分化誘導し、それを生体内に移植し、成熟化させることで内分泌細胞を製造する手法が報告されている。例えば、非特許文献3には、多能性幹細胞から分化誘導された、膵前駆細胞をマウスに移植し、成熟化させることでインスリン陽性細胞及びグルカゴン陽性細胞を含む内分泌細胞を製造する方法が記載されている。

[0005]

しかしながら、上記の方法で製造された内分泌細胞の割合は、十分に高いものであるとはいえず、当該分野においては依然として、多能性幹細胞から内分泌細胞を効率的に誘導・製造する方法が切望されていた。

先行技術文献

特許文献

[0006]

特許文献1：WO2009/012428

特許文献2：WO2016/021734

非特許文献

[0007]

非特許文献1：Rezania A. et al, Nat Biotechnol. 2014; 32:1121-33.

非特許文献2：Felicia W. Pagliuca et al, Cell. 2014 October 9; 159(2):428-439.

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008]

本発明は、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞及びグルカゴン陽性細胞を一定の割合で含む膵島様細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする新たな手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

[0009]

従来、インスリン陽性かつNKX6.1陽性細胞の割合をいかに増やし、成熟化させるかという点に主眼が置かれてきたが、本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、上記以外の細胞を所定の割合とすることで、生体内で純度の高い膵島様細胞を効率的に誘導・製造できることを見出した。従来の手法で生成されていたインスリン産生細胞よりも成熟していないインスリン産生細胞、具体的には、MafAなどの成熟化指標を発現しておらず、グルカゴン産生細胞の元となる細胞を多く含むインスリン産生細胞を分化誘導する。成熟度の低い細胞は、移植後に純度の低い細胞が得られることが懸念されるが、増殖能を有するKi67陽性細胞を極限まで減らす手法を組み合わせることで、高い純度を保ったまま生体内で膵島様細胞に成熟化させることに成功した。

本発明は、最小限の製造期間で、純度の高い膵島様細胞を効率的に誘導することができるため、膵島の細胞治療を実現する上で最も適した手法を提供する。

[0010]

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] インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集

団)。

[2] MafA遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が、膵島におけるMafA遺伝子又はその遺伝子産物の発現量よりも低い、[1]のインスリン産生細胞(集団)。

[3] Ki67陽性細胞を3%未満の割合で含む、[1]又は[2]のインスリン産生細胞(集団)。

[3-1] Ki67陽性細胞を1%未満の割合で含む、[1]又は[2]のインスリン産生細胞(集団)。

[4] グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を3%未満の割合で含む、[1]～[3-1]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[5] グルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)応答を示す、[1]～[4]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[6] クロモグラニンA陽性細胞を45%超の割合で含む、[1]～[5]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[6-1] クロモグラニンA陽性細胞を80%超の割合で含む、[1]～[5]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[6-2] クロモグラニンA陽性細胞を85%超の割合で含む、[1]～[5]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[6-3] クロモグラニンA陽性細胞を90%超の割合で含む、[1]～[5]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[6-4] クロモグラニンA陽性細胞を93%超の割合で含む、[1]～[5]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[7] アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を0.01%未満の割合で含む、[1]～[6-4]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[7-1] 生体内において膵島様細胞へと分化する[1]～[7]のいずれかのインスリン産生細胞(集団)。

[7-2] 膵島様細胞が、クロモグラニンA陽性細胞を50%以上の割合で含む、[7

－１］のインスリン産生細胞（集団）。

〔７－２－１〕 膵島様細胞が、クロモグラニンＡ陽性細胞を９５％以上の割合で含む、〔７－１］のインスリン産生細胞（集団）。

〔７－３〕 膵島様細胞が、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、〔７－１］～〔７－２－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

〔７－３－１〕 膵島様細胞が、Ｋｉ６７陽性細胞を１％未満の割合で含む、〔７－１］～〔７－２－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

〔７－４〕 膵島様細胞が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を１０％以上の割合で含む、〔７－１］～〔７－３－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

〔７－５〕 膵島様細胞が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、〔７－１］～〔７－４］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

〔８〕 〔１］～〔７－５］のいずれかのインスリン産生細胞を含む医薬。

〔９〕 前記インスリン産生細胞（集団）がデバイス中に収容されている、〔８］の医薬。

〔１０〕 前記インスリン産生細胞（集団）がハイドロゲル中に分散されている、〔８］又は〔９］の医薬。

〔１１〕 生体内に移植して用いられる、〔８］～〔１０］のいずれかの医薬。

〔１２〕 皮下移植して用いられる、〔８］～〔１１］のいずれかの医薬。

〔１３〕 糖尿病の治療において使用するための〔８］～〔１２］のいずれかの医薬。

〔１４〕 患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持に使用するための〔８］～〔１２］のいずれかの医薬。

〔１５〕 糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減するために用いられる、〔８］～〔１２］のいずれかの医薬。

〔１６〕 生体内において膵島様細胞（集団）を分化誘導する方法において使用するための〔８］～〔１２］のいずれかの医薬。

〔１７〕 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ陽性細胞を５０％以上の割合で含む、〔１６］の医薬。

〔１７－１〕 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ

陽性細胞を95%以上の割合で含む、[16]の医薬。

[18] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ki67陽性細胞を3%未満の割合で含む、[16]～[17-1]のいずれかの医薬。

[18] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ki67陽性細胞を1%未満の割合で含む、[16]～[17-1]のいずれかの医薬。

[19] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を10%以上の割合で含む、[16]～[18]のいずれかの医薬。

[20] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、[16]～[19]のいずれかの医薬。

[21] インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）の製造方法であって、

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い胚体内胚葉細胞（集団）を製造する工程、ならびに

内分泌前駆細胞を、FGFR1阻害剤を含む培地中で培養し前記インスリン産生細胞（集団）を製造する工程

を含む、方法。

[22] 膵島様細胞（集団）の生成方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。

[23] 糖尿病を治療する方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。

[24] 患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールを改善及び／又は維持

する方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。

[25] 糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。

[26] 糖尿病の治療方法において使用するための[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[27] 患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持方法において使用するための[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[28] 糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する方法において使用するための[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[29] 生体内において膵島様細胞（集団）を分化誘導する方法において使用するための[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[30] デバイス中に収容されている、[26]～[29]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[31] ハイドロゲル中に分散されている、[26]～[30]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[32] 生体内に移植して用いられる、[26]～[31]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[33] 皮下移植して用いられる、[26]～[32]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

[34] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンA陽性細胞を50%以上の割合で含む、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[34-1] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンA

陽性細胞を95%以上の割合で含む、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[35] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ki67陽性細胞を3%未満の割合で含む、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[35-1] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ki67陽性細胞を1%未満の割合で含む、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[35-2] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を10%以上の割合で含む、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[36] 生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、[29]のインスリン産生細胞（集団）。

[37] 糖尿病を治療するための医薬の製造における[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）の使用。

[38] 患者の空腹時および食後グルコースレベルのコントロールを改善及び又は維持するための医薬の製造における[1]～[7-5]のいずれかのインスリン産生細胞（集団）の使用。

[39] 糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する医薬の製造における[1]～[7-5]のいずれかのインスリン細胞（集団）の使用。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2018-175465号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

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

[0011]

本発明によれば、多能性幹細胞から内分泌細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする新たな手法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012]

[図1] 図1は、インスリン産生細胞のプロトタイプ（プロトタイプ）、インスリン産生細胞及びヒト膵島（i s l e t）におけるインスリン（INS）、NKX6. 1、グルカゴン（GCG）、及びKi67の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。

[図2] 図2は、インスリン産生細胞のプロトタイプ、インスリン産生細胞及びヒト膵島（i s l e t）におけるインスリン（INS）、グルカゴン（GCG）、MafA及びUCN3の各遺伝子発現量を定量PCR法により測定した結果を示す。

[図3] 図3は、30（0. 005%）細胞、6（0. 001%）細胞、0細胞の未分化状態を維持したiPS細胞をスパイクして調製されたインスリン産生細胞における未分化状態を維持したiPS細胞のコロニー数を示すグラフ図である。

[図4] 図4は、凍結保存されたインスリン産生細胞を解凍後、3次元培養により4日培養して得られた細胞凝集体の位相差顕微鏡像を示す。

[図5] 図5は、凍結保存前のインスリン産生細胞、ならびに凍結保存・解凍後のインスリン産生細胞におけるINS、NKX6. 1及びKi67の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。

[図6] 図6は、インスリン産生細胞が移植された糖尿病マウス及びインスリン産生細胞が移植されていない非糖尿病マウスにおける、グルコース負荷後の血中ヒトC-ペプチド濃度の測定結果を示す。

[図7] 図7は、インスリン産生細胞が移植された糖尿病マウス及びインスリン産生細胞が移植されていない非糖尿病マウスにおける、グルカゴン投与後の血中ヒトC-ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度の測定結果を示す。

[図8] 図8は、皮下移植されたインスリン産生細胞におけるインスリン、NKX6. 1、グルカゴン、及びクロモグラニンAの発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。

〔図 9〕 図 9 は、皮下移植されたインスリン産生細胞におけるインスリン及びグルカゴンについての免疫組織染色の結果を示す。緑：インスリン陽性細胞。赤：グルカゴン陽性細胞。

発明を実施するための形態

[0013]

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。

[0014]

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

本明細書において、本発明を規定する数値範囲は、「約」との記載がなくとも、その下限値及び上限値と実質的に同一視される数値を含む。

[0015]

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。

[0016]

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。

[0017]

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。

[0018]

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。

[0019]

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。

[0020]

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

[0021]

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。

[0022]

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

80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%減少（枯渇）している。

[0023]

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。

[0024]

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

[0025]

「増殖因子」は特定の細胞の分化及び／又は増殖を促す内因性タンパク質である。「増殖因子」としては、例えば、上皮成長因子（EGF）、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン

様増殖因子1 (IGF-1)、インスリン様増殖因子2 (IGF-2)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、神経増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子ベータ(TGF- β)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、トランスフェリン、種々のインターロイキン(例えば、IL-1~IL-18)、種々のコロニー刺激因子(例えば、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF))、種々のインターフェロン(例えば、IFN- γ など)及び幹細胞に対する効果を有する他のサイトカイン、例えば、幹細胞因子(SCF)及びエリスロポエチン(Epo)が挙げられる。

[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(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-ゼンカルボアミド(Wf-536)、N-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-4-イル)-4 β -[(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(G

SK429286A)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3 β ）に対する阻害活性を有する物質である。GSK3（グリコーゲンシンターゼキナーゼ3）は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に参与する。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]ピリジン-4-イルオキシ]フェノール）、ケンパウロン（Kenpaulone）、1-アザケンパウロン（Azakenpaulone）、SB216763（3-(2,4-ジクロロフェニル)

−4−(1−メチル−1H−インドール−3−イル)−1H−ピロール−2,5−ジオン)、SB415286(3−[(3−クロロ−4−ヒドロキシフェニル)アミノ]−4−(2−ニトロフェニル)−1H−ピロール−2,5−ジオン)及びAR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO−アセトキシム、ピリドカルバゾール−シクロペンタジエニルルテニウム複合体、OTDZT、アルファ−4−ジブロモアセトフェノン、リチウム等が例示される。GSK3βはこれらに限定されるものではなく、GSK3βのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、GSK3βに結合する抗体、ドミナントネガティブGSK3β変異体等もGSK3β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、Knockout Serum Replacement (KSR: Invitrogen)、StemSure Serum Replacement (Wako)、B-27サプリメント、N2-サプリメント、アルブミン(例えば、脂質リッチアルブミン)、インスリン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素(例えば亜鉛、セレン(例えば、亜セレン酸ナトリウム))、2−メルカプトエタノール、3′チオールグリセロール又はこれらの混合物(例えば、ITS-G)が挙げられる。血清代替物としては、B-27サプリメント、KSR、StemSure Serum Replacement、ITS-Gが好ましい。培地に血清代替物を添加する場合の培地中の濃度は0.01~10重量%、好ましくは0.1~2重量%である。本発明においては、血清に代えて「血清代替物」を使用することが好ましい。

[0030]

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

阻害活性を有すれば特に限定されず、FGFR1阻害活性と合わせてその他のFGFRの阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。本明細書において「FGFR1阻害剤」とは、FGFR1阻害活性を少しでも有している物質が含まれるが、好ましくは、FGFR1を50%以上阻害する物質を指し、より好ましくはFGFR1の50%阻害濃度（IC₅₀）が1 μM以下、さらに好ましくは100 nM以下である物質を指す。FGFR1阻害活性の判定方法としては、公知の方法から選択すればよく、例えばEnzyChrom Kinase Assay Kit（BioAssay Systems社）を使った判定方法などが挙げられる。FGFR1阻害剤は従来公知のものを利用することが可能であり、特許文献又は非特許文献から見つけることができる。

[0031]

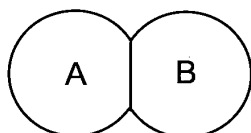
例えば、本明細書において「FGFR1阻害剤」とは、下記に示した化合物（化合物群D）に加えて、下記一般式で示される構造式を有する化合物のうち、FGFR1に阻害活性を有する化合物（又はその塩）が挙げられ、好ましくは、以下一般式で示される構造式を有する化合物I及び化合物IIのうち、FGFR1の50%阻害濃度（IC₅₀）が1 μM以下、より好ましくは100 nM以下である化合物（又はその塩）である。

[0032]

（化合物I）

化合物Iは下記式1：

[化1]



〔式中、環ABは、1以上の置換基を有する2環式複素環を示す。（環ABは、1以上の置換基を有する3環式複素環であってもよい）〕で表される化合物またはその塩が挙げられる。

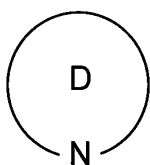
好ましくは、式中、環ABは、3個の置換基を有する2環式含窒素複素環を示す。置換基としては、以下で示した置換基もしくは化合物群Dが有している置換基が挙げられ、好ましくは化合物群Dが有している置換基を示す。

[0033]

(化合物II)

化合物IIは下記式2：

[化2]



〔式中、環Dは、置換基を有していてもよい5ないし6員単環式含窒素複素環を示し；

環D以外に1以上の含窒素複素環を含むことを示す。〕で表される化合物またはその塩が挙げられる。

好ましくは、式中、環Dは、置換基を有していてもよい、窒素を1または2含む芳香環を示す。

また、好ましくは、環D以外の1以上の含窒素複素環としては、置換基を有していてもよいピペラジンが挙げられる。

置換基としては、以下で示した置換基もしくは化合物群Dが有している置換基が挙げられ、好ましくは化合物群Dが有している置換基を示す。

[0034]

本明細書において、「複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子をそれぞれ含有する、芳香族複素環および非芳香族複素環が挙げられる。

[0035]

本明細書において、「芳香族複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以

外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子を含有する5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の芳香族複素環が挙げられる。該「芳香族複素環」の好適な例としては、チオフエン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、チアゾール、イソチアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、1, 2, 4-オキサジアゾール、1, 3, 4-オキサジアゾール、1, 2, 4-チアジアゾール、1, 3, 4-チアジアゾール、トリアゾール、テトラゾール、トリアジンなどの5ないし6員単環式芳香族複素環；

ベンゾチオフエン、ベンゾフラン、ベンゾイミダゾール、ベンゾオキサゾール、ベンゾイソオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾイソチアゾール、ベンゾトリアゾール、イミダゾピリジン、チエノピリジン、フロピリジン、ピロロピリジン、ピラゾロピリジン、オキサゾロピリジン、チアゾロピリジン、イミダゾピラジン、イミダゾピリミジン、チエノピリミジン、フロピリミジン、ピロロピリミジン、ピラゾロピリミジン、オキサゾロピリミジン、チアゾロピリミジン、ピラゾロピリミジン、ピラゾロトリアジン、ナフト〔2, 3-b〕チオフエン、フェノキサチイン、インドール、イソインドール、1H-インダゾール、プリン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、 β -カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、フェノチアジン、フェノキサジンなどの8ないし14員縮合多環式（好ましくは2または3環式）芳香族複素環が挙げられる。

[0036]

本明細書において、「非芳香族複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子を含有する3ないし14員（好ましくは4ないし10員）の非芳香族複素環が挙げられる。該「非芳香族複素環」の好適な例としては、アジリジン、オキシラン、チイラン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、テトラヒドロチオフエン、テトラヒドロフラン、ピロリン、ピロリジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、ピラゾリン、

ピラゾリジン、チアゾリン、チアゾリジン、テトラヒドロイソチアゾール、テトラヒドロオキサゾール、テトラヒドロイソオキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、テトラヒドロピリジン、ジヒドロピリジン、ジヒドロチオピラン、テトラヒドロピリミジン、テトラヒドロピリダジン、ジヒドロピラン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロチオピラン、モルホリン、チオモルホリン、アゼパニン、ジアゼパン、アゼピン、アゾカン、ジアゾカン、オキセパンなどの3ないし8員単環式非芳香族複素環；

ジヒドロベンゾフラン、ジヒドロベンゾイミダゾール、ジヒドロベンゾオキサゾール、ジヒドロベンゾチアゾール、ジヒドロベンゾイソチアゾール、ジヒドロナフト〔2，3－b〕チオフェン、テトラヒドロイソキノリン、テトラヒドロキノリン、4H－キノリジン、インドリン、イソインドリン、テトラヒドロチエノ〔2，3－c〕ピリジン、テトラヒドロベンゾアゼピン、テトラヒドロキノキサリン、テトラヒドロフェナントリジン、ヘキサヒドロフェノチアジン、ヘキサヒドロフェノキサジン、テトラヒドロフタラジン、テトラヒドロナフチリジン、テトラヒドロキナゾリン、テトラヒドロシンノリン、テトラヒドロカルバゾール、テトラヒドロ β -カルボリン、テトラヒドロアクリジン、テトラヒドロフェナジン、テトラヒドロチオキサテン、オクタヒドロイソキノリンなどの9ないし14員縮合多環式（好ましくは2または3環式）非芳香族複素環が挙げられる。

[0037]

本明細書において、「含窒素複素環」としては、「複素環」のうち、環構成原子として少なくとも1個以上の窒素原子を含有するものが挙げられる。

[0038]

以下、本明細書中で用いられる各置換基の定義について詳述する。特記しない限り各置換基は以下の定義を有する。

[0039]

本明細書において、「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。

[0040]

本明細書において、「C₁₋₆アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルが挙げられる。

[0041]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキル基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよいC₁₋₆アルキル基が挙げられる。具体例としては、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-ブロモエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、テトラフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、2, 2-ジフルオロプロピル、3, 3, 3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、4, 4, 4-トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、5, 5, 5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6, 6, 6-トリフルオロヘキシルが挙げられる。

[0042]

本明細書において、「C₂₋₆アルケニル基」としては、例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-ヘキセニル、3-ヘキセニル、5-ヘキセニルが挙げられる。

[0043]

本明細書において、「C₂₋₆アルキニル基」としては、例えば、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-

ーペンチニル、3ーペンチニル、4ーペンチニル、1ーヘキシニル、2ーヘキシニル、3ーヘキシニル、4ーヘキシニル、5ーヘキシニル、4ーメチルー2ーペンチニルが挙げられる。

[0044]

本明細書において、「 C_{3-10} シクロアルキル基」としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビスシクロ[2.2.1]ヘプチル、ビスシクロ[2.2.2]オクチル、ビスシクロ[3.2.1]オクチル、アダマンチルが挙げられる。

[0045]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよい C_{3-10} シクロアルキル基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよい C_{3-10} シクロアルキル基が挙げられる。具体例としては、シクロプロピル、2,2-ジフルオロシクロプロピル、2,3-ジフルオロシクロプロピル、シクロブチル、ジフルオロシクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルが挙げられる。

[0046]

本明細書において、「 C_{3-10} シクロアルケニル基」としては、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニルが挙げられる。

[0047]

本明細書において、「 C_{6-14} アリール基」としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントリル、2-アントリル、9-アントリルが挙げられる。

[0048]

本明細書において、「 C_{7-16} アラルキル基」としては、例えば、ベンジル、フェネチル、ナフチルメチル、フェニルプロピルが挙げられる。

[0049]

本明細書において、「C₁₋₆アルコキシ基」としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシが挙げられる。

[0050]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルコキシ基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよいC₁₋₆アルコキシ基が挙げられる。具体例としては、メトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、2, 2, 2-トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、4, 4, 4-トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシが挙げられる。

[0051]

本明細書において、「C₃₋₁₀シクロアルキルオキシ基」としては、例えば、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシ、シクロヘプチルオキシ、シクロオクチルオキシが挙げられる。

[0052]

本明細書において、「C₁₋₆アルキルチオ基」としては、例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-ブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオが挙げられる。

[0053]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキルチオ基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよいC₁₋₆アルキルチオ基が挙げられる。具体例としては、メチルチオ、ジフルオロメチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、4, 4, 4-トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオが挙げられる。

[0054]

本明細書において、「C₁₋₆アルキル-カルボニル基」としては、例えば、アセチル、プロパノイル、ブタノイル、2-メチルプロパノイル、ペンタノイル、3-メチルブタノイル、2-メチルブタノイル、2, 2-ジメチルプロパノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイルが挙げられる。

[0055]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキル-カルボニル基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよいC₁₋₆アルキル-カルボニル基が挙げられる。具体例としては、アセチル、クロロアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、プロパノイル、ブタノイル、ペンタノイル、ヘキサノイルが挙げられる。

[0056]

本明細書において、「C₁₋₆アルコキシ-カルボニル基」としては、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、sec-ブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、ペンチルオキシカルボニル、ヘキシルオキシカルボニルが挙げられる。

[0057]

本明細書において、「C₆₋₁₄アリール-カルボニル基」としては、例えば、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルが挙げられる。

[0058]

本明細書において、「C₇₋₁₆アラルキル-カルボニル基」としては、例えば、フェニルアセチル、フェニルプロピオニルが挙げられる。

[0059]

本明細書において、「5ないし14員芳香族複素環カルボニル基」としては、例えば、

ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイルが挙げられる。

[0060]

本明細書において、「3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基」としては、例えば、モルホリニルカルボニル、ピペリジニルカルボニル、ピロリジニルカルボニルが挙げられる。

[0061]

本明細書において、「モノーまたはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基」としては、例えば、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、N-エチル-N-メチルカルバモイルが挙げられる。

[0062]

本明細書において、「モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基」としては、例えば、ベンジルカルバモイル、フェネチルカルバモイルが挙げられる。

[0063]

本明細書において、「 C_{1-6} アルキルスルホニル基」としては、例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル、sec-ブチルスルホニル、tert-ブチルスルホニルが挙げられる。

[0064]

本明細書において、「ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルスルホニル基」としては、例えば、1ないし7個、好ましくは1ないし5個のハロゲン原子を有していてもよい C_{1-6} アルキルスルホニル基が挙げられる。具体例としては、メチルスルホニル、ジフルオロメチルスルホニル、トリフルオロメチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル、4,4,4-トリフルオロブチルスルホニル、ペンチルスルホニル、ヘキシルスルホニルが挙げられる。

[0065]

本明細書において、「 C_{6-14} アリールスルホニル基」としては、例えば、フェニルスル

ホニル、1-ナフチルスルホニル、2-ナフチルスルホニルが挙げられる。

[0066]

本明細書において、「置換基」としては、例えば、ハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、置換されていてもよい炭化水素基、置換されていてもよい複素環基、アシル基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいチオカルバモイル基、置換されていてもよいスルファモイル基、置換されていてもよいヒドロキシ基、置換されていてもよいスルファニル (SH) 基、置換されていてもよいシリル基が挙げられる。

[0067]

本明細書において、「炭化水素基」（「置換されていてもよい炭化水素基」における「炭化水素基」を含む）としては、例えば、 C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{3-10} シクロアルケニル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラルキル基が挙げられる。

[0068]

本明細書において、「置換されていてもよい炭化水素基」としては、例えば、下記の置換基群Aから選ばれる置換基を有していてもよい炭化水素基が挙げられる。

[置換基群A]

- (1) ハロゲン原子、
- (2) ニトロ基、
- (3) シアノ基、
- (4) オキシ基、
- (5) ヒドロキシ基、
- (6) ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基、
- (7) C_{6-14} アリールオキシ基（例、フェノキシ、ナフトキシ）、
- (8) C_{7-16} アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ）、

- (9) 5 ないし 14 員芳香族複素環オキシ基 (例、ピリジルオキシ)、
- (10) 3 ないし 14 員非芳香族複素環オキシ基 (例、モルホリニルオキシ、ピペリジニルオキシ)、
- (11) C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ基 (例、アセトキシ、プロパノイルオキシ)、
- (12) C_{6-14} アリール-カルボニルオキシ基 (例、ベンゾイルオキシ、1-ナフトイルオキシ、2-ナフトイルオキシ)、
- (13) C_{1-6} アルコキシ-カルボニルオキシ基 (例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシ)、
- (14) モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイルオキシ基 (例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシ、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシ)、
- (15) C_{6-14} アリール-カルバモイルオキシ基 (例、フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモイルオキシ)、
- (16) 5 ないし 14 員芳香族複素環カルボニルオキシ基 (例、ニコチノイルオキシ)、
- (17) 3 ないし 14 員非芳香族複素環カルボニルオキシ基 (例、モルホリニルカルボニルオキシ、ピペリジニルカルボニルオキシ)、
- (18) ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルスルホニルオキシ基 (例、メチルスルホニルオキシ、トリフルオロメチルスルホニルオキシ)、
- (19) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい C_{6-14} アリールスルホニルオキシ基 (例、フェニルスルホニルオキシ、トルエンスルホニルオキシ)、
- (20) ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ基、
- (21) 5 ないし 14 員芳香族複素環基、
- (22) 3 ないし 14 員非芳香族複素環基、
- (23) ホルミル基、
- (24) カルボキシ基、

- (25) ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキルカルボニル基、
- (26) C₆₋₁₄アリールカルボニル基、
- (27) 5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、
- (28) 3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、
- (29) C₁₋₆アルコキシカルボニル基、
- (30) C₆₋₁₄アリールオキシカルボニル基 (例、フェニルオキシカルボニル、1-ナフチルオキシカルボニル、2-ナフチルオキシカルボニル) 、
- (31) C₇₋₁₆アラキルオキシカルボニル基 (例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニル) 、
- (32) カルバモイル基、
- (33) チオカルバモイル基、
- (34) モノ-またはジ-C₁₋₆アルキルカルバモイル基、
- (35) C₆₋₁₄アリールカルバモイル基 (例、フェニルカルバモイル) 、
- (36) 5ないし14員芳香族複素環カルバモイル基 (例、ピリジルカルバモイル、チエニルカルバモイル) 、
- (37) 3ないし14員非芳香族複素環カルバモイル基 (例、モルホリニルカルバモイル、ピペリジニルカルバモイル) 、
- (38) ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキルスルホニル基、
- (39) C₆₋₁₄アリールスルホニル基、
- (40) 5ないし14員芳香族複素環スルホニル基 (例、ピリジルスルホニル、チエニルスルホニル) 、
- (41) ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキルスルフィニル基、
- (42) C₆₋₁₄アリールスルフィニル基 (例、フェニルスルフィニル、1-ナフチルスルフィニル、2-ナフチルスルフィニル) 、
- (43) 5ないし14員芳香族複素環スルフィニル基 (例、ピリジルスルフィニル、チエ

ニルスルフィニル)、

(44) アミノ基、

(45) モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基(例、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジブチルアミノ、N-エチル-N-メチルアミノ)、

(46) モノーまたはジ- C_{6-14} アリールアミノ基(例、フェニルアミノ)、

(47) 5ないし14員芳香族複素環アミノ基(例、ピリジルアミノ)、

(48) C_{7-16} アラルキルアミノ基(例、ベンジルアミノ)、

(49) ホルミルアミノ基、

(50) C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ基(例、アセチルアミノ、プロパノイルアミノ、ブタノイルアミノ)、

(51) (C_{1-6} アルキル) (C_{1-6} アルキル-カルボニル) アミノ基(例、N-アセチル-N-メチルアミノ)、

(52) C_{6-14} アリール-カルボニルアミノ基(例、フェニルカルボニルアミノ、ナフチルカルボニルアミノ)、

(53) C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ基(例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノ、tert-ブトキシカルボニルアミノ)、

(54) C_{7-16} アラルキルオキシ-カルボニルアミノ基(例、ベンジルオキシカルボニルアミノ)、

(55) C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ基(例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ)、

(56) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい C_{6-14} アリールスルホニルアミノ基(例、フェニルスルホニルアミノ、トルエンスルホニルアミノ)、

(57) ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル基、

- (58) C_{2-6} アルケニル基、
- (59) C_{2-6} アルキニル基、
- (60) C_{3-10} シクロアルキル基、
- (61) C_{3-10} シクロアルケニル基、及び
- (62) C_{6-14} アリール基。

[0069]

「置換されていてもよい炭化水素基」における上記置換基の数は、例えば、1ないし5個、好ましくは1ないし3個である。置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一であっても異なってもよい。

[0070]

本明細書において、「複素環基」（「置換されていてもよい複素環基」における「複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子をそれぞれ含有する、(i) 芳香族複素環基、(ii) 非芳香族複素環基および(iii) 7ないし10員複素架橋環基が挙げられる。

[0071]

本明細書において、「芳香族複素環基」（「5ないし14員芳香族複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子を含有する5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の芳香族複素環基が挙げられる。

該「芳香族複素環基」の好適な例としては、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、1, 2, 4-オキサジアゾリル、1, 3, 4-オキサジアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、1, 3, 4-チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニルなどの5ないし6員単環式芳香族複素環基；

ベンゾチオフェニル、ベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、イミダゾピリジニル、チエノピリジニル、フロピリジニル、ピロロピリジニル、ピラゾロピリジニル、オキサゾロピリジニル、チアゾロピリジニル、イミダゾピラジニル、イミダゾピリミジニル、チエノピリミジニル、フロピリミジニル、ピロロピリミジニル、ピラゾロピリミジニル、オキサゾロピリミジニル、チアゾロピリミジニル、ピラゾロトリアジニル、ナフト[2,3-b]チエニル、フェノキサチイニル、インドリル、イソインドリル、1H-インダゾリル、プリニル、イソキノリル、キノリル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどの8ないし14員縮合多環式（好ましくは2または3環式）芳香族複素環基が挙げられる。

[0072]

本明細書において、「非芳香族複素環基」（「3ないし14員非芳香族複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし4個のヘテロ原子を含有する3ないし14員（好ましくは4ないし10員）の非芳香族複素環基が挙げられる。

該「非芳香族複素環基」の好適な例としては、アジリジニル、オキシラニル、チイラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロフラニル、ピロリニル、ピロリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、テトラヒドロイソチアゾリル、テトラヒドロオキサゾリル、テトラヒドロイソオキサゾリル、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロピリジニル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロピリダジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホ

リニル、アゼパニル、ジアゼパニル、アゼピニル、オキセパニル、アゾカニル、ジアゾカニルなどの3ないし8員単環式非芳香族複素環基；

ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロベンゾチアゾリル、ジヒドロベンゾイソチアゾリル、ジヒドロナフト〔2，3－b〕チエニル、テトラヒドロイソキノリル、テトラヒドロキノリル、4H－キノリジニル、インドリニル、イソインドリニル、テトラヒドロチエノ〔2，3－c〕ピリジニル、テトラヒドロベンゾアゼピニル、テトラヒドロキノキサリニル、テトラヒドロフェナントリジニル、ヘキサヒドロフェノチアジニル、ヘキサヒドロフェノキサジニル、テトラヒドロフタラジニル、テトラヒドロナフチリジニル、テトラヒドロキナゾリニル、テトラヒドロシンノリニル、テトラヒドロカルバゾリル、テトラヒドロ β －カルボリニル、テトラヒドロアクリジニル、テトラヒドロフェナジニル、テトラヒドロチオキサントニル、オクタヒドロイソキノリルなどの9ないし14員縮合多環式（好ましくは2または3環式）非芳香族複素環基が挙げられる。

[0073]

本明細書において、「7ないし10員複素架橋環基」の好適な例としては、キヌクリジニル、7－アザビシクロ〔2.2.1〕ヘプタニルが挙げられる。

[0074]

本明細書において、「含窒素複素環基」としては、「複素環基」のうち、環構成原子として少なくとも1個以上の窒素原子を含有するものが挙げられる。

[0075]

本明細書において、「置換されていてもよい複素環基」としては、例えば、前記した置換基群Aから選ばれる置換基を有していてもよい複素環基が挙げられる。

[0076]

「置換されていてもよい複素環基」における置換基の数は、例えば、1ないし3個である。置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一であっても異なってもよい。

[0077]

本明細書において、「アシル基」としては、例えば、「ハロゲン原子、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基およびカルバモイル基から選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{3-10} シクロアルケニル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラルキル基、5ないし14員芳香族複素環基および3ないし14員非芳香族複素環基から選ばれる1または2個の置換基」をそれぞれ有していてもよい、ホルミル基、カルボキシ基、カルバモイル基、チオカルバモイル基、スルフィノ基、スルホ基、スルファモイル基、ホスホノ基が挙げられる。

[0078]

また、「アシル基」としては、炭化水素－スルホニル基、複素環－スルホニル基、炭化水素－スルフィニル基、複素環－スルフィニル基も挙げられる。

ここで、炭化水素－スルホニル基とは、炭化水素基が結合したスルホニル基を、複素環－スルホニル基とは、複素環基が結合したスルホニル基を、炭化水素－スルフィニル基とは、炭化水素基が結合したスルフィニル基を、複素環－スルフィニル基とは、複素環基が結合したスルフィニル基を、それぞれ意味する。

「アシル基」の好適な例としては、ホルミル基、カルボキシ基、 C_{1-6} アルキル－カルボニル基、 C_{2-6} アルケニル－カルボニル基（例、クロトノイル）、 C_{3-10} シクロアルキル－カルボニル基（例、シクロブタンカルボニル、シクロペンタンカルボニル、シクロヘキサンカルボニル、シクロヘプタンカルボニル）、 C_{3-10} シクロアルケニル－カルボニル基（例、2－シクロヘキセンカルボニル）、 C_{6-14} アリール－カルボニル基、 C_{7-16} アラルキル－カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシ－カルボニル基、 C_{6-14} アリールオキシ－カルボニル基（例、フェニルオキシカルボニル、ナフチルオキシカルボニル）、 C_{7-16} アラルキルオキシ－カルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボ

ニル)、カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{2-6} アルケニル-カルバモイル基(例、ジアリルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{3-10} シクロアルキル-カルバモイル基(例、シクロプロピルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル基(例、フェニルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基、5ないし14員芳香族複素環カルバモイル基(例、ピリジルカルバモイル)、チオカルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキル-チオカルバモイル基(例、メチルチオカルバモイル、N-エチル-N-メチルチオカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{2-6} アルケニル-チオカルバモイル基(例、ジアリルチオカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{3-10} シクロアルキル-チオカルバモイル基(例、シクロプロピルチオカルバモイル、シクロヘキシルチオカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{6-14} アリール-チオカルバモイル基(例、フェニルチオカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-チオカルバモイル基(例、ベンジルチオカルバモイル、フェネチルチオカルバモイル)、5ないし14員芳香族複素環チオカルバモイル基(例、ピリジルチオカルバモイル)、スルフィノ基、 C_{1-6} アルキルスルフィニル基(例、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル)、スルホ基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基、 C_{6-14} アリールスルホニル基、ホスホノ基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルホスホノ基(例、ジメチルホスホノ、ジエチルホスホノ、ジイソプロピルホスホノ、ジブチルホスホノ)が挙げられる。

[0079]

本明細書において、「置換されていてもよいアミノ基」としては、例えば、置換基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラルキル基、 C_{1-6} アルキル-カルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基、 C_{7-16} アラルキル-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環基、カル

バモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基および C_{6-14} アリールスルホニル基から選ばれる1または2個の置換基」を有していてもよいアミノ基が挙げられる。

[0080]

置換されていてもよいアミノ基の好適な例としては、アミノ基、モノーまたはジ-（ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル）アミノ基（例、メチルアミノ、トリフルオロメチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、プロピルアミノ、ジブチルアミノ）、モノーまたはジ- C_{2-6} アルケニルアミノ基（例、ジアリルアミノ）、モノーまたはジ- C_{3-10} シクロアルキルアミノ基（例、シクロプロピルアミノ、シクロヘキシルアミノ）、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールアミノ基（例、フェニルアミノ）、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキルアミノ基（例、ベンジルアミノ、ジベンジルアミノ）、モノーまたはジ-（ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル）-カルボニルアミノ基（例、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ）、モノーまたはジ- C_{6-14} アリール-カルボニルアミノ基（例、ベンゾイルアミノ）、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-カルボニルアミノ基（例、ベンジルカルボニルアミノ）、モノーまたはジ-5ないし14員芳香族複素環カルボニルアミノ基（例、ニコチノイルアミノ、イソニコチノイルアミノ）、モノーまたはジ-3ないし14員非芳香族複素環カルボニルアミノ基（例、ピペリジニルカルボニルアミノ）、モノーまたはジ- C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ基（例、tert-ブトキシカルボニルアミノ）、5ないし14員芳香族複素環アミノ基（例、ピリジルアミノ）、カルバモイルアミノ基、（モノーまたはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル）アミノ基（例、メチルカルバモイルアミノ）、（モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル）アミノ基（例、ベンジルカルバモイルアミノ）、 C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ基（例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ）、 C_{6-14} アリールスルホニルアミノ基（例、フェニルスルホニルアミノ）、（ C_{1-6} アルキル）（ C_{1-6} アルキル-カルボニル）アミノ基（例、N-アセチル-N-メチルアミノ）、（ C_{1-6} アルキル）（C

$6-14$ アリールーカルボニル) アミノ基 (例、 N -ベンゾイル- N -メチルアミノ) が挙げられる。

[0081]

本明細書において、「置換されていてもよいカルバモイル基」としては、例えば、「置換基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラルキル基、 C_{1-6} アルキルーカルボニル基、 C_{6-14} アリールーカルボニル基、 C_{7-16} アラルキルーカルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、5ないし14員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルーカルバモイル基およびモノーまたはジ- C_{7-16} アラルキルーカルバモイル基から選ばれる1または2個の置換基」を有していてもよいカルバモイル基が挙げられる。

[0082]

置換されていてもよいカルバモイル基の好適な例としては、カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルーカルバモイル基、モノーまたはジ- C_{2-6} アルケニルーカルバモイル基 (例、ジアリルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{3-10} シクロアルキルーカルバモイル基 (例、シクロプロピルカルバモイル、シクロヘキシルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールーカルバモイル基 (例、フェニルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{7-16} アラルキルーカルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルーカルボニルーカルバモイル基 (例、アセチルカルバモイル、プロピオニルカルバモイル)、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールーカルボニルーカルバモイル基 (例、ベンゾイルカルバモイル)、5ないし14員芳香族複素環カルバモイル基 (例、ピリジルカルバモイル) が挙げられる。

[0083]

本明細書において、「置換されていてもよいチオカルバモイル基」としては、例えば、

「置換基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラルキル基、 C_{1-6} アルキル-カルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基、 C_{7-16} アラルキル-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基およびモノ-またはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基から選ばれる1または2個の置換基」を有していてもよいチオカルバモイル基が挙げられる。

[0084]

置換されていてもよいチオカルバモイル基の好適な例としては、チオカルバモイル基、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-チオカルバモイル基（例、メチルチオカルバモイル、エチルチオカルバモイル、ジメチルチオカルバモイル、ジエチルチオカルバモイル、N-エチル-N-メチルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{2-6} アルケニル-チオカルバモイル基（例、ジアリルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{3-10} シクロアルキル-チオカルバモイル基（例、シクロプロピルチオカルバモイル、シクロヘキシルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{6-14} アリール-チオカルバモイル基（例、フェニルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{7-16} アラルキル-チオカルバモイル基（例、ベンジルチオカルバモイル、フェネチルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルボニル-チオカルバモイル基（例、アセチルチオカルバモイル、プロピオニルチオカルバモイル）、モノ-またはジ- C_{6-14} アリール-カルボニル-チオカルバモイル基（例、ベンゾイルチオカルバモイル）、5ないし14員芳香族複素環チオカルバモイル基（例、ピリジルチオカルバモイル）が挙げられる。

[0085]

本明細書において、「置換されていてもよいスルファモイル基」としては、例えば、「置換基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキ

ル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラ
ルキル基、 C_{1-6} アルキル-カルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基、 C_{7-16} アラ
ルキル-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳
香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素
環基、カルバモイル基、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基およびモノ-
またはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基から選ばれる1または2個の置換基」を有
していてもよいスルファモイル基が挙げられる。

[0086]

置換されていてもよいスルファモイル基の好適な例としては、スルファモイル基、モノ-
またはジ- C_{1-6} アルキル-スルファモイル基（例、メチルスルファモイル、エチルス
ルファモイル、ジメチルスルファモイル、ジエチルスルファモイル、N-エチル-N-メ
チルスルファモイル）、モノ-またはジ- C_{2-6} アルケニル-スルファモイル基（例、ジ
アリルスルファモイル）、モノ-またはジ- C_{3-10} シクロアルキル-スルファモイル基
（例、シクロプロピルスルファモイル、シクロヘキシルスルファモイル）、モノ-または
ジ- C_{6-14} アリール-スルファモイル基（例、フェニルスルファモイル）、モノ-または
ジ- C_{7-16} アラルキル-スルファモイル基（例、ベンジルスルファモイル、フェネチルス
ルファモイル）、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルボニル-スルファモイル基（例、
アセチルスルファモイル、プロピオニルスルファモイル）、モノ-またはジ- C_{6-14} アリ
ール-カルボニル-スルファモイル基（例、ベンゾイルスルファモイル）、5ないし14
員芳香族複素環スルファモイル基（例、ピリジルスルファモイル）が挙げられる。

[0087]

本明細書において、「置換されていてもよいヒドロキシ基」としては、例えば、「置換
基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル
基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラ
ルキル基、 C_{1-6} アルキル-カルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基、 C_{7-16} アラ

キル-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環カルボニル基、3ないし14員非芳香族複素環カルボニル基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基、5ないし14員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル基、モノ-またはジ- C_{7-16} アラルキル-カルバモイル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基および C_{6-14} アリールスルホニル基から選ばれる置換基」を有していてもよいヒドロキシ基が挙げられる。

[0088]

置換されていてもよいヒドロキシ基の好適な例としては、ヒドロキシ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニルオキシ基（例、アリルオキシ、2-ブテニルオキシ、2-ペンテニルオキシ、3-ヘキセニルオキシ）、 C_{3-10} シクロアルキルオキシ基（例、シクロヘキシルオキシ）、 C_{6-14} アリールオキシ基（例、フェノキシ、ナフチルオキシ）、 C_{7-16} アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシ）、 C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ基（例、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ、ピバロイルオキシ）、 C_{6-14} アリール-カルボニルオキシ基（例、ベンゾイルオキシ）、 C_{7-16} アラルキル-カルボニルオキシ基（例、ベンジルカルボニルオキシ）、5ないし14員芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、ニコチノイルオキシ）、3ないし14員非芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、ピペリジニルカルボニルオキシ）、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニルオキシ基（例、tert-ブトキシカルボニルオキシ）、5ないし14員芳香族複素環オキシ基（例、ピリジルオキシ）、カルバモイルオキシ基、 C_{1-6} アルキル-カルバモイルオキシ基（例、メチルカルバモイルオキシ）、 C_{7-16} アラルキル-カルバモイルオキシ基（例、ベンジルカルバモイルオキシ）、 C_{1-6} アルキルスルホニルオキシ基（例、メチルスルホニルオキシ、エチルスルホニルオキシ）、 C_{6-14} アリールスルホニルオキシ基（例、フェニルスルホニルオキシ）が挙げられる。

[0089]

本明細書において、「置換されていてもよいスルファニル基」としては、例えば、「置換基群Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキ

ル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{7-16} アラ
ルキル基、 C_{1-6} アルキル-カルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基および5ない
し14員芳香族複素環基から選ばれる置換基」を有していてもよいスルファニル基、ハロ
ゲン化されたスルファニル基が挙げられる。

[0090]

置換されていてもよいスルファニル基の好適な例としては、スルファニル(-SH)基、
 C_{1-6} アルキルチオ基、 C_{2-6} アルケニルチオ基(例、アリルチオ、2-ブテニルチオ、2-
ペンテニルチオ、3-ヘキセニルチオ)、 C_{3-10} シクロアルキルチオ基(例、シクロヘ
キシルチオ)、 C_{6-14} アリールチオ基(例、フェニルチオ、ナフチルチオ)、 C_{7-16} アラ
ルキルチオ基(例、ベンジルチオ、フェネチルチオ)、 C_{1-6} アルキル-カルボニルチオ
基(例、アセチルチオ、プロピオニルチオ、ブチリルチオ、イソブチリルチオ、ピパロイ
ルチオ)、 C_{6-14} アリール-カルボニルチオ基(例、ベンゾイルチオ)、5ないし14員
芳香族複素環チオ基(例、ピリジルチオ)、ハロゲン化チオ基(例、ペンタフルオロチオ)
が挙げられる。

[0091]

本明細書において、「置換されていてもよいシリル基」としては、例えば、「置換基群
Aから選ばれる1ないし3個の置換基をそれぞれ有していてもよい、 C_{1-6} アルキル基、
 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール基および C_{7-16} アラ
ルキル基から選ばれる1ないし3個の置換基」を有していてもよいシリル基が挙げられる。

[0092]

置換されていてもよいシリル基の好適な例としては、トリ- C_{1-6} アルキルシリル基(例、
トリメチルシリル、tert-ブチル(ジメチル)シリル)が挙げられる。

[0093]

より具体的には、本発明において利用可能なFGFR1阻害剤としては、PD-16
6866(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. : 14

43530-05-9)、BIBF 1120 esylate (CAS No. : 656247-18-6)、TG 100572 Hydrochloride (CAS No. : 867331-64-4)、ENMD-2076 (CAS No. : 934353-76-1)、Brivanib alaninate (CAS No. : 649735-63-7)、TG 100572 (CAS No. : 867334-05-2)、BIBF 1120 (CAS No. : 656247-17-5)、ENMD-2076 Tartrate (CAS No. : 1291074-87-7)、TSU-68 (CAS No. : 252916-29-3)、Ponatinib (CAS No. : 943319-70-8)、Sulfatinib (CAS No. : 1308672-74-3)、LY2784544 (CAS No. : 1229236-86-5)、Dovitinib lactate (CAS No. : 692737-80-7)、SU 5402 (CAS No. : 215543-92-3)、FGF-401 (CAS No. : 1708971-55-4)、Tyrosine kinase-IN-1 (CAS No. : 705946-27-6)、PP58 (CAS No. : 212391-58-7)、TG 100801 Hydrochloride (CAS No. : 1018069-81-2)、Crenolanib (CAS No. : 670220-88-9)、TG 100801 (CAS No. : 867331-82-6)、Pazopanib Hydrochloride (CAS No. : 635702-64-6)、Pazopanib (CAS No. : 444731-52-6)、PD168393 (CAS No. : 194423-15-9)、Apatinib (CAS No. : 1218779-75-9)、Palbociclib isethionate (CAS No. : 827022-33-3)、Foretinib (CAS No. : 849217-64-7)、Lenvatinib (CAS No. : 417716-92-8)、Tandutinib (CAS No. : 387867-13-2)、等又はその塩 (これらの化合物を、化合物群Dとす

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

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

[0094]

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

[0095]

FGFR1 阻害剤は上記に示した化合物に限定されるものではなく、FGFR1 のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、FGFR1 に結合する抗体、ドミナントネガティブFGFR1 変異体等もFGFR1 阻害剤として使用することができる。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。

[0096]

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

[0097]

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、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。

[0098]

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。

[0099]

本明細書において、「細胞」とは特記しない限り、細胞の組成物、すなわち細胞集団を意味する。したがって、「細胞」には特定の細胞もしくは細胞集団だけでなく、一又は複数の別の細胞もしくは細胞集団も含まれ得る。「細胞」における特定の細胞は、富化又は純化することによって、あるいは一又は複数の別の細胞を枯渇することによって高めることができる。

[0100]

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

[0101]

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。

[0102]

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。

[0103]

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

[0104]

「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 a

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

[0105]

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, 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。

[0106]

人工多能性細胞株としては、NIH、理化学研究所(理研)、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学のFf-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJI01s01株、QHJI01s04株、QHJI14s03株、QHJI14s04株、RWMH15s02株、Ff-MH15s02株、253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、CDI社のMyCell iPS Cells (21525. 102. 10A) 株、MyCell iPS Cells (21526. 101. 10A) 株、等が挙げられる。

[0107]

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

[0108]

本明細書において「原腸管細胞」とは、HNF1B、及びHNF4Aの少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0109]

本明細書において「後方前腸細胞」とは、PDX-1、HNF6、及びHLXB9の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0110]

本明細書において「膵前駆細胞」とは、PDX-1、NKX6.1、PTF-1 α 、GATA4及びSOX9の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

[0111]

本明細書において「内分泌前駆細胞」とは、クロモグラニンA、NeuroD及びNg3の少なくとも一つのマーカーの発現、及び膵関連のホルモン系（例えば、インスリン等）のマーカーが発現していないことによって特徴付けられる細胞を意味する。内分泌前駆細胞は、Pax-4、NKX2-2、Islet-1、PDX-1、PTF-1 α などのマーカーが発現していてもよい。

[0112]

各分化段階にある細胞の製造は、下に詳述する手法により行うことができる。

[0113]

2. インスリン産生細胞

本発明の「インスリン産生細胞」とは、*in vitro*にて多能性幹細胞を分化誘導して得られたインスリンの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。より詳細には、本発明の「インスリン産生細胞」は、インスリン及びNKX6.1の両方のマーカーを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞）を約30%以上の割合で含み、かつマーカーとしてインスリン及びNKX6.1のうちインスリンのみを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞、以下、「Ins+ NKX-細胞」と記載する）を約15%超の割合で含むことによって特徴付けられる。なお、本明細書中、「インスリン陽性」を「Ins+」、NKX6.1陽性を「NKX+」、NKX6.1陰性を「NKX-」と記載する場合がある。また、「インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞」を「Ins+ NKX+細胞」、「インスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞」を「Ins+ NKX-細胞」と記載する場合がある。

[0114]

インスリン産生細胞における、I n s + N K X + 細胞の割合の上限は特に限定されないが、好ましくは約 50 % 以下とすることができる。

[0115]

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

[0116]

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

[0117]

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

[0118]

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

[0119]

インスリン産生細胞はさらに、以下の a. ～ f. :

- a. M a f A 遺伝子又はそのタンパク質の発現量が低いこと、
- b. K i 6 7 陽性細胞の割合が低いこと、

- c. グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと、
- d. グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと、
- e. クロモグラニンA陽性細胞の割合が高いこと、
- f. アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと、

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

[0120]

- a. Ma f A遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が低いこと

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

[0121]

「膵島」とは、インスリン産生細胞よりも分化段階が進んだ細胞を意味し、成熟した膵β細胞を含み、成熟した膵β細胞のマーカーであるMa f A、UCN3、及びIAPPの少なくとも一つの発現により特徴付けられる細胞である。膵島は、健常人より単離されたものを用いることができる。

[0122]

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

[0123]

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

[0124]

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

[0125]

b. Ki67陽性細胞の割合が低いこと

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

[0126]

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

[0127]

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

[0128]

インスリン産生細胞におけるKi67+細胞の割合は、約3%未満、約1.5%未満、好ましくは約1%未満、より好ましくは約0.8%未満、さらに好ましくは約0.5%未

満である。

[0129]

本特徴は本発明のインスリン産生細胞において、K i 6 7 +細胞の混入・残存がほとんどないか、低い割合であることを示す。K i 6 7 +細胞はその増殖性の高さから、レシピエントへの悪影響や移植された細胞の長期の生着に影響を及ぼす虞があり、その混入・残存は好ましくない場合がある。

[0130]

c. グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと

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

[0131]

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

[0132]

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

[0133]

d. グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと

本発明のインスリン産生細胞は、グルコース刺激性インスリン分泌 (G S I S : G l u c o s e S t i m u l a t e d I n s u l i n S e c r e t i o n) 応答を示す。

インスリン産生細胞におけるG S I S応答は、従来公知の手法（例えば、米国出願第11/773,944号）に準じて行うことができ、例えば、培地中に分泌されるC-ペプ

チドの量を測定することにより評価することができる。C-ペプチドは、プロインスリンの成熟化の間に、インスリンに対して等モル量にて産生される分解産物である。C-ペプチドの量を測定は、例えば、抗C-ペプチドモノクローナル抗体を用いたELISAにより行うことができる。

[0134]

e. クロモグラニンA陽性細胞の割合が高いこと

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

[0135]

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

[0136]

インスリン産生細胞における、Chga+細胞の割合は好ましくは約50%以上（例えば、約55%以上）、より好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、とりわけ好ましくは約90%以上とすることができる。インスリン産生細胞におけるChga+細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約95%未満、約99%未満とすることができる。インスリン産生細胞における、Chga+細胞の割合は、約93%以上であってもよい。

[0137]

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

[0138]

f. アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと

本発明のインスリン産生細胞は、アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を約0.

0.1%未満の割合で含むことを特徴とする。

[0139]

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

[0140]

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

[0141]

アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞は、多能性を示す他のマーカーをさらに発現していてもよい。多能性幹細胞の多能性を示す他のマーカーとしては、Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81等から選択される少なくとも一つを利用することができる。

[0142]

本発明のインスリン産生細胞は、凍結保存された状態であってもよい。凍結保存された本発明のインスリン産生細胞は解凍して、凍結保存に付されたことのない新鮮なインスリン産生細胞と同様に、膵島様細胞へと分化・成熟し、ホルモン分泌することができる。凍結保存及び解凍は、当該分野で通常用いられる手法により行うことができる。

[0143]

本発明のインスリン産生細胞の製造は、下に詳述する手法により行うことができる。

[0144]

3. 膵島様細胞

本明細書において「膵島様細胞」とは、上述のインスリン産生細胞を分化誘導して得られる成熟細胞を意味しており、生体内での膵発生にて得られる「膵島」と同様に、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こと、また、膵 α 細胞の成熟マーカーであるグルカゴンを発現することによって特徴付けられる細胞を意味する。

[0145]

より詳細には、本明細書において「膵島様細胞」は、以下の(a)～(d)：

- (a) クロモグラニンA陽性細胞(ChgA+細胞)の割合が高いこと、
 - (b) Ki67陽性細胞(Ki67+細胞)の割合が低いこと、
 - (c) グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞(Gcg+Ins-細胞)の割合が高いこと、
 - (d) 低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること、
- から選択される一又は複数により特徴付けることができる。ここで「複数」とは、2、3、又は4を意味する。

(a)～(d)の特徴の有無は、インスリン産生細胞を分化誘導してから(例えば、生体内に移植してから)、1週間以降、好ましくは2週間以降に評価することができ、この期間の上限は特に限定されないが1年以内とすることができ、また、膵島様細胞における所定の細胞の割合とは、移植片に由来する細胞塊の全細胞数に対する割合を意味する。

[0146]

- (a) ChgA+細胞の割合が高いこと

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

[0147]

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

[0148]

(b) Ki67+細胞の割合が低いこと

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

[0149]

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

[0150]

(c) Gcg+Ins-細胞の割合が高いこと

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

[0151]

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

[0152]

(d) 低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること

本発明の膵島様細胞は、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有することを特徴とする。「低血糖に応答したインスリン分泌作用」とは、低血糖時から1時間以内、2時間以内、3時間以内、4時間以内、又は5時間以内にインスリン分泌量が増加することを意味する。「低血糖」とは血中又は培地中のグルコース濃度が、約70mg/dL以下である

場合を意味する。インスリン分泌量の測定は従来公知の任意の手段で行うことができ、特に限定はされないが、血中又は培地中のC-ペプチド量を測定することにより行うことができる。

[0153]

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

[0154]

4. 細胞の製造方法

本発明のインスリン産生細胞は、多能性幹細胞より分化誘導して得ることができる。多能性幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導は、以下の分化誘導工程を利用して行うことができる：

工程1) 多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞へと分化誘導する；

工程2) 胚体内胚葉細胞から原腸管細胞へと分化誘導する；

工程3) 原腸管細胞から後方前腸細胞へと分化誘導する；

工程4) 後方前腸細胞から膵前駆細胞へと分化誘導する；

工程5) 膵前駆細胞から内分泌前駆細胞へと分化誘導する；

工程6) 内分泌前駆細胞からインスリン産生細胞へと分化誘導する。

以下、各工程を説明するが、各細胞への分化誘導はこれらの手法に限定されない。

[0155]

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。

[0156]

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

[0157]

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。

[0158]

培地にはさらに、ROCK阻害剤、GSK3β阻害剤を添加することができる。

[0159]

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CHIR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。

[0160]

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5~20 μM、好ましくは5~15 μM、特に好ましくは約10 μMである。

[0161]

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。

[0162]

培養開始時の細胞数としては、特に限定されず、 $22000 \sim 150000 \text{ cells/cm}^2$ 、好ましくは $22000 \sim 100000 \text{ cells/cm}^2$ 、より好ましくは $22000 \sim 80000 \text{ cells/cm}^2$ 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。

[0163]

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

[0164]

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。

[0165]

(1) 第1の培養

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

[0166]

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。

[0167]

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。

[0168]

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。

[0169]

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

[0170]

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

M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。

[0171]

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

[0172]

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、5万～100万細胞個/cm²、好ましくは15万～30万細胞個/cm²、より好ましくは約20万細胞個/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、1万～100万細胞個/mL、好ましくは10万～50万細胞個/mLとすることができる。

[0173]

(2) 第2の培養

「インスリンが作用しない条件」とは、インスリンによる細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない条件を意味する。「細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じない」とは、当該インスリンシグナル伝達経路の活性化が全く生じないことを意味するだけでなく、インスリン非存在下における当該インスリンシグナル伝達経路の活性化と比べて有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない場合も意味するものである。したがって、「インスリンが作用しない条件」とは、例えば、培地中にインスリンが含まれないこと、あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合で

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

[0174]

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

[0175]

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。

[0176]

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

[0177]

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。

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。

[0178]

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。

[0179]

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。

[0180]

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。

[0181]

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。

[0182]

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

[0183]

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。

[0184]

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。

[0185]

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。

[0186]

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。

[0187]

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

[0188]

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。

[0189]

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。

[0190]

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。

[0191]

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。

[0192]

また培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0193]

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。

[0194]

工程3) で得られた後方前腸細胞を、既報(Toyoda et al., Stem Cell Research (2015) 14, 185-197) に従い、0.25%トリプシン-EDTAで処理後にピペッティングすることにより分散し、0.25%トリプシン-EDTAを遠心分離して懸濁した後、工程4) の新しい培地に再播種する。

[0195]

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。

[0196]

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。

[0197]

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。

[0198]

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）、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、KGF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、EGF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。

[0199]

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。

[0200]

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。アクチビンA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。

[0201]

また、培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

[0202]

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、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。

[0203]

また細胞培養は、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、Type I-collagen、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。

[0204]

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。

[0205]

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。培養期間は2日～3日、好ましくは約2日である。

[0206]

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

[0207]

また細胞培養は、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。

[0208]

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。

[0209]

工程6) インスリン産生細胞への分化

工程 5) で得られた内分泌前駆細胞を、さらに FGF R 1 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 14 日～30 日、好ましくは約 14～20 日である。

[0210]

培地は、上記工程 1) にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報 (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) に従い、ALK5 インヒビター I I、T3、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、T3、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 T3、ALK5 インヒビター I I、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。

[0211]

また細胞培養は、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。

[0212]

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。

[0213]

培地には、FGF R 1 阻害剤を、FGF R 1 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、 $4\ \mu\text{M}$ 未満、 $3\ \mu\text{M}$ 未満、 $2\ \mu\text{M}$ 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、 $0.1\ \mu\text{M}$ 以上、好ましくは $0.5\ \mu\text{M}$ 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、 $5\ \mu\text{M}$ 未満 $0.1\ \mu\text{M}$ 以上であり、より好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 未満 $0.5\ \mu\text{M}$ 以上である。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、少なくとも12時間、好ましくは24時間以上、2日以上、4日以上、8日以上、10日以上、又は15日以上行うことができる。FGFR1阻害剤の存在下における培養は、4日以上行うことが好ましい。例えば、工程6)の最後の約4～15日、好ましくは最後の約4～7日間について、FGFR1阻害剤の存在下における培養を行うことができる。FGFR1阻害剤による処理期間中も培地の交換は可能であり、培養スケジュールにしたがって、FGFR1阻害剤が添加された交換前と同じ組成を有する培地又は異なる組成を有する培地と交換することができる。

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

[0214]

工程6)で得ら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。

[0215]

5. 膵島様細胞への分化

本発明のインスリン産生細胞は、動物生体内に移植することによって膵島様細胞に分化誘導することができる。

[0216]

「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。

[0217]

移植は、細胞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、移植対象の、年齢、体重、移植部位の大きさ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～ 10×10^{11} 細胞程度とすることができる。移植された細胞は、生体内環境において分化誘導され、膵島様細胞へと分化することができる。また、移植される細胞数、移植対象の年齢、体重、移植部位等の要因に応じて変化し得るが、移植してから1週間以降、好ましくは2週間以降には、移植されたインスリン産生細胞は膵島様細胞へと分化・成熟する。得られた膵島様細胞は、その後、回収されてもよいし、そのまま生体内に留置してもよい。

[0218]

6. 用途

本発明のインスリン産生細胞は、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とすることにより、それを必要とする患者に対して、安全に投与することができる。

[0219]

「薬理学的に許容される担体」はインスリン産生細胞と共に生体内への移植を可能とし、移植されたインスリン産生細胞が膵島様細胞へと分化・成熟することを可能とするものであればよく、所望の剤形に応じたものを適宜利用することができる。例えば、「薬理学的に許容される担体」の例として、ハイドロゲルが挙げられる。ハイドロゲルは生体適合性及び／又は生分解性のポリマーからなるものが好ましく、このようなハイドロゲルとしては、アルギン酸、フィブロネクチン、ゼラチン、コラーゲン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸等）、ラミニン、ビトロネクチン、ならびにこれらの塩又はエステルから選択される一又は複数からなるものを利用することができる。例えば、ハイドロゲルとしてアルギン酸塩（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）又は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)を用いて調製されたアルギン酸を含むゲル(WO 2010/032242、WO 2011/154941)を好適に利用することができる。ハイドロゲルは、そのゲル中にインスリン産生細胞を分散させて用いることができる。

[0220]

また、インスリン産生細胞、又は医薬は、これらを収容可能なデバイス中に含めることができる。デバイスはインスリン産生細胞、又は医薬と共に生体内への移植を可能とし、移植されたインスリン産生細胞が膵島様細胞へと分化・成熟することを可能とするものであればよく、任意の形状及び材質からなるものを利用することができる。例えば、このようなデバイスの例として、生体適合性及び／又は生分解性のポリマー(例えば、ポリグリコール酸、ポリ乳酸等)、セラミックス、金属(例えば、チタン、ステンレス、コバルト、又はそれらの合金等)からなるものを利用することができる。デバイスの形状は特に限定されず、インスリン産生細胞、又は医薬を収容可能なカプセル、バッグ、チャンバー等の形状とすることができる。デバイスはその内部と外部とを連通可能とする多孔質部、孔、通路等を有することが好ましい。

[0221]

本発明のインスリン産生細胞又は医薬は、凍結保存された形態で供給することができ、使用時に解凍して用いることができる。

[0222]

本発明のインスリン産生細胞又は医薬は、それを必要とする患者の生体内に移植して用いることができる。移植は、細胞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、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。好ましくは、侵襲度の低い皮下移植である。移植されるインスリン産生細胞は、治療上有効量を投与すればよく、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 $\sim 10 \times 10^{11}$ 細胞程度とすることができる。

[0223]

移植されたインスリン産生細胞は生体内で分化・成熟して膵島様細胞となり、疾患、障害、又は症状を治療又は予防するのに有用な機能を発揮する。すなわち、本発明のインスリン産生細胞又は医薬はプロドラッグとして利用することができる。

[0224]

本発明のインスリン産生細胞又は医薬によれば、患者生体内において膵島様細胞を生成することができ、膵島様細胞の分泌するインスリンやグルカゴンの働きにより患者における血糖値（グルコース）のレベルを改善及び／又は維持することができる。

[0225]

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

[0226]

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

[0227]

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

[0228]

実施例1：インスリン産生細胞の成熟度と増殖性細胞の混入率

1. 方法

(1) インスリン産生細胞の作製

Ff-I14s04 iPS細胞株からインスリン産生細胞への分化誘導は、上記工程1)～6)や既報(Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133)に従い実施した。

すなわち、iPS細胞を $10\mu\text{M}$ のROCK阻害剤(Y-27632)を含むiPS細胞培地に懸濁し、細胞計数装置NC200(ChemoMetec社)を用いて計数し、 $7.5\times 10^4\text{ cells/mL}$ に調整し、 2 mL/well ($75\times 10^4\text{ cells/well}$)でiMatrixをコートしたプレートに播種しインキュベートした。次いで、インスリンが作用する条件下、すなわち、分化誘導因子(GSK3 β 阻害剤($3\mu\text{M}$ CHIR99021)、低用量(10 ng/mL)のアクチビンA)を含む培地(DMEM-high glucose-GlutaMAX-pyruvate/2%B27(インスリンを含む)/Penicillin Streptomycin/1%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、すなわち、分化誘導因子(低用量(10 ng/mL)のアクチビンA)を含む培地(DMEM-high glucose-GlutaMAX-pyruvate/2%B27(インスリンを含まない)/Penicillin Streptomycin/1%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。得られた胚体内胚葉細胞を、 50 ng/mL KGFを含む培地(Improved MEM/1%B27(インスリンを含む)/Penicillin Streptomycin)、次いで、 50 ng/mL KGF、 100 ng/mL ノギン、 $0.5\mu\text{M}$ シクロパミン、 10 nM TTNPB及び $250\mu\text{M}$ ビタミンCを含む培地(Improved MEM/1%B27(インスリンを含む)/P

enisilin Streptomycin) で培養して得られた後方前腸細胞を回収し、 $0.1 \mu\text{M}$ ROCK阻害剤、 100 ng/mL KGF、 50 ng/mL EGF、 10 mM ニコチンアミド及び $250 \mu\text{M}$ ビタミンCを含む培地 (Improved MEM/1% B27 (インスリンを含む) /Penicillin Streptomycin) に懸濁し、 $175 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ に調整し、 $350 \times 10^4 \text{ cells/well}$ でiMatrixをコートしたプレートに再播種して培養した。得られた細胞を再度回収し、 $0.25 \mu\text{M}$ SANT-1、 50 nM レチノイン酸、 $10 \mu\text{M}$ ALK5インヒビターII、 100 nM LDN、 $1 \mu\text{M}$ T3、 50 ng/mL bFGF、 $1 \mu\text{M}$ XAV、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632を含む培地 (Improved MEM/1% B27 (インスリンを含む) /Penicillin Streptomycin) に懸濁し、 $20 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ に調整し、 $3 \times 10^4 \text{ cells/well}$ で細胞非接着96well plate (住友ベークライト) に再播種して培養した。

得られた細胞集団を $10 \mu\text{M}$ ALK5インヒビターII、 $1 \mu\text{M}$ T3、 $100 \mu\text{M}$ LDN、 $1 \mu\text{M}$ γ -secretase阻害剤 (RO-4929097)、 $250 \mu\text{M}$ アスコルビン酸と $1 \mu\text{M}$ FGF受容体1阻害剤 (PD-166866) を含む培地 (Improved MEM/1% B27 (インスリンを含む) /Penicillin Streptomycin) で培養して、インスリン産生細胞を得た。

[0229]

(2) タンパク質発現の評価

Ff-I14s04 iPS細胞株から作製したインスリン産生細胞及び健常人から単離されたヒト膵島 (以下、「islet」と記載する) のタンパク質発現 (インスリン (INS)、NKX6.1、グルカゴン (GCG)、Ki67) をフローサイトメトリーにより測定した。また、対照としてFGF受容体1阻害剤 (PD-166866) の処置なしで調製されたインスリン産生細胞のプロトタイプ (以下、「プロトタイプ」と記載する) についても同様に測定した。

[0230]

(3) 遺伝子発現量の評価

プロトタイプ、インスリン産生細胞及び *islet* の各サンプルより採取した全RNA分画から合成したcDNAを用いてインスリン、グルカゴン及び成熟膵 β 細胞マーカーとして知られる *MafA*、*UCN3* のmRNA発現量を定量PCR法により測定した。コントロール遺伝子として同様に測定した *GAPDH* mRNA の発現量によりノーマライズを行った。

[0231]

2. 結果

(1) タンパク質発現の評価

フローサイトメトリーによる測定結果を図1に示す。また、インスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率、インスリン陽性/NKX6.1陰性細胞率、クロモグラニンA陽性細胞率、*Ki67*陽性細胞率を表1に示す。インスリン産生細胞は *islet* と同等もしくはそれ以上のインスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率を示した。一方で、インスリン陽性/NKX6.1陰性細胞率については、*islet* と比較し明らかに高いことが確認された。インスリン産生細胞とプロトタイプを比較すると、インスリン産生細胞においてインスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率、インスリン陽性/NKX6.1陰性細胞率、及びクロモグラニンA陽性細胞率が上昇し、*Ki67*陽性細胞率については顕著に減少した。

[0 2 3 2]

[表 1]

Cell line	Ff-I14-s04		
Cell type	プロトタイプ	インスリン 産生細胞	islet
インスリン陽性/NKX6.1 陽性細胞率	30.8 %	37.8 %	31.8 %
クロモグラニン A 陽性細胞率	83.9 %	94.7 %	88.7 %
インスリン陽性/NKX6.1 陰性細胞率	21.8 %	28.2 %	2.3 %
Ki67 陽性細胞率	5.5 %	0.4 %	n. d.

n. d., not determined

[0 2 3 3]

(2) 遺伝子発現量の評価

プロトタイプ、インスリン産生細胞及び i s l e t におけるインスリン、グルカゴン、M a f A 及び U C N 3 の発現レベルを表 2 及び図 2 に示す。

上記フローサイトメトリーによるインスリン陽性細胞率、グルカゴン陽性細胞率の結果と一致して、プロトタイプに比べて、インスリン産生細胞においてインスリン、グルカゴン発現量の増加が認められ i s l e t の～50%程度のレベルに達した。一方で、インスリン産生細胞における M a f A 及び U C N 3 の発現レベルはヒト膵島に比べて極めて低いことが判明した。

[0 2 3 4]

[表 2]

Cell line	Ff-I14-s04		
Cell type	β細胞	インスリン 産生細胞	islet
INS 遺伝子	121	162	326
GCG 遺伝子	2.4	6.9	25.7
MafA 遺伝子	0.01	0.01	0.39
UCN3 遺伝子	0.01	0.02	0.44

[0 2 3 5]

以上の結果は、インスリン産生細胞は膵島と同程度のβ細胞の割合を含む細胞凝集塊であるが、未だ完全に成熟した膵島ではないことを示す。また、インスリン産生細胞は増殖性を有する目的外細胞（Ki67陽性細胞）の混入が極めて少ないことが確認された。

[0 2 3 6]

実施例 2：インスリン産生細胞における未分化状態を維持した iPS 細胞の混入率

1. 方法

未分化状態を維持した iPS 細胞の高感度検出 (High efficient culture cell assay)

Ff-I14s04 iPS 細胞を分化誘導因子 (GSK3β 阻害剤、ROCK 阻害剤及び低用量のアクチビンA) を含む培地 (RPMI / 1% B27 (インスリンを含む) / Penicillin Streptomycin / ジメチルスルホキシド) 中で培養して得られた胚体内胚葉細胞より、膵前駆細胞 (インスリン産生細胞生成過程の中間体細胞) を分化誘導し、 6×10^5 細胞の膵前駆細胞懸濁液に、0、6 (0.001%)、30 (0.005%) 細胞の未分化状態を維持した iPS 細胞をスパイクし、10cm ディッシュに

播種し、未分化状態を維持した i P S 細胞にとって好条件である A K 0 3 N 培地および i M a t r i x - 5 1 1 コーティング条件下で 7 日間培養した。また、同条件において、i P S 細胞をスパイクしない 6×10^5 細胞の腭前駆細胞のみも培養した。培養終了後、アルカリホスファターゼ染色により生成された未分化状態を維持した i P S 細胞のコロニーを視覚化し、その数をカウントした。

[0 2 3 7]

2. 結果

結果を図 3 に示す。6 細胞及び 3 0 細胞の未分化状態を維持した i P S 細胞をスパイクした腭前駆細胞培養ディッシュにおいて、それぞれ平均 3 個及び 1 6 個のコロニーが観察された。一方、スパイクしていない腭前駆細胞培養ディッシュではコロニーはまったく観察されなかった。以上の結果から、現在の分化誘導法で生成された腭前駆細胞およびその後生成されるインスリン産生細胞において、未分化状態を維持した i P S 細胞の混入は 0. 0 0 1 % 以下であることが示された。

以上の結果より、インスリン産生細胞には未分化状態を維持した i P S 細胞の混入がない、又は極めて少ないことが確認された。

[0 2 3 8]

実施例 3：凍結融解によるインスリン産生細胞への影響

1. 方法

(1) インスリン産生細胞の凍結融解後の再凝集

F f - I 1 4 s 0 4 i P S 細胞を分化誘導因子 (G S K 3 β 阻害剤、R O C K 阻害剤及び低用量のアクチビン A) を含む培地 (R P M I / 1 % B 2 7 (インスリンを含む) / P e n i s i l i n S t r e p t o m y c i n / ジメチルスルホキシド) 中で培養して胚体内胚葉細胞を得たこと以外は実施例 1 に記載の方法と同じ方法により作製したインスリン産生細胞を市販の凍結保存液 (C r y o S t o r C S 1 0 (B i o L i f e S o l u t i o n s 社)) を利用した緩慢凍結法により凍結した。具体的には、1 m L の凍結

保存液に 3×10^6 細胞を懸濁し、凍結バイアルに注入した。凍結処理容器（バイセル、日本フリーザー（株））にバイアルを入れ、 -80°C で保存した。

[0239]

解凍は、凍結バイアルを ThawSTAR 凍結細胞融解ステーション（Astero Bio 社）で加温し、急速に解凍した。解凍された細胞懸濁液を 10 mL の培養液に添加した。遠心分離により上澄みを除去した後、細胞を $10 \mu\text{M}$ の ROCK 阻害剤（Y-27632）を含む培地に懸濁し、細胞計数装置 NC200（Chemometec 社）を用いて解凍後の生細胞数、細胞生存率を測定した。また、解凍後の細胞を多孔プレート（Kuraray 社）に播種し、3 次元培養することにより細胞凝集体を作製した。

[0240]

（2）凍結融解後インスリン産生細胞の生体内移植

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 マウスの腎被膜下に、凍結融解後にインスリン産生細胞を移植した。移植後の経過観察は血中ヒト C-ペプチド濃度と血糖値を測定した。

[0241]

2. 結果

（1）インスリン産生細胞の凍結融解後の再凝集

解凍直後の細胞生存率は 80.9% であった。また、凍結バイアルに注入した細胞の 77.0% の生細胞を回収することができた。3 次元培養により 4 日培養した細胞の位相差顕微鏡像を図 4 に示す。図 4 に示す通り、凍結保存を行った細胞は、生存し細胞凝集体を形成する能力を保持する事は明らかである。

[0242]

凍結保存前及び解凍・再培養後の細胞について、INS、NKX6.1 及び Ki67 の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を図 5 に示す。また、インスリン陽性率、Ki67 陽性細胞率を表 3 に示す。図 5、表 3 に示す通り、凍結保存前後におけるインス

リン陽性細胞率の減少、Ki67陽性細胞の増加はなかった。

[0243]

[表3]

	凍結保存前	解凍・再培養後
インスリン陽性細胞率	52.7 %	85.7 %
Ki67 陽性細胞率	1.3 %	0.3 %

[0244]

(2) インスリン産生細胞の生体内移植

移植後の経過観察として測定した血中ヒトC-ペプチド濃度と血糖値の結果を表4に示す。腎被膜下移植した凍結融解後のインスリン産生細胞は、移植4ヶ月後において血液中にヒトC-ペプチド分泌が確認され、高血糖改善作用を示した。

[0245]

[表4]

	移植時点	移植4ヶ月後
血中ヒトC-ペプチド濃度 (pM)	n.d.	982.4 (N=1)
血糖値 (mg/dL)	500 (N=1)	117 (N=1)

以上の結果より、インスリン産生細胞は凍結融解しても分化誘導効率が保持されることが確認された。

[0246]

実施例4：生体内に移植されたインスリン産生細胞

1. 方法

(1) 生体内へのインスリン産生細胞の移植

実施例3と同様の方法により作製されたインスリン産生細胞を、ストレプトゾトシン(S

TZ)により糖尿病を誘発した免疫不全NOD/SCIDマウスの腎被膜下、及び糖尿病を自然発症するAkita遺伝子変異を有するNOD/SCIDマウスの皮下にそれぞれ移植した。皮下への移植には、インスリン産生細胞の担体としてFibrinゲルを使用した。移植後、血液中のヒトC-ペプチド(インスリン産生細胞由来インスリンの指標)の濃度及び血糖値を測定し、インスリン産生細胞の生着を評価した。

[0247]

(2) グルコース負荷あるいは低血糖に対するインスリン産生細胞の応答の評価

移植されたインスリン産生細胞が生着したマウスを用いて、一過的に血糖値を上昇させるためにグルコース強制経口投与、あるいは低血糖を誘発するためにインスリン製剤グラルギンを皮下投与し、その後のインスリン産生細胞の応答を血中ヒトC-ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度を測定して評価した。対照として非移植・非糖尿病NOD/SCIDマウスを用い、内因性膵島由来のマウスC-ペプチドやグルカゴンの血中濃度を測定した。

[0248]

2. 結果

(1) 生体内に移植したインスリン産生細胞の生着評価

移植後の血中ヒトC-ペプチド濃度及び血糖値の測定結果を表5に示す。いずれの動物及び移植部位においても移植から3-4ヶ月後には血液中にヒトC-ペプチドを検出した。マウスにおいては移植から3ヶ月後までに高血糖が改善し、血糖値は5-6ヶ月後まで正常レベルを維持し、移植したインスリン産生細胞が長期生着していることが示された。

[0 2 4 9]

[表 5]

動物-移植部位	血中ヒト C-ペプチド濃度 (pM)		血糖値 (mg/dL)		
	移植 3-4 ヶ月後	5-6 ヶ月後	移植時点	3 ヶ月後	5-6 ヶ月後
STZ NOD/SCID マウス-腎被膜下	898±335 (N=3)	915, 1060 (N=2)	516±33 (N=4)	113±64 (N=3)	117, 91 (N=2)
Akita NOD/SCID マウス-皮下	2436±516 (N=4)	2195±882 (N=4)	562±31 (N=4)	83±27 (N=4)	61±7 (N=3)

N=3 以上は平均値±標準偏差、N=2 は個別データ

[0 2 5 0]

(2) グルコース負荷あるいは低血糖に対するインスリン産生細胞の応答の評価

グルコース負荷後の血中ヒト C-ペプチド濃度を図 6 に、グラルギン投与後の血中ヒト C-ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度を図 7 に示す。インスリン産生細胞の移植から 3-4.5 ヶ月後において、血中ヒト C-ペプチド濃度はグルコース負荷により一過的に上昇し、一方でグラルギン投与により低血糖を誘発した際には低下した。これらの変化は非移植・非糖尿病マウスにおける内因性マウス C-ペプチドの血中濃度の変化と同様だった。また、インスリン産生細胞の移植マウスでは非移植・非糖尿病マウスに比べて血中グルカゴン濃度が高値を示し、インスリン産生細胞がグルカゴンを血液中に放出していることが示唆された。

[0 2 5 1]

以上の結果から、生体内に移植されたインスリン産生細胞は長期生着し、生体内に移植されたインスリン産生細胞は長期生着し、血糖値の変動に応答して内因性膵島に類似した生理的なインスリン調節作用を発揮することが示された。

[0 2 5 2]

実施例 5：皮下に移植されたインスリン産生細胞

1. 方法

(1) インスリン産生細胞の生体内移植

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マウスに、アルギン酸ハイドロゲルに分散させたインスリン産生細胞を皮下移植した。移植後の経過観察は血中ヒトC－ペプチド濃度と血糖値を測定することにより実施した。移植3ヶ月後の時点で移植片を摘出した。

[0253]

(2) 移植片中のタンパク質発現の評価

摘出した移植片を単一細胞化処理後、固定し、インスリン産生細胞のタンパク質発現（インスリン、NKX6.1、グルカゴン、クロモグラニンA）をフローサイトメトリーにより測定した。また摘出した移植片及び移植時点のインスリン産生細胞を固定、脱水後に凍結切片を作製し、目的タンパク質発現（インスリン、グルカゴン）を免疫組織染色により評価した。

[0254]

2. 結果

(1) インスリン産生細胞の生体内移植

移植後の経過観察として測定した血中ヒトC－ペプチド濃度と血糖値の結果を表6に示す。皮下移植したインスリン産生細胞は、移植1－3ヶ月後において血液中にヒトC－ペプチド分泌が確認され、高血糖改善作用を示した。

[0 2 5 5]

[表 6]

	移植時点	移植 1 ヶ月後	移植 3 ヶ月後
血中ヒト C-ペプチド濃度 (pM)	n. d.	490. 4, 307. 6 (N=2)	714. 3 (N=1)
血糖値 (mg/dL)	568, 457 (N=2)	238, 196 (N=2)	62 (N=1)

[0 2 5 6]

(2) 移植片中のタンパク質発現の評価

インスリン陽性／NKX 6. 1 陽性細胞率、インスリン陽性／NKX 6. 1 陰性細胞率、グルカゴン陽性／インスリン陰性細胞率、クロモグラニンA陽性率の測定結果を表 7、図 8 に示す。移植時点と比較して、移植 3 ヶ月後の移植片においてグルカゴン陽性／インスリン陰性細胞率の上昇及びインスリン陽性／NKX 6. 1 陰性細胞率の減少が確認された。また移植 3 ヶ月後の移植片は高い割合のクロモグラニンA陽性の内分泌細胞で構成されることが確認された。摘出した移植片の免疫組織染色の結果を図 9 に示す。移植時点と比較して、移植 3 ヶ月後の移植片においてグルカゴン単陽性細胞率の上昇が確認され、生体内で成熟した膵島様細胞へ分化したことが示唆された。

[0 2 5 7]

[表 7]

	移植時点	移植 3 ヶ月後
インスリン陽性/NKX6.1 陽性細胞率	46.0 %	19.3 %
インスリン陽性/NKX6.1 陰性細胞率	32.0 %	7.6 %
グルカゴン陽性/インスリン陰性細胞率	0.1%	32.1 %
クロモグラニン A 陽性細胞率	n. d.	96.2 %

[0 2 5 8]

以上の結果より、糖尿病マウスの皮下に移植されたインスリン産生細胞は、高い内分泌細胞の割合を維持するとともに、成熟した α 細胞を含む成熟した膵島様細胞へと生体内で分化することが確認された。

また、生体内で成熟した膵島様細胞は、増殖性を有する目的外細胞 (K i 6 7 陽性細胞) の混入が極めて少ないこと (例えば 3 %未満) が確認された。

請求の範囲

[請求項 1]

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞。

[請求項 2]

Ma f A遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が、膵島におけるMa f A遺伝子又はその遺伝子産物の発現量よりも低い、請求項1に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 3]

K i 6 7陽性細胞を3%未満の割合で含む、請求項1又は2に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 4]

グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を3%未満の割合で含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 5]

グルコース刺激性インスリン分泌（G S I S）応答を示す、請求項1～4のいずれか1項に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 6]

クロモグラニンA陽性細胞を45%超の割合で含む、請求項1～5のいずれか1項に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 7]

アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を0.01%未満の割合で含む、請求項1～6のいずれか1項に記載のインスリン産生細胞。

[請求項 8]

請求項1～7のいずれか1項に記載のインスリン産生細胞を含む医薬。

[請求項 9]

前記インスリン産生細胞がデバイス中に收容されている、請求項8に記載の医薬。

[請求項 10]

前記インスリン産生細胞がハイドロゲル中に分散されている、請求項 8 又は 9 に記載の医薬。

[請求項 1 1]

生体内に移植して用いられる、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 2]

皮下移植して用いられる、請求項 8 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 3]

糖尿病の治療において使用するための請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 4]

患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持に使用するための請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 5]

糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減するために用いられる、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 6]

生体内において膵島様細胞を分化誘導する方法において使用するための請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 1 7]

生体内において分化誘導された膵島様細胞が、クロモグラニン A 陽性細胞を 5 0 % 以上の割合で含む、請求項 1 6 に記載の医薬。

[請求項 1 8]

生体内において分化誘導された膵島様細胞が、K i 6 7 陽性細胞を 3 % 未満の割合で含む、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の医薬。

[請求項 1 9]

生体内において分化誘導された膵島様細胞が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を 1 0 % 以上の割合で含む、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 2 0]

生体内において分化誘導された膵島様細胞が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を

有する、請求項 16～19 のいずれか 1 項に記載の医薬。

[請求項 21]

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞の製造方法であって、

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い胚体内胚葉細胞を製造する工程、ならびに

内分泌前駆細胞を、FGFR1阻害剤を含む培地中で培養し前記インスリン産生細胞を製造する工程

を含む、方法。

[請求項 22]

膵島様細胞の生成方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞を生体内に移植して、膵島様細胞へと分化誘導することを含む、方法。

[請求項 23]

糖尿病を治療する方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞を生体内に移植して、膵島様細胞へと分化誘導することを含む、方法。

[請求項 24]

患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールを改善及び／又は維持する方法であって、

インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞を生体内に移植して、膵島様細胞へと分化誘導することを含む、方法。

[請求項 25]

糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する方法であって、
インスリン陽性かつNKX6.1陽性の細胞を30%以上の割合で、かつインスリン陽性かつNKX6.1陰性の細胞を15%超の割合で含む、インスリン産生細胞を生体内に移植して、膵島様細胞へと分化誘導することを含む、方法。