

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年5月14日(14.05.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/095879 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 1/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
A61K 35/36 (2015.01) A61L 27/38 (2006.01)  
A61K 35/38 (2015.01) A61L 27/50 (2006.01)  
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)

CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1番地 Aichi (JP). 日産化学株式会社(NISSAN CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1036119 東京都中央区日本橋二丁目5番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/043213

(22) 国際出願日: 2019年11月5日(05.11.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2018-210951 2018年11月8日(08.11.2018) JP

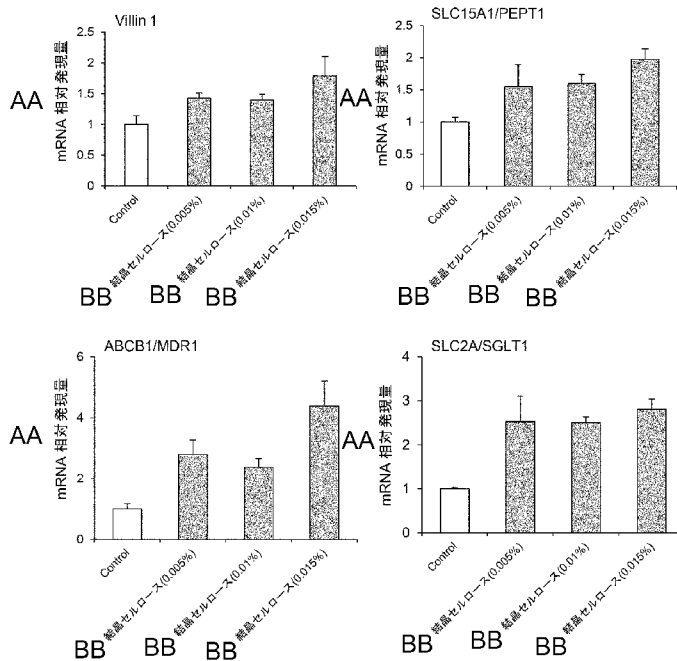
(71) 出願人: 公立大学法人名古屋市立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA

(72) 発明者: 松永 民秀(MATSUNAGA Tamihide); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi (JP). 岩尾 岳洋(IWAO Takahiro); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi (JP). 邱施萌(QIU Shimeng); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi

(54) Title: INDUCTION/DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELL INTO INTESTINAL TRACT EPITHELIAL CELL

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞の腸管上皮細胞への分化誘導

[図1-1]



AA Relative expression amount of mRNA  
BB Crystalline cellulose

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel means for preparing a cell having a function closer to that of an intestinal tract epithelial cell occurring in a living body in a simple and highly efficient manner. A pluripotent stem cell can be differentiated/induced into an intestinal tract epithelial cell through the steps of: (1) differentiating the pluripotent stem cell into an intestinal tract stem cell-like cell; and (2) differentiating the intestinal tract stem cell-like cell obtained in step (1) into an intestinal tract epithelial cell-like cell using a combination of an MEK1

WO 2020/095879 A1

(JP). 金木 達朗(KANAKI Tatsuro); 〒3490294  
埼玉県白岡市白岡 1 4 7 0 日産化学株式会社  
社生物科学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 萩野 幹治 (HAGINO Mikiharu);  
〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ  
1 丁目 1 番地 Gifu (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,  
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

---

inhibitor, a DNA methylation inhibitor, a TGF- $\beta$  receptor inhibitor, an EGF and an indigestible polysaccharide.

(57) 要約: 生体の腸管上皮細胞により近い機能を示す細胞を簡便且つ効率的に調製可能な新たな手段を提供することを課題とする。(1) 多能性幹細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程と、(2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類を併用し、工程(1)で得られた腸管幹細胞様細胞を腸管上皮細胞様細胞へと分化させる工程によって、多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する。

## 明 細 書

**発明の名称**：多能性幹細胞の腸管上皮細胞への分化誘導

### 技術分野

[0001] 本発明は多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法及びその用途に関する。本出願は、2018年11月8日に出願された日本国特許出願第2018-210951号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

### 背景技術

[0002] 小腸には多くの薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが存在することから、肝臓と同様、薬物の初回通過効果に関わる臓器として非常に重要である。そのため、医薬品開発早期の段階から小腸における医薬品の膜透過性や代謝を評価することが、薬物動態特性に優れた医薬品の開発に必要である。現在、小腸のモデル系としてはヒト結腸癌由来のCaco-2細胞が多用されている。しかし、Caco-2細胞における薬物トランスポーターの発現パターンはヒト小腸とは異なる。また、Caco-2細胞には薬物代謝酵素の発現及び酵素誘導はほとんど認められないことから、正確に小腸での薬物動態を評価することは難しい。したがって、小腸における薬物代謝及び膜透過性を総合的に評価するためには初代小腸上皮細胞の利用が望ましいが、機能の面や供給に関して問題があることから、初代肝細胞のように薬物動態試験系として広く利用することは困難である。

[0003] ところで、ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は2007年に山中らによって樹立された。このヒトiPS細胞は、1998年にThomsonらによって樹立されたヒト胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞と同様な、多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞である。ヒトiPS細胞はヒトES細胞に比べ倫理的な問題が少なく、医薬品開発のための安定した細胞供給源として期待される。

[0004] 尚、薬剤の吸収試験などに利用される腸管上皮細胞を提供するために、腸

管由来の細胞から腸管の幹／前駆細胞を選択的に取得する方法が報告されている（特許文献1）。また、ALK5阻害因子を用いた多能性細胞の作製ないし維持方法が提案されている（特許文献2）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2008-206510号公報

特許文献2：特表2012-511935号公報

特許文献3：国際公開第2014/132933号パンフレット

特許文献4：国際公開第2017/154795号パンフレット

特許文献5：国際公開第2015/111734号パンフレット

特許文献6：国際公開第2014/171486号パンフレット

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ueda T et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):38-42.

非特許文献2：McCracken KW et al., *Nat Protoc*. 2011 Nov 10;6(12):1920-8

非特許文献3：Spence JR, *Nature*. 2011 Feb 3;470(7332):105-109.

非特許文献4：Ogaki S et al., *Stem Cells*. 2013 Jun;31(6):1086-1096.

非特許文献5：Ozawa T et al., *Sci Rep*. 2015 Nov 12;5:16479.

非特許文献6：Ogaki S et al., *Sci Rep*. 2015 Nov 30;5:17297.

非特許文献7：Iwao T et al., *Drug Metab Pharmacokinet*, 29(1), 44-51 (2014).

非特許文献8：Iwao T et al., *Drug Metab Dispos*, 43(6), 603-610 (2015).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] iPS細胞から腸管上皮細胞への分化誘導に関してはいくつかの報告があるが（例えば、非特許文献1～6を参照）、これらの報告での分化誘導法は煩雑

であり、しかも分化効率が十分でなく、薬物動態学的な解析は詳細に行われていない。さらに、当該分化誘導法は極めて高価な増殖因子やサイトカイン類を大量に用いて分化を誘導しており、実用化に適さない。本発明者らも、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化について研究を進めており、作製した腸管上皮細胞様細胞はさまざまな薬物動態学的機能を有することを報告している（特許文献3、非特許文献7、8）。また、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化促進および機能獲得に有用な低分子化合物や条件を見出している（特許文献3、4、非特許文献8）。

[0008] 以上のように、多くの研究者によって精力的な研究が行われ、一定の成果が得られているものの、薬物動態アッセイや毒性試験などに利用可能な機能的な腸管上皮細胞をインビトロで調製することに対するニーズは依然として高い。特に、機能面の向上と調製効率の向上が望まれる。そこで本発明は、生体の腸管上皮細胞により近い機能を示す細胞（腸管上皮細胞様細胞）を簡便且つ効率的に調製可能な新たな手段を提供することを課題とする。

#### 課題を解決するための手段

[0009] 上記課題を解決すべく研究を進める中で本発明者らは、成熟した腸管上皮細胞への分化誘導には生体内環境を模倣することが特に重要かつ有効と考え、腸内環境の維持・改善（整腸）に有用とされる難消化性多糖類に着眼し、多能性幹細胞から腸管上皮細胞を分化誘導するための材料／因子としてのその有効性を検討した。その結果、難消化性多糖類に分化誘導効率（調製効率）を向上させる効果、及び成熟化（機能の獲得）を促進させる効果が認められた。また、効果が特に高い難消化性多糖類も特定された。尚、上掲の特許文献5では、多糖類のファイバーを細胞培養に使用しているが、その解決すべき課題（目的）は間葉系幹細胞の未分化維持であり、本発明者らが見出した上記知見を示唆すらしめない。また、特許文献6には多糖類が幹細胞の分化に対して促進効果を示すことが記載されているが、その対象（分化誘導を目指す細胞）は造血幹細胞であり、腸管上皮細胞への分化誘導に多糖類を適用することを教示ないし示唆するものではない。

以下の発明は、主として、以上の成果及び考察に基づく。

[1] 以下の工程(1)及び(2)を含む、多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法：

(1) 多能性幹細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程；

(2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類を併用し、工程(1)で得られた腸管幹細胞様細胞を腸管上皮細胞様細胞へと分化させる工程。

[2] 工程(1)が以下の工程(1-1)及び(1-2)からなる、[1]に記載の方法：

(1-1) 多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程；

(1-2) 工程(1-1)で得られた内胚葉様細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程。

[3] 工程(2)における培養期間が7日間～40日間である、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 工程(2)が、以下のA～Cのいずれかの培養工程を含む、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法、

培養工程A：(a-1) EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養と、該培養の後に行われる、(a-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む、

培養工程B：(b-1) EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(b-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む、

培養工程C：(c-1) EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(c-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤及びEGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(c-3) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む。

[5] (a-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(a-2)の

培養の期間は4日間～29日間であり、

(b-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(b-2)の培養の期間は4日間～29日間であり、

(c-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(c-2)の培養の期間は2日間～10日間であり、(c-3)の培養の期間は4日間～25日間である、[4]に記載の方法。

[6] 難消化性多糖類が、結晶セルロース及び／又は脱アシル化ジェランガムである、[1]～[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7] 難消化性多糖類が、結晶セルロース及び／又は脱アシル化ジェランガムであり、(a-2)、(b-2)及び(c-3)の培養に使用する培地における難消化性多糖類の添加量が0.001%～0.1% (w/v) である、[4]又は[5]に記載の方法。

[8] MEK1阻害剤がPD98059であり、DNAメチル化阻害剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンであり、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤がA-83-01である、[1]～[7]のいずれか一項に記載の方法。

[9] 工程(1-1)における分化誘導因子としてアクチビンAを用いる、[2]～[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10] 工程(1-2)における分化誘導因子としてFGF2又はGSK-3 $\beta$ 阻害剤を用いる、[2]～[9]のいずれか一項に記載の方法。

[11] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1]～[10]のいずれか一項に記載の方法。

[12] 人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、[11]に記載の方法。

[13] [1]～[12]のいずれか一項に記載の方法で得られた腸管上皮細胞様細胞。

[14] [13]に記載の腸管上皮細胞様細胞を用いた、被検物質の体内動態又は毒性を評価する方法。

[15] 前記体内動態が、代謝、吸収、排泄、薬物相互作用、薬物代謝酵

素の誘導、又は薬物トランスポーターの誘導である、[14]に記載の方法。

[16]以下の工程(i)～(iii)を含む、[14]又は[15]に記載の方法：

(i) [13]に記載の腸管上皮細胞様細胞で構成された細胞層を用意する工程；

(ii) 前記細胞層に被検物質を接触させる工程；

(iii) 前記細胞層を透過した被検物質を定量し、被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を評価する工程。

[17]以下の工程(l)及び(ll)を含む、[14]又は[15]に記載の方法：

(l) [13]に記載の腸管上皮細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；

(ll) 被検物質の代謝若しくは吸収、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を測定・評価する工程。

[18] [13]に記載の腸管上皮細胞様細胞を含む、細胞製剤。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1-1]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞における遺伝子発現に対する各濃度のファイバーの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールはファイバー非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図1-2]図1の続き。

[図2]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞における遺伝子発現に対するファイバー添加の影響（分化開始後17日目）。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールはファイバー非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図3]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞における遺伝子発現に対するファイバー添加の影響（分化開始後21日目）。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールはファイバー非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図4]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞における遺伝子発現に対するファイバー添加の影響（分化開始26日目）。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールはファイバー非添加群。各種ファイバーは0.015%となるよう添加した。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図5-1]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞におけるマーカー遺伝子発現に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールは脱アシル化ジェランガム非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図5-2]図5の続き。

[図5-3]図5の続き。

[図6-1]ヒトiPS細胞株Tic由来腸管上皮細胞におけるマーカー遺伝子発現に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールは脱アシル化ジェランガム非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。

[図6-2]図6の続き。

[図7-1]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞におけるマーカータンパク質発現に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールは脱アシル化ジェランガム非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。スケールバーは100 μm。

[図7-2]図7の続き。

[図7-3]図7の続き。

[図8]ヒトiPS細胞株Tic由来腸管上皮細胞におけるマーカータンパク質発現に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。コントロールは脱アシル化ジェランガム非添加群。発現量はコントロールを1とした相対値で示す。スケールバーは100 μm。

[図9]ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞における薬物代謝酵素活性に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 4)。コントロールは脱アシル化ジェランガム非添加群。

[図10]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞におけるPEPT1の輸送活性に対する脱アシル化ジェランガムの影響。平均 ± S.D. (n = 3)。イブプロフェン（阻害剤）は3 mmol/Lで添加。コントロールはファイバー非添加群。

[図11]ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞におけるP-糖蛋白質の発現。

### 発明を実施するための形態

- [0011] 本発明は多能性幹細胞を腸管上皮細胞系譜へ分化誘導する方法（以下、「本発明の分化誘導方法」とも呼ぶ。）に関する。本発明によれば、生体の腸管組織を構成する腸管上皮細胞と類似の特性を示す細胞、即ち腸管上皮細胞様細胞が得られる。
- [0012] 「多能性幹細胞」とは、生体を構成するすべての細胞に分化しうる能力（分化多能性）と、細胞分裂を経て自己と同一の分化能を有する娘細胞を生み出す能力（自己複製能）とを併せ持つ細胞をいう。分化多能性は、評価対象の細胞を、ヌードマウスに移植し、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）のそれぞれの細胞を含むテラトーマ形成の有無を試験することにより、評価することができる。
- [0013] 多能性幹細胞として、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等を挙げることができるが、分化多能性及び自己複製能を併せ持つ細胞である限り、これに限定されない。好ましくはES細胞又はiPS細胞を用いる。更に好ましくはiPS細胞を用いる。多能性幹細胞は、好ましくは哺乳動物（例えば、ヒトやチンパンジーなどの霊長類、マウスやラットなどのげっ歯類）の細胞、特に好ましくはヒトの細胞である。従って、本発明の最も好ましい態様では、多能性幹細胞として、ヒトiPS細胞が用いられる。
- [0014] ES細胞は、例えば、着床以前の初期胚、当該初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球等を培養することによって樹立することができる（Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ;Thomson, J. A. et al., Science, 282, 1145-1147 (1998)）。初期胚として、体細胞の核を核移植することによ

て作製された初期胚を用いてもよい (Wilmut et al. (Nature, 385, 810 (1997))、Cibelli et al. (Science, 280, 1256 (1998))、入谷明ら (蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999))、Baguisi et al. (Nature Biotechnology, 17, 456 (1999))、Wakayama et al. (Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 96, 14984 (1999))、Rideout III et al. (Nature Genetics, 24, 109 (2000))、Tachibana et al. (Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell (2013) in press)。初期座として、単為発生胚を用いてもよい (Kim et al. (Science, 315, 482-486 (2007))、Nakajima et al. (Stem Cells, 25, 983-985 (2007))、Kim et al. (Cell Stem Cell, 1, 346-352 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 9, 432-449 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 10, 11-24 (2008))。上掲の論文の他、ES細胞の作製についてはStrelchenko N., et al. Reprod Biomed Online. 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, Vol.365, 2003等が参考になる。尚、ES細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合ES細胞も、本発明の方法に用いられる胚性幹細胞に含まれる。

[0015] ES細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、或いは市販されているものもある。例えば、ヒトES細胞については京都大学再生医科学研究所 (例えばKhES-1、KhES-2及びKhES-3)、WiCell Research Institute、ESI BIOなどから入手可能である。

[0016] EG細胞は、始原生殖細胞を、LIF、bFGF、SCFの存在下で培養すること等により樹立することができる (Matsui et al., Cell, 70, 841-847 (1992))、Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (23), 13726-13731 (1998)、Turnpenny et al., Stem Cells, 21 (5), 598-609, (2003))。

[0017] 「人工多能性幹細胞（iPS細胞）」とは、初期化因子の導入などにより体細胞をリプログラミングすることによって作製される、多能性（多分化能）と増殖能を有する細胞である。人工多能性幹細胞はES細胞に近い性質を示す。iPS細胞の作製に使用する体細胞は特に限定されず、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。また、その由来も特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（例えば、ヒトやチンパンジーなどの霊長類、マウスやラットなどのげっ歯類）の体細胞、特に好ましくはヒトの体細胞を用いる。iPS細胞は、これまでに報告された各種方法によって作製することができる。また、今後開発されるiPS細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0018] iPS細胞作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である（Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al: Cell 131 (5), 861-72, 2007)。ヒトiPS細胞についてはOct4、Sox2、Lin28及びNonogの4因子の導入による樹立の報告がある（Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007)。c-Mycを除く3因子（Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008）、Oct3/4及びKlf4の2因子（Kim J B, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008）、或いはOct3/4のみ（Kim J B, et al: Cell 136 (3), 411-419, 2009）の導入によるiPS細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法（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）も報告されている。一方、ヒストンメチル基転移酵素G9aに対する阻害剤BIX-01294やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸（VPA）或いはBayK8644等を使用することによって作製効率の向上や導入する因子の低減などが可能であるとの報告もある（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. 6 (10), e 253, 2008)。遺伝子導入法についても検討が進められ、レトロウイルスの他、レンチウイルス（Yu J, et al:

Science 318(5858), 1917-1920, 2007)、アデノウイルス (Stadtfield M, et al: Science 322 (5903), 945-949, 2008)、プラスミド (Okita K, et al: Science 322 (5903), 949-953, 2008)、トランスポゾンベクター (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 6, 363-369, 2009)、或いはエピソーマルベクター (Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797-801, 2009) を遺伝子導入に利用した技術が開発されている。

[0019] iPS細胞への形質転換、即ち初期化（リプログラミング）が生じた細胞はFbxo15、Nanog、Oct/4、Fgf-4、Esg-1及びCript等の多能性幹細胞マーカー（未分化マーカー）の発現などを指標として選択することができる。選択された細胞をiPS細胞として回収する。

[0020] iPS細胞は、例えば、国立大学法人京都大学又は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けることもできる。

[0021] 本明細書において「分化誘導する」とは、特定の細胞系譜に沿って分化するように働きかけることをいう。本発明では多能性幹細胞を腸管上皮細胞へと分化誘導する。本発明の分化誘導方法は、大別して2段階の誘導工程、即ち、多能性幹細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程（工程（1））と、得られた腸管幹細胞様細胞を腸管上皮細胞様細胞へと分化させる工程（工程（2））を含む。以下、各工程の詳細を説明する。

[0022] <工程（1） 腸管幹細胞様細胞への分化>

この工程では多能性幹細胞を培養し、腸管幹細胞様細胞へと分化させる。換言すれば、腸管幹細胞様細胞への分化を誘導する条件下で多能性幹細胞を培養する。多能性幹細胞が腸管幹細胞様細胞へ分化する限り、培養条件は特に限定されない。典型的には、多能性幹細胞が内胚葉様細胞を介して腸管幹細胞様細胞へと分化するように、以下で説明する2段階の分化誘導、即ち、多能性幹細胞の内胚葉様細胞への分化（工程（1-1））と、内胚葉様細胞の腸管幹細胞様細胞への分化（工程（1-2））を行う。

[0023] 工程（１－１） 内胚葉様細胞への分化

この工程では多能性幹細胞を培養し、内胚葉様細胞へと分化させる。換言すれば、内胚葉への分化を誘導する条件下で多能性幹細胞を培養する。多能性幹細胞が内胚葉様細胞に分化する限り、培養条件は特に限定されない。例えば、常法に従い、アクチビンAを添加した培地で培養する。この場合、培地中のアクチビンAの濃度を例えば10 ng/mL~200 ng/mL、好ましくは20 ng/mL~150 ng/mLとする。細胞の増殖率や維持等の観点から、培地に血清又は血清代替物（KnockOut™ Serum Replacement(KSR)など）を添加することが好ましい。血清はウシ胎仔血清に限られるものではなく、ヒト血清や羊血清等を用いることもできる。血清又は血清代替物の添加量は例えば0.1%(v/v)~10%(v/v)である。

[0024] Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル経路の阻害剤（例えば、ヘキサクロロフェン、クエルセチン、WntリガンドであるWnt3a）を培地に添加し、内胚葉様細胞への分化の促進を図ってもよい。

[0025] この工程は、国際公開第2014/165663号パンフレットに記載の方法またはそれに準じた方法で行うこともできる。

[0026] 好ましい一態様では、工程（１－１）として２段階の培養を行う。１段階目の培養では比較的低濃度の血清（例えば、0.1%(v/v)~1%(v/v)）を添加した培地で行い、続く２段階目の培養では１段階目の培養よりも血清濃度を高めた培地（血清濃度を例えば1%(v/v)~10%(v/v)）で行う。このように２段階の培養を採用することは、１段階目の培養により未分化細胞の増殖を抑制し、続く２段階目により分化した細胞を増殖させる点で好ましい。

[0027] 工程（１－１）の期間（培養期間）は例えば１日間~１０日間、好ましくは２日間~７日間である。工程（１－１）として２段階の培養を採用する場合には１段階目の培養期間を例えば１日間~７日間、好ましくは２日間~５日間とし、２段階目の培養期間を例えば１日間~６日間、好ましくは１日間~４日間とする。

[0028] 工程（１－２） 腸管幹細胞様細胞への分化

この工程では、工程（1-1）で得られた内胚葉様細胞を培養し、腸管幹細胞様細胞へと分化させる。換言すれば、腸管幹細胞への分化を誘導する条件下で内胚葉様細胞を培養する。内胚葉様細胞が腸管幹細胞様細胞へと分化する限り、培養条件は特に限定されない。好ましくは、FGF2（線維芽細胞増殖因子2）の存在下、又はGSK-3 $\beta$ 阻害剤の存在下で培養を行う。FGF2としては好ましくはヒトFGF2（例えばヒト組換えFGF2）を用いる。

[0029] 典型的には、工程（1-1）を経て得られた細胞集団又はその一部を、選別することなく工程（1-2）に供する。一方で、工程（1-1）を経て得られた細胞集団の中から内胚葉様細胞を選別した上で工程（1-2）を実施することにしてもよい。内胚葉様細胞の選別は例えば、細胞表面マーカーを指標にしてフローサイトメーター（セルソーター）で行えばよい。

[0030] 「FGF2の存在下」とは、FGF2が培地中に添加された条件と同義である。従って、FGF2の存在下での培養を行うためには、FGF2が添加された培地を用いればよい。FGF2の添加濃度の例を示すと100ng/mL～500ng/mLである。

[0031] 同様に、「GSK-3 $\beta$ 阻害剤の存在下」とは、GSK-3 $\beta$ 阻害剤が培地中に添加された条件と同義である。従って、GSK-3 $\beta$ 阻害剤の存在下での培養を行うためには、FGF2が添加された培地を用いればよい。GSK-3 $\beta$ 阻害剤としてCHIR 99021、SB216763、CHIR 98014、TWS119、Tideglusib、SB415286、BI0、AZD2858、AZD1080、AR-A014418、TDZD-8、LY2090314、IM-12、Indirubin、Bikinin、1-Azakenpauulloneを例示することができる。GSK-3 $\beta$ 阻害剤の添加濃度の例（CHIR 99021の場合）を示すと1 $\mu$ M～100 $\mu$ M、好ましくは3 $\mu$ M～30 $\mu$ Mである。

[0032] 工程（1-2）の期間（培養期間）は例えば2日間～10日間、好ましくは3日間～7日間である。当該培養期間が短すぎると、期待される効果（分化効率の上昇、腸管幹細胞としての機能の獲得の促進）が十分に得られない。他方、当該培養期間が長すぎると、分化効率の低下を引き起こす。

[0033] 腸管幹細胞様細胞へ分化したことは、例えば、腸管幹細胞マーカーの発現を指標にして判定ないし評価することができる。腸管幹細胞マーカーの例を

挙げると、ロイシンリッチリピートを含むGタンパク質共役受容体5（LGR5）、エフリンB2受容体（EphB2）である。

[0034] <工程（2） 腸管上皮細胞様細胞への分化>

この工程では、MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類を併用し、工程（1）で得られた腸管幹細胞様細胞を腸管上皮細胞様細胞へと分化させる。本発明では、腸管上皮細胞様細胞への分化の際、MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤及びEGFに加え、難消化性多糖類を用い、分化及び成熟化（腸管上皮細胞としての機能の獲得）の促進を図る。「MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類を併用する」とは、工程（2）を構成する1又は2以上の培養を行うために当該全ての物質が必要とされることいい、当該全ての物質の同時使用（即ち、当該全ての物質が添加された培地を用いた培養が行われること）を必須の条件として要求するものではない。但し、典型的には、工程（2）を構成する1又は2以上の培養の1つとして、当該全ての物質が添加された培地を用いた培養が行われる。

[0035] 典型的には、工程（1）を経て得られた細胞集団又はその一部を、選別することなく工程（2）に供する。一方で、工程（1）を経て得られた細胞集団の中から腸管幹細胞様細胞を選別した上で工程（2）を実施することにしてもよい。腸管幹細胞様細胞の選別は例えば、細胞表面マーカーを指標にしてフローサイトメーター（セルソーター）で行えばよい。

[0036] MEK1阻害剤として、PD98059、PD184352、PD184161、PD0325901、U0126、MEK inhibitor I、MEK inhibitor II、MEK1/2 inhibitor II、SL327を挙げることができる。同様に、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン、5-アザシチジン、RG108、ゼブラリンを挙げることができる。TGF- $\beta$  受容体阻害剤については、後述の実施例に使用したA-83-01がTGF- $\beta$  受容体ALK4、ALK5、ALK7に阻害活性を示すことを考慮すれば、好ましくは、TGF- $\beta$  受容体ALK4、ALK5、ALK7の一以上に対して阻害活性を示すものを用いるとよい。例えば、A-83-01、SB431542、SB-505124、SB525334、D4476、ALK5 inhibitor、LY

2157299、LY364947、GW788388、RepSoxが当該条件を満たす。

[0037] 難消化性多糖類とは、ヒトの消化酵素では消化されない多糖の総称である。難消化性多糖類の多くは腸内環境を整える作用（整腸作用）を示す。本発明では、成熟した腸管上皮細胞への分化誘導を促進させるため、腸管上皮細胞様細胞の分化誘導の際、培地中に難消化性多糖類を添加する。意図した効果（分化誘導効率の向上、及び／又は成熟化の促進）が認められる限り、使用する難消化性多糖類は特に限定されない。2種類以上の難消化性多糖類を併用する場合の組合せも同様に限定されない。

[0038] 好ましい難消化性多糖類を例示すれば、結晶セルロース、又は脱アシル化ジェランガム、或いはこれらの併用である。これらの多糖類は塩の形態であってもよい。ここでいう塩とは、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムといったアルカリ金属の塩、カルシウム、バリウム、マグネシウムといったアルカリ土類金属の塩又はアルミニウム、亜鉛、銅、鉄、アンモニウム、有機塩基及びアミノ酸等の塩である。

[0039] セルロースは結晶領域と非結晶領域からなる。酸加水分解し、非結晶領域を除去し、結晶部分を取り出して精製することによって結晶セルロースが得られる。換言すれば、セルロース（例えば繊維性植物からパルプとして得られる）を酸で部分的に解重合し、精製したものが結晶セルロースである。アセチル化、ヒドロキシルエチル化、ヒドロキシルプロピル化等の表面修飾を施した結晶セルロースを用いることにしてもよい。結晶セルロースは、例えば、フナコシ株式会社製のカラムクロマトグラフィー用フナセル粉末II、旭化成（株）社製のセオラス（登録商標）シリーズUF-702、UF-711、KG-802、KG-1000、PH-101、PH-101D、PH-102、PH-301、PH-301D、PH-302、PH-F20JP、第一工業製薬株式会社製のセロディーヌ4Mを使用することができる。特に好ましい結晶セルロースの例としてセオラスUF-711を挙げることができる。

[0040] 脱アシル化ジェランガムはリン酸化したものを使用することもできる。当該リン酸化は公知の手法で行うことができる。脱アシル化ジェランガムは、例えば、三晶株式会社製「KELCOGEL（シーピー・ケルコ社の登録商標）CG-LA

」、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製「ケルコゲル（シーピー・ケルコ社の登録商標）」等を使用することができる。

[0041] 難消化性多糖類の重量平均分子量は、好ましくは10,000~50,000,000であり、より好ましくは100,000~20,000,000、更に好ましくは1,000,000~10,000,000である。例えば、当該分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）によるプルラン換算で測定できる。

[0042] MEK1阻害剤の添加濃度の例（PD98059の場合）を示すと4 $\mu$ M~100 $\mu$ M、好ましくは10~40 $\mu$ Mである。同様にDNAメチル化阻害剤の添加濃度の例（5-アザ-2'-デオキシシチジンの場合）を示すと、1 $\mu$ M~25 $\mu$ M、好ましくは2.5 $\mu$ M~10 $\mu$ Mであり、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤の添加濃度の例（A-83-01の場合）を示すと0.1 $\mu$ M~2.5 $\mu$ M、好ましくは0.2 $\mu$ M~1 $\mu$ Mである。EGFの添加濃度の例は、5ng/mL~100ng/mL、好ましくは10ng/mL~50ng/mLである。尚、例示した化合物、即ち、PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン、A-83-01及びフォルスコリンとは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、例示した化合物（PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン、A-83-01）の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。また、設定した濃度範囲が適切であるか否かは、後述の実施例に準じた予備実験によって確認することができる。

[0043] 難消化性多糖類の使用量、即ち、培地への添加濃度は、期待される上記効果を発揮できる限り特に限定されないが、例えば、0.001%~0.1%（w/v）、好ましくは0.002%~0.05%（w/v）、より好ましくは0.005%~0.045%（w/v）、更に好ましくは0.01%~0.03%（w/v）、最も好ましくは0.01%~0.02%（w/v）培地中に添加するとよい。

[0044] 工程（2）の期間（培養期間）は例えば7日間~40日間、好ましくは10日間~30日間である。当該培養期間が短すぎると、期待される効果（分化効率の上昇、腸管上皮細胞としての機能の獲得の促進）が十分に得られない。他方、当該培養期間が長すぎると、分化効率の低下を引き起こす。

[0045] 腸管上皮細胞様細胞へ分化したことは、例えば、腸管上皮細胞マーカーの発現やペプチドの取り込み、或いはビタミンD受容体を介した薬物代謝酵素の発現誘導を指標にして判定ないし評価することができる。腸管上皮細胞マーカーの例を挙げると、ATP結合カセットトランスポーターB1/多剤耐性タンパク1 (ABCB1/MDR1)、ATP結合カセットトランスポーターG2/乳ガン耐性タンパク (ABCG2/BCRP)、シトクロムP450 2C9 (CYP2C9)、シトクロムP450 2C19 (CYP2C19)、シトクロムP450 3A4 (CYP3A4)、脂肪酸結合タンパク2 (FABP)、

腸特異的ホメオボックス (ISX)、SLC (solute carrier) ファミリーメンバー15A1/ペプチドトランスポーター1 (SLC15A1/PEPT1)、P糖タンパク質 (P-gp)、プレグナンX受容体 (PXR)、SLC (solute carrier) ファミリーメンバー5A1/ナトリウム共役型グルコーストランスポーター1 (SLC5A1/SGLT1)、ビリン 1 (Villin 1)、SLC (solute carrier) 有機アニオントランスポーター2B1 (SLC02B1/OATP2B1)、スクラーゼーイソマルターゼ、ウリジン2リン酸-グルクロン酸転移酵素1A1 (UGT1A1)、ウリジン2リン酸-グルクロン酸転移酵素1A4 (UGT1A4)、カルボキシルエステラーゼ2A1 (CES2A1) である。この中でも、腸管上皮に特異性の高いビリン1、小腸での主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4、小腸でのペプチドの吸収に関与するSLC15A1/PEPT1、小腸の頂側膜側に発現しているグルコーストランスポーターであるSLC5A1/SGLTは特に有効なマーカーである。

[0046] 目的の細胞（腸管上皮細胞様細胞）のみからなる細胞集団又は目的の細胞が高比率（高純度）で含まれた細胞集団を得ようと思えば、目的の細胞に特徴的な細胞表面マーカーを指標にして培養後の細胞集団を選別・分取すればよい。

[0047] 好ましくは、工程（2）として、以下のA～Cのいずれか培養工程を行う。

<培養工程A>

培養工程Aでは、（a-1）EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養と、

該培養の後に行われる、(a-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を行う。このように2段階の培養を行えば、腸管上皮細胞への分化促進、成熟化、機能獲得の効果が期待できる。(a-1)の培養の期間は例えば2日間~10日間、好ましくは4日間~8日間であり、(a-2)の培養の期間は例えば4日間~29日間、好ましくは7日間~27日間である。尚、特に説明しない事項(各培養に使用可能な化合物、各化合物の添加濃度等)については、上記の対応する説明が援用される。

#### [0048] <培養工程B>

培養工程Bでは、(b-1) EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(b-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を行う。即ち、2段階の培養を行うことにし、2段階目の培養の際、難消化性多糖類を用いる。このように2段階の培養を行えば、腸管上皮細胞への分化促進、成熟化、機能獲得の効果が期待できる。(b-1)の培養の期間は例えば2日間~10日間、好ましくは4日間~8日間であり、(b-2)の培養の期間は例えば4日間~29日間、好ましくは7日間~27日間である。尚、特に説明しない事項(各培養に使用可能な化合物、各化合物の添加濃度等)については、上記の対応する説明が援用される。

#### <培養工程C>

培養工程Cでは、(c-1) EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(c-2) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤及びEGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、(c-3) MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$  受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を行う。即ち、3段階の培養を行うことにし、3段階目の培養の際、難消化性多糖類を用いる。このように3段階の培養を行えば、腸管上皮細胞への分化促進、成熟化、機能獲得の効果が期待できる。(c-1)の培養の期間は例えば2日間~10日間、好ましくは4日間~8日間であり、(c-2

)の培養の期間は例えば2日間～10日間、好ましくは2日間～8日間であり、(c-3)の培養の期間は例えば4日間～25日間、好ましくは7日間～20日間である。尚、特に説明しない事項(各培養に使用可能な化合物、各化合物の添加濃度等)については、上記の対応する説明が援用される。

[0049] 本発明を構成し得る各工程((1)、(1-1)、(1-2)、(2)、(a-1)、(a-2)、(b-1)、(b-2)、(c-1)、(c-2)、(c-3))において、途中で継代培養を行ってもよい。例えばコンフルエント又はサブコンフルエントになった際に細胞の一部を採取して別の培養容器に移し、培養を継続する。分化を促進するために細胞密度を低く設定することが好ましい。例えば $1 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>～ $1 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>程度の細胞密度で細胞を播種するとよい。

[0050] 培地交換や継代培養などに伴う、細胞の回収の際には、細胞死を抑制するためにY-27632等のROCK阻害剤(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ)で予め細胞を処理しておくといよい。

[0051] 本発明を構成する各工程における、その他の培養条件(培養温度など)は、動物細胞の培養において一般に採用されている条件とすればよい。即ち、例えば37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境下で培養すればよい。また、基本培地として、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(GIBCO社等)、ハムF12培地(HamF12)(SIGMA社、Gibco社等)、ダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM)(ナカライテスク株式会社、シグマ社、Gibco社等)、グラスゴー基本培地(Gibco社等)、RPMI1640培地等を用いることができる。二種以上の基本培地を併用することにしてもよい。工程(1-2)、工程(2)、工程(2)を構成する培養工程A、培養工程Bにおいては、上皮細胞の培養に適した基本培地(例えばD-MEMとハムF12培地の混合培地、D-MEM)を用いることが好ましい。培地に添加可能な成分の例としてウシ血清アルブミン(BSA)、抗生物質、2-メルカプトエタノール、PVA、非必須アミノ酸(NEAA)、インスリン、トランスフェリン、セレンウムを挙げることができる。典型的には培養皿などを用いて二次元的に細胞を培養する。本発明の方法によれば、二次元培養によって多能性

幹細胞から腸管上皮細胞様細胞を得ることが可能となる。但し、ゲル状の培養基材あるいは3次元培養プレートなどを用いた3次元培養を実施することにしてもよい。

[0052] 本発明の第2の局面は本発明の分化誘導方法で調製した腸管上皮細胞様細胞の用途に関する。第1の用途として各種アッセイが提供される。本発明の腸管上皮細胞様細胞は腸管、特に小腸のモデル系に利用可能であり、腸管、特に小腸での薬物動態（吸収、代謝など）の評価や毒性の評価に有用である。換言すれば、本発明の腸管上皮細胞様細胞は、化合物の体内動態の評価や毒性の評価にその利用が図られる。

[0053] 具体的には、本発明の腸管上皮細胞様細胞を用いて被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性等を試験することができる。即ち、本発明は、腸管上皮細胞様細胞の用途の一つとして、被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性等を評価する方法（第1の態様）を提供する。当該方法では、（i）本発明の分化誘導方法で得られた腸管上皮細胞様細胞で構成された細胞層を用意する工程と、（ii）前記細胞層に被検物質を接触させる工程と、（iii）前記細胞層を透過した被検物質を定量し、被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を評価する工程を行う。尚、被検物質の吸収性については、後述の方法（第2の態様）でも評価することができる。

[0054] 工程（i）では、典型的には、半透過性膜（多孔性膜）の上で腸管上皮細胞様細胞を培養し、細胞層を形成させる。具体的には、例えば、カルチャーインサートを備えた培養容器（例えば、コーニング社が提供するトランスウェル（登録商標））を使用し、カルチャーインサート内に細胞を播種して培養することにより、腸管上皮細胞様細胞で構成された細胞層を得る。

[0055] 工程（ii）での「接触」は、典型的には、培地に被検物質を添加することによって行われる。被検物質の添加のタイミングは特に限定されない。従

って、被検物質を含まない培地で培養を開始した後、ある時点で被検物質を添加することにしても、予め被検物質を含む培地で培養を開始することにしてもよい。

[0056] 被検物質には様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を用いることができる。有機化合物の例として核酸、ペプチド、タンパク質、脂質（単脂質、複合脂質（ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セレブロシド等）、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド、ポリフェノール、カテキン、ビタミン（B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、A、D、E等）を例示できる。医薬品、栄養食品、食品添加物、農薬、化粧品（化粧品）等の既存成分或いは候補成分も好ましい被検物質の一つである。植物抽出液、細胞抽出液、培養上清などを被検物質として用いてもよい。2種類以上の被検物質を同時に添加することにより、被検物質間の相互作用、相乗作用などを調べることにしてもよい。被検物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なアッセイ系を構築することができる。

[0057] 被検物質を接触させる期間は任意に設定可能である。接触期間は例えば10分間～3日間、好ましくは1時間～1日間である。接触を複数回に分けて行うことにしてもよい。

[0058] 工程(iii)では、細胞層を透過した被検物質を定量する。例えば、トランスウェル（登録商標）のようなカルチャーインサートを備えた培養容器を使用した場合には、カルチャーインサートを透過した被検物質、即ち、細胞層を介して上部もしくは下部容器内に移動した被検物質を、被検物質に応じて、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（FIA法）、酵素免疫測定法（EIA法））等の測定方法で定量する。定量結果（細胞層を透過した被検物質の量）と被検物質の使用量（典型的には培地への添加量）に基づき、被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を判定・

評価する。

- [0059] 本発明は別の態様（第2の態様）として、被検物質の代謝又は吸収を評価する方法も提供する。当該方法では、（1）本発明の分化誘導方法で得られた腸管上皮細胞様細胞に被検物質を接触させる工程と、（11）被検物質の代謝若しくは吸収、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を測定・評価する工程を行う。
- [0060] 工程（1）、即ち腸管上皮細胞様細胞と被検物質の接触は、上記工程（i）と同様に実施することができる。但し、予め細胞層を形成させることは必須ではない。
- [0061] 工程（1）の後、被検物質の代謝若しくは吸収、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を測定・評価する（工程（11））。工程（1）の直後、即ち、被検物質の接触の後、実質的な時間間隔を置かず代謝等を測定・評価しても、或いは、一定の時間（例えば10分～5時間）を経過した後に代謝等を測定・評価することにしてもよい。代謝の測定は、例えば、代謝産物の検出によって行うことができる。この場合には、通常、工程（1）後の培養液をサンプルとして、予想される代謝産物を定性的又は定量的に測定する。測定方法は代謝産物に応じて適切なものを選択すればよいが、例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（FIA法）、酵素免疫測定法（EIA法））等を採用可能である。
- [0062] 典型的には、被検物質の代謝産物が検出されたとき、「被検物質が代謝された」と判定ないし評価する。また、代謝産物の量に応じて被検物質の代謝量を評価することができる。代謝産物の検出結果と、被検物質の使用量（典型的には培地への添加量）に基づき、被検物質の代謝効率を算出することにしてもよい。
- [0063] 腸管上皮細胞様細胞における薬物代謝酵素（シトクロムP450（特にCYP3A4）、ウリジン2リン酸-グルクロン酸転移酵素（特にUGT1A8、UGT1A10）、硫酸転移酵素（特にSULT1A3など））の発現を指標として被検物質の代謝を測定す

ることも可能である。薬物代謝酵素の発現はmRNAレベル又はタンパク質レベルで評価することができる。例えば、薬物代謝酵素のmRNAレベルに上昇を認めたととき、「被検物質が代謝された」と判定することができる。同様に、薬物代謝酵素の活性に上昇を認めたととき、「被検物質が代謝された」と判定することができる。代謝産物を指標として判定する場合と同様に、薬物代謝酵素の発現量に基づいて定量的な判定・評価を行うことにしてもよい。

[0064] 被検物質の吸収を評価するためには、例えば、培養液中の被検物質の残存量を測定する。通常、工程（1）後の培養液をサンプルとして被検物質を定量する。測定方法は被検物質に応じて適切なものを選択すればよい。例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（FIA法）、酵素免疫測定法（EIA法））等を採用可能である。典型的には、培養液中の被検物質の含有量の低下を認めたととき、「被検物質が吸収された」と判定・評価する。また、低下の程度に応じて被検物質の吸収量ないし吸収効率を判定・評価することができる。尚、細胞内に取り込まれた被検物質の量を測定することによっても、吸収の評価は可能である。

[0065] 尚、代謝の測定・評価と吸収の測定・評価を同時に又は並行して行うことにしてもよい。

[0066] 本発明の分化誘導方法で調製した腸管上皮細胞様細胞の第2の用途として腸管上皮細胞様細胞を含有する細胞製剤が提供される。本発明の細胞製剤は各種腸疾患の治療に適用可能である。特に、障害された（機能不全を含む）腸管上皮組織の再生・再建用の材料としての利用が想定される。即ち、再生医療への貢献を期待できる。本発明の細胞製剤は、例えば、本発明の方法によって得られた腸管上皮細胞様細胞を生理食塩水や緩衝液（例えばリン酸系緩衝液）等に懸濁すること、或いは当該細胞を用いて三次元組織体（オルガノイドやスフェロイド）を作製することによって調製することができる。治療上有効量の細胞を投与できるように、一回投与分の量として例えば $1 \times 10^5$ 個～ $1 \times 10^{10}$ 個の細胞を含有させるとよい。細胞の含有量は、使用目的、対象疾患、適用対象（レシピエント）の性別、年齢、体重、患部の状態、細胞の状

態などを考慮して適宜調整することができる。

[0067] 細胞の保護を目的としてジメチルスルホキシド (DMSO) や血清アルブミン等を、細菌の混入を阻止することを目的として抗生物質等を、細胞の活性化、増殖又は分化誘導などを目的として各種の成分 (ビタミン類、サイトカイン、成長因子、ステロイド等) を本発明の細胞製剤に含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分 (例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など) を本発明の細胞製剤に含有させてもよい。

## 実施例

[0068] ヒトiPS細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する際の効率の向上、及び成熟化 (機能の獲得) の促進を目指し、以下の検討を行った。

[0069] 1. 方法

(1) 細胞

ヒトiPS細胞 (iPS-51 : Windy、iPS-25 : Tic) は、ヒト胎児肺線維芽細胞MR C-5にoctamer binding protein 3/4 (OCT3/4)、sex determining region Y-box 2 (SOX2)、kruppel-like factor 4 (KLF4)、v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (c-MYC) を、パントロピックレトロウイルスベクターを用いて導入後、ヒトES細胞様コロニーをクローン化したものであり、国立成育医療研究センター研究所の梅澤明弘博士よりご供与いただいた。フィーダー細胞はマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を使用した。

[0070] (2) 培地

MEFの培養には10%ウシ胎仔血清 (FBS)、2 mmol/L L-グルタミン (L-Glu)、1%非必須アミノ酸 (NEAA)、100 units/mLペニシリンG、100 µg/mLストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いた。MEFの剥離液には0.05%トリプシン-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を、MEFの保存液にはセルバンカー1を用いた。ヒトiPS細胞の維持培養には20%ノックアウト血清代替物 (KSR)、0.8% NEAA、2 mmol/L L-Glu、0.1 mmol/L 2-メルカプトエタノール (2-MeE)、5 ng/mL線維芽細胞増殖因子 (FGF) 2を含むDMEM Ham' s

F-12 (DMEM/F12) を用いた。ヒトiPS細胞の剥離液には1 mg/mLコラゲナーゼ IV、0.25%トリプシン、20% KSR、1 mmol/L塩化カルシウムを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた。ヒトiPS細胞の保存液には霊長類ES/iPS細胞用凍結保存液を用いた。

[0071] (3) ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞はマイトマイシンC処理を施したMEF ( $6 \times 10^5$  cells/100 mmディッシュ) 上に播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて培養した。ヒトiPS細胞の継代は、3~5日培養後、1:2~1:3のスプリット比で行った。ヒトiPS細胞は解凍48時間後に培地を交換し、それ以降は毎日交換した。

[0072] (4) ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化

ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化は、ヒトiPS細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約70%になった状態で開始した。0.5% FBS、100 ng/mLアクチビンA、100 units/mLペニシリンG、100 μg/mLストレプトマイシンを含むロズウェルパーク記念研究所 (RPMI) + グルタマックス培地で2日間 (分化開始後0日目~2日目)、2% FBS、100 ng/mLアクチビンA、100 units/mLペニシリンG、100 μg/mLストレプトマイシンを含むRPMI + グルタマックス培地で1日間 (分化開始後2日目~3日目) 培養することで内胚葉に分化させた。その後、2% FBS、1%グルタマックス、250 ng/mL FGF2を含むDMEM/F12で4日間 (分化開始後3日目~7日目) 培養することで腸管幹細胞へ分化させた。FGF2処理後、Y-27632 (Rho結合キナーゼ阻害剤) を10 μmol/Lとなるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air条件下CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cにて60分間処理した細胞をアクターゼにて剥離し、あらかじめヒトiPS細胞用培地にて30倍に希釈した、成長因子を除去したマトリゲルにてコートした細胞培養用24 well-plateに播種した。その後、2% FBS、2 mmol/Lグルタマックス、1% NEAA、2% B27サプリメント、1% N2サプリメント、100 units/mLペニシリンG、100 μg/mLストレプトマイシン、20 ng/mL上皮成長因子 (EGF)、10 μmol/L Y-27632を含むDMEM/F12で1日間 (分化開始後7日目~8日目)、2% FBS、2 mmol/Lグ

ルタマックス、1% NEAA、2% B27サプリメント、1% N2サプリメント、100 units/mLペニシリンG、100  $\mu$ g/mLストレプトマイシン、20 ng/mL EGFを含むDMEM/F12で6日間（分化開始後8日目～14日目）、2% FBS、2 mmol/Lグルタマックス、1% NEAA、2% B27サプリメント、1% N2サプリメント、100 units/mLペニシリンG、100  $\mu$ g/mLストレプトマイシン、20 ng/mL EGF、20  $\mu$ mol/L PD98059、5  $\mu$ mol/L 5-アザ-2'-デオキシシチジン、0.5  $\mu$ mol/L A-83-01を含むDMEM/F12で4日間（分化開始後14日目～18日目）、8日間（分化開始後14日目～22日目）もしくは12日間（分化開始後14日目～26日目）培養することで腸管上皮細胞へ分化させた。結晶セルロース（旭化成（株）社製のセオラス（登録商標）UF-711、原料粒子径20～100  $\mu$ m）、脱アシル化ジェランガム（三晶株式会社製KELCOGEL CG-LA）のいずれかのファイバーは分化開始後8日目から分化終了時まで培地に添加した。

[0073] (5) 総リボ核酸 (RNA) 抽出

総RNAはヒトiPS細胞の分化誘導終了後、Agencourt RNAdvance Tissue Kitの添付マニュアルに従い抽出した。

[0074] (6) 逆転写反応

相補的DNA (cDNA) の合成は、ReverTra Ace qPCR RT Master Kitを使用し、添付マニュアルに従い行った。

[0075] (7) Real-Time RT-PCR法

Real-Time RT-PCRはKAPA SYBR Fast qPCR Kitを用い、cDNAを鋳型にして、反応は添付マニュアルに従い行った。結果は内在性コントロールとしてヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) を用いて補正した。

[0076] (8) 免疫蛍光染色

分化誘導終了後、4%パラホルムアルデヒドで細胞の固定と0.1% Triton-Xで膜透過処理もしくはメタノールで細胞の固定と膜透過処理を行った。続いて必要に応じて5% FBS溶液でブロッキング処理を行った。一次抗体を4°Cで一晩反応させ、その後、二次抗体を室温で1時間反応させた。4',6-ジアミノ-2-

フェニルインドール (DAPI) で核染色を行った後、Operetta (PerkinElmer) とZeiss LSM800 with Airyscanを用いて観察および発現レベルの定量を行った。

[0077] (9) 薬物代謝実験

分化誘導終了後、CYPの基質カクテルを含む培地 (2% FBS、2 mmol/Lグルタミン酸、1% NEAA、2% B27サプリメント、1% N2サプリメント、100 units/mLペニシリンG、100 µg/mLストレプトマイシン、20 ng/mL EGFを含むDMEM/F12) で37°Cにてインキュベーションし、所定の時間経過後、培地をサンプリングした。CYP3A4の代謝実験では、阻害剤としてケトコナゾール (10 µmol/L) を用いた。代謝活性は、液体クロマトグラフィー-マススペクトロメーター (LC-MS/MS) を用いて測定した培地中の各代謝物の量より算出した。代謝実験終了後、タンパク定量を行い、代謝活性をタンパク量で補正した。

[0078] (10) グリシルサルコシン (Gly-Sar) の取り込み実験

分化誘導終了後、トリチウムラベルされたGly-Sarを含む取り込み溶液で37°Cもしくは4°Cにてインキュベーションした。取り込み溶液として、137 mmol/L塩化ナトリウム、5.4 mmol/L塩化カリウム、0.81 mmol/L硫酸マグネシウム、0.44 mmol/Lリン酸二水素カリウム、0.34 mmol/Lリン酸水素二ナトリウム、1.3 mmol/L塩化カルシウム、4.2 mmol/L炭酸水素ナトリウム、5.6 mmol/L D-グルコース、10 mmol/L MESを含むpH 6.0の水溶液を用いた。阻害剤としてはイブuproフェン (3 mmol/L) を用いた。インキュベーション終了後、氷冷した取り込み溶液で細胞を洗浄することにより取り込みを停止させた。その後、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む0.2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液で細胞を可溶化し、シンチレーション溶液を加えた。Gly-Sarの細胞内取り込み量は、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した放射活性より算出した。

[0079] 本検討で使用したマーカー遺伝子の特徴を以下に示す。

ABCB1/MDR1 (ATP結合カセットトランスポーターB1/多剤耐性タンパク1) : P糖タンパク質であり、排出トランスポーターとして機能する。

ABCG2/BCRP (ATP結合カセットトランスポーターG2/乳ガン耐性タンパク)  
: 排出トランスポーターとして機能する。

CYP2C9 (シトクロムP450 2C9) : 小腸に発現する薬物代謝酵素である。

CYP2C19 (シトクロムP450 2C19) : 小腸に発現する薬物代謝酵素である。

CYP3A4 (シトクロムP450 3A4) : 小腸において主要な薬物代謝酵素である

。

FABP2 (脂肪酸結合タンパク2) : 小腸型であり、小腸吸収細胞のマーカー  
となる。

ISX (腸特異的ホメオボックス) : 腸管上皮に発現している転写因子である

。

PEPT1 (ペプチドトランスポーター1) : 小腸の頂側膜側に発現している。

P-gp (P糖タンパク質) : 排出トランスポーターであり、小腸の頂側膜側に  
発現している。

PXR (プレグナンX受容体) : CYP3A4の発現や誘導に関与する。

SGLT1 (ナトリウム-グルコース共輸送体1) : 小腸管腔内からのグルコー  
スの取り込みを担う。

Villin 1 (ビリン1) : 微絨毛の主要な構成成分である。

## [0080] 2. 結果・考察

### (1) 腸管上皮細胞への分化に対する各種ファイバーの濃度影響の検討

各濃度の結晶セルロース又は脱アシル化ジェランガムを腸管上皮細胞への  
分化誘導時に添加し、各マーカー遺伝子の発現を解析することによって、分  
化に対する影響を検討した。0.005%、0.01%及び0.015% 結晶セルロース添加  
群ではVillin 1、PEPT1、MDR1及びSGLT1発現が上昇し、そのうち0.015%結晶  
セルロースの添加によって最も高い効果が認められた(図1)。0.005%、0.0  
15%及び0.045%の脱アシル化ジェランガムの添加群ではVillin 1、MDR1及びPE  
PT1発現は共に増加した(図1)。0.015% 脱アシル化ジェランガムの添加群  
でVillin 1とPEPT1発現は最も高く、MDR1の発現レベルは0.005% 脱アシル化  
ジェランガムの添加によって最も上昇した。これらの遺伝子発現の結果から

、結晶セルロースは0.015%、脱アシル化ジェランガムは0.015%及び0.05%の濃度で高い効果が認められた。このため、各種ファイバーの濃度を0.015%として以降の検討を行うこととした。

[0081] (2) 腸管上皮細胞への分化に対する各種ファイバーの検討

結晶セルロース又は脱アシル化ジェランガムを腸管上皮細胞への分化誘導時に添加し、分化開始後、17日目、21日目及び26日目の細胞を回収し、各マーカー遺伝子の発現を解析することによって、分化に対する影響を検討した。その結果、分化開始後17日目に回収した細胞のVillin 1、PEPT1、MDR1、PXR発現はコントロールと比べて、明らかな変化は認められなかった。CYP3A4の発現は、結晶セルロースの添加によって低下したものの、脱アシル化ジェランガム添加群では増加した(図2)。分化開始後21日目に回収した細胞ではファイバーの添加によって上記の遺伝子マーカーの発現レベルが著しく増加した。その中で、結晶セルロース及び脱アシル化ジェランガムは最も効果が高かった(図3)。分化開始後26日目に回収した細胞ではP-gpおよびPXRの発現レベルは結晶セルロース又は脱アシル化ジェランガムを添加することによって上昇した(図4)。CYP3A4発現は結晶セルロースの添加によって上昇し、脱アシル化ジェランガムについてもやや上昇が認められた(図4)。Villin 1およびPEPT1については、ファイバーの影響はあまり認められなかったものの、結晶セルロースと脱アシル化ジェランガムによって発現レベルはやや増加した(図4)。以上のことから、結晶セルロースの効果が最も高く、続いて脱アシル化ジェランガムの順に効果が認められた。培地交換時の操作性と効果のバランスの観点から、脱アシル化ジェランガムを用いて以降の詳細な検討を行うこととした。

[0082] (3) 腸管上皮細胞への分化に対する脱アシル化ジェランガムの影響の検討

脱アシル化ジェランガムを添加して分化を行うことによって、二種類のヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞において、検討した全てのマーカーについて発現レベルの上昇が認められた(図5、図6)。

[0083] 次に免疫染色を行い、各マーカーのタンパク発現の定量的解析を行った。

その結果、ヒトiPS細胞株Windy由来腸管上皮細胞においてVillin 1の発現レベルは変わらなかったものの、FABP2、PEPT1、SGLT1およびP-gpの発現は脱アシル化ジェランガムの添加によって上昇した（図7）。また、ヒトiPS細胞株Ticより分化した腸管上皮細胞においてvillin、BCRPの発現量は上昇した（図8）。

[0084] これらの結果から、脱アシル化ジェランガムはヒトiPS細胞株由来腸管上皮細胞への分化を促進することが示唆された。

[0085] (4) 分化させた腸管上皮細胞における薬物代謝酵素活性の評価

小腸において薬物代謝酵素であるCYP2C19の酵素活性に対する脱アシル化ジェランガムの影響を確認したところ、CYP2C19活性は脱アシル化ジェランガムの添加によって上昇した（図9）。

[0086] (5) 分化させた腸管上皮細胞におけるPEPT1の輸送活性評価

PEPT1を介したGly-sarの細胞内取り込み活性は、脱アシル化ジェランガムを添加することによって上昇した（図10）。また、この活性は、阻害剤であるイブプロフェン存在下および4℃条件下で抑制された（図10）。

[0087] (6) 分化させた腸管上皮細胞における上皮極性評価

腸管上皮細胞apical側に発現するタンパク質であるP-糖蛋白質が、脱アシル化ジェランガムを添加した条件で分化した腸管上皮細胞のapical側に局在することが認められた（図11）。

[0088] 3. まとめ

以上の結果より、ファイバー（結晶セルロース、脱アシル化ジェランガム）はヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化を促進することが示唆された。したがって、これらのファイバーは腸管分化に有用であることが明らかとなった。

### 産業上の利用可能性

[0089] 本願発明によれば、多能性幹細胞から、より成熟した（換言すれば、より機能的な）腸管上皮細胞様細胞を簡便且つ効率的に調製できる。腸管上皮細胞様細胞は小腸のモデル系として有用であり、吸収・代謝・膜透過性、薬物

代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性の評価等に利用できる。また、各種腸疾患治療用の細胞製剤の有効成分として、或いは再生医療の材料としての利用も期待される。

[0090] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

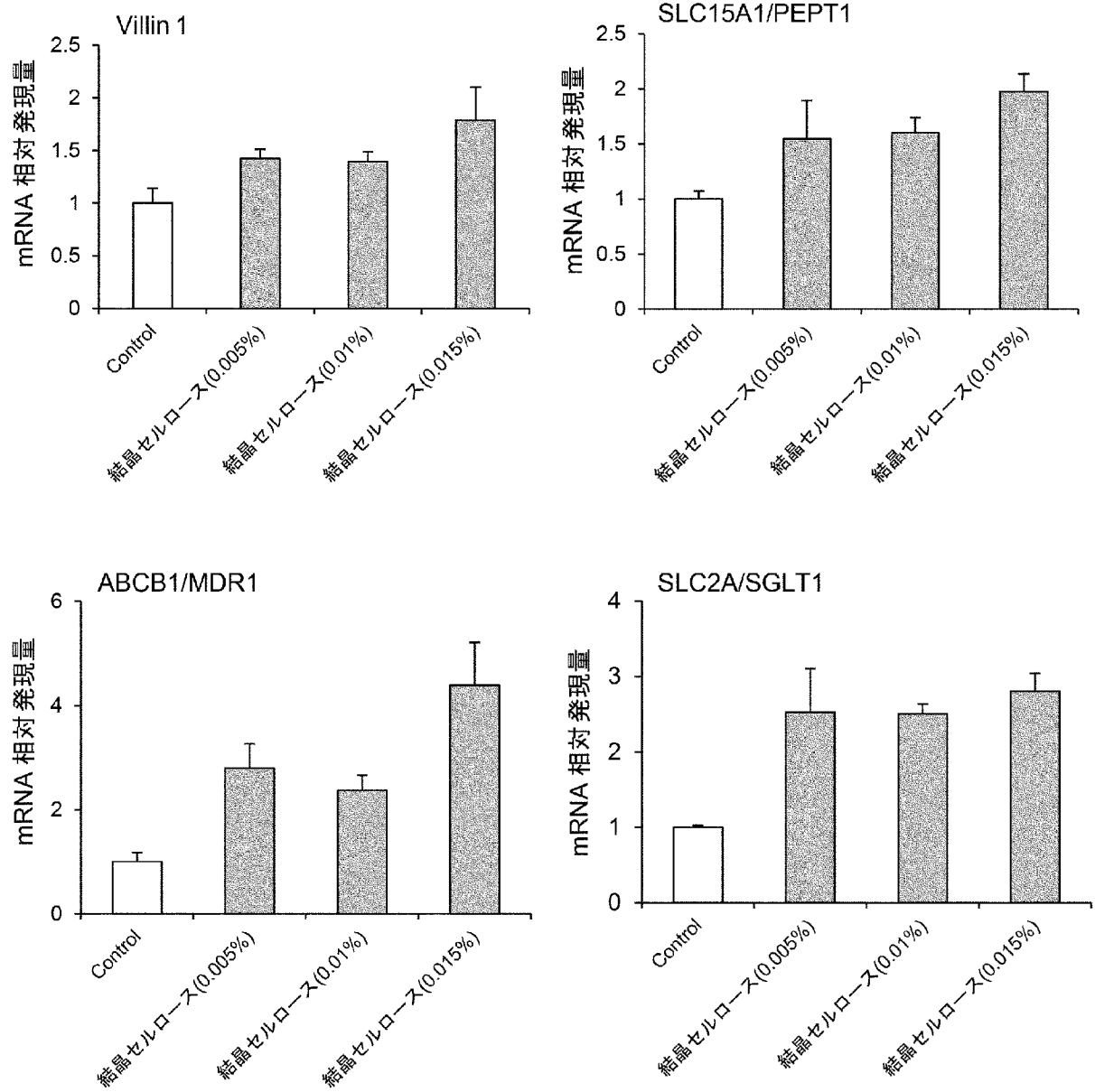
## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（１）及び（２）を含む、多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法：
- （１）多能性幹細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程；
  - （２）MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類を併用し、工程（１）で得られた腸管幹細胞様細胞を腸管上皮細胞様細胞へと分化させる工程。
- [請求項2] 工程（１）が以下の工程（１－１）及び（１－２）からなる、請求項１に記載の方法：
- （１－１）多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程；
  - （１－２）工程（１－１）で得られた内胚葉様細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程。
- [請求項3] 工程（２）における培養期間が7日間～40日間である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 工程（２）が、以下のA～Cのいずれかの培養工程を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法、
- 培養工程A：（a－１）EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養と、該培養の後に行われる、（a－２）MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む、
  - 培養工程B：（b－１）EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、（b－２）MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む、
  - 培養工程C：（c－１）EGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、（c－２）MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤及びEGFの存在下での培養と、該培養の後に行われる、（c－３）MEK1阻害剤、DNAメチル化阻害剤、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤、EGF及び難消化性多糖類の存在下での培養を含む。

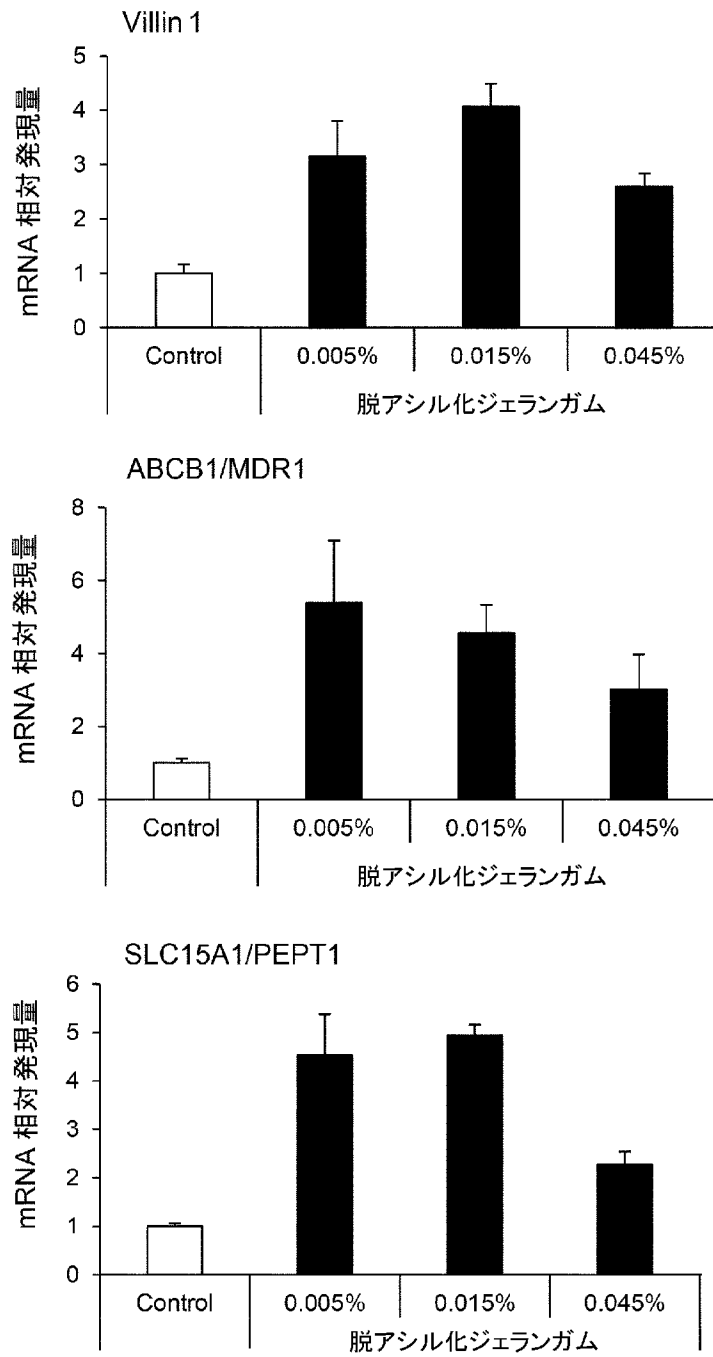
- [請求項5] (a-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(a-2)の培養の期間は4日間～29日間であり、  
(b-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(b-2)の培養の期間は4日間～29日間であり、  
(c-1)の培養の期間は2日間～10日間であり、(c-2)の培養の期間は2日間～10日間であり、(c-3)の培養の期間は4日間～25日間である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 難消化性多糖類が、結晶セルロース及び／又は脱アシル化ジェランガムである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 難消化性多糖類が、結晶セルロース及び／又は脱アシル化ジェランガムであり、(a-2)、(b-2)及び(c-3)の培養に使用する培地における難消化性多糖類の添加量が0.001%～0.1% (w/v)である、請求項4又は5に記載の方法。
- [請求項8] MEK1阻害剤がPD98059であり、DNAメチル化阻害剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンであり、TGF- $\beta$ 受容体阻害剤がA-83-01である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 工程(1-1)における分化誘導因子としてアクチビンAを用いる、請求項2～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 工程(1-2)における分化誘導因子としてFGF2又はGSK-3 $\beta$ 阻害剤を用いる、請求項2～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 請求項1～12のいずれか一項に記載の方法で得られた腸管上皮細胞様細胞。
- [請求項14] 請求項13に記載の腸管上皮細胞様細胞を用いた、被検物質の体内動態又は毒性を評価する方法。

- [請求項15] 前記体内動態が、代謝、吸収、排泄、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、又は薬物トランスポーターの誘導である、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 以下の工程(i)～(iii)を含む、請求項14又は15に記載の方法：
- (i) 請求項13に記載の腸管上皮細胞様細胞で構成された細胞層を用意する工程；
  - (ii) 前記細胞層に被検物質を接触させる工程；
  - (iii) 前記細胞層を透過した被検物質を定量し、被検物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を評価する工程。
- [請求項17] 以下の工程(i)及び(ii)を含む、請求項14又は15に記載の方法：
- (i) 請求項13に記載の腸管上皮細胞様細胞に被検物質を接触させる工程；
  - (ii) 被検物質の代謝若しくは吸収、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、又は毒性を測定・評価する工程。
- [請求項18] 請求項13に記載の腸管上皮細胞様細胞を含む、細胞製剤。

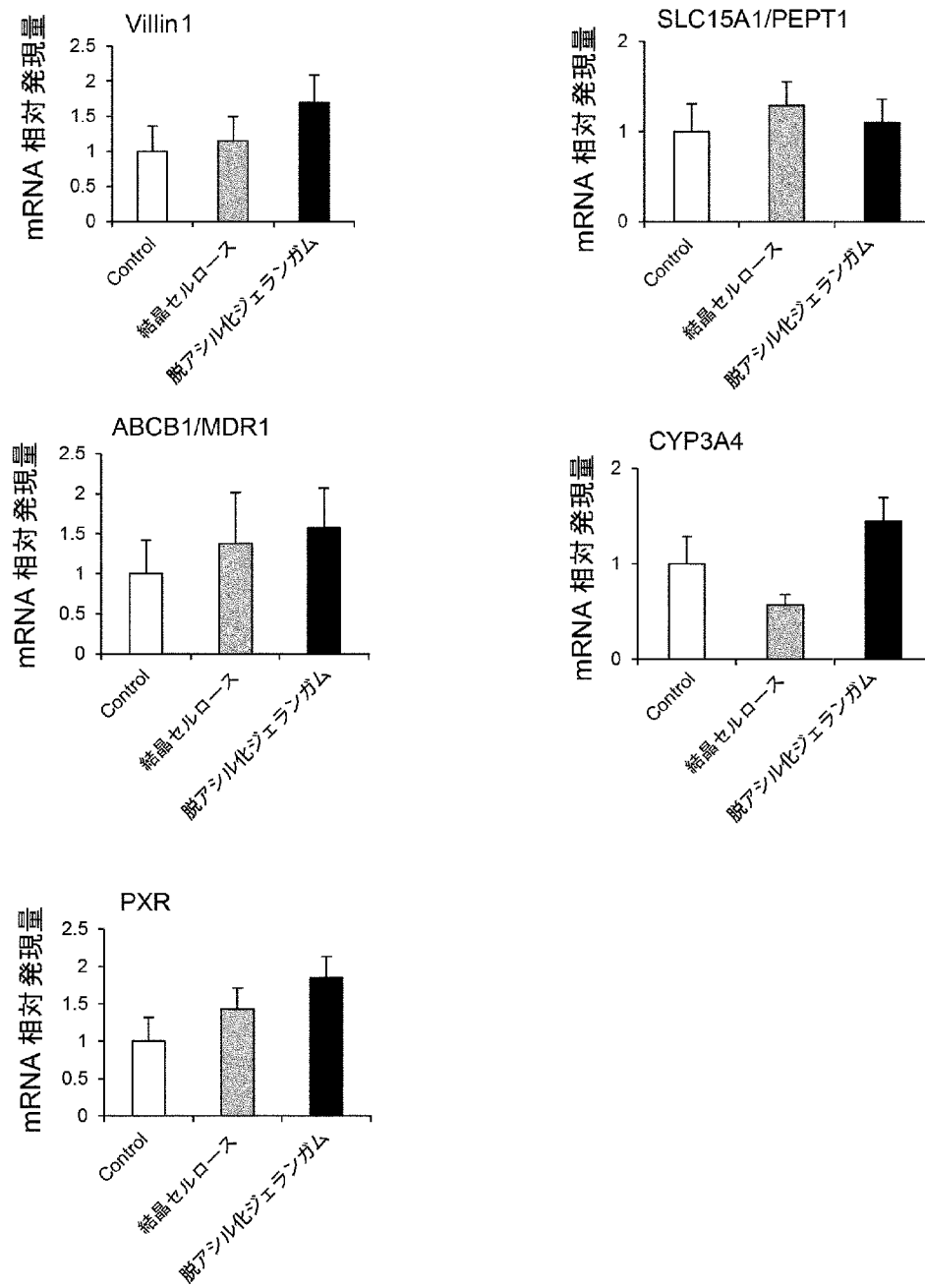
[図1-1]



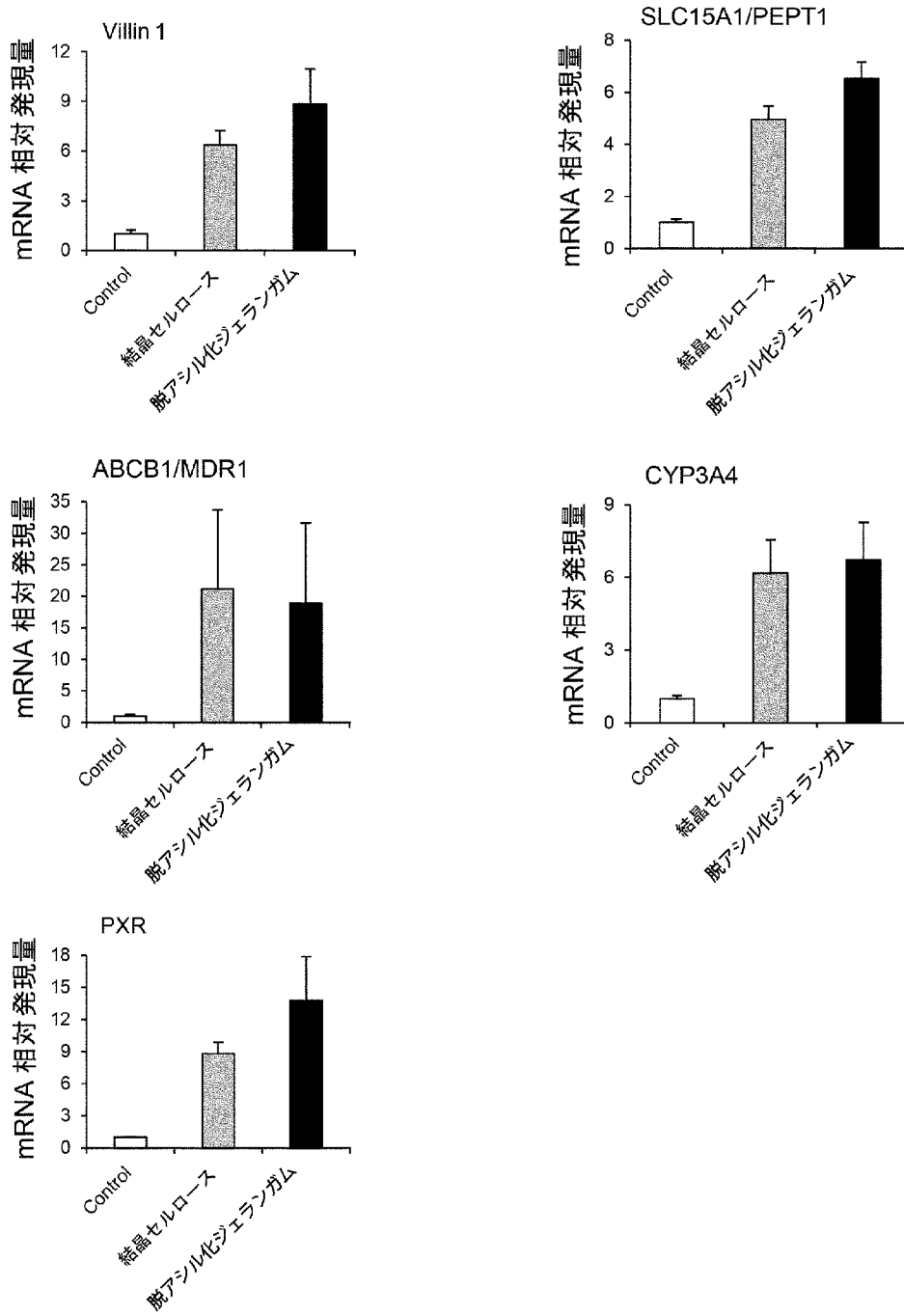
[図1-2]



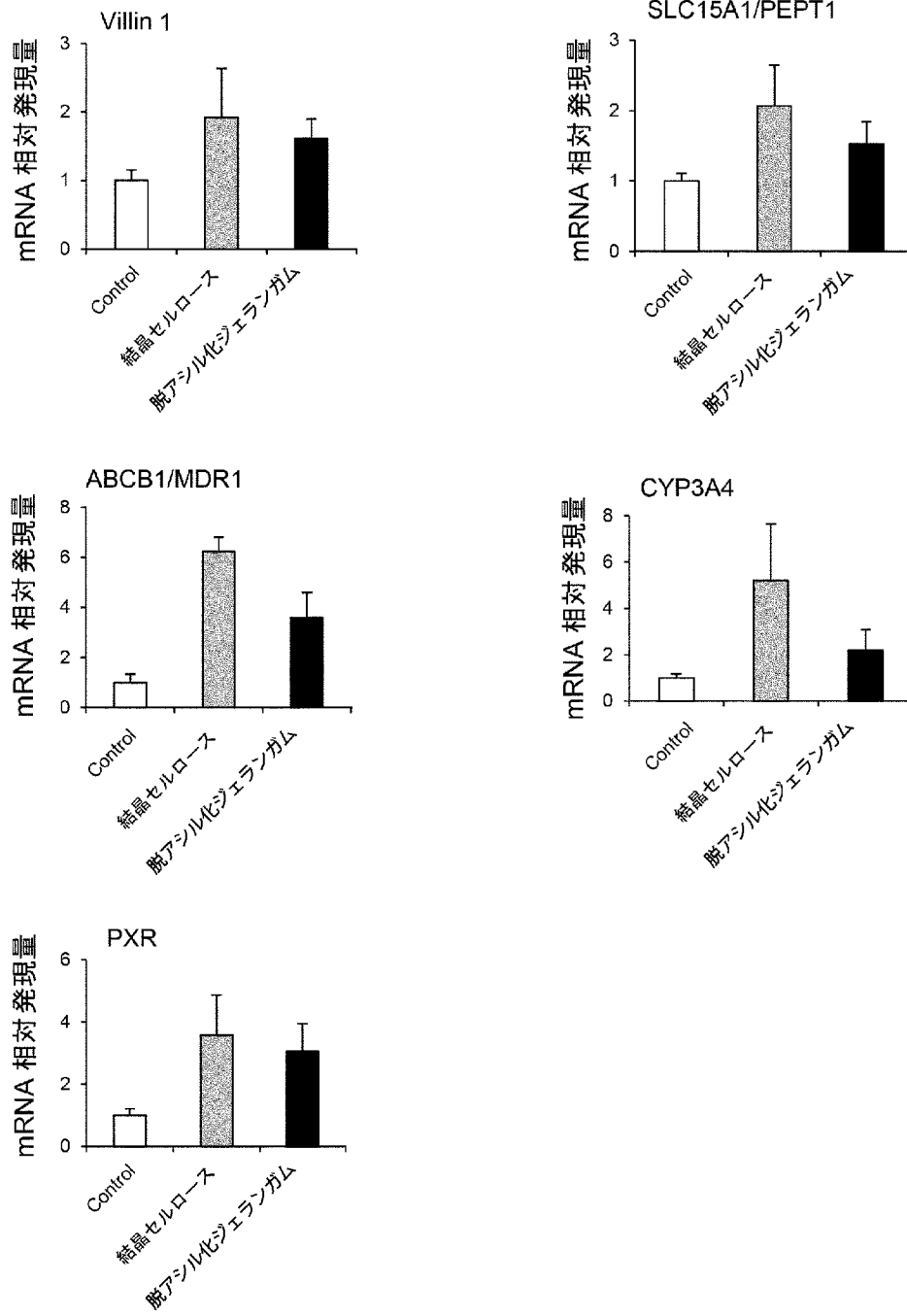
[図2]



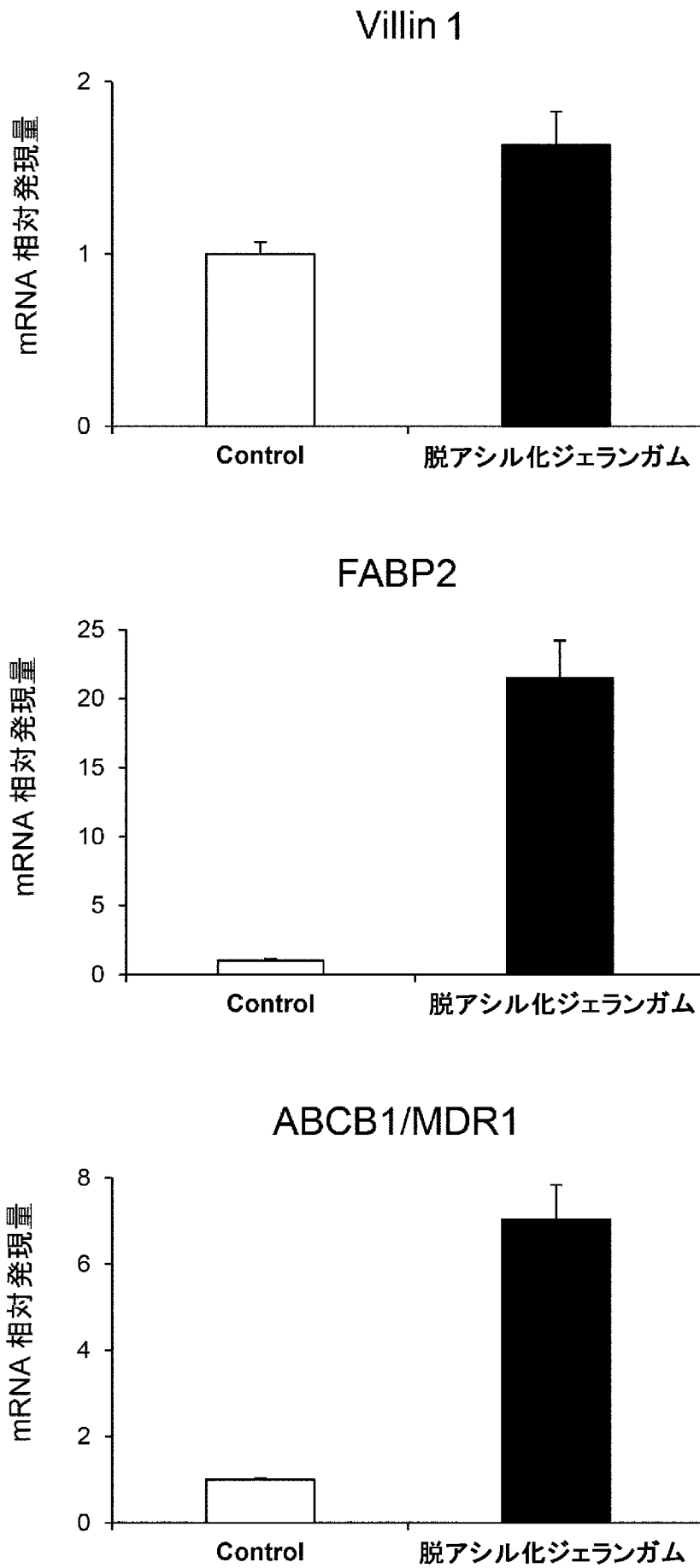
[図3]



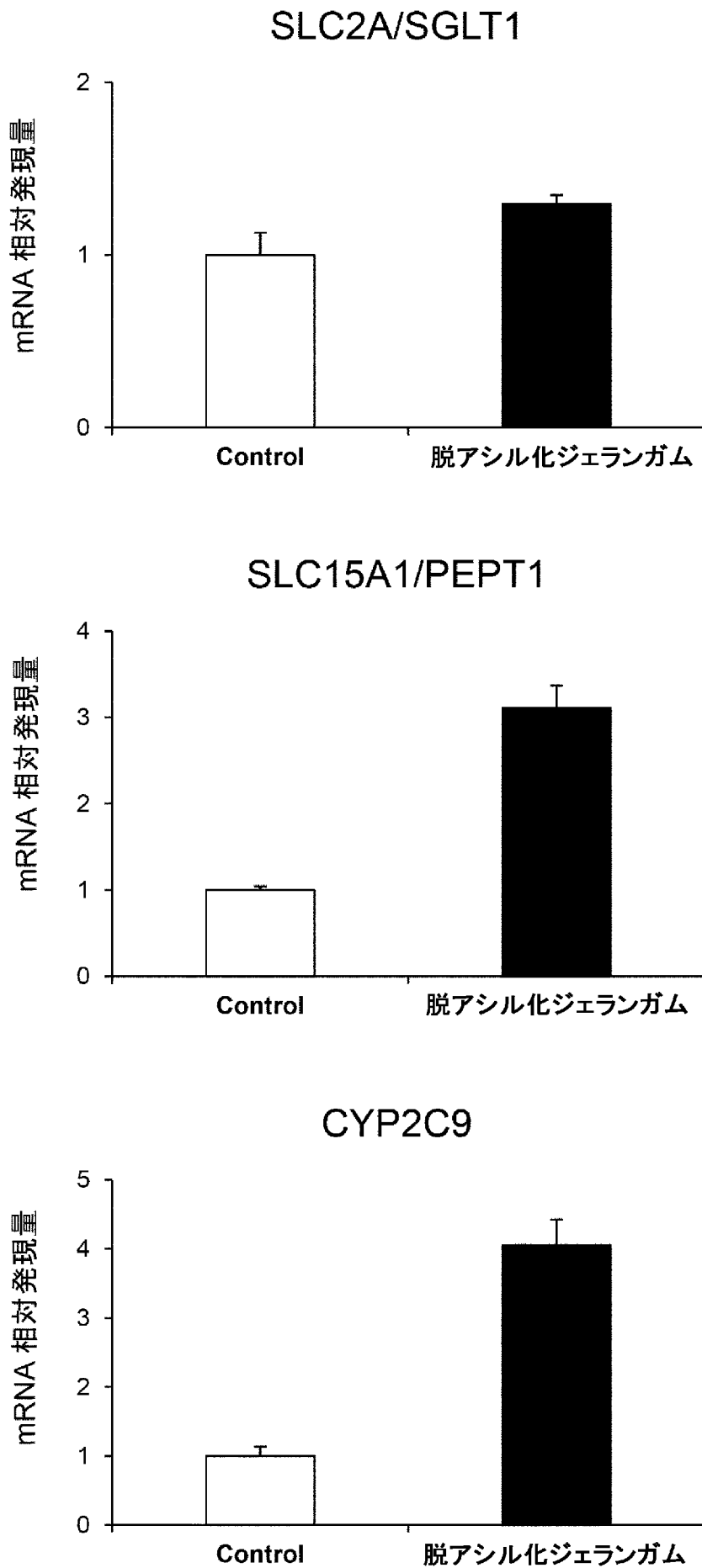
[図4]



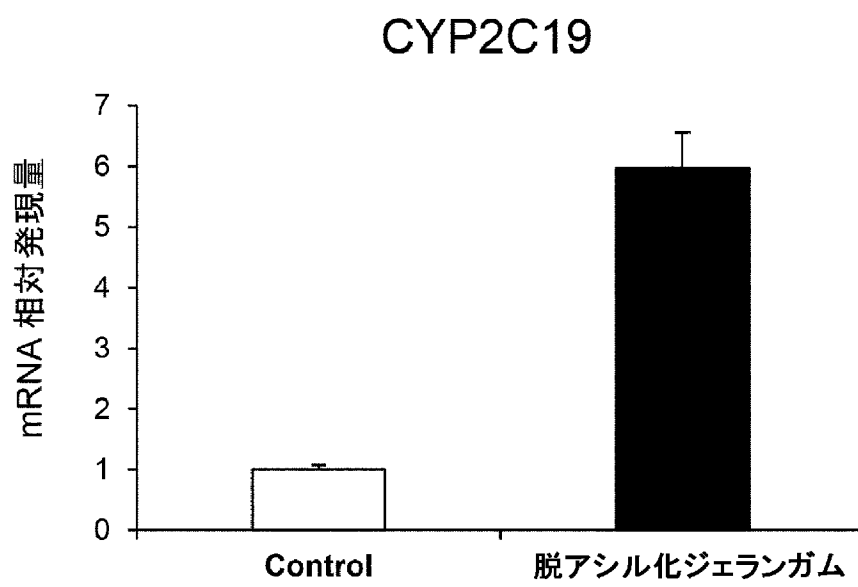
[図5-1]



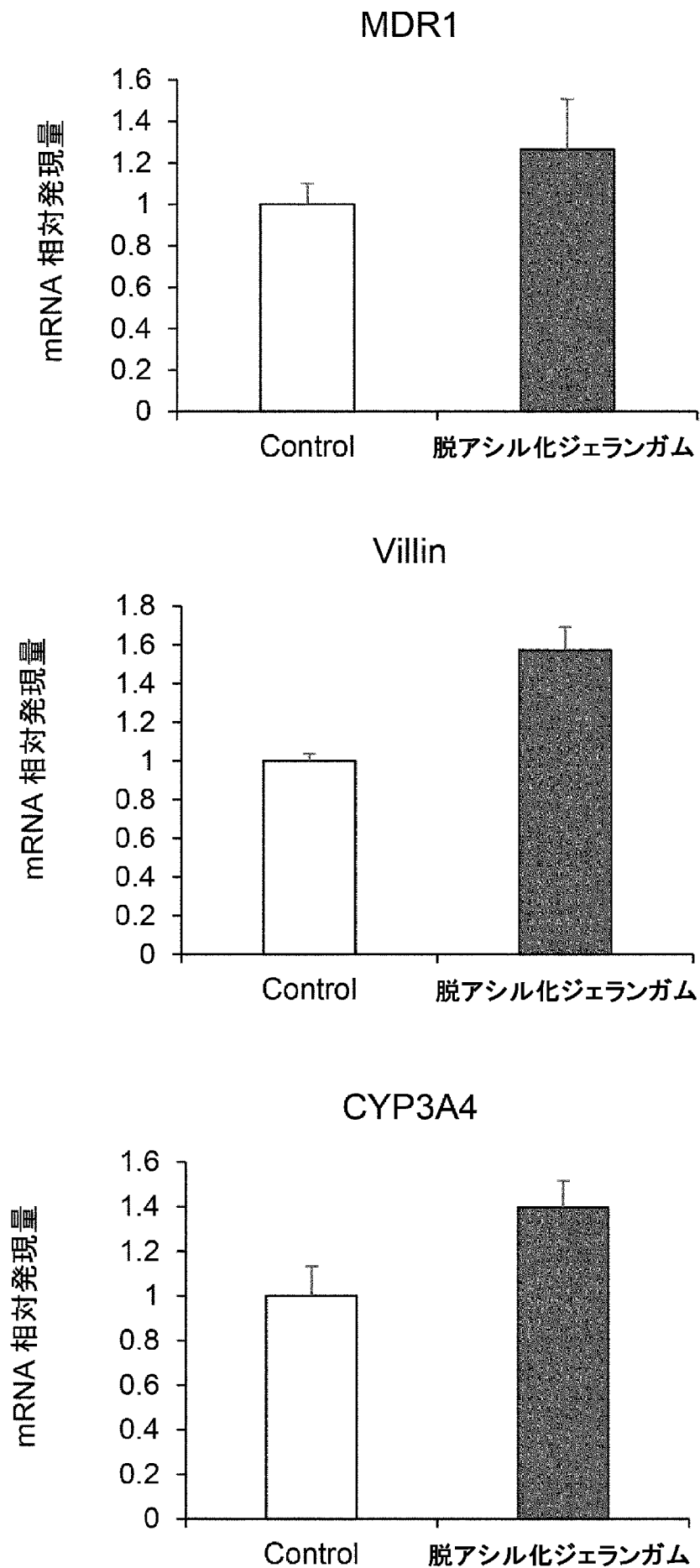
[図5-2]



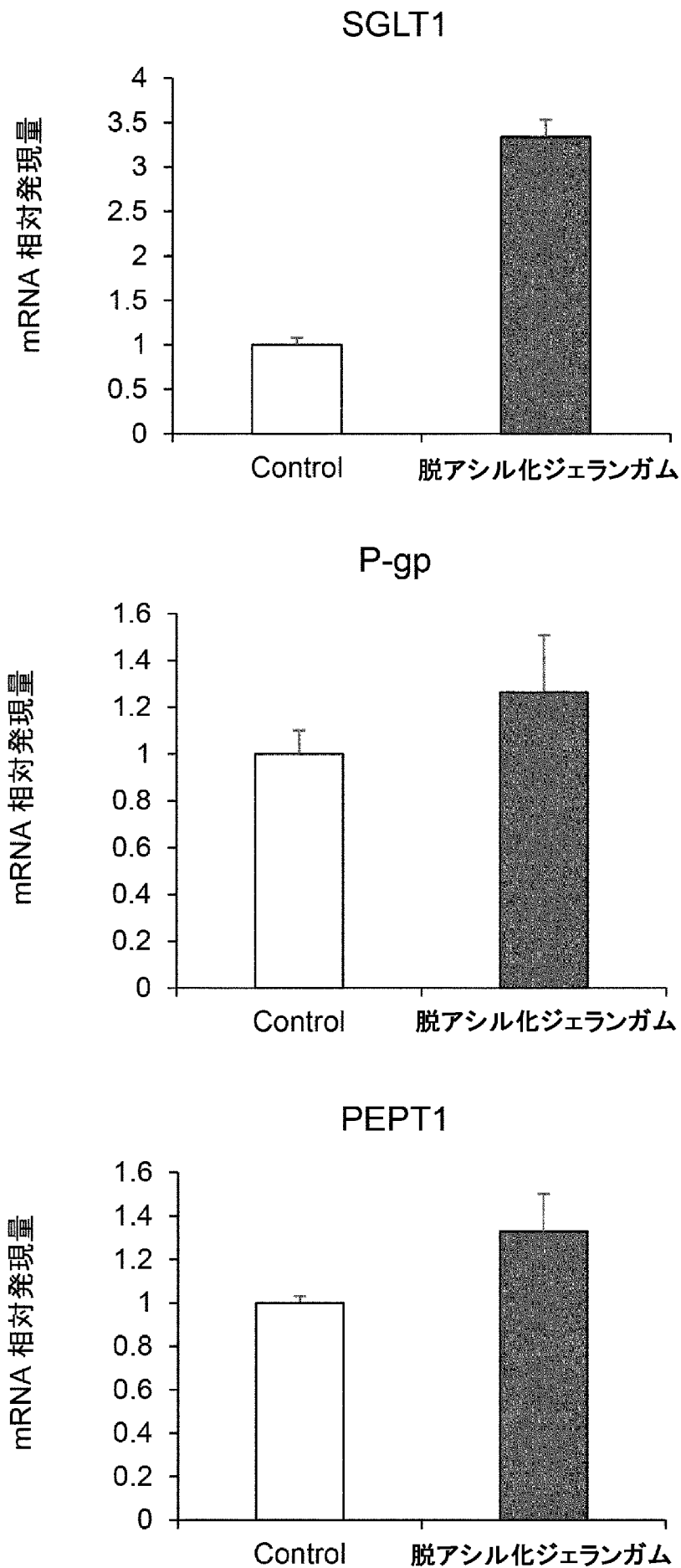
[図5-3]



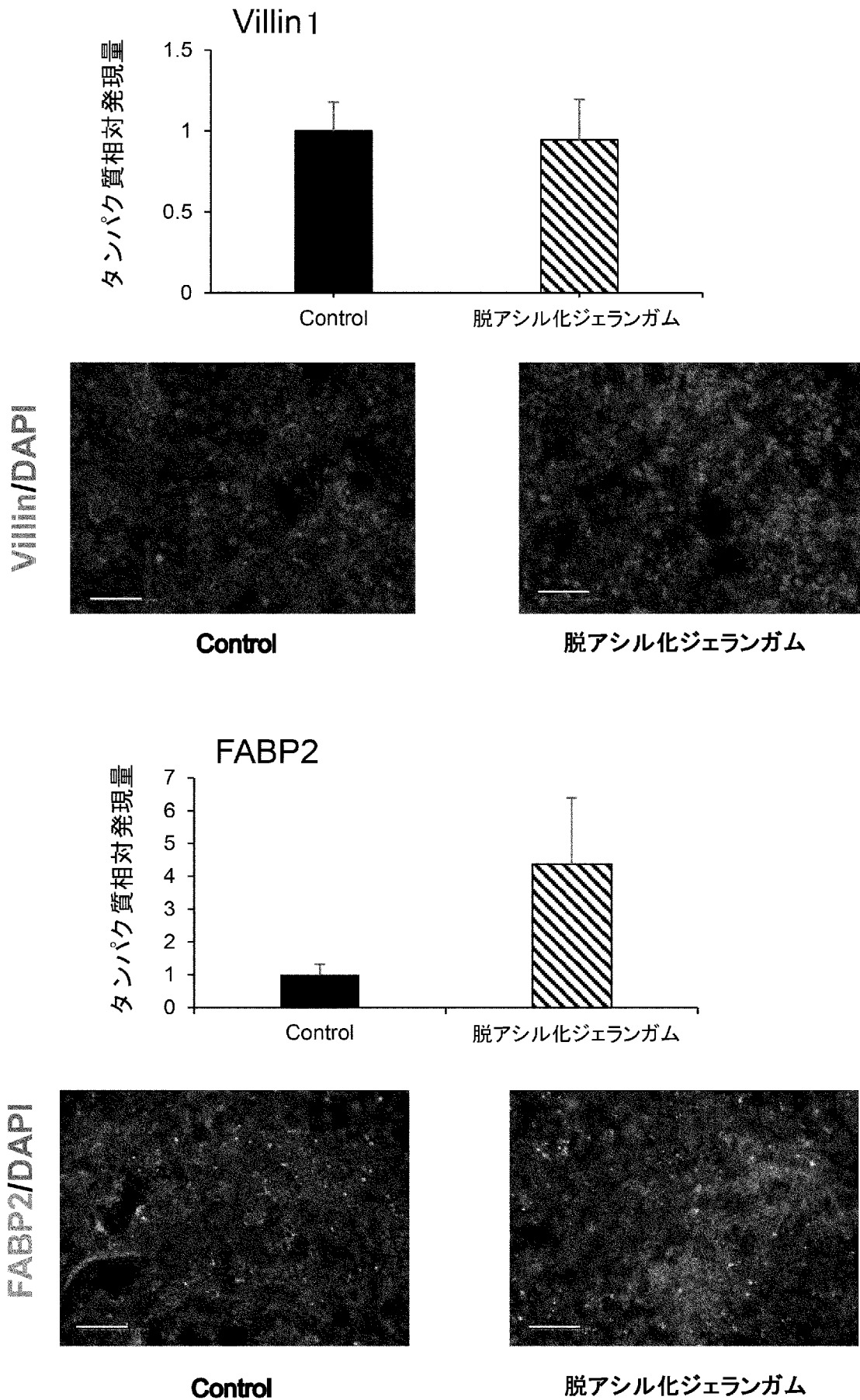
[図6-1]



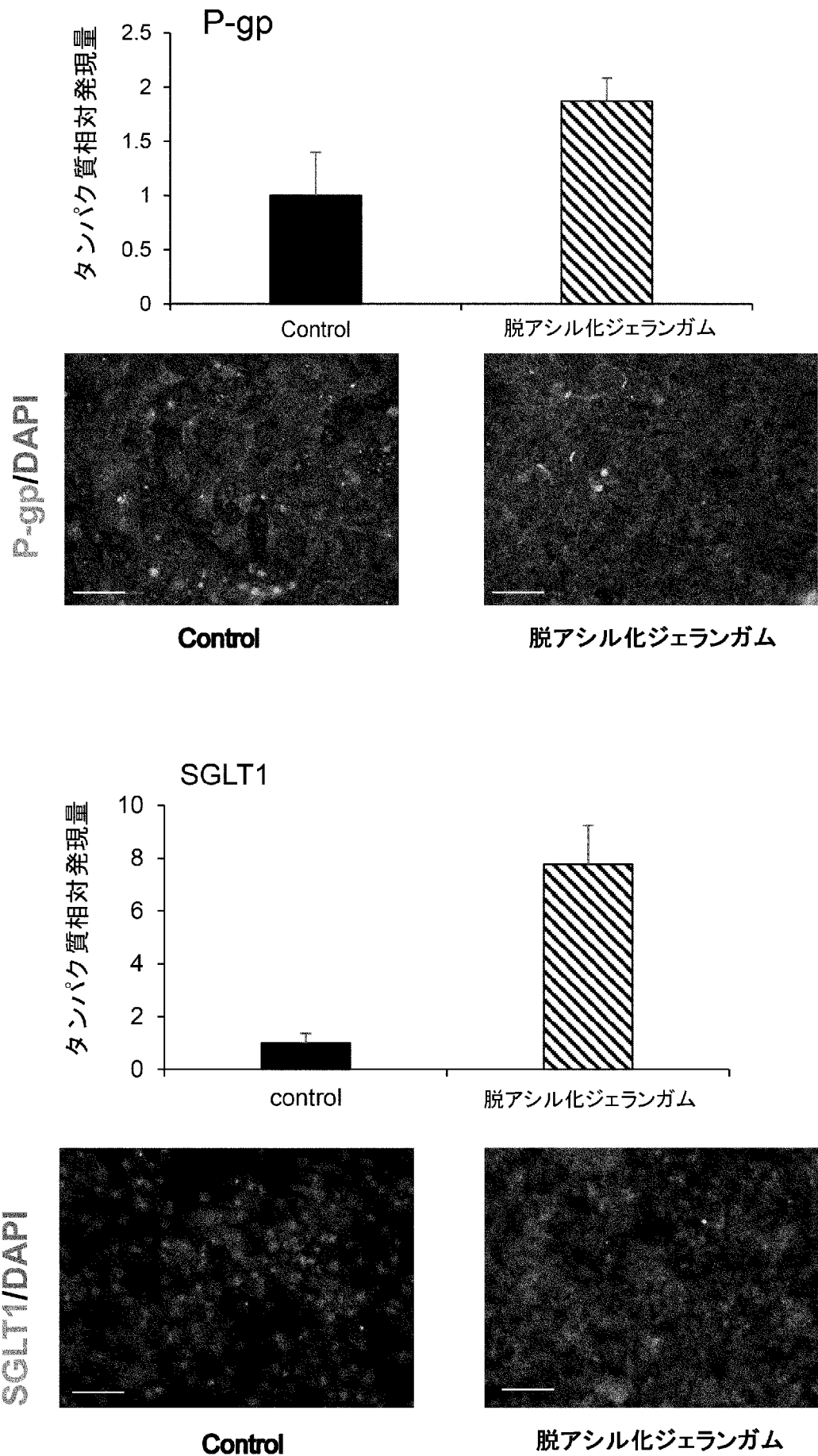
[図6-2]



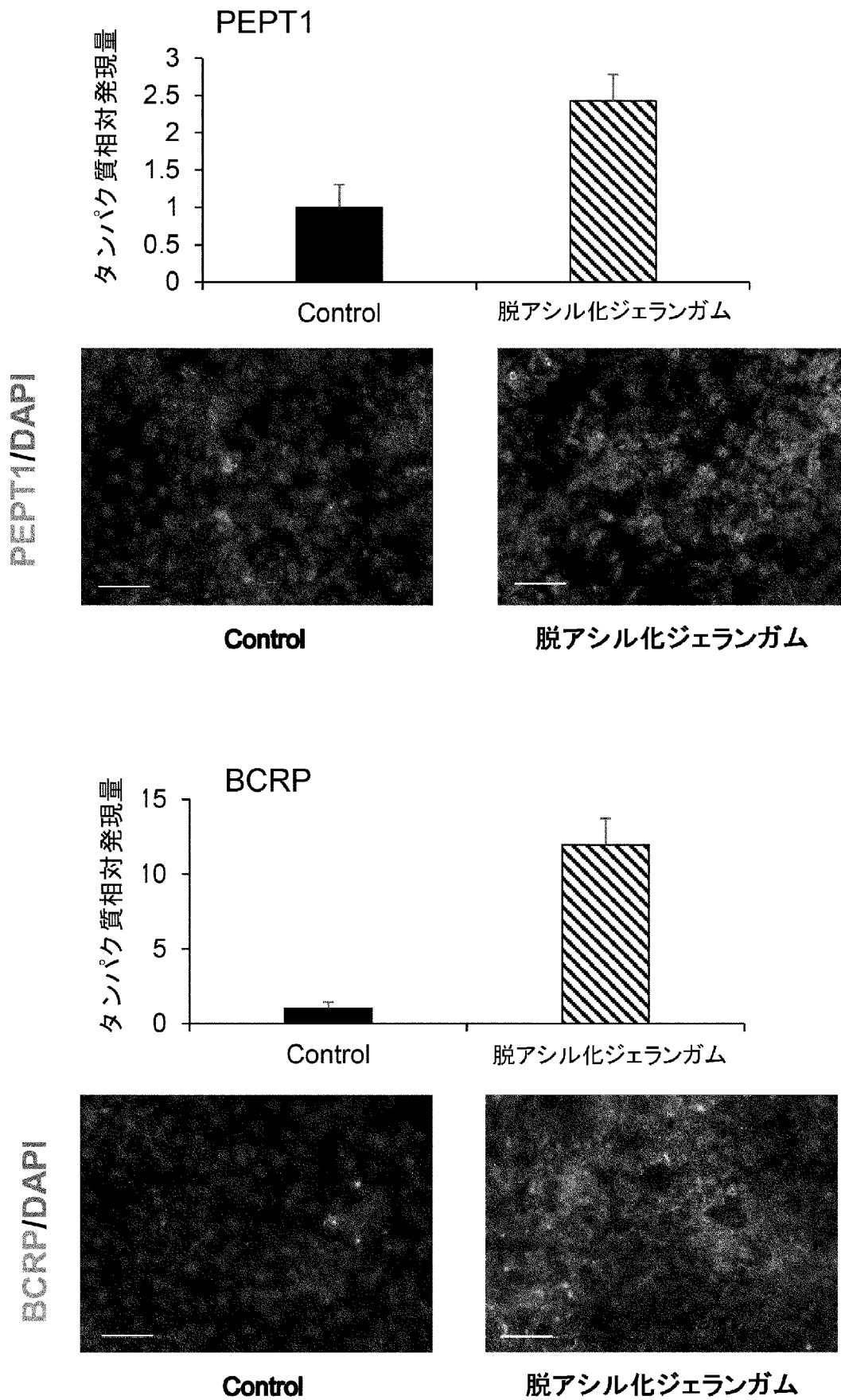
[図7-1]



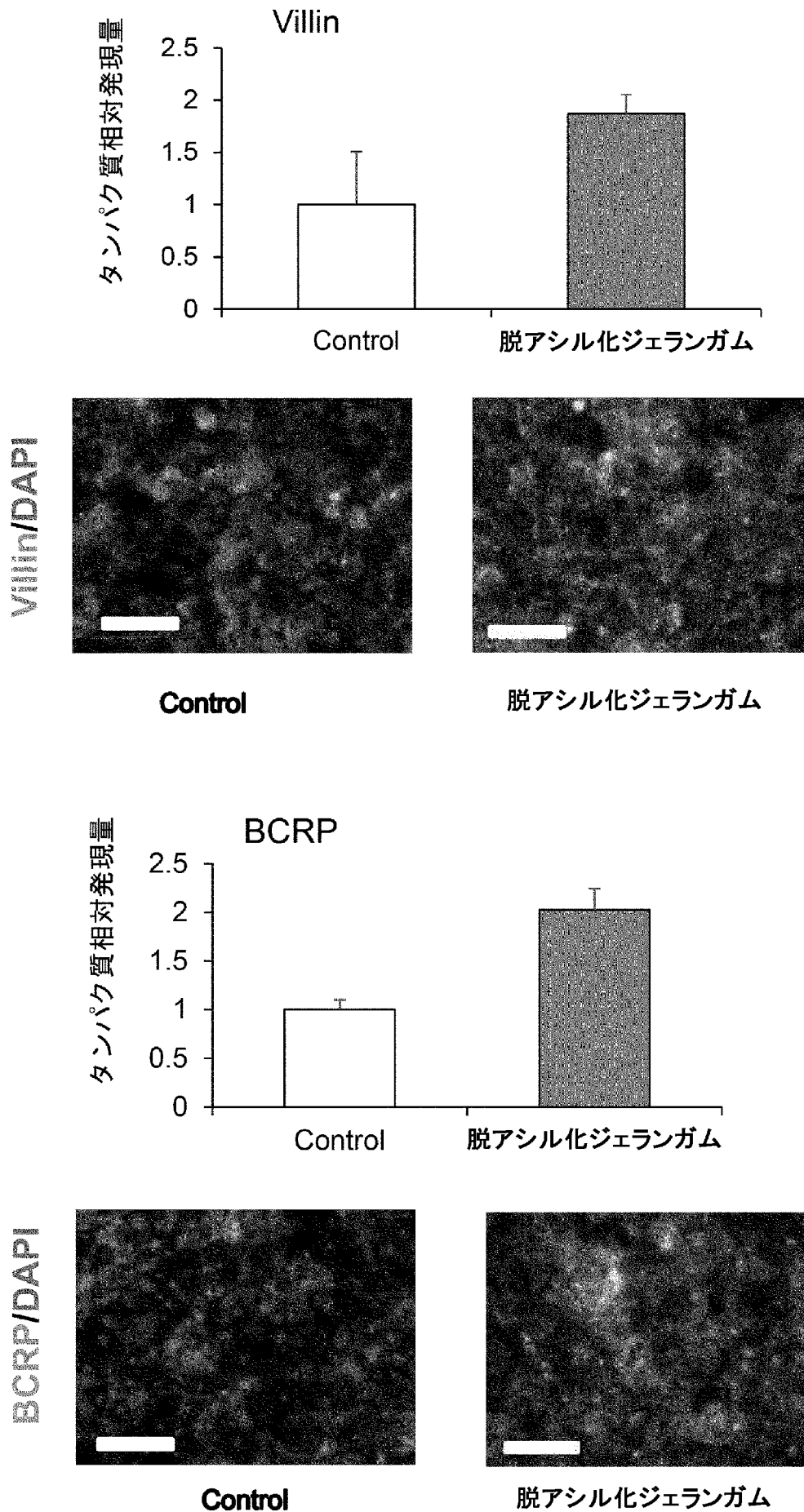
[図7-2]



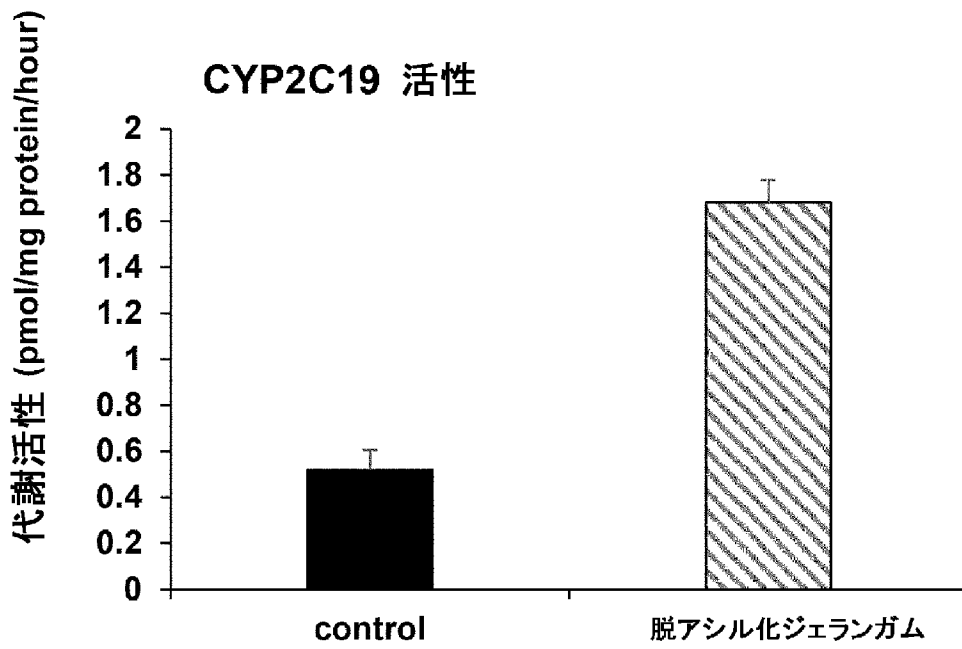
[図7-3]



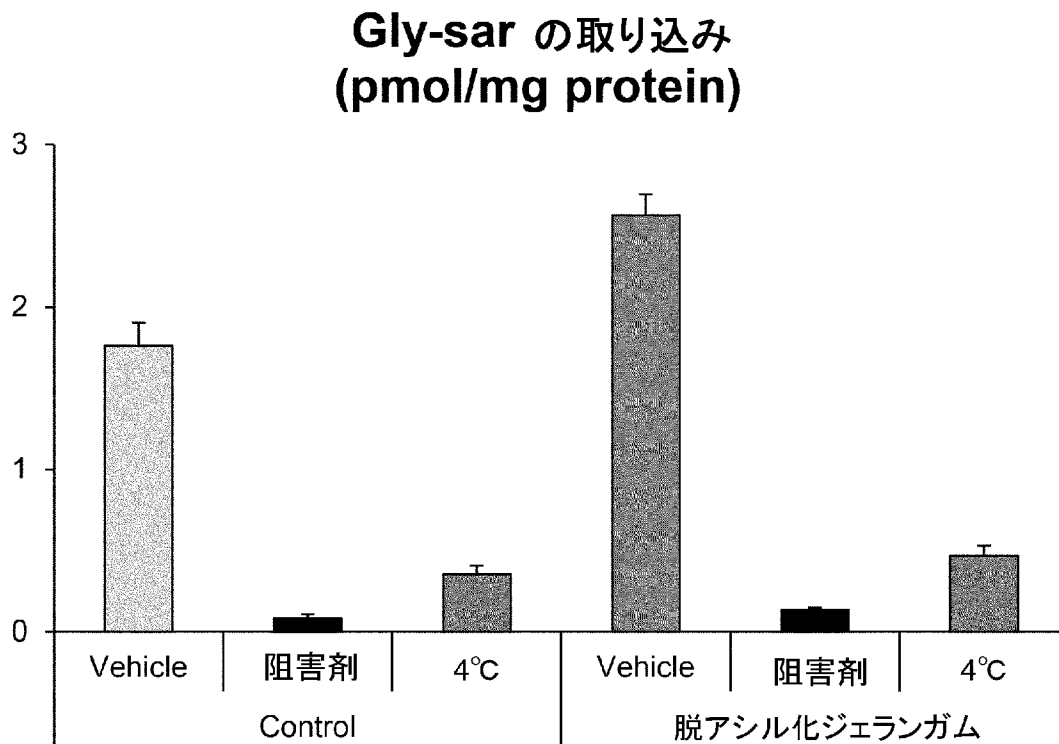
[図8]



[図9]

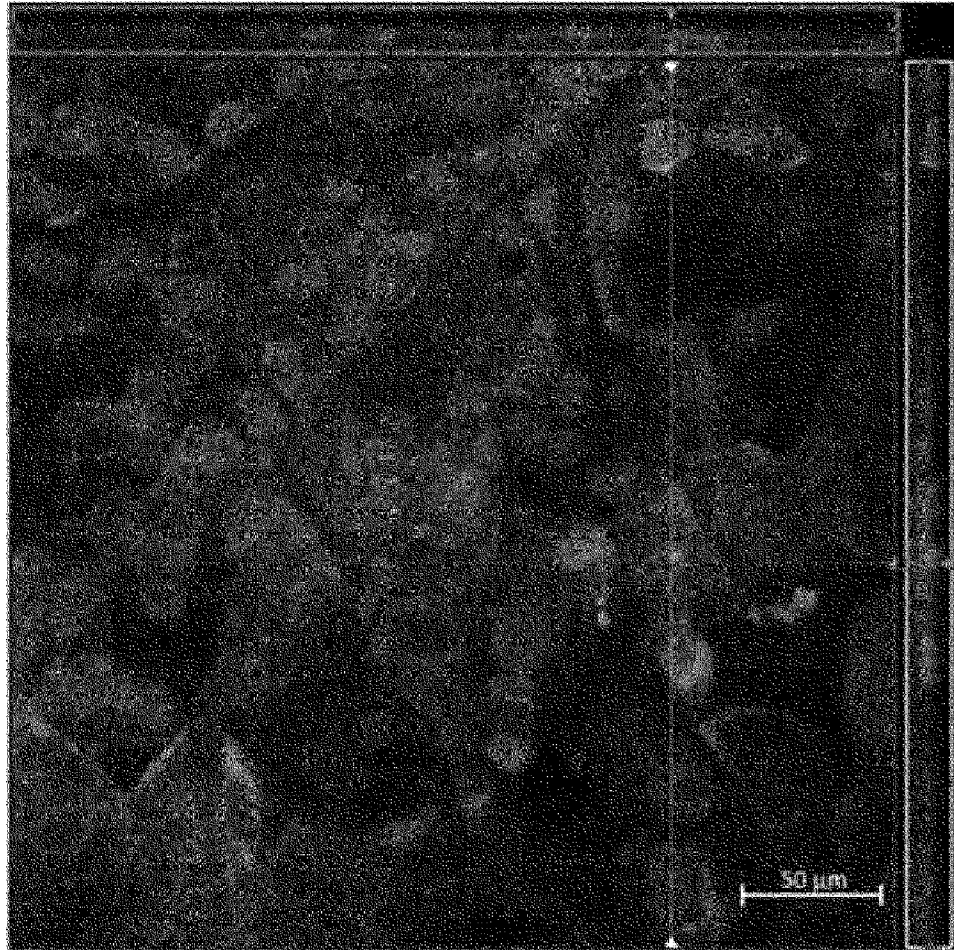


[図10]



[図11]

P-gp/DAPI



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/043213

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61P 1/00(2006.01)n; A61K 35/36(2015.01)i; A61K 35/38(2015.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i

FI: C12N5/10; C12N5/071; C12Q1/02; A61K35/36; A61K35/38; A61L27/38  
120; A61L27/50; A61P1/00

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P1/00; A61K35/36; A61K35/38; C12N5/071; C12N5/10; A61L27/38;  
A61L27/50; C12Q1/02

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/151307 A1 (NAGOYA CITY UNIVERSITY, FUJIFILM CORPORATION) 23.08.2018 (2018-08-23) claims, paragraphs [0007], [0008], examples, paragraph [0133]	13-18
Y	claims, paragraphs [0007], [0008], examples, paragraph [0133]	1-18
Y	WO 2014/017513 A1 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., KYOTO UNIVERSITY) 30.01.2014 (2014-01-30) paragraphs [0019], [0020]	1-18
Y	WO 2017/205511 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 30.11.2017 (2017-11-30) page 1, lines 14-18, fig. 6G, examples 1-2, claims	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 January 2020 (30.01.2020)

Date of mailing of the international search report  
10 February 2020 (10.02.2020)

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

Authorized officer  
  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/043213

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2018/207714 A1 (NAGOYA CITY UNIVERSITY)	1-18
P, Y	15.11.2018 (2018-11-15) claims, paragraphs [0007], [0008], examples	1-18
P, X	WO 2019/156200 A1 (NAGOYA CITY UNIVERSITY,	13-18
P, Y	FUJIFILM CORPORATION) 15.08.2019 (2019-08-15) claims, paragraphs [0007], [0008], examples	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2019/043213

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018/151307 A1	23 Aug. 2018	CA 3053893 A1 claims, paragraphs [0007], [0008], examples, paragraph [0133] KR 10-2019-0105237 A	
WO 2014/017513 A1	30 Jan. 2014	CN 110382689 A EP 2878664 A1 paragraphs [0025]-[0032] CA 2879624 A1 KR 10-2015-0038190 A	
WO 2017/205511 A1	30 Nov. 2017	CN 104640974 A JP 2019-516384 A paragraph [0003], fig. 6G, examples 1-2, claims US 2019/0211310 A1 EP 3485001 A1 CA 3025344 A1 AU 2017269364 A	
WO 2018/207714 A1	15 Nov. 2018	(Family: none)	
WO 2019/156200 A1	15 Aug. 2019	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  A61P 1/00(2006.01)n; A61K 35/36(2015.01)i; A61K 35/38(2015.01)i; C12N 5/071(2010.01)i;                  C12N 5/10(2006.01)i; A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i                  FI: C12N5/10; C12N5/071; C12Q1/02; A61K35/36; A61K35/38; A61L27/38 120; A61L27/50; A61P1/00</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  A61P1/00; A61K35/36; A61K35/38; C12N5/071; C12N5/10; A61L27/38; A61L27/50; C12Q1/02</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS/WPIDS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	WO 2018/151307 A1 (公立大学法人名古屋市立大学、富士フィルム株式会社) 23.08.2018 (2018 - 08 - 23) 特許請求の範囲、 [0007]、 [0008]、 実施例、 [0133]	13-18								
Y	特許請求の範囲、 [0007]、 [0008]、 実施例、 [0133]	1-18								
Y	WO 2014/017513 A1 (日産化学工業株式会社、国立大学法人京都大学) 30.01.2014 (2014 - 01 - 30) [0019]、 [0020]	1-18								
Y	WO 2017/205511 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 30.11.2017 (2017 - 11 - 30) 第1頁第14-18行、 Fig.6G、 Example1-2、 Claims	1-18								
P, X	WO 2018/207714 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 15.11.2018 (2018 - 11 - 15) 特許請求の範囲、 [0007]、 [0008]、 実施例	1-18								
P, Y		1-18								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
* 引用文献のカテゴリー	<p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p>									
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	<p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p>									
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	<p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p>									
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	<p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>									
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献										
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
30.01.2020	10.02.2020									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）									
日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	堂畑 厚志 4B 7880									
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	WO 2019/156200 A1 (公立大学法人名古屋市立大学、富士フイルム株式会社) 15.08.2019 (2019 - 08 - 15)	13-18
P, Y	特許請求の範囲、 [0007]、 [0008]、 実施例	1-18

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/043213

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2018/151307	A1	23.08.2018	CA 3053893 A1 Claims, [0007], [0008], Examples, [0133] KR 10-2019-0105237 A CN 110382689 A	
WO	2014/017513	A1	30.01.2014	EP 2878664 A1 [0025]-[0032] CA 2879624 A1 KR 10-2015-0038190 A CN 104640974 A	
WO	2017/205511	A1	30.11.2017	JP 2019-516384 A [0003], 図 6 G、実施例 1 - 2、特許請求の範囲 US 2019/0211310 A1 EP 3485001 A1 CA 3025344 A1 AU 2017269364 A	
WO	2018/207714	A1	15.11.2018	(ファミリーなし)	
WO	2019/156200	A1	15.08.2019	(ファミリーなし)	