(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118159644 A
(43)申请公布日 2024.06.07

(21)申请号 202280071828.9
(22)申请日 2022.10.25
(30)优先权数据
2021-173827 2021.10.25 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.04.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/039602 2022.10.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/074648 JA 2023.05.04
(71)申请人 富士胶片株式会社
地址 日本
(72)发明人 山崎奈穗 美马伸治 今仓悠贵
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王灵菇
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

权利要求书2页 说明书21页 附图3页

(54)发明名称

制造肠内分泌细胞的方法、来源于多能干细胞的肠内分泌细胞、培养基或培养基试剂盒及它们的利用

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种使用从多能干细胞衍生的肠道干细胞来制造肠内分泌细胞的方法、疾病机制的分析方法、受试物质的评价方法、针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法、来源于多能干细胞的肠内分泌细胞、培养基或培养基试剂盒以及用于制造肠内分泌细胞的试剂盒。根据本发明,可以提供一种制造肠内分泌细胞的方法,其包括使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞的步骤。

CN 118159644 A

1.一种制造肠内分泌细胞的方法,其包括:

使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞的步骤。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,

cAMP激活剂为毛喉素,DNA甲基转移酶抑制剂为5-氮杂-2'-脱氧胞苷。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述培养基包含转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂中的任一种以上。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,

转化生长因子-β信号抑制剂为A83-01,MEK抑制剂为PD98059和/或PD0325901。

5.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述培养基包含Notch抑制剂。

6.根据权利要求5所述的方法,其中,

Notch抑制剂为LY411575。

7.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述培养基不包含Wnt激活剂及Wnt抑制剂中的任一种以上。

8.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述培养基不包含视黄酸信号通路激活剂及音猬因子信号通路抑制剂中的任一种以上。

9.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述多能干细胞为人诱导多能干细胞。

10.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

使用了所述培养基的培养工序不包括悬浮培养工序。

11.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

在使用了所述培养基的培养工序中不形成球状体。

12.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所制造的肠内分泌细胞为片状。

13.一种疾病机制的分析方法,其包括:

通过权利要求1或2所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及使用所述肠内分泌细胞来分析疾病机制的工序。

14.一种受试物质的评价方法,其包括:

通过权利要求1或2所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及对在受试物质的存在下所述肠内分泌细胞分泌的激素进行定量的工序。

15.一种针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法,其包括:

通过权利要求1或2所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及在针对消化系统疾病的治疗药的存在下培养所述肠内分泌细胞的工序。

16.一种来源于多能干细胞的肠内分泌细胞,其表达TPH1、PYY、CHGA、REG4及NEUROG3,且不表达NKX6.1。

17.一种培养基或培养基试剂盒,其包含基础培养基、血清或血清替代物、cAMP激活剂、DNA甲基转移酶抑制剂、转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂,且实质上不包含表皮生

长因子受体的配体。

18.根据权利要求17所述的培养基或培养基试剂盒,其还包含Notch抑制剂。

19.根据权利要求17或18所述的培养基或培养基试剂盒,其用于制造肠内分泌细胞。

20.一种用于制造肠内分泌细胞的试剂盒,其包含:

权利要求17或18所述的培养基或培养基试剂盒及从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞。

制造肠内分泌细胞的方法、来源于多能干细胞的肠内分泌细胞、培养基或培养基试剂盒及它们的利用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过培养肠道干细胞或肠道上皮细胞来制造肠内分泌细胞的方法。本发明进一步涉及一种使用了通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞的疾病机制的分析方法、受试物质的评价方法以及针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法。本发明进一步涉及一种来源于多能干细胞的肠内分泌细胞。本发明涉及一种培养基或培养基试剂盒以及用于制造肠内分泌细胞的试剂盒。

背景技术

[0002] 肠内分泌系统通过分泌多种激素来微调体内的各种生理反应,从而控制人体对营养素的反应。肠内分泌细胞(以下,还称为EEC)在体内形成最大的内分泌系统,因此在胃肠损伤、糖尿病、肥胖等疾病中发挥着重要作用。肠内分泌细胞在整个肠上皮沿着隐窝-绒毛轴单独分布,但在体内仅以极小的比例(~1%)存在。

[0003] 肠内分泌细胞的重要功能为感知管腔内容物,尤其是营养素,并分泌调节食物摄入、能量稳态、葡萄糖耐量的多种激素(GLP-1等)。并且,已经提出肠内分泌细胞通过分泌GLP-1、PYY、GLP-2等激素,在胃旁路手术中发挥重要作用。因此,肠内分泌细胞为糖尿病及肥胖的治疗靶点。此外,也有报道肠内分泌细胞在先天免疫中具有免疫调节功能。肠内分泌细胞表达功能性Toll样受体(TLR),直接与由共生细菌生成的代谢物响应。并且,已经提出肠内分泌细胞具有在肠内有炎症时通过细胞数量的波动及激素分泌的变化来直接调整免疫细胞功能的可能性。认为肠内分泌细胞在代谢性疾病(糖尿病或肥胖等)、肠易激综合征、感染性肠炎、炎症性肠病等胃肠病理中也发挥重要作用。因此,对用于疾病干预的研究和开发的肠内分泌细胞产生了极大的兴趣。

[0004] 在专利文献1中,记载有一种用于从哺乳动物出生后细胞群获得肠内分泌细胞群的方法,其包括用上调CHGA的多个小分子处理哺乳动物出生后细胞群,使出生后细胞分化。并且,在专利文献2中,记载有肠道类器官的制作方法,其包括:使多能干细胞向内胚层样细胞分化的工序、使所获得的内胚层样细胞向肠道干细胞样细胞分化的工序、在表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、TGFβ受体抑制剂、GSK-3β抑制剂及ROCK抑制剂的存在下培养所获得的肠道干细胞样细胞的工序、培养所获得的细胞以形成球状体的工序及使所形成的球状体分化,以形成肠道类器官的工序。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开WO2017/120543号公报

[0008] 专利文献2:国际公开WO2020/091020号公报

发明内容

[0009] 发明要解决的技术课题

[0010] 为了能够进行代谢性及消化性疾病的研究,需要体外肠内分泌细胞的培养及评价系统。使用该肠内分泌细胞的培养及评价系统,不仅进行病理分析及治疗方法开发,还需要寻找如调节肠内分泌细胞的功能,并获取特定的肠内分泌细胞亚型的机制和化合物。

[0011] 为了肠内分泌细胞的有效利用,有必要对肠内分泌细胞进行详细分析并阐明其分化机制,但肠内分泌细胞在体内仅以极小的比例(~1%)存在。

[0012] 在专利文献1中有报道作为在体外制作肠内分泌细胞的方法,但专利文献1所述的方法为从包含肠道干细胞等体性干细胞的哺乳动物出生后细胞群分化诱导肠内分泌细胞的方法,本来肠道干细胞和与其类似的体性干细胞在活体内的存在频率也非常低。并且,尤其对于人类,很难从活体内分离肠道干细胞。

[0013] 本发明要解决的课题在于提供一种使用从多能干细胞衍生的肠道干细胞来制造肠内分泌细胞的方法。本发明进一步要解决的课题在于提供一种使用了通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞的疾病机制的分析方法、受试物质的评价方法以及针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法。本发明进一步要解决的课题在于提供一种来源于多能干细胞的肠内分泌细胞、培养基或培养基试剂盒以及用于制造肠内分泌细胞的试剂盒。

[0014] 用于解决技术课题的手段

[0015] 本发明人等为了解决上述课题而进行了深入研究的结果,发现通过使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞,能够制造肠内分泌细胞。本发明是根据上述见解而完成的。

[0016] 即,根据本发明,提供以下发明。

[0017] <1>一种制造肠内分泌细胞的方法,其包括:使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞的步骤。

[0018] <2>根据<1>所述的方法,其中,cAMP激活剂为Forskolin(毛喉素),DNA甲基转移酶抑制剂为5-Aza(氮杂)-2'-deoxycytidine(脱氧胞苷)。

[0019] <3>根据<1>或<2>所述的方法,其中,上述培养基包含转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂中的任一种以上。

[0020] <4>根据<3>所述的方法,其中,转化生长因子-β信号抑制剂为A83-01,MEK抑制剂为PD98059和/或PD0325901。

[0021] <5>根据<1>至<4>中任一项所述的方法,其中,上述培养基包含Notch抑制剂。

[0022] <6>根据<5>所述的方法,其中,Notch抑制剂为LY411575。

[0023] <7>根据<1>至<6>中任一项所述的方法,其中,上述培养基不包含Wnt激活剂及Wnt抑制剂中的任一种以上。

[0024] <8>根据<1>至<7>中任一项所述的方法,其中,上述培养基不包含视黄酸信号通路激活剂及音猬因子信号通路抑制剂中的任一种以上。

[0025] <9>根据<1>至<8>中任一项所述的方法,其中,上述多能干细胞为人诱导多能干细胞。

[0026] <10>根据<1>至<9>中任一项所述的方法,其中,使用了上述培养基的培养

工序不包括悬浮培养工序。

[0027] ＜11＞根据＜1＞至＜10＞中任一项所述的方法,其中,在使用了上述培养基的培养工序中不形成球状体。

[0028] ＜12＞根据＜1＞至＜11＞中任一项所述的方法,其中,所制造的肠内分泌细胞为片状。

[0029] ＜13＞一种疾病机制的分析方法,其包括:通过＜1＞至＜12＞中任一项所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及使用上述肠内分泌细胞来分析疾病机制的工序。

[0030] ＜14＞一种受试物质的评价方法,其包括:通过＜1＞至＜12＞中任一项所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及对在受试物质的存在下上述肠内分泌细胞分泌的激素进行定量的工序。

[0031] ＜15＞一种针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法,其包括:通过＜1＞至＜12＞中任一项所述的方法来制造肠内分泌细胞的工序及在针对消化系统疾病的治疗药的存在下培养上述肠内分泌细胞的工序。

[0032] ＜16＞一种来源于多能干细胞的肠内分泌细胞,其表达TPH1、PYY、CHGA、REG4及NEUROG3,且不表达NKX6.1。

[0033] ＜17＞一种培养基或培养基试剂盒,其包含基础培养基、血清或血清替代物、cAMP激活剂、DNA甲基转移酶抑制剂、转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂,且实质上不包含表皮生长因子受体的配体。

[0034] ＜18＞根据＜17＞所述的培养基或培养基试剂盒,其还包含Notch抑制剂。

[0035] ＜19＞根据＜17＞或＜18＞所述的培养基或培养基试剂盒,其用于制造肠内分泌细胞。

[0036] ＜20＞一种用于制造肠内分泌细胞的试剂盒,其包含:＜17＞至＜19＞中任一项所述的培养基或培养基试剂盒及从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞。

[0037] 发明效果

[0038] 根据本发明,能够将具有均一性并且可以大量制造的多能干细胞作为起始材料来制造肠内分泌细胞。并且,能够通过使用通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞,评价受试物质等消化道激素的产生能力。基于本发明的培养基或培养基试剂盒以及用于制造肠内分泌细胞的试剂盒能够用作药物发现支持工具。

附图说明

[0039] 图1表示在表1的各种培养基中培养的F-hiSIEC细胞中EEC标志物的基因表达。

[0040] 图2表示在表2的培养基中添加了0.5～2.0μmol/L的LY411575或5～10μmol/L的DAPT的条件下培养的F-hiSIEC细胞中EEC标志物的基因表达。

[0041] 图3表示在Caco-2细胞、在F-hiSIEC Culture Medium(F-hiSIEC培养基)中培养F-hiSIEC的细胞(F-hiSIEC)、在表3的培养基中培养F-hiSIEC并向EEC诱导的细胞(EEC)中NKX6.1的基因表达。

具体实施方式

[0042] 以下,对本发明的实施方式进行说明。

[0043] 本说明书中的术语具有以下含义。

[0044] 5-aza-2'dc:5-Aza-2'-deoxycytidine:5-氮杂-2'-脱氧胞苷

[0045] bFGF:Basic Fibroblast Growth Factor:碱性成纤维细胞生长因子

[0046] BMP4:Bone morphogenetic protein 4:骨形态发生蛋白4

[0047] cAMP:Cyclic adenosine monophosphate:环磷酸腺苷

[0048] CHGA:Chromogranin A:嗜铬粒蛋白A

[0049] Cript:Cysteine-rich PDZ-binding protein:富含半胱氨酸的PDZ结合蛋白

[0050] DMEM:Dulbecco's Modified Eagle's Medium:达尔伯克改良伊格尔培养基

[0051] DNMT:DNA甲基转移酶

[0052] EGF:Epidermal Growth Factor:表皮生长因子

[0053] FBS:Fetal Bovine Serum:胎牛血清

[0054] Fbxo15:F-Box Protein 15:F-框蛋白15

[0055] FGF2:Fibroblast Growth Factor-2:成纤维细胞生长因子2

[0056] GLP:胰高血糖素样肽-

[0057] GSK-3β:Glycogen synthase kinase 3β:糖原合酶激酶3β

[0058] LIF:Leukemia inhibitory factor:白血病抑制因子

[0059] MEK1:MAPK-ERK kinase 1:MAPK-ERK激酶1

[0060] NEAA:Non-Essential Amino Acids:非必需氨基酸

[0061] NEUROG3:Neurogenin 3:神经元素3

[0062] NKX6.1:homeobox protein Nkx-6.1:同源框蛋白Nkx-6.1

[0063] PKA:protein kinase A:蛋白激酶A

[0064] PYY:肽YY

[0065] REG4:Regenerating islet-derived protein(再生胰岛衍生蛋白)4:再生胰岛衍生家族成员4

[0066] ROCK:Rho-associated protein kinase:Rho关联蛋白激酶

[0067] SCF:Stem cell factor:干细胞因子

[0068] TGFβ:Transforming Growth Factor-β:转化生长因子β

[0069] TPH1:Tryptophan hydroxylase 1:色氨酸羟化酶1

[0070] VEGF:vascular endothelial growth factor:血管内皮细胞生长因子

[0071] Wnt:Wingless-type MMTV integration site family:无翅型MMTV整合位点家族成员

[0072] ＜制造肠内分泌细胞的方法＞

[0073] 基于本发明的制造肠内分泌细胞的方法为包括使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞的步骤的方法。

[0074] 在本发明中,通过使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基,能够有效地诱导肠内分泌细胞。

[0075] 在本发明中,使用从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞。

[0076] "多能干细胞"是指兼备能够分化为构成活体的所有细胞的能力(分化多能性)和

经过细胞分裂产生具有与自身相同的分化能力的子细胞的能力(自我复制能力)的细胞。分化多能性能够通过将评价对象的细胞移植到裸鼠中并测试有无形成包含三胚层(外胚层、中胚层、内胚层)的每一种细胞的畸胎瘤来评价。

[0077] 作为多能干细胞,能够举出胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、诱导多能干细胞(iPS细胞)等,只要是兼备分化多能性及自我复制能力的细胞,则并不限定于此。优选使用ES细胞或iPS细胞。进一步优选使用iPS细胞。多能干细胞优选为哺乳动物(例如,人或黑猩猩等灵长类、小鼠或大鼠等啮齿类)的细胞,尤其优选为人的细胞。因此,在本发明的最优选的方式中,作为多能干细胞,可以使用人诱导多能干细胞(人iPS细胞)。

[0078] ES细胞例如能够通过培养着床前的早期胚胎、构成上述早期胚胎的内部细胞团、单个卵裂球等来建立(Manipulating the Mouse Embryo ALaboratory Manual(小鼠胚胎操作实验手册),Second Edition(第二版),Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社)(1994);Thomson,J.A.et al.(等人),Science(科学),282,1145-1147(1998))。作为早期胚胎,可以使用通过核移植体细胞核而制作出的早期胚胎(Wilmut et al.(Nature(自然),385,810(1997))、Cibelli et al.(Science,280,1256(1998))、入谷明等人(蛋白质核酸酶,44,892(1999))、Baguisi et al.(Nature Biotechnology(自然生物技术),17,456(1999))、Wakayama et al.(Nature,394,369(1998);Nature Genetics(自然遗传学),22,127(1999);Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),96,14984(1999))、Rideout III et al.(Nature Genetics,24,109(2000)、Tachibana etal.(Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer(体细胞核移植衍生的人胚胎干细胞),Cell(2013)in press(细胞(2013)待出版))。作为早期胚胎,可以使用孤雌胚胎(Kim et al.(Science,315,482-486(2007))、Nakajima et al.(Stem Cells(干细胞),25,983-985(2007))、Kim et al.(Cell Stem Cell(细胞-干细胞),1,346-352(2007))、Revazova et al.(Cloning Stem Cells(克隆干细胞),9,432-449(2007))、Revazova et al.(Cloning Stem Cells,10,11-24(2008))。除了上述揭示的论文以外,关于ES细胞的制作,可参考Strelchenko N.,et al.Reprod Biomed Online.(生殖生物医学在线杂志)9:623-629,2004;Klimanskaya I.,et al.Nature 444:481-485,2006;Chung Y.,et al.Cell Stem Cell 2:113-117,2008;Zhang X.,et al Stem Cells 24:2669-2676,2006;Wassarman,P.M.et al.Methods in Enzymology(酶学方法杂志),Vol.365,2003等。另外,通过ES细胞与体细胞的细胞融合而获得的融合ES细胞也包含于本发明的方法中所使用的胚胎干细胞中。

[0079] ES细胞中也有能够从保存机构获得的细胞或市售的细胞。例如,关于人ES细胞,能够从京都大学再生医科学研究所(例如,KhES-1、KhES-2及KhES-3)、WiCell Research Institute(WiCell研究所)、ESI BIO等获得。

[0080] EG细胞能够通过在LIF、bFGF、SCF的存在下培养原始生殖细胞等来建立(Matsui et al.,Cell,70,841-847(1992)、Shamblott et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,9523,13726-13731(1998)、Turnpenny et al.,Stem Cells,21(5),598-609,2003))。

[0081] “诱导多能干细胞(iPS细胞)”是指通过初始化因子的导入等重编程体细胞来制作的具有多能性(多分化能力)和增殖能力的细胞。诱导多能干细胞显示出与ES细胞接近的性质。iPS细胞的制作中所使用的体细胞并不受特别限定,可以为分化的体细胞,也可以为未

分化的干细胞。并且,其来源也不受特别限定,但优选使用哺乳动物(例如,人或黑猩猩等灵长类、小鼠或大鼠等啮齿类)的体细胞,尤其优选使用人的体细胞。例如,除了胎儿期的体细胞以外,还可以使用来源于成人的体细胞(即,成熟的体细胞)。作为体细胞,例如可以举出(1)神经干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、齿髓干细胞等组织干细胞(体干细胞)、(2)组织前体细胞、(3)成纤维细胞(皮肤细胞等)、上皮细胞、肝细胞、淋巴细胞(T细胞、B细胞)、内皮细胞、肌肉细胞、毛细胞、胃粘膜细胞、肠细胞、脾细胞、胰腺细胞(胰腺外分泌细胞等)、脑细胞、肺细胞、肾细胞、皮肤细胞等分化的细胞。iPS细胞能够通过至今为止报道的各种方法来制作。并且,当然也可设想适用今后开发的iPS细胞制作法。

[0082] iPS细胞制作法的最基本的方法为利用病毒将转录因子即Oct3/4、Sox2、Klf4及c-Myc这4种因子导入细胞中的方法(Takahashi K,Yamanaka S:Cell126(4),663-676,2006;Takahashi,K,et al:Cell 131(5),861-72,2007)。关于人iPS细胞,有报道为通过导入Oct4、Sox2、Lin28及Nanog这4种因子来建立(Yu J,et al:Science 318(5858),1917-1920,2007)。也有报道通过导入除c-Myc以外的3种因子(Nakagawa M,et al:Nat.Biotechnol.26(1),101-106,2008)、导入Oct3/4及Klf4这两种因子(Kim J B,etal:Nature 454(7204),646-650,2008)或仅导入Oct3/4(Kim J B,et al:Cell 136(3),411-419,2009)来建立iPS细胞。并且,也有报道将基因的表达产物即蛋白质导入细胞中的方法(Zhou H,Wu S,Joo JY,et al:Cell Stem Cell 4,381-384,2009;Kim D,Kim CH,Moon JI,et al:Cell Stem Cell 4,472-476,2009)。另一方面,也有报道能够通过使用针对组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂BIX-01294或组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸(VPA)或BayK8644等来提高制作效率或减少所导入的因子等(Huangfu D,et al:Nat.Biotechnol.26(7),795-797,2008;Huangfu D,et al:Nat.Biotechnol.26(11),1269-1275,2008;Silva J,et al:PLoS.Biol.(Plos生物学)6(10),e 253,2008)。关于基因导入法也进行了研究,除了将逆转录病毒利用于基因导入的技术以外,还开发出将慢病毒(Yu J,et al:Science 318(5858),1917-1920,2007)、腺病毒Stadtfeld M,et al:Science 322(5903),945-949,2008)、质粒(Okita K,et al:Science 322(5903),949-953,2008)、转座子载体(Woltjen K,Michael IP,Mohseni P,et al:Nature 458,766-770,2009;Kaji K,Norrby K,Pac a A,et al:Nature 458,771-775,2009;Yusa K,Rad R,Takeda J,et al:Nat Methods(自然-方法)6,363-369,2009)或附加体型载体(Yu J,Hu K,Smuga-Otto K,Tian S,et al:Science 324,797-801,2009)利用于基因导入的技术。

[0083] 产生了向iPS细胞的转化即初始化(重编程)的细胞能够将Fbxo15、Nanog、Oct/4、Fgf-4、Esg-1及Cript等多能干细胞标志物(未分化标志物)的表达等作为指标而进行选择。将所选择的细胞作为iPS细胞而回收。

[0084] 例如,也能够从国立大学法人京都大学或独立行政法人理化学研究所生物资源中心获得iPS细胞。

[0085] 在本说明书中,“分化诱导”是指促使沿着特定的细胞谱系分化的作用。在本发明中,使用从多能干细胞分化诱导的肠道干细胞或肠道上皮细胞。

[0086] ＜＜从多能干细胞向肠道干细胞的分化＞＞

[0087] 通过在诱导分化为肠道干细胞的条件下培养多能干细胞,能够制造肠道干细胞。多能干细胞只要向肠道干细胞分化,则培养条件并不受特别限定。典型地,进行以下说明的

2个阶段的分化诱导,即,多能干细胞向内胚层样细胞的分化(工序(1-1))及内胚层样细胞向肠道干细胞的分化(工序(1-2)),以使多能干细胞经由内胚层样细胞分化为肠道干细胞。

[0088] 工序(1-1)向内胚层样细胞的分化

[0089] 在该工序中,培养多能干细胞,并使其向内胚层样细胞分化。换言之,在诱导分化为内胚层的条件下培养多能干细胞。多能干细胞只要分化为内胚层样细胞,则培养条件并不受特别限定。例如,根按照常规方法在添加了激活素A的培养基中培养。在该情况下,将培养基中的激活素A的浓度例如设为10ng/mL～200ng/mL,优选设为20ng/mL～150ng/mL。从细胞的增殖率或维持等观点考虑,优选在培养基中添加血清或血清替代物(KnockOut™ Serum Replacement(KnockOut™血清替代物)(KSR)等)。血清并不限于胎牛血清,也能够使用人血清或羊血清等。血清或血清替代物的添加量例如为0.1%(v/v)～10%(v/v)。

[0090] 也可以将Wnt/β-连环蛋白信号通路的抑制剂(例如,六氯酚、槲皮素、作为Wnt配体的Wnt3a)添加到培养基中以达到促进向内胚层样细胞的分化。

[0091] 也可以将BMP4、VEGF及FGF2中的一种以上添加到培养基中以达到促进向内胚层样细胞的分化。

[0092] 该工序也能够通过国际公开第2014/165663号小册子中所记载的方法或依据该方法的方法来进行。

[0093] 在优选的一方式中,作为工序(1-1),进行2个阶段的培养。第1阶段的培养在添加了相对低浓度的血清(例如,0.1%(v/v)～1%(v/v))的培养基中进行,随后的第2阶段的培养在血清浓度高于第1阶段的培养的培养基(血清浓度例如为1%(v/v)～10%(v/v))中进行。如此采用2个阶段的培养在通过第1阶段的培养抑制未分化细胞的增殖,且通过随后的第2阶段使分化的细胞增殖的方面优选。

[0094] 工序(1-1)的期间(培养期间)例如为1天～10天,优选为2天～7天。当采用2个阶段的培养作为工序(1-1)时,将第1阶段的培养期间例如设为1天～7天,优选设为2天～5天,将第2阶段的培养期间例如设为1天～6天,优选设为1天～4天。

[0095] 工序(1-2)向肠道干细胞的分化

[0096] 在该工序中,培养在工序(1-1)中所获得的内胚层样细胞,并使其向肠道干细胞分化。换言之,在诱导分化为肠道干细胞的条件下培养内胚层样细胞。内胚层样细胞只要分化为肠道干细胞,则培养条件并不受特别限定。优选在FGF2(成纤维细胞生长因子2)的存在下或在GSK-3β抑制剂的存在下进行培养。作为FGF2,优选使用人FGF2(例如,人重组FGF2)。

[0097] 典型地,将经过工序(1-1)而获得的细胞群或其一部分不进行分选而供于工序(1-2)。另一方面,也可以从经过工序(1-1)而获得的细胞群中分选内胚层样细胞之后实施工序(1-2)。内胚层样细胞的分选例如只要以细胞表面标志物为指标而用流式细胞仪(细胞分选仪)进行即可。

[0098] “FGF2的存在下”的含义与将FGF2添加到培养基中的条件相同。因此,为了在FGF2的存在下进行培养,可以使用添加了FGF2的培养基。若示出FGF2的添加浓度的例子,则为100ng/mL～500ng/mL。

[0099] 同样地,“在GSK-3β抑制剂的存在下”的含义与将GSK-3β抑制剂添加到培养基中的条件相同。因此,为了在GSK-3β抑制剂的存在下进行培养,可以使用添加了FGF2的培养基。作为GSK-3β抑制剂,能够例示出CHIR 99021、SB216763、CHIR 98014、TWS119、Tideglusib、

SB415286、BIO、AZD2858、AZD1080、AR-A014418、TDZD-8、LY2090314、IM-12、靛玉红(Indirubin)、Bikinin、1-氮杂坎帕罗酮(1-Azakenpaullone)。GSK-3β抑制剂的添加浓度可以为0.1nmol/L～30μmol/L,优选为1nmol/L～10μmol/L,更优选为10nmol/L～10μmol/L,进一步优选为50nmol/L～5μmol/L。

[0100] 工序(1-2)的期间(培养期间)例如为2天～10天,优选为3天～7天。若上述培养期间过短,则无法充分获得所期待的效果(提高分化效率、促进获得作为肠道干细胞的功能)。另一方面,若上述培养期间过长,则引起分化效率的降低。

[0101] 关于向肠道干细胞分化的情况,例如,能够以肠道干细胞标志物的表达为指标来进行判定或评价。肠道干细胞标志物的例子可以举出包含富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(LGR5)、肝配蛋白B2受体(EphB2)。

[0102] 第一分化工序结束时的细胞密度可以为5.0×10^4细胞/cm^2～20×10^4细胞/cm^2,优选为6.0×10^4细胞/cm^2～16×10^4细胞/cm^2,更优选为7.0×10^4细胞/cm^2～14×10^4细胞/cm^2。

[0103] 通过工序(1-2)得到的肠道干细胞也能够冷冻保存。可以解冻冷冻保存的肠道干细胞,并实施以后的工序(增殖工序等)。细胞的冷冻保存中通常能够使用在培养细胞的冷冻保存中所使用的溶液,且可以包含培养基、DMSO、血清及通常的冷冻保存用试剂等。作为通常的冷冻保存用试剂的例子,可以举出CryoStor(注册商标)Freeze Media、CellBanker(注册商标)、FreSR(商标)-S、NutriFreez(商标)D10 Cryopreservation Medium、Cellvation、Cryoscarless(注册商标)及Bambanker(注册商标)。

[0104] ＜＜从肠道干细胞向肠道上皮细胞的分化＞＞

[0105] 从肠道干细胞向肠道上皮细胞的分化工序优选包括在MEK1抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、TGFβ受体抑制剂、EGF及在cAMP激活剂的存在下使肠道干细胞向肠道上皮细胞分化的工序。

[0106] 通过使用cAMP激活剂,能够使细胞内的cAMP水平主动升高。“在MEK1抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、TGFβ受体抑制剂、EGF及cAMP激活剂的存在下”是指为了进行构成第二分化工序的1种或2种以上的培养而需要这些所有化合物,并不要求同时使用这些所有化合物,即,不要求进行使用添加了这些所有化合物的培养基的培养作为必要条件。

[0107] 向肠道上皮细胞的分化能够由1种或2种以上的培养组成。在构成向肠道上皮细胞的分化工序的各培养中,例如,能够使用:

[0108] 作为必要成分添加了EGF的培养基;

[0109] 作为必要成分添加了EGF及ROCK抑制剂(例如,Y-27632)的培养基;

[0110] 作为必要成分添加了EGF及cAMP激活剂(例如毛喉素(Forskolin))的培养基;

[0111] 作为必要成分添加了EGF、MEK1抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、TGFβ受体抑制剂的培养基;

[0112] 作为必要成分添加了EGF、cAMP激活剂(例如,毛喉素(Forskolin))、MEK1抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、TGFβ受体抑制剂的培养基等。

[0113] 作为MEK1抑制剂,能够举出PD98059、PD184352、PD184161、PD0325901、U0126、MEK inhibitor(抑制剂)I、MEK inhibitor II、MEK1/2inhibitor II、SL327。同样地,作为DNA甲基转移酶抑制剂,能够举出5-氮杂-2-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、RG108、泽布拉林(Zebularine)。关于TGFβ受体抑制剂,若考虑后述的实施例中所使用的A8301对TGF-β受体

ALK4、ALK5、ALK7显现出抑制活性,只要优选使用对TGF-β受体ALK4、ALK5、ALK7中的一种以上显现出抑制活性的抑制剂即可。例如,A8301、SB431542、SB-505124、SB525334、D4476、ALK5 inhibitor、LY2157299、LY364947、GW788388、RepSox满足上述条件。作为cAMP激活剂,能够使用毛喉素、吲哚美辛、NKH477(考福辛达罗帕特)、来源于细胞的毒素蛋白(百日咳毒素、霍乱毒素)、PACAP-27、PACAP-38、SKF83822等。毛喉素、NKH477(考福辛达罗帕特)、霍乱毒素、PACAP-27、PACAP-38、SKF83822显示腺苷酸环化酶激活作用,以促进细胞内cAMP的合成。

[0114] 若示出MEK1抑制剂的添加浓度的例子(在PD98059的情况下),则为4μmol/L～100μmol/L,优选为10～40μmol/L。同样地,若示出DNA甲基转移酶抑制剂的添加浓度的例子(在5-氮杂-2'-脱氧胞苷的情况下),则为1μmol/L～25μmol/L,优选为2.5μmol/L～10μmol/L,若示出TGFβ受体抑制剂的添加浓度的例子(在A8301的情况下),则为0.1μmol/L～2.5μmol/L,优选为0.2μmol/L～1μmol/L。EGF的添加浓度的例子为5ng/mL～100ng/mL,优选为10ng/mL～50ng/mL。并且,若示出cAMP激活剂的添加浓度的例子(在毛喉素的情况下),则为1μmol/L～200μmol/L,优选为5μmol/L～100μmol/L。另外,关于使用与所例示出的化合物即PD98059、5-氮杂-2-脱氧胞苷、A8301及毛喉素不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与所例示出的化合物(PD98059、5-氮杂-2-脱氧胞苷、A8301、毛喉素)的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0115] 除了上述条件以外,也可以在向细胞供给cAMP的条件(称为"追加条件1")及存在cAMP分解酶抑制剂的条件(称为"追加条件2")或这些中的任一条件下进行向肠道上皮细胞的分化的工序。追加条件1(向细胞供给cAMP的条件)的含义与存在能够被吸入细胞内且若被吸入细胞内则作为cAMP起作用的化合物的条件相同。因此,为了满足追加条件1,例如只要使用添加了能够被吸入细胞内的cAMP衍生物的培养基即可。若采用追加条件1,则能够期待抑制细胞内cAMP浓度的降低,促进向肠道上皮的分化诱导、尤其是作为肠道上皮细胞的功能的获得。即,上述条件能够进行更具功能性的肠道上皮细胞的制备。作为cAMP衍生物,能够采用PKA激活剂(例如,8-Br-cAMP(8-Bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate sodium salt(8-溴腺苷-3',5'-环单磷酸钠盐),CAS Number(CAS编号):76939-46-3)、6-Bnz-cAMP(N6-Benzoyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate sodium salt(N6-苯甲酰基腺苷-3',5'-环单磷酸钠盐),CAS Number:1135306-29-4)、cAMPS-Rp((R)-Adenosine,cyclic 3',5'-(hydrogenphosphorothioate)triethylammonium salt((R)-腺苷,环3',5'-(硫代磷酸氢)三乙基铵盐),CAS Number:151837-09-1)、cAMPS-Sp((S)-Adenosine,cyclic 3',5'-(hydrogenphosphorothioate)triethylammonium salt((S)-腺苷,环3',5'-(硫代磷酸氢)三乙基铵盐),CAS Number:93602-66-5)、Dibutyryl-cAMP(N6,O2'-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt(二丁基-cAMP(N6,O2'-二丁酰基腺苷3',5'-环单磷酸钠盐),CAS Number:16980-89-5)、8-Cl-cAMP(8-Chloroadenosine-3',5'-cyclic monophosphate salt(8-氯腺苷-3',5'-环单磷酸钠盐),CAS Number:124705-03-9)、Epac激活剂(Rp-8-Br-cAMPS(8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic Monophosphothioate:8-溴腺苷3',5'-环状硫代磷酸钠盐、Rp-Isomer.sodium salt(Rp-异构体钠盐),CAS Number:129735-00-8)、8-CPT-cAMP(8-(4-Chlorophenylthio)

adenosine 3',5'-cyclic monophosphate(8-(4-硫代氯苯基)腺苷3',5'-环单磷酸盐),CAS Number:93882-12-3)、8-pCPT-2'-O-Me-cAMP(8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate monosodium(8-(4-硫代氯苯基)-2'-O-甲基腺苷3',5'-环单磷酸单钠),CAS Number:634207-53-7)等)。若示出cAMP衍生物的添加浓度的例子(在8-Br-cAMP的情况下),则为0.1mmol/L～10mmol/L,优选为0.2mmol/L～5mmol/L,进一步优选为0.5mmol/L～2mmol/L。另外,关于使用所例示出的化合物即与8-Br-cAMP不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与所例示出的化合物(8-Br-cAMP)的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0116] 追加条件2(存在cAMP分解酶抑制剂的条件)的含义与将cAMP分解酶抑制剂添加到培养基中的条件相同。若采用追加条件2,则能够期待通过cAMP的分解抑制来抑制细胞内cAMP浓度的降低,促进向肠道上皮的分化诱导、尤其作为肠道上皮细胞的功能的获得。即,上述条件能够进行更具功能性的肠道上皮细胞的制备。另外,若同时使用追加条件1和追加条件2,则能够向细胞供给cAMP,并且抑制细胞内cAMP浓度的降低。因此,成为为了将细胞内cAMP维持在高水平的有效的条件,能够期待促进向肠道上皮细胞的有效的分化诱导。

[0117] 作为cAMP分解酶抑制剂,能够例示出IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine:3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)(MIX)、茶碱(Theophylline)、罂粟碱(Papaverine)、己酮可可碱(Pentoxifylline)(Trental)、KS-505、8-甲氧基甲基-IBMX(8-Methoxymethyl-IBMX)、长春西汀(Vinpocetine)(TCV-3B)、EHNA、曲喹辛(Trequinsin)(HL-725)、利沙齐农(Lixazinone)(RS-82856)、(LY-186126)、西洛他胺(Cilostamide)(OPC3689)、贝莫拉旦(Bemoradan)(RWJ-22867)、阿那格雷(Anergrelide)(BL4162A)、吲哚利旦(Indolidan)(LY195115)、西洛他唑(Cilostazol)(OPC-13013)、米力农(Milrinone)(WIN47203)、氰胍佐旦(Siguazodan)(SKF-94836)、5-甲基-伊马唑旦(5-Methyl-imazodan)(CI 930)、SKF-95654、Pirilobendan(UD-CG 115BS)、依诺昔酮(Enoximone)(MDL 17043)、伊马唑旦(Imazodan)(CL 914)、SKF-94120、维司力农(Vesnarinone)(OPC 8212)、咯利普兰(Rolipram)(Ro-20-1724)、(ZK-62711)、登布茶碱(Denbufyll'ine)、扎普司特(Zaprinast)(M&B-22,948)、双嘧达莫(Dipyridamole)、扎普司特(Zaprinast)(M&B-22,948)、双嘧达莫(Dipyridamole)、扎达维林(Zardaverine)、AH-21-132、硫马唑(Sulmazol)(AR-L 115BS)。若示出cAMP分解酶抑制剂的添加浓度的例子(在IBMX的情况下),则为0.05mmol/L～5mmol/L,优选为0.1mmol/L～3mmol/L,进一步优选为0.2mmol/L～1mmol/L。

[0118] 进行向肠道上皮细胞的分化的工序期间(培养期间)例如为7天～40天,优选为7天～30天。若培养期间过短,则无法充分获得所期待的效果(提高分化效率、促进获得作为肠道上皮细胞的功能)。另一方面,若培养期间过长,则引起分化效率的降低。

[0119] 关于向肠道干细胞分化的情况,例如,能够以肠道上皮细胞标志物的表达和肽的吸入或经由维生素D受体的药物代谢酶的表达诱导为指标来进行判定或评价。肠道上皮细胞标志物的例子可以举出ATP结合盒转运体B1/多药耐药蛋白1(ABCB1/MDR1)、ATP结合盒转运体G2/乳腺癌耐药蛋白(ABCG2/BCRP)、细胞色素P450 3A4(CYP3A4)、脂肪酸结合蛋白2(FABP)、孕烷X受体(PXR)、SLC(solute carrier(溶质载体))家族成员5A1/钠偶联型葡萄糖转运体1(SLC5A1/SGLT1)、SLC(solute carrier)家族成员15A1/肽转运体1(SLC15A1/

PEPT1)、SLC(solute carrier)有机阴离子转运体2B1(SLCO2B1/OATP2B1)、蔗糖酶-异麦芽糖酶、尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)、尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶1A4(UGT1A4)、绒毛蛋白1(Villin 1)、羧酸酯酶2A1(CES2A1)。其中,对肠道上皮特异性高的蔗糖酶-异麦芽糖酶及绒毛蛋白1、在小肠中主要的药物代谢酶即CYP3A4、参与小肠中的肽吸收的SLC15A1/PEPT1、在小肠的顶侧膜侧表达的葡萄糖转运体即SLC5A1/SGLT1、在小肠中参与有机阴离子吸收的SLCO2B1/OATP2B1、在小肠中的表达高的水解酶即CES2A1是特别有效的标志物。

[0120] 若想要获得仅由目标细胞(肠道上皮细胞)构成的细胞群或以高比率(高纯度)包含目标细胞的细胞群,则只要以目标细胞的特征性细胞表面标志物为指标而分选并分离培养后的细胞群即可。

[0121] 在本发明中,如上述使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基来培养从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞。

[0122] 作为表皮生长因子受体(EGFR)的配体,可以举出EGF、Betacelluin(β细胞素)、双调蛋白、TNF-α、HB-EGF等。

[0123] 作为cAMP激活剂,能够使用毛喉素(Forskolin)、吲哚美辛、NKH477(考福辛达罗帕特)、来源于细胞的毒素蛋白(百日咳毒素、霍乱毒素)、PACAP-27、PACAP-38、SKF83822等。毛喉素、NKH477(考福辛达罗帕特)、霍乱毒素、PACAP-27、PACAP-38、SKF83822显示腺苷酸环化酶激活作用,以促进细胞内cAMP的合成。

[0124] 若示出cAMP激活剂的添加浓度的例子(在毛喉素的情况下),则为1μmol/L～200μmol/L,优选为5μmol/L～100μmol/L。关于使用与毛喉素不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与毛喉素的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0125] 作为DNA甲基转移酶抑制剂,能够使用5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)、5-氮杂胞苷、RG108、泽布拉林等。

[0126] 若示出DNA甲基转移酶抑制剂的添加浓度的例子(在5-Aza-2'-deoxycytidine的情况下),则为0.1μmol/L～50μmol/L、优选为0.5μmol/L～20μmol/L。关于使用与5-Aza-2'-deoxycytidine不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与5-Aza-2'-deoxycytidine的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0127] 实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基可以包含转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂中的任一种以上。

[0128] 作为转化生长因子-β信号抑制剂,例如,能够使用A83-01、SB431542、SB-505124、SB525334、D4476、ALK5 inhibitor、LY2157299、LY364947、GW788388、RepSox等。

[0129] 转化生长因子-β信号抑制剂(在A83-01的情况下)的添加浓度可以为0.1nmol/L～30μmol/L,优选为1nmol/L～10μmol/L,更优选为10nmol/L～10μmol/L,进一步优选为50nmol/L～5μmol/L。关于使用与A83-01不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与A83-01的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0130] 作为MEK抑制剂,能够使用PD98059、PD184352、PD184161、PD0325901、U0126、MEK inhibitor I、MEK inhibitor II、MEK1/2inhibitor II、SL327等。

[0131] 若示出MEK抑制剂的添加浓度的例子(在PD98059的情况下),则为1μmol/L～200μmol/L,优选为5μmol/L～100μmol/L。关于使用与PD98059不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与PD98059的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0132] 实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基可以包含Notch抑制剂。

[0133] 作为Notch抑制剂,能够使用LY411575、DAPT、γ-Secretase Inhibitor(γ-分泌酶抑制剂)XXI(Compound E(化合物E))(CAS编号:209986-17-4)、γ-Secretase Inhibitor I(CAS编号:133407-83-7)、Dibenzazepine(二苯并氮卓)、RO4929097等。作为Notch抑制剂,优选为LY411575。

[0134] 若示出Notch抑制剂的添加浓度的例子(在LY411575的情况下),则为0.1μmol/L～10μmol/L、优选为0.5μmol/L～5μmol/L。关于使用与LY411575不同的化合物时的添加浓度,若考虑所使用的化合物的特性与LY411575的特性的差异(尤其是活性的差异),只要是本领域技术人员,则能够依据上述浓度范围进行设定。

[0135] 实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基优选不包含Wnt激活剂及Wnt抑制剂中的任一种以上。

[0136] 作为Wnt激活剂,例如,可以举出CHIR99021、LY2090314、NP031112(泰德格西布(Tideglusib))、锂、A1070722、SKL2001、R-Spondin 1、Wnt3a、Gsk抑制剂等。

[0137] 作为Wnt抑制剂,例如,可以举出Wnt-C59、Dkk家族蛋白质(例如,Dkk-1、Dkk2、Dkk3及Dkk4中的至少一种)、sFRP(例如,sFRP-1及sFRP-2中的至少一种)、OMP-18R5等针对Wnt受体的抗体、LGK974、CWP232291、PRI-724、IQR-1、IWP2、IWP-L6、ICG-001、WIKI4、Ky02111、FH535、XAV939、NSC668036、FJ9、3289-8625等。

[0138] 实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基可以包含或可以不包含组蛋白去乙酰化酶抑制剂。

[0139] 作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可以举出图巴他汀A(Tubastatin A)、ACY1215、丙戊酸、SAHA、曲古抑菌素A、SHBA、CBHA、LAQ-824、PDX-101、LBH-589、ITF2357、PCI-24781、化合物7(ChemieTek)、JNK-24681585(奎诺司他(Quisinostat))SB939(Pracinostat)、4SC-201(瑞米司他(Resminostat))、替非司他(Tefinostat)(CHR-2845)、CHR-3996、CG200745、缩酚酸肽(depsipeptide)(罗米地辛)、丁酸盐、MS-275、MGCD0103及CI994等。

[0140] 实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基优选不包含视黄酸信号通路激活剂及音猬因子(Sonic Hedgehog)信号通路抑制剂中的任一种以上。

[0141] 作为视黄酸信号通路激活剂,可以举出视黄酸、视黄酸衍生物、全反式视黄酸、合成视黄酸ec23、Ch55、TTNPB、维甲酰酚胺(Fenretinide)、AC261066、阿达帕林、AC55649、AM80、AM580、BMS753及他扎罗汀等。

[0142] 作为音猬因子信号通路抑制剂,可以举出SANT-1、SANT-2、JK184或介藜芦胺(jervine)等。

[0143] 在本发明中,使用实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基进行培养的期间例如为2天～20天,优选为4天～15天。

[0144] 作为使用了实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基的培养工序,优选不包括悬浮培养工序。并且,在使用了实质上不包含表皮生长因子受体的配体且包含cAMP激活剂及DNA甲基转移酶抑制剂的培养基的培养工序中,细胞优选不形成球状体。

[0145] 另外,在进行伴随培养基更换或继代培养等的细胞的回收时,为了抑制细胞死亡,也可以用Y-27632等ROCK抑制剂(Rho-associated coiled-coil forming kinase(Rho关联螺旋状激酶)/Rho结合激酶)预先处理细胞。

[0146] 在本发明中,其他培养条件(培养温度等)只要设为在动物细胞的培养中通常采用的条件即可。即,例如只要在37℃、5％CO_2的环境下进行培养即可。

[0147] 并且,作为基础培养基,能够使用伊斯科夫改良达尔伯克培养基(IMDM)(GIBCO公司等)、汉姆氏F12培养基(HamF12)(SIGMA公司、Gibco公司等)、达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)(NACALAI TESQUE,INC.、SIGMA公司、Gibco公司等)、Glasgow基础培养基(Gibco公司等)、RPMI1640培养基等。也可以同时使用两种以上的基础培养基。

[0148] 作为能够在培养基中添加的成分的例子,能够举出血清或血清替代物、抗生物质、2-巯基乙醇、PVA、非必需氨基酸(NEAA)、胰岛素、转铁蛋白、硒。作为血清,能够举出牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)等。作为血清替代物,能够举出Gibco(注册商标)B-27(注册商标)Supplement等。

[0149] 典型地,使用培养皿等二维培养细胞。根据本发明的方法,能够通过二维培养(优选为贴附培养)来制造肠内分泌细胞。所制造的肠内分泌细胞的形态并不受特别限定,但优选为片状。

[0150] 在一个实例中,培养能够在涂有3％～100％的细胞外基质的培养容器上进行。作为细胞外基质的例子,能够使用Matrigel™、纤连蛋白、层连蛋白、玻连蛋白、肌腱蛋白、巢蛋白、凝血栓蛋白、弹性蛋白、明胶、胶原蛋白、纤维蛋白、分区蛋白(merosin)、Ancoline、软骨结合素、锚蛋白、骨涎蛋白、骨钙蛋白、骨桥蛋白、依匹斯汀、透明质粘连蛋白、Angeline、上皮调节蛋白及缰蛋白,优选使用Matrigel™。Matrigel(注册商标)为由Corning Life Sciences生产的Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤细胞分泌的明胶状蛋白质混合物的商品名。

[0151] 在本发明的尤其优选一个实例中,将来源于人iPS细胞的肠道上皮细胞(含有肠道干细胞LGR5+细胞)接种到细胞培养插件或96well(孔)板,从第二天开始,通过在包含FBS、B27、HepExtend™、Forskolin、A83-01、5-Aza-2'-deoxycytidine、PD98059及LY41157的DMEM/F12培养基中进行培养,能够制造肠内分泌细胞。

[0152] ＜来源于多能干细胞的肠内分泌细胞＞

[0153] 根据本发明,可以提供一种通过上述的本发明的方法来制造的来源于多能干细胞的肠内分泌细胞。

[0154] 关于向肠内分泌细胞分化的情况,例如,能够以肠内分泌细胞标志物的表达为指标来进行判定或评价。作为肠内分泌细胞标志物的例子,重要的是CHGA、REG4。并且,能够以与肠内分泌细胞的功能即激素分泌有关的因子即TPH1、PYY和与肠的内分泌细胞的产生有

关的因子即NEUROG3的表达为指标进行判定或评价。

[0155] 本发明的肠内分泌细胞的特征在于表达TPH1、PYY、CHGA、REG4及NEUROG3,且不表达NKX6.1。

[0156] TPH1、PYY、CHGA、REG4、NEUROG3及NKX6.1的表达的有无能够通过mRNA或蛋白质水平来进行测定。

[0157] “表达TPH1、PYY、CHGA、REG4及NEUROG3”表示用公知的方法,能够检测TPH1、PYY、CHGA、REG4及NEUROG3的表达产物即mRNA或蛋白质。

[0158] “不表达NKX6.1”表示用公知的方法,无法检测NKX6.1的表达产物即mRNA或蛋白质。但是,不限定于表达量为0的情况,也包括表达量为微量的情况。当设为“不表达NKX6.1”的情况下,能够举出来源于人结肠癌的细胞株CaCo-2中针对NKX6.1的表达量的相对表达量为0.1以下的情况,优选为0.05以下的情况,更优选为0.01以下的情况。

[0159] ＜使用了肠内分泌细胞的疾病机制的分析方法、受试物质的评价方法以及针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法＞

[0160] 本发明涉及一种通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞的用途。

[0161] 作为第一方式,可以举出疾病机制的分析方法,其包括通过本发明的方法来制造肠内分泌细胞的工序及使用上述肠内分泌细胞来分析疾病机制的工序。

[0162] 作为第二方式,可以举出针对消化系统疾病的治疗药的筛选方法,其包括通过本发明的方法来制造肠内分泌细胞的工序及在针对消化系统疾病的治疗药的存在下培养上述肠内分泌细胞的工序。

[0163] 作为第三方式,可以举出受试物质的评价方法,其包括通过本发明的方法来制造肠内分泌细胞的工序及对在受试物质的存在下上述肠内分泌细胞分泌的激素进行定量的工序。

[0164] 由内分泌细胞产生的消化道激素的分泌异常成为全身各器官的功能障碍(便秘、腹泻、食欲不振等)及各种疾病(肥胖、糖尿病、过敏性腸炎)的主要原因。因此,内分泌细胞标志物和消化道激素的表达和产生量成为生物标志物,能够用作各种疾病的指标。可以举出当通过在诱导的肠内分泌细胞中添加药物和基因编辑来制作一种病理模型时,通过测定形态和细胞数量、上述生物标志物来分析疾病机制的方法。

[0165] 通过使治疗药或受试物质与肠内分泌细胞接触,能够筛选或评价治疗药或受试物质。通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞能够利用于肠道、尤其小肠的模型系统,对肠道、尤其小肠中的药代动力学(Pharmacokinetics)(吸收、代谢等)的评价或毒性的评价、小肠的响应评价有用。即,通过本发明的方法来制造的肠内分泌细胞可实现利用于治疗药或受试物质的体内动力学的评价或毒性的评价、针对受试物质的响应评价。

[0166] 具体而言,能够使用肠内分泌细胞测试治疗药或受试物质的吸收性或膜穿透性、药物相互作用、药物代谢酶的诱导、药物转运体的诱导、毒性、免疫响应以及肠内分泌细胞分泌的激素的产生等。即,关于本发明,作为肠内分泌细胞的用途之一,提供一种评价治疗药或受试物质的吸收性或膜穿透性、药物相互作用、药物代谢酶的诱导、药物转运体的诱导、毒性、免疫响应以及肠内分泌细胞分泌的激素的产生等的方法。在上述方法中,进行以下工序:(i)准备肠内分泌细胞的工序;(ii)使治疗药或受试物质与上述肠内分泌细胞接触的工序;及(iii)对穿透上述肠内分泌细胞的治疗药或受试物质进行定量,评价治疗药或受

试物质的吸收性或膜穿透性、药物相互作用、药物代谢酶的诱导、药物转运体的诱导、毒性、或免疫响应,或对肠内分泌细胞分泌的激素的产生量进行定量的工序。作为肠内分泌细胞分泌的激素的具体例,可以举出血清素、GLP-1(Glucagon-like peptide-1(胰高血糖素样肽))、GIP(Gastric inhibitory polypeptide(抑胃肽))、胃泌素、PYY等。另外,关于治疗药或受试物质的吸收性,也能够通过后述的方法进行评价。

[0167] 在工序(i)中,典型地,在半穿透性膜(多孔性膜)上培养肠内分泌细胞,以形成细胞层。具体而言,例如使用具备细胞培养插件的培养容器(例如,Corning Incorporated Co.,Ltd.提供的Transwell(注册商标)),在细胞培养插件内接种细胞进行培养,由此获得由肠内分泌细胞构成的细胞层。

[0168] 工序(ii)中的“接触”典型地通过在培养基中添加治疗药或受试物质来进行。治疗药或受试物质的添加时刻并不受特别限定。因此,可以在不包含治疗药或受试物质的培养基中开始培养之后,在某一时点添加治疗药或受试物质,也可以预先在包含治疗药或受试物质的培养基中开始培养。

[0169] 治疗药或受试物质能够使用各种分子大小的有机化合物或无机化合物,也能够使用细菌(肠道细菌、乳酸菌等)、病毒、细胞(免疫细胞、成纤维细胞)。作为有机化合物的例子,能够例示出核酸、肽、蛋白质、脂质(简单脂质、复合脂质、磷酸甘油酯、鞘脂、甘油醇糖脂、脑苷脂等)、前列腺素、类异戊二烯、萜烯、类固醇、多酚、儿茶素、维生素(B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、A、D、E等)。医药品、营养食品、营养补充剂、食品添加物、农药、美容品(化妆品)等现有成分或候选成分也是优选的受试物质之一。也可以将植物提取液、细胞提取液、培养上清液等用作受试物质。可以通过同时添加两种以上的治疗药或受试物质,研究治疗药或受试物质之间的相互作用、协同作用等。治疗药或受试物质可以来源于天然物,或者,也可以通过合成来得到。在后者的情况下,例如能够利用组合(combinatorial)合成方法构建有效的测定系统。

[0170] 能够任意地设定与治疗药或受试物质接触的期间。接触期间例如为10分钟～3天,优选为1小时～1天。可以分多次进行接触。

[0171] 在工序(iii)的第一方式中,对穿透细胞层的治疗药或受试物质进行定量。例如,当使用具备如Transwell(注册商标)等细胞培养插件的培养容器时,根据治疗药或受试物质,通过质谱分析、液相色谱法、免疫学方法(例如,荧光免疫测定法(FIA法)、酶免疫测定法(EIA法))等测定方法,对穿透细胞培养插件的治疗药或受试物质即经由细胞层移动到上部或下部容器内的治疗药或受试物质进行定量。根据定量结果(穿透细胞层的受试物质的量)和受试物质的使用量(典型地为向培养基中的添加量),判定并评价治疗药或受试物质的吸收性或膜穿透性、药物相互作用、药物代谢酶的诱导、药物转运体的诱导、毒性或免疫响应。

[0172] 或者,为了评价治疗药或受试物质的吸收,例如,可以测定培养液中的治疗药或受试物质的残留量。测定方法只要根据受试物质选择适当的方法即可。例如,能够采用质谱分析、液相色谱法、免疫学方法(例如,荧光免疫测定法(FIA法)、酶免疫测定法(EIA法))等。典型地,当观察到培养液中的治疗药或受试物质的含量减少时,判定并评价为“治疗药或受试物质已被吸收”。并且,能够根据减少的程度来判定并评价治疗药或受试物质的吸收量或吸收效率。另外,也能够通过测定被吸入细胞内的治疗药或受试物质的量来评价吸收。

[0173] 在工序(iii)的第二方式中,对肠内分泌细胞分泌的激素进行定量。肠内分泌细胞

分泌的激素能够通过质谱分析、液相色谱法、免疫学方法(例如,荧光免疫测定法(FIA法)、酶免疫测定法(EIA法))等测定方法进行定量。

[0174] 本发明在另一方式中,能够评价治疗药或受试物质的代谢。在上述方法中,进行以下工序:(I)使治疗药或受试物质与肠内分泌细胞接触的工序;及(II)测定和评价治疗药或受试物质的代谢的工序。

[0175] 工序(I),即肠内分泌细胞与治疗药或受试物质的接触能够以与上述工序(ii)相同的方式实施。但是,不必预先形成细胞层。

[0176] 工序(I)之后,测定和评价治疗药或受试物质的代谢(工序(II))。在紧接工序(I)之后即与治疗药或受试物质接触之后,可以不隔开实质性的时间间隔而测定并评价代谢,或者,可以在经过一定的时间(例如,10分钟~5小时)之后测定并评价代谢。代谢的测定例如能够通过检测代谢产物来进行。在该情况下,通常将工序(I)之后的培养液作为样品而定性或定量测定可预期的代谢产物。测定方法只要根据代谢产物选择适当的方法即可,例如能够采用质谱分析、液相色谱法、免疫学方法(例如,荧光免疫测定法(FIA法)、酶免疫测定法(EIA法))等。

[0177] 典型地,在检测出治疗药或受试物质的代谢产物时,判定并评价为“治疗药或受试物质已被代谢”。并且,能够根据代谢产物的量来评价治疗药或受试物质的代谢量。也可以根据代谢产物的检测结果和治疗药或受试物质的使用量(典型地为向培养基中的添加量)来计算出治疗药或受试物质的代谢效率。

[0178] 也能够将肠内分泌细胞中的药物代谢酶(细胞色素P450(尤其是CYP3A4)、尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶(尤其是UGT1A8、UGT1A10)、硫酸转移酶(尤其是SULT1A3等))的表达作为指标而测定治疗药或受试物质的代谢。药物代谢酶的表达能够以mRNA水平或蛋白质水平来评价。例如,当观察到药物代谢酶的mRNA水平升高时,能够判定为“治疗药或受试物质已被代谢”。同样地,当观察到药物代谢酶的活性升高时,能够判定为“治疗药或受试物质已被代谢”。与将代谢产物作为指标而进行判定的情况同样地,可以根据药物代谢酶的表达量进行定量判定和评价。

[0179] 另外,也可以同时或并行进行代谢的测定和评价及吸收的测定和评价。

[0180] 作为肠内分泌细胞的又一用途,可以提供一种含有肠内分泌细胞的细胞制剂。细胞制剂能够适用于各种肠疾病的治疗。尤其,可设想用作损伤的(包括机能障碍)肠道上皮组织的再生并重建用材料。即,能够期待对再生医疗的贡献。细胞制剂例如能够通过将肠内分泌细胞悬浮于生理盐水或缓冲液(例如,磷酸类缓冲液)等中或者使用上述细胞制作三维组织体(类器官或球状体)来制备。为了能够给与治疗有效量的细胞,作为一次剂量的量,例如可以含有1×10^{5}个~1×10^{10}个细胞。细胞的含量考虑使用目标、对象疾病、适用对象(接受者)的性别、年龄、体重、患部的状态、细胞的状态等而能够进行适当调整。

[0181] 在本发明的细胞制剂中可以含有以细胞的保护为目的二甲基亚砜(DMSO)或血清白蛋白等、以抑制细菌的混入为目的的抗生物质等、以细胞的激活、增殖或分化诱导等为目的的各种成分(维生素类、细胞因子、成长因子、类固醇等)。此外,在细胞制剂中也可以含有制剂上可接受的其他成分(例如,载体、赋形剂、崩解剂、缓冲剂、乳化剂、悬浮剂、镇痛剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理盐水等)。

[0182] 作为肠内分泌细胞的又一用途,可以举出使用肠内分泌细胞培养微生物(細菌、真

菌、病毒等)或寄生虫。通过使用肠内分泌细胞培养微生物或寄生虫,能够分析微生物或寄生虫对肠内分泌细胞的感染性。并且,当具有感染性时,能够确认微生物或寄生虫的维持或增殖能力。并且,通过使用肠内分泌细胞培养微生物或寄生虫,能够获得反复增殖的微生物或寄生虫。此外,能够再现病原微生物的感染状态并利用于治疗药的筛选,或者再现微生物或寄生虫所产生的物质对肠道细胞的影响并进行对活体小肠有用或有害的物质的筛选等。

[0183] 作为微生物或寄生虫的具体例,可以举出大肠杆菌、乳酸菌、双歧杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、各种肠道细菌、流感病毒、轮状病毒、腺病毒、星状病毒、札幌病毒、诺如病毒、HIV、冠状病毒等,但并不限定于这些。

[0184] 作为肠内分泌细胞的又一用途,可以举出使用了肠内分泌细胞的共培养模型。根据上述的共培养模型,能够再现活体组织的结构并分析与其他细胞的相互作用。并且,根据上述的共培养模型,能够再现疾病的病理,并进行治疗药或受试物质的筛选或评价。

[0185] 作为共培养的细胞,优选存在于灵长类或啮齿类的活体内的细胞种类,尤其是存在于小肠周边的细胞。例如,可以举出肝细胞、胰腺、血管内皮细胞、免疫细胞、神经、成纤维细胞、肌肉细胞、间质细胞等,但并不限定于这些。共培养的细胞也可以为来源于灵长类或啮齿类的确立细胞株。例如,可以举出Hela细胞或THP-1细胞等永生化细胞系、ES细胞或iPS细胞等多能干细胞及由这些分化的细胞等,但并不限定于这些。

[0186] 作为能够在共培养模型中测试的治疗药或受试物质,能够使用各种分子大小的有机化合物或无机化合物。药物或营养食品等现有成分或候选成分也是优选的受试物质。也可以将植物提取液、细胞提取液、培养上清液等用作受试物质。并且,也可以组合使用这些中的两种以上。

[0187] <培养基或培养基试剂盒以及用于制造肠内分泌细胞的试剂盒>

[0188] 根据本发明,可以提供一种培养基或培养基试剂盒,其包含基础培养基、血清或血清替代物、cAMP激活剂、DNA甲基转移酶抑制剂、转化生长因子-β信号抑制剂及MEK抑制剂,且实质上不包含表皮生长因子受体的配体。本发明的培养基或培养基试剂盒还可以包含Notch抑制剂。本发明的培养基或培养基试剂盒能够用于制造肠内分泌细胞。

[0189] 基础培养基、血清或血清替代物、cAMP激活剂、DNA甲基转移酶抑制剂、转化生长因子-β信号抑制剂、MEK抑制剂、表皮生长因子受体的配体及Notch抑制剂的详细内容在本说明书中如上所述。

[0190] 根据本发明进一步可以提供一种用于制造肠内分泌细胞的试剂盒,其包含:上述的本发明的培养基或培养基试剂盒及从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞。从多能干细胞衍生的肠道干细胞或肠道上皮细胞的详细内容在本说明书中如上所述。

[0191] 通过以下实施例对本发明进行更具体地说明,但本发明并不受实施例的限定。

[0192] 实施例

[0193] 实施例1

[0194] <方法>

[0195] 在第0天解冻来源于人iPS细胞的肠道上皮细胞(含有肠道干细胞LGR5+细胞)F-hiSIEC™(Fujifilm Corporation),用F-hiSIEC™ Seeding Medium(接种培养基)(Fujifilm Corporation)以1.0×10^{6}cells/well(细胞/孔)接种到涂有Matrigel™(CORNING)的细胞培养插件上,从第二天开始每隔1天用表1的各培养基(培养基组成1~6)

进行培养基更换。按照F-hiSIEC说明书来实施涂抹、接种及培养基更换,从而获得了细胞片。第9天从细胞中提取了total(总)RNA。在RNA提取中,回收了用Qiazol(QIAGEN)溶解细胞并添加、混合20％的氯仿,以12,000g离心10分钟而得到的溶液的上清。按照说明书使用RNeasy mini kit(总RNA小提试剂盒)(QIAGEN)从上清中提取了totalRNA。按照说明书使用High Capacity RNA-to-cDNA kit(高容量RNA到cDNA试剂盒)(Applied Biosystems)从totalRNA合成了cDNA。所获得的cDNA通过Taqman Gene Expression Assay(TaqMan™基因表达检测)系统及Taqman Gene Expression Master Mix(TaqMan™基因表达预混液)(Applied Biosystems)并使用ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)而测定了基因表达量。Taqman Assay(TaqMan™检测)ID使用了18s:03003631__g1、CHGA:Hs00900370__m1、TPH1:Hs00188220__m1、PYY:Hs00373890__g1、REG4:Hs00230746_m1。

[0196] [表1]

[0197]

培养基组成			1	2	3	4	5	6
培养基	DMEM/F12		+	+	+	+	+	+
	B27	2%						
	HepEx	1%						
胎牛血清	FBS	2%						
cAMP 激活剂	Forskolin	30μmol/L						
MEK 抑制剂	PD98059	20μmol/L						
TGFβ 信号抑制剂	A83-01	0.5μmol/L						
DNMT 抑制剂	5-Aza-2'-deoxycytidine	5μmol/L						
生长因子	EGF	0.02μg/mL	+	+	−	−	−	−
Notch 抑制剂	LY41157	1μmol/L	−	+	−	+	+	−
	DAPT	10μmol/L	−	−	−	−	−	+
Wnt 抑制剂	IWP2	5μmol/L	−	−	−	−	+	−

[0198] 在比较基因表达量时,通过ΔΔCT法用内标准基因18S的表达量进行校正,并以将在F-hiSIEC Culture Medium中培养的对照组中的表达设为1时的相对值来表示。

[0199] ＜结果＞

[0200] 将结果示于图1中。

[0201] 与通常培养肠道上皮细胞的培养基组成1中的基因表达相比,在EGF存在下添加Notch抑制剂的培养基组成2及去除了EGF的培养基组成3中,EEC标志物即CHGA的表达没有大的变化。另一方面,若去除EGF并添加Notch抑制剂,则观察到EEC标志物即CHGA及REG4的表达显著升高。此外,在培养基组成4中添加了Wnt抑制剂的培养基组成5中,没有观察到培养基组成4以上的EEC标志物表达。并且,在Notch抑制剂中比较LY411575(培养基组成4)及DAPT(培养基组成6)时,使用LY411575的组成4不仅EEC标志物即CHGA及REG4的表达显著高,

与肠内分泌细胞的功能即激素分泌有关的因子即TPH1、PYY的表达也显著高。

[0202] 实施例2

[0203] ＜方法＞

[0204] 在第0天解冻来源于人iPS细胞的肠道上皮细胞(含有肠道干细胞LGR5+细胞)F-hiSIEC™(Fujifilm Corporation),用F-hiSIEC™ Seeding Medium(Fujifilm Corporation)以1.0×10^6cells/well接种到涂有Matrigel™(CORNING)的细胞培养插件上,从第二天开始每隔1天用表2的各培养基(培养基组成7～13)进行培养基更换。按照F-hiSIEC说明书来实施涂抹、接种及培养基更换,从而获得了细胞片。第9天从细胞中提取了total RNA。在RNA提取中,回收了用Qiazol(QIAGEN)溶解细胞并添加、混合20％的氯仿,以12,000g离心10分钟而得到的溶液的上清。按照说明书使用RNeasy mini kit(QIAGEN)从上清中提取了totalRNA。按照说明书使用High Capacity RNA-to-cDNAkit(Applied Biosystems)从totalRNA合成了cDNA。所获得的cDNA通过Taqman Gene Expression Assay系统及Taqman Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems)并使用ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)而测定了基因表达量。Taqman Assay使用了18s:03003631__g1、CHGA:Hs00900370__m1、PYY:Hs00373890__g1、NEUROG3:Hs01875204__s1。

[0205] [表2]

[0206]

培养基组成		7	8	9	10	11	12	13
培养基	DMEM/F12	+	+	+	+	+	+	+
	B27 2%							
	HepEx 1%							
胎牛血清	FBS 2%							
cAMP 激活剂	Forskolin 30μmol/L							
MEK 抑制剂	PD98059 20μmol/L							
TGFβ 信号抑制剂	A83-01 0.5μmol/L							
DNMT 抑制剂	5-Aza-2'-deoxycytidine 5μmol/L							
生长因子	EGF	-	-	-	-	-	-	-
Notch 抑制剂	LY41157 (μmol/L)	-	0.5	0.75	1.0	2.0	-	-
	DAPT (μmol/L)	-	-	-	-	-	5.0	10

[0207] 在比较基因表达量时,通过ΔΔCT法用内标准基因18S的表达量进行校正,并以将在F-hiSIEC Culture Medium中培养的对照组中的表达设为1时的相对值来表示。

[0208] ＜结果＞

[0209] 将结果示于图2中。

[0210] 与DAPT添加组(培养基组成8～11)相比LY411575添加组(培养基组成12、13)的EEC标志物即CHGA的表达高,进而,与肠内分泌细胞的功能即激素分泌有关的因子即PYY的表达显著高。并且,LY411575 2μmol/L添加组(培养基组成11)的CHGA、PYY及NEUROG3的表达水平最高。

[0211] 实施例3

[0212] ＜方法＞

[0213] 在第0天解冻来源于人iPS细胞的肠道上皮细胞(含有肠道干细胞LGR5+细胞)F-hiSIEC™(Fujifilm Corporation),用F-hiSIEC™ Seeding Medium(Fujifilm Corporation)以1.0×10^6cells/well接种到涂有Matrigel™(CORNING)的细胞培养插件上,从第二天开始每隔1天用表3的培养基进行培养基更换。将所获得的细胞设为EEC。并且,以

相同的时间表将用F-hiSIEC Culture Medium更换培养基的细胞作为对照。按照F-hiSIEC说明书来实施涂抹、接种及培养基更换,从而获得了细胞片。第9天从细胞中提取了totalRNA。并且,人结肠腺癌细胞株Caco-2购自KAC Co.,Ltd.,根据说明书在培养基(MEM·E、1%NEAA、10%FBS)中培养。在RNA提取中,回收了用Qiazol(QIAGEN)溶解细胞并添加、混合20%的氯仿,以12,000g离心10分钟而得到的溶液的上清。按照说明书使用RNeasy mini kit(QIAGEN)从上清中提取了totalRNA。按照说明书使用High Capacity RNA-to-cDNA kit(Applied Biosystems)从total RNA合成了cDNA。所获得的cDNA通过Taqman Gene Expression Assay(TaqMan™基因表达检测)系统及Taqman Gene Expression Master Mix(TaqMan™基因表达预混液)(Applied Biosystems)并使用ViiA7实时PCR系统(Applied Biosystems)而测定了基因表达量。Taqman Assay使用了18s:03003631__g1、NKX6.1:Hs00232355__m1。在比较基因表达量时,通过ΔΔCT法用内标准基因18S的表达量进行校正,并以将Caco-2中的表达设为1时的相对值来表示。

[0214] [表3]

[0215]

添加因子		
培养基	DMEM/F12	
	B27	2%
	HepEx	1%
胎牛血清	FBS	2%
cAMP 激活剂	Forskolin	30μmol/L
MEK 抑制剂	PD98059	20μmol/L
TGFβ 信号抑制剂	A83-01	0.5μmol/L
DNMT 抑制剂	5-Aza-2'-deoxycytidine	5μmol/L
生长因子	EGF	-
Notch 抑制剂	LY41157	1μmol/L

[0216] <结果>

[0217] 将结果示于图3中。

[0218] 将Caco-2中的NKX6.1的表达设为1时,在使用对照及表3的培养基进行培养而获得的细胞中,没有看到NKX6.1的表达。

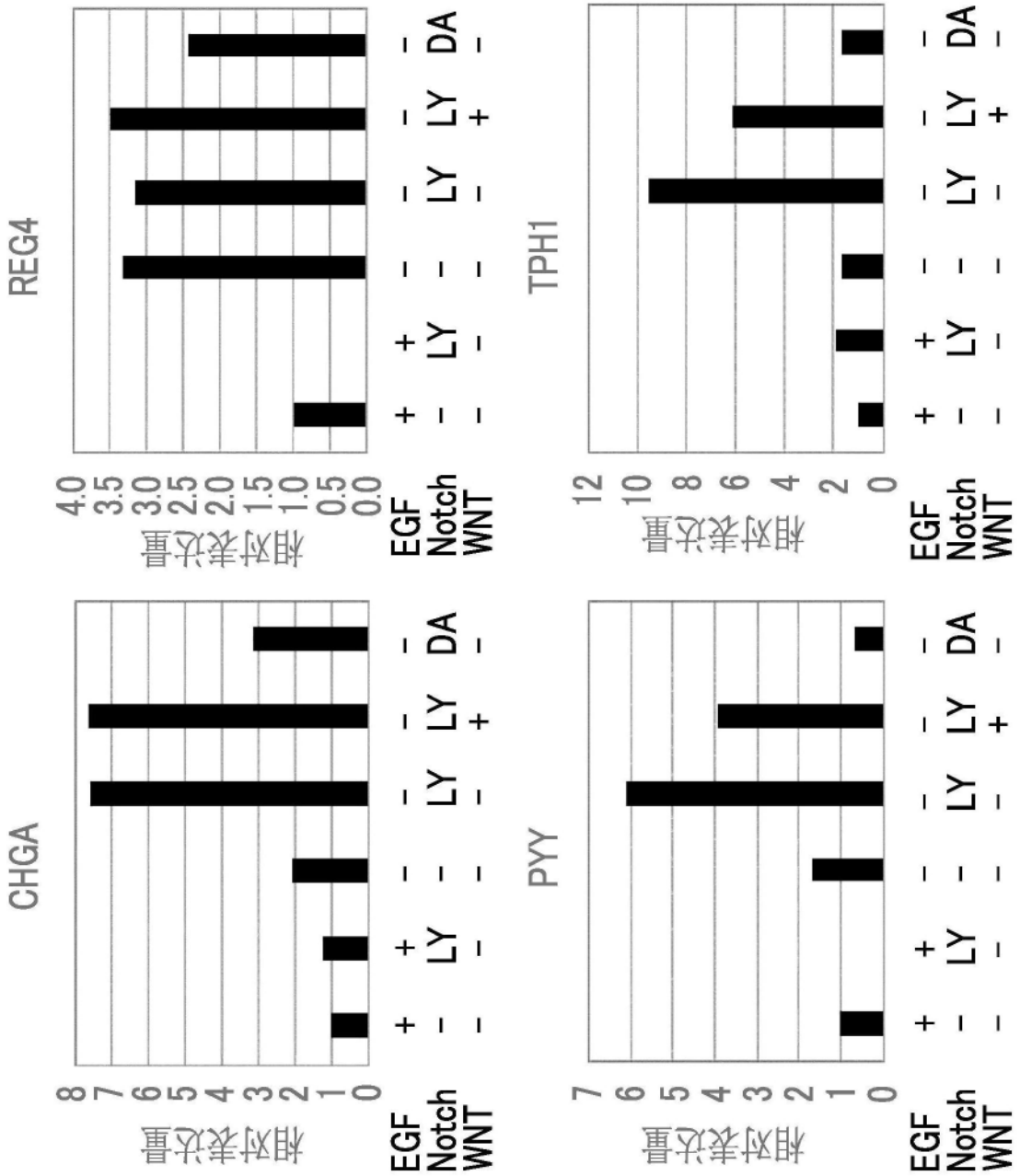


图1

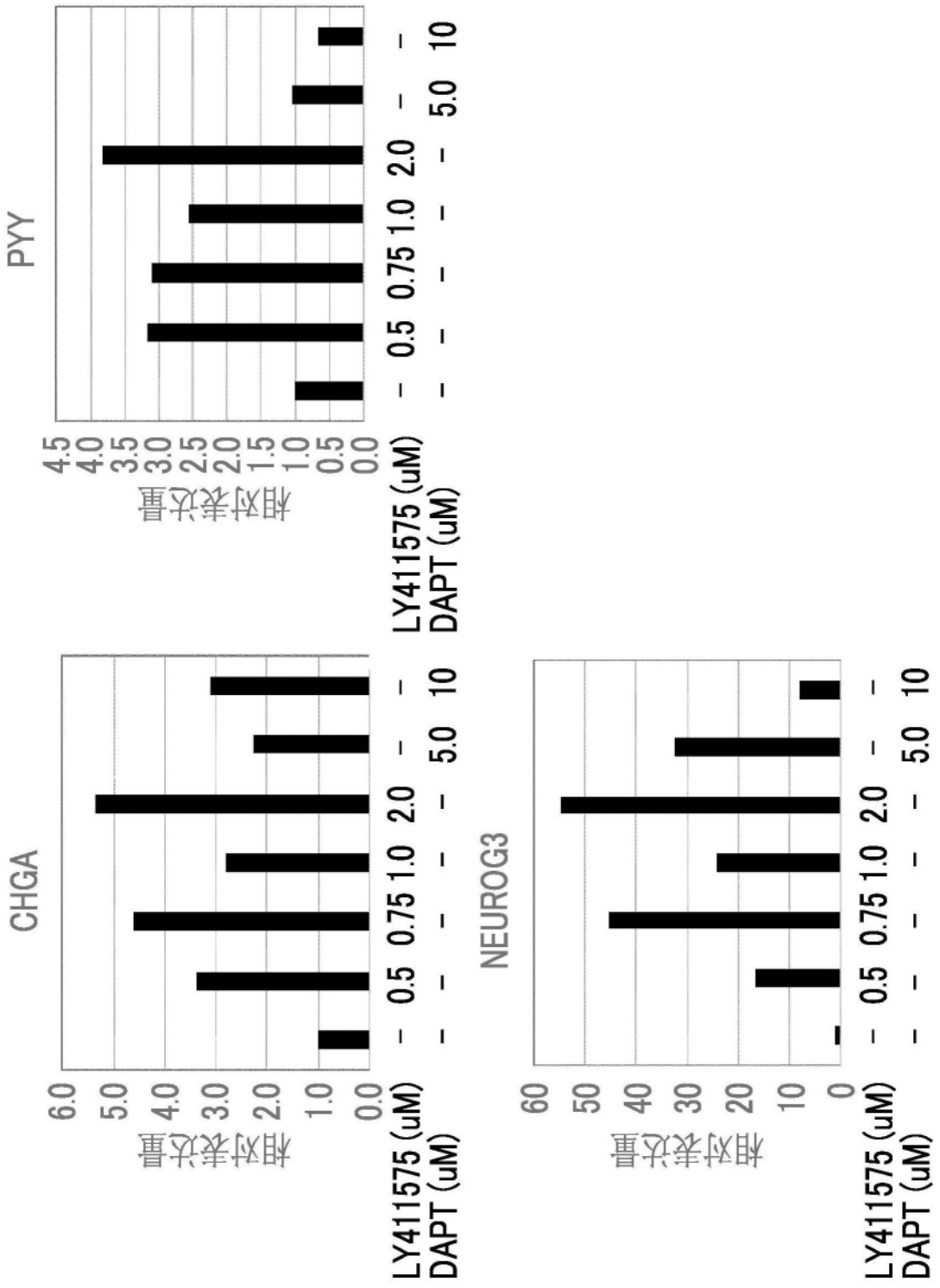


图2

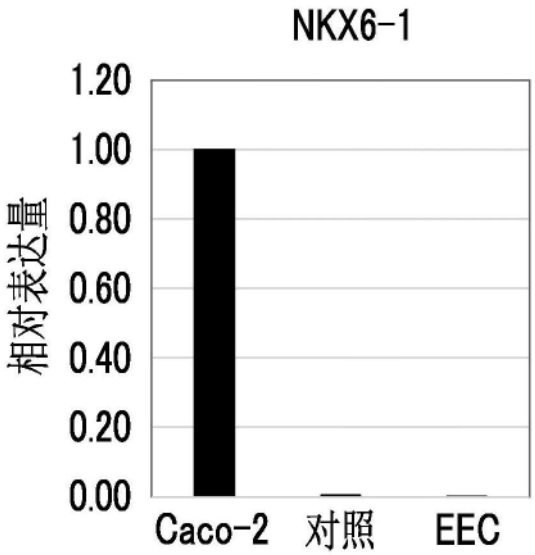


图3