

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7191925号
(P7191925)

(45)発行日 令和4年12月19日(2022.12.19)

(24)登録日 令和4年12月9日(2022.12.9)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735

請求項の数 18 (全85頁)

(21)出願番号	特願2020-210764(P2020-210764)	(73)特許権者	509087759
(22)出願日	令和2年12月18日(2020.12.18)		ヤンセン バイオテック、インコーポレ
(62)分割の表示	特願2018-218327(P2018-218327)		ーテツド
原出願日	平成24年12月7日(2012.12.7)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州190
(65)公開番号	特開2021-52789(P2021-52789A)		44 ホーシャム・リツジビユードライブ
(43)公開日	令和3年4月8日(2021.4.8)	(74)代理人	800/850
審査請求日	令和3年1月13日(2021.1.13)		100092783
(31)優先権主張番号	61/579,351	(74)代理人	弁理士 小林 浩
(32)優先日	平成23年12月22日(2011.12.22)		100095360
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 片山 英二
			100093676
		(74)代理人	弁理士 小林 純子
			100120134
		(74)代理人	弁理士 大森 規雄
			100104282

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単一ホルモンのインスリン陽性細胞へのヒト胚性幹細胞の分化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

分化培地において、

ヒト膵臓内胚葉細胞の分化集団であって、前記細胞の10%超が、単一ホルモンのインスリン陽性細胞である、分化集団と

PDX-1およびNKX6.1を発現するヒト膵臓前腸前駆細胞の集団と

を含むインビトロ培養物であって、

前記分化培地は、膵臓前腸前駆細胞を、細胞の10%超が単一ホルモンのインスリン陽性細胞である膵臓内胚葉細胞の分化集団に分化し、

前記分化培地は、以下：

a) レチノイド、アスコルビン酸およびs h h阻害剤；b) レチノイド、アスコルビン酸およびSANT-1；c) レチノイド、アスコルビン酸、s h h阻害剤およびALK5阻害剤；d) レチノイド、アスコルビン酸、SANT-1およびALK5阻害剤；e) レチノイド、アスコルビン酸、s h h阻害剤、ALK5阻害剤およびBMP阻害剤；f) レチノイド、アスコルビン酸、SANT-1、ALK5阻害剤およびBMP阻害剤；

または

g) レチノイド、アスコルビン酸、s h h阻害剤、ALK5阻害剤およびLDN-193189

のうちの1つを含む、インビトロ培養物。

【請求項 2】

前記分化培地中のアスコルビン酸の存在が、アスコルビン酸を含まない分化培地と比較して、インスリン陽性細胞の数を増加させ、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の数を減少させる、請求項 1 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 3】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸および s h h 阻害剤を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 4】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸および S A N T - 1 を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 5】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸、s h h 阻害剤および A L K 5 阻害剤を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 6】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸、S A N T - 1 および A L K 5 阻害剤を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 7】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸、s h h 阻害剤、A L K 5 阻害剤および B M P 阻害剤を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 8】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸、S A N T - 1、A L K 5 阻害剤および B M P 阻害剤を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 9】

前記分化培地が、レチノイド、アスコルビン酸、s h h 阻害剤、A L K 5 阻害剤および L D N - 1 9 3 1 8 9を含む、請求項 1 または 2 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 10】

臍臓内胚葉細胞の前記分化集団の 30% 超が、P D X - 1⁺、N K X 6 . 1⁺、S O X 2⁻および C D X 2⁻である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のインビトロ培養物。

【請求項 11】

分化培地においてヒト臍臓前腸前駆細胞を含むインビトロ培養物であって、

前記分化培地は、以下：

- a) レチノイド、アスコルビン酸および s h h 阻害剤；
 - b) レチノイド、アスコルビン酸および S A N T - 1 ；
 - c) レチノイド、アスコルビン酸、s h h 阻害剤および A L K 5 阻害剤；
 - d) レチノイド、アスコルビン酸、S A N T - 1 および A L K 5 阻害剤；
 - e) レチノイド、アスコルビン酸、s h h 阻害剤、A L K 5 阻害剤および B M P 阻害剤；
- または
- f) レチノイド、アスコルビン酸、S A N T - 1、A L K 5 阻害剤および B M P 阻害剤の 1 つが追補されており、

ここで、前記分化培地は、前記ヒト臍臓前腸前駆細胞を、細胞の 10% 超が単一ホルモンのインスリン陽性細胞であるヒト臍臓内胚葉細胞の分化集団に分化し、前記臍臓前腸前駆細胞は、P D X - 1 および N K X 6 . 1 を発現する、インビトロ培養物。

【請求項 12】

前記分化培地中のアスコルビン酸の存在が、アスコルビン酸を含まない分化培地と比較して、インスリン陽性細胞の数を増加させ、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の数を減少させる、請求項 11 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 13】

臍臓内胚葉細胞の前記分化集団の 30% 超が、P D X - 1⁺、N K X 6 . 1⁺、S O X 2⁻および C D X 2⁻である、請求項 11 または 12 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 14】

レチノイド、アスコルビン酸および S A N T - 1 が追補された分化培地における、ヒト膵臓内胚葉細胞の分化集団であって、前記細胞の 10 % 超が、単一ホルモンのインスリン陽性細胞である、分化集団と P D X - 1 および N K X 6 . 1 を発現するヒト膵臓前腸前駆細胞の集団とのインビトロ培養物であって、

前記分化培地は、膵臓前腸前駆細胞を、細胞の 10 % 超が単一ホルモンのインスリン陽性細胞である膵臓内胚葉細胞の分化集団に分化する、インビトロ培養物。

【請求項 15】

前記分化培地中のアスコルビン酸の存在が、アスコルビン酸を含まない分化培地と比較して、インスリン陽性細胞の数を増加させ、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の数を減少させる、請求項 14 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 16】

前記分化培地は、A L K 5 阻害剤、B M P 阻害剤または A L K 5 阻害剤と B M P 阻害剤の両方がさらに追補されている、請求項 14 または 15 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 17】

前記 B M P 阻害剤が L D N - 193189 である、請求項 16 に記載のインビトロ培養物。

【請求項 18】

膵臓内胚葉細胞の前記分化集団の 30 % 超が、P D X - 1⁺、N K X 6 . 1⁺、S O X 2⁻ および C D X 2⁻ である、請求項 16 または 17 に記載のインビトロ培養物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2011 年 12 月 22 日に出願された、米国特許仮出願第 61 / 579, 351 号の利益を主張するものであり、当該出願を、本明細書にその全容において、かつあらゆる目的について援用するものである。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、細胞分化の分野にある。より具体的には、本発明は、段階的分化の各工程で定義された条件を用いて、多能性幹細胞から分化した単一ホルモンのインスリン産生細胞を提供する。その集団において分化したインスリン産生細胞の 10 % 以上は、単一ホルモンの膵臓 β 細胞に特徴的なマーカーを発現する。

【背景技術】

【0003】

I 型糖尿病の細胞置換療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞すなわち β 細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、例えば、胚性幹細胞のような多能性幹細胞から機能性の β 細胞を生成することがある。

【0004】

脊椎動物の胚発生において、多能性細胞は、原腸形成として公知のプロセスにて、3つの胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）を含む細胞のグループを生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓などの組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間ステージは、胚体内胚葉の形成である。胚体内胚葉細胞 (definitive endoderm cell) は、H N F 3 β、G A T A 4、M I X L 1、C X C R 4、及び S O X 17 などの多数のマーカーを発現する。

【0005】

原腸形成の終了までに、内胚葉は、内胚葉の前部、中間、及び後部の領域を特異的にマークする因子のパネルの発現によって認識することができる前部-後部ドメインに分割される。例えば、H h e x 及び S o x 2 は内胚葉の前領域を特定し、C d x 1、2 及び 4 は

10

20

30

40

50

後半分を特定する。

【0006】

内胚葉組織の移行は、内胚葉を腸管の領域化に役立つ異なった中胚葉組織に近接させる。これは、例えば、FGF、Wnt、TGF-β、レチノイン酸（RA）、及びBMPリガンド、並びにそれらのアンタゴニストのような多数の分泌された因子によって達成される。例えば、FGF4及びBMPは推定後腸内胚葉においてCdx2の発現を促進し、前方の遺伝子Hhex及びSOX2の発現を阻害する（Development 2000, 127:1563~1567）。WNTシグナル伝達はまた、後腸の発達を促進し、前腸の運命を阻害するために、FGFシグナル伝達と平行して作用することが示されている（Development 2007, 134:2207~2217）。最後に、間葉によって分泌されるレチノイン酸は、前腸-後腸の境界を調節する（Curr Biol 2002, 12:1215~1220）。

10

【0007】

特異的転写因子の発現レベルは、組織のアイデンティティを指定するために使用できる可能性がある。原腸管への胚体内胚葉の形質転換中に、腸管は、制限された遺伝子発現パターンにより分子レベルで観察することができる広いドメインに領域化される。例えば、腸管で領域化された膵臓ドメインは、PDX-1の非常に高い発現及びCDX2並びにSOX2の非常に低い発現を示す。同様に、Foxe1の高レベルの存在は、食道組織の指標である。肺組織において高度に発現されるのはNKX2.1である。SOX2/Odd1（OSR1）は胃組織において高度に発現される。PROX1/Hhex/AFPの発現は肝組織において高い。SOX17は胆管構造の組織で高度に発現される。PDX1、NKX6.1/Ptfa、及びNKX2.2は膵臓組織において高度に発現される。CDX2の発現は、腸組織において高い。上記要約は、Dev Dyn 2009, 238:29~42及びAnnu Rev Cell Dev Biol 2009, 25:221~251からの引用である。

20

【0008】

膵臓の形成は、膵臓内胚葉への胚体内胚葉の分化から生じる（Annu Rev Cell Dev Biol 2009, 25:221~251; Dev Dyn 2009, 238:29~42）。背側と腹側の膵臓ドメインは、前腸上皮から生じる。また、前腸は、食道、気管、肺、甲状腺、胃、肝臓、膵臓、胆管系を生じさせる。

30

【0009】

膵臓内胚葉の細胞は膵臓-十二指腸ホメオボックス遺伝子PDX1を発現する。PDX1が存在しない場合、膵臓は、腹側芽及び背側芽の形成を越えて発達しない。したがって、PDX1の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を印している。成熟した膵臓は、他の細胞型の中でも、外分泌組織及び内分泌組織を含む。外分泌組織及び内分泌組織は、膵臓内胚葉の分化によって生じる。

【0010】

D'Amourらは、高濃度のアクチビン及び低血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉の濃縮培地の生産を記述している（Nature Biotechnol 2005, 23:1534~1541; U.S. Patent No. 7,704,738）。マウスの腎臓被膜下でのこれらの細胞の移植は、内胚葉組織の特徴を有する、より成熟した細胞への分化をもたらした（米国特許第7,704,738号）。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、FGF-10及びレチノイン酸の添加後、PDX1陽性細胞に更に分化することができる（米国特許公開第2005/0266554A1号）。免疫不全マウスの腎臓被膜下でのこれらの膵臓前駆細胞のその後の移植は、3~4ヶ月の成熟期の後に、機能的膵内分泌細胞の形成をもたらした（米国特許第7,993,920号及び米国特許第7,534,608号）。

40

【0011】

Fiskらは、ヒト胚性幹細胞からの膵島細胞の産生のためのシステムを報告している（米国特許第7,033,831号）。この場合、分化経路は3つの段階に分割された。

50

ヒト胚性幹細胞は、最初に、酪酸ナトリウムとアクチビンとの組み合わせを用いて内胚葉に分化された（米国特許第7,326,572号）。次に細胞をノギンなどのBMPアンタゴニストと共に、EGF又はベータセルリンと組み合わせて培養して、PDX1陽性細胞を生成した。最終分化は、ニコチンアミドにより誘発された。

【0012】

小分子阻害剤もまた、膵内分泌前駆細胞の誘導のために使用されている。例えば、TGF- β 受容体及びBMP受容体の小分子阻害剤（Development 2011, 138:861~871; Diabetes 2011, 60:239~247）は、有意に膵内分泌細胞の数を増すために使用されている。加えて、小分子活性化剤もまた、胚体内胚葉細胞又は膵臓前駆細胞を生成するために使用されている（Curr Opin Cell Biol 2009, 21:727~732; Nature Chem Biol 2009, 5:258~265）。

【0013】

ヒト胚性幹細胞からの膵臓前駆細胞の誘導におけるこれまでの試みは、膵臓内胚葉の正しい同定におけるPDX-1及びNKX6.1の共発現の重要性を明らかにした。しかし、当該技術分野は、PDX-1及びNKX6の発現において陽性の細胞の集団はCDX2の発現が低い又は発現しないものと同定してきたが、これまでの報告は、発達中の膵臓のすぐ前方のマーカーの存在を試験するに至っていない。前方の内胚葉を印すSOX2は、成人の島では発現されず、発達中の膵臓において非常に低レベルで発現される。（Diabetes 2005, 54:3402~4309）。対照的に、本願の実施例のいくつかは、ヒト胚性幹細胞から生成された膵臓内胚葉細胞の少なくとも30%がPDX-1及びNKX6.1の発現について陽性であり、かつCDX2及びSOX2の発現に陰性である細胞集団を開示する。

【0014】

機能的膵臓 β 細胞を生成するための以前のあらゆる試みは、成熟した β 細胞の特徴を有する細胞を得るまでに至っていない。成熟した β 細胞の特徴としては、単一ホルモンのインスリンの発現、プロインスリンからインスリン及びC-ペプチドへの正しい処理、PDX-1及びNKX6.1の強発現、グルコースに応答した適切なインスリン放出、グルコース輸送体の発現、及びグルコキナーゼの高発現が含まれる。以前の報告の全ては、2つ以上の膵臓ホルモンを産生する内分泌細胞をもたらしている。例えば、D'Amourら（Nature Biotech 2006, 24:1392~1401）は、シナプトフィジンによる測定で10%までのインスリン陽性細胞及び20%までの内分泌細胞を含む細胞集団の生成を報告している。その他の同様の報告（Cell Res 2009, 19:429~438; Stem Cells 2007, 25:1940~1953; Diabetes Obes Metab 2008, 10:186~194）もまた、多能性細胞から非機能的インスリン陽性細胞への分化を示している。実際に、最近の研究は、重症複合免疫不全（SCID）マウスにおける多ホルモン細胞の移植が、機能的 β 細胞の生成をもたらさなかったことを明確に示した（Diabetes 2011, 60:239~247; Nature Biotech 2011, 29:750~756）。ヒト胎児の膵臓では内分泌細胞の一部（10~20%まで）が多ホルモン細胞であるが、多ホルモン細胞は成人のヒトの膵臓では消失している（Histochem Cell Biol 1999, 112:147~153; J Histochem Cytochem 2009, 57:811~824）。

【0015】

再生医療の急成長分野が成熟し続けるにつれて、最終分化した、適切に調節された膵内分泌細胞の形成のための方法が強く望まれている。適切でありかつ定義された培養条件の操作、及び様々な経路の活性化剤／阻害剤の添加の正確なタイミングを用いて、ヒト胚性幹細胞をインビトロで機能的膵臓 β 細胞に分化させることができることが、本明細書で実証される。具体的には、BMP阻害の正確なタイミング、ビタミンCの使用とともにレチノイン酸の勾配を用いることが、単一ホルモンの膵内分泌細胞の生成に有効であることが証

明された。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、多能性細胞の段階的分化によってインビトロで得られる膵臓内胚葉系統（pancreatic endoderm lineage）の細胞の集団を提供する。分化の各工程で使用する培地には、グルコースを追補する。いくつかの実施形態では、分化の各工程で、5 mM～20 mMのグルコースを含む培地中で細胞を培養する。

【0017】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞の分化が生成する膵臓内胚葉細胞集団において、分化集団の細胞の10%超が、単一ホルモンの膵臓β細胞に特徴的なマーカーを発現する。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞の分化が生成する膵臓内胚葉細胞集団において、分化集団の30%超が、PDX-1及びNKX6.1の発現について陽性であるが、CDX2及びSOX2の発現については陰性である。

【0019】

いくつかの実施形態では、段階的分化は、TGF-βリガンドを更に追補した培地中で未分化ヒト胚性幹細胞を培養する工程を含む。いくつかの実施形態では、段階的分化は、WNT活性化剤を更に追補した培地中で未分化ヒト胚性幹細胞を培養する工程を含む。いくつかの実施形態では、段階的分化は、FGFリガンドを更に追補した培地中で胚体内胚葉細胞を培養する工程を含む。いくつかの実施形態では、段階的分化は、shh阻害剤、FGFリガンド、PKC活性化剤、TGF-βリガンド、レチノイド、及びBMP阻害剤の勾配を更に追補した培地中で腸管細胞を培養する工程を含む。いくつかの実施形態では、段階的分化は、PKC活性化剤、shh阻害剤、レチノイド、及びBMP阻害剤を更に追補した培地中で後方前腸細胞（posterior foregut cell）を培養する工程を含む。いくつかの実施形態では、段階的分化は、アスコルビン酸を更に追補した培地中で細胞を培養する工程を含む。

20

【0020】

一実施形態において、本発明は、5 mM～20 mMのグルコースを含む培地中での分化の各段階で細胞を培養する工程を含む、多能性細胞を膵臓内胚葉系統の細胞集団に段階的に分化するためのインビトロの方法を提供する。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、TGF-βリガンド及びWNT活性化剤を追補した培地中で多能性細胞を培養することによって多能性細胞を胚体内胚葉（DE）細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、FGFリガンドを追補した培地中でDE細胞を培養することによりDE細胞を腸管細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、shh阻害剤、FGFリガンド、PKC活性化剤、TGF-βリガンド、レチノイド、及びBMP阻害剤を追補した培地中で腸管細胞を培養することにより腸管細胞を後方前腸内胚葉細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、shh阻害剤、FGFリガンド、PKC活性化剤、TGF-βリガンド、レチノイド、及びBMP阻害剤を追補した培地中で腸管細胞を培養することにより腸管細胞を後方前腸内胚葉細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、PKC活性化剤、shh阻害剤、レチノイド、及びBMP阻害剤を追補した培地中で後方前腸内胚葉細胞を培養することにより後方前腸内胚葉細胞を膵臓前腸細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法は、更に、shh阻害剤、TGF-β阻害剤、及びレチノイドを追補した培地中で膵臓前腸細胞を培養することにより膵臓前腸細胞を膵臓内胚葉細胞に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビ

30

40

50

トロの方法は、更に、膵臓内胚葉細胞を膵臓β細胞集団に分化する工程を含む。

【0021】

一実施形態では、多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法の少なくとも一工程において、培地には更にアスコルビン酸が追補される。いくつかの実施形態では、分化集団の細胞の10%超が、単一ホルモンのインスリン陽性細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の方法によって生成された培養物中の膵臓内胚葉細胞の30%超は、PDX-1+、NKX6.1+、SOX2-、及びCDX2-である。

【0022】

一実施形態において、本発明は、ヒト胚性幹細胞を膵臓β細胞に分化するためのインビトロの方法に関し、この方法は、a) 胚体内胚葉(DE)の集団を生成するために、グルコース、TGF-βリガンド及びWNT活性化剤を追補した培地中で未分化ヒト胚性幹細胞を培養する工程、b) 腸管細胞の集団を生成するためにグルコース及びFGFリガンドを追補した培地中でDE細胞を培養する工程、c) PDX-1及びSOX2を発現する後方前腸内胚葉細胞の集団を生成するために、グルコース、shh阻害剤、FGFリガンド、PKC活性化剤、TGF-βリガンド、レチノイド及びBMP阻害剤の勾配を追補した培地中で腸管細胞を培養する工程、d) PDX-1及びNKX6.1を発現する膵臓前腸細胞の集団を生成するために、グルコース、PKC活性化剤、shh阻害剤、レチノイド及びBMP阻害剤を追補した培地中で後方前腸細胞を培養する工程、e) PDX-1及び膵臓前腸細胞と比較してより高いレベルのNKX6.1並びにより低いレベルのSOX2を発現する膵臓内胚葉細胞の集団を得るために、グルコース、shh阻害剤、TGF-β阻害剤及びレチノイドを追補した培地中で膵臓前腸細胞を培養する工程、及びf) 膵臓内胚葉細胞を膵臓β細胞集団に分化する工程を含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法により生成される膵臓β細胞集団は、PDX-1+、NKX6.1+、SOX2-、及びCDX2-である。いくつかの実施形態では、段階的分化方法の少なくとも一工程において、培地に更にアスコルビン酸を追補する。いくつかの実施形態では、本発明の方法により得られる膵臓β細胞は、単一ホルモンのインスリン産生細胞であり、NKX6.1+及びPDX-1+でもある。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】実施例1に従って分化された細胞におけるアイソタイプコントロールのマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1B】実施例1に従って分化された細胞におけるクロモグラニンのマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1C】実施例1に従って分化された細胞におけるKI-67のマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1D】実施例1に従って分化された細胞におけるNKX6.1のマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1E】実施例1に従って分化された細胞におけるSOX2のマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1F】実施例1に従って分化された細胞におけるCDX2のマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図1G】実施例1に従って分化された細胞におけるPDX-1のマーカーのS3の2日目のFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 2 B】実施例 1 に従って分化され、S 4 の 2 日目に収穫した細胞におけるクロモグラニンのマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 2 C】実施例 1 に従って分化され、S 4 の 2 日目に収穫した細胞における K I - 6 7 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図2D】実施例1に従って分化され、S4の2日目に収穫した細胞におけるNKX6.1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 2 E】実施例 1 に従って分化され、S 4 の 2 日目に収穫した細胞における S O X 2 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 2 F】実施例 1 に従って分化され、S 4 の 2 日目に収穫した細胞における C D X 2 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 2 G】実施例 1 に従って分化され、S 4 の 2 日目に収穫した細胞における P D X - 1 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図3A】実施例1に従って分化され、S5の2日目に収穫した細胞におけるアイソタイプコントロールのマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 3 B】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞におけるクロモグラニンのマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 3 C】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞における K I - 6 7 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図3D】実施例1に従って分化され、S5の2日目に収穫した細胞におけるNKX6.1のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 3 E】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞における S O X 2 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 3 F】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞における C D X 2 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 3 G】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞における P D X - 1 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 4 A】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞のアイソタイプコントロールのマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 4 B】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞のクロモグラニンのマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 4 C】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞の K I - 6 7 のマーカーの F A C S ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒス

トグラムに示す。

【図 4 D】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞の NK X 6 . 1 のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 4 E】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞の SOX 2 のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 4 F】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞の CD X 2 のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

10

【図 4 G】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 7 日目に収穫した細胞の PD X - 1 のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 5 A】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞のクロモグラニン（y 軸）及び CD X 2（x 軸）のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各プロットの共発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 5 B】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞のクロモグラニン（y 軸）及び SOX 2（x 軸）のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各プロットの共発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図 5 C】実施例 1 に従って分化され、S 5 の 2 日目に収穫した細胞のクロモグラニン（y 軸）及び NK X 6 . 1（x 軸）のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。各プロットの共発現百分率を各ヒストグラムに示す。

20

【図 6 A】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における CD X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 B】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における CD 1 4 2 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 C】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における FOX E 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

30

【図 6 D】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における HNF 4 - アルファの遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 E】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における NK X 2 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 F】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における NK X 2 . 2 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

40

【図 6 G】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における NK X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 H】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における OSR 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 I】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における PD X - 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 6 J】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における NK X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

50

胞株 H 1 の細胞における P R O X 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 K】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P T F 1 a の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 L】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における S O X 1 7 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 M】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における S O X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

10

【図 6 N】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるイヌリンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 O】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における Z I C 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 P】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

20

【図 6 Q】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるグルカゴンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 R】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N g n 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 S】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 6 T】実施例 1 に従って分化し、S 2、S 3、S 4 及び S 5 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるソマトスタチンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

30

【図 7 A】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞における N K X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 7 B】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞における P D X - 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 7 C】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 7 D】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

40

【図 7 E】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞における C D X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 7 F】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞におけるアルブミンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 7 G】実施例 2 に従って分化し、S 2、S 3、又は S 4 の 3 日目に収穫した H 1 細胞株の細胞における S O X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 8 A】実施例 3 に従って分化し、S 2、S 3、S 4、又は S 5 で収穫した H 1 細胞における N K X 6 . 1 のマーカーの発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 8 B】実施例 3 に従って分化し、S 2、S 3、S 4、又は S 5 で収穫した H 1 細胞に

50

における PDX-1 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 8 C】実施例 3 に従って分化し、S2、S3、S4、又は S5 で収穫した H1 細胞における NGN3 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 8 D】実施例 3 に従って分化し、S2、S3、S4、又は S5 で収穫した H1 細胞における NeuroD のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 8 E】実施例 3 に従って分化し、S2、S3、S4、又は S5 で収穫した H1 細胞におけるクロモグラニンのマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 8 F】実施例 3 に従って分化し、S2、S3、S4、又は S5 で収穫した H1 細胞における CDX2 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 8 G】実施例 3 に従って分化し、S2、S3、S4、又は S5 で収穫した H1 細胞における SOX2 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

10

【図 9 A】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における NKX6.1 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 B】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における PDX-1 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 C】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞におけるクロモグラニンのマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 D】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における NGN3 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 E】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における NeuroD のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

20

【図 9 F】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における CDX2 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 G】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞におけるアルブミンのマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 9 H】実施例 4 に従って分化し、S3 及び S4 の 4 日目に収穫した H1 細胞における SOX2 のマーカーの発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 A】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における NKX6.1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 B】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における PDX-1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

30

【図 10 C】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 D】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における NGN3 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 E】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における NeuroD の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 F】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における CDX2 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 10 G】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞におけるアルブミンの遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

40

【図 10 H】実施例 5 に従って分化し、第 4 段階で収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における SOX2 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 11 A】実施例 6 に従って分化し、S3 又は S6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における NKX6.1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 11 B】実施例 6 に従って分化し、S3 又は S6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞における PDX-1 の遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。

【図 11 C】実施例 6 に従って分化し、S3 又は S6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞

50

株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 1 D】実施例 6 に従って分化し、S 3 又は S 6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 1 E】実施例 6 に従って分化し、S 3 又は S 6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 1 F】実施例 6 に従って分化し、S 3 又は S 6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における C D X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 1 G】実施例 6 に従って分化し、S 3 又は S 6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるアルブミンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 1 H】実施例 6 に従って分化し、S 3 又は S 6 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における S O X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 A】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N K X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 B】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P D X - 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 C】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 D】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 E】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 F】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における C D X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 2 G】実施例 7 に従って分化し、S 3、S 4、又は S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における S O X 2 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 3 A】実施例 8 に従って分化し、S 3、S 4、S 5、又は S 6 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N K X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 3 B】実施例 8 に従って分化し、S 3、S 4、S 5、又は S 6 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P D X - 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 3 C】実施例 8 に従って分化し、S 3、S 4、S 5、又は S 6 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 3 D】実施例 8 に従って分化し、S 3、S 4、S 5、又は S 6 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 1 3 E】実施例 8 に従って分化し、S 3、S 4、S 5、又は S 6 で収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

10

20

30

40

50

【図13F】実施例8に従って分化し、S3、S4、S5、又はS6で収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるCDX2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図13G】実施例8に従って分化し、S3、S4、S5、又はS6で収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるSOX2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図14A】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のアイソタイプコントロールのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図14B】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のクロモグラニンのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

10

【図14C】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のK1-67のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図14D】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のNKX6.1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図14E】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のSOX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

20

【図14F】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のHNF3BのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図14G】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のCDX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図14H】実施例9に従って分化された細胞のS3の4日目のPDX-1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

30

【図15A】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のアイソタイプコントロールのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図15B】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のNKX6.1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図15C】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のK1-67のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図15D】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のクロモグラニンのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

40

【図15E】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のSOX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図15F】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のCDX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図15G】実施例9に従って分化された細胞のS4の2日目のPDX-1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラ

50

ムに示す。

【図16A】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のアイソタイプコントロールのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図16B】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のNKX6.1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図16C】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のクロモグラニンのマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図16D】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のSOX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図16E】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のCDX2のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図16F】実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目のPDX-1のマーカのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図17A】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるCDX2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17B】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるHHexの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17C】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるFOXE1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17D】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるIPF1(PDX-1)の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17E】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNKX2.1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17F】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNKX2.2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17G】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNKX6.1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17H】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるPROX1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17I】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるSOX2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図17J】実施例9に従って分化し、S1D3、S2D3、S3D4、S4D2、及びS4D4に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるSOX9の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図18A】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のアイソタイプコントロ

10

20

30

40

50

ールのマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図18B】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のNKX6.1のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図18C】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のクロモグラニンのマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図18D】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のSOX2のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

10

【図18E】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のCDX2のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図18F】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のKl-67のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図18G】実施例10に従って分化された細胞のS3の3日目のPDx-1のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

20

【図19A】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のアイソタイプコントロールのマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図19B】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のNKX6.1のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図19C】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のクロモグラニンのマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図19D】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のSOX2のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

30

【図19E】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のCDX2のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図19F】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のKl-67のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【図19G】実施例10に従って分化された細胞のS4の5日目のPDx-1のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

40

【図20A】実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるソマトスタチンの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図20B】実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるPDx1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図20C】実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるPax6の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図20D】実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるPax4の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図20E】実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNKX6

50

・ 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 0 F】実施例 1 1 に従って分化したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 0 G】実施例 1 1 に従って分化したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるグルカゴンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 0 H】実施例 1 1 に従って分化したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 0 I】実施例 1 1 に従って分化したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるインスリンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 0 J】実施例 1 1 に従って分化したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

10

【図 2 1 A】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるソマトスタチンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 B】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P D X 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 C】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P a x 6 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

20

【図 2 1 D】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P a x 4 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 E】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N K X 6 . 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 F】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N G N 3 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 G】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における N e u r o D の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

30

【図 2 1 H】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるインスリンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 I】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるグルカゴンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 1 J】実施例 1 2 に従って分化し、S 4 の 2 日目、S 5 の 2 日目、及び S 5 の 9 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞におけるクロモグラニンの遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

40

【図 2 2 A】実施例 1 3 に従って分化し、S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P a x 4 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 2 B】実施例 1 3 に従って分化し、S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P a x 6 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 2 C】実施例 1 3 に従って分化し、S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P D X 1 の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 2 D】実施例 1 3 に従って分化し、S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における P T F 1 a の遺伝子の発現のリアルタイム P C R 解析のデータを示す。

【図 2 2 E】実施例 1 3 に従って分化し、S 5 の 3 日目に収穫したヒト胚性幹細胞株 H 1

50

の細胞におけるグルカゴンの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22F】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるインスリンの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22G】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNeuroDの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22H】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるngn3の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22I】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるZic1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22J】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるCDX2の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22K】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるアルブミンの遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【図22L】実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫したヒト胚性幹細胞株H1の細胞におけるNKX6.1の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、「発明を実施するための形態」を本発明の特定の特徴、実施形態、又は用途を、説明又は例示する下記の小項目に分割する。

【0025】

定義

幹細胞は、単一細胞レベルでの自己再生能及び分化能の両方によって定義される未分化細胞である。幹細胞は、自己再生前駆細胞、非再生性前駆細胞、及び最終分化細胞を含む子孫細胞を生成することができる。幹細胞はまた、複数の胚葉（内胚葉、中胚葉及び外胚葉）から様々な細胞系統の機能性細胞へとインビトロで分化する能力を特徴とする。幹細胞はまた、移植後に複数の胚葉の組織を生じさせ、胚盤胞に注入後、実質的に（全てではないとしても）ほとんどの組織に寄与する。

【0026】

幹細胞は、発生能によって、（1）全胚及び胚体外細胞型を生じる能力を意味する全能性、（2）全胚細胞型を生じる能力を意味する多能性、（3）細胞系統の小集合を生じるが、すべて特定の組織、器官、又は生理学的システム内で生じる能力を意味する複能性（例えば、造血幹細胞（HSC）は、HSC（自己再生）、血液細胞に限定された寡能性前駆細胞、並びに血液の通常の構成要素である全細胞型及び要素（例えば、血小板）を含む後代を産生できる）、（4）複能性幹細胞と比較して、より限定された細胞系統の小集合を生じる能力を意味する寡能性、並びに（5）1つの細胞系統（例えば、精子形成幹細胞）を生じる能力を意味する単能性に分類される。

【0027】

分化は、特殊化されていない（「中立の」）又は比較特殊化されていない細胞が、例えば、神経細胞又は筋細胞などの特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスである。「分化した細胞」又は「分化誘導された細胞」とは、細胞の系統内でより特殊化した（「コミットした」）状況にある細胞である。分化プロセスに適用された際の用語「コミットした」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合への分化を続け、かつ通常的环境下で異なる細胞型に分化したり、又は低分化細胞型に戻ったりすることができない地点まで、分化経路において進行した細胞を指す。「脱分化」は、細胞が細胞系統内で比較的特殊化されて（又は拘束されて）いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用される場合、細胞系統は、細胞の遺伝、すなわちその細胞がどの細胞から来たか、またどの細胞を生じ得るかを規定する。ある細胞の系統とは、所定の発生及び分化の遺伝体系内にその細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、分化決定されていない細胞の、対象とする系統への分化

10

20

30

40

50

を評価するために使用することができる。

【0028】

本明細書で言うところの「マーカー」とは、対象とする細胞で差異的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。この文脈において、差異的な発現は、陽性マーカーのレベルの増大及び陰性マーカーのレベルの減少を意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出可能なレベルは、他の細胞と比較して対象とする細胞において十分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種の方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することが可能である。

【0029】

本明細書で使用する細胞は、特異的マーカーが細胞内で検出されたとき、特異的マーカー「について陽性」又は「陽性」である。同様に、細胞は、特異的マーカーが細胞内で検出されないとき、特異的マーカー「について陰性」又は「陰性」である。

【0030】

本明細書で使用する「ステージ1」及び「S1」は、胚体内胚葉（DE）に特徴的なマーカーを発現する細胞を同定するために互換的に使用される。

【0031】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を有する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する：HNF3β、GATA4、SOX17、CXCR4、ケルペロス、OTX2、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMIXL1。

【0032】

本明細書で使用するとき、「腸管」は、以下のマーカーのうちの少なくとも一つを発現する胚体内胚葉に由来する細胞を指す：HNF3β、HNF1β、又はHNF4α。腸管細胞は、肺、肝臓、膵臓、胃、及び腸などの全ての内胚葉臓器を生じさせ得る。

【0033】

本明細書で使用するとき、原腸管に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定する「ステージ2」及び「S2」は互換的に使用される。

【0034】

「前腸内胚葉」とは、食道、肺、胃、肝臓、膵臓、胆嚢、及び十二指腸の一部を生じさせる内胚葉細胞を指す。

【0035】

「後方前腸」は、後方胃、膵臓、肝臓、及び十二指腸の一部を生じさせることができる内胚葉細胞を指す。

【0036】

「中腸内胚葉」は、腸、十二指腸の一部、虫垂、及び上行結腸を生じさせることができる内胚葉細胞を指す。

【0037】

「後腸内胚葉」は、横行結腸の遠位3分の1、下行結腸、S状結腸、及び直腸を生じさせることができる内胚葉細胞を指す。

【0038】

「ステージ3」及び「S3」の双方は、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。「前腸系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX-1、FOXA2、CDX2、SOX2、及びHNF4α。

【0039】

「ステージ4」及び「S4」は、膵臓前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「膵臓前腸前駆細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX-1、NKX6.1、HNF6、FOXA2、PTF1a、Prox1、及びHNF4α。

10

20

30

40

50

【0040】

本明細書で使用するとき、「ステージ5」及び「S5」は、膵臓内胚葉及び膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を特定するために互換的に使用される。本明細書で使用するとき、「膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：PDX1、NKX6.1、HNF1β、PTF1α、HNF6、HNF4α、SOX9、HB9、又はPROX1。膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、CDX2又はSOX2を実質的に発現しない。

【0041】

本明細書で使用するとき、「ステージ6」及び「S6」は、膵内分泌細胞が濃縮された細胞を特定するために互換的に使用される。

10

【0042】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌細胞」又は「膵臓ホルモン発現細胞」又は「膵内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」とは、以下のホルモンの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。

【0043】

「膵内分泌前駆細胞」又は「膵内分泌前駆細胞」は、細胞を発現する膵臓ホルモンになり得る膵臓内胚葉細胞を指す。そのような細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現し得る：NGN3、NKX2.2、NeuroD、ISL-1、Pax4、Pax6、又はARX。

20

【0044】

本明細書で使用する「機能的膵臓β細胞」は、グルコース応答性でありかつPDX-1及びNKX6.1について陽性となり得る単一ホルモンのインスリン陽性細胞を指す。

【0045】

本明細書では、「d1」、「d 1」、及び「1日目」、「d2」、「d 2」、及び「2日目」、「d3」、「d 3」及び「3日目」等は互換的に使用される。これらの数字の組み合わせは、本願の段階的分化プロトコル中の異なるステージにおけるインキュベーションの日を特定する。

【0046】

「アスコルビン酸」及び「ビタミンC」は、本明細書で互換的に使用され、ヒト及び他の動物種のための必須栄養素に関する。

30

【0047】

「グルコース」及び「D-グルコース」は、本明細書で互換的に使用され、天然に一般に見出される糖、デキストロースを指す。

【0048】

特定のマーカーについて「陽性」又はマーカー「+」（すなわちPDX-1+）の細胞は、その特定のマーカーが検出され得る細胞である。特定のマーカーについて「陰性」又はマーカー「-」（すなわちNKX6.1-）の細胞は、本明細書において教示される方法によってそのマーカーが検出されない細胞である。

40

【0049】

本願では、「クロモグラニン」及び「CHGN」は、酸性の分泌糖タンパク質クロモグラニンをコードする遺伝子を特定するために互換的に使用される。

【0050】

膵内分泌前駆細胞において発現されるタンパク質及びそれをコードする遺伝子を特定する「NeuroD」及び「NeuroD1」は、本明細書で互換的に使用される。

【0051】

「LDN」及び「LDN-193189」は本明細書で互換的に使用され、米国カリフォルニア州のStemgentから入手可能なBMP受容体阻害剤を示す。

【0052】

50

多能性幹細胞の単離、増殖及び培養

多能性幹細胞は、ステージ特異的胚抗原 (SSEA) 3 及び 4、並びに Tra-1-60 及び Tra-1-81 と呼ばれる抗体によって検出可能なマーカーのうちの 1 つ以上を発現している (Thomson ら、Science 282:1145, 1998)。インビトロでの多能性幹細胞の分化は、SSEA-4、Tra-1-60、及び Tra-1-81 の発現の消失をもたらす。未分化多能性幹細胞は、一般にアルカリホスファターゼ活性を有し、これは、製造業者 (米国カリフォルニア州 Vector Laboratories) により説明されているように、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後、基質として Vector Red を使用して現像することにより検出することができる。未分化の多能性幹細胞はまた、RT-PCR により検出されるように、一般に OCT4 及び TERT も発現する。

10

【0053】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、3 つの胚葉のすべて、すなわち、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉組織の細胞に分化する能力である。幹細胞の多能性は、例えば細胞を SCID マウスに注入し、4% パラホルムアルデヒドを使用して、形成された奇形腫を固定した後、それらを 3 つの胚葉からの細胞型の痕跡に関して組織学的に検査することにより確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を 3 つの胚葉に関連したマーカーの存在に関して評価することにより決定することができる。

【0054】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的な G バンド法を使用し、対応する霊長類種の発表されている核型と比較することで、核型を決定することができる。細胞は「正常な核型」を有することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体がすべて揃っておりかつ目立った変化のないことを意味する。多能性細胞は、様々なフィーダー層を用いて、又はマトリックスタンパク質被覆した容器を用いて、容易に培養で増殖させることができる。あるいは、mTesr (商標) 1 培地 (カナダ、Vancouver の StemCell Technologies) のような定義された培地と組み合わせた化学的に定義された表面を、細胞のルーチン増殖に用いてもよい。多能性細胞は、酵素で、若しくは機械的に、又は EDTA (エチレンジアミン四酢酸) など様々なカルシウムキレート剤を用いて、培養プレートから容易に取り出すことができる。あるいは、多能性細胞は、マトリックスタンパク質又はフィーダー層の非存在下で、懸濁液中で増殖させてもよい。

20

30

【0055】

多能性幹細胞の供給源

使用が可能な多能性幹細胞の種類としては、妊娠期間中の任意の時期 (必ずしもではないが、通常は妊娠約 10 ~ 12 週よりも前) に採取した前胚性組織 (例えば胚盤胞など)、胚性組織又は胎児組織などの、妊娠後に形成される組織に由来する多能性細胞の樹立株が含まれる。非限定的な例は、ヒト胚性幹細胞 (hESCs) 又はヒト胚生殖細胞の樹立株であり、例えば、ヒト胚性幹細胞株 H1、H7、及び H9 (米国ウィスコンシン州 Madison の WiCell Research Institute) などである。フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。また、OCT4、Nanog、Sox2、KLF4、及び ZFP42 など多数の多能性に関係する転写因子の強制発現を用いて、成体体細胞から誘導することができる誘導性多能性細胞 (iPS) 又は再プログラム化された多能性細胞も好適である (Annu Rev Genomics Hum Genet, 2011, 12:165~185)。本発明の方法に使用されるヒト胚性幹細胞は、Thomson らによって記述されたように調製してもよい (米国特許第 5,843,780 号; Science, 1998, 282:1145; Curr. Top. Dev. Biol., 1998, 38:133; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1995:92:7844)。

40

【0056】

多能性幹細胞からの、腭臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成

50

多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の更なる特徴は、継続して同定されている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの、すなわち、ABC G2、cripto、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra 1-60、Tra 1-81の1つ以上の発現が挙げられる。

【0057】

本発明で用いるのに好適な多能性幹細胞としては、例えば、ヒト胚性幹細胞株H9（NIHコード：WA09）、ヒト胚性幹細胞株H1（NIHコード：WA01）、ヒト胚性幹細胞株H7（NIHコード：WA07）、及びヒト胚性幹細胞株SA002（Cellartis, Sweden）が挙げられる。多能性細胞に特徴的な以下のマーカー、すなわち、ABCG2、cripto、CD9、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra 1-60、及びTra 1-81のうちの少なくとも1つを発現する細胞も本発明で用いるのに好適である。

【0058】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーは、SOX17、GATA4、HNF3 β、GSC、CER1、Nodal、FGF8、短尾奇形、Mix様ホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、エオメソダーミン（EOMES）、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kit、CD99、及びOTX2からなる群から選択される。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーのうちの少なくとも1つを発現している細胞は本発明での使用に好適である。本発明の一態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。

【0059】

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーは、PDX1、NKX6.1、HNF1 β、PTF1 α、HNF6、HNF4 α、SOX9、HB9、及びPROX1からなる群から選択される。膵臓内胚葉系に特徴的なこれらのマーカーのうちの少なくとも1つを発現する細胞が本発明における使用に適している。本発明の一態様では、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵臓内胚葉細胞であり、PDX-1及びNKX6.1の発現はCDX2及びSOX2の発現より実質的に高い。

【0060】

膵内分泌系統に特徴的なマーカーは、NGN3、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、ARX、NKX2.2、及びPAX6からなる群から選択される。一実施形態では、膵内分泌細胞は、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することができる。本発明で使用するに好適なものは、膵内分泌系統の特徴を示すマーカーを少なくとも1つ発現する細胞である。本発明の一態様において、膵内分泌系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であってよい。あるいは、膵内分泌細胞は膵臓ホルモン分泌細胞であってもよい。

【0061】

本発明の一態様では、膵内分泌細胞は、β細胞系統に特徴的なマーカーを発現している細胞である。β細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、PDX1と、以下の転写因子、すなわち、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD、ISL1、HNF3 β、MAFA、PAX4、及びPAX6のうちの少なくとも1つを発現する。本発明の一態様では、β細胞系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、β細胞である。

【0062】

本発明は、PDX-1及びNKX6.1陽性でもある単一ホルモンのインスリン陽性細胞を生成し得るインビトロ的方法及び細胞集団を説明する。本発明で使用方法は、以下の中間ステージを経てヒト多能性細胞から単一ホルモンの細胞への分化を段階的に導

10

20

30

40

50

く一連のステージを含む。

a) グルコース、TGF-βリガンド、及びWNT活性化剤を含む培地中で多能性細胞を培養する工程を含む、未分化ヒト胚性幹細胞からの胚体内胚葉（DE）細胞の生成。

b) グルコース、ビタミンC、及びFGFリガンドを含む培地中でDE細胞を培養する工程を含む、腸管細胞へのDE細胞の分化。

c) PDX-1及びSOX2を発現する後方前腸内胚葉細胞への腸管細胞の分化。この分化は、shh阻害剤、BMP阻害剤、TGF-βリガンド、FGFリガンド、レチノイン酸、ビタミンC、及びPKC活性化剤の存在下で腸管細胞を培養することによって達成される。

d) 後方前腸細胞を、PDX-1及びNKX6.1を発現し、かつ後方前腸細胞と比較して低いレベルのSOX2を発現する膵臓前腸細胞に分化する工程。この分化は、shh阻害剤、BMP阻害剤、低用量のレチノイン酸、ビタミンC、及びPKC活性化剤の存在下で後方前腸細胞を培養することによって達成される。

e) 膵臓前腸細胞を、PDX-1及び、膵臓前腸細胞と比較して高いレベルのNKX6.1並びに低いレベルのSOX2を発現する膵臓内胚葉細胞に分化する工程。この分化は、shh阻害剤、TGF-β阻害剤、低用量のレチノイン酸、及びビタミンCを追補した培地中で膵臓前腸細胞を培養することにより達成される。

f) 膵臓内胚葉細胞を、膵内分泌前駆細胞に分化し、続いて、単一ホルモンの膵内分泌細胞に分化する工程。この分化は、shh阻害剤、低用量のレチノイン酸、及びビタミンCを追補した培地中で膵臓内胚葉細胞を培養することにより達成される。

【0063】

一実施形態では、段階的分化の全ステージにおいて、細胞は、25mM未満のグルコースを含有する培地製剤において培養される。いくつかの実施形態では、グルコース濃度は、約8mM～約20mMのグルコースの範囲内である。

【0064】

いくつかの実施形態では、腸管ステージの細胞を生成するための及びその後の全ての工程に使用される培地製剤は、アスコルビン酸（ビタミンCとしても知られる）を含有する。一実施形態では、アスコルビン酸の濃度は約0.01mM～約1mMである。一実施形態では、アスコルビン酸の濃度は約0.1mM～約0.5mMである。

【0065】

本発明を以下の実施例によって更に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例】

【0066】

（実施例1）

ウシ胎児血清の非存在下での、膵内分泌前駆細胞への細胞株H1のヒト胚性幹細胞の分化-BMP/TGF-β経路の調節は膵臓内胚葉集団の産生の改善及びSOX2+集団の百分率の低下をもたらす。

この実施例は、CDX2及びSOX2の低レベルの発現を有する一方でPDX-1及びNKX6.1の非常に高い発現レベルを有する膵臓内胚葉培養物が生成され得ることを示すために実施した。

【0067】

ヒト胚性幹細胞株H1（hESC H1）は、多様な継体（継体40～継体52）で収穫し、10μMのY27632（Rock阻害剤、カタログ番号Y0503、米国ミズーリ州のSigmaAldrich）を追補したmTeSR（登録商標）1培地（カナダ、VancouverのStemCell Technologies）において、単一細胞として、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1:30希釈、米国ニュージャージー州のBD Biosciences）で被覆された皿上に播種した。播種の48時間後に、培養物を不完全なPBS（Mg又はCaを含まないリン酸緩衝生理食塩水）中で約30秒間洗浄し、インキュベートした。培養物は、以下

10

20

30

40

50

のようにして膵内分泌系統に分化させた。

a. ステージ1 (胚体内胚葉 (DE) - 3日) : ステージ1の培地 (0.1%の無脂肪酸BSA (カタログ番号68700、米国アイオワ州のProliant)、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム (カタログ番号S3187、米国ミズーリ州のSigma Aldrich)、1X GlutaMax (商標) (カタログ番号35050-079、Invitrogen)、5mMのD-グルコース (カタログ番号G8769、米国ミズーリ州のSigma Aldrich) が追補された、100ng/mLのGDF8 (米国ミネソタ州R&D Systems) 及び1μMのMCX化合物 (GSK3B阻害剤、14-Prop-2-エン-1-イル-3, 5, 7, 14, 17, 23, 27-ヘプタアザテトラシクロ [19.3.1.1~2, 6~.1~8, 12~] ヘプタコサー1 (25), 2 (27), 3, 5, 8 (26), 9, 11, 21, 23-ノナエン-16-オン、米国特許出願第12/494, 789号、参照によりその全容が本明細書に援用される) を含有するMCDB-131培地 (カタログ番号10372-019、米国カリフォルニア州のInvitrogen) 中で、細胞を1日培養した。次いで、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、及び100nMのMCX化合物を追補したMCDB-131培地中で細胞を1日培養した。次いで、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、5mMのD-グルコース、及び100ng/mLのGDF8を追補したMCDB-131培地中で細胞を1日培養した。

10

20

b. ステージ2 (原腸管-2日) : ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、5mMのD-グルコース、及び25ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131培地で2日間処理した。

c. ステージ3 (前腸-2日) : ステージ2の細胞を、ステージ3の培地 (ITS-X (Invitrogen) の1:200希釈液)、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax (商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、25ng/mLのFGF7、10ng/mLのアクチビン-A (R&D Systems)、0.25μMのSANT-1 (shh阻害剤、Sigma Aldrich)、1μMのレチノイン酸 (RA) (Sigma Aldrich)、及び200nMのTPB (PKC活性化剤、カタログ番号565740; 米国ニュージャージー州のEMD) を追補した、100nMのLDN-193189 (BMP受容体阻害剤; カタログ番号04-0019; 米国カリフォルニア州のStemgent) を含有するMCDB-131培地) 中で、1日培養した。次いで、それらの細胞を、10nMのLDN-193189を追補したステージ3の培地中で更に1日培養した。

30

d. ステージ4 (膵臓前腸前駆細胞-2日) : ステージ3の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、2.5mMのグルコース、1XのGlutaMax (商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、50nMのRA、200nMのTPB、及び50nMのLDN-193189を追補したMCDB-131培地中で2日培養した。

40

e. ステージ5 (膵臓内胚葉-2~7日) : ステージ4の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、2.5mMのグルコース、1XのGlutaMax (商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、及び50nMのRAを追補したMCDB-131培地中で2~7日培養した。

【0068】

特定のステージで、リアルタイムPCR、免疫組織化学、又は蛍光活性化細胞選別 (FACS) により試料を収集し、解析した。

【0069】

FACS解析については、hESC由来の細胞をTrypLE Express (カタログ番号12604、Invitrogen) にて37℃で3~5分間インキュベートす

50

ることによって単一細胞懸濁液中に放出した。次いで、細胞を染色緩衝液（0.2%無脂肪酸BSAを含有するPBS）（カタログ番号554657、米国ニュージャージー州のBD Biosciences）において2回洗浄した。細胞内抗体染色については、細胞を最初にGreen Fluorescent LIVE/DEAD細胞染料（Invitrogenカタログ番号L23101）にて4℃で20分間インキュベートして、解析中の生/死の区別を可能にし、次いで、冷たいPBSにて一回洗浄した。細胞を250 μLのCytotfix/Cytoperm Buffer（BD Biosciencesカタログ番号554722）にて4℃で20分間固定し、次いで、BD Perm/Wash Buffer Solution（BD Biosciencesカタログ番号554723）で2回洗浄した。細胞を、（二次抗体の適切な種の）2%正常血清を追補したPerm/Wash緩衝液からなる染色/ブロッキング溶液100 μL中に再懸濁した。次いで、経験的に予め決定した希釈で一次抗体を用いて細胞を4℃で30分間インキュベートし、次いで、Perm/Wash緩衝液にて2回洗浄した。最後に、適切な二次抗体を用いて細胞を4℃で30分間インキュベートし、次いで、Perm/Wash緩衝液で2回洗浄してから、BD FACS Canto IIで解析した。

【0070】

以下の希釈の一次抗体を使用した。ウサギ抗インスリン（1:100；カタログ番号C27C9、米国マサチューセッツ州のCell Signaling）、マウス抗インスリン（1:100；カタログ番号ab6999、米国マサチューセッツ州のAbcam）、マウス抗グルカゴン（1:1250；カタログ番号G2654；Sigma-Aldrich）、ウサギ抗シナプトフィジン（1:100；カタログ番号A0010、米国カリフォルニア州のDako）、ウサギ抗クロモグラニンA（1:800；Dako）、マウス抗NKX6.1（1:50；DSHB、米国アイオワ州のUniversity of Iowa）、マウス抗CDX2（1:250；Invitrogen）、ヤギ抗NeuroD（1:500；R&D Systems）、マウス抗SOX2（米国カリフォルニア州のBD）、マウス抗NKX2.2（DSHB）、マウス抗Pax6（米国カリフォルニア州のBD）、マウス抗PDX-1（米国カリフォルニア州のBD）。以下の希釈で二次抗体を使用した。ヤギ抗マウスAlexa 647（1:500；Invitrogen）、ヤギ抗ウサギPE（1:200；Invitrogen）、ロバ抗ヤギ（1:800；Invitrogen）。二次抗体を添加後に、試料を4℃で30分間インキュベートし、次いで、Perm/Wash緩衝液にて最終洗浄した。BD FACS Divaソフトウェアを使用して細胞をBD FACS Canto IIで解析し、少なくとも30,000イベントを獲得した。

【0071】

図1A～図1Gは、実施例1に従って分化し、S3の2日目に解析した細胞のアイソタイプコントロール（図1A）、クロモグラニン（図1B）、KI-67（図1C）、NKX6.1（図1D）、SOX2（図1E）、CDX2（図1F）、PDX-1（図1G）のFACSヒストグラム発現プロファイルを図示する。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。ステージ3の2日目に、細胞の95%以上がPDX-1（図1G）の発現について陽性であり、集団の細胞の約60%がSOX2（図1E）の発現について陽性であったが、CDX2（図1F）若しくはNKX6.1（図1D）、又はクロモグラニン（図1B）について陽性であったのは細胞の10%未満であった。KI-67陽性細胞の百分率の高さによって示されているように、ステージ3では、有意な百分率の細胞が活性細胞周期にあった（図1C）。

【0072】

図2A～図2Gは、実施例1に従って分化し、S4の2日目に収穫した細胞の、FACS染色により決定したアイソタイプコントロール（図2A）、クロモグラニン（図2B）、KI-67（図2C）、NKX6.1（図2D）、SOX2（図2E）、CDX2（図2F）、PDX-1（図2G）の発現プロファイルを図示する。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。ステージ3と同様に、細胞の95%以上がPDX-1（図2G

）の発現について陽性であったが、CDX2の発現（図2F）については細胞の約10%が陽性であり、NKX6.1の発現（図2D）については細胞の約40%が陽性であった。SOX2の発現（図2E）については細胞の約45%が陽性であり、これはS3より60%低い。クロモグラニンの発現は約3%であった（図2B）。KI-67陽性細胞（図2C）の百分率の高さによって示されているように、ステージ4では、有意な百分率の細胞が活性細胞周期にあった。

【0073】

図3A～図3Gは、本実施例に概略を記載した分化プロトコルに続いて、ステージ5の2日目に収穫した細胞のFACS解析により決定した相対発現プロファイルを図示する。図3A：アイソタイプコントロール；図3B：クロモグラニン；図3C：KI-67；図3D：NKX6.1；図3E：SOX2；図3F：CDX2；図3G：PDX-1。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。ステージ3及び4と同様に、細胞の95%以上がPDX-1の発現について陽性であったが、CDX2の発現については細胞の約10%が陽性であり、NKX6.1の発現については細胞の約67%以上が陽性であった。SOX2の発現は約50%であり、ステージ3と比較すると低い、S4での発現と同様であった。

【0074】

図4A～図4Gは、本実施例に概略を記載したプロトコルに従った分化のステージ5の7日目に収穫し解析した細胞のFACS染色により測定したときのPDX-1（図4G）、NKX6.1（図4D）、CDX2（図4F）、SOX2（図4E）、Ki-67（増殖マーカー；図4C）、及びクロモグラニン（膵内分泌腺マーカー；図4B）の発現を図示する。ステージ3及び4と同様に、細胞の>90%がPDX-1について陽性であったが、CDX2の発現は10%未満であり、NKX6.1の発現は>70%に有意に増加し、SOX2の発現は約2%に劇的に減少した。

【0075】

更に、SOX2、CDX2、及びNKX6.1を発現する細胞の大部分は、クロモグラニンの発現について陰性であった（図5A～図5Cを参照）。したがって、本実施例に概略を記載したプロトコルに従って調製されたS5の培養物がもたらす細胞の集団において、細胞の少なくとも50%はPDX-1及びNKX6.1を発現するが、CDX2、SOX2、及びクロモグラニンについては陰性である。表Iは、S3～S5の様々な内胚葉マーカーの発現百分率をまとめたものである。

【0076】

【表1】

表I S3～S5の内胚葉マーカーの平均発現率

	合計*	%PDX-1+	%PDX-1+及びSOX2+	% PDX-1+ NKX6.1+及びSOX2-	%PDX-1+ CDX2+	%PDX-1+ NKX6.1+ SOX2+
ステージ3 2日	7	96	60	0	<5	0
ステージ4 2日	9	97	45	~40	<5	<5
ステージ5 2日	11	95	50	~42	<10	<25
ステージ5 7日後	16	92	<2	~70	<5	<2

*分化開始以降の総日数

【0077】

図6A～図6Tは、本実施例で概説したプロトコルに従って分化したS2、S3、S4、及びS5の細胞のリアルタイムPCRによって測定し、未分化H1細胞における発現の倍数変化として報告したmRNA発現プロファイルを図示する。ステージ3で、FOXe

1 (図6C) 及びNKX2.1 (図6E) のような前方前腸マーカーの非常に低い発現が認められた。しかし、腸管の胃領域をマークするSOX2 (図6M) 及びOSR1 (図6H) はステージ3で有意に上方調節され、それらの発現はS4～S5で低下した。PTF1a (図6K)、NKX6.1 (図6G)、及びPDX-1 (図6I) のような膵臓内胚葉マーカーは、培養のS5の2日目に最大発現レベルに達した。PDRデータは、細胞がステージ3でPDX-1 + SOX2 + 集団を通じた移行を経てからS4～S5でPDX-1 + NKX6.1 + SOX2 - CDX2 - になることを示している (図6I、図6G、図6M、及び図6Aを参照)。内分泌マーカー (クロモグラニン、インスリン、グルカゴン、及びソマトステイン) の発現は、S5の終わりに最大発現レベルに達した。膵内分泌前駆細胞マーカーNKX2.2、NeuroD、及びNGN3の発現は、S4～S5で最大発現レベルに達した。ZIC1及びSOX17のような他の系統のマーカーの発現は、S4～S5で低いままであった。

【0078】

結論として、本実施例で概説したプロトコルに従って分化したステージ5の2日目の細胞は、CDX2及びSOX2を低レベルで発現する一方で、NKX6.1及びPDX-1の高い発現レベルを維持する。タイムリーなBMP阻害、S4～S5での低用量RAの使用、及びS1～S2での高グルコースの使用という独特の組み合わせが、実施例1に記載の細胞集団を結果的にもたらしたと考えられる。

【0079】

(実施例2)

BMPの阻害及びPKC活性化がS3～S4でSOX2の発現に与える影響

本実施例で概説したプロトコルは、BMPの阻害、FGF7の添加、及びPKCの活性化がS3～S4でのSOX2の発現に与える影響を明らかにするために行った。

【0080】

ヒト胚性幹細胞株H1の細胞は、多様な継体 (継体40～継体52) で収穫し、10 μ MのY27632を追補したmTers (登録商標) 1培地において、単一細胞として、1 cm^2 当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL (商標) (1:30希釈) で被覆された皿上に播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1 (胚体内胚葉 (DE) - 3日) : DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS (Mg又はCaなし) で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL (商標) 被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012 g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、2.5 mMのD-グルコース、100 ng/mLのGDF8、1.5 μ MのMCX化合物 (GSK3B阻害剤) を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、2日目～3日目にかけて、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012 g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、2.5 mMのグルコース、及び100 ng/mLのGDF8を追補したMCDB-131培地で処理した。

b. ステージ2 (原腸管 - 3日) : ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012 g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax (商標)、2.5 mMのD-グルコース、及び50 ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

c. ステージ3 (前腸 - 3日) : ステージ2の細胞を、50 ng/mLのFGF7、50 nM又は200 nMのLDN-193189、及び/又は200 nMのTPBの存在下若しくは非存在下で、ITS-Xの1:200希釈、2.5 mMのグルコース、1X GlutaMax (商標)、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μ MのSANT-1、20 ng/mLのアクチビン-A、2 μ MのRAを追補したMCDB-131培地で処理した。下の表IIに記載した組み合わせを用いた培地にて細胞を3日間インキュベートした。

【0081】

【表2】

表 I I ステージ3 の処理

処理	AA	FGF7	LDN-193189	SANT	RA	TPB
1	+	+	200nM+	+	+	-
2	+	+	-	+	+	-
3	+	-	-	+	+	-
4	+	+	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+
6	+	+	50nM	+	+	-

10

【0082】

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞-3日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、200nMのTPB、400nMのLDN-193189、2μMのAlk5阻害剤（SD-208、Molecular Pharmacology 2007, 72:152~161に開示されている）、及び100nMのCYP26A阻害剤（N-{4-[2-エチル-1-(1H-1,2,4-トリアゾル-1-イル)ブチル]フェニル}-1,3-ベンゾチアゾール-2-アミン、ベルギー、Janssen）を追補したMCD B-131倍地で3日間処理した。

20

【0083】

上記の全ての条件に関し、mRNAをS2~S4で収集し、リアルタイムPCRを用いて解析した。S3の対照条件は、FGF7、AA、SANT、RA、及び200nMのLDN-193189を上記の工程cに記載されている濃度で用いた培養物を指す。図7A~図7Gに示したPCRデータにより明らかなように、S3でのLDN-193189の除去は、NGN3のような内分泌マーカー（図7D）及びクロモグラニンのような膵内分泌マーカー（図7Cを参照）の有意な減少をもたらした。S3でのPKC活性化剤の添加及びLDN-193189の除去は、内分泌マーカーを更に減少させる一方でNKX6.1の発現を高めた（図7A~図7Gを参照）。更に、50nMのLDN-193189の添加は、内分泌マーカー（クロモグラニン及びNGN3）の誘導において200nMのLDN-193189に匹敵する有効性を有した。S3でのLDN-193189の除去及びTPBの添加は、CDX2（図7E）及びアルブミン（図7F）の発現を高める一方でSOX2（図7G）の発現を抑制した。更に、FGF7及びLDN-193189の両方の除去は、LDN-193189を除去しFGF7を保持した培養物と比較して、有意にSOX2（図7G）の発現を高め、アルブミン（図7F）の発現を低下させた。これらのデータは、BMPの阻害、FGFの活性化、及びPKCの活性化の正確な調節が、PDX-1及びNKX6.1が豊富な一方でCDX2、SOX2及びアルブミンが低い内胚葉ドメインをもたらし得ることを実証している。最後に、S3~S4でのBMPの持続的な阻害は、プロ内分泌遺伝子の発現及びSOX2発現の上方調節を高めた。このことは、膵内分泌遺伝子を増す一方で、膵臓の発達においては欠如しているか又は低いが胃のような前方前腸内胚葉臓器に存在するSOX2の発現を上方調節しないように、BMPの阻害を正確に調整する必要があることを裏付けている。

30

40

【0084】

（実施例3）

続いて内分泌マーカーを誘導するには、前腸ステージでのBMPの早期阻害が必要である。

50

本実施例は、続いて内分泌マーカーを誘導するにはS3でBMPシグナル伝達を早期に阻害する必要があることを示す。しかし、ステージ3でのBMPの持続的な阻害もまた、SOX2の強発現を結果としてもたらす。内分泌マーカーの高発現及びSOX2の低発現の両方を得るためには、SXO2及びCDX2の低発現を有する一方でプロ膵内分泌マーカーを誘導するBMP阻害の勾配が必要である。

【0085】

ヒト胚性幹細胞株H1の細胞は、多様な継体（継体40～継体52）で、10 μ MのY27632を追補したmT es r（商標）1培地において、単一細胞として、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）で被覆された皿上に播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1（胚体内胚葉（DE）－4日）：DEの開始の前に、細胞を洗浄し、不完全なPBS（Mg又はCaなし）で30秒間インキュベートし、次いで、S1の培地にてインキュベートした。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、1.5 μ MのMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8を追補したMCDB-131培地で2日間（2～4日目）処理した。

b. ステージ2（原腸管－3日）：ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、及び50ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

c. ステージ3（前腸－3日）：ステージ2の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μ MのSANT-1、20ng/mLのアクチビン-A、2 μ MのRA、50ng/mLのFGF7、100nMのLDN-193189（1日目のみ又はステージ3の期間中）、及び200nMのTPBを追補したMCDB-131培地で処理した。いくつかの培地では、LDN-193189をステージ3から除去した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞－3日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μ MのSANT-1、100nMのTPB、200nMのLDN-193189、2 μ MのALK5阻害剤、及び100nMのCYP26A阻害剤を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

e. ステージ5（膵臓内胚葉／内分泌－4日）：ステージ4の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、200nMのLDN-193189、及び2 μ MのALK5阻害剤を追補したMCDB-131培地で4日間処理した。

【0086】

図8A～図8Gに示すPCRの結果により明らかなように、ステージ3からのLDN-193189（BMP阻害剤）の除去は、ステージ4及びステージ5でのプロ内分泌遺伝子NGN3（図8C）、NeuroD（図8D）、クロモグラニン（図8E）の発現を止める。しかし、PDX-1（図8B）及びNKX6.1（図8A）の発現は、ステージ4～5でのNGN3及びNeuroDと比較して有意に下方調節されない。更に、ステージ3でのLDN-193189の完全な除去は、CDX2の発現の有意な増加をもたらす（図7F）。ステージ3の初日のLDN-193189の添加の後、ステージ3の2～3日目にそれを除去することは、NGN3及びNeuroDの発現を有意に高める一方で、ス

10

20

30

40

50

ページ4でのCDX2及びSOX2の発現を減少させた。ステージ3の期間中LDN-193189を保持した培養物は、S3～S4でSOX2の非常に高い発現を示した(図8G)。このデータは、ステージ3の1日目のBMPの阻害が、膵内分泌マーカーをトリガする一方でSOX2及びCDX2の発現を抑制するのに十分であることを示している。

【0087】

要約すると、ステージ4～5に内分泌前駆細胞の形成を誘導し、かつPDX-1及びNKX6.1の発現を維持し、その一方でSOX2の発現を抑制するために、BMPの阻害はステージ3の1日目に必要である。更に、ステージ3でのPKC活性剤の添加は、PDX-1及びNKX6.1の発現を更に高めた。

【0088】

(実施例4)

ステージ3の1日目でのBMPシグナル伝達の阻害は、ステージ4で膵臓前駆細胞を生成するために十分であり、一方、ステージ3の最終日でのBMPシグナル伝達の阻害は、内分泌マーカーの発現の有意な低下をもたらす。

本実施例は、ステージ3でのBMPシグナル伝達の早期阻害が、膵内分泌前駆細胞マーカーの誘導を可能にし、一方、ステージ3の後期でのBMPシグナル伝達の阻害が、ステージ4での内分泌前駆細胞マーカーの発現レベルを有意に低下させることを示している。

【0089】

多様な継体(継体40～継体52)のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、 $10\mu\text{M}$ のY27632を追補したmTesr(商標)1培地において、単一細胞として、 1cm^2 当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)で被覆された皿上に播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1(胚体内胚葉(DE)-4日): DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS(Mg又はCaなし)で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL(商標)被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ (商標)、 2.5mM のD-グルコース、 100ng/mL のGDF8、及び $1.5\mu\text{M}$ のMCX化合物(GSK3B阻害剤)を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ (商標)、 2.5mM のグルコース、及び 100ng/mL のGDF8を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

b. ステージ2(原腸管-3日): ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ (商標)、 2.5mM のD-グルコース、及び 50ng/mL のFGF7を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

c. ステージ3(前腸-3日): ステージ2の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、 2.5mM のグルコース、 $1\times\text{GlutaMax}$ (商標)、 0.0015g/mL の重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $0.25\mu\text{M}$ のSANT-1、 50ng/mL のFGF7、 $2\mu\text{M}$ のRA、及び下の表IIIに記載した混合物を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

【0090】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 I I I ステージ 3 の処理

		20ng/mLのAA	LDN-193189	1 μ MのAlk5阻害剤 (SCIO化合物)	TPB
A	S3D1 D2-3	+ +	- -	- -	+200nM +200nM
B	D1 D2-3	- +	+100nM -	+1 μ M -	- +200nM
C	D1 D2-3	- +	+100nM -	+1 μ M -	+100nM +200nM
D	D1 D2-3	- +	+100nM -	+1 μ M -	+200nM +200nM
E	D1 D2-3	+ +	- +100nM(3日目のみ)	- -	+100nM +100nM

【0091】

d. ステージ 4 (臍臓前腸前駆細胞-3日): ステージ 3 の細胞を、ITS-X の 1 : 200 希釈、2.5mM のグルコース、1X GlutaMax (商標)、0.0015 g/mL の重炭酸ナトリウム、2% の無脂肪酸 BSA、0.25 μ M の SANT-1、100nM の TPB、200nM の LDN-193189、2 μ M の Alk5 阻害剤、及び 100nM の CYP26A 阻害剤を追補した MCDB-131 培地で 3 日間処理した。

【0092】

図 9A~図 9H は、上記の培養条件の組み合わせに関しての臍臓内胚葉、内分泌前駆細胞、及び前腸内胚葉マーカーの遺伝子発現プロファイルを図示する。前述の実施例と同じく、ステージ 3 の 1 日目の BMP 経路の遮断は、臍内内分泌マーカー、クロモグラニンの発現による測定でのその後の内分泌プログラムの誘導のために重要である (図 9C を参照)。しかし、ステージ 3 の 1 日目での BMP 阻害剤の添加は、後続ステージでの内分泌マーカーの発現をトリガする。更に、ステージ 3 の 1 日目での BMP 阻害剤の添加はまた、ステージ 3~4 で、前腸マーカーである SOX2 の発現を減少させた (図 9H)。しかし、ステージ 3 の最終日でのみ BMP 阻害剤を添加することは、ステージ 3 の 1 日目でのみ BMP 阻害剤で処理した細胞と比較して、ステージ 3 の終わりに、SOX2 の有意により高い発現を示す。図 9A~図 9H に示す発現レベルは、SOX2 の非常に高い発現レベルを有する未分化 H1 細胞の発現レベルに相対している。前方前腸のマーカーであることに加えて、SOX2 は、ES 細胞の多能性の維持において重要な周知の転写因子である。本実施例は、BMP シグナル伝達の持続期間及び動力学に対するステージ 3 培養物の感度並びにその後の SOX2 の臍内内分泌誘導及び発現への影響を明らかにした前述の結果を更に裏付けている。

【0093】

(実施例 5)

臍臓前腸ステージ (ステージ 4) での BMP 阻害の最適用量

前述の実施例では、ステージ 3 での BMP 阻害の最適な期間について説明した。本実施例では、S4 の培地での BMP 阻害剤の最適な用量を特定する。

【0094】

多様な継体 (継体 40~継体 52) のヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞を、mTsr (商標) 1 培地において、10 μ M の Y27632 と、1 cm² 当たり細胞 100,000 個の濃度で、MATRIGEL (商標) (1:30 希釈) で被覆された皿上に単一細胞として播種した。播種から 48 時間後に、培養物を以下のように臍内内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ 1 (胚体内胚葉 (DE) - 4日): DE の開始の前に、培養物を洗浄し、不完全な PBS (Mg 又は Ca なし) で 30 秒間インキュベートし、次いで、ステージ 1

の培地を加えた。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、1μMのMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、2日目～4日目にかけて、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8を追補したMCDB-131培地で処理した。

b. ステージ2（原腸管－3日）：ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、及び50ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

c. ステージ3（前腸－4日）：ステージ2の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、50ng/mLのFGF7、2μMのRA、20ng/mLのアクチビン-A、100nMのLDN-193189、及び100nMのTPBを追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、50ng/mLのFGF7、2μMのRA、20ng/mLのアクチビン-A、及び100nMのTPBを追補したMCDB-131培地中で3日間処理した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞－4日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、200nMのLDN-193189、2μMのALK5阻害剤、100nMのCYP26A阻害剤、及び表IV（下記）に記載した濃度のLDN-193189（LDN-193189-193189）を追補したMCDB-131

培地で、ステージ4の1～4日目にかけて処理した。

【0095】

【表4】

表IV S4で使用したLDN-193189の濃度

	条件A	条件B	条件C	条件D	条件E
S4D1	100nM	50nM	10nM	10nM	10nM
S4D2	50nM	10nM	50nM	10nM	10nM
S4D3	10nM	10nM	100nM	50nM	10nM
S4D4	10nM	10nM	100nM	50nM	10nM

【0096】

d. ステージ5（膵臓内胚葉／内分泌前駆細胞－3日）：ステージ4の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、50nMのLDN-193189、及び1μMのALK5阻害剤を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

【0097】

上記の処理後に収穫した細胞のリアルタイムPCR解析の結果を図10A～図10Hに示す。この図は、50nM又は100nMのLDN-193189をS4の1日目又は2日目又は3日目又は4日目に添加することが、内分泌マーカーの発現を延長する一方でS

4～S5でのSOX2の低発現を維持することができることを示している（図10A～図10Hを参照）。

【0098】

（実施例6）

前腸ステージ（ステージ3）でのBMP阻害の最適用量

本実施例は、ステージ3でのBMP阻害の最適用量、及びその後のステージ6での内分泌マーカーへの影響を特定する。

【0099】

ヒト胚性幹細胞株H1の細胞は、多様な継体（継体40～継体52）で、 $10\mu\text{M}$ のY27632を追補したmTesr（商標）1培地において、単一細胞として、 1cm^2 当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）で被覆された皿上に播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1（胚体内胚葉（DE）－4日）：DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS（Mg又はCaなし）で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、 100ng/mL のGDF8、及び $1.5\mu\text{M}$ のMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、2日目～4日目にかけて、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのグルコース、及び 100ng/mL のGDF8を追補したMCDB-131培地で処理した。

b. ステージ2（原腸管－3日）：ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、2.5mMのD-グルコース、及び 50ng/mL のFGF7を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

c. ステージ3（前腸－3日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $0.25\mu\text{M}$ のSANT-1、 50ng/mL のFGF7、 $2\mu\text{M}$ のRA、 20ng/mL のアクチビン-A、 100nM のTPB、及び $10\sim50\text{nM}$ のLDN-193189を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $0.25\mu\text{M}$ のSANT-1、 50ng/mL のFGF7、 $2\mu\text{M}$ のRA、 20ng/mL のアクチビン-A、及び 100nM のTPBを追補したMCDB-131培地で2日間処理した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞－3日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 20nM のLDN-193189、 $2\mu\text{M}$ のALK5阻害剤、 100nM のCYP26A阻害剤、及び 100nM のTPBを追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

e. ステージ5（膵臓内胚葉／内分泌前駆細胞－3日）：ステージ4の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $+/-25\text{nM}$ のLDN-193189、及び／又は $2\mu\text{M}$ のALK5阻害剤を追補したMCDB-131培地で3日間処理した。

f. ステージ6（膵内内分泌ホルモン生成－3日）：ステージ5の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、及び2%の無脂肪酸BSAを追補したMCDB-1

10

20

30

40

50

31倍地で3日間処理した。

【0100】

図11A～図11Hは、内分泌マーカーの発現をトリガする一方でSOX2の低発現を維持するには、ステージ3の1日目のBMPの低～中等度の阻害が必要であることを示している。更に、内分泌マーカーを高めながらステージ5でBMPを阻害することまた、SOX2の発現の上方調節につながった。

【0101】

本実施例のデータは、これまでの実施例で提示した結果を更に確定する。このデータは、SOX2の発現を抑制しながら膵内分泌マーカーの誘導をトリガするにはステージ3～5でのBMP経路の正確な調整が必要であることを裏付けている。

【0102】

(実施例7)

S3(前腸ステージ)でのBMP阻害の最適な時間枠

本実施例は、後のステージでの内分泌の誘導を保持しつつSOX2の発現を減少させながら、BMPシグナル伝達を阻害するための、ステージ3における最適な時間枠を特定する。

【0103】

多様な継体(継体40～継体52)のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、mTsr(商標)1培地において、10μMのY27632と、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)で被覆された皿上に単一細胞として播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1(胚体内胚葉(DE)－4日): DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS(Mg又はCaなし)で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL(商標)被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、2.5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、及び1.5μMのMCX化合物を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、2日目～4日目にかけて、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、2.5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8を追補したMCDB-131倍地で処理した。

b. ステージ2(原腸管－3日): ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、2.5mMのD-グルコース、及び50ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131倍地で3日間処理した。

c. ステージ3(前腸－3日): ステージ2の細胞を、ステージ3の最初の2時間のみ又は6時間のみ又は24時間のみ、ITS-Xの1:200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25μMのSANT-1、50ng/mLのFGF7、2μMのRA、20ng/mLのアクチビン-A、及び100nMのTPBを追補した、100nMのLDN-193189を含有するMCDB-131倍地で処理した。

d. ステージ4(膵臓前腸前駆細胞－3日): ステージ3の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、25nMのLDN-193189、2μMのALK5阻害剤、100nMのCYP26A阻害剤、及び100nMのTPBを追補したMCDB-131倍地で3日間処理した。

e. ステージ5(膵臓内胚葉/内分泌前駆細胞－3日): ステージ4の細胞を、ITS-Xの1:200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax(商標)、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、及び2μMのALK5阻害剤を追補したMCDB-131倍地で3日間処理した。

10

20

30

40

50

【0104】

図12A～図12Gは、本実施例で収集したデータのリアルタイムPCR解析を示す。ステージ3で少なくとも2時間BMP阻害剤で処理することは、Ngn3（図12D）及びNeuroD（図12E）のようなプロ内分泌転写因子の発現をトリガする一方で、SOX2（図12G）の非常に低い発現を維持することができ、S4～S5でのNKX6.1（図12A）及びPDX-1（図12B）の発現を有意に増加させる。しかし、ステージ5の3日目に、CDX2の発現は、BMP阻害剤で24時間処理した細胞よりも、その阻害剤で2時間又は6時間処理した細胞においての方が高かった（図12F）。

【0105】

本実施例のデータは、CDX2の発現及びSOX2の発現を低レベルに維持するために、及び膵臓内胚葉マーカーの高発現を維持する一方で内分泌の分化を開始するために、BMP経路の24時間の阻害が最適であることを示唆している。

【0106】

（実施例8）

ステージ3（前腸段階）及びステージ4（膵臓前腸前駆細胞ステージ）の最適な期間

本実施例は、膵内分泌系統の細胞集団への多能性細胞の段階的分化におけるS3及びS4の最適な期間を決定するために実施した。

【0107】

多様な継体（継体40～継体52）のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、 $10\mu\text{M}$ のY27632を追補したmTesr（商標）1培地において、単一細胞として、 1cm^2 当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）で被覆された皿上に播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1（胚体内胚葉（DE）－4日）：DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS（Mg又はCaなし）で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 2.5mM のD-グルコース、 100ng/mL のGDF8、 $1.5\mu\text{M}$ のMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、2日目～4日目にかけて、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 2.5mM のグルコース、及び 100ng/mL のGDF8を追補したMCDB-131培地で処理した。

b. ステージ2（原腸管－2日）：ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、 0.0012g/mL の重炭酸ナトリウム、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 2.5mM のD-グルコース、及び 50ng/mL のFGF7を追補したMCDB-131培地で2日間処理した。

c. ステージ3（前腸－2～3日）：ステージ2の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、 2.5mM のグルコース、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 0.0015g/mL の重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $0.25\mu\text{M}$ のSANT-1、 50ng/mL のFGF7、 $2\mu\text{M}$ のRA、 20ng/mL のアクチビン-A、 100nM のTPBを追補した、 100nM のLDN-193189を含有するMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、ITS-Xの1：200希釈、 2.5mM のグルコース、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 0.0015g/mL の重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 $0.25\mu\text{M}$ のSANT-1、 50ng/mL のFGF7、 $2\mu\text{M}$ のRA、 20ng/mL のアクチビン-A、及び 100nM のTPBを追補したMCDB-131培地で処理した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞－2～3日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、 2.5mM のグルコース、 $1\times\text{GlutaMax}$ （商標）、 0.0015g/mL の重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、 25nM のLDN-1931

10

20

30

40

50

89、100 nMのCYP26A阻害剤、及び100 nMのTPBを追補したMCDB-131倍地で2～3日間処理した。

e. ステージ5（臍臓内胚葉／内分泌前駆細胞－2日）：ステージ4の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5 mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、及び1 μMのALK5阻害剤を追補したMCDB-131倍地で2日間処理した。

f. ステージ6（臍内分泌前駆細胞／ホルモン－2日）：ステージ5の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5 mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、及び2%の無脂肪酸BSAを追補したMCDB-131倍地で2日間処理した。

【0108】

ステージ3、ステージ4、ステージ5、又はステージ6で収穫した試料のリアルタイムPCR解析のデータを図13A～図13Gに示す。このデータは、S3及びS4が2日間である培養と比較して、S3及びS4を3日間に延長することがNKX6.1の発現を高めることを示す（図13A）。ステージ3で3日間処理した細胞は、S3及びS4の期間が2日間だけである培養と比較したとき、プロ内分泌マーカーの発現の下方調節を示す（図13D及び図13E）。更に、ステージ4を3日間に延長することは、SOX2の発現を有意に高めた（図13G）。

【0109】

本実施例で得たデータは、これまでの実施例で生成されたデータと同じく、延長されたBMP阻害が前腸をSOX2の高い集団の方へ促すことを示している。本実施例及び前述の実施例からのデータに基づき、ステージ3及びステージ4の最適な期間は2日間であると結論することができる。理想的なプロトコルは、プロ内分泌マーカーの高レベルの発現、NKX6.1の高発現、CDX2の低発現、及びSOX2の低発現を伴う分化された細胞をもたらすであろう。

【0110】

（実施例9）

高グルコース及びB27サプリメントの存在下での、BMPの阻害への長時間の曝露は、S3及びS4のSOX2の発現を有意に増加させる。

このプロトコルは、ホルモン産生細胞への多能性細胞の段階的分化の間にS3及びS4でのSOX2の発現に影響を与える因子を決定するために行った。

【0111】

ヒト胚性幹細胞株H1の細胞は、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）被覆皿上で培養し、mTsr（商標）1培地で70%のコンフルエンスまで培養し、以下のように分化した。

a. 未分化細胞を、0.2% FBS、100 ng/mLのアクチビンA、20 ng/mLのWNT-3aが追補されたRPMI培地（Invitrogen）中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FBS、100 ng/mLのアクチビンAが追補されたRPMI培地で更に2日間処理した（ステージ1）。

b. ステージ1の細胞を、2% FBS、50 ng/mLのFGF7を添加したDMEM/F12培地で3日間処理した（ステージ2）。

c. ステージ2の細胞を、1%のB27、0.25%のSANT-1、2 μMのRA、100 ng/mLのノギン（米国ミネソタ州のR & D systems）が追補されたDMEM-高グルコース培地中で4日間培養した（ステージ3）。

d. ステージ3の細胞を、1%のB27、100 ng/mLのノギン、1 μMのALK5阻害剤II（米国カリフォルニア州のAxora）、及び50 nMのTPBが追補されたDMEM-高グルコース培地にて4日間処理した（ステージ4）。

【0112】

図14A～図14Hは、以下のマーカーに関して得られたステージ3の4日目に収穫した細胞のFACSヒストグラムを図示する：アイソタイプコントロール（図14A）、ク

10

20

30

40

50

ロモグラニン（図14B）、KI-67（図14C）、NKX6.1（図14D）、SOX2（図14E）、HNF3B（図14F）、CDX2（図14G）、PDX-1（図14H）。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。ステージ3での細胞の大部分は、PDX-1（図14H）及びHNF3B（図14F）の発現について陽性であり、NKX6.1（図14D）の発現について陰性であり、クロモグラニン（図14B）及びCDX2（図14G）について低発現を示した。しかし、90%を超える細胞が、SOX2（図14E）についてもまた強陽性であった。これは、ステージ3では細胞の大部分がPDX-1及びSOX2について陽性かつNKX6.1について陰性であり、膵臓のPDX-1ドメインに前方の前腸集団と一貫した内胚葉集団の確立を示唆している。

【0113】

更に、本実施例で概要を述べたプロトコルを用いて生成した細胞集団において、ステージ3でSOX2+であった細胞の百分率は、実施例1に概要を述べたプロトコルを用いて生成した細胞集団においてSOX2+であった細胞の百分率より有意に高かった。この差は、本実施例のステージ3での培養培地における、BMPアンタゴニスト（ノギン）への長時間の曝露並びにFGF7及びPKC活性化剤の欠如に起因し得る。

【0114】

図15A～図15Gは、実施例9に従って分化した、S4の2日目の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。図15A：アイソタイプコントロール、図15B：NKX6.1、図15C：KI-67、図15D：クロモグラニン、図15E：SOX2、図15F：CDX2、図15G：PDX-1。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【0115】

図16A～図16Fは、実施例9に従って分化された細胞のS4の4日目の以下のマーカーのFACSヒストグラム発現プロファイルを示す。図16A：アイソタイプコントロール、図16B：NKX6.1、図16C：クロモグラニン、図16D：SOX2、図16E：CDX2、図16F：PDX-1。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【0116】

下の表Vは、本実施例に概要を述べたプロトコルに従って分化した細胞のS3及びS4での内胚葉マーカーの発現率（%）について得られたデータをまとめたものである。

【0117】

【表5】

表V S3～S4の内胚葉マーカーの発現率（%）

ステージ (日数)	分化開始 以降の 総日数	% PDX-1+	% PDX-1+ SOX2+	% PDX-1+ NKX6.1+ SOX2-	% PDX-1+ CDX2+	% PDX-1+ NKX6.1+ SOX2+
ステージ3 4日	10日	95	92	<1	<5	<1
ステージ4 2日	12日	85	83	<1	~6	~30
ステージ4 4日	14日	95	75	<5	~7	~50

【0118】

図17A～図17Jは、実施例9に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞における以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析の結果を示す。図17A：CDX2、図17B：HHex、図17C：FOX E1、図17D：IPF1（PDX-1）、図17E：NKX2.1、図17F：NKX2.2、図17G：NKX6.1、図17H：PROX1、図17I：SOX2、図17J：SOX9。

【0119】

図14～図17及び表Vに見られるように、ステージ4の2日目から4日目に、NKX6.1の有意な増加があり、一方、PDX-1の高発現は維持された。ステージ3からス

ステージ 4 にかけて SOX2 の発現は低下したが、75% までの細胞がなお SOX2+ であった。図 5 と同じく、CDX2+ 細胞、SOX2+ 細胞、及び NKX6.1+ 細胞は、クロモグラニン集団から相互排他的であった。これは、実施例 9 に概要を述べたプロトコルを用いて生成したステージ 4 の 4 日目の細胞集団の NKX6.1+ SOX2+ PDX-1+ CDX2- クロモグラニン陰性の割合が 50% までであることを示唆している。これは、S4~S5 に PDX-1+ NKX6.1+ SOX2-、CDX2-、クロモグラニン陰性の割合が約 40~70% で、PDX-1+ NKX6.1+ SOX2+ が 2~25% であった実施例 1 で生成された細胞集団と対照的である。明らかに、実施例 1 のプロトコルを用いて生成された細胞は、PDX-1+ かつ NKX6.1+ でありながらも実施例 9 で生成された細胞と比較して SOX2 及び CDX2 について低い又は陰性の集団として定義されたように、はるかに高い膵臓内胚葉の百分率を有していた。

10

【0120】

本実施例で得たデータは、高グルコース及び B27 サプリメントの存在下での BMP 阻害への長時間の曝露がステージ 3 及び 4 の分化での SOX2 の発現を有意に増加させることの裏付けを提供するものである。

【0121】

(実施例 10)

これまでに公開されたプロトコルは、ステージ 3~4 で有意な数の SOX2+ の集団の形成をもたらす。

Kroon らは、ヒト胚性幹細胞からの膵臓内胚葉系統の細胞を調製するためのプロトコルを公開している (Nature Biotech 2008, 26: 443~452、これ以降においては「Kroon」)。本明細書において提供される実施例においては、ヒト胚性幹細胞は、Kroon のプロトコルに従って分化させ、分化の異なる段階に特徴的なマーカーの発現についてアッセイした。

20

【0122】

ヒト胚性幹細胞株 H1 の細胞を MATRIGEL (商標) (1:30 希釈) 被覆皿上に播種し、70% のコンフルエンスまで mTsr (商標) 培地中で培養し、Kroon によりこれまでに公開されているプロトコルを用いて以下のように分化した。

a) 未分化細胞を、0.2% の FBS、100 ng/mL のアクチビン A、20 ng/mL の WNT-3a が追補された RPMI 培地に 1 日曝露した後、0.5% の FBS、100 ng/mL のアクチビン A が追補された RPMI 培地にて更に 2 日間処理した (ステージ 1)。

30

b) ステージ 1 の細胞を、2% の FBS、50 ng/mL の FGF7 を添加した RPMI 培地で 3 日間処理した (ステージ 2)。

c) ステージ 2 の細胞を、1% の B27、0.25 µM の SANT-1、2 µM の RA、50 ng/mL のノギン (ミネソタ州の R & D systems) が追補された DMEM-高グルコース培地にて 3 日間処理した (ステージ 3)。

d) ステージ 3 の細胞を、1% の B27 が追補された DMEM-高グルコース培地中で 3 日間培養した (ステージ 4)。

e) ステージ 4 の細胞をウェルから掻き取り、1% の B27 が追補された DMEM-高グルコース培地中にクラスターとして 2 日間再懸濁した。

40

【0123】

図 18A~図 18G は、実施例 10 に従って分化した、S3 の 3 日目の以下のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。アイソタイプコントロール (図 18A)、NKX6.1 (図 18B)、クロモグラニン (図 18C)、SOX2 (図 18D)、CDX2 (図 18E)、KI-67 (図 18F)、PDX-1 (図 18G)。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【0124】

図 19A~図 19G は、実施例 10 に従って分化された細胞の S4 の 5 日目の以下のマーカーの FACS ヒストグラム発現プロファイルを示す。アイソタイプコントロール (図

50

19A)、NKX6.1 (図19B)、クロモグラニン (図19C)、SOX2 (図19D)、CDX2 (図19E)、KI-67 (図19F)、PDX-1 (図19G)。各マーカーの発現百分率を各ヒストグラムに示す。

【0125】

図18及び図19に示されるように、ステージ4の終わり(5日目)までに、懸濁液中の細胞のクラスターの20%までがNKX6.1 + PDX-1 + SOX2-であり、かつ20%までがPDX-1 + NKX6.1 + SOX2+であった。これらの結果は、実施例10に従って生成された細胞集団の有意な割合がステージ4でNKX6.1 + かつSOX2+であったことを示している。

【0126】

下の表VIは、本実施例で生成された細胞のS3～S4での内胚葉マーカーの百分率をまとめたものである。

【0127】

【表6】

表VI Kronに従って分化した細胞のS3～S4の内胚葉マーカーの発現

ステージ (日数)	分化開始 以降の 総日数	%PDX-1+	%PDX-1 + SOX2+	%PDX-1 + NKX6.1 + SOX2-	%PDX-1 + CDX2+	%PDX-1 + NKX6.1 + SOX2+
ステージ3 3日	9日	75	75	<1	<2	<1
ステージ4 5日*	14日	89	52	~20	~10	~20

*懸濁培養物中での最後の2日

【0128】

(実施例11)

アスコルビン酸の添加は、多ホルモン細胞数を有意に減少させ、単一ホルモンのインスリン陽性細胞数を同時に増加させた。

【0129】

ホルモン生成細胞への多能性細胞の分化中のマーカーの発現にアスコルビン酸が与える影響をテストした。以下のように、分化の全ての段階でグルコースを追補し、ステージ3、4及び5の形成でアスコルビン酸を追補した培地中で細胞を培養した。

【0130】

多様な継体(継体40～継体52)のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、mTesar(商標)1培地において、10μMのY27632と、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)被覆皿上に単一細胞として播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように腟内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1(胚体内胚葉(DE)-3日): DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS(Mg又はCaなし)で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL(商標)被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、及び1μMのMCX化合物(GSK3B阻害剤)を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、5mMのグルコース、100ng/mLのGDF8、及び100nMのMCX化合物が追補されたMCDB-131培地で2日目に処理し、続いて、更に1日、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax(商標)、5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8が追補されたMCDB-131培地にて処理した。

b. ステージ2(原腸管-2日): ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、

0.0012 g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのD-グルコース、及び25 ng/mLのFGF7を追補したMCDB-131倍地で2日間処理した。

c. ステージ3（前腸-2日）：ステージ2の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10 ng/mLのアクチビン-A、25 ng/mLのFGF7、0.25 μMのSANT-1、1 μMのRA、200 nMのTPB（PKC活性剤）、100 nMのLDN-193189（BMP受容体阻害剤）を追補したMCDB-131倍地で1日処理した。次いで、細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10 ng/mLのアクチビン-A、25 ng/mLのFGF7、0.25 μMのSANT-1、1 μMのRA、200 nMのTPB（PKC活性剤）、10 nMのLDN-193189を追補したMCDB-131倍地で更に1日処理した。いくつかの培養物は、ステージ3の期間中、0.25 mMのアスコルビン酸（カタログ番号A4544、Sigma、米国ミズーリ州）で処理した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞-2日）：ステージ3の細胞を、0.25 mMのアスコルビン酸あり又はなしで、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μMのSANT-1、50 nMのRA、200 nMのTPB、50 nMのLDN-193189を追補したMCDB-131倍地で2日間処理した。

e. ステージ5（膵臓内胚葉-2～7日）：ステージ4の細胞を、0.25 mMのアスコルビン酸あり又はなしで、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015 g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μMのSANT-1、50 nMのRAを追補したMCDB-131倍地で2～7日間処理した。

【0131】

図20A～図20Jは、実施例11に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞における以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析を示す。図20A：ソマトスタチン、図20B：PDX1、図20C：Pax6、図20D：Pax4、図20E：NKX6.1、図20F：NGN3、図20G：グルカゴン、図20H：NeuroD、図20I：インスリン、図20J：クロモグラニン。この図は、ステージ3、又はステージ3及び4でのアスコルビン酸の添加が、ステージ4～5でソマトスタチン及びグルカゴンの発現を有意に減少させる一方で、インスリンの発現を増加させることを示している（図20A、図20G、及び図20Iを参照）。更に、ステージ4～5で、PDX-1及びNKX6.1のような膵臓内胚葉マーカーの発現は、0.25 mMのアスコルビン酸の添加によって有意に変化しなかった（図20B及び図20Dを参照）。ステージ4～5で、Pax6の発現は下方調節され、Pax4の発現は維持された（図20C及び図20Dを参照）。S3～S5で+/-アスコルビン酸で処理した培養物は、ステージ5の終わりにインスリン、グルカゴン、及びソマトスタチンホルモンに対して免疫染色された。表VIIは、インスリン陽性細胞、グルカゴン及びソマトスタチン陽性細胞、並びに多ホルモン細胞（1つの細胞内で2つ以上のホルモンを発現）の平均百分率をまとめたものである。

【0132】

【表7】

表VII 全ホルモン数の百分率としてのホルモン発現率

処理	単一ホルモンインスリン+(%)	グルカゴン+(%)及びソマトスタチン+(%)	多ホルモン(%)
対照	16	83	50
S3～S4で+アスコルビン酸	55	44	36

10

20

30

40

50

【0133】

(実施例12)

ステージ3でのアスコルビン酸の最適用量

本実施例は、単一ホルモン、PDX-1陽性、かつNKX6.1陽性のインスリン陽性細胞を生成するために使用するアスコルビン酸の最適用量を決定するために実行した。

【0134】

多様な継体（継体40～継体52）のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、mTesar（商標）1培地において、10 μ MのY27632と、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）被覆皿上に単一細胞として播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1（胚体内胚葉（DE）-3日）：DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS（Mg又はCaなし）で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのD-グルコース、及び100ng/mLのGDF8と1 μ MのMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのグルコース、100ng/mLのGDF8、及び100nMのMCX化合物が追補されたMCDB-131培地で2日目に処理し、続いて、更に1日、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8が追補されたMCDB-131培地にて処理した。

b. ステージ2（原腸管-2日）：ステージ1の細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのD-グルコースが追補されたMCDB-131培地で、0.25mMのアスコルビン酸及び25ng/mLのFGF7あり又はなしで、2日間処理した。

c. ステージ3（前腸-2日）：ステージ2の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10ng/mLのアクチビンA、25ng/mLのFGF7、0.25 μ MのSANT-1、+/-0.25mMのアスコルビン酸、1 μ MのRA、及び200nMのTPB、並びに1日目については100nMのLDN-193189が追補されたMCDB-131培地で処理し、続いて、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10ng/mLのアクチビンA、25ng/mLのFGF7、0.25 μ MのSANT-1、+/-0.25mMのアスコルビン酸、1 μ MのRA、及び200nMのTPB、並びに更に1日は10nMのLDN-193189が追補されたMCDB-131培地で処理した。

d. ステージ4（膵臓前腸前駆細胞-2日）：ステージ3の細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μ MのSANT-1、50nMのRA、200nMのTPB、及び50nMのLDN-193189を追補したMCDB-131培地にて、0.25mM～1mMのアスコルビン酸の添加あり又はなしで、2日間処理した。

e. ステージ5（膵臓内胚葉-2～9日）：ステージ4の細胞を、0.25mMのアスコルビン酸の添加あり又はなしで、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、0.25 μ MのSANT-1、及び50nMのRAを追補したMCDB-131培地で2～9日間処理した。

【0135】

図21A～図21Jは、実施例12に従って分化したヒト胚性幹細胞株H1の細胞にお

10

20

30

40

50

ける以下の遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析のデータを示す。図21A：ソマトスタチン、図21B：PDX1、図21C：Pax6、図21D：Pax4、図21E：NKX6.1、図21F：NGN3、図21G：NeuroD、図21H：インスリン、図21I：グルカゴン、図21J：クロモグラニン。実施例10からのデータと一貫し、ステージ2～4でのアスコルビン酸の添加は、ソマトスタチン、グルカゴン、及びPax6の発現を有意に低減する一方で、ステージ5でのインスリン及びPax4の発現を維持した。更に、0.25mMのアスコルビン酸と比較して、S4で0.5～1mMのアスコルビン酸を使用することに有意な利益はなかった。最後に、ステージ2でのアスコルビン酸の添加もまた、ステージS3～5でグルカゴン及びソマトスタチンの発現を低下する一方でインスリンの発現を維持することに有効であることが証明された。したがって、アスコルビン酸は、ステージ特定のやり方で単一ホルモン細胞の発現の調節のために作用する。アスコルビン酸の添加は分化プロトコルの早期ステージで重要であるが、後期ステージでは多ホルモン細胞数を減少するのに有効であると証明されなかった。

【0136】

(実施例13)

レチノイン酸及びアスコルビン酸の組み合わせは、単一ホルモンのインスリン陽性細胞を生成するために必要である。

この実施例は、多能性細胞の分化中に単一ホルモンのインスリン陽性細胞を生成するための要件を明らかにするために実施した。

【0137】

多様な継体（継体40～継体52）のヒト胚性幹細胞株H1の細胞を、mTesar（商標）1培地において、10μMのY27632と、1cm²当たり細胞100,000個の濃度で、MATRIGEL（商標）（1：30希釈）被覆皿上に単一細胞として播種した。播種から48時間後に、培養物を以下のように膵内分泌系統の細胞に分化した。

a. ステージ1（胚体内胚葉（DE）－3日）：DEの開始の前に、培養物を洗浄し、不完全なPBS（Mg又はCaなし）で30秒間インキュベートし、次いで、ステージ1の培地を加えた。MATRIGEL（商標）被覆皿上で単一細胞として培養したヒト胚性幹細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのD-グルコース、100ng/mLのGDF8、1μMのMCX化合物（GSK3B阻害剤）を追補したMCDB-131培地で1日処理した。次いで、細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、重炭酸ナトリウム、GlutaMax（商標）、更に5mMのグルコース、100ng/mLのGDF8、及び100nMのMCX化合物が追補されたMCDB-131培地で2日目に処理し、続いて、更に1日、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのグルコース、及び100ng/mLのGDF8が追補されたMCDB-131培地にて処理した。

b. ステージ2（原腸管－2日）：細胞を、0.1%の無脂肪酸BSA、0.0012g/mLの重炭酸ナトリウム、1X GlutaMax（商標）、5mMのD-グルコース、0.25mMのアスコルビン酸、及び25ng/mLのFGF7が追補されたMCDB-131培地で2日間処理した。

c. ステージ3（前腸－2日）：細胞を、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10ng/mLのアクチビンA、25ng/mLのFGF7、0.25mMのアスコルビン酸、0.25μMのSANT-1、1μMのRA、200nMのTPB、及び1日目については100nMのLDN-193189が追補されたMCDB-131培地で処理し、続いて、ITS-Xの1：200希釈、2.5mMのグルコース、1X GlutaMax（商標）、0.0015g/mLの重炭酸ナトリウム、2%の無脂肪酸BSA、10ng/mLのアクチビンA、25ng/mLのFGF7、0.25mMのアスコルビン酸、0.25μMのSANT-1、1μMのRA、及び200nMのTPB、並びに更に1日については10nMのLDN-193189が追補された

M C D B - 1 3 1 倍地で処理した。

d. ステージ4 (臍臓前腸前駆細胞-2日) : 細胞を、I T S - X の 1 : 2 0 0 希釈、2.5 mM のグルコース、1 X G l u t a M a x (商標)、0.0015 g / mL の重炭酸ナトリウム、2 % の無脂肪酸 B S A、0.25 μ M の S A N T - 1、50 nM の R A、200 nM の T P B、50 nM の L D N - 1 9 3 1 8 9、及び0.1 mM のアスコルビン酸が追補された M C D B - 1 3 1 倍地で2日間処理した。

e. ステージ5 (臍臓内胚葉-3日) : 細胞を、I T S - X の 1 : 2 0 0 希釈、2.5 mM のグルコース、1 X G l u t a M a x (商標)、0.0015 g / mL の重炭酸ナトリウム、及び2 % の無脂肪酸 B S A を追補した M C D B - 1 3 1 倍地にて、以下の培養条件で3日間処理した。

- ・ + 0.1 mM のアスコルビン酸
- ・ 0.1 mM のアスコルビン酸 + 50 nM の R A
- ・ 0.1 mM のアスコルビン酸 + 50 nM の R A + 0.25 μ M の S A N T - 1
- ・ 0.1 mM のアスコルビン酸 + 50 nM の R A + 0.25 μ M の S A N T - 1 + 50 nM の L D N - 1 9 3 1 8 9
- ・ 0.1 mM のアスコルビン酸 + 50 nM の R A + 0.25 μ M の S A N T - 1 + 1 μ M の A l k 5 i n h
- ・ 0.1 mM のアスコルビン酸 + 50 nM の R A + 0.25 μ M の S A N T - 1 + 1 μ M の A l k 5 i n h + 50 nM の L D N - 1 9 3 1 8 9

【0138】

図22A～図22Lは、実施例13に従って分化し、S5の3日目に収穫した胚性幹細胞株H1の細胞における、P a x 4 (図22A)、P a x 6 (図22B)、P D X 1 (図22C)、P T F 1 a (図22D)、グルカゴン (図22E)、インスリン (図22F)、N e u r o D (図22G)、n g n 3 (図22H)、Z i c 1 (図22I)、C D X 2 (図22J)、アルブミン (図22K)、N K X 6.1 (図22L) の発現のリアルタイムPCR解析からのデータを示している。

【0139】

上記の組み合わせで処理した培養物は、ステージ5の終わりに、インスリン、グルカゴン、及びソマトスタチンホルモンに対して免疫染色された。表V I I I は、インスリン陽性細胞、グルカゴン及びソマトスタチン陽性細胞、並びに多ホルモン細胞 (1つの細胞内で2つ以上のホルモンを発現) の平均百分率をまとめたものである。

【0140】

図22及び下記の表V I I I に示されるように、ステージ5での低用量のレチノイン酸とアスコルビン酸の添加は、S5でビタミンCのみで処理された培養物と比較して、ホルモン陽性細胞の総数を有意に減少させる一方で、単一ホルモンのインスリン陽性細胞の百分率を増加させた。更に、レチノイン酸、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ阻害剤、及びA L K 5 阻害剤の組み合わせは、アスコルビン酸 (ビタミンC) のみで処理された培養物と比較して、単一ホルモンのインスリン陽性細胞の数を更に増加させた。このデータは、単一ホルモンのインスリン陽性細胞を生成するには因子の独特の組み合わせが必要であることを示している。

【0141】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 V I I I S 5 の 3 日目のホルモン総数の百分率としてのホルモンの発現

S5での処理	単一ホルモンインスリン+(%)	グルカゴン+(%)及び ソマトスタチン+(%)	多ホルモン(%)
+ビタミンC	12	44	44
+RA+ビタミンC	27	26	43
RA+ビタミンC+ Alk5 inh+Shh Inh	44	21	34

10

本発明は、以下の態様を包含し得る。

〔1〕

多能性細胞の段階的分化から得られる、膵臓内胚葉細胞のインビトロ分化集団であって、分化の各段階の細胞が、5 mM～20 mMのグルコースを含む培地中で培養される、膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔2〕

前記分化された膵臓内胚葉細胞の30%超が、PDX-1+NKX6.1+、SOX2-、及びCDX2-である、上記〔1〕に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔3〕

前記分化集団の細胞の10%超が単一ホルモンのインスリン陽性細胞である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

20

〔4〕

前記段階的分化が、未分化のヒト胚性幹細胞をTGF-βリガンドが更に追補された培地中で培養する工程を含む、上記〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔5〕

前記段階的分化が、未分化のヒト胚性幹細胞をWNT活性化剤が更に追補された培地中で培養する工程を含む、上記〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔6〕

前記段階的分化が、胚体内胚葉細胞をFGFリガンドが更に追補された培地中で培養する工程を含む、上記〔1〕に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

30

〔7〕

前記段階的分化が、shh阻害剤、FGFリガンド、PKC活性化剤、TGF-βリガンド、レチノイド、及びBMP阻害剤の勾配が更に追補された培地中で腸管細胞を培養する工程を含む、上記〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔8〕

前記段階的分化が、PKC活性化剤、shh阻害剤、レチノイド、及びBMP阻害剤が更に追補された培地中で後方前腸細胞を培養する工程を含む、上記〔5〕に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

40

〔9〕

前記段階的分化が、アスコルビン酸が更に追補された培地中で細胞を培養する工程を含む、上記〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の膵臓内胚葉細胞の分化集団。

〔10〕

膵臓内胚葉系統の細胞の集団への多能性細胞の段階的分化のためのインビトロの方法であって、5 mM～20 mMのグルコースを含む培地中での分化の各段階で細胞を培養する工程を含む、方法。

〔11〕

TGF-βリガンド及びWNT活性化剤を追補した培地中で前記多能性細胞を培養することによって、前記多能性細胞を胚体内胚葉（DE）細胞に分化する工程を更に含む、上

50

記〔10〕に記載のインビトロの方法。

〔12〕

F G F リガンドを追補した培地中で前記 D E 細胞を培養することによって、前記 D E 細胞を腸管細胞に分化する工程を更に含む、上記〔11〕に記載のインビトロの方法。

〔13〕

s h h 阻害剤、F G F リガンド、P K C 活性化剤、T G F - B リガンド、レチノイド、及び B M P 阻害剤を追補した培地中で腸管細胞を培養することによって、前記腸管細胞を後方前腸内胚葉細胞に分化する工程を更に含む、上記〔12〕に記載のインビトロの方法。

〔14〕

P K C 活性化剤、s h h 阻害剤、レチノイド、及び B M P 阻害剤を追補した培地中で後方前腸内胚葉細胞を培養することによって、前記後方前腸内胚葉細胞を膵臓前腸細胞に分化する工程を更に含む、上記〔13〕に記載のインビトロの方法。

〔15〕

s h h 阻害剤、T G F - B 阻害剤、及びレチノイドを追補した培地中で前記膵臓前腸細胞を培養することによって、前記膵臓前腸細胞を膵臓内胚葉細胞に分化する工程を更に含む、上記〔14〕に記載のインビトロの方法。

〔16〕

前記膵臓内胚葉細胞を膵臓β細胞集団に分化する工程を更に含む、上記〔15〕に記載のインビトロの方法。

〔17〕

少なくとも一工程において前記培地にアスコルビン酸を更に追補する、上記〔10〕～〔16〕のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

〔18〕

前記分化集団の細胞の10%超が単一ホルモンのインスリン陽性細胞である、上記〔10〕～〔17〕のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

〔19〕

培養物の膵臓内胚葉細胞の30%超が P D X - 1 +、N K X 6 . 1 +、S O X 2 -、及び C D X 2 - である、上記〔18〕に記載のインビトロの方法。

〔20〕

ヒト胚性幹細胞を膵臓β細胞に分化するためのインビトロの方法であって、

a) 胚体内胚葉 (D E) 細胞の集団を生成するために、未分化のヒト胚性幹細胞を、グルコース、T G F - B リガンド、及び W N T 活性化剤を追補した培地中で培養する工程と、

b) 腸管細胞の集団を生成するために、前記 D E 細胞を、グルコース及び F G F リガンドを追補した培地中で培養する工程と、

c) P D X - 1 及び S O X 2 を発現する後方前腸内胚葉細胞の集団を生成するために、グルコース、s h h 阻害剤、F G F リガンド、P K C 活性化剤、T G F - B リガンド、レチノイド、及び B M P 阻害剤の勾配を追補した培地中で前記腸管細胞を培養する工程と、

d) P D X - 1 及び N K X 6 . 1 を発現し、かつ前記後方前腸細胞と比較して低いレベルの S O X 2 を発現する膵臓前腸細胞の集団を生成するために、グルコース、P K C 活性化剤、s h h 阻害剤、レチノイド、及び B M P 阻害剤を追補した培地中で前記後方前腸細胞を培養する工程と、

e) P D X - 1 及び膵臓前腸細胞と比較して高いレベルの N K X 6 . 1 並びに低いレベルの S O X 2 を発現する膵臓内胚葉細胞の集団を得るために、グルコース、s h h 阻害剤、T G F - B 阻害剤、及びレチノイドを追補した培地中で前記膵臓前腸細胞を培養する工程と、

f) 前記膵臓内胚葉細胞を膵臓β細胞集団に分化する工程と、を含む、方法。

〔21〕

前記膵臓β細胞集団が P D X - 1 +、N K X 6 . 1 +、S O X 2 -、及び C D X 2 - で

10

20

30

40

50

ある、上記〔20〕に記載の方法。

〔22〕

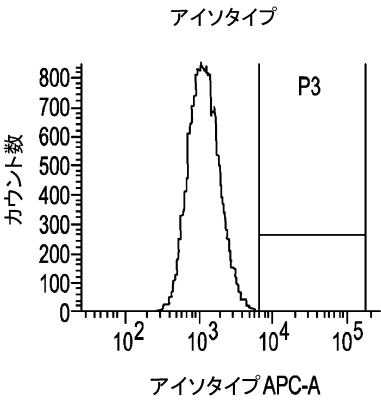
少なくとも一工程において前記培地にアスコルビン酸が更に追補される、上記〔20〕又は〔21〕に記載の方法。

〔23〕

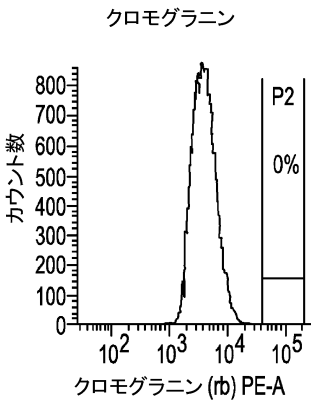
前記膵臓β細胞が、NKX6.1+及びPDX-1+でもある単一ホルモンのインスリン産生細胞である、上記〔22〕に記載の方法。

【図面】

【図1A】

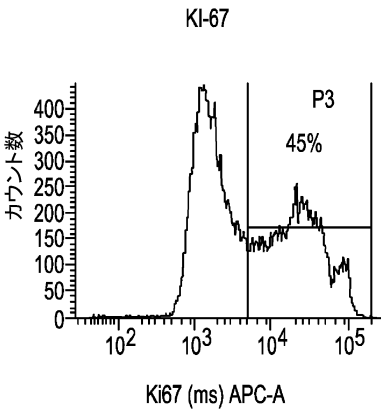


【図1B】

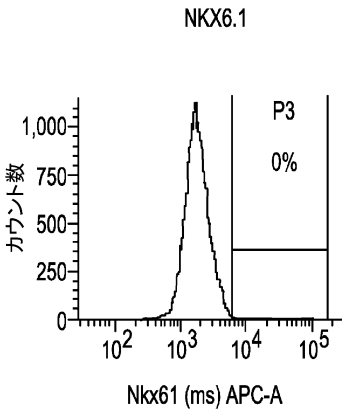


10

【図1C】



【図1D】



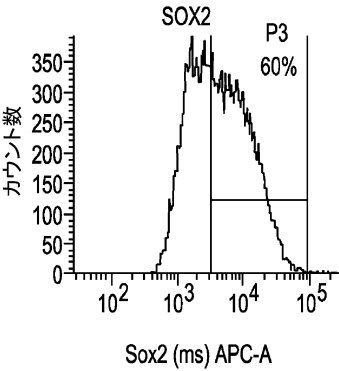
20

30

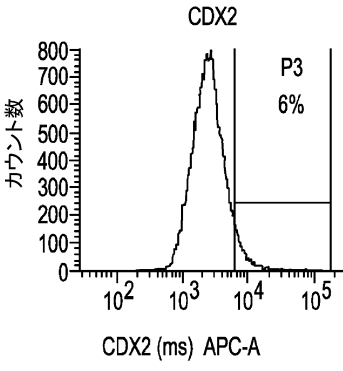
40

50

【図 1 E】

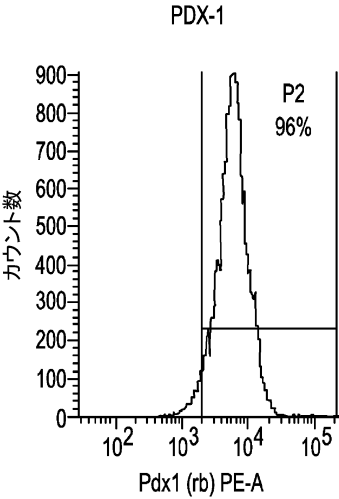


【図 1 F】

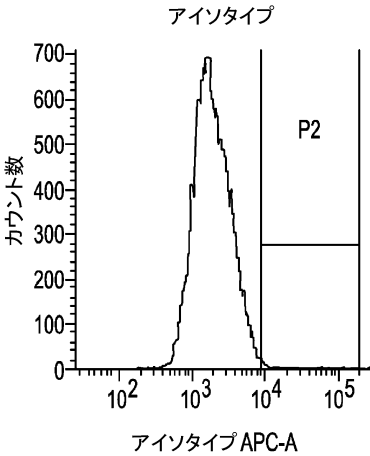


10

【図 1 G】



【図 2 A】



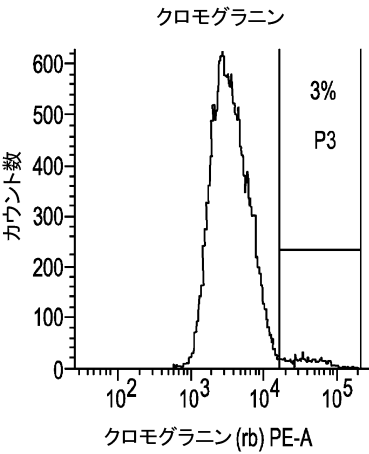
20

30

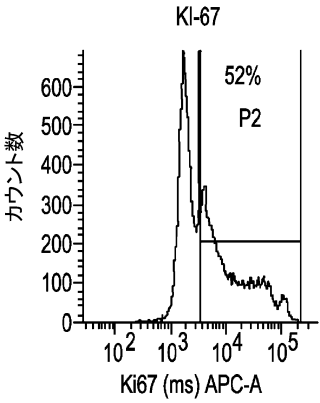
40

50

【図 2 B】

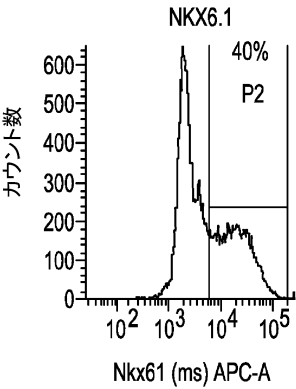


【図 2 C】

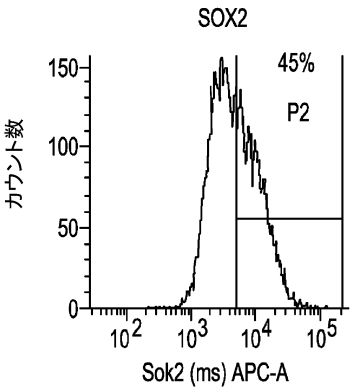


10

【図 2 D】



【図 2 E】



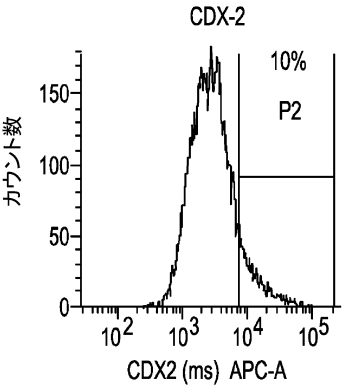
20

30

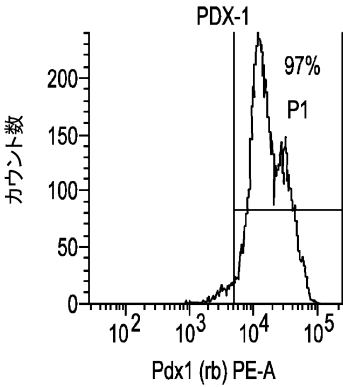
40

50

【図 2 F】

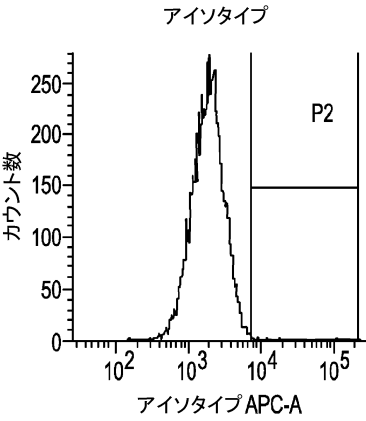


【図 2 G】

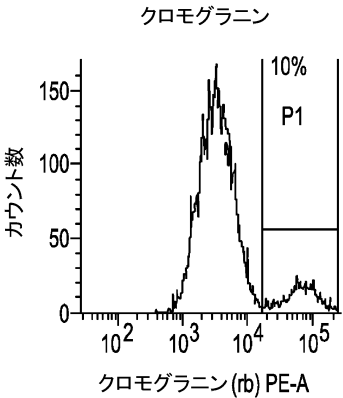


10

【図 3 A】

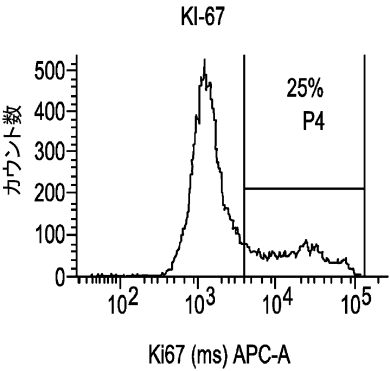


【図 3 B】

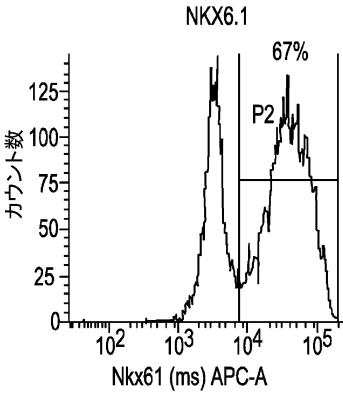


20

【図 3 C】



【図 3 D】

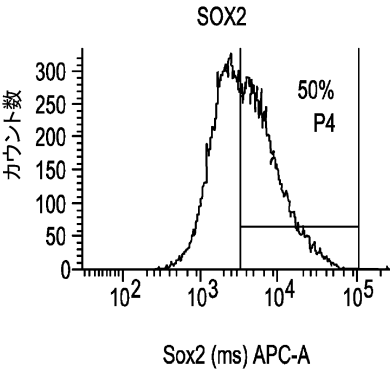


30

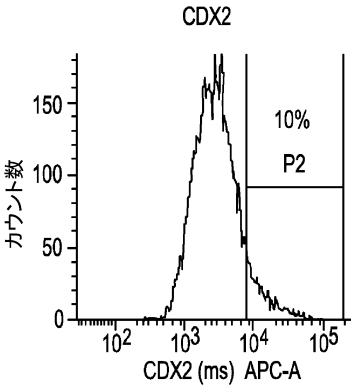
40

50

【図 3 E】

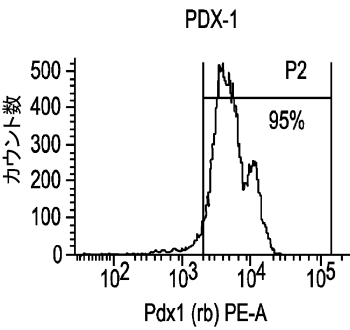


【図 3 F】

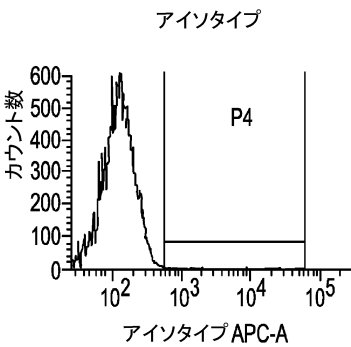


10

【図 3 G】

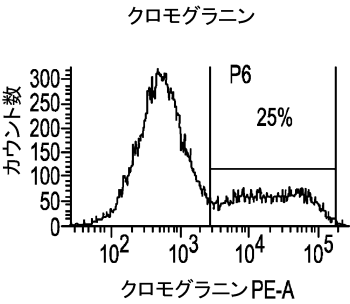


【図 4 A】

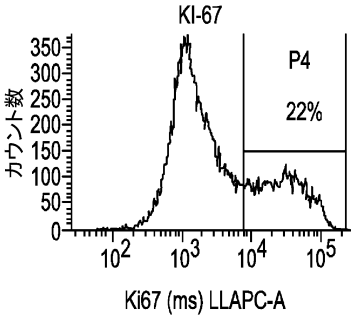


20

【図 4 B】



【図 4 C】

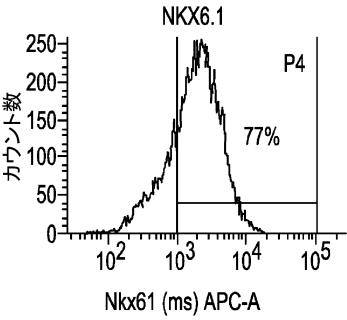


30

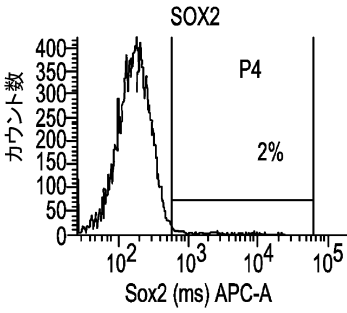
40

50

【図 4 D】

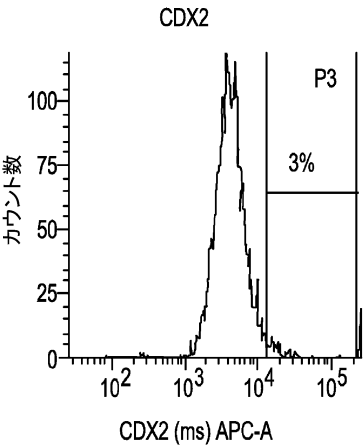


【図 4 E】

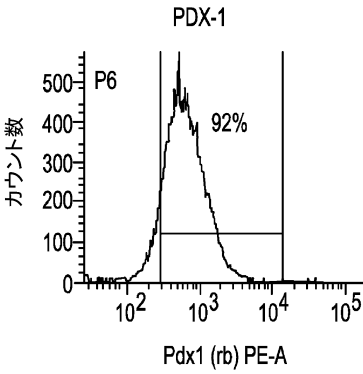


10

【図 4 F】

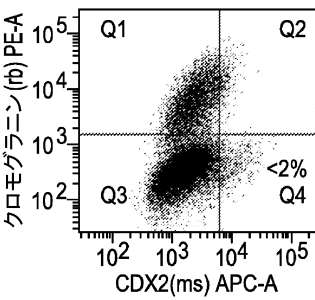


【図 4 G】

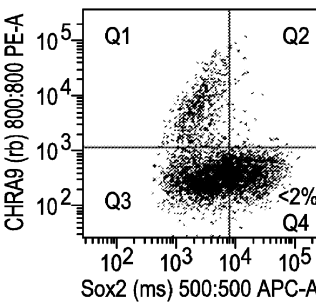


20

【図 5 A】



【図 5 B】

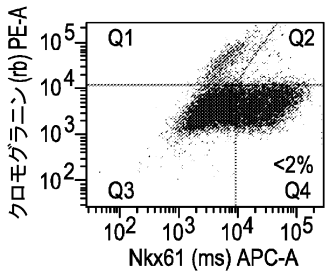


30

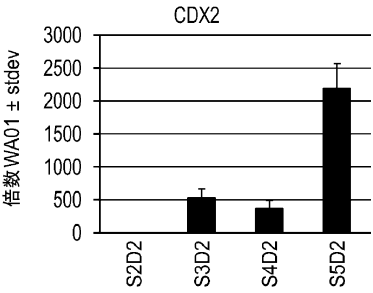
40

50

【図 5 C】

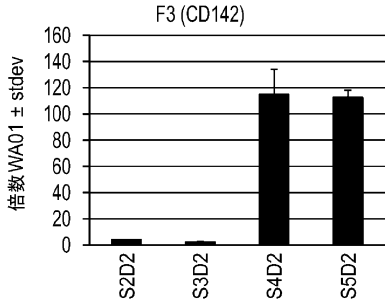


【図 6 A】

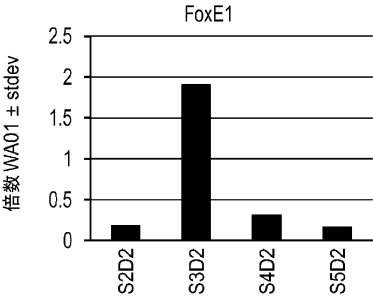


10

【図 6 B】

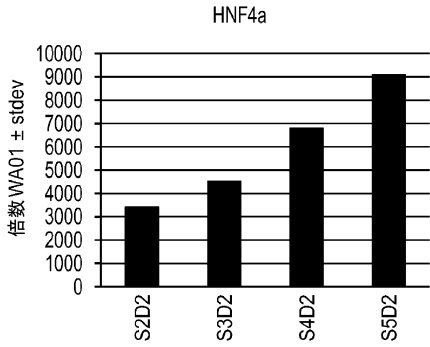


【図 6 C】

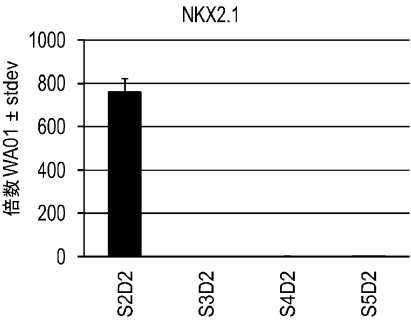


20

【図 6 D】



【図 6 E】

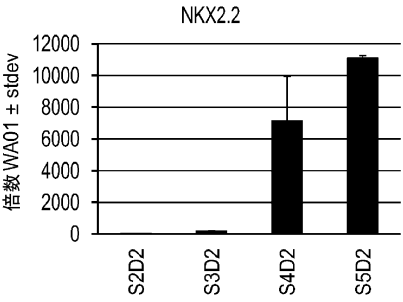


30

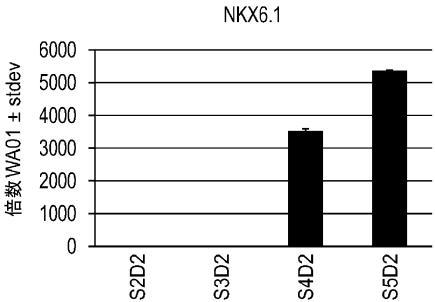
40

50

【図 6 F】

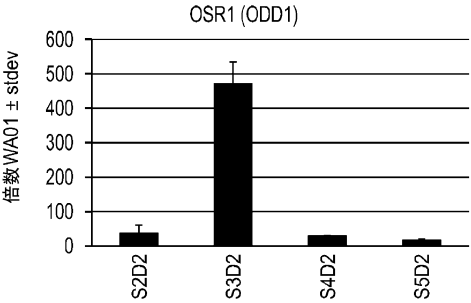


【図 6 G】

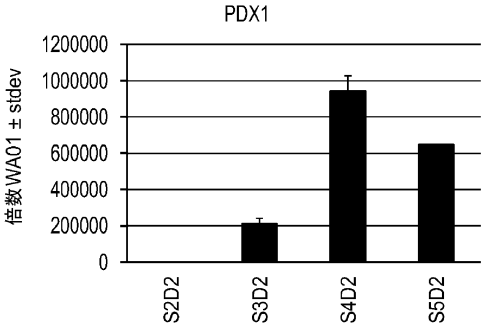


10

【図 6 H】

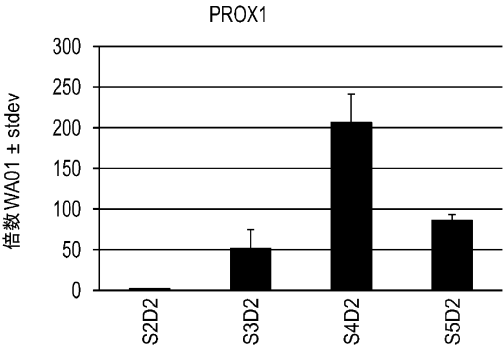


【図 6 I】

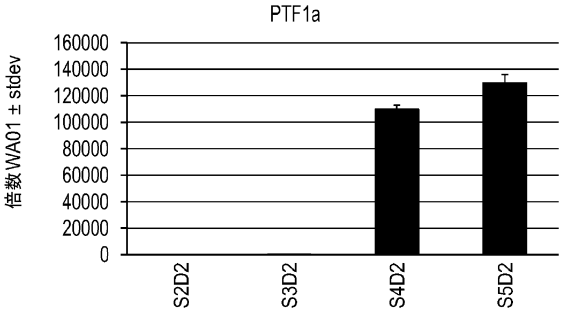


20

【図 6 J】



【図 6 K】

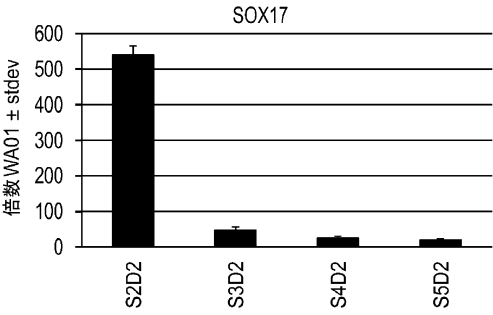


30

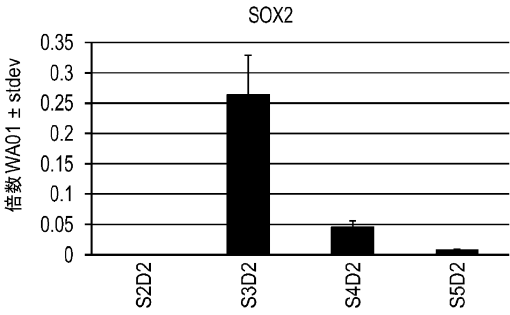
40

50

【図 6 L】

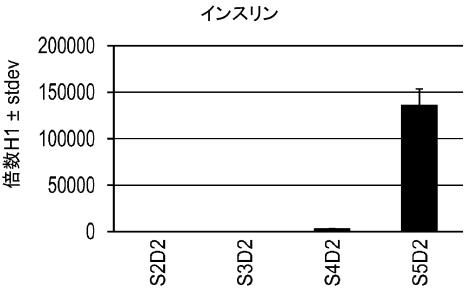


【図 6 M】

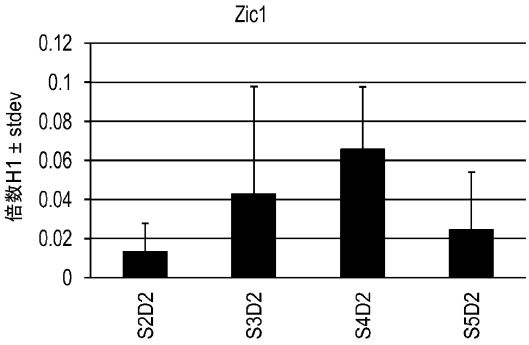


10

【図 6 N】

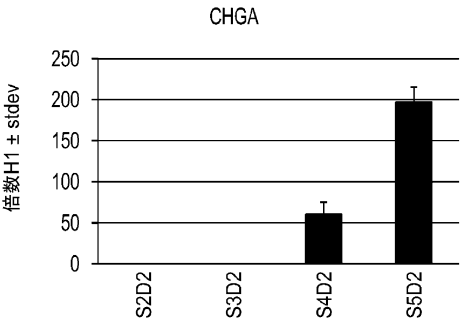


【図 6 O】

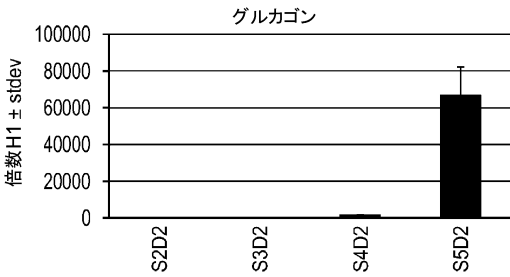


20

【図 6 P】



【図 6 Q】

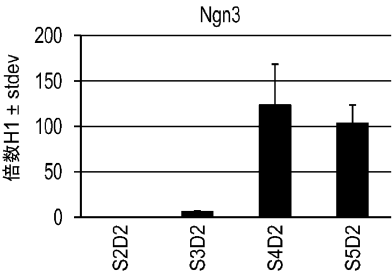


30

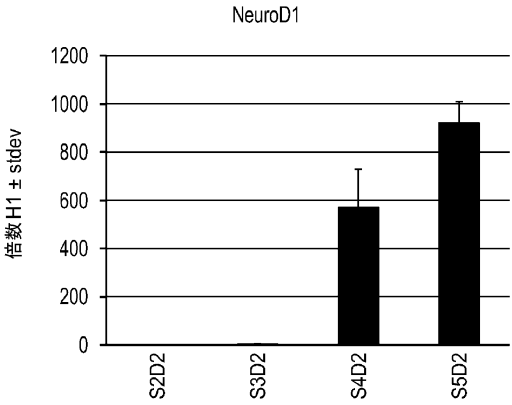
40

50

【図 6 R】

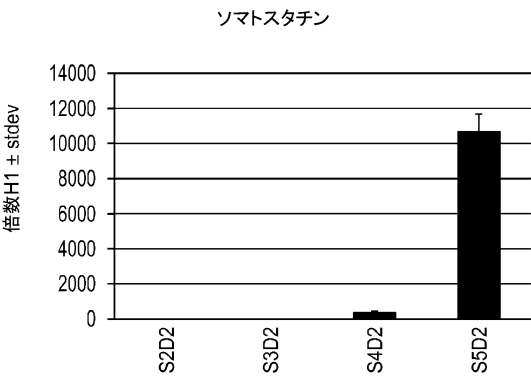


【図 6 S】

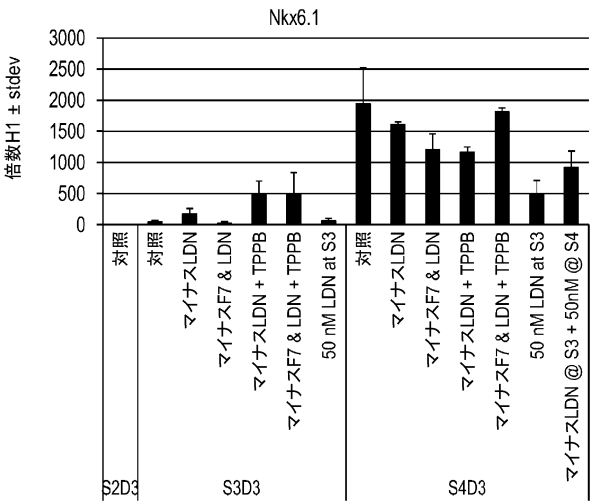


10

【図 6 T】



【図 7 A】



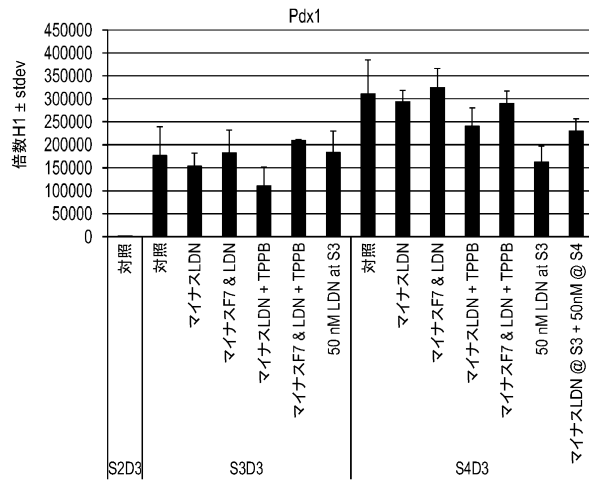
20

30

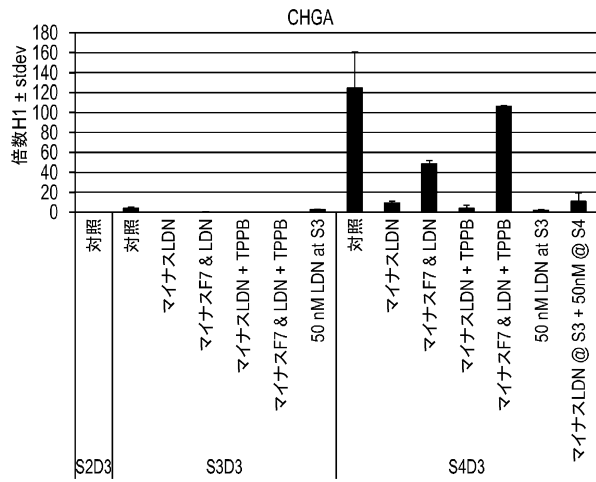
40

50

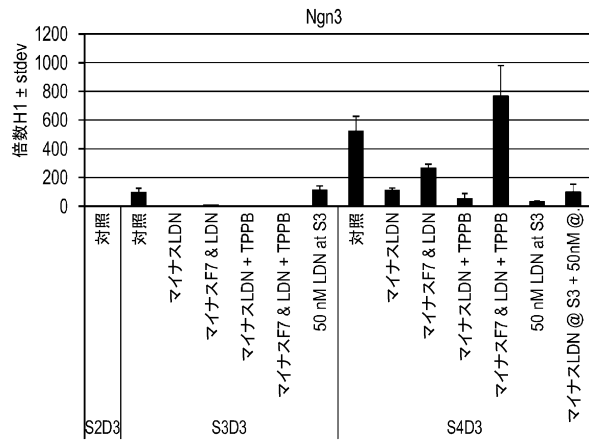
【図 7 B】



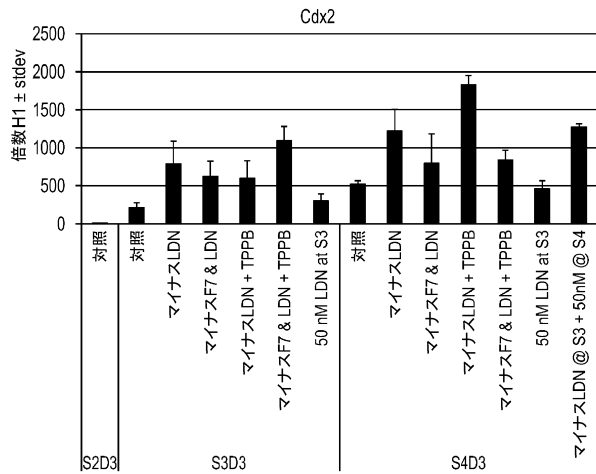
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 7 E】



10

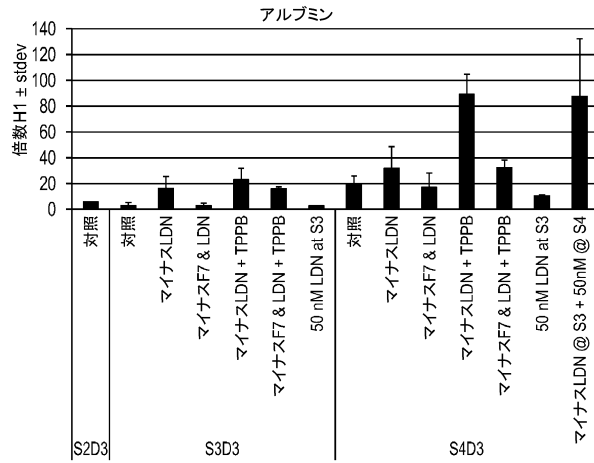
20

30

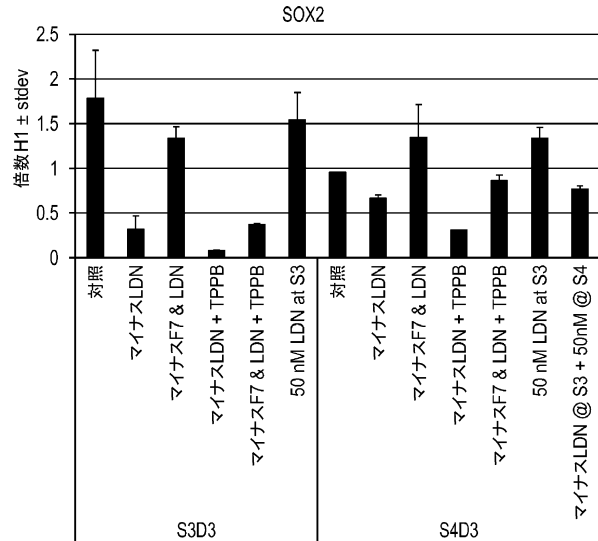
40

50

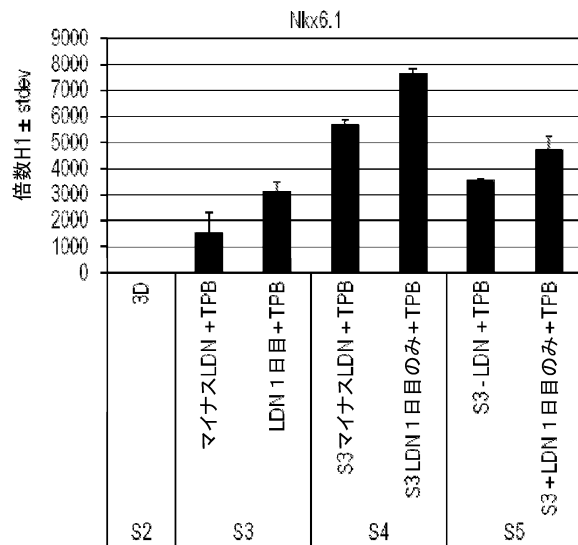
【図 7 F】



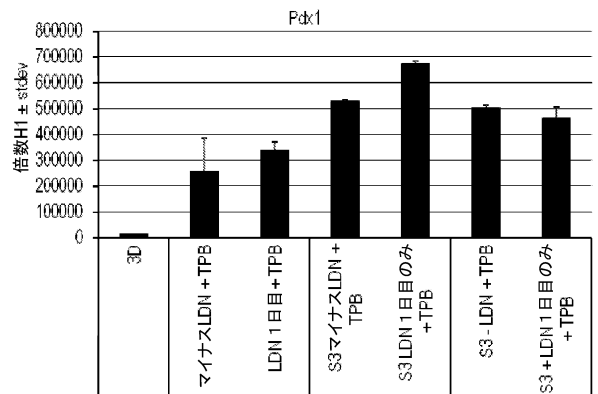
【図 7 G】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

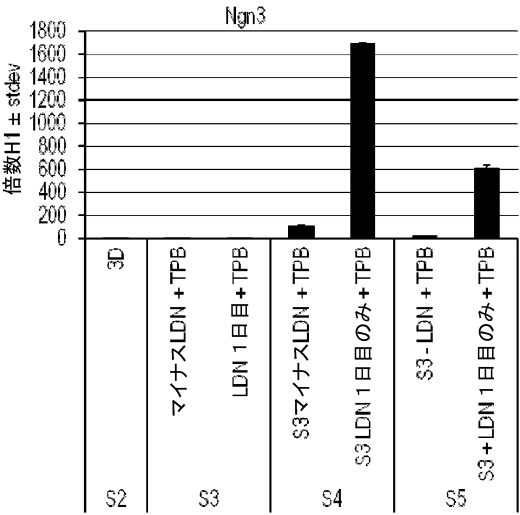
20

30

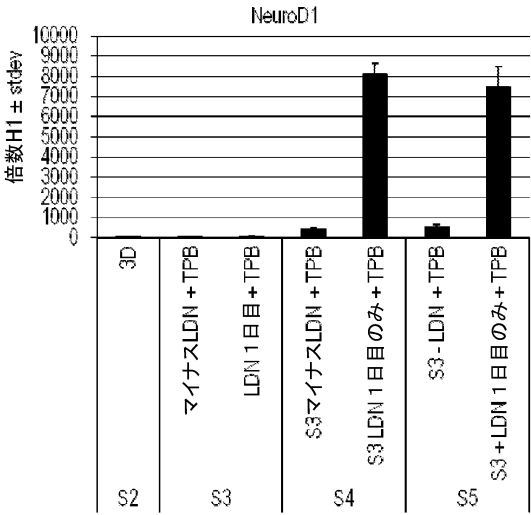
40

50

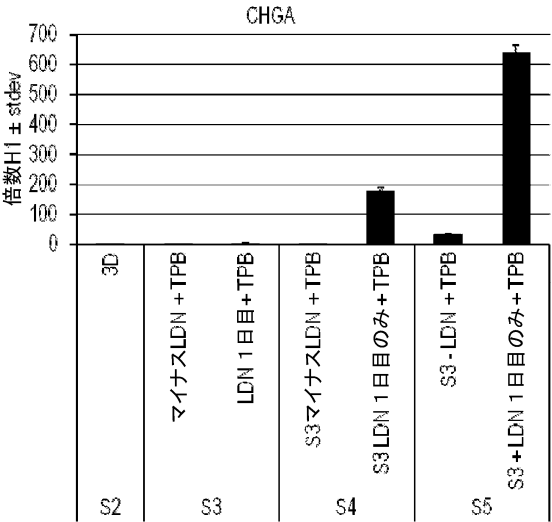
【図 8 C】



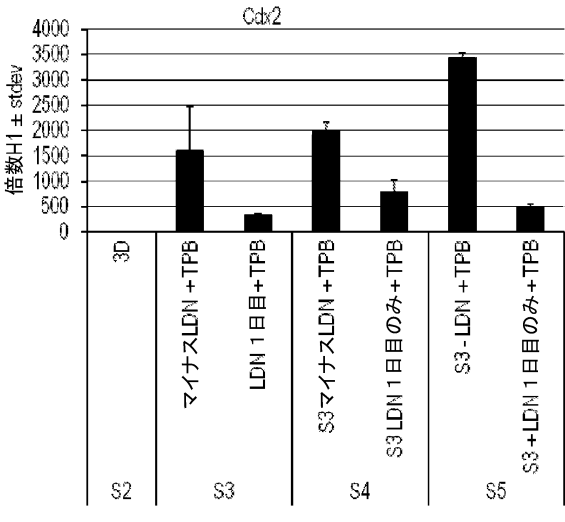
【図 8 D】



【図 8 E】



【図 8 F】



10

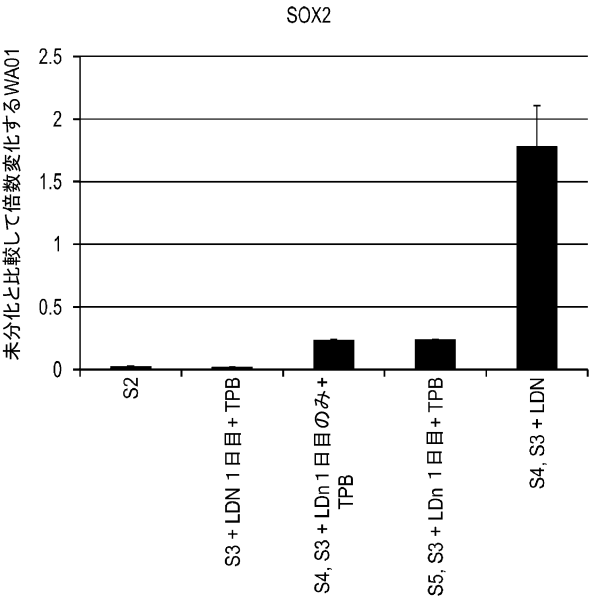
20

30

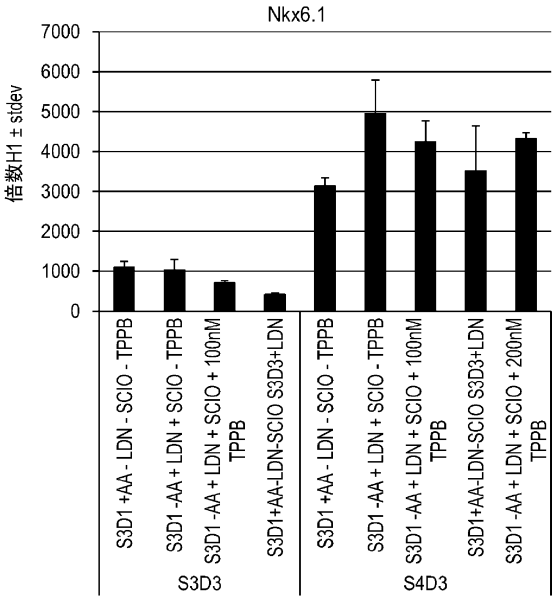
40

50

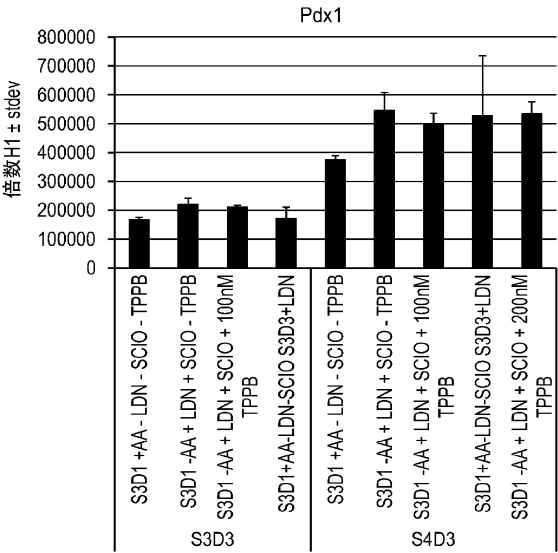
【図 8 G】



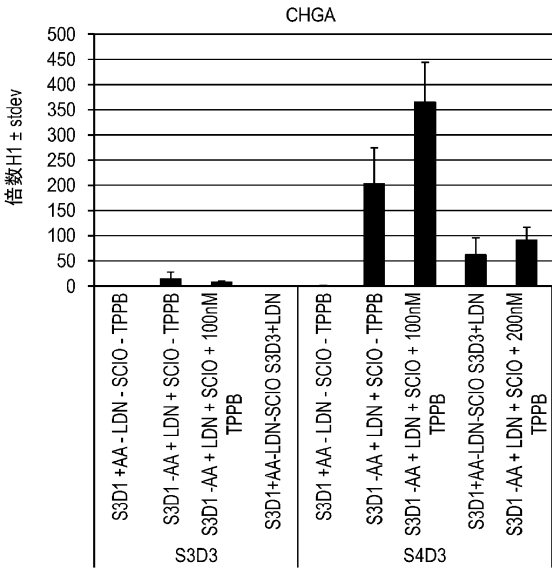
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



10

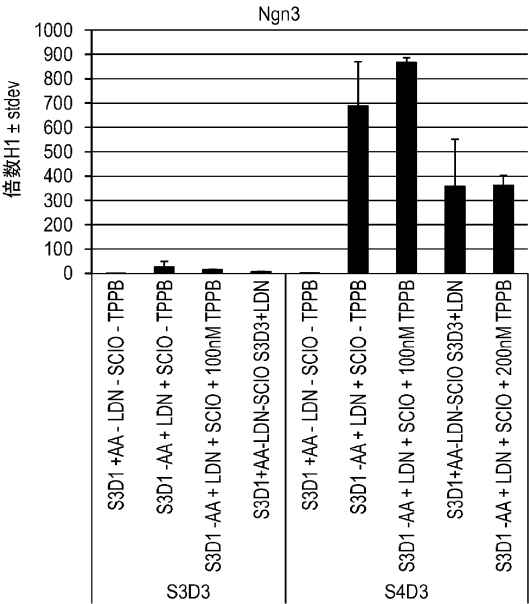
20

30

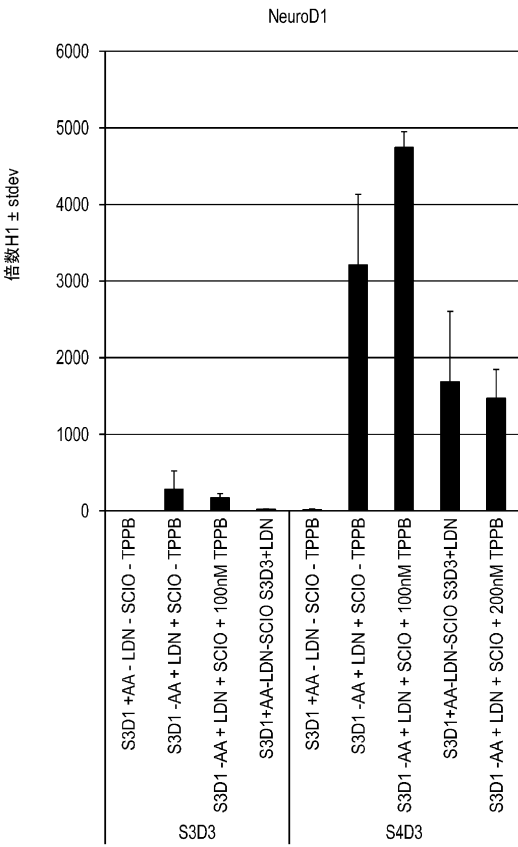
40

50

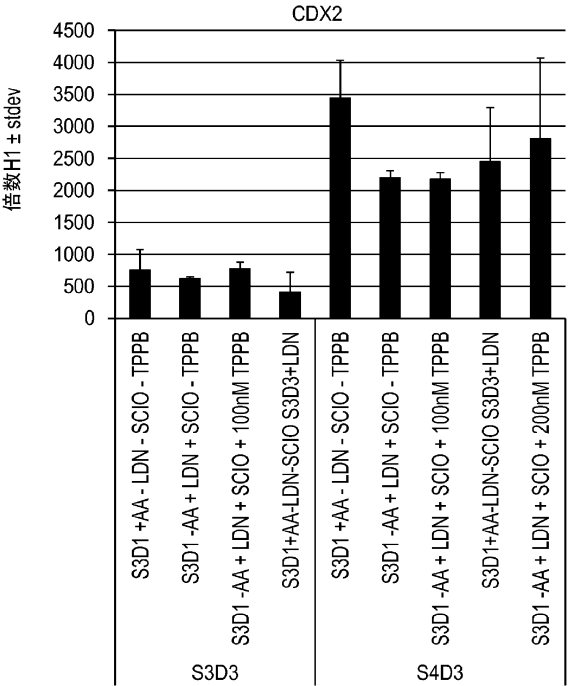
【図 9 D】



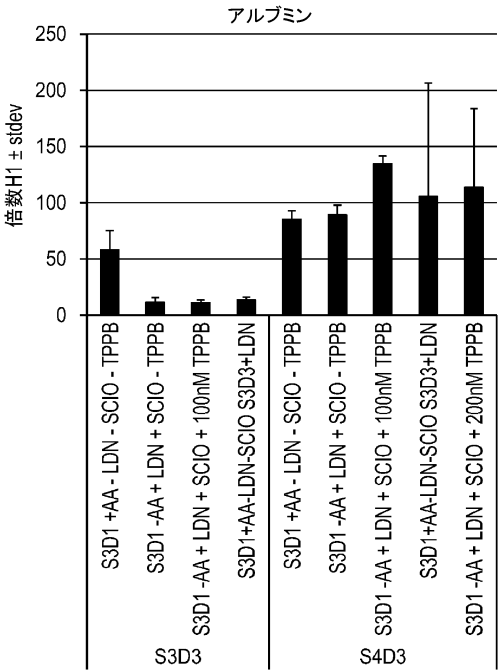
【図 9 E】



【図 9 F】



【図 9 G】



10

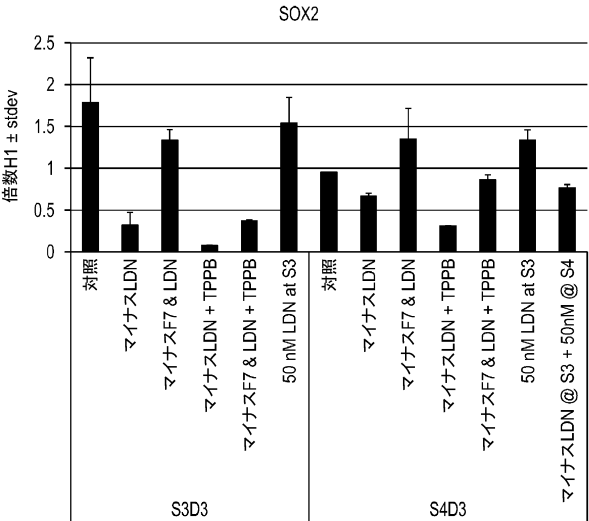
20

30

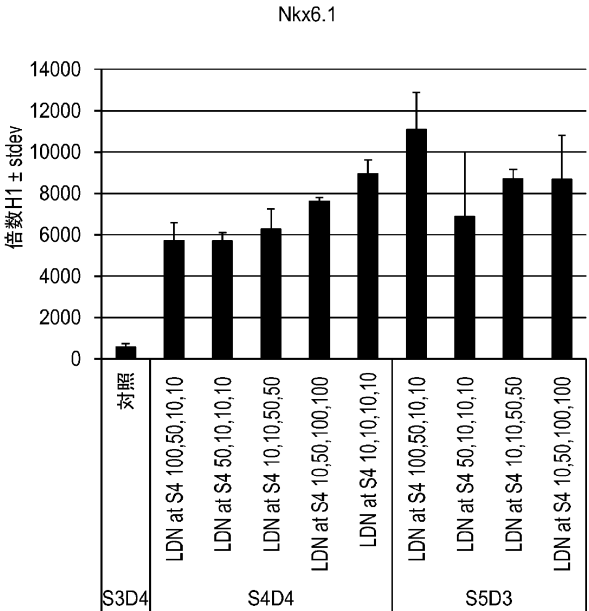
40

50

【図 9 H】

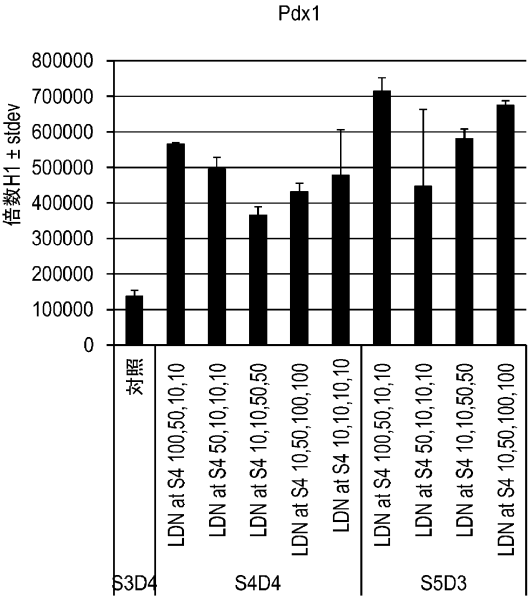


【図 10 A】

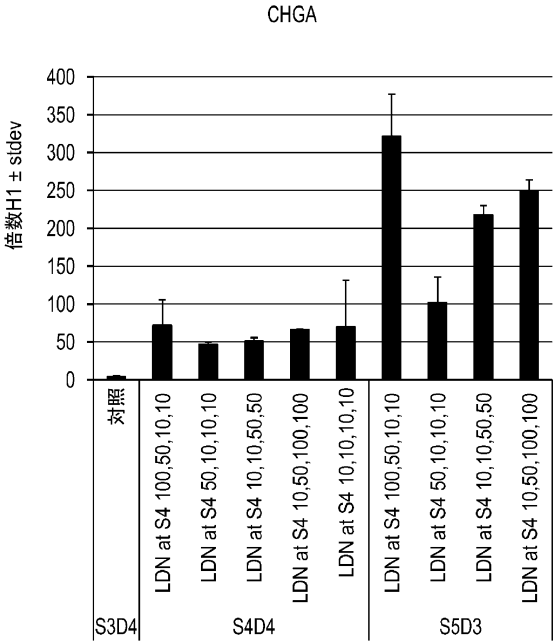


10

【図 10 B】



【図 10 C】



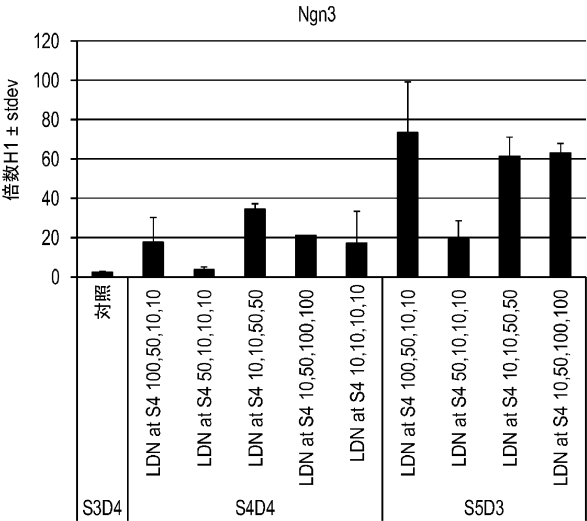
20

30

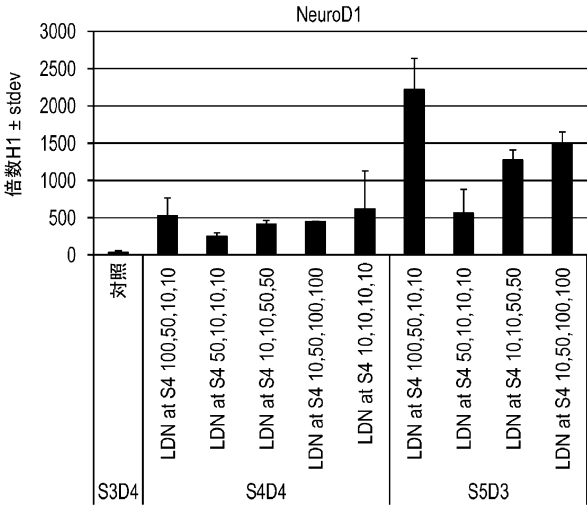
40

50

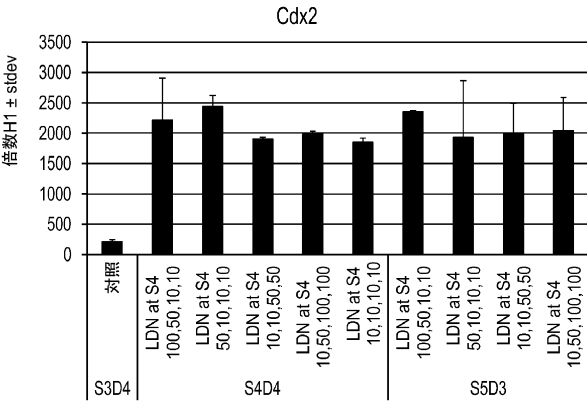
【図 10 D】



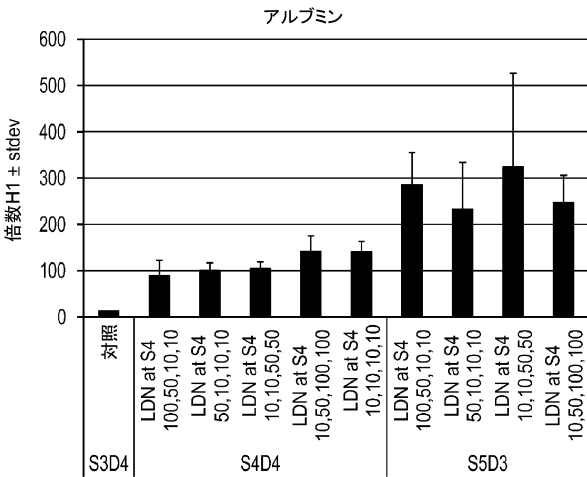
【図 10 E】



【図 10 F】



【図 10 G】



10

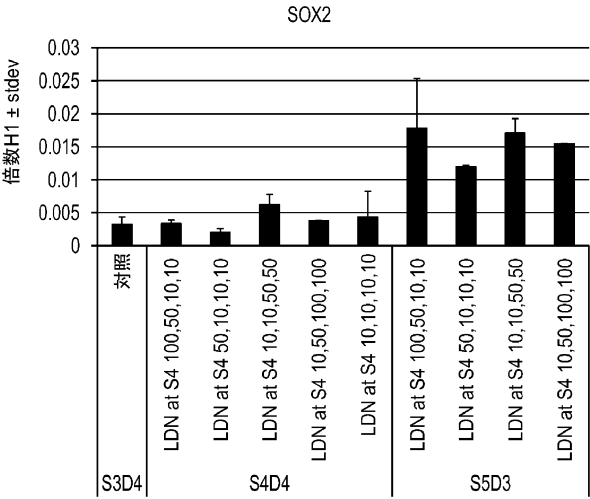
20

30

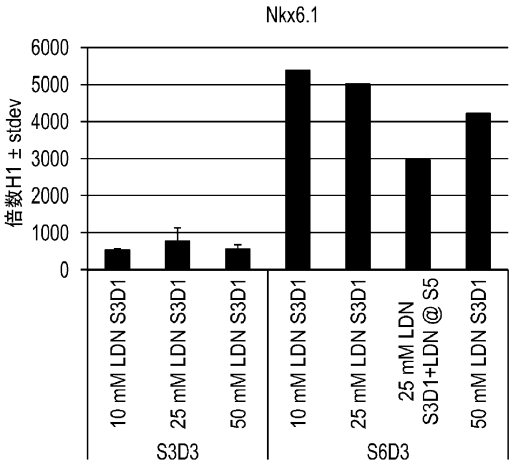
40

50

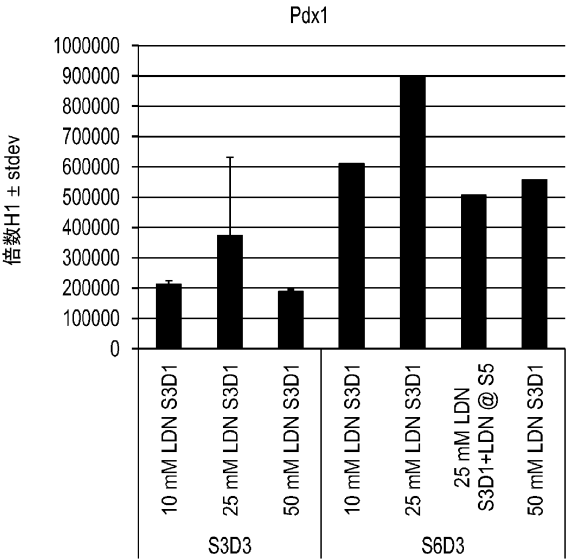
【図 1 0 H】



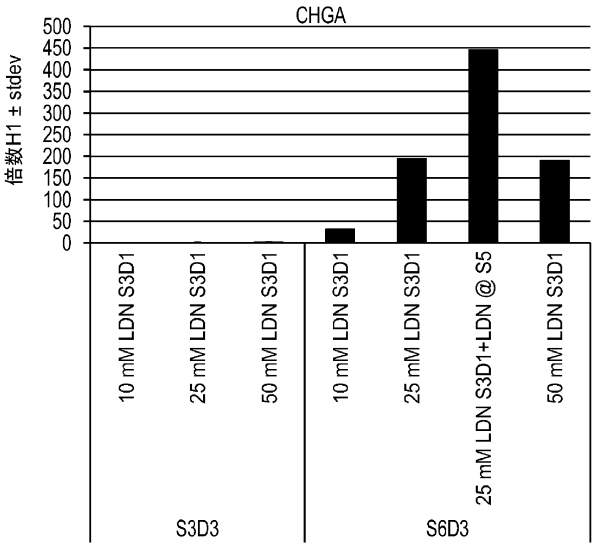
【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



10

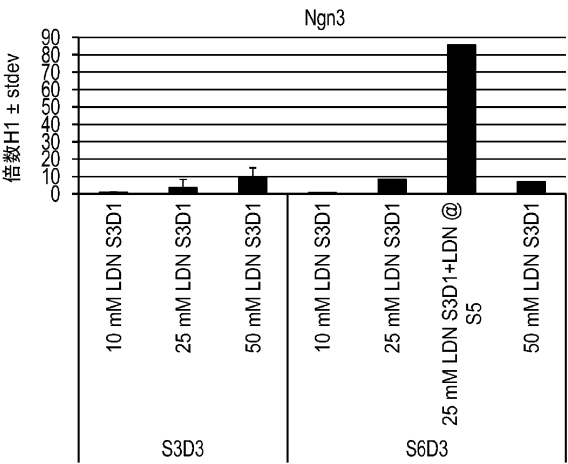
20

30

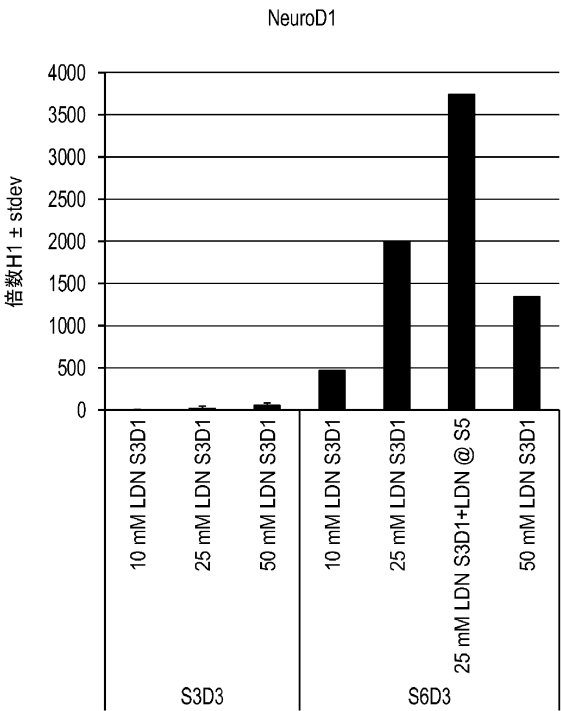
40

50

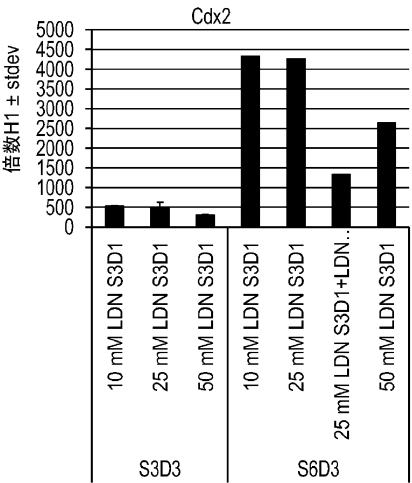
【図 1 1 D】



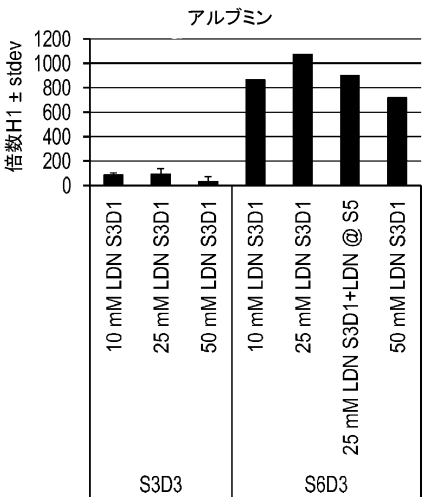
【図 1 1 E】



【図 1 1 F】



【図 1 1 G】



10

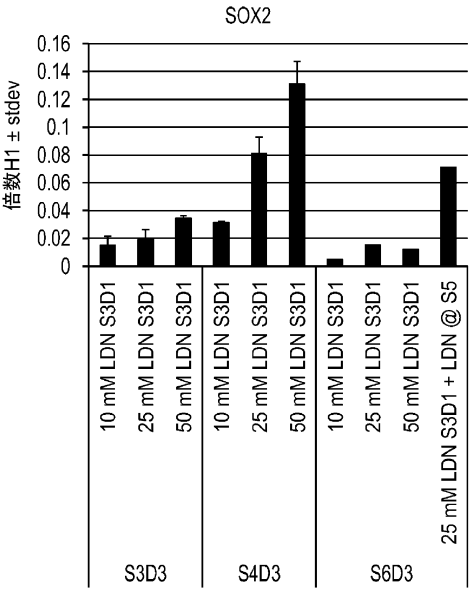
20

30

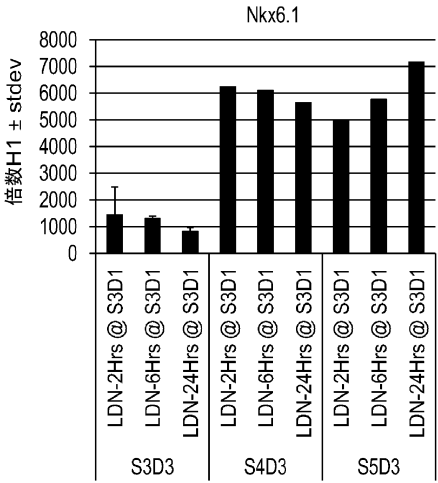
40

50

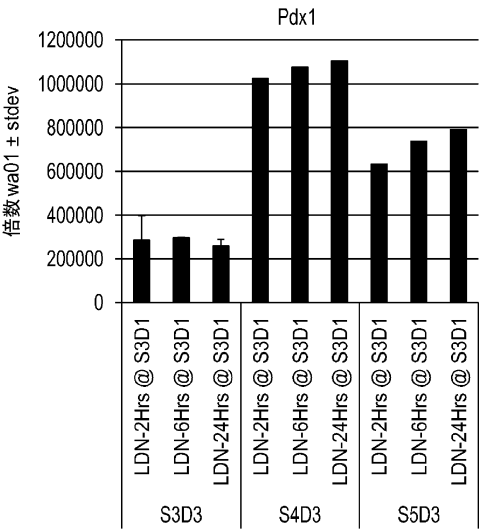
【図 1 1 H】



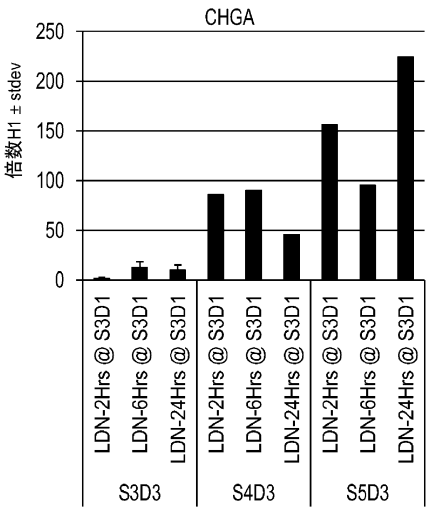
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

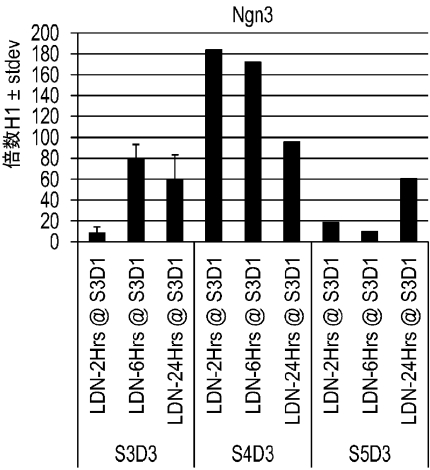
20

30

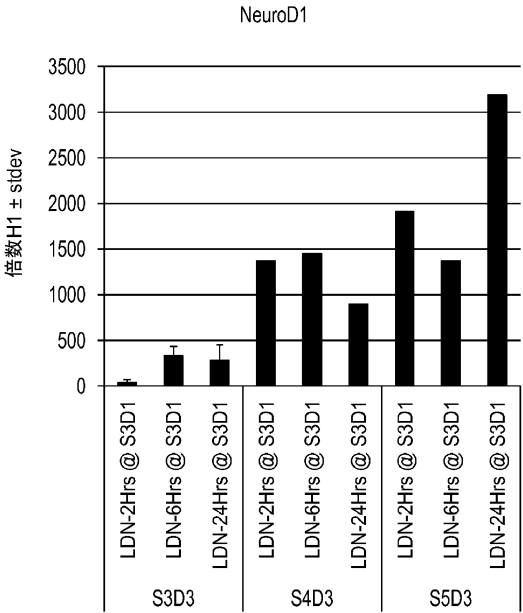
40

50

【図 1 2 D】



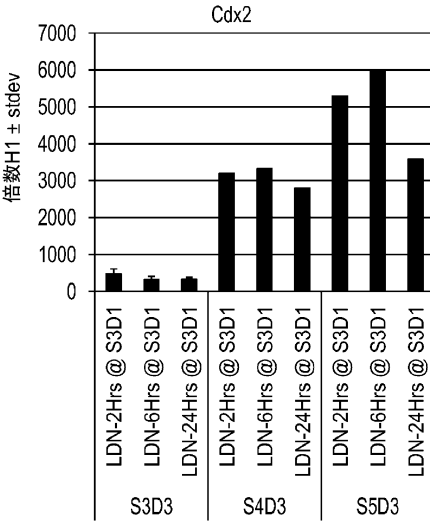
【図 1 2 E】



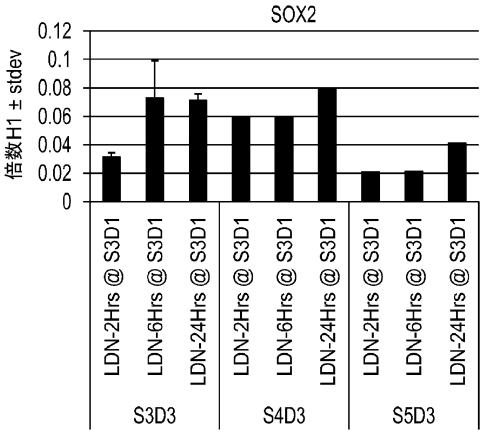
10

20

【図 1 2 F】



【図 1 2 G】

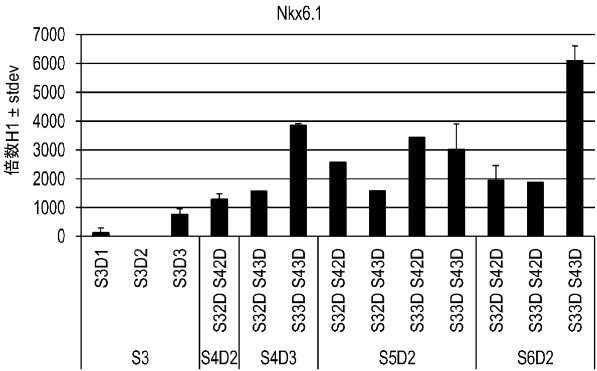


30

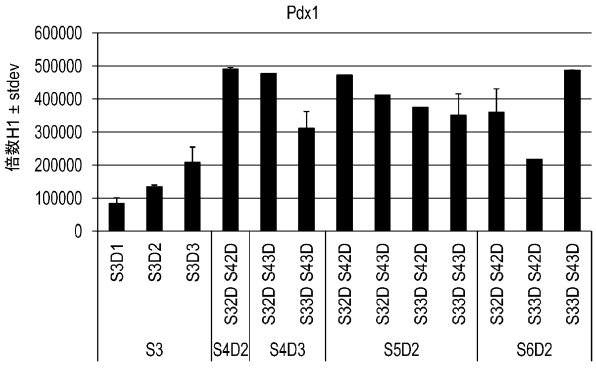
40

50

【図 1 3 A】

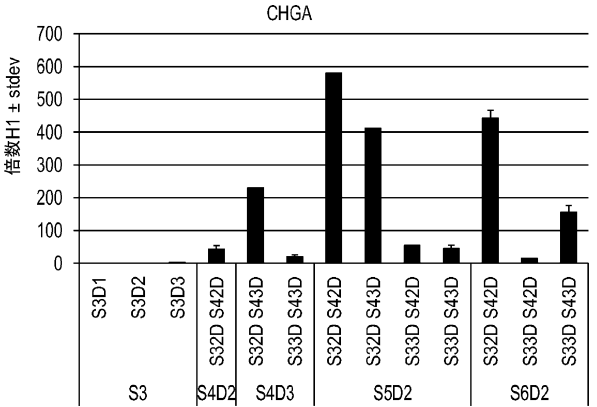


【図 1 3 B】

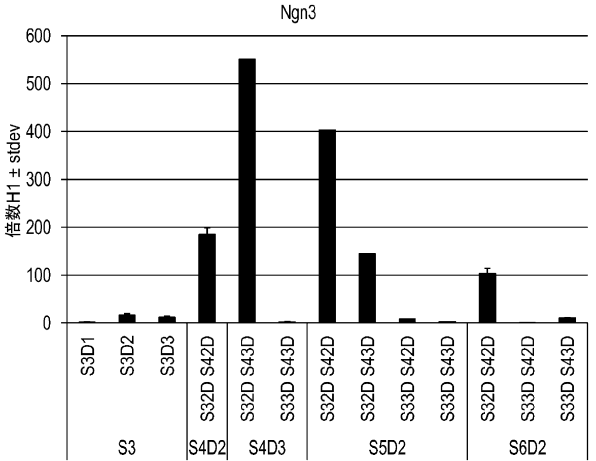


10

【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



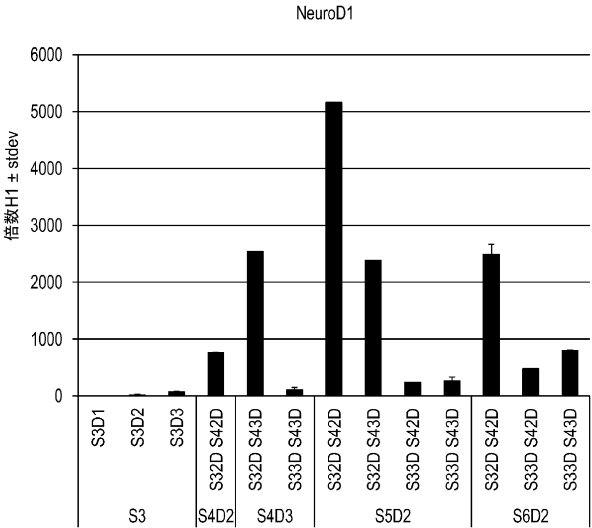
20

30

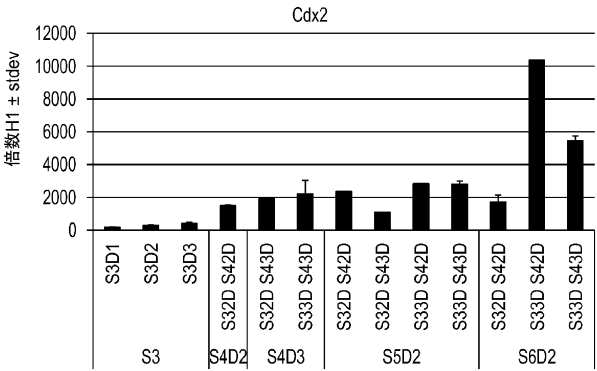
40

50

【図 1 3 E】

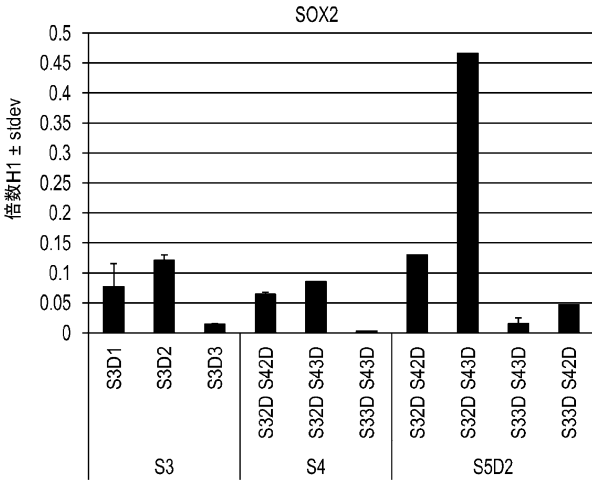


【図 1 3 F】

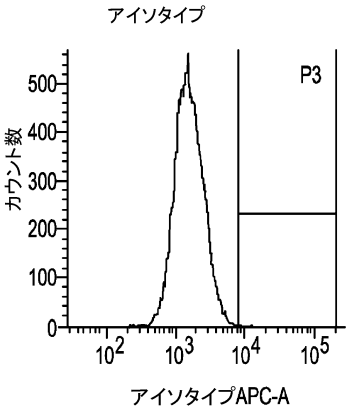


10

【図 1 3 G】



【図 1 4 A】



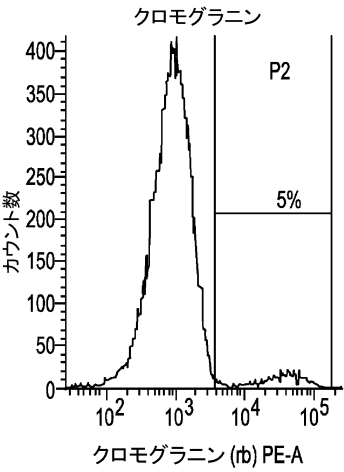
20

30

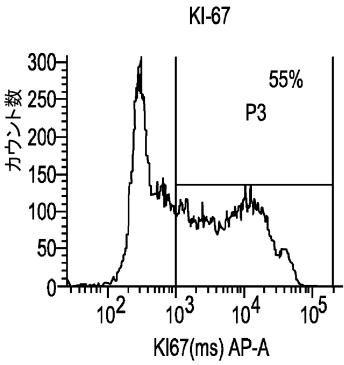
40

50

【図 1 4 B】

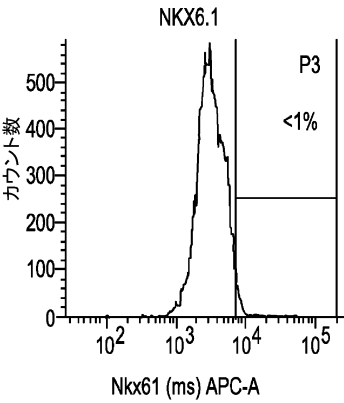


【図 1 4 C】

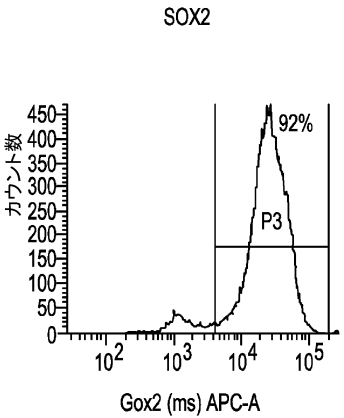


10

【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



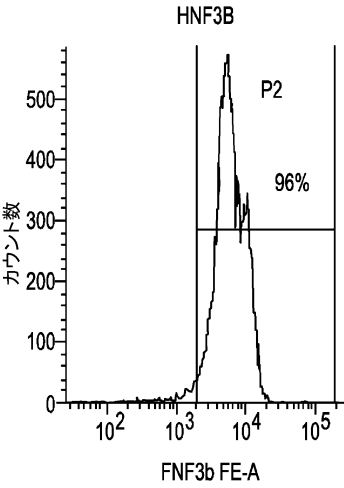
20

30

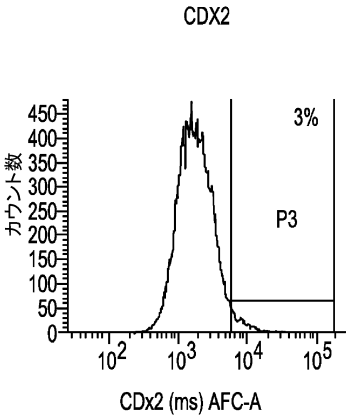
40

50

【図 1 4 F】

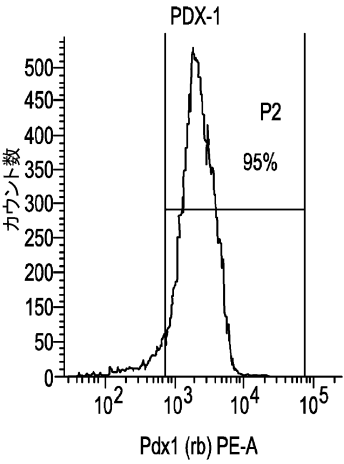


【図 1 4 G】

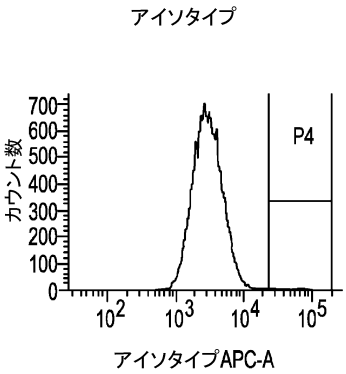


10

【図 1 4 H】



【図 1 5 A】



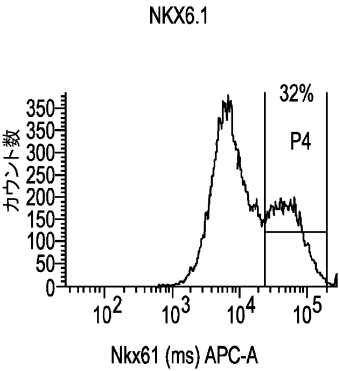
20

30

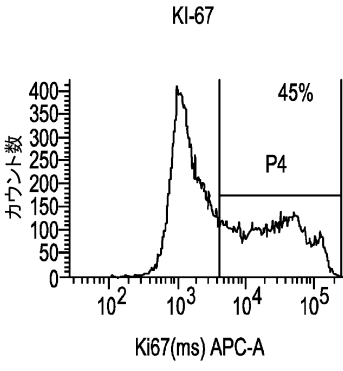
40

50

【図 1 5 B】

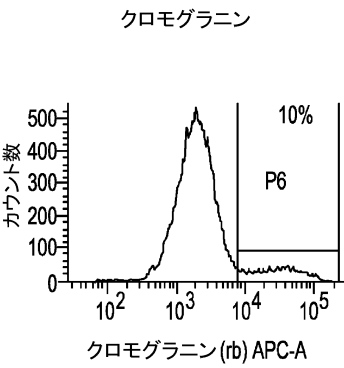


【図 1 5 C】

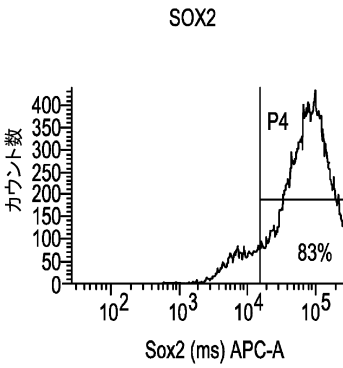


10

【図 1 5 D】

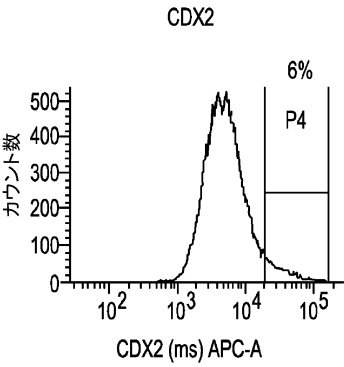


【図 1 5 E】

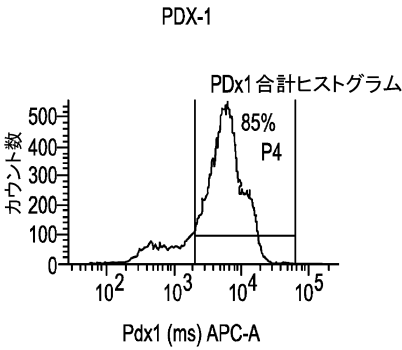


20

【図 1 5 F】



【図 1 5 G】

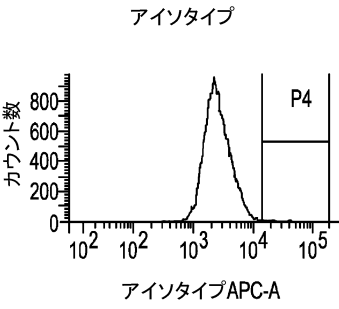


30

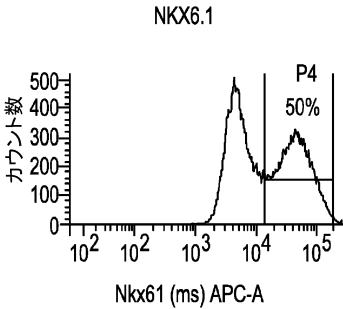
40

50

【図 1 6 A】

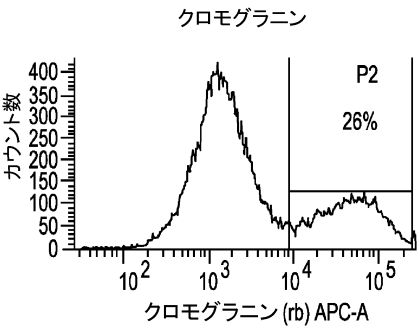


【図 1 6 B】

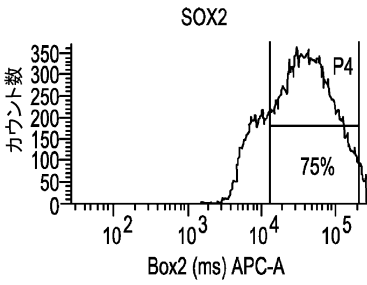


10

【図 1 6 C】

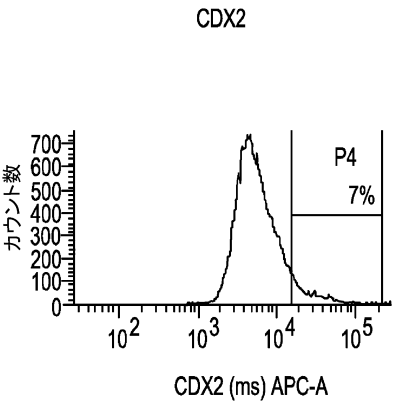


【図 1 6 D】

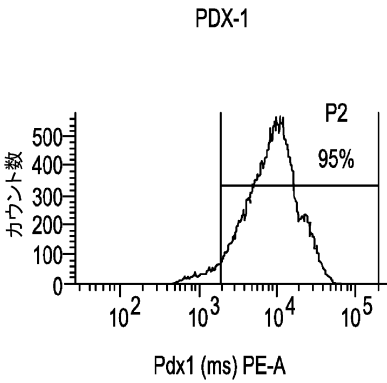


20

【図 1 6 E】



【図 1 6 F】

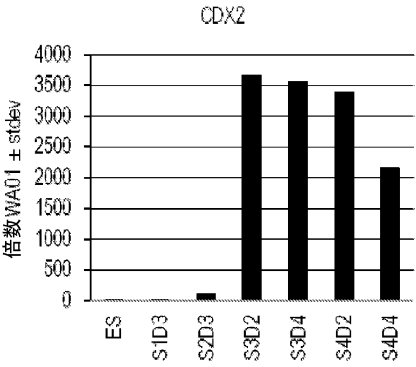


30

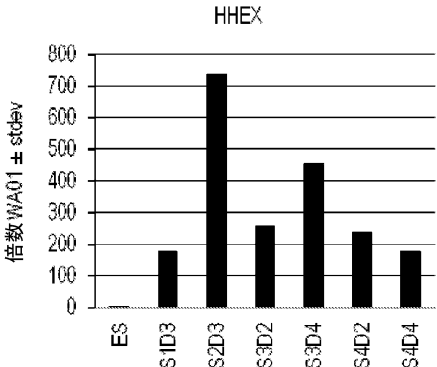
40

50

【図 1 7 A】

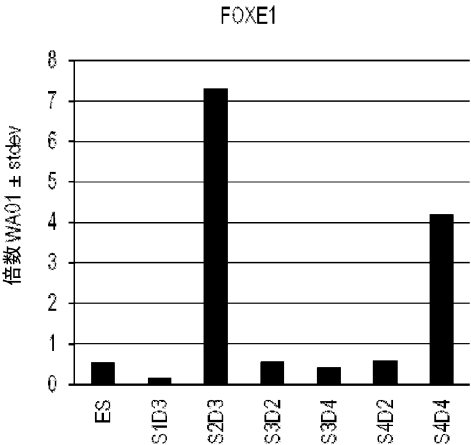


【図 1 7 B】

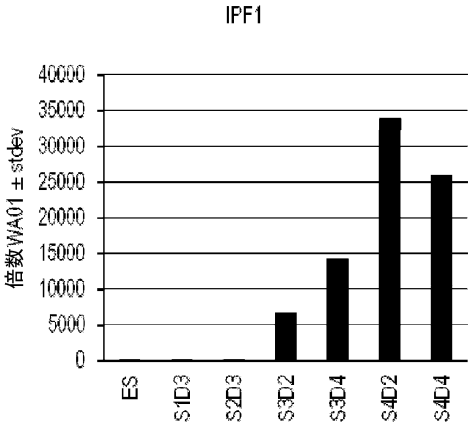


10

【図 1 7 C】

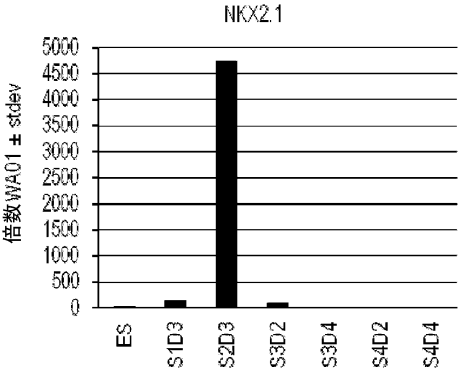


【図 1 7 D】

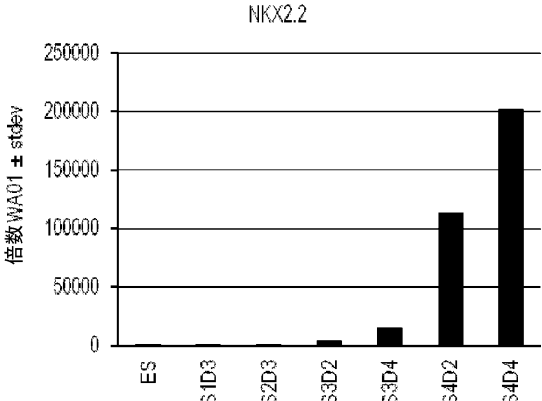


20

【図 1 7 E】



【図 1 7 F】

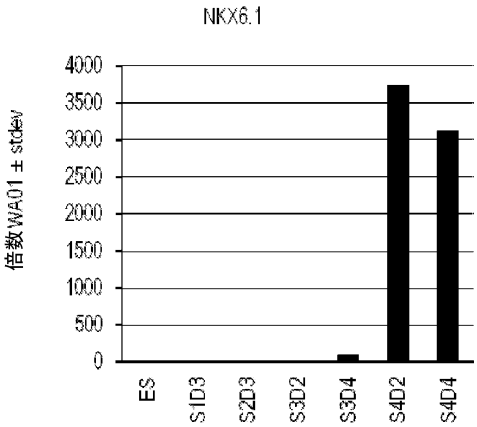


30

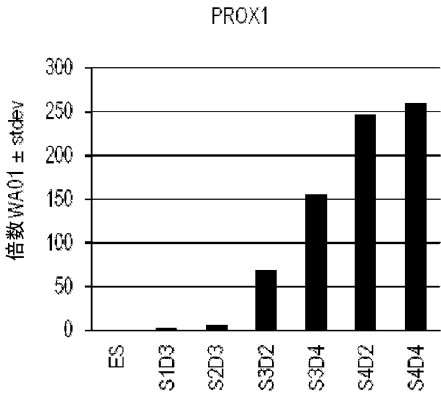
40

50

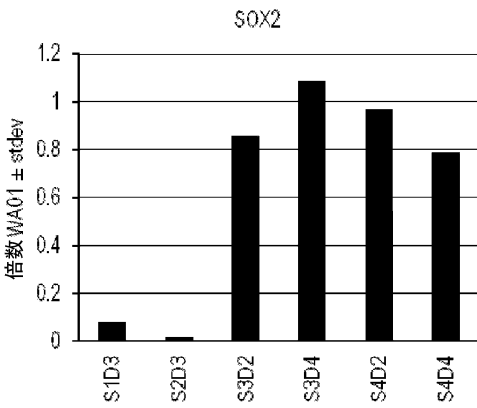
【図 1 7 G】



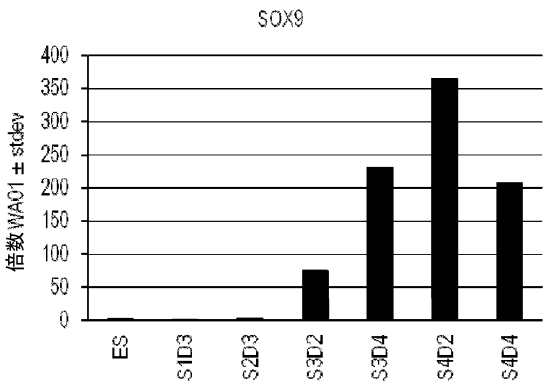
【図 1 7 H】



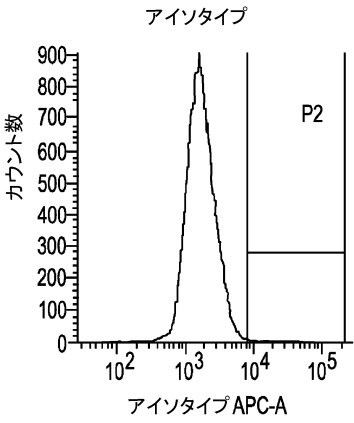
【図 1 7 I】



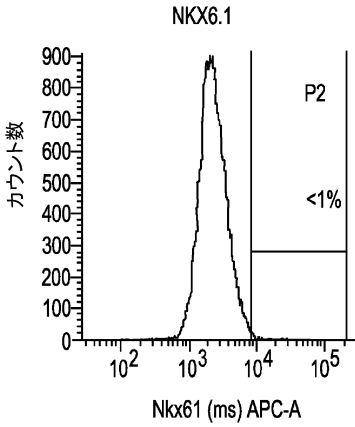
【図 1 7 J】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

20

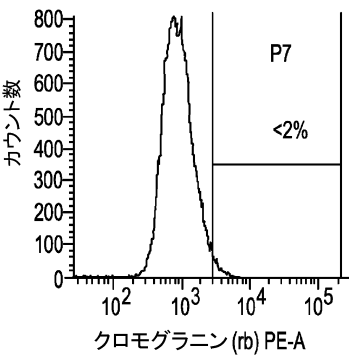
30

40

50

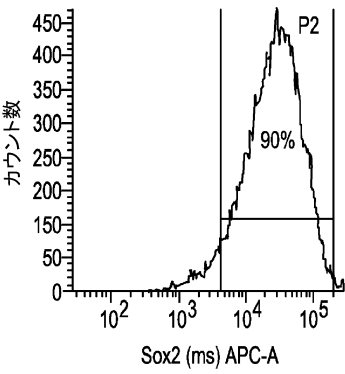
【図 1 8 C】

クロモグラニン



【図 1 8 D】

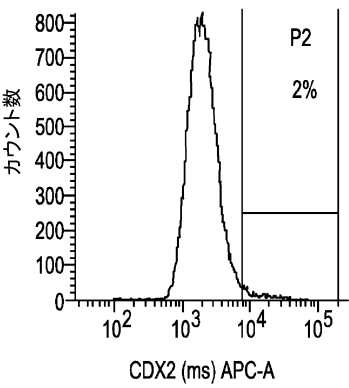
SOX2



10

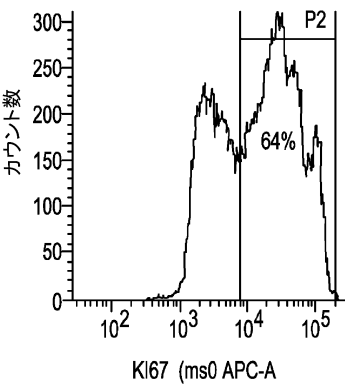
【図 1 8 E】

CDX2



【図 1 8 F】

KI-67



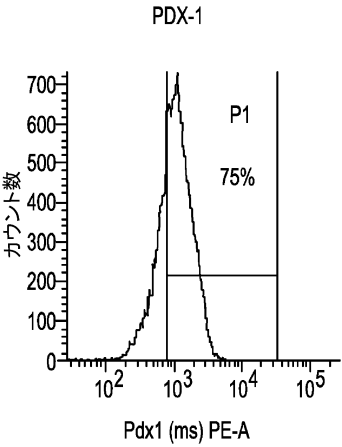
20

30

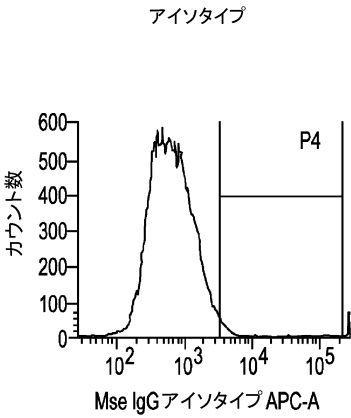
40

50

【図 1 8 G】

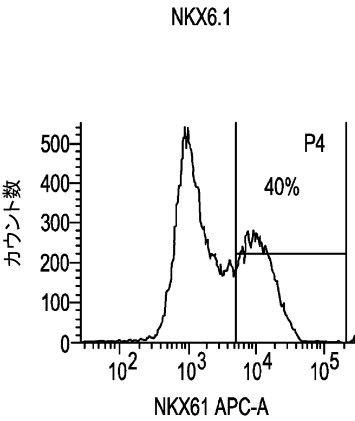


【図 1 9 A】

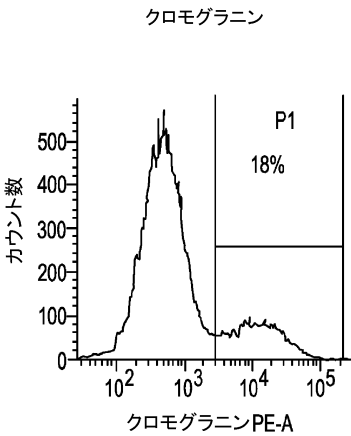


10

【図 1 9 B】



【図 1 9 C】



20

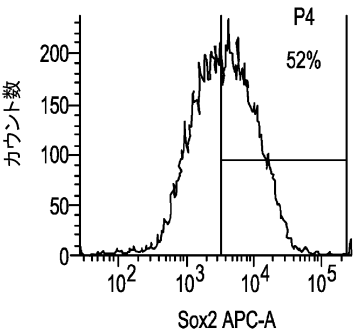
30

40

50

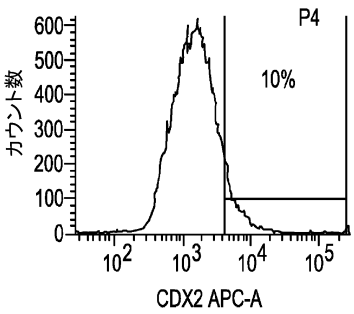
【図 19 D】

SOX2



【図 19 E】

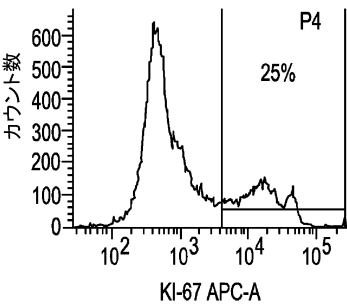
CDX2



10

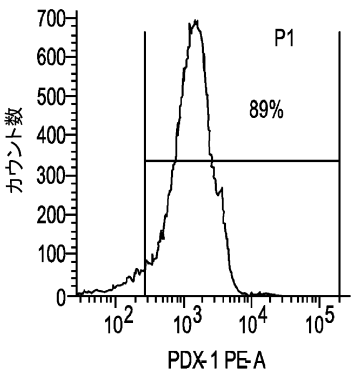
【図 19 F】

KI-67



【図 19 G】

PDX-1



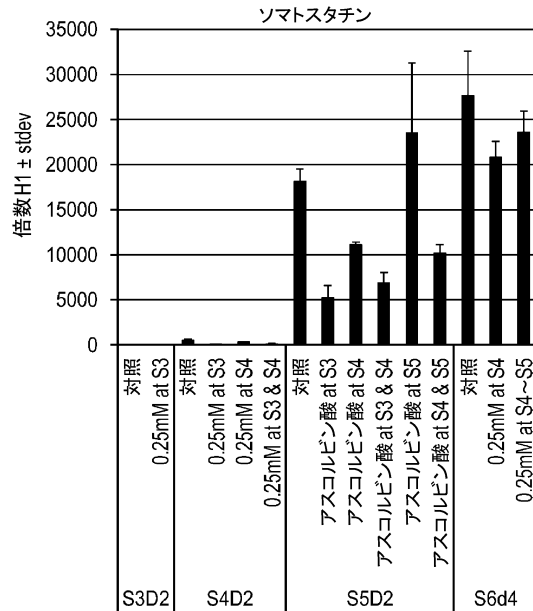
20

30

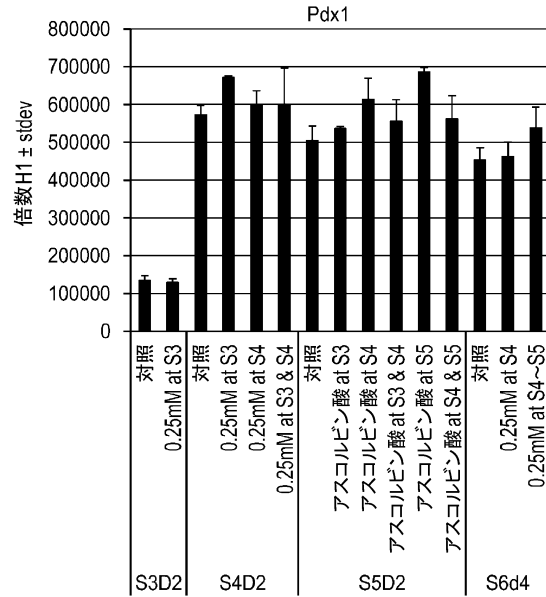
40

50

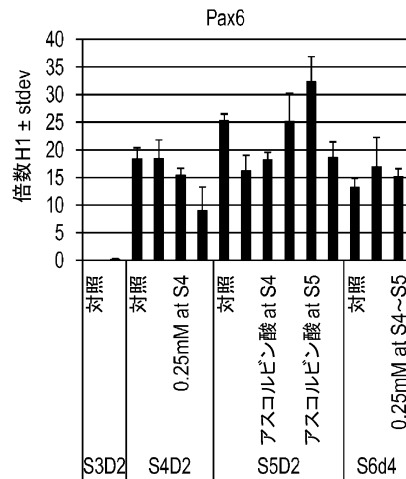
【図 20 A】



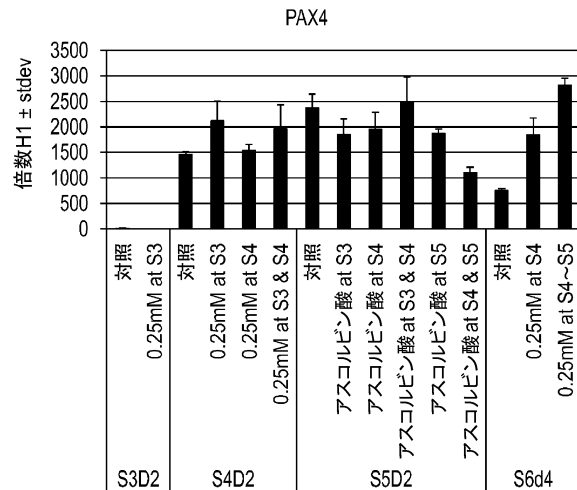
【図 20 B】



【図 20 C】



【図 20 D】



10

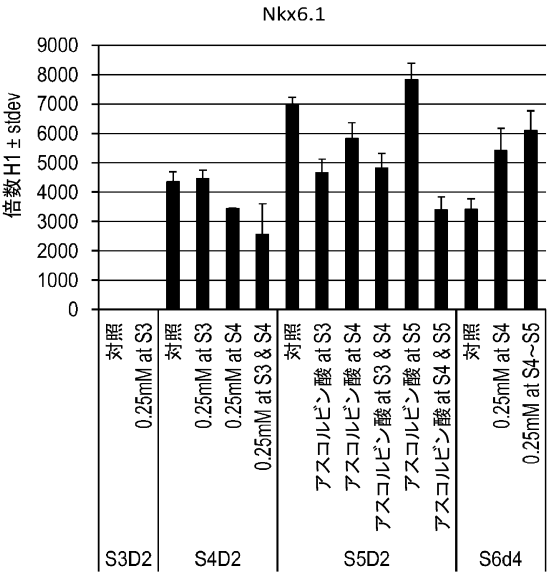
20

30

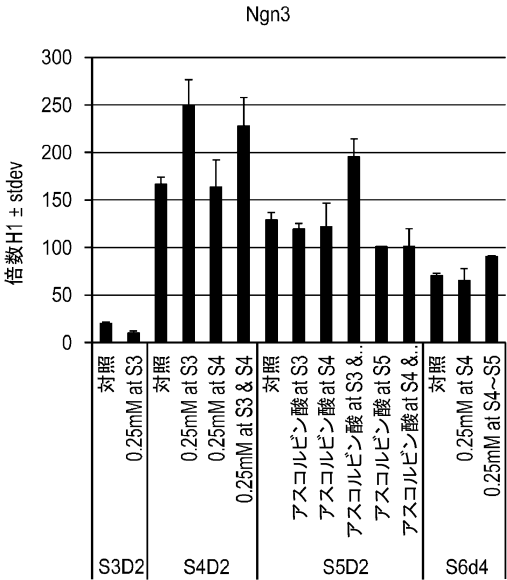
40

50

【図 20 E】

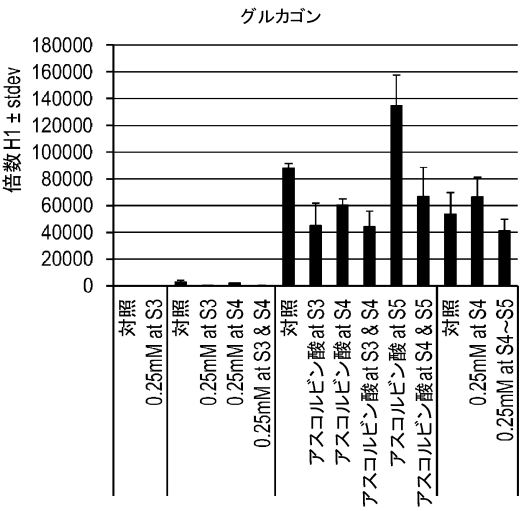


【図 20 F】

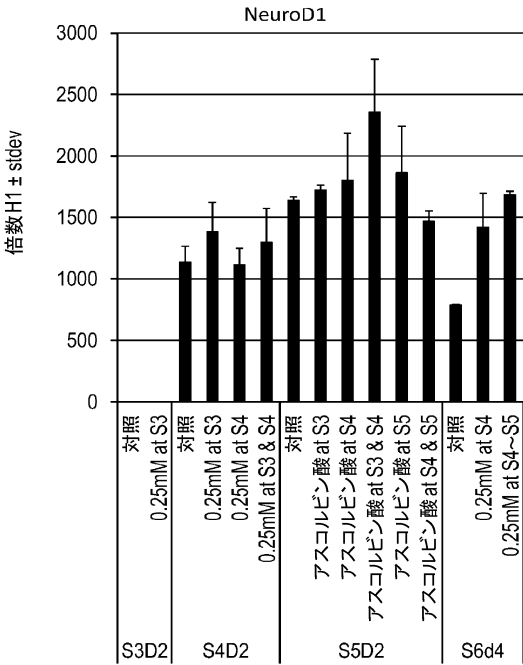


10

【図 20 G】



【図 20 H】



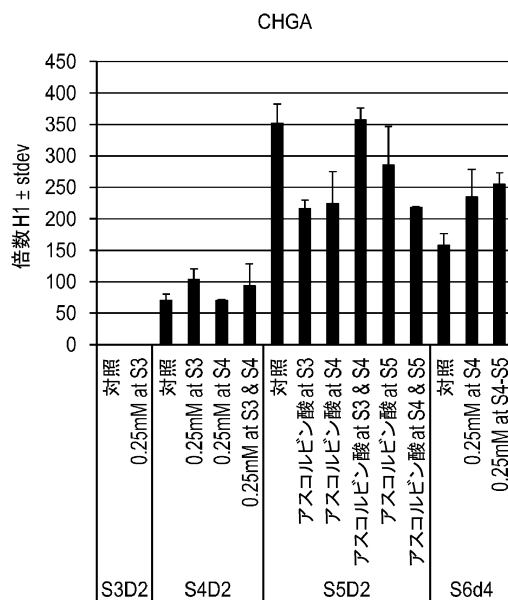
20

30

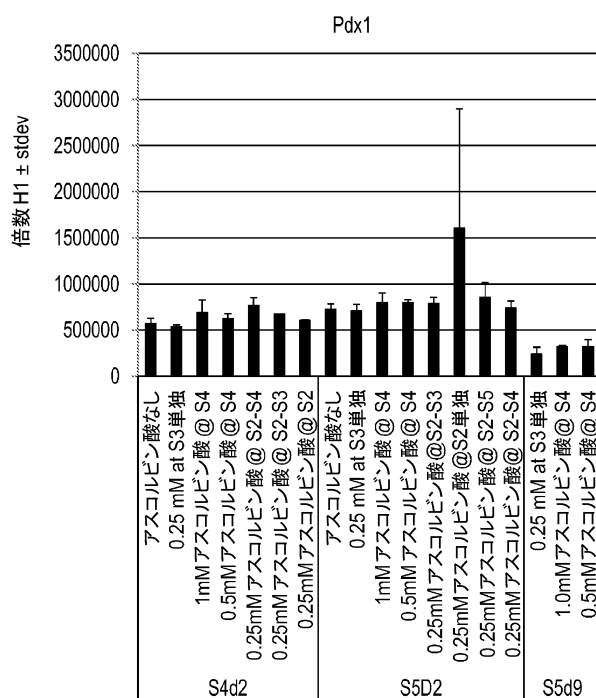
40

50

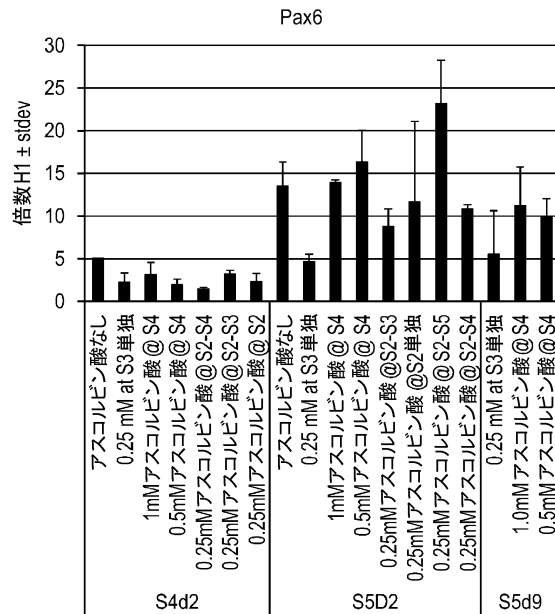
【図 20 J】



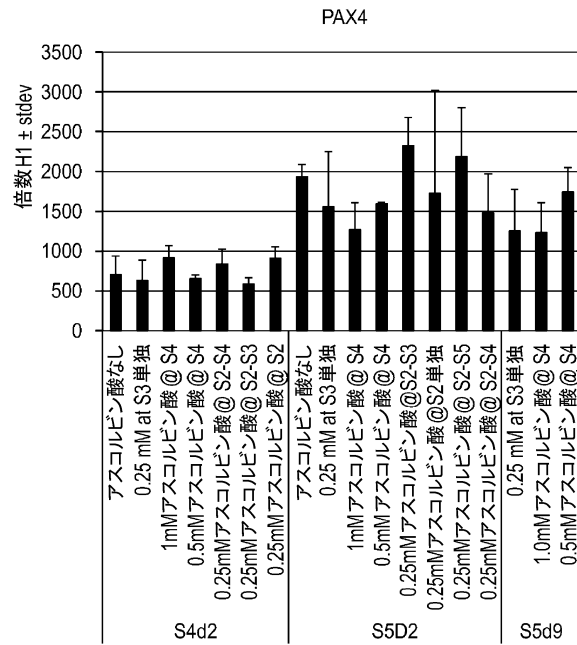
【図 2 1 B】



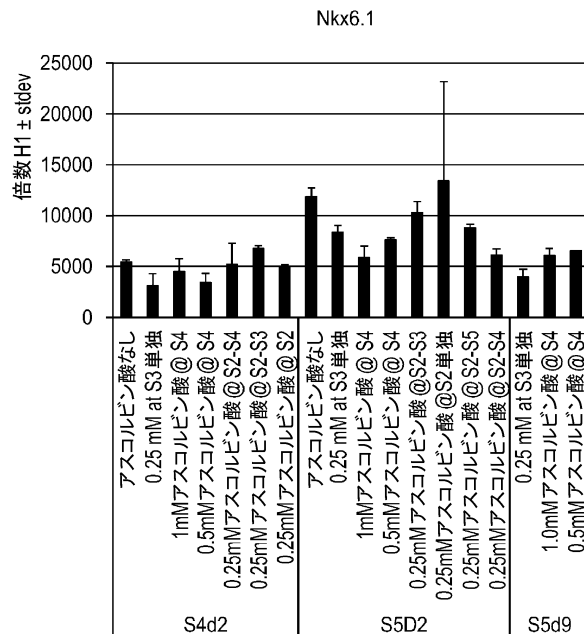
【図 2 1 C】



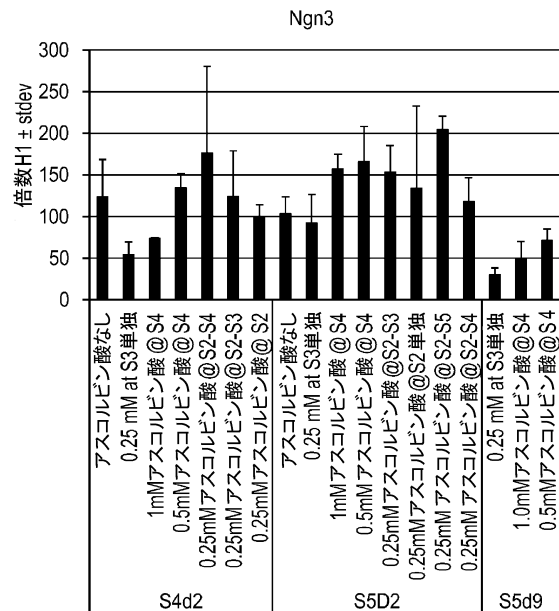
【図 2 1 D】



【図 2 1 E】



【図 2 1 F】



10

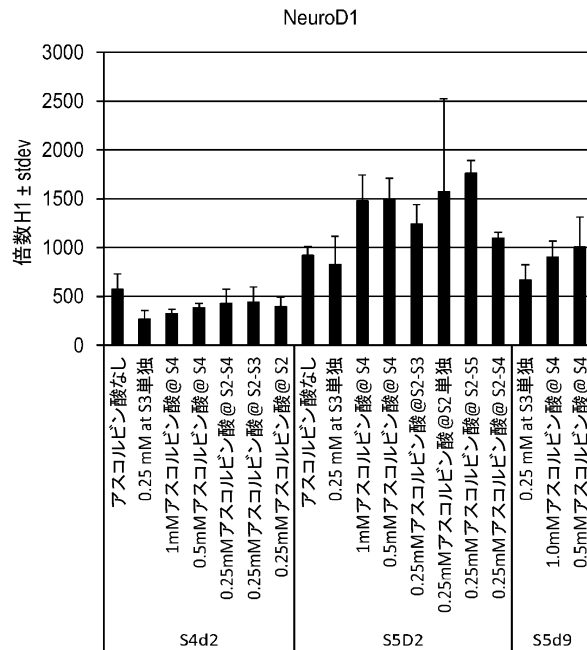
20

30

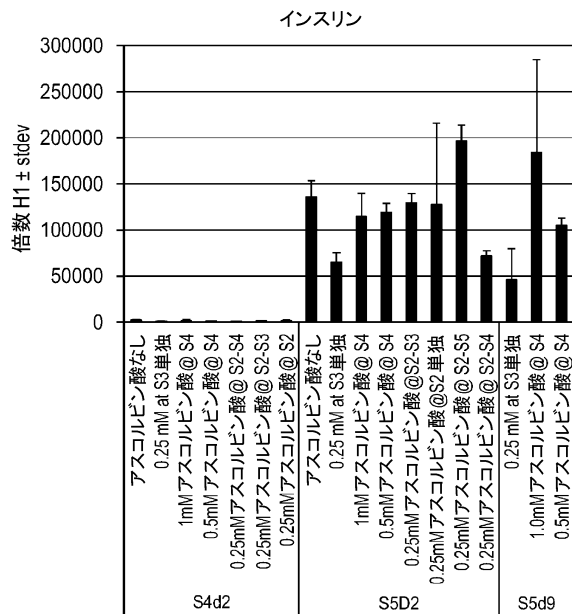
40

50

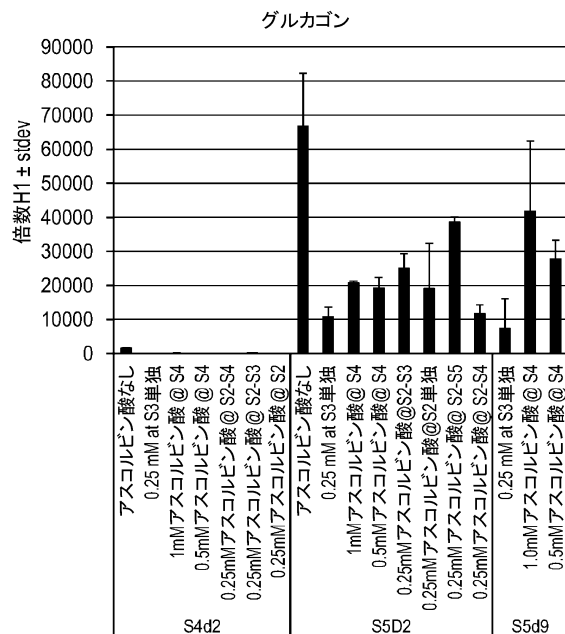
【図 2 1 G】



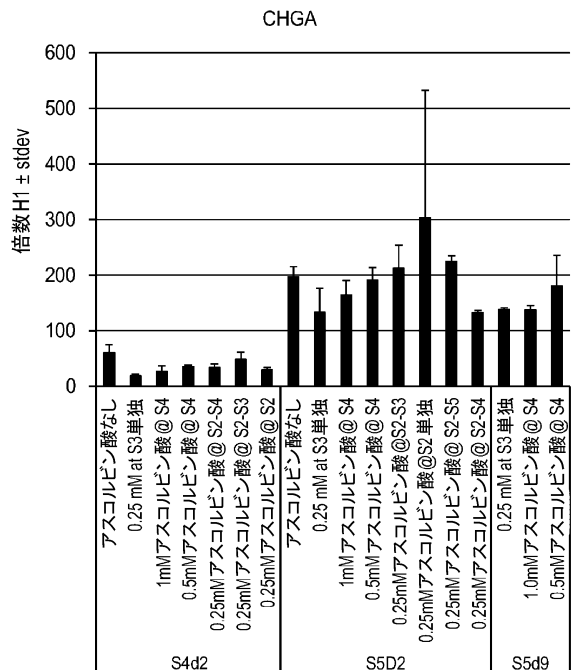
【図 2 1 H】



【図 2 1 I】



【図 2 1 J】



10

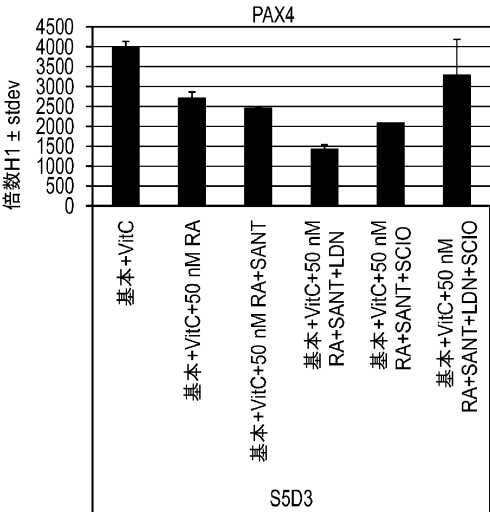
20

30

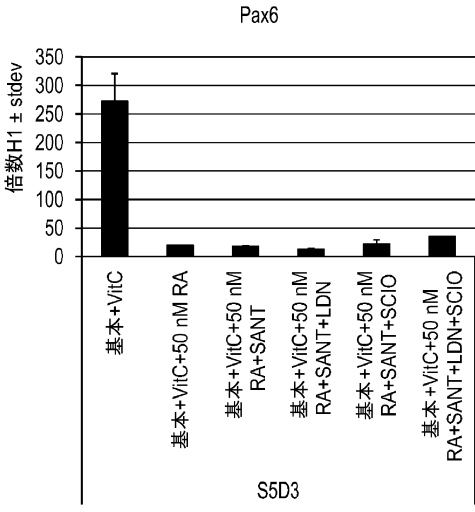
40

50

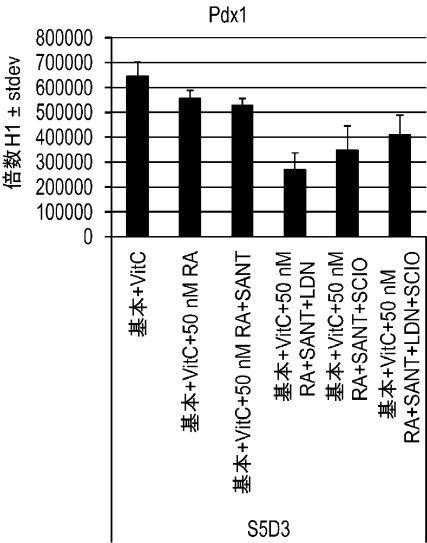
【图 2 2 A】



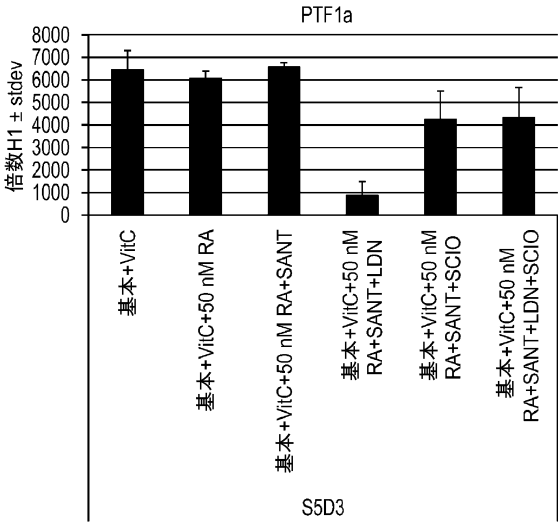
【图 2 2 B】



【图 2 2 C】



【图 2 2 D】



10

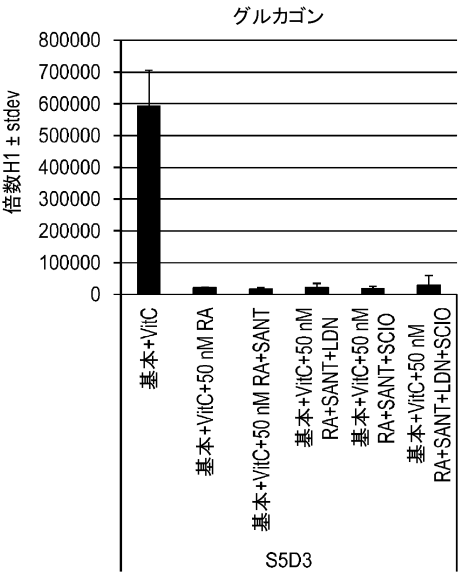
20

30

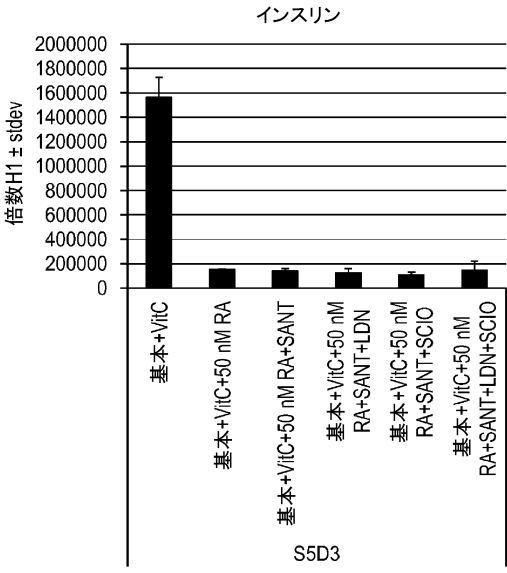
40

50

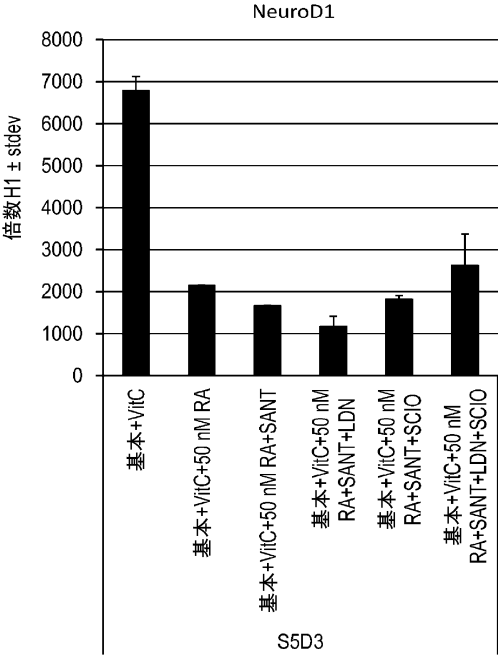
【図 2 2 E】



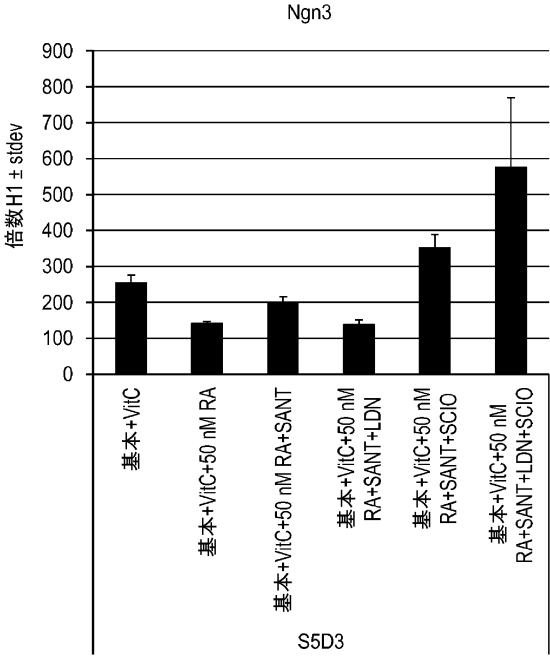
【図 2 2 F】



【図 2 2 G】



【図 2 2 H】



10

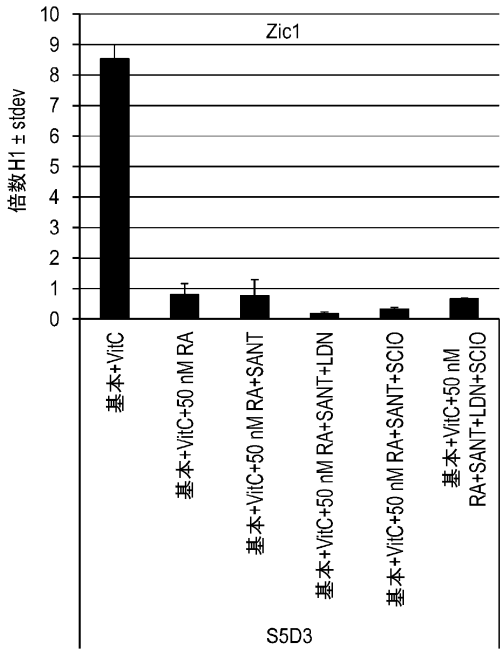
20

30

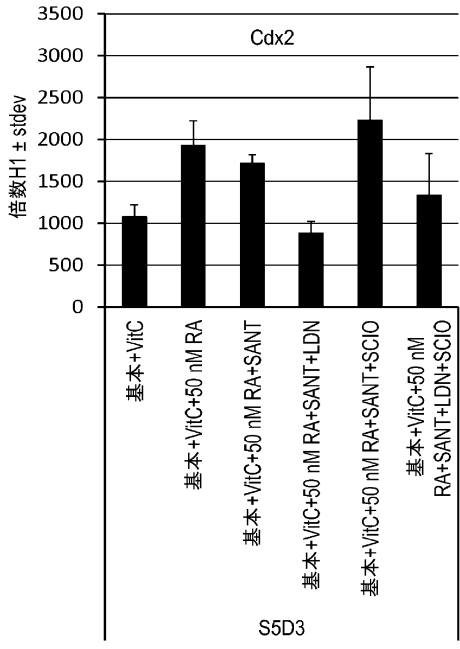
40

50

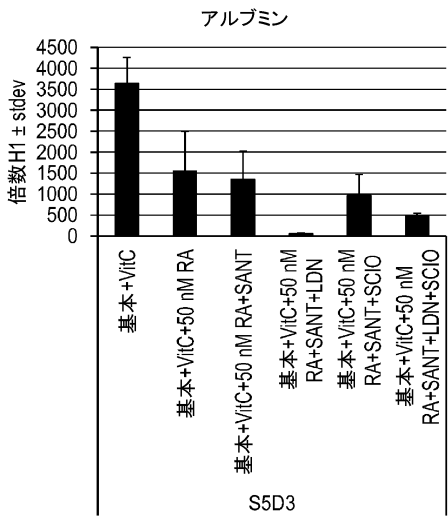
【図 2 2 I】



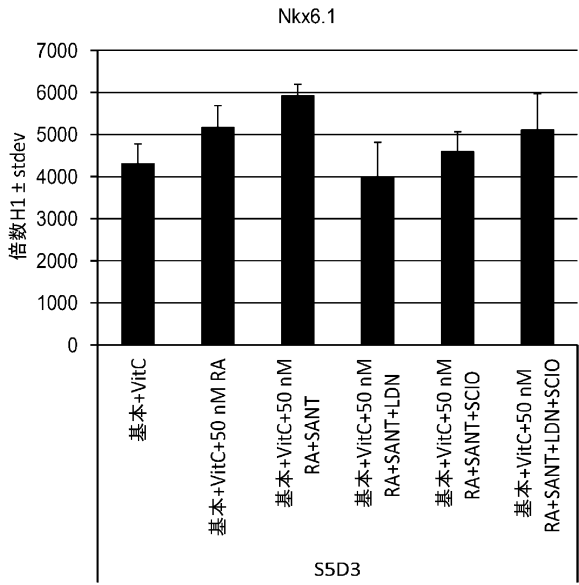
【図 2 2 J】



【図 2 2 K】



【図 2 2 L】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 レザニア, アリレザ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08558, スキルマン, グランドビュー ロード 199

審査官 進士 千尋

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0262956 (US, A1)

特表2011-504753 (JP, A)

特表2010-535036 (JP, A)

特表2009-528066 (JP, A)

特表2009-511061 (JP, A)

米国特許出願公開第2009/0291494 (US, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 5/071

C12N 5/0735

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)