

明細書

膵ホルモン産生細胞の製造法

技術分野

[0001]

- 5 本発明は、膵ホルモン産生細胞の製造法、および該製造法により得られた膵ホルモン産生細胞を含む医薬等に関する。

[0002]

(発明の背景)

- 膵臓は、内分泌腺（内分泌細胞）と外分泌腺（外分泌細胞）を有し、両方で
10 重要な役割を担っている器官である。外分泌細胞は主に膵リパーゼ、トリプシン、エラスターゼ、膵アミラーゼなどの消化酵素を分泌する役割を果たしている。

- 内分泌細胞は膵ホルモンを分泌する役割を果たし、膵 α 細胞からグルカゴン、膵 β 細胞からインスリン、膵 δ 細胞からソマトスタチン、PP細胞から膵ポリ
15 ペプチド（本明細書中、PPと略記する場合がある）が分泌されることが知られている。また、近年、胃分泌ホルモンであるグレリンが膵臓からも分泌されることが報告されている。

[0003]

- インスリンは、ブドウ糖の利用、蛋白の合成、中性脂肪の形成及び貯蔵を促
20 進し、血糖値を低下させ、血糖を正しい濃度に保つ重要な役割を果たす。膵グルカ gon は、肝糖原分解、糖新生作用などを介する血糖上昇ホルモンとしてインスリンと並び糖代謝調節機構において重要な役割を担っている。ソマトスタチンは、ソマトスタチンレセプターへの結合を介して作用を発現し、膵臓でのグルカゴン、インスリン等の種々のホルモン分泌を抑制する。PPは、食事
25 対応してランゲルハンス島の細胞から分泌されるホルモンであり、飽食因子として知られ、食物摂取や体重増加を低減させる働きがある。グレリンは食物摂

取を刺激し、脂肪酸化を低下させることによって体重を増加させることが知られている。

[0004]

糖尿病は、インスリンが不足したりその働きが失われたりすることによって
5 発症する疾患であり、一度発症すると根治するのが難しい疾患である。糖尿病は、I型糖尿病（インスリン依存性糖尿病）とII型糖尿病（インスリン非依存性糖尿病）の大きく2つのタイプに分類することができる。

II型糖尿病は、インスリンに対し抵抗性をもつために発症する慢性疾患であり、食べ過ぎや運動不足によっておこる肥満やストレス等、生活習慣との関
10 わりで問題となっている糖尿病である。II型糖尿病は中高年で発症することが多く、糖尿病患者の多くはこの型である。

I型糖尿病は、自己免疫疾患やウイルス感染等によってインスリン産生細胞が破壊され、インスリンが体内に分泌されないことによっておこる慢性疾患である。体内で常に変化する血糖値を自動的にコントロールでき、かつ、患者の
15 負担を軽くできる治療法として、I型糖尿病患者に対し、膵臓移植又は膵島移植が行われている。これらの治療法によって正常な血糖値を達成することは可能であるが、移植技術は十分に確立しているとは言えず、また移植可能な膵臓又は膵島が不足しているのが現状である。また、移植片に対する免疫拒絶反応を回避するために、患者は免疫抑制剤を一生服用し続ける必要があり、感染症
20 の危険性や免疫抑制剤による副作用等の問題が残る。

[0005]

I型糖尿病について試みられている治療法の一つに、患者のインスリン産生細胞自体を再生し移植する方法がある。この方法によれば患者自身の体内でインスリンを作り出すことができる。また、患者由来の細胞であることから拒絶
25 反応の問題が解消される等、安全性の面でも有利である。

[0006]

インスリン産生細胞を得る方法としては、ES細胞から分化させる方法、患者の膵臓の組織幹細胞から分化させる方法、患者の膵管上皮由来細胞を体外に取り出して分化させる方法等が知られている。例えば、アクチビン (a c t i v i n) やレチノイン酸 (R A) を用いてヒトES細胞から膵β細胞を分化誘導する方法 (特許文献1、非特許文献1～4) やヒトES細胞からグルカゴン産生細胞 (α細胞) を分化誘導する方法 (非特許文献8)、ヒトiPS細胞から膵β細胞を分化誘導する方法 (非特許文献5～7)、ES細胞に、膵臓の発生に関わる重要な転写因子であり、インスリン産生細胞の発生、機能維持の役割も担っていることが知られているPDX1を導入して培養することによって
10 効率よくインスリン産生細胞を分化誘導する方法 (特許文献2) などが知られている。

[0007]

しかし、これらの方法によって得られるインスリン産生細胞は、正常な膵β細胞と比較してインスリン産生効率がかなり低く、細胞医療の応用に適用可能なインスリン産生細胞を効率的に得る方法の開発が依然として求められている。
15 さらに、得られる細胞数を糖尿病治療等のための実用化レベルまで増加させることが求められている。

[先行技術文献]

[特許文献]

20 [特許文献1] 特開2009-225661号公報

[特許文献2] 米国特許7534608号公報

[非特許文献]

[非特許文献1] E. Kroon et al., "Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo.", Nature Biotechnology (2008) Vol. 26, No.4:
25 443-452

[非特許文献2] K. A D' Amour et al., "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells.", Nature Biotechnology (2006) Vol. 24, No. 11: 1392-1401

[非特許文献3] W. Jiang, "In vitro derivation of functional
5 insulin-producing cells from human embryonic stem cells.", Cell Research (2007) 17: 333-344

[非特許文献4] J. H. Shim et al., "Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate.", Diabetologia (2007) 50:1228-1238

10 [非特許文献5] R. Maehra et al., "Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes.", PNAS (2009), vol. 106, No. 37: 15768-15773

[非特許文献6] MC. Nostro et al., "Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and
15 pancreatic specification of human pluripotent stem cells.", Development (2011), 138: 861-871

[非特許文献7] A. Rezania et al., "Production of functional glucagon-secreting alpha-cells from human embryonic stem cells.", Diabetes (2011), 60: 239-247

20 [非特許文献8] T. Thatava et al., "Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny.", Gene Ther (2011), 18: 283-293

発明の概要

25 発明が解決しようとする課題

[0008]

本発明の目的は、細胞医療の応用により適した膵ホルモン産生細胞の製造法、該製造法により得られた膵ホルモン産生細胞を含む医薬、および該細胞を用いた糖尿病治療薬のスクリーニング方法を提供することである。

5 課題を解決するための手段

[0009]

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、段階的に分化誘導因子の種類やその組合せを変えること、および内胚葉細胞から細胞塊を形成させた後に浮遊状態で培養すること等によって、幹細胞からより膵発生を模倣した形
10 (三次元的な構造を維持した形)の膵ホルモン産生細胞を製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010]

すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1] 幹細胞を、以下の工程(1)～(6)に付すことを特徴とする、膵ホル
15 モン産生細胞の製造法：

- (1) 幹細胞を、Rhoキナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程
- (2) 前記(1)で得られた細胞を、GSK3阻害剤を含む培地で培養する工程
- (3) 前記(2)で得られた細胞を、GSK3阻害剤およびアクチビン受容体
20 様キナーゼ4, 7の活性化剤を含む培地で培養する工程
- (4) 前記(3)で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程
- (5) 前記(4)で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP
25 活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼ2, 3, 6の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ4, 5, 7の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程
- (6) 前記(5)で得られた細胞を、培地で培養する工程；

[2] 工程 (3) におけるアクチビン受容体様キナーゼ 4, 7 の活性化剤がアクチビンである、

上記 [1] 記載の製造法；

[3] 工程 (1) における R h o キナーゼ阻害剤が (+) - (R) - トランス
5 - 4 - (1 - アミノエチル) - N - (4 - ピリジル) シクロヘキサンカルボキ
サミド二塩酸塩である、

上記 [1] または [2] 記載の製造法；

[4] 工程 (2) および (3) における G S K 3 阻害剤が、
(i) 6 - [[2 - [[4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (4 - メチ
10 ル - 1 H - 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、および/または

(i i) (2' Z, 3' E) - 6 - ブロモインジルビン - 3' - オキシムであ
る、

上記 [1] ないし [3] のいずれかに記載の製造法；

15 [5] 工程 (5) におけるレチノイン酸受容体アゴニストがレチノイン酸であ
る、

上記 [1] ないし [4] のいずれかに記載の製造法；

[6] 工程 (5) における AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはア
クチビン受容体様キナーゼ 2, 3, 6 の阻害剤がドーソモルフィンである、

20 上記 [1] ないし [5] のいずれかに記載の製造法；

[7] 工程 (5) におけるアクチビン受容体様キナーゼ 4, 5, 7 の阻害剤
が 4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) - 5 - (2 - ピリジ
ニル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - ベンズアミドである、

上記 [1] ないし [6] のいずれかに記載の製造法；

25 [8] 工程 (5) における細胞増殖因子が塩基性線維芽細胞増殖因子である、
上記 [1] ないし [7] のいずれかに記載の製造法；

[9] 工程 (1) ~ (6) において、フィーダー細胞を実質的に用いない、上

記 [1] ないし [8] のいずれかに記載の製造法；

[10] 工程 (1) ～ (6) における培地が、血清を実質的に含まない、上記

[1] ないし [7] のいずれかに記載の製造法；

[11] 幹細胞が、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、胚性幹細胞 (ES 細

胞) 又はヒトの体性幹細胞である上記 [1] ないし [10] のいずれかに記載

の製造法；

[12] 臍ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、グルカゴニン産生細胞、ソ

マトスタチン産生細胞、臍ポリペプチド (PP) 産生細胞、及びグレリン産生

細胞からなる群より選択されるいずれかである上記 [1] ないし [11] のい

ずれかに記載の製造法；

[13] 内胚葉細胞を、以下の工程 (4') および (5') に付すことを特徴

とする、臍ホルモン産生細胞の製造法；

(4') 内胚葉細胞から細胞塊を形成させ、該細胞塊を培地中において浮遊

状態で培養する工程

(5') 前記 (4') で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、

AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチニン受容体様キナーゼ

1、2、3、6 の阻害剤、アクチニン受容体様キナーゼ 4、5、7 の阻害剤、

および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程；

[14] 上記 [1] ないし [13] のいずれかに記載の製造法で得られた臍ホ

ルモン産生細胞を含む、医薬；

[15] 以下の工程 (1) ～ (6) からなる群より選択されるいずれか 1 種以

上の工程によって得られた細胞を用いることを特徴とする、糖尿病治療薬のス

クリーニング方法；

(1) 幹細胞を、Rh キナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程

(2) 前記 (1) で得られた細胞を、GSK3 阻害剤を含む培地で培養する工

程

(3) 前記 (2) で得られた細胞を、GSK3 阻害剤およびアクチニン受容体

様キナーゼー 4, 7 の活性化剤を含む培地で培養する工程

(4) 前記 (3) で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程

(5) 前記 (4) で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 5 活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼー 2, 3, 6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼー 4, 5, 7 の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

(6) 前記 (5) で得られた細胞を、培地で培養する工程。

10 発明の効果

[0011]

本発明の製造法によれば、幹細胞からより膵発生を模倣した形の膵ホルモン産生細胞を製造することができる。また、前記工程 (1) ~ (6) のいずれか 1 種以上の工程によって得られた細胞は、糖尿病等の膵ホルモン産生及び／又は分泌異常に起因する疾患の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニ
15 ングに用いることができる。さらに本発明の細胞は、そのような疾患を治療するための細胞医療に用いることができ、三次元的な構造を維持しているので、従来の製造方法により得られる膵ホルモン産生細胞と比較しても、細胞医療への応用により適した細胞である。

20

図面の簡単な説明

[0012]

[図1] 各種の因子を用いてヒト i P S 細胞からの分化誘導を開始し、最初の 4 日間における原始線条マーカー (B r a c h y u r y) と内胚葉マーカー (S O X 1 7) の発現を定量 R T - P C R で 1 日ごとに測定した結果を示す。
25 各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である G A P D H の発現量に対する相対値で示した。培養 3 日目において B r a c h y u r y の発現量が一過

的に上昇し、4日目にはSOX17の発現量が顕著に増加した。

[図2] ヒトiPS細胞からアクチビンAとCHIR99021を用いて4日間分化誘導した細胞を、フィブロネクチンでコートした96穴プレートに再播種して1日間培養し、抗ヒトSOX17抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果を示す。SOX17陽性細胞の核はAlexa488により緑色を呈し(図中、SOX17と示す)、細胞の核はヘキスト33342によって青色を呈する(図中、Hoechstを示す)。また、それぞれの染色像を合成した図をMergeとして示す。大部分の細胞がSOX17タンパクを発現している様子が観察された。

10 [図3] ヒトiPS細胞についてCHIR99021を含む培地で2日間培養し、続いて、アクチビンAとCHIR99021、およびアクチビンAとBIOを用いて培養を行ったときのSOX17の発現を定量RT-PCRで1日ごとに測定した結果を示す。遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量に対する相対値で示した。CHIR99021およびBIOのどちらを用いても、SOX17の発現は培養4日目から経時的に上昇し、同様の発現パターンを示した。DMSOのみ添加のコントロールでは、SOX17の発現は上昇しなかった。

20 [図4] ヒトiPS細胞からアクチビンAとCHIR99021を用いて4日間分化誘導した細胞を、96穴スフェロイドプレートに播種して1日培養後、ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542及びbFGFを添加した1% B27を含むImproved MEM Zinc Option培地で8日間培養し、その後1% B27を含むImproved MEM Zinc Option培地に交換してさらに培養を継続したときのインスリンの発現解析の結果を示す(図中、Insulinと示す)。遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量に対する相対値で示した。インスリンの発現は、1% B27を含むImproved MEM Zinc Option培地に培養13日目で交換後、培養23日目まで経時的に上昇した。

〔図5〕 ヒト i P S 細胞からアクチビンAとCHIR99021を用いて4日間分化誘導した細胞を96穴スフェロイドプレートに播種して1日培養後、ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542及びbFGFの組合せ、又はドーソモルフィン、レチノイン酸及びSB431542の組み合わせを用いて8日間培養し、その後1% B27を含むImproved MEM Zinc Option培地で培養して19日目におけるインスリンの発現解析の結果を示す（図中、Insulinと示す）。遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量に対する相対値で示した。ドーソモルフィン、レチノイン酸及びSB431542の組み合わせで培養した場合よりも、ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542及びbFGFの組み合わせで培養した方が、培養19日目におけるインスリンの発現量が高かった。

〔図6〕 図4の方法と同様に分化誘導した培養21日目の細胞塊（sphere）を用いて凍結切片を作製し、抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果を示す。インスリン陽性細胞はAlexa568により赤色を（図中、Insulinと示す）、グルカゴン陽性細胞はAlexa488により緑色を呈し（図中、Glucagonと示す）、細胞の核はヘキスト33342によって青色を呈する（図中、Hoechstと示す）。また、それぞれの染色像を合成した図をMergeとして示す。インスリンを発現している細胞が細胞塊（sphere）内部に数多く認められ、グルカゴンを発現している細胞も一部認められた。

〔図7〕 BDマトリゲルまたはフィブロネクチンを基質として、ヒト i P S 細胞からアクチビンAとCHIR99021を用いて内胚葉を誘導した後、細胞塊（sphere）を形成させ、その後、さらに膵ホルモン産生前駆細胞、続いて膵ホルモン産生細胞へと分化誘導させたときの各種分化マーカーの発現解析の結果を示す。各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量に対する相対値で示した。SOX17の発現は分化に伴い顕著に減少し、PDX1とNGN3の発現は培養17日目まで徐々に増加した。インス

リン発現は培養 17 日目から急激に増加した。これら各種分化マーカーの経時的な発現変動は、BD マトリゲルまたはフィブロネクチンを基質として誘導した内胚葉細胞を用いた場合でほとんど同様であった。

- 〔図 8〕 内胚葉から細胞塊 (sphere) を形成させて分化誘導する工程〔工程 (4) 〕を含む、フィーダー細胞や血清を使用しない、膵ホルモン産生細胞の製造法の概略を示す。

発明の詳細な説明

〔0013〕

- 10 以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

〔0014〕

- 本発明において「膵ホルモン産生細胞」とは、膵ホルモンを産生する能力を有する細胞を意味する。該膵ホルモン産生細胞は常に膵ホルモンを産生している必要はなく、膵ホルモンの産生能力を有していればよい。従って、産生される膵ホルモン量は特に限定されない。膵ホルモンとしては、例えば、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド、グレリンが挙げられる。膵ホルモン産生細胞としてはインスリン産生細胞（膵 β 細胞と同義）、グルカゴン産生細胞（膵 α 細胞と同義）、ソマトスタチン産生細胞（膵 δ 細胞と同義）、膵ポリペプチド (PP) 産生細胞、グレリン産生細胞が挙げられる。これらの中でも、インスリン産生細胞が好ましい。

〔0015〕

- 本発明において「幹細胞」とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成する複数系列の細胞に分化しうる細胞をいう。具体的には胚性幹細胞 (ES 細胞)、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞 (EG 細胞：Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95:13726-31)、精巣由来の多能性幹細胞 (GS 細胞：Nature. 2008, 456:344-9)、体細胞由来人工多能性幹細胞

(induced pluripotent stem cells ; i P S 細胞)、ヒトの体性幹細胞(組織幹細胞)が挙げられ、好ましくは、i P S 細胞、E S 細胞またはヒトの体性幹細胞、さらに好ましくはi P S 細胞である。

[0 0 1 6]

- 5 E S 細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来する細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。好ましくはヒトに由来する細胞を使用できる。

- 10 E S 細胞の具体例としては、着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等のE S 細胞、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立したE S 細胞、及びこれらのE S 細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変したE S 細胞が挙げられる。各E S 細胞は当分野で通常実施されている方法や、公知文献に従って調製することができる。

- 15 マウスのE S 細胞は、1 9 8 1 年にエバンスら (Evans et al., 1981, Nature 292: 154-6) や、マーチンら (Martin GR. et al., 1981, Proc Natl Acad Sci 78: 7634-8) によって樹立されており、例えば大日本住友製薬株式会社(大阪、日本) から購入可能である。

- 20 ヒトのE S 細胞は、1 9 9 8 年にトムソンら (Thomson et al., Science, 1998, 282:1145-7) によって樹立されており、W i C e l l 研究施設 (WiCell Research Institute、ウェブサイト: <http://www.wicell.org/>、マジソン、ウィスコンシン州、米国)、米国国立衛生研究所 (National Institute of Health)、京都大学などから入手可能であり、例えばC e l l a r t i s 社 (ウェブサイト: <http://www.cellartis.com/>、スウェーデン) から購入可能
25 である。

[0 0 1 7]

i P S細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来する細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。好ましくはヒトに由来する細胞を使用できる。

- 5 i P S細胞の具体例としては、皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子を導入して得られる、E S細胞同様の多分化能を獲得した細胞（例えば、O c t 3 / 4 遺伝子、K l f 4 遺伝子、c - M y c 遺伝子及びS o x 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S細胞、O c t 3 / 4 遺伝子、K l f 4 遺伝子及びS o x 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S細胞（Nat Biotechnol
10 2008; 26: 101-106））等が挙げられる。他にも、導入遺伝子をさらに減らした方法（Nature. 2008 Jul 31;454(7204):646-50）、低分子化合物を利用した方法（Cell Stem Cell. 2009 Jan 9;4(1):16-9、Cell Stem Cell. 2009 Nov 6;5(5):491-503）、遺伝子の代わりに転写因子タンパク質を利用した方法（Cell Stem Cell. 2009 May 8;4(5):381-4）など、i P S細胞の作製法については技術的な改良が鋭意行われているが、作製された i P S細胞の基本的な性質、すなわち多分化能を有するという点は作出方法によらず同等であり、いずれも本発明の製造法に用い得る。

[0 0 1 8]

- 体性幹細胞としては、ヒトに由来するものが使用できる。ここで体性幹細胞
20 とは、膵ホルモン産生細胞へと分化し得る細胞であり、例えば骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞や膵臓内に存在する幹細胞が挙げられる。

[0 0 1 9]

本発明の方法を用いれば、作製方法の異なるヒト i P S細胞株等、種々の幹細胞株からの膵ホルモン産生細胞の製造が可能となる。

- 25 [0 0 2 0]

1. 膵ホルモン産生細胞の製造法

本発明の製造法は、幹細胞から膵ホルモン産生細胞を製造する方法である。

また、本発明の製造法は、より未分化な状態にある細胞（幹細胞）をより分化した状態（腺ホルモン産生細胞）へと分化誘導する方法でもある。

[0021]

本発明の製造法は、以下の工程（1）～（6）を含む。

5 （1）幹細胞を、R h o キナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程

（2）前記（1）で得られた細胞を、G S K 3 阻害剤を含む培地で培養する工

程

（3）前記（2）で得られた細胞を、G S K 3 阻害剤およびアクチニン受容体

様キナーゼー4，7の活性化剤を含む培地で培養する工程

10 （4）前記（3）で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を

培地中において浮遊状態で培養する工程

（5）前記（4）で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP

活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチニン受容体様キナーゼー2，

3，6の阻害剤、アクチニン受容体様キナーゼー4，5，7の阻害剤、および

15 細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

（6）前記（5）で得られた細胞を、培地で培養する工程

[0022]

工程（1）：幹細胞を、R h o キナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程

本工程は、後述する工程（2）の幹細胞から腺ホルモン産生細胞へと分化誘

20 導を開始する工程の前段階、すなわち、幹細胞の前培養（播種）の段階に相当

する。

[0023]

本工程における幹細胞は、アクトグラー細胞またはアクトグラー細胞抽出物と共

培養されたものであってもよい。ここでアクトグラー細胞とは、共培養によって、

25 他の種類の細胞が増殖できる環境を提供する細胞をいう。

本工程における幹細胞としては、分散細胞又は非分散細胞のいずれでもよい

が、分散細胞であるのが望ましい。

- 分散細胞としては、単一細胞、及び数個（典型的に約2～500、20～200、又は50～100個）の細胞からなる細胞塊〔後述の工程（4）で説明するように、細胞塊とは、複数個の細胞が相互に接着等することによって一つの塊をなしている状態をいう〕を形成している細胞が挙げられるが、本工程においては、細胞塊であるのが望ましい。
- 5 分散細胞の調製は、自体公知の方法により行われ得る。このような方法としては、キレート剤（例、EDTA）、酵素（例、トリプシン、コラゲナーゼ）等による処理、機械的な分散（例、ビペツタイズ）などの操作が挙げられる。分散細胞は、浮遊細胞〔浮遊細胞とは、培養器や基材に接着していない状態の細胞をいう〕、または接着細胞〔接着細胞とは、培養器や基材に接着している細胞の状態の細胞をいう〕であり得る。
- 10 本工程では、上述した幹細胞について、フアイバー細胞またはフアイバー細胞抽出物を除去（例えば、遠沈管に移して2～10分間静置し、上清を除くことによって、除去）した後、後述するRhキナーゼ阻害剤を含む培地で培養する（すなわち、播種時からフアイバー細胞を用いることなく、分化誘導を開始する）のが望ましい。
- [0024]
- Rhキナーゼ阻害剤とは、Rhキナーゼの活性を阻害する物質をいう。
- 20 Rhキナーゼとは、GTP（グアノシントリリン酸）の分解酵素であるGTPアーゼの範疇に含まれる低分子量GTP結合タンパク質（低分子量Gタンパク質）の1種で、アミノ末端にセリン／スレオニンキナーゼ領域、中央部にコイルドコイル領域およびカルボキシ末端にRhキナーゼ相互作用領域を有する（Amano et al., Exp. Cell. Res., 261, 44-51(2000)）。
- 25 本工程で用いるRhキナーゼ阻害剤としては、例えば、1-（5-イソキノリンホルニル）-2-メチルピペラジン（H-7）、1-（5-イソキノリンホルニル）-3-メチルピペラジン（イソH-7）、N-2-（メチルアミノ）エチル-5-イソキノリンホルニルミド二塩酸塩（H-8）、N-

(2-アミノエチル) - 5-イソキノリンスルホンアミド二塩酸塩 (H-9)、
 N- [2-p-ブロモシンナミルアミノ) エチル] - 5-イソキノリンスルホン
 アミド二塩酸塩 (H-89)、N- (2-グアニジノエチル) - 5-イソキノ
 リンスルホンアミド塩酸塩 (HA-1004)、1- (5-イソキノリンス
 5 ルホニル) ホモピペラジン二塩酸塩 (Fasudil/HA-1077)、
 (S) - (+) - 2-メチル-4-グリシル-1- (4-メチルイソキノリニ
 ル-5-スルホニル) ホモピペリジン二塩酸塩 (H-1152)、(+)-
 (R) - トランス-4- (1-アミノエチル) - N- (4-ピリジル) シクロ
 ヘキサンカルボキサミド二塩酸塩 (Y-27632) が挙げられる。

10 これらはいずれも商業的に入手可能 (例えば、SIGMA社、和光純薬工業社か
 ら購入可能) であり、なかでも特にY-27632が好ましい。

本工程では、1種又は2種以上のRhoキナーゼ阻害剤の組み合わせのいず
 れも使用可能である。

[0025]

15 本工程において、幹細胞は、Rhoキナーゼ阻害剤を含む培地で培養される。

Rhoキナーゼ阻害剤の培地中での濃度は、幹細胞の生存率の向上等の所望
 の効果を達成し得るような濃度である限り特に限定されないが、通常0.01
 ~1000 μ M、好ましくは0.1~100 μ M、特に好ましくは1.0~5
 0 μ Mである。Rhoキナーゼ阻害剤としてY-27632を用いる場合、好
 20 ましくは約1.0~約30 μ M、さらに好ましくは約2.0~約20 μ Mの濃
 度で用いられ得る。Rhoキナーゼ阻害剤としてFasudil/HA107
 7を用いる場合、Y-27632の上記濃度の約2倍の濃度で用いられ得る。

複数種のRhoキナーゼ阻害剤を組み合わせ使用する場合は、各阻害剤を
 上記した濃度範囲に基づいて適宜増減して使用する。

25 [0026]

Rhoキナーゼ阻害剤を含む培地での培養時間は、幹細胞の生存率の向上等
 の所望の効果を達成し得るような長さの時間である限り特に限定されない。例

例えば、幹細胞がヒト i P S 細胞である場合、ヒト i P S 細胞を分散させた後に約 12 時間以上の時間（例、12～72 時間）にわたり、R h o キナーゼ阻害剤を含む培地で培養すれば所望の効果を十分に得ることができる。

- 5 R h o キナーゼ阻害剤を含む培地中の幹細胞の密度は、幹細胞の生存率の向上等の所望の効果を達成し得るような密度である限り特に限定されない。好ましくは約 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞 / m l、より好ましくは約 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞 / m l、さらにより好ましくは約 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞 / m l、並びに最も好ましくは約 $3.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞 / m l である。

10 [0027]

本工程で用いる培地は、R h o キナーゼ阻害剤を含有している限り、特に限定されず、通常、幹細胞を培養するのに用いられる培地（以下、便宜上、基礎培地とも称する）に R h o キナーゼ阻害剤を添加してなるものである。

- 15 本工程で用いる基礎培地としては、霊長類 E S / i P S 細胞用培地（リプロセル培地）、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer' s培地、及びこれらの培地から任意に選択した2種以上の培地を混合した培地などが使用できる。ただし、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。
- 20 本工程では、特に霊長類 E S 細胞用培地（リプロセル培地）を用いることが望ましい。

これらの培地は、リプロセル社、Invitrogen社、SIGMA社、コスモ・バイオ社などから購入可能である。

[0028]

- 25 本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

- 5 本明細書中、血清を実質的に含まないとは、血清の含量で、約1容量%未満、好ましくは約0.01容量%未満、さらに好ましくは約0.01容量%未満であることを意味する。無血清培地とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分(例えば、増殖因子)が混入している培地は無血清培地に該当する。

[0029]

- 10 本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン(例えば、脂質リッチアルブミン)、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)、B27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシームレスサプリメント、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、及びこれらの均等物が挙げられる。ノックアウトシームレスサプリメントはInvitrogen社から購入可能である。その他の血清代替物については、Invitrogen社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能である。
- 15 培地中の濃度は、血清代替物がB27サプリメントの場合、0.01~10重量%、好ましくは、0.1~2重量%である。

[0030]

- 20 本工程では、ノイダー細胞及び/又はノイダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましい。すなわち、本工程で用いる培地は、ノイダー細胞及び/又はノイダー細胞抽出物を実質的に含まない培地であるのが好ましく、ノイダー細胞及び/又はノイダー細胞抽出物を全く含まない培地であるのがより好ましい。
- 25 本明細書中、ノイダー細胞及び/又はノイダー細胞抽出物を実質的に含まないとは、ノイダー細胞及び/又はノイダー細胞抽出物の培地中の含量が約5容量%未満、好ましくは約1容量%未満、さらに好ましくは約0.01容量%未満であることをいう。

本工程においてフィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、本発明の製造法により製造された腩ホルモン産生細胞には拒絶反応の原因物質（例、動物由来の細胞）の混入が少ない。

[0031]

- 5 本工程での培養は、通常、培養器を用いて行われる。このような培養器は、幹細胞の培養が可能なものであれば、特に限定されないが、接着培養の実施に際しては細胞接着性であるのが望ましく、浮遊培養の実施に際しては細胞非接着性であるのが望ましい。培養器の例としては、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、
- 10 マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、及びローラーボトルが挙げられる。細胞接着性の培養器は、培養器の表面の細胞との接着性を向上させる目的で、細胞外マトリックス（ECM）等の任意の細胞支持用基質でコーティングされたものである。
- 15 接着培養の際の培養器としては、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、細胞培養シートなどが挙げられる。これらの培養器は細胞との接着性を向上させるために親水性を付与したり、コラーゲン、ゼラチン、ポリーL-リジン、ポリーD-リジン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞支持用基質でコーティングされてもよい。なお、細胞培養シートとは、細胞をシート状に培養す
- 20 ることを目的する支持体を指し、例えばOptiCell (Nunc社) が市販されている。

本工程における細胞支持用基質は、Type I-collagen、BDマトリゲル（日本ベクトン・デッキンソン社）、フィブロネクチン（Invitrogen社）などが好ましく用いられるが、BDマトリゲル、フィブロネクチンを用いるのがより好ましく、フィブロネクチンを用いるのがさらに好ましい。

- 25 浮遊培養の際の培養器としては、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、チューブ、ローラーボトルなどが挙げられる。これらの培養器は疎水性の材質を用いたものであったり、ハイドロゲルや脂質など、細胞やタンパク質の吸着

を防止する素材をコーティングしたものである。細胞の凝集塊を効率的に形成させるためには、U字あるいはV字形状の底面を有する培養器を使用することが望ましい。

[0032]

- 5 その他の培養条件は、適宜設定できる。例えば、培養温度は、使用する幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されるものではないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり得る。CO₂濃度は、約1～10%、好ましくは約2～5%であり得る。酸素分圧は、1～10%であり得る。

[0033]

- 10 工程（2）：前記工程（1）で得られた細胞を、GSK3阻害剤を含む培地で培養する工程

本工程は、前記工程（1）に続いて実施する工程であり、後述する工程（3）とともに幹細胞から内胚葉細胞への分化を誘導する工程に相当する。

[0034]

- 15 セリン／スレオニンプロテインキナーゼであるGSK3（グリコーゲンシンターゼキナーゼ3）は、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に関与する。GSK3には異なる遺伝子にコードされアミノ酸レベルで高い相同性を有するGSK3 α とGSK3 β のアイソフォームが存在する。また、GSK3がWntシグナルにも関与し、GSK
- 20 3を阻害することによりWntシグナルが活性化されることが知られている。

GSK3阻害剤として、GSK3 α 阻害剤及びGSK3 β 阻害剤が挙げられるが、本工程では、GSK3 β 阻害剤が望ましい。

- GSK3阻害剤として、具体的には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-
- 25 (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、ケンパウロン、AR-AO144-18、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)、SB 216763 (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)、BIO、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) 及びSB
 5 415286 (2-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-3-(2-ニトロフェニル)マレインイミド[2-[2,5-ジヒドロ-4-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)アミノ]-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]フェニル]オキシラトオキソイミニウム) が例示される。これらはAxon Medchem BV社、和光純薬工業社、Enzo Life Sciences,
 10 Inc. 社、Merck Bioscience社、Tocris Bioscience社、Stemgent社、Sigma社などから購入可能である。

また、GSK3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GSK3阻害剤として使用することができる。これらはいずれも商業的に入手可能であるか既報に従って合成することができる。

15 幹細胞から内胚葉細胞への分化誘導にWnt-3Aペプチドを用いる方法が知られている(非特許文献1、2、5)。一方、本工程では、低分子化合物であるGSK3阻害剤を使用することで、優れた操作性、再現性、選択性を提供することができる。

GSK3β阻害剤は、好ましくは、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) またはBIO((2'Z,3'E)-6-ブロモインジルビン-3'-オキシム) である。

本工程では、1種又は2種以上のGSK3阻害剤の組み合わせのいずれも使用可能である。
 25

GSK3阻害剤の培地中の濃度は、用いる阻害剤の種類によって適宜設定されるが、通常、0.01~100 μM、好ましくは0.1~10 μMである。

CHIR99021の場合、通常0.1～20 μ M、好ましくは1～5 μ M、
BIOの場合、通常0.01～5 μ M、好ましくは0.1～2 μ Mである。

複数種のGSK3阻害剤を組み合わせる使用の場合は、各阻害剤を上記した濃度範囲に基づいて適宜増減して使用する。

5 [0035]

本工程で用いる培地は、GSK3阻害剤を含有している限り、特に限定されず、通常、幹細胞を培養するのに用いられる培地（基礎培地）にGSK3阻害剤を添加してなるものである。

本工程で用いる基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066
10 培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM ZincOption培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、無血清DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地が挙げられる。ただし、本工程で用いる基礎培地は、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。これらの培地は、Invitrogen社、SIGMA社、和
15 光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能である。

本工程で用いる基礎培地は、好ましくは、無血清DMEM/F12培地、RPMI 1640培地、Improved MEM Zinc Option培地、特に好ましくは、無血清DMEM/F12培地である。

[0036]

20 本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

本工程では、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましく、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を全く用いないのがより好ましい。

25 本工程においてフィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、本発明の製造法により製造された膵ホルモン産生細胞には拒絶反応の原因物質（例、動物由来の細胞）の混入が少ない。

[0037]

本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでいてもよい。

- 血清代替物としては、アルブミン、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）、B27サプリメント、N2サプリメント、
5 ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、及びこれらの均等物などが挙げられる。本工程で用いる血清代替物としては、B27サプリメントが好ましい。

- 培地中の濃度は、B27サプリメントの場合、0.01～10重量%、好ましくは、0.1～2重量%である。これらの血清代替物については、
10 Invitrogen社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能である。

[0038]

- 本工程における培養温度は、使用する幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されるものではないが、約30～40℃、好ましくは約37℃で
15 ある。

培養時間は、約37℃の培養温度で、6～144時間、好ましくは12～72時間である。本工程における培養は、通常、約1～10%、好ましくは5%のCO₂を通気したインキュベーター内にて行われる。

[0039]

- 20 工程（3）：前記工程（2）で得られた細胞を、GSK3阻害剤およびアクチビン受容体様キナーゼ-4，7の活性化剤を含む培地で培養する工程

本工程は、前記工程（2）に続いて実施する工程であり、幹細胞からの内胚葉細胞への分化誘導を完了させる工程に相当する。

[0040]

- 25 本工程で使用されるアクチビン受容体様キナーゼ（ALK）-4，7の活性化剤は、ALK-4及び／またはALK-7に対し活性化作用を有する物質から選択される。

本工程で使用されるアクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤の例としては、アクチビン、N o d a l、M y o s t a t i n が挙げられ、いずれも商業的に入手可能である。なかでも、本工程で使用されるアクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤としてはアクチビンが好ましい。

- 5 上記アクチビンは、T G F β (トランスフォーミング増殖因子 β) ファミリーに属する大きさ 24 k D のペプチド性細胞増殖、分化因子であり、2 個の β サブユニットが S S 結合を介して 2 量体を構成している (Ling, N., et al., (1986) Nature 321, 779-782; Vale, W., et al., (1986) Nature 321, 776-779)。本発明においてはアクチビン A、B、C、D、A B のいずれでも、また
- 10 ヒト、マウス等いずれの動物由来のものをも使用でき、これらは商業的に入手可能である。このなかでも特にアクチビン A が好適に用いられる。使用する幹細胞の由来する動物種と同じ動物種由来のアクチビンを用いるのが好ましく、例えばヒト由来の幹細胞を出発原料とする場合、ヒトアクチビン A を用いるのが好ましい。
- 15 本工程における培地中のアクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤の濃度は、用いるアクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤の種類によって適宜設定されるが、アクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤としてアクチビンを使用する場合の培地中の濃度は通常 0.1 ~ 200 ng/ml、好ましくは 5 ~ 150 ng/ml、特に好ましくは 10 ~ 100 ng/ml で
- 20 ある。

- 本工程では、1 種又は 2 種以上のアクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化剤の組み合わせのいずれも使用可能であり、複数種の活性化剤を組み合わせ使用する場合は、各活性化剤を上記した濃度範囲に基づいて適宜増減して使用する。また、本工程では、アクチビン受容体様キナーゼー 4, 7 の活性化
- 25 剤とともに G S K 3 阻害剤を培地中に含めることを特徴とする。アクチビン及び G S K 3 阻害剤との存在下に幹細胞を培養すれば、より好適に内胚葉細胞へと分化させることができる。

[0041]

本工程で使用するGSK3阻害剤として、GSK3 α 阻害剤及びGSK3 β 阻害剤が挙げられる。本工程で使用するGSK3阻害剤としては、GSK3 β 阻害剤が好ましい。

- 5 本工程で使用するGSK3阻害剤として、具体的には、前記工程（2）で例示したGSK3阻害剤と同様のものが列挙されるが、本工程においても、GSK3 β 阻害剤であるCHIR99021またはBIOが好ましく用いられる。GSK3阻害剤の培地中の濃度は、用いる阻害剤の種類によって適宜設定されるが、CHIR99021の場合、通常0.1～20 μ M、好ましくは1～5
- 10 μ M、BIOの場合、通常0.01～5 μ M、好ましくは0.1～2 μ Mである。

本工程では、1種又は2種以上のGSK3阻害剤の組み合わせのいずれも使用可能であり、複数種の阻害剤を組み合わせで使用する場合は、各阻害剤を上記した濃度範囲に基づいて適宜増減して使用する。

15 [0042]

- 本工程において、アクチビン受容体様キナーゼ4，7の活性化剤とGSK3阻害剤とは、培地中に同時に添加されてもよく、また、幹細胞の内胚葉細胞への分化を誘導し得る限り、別個に時間差を設けて培地中に添加されてもよい。アクチビン受容体様キナーゼ4，7の活性化剤とGSK3阻害剤とは、培地
- 20 中に同時に添加されることが簡便であり、また好ましい。

[0043]

本工程で用いる培地は、前記工程（2）で例示した基礎培地に、アクチビン受容体様キナーゼ4，7の活性化剤及びGSK3阻害剤を添加することにより作製される。

- 25 本工程で用いる培地は、前記工程（2）で用いたものと同種の基礎培地を用いて作製されたものであっても、異種の基礎培地を用いて作製されたものであ

ってもよいが、同種の基礎培地（例、無血清DMEM/F12培地）を用いて作製されたものであることが好ましい。

本工程で用いる基礎培地は、好ましくは、無血清DMEM/F12培地、RPMI 1640培地、Improved MEM Zinc Option培地、特に好ましくは、無血清DMEM/F12培地
5 である。

[0044]

本工程では、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましく、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を全く用いないのがより好ましい。

10 本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

本工程においてフィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、本発明の製造法により製造された膵ホルモン産生細胞には拒絶反応の原因物質（例、動物由来の細胞）の混入が少ない。

15 本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでいてもよい。血清代替物としては、アルブミン、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）、B27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、3'チオールグリセロール、及びこれらの均等物などが挙げられるが、B27サプリメントが
20 望ましい。培地中の濃度は、B27サプリメントの場合、0.01～10重量%、好ましくは、0.1～2重量%である。

本工程における培養温度は、使用する細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されるものではないが、約30～40℃、好ましくは約37℃である。

培養時間は、約37℃の培養温度で、6～288時間、好ましくは12～1
25 24時間である。本工程における培養は、通常、約1～10%、好ましくは5%のCO₂を通気したインキュベーター内にて行われる。

[0045]

本工程において、幹細胞が内胚葉細胞に分化誘導されたことの確認は、内胚葉マーカーを用いて行われる。具体的には、内胚葉細胞特異的に発現するタンパク質や遺伝子（内胚葉マーカー）の発現の有無を評価することによって行うことができる。タンパク質の発現は抗原抗体反応を利用した方法等によって、

- 5 遺伝子の発現はR T - P C Rを利用した方法等によって評価することができる。該マーカーとしては、S O X 1 7（性決定領域Y、Sex determining region Y）、G o o s e c o i d（gooseoid homeobox）、C X C R 4（chemokine（C-X-C motif）receptor 4）、F O X A 2（forkhead box A2）等が挙げられる。

10 [0 0 4 6]

工程（4）：前記工程（3）で得られた細胞から、細胞塊（sphere）を形成させた後に、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程

- 本工程は、前記工程（3）で得られた、内胚葉細胞に分化した状態にある細胞、すなわち、内胚葉細胞について、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を培
15 地中において浮遊状態で培養する工程（再播種する工程）である。

[0 0 4 7]

- 本明細書中、細胞塊とは、複数個の細胞が相互に接着等することによって、一つの塊をなしている状態（例えば、10個以上の細胞が相互に接着した状態）をいい、単離細胞及びみなし単離細胞に相對する概念である。単離細胞と
20 は、他の細胞と接着せずに独立した状態にある一つの細胞をいう。みなし単離細胞とは、1，2個の他の細胞と接着している、或いは接着力が弱く簡単に離れてしまう程度に集合している状態の数個の細胞の群をいう。

- 本工程において、細胞塊とは、前記工程（3）で得られた、複数個（例えば10個以上）の細胞（内胚葉細胞）が、細胞間で相互に接着等することによっ
25 て、一つの塊をなしている状態をいう。

細胞塊と単離細胞及びみなし単離細胞とは、集合している細胞数（例えば3個以上の細胞が集合していれば、細胞塊）によって区別されてもよいが、細胞

懸濁液を光学顕微鏡などで拡大して観察した平面像において、細胞として一つのまとまりをなす領域の面積によって区別されてもよい。

例えば、細胞の大きさ（半径）が $10\ \mu\text{m}$ 程度の場合、その断面積は約 $300\ \mu\text{m}^2$ となる。従って、例えば、細胞として一つのまとまりをなす領域の面積が $300\ \mu\text{m}^2$ 未満であれば単離細胞及びみなし単離細胞とし、 $900\ \mu\text{m}^2$ （すなわち細胞3個分）より広ければ細胞塊としてもよい。10個以上の細胞が相互に接着した細胞塊を形成したとすれば、その断面積は $3000\ \mu\text{m}^2$ 以上になると想定される。

[0048]

10 本明細書中、浮遊状態で培養するとは、培地中において、非接着性の条件下で培養することをいう。非接着性の条件下での培養とは、培養器や基材に接着させない状態（例えば、非接着性のマルチウェルプレートを利用）での培養をいう。

非接着性の条件下での培養は、自体公知の方法により行われ得る。このような方法としては、例えば、培養器の表面にポリ・ヒドロキシエチルメタアクリレート等の親水性の物質プロテオグリカンをコートし、細胞の基材への接着を阻害する方法（Cell Struct Funct, 13, 179 (1988)）や、冷却することにより培養液に溶解する合成高分子化合物を培養器の表面に塗布し、細胞を接着させた後、培養器を冷却して合成高分子化合物を溶解し、細胞のシートを作る方法（Bio Technology, 8, 854 (1990)）があり、これらの方法は必要に応じて改良することができる。例えば、培養液交換時の細胞の損失を防ぐため、一旦、培養器に遠心操作を施し、細胞塊を培養器表面に強制的に付着させた後、培養液を交換することや、細胞ごと培養液を遠沈管に移し、遠心操作で細胞を落とした後、上清の培養液を交換することができる。

25 [0049]

本工程では、細胞塊の形成前に、前記工程（3）で得られた細胞（内胚葉細胞）に、タンパク質消化酵素を添加して、細胞同士を分離させ、単一細胞の状

態にしてもよい。

- タンパク質消化酵素としては、トリプシン、コラゲナーゼ、パパイン、ディ
スパーゼ、アキュターゼ (Invitrogen) (商品名) 等を用いることができるが、
これらに限定されない。これらのタンパク質消化酵素は、典型的には、消化酵
5 素の作用の阻害剤である Ca^{2+} や Mg^{2+} をキレートするために EDTA を加
えて、トリプシン-EDTA 溶液 (例: 0.25% トリプシン-1 mM EDTA) の様な形態で用いられる。

[0050]

- 本工程において、前記工程 (3) で得られた細胞から、細胞塊は、例えば、
10 以下のようにして調製することができる。

- すなわち、前記工程 (3) で得られた細胞を、適当な媒体中、培養器上で浮
遊培養する。例えば、低接着性の培養器として 96 ウェルの丸底ディッシュを
用いた場合には、1 ウェルあたり 2~40 万細胞を播種し、形成した凝集体を
低接着性の 6 cm ディッシュ等に移したりしながら、37℃で、約 6 時間~約
15 10 日間、好ましくは約 6 時間~約 2 日間、さらに好ましくは 1 日間、適当な
培地中で培養する。低接着性の培養器としては、通常、当技術分野で用いられ
ている培養器に低接着性となるような処理を施したものが例示される。培養器
としては、培養ディッシュ、培養フラスコ、回転培養用器具 (スピナーフラス
コ等) 等が挙げられ、具体的にはスフェロイドプレートが挙げられる。低接着
20 性となるような処理としては、ハイドロゲルを共有結合させること (コーティ
ング) によって蛋白質や細胞の接着を抑制するような処理が用いられる。

[0051]

- 具体的には、本工程は、前記工程 (3) で得られた細胞を、例えば、96 穴
のスフェロイドプレートに 1 穴あたり 2×10^4 個の密度で播種し、37℃、
25 5% CO_2 の条件下で、1% の B27 サプリメントが添加された Improved MEM
Zinc Option 培地で 1 日間培養する。

[0052]

本工程において、上記のようにして得られた細胞塊を、培地中において浮遊状態で培養する。浮遊状態での培養とは、上述のとおり、非接着性の条件下での培養、すなわち、培養器や基材に接着させない状態（例、非接着性のマルチウェルプレート）での培養をいう。

- 5 本工程で用いる培地（すなわち、再播種時の培地）としては、前記工程（2）で例示した基礎培地が挙げられる。本工程で用いる培地は、上記工程（2）～（3）と同種の基礎培地を用いて作製されたものであっても、異種の基礎培地を用いて作製されたものであってもよいが、胰ホルモン産生細胞への分化誘導がより効率的に行えるという点で、Improved MEM Zinc Option培地
- 10 （Invitrogen社）が、本工程での基礎培地として好適に用いられる。該培地は公知文献（Richter A. et al., National Cancer (1972) 49, 1705）に従って調製することも可能である。

[0053]

- 本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでいてもよい。血清代替物として
- 15 は、アルブミン、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）、B 27 サプリメント、N 2 サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、3' チオールグリセロール、及びこれらの均等物などが挙げられる。本工程で用いる血清代替物としてはB 27 サプリメントが好ましい。

20 [0054]

本工程では、特に、B 27 サプリメントが添加されたImproved MEM Zinc Option培地（Invitrogen社）が好適に用いられる。培地中、B 27 サプリメントの濃度は、0.01～10重量%、好ましくは0.1～2重量%である。

[0055]

- 25 本工程では、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましく、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を全く用いないのがより好ましい。

本工程においてフアイダー細胞及び／又はフアイダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、拒絶反応の原因物質（例、動物由来の細胞）の混入が少ない。本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

5 [0056]

培養温度は、使用する細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されるものではないが、約30～40℃、好ましくは約37℃である。

培養時間は、6～360時間、好ましくは約1日間～約12日間、さらに好ましくは約8日間である。

10 浮遊状態で細胞塊を形成させた場合には、細胞塊を形成させた後、細胞塊を浮遊培養に付すことなく、工程（5）に付すこともできる。この場合、工程（5）に移る前に形成された細胞塊を、0～48時間、好ましくは0～24時間浮遊状態で培養してもよい。

15 本工程における培養は、通常、約1～10%、好ましくは5%のCO₂を通気したインキュベーター内にて行われる。

[0057]

20 具体的には、本工程は、前記工程（3）で得られた細胞を、例えば、96穴のスプレイトプレートに1穴あたり2×10⁴個の密度で播種し、37℃、5% CO₂の条件下で、1%のB27サプリメントが添加されたImproved MEM Zinc Option培地で1日間培養する。

[0058]

本工程（4）は、前記工程（1）～（3）を経て得られた内胚葉細胞以外の内胚葉細胞を出発材料としても、膝ホルモン産生細胞を製造することができる。従って、本発明は、本工程（4）により、内胚葉細胞を出発材料とする膝ホルモン産生細胞の製造法、すなわち、内胚葉細胞から細胞塊を形成させ、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養することを特徴とする、膝ホルモン産生細胞

胞の製造法（本明細書中、本発明の製造法 2 と略記する場合がある）も提供する。

なお、上記工程（1）～（3）を経て得られた内胚葉細胞以外の内胚葉細胞を出発材料とした膵ホルモン産生細胞の製造法も、前記した工程（3）で得られた細胞を出発材料とした膵ホルモン産生細胞の製造法における工程（4）と同様に行うことができる。

具体的には、本発明の製造法 2 は、内胚葉細胞を、以下の工程（4'）および（5'）に付すことを特徴とする。

（4'）内胚葉細胞から細胞塊を形成させ、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程

（5'）前記（4'）で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼ 2，3，6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ 4，5，7 の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

工程（4'）は上記工程（4）と、工程（5'）は上記工程（5）とそれぞれ同様にして行うことができる。

[0059]

本工程、より好ましくは、前記工程（1）～（3）の後、本工程（4）を経ることによって、より膵発生を模倣した形の膵ホルモン産生細胞を製造することができる。該細胞は三次元細胞塊の構造を有するので、単層培養細胞に比べ、生体内における状態に近く、より機能的であると考えられる。さらに該細胞は三次元的な構造により、従来の製造方法により得られる膵ホルモン産生細胞と比較しても、細胞医療への応用により適した細胞であると考えられる。

[0060]

工程（5）：前記工程（4）で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナ

ーゼー 2, 3, 6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼー 4, 5, 7 の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

本工程は、前記工程 (4) を経て得られた細胞、すなわち、浮遊状態で培養された内胚葉細胞から腓ホルモン産生前駆細胞への分化を誘導する工程に相当する。

[0061]

本工程で用いるレチノイン酸受容体 (RAR) アゴニストは、天然のレチノイドであっても、合成のレチノイド、レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニストや同等の活性を有する天然物であってもよい。天然のレチノイドの例は、レチノイン酸 (立体異性体の全トランスーレチノイン酸 (全トランス RA) と 9-シスーレチノイン酸 (9-シス RA) が知られている) である。合成のレチノイドは当技術分野で公知である (米国特許第 5, 234, 926 号、米国特許第 4, 326, 055 号等)。レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニストとしては、Am80、TTNPB、AC-55649 などが挙げられる。天然物の例としては、ホノキオール、マグノロールなどが挙げられる (生物機能開発研究所紀要 9:55-61、2009 年)。本工程で用いる RAR アゴニストは、好ましくはレチノイン酸である。RAR アゴニストの培地中の濃度は、用いるアゴニストの種類によって適宜設定されるが、レチノイン酸の場合、通常 0.1~100 μ M、好ましくは 0.5~10 μ M である。

[0062]

本工程で用いる AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチビン受容体様キナーゼー 2, 3, 6 の阻害剤は、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 阻害活性を有する化合物、アクチビン受容体様キナーゼ (ALK) - 2, 3, 6 阻害活性を有する化合物、及び AMP 活性化プロテインキナーゼ阻害活性とアクチビン受容体様キナーゼー 2, 3, 6 阻害活性とを併せ持つ化合物からなる群より選択される。

[0063]

AMPK阻害活性を有する化合物としては、ドーソモルフィン

(Dorsomorphin: 6-[4-(2-ピペリジン-1-イルエトキシ)フェニ
ル]-3-ピリジン-4-イルピラゾロ[1, 5-a]ピリミジン)、ara
5 A (アデニン-9-β-d-アラビノフラノシド)、C75等が挙げられる。
アクチビン受容体様キナーゼ (ALK) は幾つかに分類されておりALK-2,
3, 6はBMPタイプI受容体型のキナーゼとして、後述するALK-4, 5,
7はTGF-βスーパーファミリータイプIの受容体型キナーゼとして、それ
ぞれ知られている。ALK-2, 3, 6阻害活性を有する化合物としては、ド
10 ーソモルフィン、LDN-193189 (6-(4-ピペラジノフェニル)-
3-(キノリン-4-イル)ピラゾロ[1, 5-a]ピリミジン)等が挙げら
れる。ドーソモルフィンは、AMPK阻害活性及びALK-2, 3, 6阻害活
性の両方の活性を有する。本工程で用いるAMP活性化プロテインキナーゼお
よび/またはアクチビン受容体様キナーゼ-2, 3, 6の阻害剤としては、ド
15 ーソモルフィンが好ましい。

これらの化合物はSIGMA社、Tocris bioscience社、Stemgent社、Merck
Bioscience社などから購入可能である。

[0064]

また、AMP活性化プロテインキナーゼおよびALK-2, 3, 6のmRN
20 Aに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA等もAMP活性化プ
ロテインキナーゼおよび/またはALK-2, 3, 6の阻害剤として使用する
ことができる。また、本工程中において培養中の細胞から培地中にBMPファ
ミリーに属する分化因子の増殖、あるいは当該分化因子の分泌が確認された場
合には、当該分化因子の活性を中和する抗体、あるいはBMPに結合してその
25 作用を阻害することが知られているNoggin、Chordin、Cerberus、Gremlin等もAMP活性化プロテインキナーゼおよび/または
ALK-2, 3, 6の阻害剤として使用することができる。

[0065]

また、本工程において培養中の細胞から培地中に上記工程（３）でアクチビン受容体様キナーゼ－４，７の活性化剤として例示したアクチビンの増加、あるいは分泌が確認された場合には、アクチビンの活性を中和する抗体、あるいは

5 はアクチビンに結合してその作用を阻害することが知られているホリスタチンもAMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはALK－２，３，６の阻害剤として使用することができる。

[0066]

AMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナー

10 ゼ－２，３，６の阻害剤の培地中の濃度は、用いる阻害剤の種類によって適宜設定されるが、ドーソモルフィンの場合、通常０．１～２０μM、好ましくは０．２～５μMである。

[0067]

本工程で用いるアクチビン受容体様キナーゼ（ALK）－４，５，７の阻害

15 剤としては、SB－４３１５４２、SB－５０５１２４（２－（５－ベンゾ

[1，３] ジオキソール－５－イル－２－tert－ブチル－３H－イミダゾール－４－イル）－６－メチルピリジンヒドロクロリド）、SB－５２５３３

４（６－[２－tert－ブチル－５－（６－メチル－ピリジン－２－イル）－１H－イミダゾール－４－イル]－キノキサリン）、A－８３－０１（３－

20 （６－メチル－２－ピリジル）－N－フェニル－４－（４－キノリニル）－１H－ピラゾール－１－チオカルボキサミド）、GW６６０４、LY－５８０２

７６（２－（６－メチル－２－ピリジニル）－３－（４－フルオロフェニル）－５，６－ジヒドロ－４H－ピロロ[1，２－b]ピラゾール）及びSD－２

0 ８（２－（５－クロロ－２－フルオロフェニル）－N－（ピリジン－４－イ

25 ル）ピリド[2，３－d]ピリミジン－４－アミン）等が挙げられる。

これらはSIGMA社、Tocris bioscience社、和光純薬工業社などから購入可能である。また、ALK－４，５，７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 ALK-4, 5, 7 の阻害剤として使用することができる。

[0068]

本工程で用いる ALK-4, 5, 7 の阻害剤としては、SB-431542
 5 (4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド又はその水和物)が好ましい。アクチビン受容体様キナーゼ-4, 5, 7 の阻害剤の培地中の濃度は、用いる阻害剤の種類によって適宜設定されるが、SB-431542 の場合、通常、0.1~50 μ M、好ましくは 1~20 μ M である。

10 [0069]

本工程で用いる細胞増殖因子として、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、幹細胞増殖因子 (SCF)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、各種の線維芽細胞増殖因子 (a/bFGF) 等が挙げられるが、なかでも特に塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が好ましい。

15 細胞増殖因子の培地中の濃度は、用いる因子の種類によって適宜設定されるが、bFGF の場合、通常、1~200 ng/ml、好ましくは 20~100 ng/ml である。

[0070]

本工程は、上記したレチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチビン受容体様キナーゼ-2, 3, 6 の阻害剤、
 20 アクチビン受容体様キナーゼ-4, 5, 7 の阻害剤、及び細胞増殖因子の 4 種類全ての成分を含む培地中で実施される。

本工程において、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチビン受容体様キナーゼ-2, 3, 6 の阻害剤、
 25 アクチビン受容体様キナーゼ-4, 5, 7 の阻害剤、及び細胞増殖因子は培地中に同時に添加されてもよく、また、腓ホルモン産生前駆細胞への分化を誘導し得る限り、別個に時間差を設けて培地中に添加されてもよい。レチノイン酸

受容体アゴニスト、AMP活性化プロテインキナーゼ及び／又はアクチビン受容体様キナーゼ 2, 3, 6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ 4, 5, 7 の阻害剤、及び細胞増殖因子は、培地中に同時に添加されることが簡便であり、また好ましい。

5 [0071]

本工程で用いる培地は、前記工程（2）で例示した基礎培地に、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼ 2, 3, 6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ 4, 5, 7 の阻害剤、及び細胞増殖因子を添加することにより作製される。

- 10 本工程で用いる培地は、前記工程（4）と同種の基礎培地を用いて作製されたものであっても、異種の基礎培地を用いて作製されたものであってもよい。膝ホルモン産生前駆細胞への分化誘導がより効率的に行えるという点で、Improved MEM Zinc Option培地（Invitrogen社）が、本工程での基礎培地として好適に用いられる。

15 [0072]

本工程では、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましく、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を全く用いないのがより好ましい。

- 20 本工程においてフィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、拒絶反応の原因物質（例、動物由来の細胞）の混入が少ない。

本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

[0073]

本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでいてもよい。

- 25 血清代替物としては、アルブミン、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）、B27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、

3' チオールグリセロール及びこれらの均等物などが挙げられる。本工程で用いる血清代替物としてはB 2 7サプリメントが望ましい。

血清代替物の培地中における濃度は、B 2 7サプリメントの場合、0. 0 1 ~ 1 0 重量%、好ましくは、0. 1 ~ 2 重量%である。

5 [0 0 7 4]

本工程は、使用する内胚葉細胞の培養に適した培養温度、通常3 0 ~ 4 0 °C、好ましくは3 7 °C程度で7 2 ~ 2 8 8 時間、好ましくは1 2 0 ~ 2 1 6 時間、1 ~ 1 0 %、好ましくは5 %の二酸化炭素を通気したC O₂インキュベーター内にて培養することによって実施される。

10 [0 0 7 5]

本工程において、内胚葉細胞が膵ホルモン産生前駆細胞に分化誘導されたことの確認は、膵ホルモン産生前駆細胞特異的に発現するタンパク質や遺伝子（膵ホルモン産生前駆細胞マーカー）の発現の有無を評価することによって行うことができる。タンパク質の発現は抗原抗体反応を利用した方法等によって、
15 遺伝子の発現はR T - P C Rを利用した方法等によって評価することができる。該マーカーとしては、N G N 3、H N F 6 (hepatocyte nuclear factor 6、別名：one cut homeobox 1)、P D X 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) 等が挙げられる。

[0 0 7 6]

20 工程（6）：前記工程（5）で得られた細胞を、培地で培養する工程

本工程は、膵ホルモン産生前駆細胞から膵ホルモン産生細胞への分化を誘導する工程に相当する。

[0 0 7 7]

本工程で用いる基礎培地としては、前記工程（2）で例示した基礎培地が挙げられる。本工程で用いる培地は、前記工程（5）と同種の基礎培地を用いて
25 作製されたものであっても、異種の基礎培地を用いて作製されたものであってもよい。膵ホルモン産生細胞への分化誘導がより効率的に行えるという点で、

Improved MEM Zinc Option培地 (Invitrogen社) が、本工程での基礎培地として好適に用いられる。

[0078]

本工程では、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いないのが好ましく、フィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を全く用いないのがより好ましい。

本工程においてフィーダー細胞及び／又はフィーダー細胞抽出物を実質的に用いない場合、拒絶反応の原因物質 (例、動物由来の細胞) の混入が少ない。

本工程で用いる培地としては、血清及び／又は血清抽出物を実質的に含まない培地が好ましく、無血清培地がより好ましい。

[0079]

本工程で用いる培地は、血清代替物を含んでいてもよい。血清代替物としては、アルブミン (例えば、脂質リッチアルブミン)、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)、B 27 サプリメント、N 2 サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール又は3'-チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などが挙げられる。なかでも、B 27 サプリメントが好ましい。特に、B 27 サプリメントが添加されたImproved MEM Zinc Option培地 (Invitrogen社) が好適に用いられる。培地中、B 27 サプリメントの濃度は、0.01~10重量%、好ましくは0.1~2重量%である。また、Improved MEM Zinc Option培地へは、細胞の生存率を向上させる添加剤を添加してもよい。そのような添加物として、例えば、ノックアウトシーラムリプレースメント、N 2 サプリメント等の血清代替物等が挙げられる。培地中の前記添加剤の濃度は、0.01~10重量%、好ましくは0.1~2重量%である。

25 [0080]

好ましくは、本工程で用いる培地には、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼ

2, 3, 6 の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ 4, 5, 7 の阻害剤、及び細胞増殖因子は含まれない。従って、工程（5）と工程（6）との間に培地交換を行うことが好ましい。

[0081]

- 5 本工程は、使用する膵ホルモン産生前駆細胞の培養に適した培養温度、通常 30～40℃、好ましくは 37℃程度で 24～240 時間、好ましくは 72～192 時間、1～10%、好ましくは 5% の二酸化炭素を通気した CO₂ インキュベーター内にて培養することによって実施される。

- 本工程において膵ホルモン産生前駆細胞が膵ホルモン産生細胞に分化誘導されたことの確認は、膵ホルモン産生細胞特異的に発現するタンパク質や遺伝子（膵ホルモン産生細胞マーカー）の発現、あるいは培地中に分泌される膵ホルモンの量を測定することによって行うことができる。該マーカーとしては、インスリン、グルカゴン、パンクレアティックポリペプチド、ソマトスタチン、グレリン、P C S K 1 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1)、
- 10 S U R 1 (sulfonylurea receptor 1、別名：ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8)、N K X 6. 1 (NK6 homeobox 1)、P A X 6 (paired box 6)、N E U R O D (neurogenic differentiation 1)、A R X (aristaless related homeobox) 等が挙げられる。
- 15

[0082]

- 20 上記した通り、本発明は、幹細胞から膵ホルモン産生細胞を製造する方法を提供するが、同様の方法、すなわちより未分化な状態にある細胞をより分化した状態へと分化誘導する方法によって、幹細胞から、多様な分化状態にある細胞（内胚葉細胞、膵管細胞、膵内分泌細胞、膵外分泌細胞やそれらに共通する前駆細胞等）へと分化誘導することができる。誘導された分化の程度は各細胞
- 25 に特異的に発現しているタンパク質や遺伝子の発現の有無を確認することによって知ることができる。

[0083]

本発明の製造法では、幹細胞を膵ホルモン産生細胞へ効率的に分化誘導することにより、高い膵ホルモン分泌能を有する膵ホルモン産生細胞を大量に供給できる。この膵ホルモン産生細胞は、医薬（特に細胞医療の為の医薬）や、糖尿病治療薬を開発するためのツールとして利用することができる。

5 [0084]

2. 本発明の細胞を含む医薬

本発明は、上記した本発明の製造法又は本発明の製造法2により製造された膵ホルモン産生細胞（本発明の細胞）を含む、医薬を提供する。

さらに、本発明は、上記した本発明の製造法（好ましくは工程（1）～
10 （5））又は本発明の製造法2により製造された膵ホルモン産生前駆細胞を含む医薬（本明細書中、本発明の医薬と略記する場合がある。）を提供する。

[0085]

本発明の医薬において、膵ホルモン産生細胞又は膵ホルモン産生前駆細胞はそのまま、もしくはフィルター濾過などにより濃縮したペレットなどの細胞塊
15 などとして用いられる。さらに、該医薬は、DMSO（ジメチルスルホキシド）などの保護剤を加え、凍結保存することもできる。該医薬は、医薬として、より安全に利用するために、加熱処理、放射線処理など、膵ホルモン産生細胞としての機能又は膵ホルモン産生前駆細胞としての機能を残しつつ、病原体のタンパク質が変性する程度の条件下での処理に付してもよい。また、膵ホルモ
20 ン産生細胞又は膵ホルモン産生前駆細胞が必要量以上に増殖することを防止するために、上記処理と組み合わせて、マイトマイシンC前処理等による増殖の抑制や、哺乳類が自然には持っていない代謝酵素の遺伝子を当該細胞に導入して、その後、必要に応じて未活性型の薬を投与し、哺乳類が自然には持っていない代謝酵素の遺伝子を導入した細胞の中だけでその薬を毒物に変化させて細胞
25 を死滅させる方法（自殺遺伝子療法）等の処理に付してもよい。

[0086]

本発明の医薬は、安全で低毒性であり、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ブタ、サル等、好ましくは、ヒト）に投与（移植）することができる。

本発明の医薬の投与量（移植量）は、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞
5 /個体、好ましくは、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/個体、さらに好ましくは、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/個体である。本発明の医薬において、患者本人の細胞あるいは組織適合型が許容範囲のドナーの細胞を用いて作成された膵ホルモン産生細胞を用いることが好ましいが、年齢や体質などの理由から十分な細胞が得られない場合には、ポリエチレングリコールやシリコンのようなカプ
10 セル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で移植することも可能である。そのような場合には、腹腔内や皮下への移植も可能である。また、本発明の医薬の投与量（移植量）は、投与される患者の年齢、体重、症状などによって適宜変更することができる。

[0087]

15 本発明の医薬のうち、膵ホルモン産生細胞を含む医薬は、それ自体の投与（移植）により、患者の体内で膵ホルモンの産生（分泌）が可能となり、膵ホルモンの産生（分泌）の低下に起因する疾患の治療に有用である。例えばインスリン産生細胞を含む医薬は、糖尿病（I型およびII型、好ましくはI型またはインスリン産生量が低下したII型、特に好ましくはI型）の治療に有用
20 である。一方、本発明の医薬のうち、膵ホルモン産生前駆細胞を含む医薬は、患者に投与（移植）された後、適当な条件下で膵ホルモン産生細胞に分化誘導されることによって、膵ホルモンが産生（分泌）される。

[0088]

3. スクリーニング方法

25 本発明は、以下の工程（1）～（6）からなる群より選択されるいずれか1種以上の工程によって得られた細胞を用いることを特徴とする、医薬（好まし

くは糖尿病治療薬)のスクリーニング方法(本明細書中、本発明のスクリーニング方法と略記する場合がある)を提供する。

(1) 幹細胞を、R h oキナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程

(2) 前記(1)で得られた細胞を、G S K 3阻害剤を含む培地で培養する工

5 程

(3) 前記(2)で得られた細胞を、G S K 3阻害剤およびアクチビン受容体様キナーゼ-4, 7の活性化剤を含む培地で培養する工程

(4) 前記(3)で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程

10 (5) 前記(4)で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチビン受容体様キナーゼ-2, 3, 6の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ-4, 5, 7の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

(6) 前記(5)で得られた細胞を、培地で培養する工程

15 [0089]

上記工程(1)~(6)は、上記した本発明の膵ホルモン産生細胞の製造法における工程(1)~(6)と同様にして実施され得る。

本スクリーニングに用いられる細胞としては、上記工程(1)~(6)を経て得られる膵ホルモン産生細胞;上記工程(1)~(5)を経て得られる膵ホル
20 モン産生前駆細胞;上記工程(1)~(4)または上記工程(1)~(3)を経て得られる内胚葉細胞;上記工程(1)~(2)を経て得られる細胞;上記工程(1)を経て得られる細胞が挙げられる。

[0090]

本発明のスクリーニング方法は、具体的には以下のようにして実施される
25 (態様1)。(a)試験化合物存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合と、
(b)試験化合物非存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合における、該

細胞内の膵ホルモン発現量又は該細胞外への膵ホルモン分泌量をそれぞれ測定し、比較する方法が挙げられる。

膵ホルモンの発現量としては、膵ホルモタンパク質の発現量、膵ホルモタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例、mRNA）の発現量などが挙げられる。膵ホルモンの発現量及び分泌量の測定は、公知の方法、例えば、膵
5 ฮอร์โมนを認識する抗体を用いて、細胞抽出液中や培地中などに存在する前記膵ホルモンを、ウエスタンブロッティング解析、ELISA法などの方法又はそれに準じる方法に従って行われる。

mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、ノザンハイブリダイゼーション、
10 S1マッピング法、PCR法、DNAチップあるいはアレイ法又はそれに準じる方法に従って行われる。

膵ホルモン産生細胞の培養は、膵ホルモンが発現および／または分泌される条件下であれば特に限定されず公知の方法に従って行えばよい。培地としては、例えば、約1～20%の牛胎児血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501(1952)
15 等〕、DMEM培地〔Virology, 8巻, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519(1967)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)〕が用いられる。培地のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15時間～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を
20 加える。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿が挙げられる。ここで試験化合物は塩を形成していてもよい。該塩としては、生理学的に許容される酸や塩基（例、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属
25 塩、アルミニウム塩）などとの塩が用いられ、この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエ

ン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アルミニウム塩が用いられる。

例えば、上記 (a) の場合における膵ホルモンの発現量又は分泌量を、上記
5 (b) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは約 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上抑制 (阻害) する試験化合物を、膵ホルモン産生細胞における膵ホルモン発現を抑制 (阻害) する化合物として選択することができる。

上記 (a) の場合における膵ホルモンの発現量又は分泌量を、上記 (b) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは約 30% 以上、より好ましくは約 5
10 0% 以上促進する試験化合物を、膵ホルモン産生細胞における膵ホルモンの発現又は分泌を促進する化合物として選択することができる。

膵ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞である場合、インスリン発現を促進する化合物は糖尿病治療薬として有用である。膵ホルモン産生細胞がグルカゴン産生細胞である場合、グルカゴン発現を抑制 (阻害) する化合物は糖尿病
15 治療薬として有用である。

[0091]

本発明のスクリーニング方法の別の実施態様は、(a) 試験化合物存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合と、(b) 試験化合物非存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合における、該細胞の増殖能をそれぞれ測定し、比較
20 する方法が挙げられる (態様 2)。使用する試験化合物としては、上記態様 1 で用いられるものと同様のものが挙げられる。また、本態様における細胞の培養は、上記態様 1 と同様にして行うことができる。細胞の増殖能を測定する方法としては、通常、当技術分野で実施されている方法が用いられ、例えば細胞数を計測する方法や³H、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 等の取り
25 込み、ATP 量、テトラゾリウム化合物からホルマザン産物への変換量を評価する方法が挙げられる。

例えば、膵ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞である場合、有意にインスリン産生細胞の増殖を促進する化合物は糖尿病治療薬として有用である。膵ホルモン産生細胞がグルカゴン産生細胞である場合、有意にグルカゴン産生細胞の増殖を抑制（阻害）する化合物は糖尿病治療薬として有用である。

5 [0092]

- 本発明のスクリーニング方法の別の実施態様は、（a）試験化合物存在下で膵ホルモン産生前駆細胞を培養した場合と、（b）試験化合物非存在下で膵ホルモン産生前駆細胞を培養した場合における、該細胞の分化の程度をそれぞれ調べ、比較する方法が挙げられる（態様3）。使用する試験化合物としては、
- 10 上記態様1で用いられるものと同様のものが挙げられる。また、本態様における細胞の培養は、上記態様1と同様にして行うことができる。膵ホルモン産生前駆細胞の分化の程度は、例えば膵ホルモン産生前駆細胞及び／又は膵ホルモン産生細胞の特異マーカーの発現の有無によって調べられる。膵ホルモン産生前駆細胞の特異マーカーとしては、NGN3（neurogenin 3）、PAX4
- 15 （paired box 4）が、膵ホルモン産生細胞の特異マーカーとしてはインスリン、グルカゴン、パンクレアティックポリペプチド、ソマトスタチン、グレリン、PCSK1（proprotein convertase subtilisin/kexin type 1）、SUR1
- （sulfonylurea receptor 1、別名 ATP-binding cassette, sub-family C（CFTR/MRP）, member 8）、グルコキナーゼ、MAFA（v-maf
- 20 musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A）、IAPP（islet amyloid polypeptide）等がそれぞれ例示される。

- 例えば、膵ホルモン産生前駆細胞がインスリン産生前駆細胞である場合、有意にインスリン産生前駆細胞の分化を促進する化合物は糖尿病治療薬として有用である。膵ホルモン産生前駆細胞がグルカゴン産生前駆細胞である場合、有
- 25 意にグルカゴン産生前駆細胞の分化を抑制（阻害）する化合物は糖尿病治療薬として有用である。

[0093]

本発明のスクリーニング方法の別の実施態様は、（a）試験化合物存在下で内胚葉細胞を培養した場合と、（b）試験化合物非存在下で内胚葉細胞を培養した場合における、該細胞の増殖あるいは分化能をそれぞれ測定し、比較する方法が挙げられる（態様4）。使用する試験化合物としては、上記態様1で用いられるものと同様のものが挙げられる。また、本態様における細胞の培養は、上記態様1と同様にして行うことができる。細胞の増殖能を測定する方法としては、通常、当技術分野で実施されている方法が用いられ、例えば細胞数を計測する方法や³H、5-bromo-2'-deoxy-uridine（BrdU）等の取り込み、ATP量、テトラゾリウム化合物からホルマザン産物への変換量を評価する方法が挙げられる。内胚葉細胞の分化能は、例えば内胚葉系細胞の特異マーカーの発現の有無によって調べられる。内胚葉系細胞の特異マーカーとしては、アルファフェトプロテイン、アルブミン、ペプシン、肺サーファクタントプロテインなどが挙げられる。一般に内胚葉系細胞の分化誘導や培養は中胚葉あるいは外胚葉系細胞に比べて技術的に困難であり、当該スクリーニング系によって得られた化合物を利用して作製した細胞自体及び／又は内胚葉の分化誘導系は、新たな医薬のスクリーニング系に利用し得る。

[0094]

膵ホルモン産生細胞の機能を保護する（維持する）医薬等も本発明のスクリーニング方法に準じた方法で得ることができる。本発明のスクリーニング方法の別の実施態様は、（a）試験化合物存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合と、（b）試験化合物非存在下で膵ホルモン産生細胞を培養した場合における、該細胞の生存数あるいは機能をそれぞれ測定し、比較する方法が挙げられる（態様5）。使用する試験化合物としては、上記態様1で用いられるものと同様のものが挙げられる。また、本態様における細胞の培養は、上記態様1と同様にして行うことができる。細胞の生存数を測定する方法としては、通常、当技術分野で実施されている方法が用いられ、例えば細胞数を計測する方法や³H、5-bromo-2'-deoxy-uridine（BrdU）等の取り込み、ATP量、テト

- ラゾリウム化合物からホルマザン産物への変換量を評価する方法が挙げられる。また、アポトーシスが誘発された細胞の数は、形態的な特徴（クロマチンの凝縮、核の断片化、細胞の収縮など）を呈する細胞の計数の他に、TUNNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法による断片化DNAの検出や活性カスパーゼの有無の検出、7-AAD (7-amino-actinomycin D) など生細胞不透過性色素による核染色、ホスファチジルセリンの細胞表面への露出やミトコンドリア膜の脱分極化、特定の細胞内タンパク質の切断や分解などの測定によって定量化し得る。また、細胞の機能を測定する方法としては、グルコース濃度に応じたインスリンあるいはCペプチドの分泌量や細胞膜電位の変動を測定する方法などが挙げられる。本態様では、膵ホルモン産生細胞に対して障害を与えることが知られている因子（例えば、炎症性サイトカインや活性酸素およびその産生誘導物質、高濃度の脂肪酸やグルコース）を細胞の培養時に添加し、該細胞の生存数あるいは機能を測定し、比較する方法が挙げられる。
- 15 膵ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞である場合、膵ホルモン産生細胞に対して障害を与えることが知られている因子に対して有意にインスリン産生細胞の生存あるいは機能維持を促進する化合物は糖尿病治療薬として有用である。

[0095]

- 20 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる医薬は、常套手段に従って、生理学的に許容し得る添加剤（例、担体、香味剤、賦形剤、防腐剤、安定剤、結合剤）を用いて製剤化することができる。
- このようにして得られる製剤の剤形としては、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの経口剤；注射剤などの非経口剤が挙げられる。これら製剤における有効成分の含量は例えば、0.1～90重量%である。
- 25

[0096]

前記添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムなどの結合剤；結晶性セルロースなどの賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑

剤；シヨ糖、乳糖、サッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、アカモノ油、チエリーなどの香味剤；油脂、注射用水、植物油（例えば、ゴマ油、ヤシ油、大

豆油）、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）などの液

状担体；溶解補助剤（例えば、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチ

レングリコール）；非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80 TM、
HCO-50）；溶解補助剤（例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール

ル）；無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸フロカイン）；安定剤
（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール）；保存剤（例えば、
ベンジルアルコール、フェノール）；酸化防止剤が挙げられる。

前記注射用水としては、例えば、生理食塩水；ブドウ糖、D-ソルビトール、
D-マンニトール、塩化ナトリウムなどを含む等張液が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法によって得られる医薬（好ましくは糖尿病治療
薬）は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、
ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジ

ー）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

該医薬の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより
適宜設定される。

実施例

[0097]

以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は以下の実施例に何ら限
定されるものではない。

[0098]

実施例 1 (1) :

ヒト i P S 細胞から内胚葉細胞への分化誘導 [工程 (1) ~ (3)]

ヒト i P S 細胞から内胚葉細胞への分化誘導は次の方法で行った。

まず、細胞塊の状態でフィーダー細胞とともに培養・維持していたヒト i P S 細胞 (O c t 3 / 4 遺伝子、K l f 4 遺伝子及び S o x 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞 : Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106 参照) を、霊長類 E S 細胞用細胞剥離液 (リプロセル社) を用いて細胞塊の状態
5 で剥離させ、15 ml 遠沈管に移して5分間静置し、上清を除くことによってフィーダー細胞を除去した。

次に、遠沈管に沈んだヒト i P S 細胞に0.25%トリプシン-1 mM E
10 D T A 溶液 (GIBCO社) を添加し、単一細胞になるまで解離させた。続いて、培地に分散させたヒト i P S 細胞を、BDマトリゲル (日本ベクトン・デッキンソン社) をコートした100 mmディッシュ1枚あたり 1.5×10^4 個の密度で播種し、37℃、5% CO₂ 下で1日間培養した。100 mmディッシュは、BDマトリゲルを無血清のDMEM/F12培地 (Invitrogen社) を用い
15 て40倍希釈し、室温で3時間以上コートしたものを用いた。また、分散時および播種時の培地としては、10 μMのY-27632 (和光純薬) を添加した霊長類 E S 細胞用培地 (リプロセル社) を使用した。播種1日後に、GSK3β阻害剤であるCHIR99021 (3 μM) と2% B27サプリメント (GIBCO社) を含むDMEM/F12培地に培地交換して2日間培養した。続い
20 て、アクチビンA (50 ng/ml) とCHIR99021 (1 μM) を含むDMEM/F12培地に培地交換して2日間培養した。

[0099]

ヒト i P S 細胞培養時の内胚葉分化マーカーの発現変動を調べるため、分化誘導した細胞を経時的に回収し、RNeasy96 (Qiagen社) を用いて全RNA画分
25 を精製した。PrimeScriptRT reagent kit (タカラバイオ社) を用いてcDNAを合成した後、定量RT-PCRを実施して、原始線条マーカーであるBrachyury、内胚葉マーカーであるSOX17の遺伝子発現量を測定した。

発現解析の結果を図1に示す。培養3日目においてBrachyuryの発現量が一過的に上昇し、4日目にはSOX17の発現量が顕著に増加した。

これにより、原始線条への分化を経由して内胚葉マーカーが効率的に発現誘導されたことが明らかとなった。

5 [0100]

次に、SOX17タンパク質の発現を調べるため、抗SOX17抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した。100mmディッシュを用いて内胚葉細胞へと分化誘導した細胞を、アキュターゼ (Invitrogen社) (商品名) を用いて単一細胞へと解離させ、フィブロネクチンコートした96穴プレートに 4×10^4 個
10 の密度で播種し、37℃、5% CO₂下で1日間培養した。フィブロネクチンコートは、DMEM/F12を用いてフィブロネクチン (BD) を20倍希釈し、室温で3時間静置することによって行った。播種時の培養液としては、1% B27サブプリメントを含むImproved MEM Zinc Option培地 (Invitrogen社) を使用した。培養後、4%パラホルムアルデヒドを添加して室温で30分
15 間インキュベートし、細胞の固定を行った。培養後の細胞を、1次抗体として抗ヒトSOX17抗体 (AF1924、R&D社) と反応させ、さらに2次抗体としてAlexa488標識2次抗体 (Invitrogen社) と順次反応させた後、細胞の核をヘキスト33342を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。結果として、大部分の細胞がSOX17タンパクを発現してい
20 る様子が観察された。以上の検討により、CHIR99021とB27サブプリメントを添加したDMEM/F12培地で2日間、さらにアクチビンAとCHIR99021を添加したDMEM/F12培地で2日間培養することによって、フィーダー細胞や血清を使用せず、効率的に内胚葉細胞への分化を誘導できることが明らかとなった。

25 [0101]

実施例1 (2) :

工程（２）におけるCHIR99021以外のGSK3阻害剤（BIO）による内胚葉誘導について検討した。

ヒトiPS細胞の播種１日後に、CHIR99021（ $3\mu\text{M}$ ）と２％ B27サプリメント（GIBCO社）を含むDMEM/F12培地に交換して２日間培養した。

次に、一方は、GSK3阻害剤としてCHIR99021（ $3\mu\text{M}$ ）とアクチビンA（ 100ng/ml ）および２％ B27サプリメント（GIBCO社）を含むDMEM/F12培地に交換し、培養を継続した（図３では「Activin A + CHIR99021」と標記）。

10 もう一方は、GSK3阻害剤としてBIO（ $0.5\mu\text{M}$ ）とアクチビンA（ 100ng/ml ）および２％ B27サプリメント（GIBCO社）を含むDMEM/F12培地に交換し、培養を継続した（図３では「Activin A + BIO」と標記）。

ヒトiPS細胞培養時のSOX17の遺伝子発現量を経時的に測定した。発現解析の結果を図３に示す。CHIR99021またはBIOのどちらを用いても、培養４日目からSOX17の発現量が顕著に増加し、同様の発現パターンを示した。この結果から、CHIR99021以外のGSK3阻害剤を用いても内胚葉を誘導できることが明らかとなった。

[0102]

20 実施例２：

内胚葉細胞から膵ホルモン産生細胞への分化誘導〔工程（４）～（６）〕

内胚葉細胞へ分化させた細胞から細胞塊を形成させ、その後さらに膵ホルモン産生前駆細胞、続いて膵ホルモン産生細胞へと分化誘導させた。

100mmディッシュを用いて分化誘導した内胚葉細胞をアキュターゼ（Invitrogen）（商品名）を用いて、単一細胞になるまで解離させた。続いて、培地に分散させた内胚葉細胞を96穴スフェロイドプレート（住友ベークライト）に1穴あたり 2×10^4 個の密度で播種し、 37°C 、5％ CO_2 下で１日

間培養して細胞塊を形成させた。分散時および播種時の培地としては、1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地を使用した。内胚葉細胞を播種して1日後に、ドーソモルフィン (1 μ M)、レチノイン酸 (2 μ M)、SB431542 (10 μ M) 及び bFGF (50 ng/ml) を加えた1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地に培地交換し、37°C、5% CO₂ の条件下で8日間培養した。培地交換は4日目の時点で一度行った。8日間培養後、1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地に培地交換してさらに培養を行った。その後の培地交換は3日~4日ごとに行った。

10 内胚葉を播種して1日後にドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542 及び bFGF の組み合わせで8日間培養後、1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地に交換してさらに培養を継続したときのインスリンの発現解析の結果を図4に示す。1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地に交換した培養13日目の時点では、インスリンの発現はほとんど認められなかったが、培養15日目以降から急激に増加した。

比較例として、内胚葉細胞を播種して1日後にドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542 の組み合わせを用いて8日間培養した後、さらに1% B27 サプリメントを含む Improved MEM Zinc Option 培地に培地交換してさらに培養を行った。培養19日目の発現解析の結果を図5に示す。ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542 の組み合わせで培養した場合よりも、ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542 及び bFGF の組み合わせで培養することで、培養19日目においてインスリンの発現は高い値を示した。

25 [0103]

次に、インスリンとグルカゴンのタンパク質の発現について調べるため、抗インスリン抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した。内胚葉細胞を播種して1日

後にドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542及びbFGFを添加して8日間培養した後、さらに1% B27サプリメントを含むImproved MEM Zinc Option培地に培地交換して8日間培養した。培養後、4%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で3時間固定を行い、OCTコンパウンド (Tissue-
 5 tek) に、培養後の細胞を包埋後、厚さ10 μ mの凍結切片を作製した。その後、1次抗体として抗インスリン抗体 (A0564、DAKO社) 又は抗グルカゴン抗体 (G2654、SIGMA社) と反応させ、さらに2次抗体としてAlexa
 568標識2次抗体 (Invitrogen社) 又はAlexa488標識2次抗体 (Invitrogen社) と順次反応させた後、細胞の核をヘキスト33342を用い
 10 て染色し、蛍光顕微鏡で観察した。免疫蛍光染色の結果を図6に示す。インスリンを発現している細胞がsphere内部に数多く認められ、グルカゴンを発現している細胞も一部認められた。

[0104]

実施例3：ヒトiPS細胞から膵ホルモン産生細胞への分化誘導

15 [工程(1)～(6)；BDマトリゲルまたはフィブロネクチンを使用した内胚葉細胞への分化誘導と、膵ホルモン産生細胞への分化誘導]

ヒトiPS細胞から内胚葉細胞への分化誘導は次の方法で行った。

まず、細胞塊の状態で維持していたヒトiPS細胞を実施例1と同様の方法で、単一細胞になるまで解離させた。

20 次に、一方は、培地に分散させたヒトiPS細胞を、フィブロネクチン (Invitrogen社) をコートした100mmディッシュ1枚あたり 60×10^4 個の密度で播種し、37℃、5% CO₂下で1日間培養した。100mmディッシュは、フィブロネクチンが無血清のDMEM/F12培地 (Invitrogen社) を用いて40倍希釈し、室温で3時間以上コートしたものをを用いた。(図
 25 7では「フィブロネクチン」と表記)

もう一方は、培地に分散させたヒトiPS細胞を、BDマトリゲル (日本ベクトン・デッキンソン社) をコートした100mmディッシュ1枚あたり15

× 10⁴個の密度で播種し、37℃、5% CO₂下で1日間培養した。100 mmディッシュは、BDマトリゲルを無血清のDMEM/F12培地 (Invitrogen社) を用いて40倍希釈し、室温で3時間以上コートしたものを 用いた。(図7では「マトリゲル」と表記)

- 5 また、分散時および播種時の培地としては、10 μMのY-27632 (和光純薬) を添加した霊長類ES細胞用培地 (リプロセル社) を使用した。播種 1日後に、GSK3β阻害剤であるCHIR99021 (3 μM) と2% B 27サプリメント (GIBCO社) を含むDMEM/F12培地に培地交換して2 日間培養した。続いて、アクチビンA (50 ng/ml) とCHIR9902 10 1 (1 μM) を含むDMEM/F12培地に培地交換して2日間培養した。
[0105]

内胚葉細胞へ分化させた細胞から実施例2と同様に細胞塊を形成させ、その 後さらに腭ホルモン産生前駆細胞、続いて腭ホルモン産生細胞へと分化誘導さ せた。

- 15 実施例2と同様に、内胚葉細胞を播種して1日後にドーソモルフィン、レチ ノイン酸、SB431542及びbFGFの組み合わせで8日間培養後、1% B27を含むImproved MEM Zinc Option培地に培地交換して分化誘導させ、各 種分化マーカーの経時的な発現解析を行った。発現解析の結果を図7に示す。

- 内胚葉マーカーであるSOX17の発現は分化に伴い顕著に減少し、腭前駆 20 細胞マーカー (PDX1) と腭ホルモン産生前駆細胞マーカー (NGN3) の 発現は培養17日目まで徐々に増加した。インスリンの発現は培養17日目か ら急激に増加した。これら各種分化マーカーの経時的な発現変動は、BDマト リゲルまたはフィブロネクチンを基質として誘導した内胚葉細胞を用いた場合 でほとんど同様であった。BDマトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm (EH 25 S) マウス肉腫細胞から抽出した基底膜調製品である。一方、本実施例で使用 したフィブロネクチンはヒト血漿からアフィニティークロマトグラフィーによ って抽出したものである。このことから、フィブロネクチンを使用した場合で

あっても、BDマトリゲル（実施例1および2）の場合と同様、膵ホルモン産生細胞への分化を誘導できることが明らかとなった。

[0106]

- 5 以上の実施例1～3の検討により、内胚葉細胞を用いてsphereを形成させ、ドーソモルフィン、レチノイン酸、SB431542及びbFGFを添加した1% B27サプリメントを含むImproved MEM Zinc Option培地で8日間培養し、その後、1% B27サプリメントを含むImproved MEM Zinc Option培地に交換して培養する図8に示した膵臓分化誘導系を用いることで、膵ホルモン産生細胞への分化を誘導できることが明らかとなった。
- 10 本発明の方法により製造された膵ホルモン産生細胞は、他の方法で製造された膵ホルモン産生細胞よりもインスリン産生量に優れている。

産業上の利用可能性

[0107]

- 15 本発明の製造法によれば、幹細胞からより膵発生を模倣した形の膵ホルモン産生細胞を製造することができる。また、本発明の細胞は、糖尿病等の膵ホルモン産生及び／又は分泌異常に起因する疾患の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニングに用いることができる。さらに本発明の細胞は、そのような疾患を治療するための細胞医療に用いることができるが、三次元的な構造を維持しているので、従来の製造方法により得られる膵ホルモン産生細胞と比較しても、細胞医療への応用により適した細胞であるといえる。
- 20

本出願は、日本で出願された特願2010-178523を基礎としており、その内容は本出願にすべて包含されるものである。

請求の範囲

1. 幹細胞を、以下の工程（１）～（６）に付すことを特徴とする、膵ホルモン産生細胞の製造法：
- （１）幹細胞を、R h o キナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程
- 5 （２）前記（１）で得られた細胞を、G S K 3 阻害剤を含む培地で培養する工程
- （３）前記（２）で得られた細胞を、G S K 3 阻害剤およびアクチビン受容体様キナーゼ－４， ７の活性化剤を含む培地で培養する工程
- （４）前記（３）で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を
- 10 培地中において浮遊状態で培養する工程
- （５）前記（４）で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP 活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼ－２， ３， ６の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼ－４， ５， ７の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程
- 15 （６）前記（５）で得られた細胞を、培地で培養する工程。
2. 工程（３）におけるアクチビン受容体様キナーゼ－４， ７の活性化剤がアクチビンである、
- 請求項１記載の製造法。
3. 工程（１）におけるR h o キナーゼ阻害剤が（＋）－（R）－トランス－
- 20 ４－（１－アミノエチル）－N－（４－ピリジル）シクロヘキサンカルボキサミド二塩酸塩である、
- 請求項１記載の製造法。
4. 工程（２）および（３）におけるG S K 3 阻害剤が、
- （i） 6－[[2－[[4－（２， ４－ジクロロフェニル）－５－（４－メチル
- 25 ルー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、および／または
- （i i）（２’ Z， ３’ E）－６－ブロモインジルビン－３’－オキシムであ

- る、
- 請求項 1 記載の製造法。
5. 工程 (5) におけるレチノイン酸受容体アゴニストがレチノイン酸である、
- 請求項 1 記載の製造法。
6. 工程 (5) における AMP 活性化プロテインキナーゼおよび/またはアクチビン受容体キナーゼ-2, 3, 6 の阻害剤がドーソモルフィンである、
- 請求項 1 記載の製造法。
7. 工程 (5) におけるアクチビン受容体キナーゼ-4, 5, 7 の阻害剤が 4-[4-(1, 3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミドである、
- 請求項 1 記載の製造法。
8. 工程 (5) における細胞増殖因子が塩基性線維芽細胞増殖因子である、
- 請求項 1 記載の製造法。
9. 工程 (1) ~ (6) において、フアイター細胞を実質的に用いない、請求項 1 記載の製造法。
10. 工程 (1) ~ (6) における培地が、血清を実質的に含まない、請求項 1 記載の製造法。
11. 幹細胞が、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、胚性幹細胞 (ES 細胞) 又はヒトの体性幹細胞である請求項 1 記載の製造法。
12. 膝ホルモン産生細胞がインスリン産生細胞、グルカゴニン産生細胞、ソマトスタチン産生細胞、膝ポリペプチド (PP) 産生細胞、及びグレリン産生細胞からなる群より選択されるいずれかである請求項 1 記載の製造法。
13. 内胚葉細胞を、以下の工程 (4') および (5') に付すことを特徴とする、膝ホルモン産生細胞の製造法：
- (4') 内胚葉細胞から細胞塊を形成させ、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程
- (5') 前記 (4') で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、

AMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼー2, 3, 6の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼー4, 5, 7の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程。

14. 請求項1または13に記載の製造法で得られた膵ホルモン産生細胞を含む、医薬。

15. 以下の工程(1)～(6)からなる群より選択されるいずれか1種以上の工程によって得られた細胞を用いることを特徴とする、糖尿病治療薬のスクリーニング方法：

(1) 幹細胞を、Rhoキナーゼ阻害剤を含む培地で培養する工程

10 (2) 前記(1)で得られた細胞を、GSK3阻害剤を含む培地で培養する工程

(3) 前記(2)で得られた細胞を、GSK3阻害剤およびアクチビン受容体様キナーゼー4, 7の活性化剤を含む培地で培養する工程

15 (4) 前記(3)で得られた細胞から、細胞塊を形成させた後に、該細胞塊を培地中において浮遊状態で培養する工程

(5) 前記(4)で得られた細胞を、レチノイン酸受容体アゴニスト、AMP活性化プロテインキナーゼおよび／またはアクチビン受容体様キナーゼー2, 3, 6の阻害剤、アクチビン受容体様キナーゼー4, 5, 7の阻害剤、および細胞増殖因子を含む培地で培養する工程

20 (6) 前記(5)で得られた細胞を、培地で培養する工程。