

(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
2024年2月1日(01.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/024955 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/0793 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/027801

(22) 国際出願日: 2023年7月28日(28.07.2023)

(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 2022-121608 2022年7月29日(29.07.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)

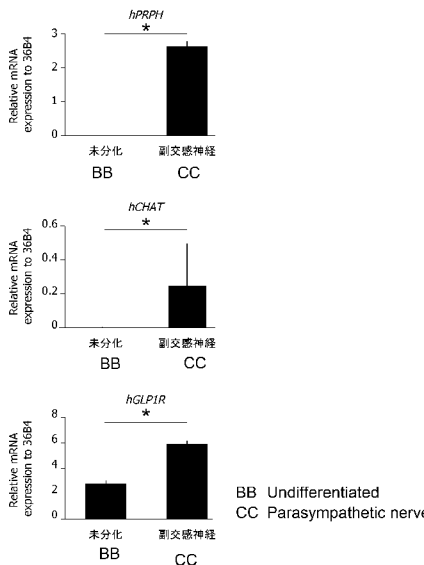
[JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). アサヒグループホールディングス株式会社(ASAHI GROUP HOLDINGS, LTD.) [JP/JP]; 〒1308602 東京都墨田区吾妻橋 1-23-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 木田 泰之(KIDA, Yasuyuki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). ▲高▼山 祐三(TAKAYAMA, Yuzo); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 二宮 赤木 祐香(NIMIYA AKAGI, Yuka); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 山下 梓(YAMASHITA, Azusa);

(54) Title: VAGUS-NERVE-LIKE PARASYMPATHETIC NERVE CELL, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 迷走神経様副交感神経細胞およびその作製方法

[図9]



(57) Abstract: Provided is a method for producing a vagus-nerve-like parasympathetic nerve cell, the method comprising (a) a step for inducing the differentiation of a pluripotent stem cell into a parasympathetic nerve cell, and (b1) a step for introducing an exogenous nucleic acid encoding a gastrointestinal hormone receptor into the pluripotent stem cell prior to the step (a) or (b2) a step for introducing an exogenous nucleic acid encoding a gastrointestinal hormone receptor into the parasympathetic nerve cell produced by the step (a) or a progenitor cell thereof. Also provided is a brain-gut

〒3020106 茨城県守谷市緑 1-1-2 1 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社 解析科学研究所内 Ibaraki (JP). 吉門理紗(YOSHIKADO, Risa); 〒3020106 茨城県守谷市緑 1-1-2 1 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社 解析科学研究所内 Ibaraki (JP). 宮本 靖久(MIYAMOTO, Yasuhisa); 〒3020106 茨城県守谷市緑 1-1-2 1 アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社 解析科学研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 1 7 番 7 号 赤坂溜池タワー 1 1 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

interaction model comprising a vagus-nerve-like parasympathetic nerve cell produced by the aforementioned method and a gastrointestinal hormone secreting cell.

(57) 要約: (a) 多能性幹細胞の副交感神経細胞への分化を誘導するステップ、および (b 1) 前記ステップ (a) の前に、前記多能性幹細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップ、または (b 2) 前記ステップ (a) により得られた副交感神経細胞またはその前駆細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップを含む、迷走神経様副交感神経細胞を作製する方法を提供する。また、前記方法により作製された迷走神経様副交感神経細胞と消化管ホルモン分泌細胞とを含んでなる、脳腸相関モデルを提供する。

明 細 書

発明の名称：迷走神経様副交感神経細胞およびその作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、迷走神経様副交感神経細胞およびその作製方法に関する。

背景技術

[0002] 脳と腸は相互作用していることが知られており、これらの双方向的な関係は「脳腸相関」または「脳腸軸」と呼ばれる。腸においては、消化管上皮に存在する胃腸内分泌細胞が栄養素を感知すると、消化管ホルモンを分泌する。消化管ホルモンが求心性迷走神経に作用すると、中枢神経系へとシグナルが伝達される。中枢神経系からは、遠心性迷走神経路により、消化管の蠕動、消化液や消化管ホルモンの分泌が調節される。

[0003] 従来、脳腸相関の研究では、ヒト以外の動物を使用した試験、例えば、迷走神経束を切断したマウスを用いた試験や、解剖により単離された臓器の解析などが行われてきた。しかし、近年では、動物福祉・愛護などの倫理上の観点から、動物を用いない代替試験系が強く望まれている。また、動物種差を考慮し、ヒトに近い試験系が求められている。脳腸相関の研究においても、インビトロ試験系の開発が求められている。しかし、消化管迷走神経細胞の培養方法や、ヒト多能性幹細胞から消化管迷走神経細胞を作製する方法は、今までに報告されていない。

[0004] 本発明者らは、ヒト多能性幹細胞から自律神経を効率的に誘導する方法およびヒト多能性幹細胞から副交感神経細胞を選択的に誘導する方法をすでに報告した（特許文献1および2）。しかし、上記方法により作製した副交感神経細胞は、消化管迷走神経の指標となる消化管ホルモン受容体を内在的に発現していないまたは低発現である。一方、マウスなどの解析により、生体内には消化管ホルモン受容体の発現様式が異なる10を超える消化管迷走神経細胞型が存在することが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6593811号

特許文献2：特許第6942398号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、消化管ホルモン受容体を恒常的に発現し、かつ、消化管ホルモン応答性を有する、脳腸関連のインビトロ試験系に使用できる迷走神経様副交感神経細胞を提供することを目的としてなされたものである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意研究の結果、グルカゴン様ペプチド1受容体、ニューロペプチドY2型受容体、グルカゴン様ペプチド2受容体、セロトニン3受容体またはコレシストキニン1受容体を発現する迷走神経様副交感神経細胞を作出することに成功した。

[0008] すなわち、本発明は、一実施形態によれば、(a)多能性幹細胞の副交感神経細胞への分化を誘導するステップ、および(b1)前記ステップ(a)の前に、前記多能性幹細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップ、または(b2)前記ステップ(a)により得られた副交感神経細胞またはその前駆細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップを含む、迷走神経様副交感神経細胞を作製する方法を提供するものである。

[0009] また、本発明は、一実施形態によれば、上記方法により作製された、迷走神経様副交感神経細胞を提供するものである。

[0010] また、本発明は、一実施形態によれば、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる多能性幹細胞を提供するものである。

[0011] また、本発明は、一実施形態によれば、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる迷走神経様副交感神経細胞を提供するものである。

[0012] また、本発明は、一実施形態によれば、（１）上記迷走神経様副交感神経細胞に試料を接触させるステップ、および、（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、試料中の消化管ホルモン受容体アゴニストを検出する方法を提供するものである。

[0013] 上記消化管ホルモン受容体は、グルカゴン様ペプチド１受容体、ニューロペプチドＹ２型受容体、グルカゴン様ペプチド２受容体、セロトニン３受容体およびコレシストキニン１受容体からなる群から選択されることが好ましい。

[0014] また、本発明は、一実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で上記迷走神経様副交感神経細胞を培養するステップ、および、（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法を提供するものである。

[0015] また、本発明は、一実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞を培養するステップ、（２）前記ステップ（１）により得られた培養物から培養上清を回収するステップ、（３）上記迷走神経様副交感神経細胞に前記培養上清を接触させるステップ、および、（４）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法を提供するものである。

[0016] また、本発明は、一実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞と上記迷走神経様副交感神経細胞とを共培養するステップ、および（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法を提供するものである。

[0017] また、本発明は、一実施形態によれば、消化管ホルモン分泌細胞と上記迷走神経様副交感神経細胞との共培養を含んでなる、脳腸相関モデルを提供するものである。

[0018] 上記消化管ホルモン分泌細胞は、腸内分泌細胞であることが好ましい。

[0019] また、本発明は、一実施形態によれば、脳腸相関を制御する物質のスクリ

ーニングのための、上記迷走神経様副交感神経細胞または上記脳腸関連モデルの使用を提供するものである。

発明の効果

[0020] 本発明に係る方法によれば、脳腸関連のインビトロ試験系に使用できる迷走神経様副交感神経細胞を、高効率かつ安価に作製することができる。また、本発明に係る迷走神経様副交感神経細胞は、消化管迷走神経求心路の消化管ホルモン応答を模倣することができる。そのため、本発明に係る迷走神経様副交感神経細胞は、例えば、脳腸関連のインビトロ試験系の開発、消化管ホルモン受容体に対するアゴニストの検出または新規アゴニストの探索、消化管内分泌細胞からの消化管ホルモン放出の検出または消化管ホルモン放出を誘導する物質の探索のために有用である。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、野生型 i P S 細胞および外因性 h G L P 1 R 遺伝子を導入した i P S 細胞における h G L P 1 R の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図2]図2は、外因性 h G L P 1 R 遺伝子を導入した i P S 細胞の H o e c h s t 染色像（上）および抗 G L P 1 R 抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図3]図3は、h G L P 1 R 発現 i P S 細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図4]図4は、野生型 i P S 細胞および h G L P 1 R 発現 i P S 細胞における h N A N O G の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図5]図5は、未分化の h G L P 1 R 発現 i P S 細胞、および、外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導された h G L P 1 R 発現 i P S 細胞における、h P A X 6、h N C A M 1 または h S O X 1 7 の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図6]図6は、h G L P 1 R 発現 i P S 細胞の染色体を G 分染法により解析した結果を示す図である。

[図7]図7は、h G L P 1 R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 0 日目の E B

および誘導 13 日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図8]図 8 は、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 13 日目の細胞における hNANOG、hSOX10 および hPHOX2B の mRNA の発現量を示すグラフである。

[図9]図 9 は、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 40 日目の細胞における hPRPH、hCHAT および hGLP1R の mRNA の発現量を示すグラフである。

[図10]図 10 は、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 45 日目の細胞の Hoechst 染色像（上）、抗 GLP1R 抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗 GLP1R 抗体 + 抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図11]図 11 は、GLP1 を添加したまたは添加しない条件下での、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 27 日目の細胞の細胞外電位ヒートマップを示す図である。

[図12]図 12 は、GLP1 を添加したまたは添加しない条件下での、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 27 日目の細胞の発火頻度の変化率を示すグラフである。

[図13]図 13 は、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 40 日目の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）GLP1 添加（測定開始から 125 秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3 つの細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity ($\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図14]図 14 は、GLP1 を添加したまたは添加しない条件下での、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 40 日目の細胞の Ca^{2+} スパイクの数を示すグラフである。

[図15]図 15 は、GLP1 を添加したまたは添加しない条件下での、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された誘導 40 日目の細胞の Ca^{2+} スパイクの振幅を示すグラフである。

[図16]図16は、野生型iPS細胞および外因性hNPY2R遺伝子を導入したiPS細胞におけるhNPY2RのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図17]図17は、外因性hNPY2R遺伝子を導入したiPS細胞のHoechst染色像（上）および抗NPY2R抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図18]図18は、hNPY2R発現iPS細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図19]図19は、野生型iPS細胞およびhNPY2R発現iPS細胞におけるhNANOGのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図20]図20は、未分化のhNPY2R発現iPS細胞、および、外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたhNPY2R発現iPS細胞における、hPAX6、hNCAM1またはhSOX17のmRNAの発現量を示すグラフである。

[図21]図21は、hNPY2R発現iPS細胞の染色体をG分染法により解析した結果を示す図である。

[図22]図22は、hNPY2R発現iPS細胞から調製された誘導0日目のEBおよび誘導13日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図23]図23は、hNPY2R発現iPS細胞から調製された誘導13日目の細胞におけるhNANOG、hSOX10およびhPHOX2BのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図24]図24は、hNPY2R発現iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞におけるhPRPH、hCHATおよびhNPY2RのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図25]図25は、hNPY2R発現iPS細胞から調製された誘導45日目の細胞のHoechst染色像（上）、抗NPY2R抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗NPY2R抗体+抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図26]図26は、PYYを添加したまたは添加しない条件下での、hNPY 2 R発現 iPS細胞から調製された誘導27日目の細胞の細胞外電位ヒートマップを示す図である。

[図27]図27は、PYYを添加したまたは添加しない条件下での、hNPY 2 R発現 iPS細胞から調製された誘導27日目の細胞の発火頻度の変化率を示すグラフである。

[図28]図28は、hNPY 2 R発現 iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）PYY添加（測定開始から125秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity ($\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図29]図29は、PYYを添加したまたは添加しない条件下での、hNPY 2 R発現 iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞のCa²⁺スパイクの数を示すグラフである。

[図30]図30は、PYYを添加したまたは添加しない条件下での、hNPY 2 R発現 iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞のCa²⁺スパイクの振幅を示すグラフである。

[図31]図31は、野生型 iPS細胞および外因性hGLP 2 R遺伝子を導入した iPS細胞におけるhGLP 2 RのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図32]図32は、外因性hGLP 2 R遺伝子を導入した iPS細胞のHoechst染色像（上）および抗GLP 2 R抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図33]図33は、hGLP 2 R発現 iPS細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図34]図34は、野生型 iPS細胞およびhGLP 2 R発現 iPS細胞におけるhNANOGのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図35]図35は、未分化のhGLP 2 R発現 iPS細胞、および、外胚葉、

中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたhGLP2R発現iPS細胞における、hNES、hNCAM1またはhSOX17のmRNAの発現量を示すグラフである。

[図36]図36は、hGLP2R発現iPS細胞の染色体をG分染法により解析した結果を示す図である。

[図37]図37は、hGLP2R発現iPS細胞から調製された誘導0日目のEBおよび誘導13日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図38]図38は、hGLP2R発現iPS細胞から調製された誘導13日目の細胞におけるhNANOG、hSOX10およびhPHOX2BのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図39]図39は、hGLP2R発現iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞におけるhPRPH、hCHATおよびhGLP2RのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図40]図40は、hGLP2R発現iPS細胞から調製された誘導40日目の細胞のHoechst染色像（上）、抗GLP2R抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗GLP2R抗体+抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図41]図41は、野生型iPS細胞および外因性hHTR3A遺伝子を導入したiPS細胞におけるhHTR3AのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図42]図42は、外因性hHTR3A遺伝子を導入したiPS細胞のHoechst染色像（上）および抗HTR3A抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図43]図43は、hHTR3A発現iPS細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図44]図44は、野生型iPS細胞およびhHTR3A発現iPS細胞におけるhNANOGのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図45]図45は、未分化のhHTR3A発現iPS細胞、および、外胚葉、

中胚葉または内胚葉への分化を誘導された h H T R 3 A 発現 i P S 細胞における、h N E S、h N C A M 1 または h S O X 1 7 の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図46]図46は、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞の染色体を G 分染法により解析した結果を示す図である。

[図47]図47は、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞から調製された誘導0日目の E B および誘導13日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図48]図48は、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞から調製された誘導13日目の細胞における h N A N O G、h S O X 1 0 および h P H O X 2 B の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図49]図49は、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞から調製された誘導40日目の細胞における h P R P H、h C H A T および h H T R 3 A の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図50]図50は、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞から調製された誘導40日目の細胞の H o e c h s t 染色像（上）、抗 H T R 3 A 抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗 H T R 3 A 抗体+抗 M A P 2 抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図51]図51は、野生型 i P S 細胞および外因性 h C C K A R 遺伝子を導入した i P S 細胞における h C C K A R の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図52]図52は、外因性 h C C K A R 遺伝子を導入した i P S 細胞の H o e c h s t 染色像（上）および抗 C C K A R 抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図53]図53は、h C C K A R 発現 i P S 細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図54]図54は、野生型 i P S 細胞および h C C K A R 発現 i P S 細胞における h N A N O G の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図55]図55は、未分化の h C C K A R 発現 i P S 細胞、および、外胚葉、

中胚葉または内胚葉への分化を誘導された h C C K A R 発現 i P S 細胞における、h N E S、h N C A M 1 または h S O X 1 7 の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図56]図 5 6 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞の染色体を G 分染法により解析した結果を示す図である。

[図57]図 5 7 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 0 日目の E B および誘導 1 3 日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を示す図である。

[図58]図 5 8 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 1 3 日目の細胞における h N A N O G、h S O X 1 0 および h P H O X 2 B の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図59]図 5 9 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 4 0 日目の細胞における h P R P H、h C H A T および h C C K A R の m R N A の発現量を示すグラフである。

[図60]図 6 0 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 4 0 日目の細胞の H o e c h s t 染色像（上）、抗 C C K A R 抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗 C C K A R 抗体 + 抗 M A P 2 抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図61]図 6 1 は、C C K - 3 3 を添加したまたは添加しない条件下での、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 2 7 日目の細胞の細胞外電位ヒートマップを示す図である。

[図62]図 6 2 は、C C K - 3 3 を添加したまたは添加しない条件下での、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 2 7 日目の細胞の発火頻度の変化率を示すグラフである。

[図63]図 6 3 は、h C C K A R 発現 i P S 細胞から調製された誘導 4 0 日目の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）C C K - 3 3 添加（測定開始から 2 0 0 秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3 つの細胞（c e l l 1 ~ 3）の蛍光強度（I n t e n s i t y（ $\Delta F / F_0$ ））の経時的変化。

[図64]図64は、CCK-33を添加したまたは添加しない条件下での、hCCKAR発現iPS細胞から調製された誘導34日目の細胞のカルシウムイメージングにおける蛍光強度の変化率を示すグラフである。

[図65]図65は、hGLP1R遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）のHoechst染色像（上）、抗ChAT抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗GLP1R抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図66]図66は、hGLP1Rを分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導30日目）の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）GLP1添加（測定開始から125秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1~3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図67]図67は、hNPY2R遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）のHoechst染色像（上）、抗ChAT抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗NPY2R抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図68]図68は、hNPY2Rを分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導45日目）の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）PPY添加（測定開始から125秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1~3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図69]図69は、hGLP2R遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）におけるhPRPH、hCHATおよびhGLP2RのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図70]図70は、hGLP2R遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）のHoechst染色像（上）、抗GLP2R抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図71]図71は、hGLP2Rを分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）の細胞のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）GLP2添加（測定開始から240秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図72]図72は、GLP2を添加したまたは添加しない条件下での、hGLP2R遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図73]図73は、hHTR3A遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）におけるhPRPH、hCHATおよびhHTR3AのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図74]図74は、hHTR3A遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）のHoechst染色像（上）、抗HTR3A抗体を用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図75]図75は、hHTR3Aを分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）5-HT添加（測定開始から240秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図76]図76は、5-HTを添加したまたは添加しない条件下での、hHTR3A遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図77]図77は、hCCKAR遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）におけるhPRPH、hCHATおよびhCCKARのmRNAの発現量を示すグラフである。

[図78]図78は、hCCKAR遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導40日目）のHoechst染色像（上）、抗CCKAR抗体を

用いた蛍光免疫染色像（中央）および抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（下）を示す図である。

[図79]図79は、hCCKARを分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）CCK-33添加（測定開始から240秒時点）直後の細胞の蛍光像、および（下）3つの細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図80]図80は、CCK-33を添加したまたは添加しない条件下での、hCCKAR遺伝子を分化後に強制発現させた副交感神経細胞（誘導37日目）の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図81]図81は、hGLP1R発現副交感神経細胞およびNCI-H716細胞の共培養の、抗MAP2抗体を用いた蛍光免疫染色像（上）、MemGlow蛍光像（中央）、およびそれらを重ねた画像（下）を示す図である。

[図82]図82は、グルコースを添加したhGLP1R発現副交感神経細胞（誘導38日目）およびNCI-H716細胞の共培養のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）グルコース添加（測定開始から200秒時点）直後の蛍光像、（下）3つのhGLP1R発現副交感神経細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図83]図83は、グルコースを添加したまたは添加しない条件下でのhGLP1R発現副交感神経細胞およびNCI-H716細胞の共培養における、hGLP1R発現副交感神経細胞の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図84]図84は、ALAを添加したhGLP1R発現副交感神経細胞（誘導44日目）およびNCI-H716細胞の共培養のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）ALA添加（測定開始から200秒時点）直後の蛍光像、（下）3つのhGLP1R発現副交感神経細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity（ $\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図85]図85は、ALAを添加したまたは添加しない条件下でのhGLP1

R発現副交感神経細胞およびNCI-H716細胞の共培養における、hGLP1R発現副交感神経細胞の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図86]図86は、グルコースを負荷されたNCI-H716細胞からの培養上清を添加したhGLP1R発現副交感神経細胞（誘導44日目）のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）培養上清添加（測定開始から200秒時点）直後の蛍光像、（下）3つのhGLP1R発現副交感神経細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity ($\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図87]図87は、グルコースを負荷されたNCI-H716細胞の培養上清を添加したまたは添加しない条件下でのhGLP1R発現副交感神経細胞の発火強度の変化率を示すグラフである。

[図88]図88は、ALAを負荷されたNCI-H716細胞からの培養上清を添加したhGLP1R発現副交感神経細胞（誘導34日目）のカルシウムイメージングの結果を示す図である。（上）培養上清添加（測定開始から200秒時点）直後の蛍光像、（下）3つのhGLP1R発現副交感神経細胞（cell 1～3）の蛍光強度（Intensity ($\Delta F/F_0$ ））の経時的変化。

[図89]図89は、ALAまたはグルコースを負荷されたNCI-H716細胞の培養上清を添加したまたは添加しない条件下でのhGLP1R発現副交感神経細胞の発火強度の変化率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0023] 本発明は、第一の実施形態によれば、（a）多能性幹細胞の副交感神経細胞への分化を誘導するステップ、および（b1）前記ステップ（a）の前に、前記多能性幹細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップ、または（b2）前記ステップ（a）により得られた副交感神経細胞またはその前駆細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸

を導入するステップを含む、迷走神経様副交感神経細胞を作製する方法である。

[0024] 本実施形態の方法では、多能性幹細胞から副交感神経細胞を誘導する。「多能性幹細胞」には、例えば、胚性幹（E S）細胞、人工多能性幹（i P S）細胞、胚性生殖（E G）細胞、多能性生殖幹（m G S）細胞、M u s e細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。本実施形態の方法では、いずれの多能性幹細胞を用いてもよいが、E S細胞またはi P S細胞を用いることが好ましく、i P S細胞を用いることがより好ましい。

[0025] 本実施形態における多能性幹細胞は、任意の脊椎動物由来のものであってよく、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。

[0026] 多能性幹細胞の調製方法は十分に確立されており（例えば、i P S細胞については、C e l l , 2 0 0 7 ; 1 3 1 (5) : 8 6 1 - 8 7 2 , d o i : 1 0 . 1 0 1 6 / j . c e l l . 2 0 0 7 . 1 1 . 0 1 9）、当分野において公知の方法にしたがって、任意の組織または細胞から多能性幹細胞を調製することができる。あるいは、すでに樹立されたi P S細胞株やE S細胞株を、例えば、京都大学i P S細胞研究財団（C i R A _ F）、理化学研究所バイオリソース研究センター（R I K E N B R C）、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n（A T C C）などのセルバンクから入手してもよい。

[0027] 多能性幹細胞を副交感神経細胞へと誘導する方法はすでに確立されており（例えば、国際公開第2 0 2 0 / 0 4 0 2 8 6、国際公開第2 0 1 6 / 1 9 4 5 2 2）、当分野において公知の方法にしたがって副交感神経細胞を調製することができる。具体的には、例えば、D M E M / H A M ' s F - 1 2 培地、ヒト幹細胞（h E S）培地、N 2 培地またはそれらの混合物などを基礎培地として、ドルソモルフィンのようなB M Pシグナル経路阻害剤、S B 4 3 1 5 4 2のようなT G Fシグナル経路阻害剤、C H I R 9 9 0 2 1のようなW n tシグナル経路活性化剤、線維芽細胞成長因子（b F G F）のよう

なF G Fシグナル経路活性化剤、上皮成長因子（E G F）のようなE G Fシグナル経路活性化剤などを適宜添加した条件下で多能性幹細胞を培養することにより、神経堤細胞を調製し、次いで、フォスコリンなどのc A M P産生促進剤、脳由来神経栄養因子（B D N F）のようなB D N Fシグナル経路活性化剤、グリア細胞株由来神経栄養因子（G D N F）のようなG D N Fシグナル経路活性化剤、N G F - β のようなN G Fシグナル経路活性化剤、ニューロトロフィン3のようなN T - 3シグナル経路活性化剤、アスコルビン酸のようなビタミンC、ホルボール12-ミリストート13-アセタート（P M A）のようなプロテインキナーゼC活性化剤、レチノイン酸のようなレチノイン酸受容体アゴニストなどを適宜添加した条件下で神経堤細胞を培養することにより、副交感神経細胞を調製することができる。この際、多能性幹細胞および神経堤細胞は、上記分化誘導前に事前調整されることが好ましく、多能性幹細胞は、Y-27632のようなR h oキナーゼ（R O C K）阻害剤を含む培地中で2～3日培養されることが好ましく、神経堤細胞は、B M P 4のようなB M Pシグナル経路活性化剤、S A N T - 1のようなS H Hシグナル経路阻害剤、I W R - 1のようなW n tシグナル経路阻害剤などを含む培地中で2～3日培養されることが好ましい（国際公開第2020/040286、国際公開第2016/194522）。

[0028] 本実施形態の方法では、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を細胞に導入する。本実施形態における「消化管ホルモン受容体」は、迷走神経細胞に発現する任意の消化管ホルモン受容体であってよい。したがって、本実施形態の方法では、例えば、グルカゴン様ペプチド1受容体（G L P 1 R）、ニューロペプチドY2型受容体（N P Y 2 R）、グルカゴン様ペプチド2受容体（G L P 2 R）、セロトニン3受容体（5-H T 3 R）およびコレシストキニン1受容体（C C K A R）などから選択される消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を用いることができるが、これらには限定されない。本実施形態の方法では、上記から選択される単独または2種類以上の消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を適宜組み合わせて用いて

よい。

[0029] 消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸は、任意の時点で細胞に導入されてよい。例えば、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸は、分化誘導前の多能性幹細胞に導入されてもよいし、分化誘導によって得られた副交感神経細胞に導入されてもよいし、副交感神経細胞へと分化しつつある前駆細胞に導入されてもよい。好ましくは、GLP1R、NPY2RおよびCCKARをコードする外因性核酸は、分化誘導前の多能性幹細胞に導入されてよく；GLP2Rおよび5-HT3Rをコードする外因性核酸は、分化誘導によって得られた副交感神経細胞に導入されてよい。

[0030] 本実施形態における消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸は、任意の脊椎動物由来のものであってよく、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。

[0031] 消化管ホルモン受容体をコードする遺伝子はすでにクローニングされており、それらの核酸配列情報は、所定のデータベースから入手することができる。例えば、ヒトグルカゴン様ペプチド1受容体(hGLP1R)遺伝子であればNM_002062.5、ヒトニューロペプチドY2型受容体(hNPY2R)遺伝子であればNM_000910.4、ヒトグルカゴン様ペプチド2受容体(hGLP2R)遺伝子であればNM_004246.3、ヒトセロトニン3受容体(hHTR3A)遺伝子であればNM_213621.4、ヒトコレシストキニン1受容体(hCCKAR)遺伝子であればNM_000730.3(いずれもNCBI RefSeq ID)が利用可能である。

[0032] 本実施形態における消化管ホルモン受容体には、同等の活性を有するそれらのバリエーションやホモログなども含まれてよい。言い換えれば、本実施形態における消化管ホルモン受容体には、その受容体活性が維持されていることを限度として、データベースに登録されているアミノ酸配列と、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、一層好ましく

は97%以上、一層より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム（FASTA、BLASTなど）を用いて算出することができる。また、本実施形態における消化管ホルモン受容体には、その受容体活性が維持されていることを限度として、データベースに登録されているアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質が包含され得る。ここで、「1～数個」とは、例えば1～30個であってよく、好ましくは1～10個であってよく、特に好ましくは1～5個であってよい。

[0033] 消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸は、当分野において周知の方法により細胞に導入することができ、例えば、それらの核酸を発現ベクターにクローニングして、細胞に導入すればよい。発現ベクターには、例えば、以下に限定されないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターや、pCMVなどのプラスミドベクターなどを用いることができる。

[0034] 本実施形態の方法において、発現ベクターは、その種類に応じて当分野において周知の方法により細胞に導入され得る。非ウイルスベクターであれば、例えば、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクションなどにより導入することができる。ウイルスベクターであれば、適切な力価または多重感染度（MOI）において細胞に感染させることにより導入することができる。

[0035] 本実施形態の方法によれば、迷走神経様副交感神経細胞を作製することが可能である。

[0036] 言い換えれば、本発明は、第二の実施形態によれば、上記方法により作製された迷走神経様副交感神経細胞である。

[0037] ここで、「迷走神経様副交感神経細胞」とは、迷走神経細胞の消化管ホルモン応答を模倣することができる副交感神経細胞をいう。本実施形態におけ

る迷走神経様副交感神経細胞は、周知の副交感神経細胞マーカー、自律神経細胞マーカー、末梢神経細胞マーカー、成熟神経細胞マーカーおよび消化管ホルモン受容体の任意の組み合わせによって定義されてよく、例えば、ChAT（コリンアセチルトランスフェラーゼ）、PHOX2B（paired-likeホメオボックス2B）、PRPH（ペリフェリン）、MAP2（微小管関連タンパク質2）、VACHT（別名SLC18A3、小胞アセチルコリントランスポーター）、CHT（別名SLC5A7、高親和性コリントランスポーター）、STMN2（スタスミン2）、PHOX2A（paired-likeホメオボックス2A）、ASCL1（別名MASH1、Achaete-scute homolog 1）または上で定義したような消化管ホルモン受容体の発現に基づいて定義されてよい。さらに、本実施形態における迷走神経様副交感神経細胞は、上記マーカーに加え、ニコチン性アセチルコリン受容体の発現していることが好ましい。マーカーおよび消化管ホルモン受容体の発現は、RT-PCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーなどの公知の手法により解析することができる。

[0038] 本実施形態における迷走神経様副交感神経細胞は、消化管ホルモン応答性に基づいて定義されてもよく、例えば、カルシウムイメージングや膜電位測定により、消化管ホルモンに対する反応性を確認することにより定義され得る。

[0039] 本発明は、第三の実施形態によれば、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる多能性幹細胞である。

[0040] 本発明は、第四の実施形態によれば、消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる迷走神経様副交感神経細胞である。

[0041] 第三および第四の実施形態における「消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸」、「多能性幹細胞」および「迷走神経様副交感神経細胞」は、第一および第二の実施形態で定義したものと同様である。第四の実施形態の迷走神経様副交感神経細胞は、第一の実施形態の方法により製造されてよく、第三の実施形態の多能性幹細胞は、その中間産物であってよい。

- [0042] 第二および第四の実施形態の迷走神経様副交感神経細胞は、脳腸関連のインビトロ評価モデルを作製するために有用である。また、第三の実施形態の多能性幹細胞は、迷走神経様副交感神経細胞を安定的に作製するために有用である。
- [0043] 本発明は、第五の実施形態によれば、（１）上記迷走神経様副交感神経細胞に試料を接触させるステップ、および、（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、試料中の消化管ホルモン受容体アゴニストを検出する方法である。
- [0044] 本実施形態における「試料」は、消化管ホルモン受容体アゴニストを含み得る任意のものであってよい。本実施形態における「消化管ホルモン受容体アゴニスト」は、第一の実施形態において定義した消化管ホルモン受容体に作用し活性化する任意の物質であってよく、既知の内因性消化管ホルモンのみならず、新規または既知の低分子化合物、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体、脂質などであってよい。また、本実施形態における消化管ホルモン受容体アゴニストには、フルアゴニストのみならず、パーシャルアゴニストも含まれてよい。したがって、本実施形態の方法における試料は、例えば、動物由来の体液、細胞または組織からの抽出物、細胞または組織の培養上清、植物抽出物などから調製されたものであり得る。本実施形態の方法における試料は、好ましくは、ヒト由来の血液、血漿、血清などの体液や、ヒト消化管由来細胞または腸管上皮組織の培養上清から調製されたものである。
- [0045] 迷走神経様副交感神経細胞に試料を接触させるためには、迷走神経様副交感神経細胞の培養に試料を添加し、一定時間インキュベートすればよい。インキュベート時間は、例えば０．０１秒～２時間であってよい。
- [0046] 次いで、迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析する。神経活動は、当分野において周知の方法により解析すればよく、例えばカルシウムイメージングや膜電位測定により解析することができる。カルシウムイメージングは、例えば、迷走神経様副交感神経細胞に蛍光カルシウム指示薬を負荷し、蛍光強度の変化に基づいて細胞カルシウム濃度変化を測定すればよい。膜電

位は、例えば、局所場電位を計測することによる細胞外電位の測定、パッチクランプ法による細胞内電位の測定、膜電位感受性色素を用いた膜電位変化の測定などにより解析することができる。試料の添加により神経活動が変化したかどうかを判定するためには、試料を添加しない培養を並行して解析して比較してもよいし、過去に実施した試料を添加しない培養についての解析結果と比較してもよい。本実施形態の方法において、試料を添加した培地中での迷走神経様副交感神経細胞の神経活動が、試料を添加しない培地中での迷走神経様副交感神経細胞と比較して有意に増強された場合には、試料中に消化管ホルモン受容体アゴニストが存在すると評価することができる。

[0047] 本発明は、第六の実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で上記迷走神経様副交感神経細胞を培養するステップ、および、（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法である。

[0048] 候補物質は、イオン、ナノ粒子、低分子化合物、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体、脂質、動物または植物の細胞、組織もしくはその抽出物、菌体またはその破砕物もしくは抽出物などであってよく、これらの候補物質は、新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

[0049] 迷走神経様副交感神経細胞は、候補物質を添加した培地中で一定期間培養される。添加される候補物質の濃度は、候補物質の種類により異なるが、例えば、低分子化合物であれば、 $0.001\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ の範囲で適宜選択することができる。培養期間は、例えば、 $0.01\text{ 秒} \sim 2\text{ 時間}$ であってよい。

[0050] 次いで、迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析する。神経活動は、第五の実施形態と同様に、例えばカルシウムイメージングや膜電位測定により解析することができる。カルシウムイメージングは、例えば、迷走神経様副交感神経細胞に蛍光カルシウム指示薬を負荷し、蛍光強度の変化に基づいて細胞カルシウム濃度変化を測定すればよい。膜電位は、例えば、局所場電位を計測することによる細胞外電位の測定、パッチクランプ法による細胞内

電位の測定、膜電位感受性色素を用いた膜電位変化の測定などにより解析することができる。候補物質の添加により神経活動が変化したかどうかを判定するためには、候補物質を添加しない培養を並行して解析して比較してもよいし、過去に実施した候補物質を添加しない培養についての解析結果と比較してもよい。本実施形態の方法において、候補物質を添加した培地中での迷走神経様副交感神経細胞の神経活動が、候補物質を添加しない培地中での迷走神経様副交感神経細胞と比較して有意に増強された場合には、当該候補物質は消化管ホルモン受容体アゴニストであり、すなわち、脳腸相関を制御する物質として有望であると評価することができる。

[0051] ここで、「脳腸相関」とは、中枢神経系と消化管との双方向的なコミュニケーションをいう。脳腸相関は、多種多様な症状または障害に関与することがすでに知られている。脳腸相関異常との関連が深い症状または障害としては、例えば、摂食行動異常；吐き気、腹痛、下痢、便秘などの消化管障害；不安行動、うつなどの精神的ストレス症状；アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症などの神経変性疾患；炎症、アレルギーなどの免疫応答異常；肥満、脂質異常症、糖尿病などの代謝性疾患などが挙げられるが、これらに限定されない。脳腸相関を制御する物質は、脳腸相関を正常化することができ、その結果、上記のような症状または障害を予防または処置し得ると判断されてよく、上記のような症状または障害を予防または処置し得る医薬品、サプリメント、特定保健用食品、機能性表示食品の開発に有用であり得る。

[0052] 本発明は、第七の実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞を培養するステップ、（２）前記ステップ（１）により得られた培養物から培養上清を回収するステップ、（３）上記迷走神経様副交感神経細胞に前記培養上清を接触させるステップ、および、（４）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法である。本実施形態における「迷走神経様副交感神経細胞」は、第一および第二の実施形態で定義したものと同様であり

、「候補物質」および「脳腸相関」は、第六の実施形態において定義したものと同様である。

[0053] 本実施形態における「消化管ホルモン分泌細胞」は、消化管ホルモンを分泌し得る細胞であれば、任意の組織に由来する任意の細胞であってよい。消化管ホルモン分泌細胞は、胃から直腸までの消化管上皮および膵臓のランゲルハンス島などに散在しており、その組織分布および分泌するホルモンに基づいて、L細胞、K細胞、I細胞、S細胞、腸クロム親和性（EC）細胞、G細胞、D細胞、N細胞、M細胞などに分類される。本実施形態の方法では、上記から選択される単独または2種類以上の消化管ホルモン分泌細胞を適宜組み合わせて用いることができる。本実施形態における消化管ホルモン分泌細胞は、腸内分泌細胞であることが好ましく、例えば、L細胞、K細胞、I細胞、S細胞、EC細胞、N細胞、M細胞などであってよいが、これらに限定されない。

[0054] 本実施形態における消化管ホルモン分泌細胞は、任意の脊椎動物由来のものであってよく、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。

[0055] また、本実施形態の方法における消化管ホルモン分泌細胞は、迷走神経様副交感神経細胞と同じ動物由来のものであってもよいし、異なる動物由来のものであってもよい。したがって、本実施形態の方法では、例えば、ヒト消化管ホルモン分泌細胞とヒト迷走神経様副交感神経細胞を組み合わせ用いてもよいし、マウス消化管ホルモン分泌細胞とヒト迷走神経様副交感神経細胞を組み合わせ用いてもよい。好ましくは、本実施形態の方法では、同種の哺乳動物由来の消化管ホルモン分泌細胞および迷走神経様副交感神経細胞を用いることができ、特に好ましくは、ヒト消化管ホルモン分泌細胞およびヒト迷走神経様副交感神経細胞を用いることができる。

[0056] 消化管ホルモン分泌細胞は、すでに確立された公知の方法により調製することができる（例えば、Sinagoga K. L. et al., Deve

l o p m e n t , 2 0 1 8 , 1 4 5 (1 9) : d e v 1 6 5 7 9 5) 。 具体的には、例えば、ヒト多能性幹細胞から腸管オルガノイドおよび大腸オルガノイドを誘導する過程において、転写因子 N E U R O G 3 を強制発現させることにより、G I P、グレリン、G L P - 1、オキシントモジュリンなどの消化管ホルモンを分泌する腸内分泌細胞を調製することができる。あるいは、すでに樹立された消化管ホルモン分泌細胞株を、A T C C などのセルバンクから入手してもよい。消化管ホルモン分泌細胞株には、例えば、ヒト L 細胞株 N C I - H 7 1 6、マウス L 細胞株 S T C - 1、マウス L 細胞株 G L U T a g、マウスやヒト消化管から採取された腸内分泌細胞などが挙げられる。

[0057] 消化管ホルモン分泌細胞は、D M E M、H A M' s F - 1 2 培地、R P M I 1 6 4 0 培地またはそれらの混合物などを基礎培地として、ウシ胎児血清 (F B S)、非必須アミノ酸溶液、ペニシリン・ストレプトマイシンなどを添加した培地を用いて、安定的に継代培養することができる。

[0058] 消化管ホルモン分泌細胞は、候補物質を添加した培地中で一定期間培養される。添加される候補物質の濃度は、候補物質の種類により異なるが、例えば、低分子化合物であれば、0. 0 0 1 n M ~ 1 0 m M の範囲で適宜選択することができる。添加期間は、例えば、1 秒 ~ 7 2 時間であってよい。

[0059] 次いで、上記培養物から培養上清を回収する。回収された培養上清は、任意選択的に、透析や限外ろ過などにより精製または濃縮されてよい。

[0060] 次いで、迷走神経様副交感神経細胞に上記培養上清を接触させる。迷走神経様副交感神経細胞に培養上清を接触させるためには、迷走神経様副交感神経細胞の培地に培養上清を添加し、一定時間インキュベートすればよい。培養上清は、迷走神経様副交感神経細胞の培養培地に対して 1 ~ 1 0 倍の液量で添加されてよい。インキュベート時間は、例えば 0. 0 1 秒 ~ 2 時間であってよい。

[0061] 次いで、迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析する。神経活動は、第五および第六の実施形態と同様に、例えばカルシウムイメージングや膜電

位測定により解析することができる。カルシウムイメージングは、例えば、迷走神経様副交感神経細胞に蛍光カルシウム指示薬を負荷し、蛍光強度の変化に基づいて細胞カルシウム濃度変化を測定すればよい。膜電位は、例えば、局所場電位を計測することによる細胞外電位の測定、パッチクランプ法による細胞内電位の測定、膜電位感受性色素を用いた膜電位変化の測定などにより解析することができる。本実施形態の方法では、候補物質を添加せずに調製された消化管ホルモン分泌細胞の培養上清を対照として実施することができる。候補物質を添加して調製された消化管ホルモン分泌細胞の培養上清と接触した迷走神経様副交感神経細胞の神経活動が、対照の培養上清と接触した迷走神経様副交感神経細胞の神経活動と比較して有意に増強された場合には、当該候補物質は、消化管ホルモン分泌細胞からの消化管ホルモン分泌を促進し得る、すなわち、脳腸相関を制御する物質として有望であると評価することができる。

[0062] 本発明は、第八の実施形態によれば、（１）候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞と上記迷走神経様副交感神経細胞とを共培養するステップ、および（２）前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップを含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法である。本実施形態における「候補物質」および「脳腸相関」は、第六および第七の実施形態において定義したものと同様である。「消化管ホルモン分泌細胞」は、第七の実施形態において定義したものと同様である。

[0063] 本実施形態の方法では、消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞とを共培養する。本実施形態における「共培養」は、両細胞が同一の培地を共有している限り、任意の様式の培養であってよい。したがって、本実施形態における共培養は、直接（接触）共培養または間接（非接触）共培養のいずれであってもよい。具体的には、例えば、消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞とを直接混合して共培養してもよいし、消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞とをフィルターなどにより分離して共培養してもよい。

- [0064] 本実施形態の方法では、消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞とを直接共培養することが好ましい。具体的には、迷走神経様副交感神経細胞の培養の上に、消化管ホルモン分泌細胞を播種すればよい。消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞との比率は、例えば1 : 3 ~ 3 : 1であってよく、好ましくは1 : 1 ~ 2 : 1であってよい。消化管ホルモン分泌細胞および迷走神経様副交感神経細胞の播種濃度は、それぞれ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/cm²の範囲であってよい。
- [0065] ここで用いられる培地は、消化管ホルモン分泌細胞を培養するための培地と迷走神経様副交感神経細胞を培養するための培地とを混合したものであってよい。例えば、DMEM、HAM's F-12培地およびRPMI 1640培地の混合培地に、ウシ胎児血清（FBS）、非必須アミノ酸溶液、N2サプリメント、B-27サプリメントなどを適宜添加したものであってよい。
- [0066] 消化管ホルモン分泌細胞および迷走神経様副交感神経細胞は、候補物質を添加した培地中で一定期間培養される。添加される候補物質の濃度は、候補物質の種類により異なるが、例えば、低分子化合物であれば、0.001 nM ~ 10 mMの範囲で適宜選択することができる。培養期間は、例えば、0.01秒 ~ 2時間であってよい。
- [0067] 次いで、迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析する。神経活動は、第五 ~ 第七の実施形態と同様に、例えばカルシウムイメージングや膜電位測定により解析することができる。本実施形態の方法では、候補物質を添加しない培地中での共培養および／または候補物質を添加した培地中での迷走神経様副交感神経細胞の単独培養を、対照として実施することができる。候補物質を添加した共培養における迷走神経様副交感神経細胞の神経活動が、対照における迷走神経様副交感神経細胞の神経活動と比較して有意に増強された場合には、当該候補物質は、消化管ホルモン分泌細胞からの消化管ホルモン分泌を促進し得る、すなわち、脳腸相関を制御する物質として、有望であ

ると評価することができる。

[0068] 本発明は、第九の実施形態によれば、消化管ホルモン分泌細胞と上記迷走神経様副交感神経細胞との共培養を含んでなる、脳腸関連モデルである。本実施形態における「迷走神経様副交感神経細胞」は、第一および第二の実施形態で定義したものと同様であり、「消化管ホルモン分泌細胞」および「脳腸関連」は、第七の実施形態において定義したものと同様であり、「共培養」は、第八の実施形態において定義したものと同様である。

[0069] 本実施形態の脳腸関連モデルは、上で記載した培地や共培養のための容器などと組み合わせて、脳腸関連を制御する物質のスクリーニングのためのキットとして提供されてもよい。キットには、適宜追加の構成、例えば、緩衝液、カルシウム指示薬、化合物ライブラリー、スクリーニングのプロトコールを記載した説明書などがさらに含まれてよい。

[0070] 本実施形態の脳腸関連モデルは、第八の実施形態において記載した手順により、消化管ホルモン分泌細胞と迷走神経様副交感神経細胞とを共培養することにより作製することができ、消化管ホルモン分泌細胞からの消化管ホルモン分泌を促進し得る物質、すなわち、脳腸関連を制御する物質のスクリーニングのために使用することができる。

[0071] また、本発明は、第十の実施形態によれば、脳腸関連を制御する物質のスクリーニングのための、上記迷走神経様副交感神経細胞または上記脳腸関連モデルの使用である。本実施形態における「迷走神経様副交感神経細胞」は、第一および第二の実施形態で定義したものと同様であり、「脳腸関連」は、第七の実施形態において定義したものと同様であり、「脳腸関連モデル」は、第九の実施形態において定義したものと同様である。第七、第八および第九の実施形態において記載された内容にしたがって、上記迷走神経様副交感神経細胞または上記脳腸関連モデルを、脳腸関連を制御する物質のスクリーニングのために使用することができる。

実施例

[0072] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本

発明を何ら限定するものではない。

[0073] <1. 消化管ホルモン受容体を発現するレンチウイルスベクターの作製>

Vector Builder社に依頼して、消化管ホルモン受容体をコードする配列を含む以下のプラスミドを合成した：

pLV-hGLP1R (ヒトGLP1R遺伝子 (NCBI RefSeq ID: NM_002062.5) を含むプラスミド、ベクターID: VB900123-1388xwv) ；

pLV-hNPY2R (ヒトNPY2R遺伝子 (NCBI RefSeq ID: NM_000910.4) を含むプラスミド、ベクターID: VB900123-1387bah) ；

pLV-hGLP2R (ヒトGLP2R遺伝子 (NCBI RefSeq ID: NM_004246.3) を含むプラスミド、ベクターID: VB210830-1115xup) ；

pLV-hHTR3A (ヒトHTR3A遺伝子 (NCBI RefSeq ID: NM_213621.4) を含むプラスミド、ベクターID: VB210823-1277qqk) ；および

pLV-hCCKAR (ヒトCCKAR遺伝子 (NCBI RefSeq ID: NM_000730.3) を含むプラスミド、ベクターID: VB900123-1385gxm)。

[0074] また、モック感染用のレンチウイルスベクターを調製するために、消化管ホルモン受容体に代えてmCherry蛍光タンパク質をコードする配列を含む以下のプラスミドを用意した：

pLV-mCherry (ベクターID: VB900084-0158zxv)。

[0075] 0.1w/v%ゼラチンでコートされた6ウェルプレートにHEK293T細胞 (1.5×10^6 /ウェル) を播種した。培地には、10%FBS、1%非必須アミノ酸 (NEAA)、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するDMEMを用いた。上記プラスミド (各4 μ g)、パッケージプラス

ミドpsPAX2 (addgene、#12260) ($2\mu\text{g}$) およびエンベローププラスミド (pMD2. G) (addgene、#12259) ($2\mu\text{g}$) を、 $500\mu\text{l}$ の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) およびポリエチレンジイミン (Polysciences inc.) を用いて HEK293T 細胞 (2 ウェル) にトランスフェクションした。24 時間後に培地を全量交換し、さらに 24 時間後に培養上清を回収して 4°C で保管した。細胞に新たな培地を加え、24 時間後に培養上清を回収した。前日に回収した培養上清と混合して PVDF シリンジフィルター ($0.45\mu\text{m}$) で濾過した後、1/3 量の Lenti-X Concentrator (クロンテック) を混合し、 4°C で 1 時間インキュベートした。その後、 $1500\times g$ 、 4°C で 45 分間遠心分離を行い、ペレットを回収した。ペレットをその後使用する培地 ($800\mu\text{L}$) に懸濁し、ウイルス懸濁液を得た。ウイルス懸濁液を $200\mu\text{L}$ ずつ分注し、 -80°C で保管した。

[0076] <2. 消化管ホルモン受容体を強制発現させた副交感神経細胞および iPS 細胞の作製>

(2-1) 試薬

本実施例において使用した試薬の情報 (試薬名、製品番号、製造元、略称など) は以下の通りである。

- ・ mTeSR1-cGMP (STEMCELL Technologies: ST-85850G) (以下、「mTeSR1」と表記)
- ・ DMEM/Ham's F-12 (富士フイルム和光純薬: 048-29785)
- ・ DMEM (high-glucose) (富士フイルム和光純薬: 043-30085)
- ・ RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) (富士フイルム和光純薬: 189-02025) (以下、「RPMI-1640」と表記)

- ・Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific: 31985062)
- ・ステムセルバンカー (STEM-CELLBANKER (商標) GMP grade) (ZNQ: CB045)
- ・Fetal Bovine Serum (Biowest, Nuaille, France) (以下、「FBS」と表記)
- ・Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific: 10828-028) (以下、「KSR」と表記)
- ・N2 supplement with transferrin (Apo) (富士フイルム和光純薬: 141-09041) supplement (以下、「N2」と表記)
- ・MEM non-essential amino acids solution (富士フイルム和光純薬: 139-15651) (以下、「NEAA」と表記)
- ・Monothioglycerol solution (富士フイルム和光純薬: 195-15791)
- ・Penicillin-streptomycin solution (富士フイルム和光純薬: 168-23191) (以下、「P/S」と表記)
- ・エタノール (99.5) (富士フイルム和光純薬: 057-00456)
- ・Brain Derived Neurotrophic Factor, Human, recombinant (富士フイルム和光純薬: 020-12913) (以下、「BDNF」と表記)
- ・Glial-cell Derived Neurotrophil Factor, Human, recombinant (富士フイルム和光純薬: 075-04153) (以下、「GDNF」と表記)

- ・ N e r v e G r o w t h F a c t o r - β , H u m a n , r e c o m b i n a n t (富士フィルム和光純薬 : 1 4 1 - 0 7 6 0 1) (以下、「NGF」と表記)
- ・ N e u r o t r o p h i n - 3 , H u m a n , r e c o m b i n a n t (富士フィルム和光純薬 : 1 4 1 - 0 6 6 4 3) (以下、「NT-3」と表記)
- ・ C i l i a r y N e u r o t r o p h i c F a c t o r , H u m a n , r e c o m b i n a n t (富士フィルム和光純薬 : 0 3 2 - 1 8 8 5 1) (以下、「CNTF」と表記)
- ・ L - アスコルビン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (富士フィルム和光純薬 : 0 1 3 - 1 2 0 6 1) (以下、「アスコルビン酸」と表記)
- ・ Y - 2 7 6 3 2 (富士フィルム和光純薬 : 0 3 6 - 2 4 0 2 3)
- ・ F o r s k o l i n (富士フィルム和光純薬 : 0 6 7 - 0 2 1 9 1) (以下、「FSK」と表記)
- ・ D o r s o m o r p h i n (Sigma-Aldrich : P 5 4 9 9 - 5 M G) (以下、「DM」と表記)
- ・ S B 4 3 1 5 4 2 h y d r a t e (Sigma-Aldrich : S 4 3 1 7 - 5 M G) (以下、「SB」と表記)
- ・ C H I R 9 9 0 2 1 (Cayman Chemical Company : 1 3 1 2 2) (以下、「CHIR」と表記)
- ・ I W R - 1 (Sigma-Aldrich : 1 0 1 6 1 - 5 M G)
- ・ S A N T 1 (Sigma-Aldrich : S 4 5 7 2 - 5 M G)
- ・ 骨形成因子 4 (t r u n c a t e d) 、 ヒト、組換え体 (富士フィルム和光純薬 : 0 2 2 - 1 7 0 7 1) (以下、「BMP4」と表記)
- ・ 線維芽細胞成長因子 (塩基性) (b a s i c F G F) 、 ヒト、組換え体 (富士フィルム和光純薬 : 0 6 4 - 0 4 5 4 1) (以下、「bFGF」と表記)
- ・ ホルボール 1 2 - ミリスタート 1 3 - アセタート (富士フィルム和光純

薬： 162-23591) (以下、「PMA」と表記)

・レチノイン酸 (Sigma-Aldrich: R2625-50MG)
(以下、「RA」と表記)

・iMatrix-511 (ニッピ: 892012)

・Poly-L-ornithine hydrobromide (Sigma-Aldrich: P3655-10MG) (以下、「PLO」と表記)

・Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane (Sigma-Aldrich: L2020-1MG) (以下、「ラミニン」と表記)

・Lipidure (日油株式会社: CM5206)

・マトリゲル (Standard Formulation) (コーニング: 256234)

・Accutase (Thermo Fisher Scientific: A11105-01)

・TrypLE express (Thermo Fisher Scientific: 12604-013)

・Ultrapure distilled water (Thermo Fisher Scientific: 10977-015) (以下、「DW」と表記)

・D-PBS (-) (富士フイルム和光純薬: 045-29795)

・Tris Buffer Powder, pH7.4 (タカラバイオ: T9153)

・HBSS (+) (フェノールレッド不含) (富士フイルム和光純薬: 084-08965) (以下、「HBSS」と表記)

・塩酸 (富士フイルム和光純薬: 080-01066)

・Albumin, from Bovine Serum (富士フイル

ム和光純薬： 017-23294) (以下、「BSA」と表記)

・ジメチルスルホキシド (富士フイルム和光純薬： 046-21981)
(以下、「DMSO」と表記)

・フェニルメチルスルホニルフルオリド (Sigma-Aldrich：
P7626-250MG) (以下、「PMSF」と表記)

・MemGlow™ Fluorogenic Plasma Membrane Probes 590 (Cytoskeleton, Inc.：
MG03-02) (以下、「MemGlow」と表記)

[0077] (2-2) ストック溶液

・FSK： DMSOを用いて10mMに調製

・DM： DMSOを用いて1mMに調製

・SB： DMSOを用いて10mMに調製

・CHIR： DMSOを用いて3mMに調製

・IWR-1： DMSOを用いて10mMに調製

・SANT1： DMSOを用いて250μMに調製

・PMA： DMSOを用いて10μg/mLに調製

・RA： DMSOを用いて1mMに調製

・BMP4： 0.1%BSAを添加した4mM塩酸溶液を用いて100μg/mLに調製

・bFGF： 1mM Tris buffer (pH7.4) で500μg/mLに調製後、DMEMを用いて10μg/mLに調製

・BDNF、GDNF、NGF、およびNT-3： PBSを用いて10μg/mLに調製

・アスコルビン酸： PBSを用いて50mg/mLに調製

・Y-27632： Opti-MEMを用いて10mMに調製

・PLO： DWを用いて1mg/mLに調製

・Lipidure： エタノール (99.5) を用いて0.5%に調製

[0078] (2-3) 培地

- ・ヒト幹細胞培地 (hESM) : 20%のKSR、1%のNEAA、1%のMonothioglycerol solution、および1%P/Sが添加されたDMEM/Ham's F-12
- ・N2培地: 1%のN2、1%のNEAA、および1%のP/Sが添加されたDMEM/Ham's F-12
- ・NDM1: 10 μ MのFSK、10 ng/mLのGDNF、10 ng/mLのNT-3、10 ng/mLのNGF、および50 μ g/mLのアスコルビン酸が添加されたN2培地
- ・NDM2: 100 ng/mLのBDNF、および100 ng/mLのCNTFが添加されたNDM1
- ・NDM3: 10 ng/mLのBDNF、1 μ MのRA、および10 ng/mLのPMAが添加されたNDM1

[0079] (2-4) iPS細胞から副交感神経細胞への分化誘導

- ・胚様体の形成 (ー3日目) :

ヒトiPS細胞 (201B7株) は、RIKEN BRCより入手した。6ウェルプレートにLipidureによりコートし、PBSで洗浄した。ヒトiPS細胞 (201B7株) を、10 μ MのY-27632が添加されたmTeSR1を用いて 1×10^6 細胞/ウェルの濃度で播種し、オービタルシェイカー (ワケンビーテック: WB-101SRC) 上で培養した (95 rpm)。播種後24時間および48時間に、10 μ MのY-27632が添加されたmTeSR1を2 mL/ウェルにて添加した。胚様体 (EB) を形成されるまで3日間培養した。

- ・分化ステップ1 (0日目) :

培地を、2 μ MのDM、10 μ MのSB、および10 ng/mLのbFGFが添加されたhESMに交換し (4 mL/ウェル)、オービタルシェイカー上で2日間培養した。

- ・分化ステップ2 (2日目) :

培地を、3 μ MのCHIR、20 μ MのSB、および10 ng/mLのb

F G F が添加された h E S M に交換し（6 mL／ウェル）、オービタルシェイカー上で3日間培養した。

・分化ステップ3（5日目）：

培地を、3 μ M の C H I R、および10 ng／mL の b F G F が添加された h E S M：N2（3：1）混合培地に交換し（4 mL／ウェル）、オービタルシェイカー上で2日間培養した。

・分化ステップ4（7日目）：

培地を、10 μ M の I W R-1、250 nM の S A N T-1、25 ng／mL の B M P 4、および10 ng／mL の b F G F が添加された h E S M：N2（1：1）混合培地に交換し（3 mL／ウェル）、オービタルシェイカー上で2日間培養した。

・分化ステップ5（9日目）：

培地を、10 μ M の I W R-1、250 nM の S A N T-1、25 ng／mL の B M P 4、および10 ng／mL の b F G F が添加された h E S M：N2（1：3）混合培地に交換し（3 mL／ウェル）、オービタルシェイカー上で3日間培養し、フレッシュな同培地に交換し、さらに24時間培養した。

・分化ステップ6（13日目）：

DWで調製したP L O溶液（20 μ g／mL）により1時間コートした後、DWで1回洗浄し、P B Sで調製したラミニン溶液（5 μ g／mL）により2時間コートすることにより、P L Oおよびラミニンによりコートされた24ウェルプレートを準備した。分化ステップ5により得られたE Bを回収し、2 mLのT r y p L E e x p r e s sを加え、37℃で10分間インキュベートした。10% F B S含有D M E M（4 mL）を加えて酵素反応を停止させ、ピペティングにより細胞を懸濁した。200×g、4分間遠心分離して細胞を回収し、N D M 1により細胞を懸濁させ、細胞数をカウントした。N D M 2を用いて細胞懸濁液を調整し（ 1×10^5 細胞／mL）、P L Oおよびラミニンによりコートされた24ウェルプレートに1 mL／ウェル

ずつ添加した。以降、1週間に2度、フレッシュなNDM2により培地を半量交換しながら培養を継続した。

[0080] (2-5) 消化管ホルモン受容体を分化後に強制発現させた副交感神経細胞の作製

上記(2-4)の手順により、ヒトiPS細胞(201B7株)を副交感神経細胞へと誘導した。誘導20日目の培養に、上記1で調製したウイルス懸濁液を1/10希釈になるように添加した。24時間後にNDM2により培地を全量交換した。以降、1週間に2度、フレッシュなNDM2により培地を半量交換しながら培養を継続し、誘導30日目以降の細胞を解析した。

[0081] (2-6) 消化管ホルモン受容体を強制発現させたiPS細胞の作製

iMatrixによりコートされた6ウェルプレートに、ヒトiPS細胞(201B7株)を、10 μ MのY-27632が添加されたmTeSR1を用いて6 $\times$ 10⁴細胞/ウェルの濃度で播種した(0日目)。翌日、培地をフレッシュなmTeSR1に交換し(2mL/ウェル)、上記1で調製した200 μ L/ウェルのウイルス懸濁液を添加した(1日目)。その後、毎日培地をフレッシュなmTeSR1に交換し、ウイルスの添加から4日後に0.3 μ g/mLのピューロマイシンを添加したmTeSR1に交換した(5日目)。ウイルスの添加から10日以上、0.3 μ g/mLのピューロマイシンを添加したmTeSR1中で細胞を培養することにより、ピューロマイシン選択を行った。得られた細胞(以下、「消化管ホルモン受容体発現iPS細胞」と記載する)を凍結保存した。

[0082] (2-7) 消化管ホルモン受容体を強制発現させたiPS細胞からの副交感神経細胞の作製

上記(2-6)で作製した消化管ホルモン受容体発現iPS細胞を、上記(2-4)の手順により副交感神経細胞へと誘導した。

[0083] <3. 消化管ホルモン受容体を強制発現させたiPS細胞の品質評価>

(3-1) 消化管ホルモン受容体遺伝子の発現

(i) qPCR解析

消化管ホルモン受容体遺伝子および幹細胞マーカーNANOG遺伝子の発現をqPCRにより確認した。NucleoSpin RNA（タカラバイオ、U0955B）を用いて、上記（2-6）で作製した消化管ホルモン受容体発現iPS細胞から全RNAを抽出した。ReverTra Ace（商標）qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡、FSQ-301）を用いてcDNAを調製した。THUNDERBIRD（商標）SYBR（商標）qPCR Mix（東洋紡、QPS-201）を用いてqPCRを行った。内部コントロールとしてハウスキーピング遺伝子36B4を用いた。反応および解析は3重に行った。

[0084] 表1. qPCRに使用したプライマーセット（1）

[表1]

Primer	Sequence (5'→3')	SEQ NO.
36B4-F	AGATGCAGCAGATCCGCA	1
36B4-R	GTTCTTGCCCATCAGCACC	2
hNANOG-F	CCAACATCCTGAACCTCAGC	3
hNANOG-R	GCTATTCTTCGGCCAGTTG	4
hGLP1R-F	CTACGCACTCTCCTTCTCTGCT	5
hGLP1R-R	CGGACAATGCTCGCAGGATGAA	6
hNPY2R-F	CATCTTGCTTGGGGTAATTGGC	7
hNPY2R-R	AGAGTGAACGGTAGACACAGAG	8
hGLP2R-F	GGAAGTGGGCTCAGTACAAAC	23
hGLP2R-R	GTCCCGTTACAAAATATGCCAGA	24
hHTR3A-F	CATCTTCATTGTGCGGCTGGTG	25
hHTR3A-R	AGTCATCAGTCTTGGTGGCTTGG	26
hCCKAR-F	AGGATTTTCATCTTCGGGAGCG	27
hCCKAR-R	CGGGACTGTAAGGGTTTGC	28

[0085] (i i) 免疫細胞染色

細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBS(−)により2回洗浄した。0.2%TritonX-100/PBS(−)溶液を加えて5分間室温でインキュベート後、上清を除去した。ブロッキング液(4%ブロッケース(DSファーマバイオメディカル)/0.2%TritonX-100/PBS(−))を加え、30分間室温でインキュベートした。ブロッキング液を除去し、一次抗体を添加して16~24時間4℃でインキュベートした。0.2%TritonX-100/PBS(−)により2回洗浄した後、二次抗体およびHoechst 33342溶液(同仁化学、1/300

0希釈)を添加して1時間室温でインキュベートした。一次抗体および二次抗体の希釈には、Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A (東洋紡)を用いた。

[0086] (一次抗体)

- ・抗GLP1R抗体 (Thermo Fisher Scientific、PA5-97789) (1:50希釈)
- ・抗NPY2R抗体 (Sigma-Aldrich、SAB4502029-100UG) (1:100希釈)
- ・抗GLP2R抗体 (R&D Systems、MAB4285) (1:50希釈)
- ・抗HTR3A抗体 (Thermo Fisher Scientific、MA5-31771) (1:250希釈)
- ・抗CCKAR抗体 (Abcam、ab115287) (1:100希釈)

[0087] (二次抗体)

- ・Alexa Fluor-555 (F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody) (Thermo Fisher Scientific、A21430)
- ・Alexa Fluor-488 (F(ab')₂-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody) (Thermo Fisher Scientific、A11017)

[0088] (3-2) 三胚様への分化能

STEMdiff (商標) Trilineage differentiation kit (STEMCELL Technologies、#ST-05230)を用いて、キットに付属のプロトコールにしたがって、消化管ホルモン受容体発現iPS細胞を内胚葉または中胚葉へと分化させた。

5日間の培養後の細胞をqPCR解析に用いた。外胚葉への分化能の解析には、上記（2－7）における分化誘導13日目の細胞を用いた。外胚葉マーカー遺伝子（hPAX6またはhNES）、中胚葉マーカー遺伝子（hNCAM1）または内胚葉マーカー遺伝子（hSOX17）の発現をqPCRにより解析した。qPCRは、以下のプライマーを用いた以外は上記（3－1）と同様の手順により行った。

[0089] 表2. qPCRに使用したプライマーセット（2）

[表2]

Primer	Sequence (5'→3')	SEQ NO.
hPAX6-F	AGAGTGGACAGACATCCGAG	9
hPAX6-R	GTTGACAAAGACACCACCGA	10
hNCAM1-F	CCGTCATCCTGCTTGATCAG	11
hNCAM1-R	GAGTTCAAGACGCAGCCA	12
hSOX17-F	GGCGCAGCAGAATCCAGA	13
hSOX17-R	CCACGACTTGCCCAGCAT	14
hNES-F	CGCTCAGGTCCTGGAAGGTCG	29
hNES-R	AAGTCTTGGAGCCACCGCCA	30

[0090] （3－3）染色体検査

消化管ホルモン受容体発現iPS細胞の安全性を評価するために、G分染法による染色体検査を株式会社日本遺伝子研究所に委託した。

[0091] <4. 消化管ホルモン受容体を強制発現させた副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析>

（4－1）マーカー発現

（i）qPCR解析

神経堤細胞マーカー遺伝子（hSOX10）、自律神経細胞マーカー遺伝

子 (hPHOX2B)、末梢神経細胞マーカー遺伝子 (hPRPH) および副交感神経細胞マーカー遺伝子 (hCHAT) の発現を qPCR により解析した。qPCR は、以下のプライマーセットを用いた以外は上記 (3-1) と同様の手順により行った。

[0092] 表3. qPCR に使用したプライマーセット (3)

[表3]

Primer	Sequence (5'→3')	SEQ NO.
hSOX10-F	CCTCACAGATCGCCTACACC	15
hSOX10-R	CATATAGGAGAAGGCCGAGTAGA	16
hPHOX2B-F	GCTGGCCCTGAAGATCGAC	17
hPHOX2B-R	TCAGACTTTTTGCCCCGAGGAG	18
hPRPH-F	GCCTTGGAAGTAGAGCGCAAG	19
hPRPH-R	CCTCGCACGTTAGACTCTGG	20
hCHAT-F	GCCTTCTACAGGCTCCATCG	21
hCHAT-R	GGAGTGGCCGATCTGATGTT	22

[0093] (i i) 免疫細胞染色

消化管ホルモン受容体およびMAP2またはCHATの発現を免疫細胞染色により解析した。免疫細胞染色は、上記 (3-1) と同様の手順により行った。MAP2およびCHATの染色には、以下の抗体を用いた。

- ・抗MAP2抗体 (Abcam、ab11267) (1:500希釈)
- ・抗CHAT抗体 (Abcam、ab181023) (1:100希釈)

[0094] (4-2) 細胞内カルシウムイメージング

上記 (2-5) および (2-7) で作製した細胞 (誘導30日目以降) に、終濃度10μMのFluo-8 AM (AAT Bioquest、21083) を添加し、37℃で20~30分間インキュベートした。培地を除去し、リンガー液 (149mM NaCl、2.8mM KCl、2mM

CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、10 mM HEPES、10 mM D-(+)-glucose (pH 7.2)) に置換した後、細胞内カルシウム濃度変化を測定した。顕微鏡 (Olympus、IX71)、Confocal scanner unit (Yokogawa、CSU-W1)、LED光源 (OPTO SCIENCE、X-Cite 120LED)、および解析ソフト (MetaMorph) (Molecular Devices) を用い、500 ms/フレームで500~800フレーム撮影した。途中 (例えば250フレーム目) で消化管ホルモン受容体アゴニスト刺激を添加した。消化管ホルモン受容体アゴニストおよびその添加量 (終濃度) は以下の通りである: GLP1 (ヒト、7-37) (ペプチド研究所、#4280-v) (以下、「GLP1」と記載する) (10 nM); PYY (ヒト、3-36) (ペプチド研究所、#4400-v) (以下、「PYY」と記載する) (100 nM); GLP2 (ヒト) (ペプチド研究所、#4376-v) (以下、「GLP2」と記載する) (100 nM); セロトニン (Serotonin hydrochloride) (Sigma-Aldrich、H9523) (以下、「5-HT」と記載する) (100 μM); CCK-33 (ヒト) (ペプチド研究所、#4201-s) (以下、「CCK-33」と記載する) (10、100、1000 nM)。

[0095] (4-3) 細胞外電位測定

上記 (2-4) の分化ステップ6に記載の手順により、PLOおよびラミンによりコートされたMEA測定用培養プレート (CytoView MEA 6 (M384-tMEA-6W), CytoView MEA 24 (M384-tMEA-24W)) (AXION Biosystems) を用意した。培地にNDM3を用いて、上記 (2-4) または (2-7) における誘導13日目の細胞を播種した (1×10^5 細胞/8 μL)。以降、1週間に2度、フレッシュなNDM3により培地を半量交換しながら培養を継続した。

[0096] NDM3またはリンガー液中にて、膜電位変化を測定した。1000×ゲ

イン、200Hz－3kHzフィルターを用い、測定ノイズ標準偏差に対し6倍以上に変化した電位値を神経発火（スパイク）として検出した。電位を5分間測定した後、消化管ホルモン受容体アゴニストを上記（4－2）と同様の終濃度で添加し、さらに5分間測定した。

[0097] ＜5. hGLP1Rを強制発現させたiPS細胞の品質評価＞

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV－hGLP1Rを用い、上記（2－6）の手順により調製したiPS細胞におけるhGLP1R遺伝子およびタンパク質の発現を、上記（3－1）の手順により解析した。qPCRの結果を図1に示す。野生型iPS細胞（対照）と比較して、外因性hGLP1R遺伝子を導入されたiPS細胞は、hGLP1R遺伝子を強く発現した（* $P<0.05$ 、 $n=3$ 、Studentのt検定）。免疫細胞染色の結果を図2に示す。図中、スケールバーは100 μm を示す。外因性hGLP1R遺伝子を導入されたiPS細胞は、hGLP1Rタンパク質を強く発現していることが確認された。これらの結果に基づき、この細胞を「hGLP1R発現iPS細胞」とした。hGLP1R発現iPS細胞の明視野像を図3に示す。図中、スケールバーは100 μm を示す。

[0098] 上記（3－1）の手順により、hGLP1R発現iPS細胞における幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現をqPCRにより確認した結果を図4に示す。図中、「GLP1R」はhGLP1R発現iPS細胞を、「Control」は野生型iPS細胞を示す。hGLP1R発現iPS細胞は、野生型iPS細胞よりもhNANOG遺伝子を強く発現し（* $P<0.05$ 、 $n=3$ 、Studentのt検定）、未分化状態であることが確認された。

[0099] 上記（3－2）の手順により、hGLP1R発現iPS細胞の三胚様への分化能を評価した。結果を図5に示す。外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたhGLP1R発現iPS細胞は、外胚葉マーカーhPAX6遺伝子、中胚葉マーカーhNCAM1遺伝子または内胚葉マーカーhSOX17遺伝子をそれぞれ強く発現した。これらの結果から、hGLP1R発現iPS細胞の三胚様への分化能を有していることが確認された。

[0100] G分染法による染色体検査の結果を図6に示す。hGLP1R発現iPS細胞の染色体には異常がないことが確認された。

[0101] <6. hGLP1R発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析>

上記(2-7)の手順により、hGLP1R発現iPS細胞の副交感神経細胞への分化を誘導した。誘導0日目のEBおよび誘導13日目の細胞の顕微鏡像(明視野)を図7に示す。スケールバーは100 μ mを示す。誘導13日目の細胞についてのqPCRの結果を図8に示す。幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現が顕著に減少し、神経堤細胞マーカーhSOX10遺伝子および自律神経細胞マーカーhPHOX2B遺伝子の発現が顕著に増加した(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。これらの結果から、誘導13日目の細胞が自律神経系前駆細胞であることが確認された。

[0102] 誘導40日目の細胞についてのqPCRの結果を図9に示す。末梢神経細胞マーカーhPRPH遺伝子、副交感神経細胞マーカーhCHAT遺伝子およびhGLP1R遺伝子の強い発現が確認された(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。免疫細胞染色の結果を図10に示す。図中、スケールバーは100 μ mを示す。hGLP1Rタンパク質の発現に加え、成熟神経細胞マーカーMAP2タンパク質の発現が確認された。

[0103] 上記(2-7)の手順によりhGLP1R発現iPS細胞から調製された細胞のリガンド応答性を、上記(4-3)の手順による細胞外電位測定により解析した。細胞外電位ヒートマップを図11に示す。GLP1を添加することにより、高い神経発火頻度を示す領域が見られた。神経発火頻度の変化率を図12に示す。GLP1を添加することにより、神経発火頻度が上昇した(* $P < 0.05$ 、 $n = 74$ 電極/4ウェル、student-t)。

[0104] 上記(2-7)の手順によりhGLP1R発現iPS細胞から調製された細胞のリガンド応答性を、上記(4-2)の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図13に示す。横軸は時間(秒)を示し、縦軸はGLP1添加前の蛍光強度の平均値(F_0)を1とした際の蛍

光強度の変化率 ($\Delta F / F_0$) を示す。GLP1 を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。1 分間あたりの神経発火 (スパイク) の数を図 14 に示す。GLP1 を添加することにより、スパイク数が増加した (* $P < 0.05$ 、 $n = 15$ 細胞 / 3 サンプル、student-t)。神経発火のピークの振幅 (GLP1 添加前の蛍光強度の平均値 (F_0) に対する蛍光強度の変化率 ($(\Delta F / F_0 - 1) \times 100$) を図 15 に示す。GLP1 を添加することにより、神経発火の強度が増強された (* $P < 0.05$ 、 $n = 15$ 細胞 / 3 サンプル、student-t)。

[0105] 以上の結果から、hGLP1R 発現 iPS 細胞から調製された副交感神経細胞が、GLP1 応答性を有する迷走神経様副交感神経細胞であることが示された。

[0106] <7. hNPY2R を強制発現させた iPS 細胞の品質評価>

上記 1 の手順においてレンチウイルスベクターとして pLV-hNPY2R を用い、上記 (2-6) の手順により調製した iPS 細胞における hNPY2R 遺伝子およびタンパク質の発現を、上記 (3-1) の手順により解析した。qPCR の結果を図 16 に示す。野生型 iPS 細胞 (対照) と比較して、外因性 hNPY2R 遺伝子を導入された iPS 細胞は、hNPY2R 遺伝子を強く発現した (* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Student の t 検定)。免疫細胞染色の結果を図 17 に示す。図中、スケールバーは $100 \mu m$ を示す。外因性 hNPY2R 遺伝子を導入された iPS 細胞は、hNPY2R タンパク質を強く発現していることが確認された。これらの結果に基づき、この細胞を「hNPY2R 発現 iPS 細胞」とした。hNPY2R 発現 iPS 細胞の明視野像を図 18 に示す。図中、スケールバーは $100 \mu m$ を示す。

[0107] 上記 (3-1) の手順により、hNPY2R 発現 iPS 細胞における幹細胞マーカー NANOG の発現を qPCR により確認した結果を図 19 に示す。図中、「NPY2R」は hNPY2R 発現 iPS 細胞を、「Control」は野生型 iPS 細胞を示す。hNPY2R 発現 iPS 細胞は、野生型 i

P S細胞よりもN A N O G遺伝子を強く発現し（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、S t u d e n t の t 検定）、未分化状態であることが確認された。

[0108] 上記（3－2）の手順により、h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞の三胚様への分化能を評価した。結果を図 2 0 に示す。外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導された h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞は、外胚葉マーカー h P A X 6 遺伝子、中胚葉マーカー h N C A M 1 遺伝子または内胚葉マーカー h S O X 1 7 遺伝子をそれぞれ強く発現した。これらの結果から、h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞の三胚様への分化能を有していることが確認された。

[0109] G 分染法による染色体検査の結果を図 2 1 に示す。h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞の染色体には異常がないことが確認された。

[0110] < 8. h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞から調製された副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析 >

上記（2－7）の手順により、h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞の副交感神経細胞への分化を誘導した。誘導 0 日目の E B および誘導 1 3 日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を図 2 2 に示す。スケールバーは $100 \mu m$ を示す。誘導 1 3 日目の細胞についての q P C R の結果を図 2 3 に示す。幹細胞マーカー h N A N O G 遺伝子の発現が顕著に減少し、神経堤細胞マーカー h S O X 1 0 遺伝子および自律神経細胞マーカー h P H O X 2 B 遺伝子の発現が顕著に増加した（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、S t u d e n t の t 検定）。これらの結果から、誘導 1 3 日目の細胞が自律神経系前駆細胞であることが確認された。

[0111] 誘導 4 0 日目の細胞についての q P C R の結果を図 2 4 に示す。末梢神経細胞マーカー h P R P H 遺伝子、副交感神経細胞マーカー h C H A T 遺伝子および h N P Y 2 R 遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、S t u d e n t の t 検定）。免疫細胞染色の結果を図 2 5 に示す。図中、スケールバーは $100 \mu m$ を示す。h N P Y 2 R タンパク質の発現に加え、成熟神経細胞マーカー M A P 2 タンパク質の発現が確認された。

[0112] 上記（2－7）の手順により h N P Y 2 R 発現 i P S 細胞から調製された

細胞のリガンド応答性を、上記（４－３）の手順による細胞外電位測定により解析した。細胞外電位ヒートマップを図２６に示す。ＰＹＹを添加することにより、高い神経発火頻度を示す領域が見られた。神経発火頻度の変化率を図２７に示す。ＰＹＹを添加することにより、神経発火頻度が上昇した（ $*P<0.05$ 、 $n=74$ 電極／４ウェル、*student-t*）。

[0113] 上記（２－７）の手順によりhNPY2R発現iPS細胞から調製された細胞のリガンド応答性を、上記（４－２）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図２８に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はＰＹＹ添加前（０～１２５秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を１とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F/F_0$ ）を示す。ＰＹＹを添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。１分間あたりの神経発火（スパイク）の数を図２９に示す。ＰＹＹを添加することにより、スパイク数が増加した（ $*P<0.05$ 、 $n=15$ 細胞／３サンプル、*student-t*）。神経発火のピークの振幅（ＰＹＹ添加前の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対する蛍光強度の変化率（ $\Delta F/F_0 - 1$ ） $\times 100$ ）を図３０に示す。ＰＹＹを添加することにより、神経発火の強度が増強された（ $*P<0.05$ 、 $n=15$ 細胞／３サンプル、*student-t*）。

[0114] 以上の結果から、hNPY2R発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞が、ＰＹＹ応答性を有する迷走神経様副交感神経細胞であることが示された。

[0115] < ９．hGLP2Rを強制発現させたiPS細胞の品質評価 >

上記１の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hGLP2Rを用い、上記（２－６）の手順により調製したiPS細胞におけるhGLP2R遺伝子およびタンパク質の発現を、上記（３－１）の手順により解析した。qPCRの結果を図３１に示す。野生型iPS細胞（対照）と比較して、外因性hGLP2R遺伝子を導入されたiPS細胞は、hGLP2R遺伝子を強く発現した（ $*P<0.05$ 、 $n=3$ 、*Student*の*t*検定）。免疫細胞染色の結果を図３２に示す。図中、スケールバーは $100\mu m$ を

示す。外因性hGLP2R遺伝子を導入されたiPS細胞は、hGLP2Rタンパク質を発現していることが確認された。これらの結果に基づき、この細胞を「hGLP2R発現iPS細胞」とした。hGLP2R発現iPS細胞の明視野像を図33に示す。図中、スケールバーは1mmを示す。

[0116] 上記(3-1)の手順により、hGLP2R発現iPS細胞における幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現をqPCRにより確認した結果を図34に示す。図中、「hGLP2R」はhGLP2R発現iPS細胞を、「Control」は野生型iPS細胞を示す。hGLP2R発現iPS細胞は、野生型iPS細胞と同程度にhNANOG遺伝子を発現し、未分化状態であることが確認された。

[0117] 上記(3-2)の手順により、hGLP2R発現iPS細胞の三胚様への分化能を評価した。結果を図35に示す。外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたhGLP2R発現iPS細胞は、外胚葉マーカーhNES遺伝子、中胚葉マーカーhNCAM1遺伝子または内胚葉マーカーhSOX17遺伝子をそれぞれ強く発現した。これらの結果から、hGLP2R発現iPS細胞の三胚様への分化能を有していることが確認された。

[0118] G分染法による染色体検査の結果を図36に示す。hGLP2R発現iPS細胞の染色体には異常がないことが確認された。

[0119] <10. hGLP2R発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析>

上記(2-7)の手順により、hGLP2R発現iPS細胞の副交感神経細胞への分化を誘導した。誘導0日目のEBおよび誘導13日目の細胞の顕微鏡像(明視野)を図37に示す。スケールバーは100μmを示す。誘導13日目の細胞についてのqPCRの結果を図38に示す。幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現が顕著に減少し、神経堤細胞マーカーhSOX10遺伝子および自律神経細胞マーカーhPHOX2B遺伝子の発現が顕著に増加した(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。これらの結果から、誘導13日目の細胞が自律神経系前駆細胞であることが確認され

た。

[0120] 誘導40日目の細胞についてのqPCRの結果を図39に示す。末梢神経細胞マーカーhPRPH遺伝子および副交感神経細胞マーカーhCHAT遺伝子の強い発現が確認された(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。また、誘導40日目のモック感染副交感神経細胞(対照)と比較して、hGLP2R遺伝子の強い発現が確認された(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。

[0121] 免疫細胞染色の結果を図40に示す。図中、スケールバーは $100\mu m$ を示す。hGLP2Rタンパク質の弱い発現および成熟神経細胞マーカーMAP2タンパク質の発現が確認された。

[0122] <11. hHTR3Aを強制発現させたiPS細胞の品質評価>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hHTR3Aを用い、上記(2-6)の手順により調製したiPS細胞におけるhHTR3A遺伝子およびタンパク質の発現を、上記(3-1)の手順により解析した。qPCRの結果を図41に示す。野生型iPS細胞(対照)と比較して、外因性hHTR3A遺伝子を導入されたiPS細胞は、hHTR3A遺伝子を強く発現した(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。免疫細胞染色の結果を図42に示す。図中、スケールバーは $100\mu m$ を示す。外因性hHTR3A遺伝子を導入されたiPS細胞は、hHTR3Aタンパク質を強く発現していることが確認された。これらの結果に基づき、この細胞を「hHTR3A発現iPS細胞」とした。hHTR3A発現iPS細胞の明視野像を図43に示す。図中、スケールバーは $1mm$ を示す。

[0123] 上記(3-1)の手順により、hHTR3A発現iPS細胞における幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現をqPCRにより確認した結果を図44に示す。図中、「hHTR3A」はhHTR3A発現iPS細胞を、「Control」は野生型iPS細胞を示す。hHTR3A発現iPS細胞は、野生型iPS細胞と同程度にhNANOG遺伝子を発現し、未分化状態であることが確認された。

[0124] 上記（３－２）の手順により、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞の三胚様への分化能を評価した。結果を図４５に示す。外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたh H T R 3 A 発現 i P S 細胞は、外胚葉マーカーh N E S 遺伝子、中胚葉マーカーh N C A M 1 遺伝子または内胚葉マーカーh S O X 1 7 遺伝子をそれぞれ強く発現した。これらの結果から、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞の三胚様への分化能を有していることが確認された。

[0125] G 分染法による染色体検査の結果を図４６に示す。h H T R 3 A 発現 i P S 細胞の染色体には異常がないことが確認された。

[0126] < 1 2. h H T R 3 A 発現 i P S 細胞から調製された副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析>

上記（２－７）の手順により、h H T R 3 A 発現 i P S 細胞の副交感神経細胞への分化を誘導した。誘導０日目のE B および誘導１３日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を図４７に示す。スケールバーは100 μ mを示す。誘導１３日目の細胞についてのq P C R の結果を図４８に示す。幹細胞マーカーh N A N O G 遺伝子の発現が顕著に減少し、神経堤細胞マーカーh S O X 1 0 遺伝子および自律神経細胞マーカーh P H O X 2 B 遺伝子の発現が顕著に増加した（* P < 0. 0 5、n = 3、S t u d e n t の t 検定）。これらの結果から、誘導１３日目の細胞が自律神経系前駆細胞であることが確認された。

[0127] 誘導４０日目の細胞についてのq P C R の結果を図４９に示す。末梢神経細胞マーカーh P R P H 遺伝子および副交感神経細胞マーカーh C H A T 遺伝子の強い発現が確認された（* P < 0. 0 5、n = 3、S t u d e n t の t 検定）。また、誘導４０日目のモック感染副交感神経細胞（対照）と比較して、h H T R 3 A 遺伝子の同程度の発現が確認された（* P < 0. 0 5、n = 3、S t u d e n t の t 検定）。

[0128] 免疫細胞染色の結果を図５０に示す。図中、スケールバーは100 μ mを示す。h H T R 3 A タンパク質および成熟神経細胞マーカーM A P 2 タンパク質の発現が確認された。

[0129] <13. hCCKARを強制発現させたiPS細胞の品質評価>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hCCKARを用い、上記(2-6)の手順により調製したiPS細胞におけるhCCKAR遺伝子およびタンパク質の発現を、上記(3-1)の手順により解析した。qPCRの結果を図51に示す。野生型iPS細胞(対照)と比較して、外因性hCCKAR遺伝子を導入されたiPS細胞は、hCCKAR遺伝子を強く発現した(* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定)。免疫細胞染色の結果を図52に示す。図中、スケールバーは $100\mu m$ を示す。外因性hCCKAR遺伝子を導入されたiPS細胞は、hCCKARタンパク質を強く発現していることが確認された。これらの結果に基づき、この細胞を「hCCKAR発現iPS細胞」とした。hCCKAR発現iPS細胞の明視野像を図53に示す。図中、スケールバーは $1mm$ を示す。

[0130] 上記(3-1)の手順により、hCCKAR発現iPS細胞における幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現をqPCRにより確認した結果を図54に示す。図中、「hCCKAR」はhCCKAR発現iPS細胞を、「Control」は野生型iPS細胞を示す。hCCKAR発現iPS細胞は、野生型iPS細胞と同程度にhNANOG遺伝子を発現し、未分化状態であることが確認された。

[0131] 上記(3-2)の手順により、hCCKAR発現iPS細胞の三胚様への分化能を評価した。結果を図55に示す。外胚葉、中胚葉または内胚葉への分化を誘導されたhCCKAR発現iPS細胞は、外胚葉マーカーhNES遺伝子、中胚葉マーカーhNCAM1遺伝子または内胚葉マーカーhSOX17遺伝子をそれぞれ強く発現した。これらの結果から、hCCKAR発現iPS細胞の三胚様への分化能を有していることが確認された。

[0132] G分染法による染色体検査の結果を図56に示す。hCCKAR発現iPS細胞の染色体には異常がないことが確認された。

[0133] <14. hCCKAR発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞またはその自律神経系前駆細胞の解析>

上記（２－７）の手順により、hCCKAR発現iPS細胞の副交感神経細胞への分化を誘導した。誘導０日目のEBおよび誘導１３日目の細胞の顕微鏡像（明視野）を図５７に示す。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。誘導１３日目の細胞についてのqPCRの結果を図５８に示す。幹細胞マーカーhNANOG遺伝子の発現が顕著に減少し、神経堤細胞マーカーhSOX10遺伝子および自律神経細胞マーカーhPHOX2B遺伝子の発現が顕著に増加した（* $P<0.05$ 、 $n=3$ 、Studentのt検定）。これらの結果から、誘導１３日目の細胞が自律神経系前駆細胞であることが確認された。

[0134] 誘導４０日目の細胞についてのqPCRの結果を図５９に示す。末梢神経細胞マーカーhPRPH遺伝子および副交感神経細胞マーカーhCHAT遺伝子の強い発現が確認された（* $P<0.05$ 、 $n=3$ 、Studentのt検定）。また、誘導４０日目のモック感染副交感神経細胞（対照）と比較して、hCCKAR遺伝子の強い発現が確認された（* $P<0.05$ 、 $n=3$ 、Studentのt検定）。

[0135] 免疫細胞染色の結果を図６０に示す。図中、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。hCCKARタンパク質および成熟神経細胞マーカーMAP2タンパク質の発現が確認された。

[0136] 上記（２－７）の手順によりhCCKAR発現iPS細胞から調製された細胞のリガンド応答性を、上記（４－３）の手順による細胞外電位測定により解析した。細胞外電位ヒートマップを図６１に示す。CCK-33を添加することにより、高い神経発火頻度を示す領域が見られた。神経発火頻度の変化率を図６２に示す。CCK-33を添加することにより、神経発火頻度が上昇した（* $P<0.05$ 、 $0\text{ nM}=128$ 電極、 $10\text{ nM}=23$ 電極、 $100\text{ nM}=57$ 電極、 $1000\text{ nM}=24$ 電極／ $2\sim4$ ウェル、student-t）。

[0137] 上記（２－７）の手順によりhCCKAR発現iPS細胞から調製された細胞のリガンド応答性を、上記（４－２）の手順による細胞内カルシウムイ

メージングにより解析した。測定結果を図63に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はCCK-33添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。CCK-33を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。CCK-33添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対するCCK-33添加後（200～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave} / F_0$ ）を図64に示す。CCK-33を添加することにより、神経発火の強度が増強された（* $P < 0.05$ 、 $n = 20$ 細胞／3サンプル、student-t）。

[0138] 以上の結果から、hCCKAR発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞が、CCK-33応答性を有する迷走神経様副交感神経細胞であることが示された。

[0139] <15. hGLP1Rを分化後に強制発現させた副交感神経細胞の解析>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hGLP1Rを用い、上記（2-5）の手順により調製した副交感神経細胞におけるhGLP1Rタンパク質の発現を、上記（3-1）の手順により解析した。誘導40日目における免疫細胞染色の結果を図65に示す。図中、スケールバーは $100\mu m$ を示す。副交感神経細胞マーカーhChATタンパク質およびhGLP1Rタンパク質の強い発現が確認された。

[0140] 上記（2-7）の手順により、hGLP1Rタンパク質を分化後に強制発現させた副交感神経細胞のリガンド応答性を、上記（4-2）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図66に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はGLP1添加前（0～124秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。GLP1を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。

[0141] <16. hNPY2Rを分化後に強制発現させた副交感神経細胞の解析>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hNPY2Rを用い、上記（2-5）の手順により調製した副交感神経細胞におけるh

N P Y 2 R タンパク質の発現を、上記（３－１）の手順により解析した。誘導４０日目における免疫細胞染色の結果を図６７に示す。図中、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。副交感神経細胞マーカーh C h A T タンパク質およびh N P Y 2 R タンパク質の強い発現が確認された。

[0142] 上記（２－７）の手順により、h N P Y 2 R タンパク質を分化後に強制発現させた副交感神経細胞のリガンド応答性を、上記（４－２）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図６８に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はP Y Y 添加前（０～１２４秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を１とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。P Y Y を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。

[0143] < １ ７ ． h G L P 2 R を分化後に強制発現させた副交感神経細胞の解析 >

上記１の手順においてレンチウイルスベクターとしてp L V - h G L P 2 R を用い、上記（２－５）の手順により調製した副交感神経細胞におけるh G L P 2 R 遺伝子およびタンパク質の発現を、上記（３－１）の手順により解析した。q P C R の結果を図６９に示す。野生型 i P S 細胞（図中、「未分化」）では末梢神経細胞マーカーh P R P H 遺伝子および副交感神経細胞マーカーh C H A T 遺伝子の発現が見られなかったのに対し、外因性h G L P 2 R 遺伝子を導入された誘導４０日目の細胞（図中、「副交感神経細胞」）では、両マーカー遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、S t u d e n t の t 検定）。また、誘導４０日目のモック感染副交感神経細胞（対照）と比較して、h G L P 2 R 遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、S t u d e n t の t 検定）。

[0144] 誘導４０日目における免疫細胞染色の結果を図７０に示す。図中、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。成熟神経細胞マーカーM A P 2 タンパク質およびh G L P 2 R タンパク質の強い発現が確認された。

[0145] 上記（２－７）の手順により、h G L P 2 R タンパク質を分化後に強制発現させた副交感神経細胞のリガンド応答性を、上記（４－２）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図７１に示す。

横軸は時間（秒）を示し、縦軸はGLP2添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。GLP2を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。GLP2添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対するGLP2添加後（240～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave} / F_0$ ）を図72に示す。GLP2を添加することにより、神経発火の強度が増強された（* $P < 0.05$ 、 $n = 20$ 細胞／3サンプル、student-t）。

[0146] <18. hHTR3Aを分化後に強制発現させた副交感神経細胞の解析>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hHTR3Aを用い、上記（2-5）の手順により調製した副交感神経細胞におけるhHTR3A遺伝子およびタンパク質の発現を、上記（3-1）の手順により解析した。qPCRの結果を図73に示す。野生型iPS細胞（図中、「未分化」）では末梢神経細胞マーカーhPRPH遺伝子および副交感神経細胞マーカーhCHAT遺伝子の発現が見られなかったのに対し、外因性hHTR3A遺伝子を導入された誘導40日目の細胞（図中、「副交感神経細胞」）では、両マーカー遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定）。また、誘導40日目のモック感染副交感神経細胞（対照）と比較して、hHTR3A遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定）。

[0147] 誘導40日目における免疫細胞染色の結果を図74に示す。図中、スケールバーは100 μm を示す。成熟神経細胞マーカーMAP2タンパク質およびhHTR3Aタンパク質の強い発現が確認された。

[0148] 上記（2-7）の手順により、hHTR3Aタンパク質を分化後に強制発現させた副交感神経細胞のリガンド応答性を、上記（4-2）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図75に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸は5-HT添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。

5-HTを添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。5-HT添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対する5-HT添加後（240～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave}/F_0$ ）を図76に示す。5-HTを添加することにより、神経発火の強度が増強された（* $P < 0.05$ 、 $n = 20$ 細胞／3サンプル、student-t）。

[0149] <19. hCCKARを分化後に強制発現させた副交感神経細胞の解析>

上記1の手順においてレンチウイルスベクターとしてpLV-hCCKARを用い、上記（2-5）の手順により調製した副交感神経細胞におけるhCCKAR遺伝子およびタンパク質の発現を、上記（3-1）の手順により解析した。qPCRの結果を図77に示す。野生型iPS細胞（図中、「未分化」）では末梢神経細胞マーカーhPRPH遺伝子および副交感神経細胞マーカーhCHAT遺伝子の発現が見られなかったのに対し、外因性hCCKAR遺伝子を導入された誘導40日目の細胞（図中、「副交感神経細胞」）では、両マーカー遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定）。また、誘導40日目のモック感染副交感神経細胞（対照）と比較して、hCCKAR遺伝子の強い発現が確認された（* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 、Studentのt検定）。

[0150] 誘導40日目における免疫細胞染色の結果を図78に示す。図中、スケールバーは100 μm を示す。成熟神経細胞マーカーMAP2タンパク質およびhCCKARタンパク質の強い発現が確認された。

[0151] 上記（2-7）の手順により、hCCKARタンパク質を分化後に強制発現させた副交感神経細胞のリガンド応答性を、上記（4-2）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。測定結果を図79に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はCCK-33添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F/F_0$ ）を示す。CCK-33を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。CCK-33添加前（0～80秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対するCC

K-33添加後（240～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave}/F_0$ ）を図80に示す。CCK-33を添加することにより、神経発火の強度が増強された（* $P < 0.05$ 、 $n = 20$ 細胞/3サンプル、student-t）。

[0152] <20. hGLP1R発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞と腸内分泌細胞との共培養の作製>

ヒトL細胞由来細胞株NCI-H716（ATCC：CCL-251）を、10%FBSおよび1%P/Sを含有するRPMI-1640（以下、「H716培地」と記載する）を用いて10cmディッシュに播種し（ $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ディッシュ）、3～4日間培養した。細胞および培地を15mL遠沈管に回収し、 $200 \times g$ 、5分間遠心分離し、上清を除去した。細胞にFBSを含有しないH716培地またはリンガー液を加え、 1×10^6 細胞/mLに調製した。得られた細胞懸濁液の1mLに20 μ MのMemGlow/DMSO溶液を5 μ L加え（終濃度100nM）、室温で10分間インキュベートした。その後、 $200 \times g$ 、5分間遠心分離し、上清を除去した。H716培地を用いて1回洗浄後、10cmディッシュに播種した。MemGlowによる細胞膜の染色は、最大10日間維持されることを確認した。以下、MemGlowにより染色されたNCI-H716細胞を「MemGlow染色NCI-H716」と記載する。

[0153] 上記（2-7）の手順によりhGLP1R発現iPS細胞から調製された副交感神経細胞（以下、「hGLP1R発現副交感神経細胞」と記載する）

（誘導37日目）に、MemGlow染色NCI-H716（ 2×10^5 細胞/mL）を1mL添加した。この結果、共培養は、NDM2およびH716培地の1：1混合培地中で行われた。48時間の培養後、上記（3-1）（ii）と同様の手順により、免疫細胞染色を行った。一次抗体には、抗MAP2抗体（Abcam、ab11267）（1：1000希釈）を用いた。

[0154] 結果を図81に示す。共培養において、hGLP1R発現副交感神経細胞の上にMemGlow染色NCI-H716細胞が接着したことが確認され

た。h G L P 1 R 発現副交感神経細胞および M e m G l o w 染色 N C I - H 7 1 6 のいずれにも形態異常は見られなかった。さらに、副交感神経のアゴニストであるニコチンを用いて、上記（４－２）の手順により細胞内カルシウムイメージングを行い、共培養における h G L P 1 R 発現副交感神経細胞のニコチン応答が正常であることを確認した（データは省略）。これらの結果から、h G L P 1 R 発現副交感神経細胞と N C I - H 7 1 6 細胞とを直接共培養できることが示された。

[0155] < 2 1. N C I - H 7 1 6 細胞との共培養における h G L P 1 R 発現副交感神経細胞の解析 >

上記（２－７）の手順により調製された h G L P 1 R 発現副交感神経細胞（誘導 3 5 日目）に、M e m G l o w 染色 N C I - H 7 1 6（ 1×10^6 細胞 / m L）を 1 m L 添加した。共培養は、NDM 2 および H 7 1 6 培地の 1 : 1 混合培地中で行われた。1 時間の共培養後、培地をグルコース不含リンガー液に交換した。グルコース（腸内分泌細胞を刺激し、摂食制御にかかわる）に対する応答を、上記（４－２）の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。

[0156] 結果を図 8 2 に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸はグルコース添加前（0 ~ 1 9 9 秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を 1 とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。共培養にグルコースを添加することにより、h G L P 1 R 発現副交感神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。グルコース添加前（0 ~ 1 9 9 秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対するグルコース添加後（2 0 0 ~ 4 0 0 秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave} / F_0$ ）を図 8 3 に示す。共培養にグルコースを添加することにより、h G L P 1 R 発現副交感神経細胞の神経発火の強度が増強された（* $P < 0.05$ 、 $n = 20$ 細胞 / サンプル、s t u d e n t - t）。一方、h G L P 1 R 発現副交感神経細胞の単独培養はグルコースに応答しなかった（データは省略）。これらの結果から、N C I - H 7 1 6 細胞がグルコースに応答して G L P 1 を分泌し、h G L P 1 R 発現副交感神経細胞が G L P 1 に応答したこ

とが示唆された。

[0157] 次に、上記共培養の α -リノレン酸に対する応答を、上記(4-2)の手順による細胞内カルシウムイメージングにより解析した。NCI-H716細胞が発現する多価不飽和脂肪酸受容体のアゴニストである α -リノレン酸(富士フィルム和光純薬: 127-05901)(以下、「ALA」と記載する)(100 μ M)を用い、測定溶液にはグルコース不含リンガー液を用いた。

[0158] 結果を図84に示す。横軸は時間(秒)を示し、縦軸はALA添加前(0~199秒)の蛍光強度の平均値(F_0)を1とした際の蛍光強度の変化率($\Delta F/F_0$)を示す。共培養にALAを添加することにより、hGLP1R発現副交感神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。ALA添加前(0~199秒)の蛍光強度の平均値(F_0)に対するALA添加後(200~400秒)の蛍光強度の平均値(ΔF_{ave})の変化率($\Delta F_{ave}/F_0$)を図85に示す。共培養にALAを添加することにより、hGLP1R発現副交感神経細胞の神経発火の強度が増強された(* $P < 0.05$, $n = 20$ 細胞/サンプル, student-t)。一方、hGLP1R発現副交感神経細胞の単独培養はALAに応答しなかった(データは省略)。これらの結果から、NCI-H716細胞がALAに応答してGLP1を分泌し、hGLP1R発現副交感神経細胞がGLP1に応答したことが示唆された。

[0159] <22. NCI-H716細胞の培養上清に対するhGLP1R発現副交感神経細胞の応答性>

HBSSにより希釈したマトリゲル(終濃度0.4~0.6 mg/mL)を24ウェルプレートに添加し、37℃で1時間インキュベートした。HBSSで2回洗浄し、乾燥させた後、H716培地を用いてNCI-H716細胞を播種した(2×10⁵細胞/ウェル)。48時間培養した後、リンガー液で1回洗浄し、グルコース(10 mM)またはALA(100 μ M)を含むリンガー液を添加した。室温で4分間インキュベートした後、上清を回収した。PMSFを添加し(終濃度50 μ g/mL)、測定に用いるまで上清

を氷上で保存し、測定時には室温に戻して使用した。以下、グルコースを含むリンガー液により調製された上清を「グルコース負荷上清」、ALAを含むリンガー液により調製された上清を「ALA負荷上清」と記載する。グルコース負荷上清またはALA負荷上清を用い、上記（４－２）と同様の手順により細胞内カルシウムイメージングを行った。

[0160] グルコース負荷上清を用いた細胞内カルシウムイメージングの結果を図86に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸は上清添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。グルコース負荷上清を添加することにより、hGLP1R発現副交感神経細胞（誘導44日目）の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。上清添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対する上清添加後（200～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave} / F_0$ ）を図87に示す。図中、「Ctrl」はNCI-H716細胞と触れていないリンガー液を示す。hGLP1R発現副交感神経細胞はグルコース未負荷上清にも反応したが、グルコース負荷上清により強い反応を示した（*** $P < 0.001$ 、 $n = 20$ 細胞／サンプル、Tukey事後検定を伴う二元配置ANOVA）。

[0161] ALA負荷上清を用いた細胞内カルシウムイメージングの結果を図88に示す。横軸は時間（秒）を示し、縦軸は上清添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）を1とした際の蛍光強度の変化率（ $\Delta F / F_0$ ）を示す。ALA負荷上清を添加することにより、hGLP1R発現副交感神経細胞（誘導34日目）の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。上清添加前（0～199秒）の蛍光強度の平均値（ F_0 ）に対する上清添加後（200～400秒）の蛍光強度の平均値（ ΔF_{ave} ）の変化率（ $\Delta F_{ave} / F_0$ ）を図89に示す。図中、「Ctrl」はNCI-H716細胞と接触していないリンガー液を示す。hGLP1R発現副交感神経細胞は、グルコース負荷上清と同程度にALA負荷上清にも強い反応を示した（*** $P < 0.001$ 、 $n = 20$ 細胞／サンプル、Tukey事後検定を伴う二元配置ANOVA）。

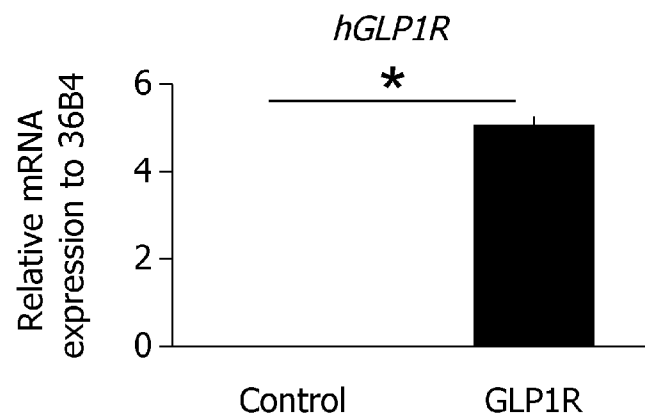
[0162] 以上の結果から、NCI-H716細胞がグルコースおよびALAに応答してGLP1を分泌し、hGLP1R発現副交感神経細胞がGLP1に応答したことが確認された。

請求の範囲

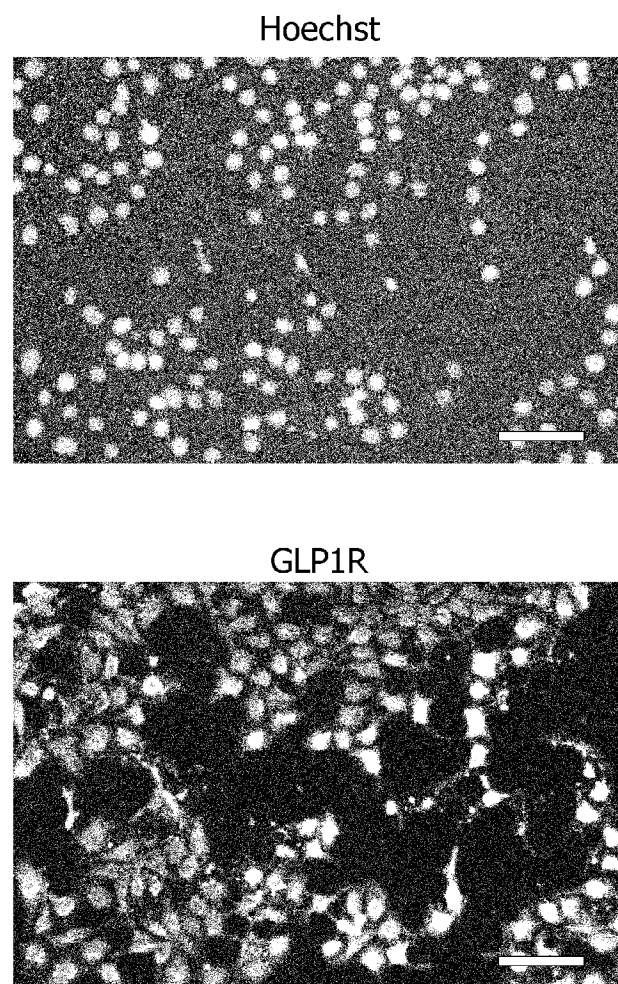
- [請求項1] (a) 多能性幹細胞の副交感神経細胞への分化を誘導するステップ、および
- (b 1) 前記ステップ (a) の前に、前記多能性幹細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップ、または
- (b 2) 前記ステップ (a) により得られた副交感神経細胞またはその前駆細胞に消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を導入するステップ
- を含む、迷走神経様副交感神経細胞を作製する方法。
- [請求項2] 前記消化管ホルモン受容体が、グルカゴン様ペプチド 1 受容体、ニューロペプチド Y 2 型受容体、グルカゴン様ペプチド 2 受容体、セロトニン 3 受容体およびコレシストキニン 1 受容体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 請求項 1 または 2 に記載の方法により作製された、迷走神経様副交感神経細胞。
- [請求項4] 消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる多能性幹細胞。
- [請求項5] 消化管ホルモン受容体をコードする外因性核酸を含んでなる迷走神経様副交感神経細胞。
- [請求項6] 前記消化管ホルモン受容体が、グルカゴン様ペプチド 1 受容体、ニューロペプチド Y 2 型受容体、グルカゴン様ペプチド 2 受容体、セロトニン 3 受容体およびコレシストキニン 1 受容体からなる群から選択される、請求項 4 または 5 に記載の細胞。
- [請求項7] (1) 請求項 3、5 または 6 に記載の迷走神経様副交感神経細胞に試料を接触させるステップ、および、
- (2) 前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップ
- を含む、試料中の消化管ホルモン受容体アゴニストを検出する方法。

- [請求項8] (1) 候補物質の存在下で請求項3、5または6に記載の迷走神経様副交感神経細胞を培養するステップ、および、
 (2) 前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップ
を含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法。
- [請求項9] (1) 候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞を培養するステップ、
 (2) 前記ステップ(1)により得られた培養物から培養上清を回収するステップ、
 (3) 請求項3、5または6に記載の迷走神経様副交感神経細胞に前記培養上清を接触させるステップ、および、
 (4) 前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップ
を含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法。
- [請求項10] (1) 候補物質の存在下で消化管ホルモン分泌細胞と請求項3、5または6に記載の迷走神経様副交感神経細胞とを共培養するステップ、および
 (2) 前記迷走神経様副交感神経細胞の神経活動を解析するステップ
を含む、脳腸相関を制御する物質のスクリーニング方法。
- [請求項11] 前記消化管ホルモン分泌細胞が腸内分泌細胞である、請求項9または10に記載のスクリーニング方法。
- [請求項12] 消化管ホルモン分泌細胞と請求項3、5または6に記載の迷走神経様副交感神経細胞との共培養を含んでなる、脳腸相関モデル。
- [請求項13] 前記消化管ホルモン分泌細胞が腸内分泌細胞である、請求項12に記載の脳腸相関モデル。

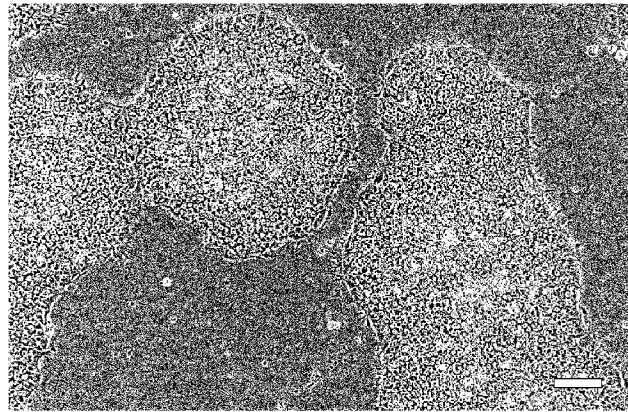
[図1]



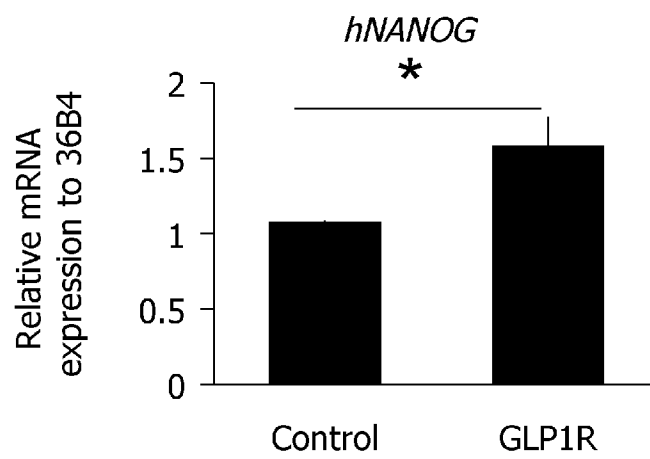
[図2]



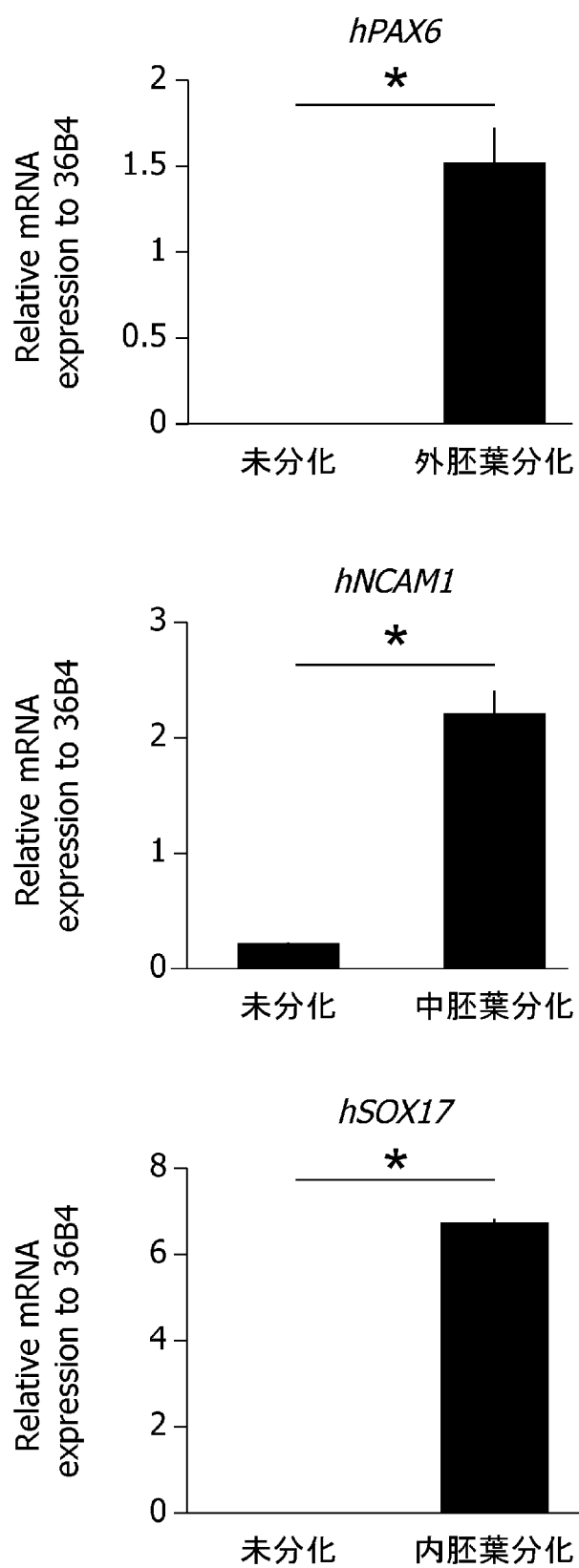
[図3]



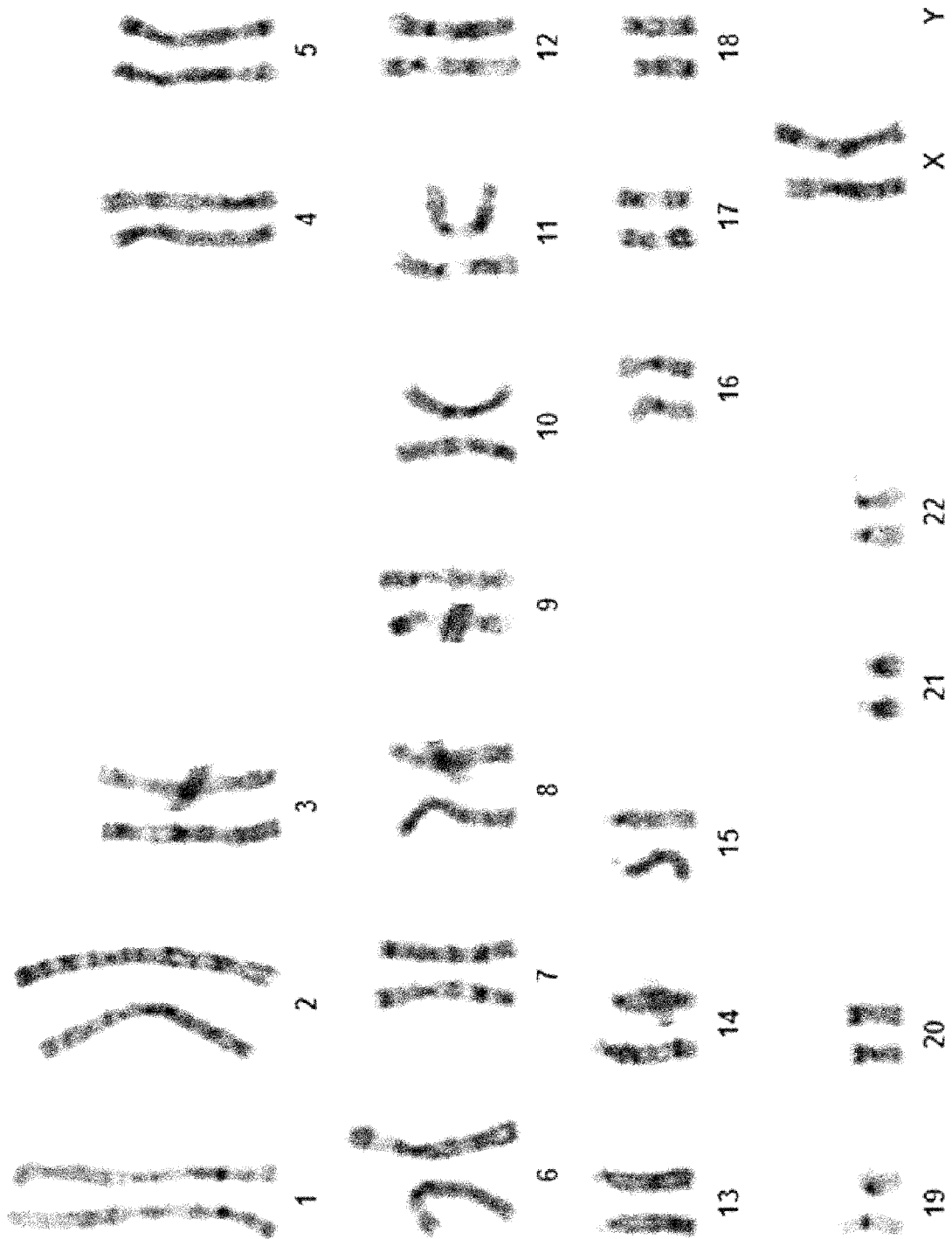
[図4]



[図5]

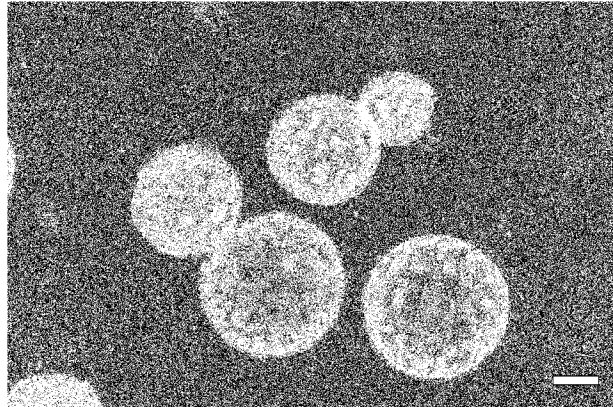


[図6]

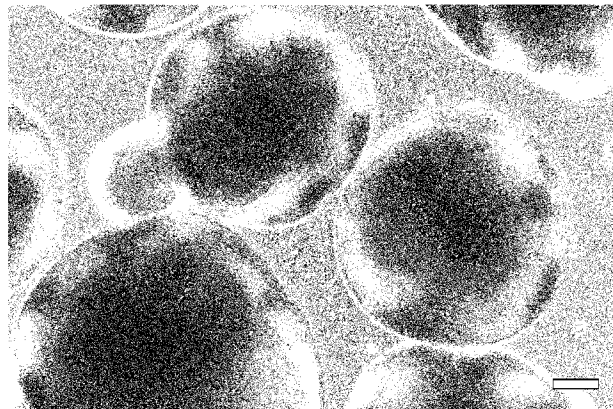


[図7]

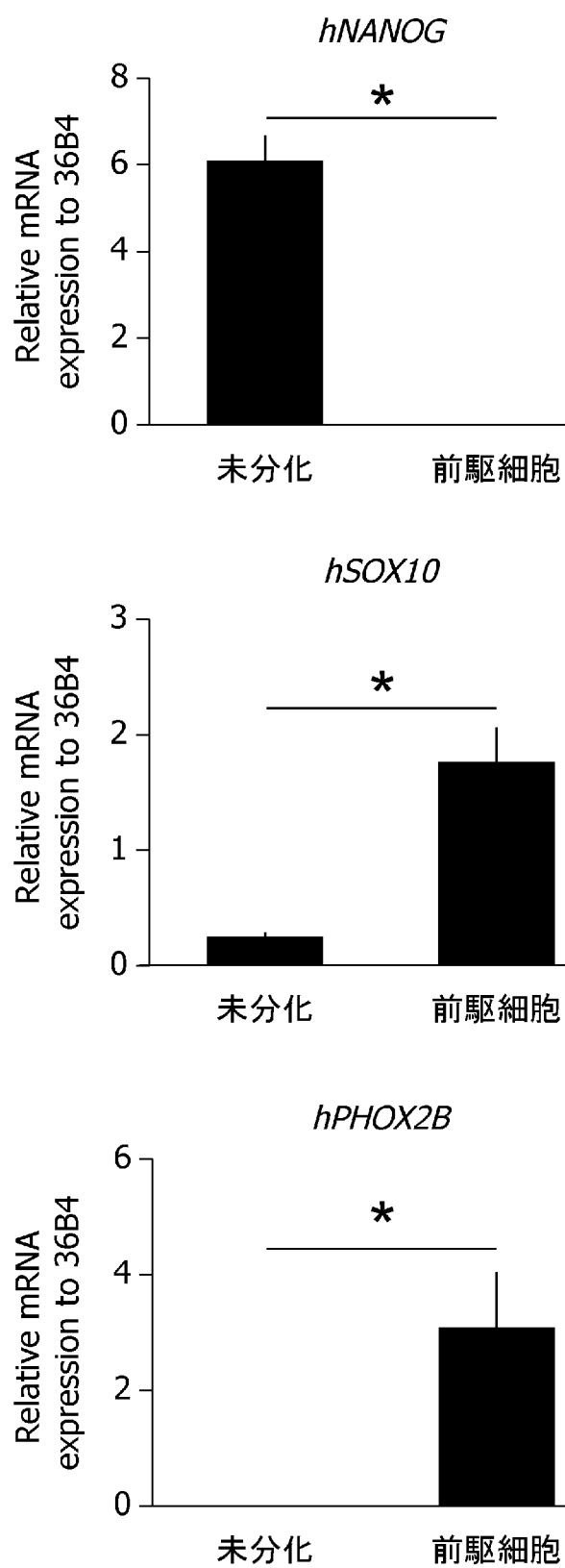
day0



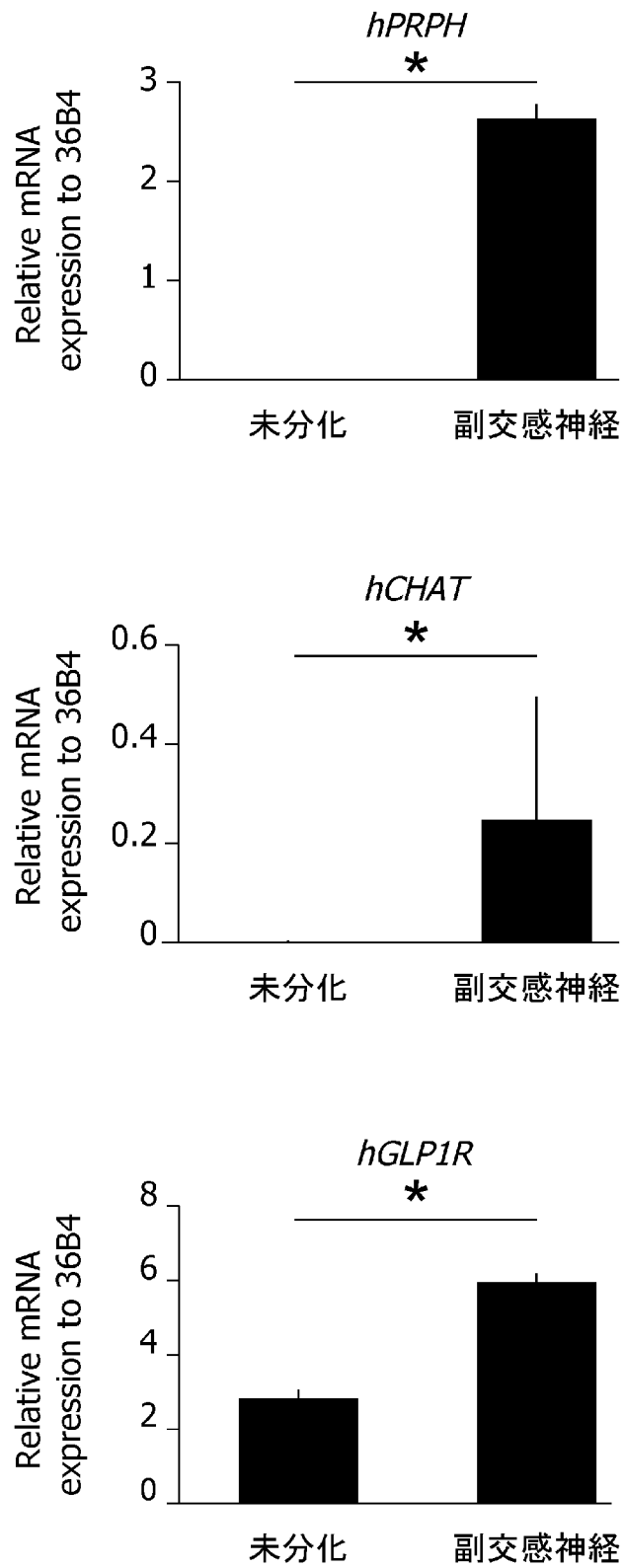
day13



[図8]

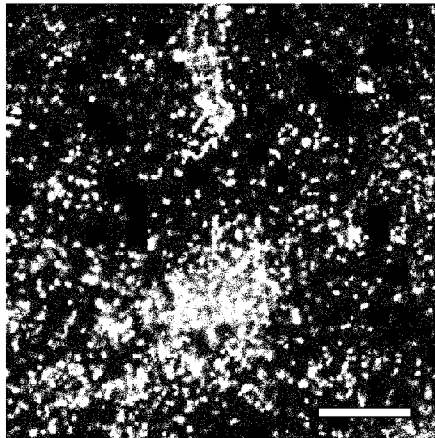


[図9]

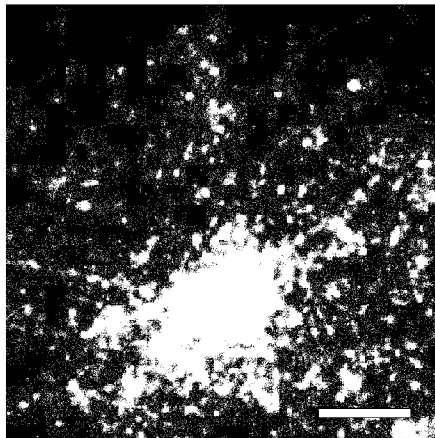


[図10]

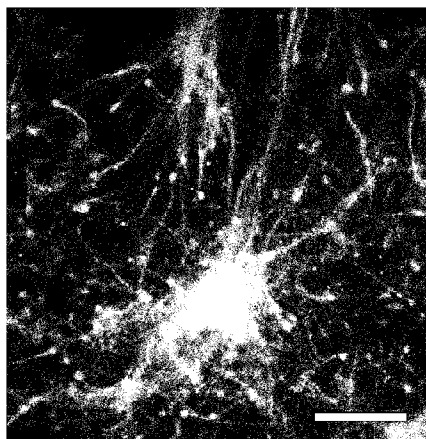
Hoechst



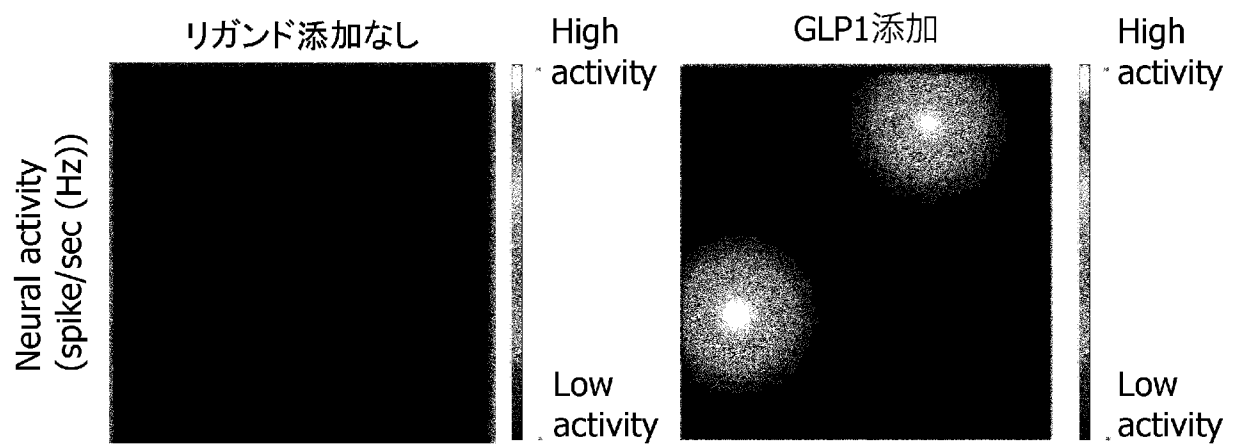
GLP1R



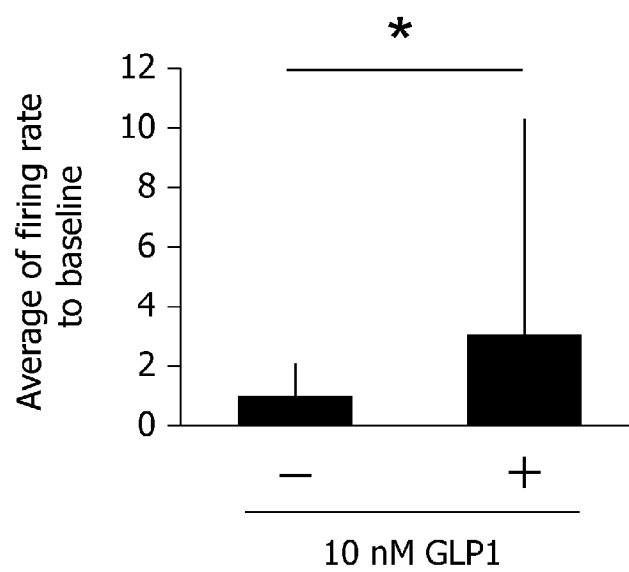
MAP2/GLP1R



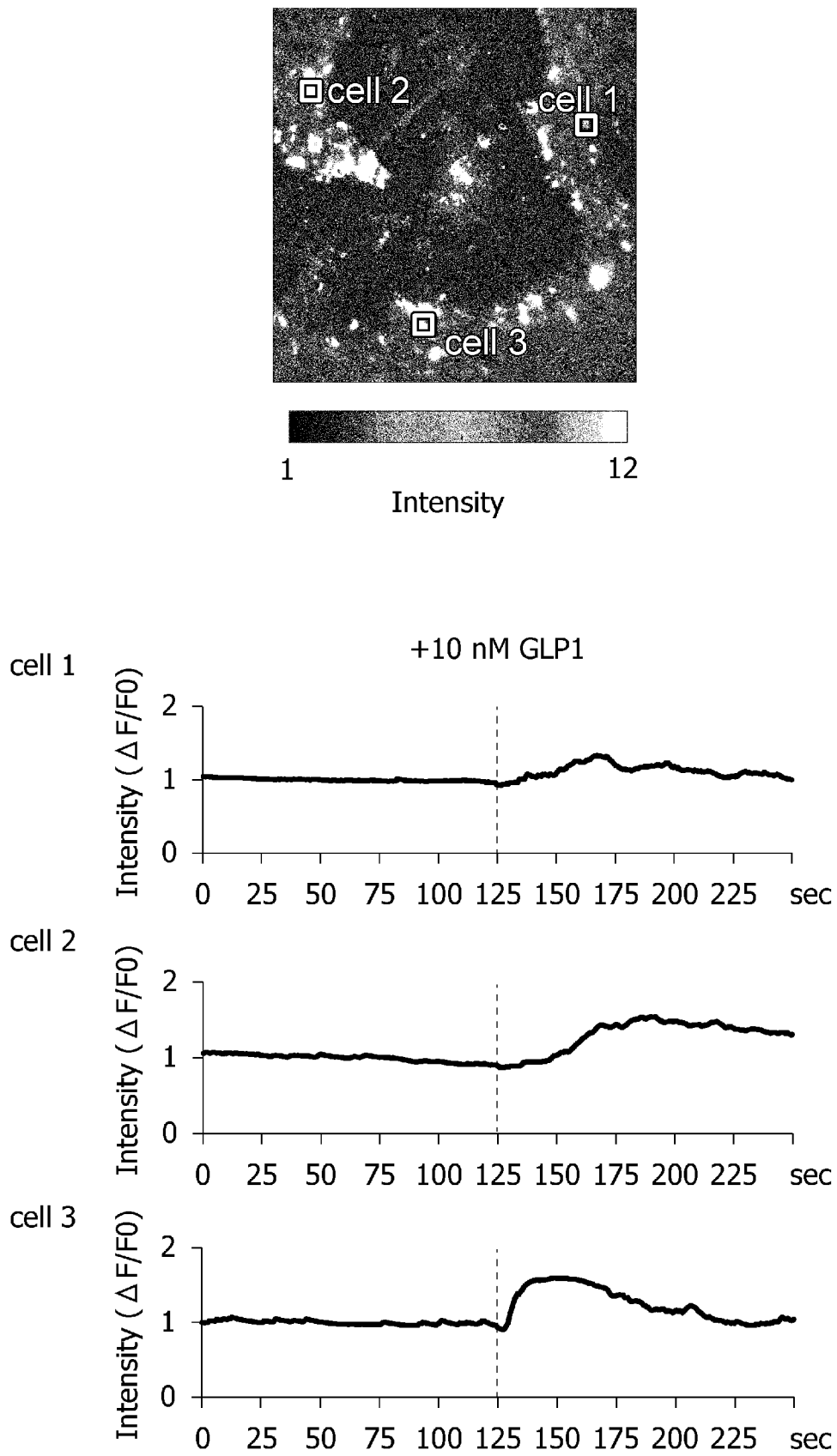
[図11]

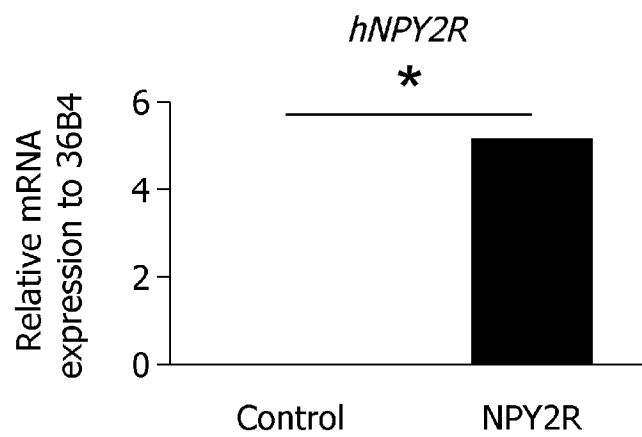


[図12]

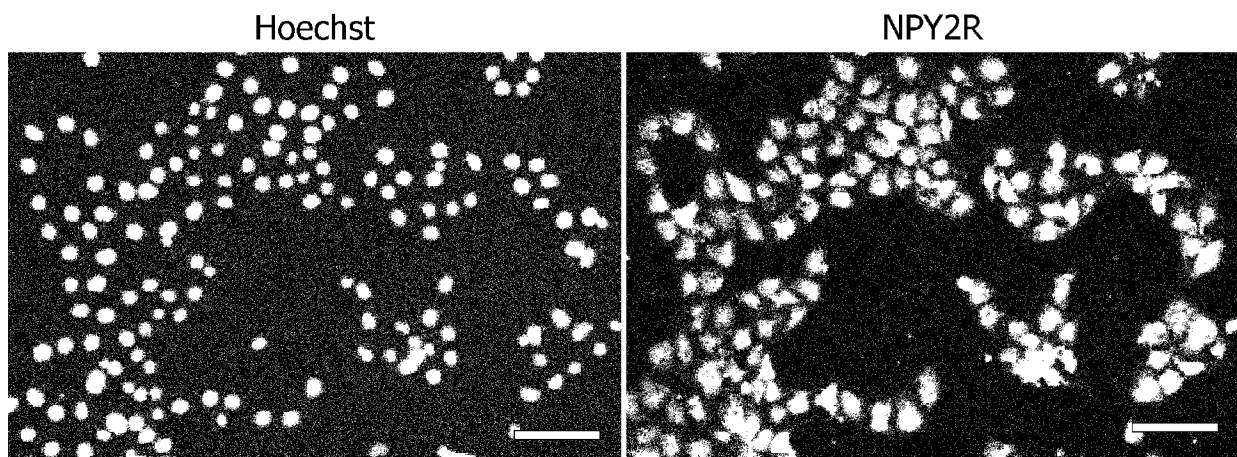


[図13]

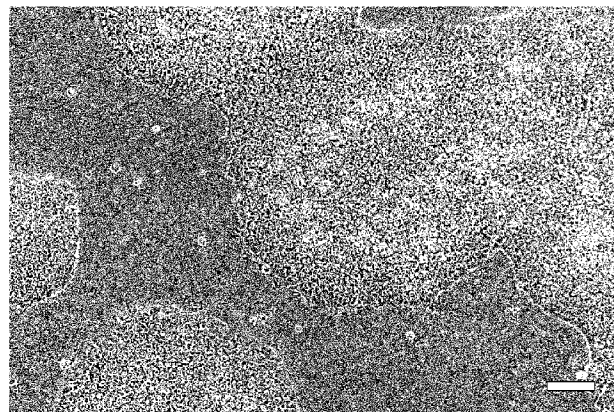




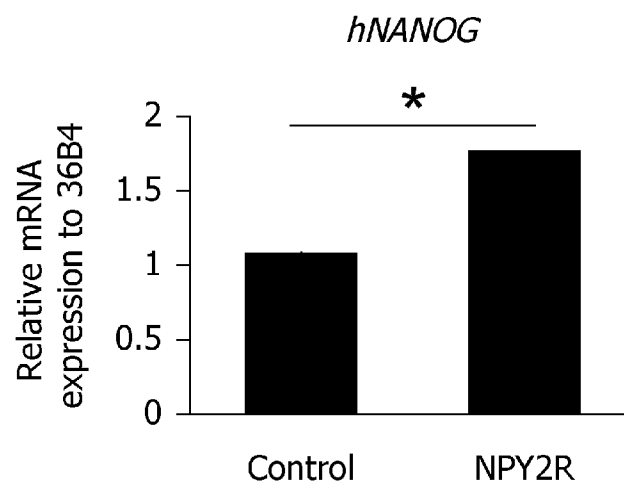
[図17]



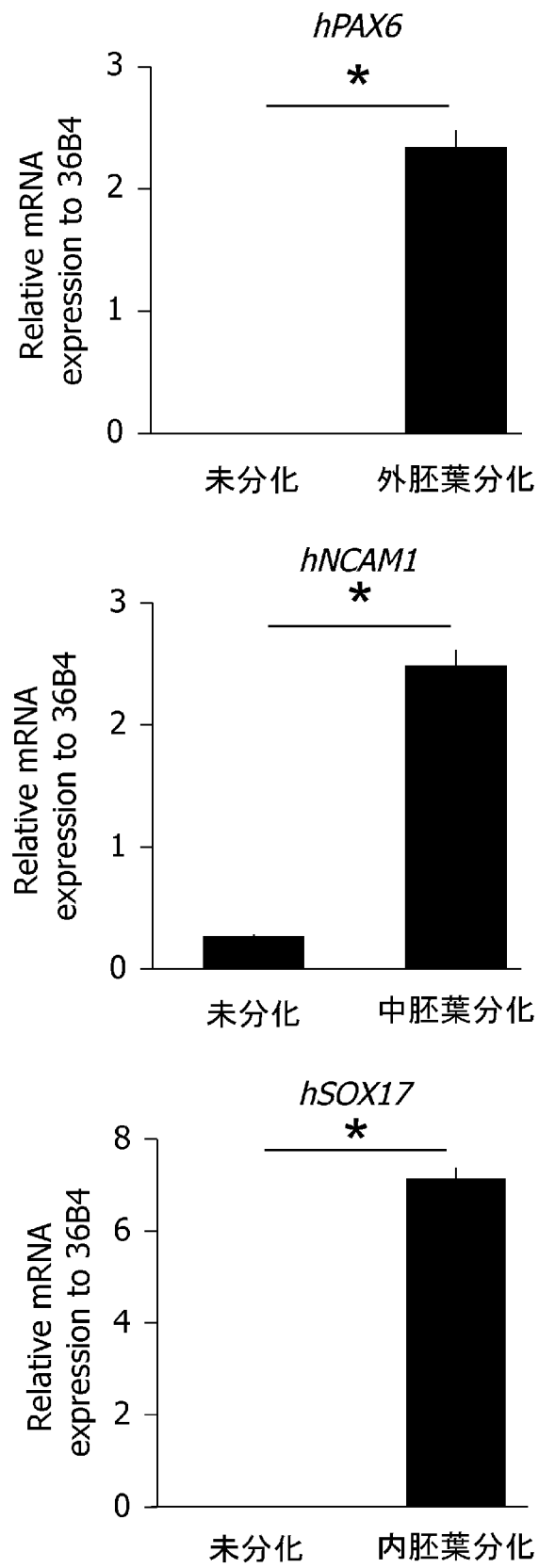
[図18]



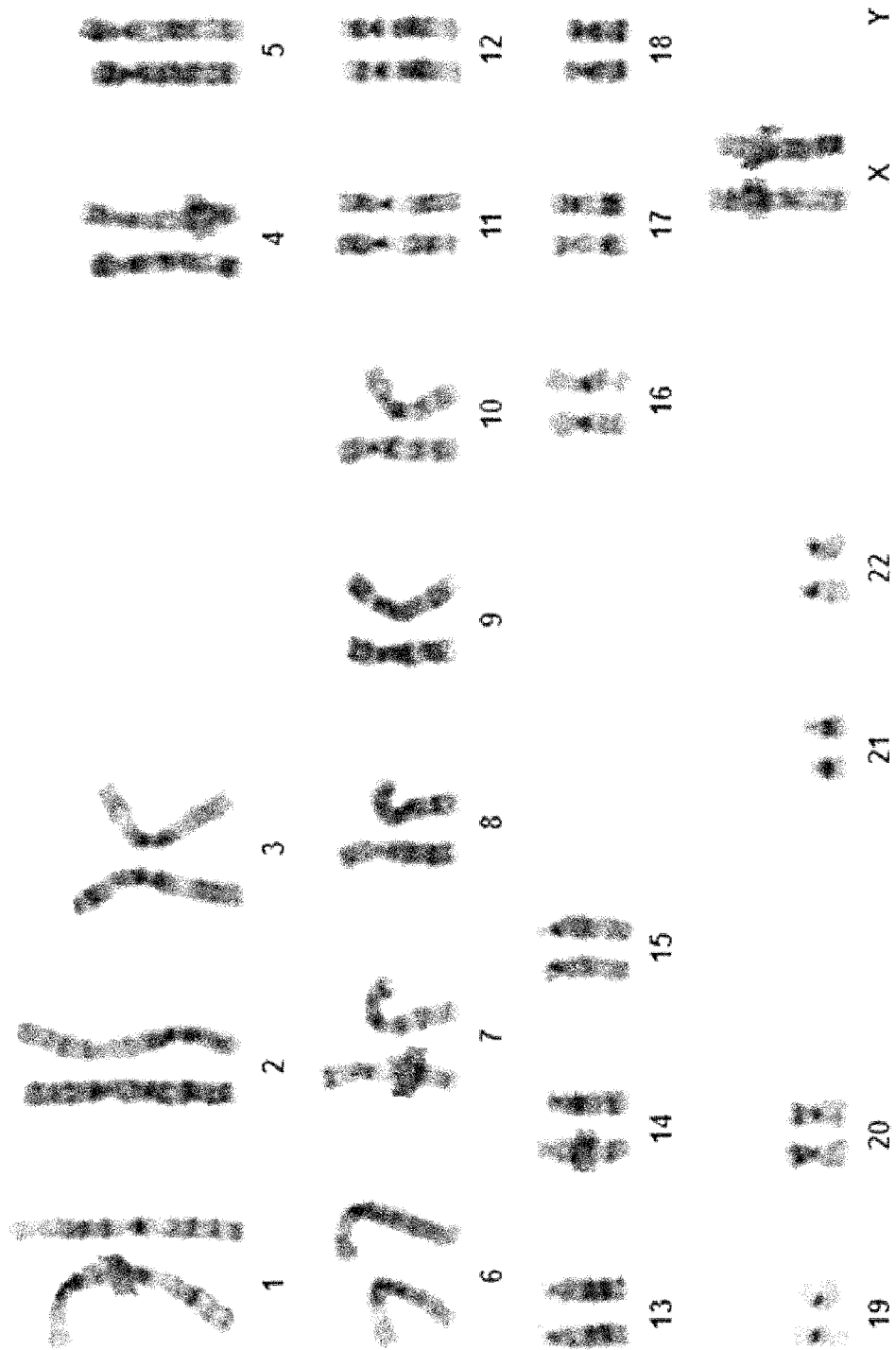
[図19]



[図20]

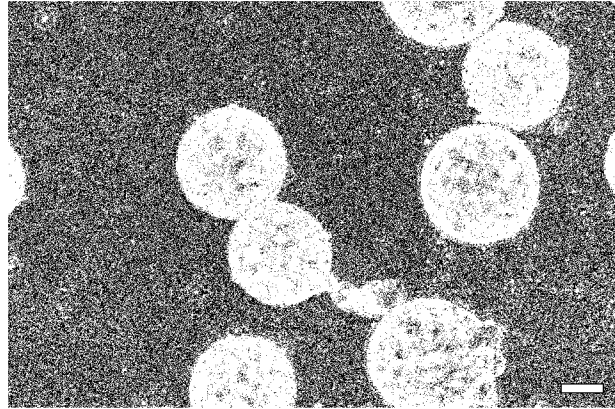


[図21]

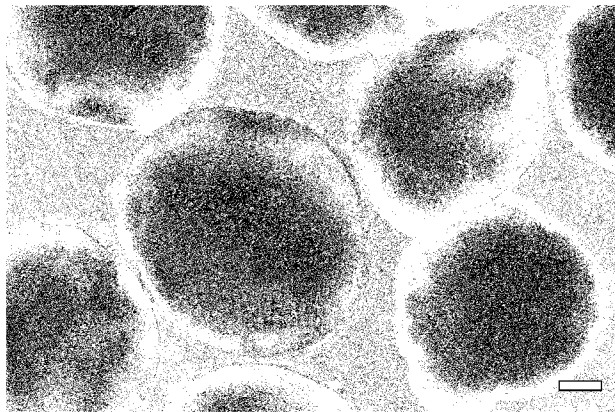


[図22]

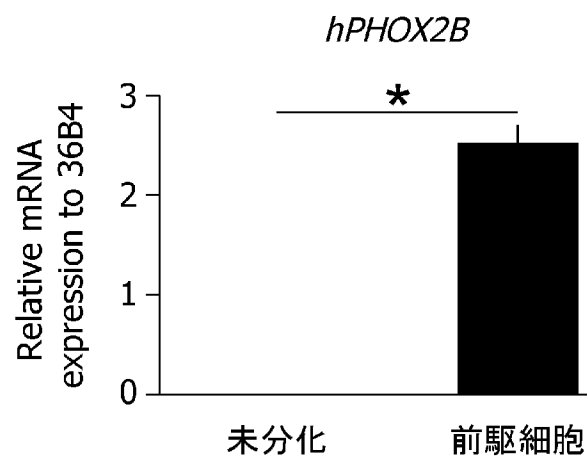
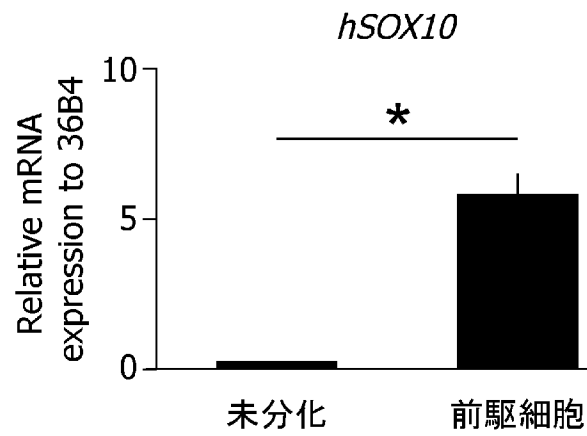
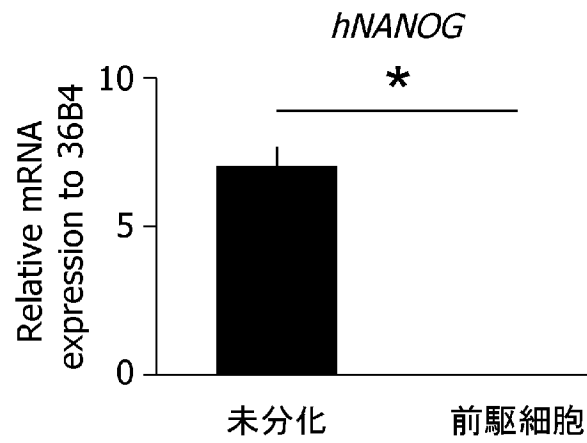
day0



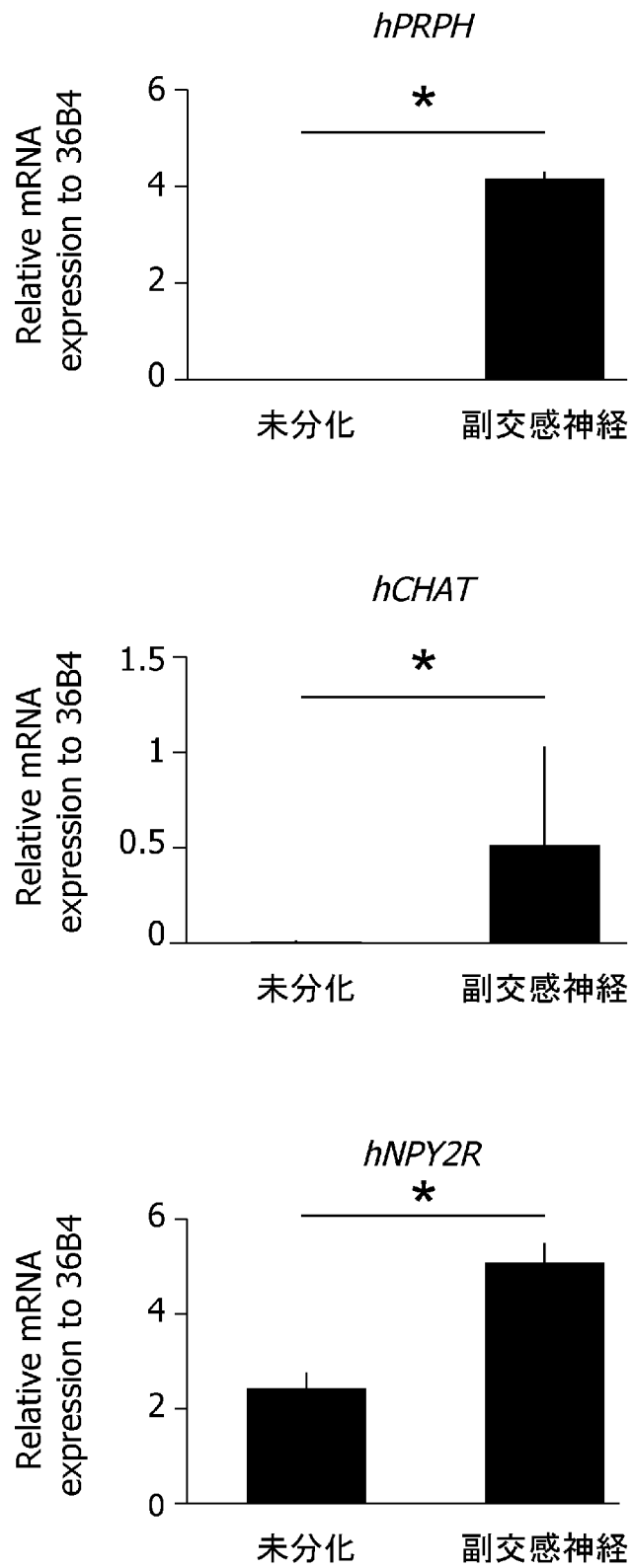
day13



[図23]

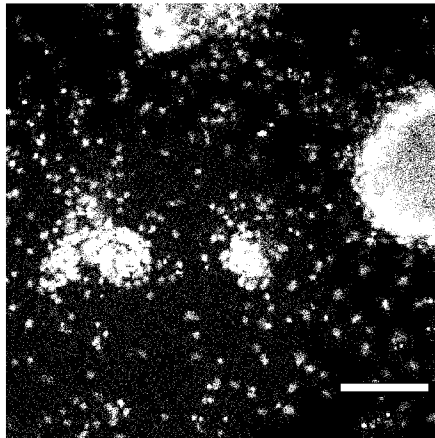


[図24]

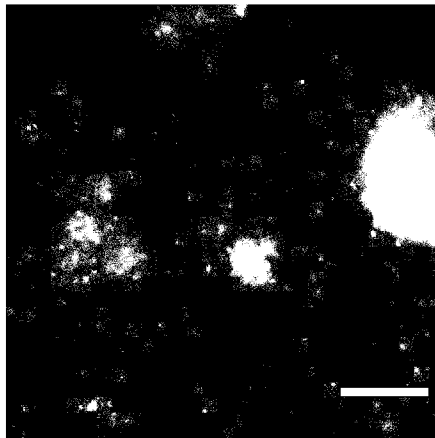


[図25]

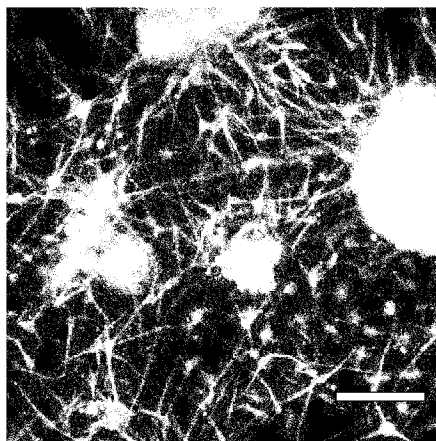
Hoechst



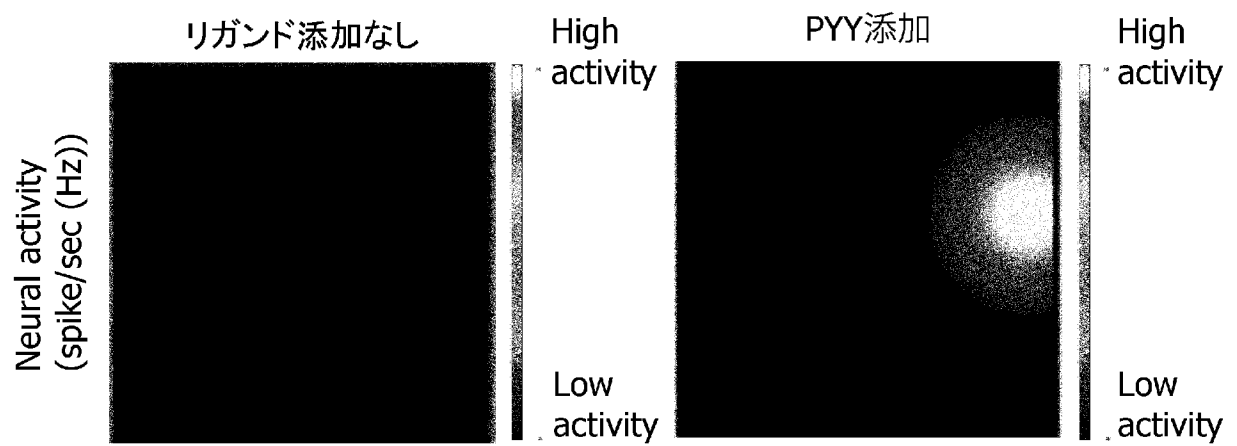
NPY2R



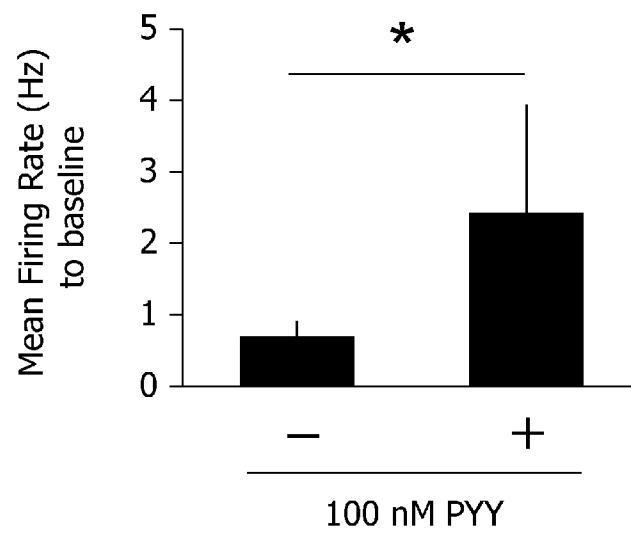
MAP2/NPY2R



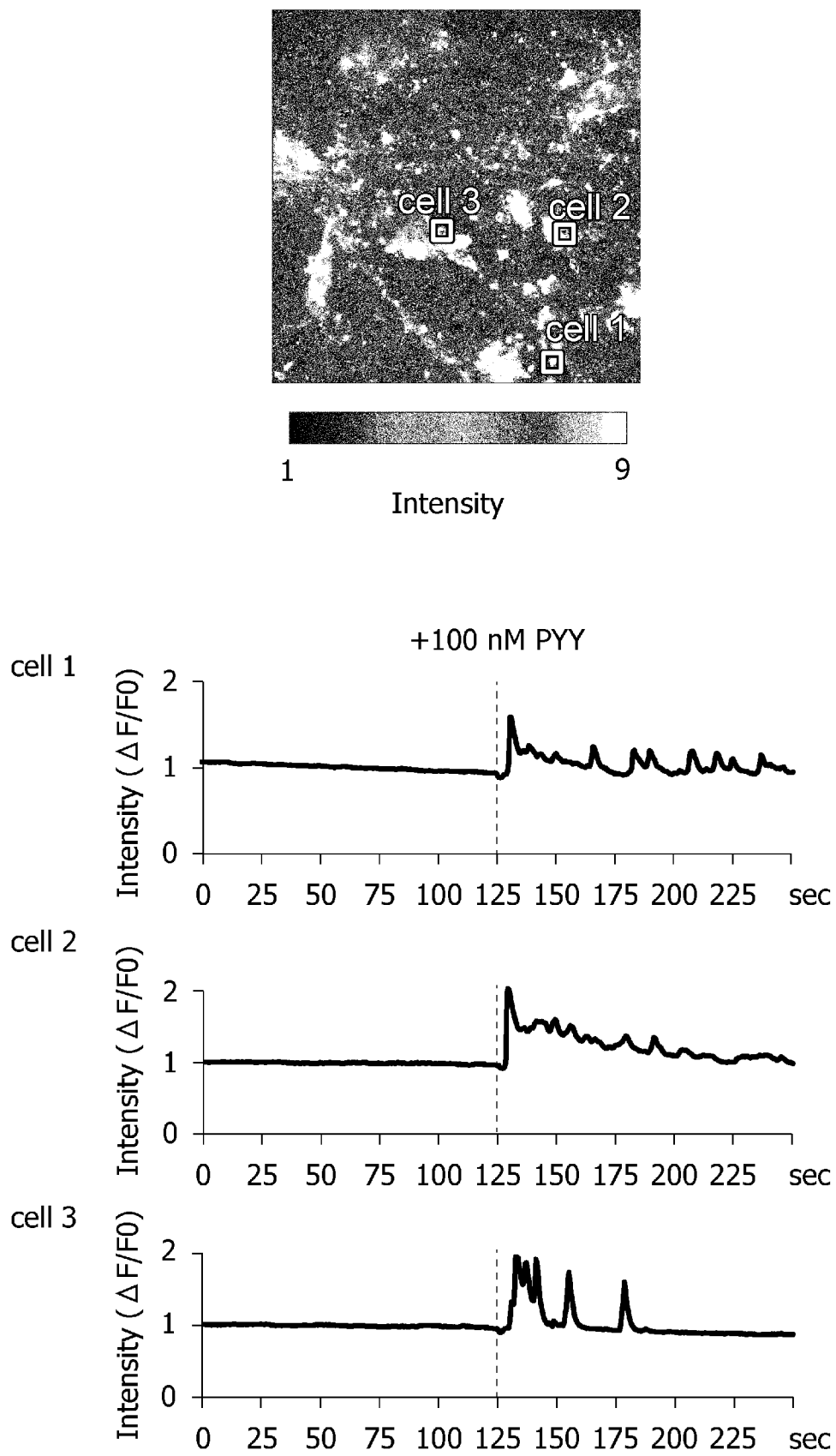
[図26]



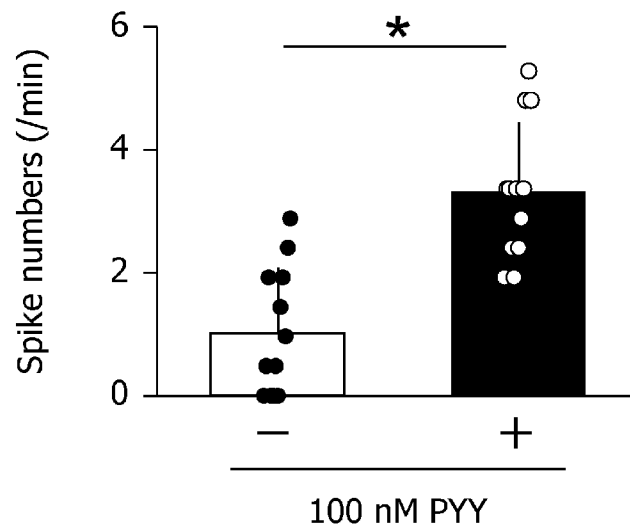
[図27]



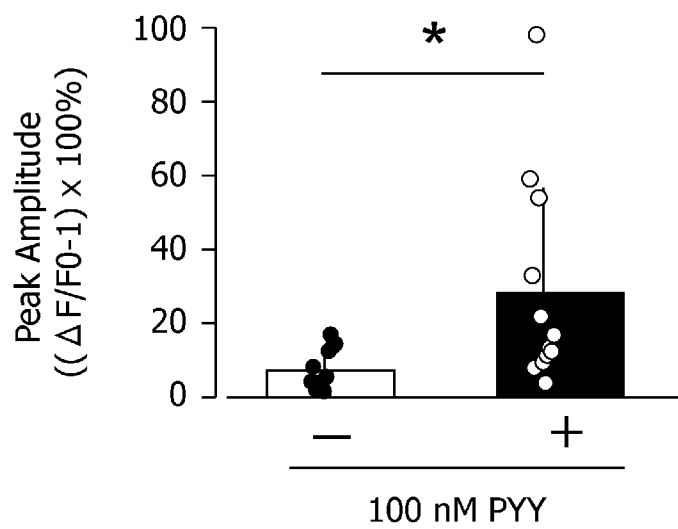
[図28]



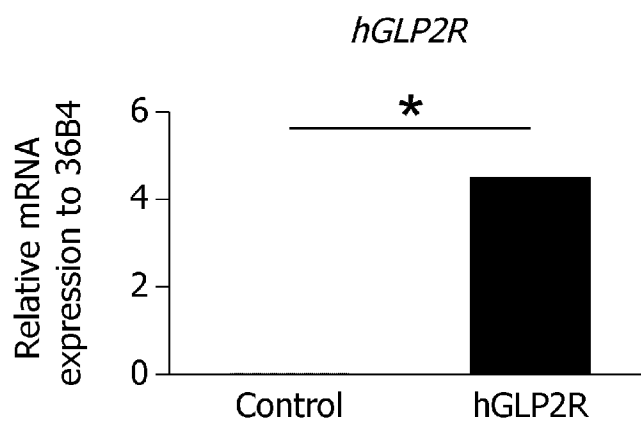
[図29]



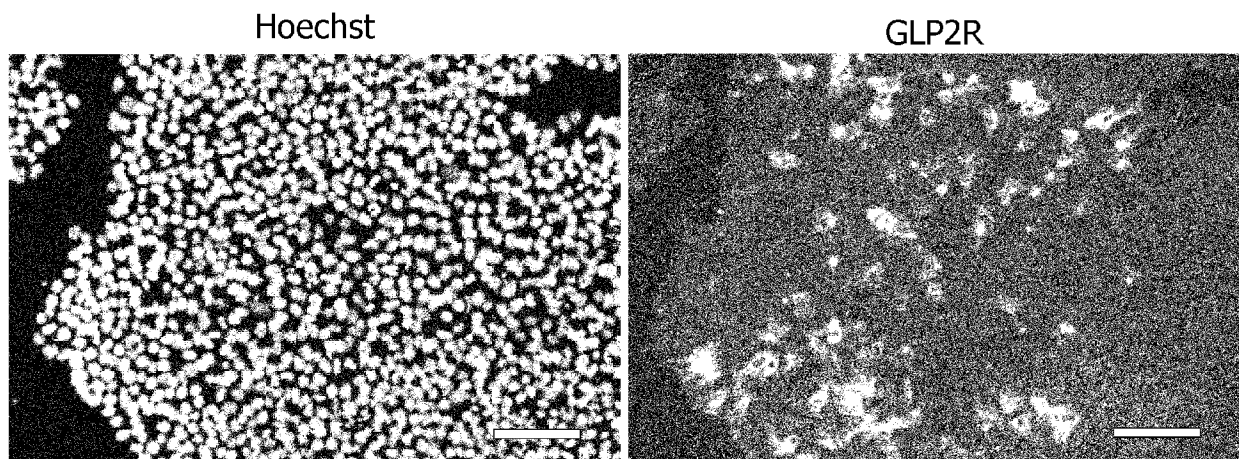
[図30]



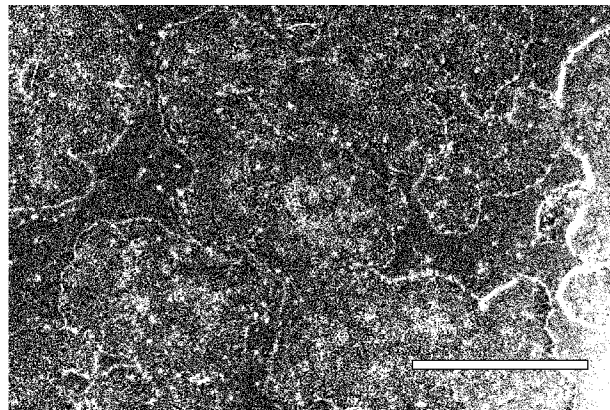
[図31]



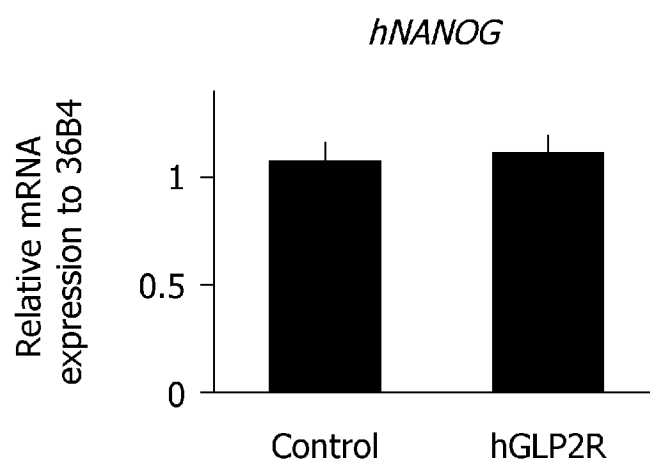
[図32]



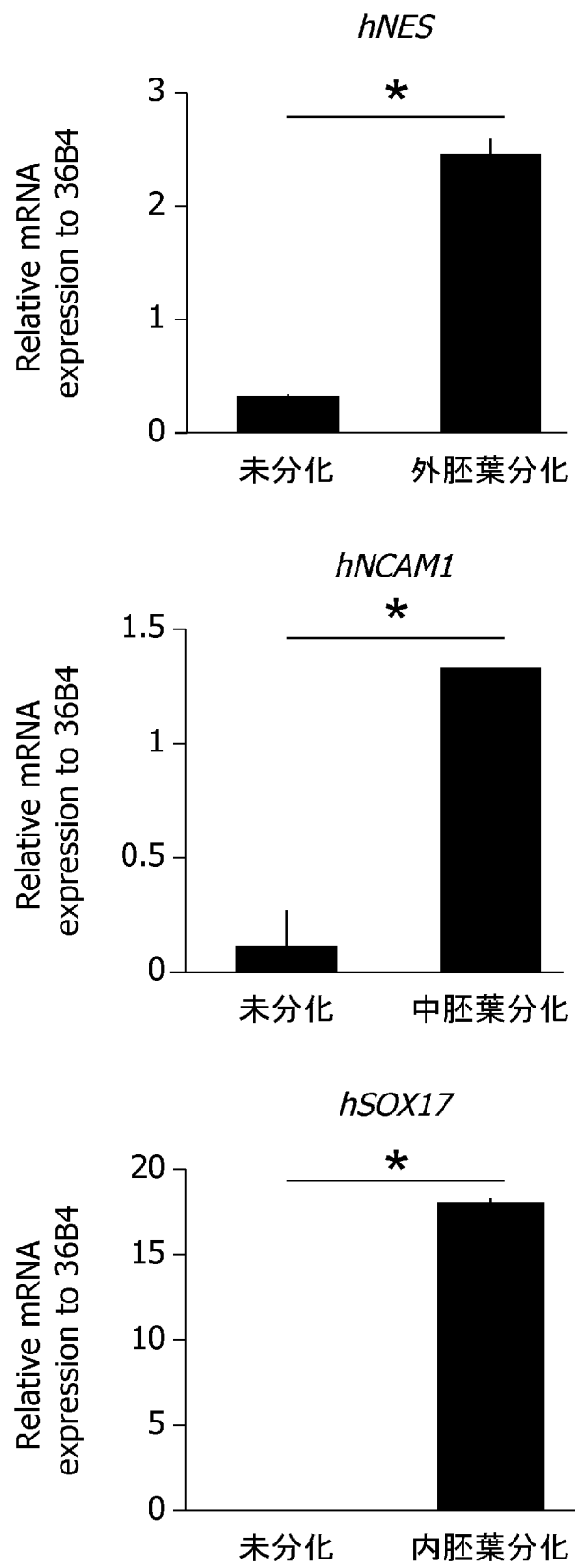
[図33]



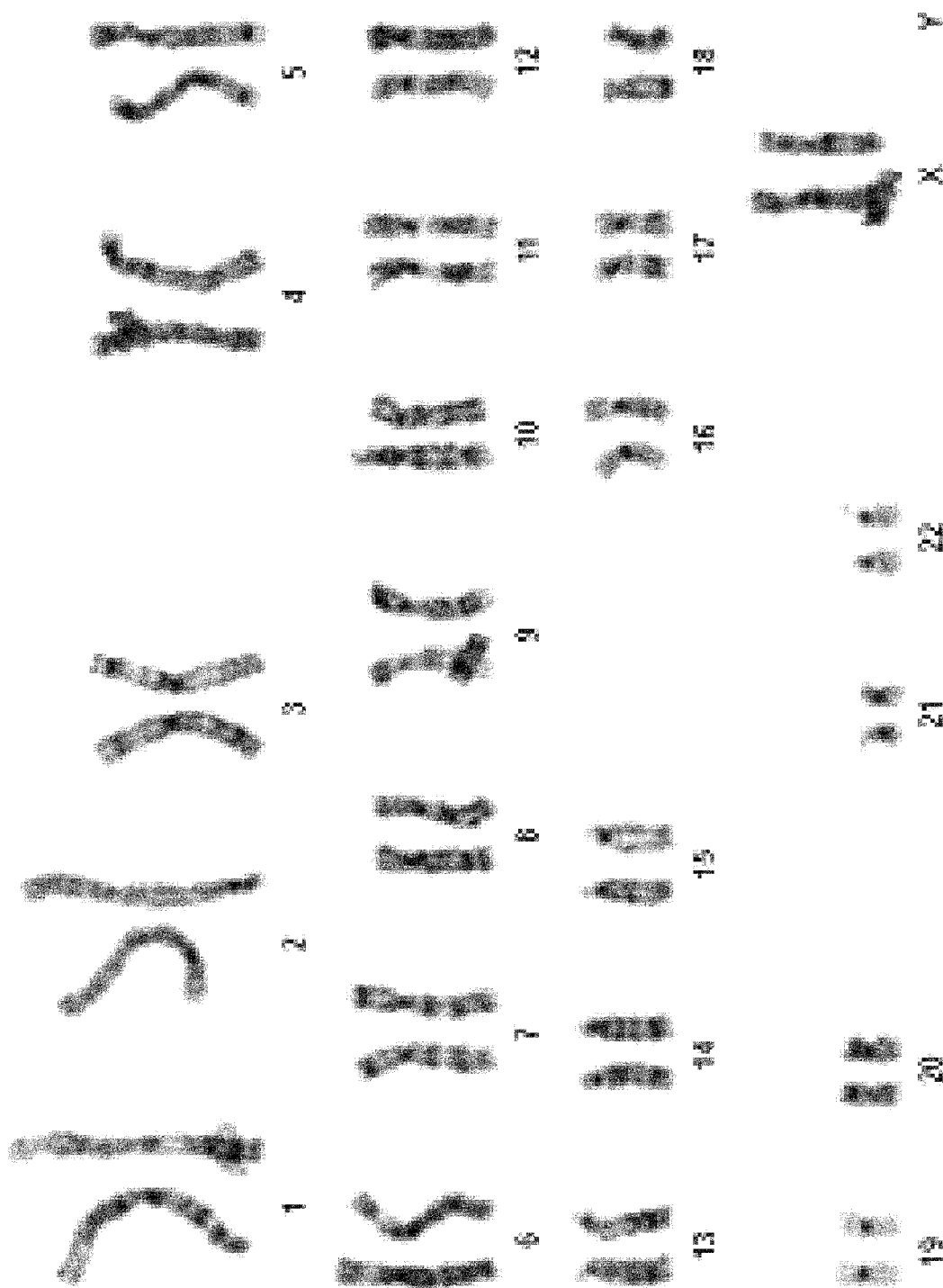
[図34]



[図35]

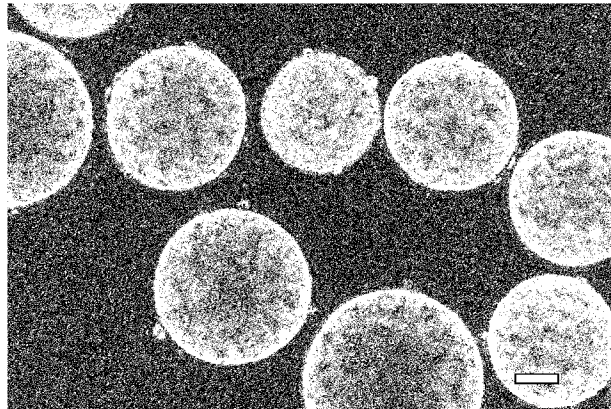


[図36]

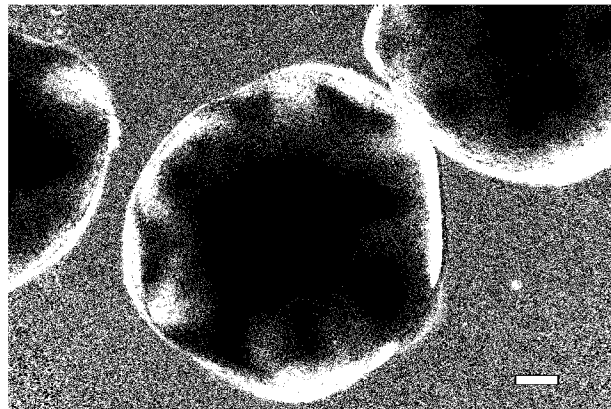


[図37]

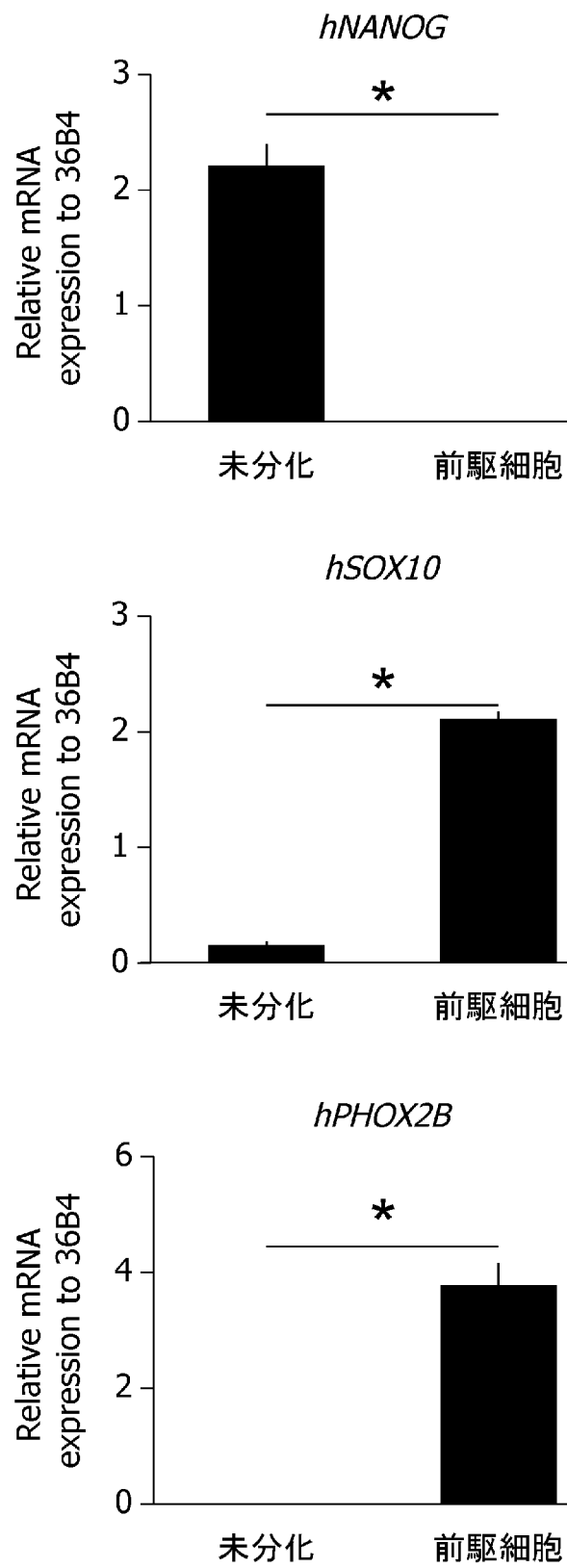
day0



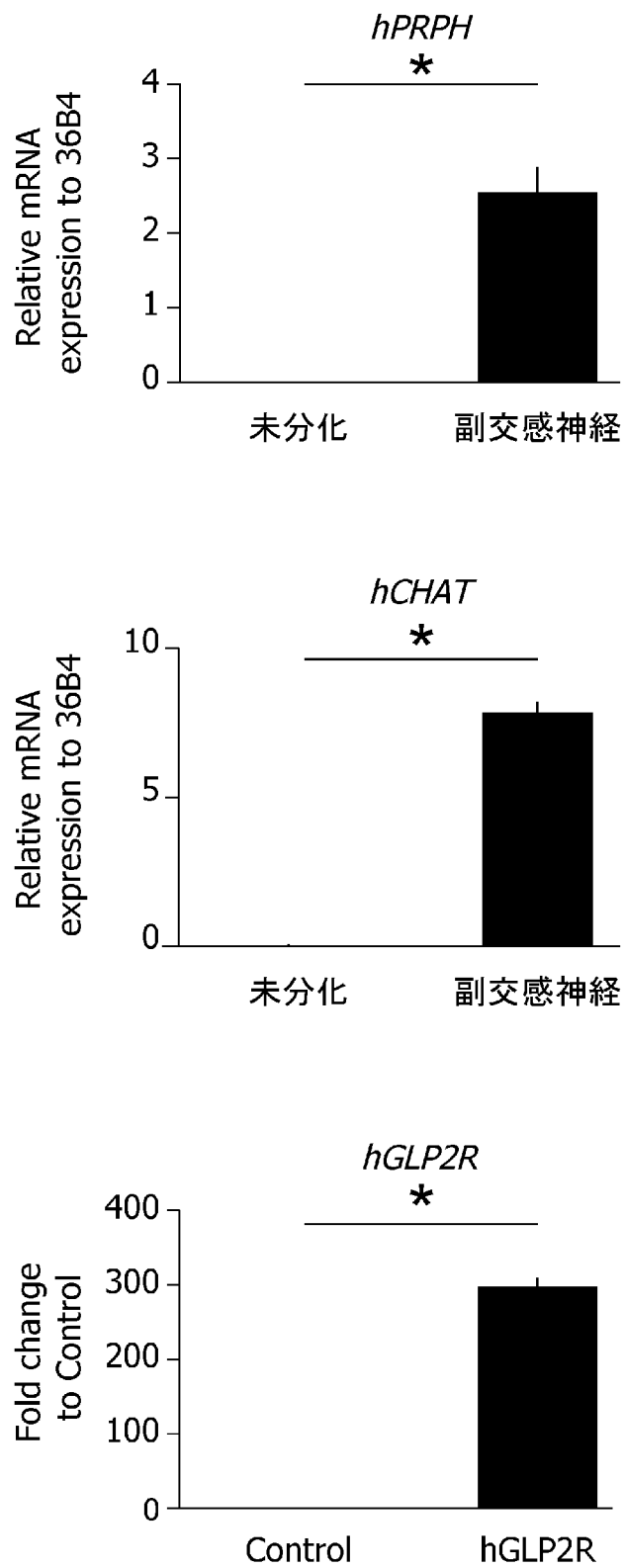
day13



[図38]

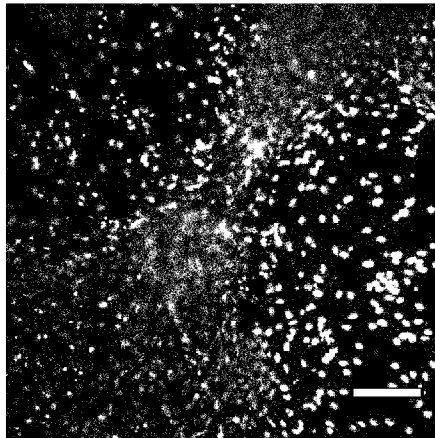


[図39]

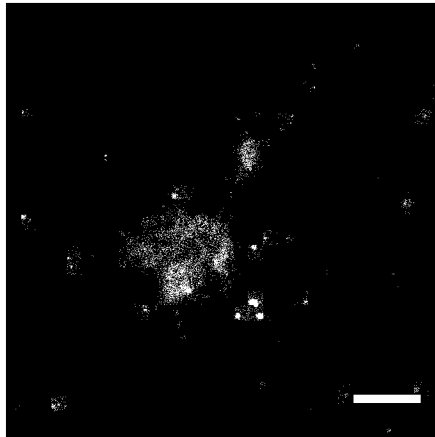


[図40]

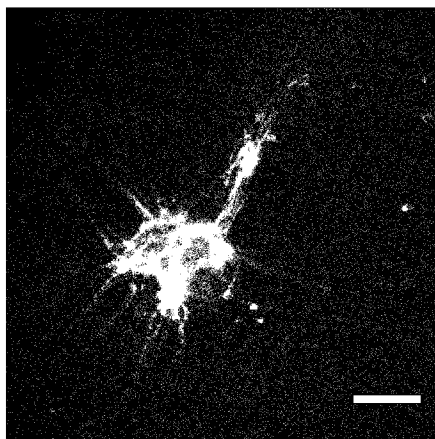
Hoechst



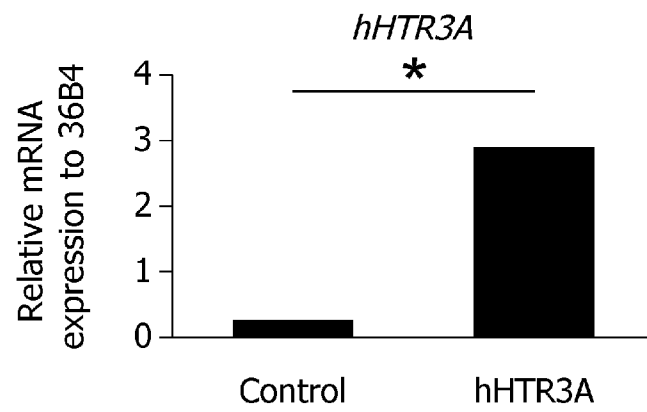
GLP2R



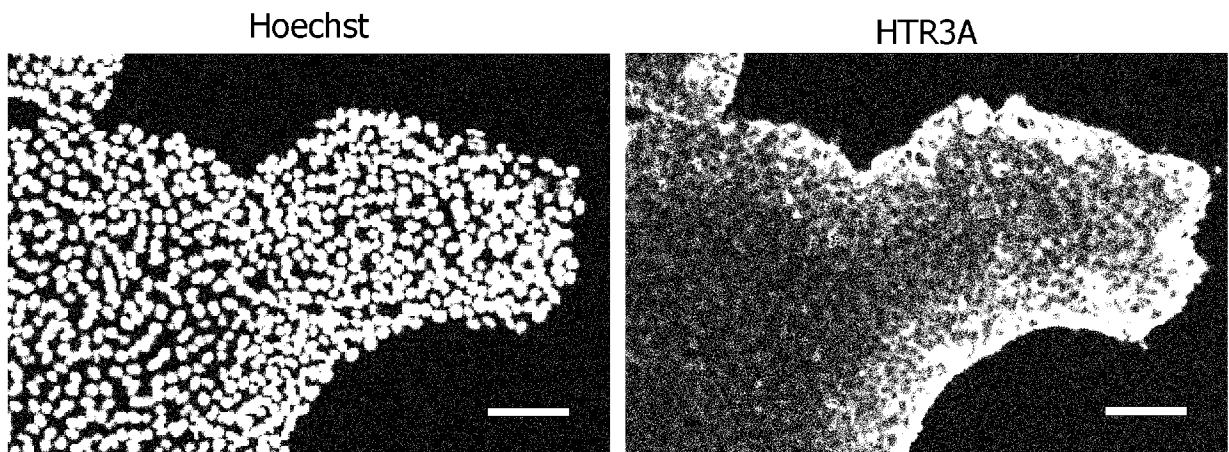
GLP2R/MAP2



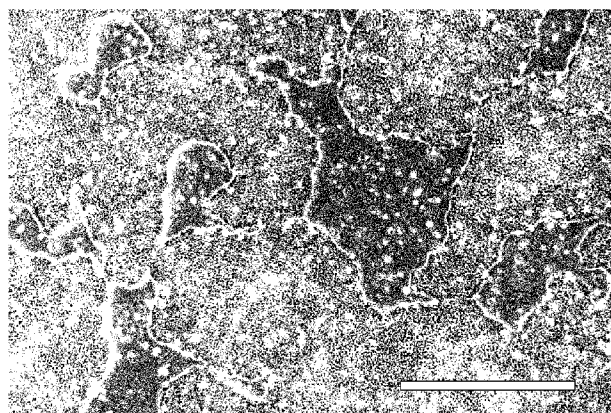
[図41]



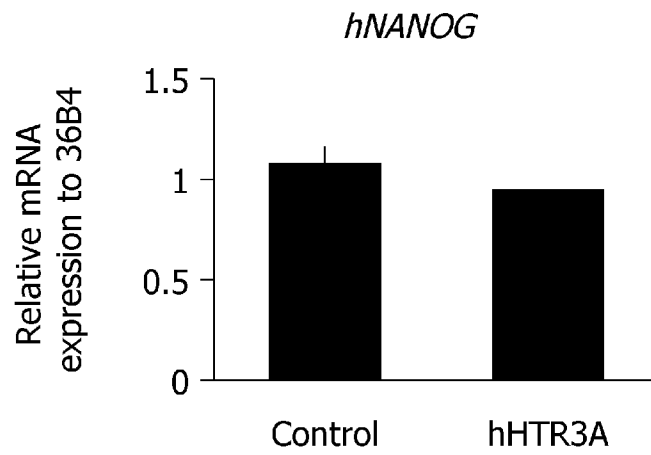
[図42]



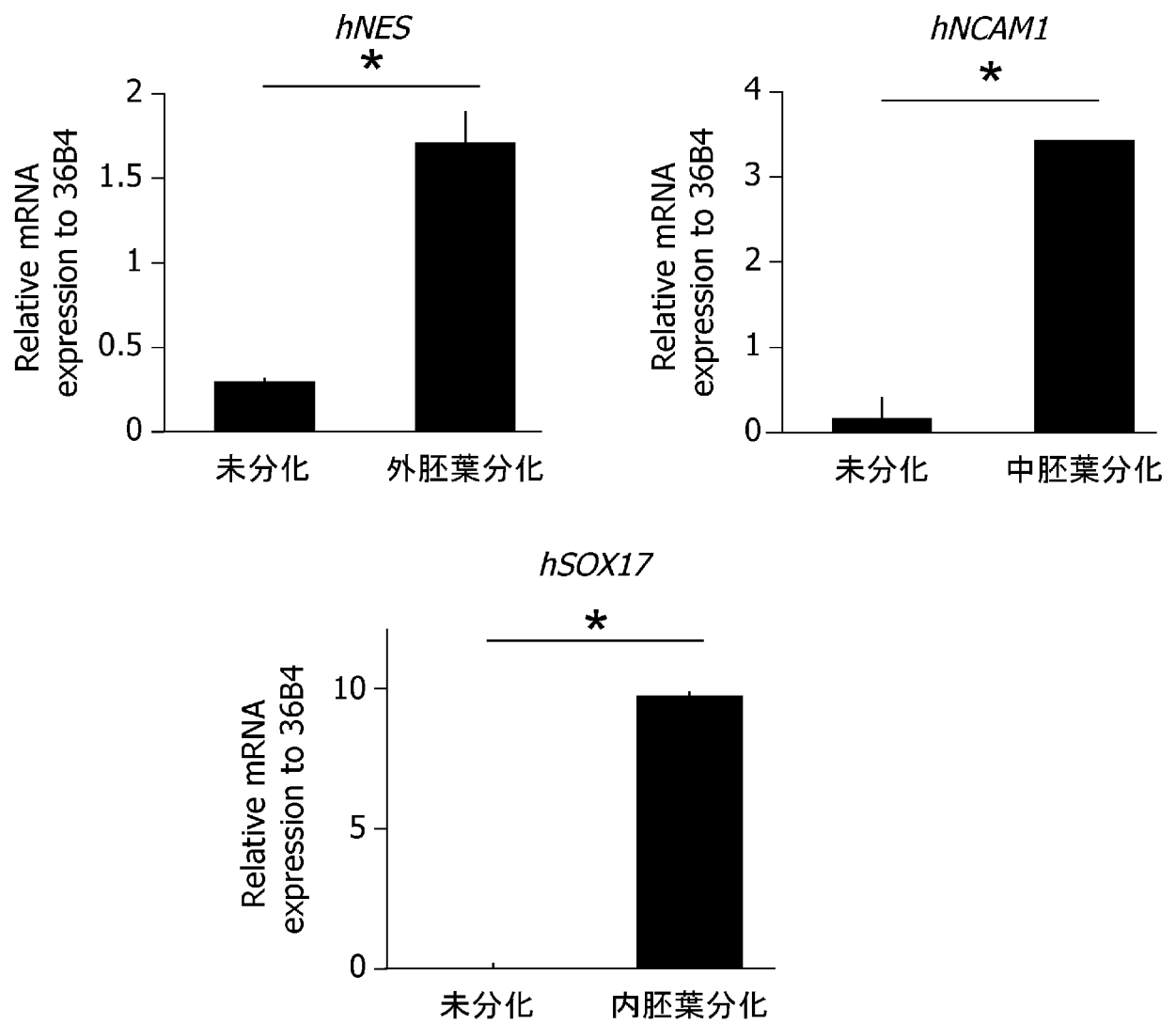
[図43]



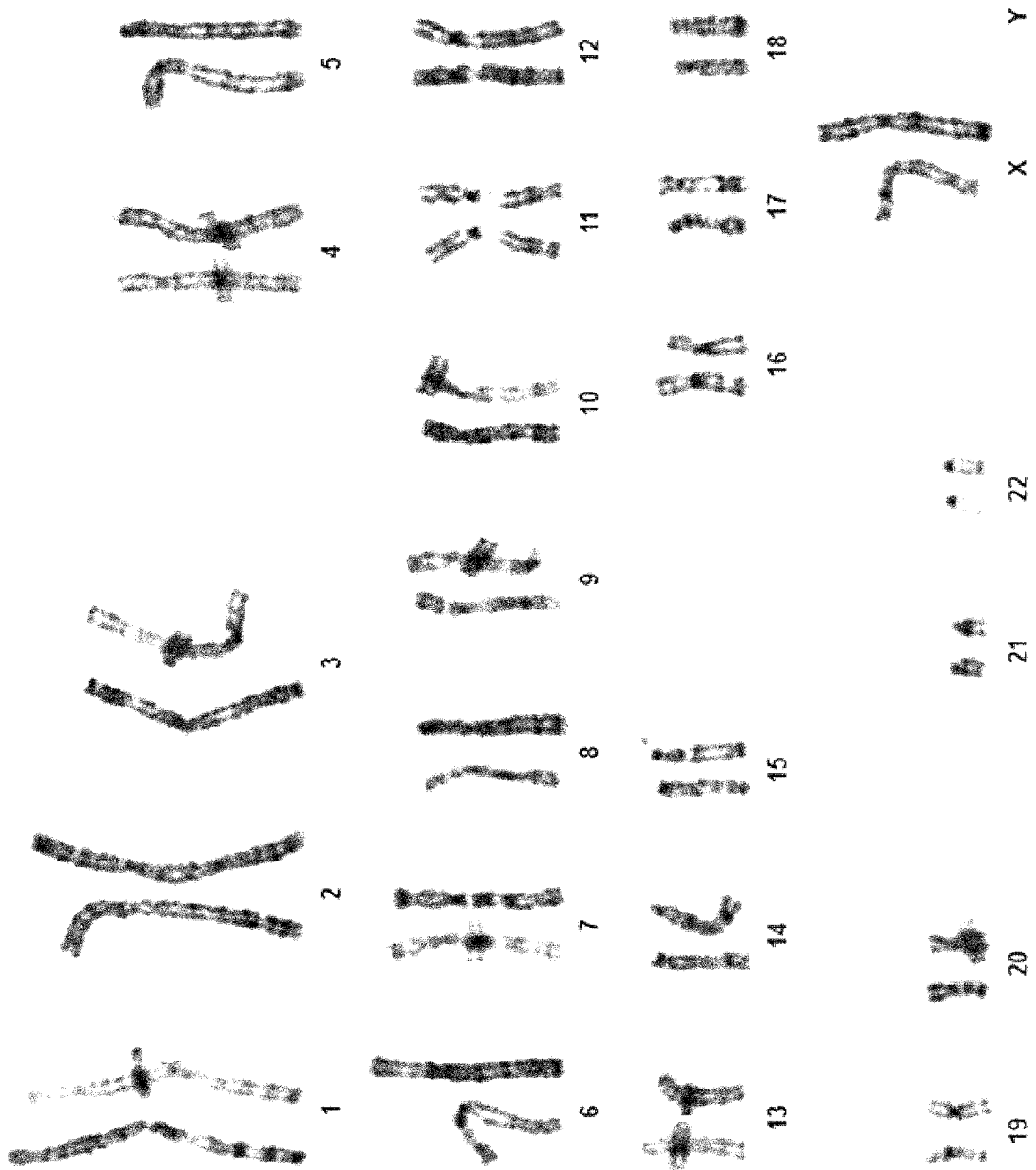
[図44]



[図45]

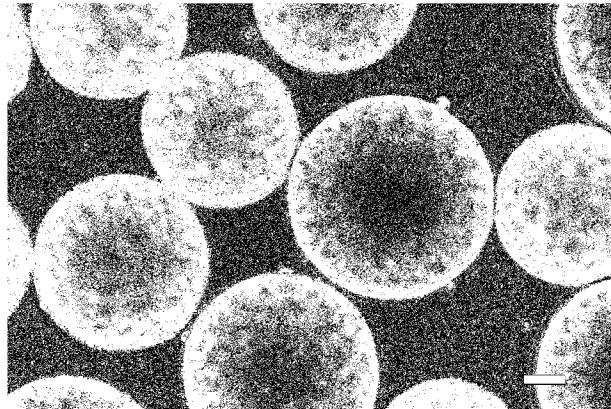


[図46]

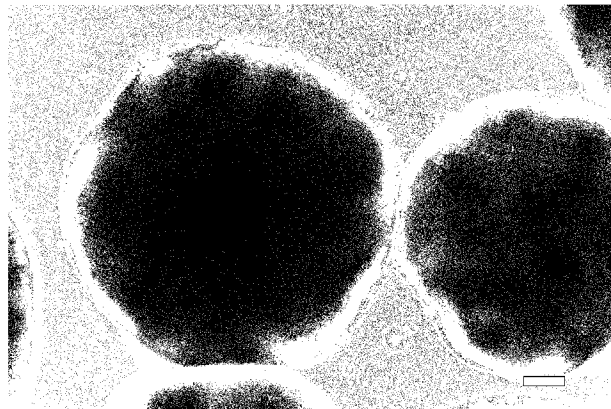


[図47]

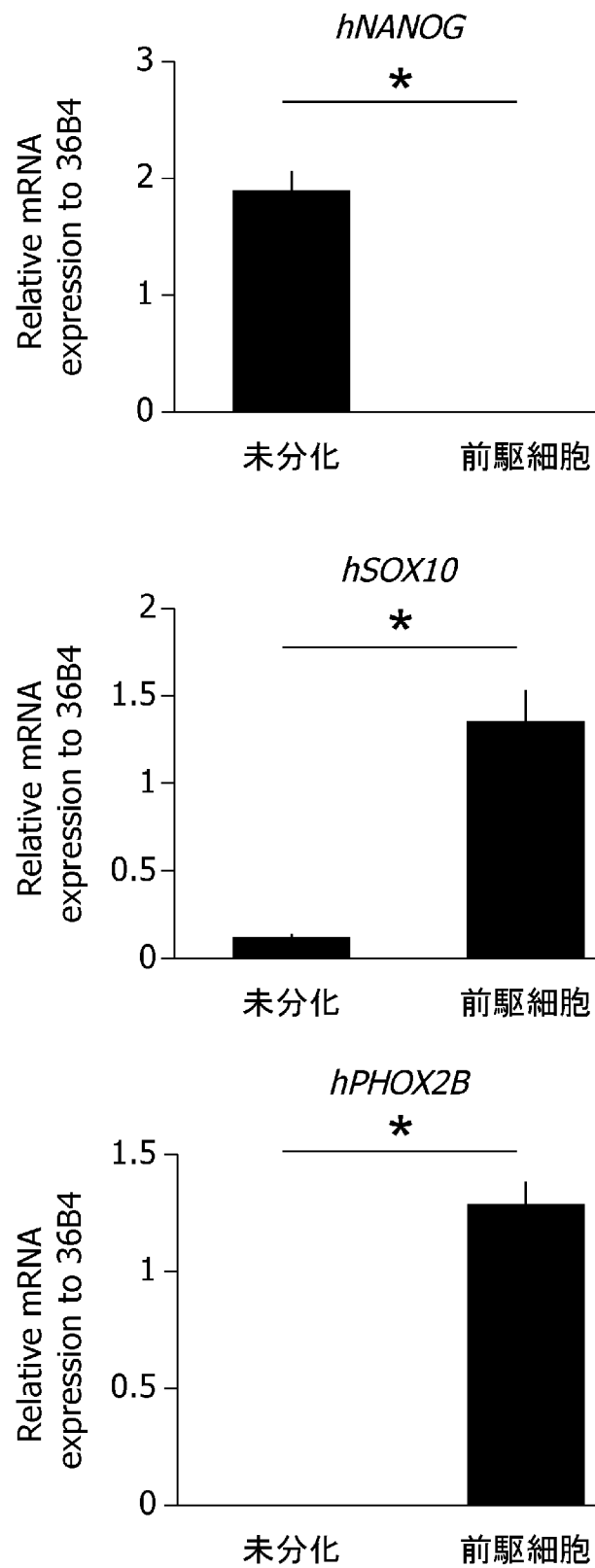
day0



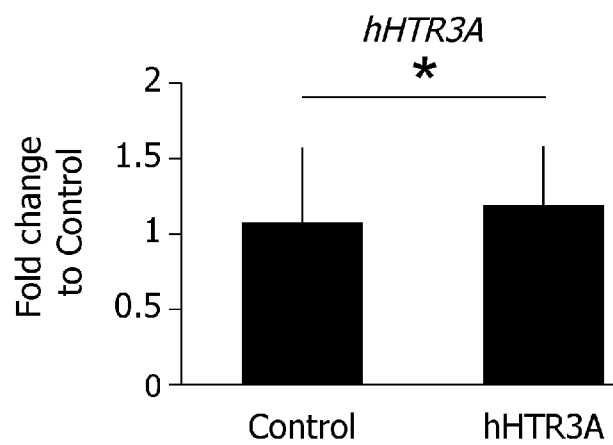
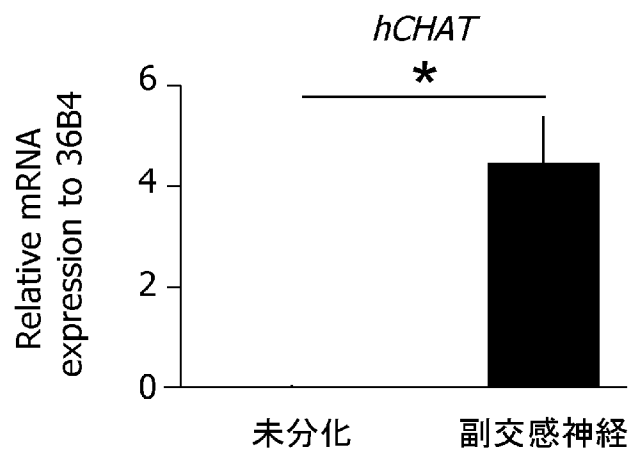
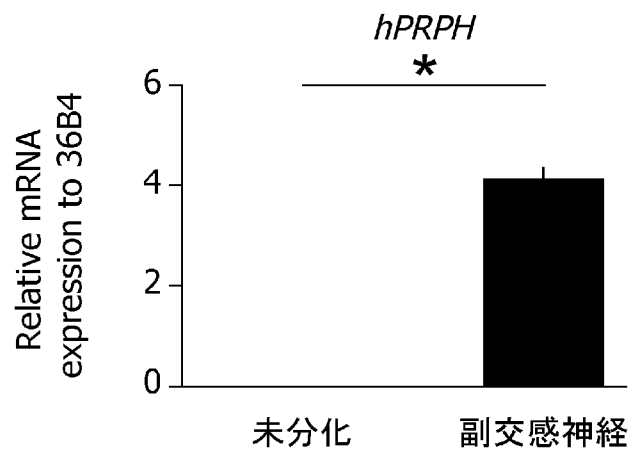
day13



[図48]

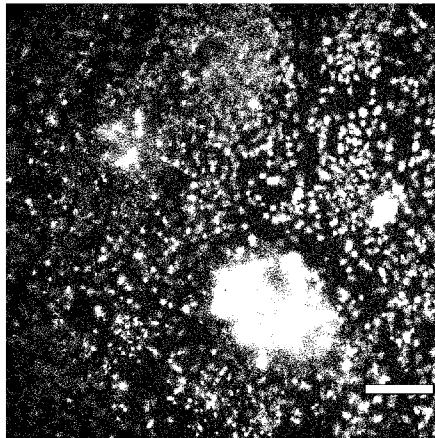


[図49]

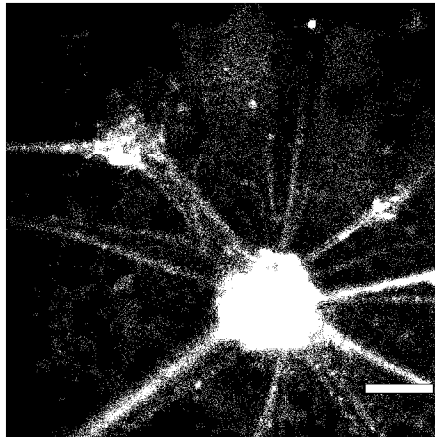


[図50]

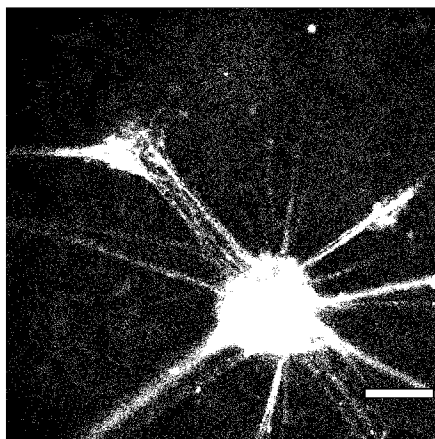
Hoechst



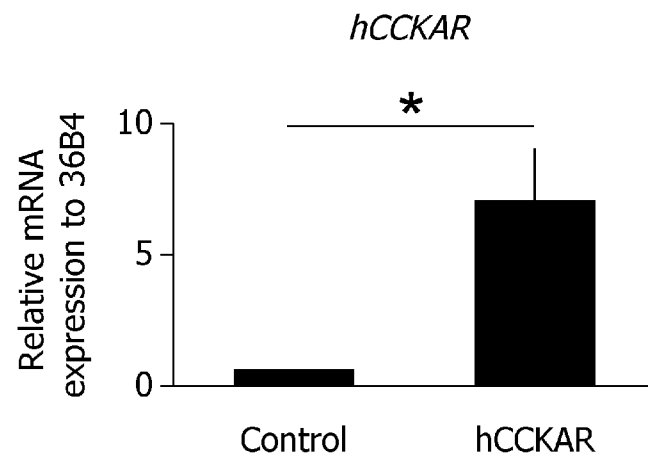
HTR3A



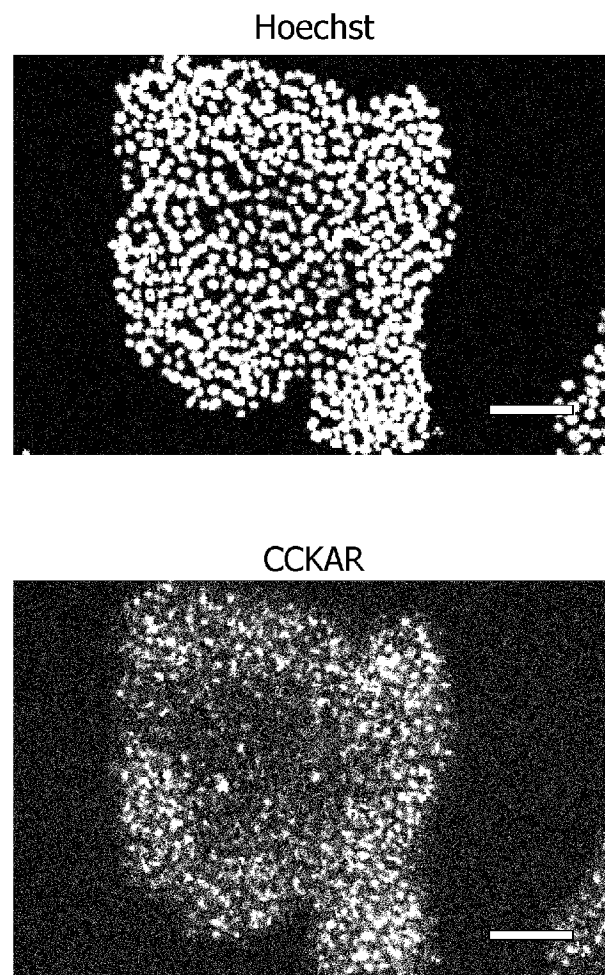
HTR3A/MAP2



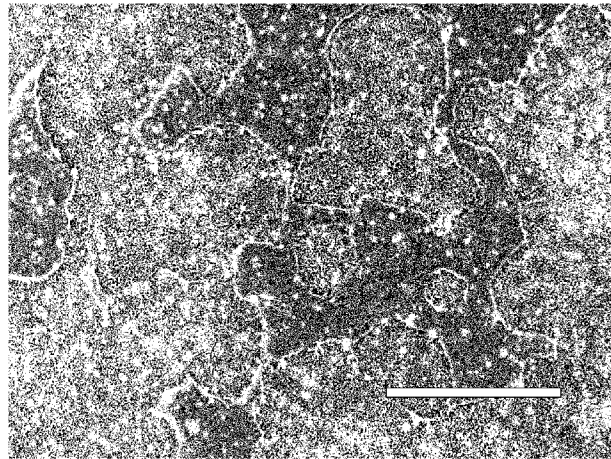
[図51]



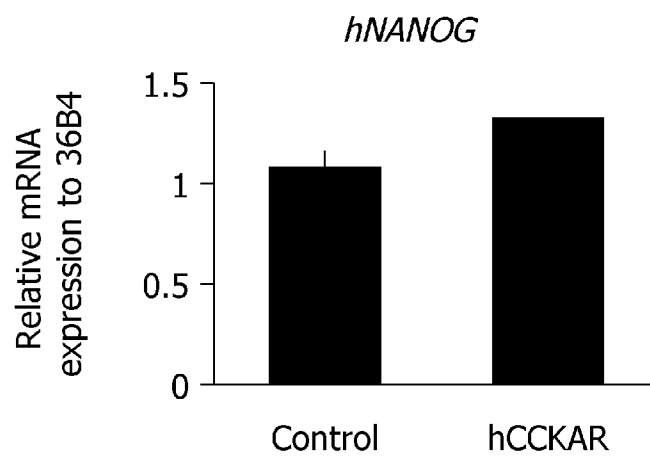
[図52]



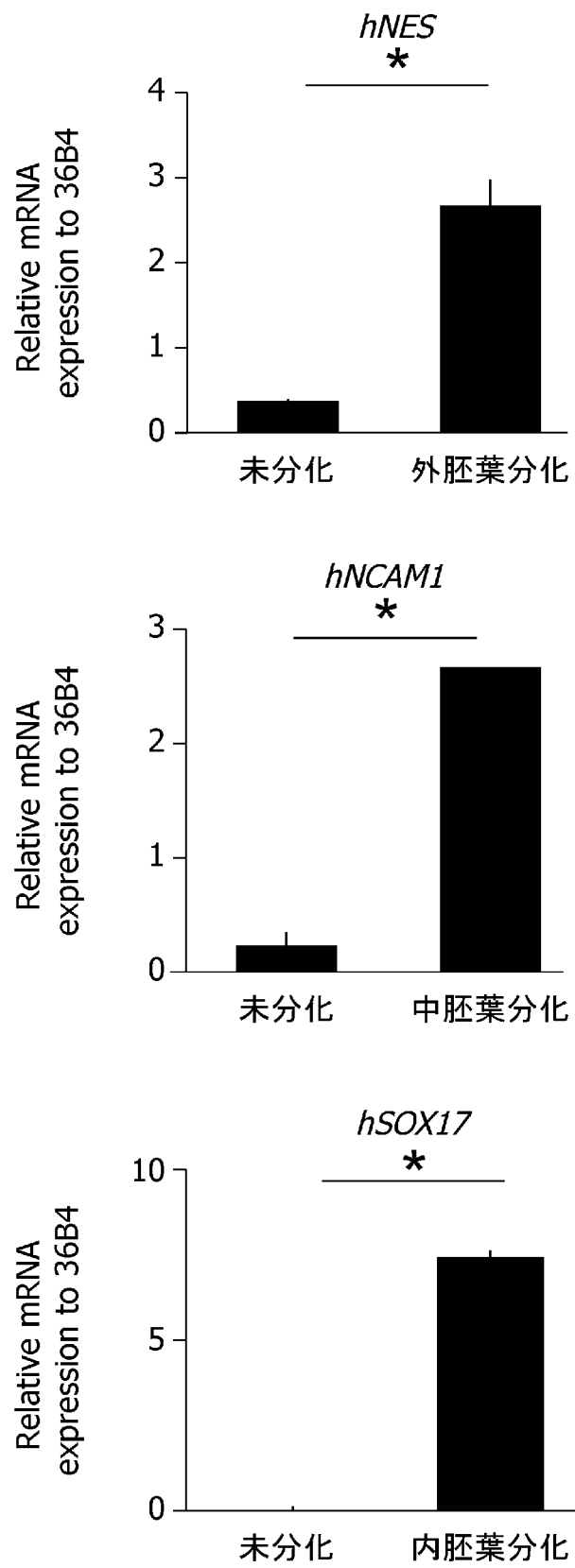
[図53]



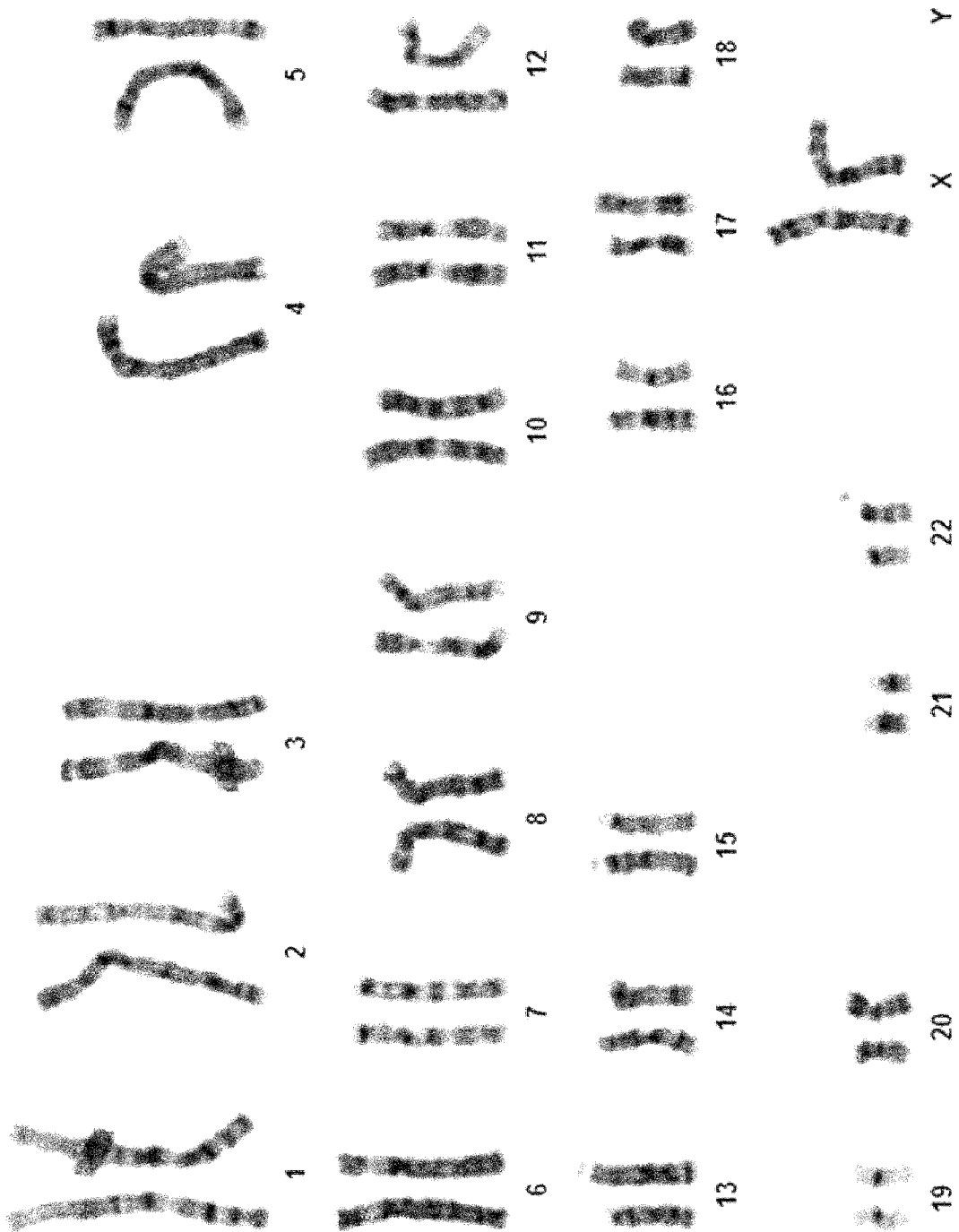
[図54]



[図55]

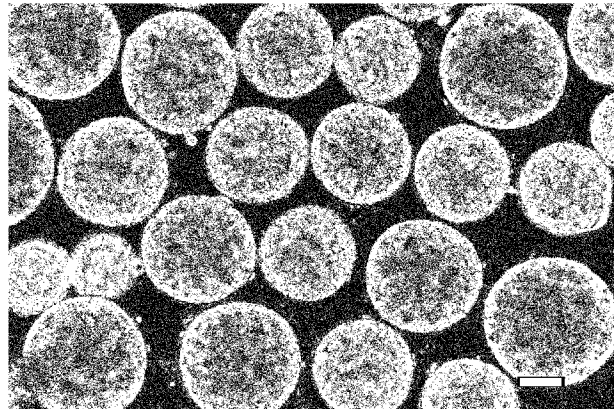


[図56]

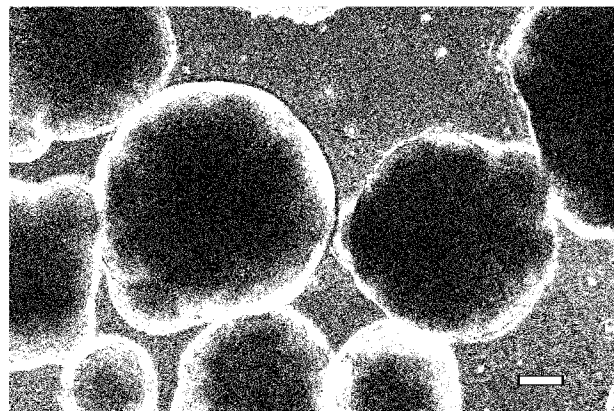


[図57]

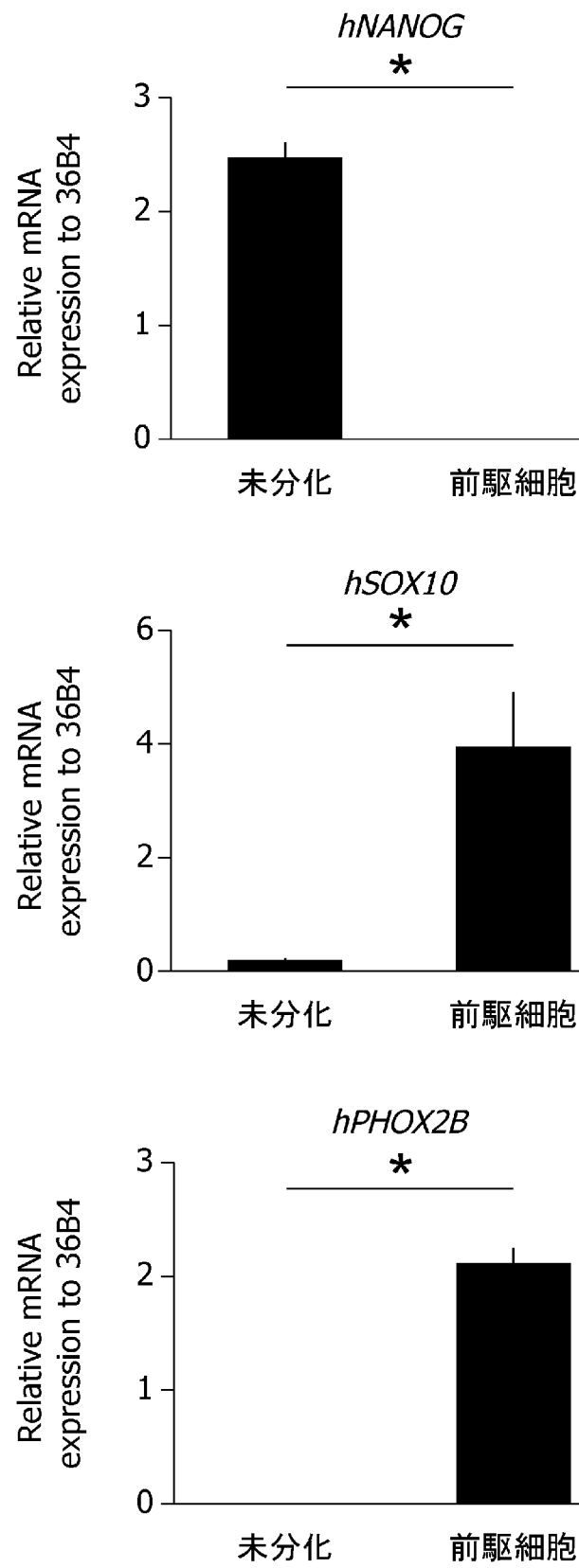
day0



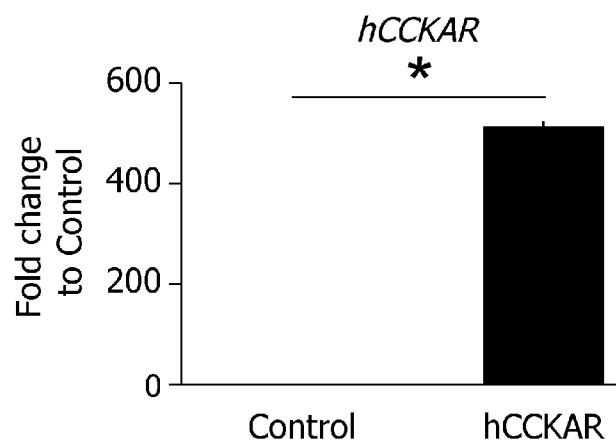
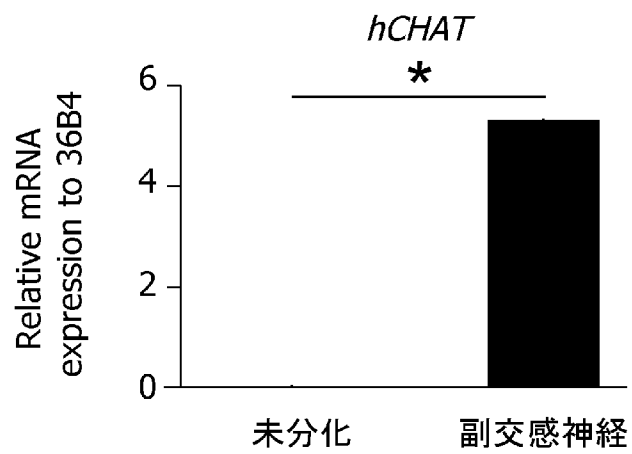
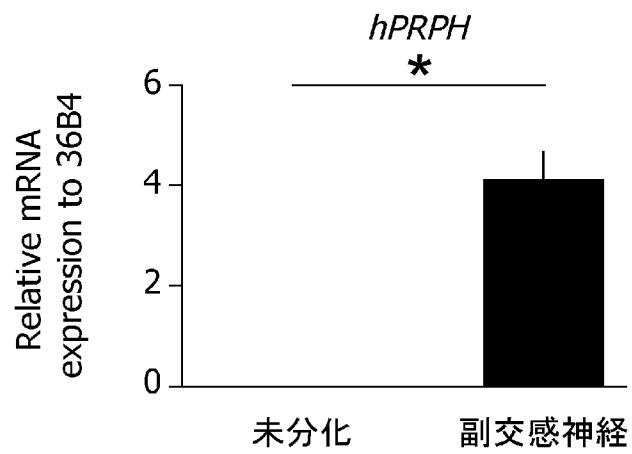
day13



[図58]

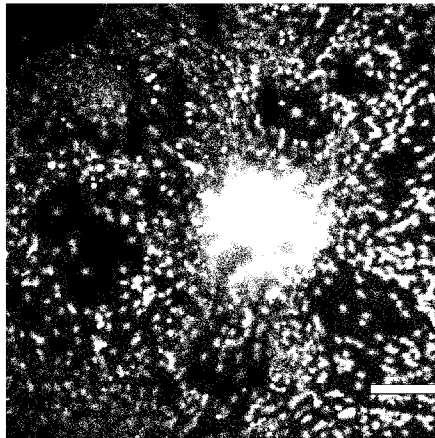


[図59]

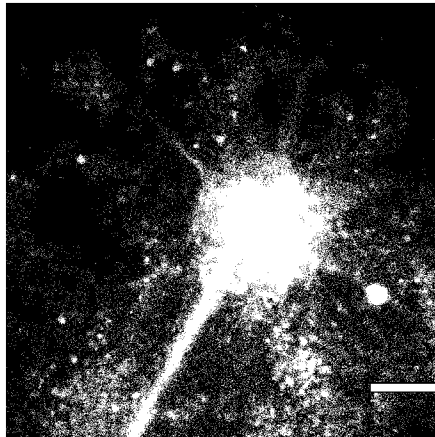


[図60]

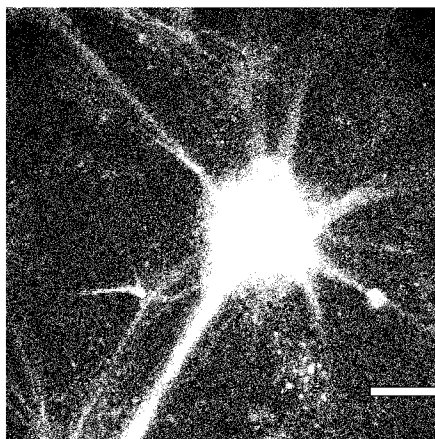
Hoechst



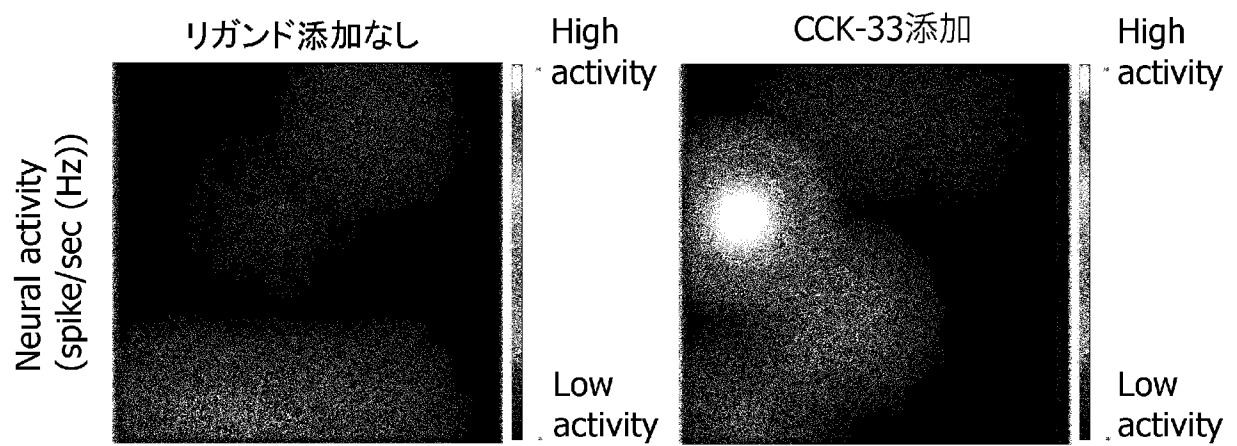
CCKAR



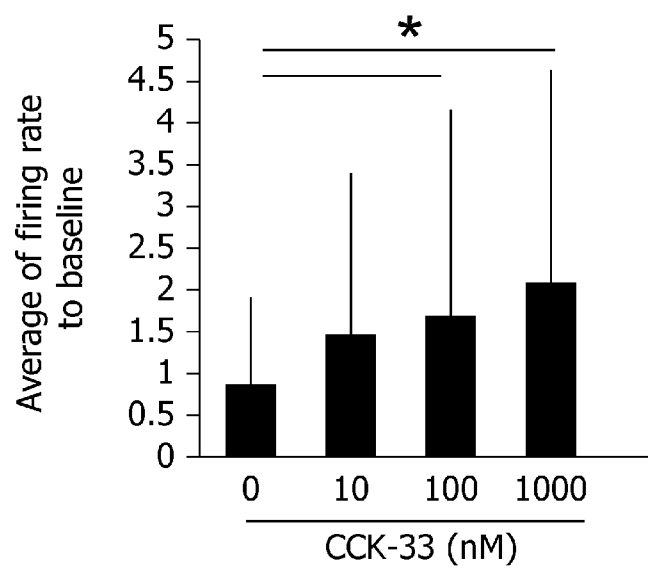
MAP2/CCKAR



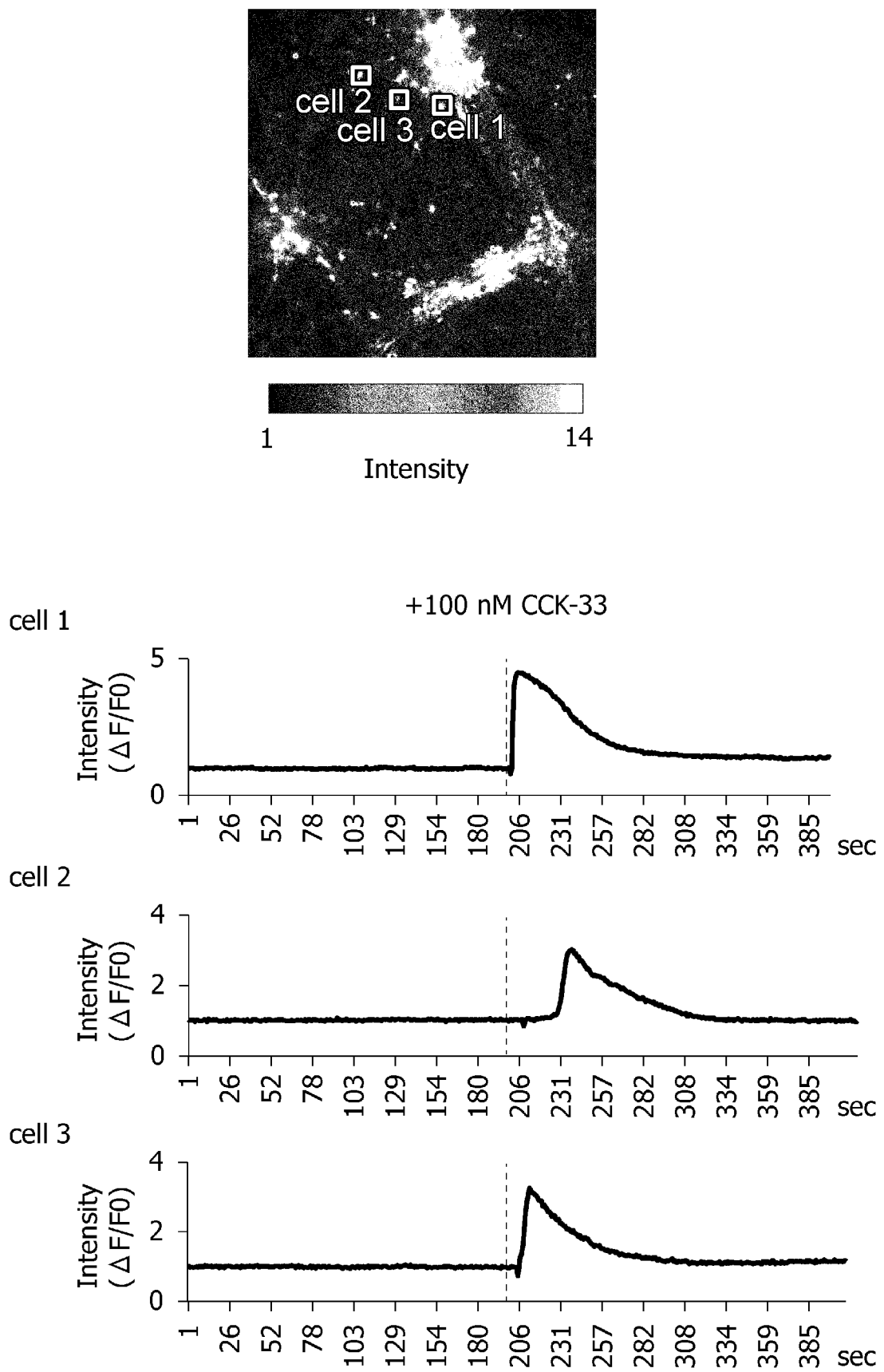
[図61]



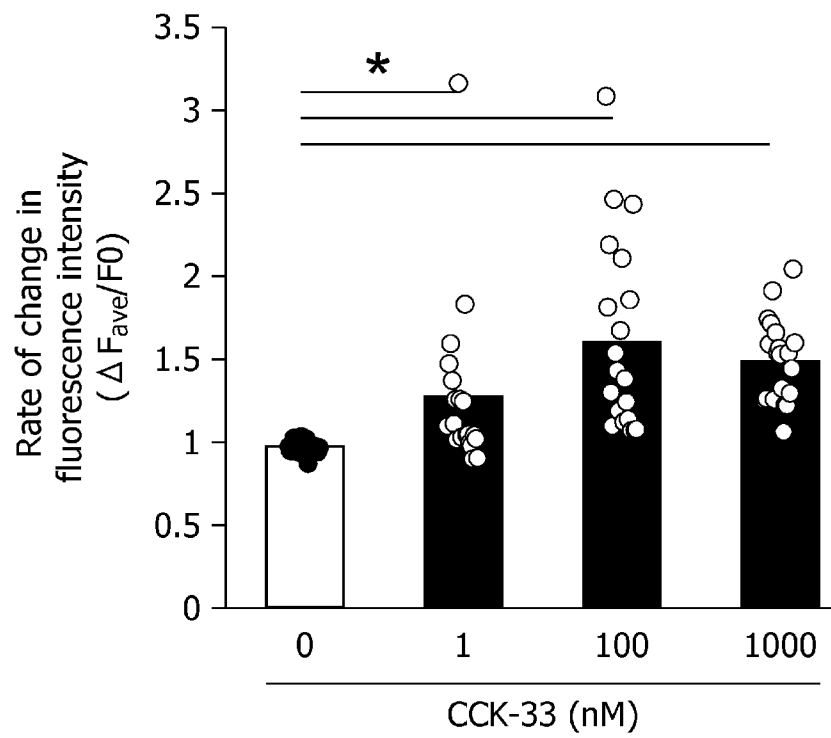
[図62]



[図63]

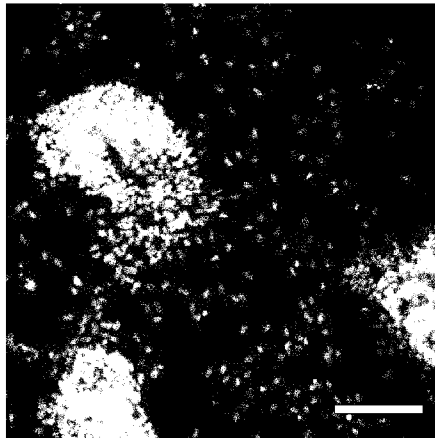


[図64]

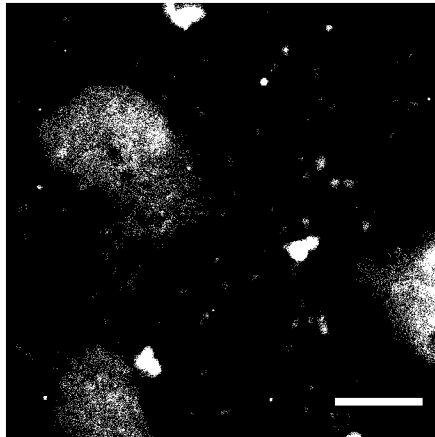


[図65]

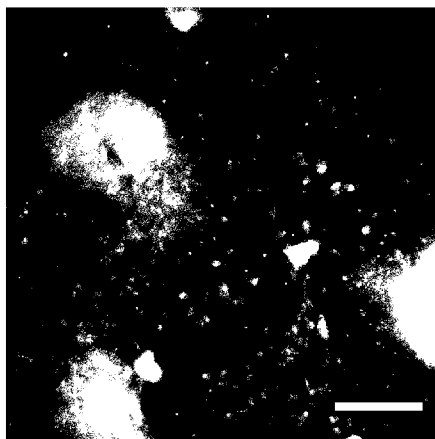
Hoechst



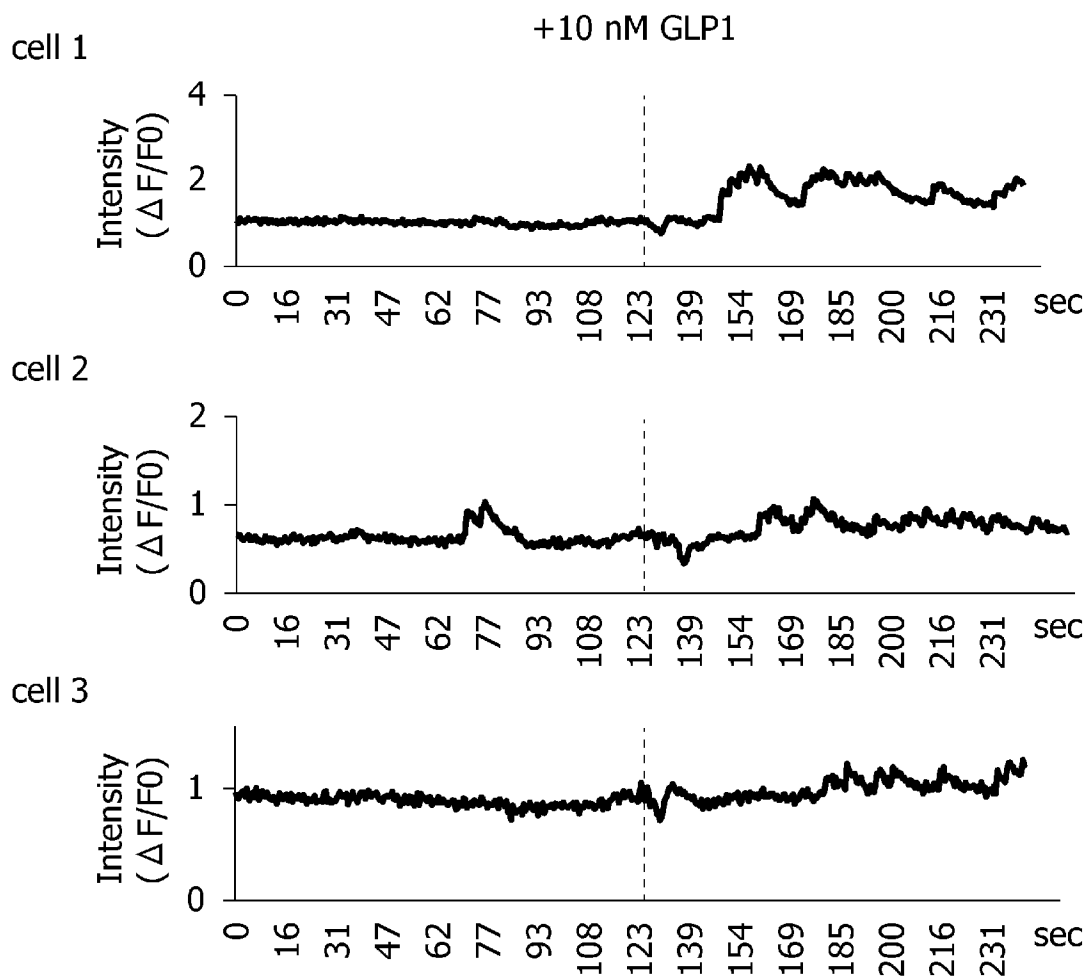
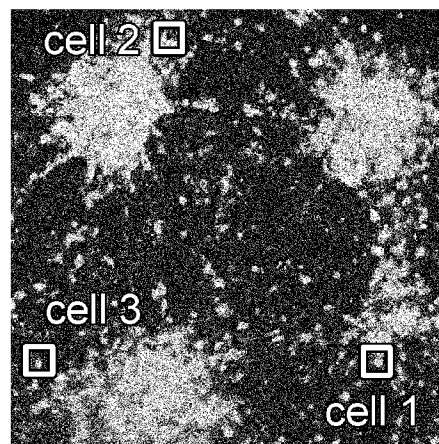
ChAT



GLP1R

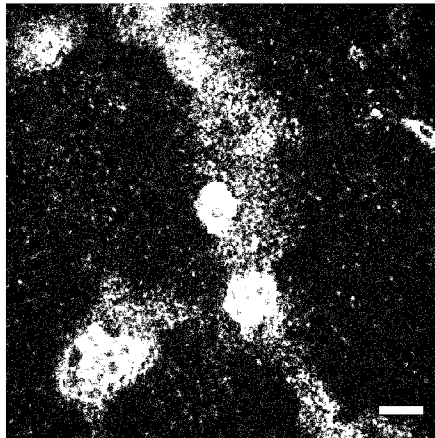


[図66]

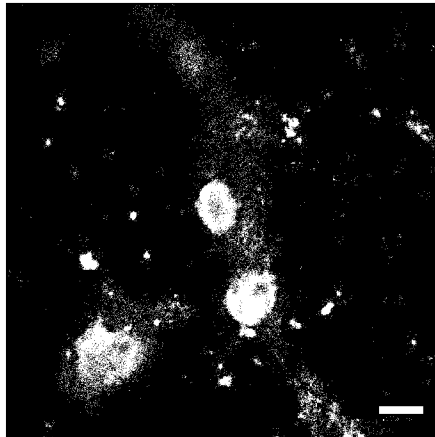


[図67]

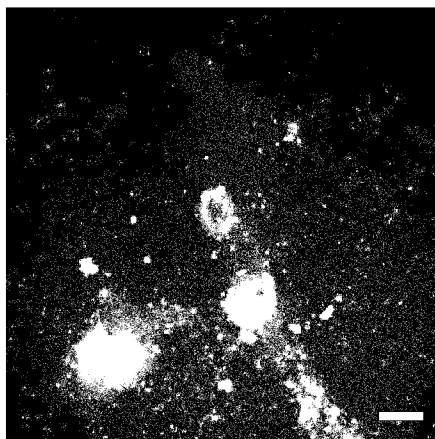
Hoechst



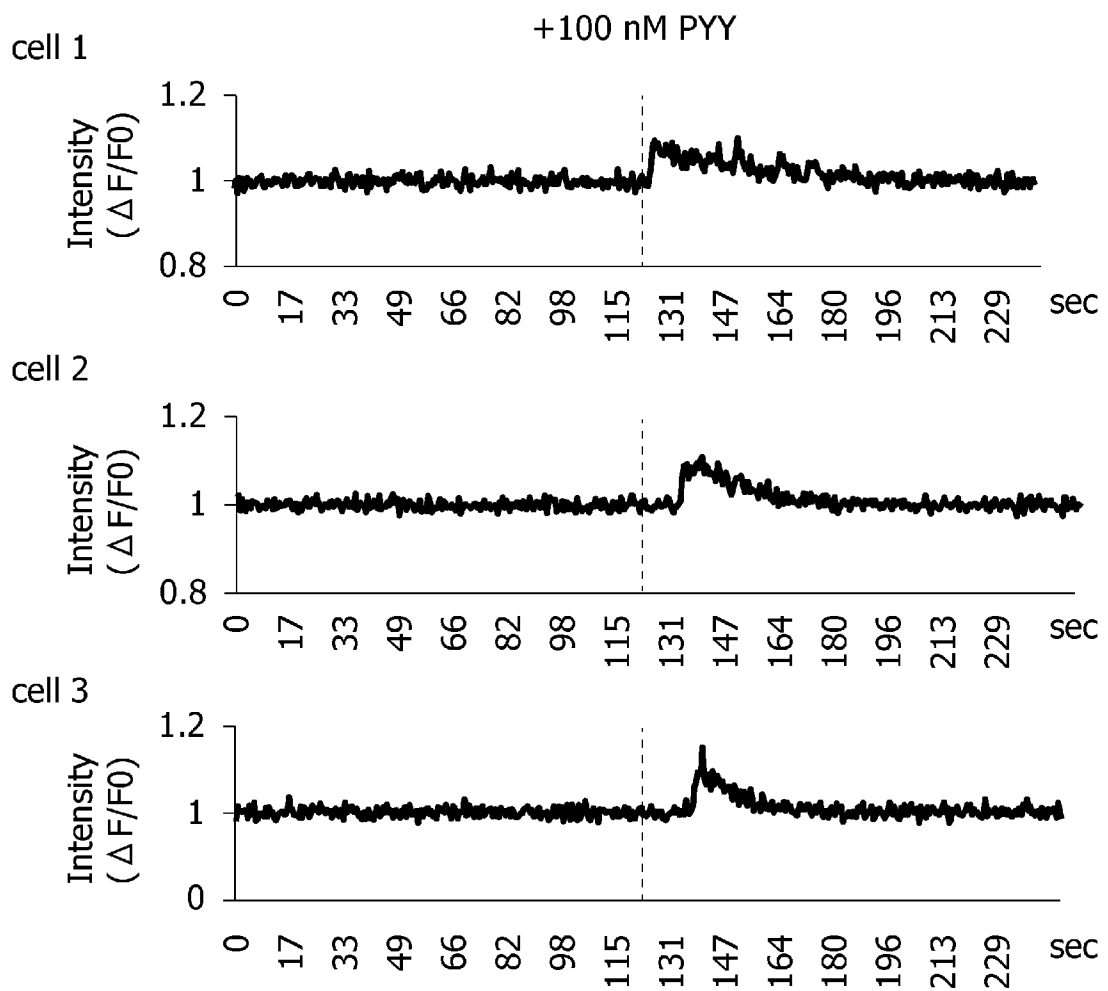
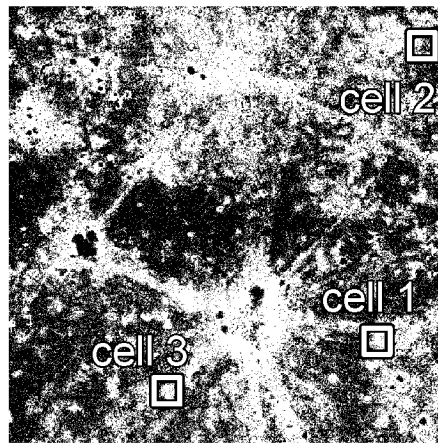
ChAT



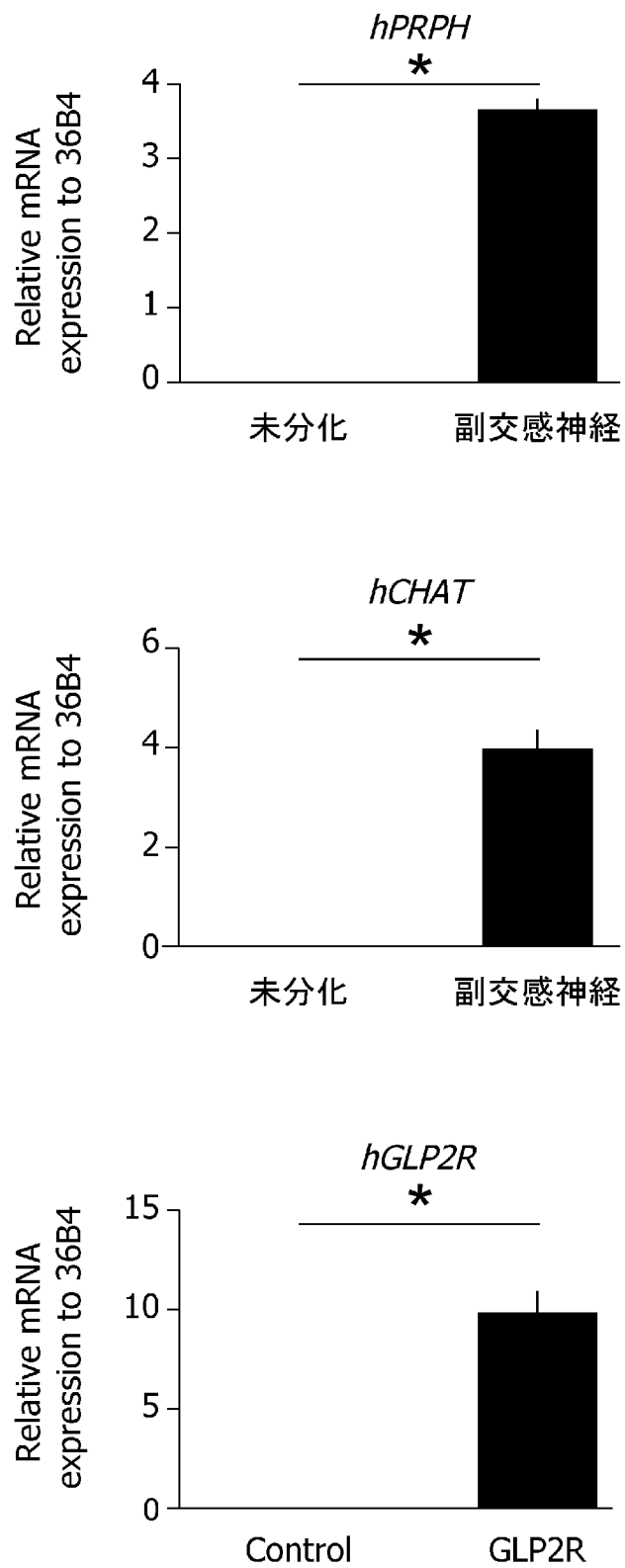
NPY2R



[図68]

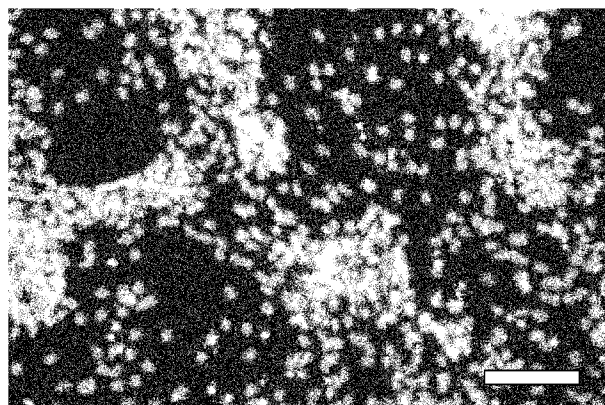


[図69]

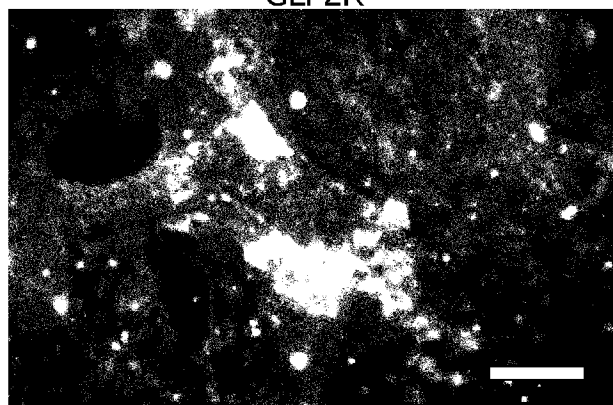


[図70]

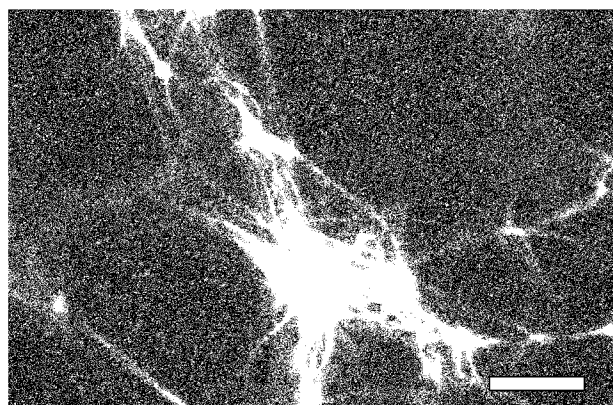
Hoechst



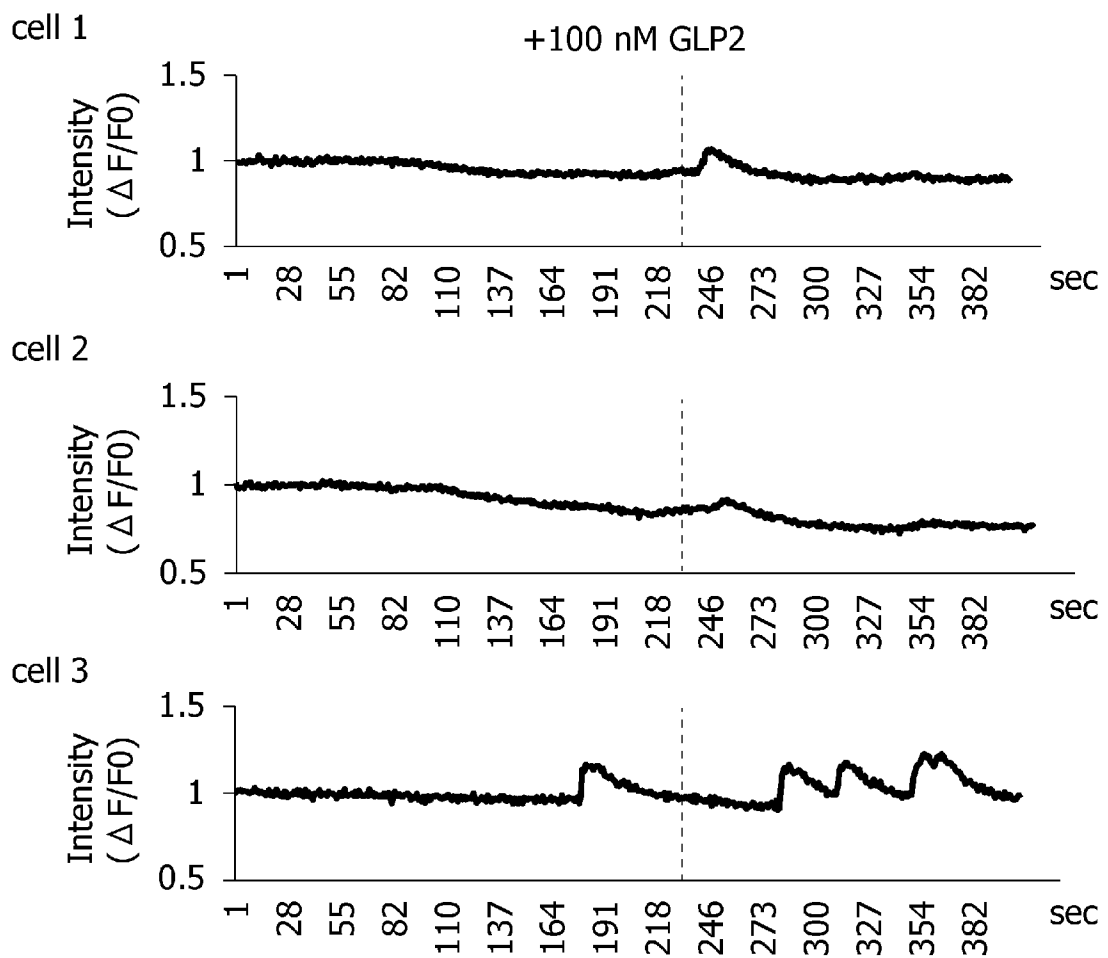
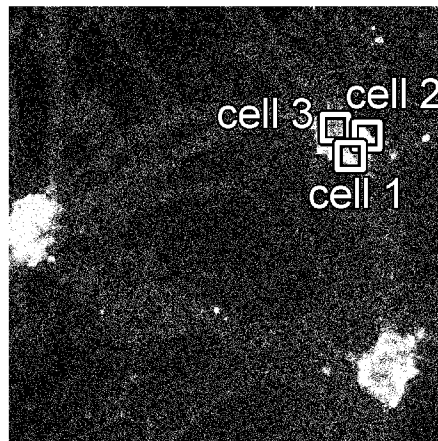
GLP2R



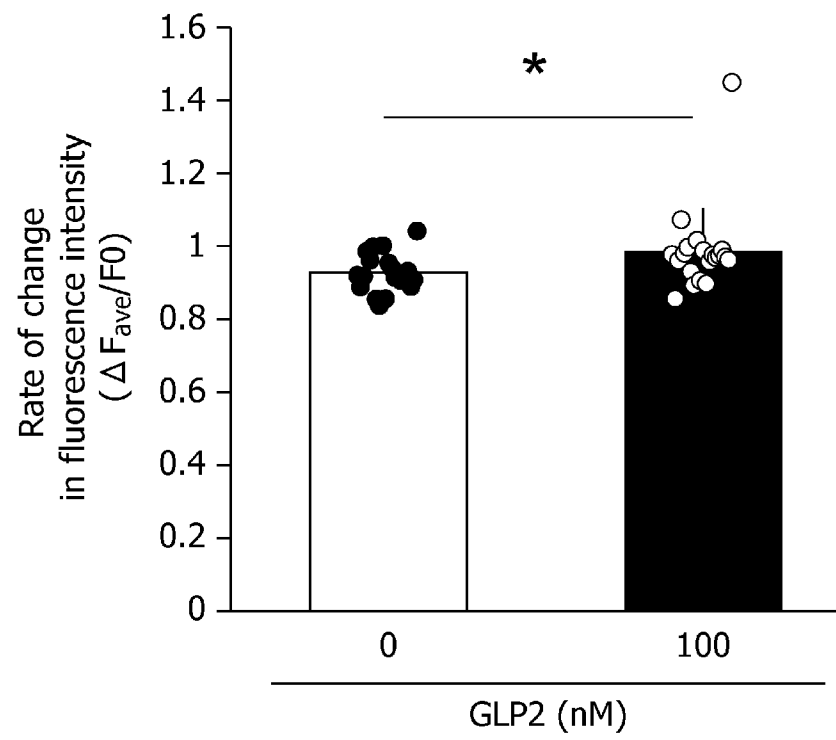
MAP2



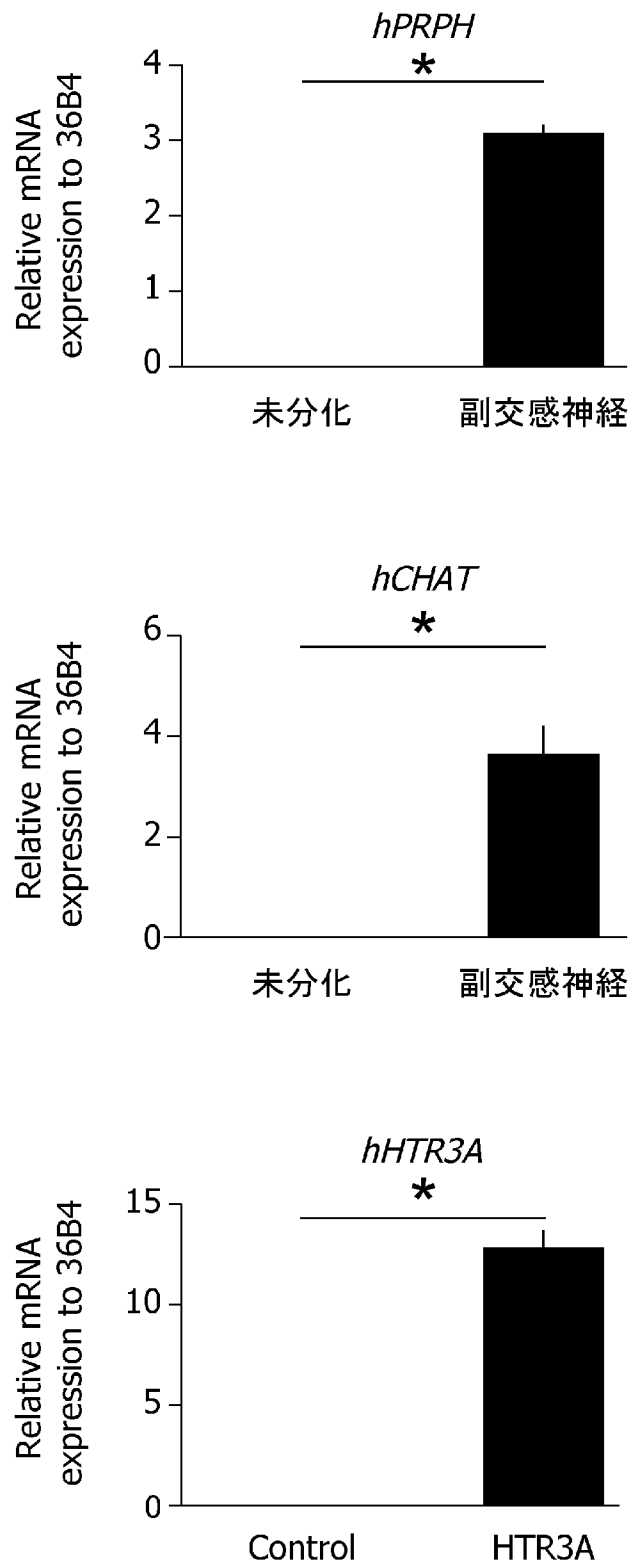
[図71]



[図72]

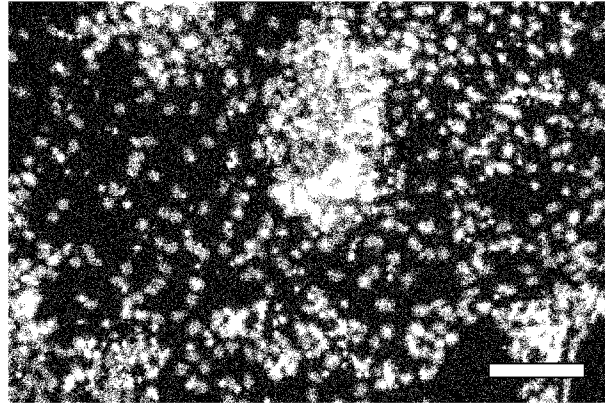


[図73]

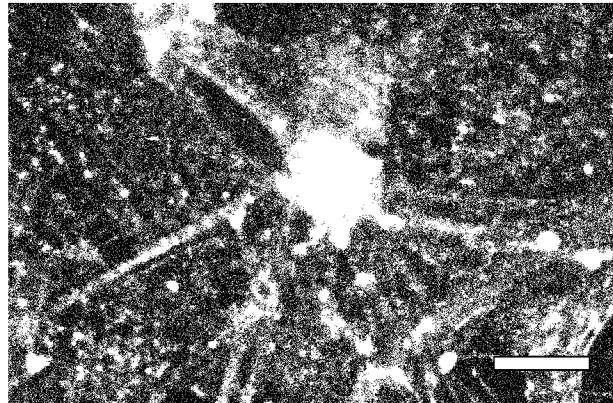


[図74]

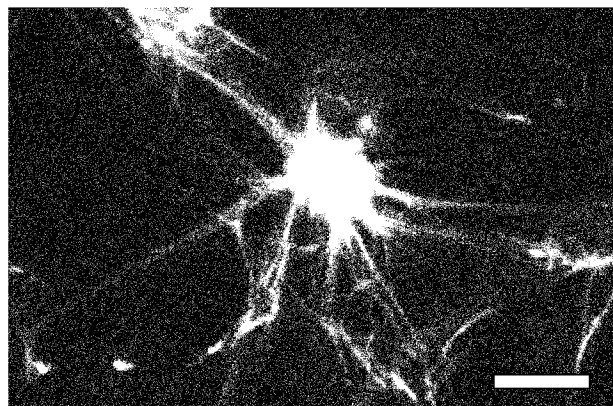
Hoechst



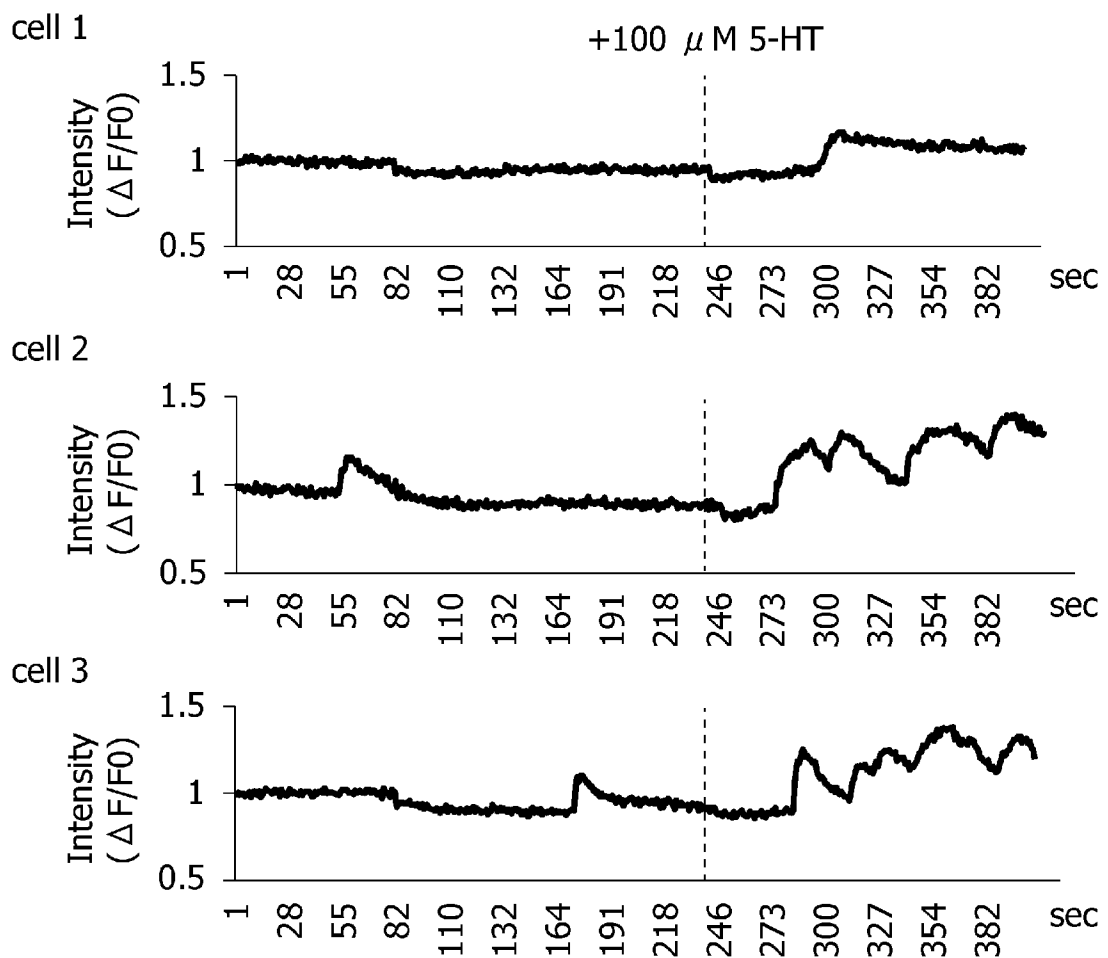
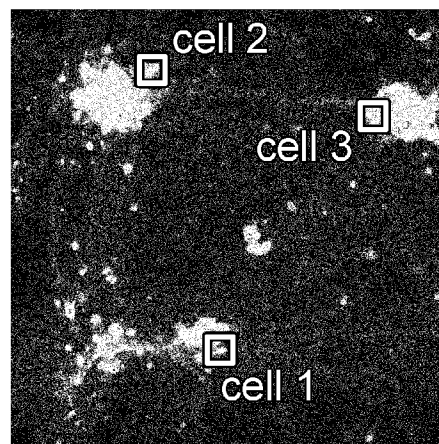
HTR3A



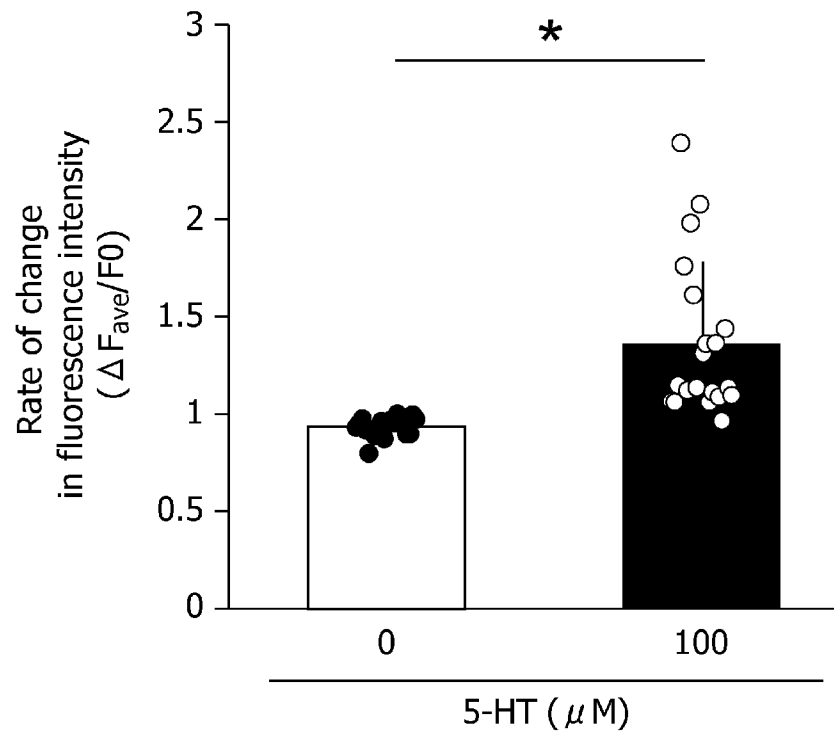
MAP2



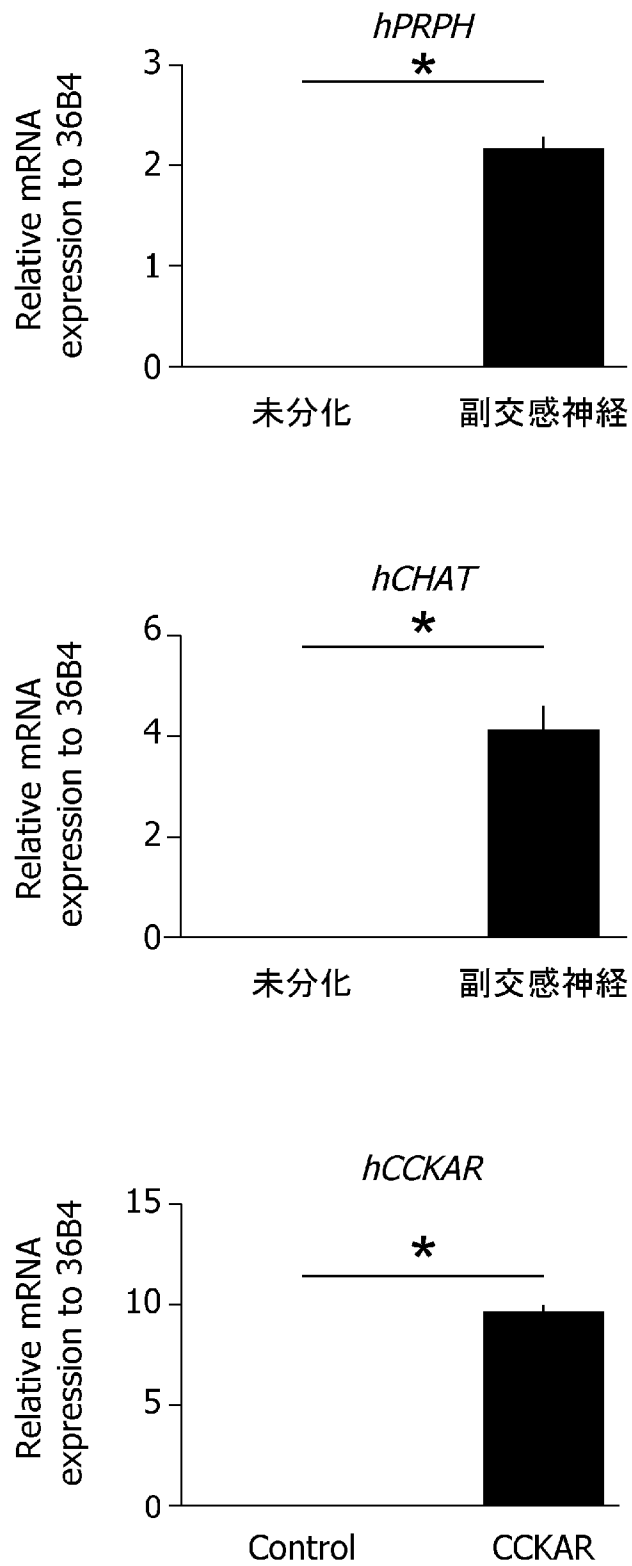
[図75]



[図76]

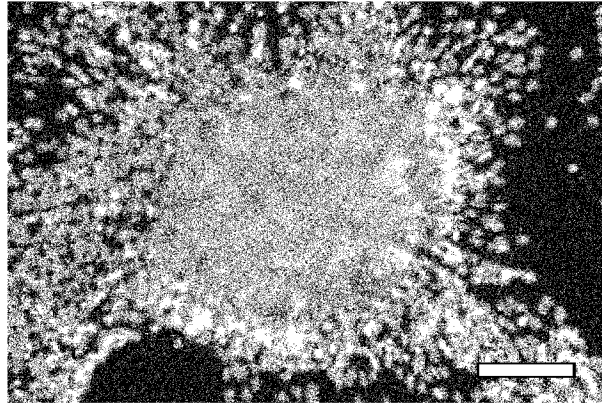


[図77]

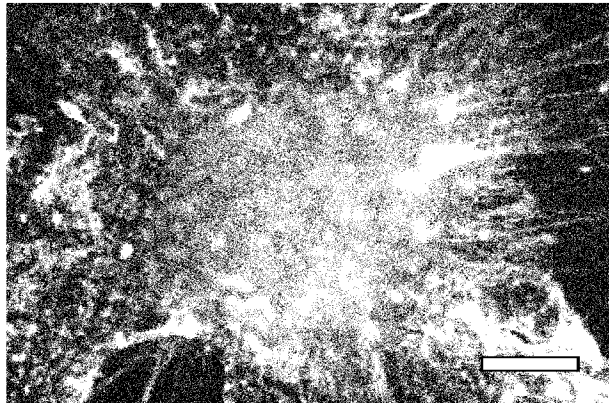


[図78]

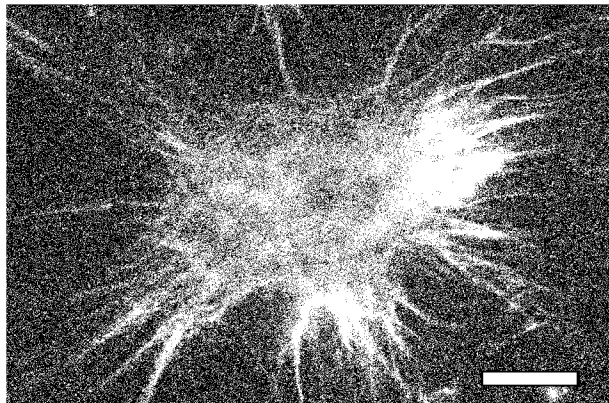
Hoechst



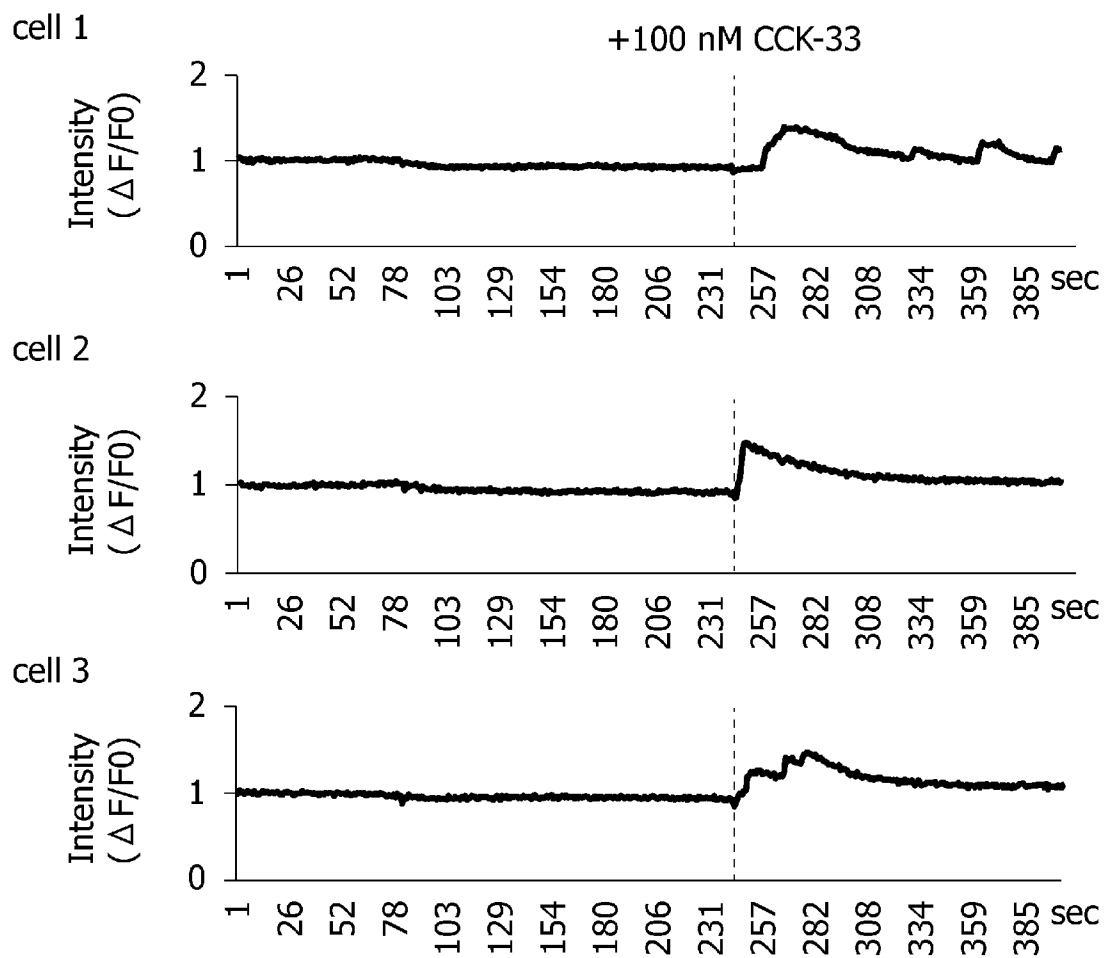
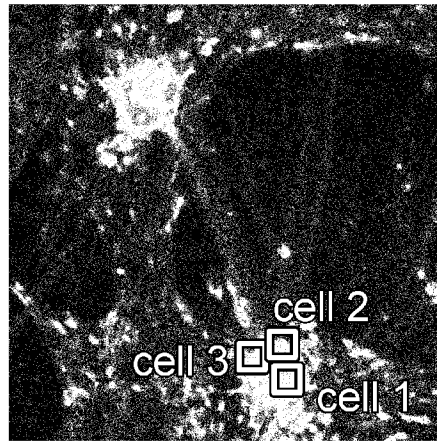
CCKAR



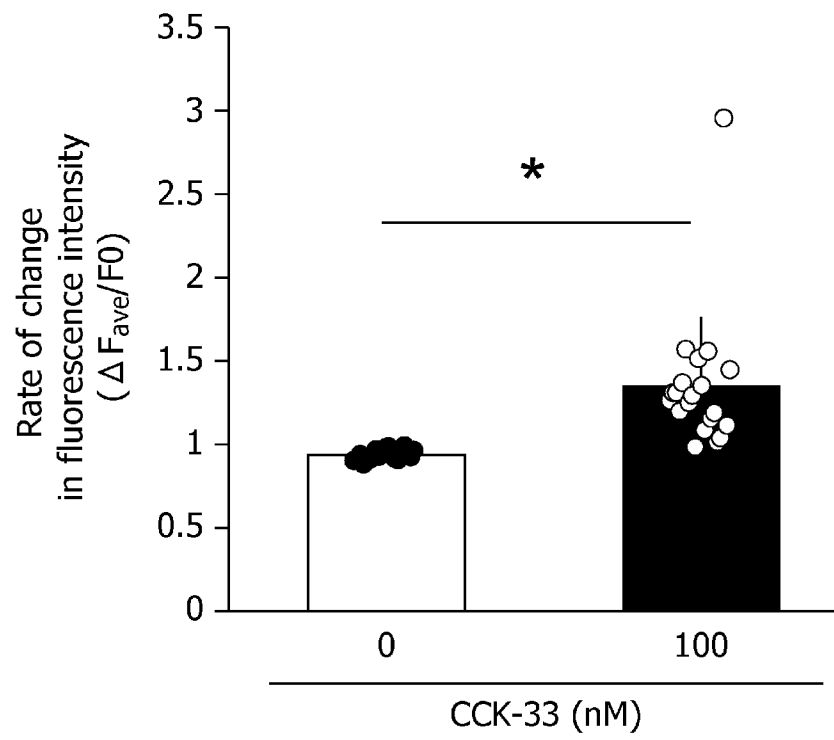
MAP2



[図79]

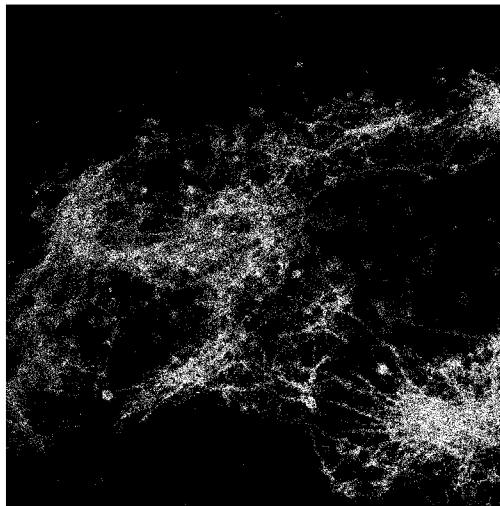


[図80]

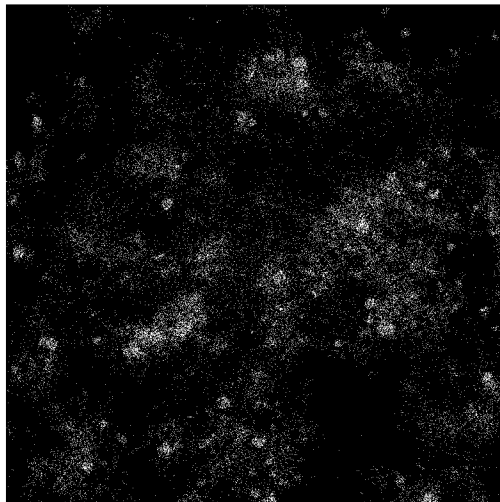


[図81]

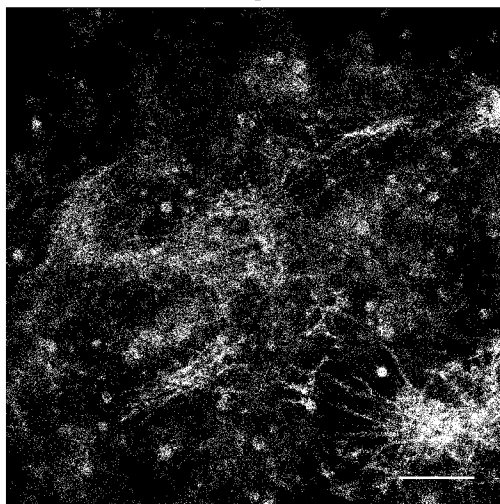
MAP2 (neuron)



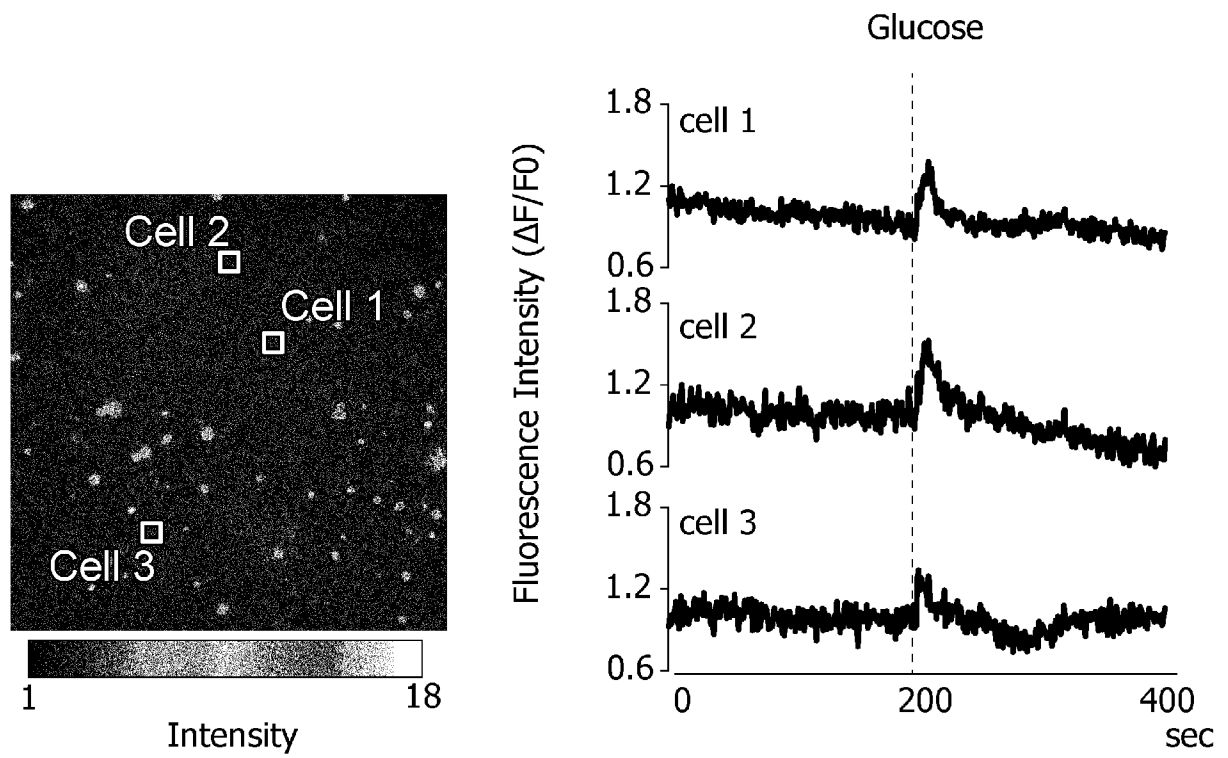
MemGlow (H716 cells)



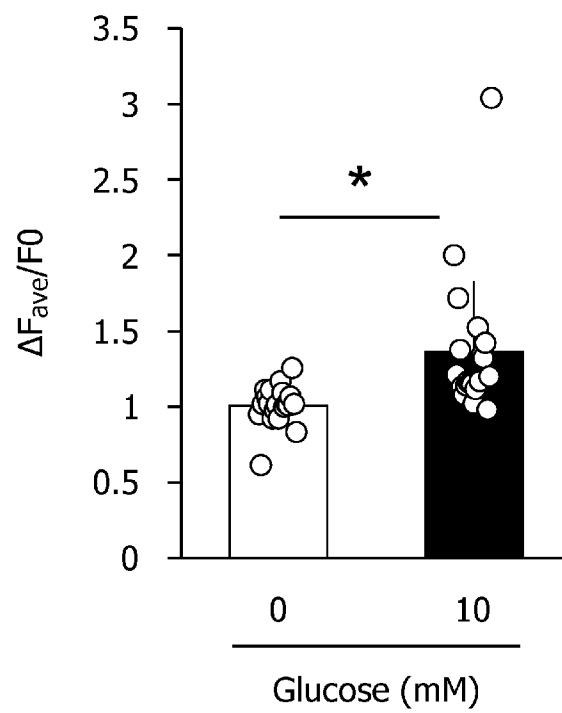
Merge

Scale bar : 100 μ m

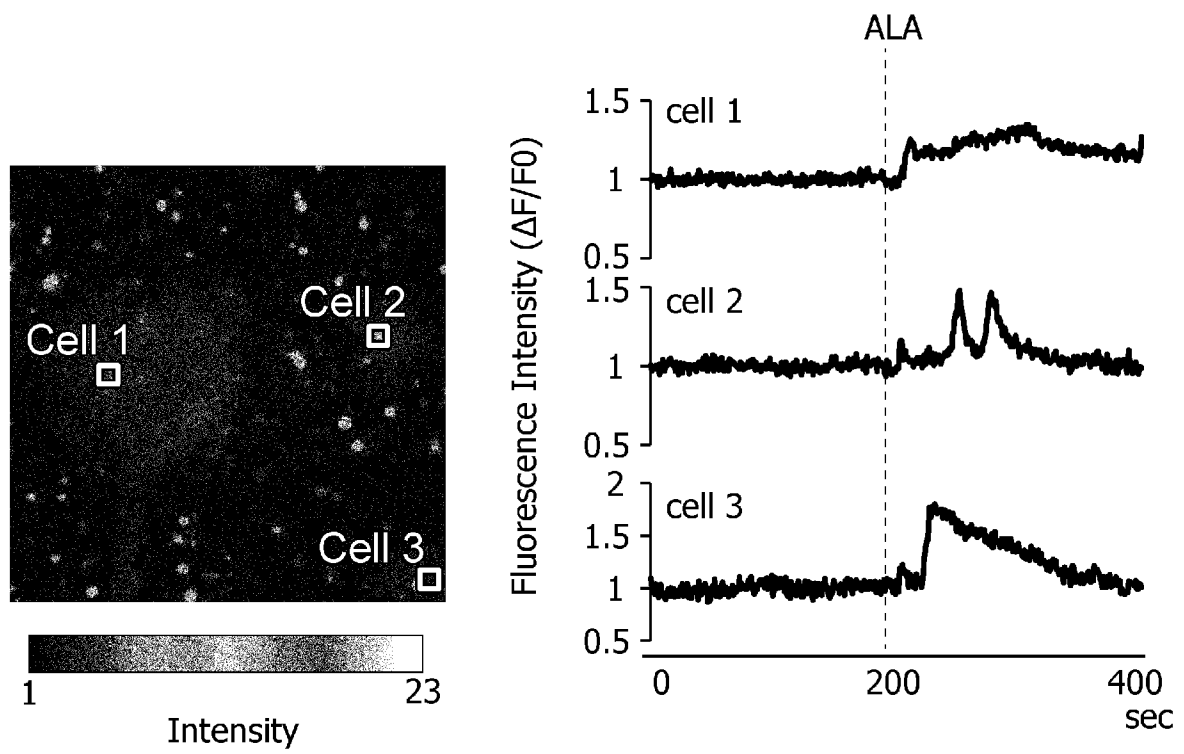
[図82]



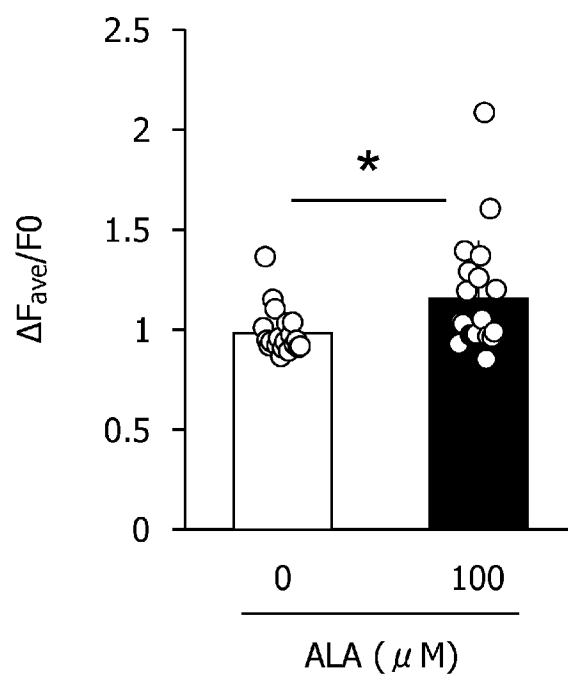
[図83]



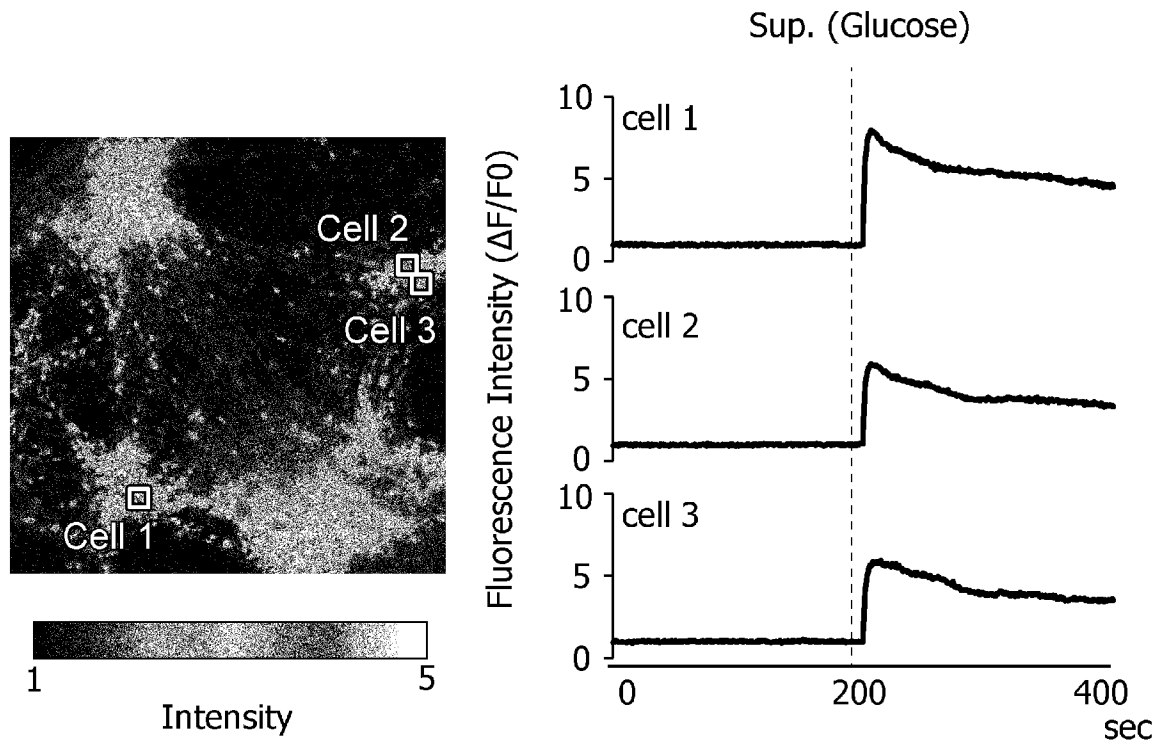
[図84]



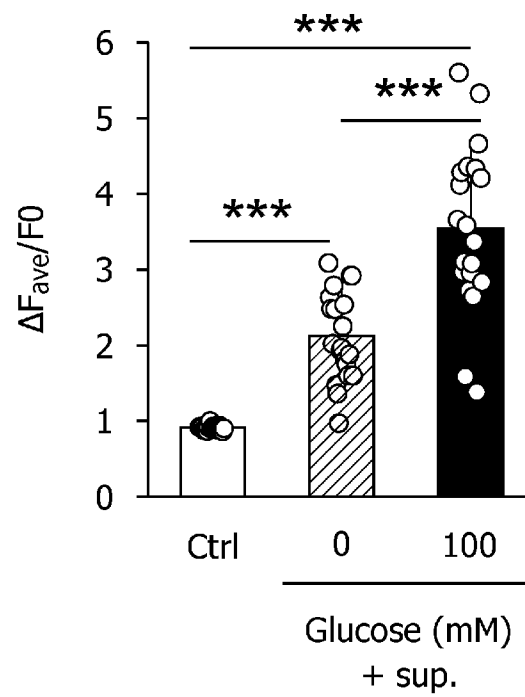
[図85]



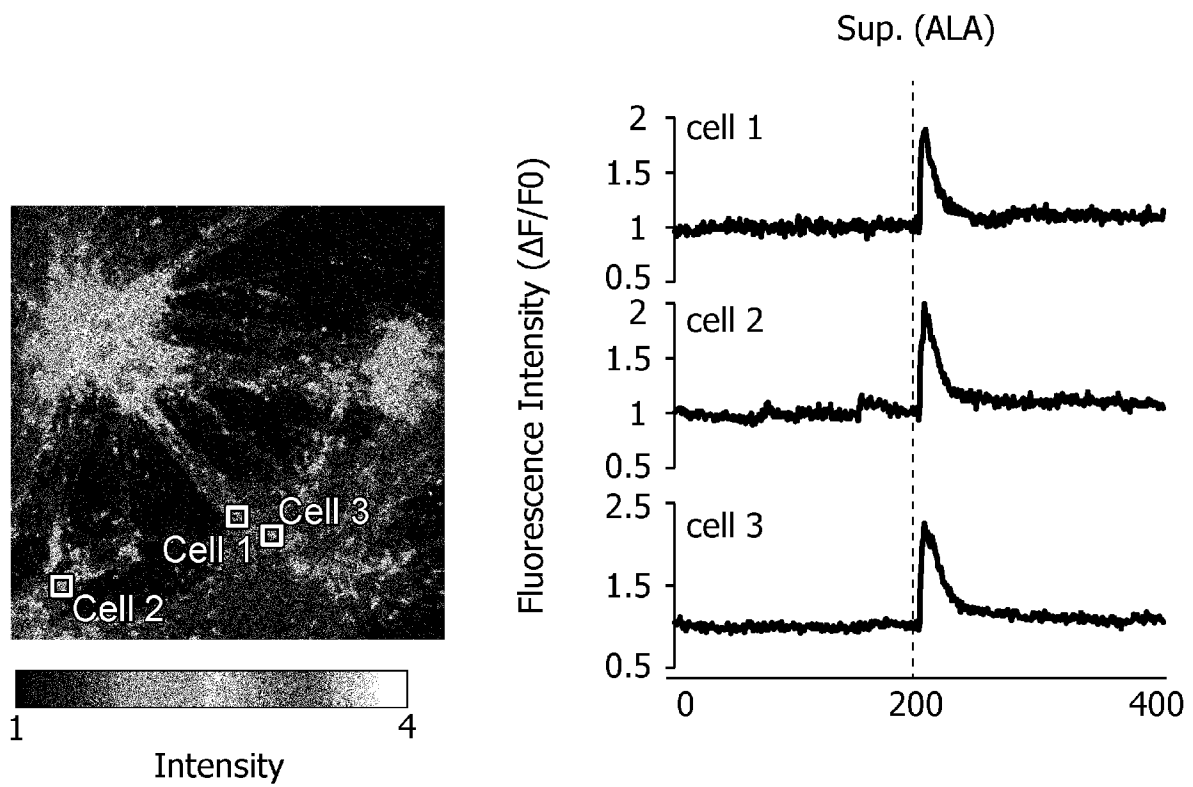
[図86]



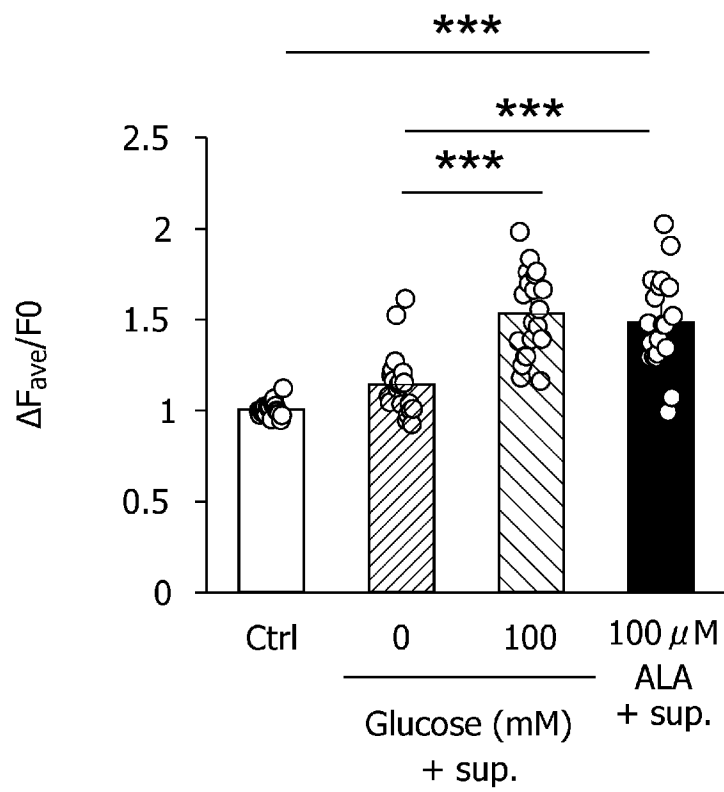
[図87]



[図88]



[図89]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/027801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0793(2010.01)i; **C12N 5/10**(2006.01)i; **C12N 15/12**(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i; **G01N 33/483**(2006.01)i;
G01N 33/50(2006.01)i

FI: C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/12 ZNA; C12Q1/02; G01N33/483 C; G01N33/483 F; G01N33/50 Z

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)

C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/12; C12Q1/02; G01N33/483; G01N33/50

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/040286 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 February 2020 (2020-02-27) claims	1-13
Y	BERTHOUD, H.-R. Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. Neurogastroenterology and motility. 2008, vol. 20, supply 1, pp. 64-72 fig. 1	1-13
Y	Homo sapiens glucagon like peptide 1 receptor (GLP1R), transcript variant 1. Acc. NM_002062.5. June 2022, <URL; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1519246335?sat=51&satkey=22181856> pp. 6-7	1-13
Y	Homo sapiens neuropeptide Y receptor Y2 (NPY2R), transcript variant 1, mRNA. Acc. NM_000910.4. June 2021, <URL; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1519311446?sat=51&satkey=65979024> pp. 4-5	1-13



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

16 August 2023

Date of mailing of the international search report

29 August 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/027801**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Homo sapiens glucagon like peptide 2 receptor (GLP2R). mRNA. Acc. NM_004246.3. August 2021, <URL; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1519243231?sat=50&satkey=19514796 > pp. 5-6	1-13
Y	Homo sapiens 5-hydroxytryptamine receptor 3A (HTR3A), transcript variant 1, mRNA. Acc. NM_213621.4. 25 July 2022, <URL; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1435071753?sat=51&satkey=20372575 > p. 5	1-13
Y	Homo sapiens cholecystokinin A receptor (CCKAR), mRNA. Acc. NM_000730.3. 2021, <URL; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nducore/1653961628?sat=51&satkey=65850160 > p. 5	1-13
Y	MINAGAWA, Atsutaka et al. Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy. Cell Stem Cell. 2018, vol. 23, pp. 850-858 fig. 3A, pp. 854-855	1-13
A	WO 2016/194522 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 December 2016 (2016-12-08) claims	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/027801

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/027801

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020/040286	A1	27 February 2020	US	2021/0171905	A1	
				claims			
				EP	3825397	A1	

WO	2016/194522	A1	08 December 2016	US	2018/0155682	A1	
				claims			
				EP	3305889	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/483(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i FI: C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/12 ZNA; C12Q1/02; G01N33/483 C; G01N33/483 F; G01N33/50 Z		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/12; C12Q1/02; G01N33/483; G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2020/040286 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 27.02.2020 (2020 - 02 - 27) 特許請求の範囲	1-13
Y	BERTHOUD H.-R., Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction, Neurogastroenterology and motility, 2008, Vol.20, Suppl.1, pp.64-72 Fig.1	1-13
Y	Homo sapiens glucagon like peptide 1 receptor (GLP1R), transcript variant 1, Acc. NM_002062.5, 2022.06, <URL;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1519246335?sat=51&satkey=22181856> pp. 6-7	1-13
Y	Homo sapiens neuropeptide Y receptor Y2 (NPY2R), transcript variant 1, mRNA, Acc. NM_000910.4, 2021.06, <URL;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1519311446?sat=51&satkey=65979024> pp. 4-5	1-13
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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 “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.08.2023		国際調査報告の発送日 29.08.2023
名称及びあて先 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		権限のある職員（特許庁審査官） 鳥居 敬司 4N 4045 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
Y	Homo sapiens glucagon like peptide 2 receptor (GLP2R), mRNA, Acc. NM_004246.3, 2021.08, <URL;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1519243231?sat=50&satkey=19514796> pp.5-6	1-13
Y	Homo sapiens 5-hydroxytryptamine receptor 3A (HTR3A), transcript variant 1, mRNA, Acc. NM_213621.4, 2022.07.25, <URL;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1435071753?sat=51&satkey=20372575> p.5	1-13
Y	Homo sapiens cholecystokinin A receptor (CCKAR), mRNA, Acc. NM_000730.3, 2021, <URL;https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1653961628?sat=51&satkey=65850160> p.5	1-13
Y	MINAGAWA Atsutaka, et al., Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy, Cell Stem Cell, 2018, Vol.23, pp.850-858 Fig.3A, pp.854-855	1-13
A	WO 2016/194522 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 08.12.2016 (2016 - 12 - 08) 特許請求の範囲	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2023/027801

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/040286	A1	27.02.2020	US	2021/0171905	A1	
				claims			
				EP	3825397	A1	
WO	2016/194522	A1	08.12.2016	US	2018/0155682	A1	
				claims			
				EP	3305889	A1	