(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年5月4日(04.05.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/074648 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/039602

(22) 国際出願日： 2022年10月25日(25.10.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-173827 2021年10月25日(25.10.2021) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 山▲崎▼ 奈穂 (**YAMAZAKI Nao**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 美馬 伸治 (**MIMA Shinji**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 今倉 悠貴 (**IMAKURA Yuki**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

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

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

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING INTESTINAL ENDOCRINE CELLS, PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED INTESTINAL ENDOCRINE CELLS, MEDIUM OR MEDIUM KIT, AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称： 腸内分泌細胞を製造する方法、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞、培地又は培地キット、およびそれらの利用

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing: a method for producing intestinal endocrine cells using gut stem cells induced from pluripotent stem cells; a method for analyzing a disease mechanism; a method for evaluating an anaylte; a therapeutic agent screening method for digestive disorders; pluripotent stem cell-derived intestinal endocrine cells; a medium or a medium kit; and a kit for producing intestinal endocrine cells. The present invention provides a method for producing intestinal endocrine cells, the method including culturing gut stem cells or gut epidermal cells induced from pluripotent stem cells using a culture medium that does not substantially include a ligand of epidermal growth factor receptor but includes a cAMP activating agent and a DNA methyl transferase inhibitor.

(57) 要約：本発明は、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞を用いて腸内分泌細胞を製造する方法、疾患メカニズムの解析方法、被験物質の評価方法、消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞、培地又は培地キット、並びに腸内分泌細胞を製造するためのキットを提供することを課題とする。本発明によれば、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養することを含む、腸内分泌細胞を製造する方法が提供される。

WO 2023/074648 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

腸内分泌細胞を製造する方法、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞、培地又は培地キット、およびそれらの利用

技術分野

[0001] 本発明は、腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を培養することによって腸内分泌細胞を製造する方法に関する。本発明はさらに、本発明の方法で製造した腸内分泌細胞を用いた、疾患メカニズムの解析方法、被験物質の評価方法、並びに消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法に関する。本発明はさらに、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞に関する。本発明は、培地又は培地キット、並びに腸内分泌細胞を製造するためのキットに関する。

背景技術

[0002] 腸内分泌系は、多様なホルモンを分泌して体内のさまざまな生理学的反応を微調整することにより、体の栄養素に対する反応を制御している。腸内分泌細胞（以下、ＥＥＣとも言う）は、体内で最大の内分泌系を形成することから、胃腸障害、糖尿病、肥満等の疾患において重要な役割を担っている。腸内分泌細胞は、腸上皮全体の陰窩－絨毛軸に沿って個別に分散しているが、インビボではごくわずかな割合（－１％）でしか存在しない。

[0003] 腸内分泌細胞の重要な機能は、管腔の内容物、特に栄養素を感知し、食物摂取、エネルギー恒常性、耐糖能を調節する多様なホルモン（ＧＬＰ－１など）を分泌することである。また、腸内分泌細胞は、ＧＬＰ－１、ＰＹＹ、ＧＬＰ－２などのホルモンを分泌することにより、胃バイパス手術において重要な役割を果たすことが示唆されている。したがって、腸内分泌細胞は糖尿病と肥満の治療標的である。さらに、腸内分泌細胞は自然免疫における免疫調節機能を有することも報告されている。腸内分泌細胞は、機能的なＴｏＬＬ様受容体（ＴＬＲ）を発現し、共生細菌によって生成される代謝物に直接応答する。また、腸内分泌細胞が、腸内炎症時に細胞数の変動とホルモン

分泌の変化を通じて免疫細胞機能を直接調整する可能性があることも示唆されている。腸内分泌細胞は、代謝性疾患（糖尿病や肥満など）、過敏性腸症候群、感染性腸炎、炎症性腸疾患などの胃腸の病状にも重要な役割を果たすと考えられている。したがって、疾患介入の調査と開発のための腸内分泌細胞に大きな関心が持たれる。

[0004] 特許文献１には、哺乳動物出生後細胞集団から腸内分泌細胞の集団を得るための方法であって、哺乳動物出生後細胞集団を、ＣｈｇＡを上方制御する複数の小分子で処理して、出生後細胞を分化させることを含む方法が記載されている。また、特許文献２には、多能性幹細胞を内胚葉様細胞へと分化させる工程、得られた内胚葉様細胞を腸管幹細胞様細胞へと分化させる工程、得られた腸管幹細胞様細胞を、上皮成長因子、線維芽細胞増殖因子、ＴＧＦβ受容体阻害剤、ＧＳＫ－３β阻害剤及びＲＯＣＫ阻害剤の存在下で培養する工程、得られた細胞を培養してスフェロイドを形成させる工程、形成されたスフェロイドを分化させ、腸管オルガノイドを形成させる工程を含む、腸管オルガノイドの作製方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１７／１２０５４３号公報

特許文献2：国際公開ＷＯ２０２０／０９１０２０号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 代謝性および消化性疾患の調査を可能にするためのインビトロ腸内分泌細胞の培養及び評価システムが必要とされている。この腸内分泌細胞の培養及び評価システムを用いて、病態解析および治療法開発を行うのみならず、腸内分泌細胞の機能を調節し、特定の腸内分泌細胞サブタイプを取得するようなメカニズムや化合物探索も必要である。

[0007] 腸内分泌細胞の有効利用のために、腸内分泌細胞の詳細な解析や分化メカ

ニズムの解明が必要だが、腸内分泌細胞はインビボではごくわずかな割合（－１％）でしか存在しない。

[0008] インビトロでの腸内分泌細胞の作製方法としては特許文献１に報告があるが、特許文献１に記載の方法は、腸管幹細胞などの体性幹細胞を含む哺乳動物出生後細胞集団から腸内分泌細胞を分化誘導する方法であり、そもそも腸管幹細胞やそれに準ずる体性幹細胞も生体内における存在頻度は非常に低い。また、特にヒトにおいては、生体内から腸管幹細胞を分取することは困難である。

[0009] 本発明は、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞を用いて腸内分泌細胞を製造する方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、本発明の方法で製造した腸内分泌細胞を用いた、疾患メカニズムの解析方法、被験物質の評価方法、並びに消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞、培地又は培地キット、並びに腸内分泌細胞を製造するためのキットを提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養することによって、腸内分泌細胞を製造できることを見出した。本発明は上記知見に基づいて完成したものである。

[0011] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

＜１＞ 多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養することを含む、腸内分泌細胞を製造する方法。

＜２＞ ｃＡＭＰ活性化剤がＦｏｒｓｋｏｌｉｎであり、ＤＮＡメチルトラ

ンスフェラーゼ阻害剤が５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅである、＜１＞に記載の方法。

＜３＞　上記培養培地が、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤のいずれか一以上を含む、＜１＞又は＜２＞に記載の方法。

＜４＞　トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤がＡ８３－０１であり、ＭＥＫ阻害剤が、ＰＤ９８０５９および/またはＰＤ０３２５９０１である、＜３＞に記載の方法。

＜５＞　上記培養培地が、Ｎｏｔｃｈ阻害剤を含む、＜１＞から＜４＞の何れか一に記載の方法。

＜６＞　Ｎｏｔｃｈ阻害剤がＬＹ４１１５７５である、＜５＞に記載の方法。

＜７＞　上記培養培地が、Ｗｎｔ活性化剤およびＷｎｔ阻害剤の何れか一以上を含まない、＜１＞から＜６＞のいずれか一に記載の方法。

＜８＞　上記培養培地が、レチノイン酸シグナル経路活性化剤およびソニック・ヘッジホッグシグナル経路阻害剤の何れか一以上を含まない、＜１＞から＜７＞のいずれか一に記載の方法。

＜９＞　上記多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、＜１＞から＜８＞のいずれか一に記載の方法。

＜１０＞　上記培養培地を用いた培養工程が、浮遊培養工程を含まない、＜１＞から＜９＞のいずれか一に記載の方法。

＜１１＞　上記培養培地を用いた培養工程においてスフェロイドを形成しない、＜１＞から＜１０＞のいずれか一に記載の方法。

＜１２＞　製造される腸内分泌細胞がシート状である、＜１＞から＜１１＞のいずれか一に記載の方法。

＜１３＞　＜１＞から＜１２＞のいずれか一に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および上記腸内分泌細胞を用いて疾患メカニズムを解析する工程を含む、疾患メカニズムの解析方法。

＜１４＞　＜１＞から＜１２＞のいずれか一に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および被験物質の存在下において上記腸内分泌細胞が分泌するホルモンを定量する工程を含む、被験物質の評価方法。

＜１５＞　＜１＞から＜１２＞のいずれか一に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および消化器疾患に対する治療薬の存在下において上記腸内分泌細胞を培養する工程を含む、消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法。

＜１６＞　ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４及びＮＥＵＲＯＧ３を発現し、ＮＫＸ６．１を発現しない、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞。

＜１７＞　基礎培地、血清又は血清代替物、ｃＡＭＰ活性化剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤を含み、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まない、培地又は培地キット。

＜１８＞　Ｎｏｔｃｈ阻害剤をさらに含む、＜１７＞に記載の培地又は培地キット。

＜１９＞　腸内分泌細胞を製造するための、＜１７＞又は＜１８＞に記載の培地又は培地キット。

＜２０＞　＜１７＞から＜１９＞の何れか一に記載の培地又は培地キットと、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞とを含む、腸内分泌細胞を製造するためのキット。

発明の効果

[0012]　本発明によれば、均一な性質を持ち大量に製造可能な多能性幹細胞を出発材料として腸内分泌細胞を製造することができる。また、本発明の方法により製造された腸内分泌細胞を用いることにより被験物質などの消化管ホルモン産生能を評価することができる。本発明による培地又は培地キット、並びに腸内分泌細胞を製造するためのキット創薬支援ツールとして使用することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、表１の各種培地で培養したＦ－ｈｉＳＩＥＣ細胞におけるＥＥＣマーカーの遺伝子発現を示す。

[図2]図２は、表２の培地に、ＬＹ４１１５７５を０．５～２．０μｍｏｌ／Ｌ、またはＤＡＰＴを５～１０μｍｏｌ／Ｌ添加した条件で培養したＦ－ｈｉＳＩＥＣ細胞におけるＥＥＣマーカーの遺伝子発現を示す。

[図3]図３は、Ｃａｃｏ－２細胞と、Ｆ－ｈｉＳＩＥＣをＦ－ｈｉＳＩＥＣ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍで培養した細胞（Ｆ－ｈｉＳＩＥＣ）、Ｆ－ｈｉＳＩＥＣをＴａｂｌｅ３の培地で培養しＥＥＣに誘導した細胞（ＥＥＣ）におけるＮＫＸ６．１の遺伝子発現を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の実施の形態を以下に説明する。

本明細書における用語は以下の意味を有する。

５－ａｚａ－２’ ｄｃ： 5-Aza-2'-deoxycytidine：5-アザ-2'-デオキシシチジン

ｂＦＧＦ： Basic Fibroblast Growth Factor：塩基性線維芽細胞増殖因子

ＢＭＰ４:Bone morphogenetic protein 4：骨形成蛋白質４

ｃＡＭＰ：Cyclic adenosine monophosphate：環状アデノシン一リン酸

ＣＨＧＡ：Chromogranin A：クロモグラニンA

Ｃｒｉｐｔ：Cysteine-rich PDZ-binding protein：システインリッチPDZ結合タンパク質

ＤＭＥＭ： Dulbecco's Modified Eagle's Medium：ダルベッコ改変イーグル培地

ＤＮＭＴ：DNAメチルトランスフェラーゼ

ＥＧＦ: Epidermal Growth Factor：上皮成長因子

ＦＢＳ：Fetal Bovine Serum：ウシ胎児血清

Ｆｂｘｏ１５：F-Box Protein 15：Ｆ－ボックスプロテイン１５

ＦＧＦ２：Fibroblast Growth Factor-2：繊維芽細胞成長因子２

ＧＬＰ：グルカゴン様ペプチド-

ＧＳＫ－３β：Glycogen synthase kinase 3β：グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β

ＬＩＦ：Leukemia inhibitory factor：白血病阻止因子

ＭＥＫ１：MAPK-ERK kinase 1：MAPK-ERKキナーゼ1

ＮＥＡＡ：Non-Essential Amino Acids:非必須アミノ酸

ＮＥＵＲＯＧ３：Neurogenin 3：ニューロゲニン3

ＮＫＸ６．１：homeobox protein Nkx-6.1:ホメオボックスプロテインNkx-6.1

ＰＫＡ：protein kinase A:プロテインキナーゼA

ＰＹＹ：ペプチドＹＹ

ＲＥＧ４：Regenerating islet-derived protein 4：再生島由来ファミリーメンバー4

ＲＯＣＫ：Rho-associated protein kinase：Rho関連プロテインキナーゼ

ＳＣＦ：Stem cell factor：幹細胞因子

ＴＧＦβ：Transforming Growth Factor-β：トランスフォーミング増殖因子β

ＴＰＨ１：Tryptophan hydroxylase 1 ：トリプトファンヒドロキシラーゼ1

ＶＥＧＦ：vascular endothelial growth factor：血管内皮細胞増殖因子

Ｗｎｔ：Wingless-type MMTV integration site family:ウイングレス型ＭＭＴＶ組み込み部位ファミリー

[0015] ＜腸内分泌細胞を製造する方法＞

本発明による腸内分泌細胞を製造する方法は、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養することを含む方法である。

[0016] 本発明においては、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いることにより、腸内分泌細胞を効率よく誘導することができる

。

[0017] 本発明においては、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を使用する。

[0018] 「多能性幹細胞」とは、生体を構成するすべての細胞に分化しうる能力（分化多能性）と、細胞分裂を経て自己と同一の分化能を有する娘細胞を生み出す能力（自己複製能）とを併せ持つ細胞をいう。分化多能性は、評価対象の細胞を、ヌードマウスに移植し、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）のそれぞれの細胞を含むテラトーマ形成の有無を試験することにより、評価することができる。

[0019] 多能性幹細胞として、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、胚性生殖細胞（ＥＧ細胞）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）等を挙げることができるが、分化多能性及び自己複製能を併せ持つ細胞である限り、これに限定されない。好ましくはＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞を用いる。更に好ましくはｉＰＳ細胞を用いる。多能性幹細胞は、好ましくは哺乳動物（例えば、ヒトやチンパンジーなどの霊長類、マウスやラットなどのげっ歯類）の細胞、特に好ましくはヒトの細胞である。従って、本発明の最も好ましい態様では、多能性幹細胞として、ヒト人工多能性幹細胞（ヒトｉＰＳ細胞）が用いられる。

[0020] ＥＳ細胞は、例えば、着床以前の初期胚、上記初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球等を培養することによって樹立することができる（Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ;Thomson, J. A. et al., Science, 282, 1145-1147 (1998)）。初期胚として、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を用いてもよい（Wilmut et al. (Nature, 385, 810 (1997)）、Cibelli et al. (Science, 280, 1256 (1998)）、入谷明ら（蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999)）、Baguisi et al. (Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)）、Wakayama et al. (Nature, 394, 369 (1998) ; Nature Genetics, 22, 127 (1999) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)）、Rideout III et al. (Nature Genetics,

24, 109 (2000)、Tachibana et al. (Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell (2013) in press)。初期座として、単為発生胚を用いてもよい(Kim et al. (Science, 315, 482-486 (2007))、Nakajima et al. (Stem Cells, 25, 983-985 (2007))、Kim et al. (Cell Stem Cell, 1, 346-352 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 9, 432-449 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 10, 11-24 (2008))。上掲の論文の他、ＥＳ細胞の作製についてはStrelchenko N., et al. Reprod Biomed Online. 9: 623-629, 2004；Klimanskaya I., et al. Nature 444: 481-485, 2006；Chung Y., et al. Cell Stem Cell 2: 113-117, 2008；Zhang X., et al Stem Cells 24: 2669-2676, 2006；Wassarman, P.M. et al. Methods in Enzymology, Vol.365, 2003等が参考になる。尚、ＥＳ細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合ＥＳ細胞も、本発明の方法に用いられる胚性幹細胞に含まれる。

[0021] ＥＳ細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、或いは市販されているものもある。例えば、ヒトＥＳ細胞については京都大学再生医科学研究所（例えばＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２及びＫｈＥＳ－３）、ＷｉＣｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、ＥＳＩ ＢＩＯなどから入手可能である。

[0022] ＥＧ細胞は、始原生殖細胞を、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦの存在下で培養すること等により樹立することができる(Matsui et al., Cell, 70, 841-847 (1992)、Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9523,13726-13731 (1998)、Turnpenny et al., Stem Cells, 21 (5), 598-609, (2003))。

[0023] 「人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）」とは、初期化因子の導入などにより体細胞をリプログラミングすることによって作製される、多能性（多分化能）と増殖能を有する細胞である。人工多能性幹細胞はＥＳ細胞に近い性質を示す。ｉＰＳ細胞の作製に使用する体細胞は特に限定されず、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。また、その由来も特に限定されな

いが、好ましくは哺乳動物（例えば、ヒトやチンパンジーなどの霊長類、マウスやラットなどのげっ歯類）の体細胞、特に好ましくはヒトの体細胞を用いる。例えば、胎児期の体細胞のほか、成人由来の体細胞（即ち、成熟した体細胞）を用いてもよい。体細胞としては、例えば、（１）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（２）組織前駆細胞、（３）線維芽細胞（皮膚細胞等）、上皮細胞、肝細胞、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞）、内皮細胞、筋肉細胞、毛細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞、皮膚細胞等の分化した細胞が挙げられる。ｉＰＳ細胞は、これまでに報告された各種方法によって作製することができる。また、今後開発されるｉＰＳ細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0024] ｉＰＳ細胞作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４及びｃ－Ｍｙｃの４因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である（Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al: Cell 131 (5), 861-72, 2007）。ヒトｉＰＳ細胞についてはＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｌｉｎ２８及びＮｏｎｏｇの４因子の導入による樹立の報告がある（Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007）。ｃ－Ｍｙｃを除く３因子（Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008）、Ｏｃｔ３／４及びＫｌｆ４の２因子（Kim Ｊ B, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008）、或いはＯｃｔ３／４のみ（Kim J B, et al: Cell 136 (3), 411-419, 2009）の導入によるｉＰＳ細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法（Zhou H, Wu S, Joo JY, et al: Cell Stem Cell 4, 381-384, 2009; Kim D, Kim CH, Moon JI, et al: Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009）も報告されている。一方、ヒストンメチル基転移酵素Ｇ９ａに対する阻害剤ＢＩＸ－０１２９４やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸（ＶＰＡ）或いはＢａｙＫ８６４４等を使用することによって作製効率の向上や導入する因子の低減などが可能であるとの報告もある（Huangfu D, et al: Nat. Bi

otechnol. 26 (7), 795-797, 2008; Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (11), 1269-1275, 2008; Silva J, et al: PLoS. Biol. 6 (10), e 253, 2008）。遺伝子導入法についても検討が進められ、レトロウイルスの他、レンチウイルス（Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007）、アデノウイルス（Stadtfeld M, et al: Science 322 (5903), 945-949, 2008）、プラスミド（Okita K, et al: Science 322 (5903), 949-953, 2008）、トランスポゾンベクター（Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al: Nature 458, 766-770, 2009; Kaji K, Norrby K, Pac a A, et al: Nature 458, 771-775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, et al: Nat Methods 6, 363-369, 2009）、或いはエピソーマルベクター（Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797-801, 2009）を遺伝子導入に利用した技術が開発されている。

[0025] ｉＰＳ細胞への形質転換、即ち初期化（リプログラミング）が生じた細胞はＦｂｘｏ１５、Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ／４、Ｆｇｆ－４、Ｅｓｇ－１及びＣｒｉｐｔ等の多能性幹細胞マーカー（未分化マーカー）の発現などを指標として選択することができる。選択された細胞をｉＰＳ細胞として回収する。

[0026] ｉＰＳ細胞は、例えば、国立大学法人京都大学又は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けることもできる。

[0027] 本明細書において「分化誘導する」とは、特定の細胞系譜に沿って分化するように働きかけることをいう。本発明では多能性幹細胞から分化誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を使用する。

[0028] ＜＜多能性幹細胞から腸管幹細胞への分化＞＞

多能性幹細胞を、腸管幹細胞への分化を誘導する条件下で培養することにより、腸管幹細胞を製造することができる。多能性幹細胞が腸管幹細胞へ分化する限り、培養条件は特に限定されない。典型的には、多能性幹細胞が内胚葉様細胞を介して腸管幹細胞へと分化するように、以下で説明する２段階の分化誘導、即ち、多能性幹細胞の内胚葉様細胞への分化（工程（１－１））と、内胚葉様細胞の腸管幹細胞への分化（工程（１－２））を行う。

[0029] 工程（１－１）内胚葉様細胞への分化

この工程では多能性幹細胞を培養し、内胚葉様細胞へと分化させる。換言すれば、内胚葉への分化を誘導する条件下で多能性幹細胞を培養する。多能性幹細胞が内胚葉様細胞に分化する限り、培養条件は特に限定されない。例えば、常法に従い、アクチビンＡを添加した培地で培養する。この場合、培地中のアクチビンＡの濃度を例えば１０ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは２０ｎｇ／ｍＬ～１５０ｎｇ／ｍＬとする。細胞の増殖率や維持等の観点から、培地に血清又は血清代替物（ＫｎｏｃｋＯｕｔ™ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＫＳＲ）など）を添加することが好ましい。血清はウシ胎仔血清に限られるものではなく、ヒト血清や羊血清等を用いることもできる。血清又は血清代替物の添加量は例えば０．１％（ｖ／ｖ）～１０％（ｖ／ｖ）である。

[0030] Ｗｎｔ／β－カテニンシグナル経路の阻害剤（例えば、ヘキサクロロフェン、クエルセチン、ＷｎｔリガンドであるＷｎｔ３ａ）を培地に添加し、内胚葉様細胞への分化の促進を図ってもよい。

ＢＭＰ４、ＶＥＧＦ、及びＦＧＦ２の一以上を培地に添加し、内胚葉様細胞への分化の促進を図ってもよい。

[0031] この工程は、国際公開第２０１４／１６５６６３号パンフレットに記載の方法又はそれに準じた方法で行うこともできる。

[0032] 好ましい一態様では、工程（１－１）として２段階の培養を行う。１段階目の培養では比較的低濃度の血清（例えば、０．１％（ｖ／ｖ）～１％（ｖ／ｖ））を添加した培地で行い、続く２段階目の培養では１段階目の培養よりも血清濃度を高めた培地（血清濃度を例えば１％（ｖ／ｖ）～１０％（ｖ／ｖ））で行う。このように２段階の培養を採用することは、１段階目の培養により未分化細胞の増殖を抑制し、続く２段階目により分化した細胞を増殖させる点で好ましい。

[0033] 工程（１－１）の期間（培養期間）は例えば１日間～１０日間、好ましくは２日間～７日間である。工程（１－１）として２段階の培養を採用する場

合には１段階目の培養期間を例えば１日間～７日間、好ましくは２日間～５日間とし、２段階目の培養期間を例えば１日間～６日間、好ましくは１日間～４日間とする。

[0034] 工程（１－２）　腸管幹細胞への分化

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

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

[0036] 「ＦＧＦ２の存在下」とは、ＦＧＦ２が培地中に添加された条件と同義である。従って、ＦＧＦ２の存在下での培養を行うためには、ＦＧＦ２が添加された培地を用いればよい。ＦＧＦ２の添加濃度の例を示すと１００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬである。

[0037] 同様に、「ＧＳＫ－３β阻害剤の存在下」とは、ＧＳＫ－３β阻害剤が培地中に添加された条件と同義である。従って、ＧＳＫ－３β阻害剤の存在下での培養を行うためには、ＦＧＦ２が添加された培地を用いればよい。ＧＳＫ－３β阻害剤としてＣＨＩＲ ９９０２１、ＳＢ２１６７６３、ＣＨＩＲ ９８０１４、ＴＷＳ１１９、Ｔｉｄｅｇｌｕｓｉｂ、ＳＢ４１５２８６、ＢＩＯ、ＡＺＤ２８５８、ＡＺＤ１０８０、ＡＲ－Ａ０１４４１８、ＴＤＺＤ－８、ＬＹ２０９０３１４、ＩＭ－１２、Ｉｎｄｉｒｕｂｉｎ、Ｂｉｋｉｎｉｎ、１－Ａｚａｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅを例示することができる。ＧＳＫ－３β阻害剤の添加濃度は０．１ｎｍｏｌ／Ｌ～３０μｍｏｌ／Ｌであって

もよく、好ましくは１ｎｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌであり、より好ましくは、１０ｎｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌであり、さらに好ましくは、５０ｎｍｏｌ／Ｌ～５μｍｏｌ／Ｌである。

[0038] 工程（１－２）の期間（培養期間）は例えば２日間～１０日間、好ましくは３日間～７日間である。上記培養期間が短すぎると、期待される効果（分化効率の上昇、腸管幹細胞としての機能の獲得の促進）が十分に得られない。他方、上記培養期間が長すぎると、分化効率の低下を引き起こす。

[0039] 腸管幹細胞へ分化したことは、例えば、腸管幹細胞マーカーの発現を指標にして判定ないし評価することができる。腸管幹細胞マーカーの例を挙げると、ロイシンリッチリピートを含むＧタンパク質共役受容体５（ＬＧＲ５）、エフリンＢ２受容体（ＥｐｈＢ２）である。

[0040] 第一の分化工程の終了時の細胞密度は、５．０×１０^{4}細胞／ｃｍ^2～２０×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}であってもよく、６．０×１０^{4}細胞／ｃｍ^2～１６×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}であることが好ましく、７．０×１０^{4}細胞／ｃｍ^2～１４×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}であることがより好ましい。

[0041] 工程（１－２）により得られた腸管幹細胞は、凍結保存することも可能である。凍結保存した腸管幹細胞を解凍し、以降の工程（増殖工程等）を実施してもよい。細胞の凍結保存には、一般的に培養細胞の凍結保存に用いられる溶液を使用することができ、培地、DMSO、血清、及び一般の凍結保存用試薬等を含んでもよい。一般の凍結保存用試薬の例としては、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）Ｆｒｅｅｚｅ　Ｍｅｄｉａ、ＣｅｌｌＢａｎｋｅｒ（登録商標）、ＦｒｅＳＲ（商標）－Ｓ 、NutriFreez（商標） D10 Cryopreservation Medium、Cellvation、Cryoscarless（登録商標）およびBambanker（登録商標）が挙げられる。

[0042] ＜＜腸管幹細胞から腸管上皮細胞への分化＞＞

腸管幹細胞から腸管上皮細胞への分化工程は、ＭＥＫ１阻害剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ＴＧＦβ受容体阻害剤、ＥＧＦ及びｃＡＭＰ活性化剤の存在下において腸管幹細胞を腸管上皮細胞へ分化させる工程を

含むことが好ましい。

[0043] ｃＡＭＰ活性化剤を使用することで、細胞内のｃＡＭＰレベルを積極的に上昇させることができる。「ＭＥＫ１阻害剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ＴＧＦβ受容体阻害剤、ＥＧＦ及びｃＡＭＰ活性化剤の存在下において」とは、第二の分化工程を構成する１又は２以上の培養を行うため、これら全ての化合物が必要とされることをいい、これら全ての化合物が同時に使用されること、即ち、これら全ての化合物が添加された培地を用いた培養が行われることを必須の条件として要求するものではない。

[0044] 腸管上皮細胞への分化は、１又は２以上の培養によって構成することができる。腸管上皮細胞への分化工程を構成する各培養では、例えば、

ＥＧＦが必須の成分として添加された培地；

ＥＧＦ及びＲＯＣＫ阻害剤（例えば、Ｙ－２７６３２）が必須の成分として添加された培地；

ＥＧＦ及びｃＡＭＰ活性化剤（例えばフォルスコリン（Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ））が必須の成分として添加された培地；

ＥＧＦ、ＭＥＫ１阻害剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ＴＧＦβ受容体阻害剤が必須の成分として添加された培地；

ＥＧＦ、ｃＡＭＰ活性化剤（例えばフォルスコリン（Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ））、ＭＥＫ１阻害剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ＴＧＦβ受容体阻害剤が必須の成分として添加された培地；

等を用いることができる。

[0045] ＭＥＫ１阻害剤として、ＰＤ９８０５９、ＰＤ１８４３５２、ＰＤ１８４１６１、ＰＤ０３２５９０１、Ｕ０１２６、ＭＥＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｉ、ＭＥＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＩＩ、ＭＥＫ１／２ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＩＩ、ＳＬ３２７を挙げることができる。同様に、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤として５－アザ－２’－デオキシシチジン、５－アザシチジン、ＲＧ１０８、ゼブラリンを挙げることができる。ＴＧＦβ受容体阻害剤については、後述の実施例に使用したＡ８３０１がＴＧＦ－β受容体ＡＬＫ４

、ＡＬＫ５、ＡＬＫ７に阻害活性を示すことを考慮すれば、好ましくは、ＴＧＦ－β受容体ＡＬＫ４、ＡＬＫ５、ＡＬＫ７の一以上に対して阻害活性を示すものを用いるとよい。例えば、Ａ８３０１、ＳＢ４３１５４２、ＳＢ－５０５１２４、ＳＢ５２５３３４、Ｄ４４７６、ＡＬＫ５ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ、ＬＹ２１５７２９９、ＬＹ３６４９４７、ＧＷ７８８３８８、ＲｅｐＳｏｘが上記条件を満たす。ｃＡＭＰ活性化剤としては、フォルスコリン、インドメタシン、ＮＫＨ４７７（コルホルシンダロパート）、細胞由来毒素タンパク質（百日咳毒素、コレラ毒素）、ＰＡＣＡＰ－２７、ＰＡＣＡＰ－３８、ＳＫＦ８３８２２等を用いることができる。フォルスコリン、ＮＫＨ４７７（コルホルシンダロパート）、コレラ毒素、ＰＡＣＡＰ－２７、ＰＡＣＡＰ－３８、ＳＫＦ８３８２２はアデニル酸シクラーゼ活性化作用を示し、細胞内ｃＡＭＰの合成を促進する。

[0046] ＭＥＫ１阻害剤の添加濃度の例（ＰＤ９８０５９の場合）を示すと４μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは１０～４０μｍｏｌ／Ｌである。同様にＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤の添加濃度の例（５－アザ－２’－デオキシシチジンの場合）を示すと、１μｍｏｌ／Ｌ～２５μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは２．５μｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌであり、ＴＧＦβ受容体阻害剤の添加濃度の例（Ａ８３０１の場合）を示すと０．１μｍｏｌ／Ｌ～２．５μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは０．２μｍｏｌ／Ｌ～１μｍｏｌ／Ｌである。ＥＧＦの添加濃度の例は、５ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは１０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬである。また、ｃＡＭＰ活性化剤の添加濃度の例（フォルスコリンの場合）を示すと、１μｍｏｌ／Ｌ～２００μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは５μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌである。尚、例示した化合物、即ち、ＰＤ９８０５９、５－アザ－２’－デオキシシチジン、Ａ８３０１及びフォルスコリンとは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、例示した化合物（ＰＤ９８０５９、５－アザ－２’－デオキシシチジン、Ａ８３０１、フォルスコリン）の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃

度範囲に準じて設定することができる。

[0047] 腸管上皮細胞への分化の工程を、上記の条件に加え、ｃＡＭＰが細胞へ供給される条件（「追加条件１」と呼ぶ）及びｃＡＭＰ分解酵素阻害剤が存在する条件（「追加条件２」と呼ぶ）、或いはこれらのいずれかの条件の下で行うことにしてもよい。追加条件１（ｃＡＭＰが細胞へ供給される条件）とは、細胞内へ取り込み可能な化合物であって、細胞内に取り込まれるとｃＡＭＰとして作用する化合物が存在する条件と同義である。従って、追加条件１を満たすためには、例えば、細胞内へと取り込み可能なｃＡＭＰ誘導体が添加された培地を用いればよい。追加条件１を採用すると、細胞内ｃＡＭＰ濃度の低下が抑えられ、腸管上皮への分化誘導、特に腸管上皮細胞としての機能の獲得が促されることを期待できる。即ち、上記条件は、より機能的な腸管上皮細胞の調製を可能にし得る。ｃＡＭＰ誘導体としてＰＫＡ活性剤（例えば、８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ（８－Ｂｒｏｍｏａｄｅｎｏｓｉｎｅ－３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：７６９３９－４６－３）、６－Ｂｎｚ－ｃＡＭＰ（Ｎ６－Ｂｅｎｚｏｙｌａｄｅｎｏｓｉｎｅ－３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：１１３５３０６－２９－４）、ｃＡＭＰＳ－Ｒｐ（（Ｒ）－Ａｄｅｎｏｓｉｎｅ，ｃｙｃｌｉｃ ３’，５’－（ｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）ｔｒｉｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：１５１８３７－０９－１）、ｃＡＭＰＳ－Ｓｐ（（Ｓ）－Ａｄｅｎｏｓｉｎｅ，ｃｙｃｌｉｃ ３’，５’－（ｈｙｄｒｏｇｅｎｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）ｔｒｉｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：９３６０２－６６－５）、Ｄｉｂｕｔｙｒｙｌ－ｃＡＭＰ（Ｎ６，Ｏ２’－Ｄｉｂｕｔｙｒｙｌ ａｄｅｎｏｓｉｎｅ ３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：１６９８０－８９－５）、８－Ｃｌ－ｃＡＭＰ（８－Ｃｈｌｏｒｏａｄｅｎｏｓｉｎｅ－ ３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ

ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：１２４７０５－０３－９））、Ｅｐａｃ活性剤（Ｒｐ－８－Ｂｒ－ｃＡＭＰＳ（８－Ｂｒｏｍｏａｄｅｎｏｓｉｎｅ ３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ Ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｔｈｉｏａｔｅ，Ｒｐ－Ｉｓｏｍｅｒ．ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：１２９７３５－００－８）、８－ＣＰＴ－ｃＡＭＰ（８－（４－Ｃｈｌｏｒｏｐｈｅｎｙｌｔｈｉｏ）ａｄｅｎｏｓｉｎｅ ３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：９３８８２－１２－３）、８－ｐＣＰＴ－２’－Ｏ－Ｍｅ－ｃＡＭＰ（８－（４－Ｃｈｌｏｒｏｐｈｅｎｙｌｔｈｉｏ）－２’－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌａｄｅｎｏｓｉｎｅ ３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｍｏｎｏｓｏｄｉｕｍ，ＣＡＳ Ｎｕｍｂｅｒ：６３４２０７－５３－７）等）を採用することができる。ｃＡＭＰ誘導体の添加濃度の例（８－Ｂｒ－ｃＡＭＰの場合）を示すと、０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは０．２ｍｍｏｌ／Ｌ～５ｍｍｏｌ／Ｌ、更に好ましくは０．５ｍｍｏｌ／Ｌ～２ｍｍｏｌ／Ｌである。尚、例示した化合物、即ち、８－Ｂｒ－ｃＡＭＰとは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、例示した化合物（８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ）の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0048] 追加条件２（ｃＡＭＰ分解酵素阻害剤が存在する条件）は、ｃＡＭＰ分解酵素阻害剤が培地中に添加された条件と同義である。追加条件２を採用すると、ｃＡＭＰの分解阻害によって細胞内ｃＡＭＰ濃度の低下が抑えられ、腸管上皮への分化誘導、特に腸管上皮細胞としての機能の獲得が促されることを期待できる。即ち、上記条件は、より機能的な腸管上皮細胞の調製を可能にし得る。尚、追加条件１と追加条件２を併用すれば、ｃＡＭＰを細胞へ供給しつつ、細胞内ｃＡＭＰ濃度の低下を抑えることができる。従って、細胞内ｃＡＭＰを高レベルに維持するために有効な条件となり、腸管上皮細胞への効率的な分化誘導が促されることを期待できる。

[0049] ｃＡＭＰ分解酵素阻害剤として、ＩＢＭＸ（３－ｉｓｏｂｕｔｙｌ－１－ｍｅｔｈｙｌｘａｎｔｈｉｎｅ）（ＭＩＸ）、Ｔｈｅｏｐｈｙｌｌｉｎｅ、Ｐａｐａｖｅｒｉｎｅ、Ｐｅｎｔｏｘｉｆｙｌｌｉｎｅ（Ｔｒｅｎｔａｌ）、ＫＳ－５０５、８－Ｍｅｔｈｏｘｙｍｅｔｈｙｌ－ＩＢＭＸ、Ｖｉｎｐｏｃｅｔｉｎｅ（ＴＣＶ－３Ｂ）、ＥＨＮＡ、Ｔｒｅｑｕｉｎｓｉｎ（ＨＬ－７２５）、Ｌｉｘａｚｉｎｏｎｅ（ＲＳ－８２８５６）、（ＬＹ－１８６１２６）、Ｃｉｌｏｓｔａｍｉｄｅ（ＯＰＣ３６８９）、Ｂｅｍｏｒａｄａｎ（ＲＷＪ－２２８６７）、Ａｎｅｒｇｒｅｌｉｄｅ（ＢＬ４１６２Ａ）、Ｉｎｄｏｌｉｄａｎ（ＬＹ１９５１１５）、Ｃｉｌｏｓｔａｚｏｌ（ＯＰＣ－１３０１３）、Ｍｉｌｒｉｎｏｎｅ（ＷＩＮ４７２０３）、Ｓｉｇｕａｚｏｄａｎ（ＳＫＦ－９４８３６）、５－Ｍｅｔｈｙｌ－ｉｍａｚｏｄａｎ（ＣＩ ９３０）、ＳＫＦ－９５６５４、Ｐｉｒｉｌｏｂｅｎｄａｎ（ＵＤ－ＣＧ １１５ ＢＳ）、Ｅｎｏｘｉｍｏｎｅ（ＭＤＬ １７０４３）、Ｉｍａｚｏｄａｎ（ＣＬ ９１４）、ＳＫＦ－９４１２０、Ｖｅｓｎａｒｉｎｏｎｅ（ＯＰＣ ８２１２）、Ｒｏｌｉｐｒａｍ（Ｒｏ－２０－１７２４）、（ＺＫ－６２７１１）、Ｄｅｎｂｕｆｙｌｌ’ｉｎｅ、Ｚａｐｒｉｎａｓｔ（Ｍ＆Ｂ－２２，９４８）、Ｄｉｐｙｒｉｄａｍｏｌｅ、Ｚａｐｒｉｎａｓｔ（Ｍ＆Ｂ－２２，９４８）、Ｄｉｐｙｒｉｄａｍｏｌｅ、Ｚａｒｄａｖｅｒｉｎｅ、ＡＨ－２１－１３２、Ｓｕｌｍａｚｏｌ（ＡＲ－Ｌ １１５ ＢＳ）を例示することができる。ｃＡＭＰ分解酵素阻害剤の添加濃度の例（ＩＢＭＸの場合）を示すと、０．０５ｍｍｏｌ／Ｌ～５ｍｍｏｌ／Ｌ、好ましくは０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～３ｍｍｏｌ／Ｌ、更に好ましくは０．２ｍｍｏｌ／Ｌ～１ｍｍｏｌ／Ｌである。

[0050] 腸管上皮細胞への分化の工程の期間（培養期間）は例えば７日間～４０日間、好ましくは７日間～３０日間である。培養期間が短すぎると、期待される効果（分化効率の上昇、腸管上皮細胞としての機能の獲得の促進）が十分に得られない。他方、培養期間が長すぎると、分化効率の低下を引き起こす。

[0051] 腸管上皮細胞へ分化したことは、例えば、腸管上皮細胞マーカーの発現やペプチドの取り込み、或いはビタミンD受容体を介した薬物代謝酵素の発現誘導を指標にして判定ないし評価することができる。腸管上皮細胞マーカーの例を挙げると、ATP結合カセットトランスポーターB1/多剤耐性タンパク１（ＡＢＣＢ１／ＭＤＲ１）、ＡＴＰ結合カセットトランスポーターＧ２／乳ガン耐性タンパク（ＡＢＣＧ２／ＢＣＲＰ）、シトクロムＰ４５０ ３Ａ４（ＣＹＰ３Ａ４）、脂肪酸結合タンパク２（ＦＡＢＰ）、プレグナンＸ受容体（ＰＸＲ）、ＳＬＣ（ｓｏｌｕｔｅ ｃａｒｒｉｅｒ）ファミリーメンバー５Ａ１／ナトリウム共役型グルコーストランスポーター１（ＳＬＣ５Ａ１／ＳＧＬＴ１）、ＳＬＣ（ｓｏｌｕｔｅ ｃａｒｒｉｅｒ）ファミリーメンバー１５Ａ１／ペプチドトランスポーター１（ＳＬＣ１５Ａ１／ＰＥＰＴ１）、ＳＬＣ（ｓｏｌｕｔｅ ｃａｒｒｉｅｒ）有機アニオントランスポーター２Ｂ１（ＳＬＣＯ２Ｂ１／ＯＡＴＰ２Ｂ１）、スクラーゼ－イソマルターゼ、ウリジン２リン酸－グルクロン酸転移酵素１Ａ１（ＵＧＴ１Ａ１）、ウリジン２リン酸－グルクロン酸転移酵素１Ａ４（ＵＧＴ１Ａ４）、ビリン １（Ｖｉｌｌｉｎ １）、カルボキシルエステラーゼ２Ａ１（ＣＥＳ２Ａ１）である。この中でも、腸管上皮に特異性の高いスクラーゼ－イソマルターゼ、及びビリン１、小腸での主要な薬物代謝酵素であるＣＹＰ３Ａ４、小腸でのペプチドの吸収に関与するＳＬＣ１５Ａ１／ＰＥＰＴ１、小腸の頂側膜側に発現しているグルコーストランスポーターであるＳＬＣ５Ａ１／ＳＧＬＴ１、小腸での有機アニオンの吸収に関与するＳＬＣＯ２Ｂ１／ＯＡＴＰ２Ｂ１、小腸での発現が高い加水分解酵素であるＣＥＳ２Ａ１は特に有効なマーカーである。

[0052] 目的の細胞（腸管上皮細胞）のみからなる細胞集団又は目的の細胞が高比率（高純度）で含まれた細胞集団を得ようと思えば、目的の細胞に特徴的な細胞表面マーカーを指標にして培養後の細胞集団を選別・分取すればよい。

[0053] 本発明においては、上記のようにして多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む

培養培地を用いて培養する。

[0054] 上皮成長因子レセプター（ＥＧＦＲ）のリガンドとしては、ＥＧＦ、Ｂｅｔａｃｅｌｌｕｉｎ、アンフィレギュリン、ＴＮＦ－α、ＨＢ－ＥＧＦなどが挙げられる。

[0055] ｃＡＭＰ活性化剤としては、フォルスコリン（Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ）、インドメタシン、ＮＫＨ４７７（コルホルシンダロパート）、細胞由来毒素タンパク質（百日咳毒素、コレラ毒素）、ＰＡＣＡＰ－２７、ＰＡＣＡＰ－３８、ＳＫＦ８３８２２等を用いることができる。フォルスコリン、ＮＫＨ４７７（コルホルシンダロパート）、コレラ毒素、ＰＡＣＡＰ－２７、ＰＡＣＡＰ－３８、ＳＫＦ８３８２２はアデニル酸シクラーゼ活性化作用を示し、細胞内ｃＡＭＰの合成を促進する。

[0056] ｃＡＭＰ活性化剤の添加濃度の例（フォルスコリンの場合）を示すと、１μｍｏｌ／Ｌ～２００μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは５μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌである。フォルスコリンとは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、フォルスコリンの特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0057] ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤としては、５－アザ－２’－デオキシシチジン（５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅ）、５－アザシチジン、ＲＧ１０８、ゼブラリン等を用いることができる。

[0058] ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤の添加濃度の例（５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅの場合）を示すと、０．１μｍｏｌ／Ｌ～５０μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは０．５μｍｏｌ／Ｌ～２０μｍｏｌ／Ｌである。５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅとは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅの特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0059] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤

およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地は、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤のいずれか一以上を含んでいてもよい。

[0060] トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤としては、例えば、Ａ８３－０１、ＳＢ４３１５４２、ＳＢ－５０５１２４、ＳＢ５２５３３４、Ｄ４４７６、ＡＬＫ５ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ、ＬＹ２１５７２９９、ＬＹ３６４９４７、ＧＷ７８８３８８、ＲｅｐＳｏｘ等を用いることができる。

[0061] トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤（Ａ８３－０１の場合）の添加濃度は０．１ｎｍｏｌ／Ｌ～３０μｍｏｌ／Ｌであってもよく、好ましくは１ｎｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌであり、より好ましくは、１０ｎｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌであり、さらに好ましくは、５０ｎｍｏｌ／Ｌ～５μｍｏｌ／Ｌである。Ａ８３－０１とは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、Ａ８３－０１の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0062] ＭＥＫ阻害剤としては、ＰＤ９８０５９、ＰＤ１８４３５２、ＰＤ１８４１６１、ＰＤ０３２５９０１、Ｕ０１２６、ＭＥＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｉ、ＭＥＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＩＩ、ＭＥＫ１／２ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＩＩ、ＳＬ３２７等を用いることができる。

[0063] ＭＥＫ阻害剤の添加濃度の例（ＰＤ９８０５９の場合）を示すと、１μｍｏｌ／Ｌ～２００μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは５μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌである。ＰＤ９８０５９とは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、ＰＤ９８０５９の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0064] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地は、Ｎｏｔｃｈ阻害剤を含んでいてもよい。

[0065] Ｎｏｔｃｈ阻害剤としては、ＬＹ４１１５７５、ＤＡＰＴ、γ－Ｓｅｃｒｅｔａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＸＸＩ（Ｃｏｍｐｏｕｎｄ Ｅ）（ＣＡＳ番号：２０９９８６－１７－４）、γ－Ｓｅｃｒｅｔａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｉ（ＣＡＳ番号：１３３４０７－８３－７）、Ｄｉｂｅｎｚａｚｅｐｉｎｅ、ＲＯ４９２９０９７等を用いることができる。Ｎｏｔｃｈ阻害剤としては、好ましくはＬＹ４１１５７５である。

[0066] Ｎｏｔｃｈ阻害剤の添加濃度の例（ＬＹ４１１５７５の場合）を示すと、０．１μｍｏｌ／Ｌ～１０μｍｏｌ／Ｌ、好ましくは０．５μｍｏｌ／Ｌ～５μｍｏｌ／Ｌである。ＬＹ４１１５７５とは異なる化合物を使用する場合の添加濃度については、使用する化合物の特性と、ＬＹ４１１５７５の特性の相違（特に活性の相違）を考慮すれば、当業者であれば上記濃度範囲に準じて設定することができる。

[0067] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地は、Ｗｎｔ活性化剤およびＷｎｔ阻害剤の何れか一以上を含まないことが好ましい。

[0068] Ｗｎｔ活性化剤としては、例えばＣＨＩＲ９９０２１、ＬＹ２０９０３１４、ＮＰ０３１１１２（チデグルシブ）、リチウム、Ａ１０７０７２２、ＳＫＬ２００１、Ｒ－Ｓｐｏｎｄｉｎ １、Ｗｎｔ３ａ、Ｇｓｋ阻害剤などが挙げられる。

[0069] Ｗｎｔ阻害剤としては、例えば、Ｗｎｔ－Ｃ５９、Ｄｋｋファミリータンパク質（例えばＤｋｋ－１、Ｄｋｋ２、Ｄｋｋ３およびＤｋｋ４の少なくとも１つ）、ｓＦＲＰ（例えばｓＦＲＰ－１およびｓＦＲＰ－２の少なくとも１つ）、ＯＭＰ－１８Ｒ５などのＷｎｔ受容体に対する抗体、ＬＧＫ９７４、ＣＷＰ２３２２９１、ＰＲＩ－７２４、ＩＱＲ－１、ＩＷＰ２、ＩＷＰ－Ｌ６、ＩＣＧ－００１、ＷＩＫＩ４、Ｋｙ０２１１１、ＦＨ５３５、ＸＡＶ９３９、ＮＳＣ６６８０３６、ＦＪ９、３２８９－８６２５などが挙げられる。

[0070] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤

およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含んでもよいし、含まなくてもよい。

[0071] ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としては、ツバスタチンＡ（Ｔｕｂａｓｔａｔｉｎ Ａ）、ＡＣＹ１２１５、バルプロ酸、ＳＡＨＡ、トリコスタチンＡ、ＳＨＢＡ、ＣＢＨＡ、ＬＡＱ－８２４、ＰＤＸ－１０１、ＬＢＨ－５８９、ＩＴＦ２３５７、ＰＣＩ－２４７８１、コンパウンド７ （ＣｈｅｍｉｅＴｅｋ）、ＪＮＫ－２４６８１５８５（キシノスタット） ＳＢ９３９（プラシノスタット）、４ＳＣ－２０１（レスミノスタット）、テフィノスタット（Ｔｅｆｉｎｏｓｔａｔ）（ＣＨＲ－２８４５）、ＣＨＲ－３９９６、ＣＧ２００７４５、デプシペプチド（ロミデプシン）、酪酸塩、ＭＳ－２７５、ＭＧＣＤ０１０３およびＣＩ９９４などが挙げられる。

[0072] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地は、レチノイン酸シグナル経路活性化剤およびソニック・ヘッジホッグシグナル経路阻害剤の何れか一以上を含まないことが好ましい。

[0073] レチノイン酸シグナル経路活性化剤としては、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、オールトランス型レチノイン酸、合成レチノイドｅｃ２３、Ｃｈ５５、ＴＴＮＰＢ、フェンレチニド、ＡＣ２６１０６６、アダパレン、ＡＣ５５６４９、ＡＭ８０、ＡＭ５８０、ＢＭＳ７５３及びタザロテンなどが挙げられる。

ソニック・ヘッジホッグシグナル経路阻害剤としては、ＳＡＮＴ－１、ＳＡＮＴ－２、ＪＫ１８４、またはジェルビンなどが挙げられる。

[0074] 本発明において、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養する期間は例えば２日間～２０日間、好ましくは４日間～１５日間である。

[0075] 上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いた培養

工程としては、浮遊培養工程を含まないことが好ましい。また、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いた培養工程においては、細胞はスフェロイドを形成しないことが好ましい。

[0076] なお、培地交換や継代培養などに伴う細胞の回収の際には、細胞死を抑制するためにＹ－２７６３２等のＲＯＣＫ阻害剤（Ｒｈｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｃｏｉｌｅｄ－ｃｏｉｌ ｆｏｒｍｉｎｇ ｋｉｎａｓｅ／Ｒｈｏ結合キナーゼ）で予め細胞を処理しておいてもよい。

[0077] 本発明において、その他の培養条件（培養温度など）は、動物細胞の培養において一般に採用されている条件とすればよい。即ち、例えば３７℃、５％CO_2の環境下で培養すればよい。

[0078] また、基礎培地として、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）（ＧＩＢＣＯ社等）、ハムＦ１２培地（ＨａｍＦ１２）（ＳＩＧＭＡ社、Ｇｉｂｃｏ社等）、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）（ナカライテスク株式会社、シグマ社、Ｇｉｂｃｏ社等）、グラスゴー基本培地（Ｇｉｂｃｏ社等）、ＲＰＭＩ１６４０培地等を用いることができる。二種以上の基礎培地を併用することにしてもよい。

[0079] 培地に添加可能な成分の例としては、血清又は血清代替物、抗生物質、２－メルカプトエタノール、ＰＶＡ、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ）、インスリン、トランスフェリン、セレニウムを挙げることができる。血清としては、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）などを挙げることができる。血清代替物としては、Ｇｉｂｃｏ（登録商標）Ｂ－２７（登録商標）Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔなどを挙げることができる。

[0080] 典型的には培養皿などを用いて二次元的に細胞を培養する。本発明の方法によれば、二次元培養（好ましくは、接着培養）によって、腸内分泌細胞を製造することができる。製造される腸内分泌細胞の形態は特に限定されないが、好ましくはシート状である。

[0081] 一例においては、培養は、３％～１００％の細胞外マトリクスでコーティ

ングした培養容器上で行うことができる。細胞外マトリクスの例として、マトリゲル™、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、トロンボスポンチン、エラスチン、ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、メロシン、アンコリン、コンドロネクチン、リンクたんぱく質、骨シアロたんぱく質、オステオカルシン、オステオポンチン、エピネクチン、ヒアルロネクチン、アンジュリン、エピリグリン及びカリニンを用いることができ、マトリゲル™を用いることが好ましい。マトリゲル（登録商標）は、Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓが生産するＥｎｇｅｌｂｒｅｔｈ－Ｈｏｌｍ－Ｓｗａｒｍマウス肉腫細胞が分泌するゼラチン状タンパク質混合物の商品名である。

[0082] 本発明の特に好ましい一例においては、ヒトｉＰＳ細胞由来の腸管上皮細胞（腸管幹細胞ＬＧＲ５＋細胞が含まれている）を、セルカルチャーインサートまたは９６ｗｅｌｌプレートに播種し、翌日から、ＦＢＳ、Ｂ２７、ＨｅｐＥｘｔｅｎｄ™、Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ、Ａ８３－０１、５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅ、ＰＤ９８０５９、及びＬＹ４１１５７を含むＤＭＥＭ／Ｆ１２培地において培養することにより、腸内分泌細胞を製造することができる。

[0083] ＜多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞＞

[0084] 本発明によれば、上記した本発明の方法により製造される多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞が提供される。

腸内分泌細胞へ分化したことは、例えば、腸内分泌細胞マーカーの発現を指標にして判定ないし評価することができる。腸内分泌細胞マーカーの例として重要なものは、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４である。また、腸内分泌細胞の機能であるホルモン分泌に関わる因子である、ＴＰＨ１、ＰＹＹや、腸における内分泌細胞の発生に関わる因子である、ＮＥＵＲＯＧ３の発現を指標にして判定ないし評価することもできる。

本発明の腸内分泌細胞は、ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４及びＮＥＵＲＯＧ３を発現し、ＮＫＸ６．１を発現しないことを特徴とする。

[0085] ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４、ＮＥＵＲＯＧ３及びＮＫＸ６．１の発現の有無は、ｍＲＮＡ又はタンパク質レベルにより測定することができる。

[0086] 「ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４及びＮＥＵＲＯＧ３を発現する」とは、公知の方法にて、ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４及びＮＥＵＲＯＧ３の発現産物であるｍＲＮＡ又はタンパク質を検出できることを意味する。

「ＮＫＸ６．１を発現しない」とは、公知の方法にて、ＮＫＸ６．１の発現産物であるｍＲＮＡ又はタンパク質を検出できないことを意味する。ただし、発現量が０である場合に限定はされず、発現量が微量の場合も包含するものとする。「ＮＫＸ６．１を発現しない」場合としては、ヒト結腸癌由来細胞株ＣａＣｏ－２におけるＮＫＸ６．１の発現量に対する相対発現量が０．１以下である場合、好ましくは０．０５以下である場合、より好ましくは０．０１以下である場合を挙げることができる。

[0087] ＜腸内分泌細胞を用いた、疾患メカニズムの解析方法、被験物質の評価方法、並びに消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法＞

本発明は、本発明の方法で製造した腸内分泌細胞の用途に関する。

第一の態様としては、本発明の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および上記腸内分泌細胞を用いて疾患メカニズムを解析する工程を含む、疾患メカニズムの解析方法が挙げられる。

第二の態様としては、本発明の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および消化器疾患に対する治療薬の存在下において上記腸内分泌細胞を培養する工程を含む、消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法が挙げられる。

第三の態様としては、本発明の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および被験物質の存在下において上記腸内分泌細胞が分泌するホルモンを定量する工程を含む、被験物質の評価方法が挙げられる。

[0088] 内分泌細胞から産生される消化管ホルモンの分泌異常は、全身諸臓器の機

能障害（便秘、下痢、食欲不振等）および種々の疾患（肥満、糖尿病、過敏性腸炎）の要因となる。従って、内分泌細胞マーカーや消化管ホルモンの発現・産生量はバイオマーカーとなり、各種疾患の指標として使用することができる。誘導した腸内分泌細胞に薬剤添加や遺伝子編集によりある病態モデルを作成した際に、形態や細胞数、上記バイオマーカーを測定することにより疾患メカニズムを解析する方法が挙げられる。

[0089] 腸内分泌細胞に治療薬又は被験物質を接触させることによって、治療薬又は被験物質をスクリーニング又は評価することができる。本発明の方法により製造される腸内分泌細胞は、腸管、特に小腸のモデル系に利用可能であり、腸管、特に小腸での薬物動態（吸収、代謝など）の評価や毒性の評価、小腸の応答評価に有用である。即ち、本発明の方法により製造される腸内分泌細胞は、治療薬又は被験物質の体内動態の評価や毒性の評価、被験物質に対する応答評価にその利用が図られる。

[0090] 具体的には、腸内分泌細胞を用いて治療薬又は被験物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性、免疫応答、並びに腸内分泌細胞が分泌するホルモンの産生等を試験することができる。即ち、本発明は、腸内分泌細胞の用途の一つとして、治療薬又は被験物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性、免疫応答、並びに腸内分泌細胞が分泌するホルモンの産生等を評価する方法を提供する。上記方法では、（ｉ）腸内分泌細胞を用意する工程と、（ｉｉ）上記腸内分泌細胞に治療薬又は被験物質を接触させる工程と、（ｉｉｉ）上記腸内分泌細胞を透過した治療薬又は被験物質を定量し、治療薬又は被験物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性、又は免疫応答を評価したり、又は腸内分泌細胞が分泌するホルモンの産生量を定量する工程を行う。腸内分泌細胞が分泌するホルモンの具体例としては、セロトニン、ＧＬＰ－１（Ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－１）、ＧＩＰ（Ｇａｓｔｏｒｉｃ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｐｏｌｙｐｅ

ｐｔｉｄｅ）、ガストリン、ＰＹＹ等が挙げられる。尚、治療薬又は被験物質の吸収性については、後述の方法でも評価することができる。

[0091] 工程（ｉ）では、典型的には、半透過性膜（多孔性膜）の上で腸内分泌細胞を培養し、細胞層を形成させる。具体的には、例えば、セルカルチャーインサートを備えた培養容器（例えば、コーニング社が提供するトランスウェル（登録商標））を使用し、セルカルチャーインサート内に細胞を播種して培養することにより、腸内分泌細胞で構成された細胞層を得る。

[0092] 工程（ｉｉ）での「接触」は、典型的には、培地に治療薬又は被験物質を添加することによって行われる。治療薬又は被験物質の添加のタイミングは特に限定されない。従って、治療薬又は被験物質を含まない培地で培養を開始した後、ある時点で治療薬又は被験物質を添加することにしても、予め治療薬又は被験物質を含む培地で培養を開始することにしてもよい。

[0093] 治療薬又は被験物質には様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を用いることができ、細菌(腸内細菌、乳酸菌等)、ウイルス、細胞(免疫細胞、線維芽細胞)を用いることもできる。有機化合物の例として核酸、ペプチド、タンパク質、脂質（単純脂質、複合脂質、ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セレブロシド等）、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド、ポリフェノール、カテキン、ビタミン（Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ５、Ｂ６、Ｂ７、Ｂ９、Ｂ１２、Ｃ、Ａ、Ｄ、Ｅ等）を例示できる。医薬品、栄養食品、サプリメント、食品添加物、農薬、香粧品（化粧品）等の既存成分或いは候補成分も好ましい被験物質の一つである。植物抽出液、細胞抽出液、培養上清などを被験物質として用いてもよい。２種類以上の治療薬又は被験物質を同時に添加することにより、治療薬又は被験物質間の相互作用、相乗作用などを調べることにしてもよい。治療薬又は被験物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なアッセイ系を構築することができる。

[0094] 治療薬又は被験物質を接触させる期間は任意に設定可能である。接触期間

は例えば１０分間～３日間、好ましくは１時間～１日間である。接触を複数回に分けて行うことにしてもよい。

[0095] 工程（ｉｉｉ）の第一の態様においては、細胞層を透過した治療薬又は被験物質を定量する。例えば、トランスウェル（登録商標）のようなセルカルチャーインサートを備えた培養容器を使用した場合には、セルカルチャーインサートを透過した治療薬又は被験物質、即ち、細胞層を介して上部もしくは下部容器内に移動した治療薬又は被験物質を、治療薬又は被験物質に応じて、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（ＦＩＡ法）、酵素免疫測定法（ＥＩＡ法））等の測定方法で定量する。定量結果（細胞層を透過した被験物質の量）と被験物質の使用量（典型的には培地への添加量）に基づき、治療薬又は被験物質の吸収性ないし膜透過性、薬物相互作用、薬物代謝酵素の誘導、薬物トランスポーターの誘導、毒性、又は免疫応答を判定・評価する。

[0096] あるいは、治療薬又は被験物質の吸収を評価するためには、例えば、培養液中の治療薬又は被験物質の残存量を測定してもよい。測定方法は被験物質に応じて適切なものを選択すればよい。例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（ＦＩＡ法）、酵素免疫測定法（ＥＩＡ法））等を採用可能である。典型的には、培養液中の治療薬又は被験物質の含有量の低下を認めたとき、「治療薬又は被験物質が吸収された」と判定・評価する。また、低下の程度に応じて治療薬又は被験物質の吸収量ないし吸収効率を判定・評価することができる。尚、細胞内に取り込まれた治療薬又は被験物質の量を測定することによっても、吸収の評価は可能である。

[0097] 工程（ｉｉｉ）の第二の態様においては、腸内分泌細胞が分泌するホルモンを定量する。腸内分泌細胞が分泌するホルモンは、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（ＦＩＡ法）、酵素免疫測定法（ＥＩＡ法））等の測定方法で定量することができる。

[0098] 本発明は別の態様においては、治療薬又は被験物質の代謝を評価すること

ができる。上記方法では、（ｉ）腸内分泌細胞に治療薬又は被験物質を接触させる工程と、（ｉｉ）治療薬又は被験物質の代謝を測定・評価する工程を行う。

[0099] 工程（ｉ）、即ち、腸内分泌細胞と治療薬又は被験物質の接触は、上記工程（ｉｉ）と同様に実施することができる。但し、予め細胞層を形成させることは必須ではない。

[0100] 工程（ｉ）の後、治療薬又は被験物質の代謝を測定・評価する（工程（ｉｉ））。工程（ｉ）の直後、即ち、治療薬又は被験物質の接触の後、実質的な時間間隔を置かずに代謝を測定・評価しても、或いは、一定の時間（例えば１０分～５時間）を経過した後に代謝を測定・評価することにしてもよい。代謝の測定は、例えば、代謝産物の検出によって行うことができる。この場合には、通常、工程（ｉ）後の培養液をサンプルとして、予想される代謝産物を定性的又は定量的に測定する。測定方法は代謝産物に応じて適切なものを選択すればよいが、例えば、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（ＦＩＡ法）、酵素免疫測定法（ＥＩＡ法））等を採用可能である。

[0101] 典型的には、治療薬又は被験物質の代謝産物が検出されたとき、「治療薬又は被験物質が代謝された」と判定ないし評価する。また、代謝産物の量に応じて治療薬又は被験物質の代謝量を評価することができる。代謝産物の検出結果と、治療薬又は被験物質の使用量（典型的には培地への添加量）に基づき、治療薬又は被験物質の代謝効率を算出することにしてもよい。

[0102] 腸内分泌細胞における薬物代謝酵素（シトクロムＰ４５０（特にＣＹＰ３Ａ４）、ウリジン２リン酸－グルクロン酸転移酵素（特にＵＧＴ１Ａ８、ＵＧＴ１Ａ１０）、硫酸転移酵素（特にＳＵＬＴ１Ａ３など））の発現を指標として治療薬又は被験物質の代謝を測定することも可能である。薬物代謝酵素の発現はｍＲＮＡレベル又はタンパク質レベルで評価することができる。例えば、薬物代謝酵素のｍＲＮＡレベルに上昇を認めたとき、「治療薬又は被験物質が代謝された」と判定することができる。同様に、薬物代謝酵素の

活性に上昇を認めたとき、「治療薬又は被験物質が代謝された」と判定することができる。代謝産物を指標として判定する場合と同様に、薬物代謝酵素の発現量に基づいて定量的な判定・評価を行うことにしてもよい。

[0103] 尚、代謝の測定・評価と吸収の測定・評価を同時に又は並行して行うことにしてもよい。

[0104] 腸内分泌細胞のさらに別の用途としては、腸内分泌細胞を含有する細胞製剤が提供される。細胞製剤は、各種腸疾患の治療に適用可能である。特に、障害された（機能不全を含む）腸管上皮組織の再生・再建用の材料としての利用が想定される。即ち、再生医療への貢献を期待できる。細胞製剤は、例えば、腸内分泌細胞を生理食塩水や緩衝液（例えばリン酸系緩衝液）等に懸濁すること、或いは上記細胞を用いて三次元組織体（オルガノイドやスフェロイド）を作製することによって調製することができる。治療上有効量の細胞を投与できるように、一回投与分の量として例えば１×１０^{5}個～１×１０^{10}個の細胞を含有させるとよい。細胞の含有量は、使用目的、対象疾患、適用対象（レシピエント）の性別、年齢、体重、患部の状態、細胞の状態などを考慮して適宜調整することができる。

[0105] 細胞の保護を目的としてジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）や血清アルブミン等を、細菌の混入を阻止することを目的として抗生物質等を、細胞の活性化、増殖又は分化誘導などを目的として各種の成分（ビタミン類、サイトカイン、成長因子、ステロイド等）を本発明の細胞製剤に含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を細胞製剤に含有させてもよい。

[0106] 腸内分泌細胞のさらに別の用途としては、腸内分泌細胞を用いて、微生物（細菌、真菌、ウイルス等）又は寄生虫を培養することが挙げられる。腸内分泌細胞を用いて微生物又は寄生虫を培養することにより、腸内分泌細胞への微生物又は寄生虫の感染性を解析することができる。また、感染性がある場合には、微生物又は寄生虫の維持又は増殖能を確認することができる。ま

た、腸内分泌細胞を用いて微生物又は寄生虫を培養することにより、繰り返し増殖する微生物又は寄生虫を得ることができる。さらに、病原性微生物の感染状態を再現し、治療薬のスクリーニングに利用したり、微生物又は寄生虫が産生する物質の腸管細胞へ与える影響を再現し、生体小腸に有用もしくは有害な物質のスクリーニング等を行うことができる。

[0107] 微生物又は寄生虫の具体例としては、大腸菌、乳酸菌、ビフィズス菌、腸炎ビブリオ菌、サルモネラ菌、各種腸内細菌、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、サッポロウイルス、ノロウイルス、ＨＩＶ、コロナウイルス等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0108] 腸内分泌細胞のさらに別の用途としては、腸内分泌細胞を用いた共培養モデルが挙げられる。上記した共培養モデルによれば、生体組織の構造を再現し、他の細胞との相互作用を解析することができる。また、上記した共培養モデルによれば、疾患の病態を再現し、治療薬又は被験物質のスクリーニング又は評価を行うことができる。

[0109] 共培養する細胞としては、霊長類又はげっ歯類の生体内に存在する細胞種で、特に小腸周辺に存在する細胞が好ましい。例えば、肝細胞、すい臓、血管内皮細胞、免疫細胞、神経、線維芽細胞、筋細胞、間質系細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。共培養する細胞は、霊長類又はげっ歯類由来の株化細胞でもよい。例えば、Ｈｅｌａ細胞やＴＨＰ－１細胞などの不死化細胞株、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞及びこれらから分化した細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0110] 共培養モデルにおいて試験することができる治療薬又は被験物質としては、様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を用いることができる。医薬や栄養食品等の既存成分あるいは候補成分も好ましい被験物質である。植物抽出液、細胞抽出液、培養上清などを被験物質として用いてもよい。またこれらの２種類以上を組み合わせて用いてもよい。

[0111] ＜培地又は培地キット、並びに腸内分泌細胞を製造するためのキット＞

本発明によれば、基礎培地、血清又は血清代替物、ｃＡＭＰ活性化剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤を含み、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まない、培地又は培地キットが提供される。本発明の培地又は培地キットは、Ｎｏｔｃｈ阻害剤をさらに含んでいてもよい。本発明の培地又は培地キットは、腸内分泌細胞を製造するために使用することができる。

[0112] 基礎培地、血清又は血清代替物、ｃＡＭＰ活性化剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、上皮成長因子レセプターのリガンド、及びＮｏｔｃｈ阻害剤の詳細は、本明細書中において上記した通りである。

[0113] 本発明によればさらに、上記した本発明の培地又は培地キットと、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞とを含む、腸内分泌細胞を製造するためのキットが提供される。多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞の詳細は、本明細書中において上記した通りである。

[0114] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0115] 実施例１

＜方法＞

ヒトｉＰＳ細胞由来腸管上皮細胞（腸管幹細胞ＬＧＲ５＋細胞が含まれている）Ｆ－ｈｉＳＩＥＣ™（富士フイルム）をｄａｙ０に解凍し、マトリゲル™（ＣＯＲＮＩＮＧ）でコートしたセルカルチャーインサート上にＦ－ｈｉＳＩＥＣ™ Ｓｅｅｄｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（富士フイルム）により１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで播種し、翌日から１日おきに表１の各培地（培地組成１～６）で培地交換した。コーティング、播種、培地交換はＦ－ｈｉＳＩＥＣ取扱説明書の通りに実施し、細胞シートを得た。Ｄａｙ９で細胞からｔｏｔａｌ ＲＮＡを抽出した。ＲＮＡ抽出には、細胞をＱｉａｚｏ

Ｉ（ＱＩＡＧＥＮ）で溶解し２０％のクロロホルムを添加、混和し１２，０００ｇで１０分遠心した溶液の上清を回収した。上清からはＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌＲＮＡを抽出した。Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡ ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。得られたｃＤＮＡは、Ｔａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ＡｓｓａｙシステムとＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によりＶｉｉＡ７リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて遺伝子発現量を測定した。Ｔａｑｍａｎ ＡｓｓａｙＩＤは、１８ｓ：０３００３６３１＿ｇ１、ＣＨＧＡ：Ｈｓ００９００３７０＿ｍ１、ＴＰＨ１：Ｈｓ００１８８２２０＿ｍ１、ＰＹＹ：Ｈｓ００３７３８９０＿ｇ１、ＲＥＧ４：Ｈｓ００２３０７４６＿ｍ１を使用した。

[0116] [表1]

培地組成			1	2	3	4	5	6
培地	DMEM／F12		＋	＋	＋	＋	＋	＋
	B27	2%						
	HepEx	1%						
ウシ胎児血清	FBS	2%						
cAMP活性化剤	Forskolin	30μmol／L						
MEK阻害剤	PD98059	20μmol／L						
TGFβシグナル阻害剤	A83－01	0．5μmol／L						
DNMT阻害剤	5-Aza-2'-deoxycytidine	5μmol／L						
成長因子	EGF	0．02μg／mL	＋	＋	－	－	－	－
Notch阻害剤	LY41157	1μmol／L	－	＋	－	＋	＋	－
	DAPT	10μmol／L	－	－	－	－	－	＋
Wnt 阻害剤	IWP2	5μmol／L	－	－	－	－	＋	－

[0117] 遺伝子発現量の比較には、ΔΔＣＴ法により内部標準遺伝子１８Ｓの発現量で補正しＦ－ｈｉＳＩＥＣ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍで培養したコントロール群での発現を１とした時の相対値で表した。

[0118] ＜結果＞

結果を図１に示す。

通常腸管上皮細胞を培養する培地組成１における遺伝子発現と比較すると、ＥＧＦ存在下でＮｏｔｃｈ阻害剤を添加する培地組成２およびＥＧＦを除去した培地組成３ではＥＥＣマーカーであるＣＨＧＡの発現に大きな変化はなかった。一方、ＥＧＦを除去してＮｏｔｃｈ阻害剤を添加すると顕著にＥＥＣマーカーであるＣＨＧＡおよびＲＥＧ４の発現上昇が認められた。さらに、培地組成４にＷｎｔ阻害剤を添加した培地組成５では、培地組成４以上のＥＥＣマーカー発現は認められなかった。またＮｏｔｃｈ阻害剤の中でもＬＹ４１１５７５（培地組成４）とＤＡＰＴ（培地組成６）を比較すると、ＬＹ４１１５７５を用いた場合に、の組成４の方がＥＥＣマーカーであるＣＨＧＡおよびＲＥＧ４の発現だけでなく、腸内分泌細胞の機能であるホルモン分泌に関わる因子である、ＴＰＨ１、ＰＹＹの発現が顕著に高かった。

[0119] 実施例２

＜方法＞

ヒトｉＰＳ細胞由来腸管上皮細胞（腸管幹細胞ＬＧＲ５＋細胞が含まれている）Ｆ－ｈｉＳＩＥＣ™（富士フイルム）をｄａｙ０に解凍し、マトリゲル™（ＣＯＲＮＩＮＧ）でコートしたセルカルチャーインサート上にＦ－ｈｉＳＩＥＣ™ Ｓｅｅｄｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（富士フイルム）により１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで播種し、翌日から１日おきに表２の各培地（培地組成７～１３）で培地交換した。コーティング、播種、培地交換はＦ－ｈｉＳＩＥＣ取扱説明書の通りに実施し、細胞シートを得た。Ｄａｙ９で細胞からｔｏｔａｌ ＲＮＡを抽出した。ＲＮＡ抽出には、細胞をＱｉａｚｏｌ（ＱＩＡＧＥＮ）で溶解し２０％のクロロホルムを添加、混和し１２，０００ｇで１０分遠心した溶液の上清を回収した。上清からはＲＮｅａｓｙ

ｍｉｎｉ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌＲＮＡを抽出した。Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡ ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。得られたｃＤＮＡは、Ｔａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ＡｓｓａｙシステムとＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によりＶｉｉＡ７リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて遺伝子発現量を測定した。Ｔａｑｍａｎ Ａｓｓａｙは、１８ｓ：０３００３６３１＿ｇ１、ＣＨＧＡ：Ｈｓ００９００３７０＿ｍ１、ＰＹＹ：Ｈｓ００３７３８９０＿ｇ１、ＮＥＵＲＯＧ３：Ｈｓ０１８７５２０４＿ｓ１を使用した。

[0120]

[表2]

培地組成		7	8	9	10	11	12	13
培地	DMEM／F12	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	B27 2%							
	HepEx 1%							
ウシ胎児血清	FBS 2%							
cAMP活性化剤	Forskolin 30μmol／L							
MEK阻害剤	PD98059 20μmol／L							
TGFβシグナル阻害剤	A83－01 0．5μmol／L							
DNMT阻害剤	5-Aza-2'-deoxycytidine 5μmol／L							
成長因子	EGF	－	－	－	－	－	－	－
Notch阻害剤	LY41157（μmol／L）	－	0．5	0．75	1．0	2．0	－	－
	DAPT（μmol／L）	－	－	－	－	－	5．0	10

[0121] 遺伝子発現量の比較には、ΔΔＣＴ法により内部標準遺伝子１８Ｓの発現量で補正しＦ－ｈｉＳＩＥＣ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍで培養したコントロール群での発現を１とした時の相対値で表した。

[0122] ＜結果＞

結果を図２に示す。

ＤＡＰＴ添加群（培地組成８～１１）に比べてＬＹ４１１５７５添加群（培地組成１２、１３）は、ＥＥＣマーカーであるＣＨＧＡの発現が高く、さらに腸内分泌細胞の機能であるホルモン分泌に関わる因子であるＰＹＹの発現が顕著に高かった。またＬＹ４１１５７５ ２μｍｏｌ／Ｌ添加群（培地

組成１１）が、ＣＨＧＡ、ＰＹＹ、およびＮＥＵＲＯＧ３の発現レベルが最も高かった。

[0123] 実施例３

＜方法＞

ヒトｉＰＳ細胞由来腸管上皮細胞（腸管幹細胞ＬＧＲ５＋細胞が含まれている）Ｆ－ｈｉＳＩＥＣ™（富士フイルム）をｄａｙ０に解凍し、マトリゲル™（ＣＯＲＮＩＮＧ）でコートしたセルカルチャーインサート上にＦ－ｈｉＳＩＥＣ™ Ｓｅｅｄｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（富士フイルム）により１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで播種し、翌日から１日おきに表３の培地で培地交換した。得られた細胞をＥＥＣとした。また、同じスケジュールでＦ－ｈｉＳＩＥＣ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍにて培地交換した細胞をコントロールとした。コーティング、播種、培地交換はＦ－ｈｉＳＩＥＣ取扱説明書の通りに実施し、細胞シートを得た。Ｄａｙ９で細胞からｔｏｔａｌＲＮＡを抽出した。また、ヒト結腸腺癌細胞株Ｃａｃｏ－２は株式会社ケー・エー・シーから購入し、培地（ＭＥＭ・Ｅ、１％ＮＥＡＡ、１０％ＦＢＳ）でマニュアルに従って培養した。ＲＮＡ抽出には、細胞をＱｉａｚｏｌ（ＱＩＡＧＥＮ）で溶解し２０％のクロロホルムを添加、混和し１２，０００ｇで１０分遠心した溶液の上清を回収した。上清からはＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌＲＮＡを抽出した。Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡ ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてマニュアルの通りにｔｏｔａｌ ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。得られたｃＤＮＡは、Ｔａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ＡｓｓａｙシステムとＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によりＶｉｉＡ７リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて遺伝子発現量を測定した。Ｔａｑｍａｎ Ａｓｓａｙは、１８ｓ：０３００３６３１＿ｇ１、ＮＫＸ６．１：Ｈｓ００２３２３５５＿ｍ１を使用した。遺伝子発現量の

比較には、ΔΔＣＴ法により内部標準遺伝子１８Ｓの発現量で補正しＣａｃｏ－２での発現を１とした時の相対値で表した。

[0124] [表3]

添加因子		
培地	DMEM／F12	
	B27	2%
	HepEx	1%
ウシ胎児血清	FBS	2%
cAMP活性化剤	Forskolin	30μmol／L
MEK阻害剤	PD98059	20μmol／L
TGFβシグナル阻害剤	A83－01	0．5μmol／L
DNMT阻害剤	5-Aza-2'-deoxycytidine	5μmol／L
成長因子	EGF	—
Notch阻害剤	LY41157	1μmol／L

[0125] ＜結果＞

結果を図３に示す。

Ｃａｃｏ－２でのＮＫＸ６．１の発現を１とした場合、コントロールおよび、表３の培地を用いて培養して得られた細胞では、ＮＫＸ６．１の発現は見られなかった。

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞を、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まず、ｃＡＭＰ活性化剤およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む培養培地を用いて培養することを含む、腸内分泌細胞を製造する方法。

[請求項2] ｃＡＭＰ活性化剤がＦｏｒｓｋｏｌｉｎであり、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤が５－Ａｚａ－２’－ｄｅｏｘｙｃｙｔｉｄｉｎｅである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記培養培地が、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤のいずれか一以上を含む、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤がＡ８３－０１であり、ＭＥＫ阻害剤が、ＰＤ９８０５９および/またはＰＤ０３２５９０１である、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 前記培養培地が、Ｎｏｔｃｈ阻害剤を含む、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項6] Ｎｏｔｃｈ阻害剤がＬＹ４１１５７５である、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記培養培地が、Ｗｎｔ活性化剤およびＷｎｔ阻害剤の何れか一以上を含まない、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項8] 前記培養培地が、レチノイン酸シグナル経路活性化剤およびソニック・ヘッジホッグシグナル経路阻害剤の何れか一以上を含まない、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項9] 前記多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項10] 前記培養培地を用いた培養工程が、浮遊培養工程を含まない、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項11] 前記培養培地を用いた培養工程においてスフェロイドを形成しない、

請求項１又は２に記載の方法。

[請求項12] 製造される腸内分泌細胞がシート状である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項13] 請求項１又は２に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および前記腸内分泌細胞を用いて疾患メカニズムを解析する工程を含む、疾患メカニズムの解析方法。

[請求項14] 請求項１又は２に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および被験物質の存在下において前記腸内分泌細胞が分泌するホルモンを定量する工程を含む、被験物質の評価方法。

[請求項15] 請求項１又は２に記載の方法により腸内分泌細胞を製造する工程、および消化器疾患に対する治療薬の存在下において前記腸内分泌細胞を培養する工程を含む、消化器疾患に対する治療薬のスクリーニング方法。

[請求項16] ＴＰＨ１、ＰＹＹ、ＣＨＧＡ、ＲＥＧ４及びＮＥＵＲＯＧ３を発現し、ＮＫＸ６．１を発現しない、多能性幹細胞由来の腸内分泌細胞。

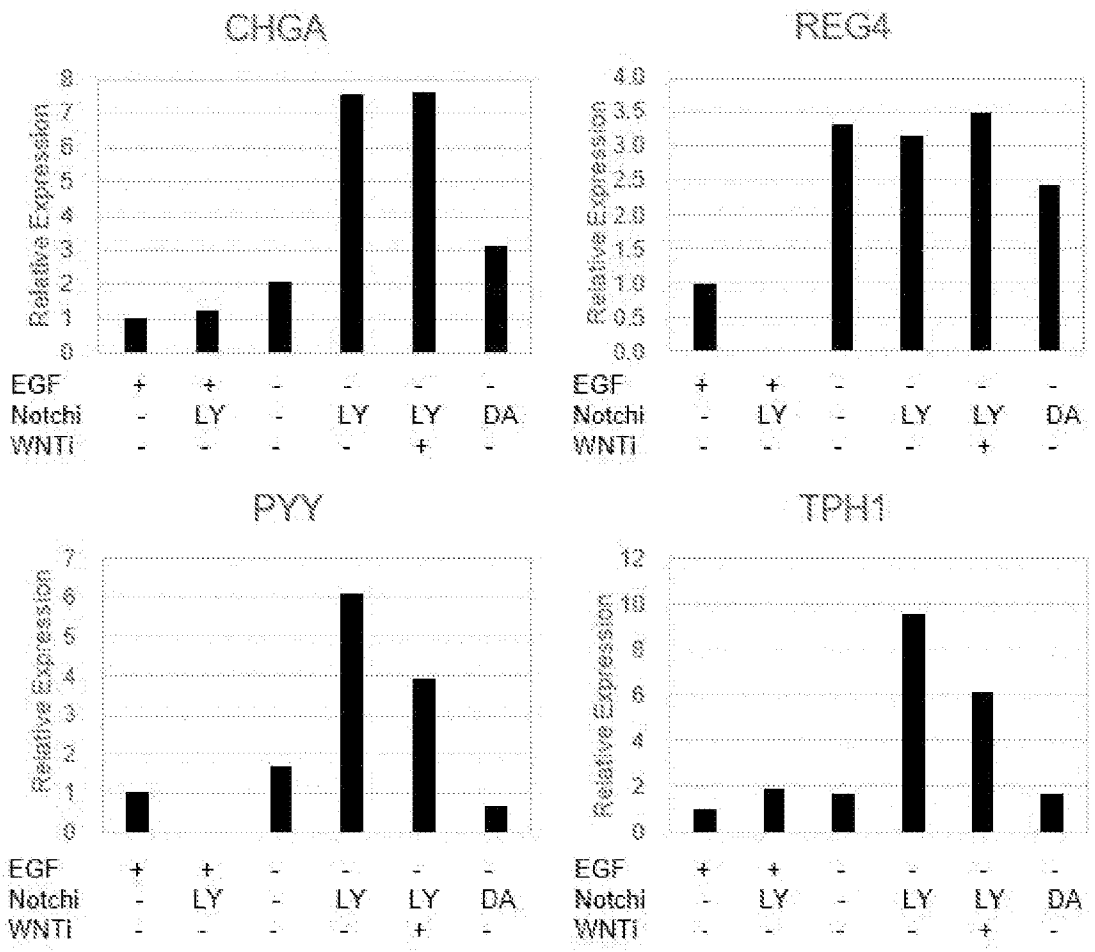
[請求項17] 基礎培地、血清又は血清代替物、ｃＡＭＰ活性化剤、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤、トランスフォーミング増殖因子-βシグナル阻害剤およびＭＥＫ阻害剤を含み、上皮成長因子レセプターのリガンドを実質的に含まない、培地又は培地キット。

[請求項18] Ｎｏｔｃｈ阻害剤をさらに含む、請求項１７に記載の培地又は培地キット。

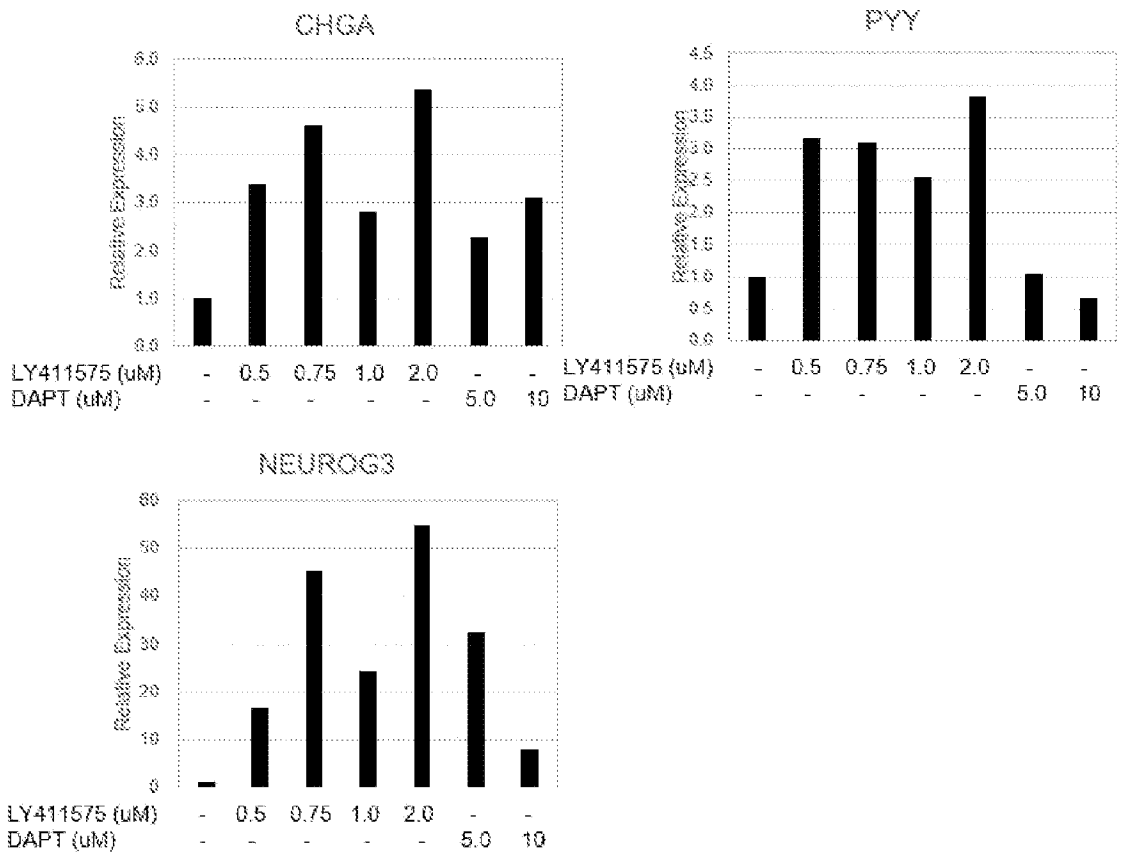
[請求項19] 腸内分泌細胞を製造するための、請求項１７又は１８に記載の培地又は培地キット。

[請求項20] 請求項１７又は１８に記載の培地又は培地キットと、多能性幹細胞から誘導した腸管幹細胞又は腸管上皮細胞とを含む、腸内分泌細胞を製造するためのキット。

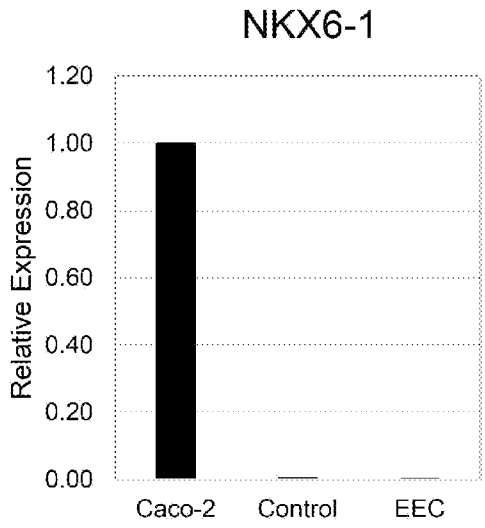
[図1]


CHGA
REG4
PYY
TPH1
Relative Expression
EGF
Notchi
WNTi
+
-
LY
DA

[図2]


CHGA
Relative Expression
LY411575 (uM) - 0.5 0.75 1.0 2.0 - -
DAPT (uM) - - - - - 5.0 10
PYY
Relative Expression
LY411575 (uM) - 0.5 0.75 1.0 2.0 - -
DAPT (uM) - - - - - 5.0 10
NEUROG3
Relative Expression
LY411575 (uM) - 0.5 0.75 1.0 2.0 - -
DAPT (uM) - - - - - 5.0 10

[図3]


NKX6-1
Relative Expression
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Caco-2
Control
EEC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/039602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12Q 1/02***(2006.01)i; ***G01N 33/15***(2006.01)i; ***G01N 33/50***(2006.01)i
FI: C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-206510 A (RIKAGAKU KENKYUSHO) 11 September 2008 (2008-09-11) claims, example 7	16
A		1-15, 17-20
X	WO 2020/091020 A1 (PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA CITY UNIVERSITY) 07 May 2020 (2020-05-07) claims, paragraphs [0151]-[0153], [0161]	16
A		1-15, 17-20
X	JP 2019-527068 A (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN) 26 September 2019 (2019-09-26) example 2	16
A		1-15, 17-20
A	WO 2019/156200 A1 (NAGOYA CITY UNIVERSITY) 15 August 2019 (2019-08-15) claims	1-20
A	JP 2011-517560 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 16 June 2011 (2011-06-16) claims	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 January 2023	**17 January 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/039602

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2008-206510 A	11 September 2008	EP 1961810 A1 claims, example 7	
WO 2020/091020 A1	07 May 2020	US 2022/0033780 A1 claims, paragraphs [0207]-[0209], [0240] EP 3901250 A1	
JP 2019-527068 A	26 September 2019	US 2021/0047618 A1 example 2 EP 3472302 A1 WO 2017/220586 A1	
WO 2019/156200 A1	15 August 2019	US 2020/0370020 A1 claims EP 3750985 A1	
JP 2011-517560 A	16 June 2011	US 2010/0233804 A1 claims EP 2279243 A4 WO 2009/117439 A2	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/039602

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i
FI: C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2008-206510 A (独立行政法人理化学研究所) 11.09.2008 (2008-09-11) 特許請求の範囲、実施例７	16
A		1-15,17-20
X	WO 2020/091020 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 07.05.2020 (2020-05-07) 請求の範囲、［０１５１］－［０１５３］、［０１６１］	16
A		1-15,17-20
X	JP 2019-527068 A (コーニンクレッカ ネザーランド アカデミー ヴァン ウェテンシャッペン) 26.09.2019 (2019-09-26) 実施例２	16
A		1-15,17-20
A	WO 2019/156200 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 15.08.2019 (2019-08-15) 請求の範囲	1-20
A	JP 2011-517560 A (ザ スクリプス リサーチ インスティチュート) 16.06.2011 (2011-06-16) 特許請求の範囲	1-20

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.01.2023	17.01.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
藤澤　雅樹 4B 5802

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/039602

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-206510 A	11.09.2008	EP 1961810 A1 請求の範囲、実施例７	
WO 2020/091020 A1	07.05.2020	US 2022/0033780 A1 請求の範囲、［０２０７］－［０２０９］、［０２４０］ EP 3901250 A1	
JP 2019-527068 A	26.09.2019	US 2021/0047618 A1 実施例２ EP 3472302 A1 WO 2017/220586 A1	
WO 2019/156200 A1	15.08.2019	US 2020/0370020 A1 請求の範囲 EP 3750985 A1	
JP 2011-517560 A	16.06.2011	US 2010/0233804 A1 請求の範囲 EP 2279243 A4 WO 2009/117439 A2	