

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年10月31日(31.10.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/208788 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/017978
- (22) 国際出願日: 2019年4月26日(26.04.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2018-087226 2018年4月27日(27.04.2018) JP
特願 2018-247334 2018年12月28日(28.12.2018) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP). 国立研究開発法人国立国際医療研究センター(NATIONAL CENTER FOR GLOBAL HEALTH AND MEDICINE) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山1-21-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 伊吹 将人 (IBUKI Masato); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町6-7-3 株

式会社カネカ神戸 M I R & D センター内 Hyogo (JP). 松田 拓敏(MATSUTA Hirotoishi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町6-7-3 株式会社カネカ神戸 M I R & D センター内 Hyogo (JP). 大河内 仁志(OKOCHI Hitoshi); 〒1628655 東京都新宿区戸山1-21-1 国立研究開発法人国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 矢部 茂治(YABE Shigeharu); 〒1628655 東京都新宿区戸山1-21-1 国立研究開発法人国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP). 福田 沙月(FUKUDA Satsuki); 〒1628655 東京都新宿区戸山1-21-1 国立研究開発法人国立国際医療研究センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 及川 周, 外 (OIKAWA Shu et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR PANCREATIC β CELLS

(54) 発明の名称: 膵臓 β 細胞の製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a method for producing pancreatic β cells from endodermal cells that have been induced to differentiate from pluripotent stem cells, wherein the method makes it possible to produce high-quality pancreatic β cells; and pancreatic precursor (PP) cells, pancreatic endocrine precursor (EP) cells, and pancreatic β cells produced by means of the method. The present invention provides a production method for pancreatic β cells, the production method including a step for: producing posterior foregut (PFG) cells by culturing primitive gut tube (PGT) cells that have been induced to differentiate from pluripotent stem cells, the culture being performed in the presence of a protein kinase C (PKC) activator; producing pancreatic precursor (PP) cells by culturing in the presence of retinoic acid or an analog thereof; producing pancreatic endocrine precursor (EP) cells by culturing in the presence of a Notch signal inhibitor and a ROCK signal inhibitor; and producing pancreatic β cells by culturing in the presence of an insulin receptor signal activator, transferrin, and selenious acid.

(57) 要約: 本発明の課題は、多能性幹細胞から分化誘導された内胚葉系細胞から、膵臓 β 細胞を製造する方法であって、高い品質を有する膵臓 β 細胞を製造することを可能とするような上記方法、並びに上記方法において製造される膵臓前駆細胞 (PP)、膵内分泌前駆細胞 (EP) および膵臓 β 細胞を提供することである。本発明によれば、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (PGT) を、プロテインキナーゼC (PKC) 活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞 (PFG) を製造し、次いで、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞 (PP) を製造し、次いで、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞 (EP) を製造し、次いで、インスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓 β 細胞を製造する工程を含む、膵臓 β 細胞の製造方法が提供される。

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 膵臓 β 細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、膵臓 β 細胞の製造方法に関する。本発明はさらに、上記の膵臓 β 細胞の製造方法において製造される膵臓前駆細胞（P P）、膵内分泌前駆細胞（E P）および膵臓 β 細胞に関する。

背景技術

[0002] 再生医療は、ドナー不足を課題とする臓器移植の代替法や難病の新たな治療法開発などにおいて大きな期待が寄せられている。胚性幹細胞（E S細胞）や人工多能性幹細胞（i P S細胞）は多能性及び無限増殖性を有しているため、再生医療に必要とされる細胞を調製するための細胞ソースとして期待されている。これらの多能性幹細胞を用いた再生医療の実用化に際しては、多能性幹細胞を効率よく目的の体細胞に分化誘導させる技術の確立が必要であり、多様な分化誘導方法について報告されている。

[0003] 例えば、膵臓 β 細胞は、糖尿病の細胞治療において有用であることから、多能性幹細胞から効率よく膵臓 β 細胞を作製する方法が検討されている。非特許文献1には、ヒトi P S細胞から機能的な膵臓 β 細胞を生成するためのプロセスについての総説が記載されている。非特許文献2には、ヒトi P S細胞から機能的な膵臓 β 細胞を効率よく生成する方法が記載されている。非特許文献2においては、ステージ1においてi P S細胞を内胚葉系細胞に分化させた後、ステージ2において原始腸管細胞（p r i m i t i v e g u t : P G T）へ分化誘導し、ステージ3において後前腸細胞（P F G）へ分化誘導し、ステージ4において膵臓前駆細胞（P P）へ分化誘導し、ステージ5において膵臓前駆細胞（P P）へ分化誘導し、ステージ6において膵臓 β 細胞へと分化誘導している。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Larry Sai Weng Loo MSc et al., Diabetes Obes Metab. 2018: 20-3-13

非特許文献2: Shigeharu G. Yabe et al., Journal of Diabetes, 2017 Feb; 9 (2) : 168-179

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記した通り、多能性幹細胞から膵臓 β 細胞を分化誘導するための培養方法は報告されているが、細胞治療製剤としての治療効果の観点から、分化誘導効率を、より向上させ、膵臓 β 細胞としての細胞の品質を高める必要がある。

[0006] 従って、本発明は、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞から膵臓 β 細胞を製造する方法であって、前記原始腸管細胞から効率的に膵臓 β 細胞を製造でき、得られた膵臓 β 細胞が高い品質を有することを可能とするような上記方法を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、上記の膵臓 β 細胞の製造方法において製造される膵臓前駆細胞（PP）、膵内分泌前駆細胞（EP）および膵臓 β 細胞を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を、それぞれ所定の条件下で培養することにより、後前腸細胞（PFG）、膵臓前駆細胞（PP）及び膵内分泌前駆細胞（EP）を経て膵臓 β 細胞へと分化誘導することができ、この膵臓 β 細胞が糖尿病モデルマウスにおいて優れた血糖値正常化作用を示すことを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

[0008] すなわち、本明細書によれば、以下の発明が提供される。

<1> (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を

、プロテインキナーゼC（PKC）活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞（PFG）を製造する工程：

（b）前記の後前腸細胞（PFG）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞（PP）を製造する工程：

（c）前記の膵臓前駆細胞（PP）を、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞（EP）を製造する工程：及び

（d）前記の膵内分泌前駆細胞（EP）をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓β細胞を製造する工程：

を含む、膵臓β細胞の製造方法。

<1-1> （a）多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を、後前腸細胞（PFG）への分化誘導に適した培養条件下、プロテインキナーゼC（PKC）活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞（PFG）を製造する工程：

（b）前記の後前腸細胞（PFG）を、膵臓前駆細胞（PP）への分化誘導に適した培養条件下、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞（PP）を製造する工程：

（c）前記の膵臓前駆細胞（PP）を、膵内分泌前駆細胞（EP）への分化誘導に適した培養条件下、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞（EP）を製造する工程：及び

（d）前記の膵内分泌前駆細胞（EP）を、膵臓β細胞への分化誘導に適した培養条件下、インスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓β細胞を製造する工程：

を含む、膵臓β細胞の製造方法。

<2> 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を、プロ

テインキナーゼC（PKC）活性化剤の存在下において培養する工程が、FGF2の非存在下である、＜1＞に記載の膵臓β細胞の製造方法。

＜3＞ 膵臓前駆細胞（PP）を、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養する工程が、ニコチンアミドを含む培地において培養する工程である、＜1＞又は＜2＞に記載の膵臓β細胞の製造方法。

＜4＞ 膵内分泌前駆細胞（EP）をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養する工程が、FGF2の非存在下である、＜1＞から＜3＞のいずれかに記載の膵臓β細胞の製造方法。

＜5＞多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）が、多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導できる条件下で培養する工程、および前記内胚葉系細胞から原始腸管細胞（PGT）に分化誘導できる条件下で培養する工程により得られる細胞である、＜1＞から＜4＞の何れかに記載の方法。

＜6＞ 多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導する工程が、多能性幹細胞を、TGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地で培養した後、FGF2及びBMP4を添加していない培地で培養する工程である、＜5＞に記載の方法。

＜7＞ 内胚葉系細胞を原始腸管細胞（PGT）に分化誘導する工程が、内胚葉系細胞を、骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤の非存在下において培養する工程である、＜5＞又は＜6＞に記載の方法。

[0009] ＜8＞ 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を、プロテインキナーゼC（PKC）活性化剤の存在下において培養する工程が、TGF-βシグナル阻害剤の非存在下である、＜1＞から＜7＞のいずれかに記載の膵臓β細胞の製造方法。

＜9＞ 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を、プロテインキナーゼC（PKC）活性化剤の存在下において培養する工程が、F

G F 受容体シグナル活性化剤及びインスリン受容体シグナル活性化剤の少なくとも一つの存在下である、＜1＞から＜8＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

＜10＞ 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（P G T）を、プロテインキナーゼC（P K C）活性化剤の存在下において培養する工程が、F G F 7 及びインスリンの少なくとも一つの存在下である、＜1＞から＜9＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

[0010] ＜11＞ 後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養する工程が、F G F 受容体シグナル活性化剤、インスリン受容体シグナル活性化剤、骨形成タンパク質（B M P）シグナル阻害剤、P K C 活性化剤、H H シグナル阻害剤及びT G F - β 受容体シグナル阻害剤の少なくとも一つの存在下である、＜1＞から＜10＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

＜12＞ 後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養する工程が、F G F 10、インスリン、I L V、S A N T 1 及びR e p S o x の少なくとも一つの存在下である、＜1＞から＜11＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

＜13＞ 後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養する工程が、さらに、亜鉛及びL D N から選択される少なくとも一の存在下である、＜1＞から＜12＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

[0011] ＜14＞ 膵臓前駆細胞（P P）を、N o t c h シグナル阻害剤及びR O C K シグナル阻害剤の存在下において培養する工程が、E G F 受容体シグナル活性化剤、インスリン受容体シグナル活性化剤、G L P - 1 （G l u c a g o n - l i k e p e p t i d e - 1）受容体シグナル活性化剤、H H シグナル阻害剤、T G F - β 受容体シグナル阻害剤、増殖因子安定化剤、及びニコチンアミドから選択される少なくとも一の存在下である、＜1＞から＜13＞のいずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

<15> 膵臓前駆細胞 (PP) を、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養する工程が、EGF、インスリン、Exendin4、SANT1、RepSox、ヘパリン、及びニコチンアミドから選択される少なくとも一の存在下である、<1>から<14>のいずれかーに記載の膵臓β細胞の製造方法。

方法。

[0012] <16> 膵内分泌前駆細胞 (EP) をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養する工程が、TGF-βスーパーファミリーシグナル活性化剤、GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体シグナル活性化剤、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、Adenylate cyclase活性化剤 (細胞内のcAMP濃度を向上させる物質)、TGF-β受容体シグナル阻害剤、増殖因子安定化剤、及びニコチンアミドから選択される少なくとも一の存在下である、<1>から<15>のいずれかーに記載の膵臓β細胞の製造方法。

<17> 膵内分泌前駆細胞 (EP) をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養する工程が、BMP4、Exendin4、HGF、IGF-1、Forskolin、RepSox、ヘパリン、及びニコチンアミドから選択される少なくとも一の存在下である、<1>から<16>のいずれかーに記載の膵臓β細胞の製造方法。

[0013] <18> 骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤が、ドルソモルフィン (Dorsomorphin) またはLDN193189である、<1>から<17>のいずれかーに記載の膵臓β細胞の製造方法。

<19> レチノイン酸又はそのアナログが、EC23である、<1>から<18>のいずれかーに記載の膵臓β細胞の製造方法。

<20> Notchシグナル阻害剤が、ジベンズアゼピン (DBZ) であり、ROCKシグナル阻害剤が、Y27632である、<1>~<19>の

いずれかに記載の膵臓 β 細胞の製造方法。

<21> (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) を、プロテインキナーゼC (P K C) 活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞 (P F G) を製造する工程；及び

(b) 前記の後前腸細胞 (P F G) を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養する工程；

を含む方法によって製造された膵臓前駆細胞 (P P) と比較して、G N A S 遺伝子及び／又はG C K 遺伝子のいずれかの遺伝子発現が向上、及び／又はC D 4 4 遺伝子の発現が減少している、膵臓前駆細胞 (P P) 。

<22> (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) を、プロテインキナーゼC (P K C) 活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞 (P F G) を製造する工程；

(b) 前記の後前腸細胞 (P F G) を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞 (P P) を製造する工程；及び

(c) 前記の膵臓前駆細胞 (P P) を、N o t c h シグナル阻害剤及びR O C K シグナル阻害剤の非存在下において培養する工程；

を含む方法によって製造された膵内分泌前駆細胞 (E P) と比較して、L I G 1 遺伝子の発現が減少している膵内分泌前駆細胞 (E P) 。

<23> (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) を、プロテインキナーゼC (P K C) 活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞 (P F G) を製造する工程；

(b) 前記の後前腸細胞 (P F G) を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞 (P P) を製造する工程；

(c) 前記の膵臓前駆細胞 (P P) を、N o t c h シグナル阻害剤及びR O C K シグナル阻害剤の非存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞 (E P) を製造する工程；及び

(d) 前記の膵内分泌前駆細胞 (E P) をインスリン受容体シグナル活性化

剤及びトランスフェリンの存在下において培養する工程；

を含む方法によって製造された膵臓β細胞と比較して、ADCY1遺伝子、ADCY2遺伝子、PLCB4遺伝子からなる群より選択される少なくとも1以上の遺伝子の発現が向上しているか、及び／又はSMAD9遺伝子の発現が減少している、膵臓β細胞。

<24>

膵内分泌前駆細胞（EP）をインスリン受容体シグナル活性化剤及びトランスフェリンの存在下において培養する工程が、亜セレン酸を含む培地において培養する工程である、<23>に記載の膵臓β細胞。

発明の効果

[0014] 本発明による膵臓β細胞の製造方法を利用することにより、優れた血糖値正常化作用を示す膵臓β細胞を多能性幹細胞由来の原始腸管細胞（PGT）から製造することが可能になる。また、本発明により製造された膵臓β細胞は、優れた血糖値正常化作用を示し、高品質な細胞治療製剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、ヒトiPS細胞から分化誘導した膵臓β細胞における膵臓β細胞マーカー遺伝子（NKX6.1）の発現を解析した結果を示す。

[図2]図2は、糖尿病モデルマウスへの細胞移植実験における血中ヒトc-Peptide濃度の測定結果を示す。

[図3]図3は、糖尿病モデルマウスへの細胞移植実験における随時血糖値の測定結果を示す。

[図4]図4は、ヒトiPS細胞から分化誘導した膵臓前駆細胞（PP）におけるGNAS遺伝子、GCK遺伝子およびCD44遺伝子の発現を解析した結果を示す。

[図5]図5は、ヒトiPS細胞から分化誘導した膵内分泌前駆細胞（EP）におけるLIG1遺伝子の発現を解析した結果を示す。

[図6]図6は、ヒトiPS細胞から分化誘導した膵臓β細胞におけるADCY

1 遺伝子、ADCY 2 遺伝子、PLCB 4 遺伝子およびSMAD 9 遺伝子の発現を解析した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明の実施形態について具体的に説明するが、下記の説明は本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が下記の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も本発明の範囲に含まれる。

[0017] [用語の説明]

本発明において、「阻害剤の非存在下において」とは、「当該阻害剤を添加していない培地において」を意味する。

[0018] 本発明の培地に関して、「を添加していない」という用語は、培養物又は馴化培地において添加していないと特定されたタンパク質、ペプチド及び化合物等の因子を外因的に加えないことを指す。なお、培養物又は馴化培地において添加していないと特定されたタンパク質、ペプチド及び化合物等の因子が培養の連続的な操作により持ち込んでいる場合は、1%未満（体積／体積）、0.5%（体積／体積）未満、0.1%（体積／体積）未満、0.05%（体積／体積）未満、0.01%（体積／体積）未満、0.001%（体積／体積）未満になるように調整する。

[0019] 遺伝子発現量に関して、「が向上している」という用語は、比較対象となる細胞集団における特定の遺伝子発現量よりも遺伝子の発現が増加していることを指し、比較対象となる細胞集団に対して、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、2.0倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、2.6倍以上、2.7倍以上、2.8倍以上、2.9倍以上、3.0倍以上、3.1倍以上、3.2倍以上、3.3倍以上、3.4倍以上、3.5倍以上、3.6倍以上、3.7倍以上、3.8倍以上、3.9倍以上、4.0倍以上、4.1倍以上、4.2倍以上、4.3倍以上、4.4倍以上、4.5倍以上、4.6倍以

上、4. 7倍以上、4. 8倍以上、4. 9倍以上、5. 0倍以上、5. 1倍以上、5. 2倍以上、5. 3倍以上、5. 4倍以上、5. 5倍以上、5. 6倍以上、5. 7倍以上、5. 8倍以上、5. 9倍以上、6. 0倍以上、6. 1倍以上、6. 2倍以上、6. 3倍以上、6. 4倍以上、6. 5倍以上、6. 6倍以上、6. 7倍以上、6. 8倍以上、6. 9倍以上、7. 0倍以上、7. 1倍以上、7. 2倍以上、7. 3倍以上、7. 4倍以上、7. 5倍以上、7. 6倍以上、7. 7倍以上、7. 8倍以上、7. 9倍以上、8. 0倍以上、8. 1倍以上、8. 2倍以上、8. 3倍以上、8. 4倍以上、8. 5倍以上、8. 6倍以上、8. 7倍以上、8. 8倍以上、8. 9倍以上、9. 0倍以上、9. 1倍以上、9. 2倍以上、9. 3倍以上、9. 4倍以上、9. 5倍以上、9. 6倍以上、9. 7倍以上、9. 8倍以上、9. 9倍以上、10. 0倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、250倍以上、500倍以上、750倍以上、1000倍以上、5000倍以上、10000倍以上である。

[0020] 遺伝子発現量に関して、「が減少している」という用語は、比較対象となる細胞集団における特定の遺伝子発現量よりも遺伝子の発現が減少していることを指し、比較対象となる細胞集団に対して、1. 1倍以下、1. 2倍以下、1. 3倍以下、1. 4倍以下、1. 5倍以下、1. 6倍以下、1. 7倍以下、1. 8倍以下、1. 9倍以下、2. 0倍以下、2. 1倍以下、2. 2倍以下、2. 3倍以下、2. 4倍以下、2. 5倍以下、2. 6倍以下、2. 7倍以下、2. 8倍以下、2. 9倍以下、3. 0倍以下、3. 1倍以下、3. 2倍以下、3. 3倍以下、3. 4倍以下、3. 5倍以下、3. 6倍以下、3. 7倍以下、3. 8倍以下、3. 9倍以下、4. 0倍以下、4. 1倍以下、4. 2倍以下、4. 3倍以下、4. 4倍以下、4. 5倍以下、4. 6倍以下、4. 7倍以下、4. 8倍以下、4. 9倍以下、5. 0倍以下、5. 1倍以下、5. 2倍以下、5. 3倍以下、5. 4倍以下、5. 5倍以下、5. 6倍以下、5. 7倍以下、5. 8倍以下、5. 9倍以下、6. 0倍以下、6.

1 倍以下、6. 2 倍以下、6. 3 倍以下、6. 4 倍以下、6. 5 倍以下、6. 6 倍以下、6. 7 倍以下、6. 8 倍以下、6. 9 倍以下、7. 0 倍以下、7. 1 倍以下、7. 2 倍以下、7. 3 倍以下、7. 4 倍以下、7. 5 倍以下、7. 6 倍以下、7. 7 倍以下、7. 8 倍以下、7. 9 倍以下、8. 0 倍以下、8. 1 倍以下、8. 2 倍以下、8. 3 倍以下、8. 4 倍以下、8. 5 倍以下、8. 6 倍以下、8. 7 倍以下、8. 8 倍以下、8. 9 倍以下、9. 0 倍以下、9. 1 倍以下、9. 2 倍以下、9. 3 倍以下、9. 4 倍以下、9. 5 倍以下、9. 6 倍以下、9. 7 倍以下、9. 8 倍以下、9. 9 倍以下、10. 0 倍以下、20 倍以下、30 倍以下、40 倍以下、50 倍以下、60 倍以下、70 倍以下、80 倍以下、90 倍以下、100 倍以下、250 倍以下、500 倍以下、750 倍以下、1000 倍以下、5000 倍以下、10000 倍以下である。

[0021] <凝集体>

本発明の凝集体に関して、「凝集塊」、「クラスター」または「スフェロイド」という用語に言い換えて使用することができ、単細胞に解離していない一群の細胞の集合体を一般的に指す。

[0022] <多能性幹細胞>

本発明における多能性幹細胞とは、生体を構成する全てまたは複数の種類の細胞に分化することができる多分化能（多能性）を有する細胞であって、適切な条件下のインビトロ（*in vitro*）での培養において多能性を維持したまま無限に増殖を続けることができる細胞をいう。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）、人工多能性幹細胞（*induced pluripotent stem cells*; iPS細胞）、体性幹細胞（組織幹細胞）などが挙げられる。多能性幹細胞は、好ましくは、iPS細胞又はES細胞であり、より好ましくはiPS細胞である。なお、「胚（em

bryonic)」とは、配偶子融合によって導出された胚に加えて、体細胞核移植によって、導出された胚も指す。

[0023] ES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、又はヒトが挙げられる。好ましくはヒトに由来する細胞を使用できる。

[0024] ES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ES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ES細胞、及びこれらのES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ES細胞が挙げられる。各ES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。マウスのES細胞は、1981年にエバンズら (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いる。ヒトのES細胞は、1998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、WiCell研究施設 (WiCell Research Institute、ウェブサイト: <http://www.wicell.org/>、マジソン、ウイスコンシン州、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Cellartis社 (ウェブサイト: <http://www.cellartis.com/>、スウェーデン) から購入可能である。

[0025] 人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は、体細胞を初期化することによって得られる多能性を有する細胞である。iPS細胞の作製は、京都大学の山中伸弥教授らのグループ、マサチューセッツ工科大学のルドルフ・ヤニッシュ (Rudolf Jaenisch) らのグループ、ウイスコンシン大学のジェー

ムス・トムソン（James Thomson）らのグループ、ハーバード大学のコンラッド・ホッケドリッカー（Konrad Hochedlinger）らのグループなどを含む複数のグループが成功している。例えば、国際公開WO2007/069666号公報には、Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子及びMyfファミリー遺伝子の遺伝子産物を含む体細胞の核初期化因子、並びにOctファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、Soxファミリー遺伝子及びMyfファミリー遺伝子の遺伝子産物を含む体細胞の核初期化因子が記載されており、さらに体細胞に上記核初期化因子を接触させる工程を含む、体細胞の核初期化により誘導多能性幹細胞を製造する方法が記載されている。

[0026] iPS細胞の製造に用いる体細胞の種類は特に限定されず、任意の体細胞を用いることができる。即ち、体細胞とは、生体を構成する細胞の内生殖細胞以外の全ての細胞を包含し、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。体細胞の由来は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、両生類の何れでもよく特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（例えば、マウスなどのげっ歯類、又はヒトなどの霊長類）であり、特に好ましくはマウス又はヒトである。また、ヒトの体細胞を用いる場合、胎児、新生児又は成人の何れの体細胞を用いてもよい。体細胞の具体例としては、例えば、線維芽細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）、上皮細胞（例えば、胃上皮細胞、肝上皮細胞、肺胞上皮細胞）、内皮細胞（例えば血管、リンパ管）、神経細胞（例えば、ニューロン、グリア細胞）、膵臓細胞、白血球細胞（B細胞、T細胞等）、骨髓細胞、筋肉細胞（例えば、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞）、肝実質細胞、非肝実質細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、歯周組織を構成する細胞（例えば、歯根膜細胞、セメント芽細胞、歯肉線維芽細胞、骨芽細胞）、腎臓・眼・耳を構成する細胞などが挙げられる。

[0027] iPS細胞は、所定の培養条件下（例えば、ES細胞を培養する条件下）において長期にわたって自己複製能を有し、また所定の分化誘導条件下において外胚葉系細胞、中胚葉系細胞又は内胚葉系細胞への何れにも多分化能を

有する幹細胞である。また、iPS細胞はマウスなどの試験動物に移植した場合にテラトーマを形成する能力を有する幹細胞でもよい。

[0028] 体細胞からiPS細胞を製造するためには、まず、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を体細胞に導入する。初期化遺伝子とは、体細胞を初期化してiPS細胞とする作用を有する初期化因子をコードする遺伝子である。初期化遺伝子の組み合わせの具体例としては、以下の組み合わせをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

(i) Oct 遺伝子、Klf 遺伝子、Sox 遺伝子、Myc 遺伝子

(ii) Oct 遺伝子、Sox 遺伝子、NANOG 遺伝子、LIN28 遺伝子

(iii) Oct 遺伝子、Klf 遺伝子、Sox 遺伝子、Myc 遺伝子、hTERT 遺伝子、SV40 large T 遺伝子

(iv) Oct 遺伝子、Klf 遺伝子、Sox 遺伝子

[0029] 上記以外にも、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) などが報告されており、いずれの方法で製造されたiPS細胞でもよい。

[0030] 初期化因子の細胞への導入形態は特に限定されないが、例えば、プラスミドを用いた遺伝子導入、合成RNAの導入、タンパク質として直接導入などが挙げられる。また、microRNAやRNA、低分子化合物等を用いた方法で作製されたiPS細胞を用いてもよい。ES細胞、iPS細胞を始めとする多能性幹細胞は、市販品又は分譲を受けた細胞を用いてもよいし、新たに作製したものを用いてもよい。

[0031] iPS細胞として、例えば253G1株、253G4株、201B6株、

201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1231A3株、1383D2株、1383D6株、iPS-TIG120-3f7株、iPS-TIG120-4f1株、iPS-TIG114-4f1株、RPCHiPS771-2株、15M63株、15M66株、HiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、TkDN4-M株、TkDA3-1株、TkDA3-2株、TkDA3-4株、TkDA3-5株、TkDA3-9株、TkDA3-20株、hiPSC38-2株、MSC-iPSC1株、BJ-iPSC1株等を使用することができる。

[0032] ES細胞として、例えばKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SEES1株、SEES2株、SEES3株、HUES8株、CyT49株、H1株、H9株、HS-181株等を使用することができる。新たに作製された臨床グレードのiPS細胞又はES細胞を用いてもよい。

[0033] <内胚葉系細胞>

内胚葉系細胞は、消化管、肺、甲状腺、膵臓、肝臓などの器官の組織、消化管に開口する分泌腺の細胞、腹膜、胸膜、喉頭、耳管、気管、気管支、尿路（膀胱、尿道の大部分、尿管の一部）などへと分化する能力を有し、一般的に、胚体内胚葉（DE）と言われることがある。多能性幹細胞から内胚葉系細胞への分化は、内胚葉系細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。内胚葉系細胞に特異的な遺伝子としては、例えば、SOX17、FOXA2、CXCR4、AFP、GATA4、EOMES等を挙げることができる。なお、本明細書中において、内胚葉系細胞を胚体内胚葉と言い換えて使用することがある。

[0034] <原始腸管細胞>

原始腸管細胞は、前腸、中腸、後腸を形成する。中腸は卵黄囊とつながっており、後腸からは胚体外の尿膜が分岐している。また、前腸からは呼吸器

系の咽頭も形成される。

胃や腸のように腸管がそのまま分化するものと、肝臓、胆嚢、膵臓、（脾臓（リンパ性器官））などのように腸管から出芽するような形で形成されるものがある。内胚葉系細胞から原始腸管細胞への分化は、原始腸管細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。始腸管細胞に特異的な遺伝子としては、例えば、HNF-1 β 、HNF-4 α などを挙げるができる。

[0035] ＜後前腸細胞（PFG）＞

原始腸管細胞から後前腸細胞への分化は、後前腸細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。後前腸細胞に特異的な遺伝子としてはPDX1、HNF6などを挙げるができる。

[0036] 本発明のPFG細胞において、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」に関する遺伝子発現が向上していることが好ましい。例えば、表1に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製したPFG細胞と比較して向上していることが好ましい。また、パスウェイ名「Viral myocarditis」および「Proteoglycans in cancer」に関する遺伝子発現が減少していることが好ましい。例えば、表2および3に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製したPFG細胞と比較して減少していることが好ましい。

[0037] ＜膵臓前駆細胞（PP）＞

膵臓前駆細胞は後前腸細胞から分化した細胞であり、膵臓の外分泌系細胞および内分泌系細胞へと分化することができる細胞である。後前腸細胞から膵臓前駆細胞への分化は、膵臓前駆細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。膵臓前駆細胞に特異的な遺伝子としてはPDX1、NKX6.1などを挙げるができる。

[0038] 本発明のPP細胞において、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」、パスウェイ名「Morphine addiction」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「Serotonergic syna

pse」、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Amphetamine addiction」、パスウェイ名「Neuroactive ligand-receptor interaction」、パスウェイ名「cAMP signaling pathway」、およびパスウェイ名「Alcoholism」に関する遺伝子発現が向上していることが好ましい。例えば、表4から16に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製したPP細胞と比較して向上していることが好ましい。また、パスウェイ名「p53 signaling pathway」、パスウェイ名「Focal adhesion」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、およびパスウェイ名「Graft-versus-host disease」に関する遺伝子発現が減少していることが好ましい。例えば、表17から21に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製したPP細胞と比較して減少していることが好ましい。

本発明の膵臓前駆細胞（PP）としては、後記する参考例1の方法によって製造された膵臓前駆細胞（PP）と比較して、GNAS遺伝子及び／又はGCK遺伝子のいずれかの遺伝子の発現が向上しているか、及び／又はCD44遺伝子の発現が減少している細胞を挙げることができる。

[0039] <膵内分泌前駆細胞（EP）>

膵内分泌前駆細胞は、膵臓前駆細胞から分化した細胞であり、膵臓の内分泌系細胞（ α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、PP細胞等）へと分化することができる細胞である。膵臓前駆細胞への分化は、膵臓前駆細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。膵臓前駆細胞に特異的な遺伝子としてはPDX1、NKX6.1、NeuroG3、NeuroD1などを挙げることができる。

[0040] 本発明のEP細胞において、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Synaptic vesicle cycle」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「cAMP si

gnaling pathway」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Serotonergic synapse」、パスウェイ名「Alcoholism」、パスウェイ名「Morphine addiction」に関する遺伝子発現が向上していることが好ましい。例えば、表 2 2 から 3 4 に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製した E P 細胞と比較して向上していることが好ましい。また、パスウェイ名「DNA replication」、パスウェイ名「Cell cycle」、パスウェイ名「Pathways in cancer」、パスウェイ名「Mismatch repair」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「p53 signaling pathway」、パスウェイ名「Fanconi anemia pathway」、パスウェイ名「Homologous recombination」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、パスウェイ名「Small cell lung cancer」に関する遺伝子発現が減少していることが好ましい。例えば、表 3 4 から 4 3 に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製した E P 細胞と比較して減少していることが好ましい。

本発明の膵内分泌前駆細胞（E P）としては、参考例 1 の方法によって製造された膵内分泌前駆細胞（E P）と比較して、L I G 1 遺伝子の発現が減少している細胞を挙げることができる。

[0041] <膵臓β細胞>

膵臓β細胞は、膵内分泌前駆細胞から分化した細胞であり、インスリンを分泌する細胞である。膵内分泌前駆細胞から膵臓β細胞への分化は、膵臓β細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。膵臓β細胞に特異的な遺伝子としては、インスリン、NKX 6. 1、MAFA、PDX 1などを挙げることができる。

[0042] 本発明の膵臓β細胞において、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Synaptic vesicle cycle」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Synaptic vesicle cycle」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Alcoholism」、

パスウェイ名「Serotonergic synapse」、パスウェイ名「Cholinergic synapse」、パスウェイ名「Morphine addiction」、パスウェイ名「Adrenergic signaling in cardiomyocytes」、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」に関する遺伝子発現が向上していることが好ましい。例えば、表45から56に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製した膵臓 β 細胞と比較して向上していることが好ましい。また、パスウェイ名「Cell cycle」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「Proteoglycans in cancer」、パスウェイ名「Pathways in cancer」、パスウェイ名「Focal adhesion」、パスウェイ名「DNA replication」、パスウェイ名「TGF-beta signaling pathway」に関する遺伝子発現が減少していることが好ましい。例えば、表57から64に示した遺伝子の発現量が既存の方法で調製した膵臓 β 細胞と比較して減少していることが好ましい。

[0043] なお、パスウェイの詳細についてはKEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)で参照することができる。

本発明の膵臓 β 細胞としては、参考例1の方法によって製造された膵臓 β 細胞と比較して、ADCY1遺伝子、ADCY2遺伝子、PLCB4遺伝子からなる群より選択される少なくとも1以上の遺伝子の発現が向上しているか、及び／又はSMAD9遺伝子の発現が減少している細胞を挙げることができる。

[0044] <シグナル及び因子>

(プロテインキナーゼC (PKC) 活性化剤)

PKCは、細胞増殖や細胞死、遺伝子の転写および翻訳、細胞の形態、細胞間接触など、多くの細胞機能の制御に関わるタンパク質である。PKCは、基質タンパク質のセリン残基およびスレオニン残基のヒドロキシル基をリン酸化するタンパク質キナーゼの一種であり、少なくとも10種類以上のアイソザイムが存在する。アイソザイムはその構造、活性化の機序、生理活性によって在来型 (Classical)、新型 (Novel)、非典型 (A

typical) の 3 種類のサブファミリーに分類される。在来型 PKC アイソザイム (α 、 β I、 β II、 γ) はその活性化のために、ジアシルグリセロール (Diacylglycerol; DAG) と Ca^{2+} を必要とします。DAG は、ホスファチジルイノシトール 4, 5-三リン酸 (PIP₂) がホスホリパーゼC (PLC) により加水分解されることによって、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) と共に生じる。IP₃ が細胞内で拡散し、小胞体上にある IP₃ 感受性 Ca^{2+} チャンネルに結合すると、 Ca^{2+} イオンが細胞質に放出されます。これらの Ca^{2+} イオンが PKC と結合することで PKC は細胞膜へと移動する。そこで PKC は C1 ドメインを介し DAG と相互作用する。すると PKC は、その触媒ドメインから調節領域が外れるような構造変化を起こして活性型となる。新型 PKC アイソザイム (δ 、 ϵ 、 θ 、 η) は DAG のみによって活性化される。これは、新型 PKC アイソザイムが有する C1 ドメインの DAG に対するアフィニティーが、在来型のものより極めて高いことに起因している。非典型 PKC アイソザイム (ζ 、M ζ 、 ι/λ) は、その活性化に DAG も Ca^{2+} も必要とせず、様々な脂質代謝産物のセカンドメッセンジャーによって活性化される (Khalil, 2010; Wu-Zhang and Newton, 2013; Mochly-Rosen et al., 2012)。

[0045] PKC活性化剤とは、上記PKCアイソザイムのうち少なくとも1つ以上のPKCアイソザイムを活性化する物質であればよい。

PKC活性化剤としては、特に限定しないが、例えば indolactam V (ILV)、Okadaic Acid、Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)、Bryostatins 1、1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃、Prostratin、1, 2-Dioctanoyl-sn-glycerol、1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)、Oleic Acid、Ingenol 3-angelate、DCP-LA、PIP₂、Phorbol-12, 13-dibutyrate、8

(S) - H E T E、およびこれらの誘導体などを用いることができる。

[0046] (N o t c hシグナル阻害剤)

N o t c hシグナルは多くの細胞の生存、増殖、および分化に深く関わっており、サイトカイン／チロシンキナーゼ、W n t、T G F - β ファミリー／S m a d、ヘッジホッグ、およびインテグリンと共に、個体発生にも関与している。N o t c hシグナルの異常は、発がん、がん細胞の増殖、およびがん幹細胞の生存にも関わっている。N o t c h受容体は、1回膜貫通型タンパク質で、機能的な細胞外ドメイン (N E C D)、膜貫通ドメイン (T M)、及び細胞内ドメイン (N I C D) からなる。シグナルを受容する細胞内における小胞体 (E R) 及びゴルジ体におけるN o t c h受容体のプロセッシングの結果、切断が起こり (S 1切断)、さらに、糖鎖が結合し、カルシウムイオン (C a ²⁺) によって安定化されたヘテロ二量体を生じるが、これは膜に挿入されたT M - N I C Dと非共有結合で接着したN E C Dから構成される。このプロセッシングを受けた受容体は、次に細胞膜へ移行し、リガンドを結合できるようになる。哺乳類では、シグナルを送る側の細胞に存在するD e l t a様 (D L L 1、D L L 3、D L L 4) 及びJ a g g e d (J A G 1、J A G 2) ファミリーのメンバーが、N o t c hシグナル受容体に対するリガンドとして働く。リガンドが結合すると直ちに、N E C DはT A C E (A D A M金属プロテアーゼT N F - α 変換酵素) によってT M - N I C Dドメインから切り離される (S 2切断)。このN E C Dはリガンドに結合した状態を維持し、この複合体はシグナル送信側の細胞内でエンドサイトーシスとリサイクリング／分解を受ける。シグナル受信側の細胞内では、 γ -セクレターゼ (アルツハイマー病にも関与する) がT MからN I C Dを遊離する (S 3切断) が、これによってN I C Dは核内へ移行し、そこでC S L (C B F 1 / S u (H) / L a g - 1) ファミリー転写因子複合体と会合するが、その結果引き続いて、基準的なNotchの標的遺伝子であるM y c、p 2 1及びH E Sファミリーメンバーの活性化が起こる。

[0047] N o t c hシグナル阻害剤としては、I M R - 1、F L I - 0 6、C r e

nigacestat (LY3039478) などが挙げられる。また、DBZ (dibenzazepine)、DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-(S)-phenylglycine t-butyl ester)、LY411575、Dibenzazepine (YO-01027)、RO4929097、Nirogacestat (PF-03084014, PF-3084014)、L-685,458、Semagacestat (LY450139)、Avagacestat (BMS-708163)、MK-0752等のγ-セクレターゼ阻害剤もNotchシグナル阻害剤として用いることができる。

[0048] (ROCKシグナル阻害剤)

ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ) はミオシン軽鎖とミオシン軽鎖脱リン酸化酵素のリン酸化を介してミオシン軽鎖を活性型構造に変化させる。さらに、ROCKは、LIMキナーゼのリン酸化を介してアクチン脱重合因子であるコフィリンを不活化し、アクチン脱重合を抑制する。その他、ROCKは多数の基質をリン酸化して、細胞運動、細胞極性、細胞接着、細胞分裂、アポトーシス、転写制御など多様な生命機能に関わっている。ROCKシグナル阻害剤としては、Y27632、Thiazovivin、Fasudil (HA-1077) HCl、GSK429286A、RKI-1447、GSK180736A (GSK180736)、Hydroxyfasudil (HA-1100) HCl、Y-39983 HCl、Netarsudil (AR-13324) 2HCl、GSK269962A HCl、Ripasudil (K-115) hydrochloride dihydrate、KD025 (SLx-2119)、AT13148などを挙げることができる。

[0049] (骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤)

骨形成タンパク質 (BMP) シグナルとは、骨形成タンパク質 (BMP)

リガンドにより媒介されるシグナルであり、脊椎動物において多様な役割を果たす。胚形成の間に、背腹軸は、リガンド、受容体、補助受容体及び可溶性アンタゴニストの協調発現により形成されるBMPシグナル伝達の勾配によって確立される。BMPは、原腸形成、中胚葉誘導、器官形成及び軟骨性骨形成の重要なレギュレータであり、多能性幹細胞集団の運命を制御する。

[0050] BMP受容体はI型受容体 (a c t i v i n r e c e p t o r - l i k e k i n a s e ; A L K - 1、A L K - 2、A L K - 3またはA L K - 6) とII型受容体 (A c t R I I、A c t R I I BまたはB M P R I I) の複合体から成り、活性化したI型受容体キナーゼはR-Smad (r e c e p t o r - r e g u l a t e d S m a d) タンパク質のC末端に存在する2個のセリン残基をリン酸化する。リガンド (BMP) が受容体に結合することによりリン酸化を受けるR-Smad (S m a d 1、S m a d 5、S m a d 8) をB R-Smad (B M P R-Smad) と呼ばれており、リン酸化を受けた2分子のR-SmadはS m a d 4とヘテロ三量体を形成し、核内に移行することで標的遺伝子の転写を調節する。

[0051] 骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤とは、リガンド (BMP-4など) による受容体への結合から始まるBMPシグナルを阻害する物質であれば特に限定しないが、好ましくはA L K - 1、A L K - 2、A L K - 3およびA L K - 6の少なくとも1つを阻害する物質である。また、リガンドが受容体へと結合するのを妨げる物質 (アンタゴニスト抗体など) をBMPシグナル阻害剤として用いることができる。

[0052] 骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤としては、特に限定しないが、I型受容体 (A L K - 1、A L K - 2、A L K - 3またはA L K - 6) に作用する阻害剤などは効果的にBMPシグナルを阻害することができ、例えばドルソモルフィン (D o r s o m o r p h i n)、L D N 1 9 3 1 8 9、L D N - 2 1 4 1 1 7、L D N - 2 1 2 8 5 4、K 0 2 2 8 8、M L 3 4 7などを挙げることができる。

[0053] (ヘッジホッグ (HH) シグナル阻害剤)

ヘッジホッグ (HH ; *Hedgehog*) シグナルは胎児期の細胞増殖因子、形態形成因子として知られている。加えて、成体でのホメオスタシスや組織再生、組織幹細胞の制御にも機能し得ることが示されている。胎児期のHHシグナルの異常は、全前脳症などの先天性疾患の原因となり、成体でのHHシグナルの持続的活性は皮膚基底細胞癌や髄芽細胞腫を含む様々な癌に関連すると言われている。ヘッジホッグシグナルのリガンドとしては、哺乳類では3種類のHHリガンド (SHH ; *Sonic hedgehog*, IHH ; *Indian hedgehog*, DHH ; *Desert hedgehog*) が知られている。ヘッジホッグリガンドが無い状態 (オフ状態) では、ヘッジホッグファミリーリガンドに対する受容体の *Patched* は、Gタンパク質共役型膜貫通タンパク質である *Smoothened* (Smo) に正常に結合し、*Smoothened* の膜への会合を阻害する。このオフ状態では、SuFu及び (脊椎動物におけるKif7である) COS2が、第一繊毛において、微小管に結合している転写因子のGliの集団を隔離する。GliはPKA、CKI及びGSK-3によってリン酸化され、 β -TrCPを介したGli活性化因子 (哺乳動物におけるGli1及びGli2) の分解が起こるか、あるいは、保存された経路においてGliの抑制因子 (ショウジョウバエにおけるGli3あるいは短縮されたCi) を産生するが、これがヘッジホッグの標的遺伝子の抑制につながる。活性化状態 (オン状態) では、ヘッジホッグリガンドが*Patched* に結合することによって β -Arrestinを介した*Smoothened* の第一繊毛への移動が可能になるが、そこでは、これに会合していたGタンパク質活性が、Gliに作用する抑制性のキナーゼ活性を阻害するため、Gliを自由に核に移行させて、サイクリンD (Cyclin D)、サイクリンE (Cyclin E)、Myc及び*Patched* などのヘッジホッグ標的遺伝子を活性化する。

[0054] ヘッジホッグ (HH) シグナル阻害剤とは、上記ヘッジホッグシグナルを阻害する物質であれば特に限定しないが、例えば、Smoに作用してシグナ

ルを阻害する物質などがある。また、ヘッジホッグリガンドが *Patched* 等の受容体に結合するのを阻害するアンタゴニスト抗体などもヘッジホッグシグナル阻害剤として使用することができる。

[0055] ヘッジホッグ (HH) シグナル阻害剤としては、特に限定しないが、例えば *SANT1*、*Cyclopamine*、*Sonidegib*、*PF-5274857*、*Glasdegib*、*Taladegib*、*BMS-833923*、*MK-4101*、*Vismodegib*、*GANT61*、*Jervine*、*HP1-4* などを挙げることができる。例えば *SANT-1* は細胞透過性の強力な HH シグナルのアンタゴニストであり、*Sm* レセプターに直接結合することにより阻害するため、好適に用いることができる。

[0056] (TGF- β 受容体シグナル阻害剤)

TGF- β 受容体 (TGF β) シグナルとは、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β) のリガンドが関与するシグナル伝達であり、例えば、細胞の成長、増殖、分化及びアポトーシスなどの細胞プロセスにおいて中心的な役割を担う。TGF β シグナルは、I 型受容体 (ALK5) を漸増してリン酸化する、II 型受容体 (セリン/トレオニンキナーゼ) への TGF β リガンドの結合が関与する。次いで、この I 型受容体が、SMAD4 に結合する受容体制御 SMAD (R-SMAD; 例えば、SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5、SMAD8、又は SMAD9) をリン酸化し、次いで、この SMAD 複合体が転写調節において役割を果たす核に入る。

[0057] TGF β シグナル阻害剤とは、上記 TGF β シグナルを阻害する物質であれば特に限定しないが、例えば、ALK5 に作用してそのリン酸化を阻害するような物質である。また、TGF β が受容体へと結合するのを阻害するアンタゴニスト抗体なども TGF β シグナル阻害剤として用いることができる。

[0058] TGF β シグナル阻害剤としては、特に限定しないが、例えば ALK5 に作用するような阻害剤は好適に用いることができる。例えば *SB431542*、*Galunisertib*、*LY2109761*、*SB525334*、

SB505124、GW788388、LY364947、RepSox、SD-208、Vactosertib、LDN-212854などを挙げることができる。

[0059] (レチノイン酸)

レチノイン酸とは、はビタミンAのカルボン酸誘導体で、*all-trans retinoic acid* (*tretinoi*ントレチノインとも呼ばれる)、*9-cis retinoic acid* (*alitretinoi*nとも呼ばれる; 9シスレチノイン酸)、*13-cis retinoic acid* (*isotretinoi*nとも呼ばれる; 13シスレチノイン酸)などいくつかの立体異性体が存在する。レチノイン酸は核内受容体の一つであるレチノイン酸受容体 (*retinoic acid receptor*; RAR) の天然リガンドとして、生体内におけるレチノイド、カロテノイドの生理活性の主役を担っている。RARはレチノイドX受容体 (*retinoid X receptor*; RXR: リガンドは9*cis*レチノイン酸) とヘテロ二量体を形成し、リガンド誘導性転写因子として、特異的な標的遺伝子群のプロモーターに結合することで標的遺伝子群の発現を正負に転写レベルで制御することが知られている。ビタミンAとは全く類似しない化学構造を持つ化合物でも、これら特異的な受容体と非常に高い結合親和性を示す合成化合物を含めて、レチノイドと称されている。

[0060] (レチノイン酸のアナログ)

レチノイン酸 (RA) は、細胞分化、細胞分裂周期の停止、またはアポトーシスを促進する作用があることが知られており、多能性幹細胞の分化誘導時にも用いられている。そのレチノイン酸のアナログとしては、核内受容体であるレチノイン酸受容体 (*Retinoic acid receptor* (PAR)、*retinoid X receptor* (RXR)) を活性化する物質であれば特に限定しないが、例えば、EC23、EC19、AC261066、AC55649、Adapalene、AM580、AM80、BMS753、BMS961、CD1530、CD2314、CD

437、Ch 55、Isotretinoin、Tazarotene、TNPBなどを挙げることができる。EC23はレチノイン酸に比べて光による劣化の影響が少なく、安定な化合物であるため好適に用いることができる。

[0061] (インスリン受容体シグナル活性化剤)

インスリン受容体は、肝臓、骨格筋、脂肪組織、神経細胞などに発現しており、インスリン受容体シグナルは、神経回路網の形成、維持、修復に関与することが知られている。インスリンはグルコースや脂質代謝のような重要なエネルギー機能を調節する重要なホルモンであり、インスリン受容体チロシンキナーゼ (insulin receptor、IR) を活性化し、IRS (insulin receptor substrate) ファミリーのような異なる基質アダプターのリクルートとリン酸化を行う。チロシンリン酸化されたIRSは多くのシグナルパートナーに結合部位を呈示する。中でも、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) は、主にAkt (protein kinase B) とPKC (protein kinase C) の活性化を介してインスリン機能において重要な役割を果たす。活性化されたAktは、GSK-3 (glycogen synthase kinase) の阻害を介したglycogen合成、mTOR (mammalian target of rapa) と下流因子を介したタンパク合成、プロアポトーシス因子 (Bad、転写因子：Forkheadファミリー、GSK-3等) の阻害による細胞生存などを引き起こす。インスリン受容体シグナルはまた、細胞の成長と細胞分裂効果を持ち、それらの効果にはRas/MAPK経路の活性化と同様に、主にAktカスケードも関与している。

[0062] インスリン受容体シグナル活性化剤とは、上記インスリン受容体シグナルを活性化する物質であれば特に限定しないが、例えば、インスリン受容体並びにIGF受容体に結合するリガンドが挙げられる。また、PI3K、PKCまたはAktを直接または間接的に活性化するような物質であってもよい

。

[0063] インスリン受容体シグナル活性化剤としては、好ましくはインスリン、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、IGF-2などを挙げることができる。また、PI3K活性化剤であるPI3-kinase activator (SantaCruz社、製品番号: sc-3036)、740 Y-Pなどもインスリン受容体シグナル活性化剤として用いることができる。

[0064] (FGF受容体シグナル活性化剤)

FGF (線維芽細胞増殖因子) 受容体シグナルは、FGF受容体を介するシグナル伝達であり、RAS-MAPK経路やPI3K-AKT経路に流れ、細胞増殖、細胞死、血管新生、上皮間葉転換 (EMT) などの様々な細胞機能に関与しており、また、胚発生 および生後の骨格系の発生の制御において重要な役割を果たす。

FGF受容体シグナル活性化剤とは、上記のようなシグナル伝達を活性化するような物質であればよく、FGF受容体に結合するリガンド (FGFファミリー) がその代表例である。またRAS-MAPK経路やPI3K-AKT経路の活性化剤もFGF受容体シグナル活性化剤として用いることができる。

[0065] FGF受容体シグナル活性化剤としては、FGFファミリーを挙げることができ、好ましくは、FGF7、FGF3、FGF10、FGF22、FGF1、FGF2、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF17、FGF18、FGF9、FGF16、FGF20、FGF19、FGF21、FGF23など挙げられ、特に好ましくはFGF7である。

[0066] (EGF受容体シグナル活性化剤)

上皮成長因子 (EGF) は53アミノ酸残基及び3つの分子内ジスルフィド結合から成る6045 Daのタンパク質であり、細胞表面に存在する上皮成長因子受容体 (EGFR) にリガンドとして結合し、細胞の成長と増殖の調節に重要な役割をする。EGF受容体シグナル活性化剤としては、EGFなどを挙げることができる。

[0067] (GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) 受容体シグナル活性化剤)

生体で分泌されるインクレチンホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、GLP-1 受容体を介して作用することにより cAMP を増加させ、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進させる。GLP-1 受容体シグナル活性化剤としては、GLP-1、Exendin 4 などが挙げられる。

[0068] (増殖因子安定化剤)

増殖因子安定化剤とは、増殖因子の安定化作用を有する物質を意味する。増殖因子の安定化とは、増殖因子の分解を抑制する作用、増殖因子の細胞外への分泌を促進する作用など、細胞外の増殖因子の量の減少を抑制する作用である限りにおいて特に限定はされない。増殖因子安定化剤としては、ヘパリン、ヘパラン硫酸などが挙げられる。

[0069] (肝細胞増殖因子)

肝細胞増殖因子 (HGF) は、生体内で組織再生や修復に関与するサイトカインの一種である。肝細胞増殖因子は、肝細胞以外にもさまざまな細胞に作用し、上皮細胞や内皮細胞の増殖を促進することや、神経細胞に対し神経栄養因子として働くことが知られている。

[0070] (インスリン様増殖因子)

インスリン様増殖因子は、プロインスリンに似た構造を持つポリペプチドであり、細胞増殖や生存、遊走やコラーゲンを含む細胞外マトリクスの産生に関与することが知られている。インスリン様増殖因子は、腫瘍細胞を含む種々の細胞型に対して、インスリン様増殖因子受容体-1 (IGFR1) と称される共通の受容体に結合することにより細胞分裂促進活性を示す。インスリン様増殖因子としては、インスリン様増殖因子-I (IGF-I) およびインスリン様増殖因子-II (IGF-II) が挙げられる。

[0071] (Adenylate cyclase 活性化剤 (細胞内の cAMP 濃度を向上させる物質))

アデニレートシクラーゼは、ATPを3', 5'-環状AMP (cAMP) とピロリン酸への変換を触媒する酵素である。cAMPはセカンドメッセンジャーと呼ばれる、真核生物のシグナル伝達に重要な分子である。Adenylylate cyclase活性化剤としては、Forskolin、NKH477などが挙げられる。

[0072] (TGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤)

TGFβスーパーファミリーシグナルとは、細胞増殖の調節、分化、広汎な生物学的システムでの発達において大変重要な役割を演じている。一般的に、リガンドにより惹起されるセリン／スレオニン受容体キナーゼの多量体形成と、骨形態発生蛋白 (BMP) 経路についてはSmad1/5/8といった細胞内シグナル分子のリン酸化によって、また、TGFβ/アクチビン経路ならびにNODAL/アクチビン経路についてはSmad2/3のリン酸化によってシグナルは開始される。活性化受容体によるSmadsのカルボキシル基末端のリン酸化は、それらと共通のシグナルトランスデューサーであるSmad4とのパートナーを形成し、核への移行を促す。活性化Smadsは、転写因子とパートナーを組むことで様々な生物学的効果を制御し、細胞の状態に特異的な転写調節を行うが知られている。

[0073] TGFβスーパーファミリーシグナル経路に関与する遺伝子としては、Activin A遺伝子、BMP2遺伝子、BMP3遺伝子、BMP4遺伝子、BMP5遺伝子、BMP6遺伝子、BMP7遺伝子、BMP8遺伝子、BMP13遺伝子、GDF2 (Growth differentiation factor 5) 遺伝子、GDF3遺伝子、GDF5遺伝子、GDF6遺伝子、GDF7遺伝子、GDF8遺伝子、GDF11遺伝子、TGF-β1遺伝子、TGF-β2遺伝子、TGF-β3遺伝子、AMH (anti-müllerian hormone) 遺伝子、paired like homeodomain 2 (PLHX2) 遺伝子、及びNODAL遺伝子などが挙げられる。

[0074] TGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤としては、骨形態発生タン

パク質（BMP）経路、TGF β /アクチビン経路、及び／又はNODAL／アクチビン経路のシグナルを活性化する物質であれば特に限定されないが、例えば、アクチビンA、BMP 2、BMP 3、BMP 4、BMP 5、BMP 6、BMP 7、BMP 8、BMP 13、GDF 2、GDF 5、GDF 6、GDF 7、GDF 8、GDF 11、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、AMH、PITX 2、及び／又はNODALなどを用いることができる。特に、TGF β /アクチビン経路のシグナルを活性化する物質を好適に用いることができ、具体的には、アクチビンA、及びBMP 4からなる群から選択される少なくとも1種類を使用することが好ましく、アクチビンA、FGF 2及びBMP 4の全てを使用することが特に好ましい。

[0075] （WNTシグナル活性化剤）

WNTシグナルとは、 β -カテニンの核移行を促し、転写因子としての機能を発揮する一連の作用をいう。WNTシグナルは細胞間相互作用に起因し、例えば、ある細胞から分泌されたWNT 3 Aというタンパクがさらに別の細胞に作用し、細胞内の β -カテニンが核移行し、転写因子として作用する一連の流れが含まれる。一連の流れは上皮間葉相互作用を例とする器官構築の最初の現象を引き起こす。WNTシグナルは β -カテニン経路、PCP経路、Ca²⁺経路の三つの経路を活性化することにより、細胞の増殖や分化、器官形成や初期発生時の細胞運動など各種細胞機能を制御することで知られる。

WNTシグナル経路に関与する遺伝子としては、WNT 3 A遺伝子などがある。

[0076] WNTシグナル活性化剤としては、特に限定されないが、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（GSK-3）の阻害活性を示すものであればいかなるものでもよく、例えばビス-インドロ（インジルビン）化合物（BIO）（（2' Z, 3' E）-6-ブロモインジルビン-3'-オキシム）、そのアセトキシム類似体BIO-アセトキシム（2' Z, 3' E）-6-ブロモインジルビン-3'-アセトキシム）、チアジアゾリジン（TDZD）類似

体（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）、オキソチアジアゾリジン－３－チオン類似体（２，４－ジベンジル－５－オキソチアジアゾリジン－３－チオン）、チエニル α －クロロメチルケトン化合物（２－クロロ－１－（４，４－ジブロモ－チオフェン－２－イル）－エタノン）、フェニル α ブロモメチルケトン化合物（ α －４－ジブロモアセトフェノン）、チアゾール含有尿素化合物（Ｎ－（４－メトキシベンジル）－Ｎ’－（５－ニトロ－１，３－チアゾール－２－イル）ユレア）やＧＳＫ－３ β ペプチド阻害剤、例えばＨ－ＫＥＡＰＰＡＰＰＱＳ_pＰ－ＮＨ₂、などを使用することができ、特に好ましくは、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＡＳ：２５２９１７－０６－９）を使用することができる。ＷＮＴ３Ａも好適に用いることができる。

[0077] [１] 原始腸管細胞（ＰＧＴ）から膵臓 β 細胞を製造する方法

本発明による膵臓 β 細胞の製造方法は、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（Primitive Gut Tube：ＰＧＴ）から後前腸細胞（Posterior Foregut：ＰＦＧ）を製造する工程、後前腸細胞（ＰＦＧ）から膵臓前駆細胞（Pancreatic Progenitor：ＰＰ）を製造する工程、膵臓前駆細胞（ＰＰ）から膵内分泌前駆細胞（Endocrine Precursor：ＥＰ）を製造する工程、膵内分泌前駆細胞から膵臓 β 細胞（pancreatic β cell： β ）を製造する工程を含む方法である。

[0078] 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（ＰＧＴ）から膵臓 β 細胞を製造する方法について説明する。

本発明における工程（ａ）においては、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（ＰＧＴ）をプロテインキナーゼ（ＰＫＣ）活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞（ＰＦＧ）を製造する。

本発明における工程（ｂ）においては、後前腸細胞（ＰＦＧ）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞（ＰＰ）を製造する。

本発明における工程（c）においては、膵臓前駆細胞（PP）を、Notchシグナル阻害剤及びROCKシグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞（EP）を製造する。

本発明における工程（d）においては、膵内分泌前駆細胞（EP）をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓β細胞を製造する。以下、それぞれの工程について説明する。なお、多能性幹細胞から原始腸管細胞への分化誘導については後記する。

[0079] <培養条件>

原始腸管細胞（PGT）から膵臓β細胞への分化誘導時における細胞の培養は、接着培養、浮遊培養のいずれを用いても良いが、浮遊培養であることが好ましい。細胞はマイクロキャリア等に接着させて浮遊培養しても良いし、細胞のみで構成された細胞凝集塊の状態では浮遊培養しても良いし、細胞凝集塊の中にコラーゲン等の高分子が混在していても良く、形態は特に限定しない。

[0080] 原始腸管細胞（PGT）から膵臓β細胞への分化誘導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、特に限定されないが、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1～10%、好ましくは5%のCO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0081] <培養期間>

工程（a）の後前腸細胞（PFG）への分化培養の培養期間は、後前腸細胞（PFG）の細胞特性が呈する細胞型になっているのであれば特に限定されないが、例えば、2週間以内であればよく、より具体的には1日以上10日以内であり、より好ましくは2日以上7日以内であり、さらに好ましくは3日以上5日以内であり、一例としては4日である。

[0082] 工程（b）の膵臓前駆細胞（PP）への分化培養の培養期間は、後前腸細胞（PFG）の細胞特性が呈する細胞型になっているのであれば特に限定さ

れないが、例えば、2週間以内であればよく、より具体的には1日以上10日以内であり、より好ましくは2日以上7日以内であり、さらに好ましくは2日以上4日以内であり、一例としては3日である。

[0083] 工程(c)の膵内分泌前駆細胞(E P)への分化培養の培養期間は、膵内分泌前駆細胞(E P)の細胞特性が呈する細胞型になっているのであれば特に限定されないが、例えば、2週間以内であればよく、より具体的には1日以上10日以内であり、より好ましくは3日以上10日以内であり、さらに好ましくは5日以上9日以内であり、一例としては7日である。

[0084] 工程(d)の膵臓 β 細胞への分化培養の培養期間は、膵臓 β 細胞の細胞特性が呈する細胞型になっているのであれば特に限定されないが、例えば、3週間以内であればよく、より具体的には3日以上20日以内であり、より好ましくは5日以上14日以内であり、さらに好ましくは7日以上12日以内であり、一例としては10日である。

[0085] <培地>

工程(a)～工程(d)において使用する培地としては、細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、 α MEM培地、IMDM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地、RPMI 1640培地、又はEssential 6™培地(Thermo Fisher Scientific社)等を用いることができる。上記培地はグルコースを含んでいてもよく、グルコース濃度は好ましくは1 mM～100 mMであり、より好ましくは2 mM～50 mMであり、さらに好ましくは5 mM～30 mMである。

[0086] 培地にはさらに、ウシ血清アルブミン(BSA)またはヒト血清アルブミン(HSA)が含まれていてもよい。好ましくはBSAまたはHSAに含まれる脂質が2 mg/g以下、遊離脂肪酸が0.2 mg/g以下である。

培地におけるBSAの添加量の下限は、好ましくは0.01%、より好ましくは0.05%、より好ましくは0.10%、より好ましくは0.15%である。培地におけるBSAの添加量の上限は、好ましくは1.00%、よ

り好ましくは0.90%、より好ましくは0.80%、より好ましくは0.70%、より好ましくは0.60%、より好ましくは0.50%、より好ましくは0.40%、より好ましくは0.30%、より好ましくは0.25%であり、より好ましくは0.20%であり、より好ましくは0.15%である。

[0087] 培地にはさらに、ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質が含まれていてもよい。例えば、培地には、0.1~2%（体積／体積）のペニシリン、0.1~2%（体積／体積）のストレプトマイシンを含めることができる。

[0088] 培地にはB27（登録商標）サプリメントが含まれていてもよい。

培地におけるB27（登録商標）サプリメントの添加量の下限は、好ましくは0.01%、より好ましくは0.1%、より好ましくは0.2%、より好ましくは0.3%、より好ましくは0.4%、より好ましくは0.5%、より好ましくは0.6%、より好ましくは0.7%、より好ましくは0.8%、より好ましくは0.9%である。培地におけるB27（登録商標）サプリメントの添加量の上限は、好ましくは10%、より好ましくは9%、より好ましくは8%、より好ましくは7%、より好ましくは6%、より好ましくは5%、より好ましくは4%、より好ましくは3%、より好ましくは2%、より好ましくは1%である。

[0089] 培地には、インスリン、トランスフェリン及び亜セレン酸を含めることができる。インスリン、トランスフェリン及び亜セレン酸は、B27サプリメントなど市販の混合物の形態で培地に含まれていてもよい。

[0090] 培地におけるトランスフェリンの添加量の下限は、好ましくは0.001mg/L、より好ましくは0.01mg/L、より好ましくは0.1mg/L、より好ましくは1mg/L、より好ましくは1.1mg/L、より好ましくは1.2mg/L、より好ましくは1.3mg/L、より好ましくは1.4mg/L、より好ましくは1.5mg/L、より好ましくは1.6mg/Lである。培地におけるトランスフェリンの添加量の上限は、好ましくは

1000 mg/L、より好ましくは500 mg/L、より好ましくは100 mg/L、より好ましくは90 mg/L、より好ましくは80 mg/L、より好ましくは70 mg/L、より好ましくは60 mg/L、より好ましくは50 mg/L、より好ましくは40 mg/L、より好ましくは30 mg/L、より好ましくは20 mg/L、より好ましくは10 mg/L、より好ましくは9 mg/L、より好ましくは8 mg/L、より好ましくは7 mg/L、より好ましくは6 mg/L、より好ましくは5 mg/L、より好ましくは4 mg/L、より好ましくは3 mg/L、より好ましくは2 mg/Lである。

[0091] 培地における亜セレン酸の添加量の下限は、好ましくは0.001 μ g/L、より好ましくは0.01 μ g/L、より好ましくは0.1 μ g/L、より好ましくは1 μ g/L、より好ましくは1.1 μ g/L、より好ましくは1.2 μ g/L、より好ましくは1.3 μ g/L、より好ましくは1.4 μ g/L、より好ましくは1.5 μ g/L、より好ましくは1.6 μ g/L、より好ましくは1.7 μ g/L、より好ましくは1.8 μ g/L、より好ましくは1.9 μ g/L、より好ましくは2 μ g/Lである。培地における亜セレン酸の添加量の上限は、好ましくは1000 μ g/L、より好ましくは500 μ g/L、より好ましくは100 μ g/L、より好ましくは90 μ g/L、より好ましくは80 μ g/L、より好ましくは70 μ g/L、より好ましくは60 μ g/L、より好ましくは50 μ g/L、より好ましくは40 μ g/L、より好ましくは30 μ g/L、より好ましくは20 μ g/L、より好ましくは10 μ g/L、より好ましくは9 μ g/L、より好ましくは8 μ g/L、より好ましくは7 μ g/Lである。

[0092] [2] 原始腸管細胞から後前腸細胞への分化誘導に用いる分化誘導因子、及びその他の添加物

本発明における工程(a)においては、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞(PGT)を後前腸細胞(PFG)への分化誘導に適した培養条件下、プロテインキナーゼ(PKC)活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞(PFG)を製造する。

後前腸細胞（PFG）への分化誘導に適した培養条件とは、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を後前腸細胞（PFG）へ好適に分化誘導できる培養条件であれば、特に限定されない。

分化誘導培地としては、内胚葉系細胞を原始腸管細胞（PGT）分化誘導させる培地であれば特に限定されるものではないが、一つの実施態様として、後述する分化誘導培地にて培養することが挙げられる。

[0093] 前記工程（a）において使用する培地におけるPKC活性剤の含有量の下限は、好ましくは $0.01 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.02 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.05 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.2 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3 \mu\text{mol/L}$ である。培地におけるPKC活性剤の含有量の上限は、好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.8 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.4 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3 \mu\text{mol/L}$ である。

[0094] 前記工程（a）において使用する培地は、ヘッジホッグ（HH）シグナル阻害剤（SANT1等）を含んでいてもよい。

培地におけるHHシグナル阻害剤（SANT1等）の添加量の下限は、好ましくは $0.01 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.02 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.03 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.05 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.10 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.15 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.20 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.25 \mu\text{mol/L}$ である。培地におけるHHシグナル阻害剤（SANT1等）の添加量の上限は、好ましくは $5.0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $4.0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3.0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $2.0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1.0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.80 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.70 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.60 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.50 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.$

40 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.30 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.35 $\mu\text{mol/L}$ である。

[0095] 工程(a)において使用する培地は、レチノイン酸のアナログ(EC23等)を含んでいてもよい。

培地におけるレチノイン酸のアナログ(EC23等)の添加量の下限は、好ましくは0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.02 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.03 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.05 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.5 $\mu\text{mol/L}$ である。培地におけるレチノイン酸のアナログ(EC23等)の添加量の上限は、好ましくは5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは4.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは3.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.9 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.7 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.5 $\mu\text{mol/L}$ である。

[0096] 工程(a)において使用する培地には、NEAA(例えば、1×non-essential amino acids (NEAA; Wako社)など)が含まれていてもよい。

培地におけるNEAAの含有量の下限は、好ましくは0.05×NEAA、より好ましくは0.1×NEAA、より好ましくは0.5×NEAA、より好ましくは0.6×NEAA、より好ましくは0.7×NEAA、より好ましくは0.8×NEAA、より好ましくは0.9×NEAA、より好ましくは1×NEAAである。培地におけるNEAAの含有量の上限は、好ましくは20×NEAA、より好ましくは15×NEAA、より好ましくは10×NEAA、より好ましくは5×NEAA、より好ましくは4×NEAA、より好ましくは3×NEAA、より好ましくは2×NEAA、より好ましくは1×NEAAである。

[0097] 工程（a）における培地は、骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤を含む。

骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤がドルソモルフィン（Dorsomorphin）である場合、培地におけるドルソモルフィンの含有量の下限は、好ましくは $0.01\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.05\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.6\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.7\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.8\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.9\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1\mu\text{mol/L}$ である。培地におけるドルソモルフィンの含有量の上限は、好ましくは $20\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $15\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $7\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $4\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $2\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1\mu\text{mol/L}$ である。

[0098] 骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤がLDN193189である場合、培地におけるLDN193189の含有量の下限は、好ましくは $0.01\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.02\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.05\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.2\mu\text{mol/L}$ である。培地におけるLDN193189の含有量の上限は、好ましくは $10\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.8\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.4\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.2\mu\text{mol/L}$ である。

[0099] 工程（a）における培地は、FGF受容体シグナル活性化剤を含んでもよい。特に好ましくは、FGF7を含む。

前記工程（a）培地におけるFGF受容体シグナル活性化剤の添加量の下限は、好ましくは 1ng/mL 、より好ましくは 5ng/mL 、より好ましくは 10ng/mL 、より好ましくは 20ng/mL 、より好ましくは 30

ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。培地におけるFGF受容体シグナル活性化剤の添加量の上限は、好ましくは500 ng/mL、より好ましくは400 ng/mL、より好ましくは300 ng/mL、より好ましくは200 ng/mL、より好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。

[0100] [3] 後前腸細胞（PFG）から腭臓前駆細胞（PP）への分化誘導に用いる分化誘導因子、及びその他の添加物

本発明における工程（b）においては、後前腸細胞（PFG）を、腭臓前駆細胞（PP）への分化誘導に適した培養条件下、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより腭臓前駆細胞（PP）を製造する。

腭臓前駆細胞（PP）への分化誘導に適した培養条件とは、後前腸細胞（PFG）を腭臓前駆細胞（PP）へ好適に分化誘導できる培養条件であれば、特に限定されない。

分化誘導培地としては、後前腸細胞（PFG）を腭臓前駆細胞（PP）へ分化誘導させる培地であれば特に限定されるものではないが、一つの実施態様として、後述する分化誘導培地にて培養することが挙げられる。

[0101] 前記工程（b）においてしようする培地におけるレチノイン酸又はレチノイン酸のアナログ（EC23等）の添加量の下限は、好ましくは0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.02 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.03 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.05 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは0.5 $\mu\text{mol/L}$ である。培地におけるレチノイン酸のアナログ（EC23等）の添加量の上限は、好ましくは5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは4.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは3.0 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは2

・ $0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1 \cdot 0 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 9 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 8 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 7 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 6 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 5 \mu\text{mol/L}$ である。

[0102] 工程 (b) において使用する培地は、ヘッジホッグ (HH) シグナル阻害剤 (SANT1 等) を含んでいてもよい。前記培地におけるヘッジホッグ (HH) シグナル阻害剤 (SANT1 等) の添加量については、上記の [2] に記載したとおりである。

[0103] また、工程 (b) において使用する培地には、NEAA (例えば、 $1 \times \text{non-essential amino acids}$ (NEAA; Wako 社) など) が含まれていてもよい。前記培地における NEAA の添加量については上記の [2] に記載したとおりである。

[0104] 工程 (b) における培地は、骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤を含んでもよい。前記培地における骨形成タンパク質 (BMP) シグナル阻害剤の添加量については上記の [2] に記載したとおりである。

[0105] 工程 (b) における培地は、FGF 受容体シグナル活性化剤を含んでいてもよい。特に好ましくは、FGF10 である。前記培地における FGF 受容体シグナル活性化剤の添加量は上記の [2] に記載したとおりである。

[0106] 工程 (b) における培地は、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤を含んでいてもよい。前記培地におけるプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤の添加量は上記の [2] に記載したとおりである。

[0107] 工程 (b) における培地は、TGF- β 受容体シグナル阻害剤 (RepSOX 等) を含んでいてもよい。

前記培地における TGF- β 受容体シグナル阻害剤 (RepSOX 等) の含有量の下限は、好ましくは $0 \cdot 1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0 \cdot 5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $6 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $7 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $8 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましく

は $9 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ である。培地における $\text{TGF-}\beta$ 受容体シグナル阻害剤 (RepSOX 等) の含有量の上限は、好ましくは $100 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $80 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $50 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $40 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $30 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $20 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $15 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $12 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ である。

[0108] 工程 (b) における培地は、 ZnSO_4 を含んでいてもよい。

培地における ZnSO_4 の含有量の下限は、好ましくは $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ である。培地における ZnSO_4 の含有量の上限は、好ましくは $100 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $80 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $50 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $40 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $30 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $20 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $15 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $12 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ である。

[0109] [3] 膵臓前駆細胞 (PP) から膵内分泌前駆細胞 (EP) への分化誘導に用いる分化誘導因子、及びその他の添加物

本発明における工程 (c) においては、膵臓前駆細胞 (PP) を、膵内分泌前駆細胞 (EP) への分化誘導に適した培養条件下、 Notch シグナル阻害剤及び ROCK シグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞 (EP) を製造する。

後前腸細胞 (PP) を膵内分泌前駆細胞 (EP) へ好適に分化誘導できる培養条件であれば、特に限定されない。

分化誘導培地としては、後前腸細胞 (PP) を膵内分泌前駆細胞 (EP) へ分化誘導させる培地であれば特に限定されるものではないが、一つの実施態様として、後述する分化誘導培地にて培養することが挙げられる。

[0110] 前記工程(c)培地におけるN o t c hシグナル阻害剤(DBZ等)の添加量の下限は、好ましくは $0.01\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.02\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.03\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.05\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.2\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.4\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5\mu\text{mol/L}$ である。培地におけるN o t c hシグナル阻害剤(DBZ等)の添加量の上限は、好ましくは $5.0\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $4.0\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3.0\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $2.0\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1.0\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.9\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.8\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.7\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.6\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5\mu\text{mol/L}$ である。

[0111] 工程(c)において使用する培地は、ヘッジホッグ(HH)シグナル阻害剤(SANT1等)を含んでいてもよい。前記培地におけるヘッジホッグ(HH)シグナル阻害剤(SANT1等)の添加量については上記の[2]に記載したとおりである。

[0112] 工程(c)において使用する培地は、レチノイン酸のアナログ(EC23等)を含んでいてもよい。前記培地におけるレチノイン酸のアナログの添加量については上記の[2]に記載のとおりである。

[0113] 工程(c)において使用する培地には、L-グルタミンが含まれていてもよい。

培地におけるL-グルタミンの含有量の下限は、好ましくは 0.01mmol/L 、より好ましくは 0.05mmol/L 、より好ましくは 0.1mmol/L 、より好ましくは 0.5mmol/L 、より好ましくは 0.7mmol/L 、より好ましくは 1.0mmol/L 、より好ましくは 1.2mmol/L 、より好ましくは 1.5mmol/L 、より好ましくは 2.0mmol/L である。培地におけるL-グルタミンの含有量の上限は、好ましくは 100mmol/L 、より好ましくは 50mmol/L 、より好ましく

は40mmol/L、より好ましくは30mmol/L、より好ましくは20mmol/L、より好ましくは10mmol/L、より好ましくは9mmol/L、より好ましくは8mmol/L、より好ましくは7mmol/L、より好ましくは6mmol/L、より好ましくは5mmol/L、より好ましくは4mmol/L、より好ましくは3mmol/L、より好ましくは2mmol/Lである。

[0114] 工程(c)における培地は、骨形成タンパク質(BMP)シグナル阻害剤を含んでもよい。前記培地における骨形成タンパク質(BMP)シグナル阻害剤の添加量については上記の[2]に記載したとおりである。

[0115] 工程(c)における培地は、TGF- β 受容体シグナル阻害剤を含んでもよい。前記培地におけるTGF- β 受容体シグナル阻害剤の添加量については上記の[2]に記載したとおりである。

[0116] 工程(c)における培地は、ZnSO₄を含んでもよい。前記培地におけるZnSO₄の添加量については上記の[2]に記載したとおりである。

[0117] 工程(c)における培地は、増殖因子安定化剤(ヘパリン等)を含んでもよい。

培地における増殖因子安定化剤(ヘパリン等)の添加量の下限は、好ましくは0.2ng/mL、より好ましくは0.5ng/mL、より好ましくは1ng/mL、より好ましくは3ng/mL、より好ましくは5ng/mL、より好ましくは6ng/mL、より好ましくは7ng/mL、より好ましくは8ng/mL、より好ましくは9ng/mL、より好ましくは10ng/mLである。培地における増殖因子安定化剤(ヘパリン等)の添加量の上限は、好ましくは100ng/mL、より好ましくは90ng/mL、より好ましくは80ng/mL、より好ましくは70ng/mL、より好ましくは60ng/mL、より好ましくは50ng/mL、より好ましくは40ng/mL、より好ましくは30ng/mL、より好ましくは20ng/mL、より好ましくは10ng/mLである。

[0118] 工程(c)における培地は、ニコチンアミドを含んでもよい。

培地におけるニコチンアミドの含有量の下限は、好ましくは0.1 mmol/L、より好ましくは0.5 mmol/L、より好ましくは1 mmol/L、より好ましくは3 mmol/L、より好ましくは5 mmol/Lである。培地におけるニコチンアミドの上限は、好ましくは100 mmol/L、より好ましくは80 mmol/L、より好ましくは50 mmol/L、より好ましくは40 mmol/L、より好ましくは30 mmol/L、より好ましくは20 mmol/L、より好ましくは15 mmol/L、より好ましくは12 mmol/L、より好ましくは10 mmol/L、より好ましくは5 mmol/Lである。

[0119] 工程(c)における培地は、EGF受容体シグナル活性化剤(EGF等)を含んでいてもよい。

培地におけるEGF受容体シグナル活性化剤(EGF等)の添加量の下限は、好ましくは0.2 ng/mL、より好ましくは0.5 ng/mL、より好ましくは1 ng/mL、より好ましくは3 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは7 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL、より好ましくは12 ng/mL、より好ましくは15 ng/mL、より好ましくは16 ng/mL、より好ましくは17 ng/mL、より好ましくは18 ng/mL、より好ましくは19 ng/mL、より好ましくは20 ng/mLである。培地におけるEGF受容体シグナル活性化剤(EGF等)の添加量の上限は、好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは25 ng/mL、より好ましくは20 ng/mLである。

[0120] 工程(c)における培地は、ROCKシグナル阻害剤(Y27632等)を含んでいてもよい。

培地におけるROCKシグナル阻害剤(Y27632等)の含有量の下限は、好ましくは0.1 μ mol/L、より好ましくは0.5 μ mol/L、

より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $6 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $7 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $8 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $9 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ である。培地における ROCK シグナル阻害剤（Y27632 等）の含有量の上限は、好ましくは $100 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $80 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $50 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $40 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $30 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $20 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $15 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $12 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ である。

[0121] [4] 膵内分泌前駆細胞（EP）から膵臓β細胞への分化誘導に用いる分化誘導因子、及びその他の添加物

本発明における工程（d）においては、膵内分泌前駆細胞（EP）を、膵臓β細胞への分化誘導に適した条件下、インスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓β細胞を製造する。

膵臓β細胞への分化誘導に適した培養条件とは、膵内分泌前駆細胞（EP）を膵臓β細胞へ好適に分化誘導できる培養条件であれば、特に限定されない。

分化誘導培地としては、膵内分泌前駆細胞（EP）を膵臓β細胞へ分化誘導させる培地であれば特に限定されるものではないが、一つの実施態様として、後述する分化誘導培地にて培養することが挙げられる。

[0122] 前記培地におけるインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の添加量については上記の<6>及び<培地>に記載したとおりである。

[0123] 工程（d）における培地は、TGF-β受容体シグナル阻害剤を含んでもよい。

前記培地における TGF-β 受容体シグナル阻害剤の添加量については上記の [2] に記載したとおりである。

[0124] 工程（d）における培地は、ZnSO₄を含んでもよい。

前記培地におけるZnSO₄の添加量については上記の〔2〕に記載したとおりである。

[0125] 工程（d）における培地は、GLP-1（Glucagon-like peptide-1）受容体シグナル活性化剤（Exendin 4等）を含んでもよい。

前記培地におけるGLP-1（Glucagon-like peptide-1）受容体シグナル活性化剤（Exendin 4等）の添加量の下限は、好ましくは1 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。培地におけるGLP-1受容体シグナル活性化剤（Exendin 4等）の添加量の上限は、好ましくは500 ng/mL、より好ましくは400 ng/mL、より好ましくは300 ng/mL、より好ましくは200 ng/mL、より好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。

[0126] 工程（d）における培地は、増殖因子安定化剤（ヘパリン等）を含んでもよい。

前記培地における増殖因子安定化剤（ヘパリン等）の添加量については上記の〔3〕に記載したとおりである。

[0127] 工程（d）における培地は、ニコチンアミドを含んでもよい。前記培地におけるニコチンアミドの添加量については上記の〔3〕に記載したとおりである。

[0128] 工程（d）における培地は、TGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤（BMP 4等）を含んでもよい。

培地におけるTGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤（BMP 4等）の添加量の下限は、好ましくは0.2 ng/mL、より好ましくは0.5

ng/mL、より好ましくは1 ng/mL、より好ましくは3 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは6 ng/mL、より好ましくは7 ng/mL、より好ましくは8 ng/mL、より好ましくは9 ng/mL、より好ましくは10 ng/mLである。培地におけるTGFβスーパーファミリーシグナル活性化剤（BMP4等）の添加量の上限は、好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは10 ng/mLである。

[0129] 工程（d）における培地は、肝細胞増殖因子（HGF）を含んでいてもよい。

培地における肝細胞増殖因子（HGF）の添加量の下限は、好ましくは1 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。培地における肝細胞増殖因子（HGF）の添加量の上限は、好ましくは500 ng/mL、より好ましくは400 ng/mL、より好ましくは300 ng/mL、より好ましくは200 ng/mL、より好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。

[0130] 工程（d）における培地は、インスリン様増殖因子（IGF1等）を含んでいてもよい。

培地におけるインスリン様増殖因子（IGF1等）の添加量の下限は、好ましくは1 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。

。培地におけるインスリン様増殖因子（IGF 1 等）の添加量の上限は、好ましくは 500 ng/mL 、より好ましくは 400 ng/mL 、より好ましくは 300 ng/mL 、より好ましくは 200 ng/mL 、より好ましくは 100 ng/mL 、より好ましくは 90 ng/mL 、より好ましくは 80 ng/mL 、より好ましくは 70 ng/mL 、より好ましくは 60 ng/mL 、より好ましくは 50 ng/mL である。

[0131] 工程（d）における培地は、Adenylate cyclase 活性化剤（Forskolin 等）を含んでいてもよい。

培地における Adenylate cyclase 活性化剤（Forskolin 等）の含有量の下限は、好ましくは $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.3 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $0.7 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $2 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $3 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $4 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ である。培地における Adenylate cyclase 活性化剤（Forskolin 等）の含有量の上限は、好ましくは $100 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $80 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $50 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $40 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $30 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $20 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $15 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $7 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ である。

[0132] [5] 多能性幹細胞の維持培養

本発明の製造方法においては、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（PGT）を使用する。

好ましくは、原始腸管細胞（PGT）は、多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導できる条件下で培養する工程、および前記内胚葉系細胞から原始腸管細胞（PGT）に分化誘導できる条件下で培養する工程により得られる細胞である。

[0133] 内胚葉系細胞への分化誘導を行う前の多能性幹細胞は、未分化維持培地を

用いて未分化性を維持したものとすることが好ましい。未分化維持培地を用いて多能性幹細胞の未分化性を維持する培養のことを、多能性幹細胞の維持培養ともいう。

[0134] 未分化維持培地は、多能性幹細胞の未分化性を維持できる培地であれば特に限定されないが、例えば、マウス胚性幹細胞及びマウス人工多能性幹細胞の未分化性を維持する性質を有していることが知られている *leukemia inhibitory factor* を含む培地や、ヒト iPS の未分化性を維持する性質を有していることが知られている *basic FGF* (*Fibroblast growth factor*) を含む培地等が挙げられる。例えば、ヒト iPS 細胞培地 (20% Knockout serum replacement (KSR; Gibco 社)、1× non-essential amino acids (NEAA; Wako 社)、55 $\mu\text{mol/L}$ 2-メルカプトエタノール (2-ME; Gibco 社)、7.5 ng/mL recombinant human fibroblast growth factor 2 (FGF2; Peprotech 社)、0.5× Penicillin and Streptomycin (PS; Wako 社) を含む DMEM/Ham' s F12 (Wako 社)、又は Essential 8 培地 (Thermo Fisher Scientific 社)、STEMPRO (登録商標) hESC SFM (ライフテクノロジー ジャパン株式会社)、mTeSR1 (Veritas 社)、TeSR2 (Veritas 社)、StemFit (登録商標) 等を使用することができるが、特に限定されない。

[0135] 多能性幹細胞の維持培養は、好適なフィーダー細胞 (例えば、SL10 フィーダー細胞、SNL フィーダー細胞等) 上において上記の未分化維持培地を用いて行うことができる。また、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン又はマトリゲル等の細胞接着タンパク質や細胞外マトリックスをコートした細胞培養用ディッシュ上においても上記した未分化維持培地を用いて行うことができる。

[0136] 培養温度は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されないが、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1～10%、好ましくは5%のCO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0137] 多能性幹細胞の維持培養は継代しながら所望の期間行うことができ、例えば、維持培養後の継代数1～100、好ましくは継代数10～50、より好ましくは継代数25～40の多能性幹細胞を用いて、凝集体の形成や分化誘導を行うことが好ましい。

[0138] [6] 多能性幹細胞の浮遊培養による凝集体の形成

多能性幹細胞の凝集体を形成するための実施形態の一つとしては、未分化で維持培養している細胞を、accumax (Innovative Cell Technologies社) 等によりフィーダー細胞から剥がし、3～4回ヒトiPS細胞培地でリンスをしてフィーダー細胞を除くことができる。次いで、ピペッティングにより小さな細胞塊又はシングルセルに砕き、それら細胞を培地中に懸濁した後に、懸濁液中の多能性幹細胞が凝集体を形成するまでの期間にわたって攪拌又は旋回させながら浮遊培養する。

[0139] 浮遊培養は、培地の粘性等や凹凸を有するマイクロウェル等を用いた静置培養であってもよいし、スピナー等を利用して液体培地が流動する条件での培養であってもよいが、好ましくは液体培地が流動する条件での培養である。液体培地が流動する条件での培養としては、細胞の凝集を促進するように液体培地が流動する条件での培養が好ましい。細胞の凝集を促進するように液体培地が流動する条件での培養としては、例えば、旋回流、揺動流等の流れによる応力（遠心力、求心力）により細胞が一点に集まるように液体培地が流動する条件での培養や、直線的な往復運動により液体培地が流動する条件での培養が挙げられ、旋回流及び／又は揺動流を利用した培養が特に好ましい。さらに、予めマイクロキャリア等に接着させて浮遊培養してもよいし、細胞のみで構成された細胞凝集塊の状態で行う浮遊培養してもよいし、細胞凝

集塊の中にコラーゲン等の高分子が混在していても良く、形態は特に限定しない。

[0140] 浮遊培養に用いる培養容器は、好ましくは容器内面への細胞の接着性が低い容器が好ましい。このような容器内面への細胞の接着性が低い容器としては、例えば生体適合性がある物質で親水性表面処理されているようなプレートが挙げられる。例えば、NuncTM Sphera（サーモフィッシュヤーサイエンティフィック株式会社）を使用できるが特に限定はされない。また、培養容器の形状は特に限定されないが、例えば、ディッシュ状、フラスコ状、ウェル状、バッグ状、スピナーフラスコ状等の形状の培養容器が挙げられる。

[0141] 凝集体を形成させる期間としては、6時間を超える期間であれば特に限定されないが、具体的には、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間の期間において凝集体を形成させることが好ましい。

[0142] 浮遊培養培地としては、多能性幹細胞を増殖可能な成分が含まれるのであれば特に限定されないが、1～100 μ MのY-27632（Cayman社）を含むmTeSR1（Veritas社）培地、又は1～100 μ MのY-27632（Cayman社）、1～100 mg/mL BSAを含むEssentialTM 8などを使用することができる。

[0143] 浮遊培養における攪拌又は旋回の条件としては、懸濁液中において多能性幹細胞が凝集体を形成し得る範囲であれば特に限定されないが、上限は、好ましくは200 rpm、より好ましくは150 rpm、さらに好ましくは120 rpm、より好ましくは100 rpm、より好ましくは90 rpm、より好ましくは80 rpm、もっと好ましくは70 rpm、より好ましくは60 rpm、特に好ましくは50 rpm、最も好ましくは45 rpmとすることができる。下限は好ましくは1 rpm、より好ましくは10 rpm、さらに好ましくは20 rpm、より好ましくは30 rpm、より好ましくは40 rpm、特に好ましくは45 rpmとすることができる。旋回培養の際の旋

回幅は特に限定されないが、下限は、例えば1 mm、好ましくは10 mm、より好ましくは20 mm、最も好ましくは25 mmとすることができる。旋回幅の上限は、例えば200 mm、好ましくは100 mm、好ましくは50 mm、より好ましくは30 mm、最も好ましくは25 mmとすることができる。旋回培養の際の回転半径もまた特に限定されないが、好ましくは旋回幅が前記の範囲となるように設定される。回転半径の下限は例えば5 mm、好ましくは10 mmであり、上限は例えば100 mm、好ましくは50 mmとすることができる。旋回培養の条件をこの範囲とすることで、適切な寸法の細胞凝集体を製造することが容易となるため好ましい。

[0144] また、浮遊培養は、揺動（ロッキング）攪拌により液体培地を流動させながら行う揺動培養であってもよい。揺動培養は、液体培地と細胞を収容した培養容器を概ね水平面に垂直な平面内で揺動させることにより行う。揺動速度は特に限定されないが、例えば1分間に2～50回、好ましくは4～25回（一往復を1回とする）揺動させることができる。揺動角度は特に限定されないが、例えば0.1°～20°、より好ましくは2°～10°とすることができる。揺動培養の条件をこの範囲とすることで、適切な寸法の細胞凝集体を製造することが可能となるため好ましい。

[0145] 更に、上記のような旋回と揺動とを組み合わせた運動により攪拌しながら培養することもできる。

[0146] スピナーフラスコ状の培養容器を用いた浮遊培養は、培養容器の中に攪拌翼を使用して、液体培地を攪拌しながら行う培養である。回転数や培地量は特に限定されない。市販のスピナーフラスコ状の培養容器であれば、メーカー推奨の培養液量を好適に使用することができ、例えばABLE社のスピナーフラスコ等も好適に用いることができる。

[0147] 本発明において、浮遊培養における細胞の播種密度は、細胞が凝集体を形成する播種密度であれば特に限定されないが、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cells/mLであることが好ましい。細胞の播種密度は、 2×10^5 cells/mL以上、 3×10^5 cells/mL以上、 4×10^5 cells/mL

以上、又は $5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 以上が好ましく、 $9 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $8 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $7 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $4 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $3 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $1.9 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $1.8 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $1.7 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $1.6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下、 $1.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下が好ましい。特に、 $5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ から $1.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の範囲の細胞密度が好適である。

[0148] 細胞の凝集体は、凝集体当たり数百から数千の細胞を含む。本発明において、細胞凝集体の大きさ（直径）は、特に限定されないが、例えば、 $50 \mu\text{m}$ 以上、 $55 \mu\text{m}$ 以上、 $60 \mu\text{m}$ 以上、 $65 \mu\text{m}$ 以上、 $70 \mu\text{m}$ 以上、 $80 \mu\text{m}$ 以上、 $90 \mu\text{m}$ 以上、 $100 \mu\text{m}$ 以上、 $110 \mu\text{m}$ 以上、 $120 \mu\text{m}$ 以上、 $130 \mu\text{m}$ 以上、 $140 \mu\text{m}$ 以上、 $150 \mu\text{m}$ 以上、であり、且つ、 $1000 \mu\text{m}$ 以下、 $900 \mu\text{m}$ 以下、 $800 \mu\text{m}$ 以下、 $700 \mu\text{m}$ 以下、 $600 \mu\text{m}$ 以下、 $500 \mu\text{m}$ 以下、 $400 \mu\text{m}$ 以下が挙げられる。 $150 \mu\text{m} \sim 400 \mu\text{m}$ の範囲の直径を有する細胞凝集体は本発明で好適である。上記範囲以外の直径を有する細胞凝集体が混在していても良い。

[0149] 浮遊培養の際の培養液量は使用する培養容器によって適宜調整することができるが、例えば12ウェルプレート（1ウェルあたりの平面視でのウェル底面の面積が 3.5 cm^2 ）を使用する場合は 0.5 mL ／ウェル以上、 1.5 mL ／ウェル以下とすることができ、より好ましくは 1 mL ／ウェルとすることができる。例えば6ウェルプレート（1ウェルあたりの平面視でのウェル底面の面積が 9.6 cm^2 ）を使用する場合は、 1.5 mL ／ウェル以上、好ましくは 2 mL ／ウェル以上、より好ましくは 3 mL ／ウェル以上とすることができ、 6.0 mL ／ウェル以下、好ましくは 5 mL ／ウェル以下、より好ましくは 4 mL ／ウェル以下とすることができる。例えば125 mL三角フラスコ（容量が125 mLの三角フラスコ）を使用する場合は、10

mL／容器以上、好ましくは15 mL／容器以上、より好ましくは20 mL／容器以上、より好ましくは25 mL／容器以上、より好ましくは20 mL／容器以上、より好ましくは25 mL／容器以上、より好ましくは30 mL／容器以上とすることができ、50 mL／容器以下、より好ましくは45 mL／容器以下、より好ましくは40 mL／容器以下とすることができる。例えば500 mL三角フラスコ（容量が500 mLの三角フラスコ）を使用する場合は、100 mL／容器以上、好ましくは105 mL／容器以上、より好ましくは110 mL／容器以上、より好ましくは115 mL／容器以上、より好ましくは120 mL／容器以上とすることができ、150 mL／容器以下、より好ましくは145 mL／容器以下、より好ましくは140 mL／容器以下、より好ましくは135 mL／容器以下、より好ましくは130 mL／容器以下、より好ましくは125 mL／容器以下とすることができる。例えば1000 mL三角フラスコ（容量が1000 mLの三角フラスコ）を使用する場合は、250 mL／容器以上、好ましくは260 mL／容器以上、より好ましくは270 mL／容器以上、より好ましくは280 mL／容器以上、より好ましくは290 mL／容器以上とすることができ、350 mL／容器以下、より好ましくは340 mL／容器以下、より好ましくは330 mL／容器以下、より好ましくは320 mL／容器以下、より好ましくは310 mL／容器以下とすることができる。例えば2000 mL三角フラスコ（容量が2000 mLの三角フラスコ）の場合は、500 mL／容器以上、より好ましくは550 mL／容器以上、より好ましくは600 mL／容器以上とすることができ、1000 mL／容器以下、より好ましくは900 mL／容器以下、より好ましくは800 mL／容器以下、より好ましくは700 mL／容器以下とすることができる。例えば3000 mL三角フラスコ（容量が3000 mLの三角フラスコ）の場合は、1000 mL／容器以上、好ましくは1100 mL／容器以上、より好ましくは1200 mL／容器以上、より好ましくは1300 mL／容器以上、より好ましくは1400 mL／容器以上、より好ましくは1500 mL／容器以上とすることができ、20

00 mL／容器以下、より好ましくは1900 mL／容器以下、より好ましくは1800 mL／容器以下、より好ましくは1700 mL／容器以下、より好ましくは1600 mL／容器以下とすることができる。例えば2 L培養バッグ（容量が2 Lのディスポーザブル培養バッグ）の場合は、100 mL／バッグ以上、より好ましくは200 mL／バッグ以上、より好ましくは300 mL／バッグ以上、より好ましくは400 mL／バッグ以上、より好ましくは500 mL／バッグ以上、より好ましくは600 mL／バッグ以上、より好ましくは700 mL／バッグ以上、より好ましくは800 mL／バッグ以上、より好ましくは900 mL／バッグ以上、より好ましくは1000 mL／バッグ以上とすることができ、2000 mL／バッグ以下、より好ましくは1900 mL／バッグ以下、より好ましくは1800 mL／バッグ以下、より好ましくは1700 mL／バッグ以下、より好ましくは1600 mL／バッグ以下、より好ましくは1500 mL／バッグ以下、より好ましくは1400 mL／バッグ以下、より好ましくは1300 mL／バッグ以下、より好ましくは1200 mL／バッグ以下、より好ましくは1100 mL／バッグ以下とすることができる。例えば10 L培養バッグ（容量が10 Lのディスポーザブル培養バッグ）の場合は、500 mL／バッグ以上、より好ましくは1 L／バッグ以上、より好ましくは2 L／バッグ以上、より好ましくは3 L／バッグ以上、より好ましくは4 L／バッグ以上、より好ましくは5 L／バッグ以上とすることができ、10 L／バッグ以下、より好ましくは9 L／バッグ以下、より好ましくは8 L／バッグ以下、より好ましくは7 L／バッグ以下、より好ましくは6 L／バッグ以下とすることができる。例えば、20 L培養バッグ（容量が20 Lのディスポーザブル培養バッグ）の場合は、1 L／バッグ以上、より好ましくは2 L／バッグ以上、より好ましくは3 L／バッグ以上、より好ましくは4 L／バッグ以上、より好ましくは5 L／バッグ以上、より好ましくは6 L／バッグ以上、より好ましくは7 L／バッグ以上、より好ましくは8 L／バッグ以上、より好ましくは9 L／バッグ以上、より好ましくは10 L／バッグ以上とすることができ、20 L／バ

バッグ以下、より好ましくは19 L／バッグ以下、より好ましくは18 L／バッグ以下、より好ましくは17 L／バッグ以下、より好ましくは16 L／バッグ以下、より好ましくは15 L／バッグ以下、より好ましくは14 L／バッグ以下、より好ましくは13 L／バッグ以下、より好ましくは12 L／バッグ以下、より好ましくは11 L／バッグ以下とすることができる。例えば50 L培養バッグ（容量が50 Lのディスポーザブル培養バッグ）の場合は、1 L／バッグ以上、より好ましくは2 L／バッグ以上、より好ましくは5 L／バッグ以上、より好ましくは10 L／バッグ以上、より好ましくは15 L／バッグ以上、より好ましくは20 L／バッグ以上、より好ましくは25 L／バッグ以上とすることができ、50 L／バッグ以下、より好ましくは45 L／バッグ以下、より好ましくは40 L／バッグ以下、より好ましくは35 L／バッグ以下、より好ましくは30 L／バッグ以下とすることができる。培養液量がこの範囲であるとき、適切な大きさの細胞凝集体が形成され易い。

[0150] 使用する培養容器の容量は適宜選択することができ特に限定されないが、液体培地を収容する部分の底面を平面視したときの面積として、下限が、例えば0.32 cm²、好ましくは0.65 cm²、より好ましくは0.95 cm²、さらに好ましくは1.9 cm²、もっと好ましくは3.0 cm²、3.5 cm²、9.0 cm²、又は9.6 cm²の培養容器を用いることができ、上限としては、例えば1000 cm²、好ましくは500 cm²、より好ましくは300 cm²、より好ましくは150 cm²、より好ましくは75 cm²、もっと好ましくは55 cm²、さらに好ましくは25 cm²、さらにより好ましくは21 cm²、さらにもっと好ましくは9.6 cm²、又は3.5 cm²の培養容器を用いることができる。

[0151] 培養温度は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されないが、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1～10%、好ましくは5%の

CO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0152] [7] 多能性幹細胞の前培養

上記多能性幹細胞の凝集体又は多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導する前に、2-メルカプトエタノールを含む培地を用いて浮遊培養し、細胞集団を調製することができる。

前培養に用いる培地は、細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、 α MEM培地、IMDM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地、RPMI1640培地、又はEssential 6™培地(Thermo Fisher Scientific社)等を用いることができる。

[0153] 多能性幹細胞の前培養は、浮遊培養にて実施する。上述した浮遊培養の条件によって行うことができ、さらに、予めマイクロキャリア等に接着させて浮遊培養しても良いし、細胞のみで構成された細胞凝集塊の状態で浮遊培養しても良いし、細胞凝集塊の中にコラーゲン等の高分子が混在していても良く、形態は特に限定しない。

[0154] 前培養に用いる培地中における2-メルカプトエタノールの濃度としては、分化誘導の効率が向上する範囲であれば特に限定されないが、例えば、2-メルカプトエタノールの濃度として、1 μ M以上、2 μ M以上、5 μ M以上、10 μ M以上、20 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上、又は50 μ M以上が好ましく、200 μ M以下、150 μ M以下、120 μ M以下、100 μ M以下、90 μ M以下、80 μ M以下、70 μ M以下、又は60 μ M以下が好ましい。

[0155] 前培養に用いる培地は、FGF2(Fibroblast Growth Factor 2)を添加していない培地であることも好ましい。FGF2を添加していない培地を使用することにより、内胚葉系細胞への分化効率をより向上することができる場合がある。

前培養に用いる培地は、TGF β 1(Transforming growth factor- β 1)を添加していない培地であることも好ましい。

。TGF β 1を添加していない培地を使用することにより、内胚葉系細胞への分化効率をより向上することができる場合がある。

[0156] 前培養に用いる培地は、WNTシグナル活性化剤を添加していない培地であることも好ましい。WNTシグナル活性化剤を添加していない培地を使用することにより、内胚葉系細胞への分化効率をより向上することができる場合がある。

前培養に用いる培地は、アクチビンA（本明細書中において「ACTIVIN A」と言い換える場合がある）を添加していない培地であることも好ましい。アクチビンAを添加していない培地を使用することにより、内胚葉系細胞への分化効率をより向上することができる場合がある。

[0157] 前培養用の培地には、アミノ酸、抗生物質、抗酸化剤、その他の添加物を加えてもよい。例えば0.1～2%（体積／体積）のNEAA（非必須アミノ酸）、0.1～2%（体積／体積）のペニシリン／ストレプトマイシン、0.1～20mg/mLのBSA又は1～25%（体積／体積）（好ましくは1～20%（体積／体積））のKnockout serum replacement（KSR）などを添加してもよい。

[0158] 培養温度は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されないが、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1～10%、好ましくは5%のCO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0159] 多能性幹細胞の前培養の培養期間は、多分化能が向上するまで培養する日数であれば特に限定されないが、例えば1週間を超えない期間であれば良い。より具体的には、6日未満、5日未満、4日未満、3日未満、または、6時間～48時間であり、12時間～36時間程度であり、18時間～24時間である。

[0160] [8] 内胚葉系細胞への分化誘導

本発明においては、上記の前培養で得られた細胞集団を、内胚葉系細胞に

分化誘導できる条件下で培養することによって、内胚葉系細胞を製造することができる。

[0161] 内胚葉系細胞は、消化管、肺、甲状腺、膵臓、肝臓などの器官の組織、消化管に開口する分泌腺の細胞、腹膜、胸膜、喉頭、耳管、気管、気管支、尿路（膀胱、尿道の大部分、尿管の一部）などへと分化する能力を有し、一般的に、胚体内胚葉（DE）と言われることがある。多能性幹細胞から内胚葉系細胞への分化は、内胚葉系細胞に特異的な遺伝子の発現量を測定することにより確認することができる。内胚葉系細胞に特異的な遺伝子としては、例えば、SOX17、FOXA2、CXCR4、AFP、GATA4、EOMES等を挙げることができる。なお、本明細書中において、内胚葉系細胞を胚体内胚葉と言い換えて使用することがある。

[0162] 多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導する際には、分化誘導化培地を使用して多能性幹細胞の培養を行う。

分化誘導化培地としては、多能性幹細胞を分化誘導させる培地であれば特に限定されるものではないが、例えば、血清含有培地や、血清代替成分を含有した無血清培地等が挙げられる。

[0163] 用いる細胞の種類に応じて、霊長類ES/iPS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。なお、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。

[0164] 分化誘導培地は、血清成分又は血清代替成分を含んでいてもよい。血清成分又は血清代替成分としては、例えば、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）、B-27サプリメント（Thermo Fisher Scientific社

)、N2サプリメント、N21サプリメント(R&D Systems社)、NeuroBrew-21サプリメント(Miltenyibiotec社)、Knockout serum replacement(KSR)、2-メルカプトエタノール、3'チオールグリセロール、並びにこれらの均等物が挙げられる。

[0165] 分化誘導培地には、さらに各種の添加物、抗生物質、抗酸化剤などを加えてもよい。例えば、0.1 mM~5 mMのピルビン酸ナトリウム、0.1~2% (体積/体積) の非必須アミノ酸、0.1~2% (体積/体積) のペニシリン、0.1~2% (体積/体積) のストレプトマイシン、0.1~2% (体積/体積) のアンフォテリシンB、カタラーゼ、グルタチオン、ガラクトース、レチノイン酸(ビタミンA)、スーパーオキシドディスムターゼ、アスコルビン酸(ビタミンC)、D- α -トコフェロール(ビタミンE)などを添加してもよい。

[0166] 分化誘導培地にはさらに、分化誘導因子を添加する。分化誘導因子の詳細については後記する。

[0167] 分化誘導時における多能性幹細胞の培養は、浮遊培養であることが好ましい。細胞はマイクロキャリア等に接着させて浮遊培養しても良いし、細胞のみで構成された細胞凝集塊の状態でも浮遊培養しても良いし、細胞凝集塊の中にコラーゲン等の高分子が混在していても良く、形態は特に限定しない。

[0168] 分化誘導のための培養における培養温度は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されないが、一般的には30℃~40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1~10%、好ましくは5%のCO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0169] 多能性幹細胞から内胚葉系細胞への分化培養の培養期間は、内胚葉系列の細胞特性が呈する細胞型になっているのであれば特に限定されないが、例えば、2週間以内であればよく、より具体的には2日以上8日以内であり、より好ましくは2日以上7日以内であり、さらに好ましくは3日以上6日以内

であり、一例としては4日または5日である。

[0170] [9] 内胚葉系細胞への分化誘導に用いる分化誘導因子、及びその他の添加物

好ましくは、内胚葉系細胞は、多能性幹細胞集団を、TGF β (Transforming growth factor- β)スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地で培養した後、FGF2及びBMP4 (Bone morphogenetic protein 4)を添加していない培地で培養することにより分化誘導された内胚葉系細胞である。

[0171] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地においてアクチビンAを使用する場合、アクチビンAの添加初期濃度は、好ましくは1 ng/mL以上、2 ng/mL以上、3 ng/mL以上、5 ng/mL以上、10 ng/mL以上、20 ng/mL以上、30 ng/mL以上、40 ng/mL以上、又は50 ng/mL以上であり、好ましくは1,000 ng/mL以下、900 ng/mL以下、800 ng/mL以下、700 ng/mL以下、600 ng/mL以下、500 ng/mL以下、400 ng/mL以下、300 ng/mL以下、200 ng/mL以下、150 ng/mL以下又は100 ng/mL以下である。

[0172] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地においてFGF2を使用する場合、FGF2の添加初期濃度は、好ましくは1 ng/mL以上、2 ng/mL以上、3 ng/mL以上、5 ng/mL以上、10 ng/mL以上、20 ng/mL以上、30 ng/mL以上、又は40 ng/mL以上であり、好ましくは1,000 ng/mL以下、900 ng/mL以下、800 ng/mL以下、700 ng/mL以下、600 ng/mL以下、500 ng/mL以下、400 ng/mL以下、300 ng/mL以下、200 ng/mL以下、150 ng/mL、100 ng/mL以下、90 ng/mL以下、80 ng/mL以下、又は70 ng/mL以下である。

[0173] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地においてBMP4を使用する場合、BMP4の添加初期濃度は、好ましくは1 ng/mL以

上、 2 ng/mL 以上、 3 ng/mL 以上、 5 ng/mL 以上、 6 ng/mL 以上、 7 ng/mL 以上、 8 ng/mL 以上、 9 ng/mL 以上、 10 ng/mL 以上、 11 ng/mL 以上、 12 ng/mL 以上、 13 ng/mL 以上、 14 ng/mL 以上、又は 15 ng/mL 以上であり、好ましくは $1,000\text{ ng/mL}$ 以下、 900 ng/mL 以下、 800 ng/mL 以下、 700 ng/mL 以下、 600 ng/mL 以下、 500 ng/mL 以下、 400 ng/mL 以下、 300 ng/mL 以下、 200 ng/mL 以下、 150 ng/mL 以下、 100 ng/mL 以下、 90 ng/mL 以下、 80 ng/mL 以下、 70 ng/mL 以下、 60 ng/mL 以下、 50 ng/mL 以下、 40 ng/mL 以下、又は 30 ng/mL 以下である。

[0174] FGF 2 及び BMP 4 を添加していない培地は、アクチビン A を含むことが好ましい。

FGF 2 及び BMP 4 を添加していない培地がアクチビン A を含む場合におけるアクチビン A の添加初期濃度は、好ましくは 1 ng/mL 以上、 2 ng/mL 以上、 3 ng/mL 以上、 5 ng/mL 以上、 10 ng/mL 以上、 20 ng/mL 以上、 30 ng/mL 以上、 40 ng/mL 以上、又は 50 ng/mL 以上であり、好ましくは $1,000\text{ ng/mL}$ 以下、 900 ng/mL 以下、 800 ng/mL 以下、 700 ng/mL 以下、 600 ng/mL 以下、 500 ng/mL 以下、 400 ng/mL 以下、 300 ng/mL 以下、 200 ng/mL 以下、 150 ng/mL 以下又は 100 ng/mL 以下である。

[0175] FGF 2 及び BMP 4 を添加していない培地は、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム及びエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも 1 種類以上を含むことが好ましい。

インスリンの添加濃度は、好ましくは $0.001\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、 $0.01\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、 $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上であり、好ましくは $10,000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、 $1,000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、 $9\text{ }\mu\text{g/mL}$

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。トランスフェリンの添加濃度は、好ましくは $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.06\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.07\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.08\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.09\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.11\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり、好ましくは $10,000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1,000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.9\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.3\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。亜セレン酸ナトリウムの添加濃度は、好ましくは $0.001\text{ng}/\text{mL}$ 以上、 $0.01\text{ng}/\text{mL}$ 以上、 $0.1\text{ng}/\text{mL}$ 以上であり、好ましくは $10,000\text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $1,000\text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $100\text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $10\text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $1\text{ng}/\text{mL}$ 以下である。エタノールアミンの添加濃度は、好ましくは $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.03\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $0.04\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり、好ましくは $10,000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1,000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.9\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。

[0176] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地、及び／又はFGF2及びBMP4を添加していない培地は、さらに2-メルカプトエタノールを含むことが好ましい。2-メルカプトエタノールを作用することにより、内胚葉系細胞への分化誘導効率を高めることができる。

[0177] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地は、さらにWN

Tシグナル活性化剤を含むことが好ましい。

[0178] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地においてCHIR99021を使用する場合、添加初期濃度は、好ましくは0.01 μ M以上、0.02 μ M以上、0.03 μ M以上、0.04 μ M以上、0.05 μ M以上、0.1 μ M以上、0.2 μ M以上、0.3 μ M以上、0.4 μ M以上、0.5 μ M以上、0.6 μ M以上、0.7 μ M以上、0.8 μ M以上、0.9 μ M以上、1 μ M以上、又は2 μ M以上であり、好ましくは100 μ M以下、90 μ M以下、80 μ M以下、70 μ M以下、60 μ M以下、50 μ M以下、45 μ M以下、40 μ M以下、35 μ M以下、30 μ M以下、25 μ M以下、20 μ M以下、15 μ M以下、10 μ M以下又は5 μ M以下である。より好ましくは3 μ Mまたは4 μ Mである。

[0179] TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地、及び／又はFGF2及びBMP4を添加していない培地は、少なくともグルコースを含む。前記培地中に含まれるグルコース濃度の下限は、細胞が増殖できる濃度であれば特に限定されないが、0.01g/L以上が好ましい。また、前記培地中に含まれるグルコース濃度の上限は、細胞が死滅しない濃度であれば特に限定されないが、例えば10g/L以下が好ましい。他の実施態様として、内胚葉系列の体細胞に効率的に分化させる観点においては、グルコースを2.0g/L未満で含有する培地が好ましい。TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地、及び／又はFGF2及びBMP4を添加していない培地におけるグルコースの濃度は、1.0g/L以下でもよく、0.9g/L以下でもよく、0.8g/L以下、0.7g/L以下、0.6g/L以下でもよい。TGF β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地、及び／又はFGF2及びBMP4を添加していない培地がグルコースを含む場合における、グルコースの濃度の下限は特に限定されないが、0.01g/L以上でもよく、0.02g/L以上、0.05g/L以上、0.1g/L以上、0.2g/L以上、0.3g/L以上、0.4g/L以上、0.5g/L以上でもよい。

[0180] [10] 内胚葉系細胞から原始腸管細胞（PGT）を製造する工程

本発明においては、多能性幹細胞から分化誘導された内胚葉系細胞を、原始腸管細胞（PGT）への分化誘導に適した条件下において培養することによって、原始腸管細胞（PGT）を誘導することができる。

[0181] 好ましくは、多能性幹細胞から誘導された内胚葉系細胞を、インスリン受容体シグナル活性化剤を含む培地において培養することができる。

[0182] 培地におけるインスリン受容体シグナル活性化剤の添加量の下限は、好ましくは0.001mg/L、より好ましくは0.01mg/L、より好ましくは0.1mg/L、より好ましくは1mg/L、より好ましくは2mg/L、より好ましくは3mg/Lである。培地におけるインスリン受容体シグナル活性化剤の添加量の上限は、好ましくは1000mg/L、より好ましくは500mg/L、より好ましくは100mg/L、より好ましくは90mg/L、より好ましくは80mg/L、より好ましくは70mg/L、より好ましくは60mg/L、より好ましくは50mg/L、より好ましくは40mg/L、より好ましくは30mg/L、より好ましくは20mg/L、より好ましくは10mg/Lである。

[0183] 好ましくは、多能性幹細胞から分化誘導された内胚葉系細胞を、インスリン、トランスフェリン及び亜セレン酸を含む培地において培養することができる。

インスリン、トランスフェリン及び亜セレン酸は、B27サプリメントなど市販の混合物の形態で培地に含まれていてもよい。インスリン、トランスフェリン及び亜セレン酸に加えてエタノールアミンが含まれていてもよい。

[0184] 培地におけるトランスフェリンの添加量の下限は、好ましくは0.001mg/L、より好ましくは0.01mg/L、より好ましくは0.1mg/L、より好ましくは1mg/L、より好ましくは1.1mg/L、より好ましくは1.2mg/L、より好ましくは1.3mg/L、より好ましくは1.4mg/L、より好ましくは1.5mg/L、より好ましくは1.6mg/Lである。培地におけるトランスフェリンの添加量の上限は、好ましくは

1000 mg/L、より好ましくは500 mg/L、より好ましくは100 mg/L、より好ましくは90 mg/L、より好ましくは80 mg/L、より好ましくは70 mg/L、より好ましくは60 mg/L、より好ましくは50 mg/L、より好ましくは40 mg/L、より好ましくは30 mg/L、より好ましくは20 mg/L、より好ましくは10 mg/L、より好ましくは9 mg/L、より好ましくは8 mg/L、より好ましくは7 mg/L、より好ましくは6 mg/L、より好ましくは5 mg/L、より好ましくは4 mg/L、より好ましくは3 mg/L、より好ましくは2 mg/Lである。

[0185] 培地における亜セレン酸の添加量の下限は、好ましくは0.001 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは0.01 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは0.1 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.1 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.2 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.3 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.4 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.5 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.6 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.7 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.8 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは1.9 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは2 $\mu\text{g/L}$ である。培地における亜セレン酸の添加量の上限は、好ましくは1000 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは500 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは100 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは90 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは80 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは70 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは60 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは50 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは40 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは30 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは20 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは10 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは9 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは8 $\mu\text{g/L}$ 、より好ましくは7 $\mu\text{g/L}$ である。

[0186] 好ましくは、多能性幹細胞から誘導された内胚葉系細胞を、FGF受容体シグナル活性化剤を含む培地において培養することができる。より効率的な分化誘導の達成という観点からは、FGF2非存在下において培養することが好ましい。

[0187] 培地におけるFGF受容体シグナル活性化剤の添加量の下限は、好ましくは1 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL

mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。培地におけるFGF受容体シグナル活性化剤の添加量の上限は、好ましくは500 ng/mL、より好ましくは400 ng/mL、より好ましくは300 ng/mL、より好ましくは200 ng/mL、より好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは60 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。

[0188] 好ましくは、多能性幹細胞から誘導された内胚葉系細胞を、B27（登録商標）サプリメント及び／またはFGF7を含む培地において培養することができる。

[0189] 培地におけるB27（登録商標）サプリメントの添加量の下限は、好ましくは0.01%、より好ましくは0.1%、より好ましくは0.2%、より好ましくは0.3%、より好ましくは0.4%、より好ましくは0.5%、より好ましくは0.6%、より好ましくは0.7%、より好ましくは0.8%、より好ましくは0.9%である。培地におけるB27（登録商標）サプリメントの添加量の上限は、好ましくは10%、より好ましくは9%、より好ましくは8%、より好ましくは7%、より好ましくは6%、より好ましくは5%、より好ましくは4%、より好ましくは3%、より好ましくは2%、より好ましくは1%である。

[0190] 培地におけるFGF7の添加量の下限は、好ましくは1 ng/mL、より好ましくは5 ng/mL、より好ましくは10 ng/mL、より好ましくは20 ng/mL、より好ましくは30 ng/mL、より好ましくは40 ng/mL、より好ましくは50 ng/mLである。培地におけるFGF7の添加量の上限は、好ましくは500 ng/mL、より好ましくは400 ng/mL、より好ましくは300 ng/mL、より好ましくは200 ng/mL、より好ましくは100 ng/mL、より好ましくは90 ng/mL、より好ましくは80 ng/mL、より好ましくは70 ng/mL、より好ましくは

は 60 ng/mL 、より好ましくは 50 ng/mL である。

[0191] 効率的な分化誘導の達成及び、優れた治療効果を有する膵臓 β 細胞の製造という観点から、多能性幹細胞から誘導された内胚葉系細胞から原始腸管細胞（PGT）への分化誘導は、骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤の非存在下において培養することが好ましい。FGF受容体シグナル活性化剤を含む培地において培養することができる。

さらに好ましくは、ヘッジホッグ（HH）シグナル阻害剤の非存在下における培養であり、TGF β シグナル阻害剤の非存在下における培養であり、レチノイン酸及びそのアナログの非存在下における培養である。

[0192] 培地としては、細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、 α MEM培地、IMDM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地、RPMI1640培地、又はEssential 6™培地（Thermo Fisher Scientific社）等を用いることができる。

[0193] 培地にはさらに、ウシ血清アルブミン（BSA）またはヒト血清アルブミン（HSA）が含まれていてもよい。好ましくはBSAまたはHSAに含まれる脂質が 2 mg/g 以下、遊離脂肪酸が 0.2 mg/g 以下である。

培地におけるBSAの添加量の下限は、好ましくは 0.01% （重量%）、より好ましくは 0.05% 、より好ましくは 0.10% 、より好ましくは 0.15% 、より好ましくは 0.20% 、より好ましくは 0.25% である。培地におけるBSAの添加量の上限は、好ましくは 1.00% 、より好ましくは 0.90% 、より好ましくは 0.80% 、より好ましくは 0.70% 、より好ましくは 0.60% 、より好ましくは 0.50% 、より好ましくは 0.40% 、より好ましくは 0.30% 、より好ましくは 0.25% である。

[0194] 培地にはさらに、sodium pyruvateが含まれていてもよい。

培地におけるsodium pyruvateの添加量の下限は、好まし

くは0.01 mmol/L、より好ましくは0.05 mmol/L、より好ましくは0.1 mmol/L、より好ましくは0.2 mmol/L、より好ましくは0.5 mmol/L、より好ましくは0.6 mmol/L、より好ましくは0.7 mmol/L、より好ましくは0.8 mmol/L、より好ましくは0.9 mmol/L、より好ましくは1 mmol/Lである。培地におけるsodium pyruvateの添加量の上限は、好ましくは20 mmol/L、より好ましくは15 mmol/L、より好ましくは10 mmol/L、より好ましくは5 mmol/L、より好ましくは4 mmol/L、より好ましくは3 mmol/L、より好ましくは2 mmol/L、より好ましくは1 mmol/Lである。

[0195] 培地にはさらに、NEAA（例えば、1×non-essential amino acids（NEAA；Wako社）など）が含まれていてもよい。

培地におけるNEAAの含有量の下限は、好ましくは0.05×NEAA、より好ましくは0.1×NEAA、より好ましくは0.5×NEAA、より好ましくは0.6×NEAA、より好ましくは0.7×NEAA、より好ましくは0.8×NEAA、より好ましくは0.9×NEAA、より好ましくは1×NEAAである。培地におけるNEAAの含有量の上限は、好ましくは20×NEAA、より好ましくは15×NEAA、より好ましくは10×NEAA、より好ましくは5×NEAA、より好ましくは4×NEAA、より好ましくは3×NEAA、より好ましくは2×NEAA、より好ましくは1×NEAAである。

[0196] 培地にはさらに、ペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質が含まれていてもよい。

[0197] 培養温度は、使用する多能性幹細胞の培養に適した培養温度であれば、特に限定されないが、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは約37℃である。

CO₂インキュベーターなどを利用して、約1～10%、好ましくは5%の

CO₂濃度雰囲気下で培養を行うことが好ましい。

[0198] 培養は攪拌しながら行ってもよい。攪拌速度は特に限定されないが、上限は、好ましくは200rpm、より好ましくは150rpm、さらに好ましくは120rpm、より好ましくは110rpm、より好ましくは100rpm、より好ましくは90rpm、より好ましくは80rpm、より好ましくは70rpm、特に好ましくは60rpm、最も好ましくは55rpmとすることができる。下限は好ましくは1rpm、より好ましくは10rpm、さらに好ましくは20rpm、より好ましくは30rpm、より好ましくは40rpm、特に好ましくは50rpm、最も好ましくは55rpmとすることができる。

[0199] 内胚葉系細胞（胚体内胚葉）から原始腸管細胞への分化誘導の培養期間は、一般的には24時間～120時間であり、好ましく48時間～96時間程度である。例えば、72時間である。

[0200] [11] 膵臓β細胞の利用

本発明の方法により得られる膵臓β細胞は、インスリン分泌能が高く、糖尿病に対して高い治療効果を発揮できる。即ち、本発明の方法を利用して膵臓β細胞（インスリン産生細胞と言い換える場合がある）を得た場合には、これをカテーテルなどあるいは免疫隔離デバイス等に封入して移植することにより、糖尿病の治療へ利用できる。また、膵臓β細胞などの物質代謝が可能な膵臓系の細胞を得ることにより、その膵臓β細胞が産生したインスリンを直接注射することにより、1型糖尿病の治療に用いることもできる。

[0201] 以下の実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0202] [比較例1]

<多能性幹細胞の維持培養>

ヒトiPS細胞株TKDN4-M(東京大学医科学研究所)はMITOMY CIN-C(WAKO社)で処理をしたSNL FEEDER細胞上でヒトiP

S細胞培地(20%KNOCKOUT SERUM REPLACEMENT (KSR; GIBCO社)、1×NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS (NEAA; WAKO社)、 $55\mu\text{mol/L}$ 2-MERCAPTETHANOL (2-ME; GIBCO社)、 7.5ng/mL RECOMBINANT HUMAN FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF2; PEPROTECH社)、 $0.5\times$ PENICILLIN AND STREPTOMYCIN PS; WAKO社)を含むDMEM/HAM'S F12 (WAKO社))で未分化維持培養を行った。または、VITRONECTIN (GIBCO)でコーティングしたプレート上で、 $1\times$ PENICILLIN AND STREPTOMYCIN AND AMPHOTERICIN B (WAKO社)を含むESSENTIAL 8培地 (E8; GIBCO社)で未分化維持培養した。なお、播種時のみ最終濃度 $10\mu\text{M}$ となるように Y27632を添加して培養した。培養は、 37°C の5% CO_2 インキュベーター内で行った。

[0203] <凝集塊の作製>

ヒトiPS細胞株TkDN4-M (東京大学医科学研究所)は、1回PBSでリンスを行い、accumax (Innovative Cell Technologies社)にて 37°C で5分から15分インキュベートしてからピペティングによりシングルセルまで分散して回収した。 3×10^7 個の細胞を $10\mu\text{M}$ のY27632を含むmTeSR1の培地30mL中に懸濁し、30mLシングルユースバイオリアクター (ABLE社)へ移し6チャンネルマグネチックスターラー (ABLE社)に装着して45rpmの速度で攪拌しながら 37°C の5% CO_2 インキュベーター内で浮遊培養を1日間行った。

[0204] <多能性幹細胞の前培養>

維持培養にて得られた凝集体を形成した細胞集団を、20% (体積/体積) Knockout serum replacement (KSR; Gibco社)、 $1\times$ non-essential amino acids (

NEAA; Wako社)、 $55\mu\text{mol/L}$ 2-メルカプトエタノール (2-mercaptethanol; Gibco社)、 $0.5\times$ Penicillin and Streptomycin (PS; Wako社) を含むDMEM/Ham's F12 (Wako社) に懸濁し、30mL シングルスバイオリアクター (ABLE社) へ移し、6チャンネルマグネチックスターラー (ABLE社) に装着して45rpmの速度で攪拌しながら37°Cの5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を1日間行った。

[0205] <膵臓β細胞への分化誘導>

前培養にて得られた細胞集団を、まずは内胚葉系細胞 (胚体内胚葉: Definitive endoderm: DE) へ分化誘導した。具体的には、最初の1~2日目は、0.25% Bovine Serum Albumin (BSA; sigma)、 $0.4\times$ PS、 1mmol/L sodium pyruvate (Wako社)、 $1\times$ NEAA、 80ng/mL recombinant human アクチビンA (Peprotech社)、 20ng/mL recombinant bone morphogenetic protein 4 (BMP4; Peprotech社)、 $3\mu\text{mol/L}$ CHIR99021 (Wako社) を含むRPMI1640 (Wako社) で浮遊培養した。3日目はこの培地からCHIR99021のみ、又はCHIR99021、BMP4及びFGF2を除いて浮遊培養を行い、4日目はさらに0.5% KSRを加えた培地で浮遊培養を1日間行うことで内胚葉系細胞へ分化誘導した。なお、浮遊培養は30mL シングルスバイオリアクター (ABLE社) を6チャンネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、45rpmの速度で攪拌しながら37°Cの5% CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0206] 上記で得られた内胚葉系細胞から原始腸管細胞 (Primitive Gut Tube; PGT) へ分化誘導した。具体的には、0.25% BSA、 1mmol/L sodium pyruvate、 $1\times$ NEAA、 $0.4\times$ PS、 50ng/mL recombinant human FGF

7 (Peprotech社)、1%B27 supplement (Gibco社)、0.3%ITS-X、0.5 $\mu\text{mol/L}$ EC23、0.3 $\mu\text{mol/L}$ ILV (Indolactam V)、0.2 $\mu\text{mol/L}$ LDN193189、0.25 $\mu\text{mol/L}$ SANT1を含むRPMI1640培地で2から3日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター (ABLE社) を6チャンネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、55 rpmの速度で攪拌しながら37°Cの5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0207] 上記で得られた原始腸管細胞 (PGT) から後前腸細胞 (Posterior Fore Gut、PFG) へ分化誘導した。具体的には、0.15%BSA、0.4×PS、1×NEAA、1%B27 supplement (Gibco社)、0.3%ITS-X、50ng/mL recombinant human FGF7 (Peprotech社)、0.5 $\mu\text{mol/L}$ EC23、1 $\mu\text{mol/L}$ dorsomorphin (Wako社)、0.25 $\mu\text{mol/L}$ SANT1を含むDMEM (8mMグルコース含有) で4日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター (ABLE社) を6チャンネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、55 rpmの速度で攪拌しながら37°Cの5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0208] 上記で得られた後前腸細胞 (PFG) から膵臓前駆細胞 (Pancreatic Progenitor、PP) へ分化誘導した。具体的には、0.15%BSA、0.4×PS、1×NEAA、50ng/mL recombinant human FGF10 (Peprotech社)、1%B27 supplement (Gibco社)、0.3%ITS-X、0.04 $\mu\text{mol/L}$ EC23、0.3 $\mu\text{mol/L}$ indolactam V (ILV; Cayman社)、0.2 $\mu\text{mol/L}$ LDN193189、0.25 $\mu\text{mol/L}$ SANT1、10 $\mu\text{mol/L}$ Alk5 inhibitor II (Biovision社; RepSox)、5 $\mu\text{mol/L}$

1/L ZnSO_4 を含むDMEM（8mMグルコース含有）で3日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター（ABLE社）を6チャンネルマグネチックスターラー（エイブル社）に装着し、55rpmの速度で攪拌しながら37℃の5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0209] 上記で得られた膵臓前駆細胞（PP）から膵内分泌前駆細胞（Endocrine Progenitor、EP）へ分化誘導した。具体的には、0.15%BSA、0.4×PS、2mmol/L L-glutamine、1%B27 supplement（Gibco社）、0.3%ITS-X、20ng/mL EGF、50ng/mL Exendin4、0.02μmol/L EC23、0.2μmol/L LDN193189、0.25μmol/L SANT1、10μmol/L Alk5 inhibitor II（RepSox）、0.5μmol/L DBZ、10μmol/L Y27632、5μmol/L ZnSO_4 、10ng/mL Heparin、5mmol/L Nicotinamideを含むDMEM（20mMグルコース含有）で7日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター（ABLE社）を6チャンネルマグネチックスターラー（エイブル社）に装着し、55rpmの速度で攪拌しながら37℃の5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0210] 上記で得られた膵内分泌前駆細胞（EP）から膵臓β細胞へ分化誘導した。具体的には、0.15%BSA、0.4×PS、2mmol/L L-glutamine、1%B27 supplement（Gibco社）、0.3%ITS-X、10ng/mL BMP4、50ng/mL recombinant human hepatocyte growth factor（HGF；Peprotech社）、50ng/mL insulin-like growth factor 1（IGF1；Peprotech社）、10μmol/L Alk5 inhibitor II（RepSox）、50ng/mL Exendin4、5mmol/L

nicotinamide (Sigma社)、 $5\mu\text{mol/L}$ forskolin (Wako社)、 $5\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 、 10ng/mL Heparinを含むDMEM (20mMグルコース含有) で10日間浮遊培養した。これにより得られた細胞をiPS- β 細胞と称する。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター (ABLE社) を6チャンネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、55rpmの速度で攪拌しながら37℃の5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。

[0211] [実施例1]

原始腸管細胞 (PGT) までは比較例1と同様の方法にて製造し、前記原始腸管細胞 (PGT) から後前腸細胞 (PFG) への分化誘導は、0.15%BSA、0.4×PS、1×NEAA、1%B27 supplement (Gibco社)、0.3%ITS-X、 50ng/mL recombinant human FGF7 (Peprotech社)、 $0.5\mu\text{mol/L}$ EC23、 $0.3\mu\text{mol/L}$ ILV (Indolactam V)、 $0.2\mu\text{mol/L}$ LDN193189、 $0.25\mu\text{mol/L}$ SANT1を含むDMEM (8mMグルコース含有) で4日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター (ABLE社) を6チャンネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、55rpmの速度で攪拌しながら37℃の5%CO₂インキュベーター内で浮遊培養を行った。膵臓前駆細胞 (PP) への分化誘導、膵内分泌前駆細胞 (EP) への分化誘導、及び膵臓 β 細胞への分化誘導は比較例1と同様の方法にて培養した。

[0212] [実施例2]

内胚葉系細胞までは比較例1と同様の方法にて製造し、前記内胚葉系細胞から原始腸管細胞 (PGT) への分化誘導は、0.25%BSA、0.4×PS、1×NEAA、1%B27 supplement (Gibco社)、0.3%ITS-X、 50ng/mL recombinant human FGF7 (Peprotech社) を含むRPMI1640培地で3日間浮遊培養した。浮遊培養は30mLシングルユースバイオリアクター (A

B L E 社) を 6 チャネルマグネチックスターラー (エイブル社) に装着し、
5 5 r p m の速度で攪拌しながら 3 7 °C の C O ₂ インキュベーター内で浮遊培
養を行った。後前腸細胞 (P F G) 、 膵臓前駆細胞 (P P) 、 膵内分泌前駆
細胞 (E P) 及び膵臓 β 細胞への分化誘導については、実施例 1 と同様の方
法にて培養した。

[0213] [参考例 1]

<多能性幹細胞の維持培養>

ヒト i P S 細胞株 T K D N 4 - M (東京大学医科学研究所) は M I T O M Y
C I N - C (W A K O 社) で処理をした S N L F E E D E R 細胞上でヒト i P
S 細胞培地 (2 0 % K N O C K O U T S E R U M R E P L A C E M E N T
(K S R ; G I B C O 社)、1 × N O N - E S S E N T I A L A M I N O A
C I D S (N E A A ; W A K O 社)、5 5 μ m o L / L 2 - M E R C A P T
E T H A N O L (2 - M E ; G I B C O 社)、7 . 5 n g / M L R E C O M
B I N A N T H U M A N F I B R O B L A S T G R O W T H F A C
T O R (F G F 2 ; P E P R O T E C H 社)、0 . 5 × P E N I C I L L I
N A N D S T R E P T O M Y C I N (P S ; W A K O 社) を含む D M E
M / H A M ' S F 1 2 (W A K O 社)) で未分化維持培養を行った。また
は、V I T R O N E C T I N (G I B C O) でコーティングしたプレート上
で、1 × P E N I C I L L I N A N D S T R E P T O M Y C I N A N
D A M P H O T E R I C I N B (W A K O 社) を含む E S S E N T I A
L 8 培地 (E 8 ; G I B C O 社) で未分化維持培養した。なお、播種時の
み最終濃度 1 0 μ M となるように Y 2 7 6 3 2 を添加して培養した。培養は
、3 7 °C の 5 % C O ₂ インキュベーター内で行った。

[0214] <多能性幹細胞の前培養>

維持培養にて得られた細胞集団を、T k D N 4 - M 株は M i t o m y c
i n - C で処理をした S N L f e e d e r 細胞上で、4 5 4 E 2 株は V i t
r o n e c t i n でコートしたディッシュ上で、2 0 % K n o c k o u t
s e r u m r e p l a c e m e n t、1 × n o n - e s s e n t i a l

amino acids、 $55\mu\text{mol/L}$ 2-メルカプトエタノール、 7.5ng/mL recombinant human fibroblast growth factor、 $0.5\times$ Penicillin and Streptomycinを含むDMEM/Ham's F12にて、フィーダー細胞又はディッシュ上に接着させた状態で培養を1日間行った。培養は、 37°C の $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で行った。

[0215] <膵臓 β 細胞への分化誘導>

膵臓 β 細胞への分化誘導は、Yabe SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H. Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. J Diabetes. 2017 Feb ;9(2):168-179に記載の方法に基づいて実施した。

[0216] 前培養にて得られた細胞集団を、まずは内胚葉系細胞（胚体内胚葉：Definitive endoderm：DE）へ分化誘導した。具体的には、最初の2日間は、 $0.5\%\text{Bovine Serum Albumin}$ 、 $0.4\times\text{PS}$ 、 1mmol/L sodium pyruvate、 $1\times\text{NEAA}$ 、 80ng/mL recombinant human アクチビンA、 50ng/mL FGF2、 20ng/mL recombinant bone morphogenetic protein 4、 $3\mu\text{mol/L}$ CHIR99021を含むRPMI1640でディッシュ上に接着させた状態で培養した。3日目はこの培地からCHIR99021を除いてディッシュ上に接着させた状態で培養を行い、4日目はさらに 1% （体積／体積）KSRを加えた培地でディッシュ上に接着させた状態で培養を1日間行った。培養は、 37°C の $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で行った。

[0217] 上記で得られた内胚葉系細胞を原始腸管細胞（PGT）へ分化誘導した。具体的には $0.5\%\text{BSA}$ 、 1mmol/L sodium pyruvate、 $1\times\text{NEAA}$ 、 $0.4\times\text{PS}$ 、 50ng/mL FGF2、 50ng/mL recombinant human FGF7（Peprrotech社）、 $2\%\text{B27 supplement}$ （Gibco社）、 0.67μ

mol/L EC23 (Santa Cruz社)、 $1\mu\text{mol/L}$ dorsomorphin (Wako社)、 $10\mu\text{mol/L}$ SB431542 (Wako社)、 0.25mol/L SANT1 (Wako社)を含むRPMI1640で2日間培養した。培養は、 37°C の5% CO_2 インキュベーター内で行った。

[0218] 上記で得られた原始腸管細胞 (PGT) から後前腸細胞 (PFG) へ分化誘導した。具体的には $0.4\times\text{PS}$ 、 $1\times\text{NEAA}$ 、 50ng/mL FGF2、2% B27、 $0.67\mu\text{mol/L}$ EC23、 $1\mu\text{mol/L}$ dorsomorphin、 $10\mu\text{mol/L}$ SB431542、 $0.25\mu\text{mol/L}$ SANT1を含むDMEM-high glucose (Wako社)で4日間培養した。培養は、 37°C の5% CO_2 インキュベーター内で行った。

[0219] 上記で得られた後前腸細胞 (PFG) から膵臓前駆細胞 (PP) へ分化誘導した。具体的には $0.4\times\text{PS}$ 、 $1\times\text{NEAA}$ 、 50ng/mL recombinant human FGF10 (Peprotech社)、2% B27、 $0.5\mu\text{mol/L}$ EC23、 $1\mu\text{mol/L}$ dorsomorphin、 $0.25\mu\text{mol/L}$ SANT1、 $5\mu\text{mol/L}$ Alk5 inhibitor II (Biovision社)、 $0.3\mu\text{mol/L}$ indolactam V (ILV; Cayman社)を含むDMEM-high glucoseで3日間培養した。培養は、 37°C の5% CO_2 インキュベーター内で行った。

[0220] 上記で得られた膵臓前駆細胞 (PP) から膵内分泌前駆細胞 (EP) へ分化誘導した。具体的には、 $0.4\times\text{PS}$ 、 2mmol/L L-glutamine、2% B27、 $0.2\mu\text{mol/L}$ EC23、 $1\mu\text{mol/L}$ dorsomorphin、 $0.25\mu\text{mol/L}$ SANT1、 $5\mu\text{mol/L}$ Alk5 inhibitor II (RepSox)、 50ng/mL Exendin4 (Sigma社)を含むAdvanced-DMEM (Gibco社)で3日間培養した。培養は、 37°C の5% CO_2 インキ

ュベーター内で行った。

[0221] 上記で得られた膵内分泌前駆細胞 (EP) から膵臓β細胞 (以下、「iPS-β細胞」と記載することもある) へ分化誘導した。具体的には、0.4 × PS、2 mmol/L L-glutamine、2% B27、10 ng/mL BMP4、10 ng/mL FGF2、50 ng/mL recombinant human hepatocyte growth factor (HGF; Peprotech社)、50 ng/mL insulin-like growth factor 1 (IGF1; Peprotech社)、5 μmol/L Alk5 inhibitor II (RepSox)、50 ng/mL Exendin4、5 mmol/L nicotinamide (Sigma社)、5 μmol/L forskolin (Wako社) を含む Advanced-DMEM で6日間培養した。培養は、37℃の5% CO₂ インキュベーター内で行った。

[0222] <定量的RT-PCR>

分化誘導した iPS-β細胞の total RNA を ISOGEN (Wako社) により単離・精製し、PrimeScript II (Takara Bio社) を用いて cDNA の合成を行った。ここで合成した cDNA を鋳型とし、GoTaq qPCR master mix (Promega社) を使い MyiQ qPCR machine (Bio-Rad社) により定量PCRを実行した。検出はSYBR Greenによるインターカレーション法で、遺伝子発現量比較は比較Ct法による相対定量法で行った。各遺伝子の発現レベルはハウスキーピング遺伝子であるOAZ1またはβ-Actinにより標準化した。

[0223] 定量PCRに使用したプライマーの塩基配列は次のとおりである。

OAZ1 F : GTC AGA GGG ATC ACA ATC TTT CAG (配列番号1)

OAZ1 R : GTC TTG TCG TTG GAC GTT AGT TC (配列番号2)

INS F : TTG TGA ACC AAC ACC TGT GC (配列番号3)

INS R : GTG TGT AGA AGA AGC CTC GTT CC (配列番号4)

NKX6.1 F : ATC TTC GCC CTG GAG AAG AC (配列番号 5)
NKX6.1 R : CGT GCT TCT TCC TCC ACT TG (配列番号 6)
 β -Actin F : CCT CAT GAA GAT CCT CAC CGA (配列番号 7)
 β -Actin R : TTG CCA ATG GTG ATG ACC TGG (配列番号 8)
GNAS F : ACA TCA TTC AGC GCA TGC AC (配列番号 9)
GNAS R : GTA GGC CGC CTT AAG CTT TC (配列番号 10)
GCK F : CAG CTT GAC CAG ACC TAG AC (配列番号 11)
GCK R : CAT CCC AGA ATC ACA AGC CA (配列番号 12)
CD44 F : GAG TCA AGA AGG TGG AGC AA (配列番号 13)
CD44 R : TGG TCT GGA GTT TCT GAC GA (配列番号 14)
LIG1 F : TGT GTT TGT ACG CCT TCG AC (配列番号 15)
LIG1 R : ACT GAC TGC TCC AGG AAC TC (配列番号 16)
ADCY1 F : GGG ACT CGA CAT GAT TGA TAC C (配列番号 17)
ADCY1 R : ACT GTT CCT CTC ATG TCC GTA A (配列番号 18)
ADCY2 F : GAG CAT CTT ATA CGC TGA CAT C (配列番号 19)
ADCY2 R : CAG TTC TTG GCA TGG TTA GG (配列番号 20)
PLCB4 F : TGC AAA GGA ACA CAG TAC CA (配列番号 21)
PLCB4 R : CTC GGA TTT CTT GCT CCT CA (配列番号 22)
SMAD9 F : AGG TCA TGC TTT CAG AAC GA (配列番号 23)
SMAD9 R : CGT ACT CCA TCA CAA AGT ACA G (配列番号 24)

[0224] <測定の結果>

遺伝子発現量を測定した結果を図 1 に示す。

実施例 1 の方法にて得られた i P S - β 細胞を、参考例 1 及び比較例 1 の方法にて得られた i P S - β 細胞と比較すると、実施例 1 の方法にて得られた i P S - β 細胞の NK X 6. 1 遺伝子の発現が高いことが明らかとなった (図 1) 。すなわち、多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞を、本発明の方法にて培養し、膵臓 β 細胞を製造すると、膵臓 β 細胞への分化誘導効率が向上することが明らかとなった。また、比較例 1 と実施例 1 では、

原始腸管細胞（P G T）から後前腸細胞（P F G）への分化誘導時に使用する培養条件のみが異なっており、膵臓前駆細胞（P P）、膵内分泌前駆細胞（E P）及び膵臓 β 細胞の製造方法は同一の方法であることから、膵臓 β 細胞への効率的な分化誘導を達成するためには、原始腸管細胞（P G T）から後前腸細胞（P P）への分化誘導工程が重要であることが示唆される。すなわち、原始腸管細胞（P G T）を、プロテインキナーゼC（P K C）活性化剤の存在下において培養することにより、膵臓 β 細胞への分化誘導効率を向上させることができるといえる。

[0225] [網羅的遺伝子発現解析]

各分化段階（P F G、P P、E P、i P S - β ）の細胞について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

[0226] <RNA抽出>

実施例1または参考例1に記載の方法で培養して分化誘導したP F G細胞、P P細胞、E P細胞およびi P S - β 細胞のt o t a l R N AをI S O G E N（W a k o社）により単離・精製した。

[0227] <DNAマイクロアレイ解析>

抽出したt o t a l R N Aを用いて、DNAマイクロアレイ解析を行った。

(1) c R N A合成

3' I V T P L U S R e a g e n t K i tを用いてc R N A合成を行った。方法はA f f y m e t r i x（登録商標）推奨プロトコールに準ずる。t o t a l R N A（100ng）から逆転写反応によりc D N Aを作製した。作製したc D N Aからi n v i t r o t r a n s c r i p t i o nにより、c R N Aに転写してビオチン標識を行った。

[0228] (2) ハイブリダイゼーション

標識c R N A（12.5 μ g）をハイブリダイゼーションバッファーに加え、H u m a n G e n o m e U 1 3 3 P l u s 2.0 A r r a y上で16時間のハイブリダイゼーションを行った。G e n e C h i p（登録商標

) Fluidics Station 450にて洗浄・フィコエリスリン染色後、GeneChip (登録商標) Scanner 3000 7Gでスキャンを行い、AGCC (Affymetrix (登録商標) GeneChip (登録商標) Command Console (登録商標) Software)にて画像解析、Affymetrix (登録商標) Expression Console™を用いて数値化を行った。

[0229] なお、上記(1)、(2)の各工程については、は株式会社理研ジェネシスが提供する、Affymetrix社製DNAマイクロアレイ「GeneChip (登録商標) : Human Genome U133 Plus 2.0 Array」を使用した受託解析サービスを利用した (https://rikengenes.jp/contents/ja_JPY/microarray_affymetrix.html)。本受託解析サービスは、サンプル(トータルRNA等)を提供するだけで、GeneChip (登録商標)を使用した網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行ってくれるものである。

[0230] <DNAマイクロアレイデータを用いたエンリッチメント解析>

データの統計解析はR version 3.4.2およびBioconductor version 3.6 (The R Foundation for Statistical Computing, 2017)を用いて実施した。また、エンリッチメント解析はThe Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 6.8 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH)を利用した (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)。

[0231] 上記DNAマイクロアレイ解析によって得られたAffymetrix arrayデータ(CELファイル)並びに参考例1に記載の方法で培養して分化誘導した原始腸管細胞集団由来のAffymetrix arrayデータ(CELファイル)をReadAffy()関数でRに読み込んだ。その後、rma()関数を用いてマイクロアレイデータの正規化を行った。このrma()関数はRobust Multi-array Aver

age (RMA) 法を実施する関数である(Irizarry R, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay Y, Antonellis K, Scherf U, Speed T. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003;4:249.)。RMA法は現在、最も一般的に用いられている正規化方法のひとつであり、Background correcting、Normalizing、Calculating Expressionを一括して行う。なお、RMA法はperfect match (PM) 値に対して底が2の対数変換を施して正規化処理を実施するため、正規化後の結果も底が2の対数変換値で出力される。

[0232] 次に、正規化後のシグナルについて、実施例1に記載の方法で培養して分化誘導した原始腸管細胞集団由来のシグナル値と参考例1に記載の方法で培養して分化誘導した原始腸管細胞集団由来のシグナル値の差分を計算した。

[0233] RMA法による正規化後のシグナルは底が2の対数変換が成されている。ゆえに、シグナルの差分は fold changeに対する底が2の対数変換値である ($\log_2(x) - \log_2(y) = \log_2(x/y)$)。よって、差分に対して逆変換を行うことで、fold changeを計算した。その後、fold changeが2以上の転写産物と、0.5以下の転写産物を抽出して、それぞれ発現変動遺伝子とした。今回の実験では各条件のサンプルの反復はないこと、およびサンプル数が1であることから、t検定やそれに関連する、仮説検定手法に基づく発現変動遺伝子の選択ができない。そのため、一般的に使用されている基準として、fold changeが2以上および0.5以下という基準を採用した。Fold change が2以上あるいは0.5以下の転写産物をエンリッチメント解析の対象とした。

[0234] エンリッチメント解析とは、発現変動遺伝子のうち、機能の多いものを解析する手法であり、アノテーション解析のひとつである。例えば、発現変動遺伝子は確率論的に転写因子が相対的に多いのか、細胞周期が多いのか、等を解析することが可能である。上記の解析で選択された転写産物リストを、

発現量などの情報は除いてDAVIDに読み込ませ、エンリッチメント解析を実施した。DAVIDでは様々なエンリッチメント解析が可能であるが、多数の解析を実施することによる多重性のリスクを低減するために、今回はKEGG pathway 解析に限定して解析を実施した。

[0235] KEGG pathway 解析は、DAVIDがKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベース (www.genome.jp/kegg/) にアクセスし、転写産物リストと相関が高い pathway を統計的に抽出することで実施される。Pathway 毎に相関性に対する p 値が表示されるが、一度に多数の pathway に対して仮説検定を実施するため、DAVIDでは様々な多重性調整 p 値を算出することが可能である。今回の解析では、その中でも、マイクロアレイ解析で最も一般的に用いられているBenjamini-Hochberg法を用いることとした (Benjamini, Y; Hochberg, Y (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". Journal of the Royal Statistical Society, Series B. 57 (1): 289-300.)。Benjamini-Hochberg法で算出された調整 p 値を用いて、シグナルセットと相関の高い pathway を選択した。Bonferroni法でさらに多重性を調整して、調整 p 値が $0.05 / 20 > 0.0033 = 3.3 \times 10^{-3}$ 未満であるときに、当該 pathway を統計的に有意な pathway であると判断することとした。

[0236] エンリッチメント解析の結果、参考例1に記載の方法で培養して分化誘導したPFG細胞に比べて、実施例1に記載の方法で培養して分化誘導したPFG細胞では、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」に関する遺伝子発現が向上しており、パスウェイ名「Viral myocarditis」および「Proteoglycans in cancer」に関する遺伝子発現が低下していた。これらの遺伝子の発現発現量の変動することにより、PFG細胞への分化効率が向上したと考えられる。各パスウェイにおいて発現が変動していた遺伝子については、表1～3に示す。

[0237] また、参考例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した膵臓前駆細胞（P P）に比べて、実施例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した膵臓前駆細胞（P P）では、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」、パスウェイ名「Morphine addiction」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「Serotonergic synapse」、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Amphetamine addiction」、パスウェイ名「Neuroactive ligand-receptor interaction」、パスウェイ名「cAMP signaling pathway」、およびパスウェイ名「Alcoholism」に関する複数の遺伝子の発現が向上しており、パスウェイ名「p53 signaling pathway」、パスウェイ名「Focal adhesion」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、およびパスウェイ名「Graft-versus-host disease」に関する複数の遺伝子の発現が低下していた。各パスウェイにおいて発現が変動していた遺伝子については、表 4～21 に示す。さらに、上記に含まれる遺伝子について定量的 R T - P C R による発現解析を上記の方法で行ったところ、例えば、G N A S 遺伝子および G C K 遺伝子については、参考例 1 または比較例 1 と比較して実施例 1 で発現が向上しており、また C D 4 4 遺伝子については、参考例 1 または比較例 1 と比較して実施例 1 で発現が低下していた（図 4 および表 65）。したがって、定量的 R T - P C R による発現解析の結果から得られたこれらの遺伝子の発現量の変動することにより、膵臓前駆細胞および β 細胞への分化効率が向上したと考えられる。

[0238] また、参考例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した膵内分泌前駆細胞（E P）に比べて、実施例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した膵内分泌前駆細胞（E P）では、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Synaptic ve

sicle cycle」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「cAMP signaling pathway」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Serotonergic synapse」、パスウェイ名「Alcoholism」、パスウェイ名「Morphine addiction」に関する複数の遺伝子の発現が向上しており、パスウェイ名「DNA replication」、パスウェイ名「Cell cycle」、パスウェイ名「Pathways in cancer」、パスウェイ名「Mismatch repair」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「p53 signaling pathway」、パスウェイ名「Fanconi anemia pathway」、パスウェイ名「Homologous recombination」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、パスウェイ名「Small cell lung cancer」に関する複数の遺伝子の発現が低下していた。各パスウェイにおいて発現が変動していた遺伝子については、表 22～43 に示す。さらに、上記に含まれる遺伝子について定量的 RT-PCR による発現解析を上記の方法で行ったところ、例えば、LIG1 遺伝子については、参考例 1 または比較例 1 と比較して実施例 1 で発現が低下していた（図 5 および表 66）。したがって、定量的 RT-PCR による発現解析の結果から得られたこれらの遺伝子の発現量の変動することにより、膵内分泌前駆細胞および β 細胞への分化効率が向上したと考えられる。

[0239] また、参考例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した β 細胞に比べて、実施例 1 に記載の方法で培養して分化誘導した β 細胞では、パスウェイ名「Dopaminergic synapse」、パスウェイ名「Insulin secretion」、パスウェイ名「Synaptic vesicle cycle」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Synaptic vesicle cycle」、パスウェイ名「GABAergic synapse」、パスウェイ名「Glutamatergic synapse」、パスウェイ名「Retrograde endocannabinoid signaling」、パスウェイ名「Circadian entrainment」、パスウェイ名「Alcoholism」、パスウェイ名「Serotonergic synapse」、パスウェイ名「Cholinergic synapse」、パスウェイ名「Morphine addiction」、パスウェイ名「Adrenergic signaling in cardiomyocytes」、パ

スウェイ名「Maturity onset diabetes of the young」に関する複数の遺伝子の発現が向上しており、パスウェイ名「Cell cycle」、パスウェイ名「ECM-receptor interaction」、パスウェイ名「PI3K-Akt signaling pathway」、パスウェイ名「Proteoglycans in cancer」、パスウェイ名「Pathways in cancer」、パスウェイ名「Focal adhesion」、パスウェイ名「DNA replication」、パスウェイ名「TGF-beta signaling pathway」に関する複数の遺伝子の発現が低下していた。パスウェイの詳細についてはKEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) を参照。各パスウェイにおいて発現が変動していた遺伝子については、表44～64に示す。これらの遺伝子の発現量の変動することにより、iPS-β細胞への分化効率が向上したと考えられる。さらに、上記に含まれる遺伝子について定量的RT-PCRによる発現解析を上記の方法で行ったところ、例えば、ADCY1遺伝子、ADCY2遺伝子およびPLCB4遺伝子については、参考例1または比較例1と比較して実施例1で発現が向上しており、またSMAD9遺伝子については、参考例1または比較例1と比較して実施例1で発現が低下していた（図6および表67）。したがって、定量的RT-PCRによる発現解析の結果から得られたこれらの遺伝子の発現量の変動することにより、iPS-β細胞への分化効率が向上したと考えられる。

[0240]

[表1]

表1. 「Maturity onset diabetes of the young」に関する発現向上遺伝子（PFG細胞）

遺伝子名(略称)
NK2 homeobox 2(NKX2-2)
forkhead box A3(FOXA3)
glucokinase(GCK)
hematopoietically expressed homeobox(HHEX)
hepatocyte nuclear factor 4 alpha(HNF4A)
hepatocyte nuclear factor 4 gamma(HNF4G)
neurogenin 3(NEUROG3)
neuronal differentiation 1(NEUROD1)
nuclear receptor subfamily 5 group A member 2(NR5A2)
one cut homeobox 1(ONECUT1)
paired box 4(PAX4)
pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)

[0241]

[表2]

表2. 「Viral myocarditis」に関する発現向上遺伝子（PFG細胞）

遺伝子名(略称)
CD55 molecule (Cromer blood group)(CD55)
caspase 8(CASP8)
caveolin 1(CAV1)
dystrophin(DMD)
intercellular adhesion molecule 1(ICAM1)
major histocompatibility complex, class I, A(HLA-A)
major histocompatibility complex, class I, B(HLA-B)
major histocompatibility complex, class I, C(HLA-C)
major histocompatibility complex, class I, F(HLA-F)
major histocompatibility complex, class I, G(HLA-G)
major histocompatibility complex, class II, DM alpha(HLA-DMA)
major histocompatibility complex, class II, DO alpha(HLA-DOA)
major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1(HLA-DPA1)
major histocompatibility complex, class II, DP beta 1(HLA-DPB1)

major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1(HLA-DQB1)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)(RAC2)
sarcoglycan gamma(SGCG)

[0242]

[表3]

表3. 「Proteoglycans in cancer」に関する発現向上遺伝子（PFG細胞）

遺伝子名(略称)
Cbl proto-oncogene C(CBLC)
Cbl proto-oncogene(CBL)
Fas cell surface death receptor(FAS)
IQ motif containing GTPase activating protein 1(IQGAP1)
T-cell lymphoma invasion and metastasis 1(TIAM1)
ankyrin 1(ANK1)
ankyrin 2(ANK2)
ankyrin 3(ANK3)
caveolin 1(CAV1)
cortactin(CTTN)
cyclin dependent kinase inhibitor 1A(CDKN1A)
eukaryotic translation initiation factor 4B(EIF4B)
ezrin(EZR)

fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor receptor 1(FGFR1)
frizzled class receptor 4(FZD4)
frizzled class receptor 7(FZD7)
glypican 3(GPC3)
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1(ITPR1)
insulin like growth factor 1 receptor(IGF1R)
insulin like growth factor 1(IGF1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
kinase insert domain receptor(KDR)
microRNA 10a(MIR10A)
mitogen-activated protein kinase 1(MAPK1)
mitogen-activated protein kinase 14(MAPK14)

phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta(PIK3CB)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5(PIK3R5)
protein kinase C beta(PRKCB)
protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta(PRKACB)
protein tyrosine kinase 2(PTK2)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
related RAS viral (r-ras) oncogene homolog(RRAS)
signal transducer and activator of transcription 3(STAT3)
twist family bHLH transcription factor 1(TWIST1)

[0243]

[表4]

表4. 「Maturity onset diabetes of the young」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
NK2 homeobox 2(NKX2-2)
NK6 homeobox 1(NKX6-1)
glucokinase(GCK)
hepatocyte nuclear factor 4 alpha(HNF4A)
insulin(INS)
islet amyloid polypeptide(IAPP)
motor neuron and pancreas homeobox 1(MNX1)
neurogenin 3(NEUROG3)
neuronal differentiation 1(NEUROD1)
nuclear receptor subfamily 5 group A member 2(NR5A2)
one cut homeobox 1(ONECUT1)
paired box 4(PAX4)
paired box 6(PAX6)
pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)

[0244] [表5]

表5. 「Morphine addiction」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
G protein-coupled receptor kinase 4(GRK4)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit(GABRB2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)

gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
phosphodiesterase 1A(PDE1A)
phosphodiesterase 2A(PDE2A)
phosphodiesterase 3B(PDE3B)
phosphodiesterase 4B(PDE4B)
phosphodiesterase 8B(PDE8B)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 5(KCNJ5)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)

[0245]

[表6]

表6. 「GABAergic synapse」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit(GABRB2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)

glutamate decarboxylase 2(GAD2)
huntingtin associated protein 1(HAP1)
phospholipase C like 1(PLCL1)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)

[0246]

[表7]

表7. 「Dopaminergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (P P細胞)

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
dopa decarboxylase(DDC)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)

glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
monoamine oxidase A(MAOA)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 5(KCNJ5)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein phosphatase 3 catalytic subunit beta(PPP3CB)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0247]

[表8]

表8. 「Retrograde endocannabinoid signaling」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit(GABRB2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)

glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 5(KCNJ5)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)

[0248]

[表9]

表9. 「Serotonergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (P P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8(CYP2C8)
cytochrome P450 family 4 subfamily X member 1(CYP4X1)
dopa decarboxylase(DDC)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit(GABRB2)

gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
monoamine oxidase A(MAOA)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 5(KCNJ5)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
tryptophan hydroxylase 1(TPH1)

[0249]

[表10]

表10. 「Insulin secretion」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
ATP binding cassette subfamily C member 8(ABCC8)
GNAS complex locus(GNAS)
Rap guanine nucleotide exchange factor 4(RAPGEF4)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
cholinergic receptor muscarinic 3(CHRM3)
glucagon(GCG)
glucokinase(GCK)
insulin(INS)
pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1(KCNMA1)

regulating synaptic membrane exocytosis 2(RIMS2)
solute carrier family 2 member 1(SLC2A1)
synaptosome associated protein 25(SNAP25)
syntaxin 1A(STX1A)

[0250]

[表11]

表 1 1. 「Glutamatergic synapse」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)

glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2(GRIK2)
glutamate metabotropic receptor 8(GRM8)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
protein phosphatase 3 catalytic subunit beta(PPP3CB)
solute carrier family 1 member 6(SLC1A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)

[0251]

[表12]

表12. 「Circadian entrainment」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)

guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha(GUCY1A3)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 5(KCNJ5)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
ras related dexamethasone induced 1(RASD1)

[0252]

[表13]

表13. 「Amphetamine addiction」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
dopa decarboxylase(DDC)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
monoamine oxidase A(MAOA)
protein phosphatase 3 catalytic subunit beta(PPP3CB)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
syntaxin 1A(STX1A)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0253] [表14]

表14. 「Neuroactive ligand-receptor interaction」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
adrenoceptor alpha 2A(ADRA2A)
cholinergic receptor muscarinic 3(CHRM3)
cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit(CHRNA3)
galanin receptor 1(GALR1)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit(GABRB2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2(GRIK2)

glutamate metabotropic receptor 8(GRM8)
glycine receptor beta(GLRB)
luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor(LHCGR)
lysophosphatidic acid receptor 1(LPAR1)
lysophosphatidic acid receptor 6(LPAR6)
neuropeptide Y receptor Y1(NPY1R)
neuropeptide Y receptor Y5(NPY5R)
opioid receptor kappa 1(OPRK1)
parathyroid hormone 2 receptor(PTH2R)
prolactin releasing hormone receptor(PRLHR)
prostaglandin D2 receptor(PTGDR)
prostaglandin E receptor 2(PTGER2)
prostaglandin E receptor 3(PTGER3)
prostaglandin E receptor 4(PTGER4)

protease, serine 3(PRSS3)
secretin receptor(SCTR)
somatostatin receptor 1(SSTR1)
somatostatin receptor 2(SSTR2)
tachykinin receptor 1(TACR1)
thyroid stimulating hormone receptor(TSHR)

[0254]

[表15]

表15. 「cAMP signaling pathway」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
GNAS complex locus(GNAS)
Rap guanine nucleotide exchange factor 4(RAPGEF4)
SRY-box 9(SOX9)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
afadin, adherens junction formation factor(AFDN)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
cyclic nucleotide gated channel alpha 3(CNGA3)
free fatty acid receptor 2(FFAR2)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
ghrelin and obestatin prepropeptide(GHRL)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)

glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
neuropeptide Y receptor Y1(NPY1R)
patched 1(PTCH1)
phosphodiesterase 3B(PDE3B)
phosphodiesterase 4B(PDE4B)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1)
prostaglandin E receptor 2(PTGER2)
prostaglandin E receptor 3(PTGER3)
somatostatin receptor 1(SSTR1)
somatostatin receptor 2(SSTR2)
thyroid stimulating hormone receptor(TSHR)

[0255]

[表16]

表16. 「Alcoholism」に関する発現向上遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
corticotropin releasing hormone(CRH)
dopa decarboxylase(DDC)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
histone cluster 1 H2A family member c(HIST1H2AC)
histone cluster 1 H2A family member i(HIST1H2AI)
histone cluster 1 H2B family member d(HIST1H2BD)
histone cluster 1 H2B family member e(HIST1H2BE)

histone cluster 1 H2B family member g(HIST1H2BG)
histone cluster 1 H2B family member h(HIST1H2BH)
histone cluster 1 H2B family member j(HIST1H2BJ)
histone cluster 1 H2B family member k(HIST1H2BK)
histone cluster 1 H3 family member e(HIST1H3E)
histone cluster 2 H2B family member e(HIST2H2BE)
monoamine oxidase A(MAOA)
neurotrophic receptor tyrosine kinase 2(NTRK2)
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha(PKIA)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0256]

[表17]

表 1 7. 「p53 signaling pathway」に関する発現低下遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
BCL2 associated X, apoptosis regulator(BAX)
Fas cell surface death receptor(FAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
PERP, TP53 apoptosis effector(PERP)
STEAP3 metalloreductase(STEAP3)
caspase 8(CASP8)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin dependent kinase 1(CDK1)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 1A(CDKN1A)
cyclin dependent kinase inhibitor 2A(CDKN2A)
damage specific DNA binding protein 2(DDB2)

growth arrest and DNA damage inducible beta(GADD45B)
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1(PMAIP1)
ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B(RRM2B)
serpin family E member 1(SERPINE1)
sestrin 1(SESN1)
sestrin 2(SESN2)
stratifin(SFN)
zinc finger matrin-type 3(ZMAT3)

[0257]

[表18]

表18. 「Focal adhesion」に関する発現低下遺伝子（PP細胞）

遺伝子名(略称)
Rho GTPase activating protein 5(ARHGAP5)
SHC adaptor protein 1(SHC1)
calpain 2(CAPN2)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
collagen type VI alpha 2 chain(COL6A2)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)

epidermal growth factor(EGF)
filamin B(FLNB)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)
integrin subunit alpha V(ITGAV)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)
myosin light chain 12A(MYL12A)
myosin light chain 12B(MYL12B)
myosin light chain 7(MYL7)
myosin light chain 9(MYL9)

p21 (RAC1) activated kinase 1(PAK1)
p21 (RAC1) activated kinase 6(PAK6)
placental growth factor(PGF)
platelet derived growth factor C(PDGFC)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)(RAC3)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
tenascin C(TNC)
vascular endothelial growth factor C(VEGFC)
vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)

[0258]

[表19]

表19. 「PI3K-Akt signaling pathway」に関する発現低下遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
BCL2 family apoptosis regulator(MCL1)
EPH receptor A2(EPHA2)
G protein subunit beta 4(GNB4)
Janus kinase 1(JAK1)
KIT ligand(KITLG)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1(PHLPP1)
Ras homolog enriched in brain(RHEB)
TEK receptor tyrosine kinase(TEK)
chorionic somatomammotropin hormone 1(CSH1)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)

collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
collagen type VI alpha 2 chain(COL6A2)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 1A(CDKN1A)
ephrin A1(EFNA1)
ephrin A5(EFNA5)
epidermal growth factor(EGF)
fibroblast growth factor 10(FGF10)

fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)
growth hormone 1(GH1)
growth hormone receptor(GHR)
heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
insulin receptor substrate 1(IRS1)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)
integrin subunit alpha V(ITGAV)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)

lysophosphatidic acid receptor 3(LPAR3)
oncostatin M receptor(OSMR)
phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial(PCK2)
placental growth factor(PGF)
platelet derived growth factor C(PDGFC)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B'epsilon(PPP2R5E)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bbeta(PPP2R2B)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
tenascin C(TNC)
vascular endothelial growth factor C(VEGFC)

[0259]

[表20]

表 20. 「ECM-receptor interaction」に関する発現低下遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
CD44 molecule (Indian blood group)(CD44)
CD47 molecule(CD47)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
collagen type VI alpha 2 chain(COL6A2)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)

integrin subunit alpha V(ITGAV)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
syndecan 1(SDC1)
tenascin C(TNC)

[0260]

[表21]

表 2 1. 「Graft-versus-host disease」に関する発現低下遺伝子（P P細胞）

遺伝子名(略称)
Fas cell surface death receptor(FAS)
interleukin 1 alpha(IL1A)
major histocompatibility complex, class I, A(HLA-A)
major histocompatibility complex, class I, B(HLA-B)
major histocompatibility complex, class I, C(HLA-C)
major histocompatibility complex, class I, F(HLA-F)
major histocompatibility complex, class I, G(HLA-G)
major histocompatibility complex, class II, DM alpha(HLA-DMA)
major histocompatibility complex, class II, DO alpha(HLA-DOA)
major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1(HLA-DPA1)
major histocompatibility complex, class II, DP beta 1(HLA-DPB1)
major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1(HLA-DQB1)

[0261]

[表22]

表 2 2. 「Insulin secretion」に関する発現向上遺伝子 (E P 細胞)

遺伝子名(略称)
ATP binding cassette subfamily C member 8(ABCC8)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2(ATP1B2)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 3(ATP1B3)
GNAS complex locus(GNAS)
Rap guanine nucleotide exchange factor 4(RAPGEF4)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
adenylate cyclase activating polypeptide 1(ADCYAP1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
free fatty acid receptor 1(FFAR1)
gastric inhibitory polypeptide(GIP)
glucagon like peptide 1 receptor(GLP1R)

glucagon(GCG)
glucokinase(GCK)
insulin(INS)
pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
piccolo presynaptic cytomatrix protein(PCLO)
potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1(KCNMA1)
potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 2(KCNMB2)
potassium calcium-activated channel subfamily N member 3(KCNN3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 11(KCNJ11)
regulating synaptic membrane exocytosis 2(RIMS2)
solute carrier family 2 member 1(SLC2A1)
synaptosome associated protein 25(SNAP25)
syntaxin 1A(STX1A)

[表23]

表23. 「Maturity onset diabetes of the young」に関する発現向上遺伝子（E P細胞）

遺伝子名(略称)
NK2 homeobox 2(NKX2-2)
NK6 homeobox 1(NKX6-1)
forkhead box A3(FOXA3)
glucokinase(GCK)
hematopoietically expressed homeobox(HHEX)
hepatocyte nuclear factor 4 alpha(HNF4A)
hepatocyte nuclear factor 4 gamma(HNF4G)
insulin(INS)
islet amyloid polypeptide(IAPP)
neurogenin 3(NEUROG3)
neuronal differentiation 1(NEUROD1)
paired box 4(PAX4)
paired box 6(PAX6)
pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)

[0263]

[表24]

表 2 4. 「GABAergic synapse」に関する発現向上遺伝子（E P細胞）

遺伝子名(略称)
4-aminobutyrate aminotransferase(ABAT)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
glutamate decarboxylase 1(GAD1)
glutamate decarboxylase 2(GAD2)
glutaminase(GLS)
phospholipase C like 1(PLCL1)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)
solute carrier family 38 member 5(SLC38A5)

[0264]

[表25]

表 25. 「Dopaminergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
calcyon neuron specific vesicular protein(CALY)
dopa decarboxylase(DDC)
dopamine receptor D2(DRD2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
kinesin family member 5C(KIF5C)
mitogen-activated protein kinase 13(MAPK13)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B'beta(PPP2R5B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bbeta(PPP2R2B)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)

solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0265] [表26]

表26. 「Synaptic vesicle cycle」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
ATPase H ⁺ transporting V0 subunit a1(ATP6V0A1)
ATPase H ⁺ transporting V0 subunit b(ATP6V0B)
ATPase H ⁺ transporting V0 subunit c(ATP6V0C)
ATPase H ⁺ transporting V0 subunit e2(ATP6V0E2)
ATPase H ⁺ transporting V1 subunit B2(ATP6V1B2)
ATPase H ⁺ transporting V1 subunit G2(ATP6V1G2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
complexin 1(CPLX1)
complexin 2(CPLX2)
dynamin 1(DNM1)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
synaptosome associated protein 25(SNAP25)
syntaxin 1A(STX1A)
syntaxin binding protein 1(STXBP1)
unc-13 homolog A(UNC13A)

[0266]

[表27]

表 27. 「Glutamatergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3(SHANK3)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2(GRIK2)
glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3(GRIK3)
glutaminase(GLS)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
phospholipase D1(PLD1)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)

[表28]

表28. 「Retrograde endocannabinoid signaling」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
mitogen-activated protein kinase 13(MAPK13)
monoglyceride lipase(MGLL)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)

[0268]

[表29]

表 29. 「cAMP signaling pathway」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2(ATP1B2)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 3(ATP1B3)
ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 4(ATP2B4)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
GNAS complex locus(GNAS)
Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(JUN)
Rap guanine nucleotide exchange factor 4(RAPGEF4)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
afadin, adherens junction formation factor(AFDN)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
cyclic nucleotide gated channel alpha 3(CNGA3)
cyclic nucleotide gated channel alpha 4(CNGA4)
dopamine receptor D2(DRD2)
free fatty acid receptor 2(FFAR2)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
gastric inhibitory polypeptide receptor(GIPR)
ghrelin and obestatin prepropeptide(GHRL)
glucagon like peptide 1 receptor(GLP1R)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4(HCN4)
phosphodiesterase 4B(PDE4B)

phospholipase D1(PLD1)
prostaglandin E receptor 2(PTGER2)
prostaglandin E receptor 3(PTGER3)
solute carrier family 9 member A1(SLC9A1)
somatostatin receptor 1(SSTR1)
somatostatin receptor 2(SSTR2)
thyroid stimulating hormone receptor(TSHR)
troponin I3, cardiac type(TNNI3)

[0269]

[表30]

表30. 「Circadian entrainment」に関する発現向上遺伝子（E P細胞）

遺伝子名(略称)
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(FOS)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3(GRIA3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
nitric oxide synthase 1(NOS1)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
ras related dexamethasone induced 1(RASD1)
ryanodine receptor 1(RYR1)

[0270]

[表31]

表 3 1. 「Serotonergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
arachidonate 5-lipoxygenase(ALOX5)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8(CYP2C8)
cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2(CYP2J2)
dopa decarboxylase(DDC)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
solute carrier family 6 member 4(SLC6A4)
tryptophan hydroxylase 1(TPH1)

[0271]

[表32]

表 3 2. 「Alcoholism」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
GNAS complex locus(GNAS)
H2A histone family member J(H2AFJ)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
corticotropin releasing hormone(CRH)
dopa decarboxylase(DDC)
dopamine receptor D2(DRD2)
glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A(GRIN3A)
histone cluster 1 H2A family member c(HIST1H2AC)
histone cluster 1 H2A family member e(HIST1H2AE)
histone cluster 1 H2A family member i(HIST1H2AI)
histone cluster 1 H2B family member d(HIST1H2BD)
histone cluster 1 H2B family member e(HIST1H2BE)
histone cluster 1 H2B family member g(HIST1H2BG)
histone cluster 1 H2B family member h(HIST1H2BH)
histone cluster 1 H2B family member j(HIST1H2BJ)
histone cluster 1 H2B family member k(HIST1H2BK)
histone cluster 1 H3 family member e(HIST1H3E)
histone cluster 2 H2A family member a4(HIST2H2AA4)
histone cluster 2 H2B family member e(HIST2H2BE)
histone cluster 3 H2A(HIST3H2A)

histone cluster 4 H4(HIST4H4)
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha(PKIA)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0272] [表33]

表33. 「Morphine addiction」に関する発現向上遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha i1(GNAI1)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 1(GNB1)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 8(GNG8)
G protein-coupled receptor kinase 4(GRK4)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 9(ADCY9)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit(GABRA1)
gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha2 subunit(GABRA2)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
phosphodiesterase 2A(PDE2A)
phosphodiesterase 4B(PDE4B)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)

[0273]

[表34]

表 3 4. 「DNA replication」に関する発現低下遺伝子 (E P 細胞)

遺伝子名(略称)
DNA ligase 1(LIG1)
DNA polymerase alpha 1, catalytic subunit(POLA1)
DNA polymerase alpha 2, accessory subunit(POLA2)
DNA polymerase delta 1, catalytic subunit(POLD1)
DNA polymerase delta 3, accessory subunit(POLD3)
DNA polymerase epsilon 2, accessory subunit(POLE2)
DNA polymerase epsilon, catalytic subunit(POLE)
DNA replication helicase/nuclease 2(DNA2)
flap structure-specific endonuclease 1(FEN1)
minichromosome maintenance complex component 2(MCM2)
minichromosome maintenance complex component 3(MCM3)
minichromosome maintenance complex component 4(MCM4)
minichromosome maintenance complex component 5(MCM5)
minichromosome maintenance complex component 6(MCM6)
minichromosome maintenance complex component 7(MCM7)
primase (DNA) subunit 1(PRIM1)
primase (DNA) subunit 2(PRIM2)
proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
replication factor C subunit 2(RFC2)
replication factor C subunit 3(RFC3)
replication factor C subunit 4(RFC4)
replication factor C subunit 5(RFC5)
replication protein A1(RPA1)
replication protein A3(RPA3)
ribonuclease H2 subunit B(RNASEH2B)

[0274]

[表35]

表 3 5. 「Cell cycle」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B(BUB1B)
BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase(BUB1)
DBF4 zinc finger(DBF4)
E2F transcription factor 2(E2F2)
E2F transcription factor 3(E2F3)
MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)(MAD2L1)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
RB transcriptional corepressor like 1(RBL1)
S-phase kinase associated protein 2(SKP2)
SMAD family member 3(SMAD3)
TTK protein kinase(TTK)
cell division cycle 14B(CDC14B)
cell division cycle 20(CDC20)
cell division cycle 25C(CDC25C)
cell division cycle 45(CDC45)
cell division cycle 6(CDC6)
cell division cycle 7(CDC7)
checkpoint kinase 1(CHEK1)
cyclin A2(CCNA2)
cyclin B1(CCNB1)
cyclin B2(CCNB2)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin E2(CCNE2)
cyclin dependent kinase 1(CDK1)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)

cyclin dependent kinase inhibitor 2A(CDKN2A)
extra spindle pole bodies like 1, separase(ESPL1)
minichromosome maintenance complex component 2(MCM2)
minichromosome maintenance complex component 3(MCM3)
minichromosome maintenance complex component 4(MCM4)
minichromosome maintenance complex component 5(MCM5)
minichromosome maintenance complex component 6(MCM6)
minichromosome maintenance complex component 7(MCM7)
origin recognition complex subunit 1(ORC1)
pituitary tumor-transforming 1(PTTG1)
proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
structural maintenance of chromosomes 1A(SMC1A)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
tumor protein p53(TP53)

[0275]

[表36]

表36. 「Pathways in cancer」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
BCR, RhoGEF and GTPase activating protein(BCR)
BRCA2, DNA repair associated(BRCA2)
CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B(CKS1B)
Cbl proto-oncogene(CBL)
E2F transcription factor 2(E2F2)
E2F transcription factor 3(E2F3)
Fas cell surface death receptor(FAS)
G protein subunit beta 4(GNB4)
G protein subunit gamma 12(GNG12)
GLI family zinc finger 2(GLI2)
GLI family zinc finger 3(GLI3)
KIT ligand(KITLG)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
MDS1 and EVI1 complex locus(MECOM)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
NK3 homeobox 1(NKX3-1)
RAD51 recombinase(RAD51)
S-phase kinase associated protein 2(SKP2)
SMAD family member 3(SMAD3)
TNF receptor associated factor 5(TRAF5)
Wnt family member 5A(WNT5A)
adenylate cyclase 3(ADCY3)
adenylate cyclase 7(ADCY7)
androgen receptor(AR)
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator(ARNT)

baculoviral IAP repeat containing 5(BIRC5)
bone morphogenetic protein 2(BMP2)
cadherin 1(CDH1)
caspase 8(CASP8)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 2 chain(COL4A2)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
cyclin D1(CCND1)
cyclin E2(CCNE2)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 2A(CDKN2A)
death associated protein kinase 1(DAPK1)
endothelin receptor type A(EDNRA)
endothelin receptor type B(EDNRB)
fibroblast growth factor 13(FGF13)
fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)
fibronectin 1(FN1)
frizzled class receptor 2(FZD2)
frizzled class receptor 4(FZD4)
frizzled class receptor 7(FZD7)
heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit beta 1(LAMB1)
lysophosphatidic acid receptor 3(LPAR3)

melanogenesis associated transcription factor(MITF)
mutS homolog 6(MSH6)
phospholipase C beta 1(PLCB1)
platelet derived growth factor receptor alpha(PDGFR α)
prostaglandin E receptor 3(PTGER3)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
retinoic acid receptor beta(RARB)
sonic hedgehog(SHH)
transcription factor 7 like 1(TCF7L1)
transcription factor 7 like 2(TCF7L2)
transforming growth factor alpha(TGFA)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
translocated promoter region, nuclear basket protein(TPR)
tumor protein p53(TP53)
vascular endothelial growth factor C(VEGFC)

[0276]

[表37]

表 3 7. 「Mismatch repair」に関する発現低下遺伝子（E P細胞）

遺伝子名(略称)
DNA ligase 1(LIG1)
DNA polymerase delta 1, catalytic subunit(POLD1)
DNA polymerase delta 3, accessory subunit(POLD3)
exonuclease 1(EXO1)
mutS homolog 6(MSH6)
proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
replication factor C subunit 2(RFC2)
replication factor C subunit 3(RFC3)
replication factor C subunit 4(RFC4)
replication factor C subunit 5(RFC5)
replication protein A1(RPA1)
replication protein A3(RPA3)

[0277]

[表38]

表38. 「PI3K-Akt signaling pathway」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2 family apoptosis regulator(MCL1)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
BRCA1, DNA repair associated(BRCA1)
G protein subunit beta 4(GNB4)
G protein subunit gamma 12(GNG12)
Janus kinase 2(JAK2)
KIT ligand(KITLG)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
MYB proto-oncogene, transcription factor(MYB)
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1(PHLPP1)
Ras homolog enriched in brain(RHEB)
chorionic somatomammotropin hormone 1(CSH1)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type II alpha 1 chain(COL2A1)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 2 chain(COL4A2)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
collagen type VI alpha 1 chain(COL6A1)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin E2(CCNE2)

cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
ephrin A2(EFNA2)
ephrin A5(EFNA5)
fibroblast growth factor 13(FGF13)
fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)
fibronectin 1(FN1)
forkhead box O3(FOXO3)
growth hormone receptor(GHR)
heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
insulin receptor substrate 1(IRS1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
interleukin 4 receptor(IL4R)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit beta 1(LAMB1)
lysophosphatidic acid receptor 3(LPAR3)
oncostatin M receptor(OSMR)
platelet derived growth factor C(PDGFC)
platelet derived growth factor receptor alpha(PDGFR)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B'epsilon(PPP2R5E)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
reelin(RELN)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
serum/glucocorticoid regulated kinase 1(SGK1)
spleen associated tyrosine kinase(SYK)

tenascin C(TNC)
thioesterase superfamily member 4(THEM4)
tumor protein p53(TP53)
vascular endothelial growth factor C(VEGFC)

[0278] [表39]

表39. 「p53 signaling pathway」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
Fas cell surface death receptor(FAS)
G2 and S-phase expressed 1(GTSE1)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
STEAP3 metalloreductase(STEAP3)
caspase 8(CASP8)
checkpoint kinase 1(CHEK1)
cyclin B1(CCNB1)
cyclin B2(CCNB2)
cyclin D1(CCND1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin E2(CCNE2)
cyclin dependent kinase 1(CDK1)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 2A(CDKN2A)
damage specific DNA binding protein 2(DDB2)
insulin like growth factor binding protein 3(IGFBP3)
ribonucleotide reductase regulatory subunit M2(RRM2)
tumor protein p53(TP53)
zinc finger matrin-type 3(ZMAT3)

[0279]

[表40]

表 4 0. 「Fanconi anemia pathway」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1(BRIP1)
BRCA1, DNA repair associated(BRCA1)
BRCA2, DNA repair associated(BRCA2)
Bloom syndrome RecQ like helicase(BLM)
Fanconi anemia complementation group A(FANCA)
Fanconi anemia complementation group B(FANCB)
Fanconi anemia complementation group D2(FANCD2)
Fanconi anemia complementation group G(FANCG)
Fanconi anemia complementation group I(FANCI)
Fanconi anemia complementation group M(FANCM)
RAD51 recombinase(RAD51)
RecQ mediated genome instability 2(RMI2)
essential meiotic structure-specific endonuclease 1(EME1)
hes family bHLH transcription factor 1(HES1)
replication protein A1(RPA1)
replication protein A3(RPA3)
ubiquitin specific peptidase 1(USP1)

[0280]

[表41]

表 4 1. 「Homologous recombination」に関する発現低下遺伝子（E P細胞）

遺伝子名(略称)
BRCA2, DNA repair associated(BRCA2)
Bloom syndrome RecQ like helicase(BLM)
DNA polymerase delta 1, catalytic subunit(POLD1)
DNA polymerase delta 3, accessory subunit(POLD3)
RAD51 paralog B(RAD51B)
RAD51 recombinase(RAD51)
RAD54 homolog B (S. cerevisiae)(RAD54B)
RAD54-like (S. cerevisiae)(RAD54L)
essential meiotic structure-specific endonuclease 1(EME1)
nibrin(NBN)
replication protein A1(RPA1)
replication protein A3(RPA3)

[0281]

[表42]

表 4 2. 「ECM-receptor interaction」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
CD47 molecule(CD47)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type II alpha 1 chain(COL2A1)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 2 chain(COL4A2)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
collagen type VI alpha 1 chain(COL6A1)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
fibronectin 1(FN1)
hyaluronan mediated motility receptor(HMMR)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit beta 1(LAMB1)
reelin(RELN)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
syndecan 1(SDC1)
tenascin C(TNC)

[0282]

[表43]

表 4 3. 「Small cell lung cancer」に関する発現低下遺伝子 (E P細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B(CKS1B)
E2F transcription factor 2(E2F2)
E2F transcription factor 3(E2F3)
S-phase kinase associated protein 2(SKP2)
TNF receptor associated factor 5(TRAF5)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 2 chain(COL4A2)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
cyclin D1(CCND1)
cyclin E2(CCNE2)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
fibronectin 1(FN1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit beta 1(LAMB1)
retinoic acid receptor beta(RARB)
tumor protein p53(TP53)

[0283]

[表44]

表 4 4. 「Dopaminergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
AKT serine/threonine kinase 2(AKT2)
AKT serine/threonine kinase 3(AKT3)
G protein subunit alpha L(GNAL)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
calcyon neuron specific vesicular protein(CALY)
dopa decarboxylase(DDC)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1(GRIA1)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
kinesin family member 5A(KIF5A)
kinesin family member 5C(KIF5C)
mitogen-activated protein kinase 12(MAPK12)
mitogen-activated protein kinase 13(MAPK13)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)

potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)
protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1B(PPP1R1B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B"beta(PPP2R3B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B'beta(PPP2R5B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bbeta(PPP2R2B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta(PPP2R2D)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0284]

[表45]

表45. 「Insulin secretion」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
ATP binding cassette subfamily C member 8(ABCC8)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2(ATP1B2)
FXYD domain containing ion transport regulator 2(FXYD2)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
adenylate cyclase activating polypeptide 1(ADCYAP1)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
free fatty acid receptor 1(FFAR1)
gastric inhibitory polypeptide(GIP)
glucagon(GCG)
glucokinase(GCK)
insulin(INS)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
piccolo presynaptic cytomatrix protein(PCLO)
potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1(KCNMA1)
potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 2(KCNMB2)
potassium calcium-activated channel subfamily N member 3(KCNN3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 11(KCNJ11)
protein kinase C beta(PRKCB)
regulating synaptic membrane exocytosis 2(RIMS2)
solute carrier family 2 member 1(SLC2A1)
synaptosome associated protein 25(SNAP25)
syntaxin 1A(STX1A)
vesicle associated membrane protein 2(VAMP2)

[表46]

表 4 6. 「Synaptic vesicle cycle」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
ATPase H+ transporting V0 subunit a1(ATP6V0A1)
ATPase H+ transporting V0 subunit e2(ATP6V0E2)
ATPase H+ transporting V1 subunit B2(ATP6V1B2)
ATPase H+ transporting V1 subunit G2(ATP6V1G2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
clathrin heavy chain like 1(CLTCL1)
complexin 1(CPLX1)
complexin 2(CPLX2)
dynamin 1(DNM1)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
synaptosome associated protein 25(SNAP25)
synaptotagmin 1(SYT1)
syntaxin 1A(STX1A)
syntaxin 2(STX2)
syntaxin binding protein 1(STXBP1)
unc-13 homolog A(UNC13A)
unc-13 homolog B(UNC13B)
vesicle associated membrane protein 2(VAMP2)

[0286]

[表47]

表 4 7. 「GABAergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
GABA type A receptor associated protein like 1(GABARAPL1)
GABA type A receptor associated protein like 2(GABARAPL2)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
glutamate decarboxylase 1(GAD1)
glutamate decarboxylase 2(GAD2)
glutaminase 2(GLS2)
phospholipase C like 1(PLCL1)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)

[0287]

[表48]

表48. 「Glutamatergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
G protein-coupled receptor kinase 3(GRK3)
GNAS complex locus(GNAS)
SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3(SHANK3)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1(GRIA1)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3(GRIK3)
glutaminase 2(GLS2)
phospholipase A2 group IVC(PLA2G4C)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
protein kinase C beta(PRKCB)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)
solute carrier family 38 member 3(SLC38A3)

[表49]

表 4 9. 「Retrograde endocannabinoid signaling」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1(GRIA1)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
mitogen-activated protein kinase 12(MAPK12)
mitogen-activated protein kinase 13(MAPK13)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)
solute carrier family 17 member 6(SLC17A6)
solute carrier family 17 member 8(SLC17A8)

[表50]

表50. 「Circadian entrainment」に関する発現向上遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H(CACNA1H)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1(GRIA1)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2(GRIA2)
glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4(GRIA4)
period circadian clock 3(PER3)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)
ras related dexamethasone induced 1(RASD1)
ryanodine receptor 1(RYR1)

[0290]

[表51]

表 5 1. 「Alcoholism」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
GNAS complex locus(GNAS)
SHC adaptor protein 2(SHC2)
dopa decarboxylase(DDC)
histone cluster 1 H2A family member c(HIST1H2AC)
histone cluster 1 H2A family member e(HIST1H2AE)
histone cluster 1 H2A family member i(HIST1H2AI)
histone cluster 1 H2A family member k(HIST1H2AK)
histone cluster 1 H2B family member c(HIST1H2BC)
histone cluster 1 H2B family member d(HIST1H2BD)
histone cluster 1 H2B family member e(HIST1H2BE)
histone cluster 1 H2B family member g(HIST1H2BG)
histone cluster 1 H2B family member h(HIST1H2BH)
histone cluster 1 H2B family member j(HIST1H2BJ)
histone cluster 1 H2B family member k(HIST1H2BK)
histone cluster 1 H3 family member a(HIST1H3A)
histone cluster 2 H2A family member a4(HIST2H2AA4)
histone cluster 2 H2B family member e(HIST2H2BE)
histone cluster 3 H2A(HIST3H2A)
histone cluster 4 H4(HIST4H4)
histone deacetylase 11(HDAC11)

histone deacetylase 5(HDAC5)
prodynorphin(PDYN)
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha(PKIA)
protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1B(PPP1R1B)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
tyrosine hydroxylase(TH)

[0291]

[表52]

表 5 2. 「Serotonergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
GNAS complex locus(GNAS)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2(CYP2J2)
cytochrome P450 family 4 subfamily X member 1(CYP4X1)
dopa decarboxylase(DDC)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
phospholipase A2 group IVC(PLA2G4C)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)
solute carrier family 18 member A1(SLC18A1)
solute carrier family 18 member A2(SLC18A2)
solute carrier family 6 member 4(SLC6A4)
tryptophan hydroxylase 1(TPH1)

[表53]

表 5 3. 「Cholinergic synapse」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
AKT serine/threonine kinase 2(AKT2)
AKT serine/threonine kinase 3(AKT3)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit(CHRNB2)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta(PIK3CD)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2(KCNQ2)
protein kinase C beta(PRKCB)

[0293]

[表54]

表 5 4. 「Morphine addiction」に関する発現向上遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
G protein subunit alpha o1(GNAO1)
G protein subunit beta 5(GNB5)
G protein subunit gamma 13(GNG13)
G protein subunit gamma 2(GNG2)
G protein subunit gamma 3(GNG3)
G protein subunit gamma 4(GNG4)
G protein subunit gamma 7(GNG7)
G protein-coupled receptor kinase 3(GRK3)
G protein-coupled receptor kinase 4(GRK4)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B(CACNA1B)
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit(GABRB3)
gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2(GABBR2)
phosphodiesterase 2A(PDE2A)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 3(KCNJ3)
potassium voltage-gated channel subfamily J member 6(KCNJ6)
protein kinase C beta(PRKCB)

[0294]

[表55]

表 55. 「Adrenergic signaling in cardiomyocytes」に関する発現向上遺伝子（i P S - β 細胞）

遺伝子名(略称)
AKT serine/threonine kinase 2(AKT2)
AKT serine/threonine kinase 3(AKT3)
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2(ATP1B2)
FXRD domain containing ion transport regulator 2(FXRD2)
GNAS complex locus(GNAS)
adenylate cyclase 1(ADCY1)
adenylate cyclase 2(ADCY2)
adrenoceptor beta 1(ADRB1)
cAMP responsive element modulator(CREM)
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 2(CACNA2D2)
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3(CACNA2D3)
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2(CACNB2)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D(CACNA1D)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta(CAMK2B)
mitogen-activated protein kinase 12(MAPK12)
mitogen-activated protein kinase 13(MAPK13)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta(PIK3CD)
phospholipase C beta 4(PLCB4)
protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1A(PPP1R1A)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B"beta(PPP2R3B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B'beta(PPP2R5B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bbeta(PPP2R2B)
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta(PPP2R2D)
sodium voltage-gated channel alpha subunit 7(SCN7A)
sodium voltage-gated channel beta subunit 1(SCN1B)

troponin I3, cardiac type(TNNI3)

[0295] [表56]

表56. 「Maturity onset diabetes of the young」に関する発現向上遺伝子（iPS-β細胞）

遺伝子名(略称)
NK2 homeobox 2(NKX2-2)
NK6 homeobox 1(NKX6-1)
forkhead box A2(FOXA2)
glucokinase(GCK)
insulin(INS)
motor neuron and pancreas homeobox 1(MNX1)
neurogenin 3(NEUROG3)
neuronal differentiation 1(NEUROD1)
paired box 4(PAX4)
paired box 6(PAX6)

[0296]

[表57]

表 5 7. 「Cell cycle」に関する発現低下遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B(BUB1B)
BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase(BUB1)
DBF4 zinc finger(DBF4)
E2F transcription factor 5(E2F5)
MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)(MAD2L1)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
RB transcriptional corepressor like 1(RBL1)
S-phase kinase associated protein 2(SKP2)
SMAD family member 3(SMAD3)
SMAD family member 4(SMAD4)
TTK protein kinase(TTK)
cell division cycle 14B(CDC14B)
cell division cycle 20(CDC20)
cell division cycle 25A(CDC25A)
cell division cycle 25C(CDC25C)
cell division cycle 45(CDC45)
cell division cycle 6(CDC6)
cell division cycle 7(CDC7)
checkpoint kinase 1(CHEK1)
cyclin A2(CCNA2)
cyclin B1(CCNB1)
cyclin B2(CCNB2)
cyclin D2(CCND2)
cyclin dependent kinase 1(CDK1)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 2B(CDKN2B)

minichromosome maintenance complex component 2(MCM2)
minichromosome maintenance complex component 3(MCM3)
minichromosome maintenance complex component 4(MCM4)
minichromosome maintenance complex component 5(MCM5)
minichromosome maintenance complex component 6(MCM6)
minichromosome maintenance complex component 7(MCM7)
origin recognition complex subunit 1(ORC1)
proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide(PRKDC)
stratifin(SFN)
structural maintenance of chromosomes 1A(SMC1A)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
tumor protein p53(TP53)
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog(MYC)

[0297]

[表58]

表58. 「ECM-receptor interaction」に関する発現低下遺伝子 (iPS- β 細胞)

遺伝子名(略称)
CD44 molecule (Indian blood group)(CD44)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type II alpha 1 chain(COL2A1)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type V alpha 1 chain(COL5A1)
collagen type VI alpha 1 chain(COL6A1)
collagen type VI alpha 3 chain(COL6A3)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
fibronectin 1(FN1)
hyaluronan mediated motility receptor(HMMR)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 4(ITGA4)
integrin subunit alpha 6(ITGA6)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)
integrin subunit alpha 9(ITGA9)
integrin subunit beta 4(ITGB4)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit alpha 4(LAMA4)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)

secreted phosphoprotein 1(SPP1)
syndecan 1(SDC1)
tenascin C(TNC)
thrombospondin 1(THBS1)

[0298]

[表59]

表59. 「PI3K-Akt signaling pathway」に関する発現低下遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2 family apoptosis regulator(MCL1)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
BRCA1, DNA repair associated(BRCA1)
EPH receptor A2(EPHA2)
G protein subunit beta 4(GNB4)
G protein subunit gamma 11(GNG11)
G protein subunit gamma 12(GNG12)
Janus kinase 2(JAK2)
KIT ligand(KITLG)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
Ras homolog enriched in brain(RHEB)
SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1(SOS1)
angiopoietin 1(ANGPT1)
cAMP responsive element binding protein 3 like 3(CREB3L3)
coagulation factor II thrombin receptor(F2R)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type II alpha 1 chain(COL2A1)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type V alpha 1 chain(COL5A1)
collagen type VI alpha 1 chain(COL6A1)
collagen type VI alpha 3 chain(COL6A3)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)

collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
cyclin D2(CCND2)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
ephrin A2(EFNA2)
ephrin A5(EFNA5)
epidermal growth factor receptor(EGFR)
epidermal growth factor(EGF)
eukaryotic translation initiation factor 4B(EIF4B)
fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor 20(FGF20)
fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)
fibronectin 1(FN1)
fms related tyrosine kinase 1(FLT1)
growth hormone receptor(GHR)
heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
hepatocyte growth factor(HGF)
insulin receptor substrate 1(IRS1)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 4(ITGA4)
integrin subunit alpha 6(ITGA6)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)
integrin subunit alpha 9(ITGA9)
integrin subunit beta 4(ITGB4)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
interleukin 2 receptor subunit gamma(IL2RG)
kinase insert domain receptor(KDR)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)

laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit alpha 4(LAMA4)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)
lysophosphatidic acid receptor 3(LPAR3)
lysophosphatidic acid receptor 6(LPAR6)
oncostatin M receptor(OSMR)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta(PIK3CB)
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1)
platelet derived growth factor C(PDGFC)
platelet derived growth factor receptor alpha(PDGFR)
protein kinase N2(PKN2)
protein phosphatase 2 regulatory subunit B"alpha(PPP2R3A)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
serum/glucocorticoid regulated kinase 1(SGK1)
spleen associated tyrosine kinase(SYK)
tenascin C(TNC)
thrombospondin 1(THBS1)
toll like receptor 4(TLR4)
tumor protein p53(TP53)
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog(MYC)

[0299]

[表60]

表60. 「Proteoglycans in cancer」に関する発現低下遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
CD44 molecule (Indian blood group)(CD44)
Cbl proto-oncogene B(CBLB)
Cbl proto-oncogene(CBL)
Fas cell surface death receptor(FAS)
GRB2 associated binding protein 1(GAB1)
IQ motif containing GTPase activating protein 1(IQGAP1)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1(SOS1)
T-cell lymphoma invasion and metastasis 1(TIAM1)
TIMP metalloproteinase inhibitor 3(TIMPI3)
Wnt family member 5A(WNT5A)
ankyrin 3(ANK3)
calcium/calmodulin dependent protein kinase II delta(CAMK2D)
caveolin 1(CAV1)
caveolin 2(CAV2)
decorin(DCN)
epidermal growth factor receptor(EGFR)
eukaryotic translation initiation factor 4B(EIF4B)
ezrin(EZR)
fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibronectin 1(FN1)
frizzled class receptor 2(FZD2)
frizzled class receptor 4(FZD4)
frizzled class receptor 5(FZD5)
frizzled class receptor 7(FZD7)

glypican 3(GPC3)
hepatocyte growth factor(HGF)
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2(ITPR2)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
kinase insert domain receptor(KDR)
lumican(LUM)
matrix metalloproteinase 2(MMP2)
matrix metalloproteinase 9(MMP9)
microRNA 10a(MIR10A)
microRNA 21(MIR21)
patched 1(PTCH1)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta(PIK3CB)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1)
plasminogen activator, urokinase(PLAU)
protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta(PRKACB)
radixin(RDX)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
syndecan 1(SDC1)
thrombospondin 1(THBS1)
toll like receptor 4(TLR4)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
tumor protein p53(TP53)
twist family bHLH transcription factor 1(TWIST1)
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog(MYC)

[0300]

[表61]

表 6 1. 「Pathways in cancer」に関する発現低下遺伝子 (i P S - β 細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
BRCA2, DNA repair associated(BRCA2)
C-X-C motif chemokine ligand 12(CXCL12)
C-X-C motif chemokine ligand 8(CXCL8)
CCAAT/enhancer binding protein alpha(CEBPA)
CRK like proto-oncogene, adaptor protein(CRKL)
Cbl proto-oncogene B(CBLB)
Cbl proto-oncogene(CBL)
Fas cell surface death receptor(FAS)
G protein subunit beta 4(GNB4)
G protein subunit gamma 11(GNG11)
G protein subunit gamma 12(GNG12)
GLI family zinc finger 2(GLI2)
GLI family zinc finger 3(GLI3)
KIT ligand(KITLG)
KRAS proto-oncogene, GTPase(KRAS)
MDM2 proto-oncogene(MDM2)
MDS1 and EVI1 complex locus(MECOM)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
RAD51 recombinase(RAD51)
RAS like proto-oncogene B(RALB)
S-phase kinase associated protein 2(SKP2)
SMAD family member 3(SMAD3)
SMAD family member 4(SMAD4)
SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1(SOS1)
TRK-fused gene(TFG)
Wnt family member 5A(WNT5A)

adenylate cyclase 3(ADCY3)
adenylate cyclase 7(ADCY7)
angiotensin II receptor type 1(AGTR1)
baculoviral IAP repeat containing 3(BIRC3)
baculoviral IAP repeat containing 5(BIRC5)
cadherin 1(CDH1)
caspase 8(CASP8)
catenin alpha 1(CTNNA1)
coagulation factor II thrombin receptor(F2R)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
cullin 2(CUL2)
cyclin dependent kinase 2(CDK2)
cyclin dependent kinase 6(CDK6)
cyclin dependent kinase inhibitor 2B(CDKN2B)
endothelin receptor type A(EDNRA)
endothelin receptor type B(EDNRB)
epidermal growth factor receptor(EGFR)
epidermal growth factor(EGF)
fibroblast growth factor 2(FGF2)
fibroblast growth factor 20(FGF20)
fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)
fibronectin 1(FN1)
frizzled class receptor 2(FZD2)
frizzled class receptor 4(FZD4)
frizzled class receptor 5(FZD5)
frizzled class receptor 7(FZD7)
heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
hedgehog interacting protein(HHIP)

hepatocyte growth factor(HGF)
integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 6(ITGA6)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit alpha 4(LAMA4)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)
lymphoid enhancer binding factor 1(LEF1)
lysophosphatidic acid receptor 3(LPAR3)
lysophosphatidic acid receptor 6(LPAR6)
matrix metalloproteinase 1(MMP1)
matrix metalloproteinase 2(MMP2)
matrix metalloproteinase 9(MMP9)
patched 1(PTCH1)
peroxisome proliferator activated receptor gamma(PPARG)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta(PIK3CB)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1)
platelet derived growth factor receptor alpha(PDGFR)
prostaglandin E receptor 3(PTGER3)
protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta(PRKACB)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
retinoic acid receptor beta(RARB)
sonic hedgehog(SHH)
transcription factor 7 like 2(TCF7L2)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
translocated promoter region, nuclear basket protein(TPR)
tumor protein p53(TP53)
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog(MYC)

[0301]

[表62]

表62. 「Focal adhesion」に関する発現低下遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
BCL2, apoptosis regulator(BCL2)
CRK like proto-oncogene, adaptor protein(CRKL)
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase(MET)
Rho GTPase activating protein 35(ARHGAP35)
SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1(SOS1)
actinin alpha 1(ACTN1)
baculoviral IAP repeat containing 3(BIRC3)
caveolin 1(CAV1)
caveolin 2(CAV2)
collagen type I alpha 1 chain(COL1A1)
collagen type I alpha 2 chain(COL1A2)
collagen type II alpha 1 chain(COL2A1)
collagen type III alpha 1 chain(COL3A1)
collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
collagen type V alpha 1 chain(COL5A1)
collagen type VI alpha 1 chain(COL6A1)
collagen type VI alpha 3 chain(COL6A3)
collagen type VI alpha 6 chain(COL6A6)
collagen type XI alpha 1 chain(COL11A1)
cyclin D2(CCND2)
epidermal growth factor receptor(EGFR)
epidermal growth factor(EGF)
fibronectin 1(FN1)
fms related tyrosine kinase 1(FLT1)
hepatocyte growth factor(HGF)
integrin subunit alpha 1(ITGA1)

integrin subunit alpha 2(ITGA2)
integrin subunit alpha 4(ITGA4)
integrin subunit alpha 6(ITGA6)
integrin subunit alpha 8(ITGA8)
integrin subunit alpha 9(ITGA9)
integrin subunit beta 4(ITGB4)
integrin subunit beta 5(ITGB5)
kinase insert domain receptor(KDR)
laminin subunit alpha 1(LAMA1)
laminin subunit alpha 3(LAMA3)
laminin subunit alpha 4(LAMA4)
laminin subunit gamma 1(LAMC1)
laminin subunit gamma 2(LAMC2)
myosin light chain 12A(MYL12A)
myosin light chain kinase(MYLK)
parvin alpha(PARVA)
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta(PIK3CB)
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1(PIK3R1)
platelet derived growth factor C(PDGFC)
platelet derived growth factor receptor alpha(PDGFR α)
ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)(RAC1)
secreted phosphoprotein 1(SPP1)
tenascin C(TNC)
thrombospondin 1(THBS1)
vav guanine nucleotide exchange factor 3(VAV3)

[0302]

[表63]

表63. 「DNA replication」に関する発現低下遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
DNA polymerase alpha 1, catalytic subunit(POLA1)
DNA polymerase epsilon 2, accessory subunit(POLE2)
DNA polymerase epsilon 4, accessory subunit(POLE4)
flap structure-specific endonuclease 1(FEN1)
minichromosome maintenance complex component 2(MCM2)
minichromosome maintenance complex component 3(MCM3)
minichromosome maintenance complex component 4(MCM4)
minichromosome maintenance complex component 5(MCM5)
minichromosome maintenance complex component 6(MCM6)
minichromosome maintenance complex component 7(MCM7)
primase (DNA) subunit 1(PRIM1)
primase (DNA) subunit 2(PRIM2)
proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
replication factor C subunit 2(RFC2)
replication factor C subunit 3(RFC3)
ribonuclease H2 subunit B(RNASEH2B)

[0303]

[表64]

表64. 「TGF-beta signaling pathway」に関する発現低下遺伝子 (iPS-β細胞)

遺伝子名(略称)
BMP and activin membrane bound inhibitor(BAMBI)
E2F transcription factor 5(E2F5)
RB transcriptional corepressor like 1(RBL1)
SMAD family member 3(SMAD3)
SMAD family member 4(SMAD4)
SMAD family member 6(SMAD6)
SMAD family member 7(SMAD7)
SMAD family member 9(SMAD9)
TGFB induced factor homeobox 1(TGIF1)
bone morphogenetic protein 5(BMP5)
bone morphogenetic protein receptor type 1A(BMPR1A)
bone morphogenetic protein receptor type 1B(BMPR1B)
cyclin dependent kinase inhibitor 2B(CDKN2B)
decorin(DCN)
follistatin(FST)
inhibitor of DNA binding 1, HLH protein(ID1)
inhibitor of DNA binding 2, HLH protein(ID2)
inhibitor of DNA binding 3, HLH protein(ID3)
inhibitor of DNA binding 4, HLH protein(ID4)
latent transforming growth factor beta binding protein 1(LTBP1)
left-right determination factor 1(LEFTY1)
noggin(NOG)
paired like homeodomain 2(PITX2)
thrombospondin 1(THBS1)
transforming growth factor beta 2(TGFB2)
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog(MYC)

[表65]

PP	実施例1で発現向上した遺伝子		実施例1で発現低下した遺伝子
	GNAS	GCK	CD44
参考例1	0.585	0.00023	0.00777
比較例1	0.752	0.00624	0.00130
実施例1	1.107	0.00822	0.00057

[0305] [表66]

EP	実施例1で発現低下した遺伝子
	LIG1
参考例1	0.00577
比較例1	0.00331
実施例1	0.00240

[0306] [表67]

INS	実施例1で発現向上した遺伝子			実施例1で発現低下した遺伝子
	ADCY1	ADCY2	PLCB4	SMAD9
参考例1	0.0043	0.0047	0.00253	0.000719
比較例1	0.0170	0.0130	0.00928	0.000952
実施例1	0.0486	0.0214	0.01646	0.000548

[0307] <マウスへの移植実験：血中c-Peptide濃度の分析>

実施例1及び実施例2で得られたiPS-β細胞を、HBSSで一回リンスした後に、 $3.33\mu\text{g/mL}$ のiMatrix-511（Wako社）を含むHBSSに懸濁し、懸濁した細胞をハミルトンシリンジ（ハミルトン社）により糖尿病モデルマウス（日本クレア社）の左腎被膜下に移植した（ 6×10^6 個の細胞を投与）。糖尿病モデルNOD/SCIDマウス作成は正常NOD/SCIDマウスの尾静脈から 130mg/kg のstreptozotocin

i n (S T Z ; S i g m a 社) を投与する事により行った。移植後10週間後、12週間後及び14週間後のマウス血液サンプルを尾静脈から F i s h e r b r a n d へパリン処理ヘマトクリット管 (F i s h e r S c i e n t i f i c 社) に採取し、遠心分離(10分、4℃、800x g)により血清を分離した後、マウス血中におけるヒト c - P e p t i d e 濃度を M e r c o d i a U l t r a s e n s i t i v e C - p e p t i d e E L I S A k i t (M e r c o d i a 社) を用いて測定した。なお、比較のため、参考例1に記載の方法で調製した i P S - β 細胞 (4×10^6 個) を移植したマウスにおける移植後12週間後のマウス血中におけるヒト c - P e p t i d e 濃度を M e r c o d i a U l t r a s e n s i t i v e C - p e p t i d e E L I S A k i t (M e r c o d i a 社) を用いて測定した。

移植後のマウス血中におけるヒト c - P e p t i d e 濃度を図2に示す。

[0308] 参考例1の方法で製造した i P S - β 細胞を移植したマウス個体の血中では、移植後12週間後に100万個の移植細胞あたり平均3.5 pMの c - P e p t i d e が検出された。一方で、実施例1の方法で製造した i P S - β 細胞を移植したマウス個体の血中では、移植後10週間後に100万個の移植細胞あたり、平均48.6 pMの c - P e p t i d e が検出され、移植後12週間後には、100万個の移植細胞あたり、平均68.2 pMの c - P e p t i d e が検出された。また、実施例2の方法で製造した i P S - β 細胞を移植したマウス個体の血中では、移植後10週間後に100万個の移植細胞あたり、平均76.8 pMの c - P e p t i d e が検出され、移植後14週間後には、100万個の移植細胞あたり、平均108.2 pMの c - P e p t i d e が検出された。

c - P e p t i d e は、インスリンと1 : 1 のモル比で膵臓 β 細胞から分泌されるタンパク質であり、c - P e p t i d e の濃度によって、膵臓 β 細胞から分泌されるインスリン量を推測できる。すなわち、上記結果によれば、実施例1及び2の方法で製造した膵臓 β 細胞は、参考例1で製造した膵臓 β 細胞と比較して、極めて多量のインスリンを分泌しており、糖尿病等を対

象疾患とした細胞治療製剤として高い治療効果を有する膵臓 β 細胞であることが推測される。

したがって、本発明の方法によれば、膵臓 β 細胞への分化効率を向上させることが可能であり、また、本発明の方法により得られた、原始腸管細胞から分化誘導して得られた膵臓 β 細胞については、糖尿病等の治療において高い治療効果を期待できる。

[0309] <マウスへの移植実験：糖尿病モデル実験>

実施例2の方法で調製した原始腸管細胞から分化誘導して得られたiPS- β 細胞を移植したマウス個体（図3実施例2）では、移植後40日程度で血糖値が正常値（200mg/dL以下）まで低下した。また、移植後101日目に腎摘出（移植細胞をマウスから除去）したところ、血糖値が再上昇しており、移植したiPS- β 細胞が血糖値を制御していたことをわかる。これらの結果より、本発明の方法により得られた原始腸管細胞から分化誘導して得られた体細胞（膵臓 β 細胞）は、糖尿病の治療応用などにおいて、効果的であることが期待できる。

請求の範囲

- [請求項1] (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) を、プロテインキナーゼC (P K C) 活性化剤の存在下において培養することにより後前腸細胞 (P F G) を製造する工程：
- (b) 前記の後前腸細胞 (P F G) を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞 (P P) を製造する工程：
- (c) 前記の膵臓前駆細胞 (P P) を、N o t c hシグナル阻害剤及びR O C Kシグナル阻害剤の存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞 (E P) を製造する工程：及び
- (d) 前記の膵内分泌前駆細胞 (E P) をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養することにより膵臓β細胞を製造する工程：
- を含む、膵臓β細胞の製造方法。
- [請求項2] 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) を、プロテインキナーゼC (P K C) 活性化剤の存在下において培養する工程が、F G F 2の非存在下である、請求項1に記載の膵臓β細胞の製造方法。
- [請求項3] 膵臓前駆細胞 (P P) を、N o t c hシグナル阻害剤及びR O C Kシグナル阻害剤の存在下において培養する工程が、ニコチンアミドを含む培地において培養する工程である、請求項1又は2に記載の膵臓β細胞の製造方法。
- [請求項4] 膵内分泌前駆細胞 (E P) をインスリン受容体シグナル活性化剤、トランスフェリン及び亜セレン酸の存在下において培養する工程が、F G F 2の非存在下である、請求項1から3のいずれか一項に記載の膵臓β細胞の製造方法。
- [請求項5] 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞 (P G T) が、多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導できる条件下で培養する工程、およ

び前記内胚葉系細胞から原始腸管細胞（P G T）に分化誘導できる条件下で培養する工程により得られる細胞である、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

[請求項6] 多能性幹細胞を内胚葉系細胞に分化誘導する工程が、多能性幹細胞を、T G F β スーパーファミリーシグナル活性化剤を含む培地で培養した後、F G F 2 及びB M P 4 を添加していない培地で培養する工程である、請求項 5 に記載の方法。

[請求項7] 内胚葉系細胞を原始腸管細胞（P G T）に分化誘導する工程が、内胚葉系細胞を、骨形成タンパク質（B M P）シグナル阻害剤の非存在下において培養する工程である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

[請求項8] (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（P G T）を、プロテインキナーゼC（P K C）活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞（P F G）を製造する工程；及び
(b) 前記の後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養する工程；
を含む方法によって製造された膵臓前駆細胞（P P）と比較して、G N A S 遺伝子及び／又はG C K 遺伝子のいずれかの遺伝子発現が向上しているか、及び／又はC D 4 4 遺伝子の発現が減少している、膵臓前駆細胞（P P）。

[請求項9] (a) 多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（P G T）を、プロテインキナーゼC（P K C）活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞（P F G）を製造する工程；
(b) 前記の後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞（P P）を製造する工程；及び
(c) 前記の膵臓前駆細胞（P P）を、N o t c hシグナル阻害剤及びR O C Kシグナル阻害剤の非存在下において培養する工程；
を含む方法によって製造された膵内分泌前駆細胞（E P）と比較して

、L I G 1 遺伝子の発現が減少している膵内分泌前駆細胞（E P）。

[請求項10]

（a）多能性幹細胞から分化誘導された原始腸管細胞（P G T）を、プロテインキナーゼC（P K C）活性化剤の非存在下において培養することにより後前腸細胞（P F G）を製造する工程；

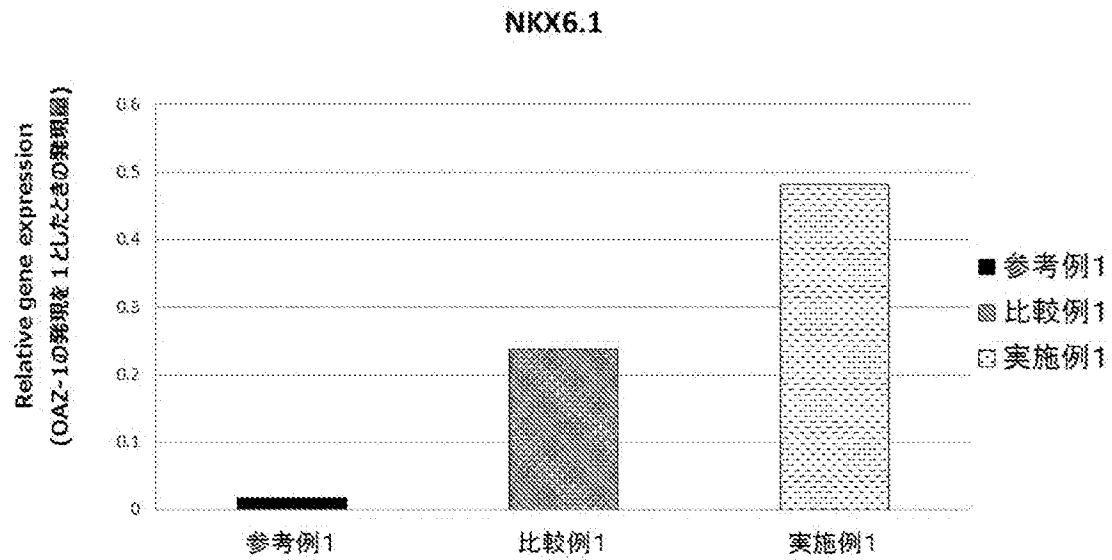
（b）前記の後前腸細胞（P F G）を、レチノイン酸又はそのアナログの存在下において培養することにより膵臓前駆細胞（P P）を製造する工程；

（c）前記の膵臓前駆細胞（P P）を、N o t c hシグナル阻害剤及びR O C Kシグナル阻害剤の非存在下において培養することにより膵内分泌前駆細胞（E P）を製造する工程；及び

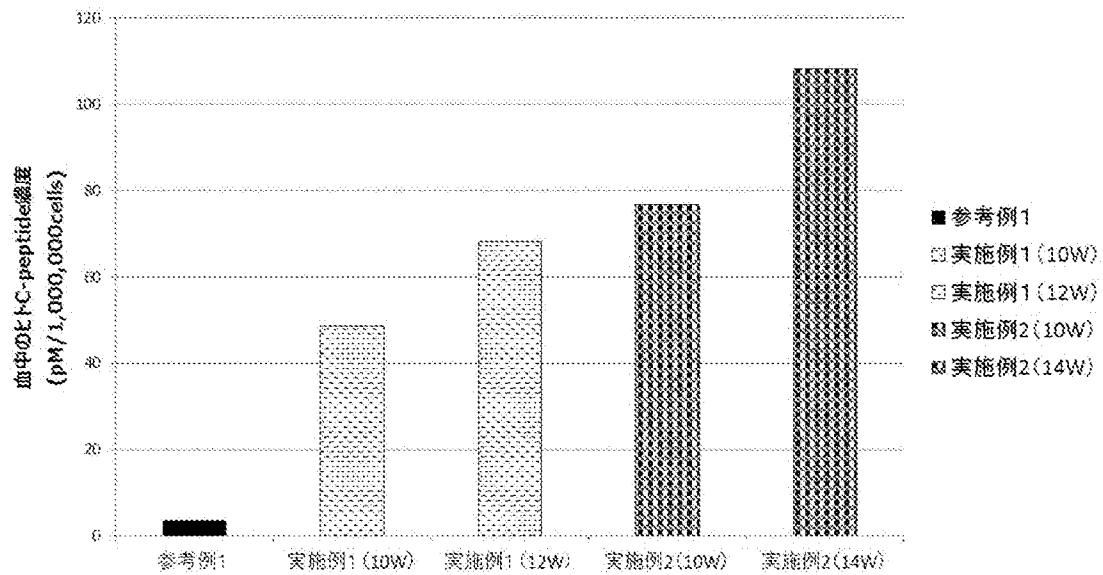
（d）前記の膵内分泌前駆細胞（E P）をインスリン受容体シグナル活性化剤及びトランスフェリンの存在下において培養する工程；

を含む方法によって製造された膵臓 β 細胞と比較して、A D C Y 1 遺伝子、A D C Y 2 遺伝子、P L C B 4 遺伝子からなる群より選択される少なくとも1以上の遺伝子の発現が向上しているか、及び／又はS M A D 9 遺伝子の発現が減少している、膵臓 β 細胞。

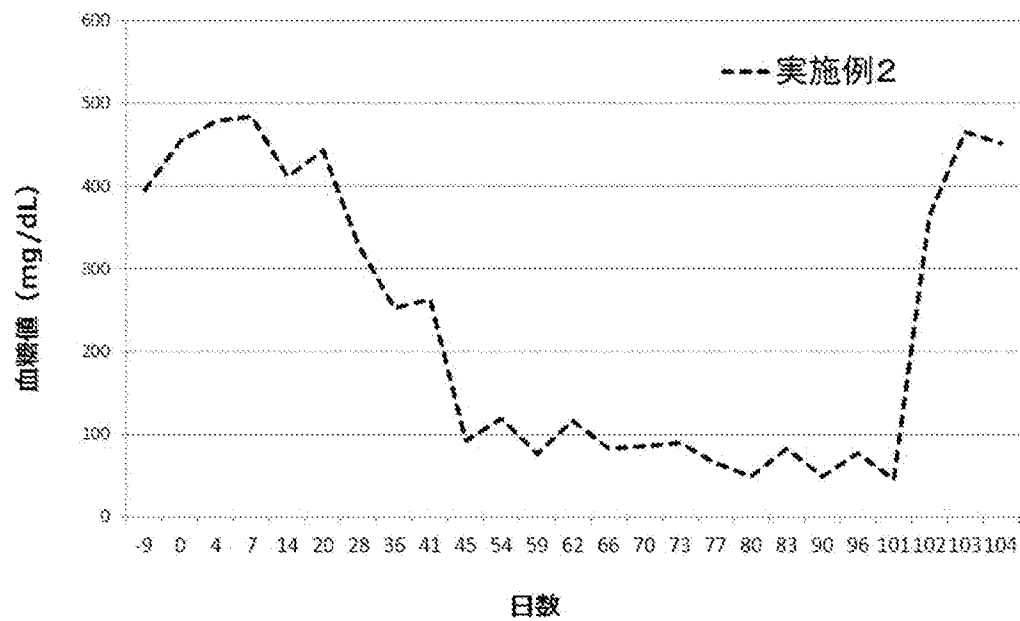
[図1]



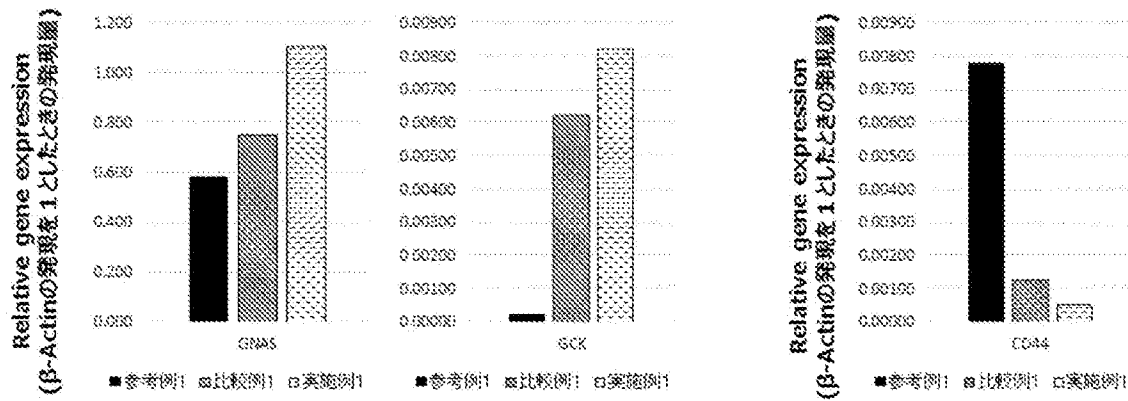
[図2]



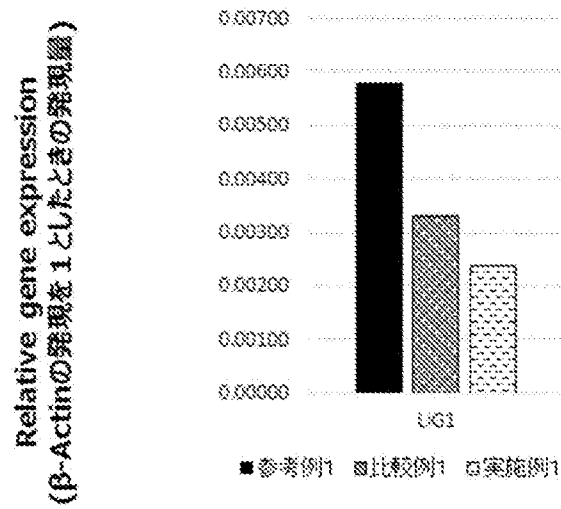
[図3]



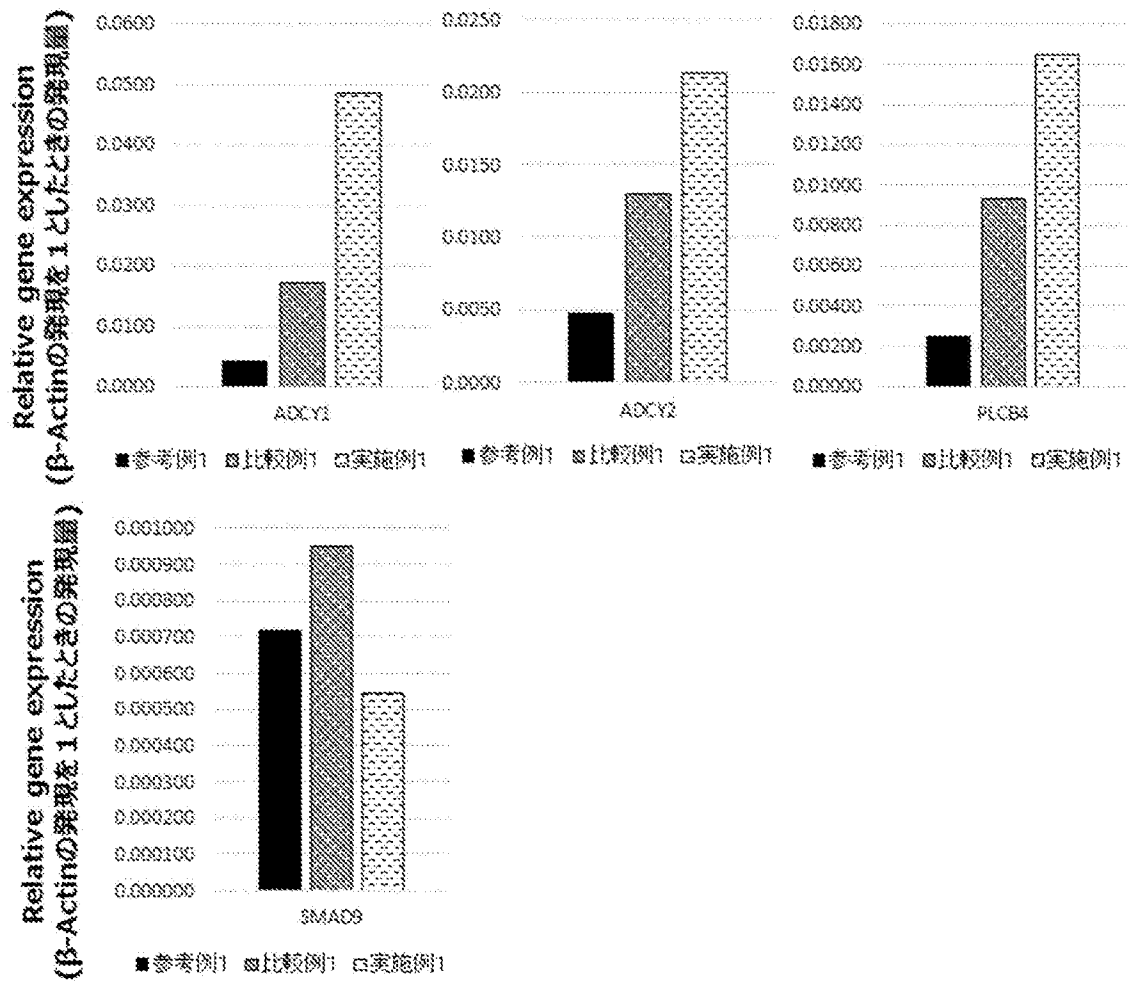
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/017978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/071 (2010.01) i, C12N15/09 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N5/071, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2017/222879 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 28 December 2017, claims, particularly, claims 27, 40, 82, 86, 87, 89, paragraph [0168], examples 3- 5, table XVIII & US 2017/0362572 A1 & EP 3472303 A1	1, 2, 4-10 1-10
X Y	LOO, L. S. W. et al., An arduous journey from human pluripotent stem cells to functional pancreatic beta cells., Diabetes Obes Metab, January 2018, vol. 20, issue 1, pp. 3-13, supplementary tables, fig. 2, supplementary table 1	8-10 1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18.07.2019

Date of mailing of the international search report
30.07.2019

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/017978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	REZANIA, A. et al., Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells., Nature Biotechnology, 2014, vol. 32, no. 11, pp. 1121-1133, Online Methods, fig. 1, 4, Online Methods, item of "In vitro differentiation of human pluripotent stem cells"	8-10 1-10
X A	JP 2009-528066 A (CYTHERA, INC.) 06 August 2009, claims, example 17, fig. 1, 22 & WO 2007/103282 A2, claims, example 17, fig. 1, 22	8-10 1-7
P, X	YABE, S. G. et al., Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture., Regenerative Therapy, 02 January 2019, 10, pp. 69-76	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2017/222879 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 2017.12.28, 特許請求の範囲、特に請求項27、40、82、86、87、89、[0168]、実施例3-5、表XVIII & US 2017/0362572 A1 & EP 3472303 A1	1, 2, 4-10 1-10
X Y	L00 Larry Sai Weng et al., An arduous journey from human pluripotent stem cells to functional pancreatic beta cells., Diabetes Obes Metab, 2018.01, Vol.20 Issue 1, p.3-13, Supplementary Tables, 図2、Supplementary Table 1	8-10 1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.07.2019

国際調査報告の発送日

30.07.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮岡 真衣

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4044

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	REZANIA A. et al., Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells., Nature Biotechnology, 2014, Vol.32, No.11, p.1121-1133, ONLINE METHODS, 図1、4、ONLINE METHODS "In vitro differentiation of human pluripotent stem cells"項	8-10 1-10
X A	JP 2009-528066 A (サイセラ, インコーポレイテッド) 2009.08.06, 特許請求の範囲、実施例17、図1、22 & WO 2007/103282 A2 Claims, Example 17, Figs. 1&22	8-10 1-7
P, X	YABE S. G. et al., Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture., Regenerative Therapy, 2019.01.02, 10, p.69-76	1-10