

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6588969号
(P6588969)

(45) 発行日 令和1年10月9日 (2019. 10. 9)

(24) 登録日 令和1年9月20日 (2019. 9. 20)

(51) Int. Cl.

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

F 1

C 1 2 N 5/071

請求項の数 18 (全 61 頁)

(21) 出願番号	特願2017-512643 (P2017-512643)	(73) 特許権者	509087759
(86) (22) 出願日	平成27年5月7日 (2015. 5. 7)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(65) 公表番号	特表2017-515507 (P2017-515507A)		テッド
(43) 公表日	平成29年6月15日 (2017. 6. 15)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/029636		4 ホーシヤム・リッジビュードライブ 8 0
(87) 国際公開番号	W02015/175307		0 / 8 5 0
(87) 国際公開日	平成27年11月19日 (2015. 11. 19)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成30年5月7日 (2018. 5. 7)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	61/994, 259	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成26年5月16日 (2014. 5. 16)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵内分泌細胞内の M A F A 発現を強化するための小分子の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する、分化した多能性幹細胞の集団、及び培地を含み、前記分化細胞の少なくとも 1 0 % が、インスリン、P D X 1、N K X 6 . 1、及び M A F A を発現する、インビトロ細胞培養物であって、

前記細胞の集団が、R S K 阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地での処理によって得られるものである

、
前記インビトロ細胞培養物。

【請求項 2】

前記細胞の集団が、R S K 阻害剤が補充された培地での処理によって得られるものである、請求項 1 に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 3】

前記 R S K 阻害剤が、R S K 阻害剤 I I である、請求項 2 に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 4】

前記細胞の集団が、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤が補充された培地での処理によって得られるものである、請求項 1 に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 5】

10

20

前記タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤が、E P Z - 5 6 7 6 である、請求項 4 に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 6】

前記培地に、抗酸化剤が更に補充されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 7】

前記多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のインビトロ細胞培養物。

【請求項 8】

多能性細胞から誘導される細胞内で M A F A 発現を誘導する方法であって、多能性細胞を培養することと、R S K 阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地での処理によって、前記多能性細胞を、より成熟した表現型の膵内分泌細胞に分化させることとを含む、前記方法。

10

【請求項 9】

前記培地に、R S K 阻害剤が補充されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

R S K キナーゼ阻害剤が、R S K 阻害剤 I I である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記培地が、抗酸化剤を更に含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記培地にタンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤が補充されている、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤が、E P Z - 5 6 7 6 である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

(a) 前記多能性幹細胞を、膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞へ分化することと、
 (b) (i) S M O 阻害剤又は S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト、(i i) B M P 阻害剤、(i i i) T 3、T 4、それらの類似体及びそれらの混合物、及び(i v) A L K 5 阻害剤が補充された培地で、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を培養することにより、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を膵内分泌細胞へ分化することと、及び
 (c) 前記膵内分泌細胞を、R S K 阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地で処理することとを含む、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 15】

(a) 多能性幹細胞を、(i) アクチビン A 及び w n t 3 A 又は(i i) G D F - 8 及び 1 4 - プロパ - 2 - エン - 1 - イル - 3 , 5 , 7 , 1 4 , 1 7 , 2 3 , 2 7 - ヘプタアザテトラシクロ [1 9 . 3 . 1 . 1 ~ 2 , 6 ~ . 1 ~ 8 , 1 2 ~] ヘプタコサ - 1 (2 5) , 2 (2 7) , 3 , 5 , 8 (2 6) , 9 , 1 1 , 2 1 , 2 3 - ノナエン - 1 6 - オンのいずれかが補充された培地で培養して胚体内胚葉細胞を得ることと、

40

(b) 前記胚体内胚葉細胞を、膵前腸前駆細胞へ分化することと、

(c) 前記膵前腸前駆細胞を、膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞へ分化することと、

(d) (i) S M O 阻害剤又は S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト、(i i) B M P 阻害剤、(i i i) T 3、T 4、それらの類似体及びそれらの混合物、及び(i v) A L K 5 阻害剤が補充された培地で、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を培養することにより、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を膵内分泌細胞へ分化することと、及び

(e) 前記膵内分泌細胞を、R S K 阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地で処理することとを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記多能性幹細胞が、ヒト細胞である、請求項 8 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記膵内分泌細胞が、単一ホルモンインスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する、請求項 8 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

膵内分泌細胞を懸濁培養中又は空気 - 液体界面において処理することを含む、請求項 8 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

(関連出願の相互参照)

本願は、2014年5月16日に出願された、米国特許仮出願第61/994,259号の利益を主張するものであり、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、多能性幹細胞の分化のための方法、並びにそれから生じる細胞及び集団に関する。とりわけ、本発明は、MAFAの増加した発現を呈する膵内分泌細胞、及びそのような細胞の集団を生成するためのある特定の小分子の使用に関する。

【背景技術】

20

【0003】

I型真性糖尿病の細胞補充療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞、又はベータ()細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、胚性幹細胞などの多能性幹細胞から機能的細胞を生成するものがある。

【0004】

脊椎動物の胚発生では、多能性細胞は、原腸形成として知られるプロセスにおいて3つの胚葉(外胚葉、中胚葉、及び内胚葉)から構成される細胞群を生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓などの組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間ステージは、胚体内胚葉(definitive endoderm)の形成である。

30

【0005】

原腸形成の終了までに、内胚葉は、内胚葉の前部、中間、及び後部の領域を特異的にマークする因子のパネルの発現によって認識することができる前部 - 後部ドメインに分割される。例えば、HHEX及びSOX2は内胚葉の前領域を特定し、CDX1、2及び4は後老域を特定する。

【0006】

内胚葉組織の移行は、内胚葉を腸管の領域化に役立つ異なった中胚葉組織に近接させる。これは、線維芽細胞増殖因子(「FGF」)、WNT5、形質転換増殖因子(「TGF - 」)、レチノイン酸、及び骨形成タンパク質(「BMP」)リガンド、並びにそれらのアンタゴニストなどの分泌因子の過多によって達成される。例えば、FGF4及びBMPは、推定後腸内胚葉においてCDX2の発現を促進し、前方の遺伝子HHEX及びSOX2の発現を抑制する(2000 Development, 127:1563~1567)。WNTシグナル伝達はまた、後腸の発達を促進し、前腸の運命を阻害するために、FGFシグナル伝達と平行して作用することが示されている(2007 Development, 134:2207~2217)。最後に、間葉によって分泌されるレチノイン酸は、前腸 - 後腸の境界を調節する(2002 Curr. Biol., 12:1215~1220)。

40

【0007】

特異的転写因子の発現レベルは、組織のアイデンティティを指定するために使用できる

50

可能性がある。原腸管への胚体内胚葉の形質転換中に、腸管は、制限された遺伝子発現パターンにより分子レベルで観察することができる広いドメインに領域化される。腸管で領域化された膵臓ドメインは、PDX1の非常に高い発現並びにCDX2及びSOX2の非常に低い発現を示す。PDX1、NKX6.1/PTF1A、及びNKX2.2は、膵臓組織で高く発現し、CDX2の発現は腸組織で高い。

【0008】

膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により生じる。背側と腹側の膵臓ドメインは、前腸上皮から生じる。また、前腸は、食道、気管、肺、甲状腺、胃、肝臓、及び胆管系を生じさせる。

【0009】

膵臓内胚葉の細胞は膵臓 - 十二指腸ホメオボックス遺伝子PDX1を発現する。PDX1が存在しない場合、膵臓の発達は、腹側芽及び背側芽の形成より先に進行しない。したがって、PDX1の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を示している。成熟した膵臓は、膵臓内胚葉の分化から生じる外分泌組織及び内分泌組織の両方を含む。

【0010】

D'Amourらは、高濃度のアクチビン及び低血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉の濃縮培地の産生を記述している(Nature Biotechnology 2005, 23:1534~1541、米国特許第7,704,738号)。マウスの腎臓被膜下でのこれらの細胞の移植は、内胚葉組織の特徴を有する、より成熟した細胞への分化をもたらした(米国特許第7,704,738号)。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、FGF-10及びレチノイン酸の添加後、PDX1陽性細胞に更に分化させることができる(米国特許出願公開第2005/0266554号)。免疫不全マウスの脂肪パッド中のこれら膵臓前駆細胞のその後の移植は、3~4ヶ月の成熟期の後に、機能的膵内分泌細胞の形成をもたらした(米国特許第7,534,608号及び同第7,993,920号)。

【0011】

Fiskらは、ヒト胚性幹細胞からの膵島細胞の産生のためのシステムを報告している(米国特許第7,033,831号)。この場合、分化経路は3つのステージに分割された。ヒト胚性幹細胞は、最初に、酪酸ナトリウムとアクチビンAとの組み合わせを用いて内胚葉に分化された(米国特許第7,326,572号)。次に細胞をノギンなどのBMPアンタゴニストと共に、EGF又はセルリンと組み合わせて培養して、PDX1陽性細胞を生成した。最終分化は、ニコチンアミドにより誘発された。

【0012】

小分子阻害剤もまた、膵内分泌前駆細胞の誘導のために使用されている。例えば、TGF-受容体及びBMP受容体の小分子阻害剤(Development 2011, 138:861~871、Diabetes 2011, 60:239~247)は、膵内分泌細胞の数を著しく増強するために使用されている。加えて、小分子活性因子もまた、胚体内胚葉細胞又は膵内前駆細胞を生成するために使用されている(Curr. Opin. Cell Biol. 2009, 21:727~732、Nature Chem. Biol. 2009, 5:258~265)。

【0013】

HB9(HIXB9及びMNX1としても知られる)は、およそ胎生8日目に開始する膵臓発達において早期に発現される塩基性ヘリックスループヘリックス(「bHLH」)転写活性因子タンパク質である。HB9の発現は一時的であり、膵臓上皮内で約10.5日目にピークに達し、PDX1及びNKX6.1発現細胞内で発現される。約12.5日目に、HB9発現は減少し、後のステージにおいて、細胞のみに制限されるようになる。HB9のヌル突然変異のためのマウスホモ接合体において、膵臓の背葉は発達に失敗する(Nat. Genet. 23:67~70, 1999、Nat. Genet. 23:71~75, 1999)。HB9-/-細胞は、低レベルのグルコース輸送体、GLUT2、及びNKX6.1を発現する。更に、HB9-/-膵臓は、インスリン陽性細胞の数

10

20

30

40

50

の著しい低減を示す一方、他の膵臓ホルモンの発現には著しく影響しない。したがって、HB9の一時的制御は、正常な細胞の発達及び機能に必須である。細胞内のHB9発現を調節する因子について多くは知られていないが、ゼブラフィッシュにおける近年の研究は、レチノイン酸がHB9の発現を積極的に調節できることを示唆する(Development, 138, 4597~4608, 2011)。

【0014】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/998,883号において、トリヨードチロニン(「T3」)は、細胞を細胞に向かって分化させる際に、HB9タンパク質発現の誘導体として作用し得ることが実証された。T3及びT4の一方又は両方を使用して、NKX6.1、PDX1、及びHB9に陽性の膵臓内胚葉細胞を生成するための方法もまた、そこに開示されている。追加として、及び参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/998,884号に開示されるように、空気-液体界面において培養し、T3及びアクチビン受容体様キナーゼ(「ALK」)5阻害剤を使用することによって、膵内分泌マーカーの発現が、著しく増強され得ることが実証された。

【0015】

多様な転写因子は、膵内分泌細胞の、インスリン分泌細胞への分化を調節する。これらの因子には、v-maf鳥類筋腱膜線維腫発癌遺伝子相同体A(「MAFA」)がある。実際に、MAFAは、グルコース促進インスリン分泌の、細胞内の主要調節因子であり得ると考えられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

一般に、前駆細胞を機能的細胞に分化させるプロセスは、様々なステージを経て、ヒト多能性幹細胞などの前駆細胞から膵臓細胞を生成するためのプロトコルを改善することにおいて大幅に進歩した。研究におけるこれらの進歩にも関わらず、前駆細胞を分化させるプロセスにおける各工程は、特有の問題を提示する。このようにして、機能的内分泌細胞、とりわけ機能的細胞を産生する目的で、更なる分化プロトコル開発の必要性が依然として存在する。とりわけ、膵内分泌細胞内のMAFAの発現が増強されるプロセスを開発することが望ましい。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図A~図Mは実施例1に従い分化される幹細胞株H1からの、PDX1、NKX6.1、PAX4、PAX6、NGN3、MAFA、ABCC8、クロモグラニン-A、G6PC2、IAPP、インスリン、グルカゴン、及びPTF1aの未分化ES細胞に対する遺伝子発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図2】図A~図Cは実施例1に従い分化され、図2AではKi67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、図2BではCDX2(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、及び図2CではNKX6.1について染色された、ステージ3細胞のFACSプロファイルを描く。

【図3】図A~図Dは実施例1に従い分化され、図3AではNKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニン(X軸)、図3BではKi67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、図3Cではインスリン(Y軸)と共染色されるNKX6.1(X軸)、及び図3DではNeuroD1について染色された、ステージ4細胞のFACSプロファイルである。

【図4】図A~図Eは実施例1に従い分化され、図4AではNKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニン(X軸)、図4BではKi67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、図4Cではインスリン(Y軸)と共染色されるNKX6.1(X軸)、図4DではNeuroD1、及びグルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルである。

【図5】図A～図Fは実施例1に従い分化され、図5AではNKX6.1 (Y軸)と共染色されるクロモグラニン (X軸)、図5BではKi67 (Y軸)と共染色されるPDX1 (X軸)、図5Cではインスリン (Y軸)と共染色されるNKX6.1 (X軸)、図5DではOct3/4 (Y軸)と共染色されるPAX6 (X軸)、図5Eではグルカゴン (Y軸)と共染色されるインスリン (X軸)、及び図5FではFOX A2について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルである。

【図6】図A～図Fは実施例1に従い分化され、図6AではNKX6.1 (Y軸)と共染色されるクロモグラニン (X軸)、図6BではKi67 (Y軸)と共染色されるPDX1 (X軸)、及び図6Cではインスリン (Y軸)と共染色されるNKX6.1 (X軸)、図6DではOct3/4 (Y軸)と共染色されるPAX6 (X軸)、図6Eではグルカゴン (Y軸)と共染色されるインスリン (X軸)、及び図6FではFOX A2について染色された、ステージ7細胞のFACSプロファイルである。

10

【図7】実施例1に従い分化されたステージ3～ステージ7細胞の複数の膵内胚葉マーカー (FOX A2、PDX1、NKX6.1)、未分化ES細胞マーカー (Oct3/4)、内分泌マーカー (PAX6、ISL-1、NKX2.2、クロモグラニン)、及びホルモン (インスリン、グルカゴン)の発現率のグラフである。

【図8】図A～図Eはステージ6～7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のインスリン及びMAFAの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図9】未分化細胞に対する実施例4の分化細胞のAXL及びGAS6の発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

20

【図10A】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10B】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである

【図10C】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである

30

【図10D】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10E】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10F】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図11A】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

40

【図11B】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図11C】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図11D】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアル

50

タイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の以降の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことでより良好に理解されるであろう。本発明を例示する目的で、図面の本発明の実施形態を示す。しかしながら、本発明は、示される正確な構成、実施例、及び手段に限定されない。開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、「発明を実施するための形態」を、本発明の特定の特徴、実施形態、又は用途を説明又は例示する小項目に分割する。

【0019】

本発明は、ある特定の小分子による比較的成熟していない膵内分泌細胞の処理によって、より成熟した表現型の膵内分泌細胞を生成することを目的としている。本発明のある特定の実施形態において、膵内分泌細胞は、タンパク質メチルトランスフェラーゼ阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、及びp90リボソームS6キナーゼ(「RSK」)阻害剤のうちの1つ又は2つ以上である小分子の存在下、1つ又は2つ以上のステージで培養される。したがって、本発明は、多能性幹細胞を、成熟した表現型の膵内分泌細胞の特徴を呈する細胞に分化させるための細胞培養物だけでなく、分化を開始させ、分化を促す分化培地、並びにそのような分化、及び分化から生じる分化細胞及び細胞集団を提供する。本発明の方法は、膵内分泌細胞集団の形成をもたらし、細胞の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、及び最も好ましくは少なくとも50%が、単一ホルモンインスリンを発現し、PDX1、NKX6.1、及びMAFA陽性である。

【0020】

有利かつ好適に、本発明の細胞培養物及び分化培地は、空気-液体界面での分化と併せて使用されてもよい。培養は、多能性幹細胞から成熟した表現型の膵内分泌細胞への分化経路に關与する全てのステージで空気-液体界面で起こり得るか、又は分化の早期ステージで培地中に浸漬された平板培養上で培養することに続いて、分化の後期ステージのうちの1つ又は2つ以上の間に空気-液体界面で培養することを必要とし得る。より好ましくは、本発明のプロセスは、早期ステージを通じて培地中に浸漬された支持表面上で多能性幹細胞を培養することと、次いで分化の後期ステージに空気-液体界面で培養することとの組み合わせを必要とする。このような実施形態において、細胞は、最初に浸漬培養のための固体表面上に播種され、次いでその固体支持体から除去され、空気-液体界面で培養するために、多孔性支持体上に再度播種され得る。代替的に、細胞は、最初に多孔性支持体上に播種され、次いで分化の早期ステージで培地中に浸漬され、次に分化の後期ステージで空気-液体界面に置かれ得る。

【0021】

更に別の実施形態において、1つ又は2つ以上のステージでの分化はまた、T3、T4、それらの類似体のうちの1つ又は2つ以上の存在下、任意選択であるが好ましくはアクチビン受容体様キナーゼ5(「ALK5」)阻害剤を用いて行われる。好ましい実施形態において、膵内胚葉/内分泌前駆細胞の集団は、T3、T4、それらの類似体、及び膵内分泌細胞に対するALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上を含有する培地中で培養される。より好ましい実施形態において、結果として生じる膵内分泌細胞は、T3、T4、それらの類似体、及びALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上を含有する培地の存在下で更に分化される。

【0022】

ALK5阻害剤及び甲状腺受容体アゴニストのうちの1つ又は2つ以上の組み合わせによる膵内胚葉細胞の処理に続いて、タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、及びRSK阻害剤のうちの1つ又は2つ以上と併せて、結果として生じる膵内分泌細胞を培養することは、単一ホルモンインスリン、MAFA、PDX1、及びNKX6.1を発現する集団内の細胞の数を著しく増強すると共に、細胞内のMAFA発現のレベルを増加させることは、本発明の特定の発見である。本発明は、

空気 - 液体界面での分化と併せて使用されるときに特定の有用性を見出す。

【 0 0 2 3 】

定義

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

【 0 0 2 4 】

幹細胞は、それらの発生上の潜在性によって分類される。多能性幹細胞は、全ての胚細胞型を生じさせることが可能である。

【 0 0 2 5 】

分化は、特殊化されていない（unspecialized）（「拘束されていない（uncommitted）」）又は比較的特殊化されていない細胞が、特殊化された細胞、例えば、神経細胞又は筋細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した細胞は、細胞の系統の範囲内で、より特殊化した（「拘束された」）状態を呈している細胞である。分化プロセスに適用された際の用語「拘束された」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合への分化を続け、かつ通常的环境下で異なる細胞型に分化したり、又は低分化細胞型に戻ったりすることができない地点まで、分化経路において進行した細胞を指す。「脱分化」は、細胞が細胞の系統内で比較的特殊化されて（又は拘束されて）いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用する時、細胞の系統は、その細胞の遺伝性、すなわち、その細胞がどの細胞に由来するか、またその細胞がどのような細胞を生じさせ得るかを規定する。細胞の系統は、発達及び分化の遺伝スキームの範囲内で、その細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、拘束されていない細胞の、対象とする系統への分化を評価するために使用することができる。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用する時「マーカー」とは、対象とする細胞で差別的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。これに関して、差別的発現とは、未分化細胞又は分化の別のステージの細胞と比較して、陽性マーカーについては増殖したレベルを意味し、陰性マーカーについては減少したレベルを意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出限界は、他の細胞と比較して対象とする細胞において十分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することが可能である。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する時、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されたとき、特異的マーカー「について陽性」、「陽性」又は「+」である。同様に、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されないとき、特異的マーカー「について陰性」、「陰性」又は「-」である。とりわけ、蛍光活性細胞分類サイトメトリー（「FACS」）による陽性は通常約2%を超えるが、FACSによる陰性閾値は通常約1%を下回る。ポリメラーゼ連鎖反応サイトメトリー（「PCR」）による陽性は、通常約30サイクル（Ct s）以下であるが、PCRによる陰性は、通常約31サイクルを超える。

【 0 0 2 8 】

静的生体内細胞培養において、多能性幹細胞の機能的胚内分泌細胞への分化を複製する試みでは、分化プロセスは、多くの連続ステージを通じて進行すると見られる場合が多い。とりわけ、分化プロセスは、一般に複数のステージを通じて進行すると見られている。この段階的分化において、「ステージ1」は、分化プロセスの第1の工程、多能性幹細胞の、胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ1細胞」）への分化を指す。「ステージ2」は、第2の工程、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞

10

20

30

40

50

の、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ２細胞」）への分化を指す。「ステージ３」は、第３の工程、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ３細胞」）への分化を指す。「ステージ４」は、第４の工程、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腭前腸前駆体細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ４細胞」）への分化を指す。「ステージ５」は、第５の工程、腭前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腭内胚葉細胞及び腭内分泌前駆細胞のうちの一方又は両方に特徴的なマーカーを発現する細胞（集散的に「ステージ５細胞」又は代替的に「腭内胚葉／内分泌前駆体細胞」と称される）への分化を指す。ステージ６は、第６の工程、腭内胚葉／内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、未成熟細胞である腭内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ６細胞」）への分化を指す。ステージ６細胞は、単一ホルモニンスリンを発現し、PD \times 1、NK \times 6.1、及びクロモグラニン陽性である。本発明の細胞の集団を産生するプロセスにおいて、及びその目的で、第７の工程、「ステージ７」が使用され、未成熟細胞である腭内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、成熟化細胞であり、ステージ６細胞と比較してより成熟した表現型を有する腭内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を指す。「ステージ７細胞」とは、単一ホルモニンスリン+、MAFA+、NK \times 6.1+、及びPD \times 1+であるが、未成熟細胞よりも高いレベルでMAFAを発現する腭内分泌細胞も意味する。追加として、ステージ７を実行することから生じる細胞集団は、ステージ６の細胞集団と比較してより高い割合のMAFA陽性及び単一ホルモニンスリン発現細胞を有する。

【００２９】

特定集団の全ての細胞がこれらのステージを同じ速度で進行するとは限らないことに留意されたい。結論として、生体外細胞培養において、特に後期分化ステージでは、集団に存在する細胞の大半よりも分化経路を進行していなかったり、大半よりも進行していたりする細胞の存在を検出することは稀ではない。例えば、ステージ５での細胞の培養中、腭内分泌細胞に特徴的なマーカーの出現を見ることは稀ではない。本発明を例証する目的で、上で特定されたステージと関連した様々な細胞型の特徴が本明細書に記載される。

【００３０】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保有している細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、FOXA2（肝細胞核因子3-（「HNF3-」）としても知られる）、GATA4、SOX17、CXCR4、ブラチュウリー（Brachyury）、ケルベロス、OTX2、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMIXL1のうちの少なくとも１つを発現する。胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーは、CXCR4、FOXA2、及びSOX17である。したがって、胚体内胚葉細胞は、CXCR4、FOXA2、及びSOX17の発現で特徴付けられ得る。加えて、細胞がステージ１に留まることができる時間の長さに応じて、HNF4における増加が観察され得る。

【００３１】

「腸管細胞」は、本明細書で使用するとき、胚体内胚葉から誘導され、肺、肝臓、膵臓、胃、及び腸などの全ての内胚葉器官を生じ得る細胞を指す。腸管細胞は、胚体内胚葉細胞によって発現されたものに対するHNF4の実質的に増加した発現で特徴付けられ得る。例えば、HNF4のmRNA発現の10倍～40倍の増加が、ステージ２中に観察され得る。

【００３２】

「前腸内胚葉細胞」は、本明細書で使用するとき、食道、肺、胃、肝臓、膵臓、膀胱、及び十二指腸の一部分を生じる細胞を指す。前腸内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、PD \times 1、FOXA2、CD \times 2、SOX2、及びHNF4のうちの少なくとも１つを発現する。前腸内胚葉細胞は、腸管細胞と比較してPD \times 1の発現の増加で特徴付けられ得る。例えば、ステージ３培養において、細胞の50パーセント超が、典型的にPD \times 1を発現する。

【0033】

「膵前腸前駆細胞」は、本明細書で使用する時、以下のマーカー、すなわち、PDX 1、NKX 6.1、HNF 6、NGN 3、SOX 9、PAX 4、PAX 6、ISL 1、ガストリン、FOXA 2、PTF 1a、PROX 1、及びHNF 4 のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵前腸前駆細胞は、PDX 1、NKX 6.1、及びSOX 9のうちの少なくとも1つの発現について陽性であることで特徴付けられ得る。

【0034】

「膵内胚葉細胞」は、本明細書で使用する時、以下のマーカー、すなわち、PDX 1、NKX 6.1、HNF 1、PTF 1、HNF 6、HNF 4、SOX 9、NGN 3、ガストリン、HB 9、又はPROX 1のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵内胚葉細胞は、CDX 2又はSOX 2の実質的発現の欠失で特徴付けられ得る。

10

【0035】

「膵内分泌前駆細胞」は、本明細書で使用する時、膵ホルモン発現細胞になることが可能な膵内胚葉細胞を指す。膵内分泌前駆細胞は、以下のマーカー、すなわち、NGN 3、NKX 2.2、NeuroD 1、ISL 1、PAX 4、PAX 6、又はARXのうちの少なくとも1つを発現する。膵内分泌前駆細胞は、NKX 2.2及びNeuroD 1の発現で特徴付けられ得る。

【0036】

「膵内分泌細胞」は、本明細書で使用する時、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す。これらのホルモンに加え、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD 1、ISL 1、PDX 1、NKX 6.1、ARX、NKX 2.2、HB 9、及びPAX 6のうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の1つのサブセットは、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドではないが、インスリンを発現することが可能な細胞である「未成熟細胞」である。加えて、未成熟細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD 1、ISL 1、PDX 1、NKX 6.1、NKX 2.2、HB 9、及びPAX 6のうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の第2のサブセットは、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドではないが、インスリンを発現することが可能な細胞である「成熟化細胞」である。追加として、成熟化細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD 1、ISL 1、PDX 1、NKX 6.1、NKX 2.2、HB 9、PAX 6、及びMAFAのうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の更に別のサブセットは、成熟細胞に特徴的なマーカーを発現するものであり、比較的成熟していない細胞のそれと比較して頑強かつ増加したグルコースチャレンジに反応するインスリン放出に伴うPDX 1、NKX 2.2、NKX 6.1、NeuroD 1、ISL 1、HNF 3、HB 9、MAFA、及びPAX 6の発現で特徴付けられ得る。

20

30

【0037】

「空気 - 液体界面」又は「ALI」は、本明細書で使用する時、開放培養容器又は培地で部分的に充填された培養容器内に存在する空気 - 液体界面を指す。本明細書では便宜上「空気」と称されるが、本発明は、周囲環境内で見出されるガス及び組成物の混合物に限定されない。本発明は、具体的に企図され、例えば、特定成分が豊富であるか、又は特定成分が枯渇若しくは排除された混合物を含む、周囲環境とは異なる組成物を有するガス混合物を含む。

40

【0038】

本明細書では、「d 1」、「1 d」、及び「1日目」、「d 2」、「2 d」、及び「2日目」などが同義的に使用される。これらの数字の組み合わせは、本願の段階的分化プロトコル中の異なるステージにおける培養の特定の日を指す。

【0039】

「LDN - 193189」は、((6 - (4 - (2 - (ピペリジン - 1 - イル)エトキシ)フェニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル)ピラゾロ[1, 5 - a]ピリミジン、塩酸

50

塩))、Shanghai ChemPartner, Co., LTDから入手可能なBMP受容体阻害剤を指す。

【0040】

多能性幹細胞の特徴付け、供給源、増殖、及び培養

A．多能性幹細胞の特徴付け

多能性幹細胞は、指定されたTRA-1-60及びTRA-1-81抗体のうちの1つ又は2つ以上を発現し得る(Thomson et al., 1998, Science 282:1145~1147)。多能性幹細胞の生体外分化は、TRA-1-60及びTRA-1-81発現の喪失をもたらす。未分化の多能性幹細胞は、典型的には、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、製造業者(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California)によって記載されるように、商標VECTOR(登録商標)Redを付して販売されているアルカリホスファターゼ基質キットで発色させることによって検出され得る、アルカリホスファターゼ活性を有する。未分化の多能性幹細胞はまた、典型的には、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(「RT-PCR」)によって検出されるように、OCT4及びTERTも発現する。

【0041】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉の3胚葉層の全ての細胞に分化する能力である。幹細胞の多能性は、例えば、細胞を重症複合免疫不全症(「SCID」)マウスに注入し、形成される奇形腫を4%パラホルムアルデヒドで固定し、次いでこれらの3胚葉由来の細胞型の根拠について組織学的に調べることで確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を3つの胚葉層に関連したマーカーの存在に対して評価することにより決定することができる。

【0042】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的なGバンド法を使用して核型を決定し、次いで確立された、対応する霊長類種の核型と比較することができる。細胞は「正常な核型」を有する細胞を獲得することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体が全て揃っておりかつ目立った変化のないことを意味する。

【0043】

B．多能性幹細胞の供給源

本発明の方法では、任意の多能性幹細胞が使用され得る。使用が可能な多能性幹細胞の例示の種類としては、妊娠期間中の任意の時期(必ずしもではないが、通常は妊娠約10~12週よりも前)に採取した前胚性組織(胚盤胞など)、胚性組織又は胎児組織を含む、多能性細胞の樹立株が挙げられる。限定されない例は、ヒト胚性幹細胞(「hESC」)又はヒト胚生殖細胞の樹立株であり、ヒト胚性幹細胞株H1(NIHコード:WA01)、H7(NIHコード:WA07)、H9(NIHコード:WA09)(WiCell Research Institute, Madison, WI, USA)、及びSA002(Cellartis AB Corporation, Goteburg, Sweden)などである。

【0044】

フィーダー細胞の非存在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞もまた好適である。OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、及びZFP42など多数の多能性に関係する転写因子の強制発現を使用して、成体体細胞から誘導される誘導性多能性細胞(iPS)又は再プログラム化された多能性細胞(Annu Rev Genomics Hum Genet 2011, 12:165~185、また、iPS, Cell, 126(4):663~676も参照されたい)を使用することもできる。本発明の方法で使用されるヒト胚性幹細胞もまた、Thomsonらによって記載されるように調製され得る(米国特許第5,843,780号、Science, 1998, 282:1145~1147、Curr Top Dev Biol 1998, 38:133~165、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92:7844~7848)。BG01v(BresaGen, Athens, Georgia.)などの

変異体ヒト胚性幹細胞株、又はTakahashi et al., Cell 131: 1 ~ 12 (2007) に開示されている細胞などのヒト成体細胞に由来する細胞を使用することもできる。ある特定の実施形態において、本発明での使用に好適な多能性幹細胞は、Liら (Cell Stem Cell 4: 16 ~ 19, 2009)、Maheraliら (Cell Stem Cell 1: 55 ~ 70, 2007)、Stadtfeildら (Cell Stem Cell 2: 230 ~ 240)、Nakagawara (Nature Biotechnol 26: 101 ~ 106, 2008)、Takahashiら (Cell 131: 861 ~ 872, 2007)、及び米国特許出願公開第2011/0104805号に記載の方法に従って誘導することができる。ある特定の実施形態において、本発明での使用に好適な多能性幹細胞は、「ナイーブ」と見なされ、以下に記載の方法に従って誘導することができる。Gafniら (Nature, 504: 282, 2013)、及びWareら (PNAS, 111: 4484 ~ 4489, 2014)。これらの参考文献、特許、及び特許出願の全ては、とりわけそれらが多能性細胞の単離、培養、増殖、及び分化に関するため、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0045】

多能性幹細胞の他の供給源は、誘導された多能性幹細胞を含む (IPS, Cell, 126 (4): 663 ~ 676)。好適な細胞の更に他の供給源には、ヒト臍帯組織由来細胞、ヒト羊水由来細胞、ヒト胎盤由来細胞、及びヒト単為生殖生物が挙げられる。一実施形態において、臍帯組織由来細胞は、米国特許第7,510,873号に記載の方法によって得ることができる。別の実施形態において、胎盤組織由来細胞は、米国特許出願公開第2005/0058631号に記載の方法を使用して得ることができる。別の実施形態において、羊水由来細胞は、米国特許出願公開第2007/0122903号に記載の方法を使用して得ることができる。これらの特許出願の各々の開示は、それが細胞の単離及び特徴付けに関するため、その全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態において、多能性幹細胞は、非胎生起源であり得る。

20

【0046】

C. 多能性幹細胞の増殖及び培養

多能性幹細胞は、様々な点で多能性幹細胞を支持するフィーダー細胞の層上で一般的に培養される。代替的に、多能性幹細胞は、基本的にフィーダー細胞が存在しないにも関わらず、ほぼ分化を受けないで多能性幹細胞の増殖を支持する培養液システム中で培養され得る。多能性幹細胞を分化させずに無フィーダー培養液中で増殖させる際には、以前に他の細胞種を予め培養しておいて馴化させた培地を使用することでこの操作が支持される場合が多い。代替的に、多能性幹細胞を無フィーダー培養液中で分化させずに増殖させる際は、化学的合成培地を使用することでこの操作が支持され得る。

30

【0047】

多能性細胞は、様々なフィーダー層を用いて、又はマトリックスたんぱく質被覆した容器を用いて、容易に培養で増殖させることができる。代替的に、商標mTESR (登録商標) 1を付して販売されている培地 (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, B.C., Canada) などの合成培地との組み合わせで、化学的合成表面を、細胞の常用増殖のために使用してもよい。多能性細胞は、酵素消化、機械的分離、又はエチレンジアミン四酢酸 (「EDTA」) などの様々なカルシウムキレート剤を使用して、培養プレートから容易に取り出すことができる。代替的に、多能性細胞は、マトリックスタンパク質又はフィーダー層の非存在下で、懸濁液中で増殖させてもよい。

40

【0048】

多能性幹細胞を増殖及び培養する多くの異なる既知の方法が、特許請求される発明で使用されてもよい。例えば、本発明の方法は、Reubinoффら、Thompsonら、Richardsら、及び米国特許出願公開第2002/0072117号に記載の方法を使用することができる。Reubinoффら (Nature Biotechno

50

l o g y 1 8 : 3 9 9 ~ 4 0 4 (2 0 0 0)) 及び T h o m p s o n ら (S c i e n c e 2 8 2 : 1 1 4 5 ~ 1 1 4 7 (1 9 9 8)) は、マウス胚性繊維芽細胞フィーダー細胞層を用いたヒト胚盤胞からの多能性幹細胞株の培養について開示している。R i c h a r d s ら (S t e m C e l l s 2 1 : 5 4 6 ~ 5 5 6 , 2 0 0 3) は、1 1 の異なるヒト成体、胎児、及び新生児フィーダー細胞層の一団を、ヒト多能性幹細胞培養を支持する能力について評価し、「成体皮膚線維芽細胞フィーダー上で培養されたヒト胚性幹細胞株が、ヒト胚性幹細胞の形態を保持し、多能性を保持する」ことを示した。米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 7 2 1 1 7 号は、無フィーダー培養において霊長類の多能性幹細胞の増殖を支持する培地を産生する細胞系を開示している。使用される細胞系は、胚性組織から得られるか又は胚性幹細胞から分化させた間葉系かつ線維芽細胞様の細胞系である。米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 7 2 1 1 7 号はまた、霊長類のフィーダー細胞層としての細胞株の使用についても開示している。

10

【 0 0 4 9 】

多能性幹細胞を増殖及び培養する他の好適な既知の方法は、例えば、W a n g ら、S t o j k o v i c ら、M i y a m o o ら、及び A m i t らにおいて開示されている。W a n g ら (S t e m C e l l s 2 3 : 1 2 2 1 ~ 1 2 2 7 , 2 0 0 5) は、ヒト胚性幹細胞由来のフィーダー細胞層上のヒト多能性幹細胞の長期増殖のための方法を開示している。S t o j k o v i c ら (S t e m C e l l s 2 0 0 5 2 3 : 3 0 6 ~ 3 1 4 , 2 0 0 5) は、ヒト胚性幹細胞の自然分化から誘導されたフィーダー細胞系を開示している。M i y a m o t o ら (S t e m C e l l s 2 2 : 4 3 3 ~ 4 4 0 , 2 0 0 4) は、ヒトの胎盤から得られたフィーダー細胞の供給源を開示している。A m i t ら (B i o l . R e p r o d 6 8 : 2 1 5 0 ~ 2 1 5 6 , 2 0 0 3) は、ヒトの包皮由来のフィーダー細胞層を開示している。

20

【 0 0 5 0 】

多能性幹細胞を増殖及び培養する他の好適な方法は、例えば、I n z u n z a ら、米国特許第 6 , 6 4 2 , 0 4 8 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 7 9 9 号、X u ら、及び米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 1 0 0 1 1 号に開示されている。I n z u n z a ら (S t e m C e l l s 2 3 : 5 4 4 ~ 5 4 9 , 2 0 0 5) は、ヒトの出生直後産児の包皮線維芽細胞から得られたフィーダー細胞層を開示している。米国特許第 6 , 6 4 2 , 0 4 8 号は、無フィーダー細胞培養中での霊長類の多能性幹細胞の増殖を支持する培地、及びこうした培地の産生に有用な細胞株を開示している。米国特許第 6 , 6 4 2 , 0 4 8 号は、胚性組織から得られるか、又は胚性幹細胞から分化した間葉系かつ線維芽細胞様の細胞株、並びにこうした細胞株を誘導し、培地を処理し、こうした培地を用いて幹細胞を増殖させるための方法を報告している。国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 7 9 9 号は、哺乳類細胞の維持、増殖及び分化のための馴化培地を開示している。国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 7 9 9 号は、この開示を介して産生された培養培地が、マウス細胞、とりわけ、MMH (M e t マウス肝細胞) と呼ばれるそれらの分化及び不死化遺伝子導入幹細胞の細胞分泌活性によって馴化されることを報告している。X u ら (S t e m C e l l s 2 2 : 9 7 2 ~ 9 8 0 , 2 0 0 4) は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を過剰発現するように遺伝子改変されたヒト胚性幹細胞由来細胞から得られた馴化培地を開示している。米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 1 0 0 1 1 号は、多能性幹細胞の維持のための化学的合成培地を開示している。

30

40

【 0 0 5 1 】

既知の代替培養系は、胚性幹細胞の増殖を促進することができる増殖因子が補充された無血清培地を用いる。こうした培養系の例には、C h e o n ら、L e v e n s t e i n ら、及び米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 8 0 7 0 号が挙げられるが、これらに限定されない。C h e o n ら (B i o R e p r o d D O I : 1 0 . 1 0 9 5 / b i o l r e p r o d . 1 0 5 . 0 4 6 8 7 0 , O c t o b e r 1 9 , 2 0 0 5) は、胚性幹細胞の自己再生を誘発することが可能な異なる増殖因子が補充された非馴化血清補充培地中に胚性幹細胞が維持されている、無フィーダー、無血清培養系を開示している。L e v e n s t

50

einら (Stem Cells 24:568~574, 2006) は、線維芽細胞又は馴化培地の非存在下で、bFGFが補充された培地を使用して、ヒト胚幹細胞を長期間培養する方法を開示している。米国特許出願公開第2005/0148070号は、血清及び線維芽細胞フィーダー細胞を含まない合成培地中でのヒト胚幹細胞の培養方法を開示し、同方法は、アルブミン、アミノ酸、ビタミン、無機物、少なくとも1つのトランスフェリン又はトランスフェリン代替物、少なくとも1つのインスリン又はインスリン代替物を含有する培地中で幹細胞を培養することを含み、この培地は、本質的に哺乳類胎児血清を含有せず、線維芽細胞増殖因子シグナル伝達受容体を活性化できる少なくとも約100 ng/mLの線維芽細胞増殖因子を含有し、増殖因子は、線維芽細胞フィーダー層のみでなく他の源からも供給され、培地はフィーダー細胞又は馴化培地なしで、未分化状態の幹細胞の増殖を支持した。

10

【0052】

多能性幹細胞を培養及び増殖させる更に他の既知の好適な方法は、米国特許出願公開第2005/0233446号、米国特許第6,800,480号、米国特許出願公開第2005/0244962号、及び国際公開第2005/065354号に開示されている。米国特許出願公開第2005/0233446号は、未分化の霊長類始原幹細胞を含む、幹細胞を培養する際に有用な合成培地を開示している。溶液において、培地は、培養されている幹細胞と比較して実質的に等張である。所定の培養において、特定の培地は、基本培地、及び実質的に未分化の始原幹細胞の増殖の支持に必要な、ある量のbFGF、インスリン、及びアスコルビン酸の各々である。米国特許第6,800,480号は、実質的に未分化状態の霊長類由来の始原幹細胞を増殖させるための細胞培地であって、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持する上で効果的な低浸透圧、低エンドトキシンの基本培地を含む細胞培地が提供されることを報告している。この第6,800,480号特許の開示は更に、基本培地が、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持する上で効果的な栄養素血清、並びにフィーダー細胞及びフィーダー細胞から誘導される細胞外マトリックス成分から選択される基質と組み合わせられることを報告している。この培地は更に、非必須アミノ酸、抗酸化剤、並びにヌクレオシド及びピルビン酸塩から選択される第1の増殖因子を含むことを述べている。米国特許出願公開第2005/0244962号は、本開示の一態様が、霊長類胚性幹細胞を培養する方法を提供すること、及び培養中の幹細胞が、線維芽細胞フィーダー層以外の源から供給される線維芽細胞増殖因子の存在下、本質的に哺乳類胎児血清を含まない（好ましくは本質的にいかなる動物血清も含まない）ことを報告している。

20

30

【0053】

国際公開第2005/065354号は、本質的に無フィーダーかつ無血清であり、実質的に未分化の哺乳類幹細胞の増殖を支持するのに十分な量の基本培地、bFGF、インスリン、及びアスコルビン酸である、合成、等張培養培地を開示している。更に、国際公開第2005/086845号は、幹細胞を、細胞を未分化な状態に維持するのに十分な量の、形質転換増殖因子（「TGF-」）ファミリータンパク質のメンバー、線維芽細胞増殖因子（「FGF」）ファミリータンパク質のメンバー、又はニコチンアミドに、所望の結果を得るのに十分な時間にわたって曝露することを含む、未分化幹細胞を維持するための方法を開示している。

40

【0054】

多能性幹細胞は、好適な培養基質上で平板培養することができる。一実施形態において、好適な培養基質は、基底膜から誘導されたもの、又は接着分子受容体-リガンド結合の一部を形成し得るものなどの細胞外マトリックス成分である。好適な培養基質は、商標MATRIGEL（商標）（Corning Incorporated, Corning, New York）を付して販売されている再構成された基底膜である。MATRIGEL（商標）は、Engelbreth-Holm Swarm腫瘍細胞由来の可溶性製剤であり、室温でゲル化して再構成基底膜を形成する。

【0055】

50

当該技術分野において既知の他の細胞外マトリックス成分及び成分混合物は、代替物として好適である。増殖させる細胞型に応じて、これは、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパリン硫酸塩などを、単独で又は様々な組み合わせで含み得る。

【0056】

多能性幹細胞は、好適な分布で、細胞の生存、増殖、及び所望の特徴の維持を促進する培地の存在下、基質上に平板培養されてもよい。これらの特徴の全ては、播種分布に細心の注意を払うことで利益を得られるものであり、当業者は容易に決定することができる。好適な培養培地は、以下の成分、Life Technologies Corporation, Grand Island New Yorkにより商標GIBCO(登録商標)(カタログ番号11965-092)を付して販売されているダルベッコ改変イーグル培地(「DMEM」)、Life Technologies Corporationにより商標GIBCO(登録商標)(カタログ番号10829-018)を付して販売されているノックアウトダルベッコ改変イーグル培地(「KO DMEM」)、ハムF12/50% DMEM基本培地、Life Technologiesにより商標GIBCO(登録商標)(カタログ番号25030-081)を付して販売されている200mM L-グルタミン、Life Technologiesにより商標GIBCO(登録商標)(カタログ番号11140-050)を付して販売されている非必須アミノ酸溶液、
-メルカプトエタノール、Sigma-Aldrich Company, LLC Saint Louis, MO(カタログ番号M7522)、Life Technologiesにより商標GIBCO(登録商標)(カタログ番号13256-029)を付して販売されているヒト組換え塩基性線維芽細胞増殖因子(「bFGF」)から作製され得る。

【0057】

ヒト胚性幹細胞の大規模増殖及び制御された分化はまた、懸濁バイオリアクターを使用して達成され得る。こうした系は、制御された培養系内で、優れた効能を有する、臨床的に関連する細胞数を生成することができ得る。例えば、Journal of Biotechnology, May 2014, Vol. 178: 54~64、Stem Cell Reports, Apr 2014, Vol. 3, No. 6: 1132、及びTissue Engineering Part C: Methods, Feb 2013, Vol. 19, No. 2: 166~180に開示されるように、多能性マウス及びhES細胞の増殖を可能にする、確立されたバイオリアクター培養システムを使用することが知られている。

【0058】

多能性幹細胞の分化

多能性細胞が細胞に向かって分化するとき、それらは、様々なステージを通じて分化し、各々が特定のマーカーの存在又は非存在で特徴付けられ得る。これらのステージへの細胞の分化は、培養培地に添加されるある特定の因子の存在及び欠失を含む、特異的培養条件によって達成される。一般に、この分化は、多能性幹細胞の、胚体内胚葉系統及び胚体内胚葉細胞への分化を必要とし得る。次いでこれらの細胞は、腸管細胞へと更に分化され得、次いで順次前腸内胚葉細胞へと分化され得る。前腸内胚葉細胞は、腭前腸前駆細胞へと分化され得、次いで腭内胚葉細胞、腭内分泌前駆細胞、又は両方へと更に分化され得る。これらの細胞は、細胞を産生又は分泌する腭臓ホルモンへと分化され得る。この出願は、好ましくは培地で部分的に充填された培養容器内に存在する空気-液体界面で細胞を培養することによって、特にステージ5~7のうちの1つ又は2つ以上において空気-液体界面で細胞を培養することによって、多能性幹細胞の腭内分泌細胞への段階的分化を提供する。

【0059】

甲状腺ホルモントリヨードチロニン(「T3」)及びチロキシン(「T4」)、並びにそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上が、単独で又はALK5阻害剤との更なる組み

合わせで、分化のステージ1～7のうちの1つ又は2つ以上で、好ましくはステージ5～7の各々で培養する細胞内で使用され得る。代替的に、ALK5阻害剤は、分化の1つ又は2つ以上のステージにおいて、しかし好ましくはステージ5～7の各々で、単独で使用され得る。より好ましくは、甲状腺ホルモン又はそれらの類似体及びALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上は、1つ又は2つ以上の分化ステージにおいて、及び好ましくはステージ5～7の各々で使用される。好適な甲状腺ホルモン類似体には、制限なしに、GC-1 (Soberbtirome) (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesotaから入手可能)、3, 5-ジヨードチロプロピオン酸 (「D IPTA」)、J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2008, 111: 262～267及びProc. Natl. Acad. Sci. US 2003, 100: 10067～10072に論じられているKB-141、Proc. Natl. Acad. Sci. US 2007, 104: 15490～15495に論じられているMB07344、J. Lipid Res., May 2009, 50: 938及びEndocr. Pract. 2012, 18(6): 954～964 (これらの開示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に論じられているT0681が挙げられ得る。有用なALK5阻害剤としては、好ましいALK5阻害剤でもある、ALK5阻害剤II (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York)、ALK5i (Axxora, Inc., San Diego, California)、SD208 (R&D Systems)、TGF-阻害剤SB431542 (Xcess Biosciences, Inc., San Diego, California)、ITD-1 (Xcess Biosciences)、LY2109761 (Xcess Biosciences)、A83-01 (Xcess Biosciences)、LY2157299 (Xcess Biosciences)、TGF-受容体阻害剤V (EMD Millipore Chemical, Gibbstown, New Jersey)、TGF-受容体阻害剤I (EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤IV (EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VII (EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VIII (EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤II (EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VI (EMD Millipore)、及びTGF-受容体阻害剤VI (EMD Millipore)が挙げられる。

【0060】

加えて、本発明の好ましい実施形態において、これらの方法は、ビタミンE、アセチルシステイン、ビタミンC、抗酸化剤補助剤 (カタログ番号A1345、Sigma-Aldrich Company, LLC Saint Louis, Missouri)、グルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼなどの抗酸化剤、及びそれらの組み合わせの一方又は両方を含む分化培地を用いて、1つ又は2つ以上のステージで細胞を処理すること、しかし好ましくは細胞をステージ7中に処理することを含む。更により好ましい実施形態において、ステージ6を実行する際に、分泌酵素阻害剤が使用され、これは分泌酵素阻害剤XX (EMD Millipore)、分泌酵素阻害剤XXI (EMD Millipore)、分泌酵素阻害剤XVI (EMD Millipore)、N-[(3, 5-ジフルオロフェニル) アセチル] - L - アラニル - 2 - フェニル] グリシン - 1, 1 - ジメチルエチルエステル (「DAPT」) (カタログNi. 2634, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) など、及びそれらの組み合わせであり得る。分泌酵素阻害剤の有用な量は、約50 nM～5000 nM、好ましくは約50 nM～500 nMであり得る。抗酸化剤の量は、約0.1～100 µM、代替的には約0.1～20 µM、及び好ましくは約1～10 µMであり得る。代替的に、抗酸化剤の有用な量は、約100 nM～5 mM、約1000 nM～2 mM、及び好ましくは約0.1～1 mMであり得る。

【0061】

本発明の最も好ましい実施形態において、特定の小分子は、1つ又は2つ以上の分化の

10

20

30

40

50

ステージにおいて、好ましくはステージ 6 及び 7 の一方又は両方で使用される。関心対象の小分子は、オーロラキナーゼ、p90 リボソーム S6 キナーゼ、又はメチルトランスフェラーゼ DOT1L を阻害することが可能なものであり、好ましくは、培養された細胞の酸化ストレスを低減する抗酸化剤と共に使用される。こうした有用な阻害剤には、オーロラキナーゼ阻害剤 II (4 - (4' - ベンズアミドアニリノ) - 6, 7 - ジメトキシキナゾリン)、SNS 314 メシラート (N - (3 - クロロフェニル) - N' - [5 - [2 - (チエノ [3, 2 - d] ピリミジン - 4 - イルアミノ) エチル] - 2 - チアゾリル] ウレアメタンスルホン酸塩)、GSK1070916 (3 - (4 - (4 - (2 - (3 - (ジメチルアミノ) メチル) フェニル) - 1 H - ピロロ [2, 3 - b] ピリジン - 4 - イル) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル) フェニル) - 1, 1 - ジメチルウレア)、TAK-901 (5 - (3 - (エチルスルホニル) フェニル) - 3, 8 - ジメチル - N - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 9 H - ピリド [2, 3 - b] インドール - 7 - カルボキシアミド)、RSK 阻害剤 II (ジヒドロプテリジノン 2 - (3, 5 - ジフルオロ - 4 - ヒドロキシ - アニリノ) - 8 - イソペンチル - 5, 7 - ジメチル - 7 H - プテリジン - 6 - オン)、及び EPZ-5676 (9 H - プリン - 6 - アミン, 9 - [5 - デオキシ - 5 - [[シス - 3 - [2 - [6 - (1, 1 - ジメチルエチル) - 1 H - ベンズイミダゾール - 2 - イル] エチル] シクロブチル] (1 - メチルエチル) アミノ] - D - リボフラノシル] - のラセミ混合物)、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。オーロラキナーゼ阻害剤 II、及び RSK 阻害剤 II、及び DOT1L、とりわけ EPZ-5676 が特に関心対象である。本発明の好ましい実施形態において、小分子は、ステージ 6 及び 7 のうちの 1 つ又は 2 つ以上の培地中で、より好ましくはステージ 7 で使用される。有用な小分子の量は、成熟マーカーの最良の発現を示す量、及びどの量が毒性作用をもたらさないかを選択することによって決定され得る。典型的に、有用な量は、約 500 nM ~ 10 µM、代替的には約 500 nM ~ 5 µM、及び好ましくは約 500 nM ~ 2 µM となる。

【0062】

多能性細胞の、成熟した表現型を有する膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化

多能性幹細胞の特性は当業者には周知であり、多能性幹細胞の更なる特性が引き続き同定されている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの、すなわち、ABC G2、cripto、FOX D3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 のうちの 1 つ又は 2 つ以上の発現が挙げられる。これらは、RT-PCR によって検出可能であり得る。

【0063】

例示的な多能性幹細胞として、ヒト胚性幹細胞株 H9 (NIHコード: WA09)、ヒト胚性幹細胞株 H1 (NIHコード: WA01)、ヒト胚性幹細胞株 H7 (NIHコード: WA07)、及びヒト胚性幹細胞株 SA002 が挙げられる。また、多能性細胞に特徴的な以下のマーカー、すなわち、ABC G2、cripto、CD9、FOX D3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、及び TRA-1-81 のうちの少なくとも 1 つを発現する細胞も好適である。

【0064】

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーの少なくとも 1 つを発現している細胞は本発明での使用に好適である。本発明の一態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆体細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。

【0065】

膵内胚葉系統に特徴的なこれらのマーカーのうちの少なくとも 1 つを発現する細胞もま

た、本発明における使用に適している。本発明の一態様では、膵内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵内胚葉細胞であり、PD \times 1及びNK \times 6.1の発現は、CD \times 2及びSO \times 2の発現より実質的に高い。ある特定の実施形態において、FACSにより測定して、細胞の30%超が、PD \times 1及びNK \times 6.1を発現し、細胞の30%未満が、CD \times 2又はSO \times 2を発現する。PD \times 1及びNK \times 6.1の発現が、CD \times 2又はSO \times 2の発現より少なくとも2倍高い細胞が特に有用である。

【0066】

膵内分泌系統に特徴的なこれらのマーカーのうちの少なくとも1つを発現する細胞もまた、本発明における使用に更に適している。本発明の一態様において、膵内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であり得、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、又は膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を意味する。好ましい実施形態において、膵内分泌細胞は、インスリン産生細胞である。

【0067】

本発明のある特定の実施形態において、成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞に到達するために、多能性幹細胞で開始するプロトコルが用いられる。このプロトコルは、以下を含む。

ステージ1：細胞培養株から得られる胚性幹細胞などの多能性幹細胞が、胚体内胚葉細胞の形成を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ2：ステージ1から生じる細胞が、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への形成を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ3：ステージ2細胞から生じる細胞が、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への更なる分化を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ4：ステージ3から生じる細胞が、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への更なる分化を誘導するように適切な因子で処理される。これらの細胞は、後期ステージ4において、空気-液体界面で任意選択で培養される。

ステージ5：ステージ4から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、又は(ii)(i)及び(ii)の両方を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、膵内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。

ステージ6：ステージ5細胞から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、(iii) オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、(v)(i)及び(ii)の両方、(v)(i)、(ii)、及び(ii)(i)、(vi)(i)及び(ii)(i)、又は(vii)(ii)及び(ii)(i)を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。

ステージ7：ステージ6細胞から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、(iii) 抗酸化剤、(iv) オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、(v)(i)及び(ii)、(vi)(i)及び(ii)(i)、(vii)(i)及び(iv)、(viii)(ii)及び(ii)(i)、(ix)(ii)及び(iv)、(x)(i)、(ii)、及び(ii)(i)、(xi)(i)、(iii)、及び(iv)、(xii)(ii)、(iii)、及び(iv)、(xiii)(ii)、(ii)及び(iv)、(xiv)(ii)及び(iv)、又は(xv)(i)、(ii)、(iii)及び(iv)を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、単一

10

20

30

40

50

ホルモンインスリンを発現し、PDX 1、NKX 6.1、及びMAFA陽性であり、ステージ6細胞より高いレベルのMAFAの発現を有する膵内分泌細胞の形成を誘導し、結果として生じる細胞集団は、ステージ6細胞より高い割合のMAFA陽性かつ単一ホルモンインスリンを発現する細胞を有する。

【0068】

ある特定の実施形態において、本発明は、多能性幹細胞（例えば、前ステージ1細胞）をステージ7細胞に分化させることを包含するが、本発明はまた、他のステージの細胞をステージ7に向かって分化させることも包含する。とりわけ、本発明は、ステージ4細胞のステージ7細胞への分化を包含する。更に、プロセスは別個のステージで記載されているが、分化プロセスを通じた細胞の処理並びに進行は、連続的又は継続的であり得る。更に、多能性幹細胞の、ステージ6又はステージ7細胞への分化は、懸濁培養において行うことができる。

10

【0069】

分化効率は、被処理細胞集団を、関心対象の分化細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する剤、例えば抗体に曝露することにより決定することができる。培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当技術分野にて標準的である。これらの方法としては、RT-PCR、ノーザンブロット、インシチュハイブリダイゼーション（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 2001 supplement)を参照されたい）、及びイムノアッセイ、例えば、材料切片の免疫組織化学的分析、ウェスタンブロット、並びに無傷細胞内でアクセス可能なマーカーの場合、フローサイトメトリー分析（FACS）（例えば、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)を参照されたい）が挙げられる。

20

【0070】

分化細胞は、更に精製されてもよい。例えば、多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、被処理細胞集団を、精製される分化細胞により特徴的に発現されるタンパク質マーカーを特異的に認識する剤（抗体など）に曝露することにより、分化細胞を精製することができる。

30

【0071】

細胞分化に望ましい十分な量のビタミン、無機物、塩、グルコース、アミノ酸、及び担体タンパク質を含有する任意の好適な増殖培地は、様々なステージ1～7に使用され得る。しかしながら、好ましくは、以下が使用される。ステージ1-MCDB-131（Life Technologies Corporation, Grand Island, NYから入手可能）又はRPMI（Sigma-Aldrichから入手可能）、ステージ2-MCDB-131又はダルベッコ改変イーグル培地F12（「DMEM-F12」）、ステージ3～5-MCDB-131、BLAR（表1）、又はDMEM、及びステージ6及び7-BLAR又はCMRL（Life Technologies）。好ましくは、培地のグルコース濃度は、ステージ1～4については約10mMで、又はより好ましくはそれより低く保持され、ステージ5～7については約10mMより高く保持される。

40

ステージ1：多能性細胞の、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0072】

多能性幹細胞は、当技術分野において既知の任意の方法により、又は本発明で提案される任意の方法により、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。多能性幹細胞を、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるために有用であると報告されている方法は、D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534～1541 (2005)、Shinoz

50

aki et al., Development 131, 1651~1662 (2004)、McLean et al., Stem Cells 25, 29~38 (2007)、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392~1401 (2006)に開示されている。追加の好適な分化方法は、米国特許出願公開第2007/0254359号、同第2009/0170198号、同第2011/0091971号、同第2010/0015711号、同第2012/0190111号、同第2012/0190112号、同第2012/0196365号に開示されている。これらの開示は、それらが多能性幹細胞の胚体内胚葉細胞への分化に関するため、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0073】

一実施形態において、多能性細胞は、好適な増殖培地、好ましくはMCDB-131又はRPMIで処理される。培地は、好ましくは増殖分化因子、例えば増殖分化因子8(「GDF8」)、及びグリコゲンシンターゼキナーゼ-3(「GSK3」)阻害剤、例えば米国特許出願公開第2010/0015711(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示される環式アニリン-ピリジントリアジン化合物が補充され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。好ましいGSK3阻害剤は、14-プロパ-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナエン-16-オン(「MCX化合物」)である。処理は、多能性幹細胞を、約50ng/mL~約150ng/mL、代替的に約75ng/mL~約125ng/mL、好ましくは約100ng/mLのGDF8が補充された培地と接触させることを必要とし得る。この処理はまた、細胞を、約0.1~約5μM、代替的に約0.5~約2.5μM、好ましくは約1μMのMCX化合物と接触させることも必要とし得る。多能性細胞は、約2~5日間、好ましくは約2~3日間にわたって培養され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を促進することができる。

【0074】

好ましい実施形態において、細胞は、GDF8及びMCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及びより低い濃度のMCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8の存在下、MCX化合物の非存在下で1日培養される。とりわけ、細胞は、GDF8及び約1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及び約0.1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8の存在下、MCX化合物の非存在下で1日培養される。代替的に、細胞は、GDF8及び約1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及び約0.1μM MCX化合物の存在下で1日培養される。

【0075】

代替的に、多能性幹細胞は、血清の非存在下、アクチビンAを含有する培地中で培養され得、次いで細胞をアクチビンA及び血清と培養した後、D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534~1541(2005)に開示されるように、細胞を異なる濃度のアクチビンA及び血清と培養する。更に別の代替として、多能性幹細胞は、アクチビンAを含む培地中、血清の非存在下で多能性幹細胞を培養し、次いでD'Amour et al., Nature Biotechnology, 2005に開示されるように、細胞をアクチビンAと培養することによって胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。なおも更に、多能性幹細胞は、アクチビンA及びWNTリガンドを含む培地中、血清の非存在下で多能性幹細胞を培養し、次いでWNTリガンドを除去し、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392~1401(2006)に開示されるように、細胞をアクチビンAと培養することによって胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0076】

本発明の一実施形態において、多能性幹細胞は、アクチビン A 及び WNT 3 A で処理され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成をもたらす。処理は、多能性幹細胞を、約 50 ng/mL ~ 約 150 ng/mL、代替的に約 75 ng/mL ~ 約 125 ng/mL、代替的に約 100 ng/mL のアクチビン A と接触させることを必要とし得る。この処理はまた、細胞を、約 10 ng/mL ~ 約 50 ng/mL、代替的に約 15 ng/mL ~ 約 30 ng/mL、代替的に約 20 ng/mL の WNT 3 A と接触させることを必要とし得る。多能性細胞は、約 3 日間培養され、胚体内胚葉細胞に到達し得る。一実施形態において、細胞は、アクチビン A 及び WNT 3 A の存在下で 1 日培養され、続いてアクチビン A の存在下で (WNT 3 A は存在しない) 残りを培養する。

【0077】

10

胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、以下の特定のプロトコルの前後に、マーカーの存在に関して試験することにより決定することができる。多能性幹細胞は、一般にかかるマーカーを発現しない。したがって、多能性細胞の分化は、細胞が胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現し始めた際に検出され得る。

ステージ 2 : 胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0078】

胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞は、MCDB - 131 又は DMEM F12 などの増殖培地中で、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと更に分化され得る。一実施形態において、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、線維芽細胞増殖因子 (「FGF」) を含有する培地、好ましくは FGF 7 又は FGF 10 と培養して、細胞を分化させることを含む。例えば、細胞培養物は、約 10 ng/mL ~ 約 75 ng/mL、代替的に約 25 ng/mL ~ 約 75 ng/mL、更に代替的に約 30 ng/mL ~ 約 60 ng/mL、代替的に約 50 ng/mL の線維芽細胞増殖因子、好ましくは FGF 7 又は FGF 10、より好ましくは FGF 7、及び最も好ましくは約 25 ng/mL の FGF 7 を含み得る。細胞は、これらの条件下で約 2 ~ 3 日間、好ましくは約 2 日間培養され得る。

20

【0079】

別の実施形態において、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を、線維芽細胞増殖因子、好ましくは FGF 7 又は FGF 10、及びアスコルビン酸 (ビタミン C) と培養することを含む。培養培地は、約 0.1 mM ~ 約 0.5 mM のアスコルビン酸、代替的に約 0.2 mM ~ 約 0.4 mM のアスコルビン酸、代替的に約 0.25 mM のアスコルビン酸を含み得る。細胞培養物はまた、約 10 ng/mL ~ 約 35 ng/mL、代替的に約 15 ng/mL ~ 約 30 ng/mL、代替的に約 25 ng/mL の線維芽細胞増殖因子、好ましくは FGF 7 又は FGF 10、より好ましくは FGF 7 を含み得る。例えば、細胞培養物は、約 0.25 mM のアスコルビン酸及び約 25 ng/mL の FGF 7 を含み得る。一実施形態において、ステージ 1 細胞は、FGF 7 及びアスコルビン酸で 2 日間処理される。

30

ステージ 3 : 腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化

40

【0080】

ステージ 2 を実行することから生じる腸管細胞は、これらの細胞を、MCDB - 131、DMEM などの増殖培地、又は BLAR などのカスタム培地 (表 I) 中で培養することによってステージ 3 細胞、つまり前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞へと更に分化し得る。培地は、(i) 線維芽細胞増殖因子、好ましくは FGF 7 又は FGF 10、及びより好ましくは FGF 7、(ii) レチノイン酸 (「RA」)、(iii) 1 - ピペラジンアミン、N - [(3, 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1H - ピラゾール - 4 - イル)メチレン] - 4 - (フェニルメチル) - 又は ((E) - 4 - ベンキシル - N - ((3, 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1H - ピラゾール - 4 - イル), エチレン - ピペラジン - 1 - アミン) である、ソニックヘッジホッグ (「SHH」) シグナル伝達経路アンタゴニ

50

スト（例えばスムーズンド（Smoothened）アンタゴニスト（「SANT-1」）、2-メトキシエチル1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-(3ヒドロキシフェニル)-7-(2-メトキシフェニル)-2-メチル-5-オキソ-3-キノリンカルボキシレートである、HPI-1、及び好ましくはSANT-1、(iv)タンパク質キナーゼC（「PKC」）活性因子、例えば((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエンオイルアミノ)ベンゾラクタム)（「TPB」）、ホルボール-12,13-ジブチレート（「PDBu」）、ホルボール-12-ミリステート-13-酢酸塩（「PMA」）又はインドラクタムV（「ILV」）及び好ましくはTPB、(v)骨形成タンパク質（「BMP」）阻害剤、例えばLDN-193189、Noggin、又はChordin、及び好ましくはLDN-193189、並びに(vi)アスコルビン酸が補充され得る。代替的に、スムーズンド（「SMO」）受容体阻害剤（例えば、MRT10（N[[[3-ベンゾイルアミノ]フェニル]アミノ]チオキシメチル]-3,4,5-トリメトキシベンズアミド））又はシクロパミンが使用されてもよい。例えば、細胞培養物は、約100nM～約500nM、代替的に約100nM～約400nM、代替的に約200nMのPKC活性因子を含み得る。細胞は、これらの増殖因子、小分子アゴニスト、及びアンタゴニストの存在下で約2～4日間、好ましくは約2～3日間、より好ましくは約2日間培養され得る。

【0081】

代替的に、ステージ2細胞は、SMO受容体阻害剤、SANT-1、レチノイン酸、及びNogginが補充された培養培地中でこれらの細胞を培養することによってステージ3細胞へと分化され得る。細胞は、約2～4日間、好ましくは約2日間培養され得る。

【0082】

一実施形態において、培地は、約10ng/mL～約35ng/mL、代替的に約15ng/mL～約30ng/mL、代替的に約25ng/mLの線維芽細胞増殖因子、好ましくはFGF7又はFGF10、より好ましくはFGF7、約0.1mM～約0.5mMのアスコルビン酸、代替的に約0.2mM～約0.4mM、代替的に約0.25mMのアスコルビン酸、約0.1μM～約0.4μMのSANT-1、約100～約300nMのTPB、及び約50nM～約200nM、及び約100nMのLDN-193189が補充される。別の実施形態において、培地は、約25ng/mLのFGF-7、約1μMのレチノイン酸、約0.25μMのSANT-1、約200nMのTPB、約100nMのLDN-193189、及び約0.25mMのアスコルビン酸が補充される。

【0083】

一実施形態において、培地は、約0.1μM～約0.3μMのSANT-1、約0.5μM～約3μMのレチノイン酸、及び約75ng/mL～約125ng/mLのNogginが補充される。

ステージ4～ステージ7：オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上と共に甲状腺ホルモン及びALK阻害剤の一方又は両方が補充された培養培地での処理による、好ましくは空気-液体界面で培養することによる、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、成熟した表現型膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0084】

一実施形態において、本発明は、膵内分泌細胞への多能性細胞の経路における全てのステージについて、空気-液体界面で培養することを企図しているが、本発明は、好ましくは平板又は浸漬培養におけるステージ1～ステージ4細胞、並びに空気-液体界面で細胞を培養することによるステージ5、6、及び7細胞の形成を提供する。他の実施形態において、本発明は、ステージ4、5、及び6細胞を空気-液体界面で培養することを含む、多能性細胞の分化の段階的方法に関する。ある特定の実施形態において、ステージ4～7中に培養される細胞は、空気-液体界面で培養され得る。他の実施形態において、後期ステージ4～ステージ6細胞、又はステージ5及びステージ6細胞のみが空気-液体界面で培養される。更に別の代替実施形態において、ステージ1～4は、細胞を浸漬された平板

10

20

30

40

50

培養において細胞を培養することによって行われ、ステージ5～7は、浸漬された懸濁培養において培養することによって行われる。

【0085】

追加として、ステージ5、6、及び7のうちの1つ又は2つ以上、好ましくは全ての間の培養は、T3、T4、及びそれらの類似体、ALK5阻害剤のうちの1つ若しくは2つ以上、又はT3、T4、及びそれらの類似体のうちの1つ若しくは2つ以上及びALK5阻害剤の両方の存在下で行われる。好ましい実施形態において、ステージ5、6、及び7のうちの1つ又は2つ以上、及び好ましくはそれらの全ての間の培養は、好ましくはT3及びALK5阻害剤の存在下、及びより好ましくはT3及びALK5阻害剤IIの存在下で行われる。甲状腺ホルモン又はそれらの類似体の好適な量は、約0～約1000nM、代替的に約10～約900nM、代替的に約100～約800nM、代替的に約200～約700nM、代替的に約300～約600nM、代替的に約400～約500nM、代替的に約1～約500nM、代替的に約1～約100nM、代替的に約100～約1000nM、代替的に約500～約1000nM、代替的に約100～約500nM、代替的に約1μM、及び好ましくは約0.1～1μMである。ALK5阻害剤の量は、約250nM～2μM、代替的に約300～約2000nM、代替的に約400～約2000nM、代替的に約500～約2000nM、代替的に約600～約2000nM、代替的に約700～約2000nM、代替的に約800～約2000nM、代替的に約1000～約2000nM、代替的に約1500～約2000nM、代替的に約250～約1000nM、代替的に約250～約500nM、代替的に約300～約1000nM、代替的に約400～約1000nM、代替的に約500～約1000nM、代替的に約600～約1000nM、代替的に約700～約1000nM、代替的に約800～約1000nM、代替的に約500nM、代替的に約10μM、及び好ましくは約10μMである。

【0086】

細胞が空気-液体界面(「ALI」)で培養されるとき、細胞は、多孔性基質上で培養され得、それにより、細胞は上側で空気と接触し、底側で細胞培養培地と接触する。例えば、十分な体積の培地が、多孔性基質(例えば、フィルター挿入物)を収容する培養容器の底部に添加され得、それにより、培地は基質上に存在する細胞の底面と接触するが、それらを被包又は浸漬しない。好適な多孔性基質は、細胞の増殖及び分化に悪影響を及ぼさない任意の材料で形成され得る。例示的な多孔性基質は、ポリエチレンテレフタレート(「PET」)、ポリエステル、又はポリカーボネートなどのポリマーで作製される。好適な多孔性基質は、コーティングされても、コーティングされなくてもよい。一実施形態において、コーティングは、MATRIGEL(商標)であり得る。本発明の一実施形態において、多孔性基質は、MATRIGEL(商標)でコーティングされ得る多孔性フィルター挿入物である。本発明の一実施形態において、多孔性基質は、無コーティングフィルター挿入物である。基質の多孔性は、細胞生存性を維持し、細胞の分化を促進するのに十分であるべきである。好適な基質は、約0.3～約3.0μm、約0.3～約2.0μm、約0.3～約1.0μm、約0.3～約0.8μm、約0.3～約0.6μm、約0.3～約0.5μm、約0.3～約3.0μm、約0.6～約3.0μm、約0.8～約3.0μm、約1.0～約3.0μm、約2.0～約3.0μm、好ましくは約0.4μmの孔径、及び約5000万～約1億2000万孔/cm²、約6000万～約1億1000万孔/cm²、約7000万～約1億孔/cm²、好ましくは約8000万～約1億孔/cm²、約9000万～約1億孔/cm²、及びより好ましくは約1億孔/cm²の孔密度を有するフィルター挿入物を含む。

【0087】

培地は、1日おき又は好ましくは毎日、交換又はリフレッシュされ得る。多孔性基質の上部で増殖される細胞は、一般に単一細胞ではないが、むしろそれらは、シートの形態であるか、又は集合細胞集団として存在する。ALIで培養される細胞は、培地中に浸漬された細胞と比較して、より高い酸素分圧を経験し得る。

【0088】

本発明は、空気 - 液体界面でのステージ 4 ~ 7、好ましくはステージ 5 ~ 7 細胞の形成を包含する。細胞は、多能性幹細胞を分化させることによって、又はステージ 3、4、5、又は 6 細胞を分化させることによって形成され得る。ステージ 4 細胞は、空気 - 液体界面で全体的に培養され得るか、又は細胞は、ステージ 4 の早期部分（約 1 ~ 2 日を意味する）の間に、浸漬された平板培養において培養され得、次いでステージ 4 の後期部分（約 2 日目 ~ 3 日目を意味する）については空気 - 液体界面で培養され得る。好ましくは、ステージ 4 は、A L I で行われえないが、浸漬培養において行われる。

【 0 0 8 9 】

一実施形態において、本発明は、多能性幹細胞から膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を産生するための方法を提供し、多能性幹細胞を培養することと、多能性幹細胞を、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることと、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞を、任意選択で空気 - 液体界面で培養することによって、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることとを含む。この方法は、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、あるいは (i) 及び (i i) の両方が補充された培地での処理を含み得る。この方法は、前腸内胚葉細胞（ステージ 3 細胞）に特徴的なマーカーを発現する細胞を、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が補充された培地での処理、並びに平板培養における培養によって膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（ステージ 4 細胞）へと分化させることを含み得る。この方法はまた、膵前腸前駆細胞（ステージ 4 細胞）に特徴的なマーカーを発現する細胞を、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が補充された培地での処理、並びに平板培養における培養、好ましくは空気 - 液体界面での培養によって膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（ステージ 6 細胞）へと分化させることを含み得る。この方法は、ステージ 6 細胞を、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K 阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤のうちの 1 つ若しくは 2 つ以上、並びに任意選択だが好ましくはビタミン E、又は好ましくはアセチルシステインなどの抗酸化剤と共に補充された培地での処理によって、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現し、ステージ 6 と比較して、より成熟した表現型を有する細胞（ステージ 7 細胞）へと分化させることを更に含む。有用なアセチルシステインの量は、約 0 . 1 ~ 約 2 m M である。ビタミン E の量は、約 0 . 1 ~ 約 1 0 μ M である。更に別の実施形態において、この方法は、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K 阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤のうちの 1 つ若しくは 2 つ以上と共に補充された培地でのステージ 5 細胞の処理によってステージ 6 を行うことを更に含む。更に別の実施形態において、ステージ 6 は、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K 阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤のうちの 1 つ若しくは 2 つ以上と共に補充された培地において、ステージ 5 細胞の処理によって行われ、続いてステージ 7 が、(i) T 3、T 4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(i i) A L K 5 阻害剤、又は (i) 及び (i i) の両方が、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K 阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤のうちの 1 つ若しくは 2 つ以上、並びに任意選択だが好ましくはビタミン E、又は好ましくはアセチルシステインなどの抗酸化剤と共に補充された培地での処理によって行われる。

【 0 0 9 0 】

本発明の一実施形態は、成熟化 細胞に特徴的なマーカーを発現する膵内分泌細胞（ステージ 7 細胞）を形成する方法であり、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（ステージ 4 細胞）を、好ましくは空気 - 液体界面で培養することによってステージ 7

10

20

30

40

50

細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることを含む。別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ 6 細胞、又は未成熟 細胞である細胞の形成をもたらす。この方法は、好ましくは少なくともステージ 5 ~ 7 の間、T 3、T 4、若しくはそれらの類似体、ALK 5 阻害剤、又は両方が補充された培地での処理を含む。

【0091】

空気 - 液体界面での細胞の培養は、細胞を、多孔性フィルター挿入物などの多孔性基質上に播種することを含む。ある特定の実施形態において、基質孔径は、約 0.3 ~ 約 3 ミクロンの範囲であり得る。播種は、細胞を単一細胞として単層培養物から、又は細胞の集団を単層培養物から懸濁液へと放出し、続いて単一細胞懸濁液又は懸濁された細胞培養物を ALI で多孔性基質の上に分取することによって達成され得る。細胞は、約 1000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 90,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 80,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 70,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 60,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 50,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 40,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 30,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 20,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 10,000 細胞 / μL 、約 1000 細胞 / μL ~ 約 5000 細胞 / μL 、約 5000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 10,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 20,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 30,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 40,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 50,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 60,000 細胞 / μL ~ 約 100,000 細胞 / μL 、約 70,000 細胞 / μL ~ 約 80,000 細胞 / μL 、約 30,000 細胞 / μL ~ 約 70,000 細胞 / μL 、約 40,000 細胞 / μL ~ 約 60,000 細胞 / μL 、及び好ましくは約 50,000 細胞 / μL を有する懸濁液から多孔性基質の上に播種され得る。細胞は、個々の細胞又は細胞の集合体若しくは集団を含有する細胞懸濁液の液滴として播種され得る。結果として生じる細胞体積物は、約 5×10^6 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 6×10^6 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 7×10^6 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 8×10^6 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 9×10^6 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 1×10^7 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 2×10^7 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 3×10^7 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 4×10^7 ~ 約 5×10^7 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 4×10^7 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 3×10^7 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 2×10^7 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 1×10^7 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 9×10^6 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 8×10^6 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 7×10^6 細胞 / cm^2 、約 5×10^6 ~ 約 6×10^6 細胞 / cm^2 、約 7×10^6 ~ 約 4×10^7 細胞 / cm^2 、約 8×10^6 ~ 約 3×10^7 細胞 / cm^2 、約 9×10^6 ~ 約 2×10^7 細胞 / cm^2 、及び好ましくは約 1×10^7 細胞 / cm^2 を含有し得る。

【0092】

別の実施形態において、本発明は、単一ホルモン陽性細胞の数を増強する方法を指す（例えば、PDX 1 及び NKX 6.1 共発現細胞の集団を、好ましくは空気 - 液体界面で培養及び分化させることによって、NKX 6.1 及びインスリンを共発現する細胞、又は NKX 6.1 及びクロモグラニンを共発現する細胞）。別の実施形態において、空気 - 液体界面で培養された膵内胚葉細胞を、以下、すなわち、ALK 5 阻害剤、BMP 阻害剤、分泌酵素阻害剤、エフリンリガンド、EphB 阻害剤、PKC 阻害剤、EGFR 阻害剤、レチノイン酸、ビタミン C、T3 / T4、グルコース、細胞周期調節因子、WNT 調節因子、SHH 阻害剤、オーロラ阻害剤、抗酸化剤、ビタミン E、アセチル - システイン、又はそれらの組み合わせから選択される化合物での処理によって膵内分泌細胞へと更に分化させる。

【0093】

更なる実施形態において、本発明は、多能性細胞を分化させる段階的方法に関し、ステージ 4 ~ ステージ 6 細胞を、十分な量の (i) T3、T4、及びそれらの類似体のうちの

10

20

30

40

50

1つ又は2つ以上、(ii) ALK5 阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方を含有する培地中で培養することと、ステージ6細胞を、任意選択で好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、並びに抗酸化剤を含有する培地中で更に培養して、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する膵内分泌細胞及び膵内分泌細胞の集団を生成することを含む。

【0094】

一部の実施形態において、結果として生じる細胞集団の細胞の少なくとも10%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも20%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも30%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも40%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも50%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。代替実施形態において、細胞の少なくとも60%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の代替実施形態において、集団の細胞の少なくとも70%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも80%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも90%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。代替実施形態において、集団の細胞の少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。

ステージ4：前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0095】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ3細胞を、任意の好適な増殖培地であり得、好ましくはMCDB-131、DMEM、又はBLARなどのカスタム培地(表I)である分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、TGF-阻害剤SB431542、SD-208、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、T3の類似体、T4の類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c) SANT-1又はHIP-1から選択されるSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、(d) LDN-193189、Noggin、又はChordinから選択されるBMP受容体阻害剤、(e) TPB、PPBu、PMA、及びILVから選択されるPKC活性因子、(f) FGF-7又はFGF-10から選択される線維芽細胞増殖因子、(g) レチノイン酸、及び(h) アスコルビン酸のうちの1つ又は2つ以上が補充され得る。例えば、MCDB131又は好ましくはBLARなどの増殖培地は、SHHシグナル伝達経路アンタゴニスト(SANT-1若しくはHPI-1など)、BMP阻害剤(LDN-193189、Noggin、若しくはChordin)、アスコルビン酸、及びPKC活性因子(TPB、PDBu、PMA、若しくはILV)が補充され、有用な分化培地を提供することができる。ステージ3細胞を、こうした培地中で約2~4日間、好ましくは約2~3日間、より好ましくは約3日間培養することは、通常、ステージ3細胞をステージ4細胞へと分化させるのに十分である。別の実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストが補充され得る。好ましい実施形態において、ステージ3細胞は、約0.25 µM SANT-1、約100 nM RA、約2 ng/mL FGF7、約100 nM LDN-193189、及

び約 0.25 mM アスコルビン酸、及び約 200 nM が補充された培地で 3 日間処理され得る。

【0096】

ステージ 4 において、細胞は、ステージ全体の間、又は好ましくは約 2 ~ 3 日間の平板培養後のいずれかに、空気 - 液体界面で培養され得る。具体的に、本発明は、空気 - 液体界面で多能性幹細胞から誘導された細胞を分化させるための生体外細胞培養を提供し、(a) 培養容器、(b) 容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c) 培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d) 培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(e) 培地が細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される細胞を含む。代替的に、ステージ 4 は、平坦培養中で全体的に行われ得る。

10

【0097】

更なる実施形態において、ステージ 4 の完了時の細胞は、Rho 関連キナーゼ (「ROCK」) 阻害剤、例えば、Y27632 ((1R, 4r) - 4 - ((R) - 1 - アミノエチル) - N - (ピリジン - 4 - イル) シクロヘキサンカルボキシアミド)、GSK269962 (N - [3 - [[2 - (4 - アミノ - 1, 2, 5 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 1 - エチル - 1H - イミダゾ[4, 5 - c]ピリジン - 6 - イル]オキシ]フェニル] - 4 - [2 - (4 - モルホリニル)エトキシ]ベンズアミド)、H1152 ((S) - (+) - 2 - メチル - 1 - [(4 - メチル - 5 - イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン、2HCl)、及びSR3677 (N - [2 - [2 - (ジメチルアミノ)エトキシ] - 4 - (1H - ピラゾール - 4 - イル)フェニル - 2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 - ベンゾジオキシン - 2 - カルボキシアミドジヒドロクロリド)で処理され得る。ある特定の実施形態において、約 1 ~ 20 μ M、代替的に約 1 ~ 15 μ M、代替的に約 1 ~ 10 μ M、好ましくは約 10 μ M の ROCK 阻害剤が使用され得る。

20

【0098】

ある特定の実施形態において、平板培養中で 1 ~ 2 日間培養された細胞を意味する、後期ステージ 4 細胞のみが、ステージ 4 の完了のために、続けて空気 - 液体界面で培養され得る。一実施形態において、ROCK 阻害剤で処理された後期ステージ 4 細胞のみが、空気 - 液体界面で培養される。他の実施形態において、0.5 ~ 約 0.75 $\times 10^5$ 細胞 / μ L が播種され、空気 - 液体界面で培養される。代替的に、約 2 ~ 6 $\times 10^6$ 細胞が播種され、空気 - 液体界面で培養される。ある特定の実施形態において、細胞は、空気 - 液体界面での培養前に、TrypLE (商標)、Accutase (商標)、又はDispase (商標)などのタンパク質分解及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

30

【0099】

代替実施形態において、ステージ 3 細胞は、ALK5 阻害剤、Noggin、及びPKC 活性因子、例えばTPBが補充された増殖培地を含む分化培地で処理され得る。ある特定の実施形態において、培地は、約 0.1 μ M ALK5 阻害剤、約 100 ng/mL の Noggin、及び約 500 nM TPB が補充され得る。細胞培養は、単層形式であり得る。処理は、合計約 3 日間にわたって継続し得る。ある特定の実施形態において、細胞は、2 日間処理され得、次いで最後の日に、細胞は、タンパク質分解酵素、コラーゲン分解酵素、又は両方、例えばDispase (商標)で処理され、約 100 ミクロン未満の直径を有する細胞集団に分割され、続いてALK5 阻害剤及びLDN - 193189 の存在下で培養され得る。ある特定の実施形態において、約 100 ミクロン未満の直径を有する細胞集団は、約 200 nM ALK5 阻害剤及び約 100 nM LDN - 193189 が補充された培地中で培養され得る。代替実施形態において、ステージ 4 細胞を空気 - 液体界面で培養することは、内分泌関連マーカーと共に、臍内胚葉マーカーを著しく増強することができる。したがって、本発明は、ステージ 4 細胞を空気 - 液体界面で培養することによって、臍内胚葉及び内分泌関連マーカーを増強する方法を提供する。

40

ステージ 5 : 臍前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、臍内胚葉 / 内分泌

50

前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0100】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、任意の好適な増殖培地であり得、好ましくはMCD B - 131、DMEMである分化培地、又は好ましくはBLARなどのカスタム培地(表I)で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF - 受容体阻害剤V、TGF - 受容体阻害剤I、TGF - 受容体阻害剤IV、TGF - 受容体阻害剤VII、TGF - 受容体阻害剤VIII、TGF - 受容体阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤VI、TGF - 受容体阻害剤III、TGF - 阻害剤SB431542、SD - 208、ITD - 1、LY2109761、A83 - 01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、T3の類似体、T4の類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c) SANT - 1又はHIP - 1から選択されるSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、(d) LDN - 193189、Noggin、又はChordinから選択されるBMP受容体阻害剤、(e) レチノイン酸、(f) アスコルビン酸(g) ヘパリン、及び(h) 硫酸亜鉛のうちの1つ又は2つ以上が補充され得、細胞を、好ましくは空気 - 液体界面で約2 ~ 4日間、好ましくは約3日間培養して、細胞をステージ5細胞へと分化させる。別の実施形態において、増殖培地はまた、SMO阻害剤(MRT10又はシクロパミンなど)、及び好ましくはFGF - 7又はFGF - 10から選択される線維芽細胞増殖因子の一方又は両方が補充される。ステージ4細胞の処理は、約2 ~ 4日間、好ましくは約3日間行われ、細胞をステージ5細胞へと分化させる。

【0101】

好ましい実施形態において、ステージ4細胞は、約0.1 μ M ~ 約0.4 μ MのSANT - 1及び好ましくは約0.25 μ M SANT - 1、約50 nM RA、約0.1 mM ~ 約0.5 mMアスコルビン酸、代替的に約0.2 mM ~ 約0.4 mM及び好ましくは約0.25 mMアスコルビン酸、約50 nM ~ 約200 nM及び好ましくは約100 nM LDN - 193189、約1 μ MのT3、並びに約10000 nM ALK5阻害剤、より好ましくはALK5阻害剤IIが補充された培地で細胞を処理することによって、ステージ5細胞へと分化される。更に別の実施形態において、細胞はまた、任意選択で好ましくは約1 ~ 15 μ M、代替的に約1 ~ 10 μ M ZnSO₄、代替的に約5 ~ 10 μ M、好ましくは約10 μ M、約10 μ M硫酸亜鉛、及び約1 ~ 100 μ g/mL、好ましくは約10 μ g/mLのヘパリンで処理される。ステージ4細胞の処理は、約2 ~ 4日間、好ましくは約3日間行われ、細胞をステージ5細胞へと分化させる。

【0102】

更に別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、ヘパリン、SMO阻害剤、又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、RA、BMP受容体阻害剤、及びALK5阻害剤が補充された培地で処理することと、細胞を空気 - 液体界面で約3日間培養して、細胞をステージ5細胞へと分化させることとを含む。代替実施形態において、培地は、RA、BMP受容体阻害剤、及びALK5阻害剤と共に、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。したがって、一実施形態において、ステージ4細胞は、ヘパリン、ZnSO₄、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、RA、LDN - 193189、及びALK5阻害剤IIが補充された培地でステージ4細胞を処理することによってステージ5細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。一実施形態において、ステージ4細胞は、約10 μ g/mLのヘパリン、約0.25 μ M SANT - 1、約50 nM RA、約50 nM LDN - 193189、約10 nMのT3、及び約10000 nM ALK5阻害剤が補充された培地で細胞を処理することによってステージ5細胞へと分化される。好適なALK5阻害剤としては、SD - 208、ALK5阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤V、TGF - 受容体阻害剤I、TGF - 受容体阻害剤IV、TGF - 受容体阻害剤VII、TGF - 受容体

阻害剤 V I I I、T G F - 受容体阻害剤 I I、T G F - 受容体阻害剤 V I、T G F - 受容体阻害剤 I I I、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ステージ 4 細胞の処理は、約 2 ~ 4 日間、好ましくは約 3 日間行われ、細胞をステージ 5 細胞へと分化させる。

【 0 1 0 3 】

好ましい実施形態において、A L K 5 阻害剤は、A L K 5 阻害剤 I I である。別の好ましい実施形態において、約 1 0 0 0 0 n M の A L K 5 阻害剤 I I が使用される。代替の好ましい実施形態において、ステージ 4 細胞は、約 1 0 μ g / m L のヘパリン、約 0 . 2 5 μ M S A N T - 1、約 5 0 n M R A、約 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、及び約 1 0 0 0 0 n M の A L K 5 阻害剤 I I が補充された培地で処理される。更に別の代替実施形態において、本発明の方法は、ステージ 4 細胞を、S M O 阻害剤、又は S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト、R A、及び A L K 5 阻害剤が補充された培地で処理することと、細胞を好ましくは空気 - 液体界面で約 2 ~ 4 日間、好ましくは約 3 日間培養して、細胞をステージ 5 細胞へと分化させることとを含む。代替実施形態において、培地は、S M O 阻害剤及び S H H シグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。一実施形態において、ステージ 4 細胞は、約 0 . 2 5 μ M S A N T - 1、約 5 0 n M R A、約 5 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、約 1 μ M T 3、及び約 1 0 0 0 n M の A L K 5 阻害剤が補充された培地で細胞を処理することによってステージ 5 細胞へと分化される。

【 0 1 0 4 】

空気 - 液体界面で培養するために播種される細胞の量は異なり得る。例えば、細胞を空気 - 液体界面で培養するために、約 0 . 5 ~ 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L を含有する細胞懸濁液の液滴が多孔性基質（例えば、フィルター）上に播種され得る。懸濁液は、約 2 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 4 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 2 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 2 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 4 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、又は約 3 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L を含有し得、空気 - 液体界面に位置するフィルターなどの多孔性基質の上に播種され得る。一部の実施形態において、約 0 . 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 0 . 7 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、約 0 . 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 0 . 7 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L、又は約 0 . 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L ~ 約 0 . 6 × 1 0 ⁵ 細胞 / μ L を含有する細胞懸濁液の液滴は、A L I で培養されるように多孔性支持体の上に播種される。

【 0 1 0 5 】

別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ 4 細胞を、B M P 受容体阻害剤（例えば、L D N - 1 9 3 1 8 9、N o g g i n、又は C h o r d i n）及び A L K 5 阻害剤が補充された培地で約 1 日間処理して、ステージ 4 細胞をステージ 5 細胞へと分化させることを含む。例えば、培地は、約 1 0 0 n M の L D N - 1 9 3 1 8 9、及び約 1 0 0 n M の A L K 5 阻害剤及び約 1 μ M T 3 が補充され得る。細胞は、集団の形態であり得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気 - 液体界面で培養する前に、タンパク質分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

【 0 1 0 6 】

前述の方法に従い、本発明は、腓前腸前駆体に特徴的なマーカーを発現する細胞を、腓内胚葉 / 腓内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a) 培養容器、(b) 容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c) 培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d) 培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び (e) 培地が細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される腓前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

ステージ 6 : 腓内胚葉 / 腓内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腓内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【 0 1 0 7 】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ5細胞を、任意の好適な増殖培地、好ましくはMCD B - 131又はCMRL、より好ましくはBLARなどのカスタム培地(表I)であり得る分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF - 受容体阻害剤V、TGF - 受容体阻害剤I、TGF - 受容体阻害剤IV、TGF - 受容体阻害剤VII、TGF - 受容体阻害剤VIII、TGF - 受容体阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤VI、TGF - 受容体阻害剤III、TGF - 阻害剤SB431542、SD - 208、ITD - 1、LY2109761、A83 - 01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、それらの類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c) 好ましくはLDN - 193189、Noggin、又はChordinから選択されるBMP受容体阻害剤、(d) 分泌酵素阻害剤XX、分泌酵素阻害剤XXI、分泌酵素阻害剤XVI、又はDAPTなどの分泌酵素阻害剤、(e) アスコルビン酸、(f) ヘパリン、及び(g) 硫酸亜鉛のうちの1つ又は2つ以上が補充され得、好ましくは空気 - 液体界面で、約2 ~ 4日間、好ましくは約3日間培養して、ステージ5細胞をステージ6細胞へと分化させることができる。任意選択で、培地は、追加としてSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、スミーズンド受容体阻害剤、線維芽細胞増殖因子、及びレチノイン酸のうちの1つ又は2つ以上が補充され得る。

【0108】

好ましい実施形態において、ステージ5細胞は、約50 nM RA、約0.25 mM アスコルビン酸、約100 nM LDN - 193189、約10000 nMのALK5阻害剤及び好ましくはALK5阻害剤II、1 µM T3、約100 nMの分泌酵素阻害剤が補充された培地で約7日間処理することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替的に、ステージ5細胞は、約0.25 µM SANT - 1、約50 nM RA、約0.25 mMアスコルビン酸、約1000 nM ALK5阻害剤、及び1 µM T3が補充された培地で約3日間処理することによってステージ6細胞へと分化され得る。細胞は、こうした培地中で、必要に応じて更に2日間以上培養され得る。

【0109】

代替的に、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気 - 液体界面で、約1 ~ 7日間、代替的に約6日間、代替的に約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。例えば、細胞は、約10 µg/mLのヘパリン、約0.25 µM SANT - 1、約100 nM LDN - 193189、約1000 nMのT3、及び約500 ~ 約10,000 nM、代替的に約500 nM、代替的に約1000 mM、及び代替的に約10,000 nMのALK5阻害剤が補充された培地中で培養され得る。好適なALK5阻害剤としては、SD - 208、ALK5阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤V、TGF - 受容体阻害剤I、TGF - 受容体阻害剤IV、TGF - 受容体阻害剤VII、TGF - 受容体阻害剤VIII、TGF - 受容体阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤VI、TGF - 受容体阻害剤III、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

好ましい実施形態において、ALK5阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。より好ましい実施形態において、約10000 nMのALK5阻害剤IIが使用される。したがって、一実施形態において、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気 - 液体界面で、約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気 - 液体界面で培養する前に、タンパク質

10

20

30

40

50

分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

【0111】

別の実施形態において、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、及びALK5阻害剤IIが補充された培地で処理し、空気-液体界面で約5日～約7日間、代替的に約5日間、代替的に約6日間、代替的に約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。これらの実施形態において、培地は、約10 µg/mLのヘパリン、約0.25 µM SANT-1、約100 nM LDN-193189、約1000 nMのT3、及び約10,000 nMのALK5阻害剤IIが補充され得る。ある特定の実施形態において、培地は、硫酸亜鉛(ZnSO₄)が更に補充されてもよい。例えば、培地は、約10 mM ZnSO₄が更に補充されてもよい。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。

10

【0112】

本発明の特に好ましい実施形態において、オーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤II、RSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤II、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、好ましくはEPZ5676のうちの1つ又は2つ以上が培地に添加される。添加される量は、オーロラキナーゼ及びRSK阻害剤については約100～5000 nM、代替的に約1000～5000 nM、代替的に約2000～5000 nM、代替的に約3000～5000 nM、好ましくは約1000～2000 nM、DOT1L阻害剤については約100～1000 nM、より好ましくは約1 µM～約10 nMであり得る。

20

【0113】

前述の方法に従い、本発明は、臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、臍内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a)培養容器、(b)容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c)培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d)培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(d)培地が細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

【0114】

一実施形態において、本発明の実施形態に従い培養されたステージ5細胞が用いられ、ステージ6細胞へと分化されるが、他の実施形態において、他のプロトコルに従い培養されたステージ5細胞が用いられてもよい。

30

【0115】

別の実施形態において、本発明の方法は、単一ホルモン陽性であるステージ6細胞の形成をもたらす。したがって、一実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、インスリン、クロモグラニン、及びPDX1を共発現するステージ6細胞をもたらす。別の実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1及びインスリンを共発現するステージ6細胞をもたらす。本発明のある特定の実施形態において、この方法は、ステージ4～6、又は後期ステージ4～6、又はステージ5及び6でBLARカスタム培地(表Iを参照されたい)を用いる。培地は、毎日又は代替的に1日おきに交換され得るか、又は好ましくは交換される。

40

【0116】

別の実施形態において、本発明は、NKX6.1及びクロモグラニンを共発現するステージ6細胞を形成する方法に関し、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ6細胞へと培養することを含む。更に別の実施形態において、本発明は、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ6細胞へと培養することによって、NKX6.1ステージ6細胞を発現する単一ホルモンインスリン陽性細胞を形成する方法に関する。

ステージ7：臍内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、より成熟した表現型

50

を有する膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0117】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ6細胞を、任意の好適な増殖培地、好ましくはMCD B - 131若しくはCMRL、又はより好ましくはBLARなどのカスタム培地（表I）であり得る、分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、（a）TGF - 受容体阻害剤V、TGF - 受容体阻害剤I、TGF - 受容体阻害剤IV、TGF - 受容体阻害剤VII、TGF - 受容体阻害剤VIII、TGF - 受容体阻害剤II、TGF - 受容体阻害剤VI、TGF - 受容体阻害剤III、TGF - 阻害剤SB431542、SD - 208、ITD - 1、LY2109761、A83 - 01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、（b）T3、T4、それらの類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、（c）ヘパリン、（d）硫酸亜鉛、（e）ビタミンE、ビタミンC、アセチルシステイン、抗酸化剤補助剤A1345、グルタチオン、ペルオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される抗酸化剤、並びに（f）好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤IIであるオーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはRSK阻害剤IIであるRSK阻害剤、及び好ましくはEPZ 5676であるタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上が補充され、好ましくは空気 - 液体界面で約7～21日間、好ましくは約7～10日間、より好ましくは約7日間培養して、ステージ6細胞をステージ7細胞へと分化させる。一実施形態において、増殖培地は、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、ALK5阻害剤、抗酸化剤、並びにオーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤II、又はRSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤IIが補充される。ステージ6細胞は、約10000nMのALK5阻害剤II、約1000nMのT3、約10μMの6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸（「Trolox」）、及び約1μM～約1μMのオーロラキナーゼ阻害剤II又はRSK阻害剤IIが補充された培地で約7日間処理することによってステージ7細胞へと分化され得る。

【0118】

一実施形態において、ステージ6細胞は、約10000nMのALK5阻害剤、約1μMのT3、約2μMの、オーロラキナーゼ阻害剤II、RSK阻害剤II、及びEPZ 5676のうちの1つ又は2つ以上、並びに約1mM N - アセチルシステインが補充された培地で処理することによってステージ7細胞へと分化され得る。代替的に、約0.25μM SANT - 1、約50nM RA、約0.25mMアスコルビン酸、及び約100nM LDN - 193189のうちの1つ又は2つ以上が添加されてもよい。

【0119】

代替的に、ステージ6細胞は、ヘパリン、T3、T4、それらの類似体又はそれらの混合物、ALK5阻害剤、抗酸化剤、及びオーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、DOT1Lのタンパク質メチルトランスフェラーゼ阻害剤、又はそれらの混合物が補充された培地で処理し、好ましくは空気 - 液体界面で約7～21日間、代替的に約7～10日間、好ましくは約7日間培養することによってステージ7細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、レチノイン酸、SMO阻害剤、SHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP受容体阻害剤、及びN - アセチルシステインのうちの1つ又は2つ以上が補充され得る。

【0120】

好ましい実施形態において、ALK5阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。より好ましい実施形態において、約10000nMのALK5阻害剤IIが使用される。したがって、一実施形態において、ステージ6細胞は、ヘパリン、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤、抗酸化剤、及びオーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、又はタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気 - 液体界面で約7日間培養することによってステージ7細胞へと分化され得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気 - 液体界面で培養する

前に、タンパク質分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。本発明の特に好ましい実施形態において、オーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤ⅠⅠ、RSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤ⅠⅠ、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、好ましくはEPZ 5676のうちの1つ又は2つ以上が培地に添加される。添加される量は、約100～5000nM、代替的に約1000～5000nM、代替的に約2000～5000nM、代替的に約3000～5000nM、より好ましくは約1000nM～2000nMオーロラキナーゼ阻害剤、より好ましくは約2000nMオーロラキナーゼ若しくはRSK阻害剤、又は約100～500nM DOT1L阻害剤、より好ましくは約1μM～約10nMのDOT1L阻害剤であり得る。

10

【0121】

前述の方法に従い、本発明は、臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、臍内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a)培養容器、(b)容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c)培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d)培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(d)培地が細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

【0122】

一実施形態において、本発明の実施形態に従い培養されたステージ6細胞が用いられ、ステージ7細胞へと分化されるが、他の実施形態において、他のプロトコルに従い培養されたステージ6細胞が用いられてもよい。

20

【0123】

別の実施形態において、本発明の方法は、単一ホルモン陽性であるステージ7細胞の形成をもたらす。したがって、一実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、インスリン、PDX1、及びMAFAを共発現するステージ7細胞をもたらす。別の実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、PDX1、インスリン、及びMAFAを共発現するステージ7細胞をもたらす。更に別の実施形態において、細胞の各々の少なくとも約10%、代替的に少なくとも約20%、代替的に少なくとも約30%、代替的に少なくとも約40%、代替的に少なくとも約50%、代替的に少なくとも約60%、代替的に少なくとも約70%、代替的に少なくとも約80%、又は代替的に少なくとも約90%の細胞集団が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFA結果を発現する細胞の集団が生じる。

30

【0124】

本発明のある特定の好ましい実施形態において、この方法は、ステージ4～7又は後期ステージ4～7、又はステージ5、6、及び7でBLARカスタム培地(表Ⅰ)を用いる。培地は、好ましくは毎日、又は代替的に1日おきに交換され得る。

【0125】

別の実施形態において、本発明は、NKX6.1、PDX1、MAFA、及びインスリンを共発現するステージ7細胞を形成する方法に関し、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ7細胞へと培養することを含む。更に別の実施形態において、本発明は、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ7細胞へと培養することによって、NKX6.1、PDX1、及びMAFAステージ7細胞を発現する単一ホルモンインスリン陽性細胞を形成する方法に関する。

40

【0126】

本明細書に記載する方法に従い生成されたステージ6及び7細胞はまた、臍臓ホルモン及び内分泌マーカーの分泌に対するそれらの作用について化合物をスクリーニングにおける使用のために適切である。とりわけ、ALIで培養されたステージ4～ステージ7細胞は、384～6ウェルフォーマットの異なる培養フォーマットで試験され得る。こうしたフォーマットは、臍内胚葉、臍内分泌前駆体、臍内分泌及び臍細胞マーカーの後次発現

50

に関する、様々な用量及び時間間隔での様々な小分子又は生物学の評価を可能にする。こうした評価は、遺伝子発現をPCRによって、タンパク質発現をFACS若しくは免疫染色によって、又は小分子/生物学の追加により影響される細胞による因子の分泌についてはELISAによって測定することにより達成され得る。

【0127】

本発明の方法により取得可能な細胞

本発明は、本発明の方法によって取得可能な細胞、又は細胞の集団を提供する。本発明はまた、好ましくは成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、又は細胞集団を提供する。本発明はまた、好ましくは、NKX6.1発現（好ましくは約30%超）、PDX1発現（好ましくは約30%超）、及びMAFA発現（好ましくは約10%超）で特徴付けられる、成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現するインスリン陽性細胞又はインスリン陽性細胞の集団を提供する。

10

【0128】

治療のための方法

本発明は、糖尿病の治療方法、とりわけ、糖尿病を罹患しているか、又は発症するリスクを有する患者を治療するための方法を提供する。本発明はまた、治療法で使用するために、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞の集団を提供する。とりわけ、本発明は、糖尿病に罹患しているか、又は糖尿病を発症するリスクを有する人を治療する方法で使用する、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞又は細胞の集団を提供する。糖尿病は、I型又はII型であり得る。

20

【0129】

一実施形態において、治療法は、本発明の方法によって得られるか、又は取得可能な細胞を患者に埋め込むことを含む。一実施形態において、治療法は、生体外で多能性細胞をステージ1、ステージ2、ステージ3、ステージ4、ステージ5、ステージ6、又はステージ7の細胞に分化させることと、例えば、本明細書に記載するように、分化した細胞を患者内に埋め込むこととを含む。別の実施形態において、この方法は、例えば、本明細書に記載するように、多能性幹細胞を分化させる工程の前に、多能性幹細胞を培養する工程を更に含む。なおも更なる実施形態において、この方法は、埋め込む工程の後に、生体内で細胞を分化させる工程を更に含む。一実施形態において、これらの方法のうちのいずれかにより治療される患者は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

30

【0130】

一実施形態において、細胞は、分散した細胞として埋め込まれてもよく、又は血管系、例えば、肝門脈内に注入され得る集団に形成されてもよい。あるいは、細胞は、生体適合性の分解性ポリマー支持体、多孔性の非分解性デバイス内に提供されてもよく、又は宿主の免疫系から保護されるよう封入されてもよい。一実施形態において、治療法は、埋め込み前に、細胞を三次元の支持体内に取り込むことを更に含む。細胞は、患者に埋め込む前に、生体外でこの支持体上に維持されてもよい。あるいは、細胞を含む支持体は、更に生体外で培養することなく、直接患者に埋め込んでもよい。支持体は、場合により、埋め込まれた細胞の生存及び機能を促進する少なくとも1つの医薬品を組み込んでもよい。細胞は、例えば、肝臓、天然の膵臓、腎被膜下空間、網、腹膜、漿膜下空間、腸、胃、又は皮下ポケットを含む、レシピエントの適切な部位に埋め込まれ得る。

40

【0131】

生体内で埋め込まれた細胞の更なる分化、生存、又は活性を向上させるために、増殖因子、抗酸化剤、又は抗炎症剤などの追加の因子を、細胞の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与してもよい。これらの因子は、内在性細胞により分泌され、投与された細胞に原位置で曝露されてもよい。移植された細胞には、当該技術分野で既知の内因性の及び外因性の増殖因子の任意の組み合わせにより、分化を誘導することもできる。

【0132】

埋め込みに使用する細胞の量は、埋め込み対象の状態及び埋め込み治療に対する応答を含む、多数の要因に基づき、当業者により決定され得る。

50

【0133】

本発明は、以下の限定されない例を考察することによって更に明確にすることができるだろう。

【実施例】

【0134】

(実施例1)

空気 - 液体界面で培養された臍内胚葉細胞 - ステージ5 ~ ステージ7のMAFAの発現の漸増

この実施例は、ステージ5 ~ 7中に空気 - 液体界面(「ALI」)で培養され、ステージ5 ~ ステージ7にT3及びALK5阻害剤IIで処理された臍内胚葉細胞内のMAFA発現の動態を実証する。経路42におけるヒト胚幹細胞株H1の細胞(WA01細胞、WiCell Research Institute, Madison, Wisconsin)を、単一細胞として 1×10^5 細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)上に、1:30希釈液(Corning Incorporated, Corning New York, カタログ番号354230)でコーティングされた皿で、ダルベッコ改変イーグル培地、栄養素混合物F-12(「DMEM-F12」)(Life Technologies Corporation, Carlsbad, California、カタログ番号11330-032)、1:100希釈(「1倍濃度」)のGlutaMAX(商標)(Life Technologies、カタログ番号35050-079)、0.25mMアスコルビン酸(Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis Missouri、カタログ番号A4544)、100ng/mLの線維芽細胞増殖因子2(「FGF2」)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota、カタログ番号233-FB-025)、1ng/mLの形質転換増殖因子(「TGF-」)(R&D Systems Inc.、カタログ番号240-B-002)、1:100希釈でのインスリン - トランスフェリン - セレニウム - エタノールアミン(「ITS-X」)(Life Technologies、カタログ番号51500056)、2%無脂肪酸ウシ血清アルブミン(「FAF-BSA」)(Proliant, Inc., Boone, Idaho、カタログ番号68700)、及び20ng/mLのインスリン様増殖因子-1(「IGF-1」)(R&D Systems、カタログ番号291-G1-200)の、10μMのロック阻害剤Y-27632(カタログ番号Y0503、Sigma-Aldrich)が補充された培地中に播種した。播種から48時間後、培養物を不完全PBS(マグネシウム又はカルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素(Life Science、カタログ番号14190)で3~5分間、37℃で培養した。放出された細胞を、DMEM-F12ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じるペレットを、10μM Y-27632、1:100希釈(「1倍濃度」)のGlutaMAX(商標)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mL FGF2、1ng/mL TGF-、1:100希釈のITS-X、2% FAF-BSA、及び20ng/mL IGF-1が補充されたDMEM-F12中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm²で播種した。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。使用される分化プロトコルのステージ1~4の間、培養は、平板接着培養上で、かつ空気 - 液体界面でステージ5~7の間維持された。

【0135】

ステージ1(3日間):

MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.2g/1000mL重炭酸ナトリウム(Sigma-Aldrich、カタログ番号S3187)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、このステージでは4.5mM D-グルコース(Sigma-Aldrich、カタログ番号

G 8 7 6 9) (続くステージを使用して、10 mM濃度のグルコース (Sigma - Aldrich、カタログ番号 G 8 7 6 9) を得た)、100 ng/mL増殖/分化因子8 (「GDF8」) (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey、カタログ番号 120-00)、及び1 µMの14-プロバ-2-エン-1-イル-3, 5, 7, 14, 17, 23, 27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2, 6~.1~8, 12~]ヘプタコサ-1(25), 2(27), 3, 5, 8(26), 9, 11, 21, 23-ノナエン-16-オン(「MCX化合物」)が補充されたMCDB-131培地(Life Technologies、カタログ番号 10372-019)中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、0.0012 g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、4.5 mM D-グルコース、100 ng/mL GDF8、及び0.1 µM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5%の無脂肪酸BSA、1.2 g/1000 mL重炭酸ナトリウム、1倍GlutaMAX(商標)、4.5 mM D-グルコース、及び100 ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

【0136】

ステージ2(2日間)：

細胞を最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.2 g/1000 mL重炭酸ナトリウム、1倍GlutaMAX(商標)、4.5 mM D-グルコース、0.25 mMアスコルビン酸、及び25 ng/mL FGF7(R & D Systems, Inc.、カタログ番号 251-KG)が補充されたMCDB-131培地で処理した。

20

【0137】

ステージ3(2日間)：

細胞を、1:200希釈のITS-X、4.5 mMグルコース、1倍GlutaMAX(商標)、2.5 g/1000 mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25 µM SANT-1(N-[(3, 5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)メチレン]-4-(フェニルメチル)-1-ピペラジンアミン)(Sigma Aldrich、カタログ番号 S4572)、1 µMレチノイン酸(「RA」)(Sigma Aldrich、カタログ番号 R2625)、25 ng/mL FGF7、0.25 mMアスコルビン酸、200 nM PKC活性剤((2S, 5S-(E, E)-8-(5-(4-トリフルオロメチル)フェニル-2, 4,-ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクトラム(「TPB」)(EMD Millipore Corporation, Gibbstown, New Jersey、カタログ番号 565740)、及び100 nMの骨形成タンパク質(「BMP」)受容体阻害剤LDN-193189(Shanghai ChemPartners Co Ltd., Shanghai, China)が補充されたBLARカスタム培地(Life Technologiesにより製造、成分は表Iに列挙される)で2日間処理した。

30

【0138】

ステージ4(3日間)：

細胞を、1:200希釈のITS-X、4.5 mMグルコース、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、2.5 g/1000 mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25 µM SANT-1、100 nM RA、2 ng/mL FGF7、100 nM LDN-193189、0.25 mMアスコルビン酸、及び200 nM TPBが補充されたBLAR培地で3日間処理した。ステージ4(3日間)の最後に、平皿上で培養された細胞を、10 µMのY27632で4時間処理し、PBSですすいで、1倍濃度の酵素TrypLE(商標)発現酵素(Life Technologies Corporation、カタログ番号 12604-013)で5分間室温で処理した後、酵素を除去し、BLAR培地ですすいで、細胞スクレーパによって細胞をこすり取った。結果として生じる細胞の懸濁液を、0.5~0.75×10⁶細胞(5~10 µL分量)の密度で、6

40

50

ウェルプレートの0.4ミクロン多孔性細胞培養フィルター挿入物(Corning、カタログ番号353493)上に播種した。1.5mLの培地を、各挿入物の底部に添加し、フィルターの尖端、又は上部、側部には更なる培地を添加しなかった。培地は、ステージ5、6、及び7の期間に毎日交換した。

【0139】

ステージ5(3日間)：

空気-液体界面で培養された細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍GlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10µg/mLのヘパリン(Sigma-Aldrich、カタログ番号H3149)、10µM ZnSO₄(Sigma-Aldrich、カタログ番号Z0251)、0.25µM SANT-1、50nM RA、100nM LDN-193189、3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩(Sigma-Aldrich、カタログ番号T6397)、10000nMの2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン(「ALK5阻害剤II」)(Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York、カタログ番号ALX-270-445)の形態の1µMのT3が補充されたBLAR培地で3日間処理した。

【0140】

ステージ6(7日間)：

ステージ5細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、1.5g/mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10µg/mLのヘパリン、10µM ZnSO₄、100nM LDN-193189、1µM T3、100nM(S,S)-2-[2-(3,5-ジフルオロフェニル)アセチルアミノ]-N-(5-メチル-6-オキソ-6,7-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,d]アゼピン-7-イル)プロピオンアミド(「分泌酵素阻害剤XX」)(EMD Millipore、カタログ番号#565789)、及び10000nM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地で7日間処理した。

【0141】

ステージ7(7日間)：

ステージ6細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍GlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10µg/mLのヘパリン、10µM ZnSO₄、1µM T3、10000nM ALK5阻害剤II、10µMビタミンE類似体Trolox(EMD Millipore、カタログ番号648471)が補充されたBLAR培地で7~15日間処理した。

【0142】

図1A~Mは、実施例1に概説するように分化させたヒト胚性幹細胞株H1の細胞における以下の遺伝子のリアルタイムPCR解析のデータを示す：PDX1(図1A)、NKX6.1(図1B)、PAX4(図1C)、PAX6(図1D)、NGN3(図1E)、MAFA(図1F)、ABCC8(図1G)、クロモグラニン-A(図1H)、G6PC2(図1I)、IAPP(図1J)、インスリン(図1K)、グルカゴン(図1L)、及びPTF1a(図1M)。図1Fに示されるように、ステージ4及び5をステージ6及び7と比較して、MAFAに明らかな増加又は上方調節があり、細胞系統に向かう細胞の成熟の増加を実証する。しかしながら、ステージ6及び7において、MAFAのmRNA発現は、成人膵島よりも低かった。

【0143】

【表 1】

表I. BLAR培地の成分の一覧	
構成成分	濃度 (mM)
アミノ酸	
グリシン	3.0E-02
アラニン	3.0E-02
アルギニン	3.0E-01
アスパラギン	1.0E-01
アスパラギン酸	1.0E-01
システイン	2.0E-01
グルタミン酸	3.0E-02
ヒスチジン	1.1E-01
イソロイシン	1.0E-02
ロイシン	9.0E-02
リジン塩酸塩	1.5E-01
メチアン	3.0E-02
フェニルアラニン	3.0E-02
プロリン	1.0E-01
セリン	1.0E-01
トレオニン	3.0E-02
トリプトファン	2.0E-03
チロシンニナトリウム	1.0E-02
バリン	3.0E-02
ビタミン	
ビオチン	3.0E-05
塩化コリン	5.0E-03
D-パントテン酸カルシウム	1.5E-03
フォリン酸カルシウム塩	2.3E-03
ナイアシンアミド	4.9E-03
ピリドキシン塩酸塩	9.7E-04
リボフラビン	1.0E-05
チアミン塩酸塩	3.0E-03
ビタミンB12	3.7E-06
i-イノシトール	2.8E-03
無機物/その他	
塩化カルシウム (CaCl ₂ ・2H ₂ O)	3.0E-01
硫酸銅 (CuSO ₄ ・5H ₂ O)	4.8E-06
硫酸鉄 (FeSO ₄ ・7H ₂ O)	1.0E-03
硫酸マグネシウム (MgSO ₄ ・7H ₂ O)	4.1E-01
塩化カリウム (KCl)	3.8E+00
重炭酸ナトリウム (NaHCO ₃)	1.4E+01
塩化ナトリウム (NaCl)	1.1E+02
二塩基性リン酸ナトリウム (Na ₂ HPO ₄ ・7H ₂ O)	5.0E-01
硫酸亜鉛 (ZnSO ₄ ・H ₂ O)	1.0E-04
アデニン	1.0E-03
D-グルコース (デキストロース)	5.0E+00
リボ酸	1.2E+05
フェノール赤	1.0E-02
ピルビン酸ナトリウム	1.0E+00
チミジン	9.8E-05

【0144】

様々なステージの追加的な特徴付けのために、細胞をステージ 3、4、5、6、及び 7

10

20

30

40

50

で採取し、蛍光活性化フローサイトメトリー（「FACS」）によって解析した。FACS染色は、Diabetes, 61, 2016, 2012に記載されるように、かつ表IIに列挙される抗体を使用して行った。簡単に言うと、細胞をTrypLE（商標）Express（Life Technologies、カタログ番号12604）中で3～5分間37℃で培養し、単一細胞懸濁液へと放出した後、それらを0.2% BSAを含有するPBSの染色緩衝液（BD Sciences、カタログ番号554657）で2回洗浄した。細胞（ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ ）を、表面マーキングのために、染色緩衝液中に1:4で希釈された0.5%ヒト グロブリンの100 μ L遮断緩衝液に再懸濁した。細胞に、最終希釈1:20で、直接共役一次抗体を添加し、続いて4℃で30分間培養した。染色した細胞を、染色緩衝液中で2回洗浄し、続いて200 μ L染色緩衝液中に再懸濁した後、BD Canto II上のFACS解析の前に、生/死区別のために、15 μ Lの7AAD中で培養した。細胞内抗体染色は、最初に緑色蛍光生/死細胞染料（Life Technologies、カタログ番号L23101）を用いて4℃で20分間培養し、続いて冷たいPBSで単回洗浄することによって達成した。250 μ LのCytotfix/Cytoperm緩衝液（BDカタログ番号554723）中に細胞を固定し、続いて2%正常ヤギ血清を含む100 μ LのPerm洗浄緩衝染色/遮断溶液中に細胞を再懸濁した。細胞を、実験的に事前決定された希釈で一次抗体と4℃で30分間培養し、続いてPerm/Wash緩衝液中で2回洗浄した。次いで細胞を、適切な抗体と4℃で30分間培養した後、BD FACS Canto II上の解析前に2回洗浄した。使用した抗体の濃度を表IIIに示す。膵臓マーカーのための抗体は、ヒト膵島又は未分化H1細胞を陽性対照として使用し、特異性について試験した。二次抗体については、以下、すなわち、1:500の抗マウスAlexa Fluor（登録商標）647（Life Technologies）、1:200（v）のヤギ抗ウサギPE又は1:800のロバ抗ヤギAlexa 647（Life Technologies）を添加し、4℃で30分間培養し、続いてPerm/Wash緩衝液中で最終洗浄し、BD FACS Divaソフトウェアを使用してBD FACS Canto II上で解析し、少なくとも30,000事象を獲得した。

【0145】

図2～6は、それぞれステージ3、4、5、6、及び7で収集された細胞のFACSプロファイルを描く。図4に示されるように、ステージ5において、細胞の約15%がインスリン及びNKX6.1を共発現し、PDX1陽性細胞の約21%が、PDX1及びKI-67の共発現によって測定して、活性細胞周期にあった（約23%、KI-67は、活性細胞周期にある細胞を示す）。しかしながら、ステージ6及びステージ7によって（図5及び6）、PDX1+細胞の増殖は著しく低下したが（1～2%）、インスリンを共発現するNKX6.1+細胞の数は著しく増加した（ステージ6で約39%、及びステージ7で約50%）。更に、内分泌前駆体マーカーISL-1、NeuroD1、及びNKX2.2を発現する細胞が著しく上昇した。これらの結果は、ステージ6及び7の培養が、内分泌細胞を早期に成熟させる増殖前駆体から離れて細胞の急速成熟を可能にすることを示している。加えて、インスリン及びNKX6.1を共発現する細胞の割合の増加（33%）は、ステージ6からステージ7へと延長することによって観察された（図5を図6と比較して）。図7は、複数の膵内胚葉（FOXA2、PDX-1、NKX6.1）、未分化ES細胞（Oct3/4）、内分泌（Pax6、ISL-1、NKX2.2、クロモグラニン）、及びホルモン（インスリン、グルカゴン）の、ステージ3～ステージ7の発現率を要約する。

【0146】

【表 2】

表II. FACS解析に使用した抗体の一覧			
抗原	種	供給元／カタログ番号	希釈
グルカゴン	マウス	Sigma-Aldrich Co. LLC/G2654	1:250
インスリン	ウサギ	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA/3014B	1:10
NKX6.1	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa/F55A12	1:50
NKX2.2	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank/74.5A5	1:100
PDX1	マウス	BD BioSciences, San Jose, CA/562161	1:50
Ki67	マウス	BD Biosciences/558595	1:20
Pax6	マウス	BD Biosciences, 561552	1:20
クロモグラニンA	ウサギ	Dako, Carpinteria, CA/A0430	1:40
ISL-1	マウス	BD Biosciences/562547	1:20
NeuroD1	マウス	BD Bioscience/563001	1:40
FOXA2	マウス	BD Bioscience/561589	1:80
OCT3/4	マウス	BD Biosciences/560329	1:20

10

【0147】

(実施例2)

MAFA及びインスリン発現の一方又は両方を著しく上方調節することができる小分子を特定するためのスクリーニング

この実施例は、膵細胞に向かう細胞の成熟を著しく増強することができる小分子を特定することを目的とする。経路42におけるヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として 1×10^5 細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)コーティングされた皿上で、DMEM-F12、GlutaMAX(商標)(1:100希釈)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mLのFGF2(R&D systems, MN)、1ng/mLのTGF- β 、ITS-X(1:100希釈)、2% FAF-BSA、及び20ng/mLのIGF-1から構成される、10 μ MのY-27632が補充された培地中に播種した。播種から48時間後、培養物を不完全PBS(Mg又はCaを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素(Life Science、カタログ番号14190)で3~5分間、37

で培養した。放出された細胞を、DMEM-F12ですすぎ、1000rpmで5分間回

転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10 μ M Y-27632、1倍GlutaMAX(商標)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mL FGF2、1ng/mL TGF- β 、1:100希釈のITS-X、2% FAF-BSA、及び20ng/mLのIGF-1が補充されたDMEM-F12中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約1.3~1.5 $\times 10^5$ 細胞/cm²で播種した。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。別途記載されない限り、実施例で使用した培地、試薬、分子などの供給元は、実施例1に記載のとおりである。

20

30

【0148】

ステージ1(3日間):

MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、0.0012g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、4.5mM D-グルコース、100ng/mL GDF8、及び1 μ M MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、0.0012g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、4.5mMのD-グルコース、100ng/mL GDF8、及び0.1 μ M MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、0.0012g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、4.5mM D-グルコース、及び100n

40

50

g / m L G D F 8 が補充された M C D B - 1 3 1 培地中でもう 1 日培養した。

【 0 1 4 9 】

ステージ 2 (2 日間) :

細胞を最初に 1 倍不完全 D P B S ですすぎ、次いで 2 日間、0 . 5 % F A F - B S A 、 0 . 0 0 1 2 g / m L 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の G l u t a M A X (商標) 、 4 . 5 m M D - グルコース、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、及び 2 5 n g / m L F G F 7 が補充された M C D B - 1 3 1 培地で処理した。

【 0 1 5 0 】

ステージ 3 (2 日間) :

細胞を、1 : 2 0 0 希釈の I T S - X 、 4 . 5 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商標) 、 0 . 0 0 2 5 g / m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A 、 0 . 2 5 μ M S A N T - 1 、 1 μ M R A 、 2 5 n g / m L F G F 7 、 0 . 2 5 m M アスコルビン酸、2 0 0 n M T P B 、及び 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9 が補充された B L A R カスタム培地で 2 日間処理した。

10

【 0 1 5 1 】

ステージ 4 (3 日間) :

細胞を、1 : 2 0 0 希釈の I T S - X 、 4 . 5 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商標) 、 0 . 0 0 2 5 g / m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A 、 0 . 2 5 μ M S A N T - 1 、 1 0 0 n M R A 、 2 n g / m L F G F 7 、 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9 、 0 . 2 5 m M アスコルビン酸、及び 2 0 0 n M T P B が補充された B L A R 培地で 3 日間処理した後、ステージ 4 の最後に、平板皿上で培養された細胞を、1 0 μ M の Y - 2 7 6 3 2 で 4 時間処理し、P B S ですすぎ、1 倍濃度の T r y p L E (商標) で 5 分間、室温で処理した後、酵素を除去し、B L A R 基本培地ですすぎ、細胞スクレーバによって細胞をこすり取った。結果として生じる細胞の懸濁液を、0 . 5 ~ 0 . 7 5 × 1 0 ⁶ 細胞 (5 ~ 1 0 μ L 分量) の密度で、6 ウェルプレートの 0 . 4 ミクロン多孔性細胞培養フィルター挿入物上に播種した。1 . 5 m L の培地を、各挿入物の底部に添加し、フィルターの尖端側には更なる培地を添加しなかった。培地は、ステージ 5 、 6 、及び 7 の期間に毎日交換した。

20

【 0 1 5 2 】

ステージ 5 (3 日間) :

空気 - 液体界面で培養された細胞を、1 : 2 0 0 希釈の I T S - X 、 2 0 m M グルコース、1 倍 G l u t a M A X (商標) 、 0 . 0 0 1 5 g / m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A 、 0 . 2 5 m M アスコルビン酸、1 0 μ g / m L のヘパリン、1 0 μ M Z n S O ₄ 、 0 . 2 5 μ M S A N T - 1 、 5 0 n M R A 、 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9 、 1 μ M の T 3 (3 , 3 ' , 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として) 、及び 1 0 0 0 0 n M の A L K 5 阻害剤 I I が補充された B L A R 培地で 3 日間処理した。

30

【 0 1 5 3 】

ステージ 6 (7 日間) :

ステージ 5 細胞を、空気 - 液体界面で培養し、1 : 2 0 0 希釈の I T S - X 、 2 0 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商標) 、 0 . 0 0 1 5 g / m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A 、 0 . 2 5 m M アスコルビン酸、1 0 μ g / m L のヘパリン、1 0 μ M Z n S O ₄ 、 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9 、 1 μ M T 3 (3 , 3 ' , 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として) 、 1 0 0 n M 分泌酵素阻害剤 X X 、及び 1 0 0 0 0 n M A L K 5 阻害剤 I I が補充された B L A R 培地で 7 日間処理した。

40

【 0 1 5 4 】

ステージ 7 (7 日間) :

ステージ 6 細胞を、空気 - 液体界面で培養し、1 : 2 0 0 希釈の I T S - X 、 2 0 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商標) 、 0 . 0 0 1 5 g / m L 重炭酸ナトリ

50

ウム、2% FAF-BSA、10 µg/mLのヘパリン、10 µM ZnSO₄、1000 nM T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10000 nM ALK5阻害剤II、10 µM Troloxが補充されたBLAR培地で7日間処理した。

【0155】

ステージ6又は7において、様々な小分子を添加し、それらの作用をリアルタイムPCRによって評価した。表IIIは、評価した小分子、及びそれらがいつ添加されたかを列挙している。

【0156】

【表3】

表III: 評価した小分子

化学名/CAS番号/分子式	対象	小分子名/供給元/カタログ番号	濃度
4-(アセチルアミノ)-N-(2-アミノフェニル)ベンズアミド/ 112522-64-2/C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂	ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤	CI-994/Sigma Aldrich Co LLC./EPI109A	S6で1 µM
(E)-N-N-ヒドロキシ-3-[4-[[2-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチルアミノ]メチル]フェニル]プロパ-2-エンアミド/404950-80-7/ C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₂	両方のヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)活性の阻害剤	Panobinostat(LBH-589)/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009B	S6で1 µM
N-ヒドロキシ-N'-フェニル-オクタンジアミド/149647-78-9/ C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	ヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)及び3(HDAC3)の阻害剤	SAHA/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009C	S6で1 µM
N, N'-ジヒドロキシオクタンジアミド/ 38937-66-5/C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄	HDAC1を阻害することが示されたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤	SBHA/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009D	S6で1 µM
6-(1,3-ジオキソ-1H,3H-ベンゾ[デ]イソキノリン-2-イル)-ヘキサン酸ヒドロキシアミド/ 287383-59-9/C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄	ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤	Scriptaid/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009E	S6で1 µM
[R-(E,E)]-7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド/ 58880-19-6/C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃	ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤	トリコスタチンA/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009F	S6で1 µM
N1-[4-[(2R,4R,6S)-4-[[4,5-ジフェニル-2-オキサゾリル]チオ]メチル]-6-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]-1,3-ジオキサン-2-イル]フェニル]-N8-ヒドロキシ-オクタンジアミド/537049-40-4/ C ₄₁ H ₄₃ N ₃ O ₇ S	ヒストン脱アセチル化酵素6の阻害剤	Tubacin/Sigma Aldrich Co LLC./EPI009G	S6で1 µM

【0157】

【表 4】

表III: 評価した小分子 (続き)			
1, 4-ジメトキシ-9(10H)- アクリジンチオン/141992- 47-4/C ₁₅ H ₁₃ NO ₂ S	サイクリン依存性 キナーゼ (cdk) 4 阻害剤	NSC625987/Tocris Bioscience/2152	S6で1 μM
4-[4, 5-ジヒドロ-5-(4- メトキシフェニル)-3-フェニル- 1H-ピラゾール-1-イル] ベンゼンスルホンアミド/71203- 35-5/C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	Cdc42 GTPaseの 阻害剤	ML141/Tocris Bioscience/4266	S6で1 μM
N-(2-クロロフェニル)-6- (ピペリジン-4-イル)イミダゾ [1, 2-a]ピリジン-3- カルボキシアミドシウ酸塩/ 1198408-39-7/ C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₅	EphB3受容体 チロシンキナーゼの 阻害剤	LDN211904 (EphB3 阻害剤)/EMD Millipore Corporation, MA/ 428201-5MG	S6で1 μM
(S)-2-(4-(4- クロロフェニル)-2, 3, 9- トリメチル-6H-チエノ[3, 2-f] [1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a] [1, 4]ジアゼピン-6-イル) アセトアミド/1446144-04- 2/C ₁₉ H ₁₈ ClN ₅ OS	プロモドメイン及び 特異的末端(BET) ファミリータンパク質 BRD4のCPIe阻害剤	CPI203/Xcess Biosciences, Inc., San Diego, CA/M60124-2	S6で1 μM
1-(3, 6-ジブromo-9H- カルバゾール-9-イル)-3- (フェニルアミノ)プロパン-2- オール/301353-96-8/ C ₂₁ H ₁₈ Br ₂ N ₂ O	前神経原性、神経保護性 小分子	P7C3/Xcess Biosciences, Inc. / M60017-2	S6で1 μM
2-(4-ベンゾイルフェノキシ)- N-(1-ベンジルピペリジン-4- イル)アセトアミド/924416- 43-3/C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₃	アジポネクチン受容体 (AdipoR)の アゴニスト	AdipoRon/Xcess Biosciences, Inc. / M60152-2s	S6で1 μM
(S)-2-((S)-2-(3, 5- ジフルオロフェニル)-2- ヒドロキシアセトアミド)-N-((S)- 5-メチル-6-オキソ-6, 7- ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, d] アゼピン-7-イル)プロパンアミド /209984-57-6/ C ₂₆ H ₂₃ F ₂ N ₃ O ₄	γ 分泌酵素の阻害剤	LY411575/Xcess Biosciences, Inc. / M60078-5s	S6で1 μM
2-(4-(tert-ブチル)フェニル)- 1H-ベンゾ[d]イミダゾール/ 49671-76-3/C ₁₇ H ₁₈ N ₂	PGC-1αの 転写活性因子	ZLN005/Xcess Biosciences, Inc. / M60142-5s	S6で1 μM
2-クロロ-4-フルオロ-3- メチル-N-(2-(4- メチルピペラジン-1-イル)- 5-ニトロフェニル)ベンズアミド/ 1422389-91-O/ C ₁₉ H ₂₀ ClF ₂ N ₄ O ₃	WDR5-MLL 相互作用のアゴニスト	WDR5-C47/Xcess Biosciences, Inc. / M60118-2	S6で1 μM
3-ピリジニルメチル[[4-[[2- アミノフェニル)アミノ]カルボニル] フェニル]メチル]カルバメート/ 209783-80-2/C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₃	HDAC阻害剤、抗増殖、 HDAC3よりも優先して HDAC1を阻害する	MS-275/Sigma Aldrich Co LLC. / EPS002	S6で1 μM
4-ジメチルアミノ)-N-[7- (ヒドロキシアミノ)-7- オキソヘブチル]-ベンズアミド/ 251456-60-7/C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₃	HDAC阻害剤、 HDAC1よりも HDAC6に対して 選択的な亜型	M344/Sigma Aldrich Co LLC. /M5820	S6で1 μM
1-[[4-エチル-5-[5-(4- フェノキシフェニル)-1, 2, 4- オキサジアゾール-3-イル]-2- チエニル]メチル]-3- アゼチジンカルボン酸/913827- 99-3/C ₂₅ H ₂₃ N ₃ O ₄ S	スフィンゴシン-1- リン酸塩受容体1 (S1P1)アゴニスト、 S1P3よりもヒト S1P1に対して 5000倍の選択性を 呈する	CS2100/Tocris BioSciences, Bristol, BS11 0QL, UK/4543	S6で1 μM

10

20

30

40

【表 5】

表III: 評価した小分子 (続き)			
2-(4-ブromo-2-クロロフェノキシ)-N-[[[4-[(4,6-ジメチル-2-ピリミジン)アミノ]スルホニル]フェニル]アミノ]チオキソメチル]アセトアミド/ 587841-73-4/ C ₂₁ H ₁₉ BrClN ₅ O ₄ S ₂	Cdc42の選択的阻害剤	ZCL278/Tocris Bioscience/4794	S6で1 μM
N-(4-(2-アミノ-3-クロロピリジン-4-イルオキシ)-3-フルオロフェニル)-4-エトキシ-1-(4-フルオロフェニル)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボキシアミド/1025720-94-8/ C ₂₅ H ₁₉ ClF ₂ N ₄ O ₄	c-Met、Axl、Ron、及びTyro3のMet関連阻害剤	BMS-777607/Selleck Chemicals, Houston, TX/S1561	S6で1 μM
N-(2,6-ジフルオロフェニル)-5-(3-(2-(5-エチル-2-メトキシ-4-(4-(メチルスルホニル)ピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル)フェニルアミノ)ピリミジン-4-イル)H-イミダゾ[1,2-a]ピリジン-2-イル)-2-メトキシベンズアミド/1089283-49-7/ C ₄₄ H ₄₇ F ₂ N ₉ O ₅ S	IGF-1R及びIRの阻害剤	GSK1904529A/Selleck Chemicals/S1093	S6で1 μM
N-(4-(3-(2-アミノピリミジン-4-イル)ピリジン-2-イルオキシ)フェニル)-4-(4-(メチルチオフェン-2-イル)フタラジン-1-アミノ/945595-80-2/ C ₂₈ H ₂₁ N ₇ OS	オーロラA/B/Cのpan-オーロラキナーゼ阻害剤	AMG-900/Selleck Chemicals/S2719	S6で1 μM
5-((1-(3-イソプロピル-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ピペリジン-4-イル)メトキシ)-2-(4-(メチルスルホニル)フェニル)ピリジン/1032823-75-8/ C ₂₃ H ₂₈ N ₄ O ₄ S	GPR119アゴニスト	GSK1292263/Selleck Chemicals/S2149	S6で1 μM
4-(5-アミノ-1-(2,6-ジフルオロベンゾイル)-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-イルアミノ)-ベンゼンスルホンアミド/443797-96-4/ C ₁₅ H ₁₂ F ₂ N ₆ O ₃ S	CDK1/2に対して最高の能力を有するpan-CDK阻害剤	JNJ-7706621/Selleck Chemicals/S1249	S6で1 μM
6-(ジフルオロ(6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル))-[1,2,4]トリアゾロ[4,3-b]ピリダジン-3-イル)メチル)キノリン/943540-75-8/ C ₁₉ H ₁₃ F ₂ N ₇	c-Metの阻害剤	JNJ-38877605/Selleck Chemicals/S1114	S6で1 μM
(R)-4-(8-シクロペンチル-7-エチル-5-メチル-6-オキソ-5,6,7,8-テトラヒドロプテリジン-2-イルアミノ)-3-メトキシ-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)ベンズアミド/755038-02-9/ C ₂₈ H ₃₉ N ₇ O ₃	Pik1阻害剤	BI2536/Selleck Chemicals/S1109	S6で1 μM

【 0 1 5 9 】

【表 6】

表III: 評価した小分子(続き)			
N-ヒドロキシ-2-(4-((1-メチル-1H-インドール-3-イル)メチルアミノ)メチル)ピペリジン-1-イル)ピリミジン-5-カルボキシアミド/875320-29-9/C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₂	HDAC1に対して最高の能力、HDAC6及び7に対して最低の能力を有するHDAC阻害剤、第2相	Quisinostat(JNJ-26481585)/Selleck Chemicals/S1096	S6で1 μM
シクロヘキシル2,7,7-トリメチル-4-(4-ニトロフェニル)-5-オキソ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロキノリン-3-カルボキシレート/313967-18-9/C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	Notchシグナル伝達の阻害剤	FLI-06/Selleck Chemicals/S7399	S6で1 μM
4H-[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ベンゾジアゼピン-4-アセトアミド、6-(4-クロロフェニル)-N-エチル-8-メトキシ-1-メチル-, (4S)-/1260907-17-2/C ₂₂ H ₂₂ ClN ₅ O ₂	BETタンパク質の阻害剤	I-BET-762 (GSK525762)/Selleck Chemicals/S7189	S6で1 μM
N-(6-(4-(2-((4-(4-メチルピペラジン-1-イル)メチル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)アミノ)-2-オキソエチル)フェノキシ)ピリミジン-4-イル)シクロプロパンカルボキシアミド/1421227-53-3/C ₂₉ H ₃₁ F ₃ N ₆ O ₃	齧歯類及びヒト霊長類脾臓内で脾β細胞増殖を促進する小分子	WS6/Xcess Biosciences, Inc. /M60097-2s	S6で1 μM
1-[3-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-5-プロモ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル](イソプロピル)アミノ]プロピル]-3-[4-(2,2-ジメチルエチル)フェニル]ウレア/-----/C ₂₈ H ₄₀ BrN ₇ O ₄	DOT1Lメチルトランスフェラーゼ阻害剤	SGC0946/Selleck Chemicals/S7079	S6で1 μM
9H-プリン-6-アミン, 9-[5-デオキシ-5-[[[シス-3-[2-[6-(1,1-ジメチルエチル)-1H-ベンズイミダゾール-2-イル]エチル]シクロブチル](1-メチルエチル)アミノ]-β-D-リボフラノシル]-/1380288-87-8/C ₃₀ H ₄₂ N ₈ O ₃	タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤	EPZ5676/Selleck Chemicals/S7062	S6で1 μM
(2R)-2-(N-(2-フルオロ-4-(1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)ベンジル)-4-クロロフェニルスルホンアミド)-5,5,5-トリフルオロペンタンアミド/1146699-66-2/C ₂₀ H ₁₇ ClF ₄ N ₄ O ₄ S	Aβ40及びAβ42のγ分泌酵素阻害剤	Avagacestat(BMS-708163)/Selleck Chemicals/S1262	S6で1 μM
[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシアミド、N-[(1,2-ジヒドロ-4,6-ジメチル-2-オキソ-3-ピリジニル)メチル]-5-[エチル(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アミノ]-4-メチル-4'-(4-モルホリニルメチル)-/1403254-99-8/C ₃₄ H ₄₄ N ₄ O ₄	EZH2阻害剤	EPZ-6438/Selleck Chemicals/S7128	S6で1 μM

【 0 1 6 0 】

【表 7】

表III: 評価した小分子(続き)			
N-(4-(6,7-ジメトキシキノリン-4-イルオキシ)フェニル)-N-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキシアミド/849217-68-1/C ₂₈ H ₂₄ FN ₃ O ₅	VEGFR2阻害剤	カボザンチニブ(XL184、BMS-907351)/Selleck Chemicals/S1119	S6で1 μM
3-(ベンゾ[d]チアゾール-2-イル)-6-エチル-7-ヒドロキシ-8-(ピペリジン-1-イルメチル)-4H-クロメン-4-オン/222716-34-9/C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₃ S	Skp2阻害剤	SKP2-C25/Xcess Biosciences, Inc. M60136-2s	S6で1 μM
5-クロロ-2-[(E)-2-[フェニル(ピリジン-2-イル)メチリデン]ヒドラジン-1-イル]ピリジン/199596-05-9/C ₁₇ H ₁₃ CIN ₄	Jumonjiヒストン脱メチル化酵素阻害剤	JIB-04/Selleck Chemicals/S7281	S6で1 μM
1H-1,2,4-トリアゾール-3,5-ジアミン,1-(6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジン-3-イル)-N3-[(7S)-6,7,8,9-テトラヒドロ-7-(1-ピロリジニル)-5H-ベンゾシクロヘプテン-2-イル]-/1037624-75-1/C ₃₀ H ₃₄ N ₈	Axlの阻害剤	R428(BGB324)/Selleck Chemicals/S2841	S7で1 μM
2-クロロ-3-[2-(2,4-ジクロロフェノキシ)エトキシ]-6-(フルオロメチル)ピリジン/1355026-60-6/C ₁₄ H ₁₁ Cl ₃ FNO ₂	強力なスフィンゴシン-1-リン酸塩受容体4(S1P4)アゴニスト	CYM50260/Tocris Bioscience/4677	S6~S7で2 μM
N,N-ジシクロヘキシル-5-シクロプロピル-3-イソキサゾールカルボキシアミド/945128-26-7/C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₂	選択的スフィンゴシン-1-リン酸塩受容体3(S1P3)アロステリック	CYM5541/Tocris Bioscience/4897	S6~S7で2 μM
5-[4-フェニル-5-(トリフルオロメチル)チオフェン-2-イル]-3-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]1,2,4-オキサジアゾール/256414-75-2/C ₂₀ H ₁₀ F ₆ N ₂ OS	強力な選択的スフィンゴシン-1-リン酸塩1(S1P1)受容体アゴニスト	SEW2871/Tocris Bioscience/2284	S6~S7で2 μM
[9S-(9α,10β,11β,13α)]-2,3,10,11,12,13-ヘキサヒドロ-10-メトキシ-9-メチル-11-(メチルアミノ)-9,13-エポキシ-1H,9H-ジインドロ[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]ピロロ[3,4-i][1,7]ベンゾジアゾニン-1-オン/62996-74-1/C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	広域スペクトルタンパク質キナーゼ阻害剤	スタウロスポリン/Tocris Bioscience/1285	S6~S7で10nM

【0161】

小分子での処理後のインスリン及びMAFAの発現のリアルタイムPCR解析のデータを描くグラフである図8A~8Eに示されるように、EPZ-5676(タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤)及びAXL阻害剤(R428)の添加は、それぞれステージ6及びステージ7での未処理の培養物と比較して、MAFAの発現を著しく上方調節した。

【0162】

(実施例3)(仮説)

懸濁培養中でインスリン、PDX-1、NKX6.1、及びMAFAを共発現する内分泌細胞の生成

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1×10⁵細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で、DMEM-F

10

20

30

40

50

12、G l u t a M A X (商 標) (1 : 1 0 0 希 釈)、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、1 0 0 n g / m L の F G F 2 (R & D s y s t e m s , M N)、1 n g / m L の T G F - 、 I T S - X (1 : 1 0 0 希 釈)、2 % F A F - B S A、及び 2 0 n g / m L の I G F - 1 から構成される、1 0 μ M の Y - 2 7 6 3 2 が補充された培地中に播種した。播種から 4 8 時間後、培養物を不完全 P B S (M g 又は C a を含まないリン酸緩衝生理食塩水) 中で洗浄し、続いて 1 倍 T r y p L E (商 標) 発現酵素で 3 ~ 5 分間、3 7 で培養する。放出された細胞を、D M E M - F 1 2 ですすぎ、1 0 0 0 r p m で 5 分間回転させる。結果として生じる細胞ペレットを、1 0 μ M Y - 2 7 6 3 2、1 倍 G l u t a M A X (商 標)、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、1 0 0 n g / m L F G F 2、1 n g / m L T G F - 、 I T S - X (1 : 1 0 0 希 釈 で)、2 % F A F - B S A、及び 2 0 n g / m L の I G F - 1 が補充された D M E M - F 1 2 中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 1 . 3 ~ 1 . 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / c m ² で播種する。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の 4 8 時間後に分化が開始し、約 9 0 % の開始培養密度をもたらす。ステージ 1 ~ ステージ 4 は、平坦接着培養上で維持され、一方ステージ 5 ~ 7 は、懸濁培養において維持される。

10

【 0 1 6 3 】

ステージ 1 (3 日間) :

M A T R I G E L (商 標) (1 : 3 0 希 釈) でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に 1 倍不完全 D P B S ですすぎ、次いで以下のステージ 1 培地、すなわち、0 . 5 % F A F - B S A、1 . 2 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、4 . 5 m M D - グルコース、1 0 0 n g / m L G D F 8、及び 1 μ M M C X 化合物が補充された M C D B - 1 3 1 培地中で 1 日培養する。次いで、細胞を、0 . 5 % F A F - B S A、1 . 2 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、4 . 5 m M D - グルコース、1 0 0 n g / m L G D F 8、及び 0 . 1 μ M の M C X 化合物が補充された M C D B - 1 3 1 培地中でもう 1 日培養する。次いで、細胞を、0 . 5 % F A F - B S A、1 . 2 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、4 . 5 m M D - グルコース、及び 1 0 0 n g / m L G D F 8 が補充された M C D B - 1 3 1 培地中でもう 1 日培養する。

20

【 0 1 6 4 】

ステージ 2 (2 日間) :

細胞を最初に 1 倍不完全 D P B S ですすぎ、次いで 2 日間、0 . 5 % F A F - B S A、1 . 2 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、4 . 5 m M D - グルコース、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、及び 2 5 n g / m L F G F 7 が補充された M C D B - 1 3 1 培地で処理する。

30

【 0 1 6 5 】

ステージ 3 (2 日間) :

細胞を、1 : 2 0 0 希 釈 の I T S - X、4 . 5 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、2 . 5 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A、0 . 2 5 μ M S A N T - 1、1 μ M R A、2 5 n g / m L F G F 7、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、2 0 0 n M T P B、及び 1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、T P B が補充された B L A R カスタム培地で 2 日間処理する。

40

【 0 1 6 6 】

ステージ 4 (3 日間) :

細胞を、1 : 2 0 0 希 釈 の I T S - X、4 . 5 m M グルコース、1 倍濃度の G l u t a M A X (商 標)、2 . 5 g / 1 0 0 0 m L 重炭酸ナトリウム、2 % F A F - B S A、0 . 2 5 μ M S A N T - 1、1 0 0 n M R A、2 n g / m L F G F 7、1 0 0 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、0 . 2 5 m M アスコルビン酸、及び 2 0 0 n M T P B が補充された B L A R 培地で 3 日間処理した後、ステージ 4 の最後に、平板皿上で培養された細胞を、1 0 μ M の Y - 2 7 6 3 2 で 4 時間処理し、P B S ですすぎ、1 倍濃度の S t e m P r o (登 録 商 標) A c c u t a s e (登 録 商 標) 酵素 (L i f e T e c h n o l o g i

50

es、#A11105-01)で5分間、室温で処理し、酵素を除去して、BLAR基本培地ですすぎ、細胞スクレーパを使用して細胞をこすり取り、細胞集団に分割する(100ミクロン未満)。細胞集団を、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコ(Corning)へと移し、下で指定されるステージ5培地を含む懸濁液中で80~100rpmで回転させる。

【0167】

ステージ5(3日間)：

集団として調製されたステージ4細胞を、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍GlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、0.25μM SANT-1、50nM RA、100nM LDN-193189、1μMのT3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10000nMのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中の懸濁液中で3日間培養する。

【0168】

ステージ6(7日間)：

ステージ5細胞を、懸濁液中で培養し、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mM アスコルビン酸、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、100nM LDN-193189、1μM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10000nM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地で7日間処理する。

【0169】

ステージ7(15日間)：

ステージ6細胞を、懸濁液中で培養し、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、0.0015g/mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、1nM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10000nM ALK5阻害剤II、10μM Trolox、1mM N-アセチルシステイン、及び2μM AXL阻害剤(R428)が補充されたBLAR培地で最大15日間処理する。

【0170】

ステージ5~7において、細胞集団の分量を除去し、PCR、FACS、及び免疫組織化学によって、インスリン、NKX6.1、PDX-1、MAFAの共発現について特徴付ける。こうした試験の結果は、同一細胞及び細胞の集団内でインスリン、PDXI、NKX6.1、及びMAFAの共発現を示すことが予想され、細胞集団の少なくとも約10%が、こうした発現を示した。

【0171】

(実施例4)

AXL及び共リガンドGAS6のmRNA発現は、ステージ7又はヒト臍島細胞に対して非常に低い

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として 1×10^5 細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で、Essential 8(商標)(「E8」)(BD Biosciences、カタログ番号356231)から構成される培地中に播種した。播種から48時間後に、培養物を1倍不完全PBSで洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素(Life Science、カタログ番号14190)で3~5分間、37℃で培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10μM Y-27632が補充されたE8中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、1.3~1.

10

20

30

40

50

5×10^5 細胞/cm²で播種した。培養物をE8培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。

【0172】

ステージ1(3日間)：

MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース、100ng/mL GDF8、及び1.5μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び0.1μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

【0173】

ステージ2(2日間)：

細胞を最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース、0.25mM アスコルビン酸、及び50ng/mL FGF7が補充されたMCDB-131培地で培養した。

20

【0174】

ステージ3(2日間)：

細胞を、1:100希釈のITS-X、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース、2.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、1μM RA、25ng/mL FGF7、0.25mM アスコルビン酸、300nM TPB、及び100nM LDN-193189が補充されたBLARカスタム培地中で2日間培養した。

30

【0175】

ステージ4(3日間)：

細胞を、1:100希釈のITS-X、1倍濃度のGlutamax(商標)、4.5mM D-グルコース、2.5g/1000mL 重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、0.1μM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mM アスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地中で3日間培養し、次いでステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10μMのY-27632で4時間処理し、1倍不完全PBSですすぎ、1倍TrypLE(商標)で3~5分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出してBLAR培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコへと移し、1000rpmで3分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約 0.5×10^5 細胞/cm²の密度で、フィルター挿入物(BD Biosciences、カタログ番号3420)上に再懸濁した(合計25万~50万細胞/スポットの場合、スポット当たり5~10μL)。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約1~2mmと測定された。6ウェル挿入物の場合、1.5mL/ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10cmフィルター挿入物の場合、8mLを添加した。典型的に、6ウェル挿入物の1ウェル当たり20~15スポットを使用し、10cm挿入物の場合、80~90スポットを使用した。

40

【0176】

ステージ5(3日間)：

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mM グルコース(最終)、1.

50

5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、2 % FAF - BSA、10 μ g / mL のヘパリン、10 μ M ZnSO₄、0.25 μ M SANT - 1、0.05 μ M RA、100 nM LDN - 193189、1 μ M の T3 (3, 3', 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、及び 10 μ M の ALK5 阻害剤 II が補充された BLAR 培地中で 3 日間培養した。

【0177】

ステージ 6 (7 日間) :

ステージ 5 細胞を、1 : 100 希釈の ITS - X、20 mM グルコース (最終)、1.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、2 % FAF - BSA、10 μ g / mL のヘパリン、10 μ M ZnSO₄、100 nM LDN - 193189、1 μ M T3 (3, 3', 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、100 nM 分泌酵素阻害剤 XX、及び 10 μ M ALK5 阻害剤 II が補充された BLAR 培地中で 7 日間培養した。

10

【0178】

ステージ 7 (7 日間) :

ステージ 6 細胞を、1 : 100 希釈の ITS - X、20 mM グルコース (最終)、1.5 g / L 重炭酸ナトリウム、2 % FAF - BSA、10 μ g / mL のヘパリン、10 μ M ZnSO₄、1 μ M T3 (3, 3', 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、10 μ M ALK5 阻害剤 II、1 mM N - アセチルシステイン、及び 2 μ M AXL 阻害剤 (R428) が補充された BLAR 培地中で 7 日間培養した。

20

【0179】

ステージ 4 の 3 日目、ステージ 5 の 3 日目、ステージ 6 の 3 日目、及びステージ 7 の 7 日目において、mRNA を収集し、AXL 及び GAS6 の発現を、未分化ヒト幹細胞及び屍体ヒト臍島 (Prodo Labs, California) と比較して評価した。図 9 に描かれるように、AXL の発現は、未分化幹細胞中に高レベルで存在した。しかしながら、幹細胞の、臍内胚葉、臍内分泌、及び未成熟細胞への分化は、AXL 発現の急落をもたらした。更に、ステージ 4 ~ 7 では、GAS6 発現が低レベルで維持された。AXL の発現もまた、未分化幹細胞と比較して、ヒト臍島において著しく低かった。これらの結果は、ステージ 6 及び 7 細胞が、非常に低い AXL の発現を有することを示す。

【0180】

(実施例 5)

R428 は、AXL 及び多くの追加のキナーゼを阻害する

異なるキナーゼを標的とするための AXL 阻害剤 R428 の効率を、キナーゼプロファイリングサービスによって、100 μ M ATP 濃度 (EMD Millipore) を使用して評価した。R428 を、1 μ M 及び 10 μ M で試験した。表 IV は、キナーゼを標的とする際の効率に従ってプロファイルされたキナーゼを列挙し、より小さい数字は、特定キナーゼのより頑強な阻害を示す。

【0181】

30

【表 8】

表 I V - R 4 2 8 のキナーゼプロファイリング

キナーゼ	R428	R428
	1001010@1 μ M	1001010@10 μ M
ALK4 (h)	84	48
オーロラ-A (h)	20	3
オーロラ-B (h)	1	0
Axl (h)	-1	-1
Blk (h)	27	2
CaMKII β (h)	76	5
CaMKI δ (h)	76	24
CDK1 / シクリンB (Hh)	101	88
CDK5 / p35 (h)	101	94
CHK1 (h)	71	23
CHK2 (h)	47	9
CK2 (h)	103	106
CK2 α 2 (h)	112	97
CLK2 (h)	78	28
cSRC (h)	51	10
EGFR (h)	89	40

10

20

【 0 1 8 2 】

【表 9】

表IV-R428の キナーゼプロファイリング(続き)		
Eph A2(h)	54	12
FGFR1(h)	17	1
Flt3(h)	9	1
GSK3 α (h)	95	105
GSK3 β (h)	106	99
IGF-1R(h)	93	58
IKK β (h)	86	53
IR(h)	83	24
IRAK4(h)	94	51
JAK2(h)	96	41
JAK3(h)	69	18
MAPK1(h)	108	106
Met(h)	49	-1
NEK2(h)	60	10
PAK4(h)	97	73
PDGFR β (h)	37	21
Pim-2(h)	87	74
PKA(h)	88	35
PKB α (h)	87	57
PKC α (h)	101	96
PKC β 1(h)	102	95
Plk1(h)	83	65
Plk3(h)	101	81
Ret(h)	1	1
ROCK-1(h)	93	41
Rsk3(h)	2	1
SAPK3(h)	106	108
SAPK4(h)	94	91
TGFBR1(h)	97	69
TrkC(h)	47	13
ZAP-70(h)	92	66
ZIPK(h)	97	46

【0183】

キナーゼプロファイリング結果は、R428が、予想どおりAXLを阻害することを示す。しかしながら、追加として、R428は、RSK3、Ret、Flt、FGFR1、オーロラA、及びオーロラBキナーゼを1 μ M及び10 μ Mで強力に阻害する。これは、MAFAの誘導におけるR428の作用機序が、AXL受容体阻害剤によるものではない場合があることを意味する。実際に、本明細書の実施例は、ステージ7におけるAXLのmRNA発現が非常に低いことを示し、MAFA発現を誘導することにおけるR428の作用機序は、AXLの阻害によるものではないが、むしろRSK3及びオーロラキナーゼなどの他のキナーゼの阻害によるものであることを強調する。

【0184】

(実施例6)

オーロラキナーゼ発現の阻害は、R428の非存在下、ステージ7におけるMAFA発現を増強した

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1 \times 10⁵細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上のE8培地中に播種した。約70~80%の培養密度で、培養物を1倍不完全DPBSで洗浄し、続いて1

倍TrypLE（商標）発現酵素で3～5分間、37℃で培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10μM Y-27632が補充されたE8中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm²で播種した。培養物をE8培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。

【0185】

ステージ1（3日間）：

MATRIGEL（商標）（1：30希釈）でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び1.5μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び0.1μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

【0186】

ステージ2（2日間）：

細胞を1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、0.25mMアスコルビン酸、及び50ng/mL FGF7が補充されたMCDB-131培地で培養した。

20

【0187】

ステージ3（2日間）：

細胞を、1：100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、1μM RA、25ng/mL FGF7、0.25mMアスコルビン酸、300nM TPB、及び100nM LDN-193189が補充されたBLARカスタム培地中で2日間培養した。

30

【0188】

ステージ4（3日間）：

細胞を、1：100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、0.1μM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地中で3日間培養し、次いでステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10μMのY-27632で4時間処理し、1倍不完全PBSですすぎ、1倍TrypLE（商標）で3～5分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出してBLAR培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコへと移し、1000rpmで3分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約 0.5×10^5 細胞/cm²の密度で、フィルター挿入物上で再懸濁した（合計25万～50万細胞/スポットに対して1スポット当たり5～10μL）。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約1～2mmと測定された。6ウェル挿入物の場合、1.5mL/ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10cmフィルター挿入物の場合、8mLを添加した。典型的に、6ウェル挿入物の1ウェル当たり20～15スポットを使用し、10cm挿入物の場合、80～90スポットを使用した。

40

【0189】

ステージ5（3日間）：

50

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、0.25μM SANT-1、0.05μM RA、100nM LDN-193189、1μMのT3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10μMのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で3日間培養した。

【0190】

ステージ6(7日間):

ステージ5細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、100nM LDN-193189、1μM T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10μM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

【0191】

ステージ7(7日間):

ステージ6細胞を、7日間、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/L重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、1nM T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10μM ALK5阻害剤II、1mM N-アセチルシステインが補充されたBLAR培地中で培養した。一部の培養物はまた、2μM R428、2μM オーロラキナーゼ阻害剤VI(4-(4-(N-ベンゾイルアミノ)アニリノ)-6-メトキシ-7-(3-(1-モルホリノ)プロポキシ)キナゾリン)(EMD Millipore、カタログ番号18941)、又は2μM オーロラキナーゼ阻害剤II(4-(4'-ベンズアミドアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)(EMD Millipore、カタログ番号189404)のうちの1つを含んでいた。

【0192】

ステージ7の7日目に、mRNAを収集し、MAFA、UCN3、PDX1、NKX6.1、インスリン、及びG6PC2の発現を、未分化ヒト幹細胞と比較して評価した。図10に描かれるように、R428の除去は、MAFA発現の著しい減少をもたらした。成熟細胞の両方のマーカー、UCN3及びG6PC2発現の著しい上昇は、R428で処理されていない培養物について示され、R428は、MAFA発現を増加させるが、化合物が他の細胞成熟マーカーを低減することを示唆している。オーロラキナーゼ阻害剤をR428に置換することは、MAFA発現を回復するが、G6PC2レベルを減少させない。したがって、ステージ7でのR428によるMAFA発現の誘導は、AXL阻害剤によるものではなく、オーロラキナーゼの阻害によるものである可能性があった。オーロラキナーゼ阻害剤IIの使用は、MAFA発現の増加及びUCN3及びG6PC2発現の維持をもたらした。

【0193】

(実施例7)

オーロラキナーゼ又はRSKの阻害は、R428の非存在下、ステージ7におけるMAFA発現の発現を増強した

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として 1×10^5 細胞/cm²で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上のE8培地中に播種した。約70~80%の培養密度で、培養物を1倍不完全DPBSで洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素で3~5分間、37℃で培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10μM Y-27632が補充されたE8中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm²で播種した。培養物をE8培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした

た。

【0194】

ステージ1(3日間)：

MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び1.5μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び0.1μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

【0195】

ステージ2(2日間)：

細胞を1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、0.25mMアスコルビン酸、及び50ng/mL FGF7が補充されたMCDB-131培地で培養した。

20

【0196】

ステージ3(2日間)：

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、1μM RA、25ng/mL FGF7、0.25mMアスコルビン酸、300nM TPB、及び100nM LDN-193189が補充されたBLARカスタム培地中で2日間培養した。

【0197】

ステージ4(3日間)：

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、0.1μM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地中で3日間培養し、次いでステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10μMのY-27632で4時間処理し、1倍不完全PBSですすぎ、1倍TrypLE(商標)で3~5分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出してBLAR培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコへと移し、1000rpmで3分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約 0.5×10^5 細胞/cm²の密度で、フィルター挿入物上で再懸濁した(合計25万~50万細胞/スポットに対して1スポット当たり5~10μL)。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約1~2mmと測定された。6ウェル挿入物の場合、1.5mL/ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10cmフィルター挿入物の場合、8mLを添加した。典型的に、6ウェル挿入物の1ウェル当たり20~15スポットを使用し、10cm挿入物の場合、80~90スポットを使用した。

30

40

【0198】

ステージ5(3日間)：

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、0.25μM SANT-1、0.05μM RA、100nM LDN-193189、1μMのT3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10μMのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中

50

で3日間培養した。

【0199】

ステージ6(7日間)：

ステージ5細胞を、1：100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、100nM LDN-193189、1μM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10μM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

【0200】

ステージ7(7日間)：

ステージ6細胞を、14日間、1：100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/L重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO₄、1μM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10μM ALK5阻害剤II、1mM N-アセチルシステインが補充されたBLAR培地中で培養した。一部の培養物はまた、2μM R428、2~5μM RSK阻害剤II(2-(3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-アニリノ)-8-イソペンチル-5,7-ジメチル-7H-プテリジン-6-オン)(EMD Millipore、カタログ番号559286-5MG)、2~5μMオーロラキナーゼ阻害剤II(EMD Millipore、又は2~5μM RSK阻害剤II、及び2~5μMオーロラキナーゼII阻害剤の組み合わせ)のうちの1つを含んでいた。

【0201】

ステージ7の14日目に、mRNAを収集し、未分化ヒト幹細胞と比較した。図11に描かれるように、R428の除去は、MAFA発現の著しい減少をもたらした。R428をオーロラキナーゼ阻害剤IIと置換することは、MAFA発現を回復した。同様に、R428をRSK阻害剤と置換することは、MAFA発現を回復した。R428をオーロラキナーゼ阻害剤II及びRSK阻害剤と置換することは、MAFA発現を更に増強した。このデータは、R428によるMAFA発現の誘導が、AXL阻害剤によるものではなく、むしろオーロラキナーゼ、RSK、又はそれらの組み合わせの阻害によるものである可能性があったことを示す。

本発明は以下の態様を包含し得る。

[1] 膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する、分化した多能性幹細胞の集団を含み、前記分化細胞の少なくとも10%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する、インビトロ細胞培養物。

[2] 多能性細胞から誘導される細胞内でMAFA発現を誘導する方法であって、多能性細胞を培養することと、オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される阻害剤が補充された培地での処理によって、前記多能性細胞を、より成熟した表現型の膵内分泌細胞に分化させることと、を含む、方法。

[3] 前記阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤である、請求項2に記載の方法。

[4] オーロラキナーゼ阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤IIである、請求項3に記載の方法。

[5] 前記阻害剤が、RSK阻害剤である、請求項2に記載の方法。

[6] オーロラキナーゼ阻害剤が、RSK阻害剤IIである、請求項3に記載の方法。

[7] 前記培地が、抗酸化剤を更に含む、請求項2に記載の方法。

また本発明は以下の態様も包含し得る。

[1] 膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する、分化した多能性幹細胞の集団、及び培地を含み、前記分化細胞の少なくとも10%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及び

1、及びM A F Aを発現する、インビトロ細胞培養物。

[2] オーロラキナーゼ阻害剤、R S K阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地での処理によって、前記多能性幹細胞を、より成熟した表現型の膵内分泌細胞に分化させることにより、前記細胞の集団を得る、請求項1に記載のインビトロ細胞培養物。

[3] オーロラキナーゼ阻害剤が補充された培地での処理によって、前記細胞の集団を得る、請求項2に記載のインビトロ細胞培養物。

[4] 前記オーロラキナーゼ阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤I I、S N S 3 1 4メシラート、G S K 1 0 7 0 9 1 6、及びT A K - 9 0 1からなる群から選択される、請求項3に記載のインビトロ細胞培養物。

[5] R S K阻害剤が補充された培地での処理によって、前記細胞の集団を得る、請求項2に記載のインビトロ細胞培養物。

[6] 前記R S K阻害剤が、R S K阻害剤I Iである、請求項5に記載のインビトロ細胞培養物。

[7] タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤が補充された培地での処理によって、前記細胞の集団を得る、請求項2に記載のインビトロ細胞培養物。

[8] 前記タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤が、E P Z - 5 6 7 6である、請求項7に記載のインビトロ細胞培養物。

[9] 前記培地に、抗酸化剤が更に補充されている、請求項1又は2に記載のインビトロ細胞培養物。

[1 0] 前記多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、請求項1に記載のインビトロ細胞培養物。

[1 1] 多能性細胞から誘導される細胞内でM A F A発現を誘導する方法であって、多能性細胞を培養することと、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地での処理によって、前記多能性細胞を、より成熟した表現型の膵内分泌細胞に分化させることと、を含む、前記方法。

[1 2] 前記培地に、オーロラキナーゼ阻害剤が補充されている、請求項11に記載の方法。

[1 3] オーロラキナーゼ阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤I Iである、請求項12に記載の方法。

[1 4] 前記オーロラキナーゼ阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤I I、S N S 3 1 4メシラート、G S K 1 0 7 0 9 1 6、及びT A K - 9 0 1からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

[1 5] 前記培地に、R S K阻害剤が補充されている、請求項11に記載の方法。

[1 6] R S Kキナーゼ阻害剤が、R S K阻害剤I Iである、請求項15に記載の方法。

[1 7] 前記培地が、抗酸化剤を更に含む、請求項11に記載の方法。

[1 8] 前記培地にタンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤が補充されている、請求項11に記載の方法。

[1 9] 前記タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤が、E P Z - 5 6 7 6である、請求項18に記載の方法。

[2 0] (a) 前記多能性幹細胞を、膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞へ分化することと、
(b) (i) S M O阻害剤又はS H Hシグナル伝達経路アンタゴニスト、(i i) B M P阻害剤、(i i i) T 3、T 4、それらの類似体及びそれらの混合物、及び(i v) A L K 5阻害剤が補充された培地で、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を培養することにより、前記膵内胚葉 / 内分泌前駆細胞を膵内分泌細胞へ分化することと、及び

(c) 前記膵内分泌細胞を、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼD O T 1 Lの阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地で処理することと、を含む、

10

20

30

40

50

請求項 11 に記載の方法。

[21] (a) 多能性幹細胞を、(i) アクチビン A 及び w n t 3 A 又は (i i) G D F - 8 及び 14 - プロパ - 2 - エン - 1 - イル - 3 , 5 , 7 , 14 , 17 , 23 , 27 - ヘプタアザテトラシクロ [19 . 3 . 1 . 1 ~ 2 , 6 ~ . 1 ~ 8 , 12 ~] ヘプタコサ - 1 (25) , 2 (27) , 3 , 5 , 8 (26) , 9 , 11 , 21 , 23 - ノナエン - 16 - オンのいずれかが補充された培地で培養して胚体内胚葉細胞を得ることと、

(b) 前記胚体内胚葉細胞を、腭前腸前駆細胞へ分化することと、

(c) 前記腭前腸前駆細胞を、腭内胚葉 / 内分泌前駆細胞へ分化することと、

(d) (i) S M O 阻害剤又は S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト、(i i) B M P 阻害剤、(i i i) T 3、T 4、それらの類似体及びそれらの混合物、及び (i v) A L K 5 阻害剤が補充された培地で、前記腭内胚葉 / 内分泌前駆細胞を培養することにより、前記腭内胚葉 / 内分泌前駆細胞を腭内分泌細胞へ分化することと、及び

(e) 前記腭内分泌細胞を、オーロラキナーゼ阻害剤、R S K 阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L の阻害剤、又はそれらの組み合わせが補充された培地で処理することと、を含む、

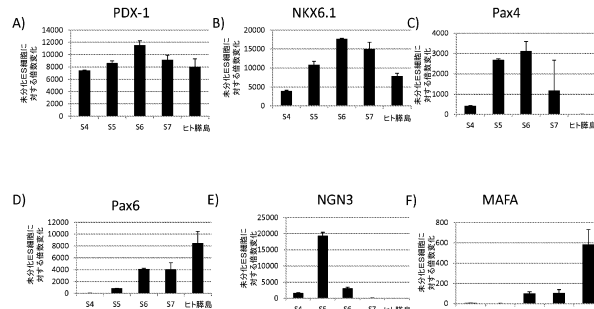
請求項 11 に記載の方法。

[22] 前記多能性幹細胞が、ヒト細胞である、請求項 11、20、又は 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

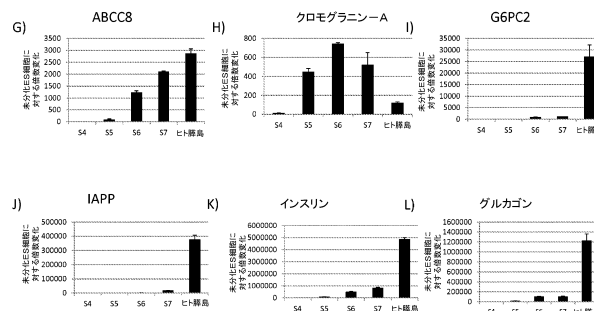
[23] 前記腭内分泌細胞が、単一ホルモンインスリン、P D X 1、N K X 6 . 1、及び M A F A を発現する、請求項 11、20、又は 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

[24] 腭内分泌細胞を懸濁培養中で空気 - 液体界面において処理することを含む、請求項 11、20、又は 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

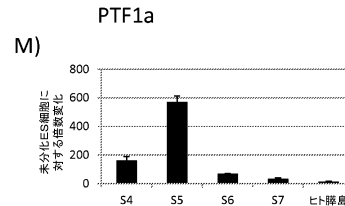
【図 1 - 1】



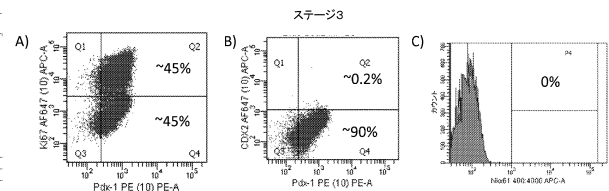
【図 1 - 2】



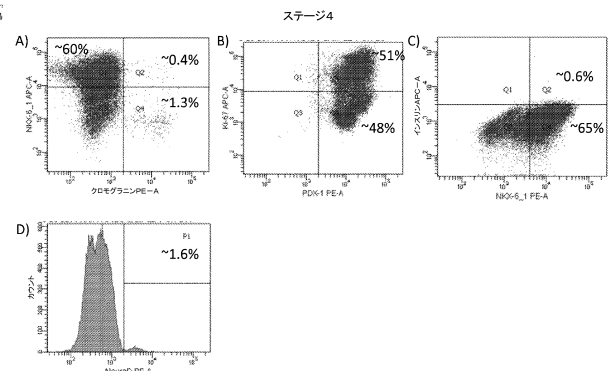
【図 1 - 3】



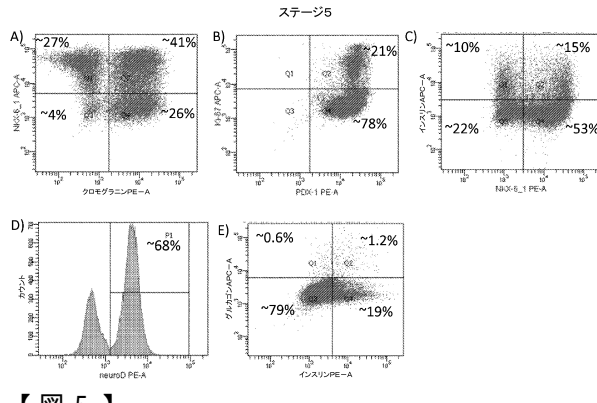
【図 2】



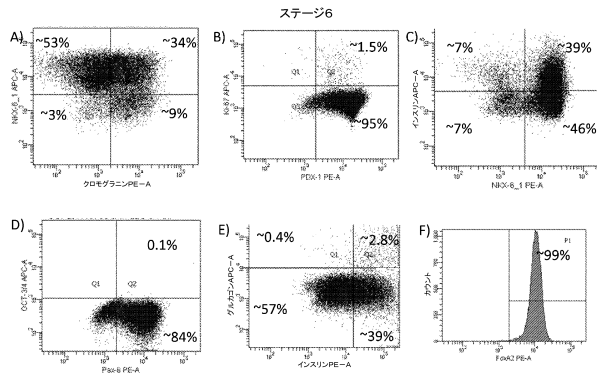
【図 3】



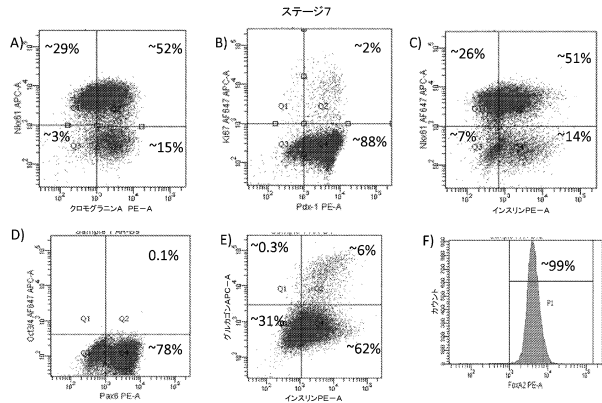
【 図 4 】



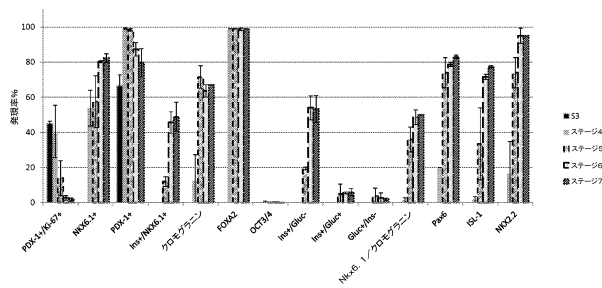
【 図 5 】



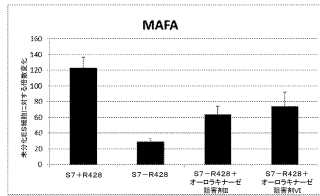
【 図 6 】



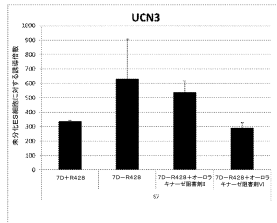
【圖 7】



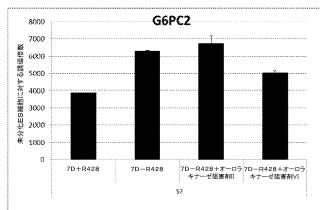
【図10A】



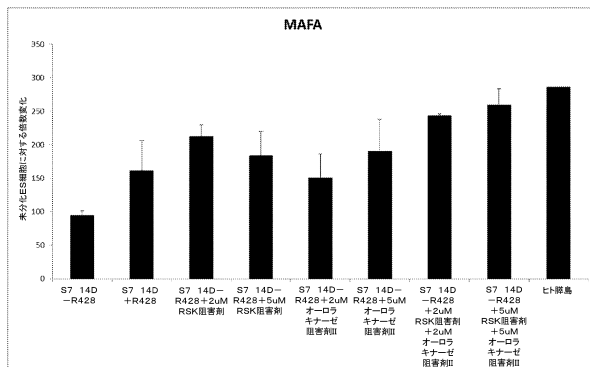
【図10B】



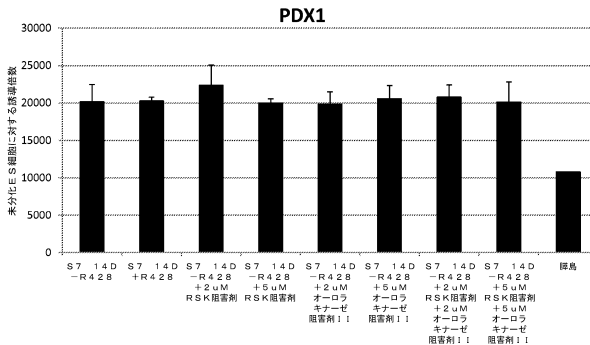
【図10C】



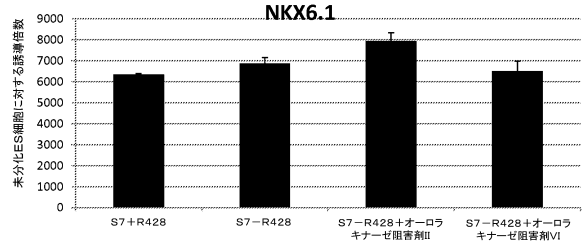
【図11A】



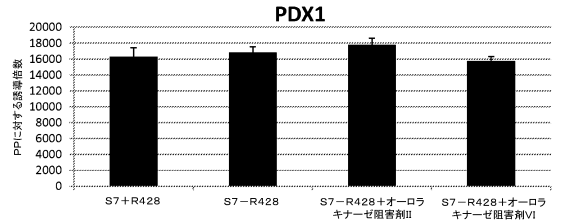
【図11B】



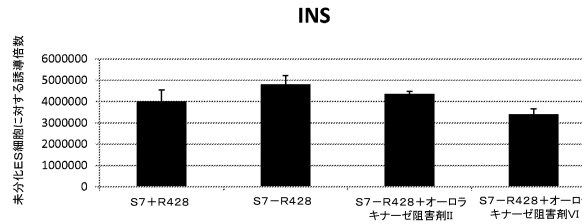
【図10D】



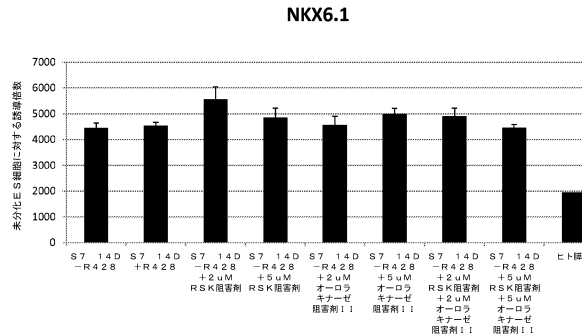
【図10E】



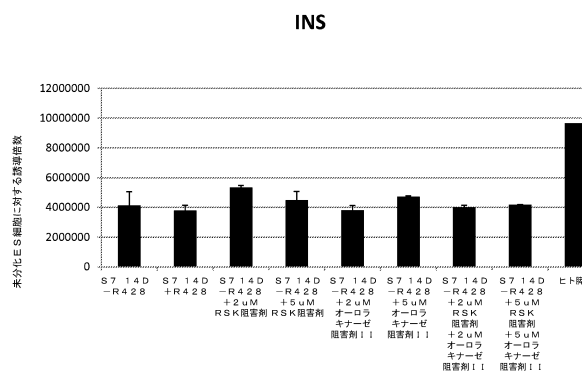
【図10F】



【図11C】



【図11D】



フロントページの続き

(74)代理人 100147131

弁理士 今里 崇之

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 レザニア, アリレザ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, 1000 ルート 202 サウス

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第2013/095953(WO, A1)

国際公開第2014/033322(WO, A1)

特表2012-507292(JP, A)

特開2012-040025(JP, A)

Cell research, 2009, Vol.19, p.429-438

Journal of Cellular Physiology, 2005, Vol.204, p.286-296

DIABETES, 2010, Vol.59, p.662-669

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)