(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7295576号
(P7295576)

(45)発行日　令和5年6月21日(2023.6.21)

(24)登録日　令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類		FI	
Ｃ１２Ｎ	*5/071(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10
Ａ６１Ｐ	*5/50 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/50

請求項の数　19　（全51頁）

(21)出願番号　特願2020-549318(P2020-549318)
(86)(22)出願日　令和1年9月18日(2019.9.18)
(86)国際出願番号　PCT/JP2019/037725
(87)国際公開番号　WO2020/059892
(87)国際公開日　令和2年3月26日(2020.3.26)
審査請求日　令和4年9月5日(2022.9.5)
(31)優先権主張番号　特願2018-175465(P2018-175465)
(32)優先日　平成30年9月19日(2018.9.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
早期審査対象出願
前置審査

(73)特許権者　521442589
オリヅルセラピューティクス株式会社
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１
(74)代理人　100149076
弁理士　梅田 慎介
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷 優子
(74)代理人　100162503
弁理士　今野 智介
(74)代理人　100144794
弁理士　大木 信人
(72)発明者　伊藤 亮
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　インスリン産生細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含み、ならびに、

Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で、かつクロモグラニンＡ陽性細胞を８５％以上の割合で含む、多能性幹細胞をインスリン産生細胞へと分化誘導して得られた、インスリン産生細胞を含む細胞集団。

【請求項２】

ＭａｆＡ遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が、膵島におけるＭａｆＡ遺伝子又はその遺伝子産物の発現量よりも低い、請求項１に記載のインスリン産生細胞を含む細胞集団。

【請求項３】

グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を３％未満の割合で含む、請求項１又は２に記載のインスリン産生細胞を含む細胞集団。

【請求項４】

グルコース刺激性インスリン分泌（ＧＳＩＳ）応答を示す、請求項１～３のいずれか１項に記載のインスリン産生細胞を含む細胞集団。

【請求項５】

アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を０．０１％未満の割合で含む、請求項１～４のいずれか１項に記載のインスリン産生細胞を含む細胞集団。

【請求項６】

請求項１～５のいずれか１項に記載のインスリン産生細胞を含む細胞集団を含む医薬。
【請求項７】
前記インスリン産生細胞を含む細胞集団がデバイス中に収容されている、請求項６に記載の医薬。
【請求項８】
前記インスリン産生細胞を含む細胞集団がハイドロゲル中に分散されている、請求項６又は７に記載の医薬。
【請求項９】
生体内に移植して用いられる、請求項６～８のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１０】
皮下移植して用いられる、請求項６～９のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１１】
糖尿病の治療において使用するための請求項６～１０のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１２】
患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持に使用するための請求項６～１０のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１３】
糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減するために用いられる、請求項６～１０のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１４】
生体内において膵島様細胞を分化誘導する方法において使用するための請求項６～１０のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１５】
生体内において分化誘導された膵島様細胞が、クロモグラニンＡ陽性細胞を５０％以上の割合で含む、請求項１４に記載の医薬。
【請求項１６】
生体内において分化誘導された膵島様細胞が、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、請求項１４又は１５に記載の医薬。
【請求項１７】
生体内において分化誘導された膵島様細胞が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を１０％以上の割合で含む、請求項１４～１６のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１８】
生体内において分化誘導された膵島様細胞が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、請求項１４～１７のいずれか１項に記載の医薬。
【請求項１９】
インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含み、ならびに、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で、かつクロモグラニンＡ陽性細胞を８５％以上の割合で含む、インスリン産生細胞集団の製造方法であって、
多能性幹細胞を、５～１００ｎｇ／ｍＬの量のアクチビンＡの存在下にて培養を行い胚体内胚葉細胞を製造する工程、ならびに
内分泌前駆細胞を、１０μＭ以下の量にてＦＧＦＲ１阻害剤を含む培地中で培養し前記インスリン産生細胞を製造する工程
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、膵β細胞や膵α細胞といったホルモン分泌を行う内分泌細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする、インスリン産生細胞、その製造法及び用途に関する。
【背景技術】

【０００２】
人工多能性細胞や胚性幹細胞（ＥＳ細胞）等の多能性幹細胞から、膵β細胞や膵α細胞といったホルモン分泌を行う内分泌細胞を分化誘導し、糖尿病の治療に応用する研究が進められている。多能性幹細胞を分化誘導すると、分化段階に応じて異なる特徴を有する細胞が出現することが知られている（ＷＯ２００９／０１２４２８、ＷＯ２０１６／０２１７３４）。例えば、この分化段階は比較的未分化な順に、多能性幹細胞、胚体内胚葉細胞、原腸管細胞、後方前腸細胞、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、インスリン産生細胞、膵β細胞に大きく分類することができる。
【０００３】
これまでに、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞を含む内分泌細胞へと分化誘導する手法が開発、報告されている。例えば、非特許文献１－２には、多能性幹細胞から分化誘導された、インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％以下の割合で含むインスリン産生細胞を製造する方法が記載されている。
【０００４】
また、これまでに、多能性幹細胞から膵前駆細胞へと分化誘導し、それを生体内に移植し、成熟化させることで内分泌細胞を製造する手法が報告されている。例えば、非特許文献３には、多能性幹細胞から分化誘導された、膵前駆細胞をマウスに移植し、成熟化させることでインスリン陽性細胞及びグルカゴン陽性細胞を含む内分泌細胞を製造する方法が記載されている。
【０００５】
しかしながら、上記の方法で製造された内分泌細胞の割合は、充分に高いものであるとはいえず、当該分野においては依然として、多能性幹細胞から内分泌細胞を効率的に誘導・製造する方法が切望されていた。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【文献】ＷＯ２００９／０１２４２８
ＷＯ２０１６／０２１７３４
【非特許文献】
【０００７】
【文献】Ｒｅｚａｎｉａ Ａ．ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１４；３２：１１２１－３３．
Ｆｅｌｉｃｉａ Ｗ．Ｐａｇｌｉｕｃａ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．２０１４ Ｏｃｔｏｂｅｒ ９；１５９（２）：４２８－４３９．
Ｒｏｂｅｒｔ Ｔ ｅｔ ａｌ，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ．２０１８ Ｍａｒ １３；１０（３）：７３９－７５０．
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
本発明は、多能性幹細胞からインスリン陽性細胞及びグルカゴン陽性細胞を一定の割合で含む膵島様細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする新たな手法を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
従来、インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性細胞の割合をいかに増やし、成熟化させるかという点に主眼が置かれてきたが、本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、上記以外の細胞を所定の割合とすることで、生体内で純度の高い膵島様細胞を効率的に誘導・製造できることを見出した。従来の手法で生成されていたインスリン産生細胞よりも成熟していないインスリン産生細胞、具体的には、ＭａｆＡなどの成熟化指標を発

現しておらず、グルカゴン産生細胞の元となる細胞を多く含むインスリン産生細胞を分化誘導する。成熟度の低い細胞は、移植後に純度の低い細胞が得られることが懸念されるが、増殖能を有するＫｉ６７陽性細胞を極限まで減らす手法を組み合わせることで、高い純度を保ったまま生体内で膵島様細胞に成熟化させることに成功した。

本発明は、最小限の製造期間で、純度の高い膵島様細胞を効率的に誘導することができるため、膵島の細胞治療を実現する上で最も適した手法を提供する。

【００１０】

本発明は、これらの新規知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

［１］　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）。

［２］　ＭａｆＡ遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が、膵島におけるＭａｆＡ遺伝子又はその遺伝子産物の発現量よりも低い、［１］のインスリン産生細胞（集団）。

［３］　Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、［１］又は［２］のインスリン産生細胞（集団）。

［３－１］　Ｋｉ６７陽性細胞を１％未満の割合で含む、［１］又は［２］のインスリン産生細胞（集団）。

［４］　グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を３％未満の割合で含む、［１］～［３－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［５］　グルコース刺激性インスリン分泌（ＧＳＩＳ）応答を示す、［１］～［４］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［６］　クロモグラニンＡ陽性細胞を４５％超の割合で含む、［１］～［５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［６－１］　クロモグラニンＡ陽性細胞を８０％超の割合で含む、［１］～［５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［６－２］　クロモグラニンＡ陽性細胞を８５％超の割合で含む、［１］～［５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［６－３］　クロモグラニンＡ陽性細胞を９０％超の割合で含む、［１］～［５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［６－４］　クロモグラニンＡ陽性細胞を９３％超の割合で含む、［１］～［５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７］　アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を０．０１％未満の割合で含む、［１］～［６－４］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７－１］　生体内において膵島様細胞へと分化する［１］～［７］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７－２］　膵島様細胞が、クロモグラニンＡ陽性細胞を５０％以上の割合で含む、［７－１］のインスリン産生細胞（集団）。

［７－２－１］　膵島様細胞が、クロモグラニンＡ陽性細胞を９５％以上の割合で含む、［７－１］のインスリン産生細胞（集団）。

［７－３］　膵島様細胞が、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、［７－１］～［７－２－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７－３－１］　膵島様細胞が、Ｋｉ６７陽性細胞を１％未満の割合で含む、［７－１］～［７－２－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７－４］　膵島様細胞が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を１０％以上の割合で含む、［７－１］～［７－３－１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［７－５］　膵島様細胞が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、［７－１］～［７－４］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。

［８］　［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞を含む医薬。

［９］　前記インスリン産生細胞（集団）がデバイス中に収容されている、［８］の医薬。

［１０］　前記インスリン産生細胞（集団）がハイドロゲル中に分散されている、［８］

又は［９］の医薬。
［１１］　生体内に移植して用いられる、［８］～［１０］のいずれかの医薬。
［１２］　皮下移植して用いられる、［８］～［１１］のいずれかの医薬。
［１３］　糖尿病の治療において使用するための［８］～［１２］のいずれかの医薬。
［１４］　患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持に使用するための［８］～［１２］のいずれかの医薬。
［１５］　糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減するために用いられる、［８］～［１２］のいずれかの医薬。
［１６］　生体内において膵島様細胞（集団）を分化誘導する方法において使用するための［８］～［１２］のいずれかの医薬。
［１７］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ陽性細胞を５０％以上の割合で含む、［１６］の医薬。
［１７－１］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ陽性細胞を９５％以上の割合で含む、［１６］の医薬。
［１８］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、［１６］～［１７－１］のいずれかの医薬。
［１８］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ｋｉ６７陽性細胞を１％未満の割合で含む、［１６］～［１７－１］のいずれかの医薬。
［１９］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を１０％以上の割合で含む、［１６］～［１８］のいずれかの医薬。
［２０］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、［１６］～［１９］のいずれかの医薬。
［２１］　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）の製造方法であって、
　多能性幹細胞を、低用量のアクチビンＡの存在下にて培養を行い胚体内胚葉細胞（集団）を製造する工程、ならびに
　内分泌前駆細胞を、ＦＧＦＲ１阻害剤を含む培地中で培養し前記インスリン産生細胞（集団）を製造する工程
を含む、方法。
［２２］　膵島様細胞（集団）の生成方法であって、
　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。
［２３］　糖尿病を治療する方法であって、
　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。
［２４］　患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールを改善及び／又は維持する方法であって、
　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。
［２５］　糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する方法であって、
　インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞を３０％以上の割合で、かつインスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞を１５％超の割合で含む、インスリン産生細胞（集団）を生体内に移植して、膵島様細胞（集団）へと分化誘導することを含む、方法。
［２６］　糖尿病の治療方法において使用するための［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［２７］　患者の空腹時及び食後グルコースレベルのコントロールの改善及び／又は維持

方法において使用するための［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［２８］　糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する方法において使用するための［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［２９］　生体内において膵島様細胞（集団）を分化誘導する方法において使用するための［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［３０］　デバイス中に収容されている、［２６］～［２９］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［３１］　ハイドロゲル中に分散されている、［２６］～［３０］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［３２］　生体内に移植して用いられる、［２６］～［３１］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［３３］　皮下移植して用いられる、［２６］～［３２］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）。
［３４］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ陽性細胞を５０％以上の割合で含む、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３４－１］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、クロモグラニンＡ陽性細胞を９５％以上の割合で含む、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３５］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含む、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３５－１］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、Ｋｉ６７陽性細胞を１％未満の割合で含む、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３５－２］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、グルカゴン陽性かつインスリン陰性の細胞を１０％以上の割合で含む、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３６］　生体内において分化誘導された膵島様細胞（集団）が、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有する、［２９］のインスリン産生細胞（集団）。
［３７］糖尿病を治療するための医薬の製造における［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）の使用。
［３８］患者の空腹時および食後グルコースレベルのコントロールを改善及び又は維持するための医薬の製造における［１］～［７－５］のいずれかのインスリン産生細胞（集団）の使用。
［３９］糖尿病患者における低血糖症の危険性を低減する医薬の製造における［１］～［７－５］のいずれかのインスリン細胞（集団）の使用。
　本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願２０１８－１７５４６５号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。
　本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。
【発明の効果】
【００１１】
　本発明によれば、多能性幹細胞から内分泌細胞を効率的に誘導・製造することを可能とする新たな手法を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】図１は、インスリン産生細胞のプロトタイプ（プロトタイプ）、インスリン産生細胞及びヒト膵島（ｉｓｌｅｔ）におけるインスリン（ＩＮＳ）、ＮＫＸ６．１、グルカゴン（ＧＣＧ）、及びＫｉ６７の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。
【図２】図２は、インスリン産生細胞のプロトタイプ、インスリン産生細胞及びヒト膵島（ｉｓｌｅｔ）におけるインスリン（ＩＮＳ）、グルカゴン（ＧＣＧ）、ＭａｆＡ及びＵＣＮ３の各遺伝子発現量を定量ＰＣＲ法により測定した結果を示す。

【図３】図３は、３０（０．００５％）細胞、６（０．００１％）細胞、０細胞の未分化状態を維持したｉＰＳ細胞をスパイクして調製されたインスリン産生細胞における未分化状態を維持したｉＰＳ細胞のコロニー数を示すグラフ図である。
【図４】図４は、凍結保存されたインスリン産生細胞を解凍後、３次元培養により４日培養して得られた細胞凝集体の位相差顕微鏡像を示す。
【図５】図５は、凍結保存前のインスリン産生細胞、ならびに凍結保存・解凍後のインスリン産生細胞におけるＩＮＳ、ＮＫＸ６．１及びＫｉ６７の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。
【図６】図６は、インスリン産生細胞が移植された糖尿病マウス及びインスリン産生細胞が移植されていない非糖尿病マウスにおける、グルコース負荷後の血中ヒトＣ－ペプチド濃度の測定結果を示す。
【図７】図７は、インスリン産生細胞が移植された糖尿病マウス及びインスリン産生細胞が移植されていない非糖尿病マウスにおける、グラルギン投与後の血中ヒトＣ－ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度の測定結果を示す。
【図８】図８は、皮下移植されたインスリン産生細胞におけるインスリン、ＮＫＸ６．１、グルカゴン、及びクロモグラニンＡの発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を示す。
【図９】図９は、皮下移植されたインスリン産生細胞におけるインスリン及びグルカゴンについての免疫組織染色の結果を示す。緑：インスリン陽性細胞。赤：グルカゴン陽性細胞。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
１．用語
以下、本明細書において記載される用語について説明する。
【００１４】
本明細書において、「約」とは、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ２５％、２０％、１０％、８％、６％、５％、４％、３％、２％又は１％まで変動する値を示す。好ましくは、「約」又は「およそ」という用語は、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ１５％、１０％、５％、又は１％の範囲を示す。
本明細書において、本発明を規定する数値範囲は、「約」との記載がなくとも、その下限値及び上限値と実質的に同一視される数値を含む。
【００１５】
本明細書において、「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ（ｓ）又はｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。
【００１６】
本明細書において、「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔ（ｓ） ｏｆ又はｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。
【００１７】
本明細書において、「フィーダー細胞を使用」しないとは、基本的にフィーダー細胞を含まないこと、フィーダー細胞を培養することによってプレコンディショニングした培地などを使用しないことを意味する。したがって、培地中にはフィーダー細胞から分泌される成長因子及びサイトカインなどの物質は含まれない。
【００１８】
なお、「フィーダー細胞」又は「フィーダー」とは、別な種類の細胞と共培養され、その細胞を支持し、成長することができる環境をもたらす細胞を意味する。フィーダー細胞は、それらが支持する細胞とは同じ種由来であっても、異なる種由来であってもよい。例えば、ヒト細胞のフィーダーとして、ヒト皮膚線維芽細胞又はヒト胚性幹細胞を使用して

もよいし、マウス胚線維芽細胞の初代培養物、及び不死化マウス胚線維芽細胞を使用してもよい。フィーダー細胞は、放射線照射又はマイトマイシンＣ処理などによって不活性化することができる。

【００１９】

本明細書において、「接着」とは、細胞が容器に付着していること、例えば、細胞が適切な培地の存在下で滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）の細胞培養ディッシュ又はフラスコに付着していることを指す。細胞のなかには、細胞培養容器に接着させなければ培養物中で維持できない、あるいは成長しないものもある。これに対し、非接着性細胞は、容器に接着させることなく培養物中で維持され、増殖できる。

【００２０】

本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、成長させ、かつ／又は分化させることを指す。「培養する」とは、組織又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を持続させ、増殖させ（成長させ）、かつ／又は分化させることを意味する。培養には２次元培養（平面培養）や、３次元培養（浮遊培養）が含まれる。

【００２１】

本明細書において、「富化する（ｅｎｒｉｃｈ）」及び「富化すること（ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）」とは、細胞の組成物などの組成物中の特定の構成成分の量を増加させることを指し、「富化された（ｅｎｒｉｃｈｅｄ）」とは、細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、特定の構成成分の量が、富化される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して増加している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して富化することができ、したがって、標的細胞型の割合は、富化される前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について富化することもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって富化することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を富化する方法により、細胞集団が標的細胞集団に関して少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％又は９９％富化される。

【００２２】

本明細書において、「枯渇する（ｄｅｐｌｅｔｅ）」及び「枯渇すること（ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）」とは、細胞もしくは細胞の組成物などの組成物中の特定の構成成分の量を減少させることを指し、「枯渇された（ｄｅｐｌｅｔｅｄ）」とは、細胞もしくは細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、特定の構成成分の量が、枯渇される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して減少している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して枯渇させることができ、したがって、標的細胞型の割合は、枯渇される前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して減少する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択及び選別方法によって、標的細胞型について枯渇させることもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって枯渇させることもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を枯渇させる方法により、細胞集団は標的細胞集団に関して少なくとも５０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％又は９９％減少（枯渇）している。

【００２３】

本明細書において、「純化する（ｐｕｒｉｆｙ）」及び「純化すること（ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」とは、細胞の組成物などの組成物中の不純物を取り除き、特定の構成成分について純粋なものにすることを指し、「純化された（ｐｕｒｉｆｉｅｄ）」とは、細胞の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、不純物の量が、純化される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して減少し、特定の構成成分の純度が向上している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して純化することができ、したがって、標的細胞型の割合は、純化する前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選

択及び選別方法によって、標的細胞型について純化させることもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の選別又は選択プロセスによって純化することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を純化する方法により、標的細胞集団の純度は、少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％又は９９％になるか、不純物（夾雑細胞を含む）は検出できない程度になりうる。

【００２４】

本明細書において、「ＣＤＫ８／１９阻害活性を有する因子」とは、ＣＤＫ８／１９の阻害活性を有するあらゆる物質を意味する。同じＣＤＫファミリーの他のタンパク質とは対照的に、ＣＤＫ８は、細胞増殖には必要とされず、ＣＤＫ８の阻害は、通常の条件下では大きな効果はない。ＣＤＫ１９とＣＤＫ８は類似しており、ＣＤＫ８阻害は通常ＣＤＫ１９の阻害も伴う。

【００２５】

「増殖因子」は特定の細胞の分化及び／又は増殖を促す内因性タンパク質である。「増殖因子」としては、例えば、上皮成長因子（ＥＧＦ）、酸性線維芽細胞増殖因子（ａＦＧＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ－１）、インスリン様増殖因子２（ＩＧＦ－２）、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、神経増殖因子（ＮＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、トランスフェリン、種々のインターロイキン（例えば、ＩＬ－１～ＩＬ－１８）、種々のコロニー－刺激因子（例えば、顆粒球／マクロファージコロニー－刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ））、種々のインターフェロン（例えば、ＩＦＮ－γなど）及び幹細胞に対する効果を有する他のサイトカイン、例えば、幹細胞因子（ＳＣＦ）及びエリスロポエチン（Ｅｐｏ）が挙げられる。

【００２６】

本明細書において、「ＲＯＣＫ阻害剤」とは、Ｒｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ：Ｒｈｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ，ｃｏｉｌｅｄ－ｃｏｉｌ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ）を阻害する物質を意味し、ＲＯＣＫ ＩとＲＯＣＫ ＩＩのいずれを阻害する物質であってもよい。ＲＯＣＫ阻害剤は、上記の機能を有する限り特に限定されず、例えば、Ｎ－（４－ピリジニル）－４β－［（Ｒ）－１－アミノエチル］シクロヘキサン－１α－カルボアミド（Ｙ－２７６３２と称することもある）、Ｆａｓｕｄｉｌ（ＨＡ１０７７）、（２Ｓ）－２－メチル－１－［（４－メチル－５－イソキノリニル）スルホニル］ヘキサヒドロ－１Ｈ－１，４－ジアゼピン（Ｈ－１１５２）、４β－［（１Ｒ）－１－アミノエチル］－Ｎ－（４－ピリジル）ベンゼン－１ゼンカルボアミド（Ｗｆ－５３６）、Ｎ－（１Ｈ－ピロロ［２，３－ｂ］ピリジン－４－イル）－４β－［（Ｒ）－１－アミノエチル］シクロヘキサン－１α－カルボアミド（Ｙ－３０１４１）、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）エチル］－オキシ｝ベンズアミド（ＧＳＫ２６９９６２Ａ）、Ｎ－（６－フルオロ－１Ｈ－インダゾール－５－イル）－６－メチル－２－オキソ－４－［４－（トリフルオロメチル）フェニル］－３，４－ジヒドロ－１Ｈ－ピリジン－５－カルボキサミド（ＧＳＫ４２９２８６Ａ）を挙げることができる。ＲＯＣＫ阻害剤はこれらに限定されるものではなく、ＲＯＣＫのｍＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやｓｉＲＮＡ、ＲＯＣＫに結合する抗体、ドミナントネガティブＲＯＣＫ変異体等もＲＯＣＫ阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

【００２７】

本明細書において、「ＧＳＫ３β阻害剤」とは、ＧＳＫ３β（グリコーゲンシンターゼキナーゼ３β）に対する阻害活性を有する物質である。ＧＳＫ３（グリコーゲンシンターゼキナーゼ３）は、セリン／スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に関与する。Ｇ

ＳＫ３にはαとβの２つのアイソフォームが存在する。本発明で用いられる「ＧＳＫ３β阻害剤」は、ＧＳＫ３β阻害活性を有すれば特に限定されず、ＧＳＫ３β阻害活性と合わせてＧＳＫ３α阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。

【００２８】

ＧＳＫ３β阻害剤としては、ＣＨＩＲ９８０１４（２－［［２－［（５－ニトロ－６－アミノピリジン－２－イル）アミノ］エチル］アミノ］－４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（１Ｈ－イミダゾール－１－イル）ピリミジン）、ＣＨＩＲ９９０２１（６－［［２－［［４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（４－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）－２－ピリミジニル］アミノ］エチル］アミノ］ニコチノニトリル）、ＴＤＺＤ－８（４－ベンジル－２－メチル－１，２，４－チアジアゾリジン－３，５－ジオン）、ＳＢ２１６７６３（３－（２，４－ジクロロフェニル）－４－（１－メチル－１Ｈ－インドール－３－イル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン）、ＴＷＳ－１１９（３－［６－（３－アミノフェニル）－７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－４－イルオキシ］フェノール）、ケンパウロン（Ｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ）、１－アザケンパウロン（Ａｚａｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ）、ＳＢ２１６７６３（３－（２，４－ジクロロフェニル）－４－（１－メチル－１Ｈ－インドール－３－イル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン）、ＳＢ４１５２８６（３－［（３－クロロ－４－ヒドロキシフェニル）アミノ］－４－（２－ニトロフェニル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン）及びＡＲ－ＡＯ１４４－１８、ＣＴ９９０２１、ＣＴ２００２６、ＢＩＯ、ＢＩＯ－アセトキシム、ピリドカルバゾール－シクロペンタジエニルルテニウム複合体、ＯＴＤＺＴ、アルファ－４－ジブロモアセトフェノン、リチウム等が例示される。ＧＳＫ３βはこれらに限定されるものではなく、ＧＳＫ３βのｍＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやｓｉＲＮＡ、ＧＳＫ３βに結合する抗体、ドミナントネガティブＧＳＫ３β変異体等もＧＳＫ３β阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

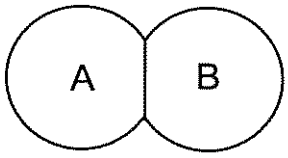
【００２９】

本明細書において「血清代替物」とは、例えば、Ｋｎｏｃｋｏｕｔ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＫＳＲ：Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＳｔｅｍＳｕｒｅ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｗａｋｏ）、Ｂ－２７サプリメント、Ｎ２－サプリメント、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、インスリン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン（例えば、亜セレン酸ナトリウム））、２－メルカプトエタノール、３’チオールグリセロール又はこれらの混合物（例えば、ＩＴＳ－Ｇ）が挙げられる。血清代替物としては、Ｂ－２７サプリメント、ＫＳＲ、ＳｔｅｍＳｕｒｅ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、ＩＴＳ－Ｇが好ましい。培地に血清代替物を添加する場合の培地中の濃度は０．０１～１０重量％、好ましくは０．１～２重量％である。本発明においては、血清に代えて「血清代替物」を使用することが好ましい。

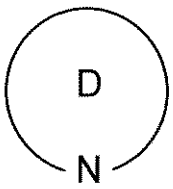
【００３０】

本明細書において「ＦＧＦＲ１阻害剤」とは、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）１に対する阻害活性を有する物質である。ＦＧＦＲ１は、成長因子であるＦＧＦ１～ＦＧＦ１７に対して高い親和性を有する受容体として、４回膜貫通型チロシンキナーゼのファミリー（ＦＧＦＲ１，２，３，４）のメンバーである。ＦＧＦＲ１阻害剤は、ＦＧＦＲ１阻害活性を有すれば特に限定されず、ＦＧＦＲ１阻害活性と合わせてその他のＦＧＦＲの阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。本明細書において「ＦＧＦＲ１阻害剤」とは、ＦＧＦＲ１阻害活性を少しでも有している物質が含まれるが、好ましくは、ＦＧＦＲ１を５０％以上阻害する物質を指し、より好ましくはＦＧＦＲ１の５０％阻害濃度（IC_{50}）が１μＭ以下、さらに好ましくは１００ｎＭ以下である物質を指す。ＦＧＦＲ１阻害活性の判定方法としては、公知の方法から選択すればよく、例えばＥｎｚｙＣｈｒｏｍ Ｋｉｎａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（ＢｉｏＡｓｓａｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を使った判定方法などが挙げられる。ＦＧＦＲ１阻害剤は従来公知のものを利用することが可能であり、特許文献又は非特許文献から見つけることができる。

【００３１】
例えば、本明細書において「ＦＧＦＲ１阻害剤」とは、下記に示した化合物（化合物群Ｄ）に加えて、下記一般式で示される構造式を有する化合物のうち、ＦＧＦＲ１に阻害活性を有する化合物（又はその塩）が挙げられ、好ましくは、以下一般式で示される構造式を有する化合物Ｉ及び化合物ＩＩのうち、ＦＧＦＲ１の５０％阻害濃度（IC_{50}）が１μＭ以下、より好ましくは１００ｎＭ以下である化合物（又はその塩）である。
【００３２】
（化合物Ｉ）
化合物Ｉは下記式１：
【化１】



〔式中、環ＡＢは、１以上の置換基を有する２環式複素環を示す。（環ＡＢは、１以上の置換基を有する３環式複素環であってもよい）〕で表される化合物またはその塩が挙げられる。
好ましくは、式中、環ＡＢは、３個の置換基を有する２環式含窒素複素環を示す。置換基としては、以下で示した置換基もしくは化合物群Ｄが有している置換基が挙げられ、好ましくは化合物群Ｄが有している置換基を示す。
【００３３】
（化合物ＩＩ）
化合物ＩＩは下記式２：
【化２】



〔式中、環Ｄは、置換基を有していてもよい５ないし６員単環式含窒素複素環を示し；
環Ｄ以外に１以上の含窒素複素環を含むことを示す。〕で表される化合物またはその塩が挙げられる。
好ましくは、式中、環Ｄは、置換基を有していてもよい、窒素を１または２含む芳香環を示す。
また、好ましくは、環Ｄ以外の１以上の含窒素複素環としては、置換基を有していてもよいピペラジンが挙げられる。
置換基としては、以下で示した置換基もしくは化合物群Ｄが有している置換基が挙げられ、好ましくは化合物群Ｄが有している置換基を示す。
【００３４】
本明細書において、「複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子をそれぞれ含有する、芳香族複素環および非芳香族複素環が挙げられる。
【００３５】
本明細書において、「芳香族複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以

外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子を含有する５ないし１４員（好ましくは５ないし１０員）の芳香族複素環が挙げられる。該「芳香族複素環」の好適な例としては、チオフェン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、チアゾール、イソチアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、１，２，４－オキサジアゾール、１，３，４－オキサジアゾール、１，２，４－チアジアゾール、１，３，４－チアジアゾール、トリアゾール、テトラゾール、トリアジンなどの５ないし６員単環式芳香族複素環；
ベンゾチオフェン、ベンゾフラン、ベンゾイミダゾール、ベンゾオキサゾール、ベンゾイソオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾイソチアゾール、ベンゾトリアゾール、イミダゾピリジン、チエノピリジン、フロピリジン、ピロロピリジン、ピラゾロピリジン、オキサゾロピリジン、チアゾロピリジン、イミダゾピラジン、イミダゾピリミジン、チエノピリミジン、フロピリミジン、ピロロピリミジン、ピラゾロピリミジン、オキサゾロピリミジン、チアゾロピリミジン、ピラゾロピリミジン、ピラゾロトリアジン、ナフト［２，３－ｂ］チオフェン、フェノキサチイン、インドリン、イソインドール、１Ｈ－インダゾール、プリン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、β－カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、フェノチアジン、フェノキサジンなどの８ないし１４員縮合多環式（好ましくは２または３環式）芳香族複素環が挙げられる。

【００３６】

本明細書において、「非芳香族複素環」としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子を含有する３ないし１４員（好ましくは４ないし１０員）の非芳香族複素環が挙げられる。該「非芳香族複素環」の好適な例としては、アジリジン、オキシラン、チイラン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、テトラヒドロチオフェン、テトラヒドロフラン、ピロリン、ピロリジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、ピラゾリン、ピラゾリジン、チアゾリン、チアゾリジン、テトラヒドロイソチアゾール、テトラヒドロオキサゾール、テトラヒドロイソオキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、テトラヒドロピリジン、ジヒドロピリジン、ジヒドロチオピラン、テトラヒドロピリミジン、テトラヒドロピリダジン、ジヒドロピラン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロチオピラン、モルホリン、チオモルホリン、アゼパニン、ジアゼパン、アゼピン、アゾカン、ジアゾカン、オキセパンなどの３ないし８員単環式非芳香族複素環；
ジヒドロベンゾフラン、ジヒドロベンゾイミダゾール、ジヒドロベンゾオキサゾール、ジヒドロベンゾチアゾール、ジヒドロベンゾイソチアゾール、ジヒドロナフト［２，３－ｂ］チオフェン、テトラヒドロイソキノリン、テトラヒドロキノリン、４Ｈ－キノリジン、インドリン、イソインドリン、テトラヒドロチエノ［２，３－ｃ］ピリジン、テトラヒドロベンゾアゼピン、テトラヒドロキノキサリン、テトラヒドロフェナントリジン、ヘキサヒドロフェノチアジン、ヘキサヒドロフェノキサジン、テトラヒドロフタラジン、テトラヒドロナフチリジン、テトラヒドロキナゾリン、テトラヒドロシンノリン、テトラヒドロカルバゾール、テトラヒドロ－β－カルボリン、テトラヒドロアクリジン、テトラヒドロフェナジン、テトラヒドロチオキサンテン、オクタヒドロイソキノリンなどの９ないし１４員縮合多環式（好ましくは２または３環式）非芳香族複素環が挙げられる。

【００３７】

本明細書において、「含窒素複素環」としては、「複素環」のうち、環構成原子として少なくとも１個以上の窒素原子を含有するものが挙げられる。

【００３８】

以下、本明細書中で用いられる各置換基の定義について詳述する。特記しない限り各置換基は以下の定義を有する。

【００３９】

本明細書において、「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。

【００４０】
本明細書において、「C_{1-6}アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、１－エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、１，１－ジメチルブチル、２，２－ジメチルブチル、３，３－ジメチルブチル、２－エチルブチルが挙げられる。
【００４１】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキル基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいC_{1-6}アルキル基が挙げられる。具体例としては、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、２－ブロモエチル、２，２，２－トリフルオロエチル、テトラフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、２，２－ジフルオロプロピル、３，３，３－トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、４，４，４－トリフルオロブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、５，５，５－トリフルオロペンチル、ヘキシル、６，６，６－トリフルオロヘキシルが挙げられる。
【００４２】
本明細書において、「C_{2-6}アルケニル基」としては、例えば、エテニル、１－プロペニル、２－プロペニル、２－メチル－１－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、３－メチル－２－ブテニル、１－ペンテニル、２－ペンテニル、３－ペンテニル、４－ペンテニル、４－メチル－３－ペンテニル、１－ヘキセニル、３－ヘキセニル、５－ヘキセニルが挙げられる。
【００４３】
本明細書において、「C_{2-6}アルキニル基」としては、例えば、エチニル、１－プロピニル、２－プロピニル、１－ブチニル、２－ブチニル、３－ブチニル、１－ペンチニル、２－ペンチニル、３－ペンチニル、４－ペンチニル、１－ヘキシニル、２－ヘキシニル、３－ヘキシニル、４－ヘキシニル、５－ヘキシニル、４－メチル－２－ペンチニルが挙げられる。
【００４４】
本明細書において、「C_{3-10}シクロアルキル基」としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビシクロ［２．２．１］ヘプチル、ビシクロ［２．２．２］オクチル、ビシクロ［３．２．１］オクチル、アダマンチルが挙げられる。
【００４５】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいC_{3-10}シクロアルキル基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいC_{3-10}シクロアルキル基が挙げられる。具体例としては、シクロプロピル、２，２－ジフルオロシクロプロピル、２，３－ジフルオロシクロプロピル、シクロブチル、ジフルオロシクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルが挙げられる。
【００４６】
本明細書において、「C_{3-10}シクロアルケニル基」としては、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニルが挙げられる。
【００４７】
本明細書において、「C_{6-14}アリール基」としては、例えば、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、１－アントリル、２－アントリル、９－アントリルが挙げられる。
【００４８】
本明細書において、「C_{7-16}アラルキル基」としては、例えば、ベンジル、フェネチル、ナフチルメチル、フェニルプロピルが挙げられる。

【００４９】
本明細書において、「Ｃ$_{1-6}$アルコキシ基」としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシが挙げられる。
【００５０】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルコキシ基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいＣ$_{1-6}$アルコキシ基が挙げられる。具体例としては、メトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、２，２，２－トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、４，４，４－トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシが挙げられる。
【００５１】
本明細書において、「Ｃ$_{3-10}$シクロアルキルオキシ基」としては、例えば、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシ、シクロヘプチルオキシ、シクロオクチルオキシが挙げられる。
【００５２】
本明細書において、「Ｃ$_{1-6}$アルキルチオ基」としては、例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、ｓｅｃ－ブチルチオ、ｔｅｒｔ－ブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオが挙げられる。
【００５３】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルチオ基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいＣ$_{1-6}$アルキルチオ基が挙げられる。具体例としては、メチルチオ、ジフルオロメチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、４，４，４－トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオが挙げられる。
【００５４】
本明細書において、「Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基」としては、例えば、アセチル、プロパノイル、ブタノイル、２－メチルプロパノイル、ペンタノイル、３－メチルブタノイル、２－メチルブタノイル、２，２－ジメチルプロパノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイルが挙げられる。
【００５５】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいＣ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基が挙げられる。具体例としては、アセチル、クロロアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、プロパノイル、ブタノイル、ペンタノイル、ヘキサノイルが挙げられる。
【００５６】
本明細書において、「Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニル基」としては、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、ｓｅｃ－ブトキシカルボニル、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル、ペンチルオキシカルボニル、ヘキシルオキシカルボニルが挙げられる。
【００５７】
本明細書において、「Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基」としては、例えば、ベンゾイル、１－ナフトイル、２－ナフトイルが挙げられる。
【００５８】
本明細書において、「Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルボニル基」としては、例えば、フェニルアセチル、フェニルプロピオニルが挙げられる。
【００５９】
本明細書において、「５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基」としては、例えば、

ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイルが挙げられる。
【００６０】
本明細書において、「３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基」としては、例えば、モルホリニルカルボニル、ピペリジニルカルボニル、ピロリジニルカルボニルが挙げられる。
【００６１】
本明細書において、「モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイル基」としては、例えば、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルカルバモイルが挙げられる。
【００６２】
本明細書において、「モノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルバモイル基」としては、例えば、ベンジルカルバモイル、フェネチルカルバモイルが挙げられる。
【００６３】
本明細書において、「Ｃ$_{1-6}$アルキルスルホニル基」としては、例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル、ｓｅｃ－ブチルスルホニル、ｔｅｒｔ－ブチルスルホニルが挙げられる。
【００６４】
本明細書において、「ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルスルホニル基」としては、例えば、１ないし７個、好ましくは１ないし５個のハロゲン原子を有していてもよいＣ$_{1-6}$アルキルスルホニル基が挙げられる。具体例としては、メチルスルホニル、ジフルオロメチルスルホニル、トリフルオロメチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル、４，４，４－トリフルオロブチルスルホニル、ペンチルスルホニル、ヘキシルスルホニルが挙げられる。
【００６５】
本明細書において、「Ｃ$_{6-14}$アリールスルホニル基」としては、例えば、フェニルスルホニル、１－ナフチルスルホニル、２－ナフチルスルホニルが挙げられる。
【００６６】
本明細書において、「置換基」としては、例えば、ハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、置換されていてもよい炭化水素基、置換されていてもよい複素環基、アシル基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいチオカルバモイル基、置換されていてもよいスルファモイル基、置換されていてもよいヒドロキシ基、置換されていてもよいスルファニル（ＳＨ）基、置換されていてもよいシリル基が挙げられる。
【００６７】
本明細書において、「炭化水素基」（「置換されていてもよい炭化水素基」における「炭化水素基」を含む）としては、例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、Ｃ$_{2-6}$アルキニル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルケニル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル基が挙げられる。
【００６８】
本明細書において、「置換されていてもよい炭化水素基」としては、例えば、下記の置換基群Ａから選ばれる置換基を有していてもよい炭化水素基が挙げられる。
［置換基群Ａ］
（１）ハロゲン原子、
（２）ニトロ基、
（３）シアノ基、
（４）オキソ基、
（５）ヒドロキシ基、
（６）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルコキシ基、
（７）Ｃ$_{6-14}$アリールオキシ基（例、フェノキシ、ナフトキシ）、
（８）Ｃ$_{7-16}$アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ）、

（９）５ないし１４員芳香族複素環オキシ基（例、ピリジルオキシ）、
（１０）３ないし１４員非芳香族複素環オキシ基（例、モルホリニルオキシ、ピペリジニルオキシ）、
（１１）Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニルオキシ基（例、アセトキシ、プロパノイルオキシ）、
（１２）Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニルオキシ基（例、ベンゾイルオキシ、１－ナフトイルオキシ、２－ナフトイルオキシ）、
（１３）Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニルオキシ基（例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシ）、
（１４）モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイルオキシ基（例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシ、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシ）、
（１５）Ｃ$_{6-14}$アリール－カルバモイルオキシ基（例、フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモイルオキシ）、
（１６）５ないし１４員芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、ニコチノイルオキシ）、
（１７）３ないし１４員非芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、モルホリニルカルボニルオキシ、ピペリジニルカルボニルオキシ）、
（１８）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルスルホニルオキシ基（例、メチルスルホニルオキシ、トリフルオロメチルスルホニルオキシ）、
（１９）Ｃ$_{1-6}$アルキル基で置換されていてもよいＣ$_{6-14}$アリールスルホニルオキシ基（例、フェニルスルホニルオキシ、トルエンスルホニルオキシ）、
（２０）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルチオ基、
（２１）５ないし１４員芳香族複素環基、
（２２）３ないし１４員非芳香族複素環基、
（２３）ホルミル基、
（２４）カルボキシ基、
（２５）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基、
（２６）Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基、
（２７）５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、
（２８）３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、
（２９）Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニル基、
（３０）Ｃ$_{6-14}$アリールオキシ－カルボニル基（例、フェニルオキシカルボニル、１－ナフチルオキシカルボニル、２－ナフチルオキシカルボニル）、
（３１）Ｃ$_{7-16}$アラルキルオキシ－カルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニル）、
（３２）カルバモイル基、
（３３）チオカルバモイル基、
（３４）モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイル基、
（３５）Ｃ$_{6-14}$アリール－カルバモイル基（例、フェニルカルバモイル）、
（３６）５ないし１４員芳香族複素環カルバモイル基（例、ピリジルカルバモイル、チエニルカルバモイル）、
（３７）３ないし１４員非芳香族複素環カルバモイル基（例、モルホリニルカルバモイル、ピペリジニルカルバモイル）、
（３８）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルスルホニル基、
（３９）Ｃ$_{6-14}$アリールスルホニル基、
（４０）５ないし１４員芳香族複素環スルホニル基（例、ピリジルスルホニル、チエニルスルホニル）、
（４１）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキルスルフィニル基、
（４２）Ｃ$_{6-14}$アリールスルフィニル基（例、フェニルスルフィニル、１－ナフチルスルフィニル、２－ナフチルスルフィニル）、

（４３）５ないし１４員芳香族複素環スルフィニル基（例、ピリジルスルフィニル、チエニルスルフィニル）、
（４４）アミノ基、
（４５）モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキルアミノ基（例、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジブチルアミノ、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルアミノ）、
（４６）モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリールアミノ基（例、フェニルアミノ）、
（４７）５ないし１４員芳香族複素環アミノ基（例、ピリジルアミノ）、
（４８）Ｃ$_{7-16}$アラルキルアミノ基（例、ベンジルアミノ）、
（４９）ホルミルアミノ基、
（５０）Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニルアミノ基（例、アセチルアミノ、プロパノイルアミノ、ブタノイルアミノ）、
（５１）（Ｃ$_{1-6}$アルキル）（Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル）アミノ基（例、Ｎ－アセチル－Ｎ－メチルアミノ）、
（５２）Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニルアミノ基（例、フェニルカルボニルアミノ、ナフチルカルボニルアミノ）、
（５３）Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニルアミノ基（例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノ、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）、
（５４）Ｃ$_{7-16}$アラルキルオキシ－カルボニルアミノ基（例、ベンジルオキシカルボニルアミノ）、
（５５）Ｃ$_{1-6}$アルキルスルホニルアミノ基（例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ）、
（５６）Ｃ$_{1-6}$アルキル基で置換されていてもよいＣ$_{6-14}$アリールスルホニルアミノ基（例、フェニルスルホニルアミノ、トルエンスルホニルアミノ）、
（５７）ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキル基、
（５８）Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、
（５９）Ｃ$_{2-6}$アルキニル基、
（６０）Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、
（６１）Ｃ$_{3-10}$シクロアルケニル基、及び
（６２）Ｃ$_{6-14}$アリール基。

【００６９】

「置換されていてもよい炭化水素基」における上記置換基の数は、例えば、１ないし５個、好ましくは１ないし３個である。置換基数が２個以上の場合、各置換基は同一であっても異なっていてもよい。

【００７０】

本明細書において、「複素環基」（「置換されていてもよい複素環基」における「複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子をそれぞれ含有する、（ｉ）芳香族複素環基、（ｉｉ）非芳香族複素環基および（ｉｉｉ）７ないし１０員複素架橋環基が挙げられる。

【００７１】

本明細書において、「芳香族複素環基」（「５ないし１４員芳香族複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子を含有する５ないし１４員（好ましくは５ないし１０員）の芳香族複素環基が挙げられる。

該「芳香族複素環基」の好適な例としては、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、１，２，４－オキサジアゾリル、１，３，４－オキサジアゾリル、１，２，４－チアジアゾリル、１，３，４－チアジアゾリル

、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニルなどの５ないし６員単環式芳香族複素環基；ベンゾチオフェニル、ベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、イミダゾピリジニル、チエノピリジニル、フロピリジニル、ピロロピリジニル、ピラゾロピリジニル、オキサゾロピリジニル、チアゾロピリジニル、イミダゾピラジニル、イミダゾピリミジニル、チエノピリミジニル、フロピリミジニル、ピロロピリミジニル、ピラゾロピリミジニル、オキサゾロピリミジニル、チアゾロピリミジニル、ピラゾロトリアジニル、ナフト［２，３－ｂ］チエニル、フェノキサチイニル、インドリル、イソインドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、イソキノリル、キノリル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどの８ないし１４員縮合多環式（好ましくは２または３環式）芳香族複素環基が挙げられる。

【００７２】

本明細書において、「非芳香族複素環基」（「３ないし１４員非芳香族複素環基」を含む）としては、例えば、環構成原子として炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし４個のヘテロ原子を含有する３ないし１４員（好ましくは４ないし１０員）の非芳香族複素環基が挙げられる。

該「非芳香族複素環基」の好適な例としては、アジリジニル、オキシラニル、チイラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロフラニル、ピロリニル、ピロリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、テトラヒドロイソチアゾリル、テトラヒドロオキサゾリル、テトラヒドロイソオキサゾリル、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロピリジニル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロピリダジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、アゼパニル、ジアゼパニル、アゼピニル、オキセパニル、アゾカニル、ジアゾカニルなどの３ないし８員単環式非芳香族複素環基；
ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロベンゾチアゾリル、ジヒドロベンゾイソチアゾリル、ジヒドロナフト［２，３－ｂ］チエニル、テトラヒドロイソキノリル、テトラヒドロキノリル、４Ｈ－キノリジニル、インドリニル、イソインドリニル、テトラヒドロチエノ［２，３－ｃ］ピリジニル、テトラヒドロベンゾアゼピニル、テトラヒドロキノキサリニル、テトラヒドロフェナントリジニル、ヘキサヒドロフェノチアジニル、ヘキサヒドロフェノキサジニル、テトラヒドロフタラジニル、テトラヒドロナフチリジニル、テトラヒドロキナゾリニル、テトラヒドロシンノリニル、テトラヒドロカルバゾリル、テトラヒドロ－β－カルボリニル、テトラヒドロアクリジニル、テトラヒドロフェナジニル、テトラヒドロチオキサンテニル、オクタヒドロイソキノリルなどの９ないし１４員縮合多環式（好ましくは２または３環式）非芳香族複素環基が挙げられる。

【００７３】

本明細書において、「７ないし１０員複素架橋環基」の好適な例としては、キヌクリジニル、７－アザビシクロ［２．２．１］ヘプタニルが挙げられる。

【００７４】

本明細書において、「含窒素複素環基」としては、「複素環基」のうち、環構成原子として少なくとも１個以上の窒素原子を含有するものが挙げられる。

【００７５】

本明細書において、「置換されていてもよい複素環基」としては、例えば、前記した置換基群Ａから選ばれる置換基を有していてもよい複素環基が挙げられる。

【００７６】

「置換されていてもよい複素環基」における置換基の数は、例えば、１ないし３個であ

る。置換基数が２個以上の場合、各置換基は同一であっても異なっていてもよい。
【００７７】
本明細書において、「アシル基」としては、例えば、「ハロゲン原子、ハロゲン化されていてもよいＣ$_{1-6}$アルコキシ基、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基およびカルバモイル基から選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルケニル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル基、５ないし１４員芳香族複素環基および３ないし１４員非芳香族複素環基から選ばれる１または２個の置換基」をそれぞれ有していてもよい、ホルミル基、カルボキシ基、カルバモイル基、チオカルバモイル基、スルフィノ基、スルホ基、スルファモイル基、ホスホノ基が挙げられる。
【００７８】
また、「アシル基」としては、炭化水素－スルホニル基、複素環－スルホニル基、炭化水素－スルフィニル基、複素環－スルフィニル基も挙げられる。
ここで、炭化水素－スルホニル基とは、炭化水素基が結合したスルホニル基を、複素環－スルホニル基とは、複素環基が結合したスルホニル基を、炭化水素－スルフィニル基とは、炭化水素基が結合したスルフィニル基を、複素環－スルフィニル基とは、複素環基が結合したスルフィニル基を、それぞれ意味する。
「アシル基」の好適な例としては、ホルミル基、カルボキシ基、Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル－カルボニル基（例、クロトノイル）、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル－カルボニル基（例、シクロブタンカルボニル、シクロペンタンカルボニル、シクロヘキサンカルボニル、シクロヘプタンカルボニル）、Ｃ$_{3-10}$シクロアルケニル－カルボニル基（例、２－シクロヘキセンカルボニル）、Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニル基、Ｃ$_{6-14}$アリールオキシ－カルボニル基（例、フェニルオキシカルボニル、ナフチルオキシカルボニル）、Ｃ$_{7-16}$アラルキルオキシ－カルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニル）、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{2-6}$アルケニル－カルバモイル基（例、ジアリルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル－カルバモイル基（例、シクロプロピルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－カルバモイル基（例、フェニルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルバモイル基、５ないし１４員芳香族複素環カルバモイル基（例、ピリジルカルバモイル）、チオカルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－チオカルバモイル基（例、メチルチオカルバモイル、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{2-6}$アルケニル－チオカルバモイル基（例、ジアリルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル－チオカルバモイル基（例、シクロプロピルチオカルバモイル、シクロヘキシルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－チオカルバモイル基（例、フェニルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－チオカルバモイル基（例、ベンジルチオカルバモイル、フェネチルチオカルバモイル）、５ないし１４員芳香族複素環チオカルバモイル基（例、ピリジルチオカルバモイル）、スルフィノ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル基（例、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル）、スルホ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルスルホニル基、Ｃ$_{6-14}$アリールスルホニル基、ホスホノ基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキルホスホノ基（例、ジメチルホスホノ、ジエチルホスホノ、ジイソプロピルホスホノ、ジブチルホスホノ）が挙げられる。
【００７９】
本明細書において、「置換されていてもよいアミノ基」としては、例えば、置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル基、Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基、Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４

員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ１－６アルコキシ－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイル基、Ｃ１－６アルキルスルホニル基およびＣ６－１４アリールスルホニル基から選ばれる１または２個の置換基」を有していてもよいアミノ基が挙げられる。

【００８０】

置換されていてもよいアミノ基の好適な例としては、アミノ基、モノ－またはジ－（ハロゲン化されていてもよいＣ１－６アルキル）アミノ基（例、メチルアミノ、トリフルオロメチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、プロピルアミノ、ジブチルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ２－６アルケニルアミノ基（例、ジアリルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ３－１０シクロアルキルアミノ基（例、シクロプロピルアミノ、シクロヘキシルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ６－１４アリールアミノ基（例、フェニルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキルアミノ基（例、ベンジルアミノ、ジベンジルアミノ）、モノ－またはジ－（ハロゲン化されていてもよいＣ１－６アルキル）－カルボニルアミノ基（例、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ６－１４アリール－カルボニルアミノ基（例、ベンゾイルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルボニルアミノ基（例、ベンジルカルボニルアミノ）、モノ－またはジ－５ないし１４員芳香族複素環カルボニルアミノ基（例、ニコチノイルアミノ、イソニコチノイルアミノ）、モノ－またはジ－３ないし１４員非芳香族複素環カルボニルアミノ基（例、ピペリジニルカルボニルアミノ）、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルコキシ－カルボニルアミノ基（例、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）、５ないし１４員芳香族複素環アミノ基（例、ピリジルアミノ）、カルバモイルアミノ基、（モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルバモイル）アミノ基（例、メチルカルバモイルアミノ）、（モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイル）アミノ基（例、ベンジルカルバモイルアミノ）、Ｃ１－６アルキルスルホニルアミノ基（例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ）、Ｃ６－１４アリールスルホニルアミノ基（例、フェニルスルホニルアミノ）、（Ｃ１－６アルキル）（Ｃ１－６アルキル－カルボニル）アミノ基（例、Ｎ－アセチル－Ｎ－メチルアミノ）、（Ｃ１－６アルキル）（Ｃ６－１４アリール－カルボニル）アミノ基（例、Ｎ－ベンゾイル－Ｎ－メチルアミノ）が挙げられる。

【００８１】

本明細書において、「置換されていてもよいカルバモイル基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ１－６アルキル基、Ｃ２－６アルケニル基、Ｃ３－１０シクロアルキル基、Ｃ６－１４アリール基、Ｃ７－１６アラルキル基、Ｃ１－６アルキル－カルボニル基、Ｃ６－１４アリール－カルボニル基、Ｃ７－１６アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ１－６アルコキシ－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルバモイル基およびモノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイル基から選ばれる１または２個の置換基」を有していてもよいカルバモイル基が挙げられる。

【００８２】

置換されていてもよいカルバモイル基の好適な例としては、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ２－６アルケニル－カルバモイル基（例、ジアリルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ３－１０シクロアルキル－カルバモイル基（例、シクロプロピルカルバモイル、シクロヘキシルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ６－１４アリール－カルバモイル基（例、フェニルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルボニル－カルバモイル基（例、アセチルカルバモイル、プロピオニルカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ６－１４アリール－カルボニル－カルバモイル基（例、ベンゾイルカルバモイル）、５ないし１４員芳香族複素環カルバモイル基（例、ピリジルカルバモイル）が挙げられる。

【００８３】
本明細書において、「置換されていてもよいチオカルバモイル基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル基、Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基、Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイル基およびモノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルバモイル基から選ばれる１または２個の置換基」を有していてもよいチオカルバモイル基が挙げられる。
【００８４】
置換されていてもよいチオカルバモイル基の好適な例としては、チオカルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－チオカルバモイル基（例、メチルチオカルバモイル、エチルチオカルバモイル、ジメチルチオカルバモイル、ジエチルチオカルバモイル、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{2-6}$アルケニル－チオカルバモイル基（例、ジアリルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル－チオカルバモイル基（例、シクロプロピルチオカルバモイル、シクロヘキシルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－チオカルバモイル基（例、フェニルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－チオカルバモイル基（例、ベンジルチオカルバモイル、フェネチルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル－チオカルバモイル基（例、アセチルチオカルバモイル、プロピオニルチオカルバモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル－チオカルバモイル基（例、ベンゾイルチオカルバモイル）、５ないし１４員芳香族複素環チオカルバモイル基（例、ピリジルチオカルバモイル）が挙げられる。
【００８５】
本明細書において、「置換されていてもよいスルファモイル基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{2-6}$アルケニル基、Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル基、Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル基、Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル基、Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルバモイル基およびモノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－カルバモイル基から選ばれる１または２個の置換基」を有していてもよいスルファモイル基が挙げられる。
【００８６】
置換されていてもよいスルファモイル基の好適な例としては、スルファモイル基、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－スルファモイル基（例、メチルスルファモイル、エチルスルファモイル、ジメチルスルファモイル、ジエチルスルファモイル、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{2-6}$アルケニル－スルファモイル基（例、ジアリルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{3-10}$シクロアルキル－スルファモイル基（例、シクロプロピルスルファモイル、シクロヘキシルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－スルファモイル基（例、フェニルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{7-16}$アラルキル－スルファモイル基（例、ベンジルスルファモイル、フェネチルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{1-6}$アルキル－カルボニル－スルファモイル基（例、アセチルスルファモイル、プロピオニルスルファモイル）、モノ－またはジ－Ｃ$_{6-14}$アリール－カルボニル－スルファモイル基（例、ベンゾイルスルファモイル）、５ないし１４員芳香族複素環スルファモイル基（例、ピリジルスルファモイル）が挙げられる。
【００８７】
本明細書において、「置換されていてもよいヒドロキシ基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ$_{1-6}$アルキル

基、Ｃ２－６アルケニル基、Ｃ３－１０シクロアルキル基、Ｃ６－１４アリール基、Ｃ７－１６アラルキル基、Ｃ１－６アルキル－カルボニル基、Ｃ６－１４アリール－カルボニル基、Ｃ７－１６アラルキル－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環カルボニル基、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニル基、Ｃ１－６アルコキシ－カルボニル基、５ないし１４員芳香族複素環基、カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ１－６アルキル－カルバモイル基、モノ－またはジ－Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイル基、Ｃ１－６アルキルスルホニル基およびＣ６－１４アリールスルホニル基から選ばれる置換基」を有していてもよいヒドロキシ基が挙げられる。

【００８８】

置換されていてもよいヒドロキシ基の好適な例としては、ヒドロキシ基、Ｃ１－６アルコキシ基、Ｃ２－６アルケニルオキシ基（例、アリルオキシ、２－ブテニルオキシ、２－ペンテニルオキシ、３－ヘキセニルオキシ）、Ｃ３－１０シクロアルキルオキシ基（例、シクロヘキシルオキシ）、Ｃ６－１４アリールオキシ基（例、フェノキシ、ナフチルオキシ）、Ｃ７－１６アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシ）、Ｃ１－６アルキル－カルボニルオキシ基（例、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ、ピバロイルオキシ）、Ｃ６－１４アリール－カルボニルオキシ基（例、ベンゾイルオキシ）、Ｃ７－１６アラルキル－カルボニルオキシ基（例、ベンジルカルボニルオキシ）、５ないし１４員芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、ニコチノイルオキシ）、３ないし１４員非芳香族複素環カルボニルオキシ基（例、ピペリジニルカルボニルオキシ）、Ｃ１－６アルコキシ－カルボニルオキシ基（例、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルオキシ）、５ないし１４員芳香族複素環オキシ基（例、ピリジルオキシ）、カルバモイルオキシ基、Ｃ１－６アルキル－カルバモイルオキシ基（例、メチルカルバモイルオキシ）、Ｃ７－１６アラルキル－カルバモイルオキシ基（例、ベンジルカルバモイルオキシ）、Ｃ１－６アルキルスルホニルオキシ基（例、メチルスルホニルオキシ、エチルスルホニルオキシ）、Ｃ６－１４アリールスルホニルオキシ基（例、フェニルスルホニルオキシ）が挙げられる。

【００８９】

本明細書において、「置換されていてもよいスルファニル基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ１－６アルキル基、Ｃ２－６アルケニル基、Ｃ３－１０シクロアルキル基、Ｃ６－１４アリール基、Ｃ７－１６アラルキル基、Ｃ１－６アルキル－カルボニル基、Ｃ６－１４アリール－カルボニル基および５ないし１４員芳香族複素環基から選ばれる置換基」を有していてもよいスルファニル基、ハロゲン化されたスルファニル基が挙げられる。

【００９０】

置換されていてもよいスルファニル基の好適な例としては、スルファニル（－ＳＨ）基、Ｃ１－６アルキルチオ基、Ｃ２－６アルケニルチオ基（例、アリルチオ、２－ブテニルチオ、２－ペンテニルチオ、３－ヘキセニルチオ）、Ｃ３－１０シクロアルキルチオ基（例、シクロヘキシルチオ）、Ｃ６－１４アリールチオ基（例、フェニルチオ、ナフチルチオ）、Ｃ７－１６アラルキルチオ基（例、ベンジルチオ、フェネチルチオ）、Ｃ１－６アルキル－カルボニルチオ基（例、アセチルチオ、プロピオニルチオ、ブチリルチオ、イソブチリルチオ、ピバロイルチオ）、Ｃ６－１４アリール－カルボニルチオ基（例、ベンゾイルチオ）、５ないし１４員芳香族複素環チオ基（例、ピリジルチオ）、ハロゲン化チオ基（例、ペンタフルオロチオ）が挙げられる。

【００９１】

本明細書において、「置換されていてもよいシリル基」としては、例えば、「置換基群Ａから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有していてもよい、Ｃ１－６アルキル基、Ｃ２－６アルケニル基、Ｃ３－１０シクロアルキル基、Ｃ６－１４アリール基およびＣ７－１６アラルキル基から選ばれる１ないし３個の置換基」を有していてもよいシリル基が挙げられる。

【００９２】

置換されていてもよいシリル基の好適な例としては、トリ－Ｃ$_{1-6}$アルキルシリル基（例、トリメチルシリル、ｔｅｒｔ－ブチル（ジメチル）シリル）が挙げられる。

【００９３】

より具体的には、本発明において利用可能なＦＧＦＲ１阻害剤としては、ＰＤ－１６６８６６（１－［２－アミノ－６－（３，５－ジメトキシフェニル）－ピリド（２，３－ｄ）ピリミジン－７－イル］－３－ｔｅｒｔ－ブチルウレア：ＣＡＳ Ｎｏ．：１９２７０５－７９－６）、Ｅ－３８１０（ＣＡＳ Ｎｏ．：１０５８１３７－２３－７）、ＰＤ－１７３０７４（ＣＡＳ Ｎｏ．：２１９５８０－１１－７）、ＦＧＦＲ４－ＩＮ－１（ＣＡＳ Ｎｏ．：１７０８９７１－７２－５）、ＦＧＦＲ－ＩＮ－１（ＣＡＳ Ｎｏ．：１４４８１６９－７１－８）、ＦＩＩＮ－２（ＣＡＳ Ｎｏ．：１６３３０４４－５６－０）、ＡＺＤ４５４７（ＣＡＳ Ｎｏ．：１０３５２７０－３９－３）、ＦＩＩＮ－３（ＣＡＳ Ｎｏ．：１６３７７３５－８４－２）、ＮＶＰ－ＢＧＪ３９８（ＣＡＳ Ｎｏ．：１３１０７４６－１０－１）、ＮＶＰ－ＢＧＪ３９８（ＣＡＳ Ｎｏ．：８７２５１１－３４－７）、ＣＨ５１８３２８４（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２６５２２９－２５－１）、Ｄｅｒａｚａｎｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２３４３５６－６９－４）、Ｄｅｒａｚａｎｔｉｎｉｂ Ｒａｃｅｍａｔｅ、Ｆｅｒｕｌｉｃ ａｃｉｄ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１１３５－２４－６）、ＳＳＲ１２８１２９Ｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：８４８３１８－２５－２）、ＳＳＲ１２８１２９Ｅ ｆｒｅｅ ａｃｉｄ（ＣＡＳ Ｎｏ．：８４８４６３－１３－８）、Ｅｒｄａｆｉｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１３４６２４２－８１－６）、ＢＬＵ９９３１（ＣＡＳ Ｎｏ．：１５３８６０４－６８－０）、ＰＲＮ１３７１（ＣＡＳ Ｎｏ．：１８０２９２９－４３－６）、Ｓ４９０７６（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２６５９６５－２２－７）、ＬＹ２８７４４５５（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２５４４７３－６４－７）、Ｌｉｎｓｉｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：８６７１６０－７１－２）、Ｄｏｖｉｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：４０５１６９－１６－６）、Ａｎｌｏｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１０５８１５６－９０－３）、Ｂｒｉｖａｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６４９７３５－４６－６）、Ｄｅｒａｚａｎｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２３４３５６－６９－４）、Ａｎｌｏｔｉｎｉｂ Ｄｉｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１３６０４６０－８２－７）、ＡＣＴＢ－１００３（ＣＡＳ Ｎｏ．：９３９８０５－３０－８）、ＢＬＵ－５５４（ＣＡＳ Ｎｏ．：１７０７２８９－２１－１）、Ｒｏｇａｒａｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１４４３５３０－０５－９）、ＢＩＢＦ １１２０ ｅｓｙｌａｔｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６５６２４７－１８－６）、ＴＧ １００５７２ Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：８６７３３１－６４－４）、ＥＮＭＤ－２０７６（ＣＡＳ Ｎｏ．：９３４３５３－７６－１）、Ｂｒｉｖａｎｉｂ ａｌａｎｉｎａｔｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６４９７３５－６３－７）、ＴＧ １００５７２（ＣＡＳ Ｎｏ．：８６７３３４－０５－２）、ＢＩＢＦ １１２０（ＣＡＳ Ｎｏ．：６５６２４７－１７－５）、ＥＮＭＤ－２０７６ Ｔａｒｔｒａｔｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２９１０７４－８７－７）、ＴＳＵ－６８（ＣＡＳ Ｎｏ．：２５２９１６－２９－３）、Ｐｏｎａｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：９４３３１９－７０－８）、Ｓｕｌｆａｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１３０８６７２－７４－３）、ＬＹ２７８４５４４（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２２９２３６－８６－５）、Ｄｏｖｉｔｉｎｉｂ ｌａｃｔａｔｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６９２７３７－８０－７）、ＳＵ ５４０２（ＣＡＳ Ｎｏ．：２１５５４３－９２－３）、ＦＧＦ－４０１（ＣＡＳ Ｎｏ．：１７０８９７１－５５－４）、Ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ－ＩＮ－１（ＣＡＳ Ｎｏ．：７０５９４６－２７－６）、ＰＰ５８（ＣＡＳ Ｎｏ．：２１２３９１－５８－７）、ＴＧ １００８０１ Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１０１８０６９－８１－２）、Ｃｒｅｎｏｌａｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６７０２２０－８８－９）、ＴＧ １００８０１（ＣＡＳ Ｎｏ．：８６７３３１－８２－６）、Ｐａｚｏｐａｎｉｂ Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：６３５７０２－６４－６）、Ｐａｚｏｐａｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：４４４７３１－５２－６）、ＰＤ１６８３９３（ＣＡＳ Ｎｏ．：１９４４２３－１５－９）、Ａｐａｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：１２１８７７９－７５－９）、Ｐａｌｂｏｃｉｃｌｉｂ ｉｓｅｔｈｉｏｎａｔｅ（ＣＡＳ Ｎｏ．：８２７０２２－３３－３）、Ｆｏｒｅｔ

ｉｎｉｂ（ＣＡＳ　Ｎｏ．：８４９２１７－６４－７）、Ｌｅｎｖａｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ Ｎｏ．：４１７７１６－９２－８）、Ｔａｎｄｕｔｉｎｉｂ（ＣＡＳ　Ｎｏ．：３８７８６７－１３－２）、等又はその塩（これらの化合物を、化合物群Ｄとする）が例示される。また、これらの化合物は、ＦＧＦＲ１阻害活性を有する限り、好ましくはＦＧＦＲ１の５０％阻害濃度（ＩＣ$_{50}$）が１００ｎＭ以下である限り、上記より選択される一又は複数の置換基を有していてもよい。

また、これらの化合物は、ＦＧＦＲ１阻害活性を有する限り、好ましくはＦＧＦＲ１の５０％阻害濃度（ＩＣ$_{50}$）が１００ｎＭ以下である限り、一部の部分構造（置換基、環等）が変換されていてもよい。

【００９４】

好ましくは、本発明においてＦＧＦＲ１阻害剤は、ＣＡＳ１９２７０５－７９－６（１－［２－アミノ－６－（３，５－ジメトキシフェニル）－ピリド（２，３－ｄ）ピリミジン－７－イル］－３－ｔｅｒｔ－ブチルウレア：ＣＡＳ　Ｎｏ．：１９２７０５－７９－６）、Ｅ－３８１０（ＣＡＳ　Ｎｏ．：１０５８１３７－２３－７）、ＰＤ１７３０７４（ＣＡＳ　Ｎｏ．：２１９５８０－１１－７）である。

【００９５】

ＦＧＦＲ１阻害剤は上記に示した化合物に限定されるものではなく、ＦＧＦＲ１のｍＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやｓｉＲＮＡ、ＦＧＦＲ１に結合する抗体、ドミナントネガティブＦＧＦＲ１変異体等もＦＧＦＲ１阻害剤として使用することができ、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

【００９６】

本明細書において、「マーカー」とは、「マーカータンパク質」、「マーカー遺伝子」など、所定の細胞型により特異的に発現される細胞抗原又はその遺伝子を意味する。好ましくは、マーカーは細胞表面マーカーであり、その場合、生存細胞の濃縮、単離、及び／又は検出が実施可能となる。マーカーは、陽性選択マーカー、又は陰性選択マーカーでありうる。

【００９７】

マーカータンパク質の検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ＥＬＩＳＡ、免疫染色、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。マーカー遺伝子の検出は、当該分野で公知の核酸増幅方法及び／又は核酸検出方法、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、マイクロアレイ、バイオチップ等を利用して行うことができる。本明細書中において、マーカータンパク質が「陽性」であるとは、フローサイトメトリーで陽性と検出されることを意味し、「陰性」とは、フローサイトメトリーで検出限界以下であることを意味する。また、マーカー遺伝子が「陽性」であるとは、ＲＴ－ＰＣＲにより検出されることを意味し、「陰性」とはＲＴ－ＰＣＲで検出限界以下であることを意味する。

【００９８】

本明細書において、「発現（ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）」とは、細胞内のプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写及び／又は翻訳として定義される。

【００９９】

本明細書において、「細胞」とは特記しない限り、細胞の組成物、すなわち細胞集団を意味する。したがって、「細胞」には特定の細胞もしくは細胞集団だけでなく、一又は複数の別の細胞もしくは細胞集団も含まれ得る。「細胞」における特定の細胞は、富化又は純化することによって、あるいは一又は複数の別の細胞を枯渇することによって高めることができる。

【０１００】

本明細書において、「多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ）」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、３胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ）」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる

「全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｃｙ）」とは区別される。
【０１０１】
本明細書において「多能性（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｃｙ）」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞はｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔだが、ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔではない。
【０１０２】
本明細書において、「多能性幹細胞（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）」とは、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）及びこれと同様の分化多能性、すなわち生体の様々な組織（内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て）に分化する能力を潜在的に有する細胞を指す。ＥＳ細胞と同様の分化多能性を有する細胞としては、「人工多能性幹細胞」（本明細書中、「ｉＰＳ細胞」と称することもある）が挙げられる。好ましくは、本発明において、多能性幹細胞とはヒト多能性幹細胞である。
【０１０３】
「ＥＳ細胞」としては、マウスＥＳ細胞であれば、ｉｎＧｅｎｉｏｕｓ社、理研等が樹立した各種マウスＥＳ細胞株が利用可能であり、ヒトＥＳ細胞であれば、ＮＩＨ、理研、京都大学、Ｃｅｌｌａｒｔｉｓ社が樹立した各種ヒトＥＳ細胞株が利用可能である。たとえばＥＳ細胞株としては、ＮＩＨのＣＨＢ－１～ＣＨＢ－１２株、ＲＵＥＳ１株、ＲＵＥＳ２株、ＨＵＥＳ１～ＨＵＥＳ２８株等、ＷｉｓＣｅｌｌ ＲｅｓｅａｒｃｈのＨ１株、Ｈ９株、理研のＫｈＥＳ－１株、ＫｈＥＳ－２株、ＫｈＥＳ－３株、ＫｈＥＳ－４株、ＫｈＥＳ－５株、ＳＳＥＳ１株、ＳＳＥＳ２株、ＳＳＥＳ３株等を利用することができる。
【０１０４】
「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にＯｃｔ３／４、Ｓｏｚ２、Ｋｌｆ４及びｃ－Ｍｙｃの４因子を導入することにより、樹立されたｉＰＳ細胞（Ｔａｋａｈａｓｈｉ Ｋ，Ｙａｍａｎａｋａ Ｓ．，Ｃｅｌｌ，（２００６）１２６：６６３－６７６）のほか、同様の４因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のｉＰＳ細胞（Ｔａｋａｈａｓｈｉ Ｋ，Ｙａｍａｎａｋａ Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ，（２００７）１３１：８６１－８７２．）、上記４因子導入後、Ｎａｎｏｇの発現を指標として選別し、樹立したＮａｎｏｇ－ｉＰＳ細胞（Ｏｋｉｔａ，Ｋ．，Ｉｃｈｉｓａｋａ，Ｔ．， ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，Ｓ．（２００７）．Ｎａｔｕｒｅ ４４８，３１３－３１７．）、ｃ－Ｍｙｃを含まない方法で作製されたｉＰＳ細胞（Ｎａｋａｇａｗａ Ｍ，Ｙａｍａｎａｋａ Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（２００８）２６，１０１－１０６））、ウイルスフリーで６因子を導入して樹立されたｉＰＳ細胞（Ｏｋｉｔａ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１１ Ｍａｙ；８（５）：４０９－１２，Ｏｋｉｔａ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ．３１（３）：４５８－６６．）も用いることができる。また、Ｔｈｏｍｓｏｎらにより作製されたＯＣＴ３／４・ＳＯＸ２・ＮＡＮＯＧ・ＬＩＮ２８の４因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞（Ｙｕ Ｊ．，Ｔｈｏｍｓｏｎ ＪＡ．ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（２００７）３１８：１９１７－１９２０．）、Ｄａｌｅｙらにより作製された人工多能性幹細胞（Ｐａｒｋ ＩＨ，Ｄａｌｅｙ ＧＱ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（２００７）４５１：１４１－１４６）、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞（特開２００８－３０７００７号）等も用いることができる。
【０１０５】
このほか、公開されているすべての論文（例えば、Ｓｈｉ Ｙ．，Ｄｉｎｇ Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，（２００８）Ｖｏｌ３，Ｉｓｓｕｅ ５，５６８－５７４；、Ｋｉｍ ＪＢ．，Ｓｃｈｏｌｅｒ ＨＲ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，（２００８）４５４，６４６－６５０；Ｈｕａｎｇｆｕ Ｄ．，Ｍｅｌｔｏｎ，ＤＡ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（２００８）２６，Ｎｏ ７，７９５－７９７）、あるいは特許（例えば、特開２００８－３０７００７号、特開２００８－

２８３９７２号、ＵＳ２００８／２３３６６１０、ＵＳ２００９／０４７２６３、ＷＯ２００７／０６９６６６、ＷＯ２００８／１１８２２０、ＷＯ２００８／１２４１３３、ＷＯ２００８／１５１０５８、ＷＯ２００９／００６９３０、ＷＯ２００９／００６９９７、ＷＯ２００９／００７８５２）に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

【０１０６】

人工多能性細胞株としては、ＮＩＨ、理化学研究所（理研）、京都大学等が樹立した各種ｉＰＳ細胞株が利用可能である。例えば、ヒトｉＰＳ細胞株であれば、理研のＨｉＰＳ－ＲＩＫＥＮ－１Ａ株、ＨｉＰＳ－ＲＩＫＥＮ－２Ａ株、ＨｉＰＳ－ＲＩＫＥＮ－１２Ａ株、Ｎｉｐｓ－Ｂ２株、京都大学のＦｆ－ＷＪ－１８株、Ｆｆ－Ｉ０１ｓ０１株、Ｆｆ－Ｉ０１ｓ０２株、Ｆｆ－Ｉ０１ｓ０４株、Ｆｆ－Ｉ０１ｓ０６株、Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０３株、Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０４株、ＱＨＪＩ０１ｓ０１株、ＱＨＪＩ０１ｓ０４株、ＱＨＪＩ１４ｓ０３株、ＱＨＪＩ１４ｓ０４株、ＲＷＭＨ１５ｓ０２株、Ｆｆ－ＭＨ１５ｓ０２株、２５３Ｇ１株、２０１Ｂ７株、４０９Ｂ２株、４５４Ｅ２株、６０６Ａ１株、６１０Ｂ１株、６４８Ａ１株、ＣＤＩ社のＭｙＣｅｌｌ ｉＰＳ Ｃｅｌｌｓ（２１５２５．１０２．１０Ａ）株、ＭｙＣｅｌｌ ｉＰＳ Ｃｅｌｌｓ（２１５２６．１０１．１０Ａ）株、等が挙げられる。

【０１０７】

本明細書において「胚体内胚葉細胞」とは、ＳＯＸ１７、ＦＯＸＡ２、ＢＭＰ２、ＣＥＲ、及びＣＸＣＲ４の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

【０１０８】

本明細書において「原腸管細胞」とは、ＨＮＦ１Ｂ、及びＨＮＦ４Ａの少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

【０１０９】

本明細書において「後方前腸細胞」とは、ＰＤＸ－１、ＨＮＦ６、及びＨＬＸＢ９の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

【０１１０】

本明細書において「膵前駆細胞」とは、ＰＤＸ－１、ＮＫＸ６．１、ＰＴＦ－１α、ＧＡＴＡ４及びＳＯＸ９の少なくとも一つのマーカーの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。

【０１１１】

本明細書において「内分泌前駆細胞」とは、クロモグラニンＡ、ＮｅｕｒｏＤ及びＮｇｎ３の少なくとも一つのマーカーの発現、及び膵関連のホルモン系（例えば、インスリン等）のマーカーが発現していないことによって特徴付けられる細胞を意味する。内分泌前駆細胞は、Ｐａｘ－４、ＮＫＸ２－２、Ｉｓｌｅｔ－１、ＰＤＸ－１、ＰＴＦ－１αなどのマーカーが発現していてもよい。

【０１１２】

各分化段階にある細胞の製造は、下に詳述する手法により行うことができる。

【０１１３】

２．インスリン産生細胞

本発明の「インスリン産生細胞」とは、ｉｎ ｖｉｔｒｏにて多能性幹細胞を分化誘導して得られたインスリンの発現によって特徴付けられる細胞を意味する。より詳細には、本発明の「インスリン産生細胞」は、インスリン及びＮＫＸ６．１の両方のマーカーを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陽性の細胞）を約３０％以上の割合で含み、かつマーカーとしてインスリン及びＮＫＸ６．１のうちインスリンのみを発現する細胞（すなわち、インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞、以下、「Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞」と記載する）を約１５％超の割合で含むことによって特徴付けられる。なお、本明細書中、「インスリン陽性」を「Ｉｎｓ＋」、ＮＫＸ６．１陽性を「ＮＫＸ＋」、ＮＫＸ６．１陰性を「ＮＫＸ－」と記載する場合がある。また、「インスリン陽性かつ

ＮＫＸ６．１陽性の細胞」を「Ｉｎｓ＋ＮＫＸ＋細胞」、「インスリン陽性かつＮＫＸ６．１陰性の細胞」を「Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞」と記載する場合がある。

【０１１４】

インスリン産生細胞における、Ｉｎｓ＋ＮＫＸ＋細胞の割合の上限は特に限定されないが、好ましくは約５０％以下とすることができる。

【０１１５】

インスリン産生細胞における、Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞の割合は好ましくは約２０％以上、より好ましくは約２５％以上、さらに好ましくは約３０％以上とすることができる。また、インスリン産生細胞における、Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞の割合の上限は特に限定されないが、好ましくは約４０％以下とすることができる。

【０１１６】

例えば、インスリン産生細胞は、Ｉｎｓ＋ＮＫＸ＋細胞を約３０％以上、約５０％以下の割合で含み、かつＩｎｓ＋ＮＫＸ－細胞を約１５％超、約４０％以下の割合、好ましくは、約２０％以上、約４０％以下の割合、より好ましくは約２５％以上、約４０％以下の割合、さらに好ましくは約３０％以上、約４０％以下の割合で含む。

【０１１７】

なお、本明細書中、インスリン産生細胞における所定の細胞の割合とは、インスリン産生細胞に含まれる全細胞数に対する割合を意味する。また、各細胞の割合は、膵島様細胞への分化誘導に付される（すなわち、生体内への移植に付される）インスリン産生細胞における値を示す。

【０１１８】

Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞は、成熟していない（分化段階の早い）インスリン産生細胞に多く見られることから、Ｉｎｓ＋ＮＫＸ－細胞の割合が高いほど、より成熟していない（分化段階の早い）インスリン産生細胞であることを示す。

【０１１９】

インスリン産生細胞はさらに、以下のａ．～ｆ．　：

ａ．　ＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量が低いこと、

ｂ．　Ｋｉ６７陽性細胞の割合が低いこと、

ｃ．　グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと、

ｄ．　グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと、

ｅ．　クロモグラニンＡ陽性細胞の割合が高いこと、

ｆ．　アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと、

から選択される一又は複数により特徴付けることができる。ここで「複数」とは、２，３，４，５又は６を意味する。

【０１２０】

ａ．　ＭａｆＡ遺伝子又はその遺伝子産物の発現量が低いこと

本発明のインスリン産生細胞は、ＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量が、膵島におけるＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量と比べて低いことを特徴とする。

【０１２１】

「膵島」とは、インスリン産生細胞よりも分化段階が進んだ細胞を意味し、成熟した膵β細胞を含み、成熟した膵β細胞のマーカーであるＭａｆＡ、ＵＣＮ３、及びＩＡＰＰの少なくとも一つの発現により特徴付けられる細胞である。膵島は、健常人より単離されたものを用いることができる。

【０１２２】

インスリン産生細胞と膵島間のＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量の比較は、当該分野で公知の手法を用いて行うことができ、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、マイクロアレイ、バイオチップ、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、免疫染色、フローサイトメトリー等の手法を用いて検出・定量されたＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量を、内部標準遺伝子又はそのタンパク質の発現量で補正して得られた相対値を比較することにより行うことができる。「内部標準遺伝子」は特に限定されないが、例えば、ＧＡＰＤＨ（ｇｌ

ｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ）、β－アクチン、β２－マイクログロブリン、ＨＰＲＴ　１（ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ　１）等を利用することができる。

【０１２３】

インスリン産生細胞におけるＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量は、膵島におけるＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質の発現量の約２０％以下、好ましくは約１５％以下、より好ましくは約１０％以下、さらに好ましくは約５％以下、とりわけ好ましくは約１％以下である。

【０１２４】

ＭａｆＡ遺伝子又はそのタンパク質は成熟した膵β細胞のマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、成熟した膵β細胞をほとんど含まないか、低い割合で含む程度の分化段階にあることを示す。

【０１２５】

ｂ．　Ｋｉ６７陽性細胞の割合が低いこと

本発明のインスリン産生細胞は、Ｋｉ６７陽性細胞を３％未満の割合で含むことを特徴とする。

【０１２６】

「Ｋｉ６７陽性細胞」とは、多能性幹細胞から分化誘導されたインスリン産生細胞中に混在する、マーカーとしてＫｉ６７の発現によって特徴付けられる増殖性の高い細胞を意味する。「Ｋｉ６７」は細胞周期関連核タンパク質として公知であり、増殖中の細胞のＧ１期、Ｓ期、Ｇ２期、Ｍ期において発現が認められ、増殖を休止しているＧ０期においては発現が認められないため、細胞増殖と細胞周期のマーカーとしても知られている。

【０１２７】

以下、本明細書中において「Ｋｉ６７陽性」を「Ｋｉ６７＋」と記載する場合がある。また、「Ｋｉ６７陽性細胞」を「Ｋｉ６７＋細胞」と記載する場合がある。

【０１２８】

インスリン産生細胞におけるＫｉ６７＋細胞の割合は、約３％未満、約１．５％未満、好ましくは約１％未満、より好ましくは約０．８％未満、さらに好ましくは約０．５％未満である。

【０１２９】

本特徴は本発明のインスリン産生細胞において、Ｋｉ６７＋細胞の混入・残存がほとんどないか、低い割合であることを示す。Ｋｉ６７＋細胞はその増殖性の高さから、レシピエントへの悪影響や移植された細胞の長期の生着に影響を及ぼす虞があり、その混入・残存は好ましくない場合がある。

【０１３０】

ｃ．　グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞の割合が低いこと

本発明のインスリン産生細胞は、グルカゴン陽性かつＩｎｓ－細胞を３％未満の割合で含むことを特徴とする。以下、本明細書中において「グルカゴン陽性」を「Ｇｃｇ＋と記載する場合がある。また、「グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞」を「Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞」と記載する場合がある。

【０１３１】

インスリン産生細胞におけるＧｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞の割合は、約２．５％以下、好ましくは約２％以下、より好ましくは約１％以下、さらに好ましくは約０．５％以下である。

【０１３２】

Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－は成熟した膵α細胞のマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、成熟した膵α細胞をほとんど含まないか、低い割合で含む程度の分化段階にあることを示す。

【０１３３】

ｄ．　グルコース刺激性インスリン分泌応答を示すこと

本発明のインスリン産生細胞は、グルコース刺激性インスリン分泌（ＧＳＩＳ：Ｇｌｕ

ｃｏｓｅ Ｓｔｉｍｕｌａｔｅｄ Ｉｎｓｕｌｉｎ Ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ）応答を示す。
インスリン産生細胞におけるＧＳＩＳ応答は、従来公知の手法（例えば、米国出願第１１／７７３，９４４号）に準じて行うことができ、例えば、培地中に分泌されるＣ－ペプチドの量を測定することにより評価することができる。Ｃ－ペプチドは、プロインスリンの成熟化の間に、インスリンに対して等モル量にて産生される分解産物である。Ｃ－ペプチドの量を測定は、例えば、抗Ｃ－ペプチドモノクローナル抗体を用いたＥＬＩＳＡにより行うことができる。

【０１３４】

ｅ． クロモグラニンＡ陽性細胞の割合が高いこと

本発明のインスリン産生細胞は、クロモグラニンＡ陽性細胞を約４５％超の割合で含むことを特徴とする。

【０１３５】

以下、本明細書中において「クロモグラニンＡ陽性」を「Ｃｈｇａ＋と記載する場合がある。また、「クロモグラニンＡ陽性細胞」を「Ｃｈｇａ＋細胞」と記載する場合がある。

【０１３６】

インスリン産生細胞における、Ｃｈｇａ＋細胞の割合は好ましくは約５０％以上（例えば、約５５％以上）、より好ましくは約６０％以上、より好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、とりわけ好ましくは約９０％以上とすることができる。インスリン産生細胞におけるＣｈｇａ＋細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約９５％未満、約９９％未満とすることができる。インスリン産生細胞における、Ｃｈｇａ＋細胞の割合は、約９３％以上であってもよい。

【０１３７】

Ｃｈｇａ＋細胞にはインスリン等のホルモンを分泌する細胞（内分泌細胞）が含まれ、これには上記Ｉｎｓ＋ＮＫＸ＋細胞やＩｎｓ＋ＮＫＸ－細胞も含まれる。したがって、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、内分泌細胞を高い割合で含むことを示す。

【０１３８】

ｆ． アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合が低いこと

本発明のインスリン産生細胞は、アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞を約０．０１％未満の割合で含むことを特徴とする。

【０１３９】

インスリン産生細胞における、アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞の割合は好ましくは約０．００８％以下、より好ましくは約０．００５％以下、さらに好ましくは約０．００１％以下とすることができる。

【０１４０】

アルカリフォスファターゼは多能性幹細胞の未分化状態を示すマーカーであることから、本特徴は本発明のインスリン産生細胞が、分化誘導されていない目的外の多能性幹細胞をほとんど含まないか、低い割合で含むことを示す。

【０１４１】

アルカリフォスファターゼ陽性の多能性幹細胞は、多能性を示す他のマーカーをさらに発現していてもよい。多能性幹細胞の多能性を示す他のマーカーとしては、Ｎａｎｏｇ、Ｓｏｘ２、ＳＳＥＡ－１、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１等から選択される少なくとも一つを利用することができる。

【０１４２】

本発明のインスリン産生細胞は、凍結保存された状態であってもよい。凍結保存された本発明のインスリン産生細胞は解凍して、凍結保存に付されたことのない新鮮なインスリン産生細胞と同様に、膵島様細胞へと分化・成熟し、ホルモン分泌することができる。凍結保存及び解凍は、当該分野で通常用いられる手法により行うことができる。

【０１４３】

本発明のインスリン産生細胞の製造は、下に詳述する手法により行うことができる。

【０１４４】

３．膵島様細胞

本明細書において「膵島様細胞」とは、上述のインスリン産生細胞を分化誘導して得られる成熟細胞を意味しており、生体内での膵発生にて得られる「膵島」と同様に、膵β細胞の成熟マーカーであるＭａｆＡ、ＵＣＮ３、及びＩＡＰＰの少なくとも一つのマーカーを発現すること、また、膵α細胞の成熟マーカーであるグルカゴンを発現することによって特徴付けられる細胞を意味する。

【０１４５】

より詳細には、本明細書において「膵島様細胞」は、以下の（ａ）～（ｄ）：

（ａ）クロモグラニンＡ陽性細胞（Ｃｈｇａ＋細胞）の割合が高いこと、

（ｂ）Ｋｉ６７陽性細胞（Ｋｉ６７＋細胞）の割合が低いこと、

（ｃ）グルカゴン陽性かつインスリン陰性細胞（Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞）の割合が高いこと、

（ｄ）低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること、

から選択される一又は複数により特徴付けることができる。ここで「複数」とは、２，３，又は４を意味する。

（ａ）～（ｄ）の特徴の有無は、インスリン産生細胞を分化誘導してから（例えば、生体内に移植してから）、１週間以降、好ましくは２週間以降に評価することができ、この期間の上限は特に限定されないが１年以内とすることとができる。また、膵島様細胞における所定の細胞の割合とは、移植片に由来する細胞塊の全細胞数に対する割合を意味する。

【０１４６】

（ａ）Ｃｈｇａ＋細胞の割合が高いこと

本発明の膵島様細胞は、Ｃｈｇａ＋細胞を約５０％以上の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Ｃｈｇａ＋細胞の割合は約６０％以上であり、より好ましくは約７０％以上、よりさらに好ましくは約９０％以上、とりわけ好ましくは約９５％以上（例えば、約９７％以上、約９８％以上）である。

【０１４７】

Ｃｈｇａ＋細胞にはインスリンやグルカゴン等のホルモンを分泌する細胞（内分泌細胞）が含まれ、本特徴は膵島様細胞が、内分泌細胞を高い割合で含むことを示す。

【０１４８】

（ｂ）Ｋｉ６７＋細胞の割合が低いこと

本発明の膵島様細胞は、Ｋｉ６７陽性細胞を約３％未満の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Ｋｉ６７陽性細胞の割合は約１％未満、より好ましくは約０．８％未満、さらに好ましくは約０．５％未満である。

【０１４９】

本特徴は膵島様細胞において、その混入・残存が好ましくない場合があるＫｉ６７＋細胞はほとんどないか、非常に低い割合であることを示す。

【０１５０】

（ｃ）Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞の割合が高いこと

本発明の膵島様細胞は、Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞を約１０％以上の割合で含むことを特徴とする。好ましくは、膵島様細胞における、Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞の割合は約１５％以上であり、より好ましくは約２０％以上、よりさらに好ましくは約２５％以上である。膵島様細胞におけるＧｃｇ＋Ｉｎｓ－細胞の割合の上限は特に限定されないが、例えば、約５０％以下、好ましくは約４５％以下、より好ましくは約４０％以下とすることができる。

【０１５１】

Ｇｃｇ＋Ｉｎｓ－は成熟した膵α細胞のマーカーであることから、膵島様細胞が、成熟した膵α細胞をインスリン産生細胞よりも高い割合で含むことを示す。膵島様細胞が、インスリン産生細胞よりも成熟した分化段階にあることを示す。

【０１５２】

（ｄ）低血糖に応答したインスリン分泌作用を有すること

本発明の膵島様細胞は、低血糖に応答したインスリン分泌作用を有することを特徴とす

る。「低血糖に応答したインスリン分泌作用」とは、低血糖時から１時間以内、２時間以内、３時間以内、４時間以内、又は５時間以内にインスリン分泌量が増加することを意味する。「低血糖」とは血中又は培地中のグルコース濃度が、約７０ｍｇ／ｄＬ以下である場合を意味する。インスリン分泌量の測定は従来公知の任意の手段で行うことができ、特に限定はされないが、血中又は培地中のＣ－ペプチド量を測定することにより行うことができる。

【０１５３】

通常、生体内では低血糖になると、グルカゴン等の分泌により血糖値の上昇が促されると共に、グルカゴンに拮抗してインスリンが分泌され、血糖値レベルがコントロールされる。本発明の膵島様細胞は同様に、低血糖に対する血糖値レベルのコントロールを可能とするものであり、低血糖に応答して血糖値の上昇を促すと共に、これに拮抗してインスリンを分泌する作用を有する。

【０１５４】

４．細胞の製造方法

本発明のインスリン産生細胞は、多能性幹細胞より分化誘導して得ることができる。多能性幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導は、以下の分化誘導工程を利用して行うことができる：

工程１）多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞へと分化誘導する；

工程２）胚体内胚葉細胞から原腸管細胞へと分化誘導する；

工程３）原腸管細胞から後方前腸細胞へと分化誘導する；

工程４）後方前腸細胞から膵前駆細胞へと分化誘導する；

工程５）膵前駆細胞から内分泌前駆細胞へと分化誘導する；

工程６）内分泌前駆細胞からインスリン産生細胞へと分化誘導する。

以下、各工程を説明するが、各細胞への分化誘導はこれらの手法に限定されない。

【０１５５】

工程１）胚体内胚葉細胞への分化

多能性幹細胞は、低用量のアクチビンＡを含む培地中で培養して、胚体内胚葉細胞に分化させる。

【０１５６】

本工程で用いる培地としては、ＲＰＭＩ培地、ＭＥＭ培地、ｉＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＭＥＭ Ｚｉｎｃ Ｏｐｔｉｏｎ培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＭＥＭ／１％Ｂ－２７サプリメント／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ培地、ＭＣＤＢ１３１／２０ｍＭ Ｇｌｕｃｏｓｅ／$NaHCO_3$／ＦＡＦ－ＢＳＡ／ＩＴＳ－Ｘ／Ｇｌｕｔａｍａｘ／アスコルビン酸／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ培地など、哺乳類細胞の培養に使用される基本培地を使用することができる。

【０１５７】

アクチビンＡは培地中に低用量にて、例えば、５～１００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは５～５０ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは５～１０ｎｇ／ｍＬの量にて含めることができる。

【０１５８】

培地にはさらに、ＲＯＣＫ阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤を添加することができる。

【０１５９】

ＧＳＫ３β阻害剤の培地中の濃度は、用いるＧＳＫ３β阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばＧＳＫ３β阻害剤としてＣＨＩＲを使用する場合の濃度は、通常２～５μＭ、好ましくは２～４μＭ、特に好ましくは約３μＭである。

【０１６０】

ＲＯＣＫ阻害剤の培地中の濃度は、用いるＲＯＣＫ阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばＲＯＣＫ阻害剤としてＹ２７６３２を使用する場合の濃度は、通常５～２０μＭ、好ましくは５～１５μＭ、特に好ましくは約１０μＭである。

【０１６１】

培地にはさらに、インスリンを添加することができる。インスリンは培地中に０．０１～２０μＭ、好ましくは０．１～１０μＭ、より好ましくは０．５～５μＭの量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したＢ－２７サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

【０１６２】

培養開始時の細胞数としては、特に限定されず、２２０００～１５００００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2、好ましくは２２０００～１０００００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2、より好ましくは２２０００～８００００ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}である。培養期間は１日～４日、好ましくは１日～３日、特に好ましくは３日である。

【０１６３】

培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。

【０１６４】

あるいは、本発明において胚体内胚葉細胞は、低用量のアクチビンＡの存在下、多能性幹細胞を、インスリンが作用する条件下の培地中で第１の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第２の培養を行うことにより製造することができる。

【０１６５】

（１）第１の培養

「インスリンが作用する条件」とは、インスリンによって細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる条件を意味する。通常、インスリンは、細胞膜表面上に存在するインスリンレセプターと結合し、レセプターに内在するチロシンキナーゼを活性化させ、インスリンレセプター基質タンパクファミリー（ＩＲＳ：ＩＲＳ－１，２，３）をチロシンリン酸化する。本明細書においては、インスリンとインスリンレセプターとの結合により開始されるこれら一連の反応が生じることを、「インスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる」という。

【０１６６】

インスリンが作用する条件としては、例えば、培地中にインスリンを含む場合が挙げられる。インスリンは、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路を活性化できるものであればよく、組換え法で製造したものであっても、固相合成法で合成して製造したものであってもよい。インスリンは、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット等に由来するものを利用することができるが、好ましくはヒトインスリンである。

【０１６７】

本発明においては、多能性幹細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じる限り、インスリン変異体、インスリン誘導体又はインスリンアゴニストも、「インスリン」として用いることができる。「インスリン変異体」とは、インスリンのアミノ酸配列において１～２０個、好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドや、インスリンのアミノ酸配列と８０％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドを有するものが挙げられる。アミノ酸配列の比較は公知の手法によって行うことができ、例えば、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ ａｔ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール））等を例えば、デフォルトの設定で用いて実施できる。「インスリン誘導体」とは、インスリン又はインスリン変異体のアミノ酸残基の一部の基が化学的に置換（例えば、α－メチル化、α－ヒドロキシル化）、欠失（例えば、脱アミノ化）、又は修飾（例えば、Ｎ－メチル化）されたアミノ酸配列からなり、かつインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドまたは同様

の作用を有する物質を意味する。「インスリンアゴニスト」とは、インスリンの構造に関係なく、インスリンレセプターと結合してインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じることが可能なポリペプチドまたは同様の作用を有する物質を意味する。

【０１６８】

第１の培養の培地には、インスリンを０．０１～２０μＭ、好ましくは０．１～１０μＭ、より好ましくは０．５～５μＭの量で含めることができる。培地中のインスリンの濃度は、添加したＢ－２７サプリメントに含まれるインスリンの濃度であってもよいが、これに限定されない。

【０１６９】

培地にはさらに、ＲＯＣＫ阻害剤、及び／又はＧＳＫ３β阻害剤を含めることができる。ＲＯＣＫ阻害剤の培地中の濃度は、用いるＲＯＣＫ阻害剤の種類によって適宜設定されるが、例えばＲＯＣＫ阻害剤としてＹ－２７６３２を使用する場合の濃度は、通常５～２０μＭ、好ましくは５～１５μＭ、特に好ましくは約１０μＭとすることができる。ＧＳＫ３β阻害剤の培地中の濃度は、用いるＧＳＫ３β阻害剤の種類によって適宜設定され、例えばＧＳＫ３β阻害剤としてＣＨＩＲを使用する場合の濃度は、通常２～５μＭ、好ましくは２～４μＭ、特に好ましくは約３μＭとすることができる。

【０１７０】

培地にはさらに、ピルビン酸塩（ナトリウム塩等）、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。ピルビン酸塩は培地中に、１０～１０００ｍｇ／Ｌ、好ましくは３０～５００ｍｇ／Ｌ、より好ましくは５０～２００ｍｇ／Ｌ、特に好ましくは約１１０ｍｇ／Ｌの量で含めることができる。Ｌ－アラニルＬ－グルタミンは培地中に、５０～２０００ｍｇ／Ｌ、好ましくは１００～１５００ｍｇ／Ｌ、より好ましくは５００～１０００ｍｇ／Ｌ、特に好ましくは約８６０ｍｇ／Ｌの量で含めることができる。グルコースは培地中に、１５ｍＭ以上、好ましくは１５～３０ｍＭ、より好ましくは１５～２５、特に好ましくは約２５ｍＭの量で含めることができる。培地中のピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン及びグルコースの濃度は、ＤＭＥＭ培地（ＤＭＥＭ，ｈｉｇｈ ｇｌｕｃｏｓｅ，ＧｌｕｔａＭＡＸ^{TM}，ｐｙｒｕｖａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））またはその他のＤＭＥＭ培地に含まれるピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン及びグルコースの濃度であってもよいが、これに限定されない。

【０１７１】

培地は、上記基本培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものを用いることができる。基本培地としては、好ましくはＤＭＥＭ培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むＤＭＥＭ培地である。

【０１７２】

第１の培養の培養期間は６時間～４８時間、好ましくは１２～２４時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。培養は２次元培養及び３次元培養のいずれで行ってもよい。培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、２次元培養であれば、５万～１００万細胞個／ｃｍ^2、好ましくは１５万～３０万細胞個／ｃｍ^2、より好ましくは約２０万細胞個／ｃｍ^{2}とすることができる。また、培養開始時の細胞数は、特に限定されないが、３次元培養であれば、１万～１００万細胞個／ｍＬ、好ましくは１０万～５０万細胞個／ｍＬとすることができる。

【０１７３】

（２）第２の培養

「インスリンが作用しない条件」とは、インスリンによる細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない条件を意味する。「細胞におけるインスリンシグナル伝達経路の活性化を生じない」とは、当該インスリンシグナル伝達経路の活性化が全く生じないことを意味するだけでなく、インスリン非存在下における当該インスリンシグナル伝

達経路の活性化と比べて有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない場合も意味するものである。したがって、「インスリンが作用しない条件」とは、例えば、培地中にインスリンが含まれないこと、あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、その量が前記有意な差が認められない程度のわずかな活性化しか生じない量で含まれる条件が挙げられる。あるいは、培地中にインスリンが含まれる場合であっても、一緒にインスリンシグナル阻害剤を含むことによって、前記インスリンシグナル伝達経路の活性化が生じない場合も意味する。「インスリンシグナル阻害剤」は、インスリンシグナル伝達経路をいずれかの位置で遮断することが可能な成分を意味する。このようなインスリンシグナル阻害剤としては、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質等に結合して又は競合し、これら因子が関与する分子間の相互作用を阻害するポリペプチドや化合物等が挙げられる。例えば、このようなインスリンシグナル阻害剤としては、ＰＩ３キナーゼの触媒サブユニットへのＡＴＰ結合を競合阻害するＬＹ２９４００２［２－（４－モルホリニル）－８－フェニル－４Ｈ－１－ベンゾピラン－４－オン］等が挙げられる。インスリンシグナル阻害剤はこれらに限定されるものではなく、インスリン、インスリンレセプター、シグナル伝達物質として作用する各種タンパク質に結合する抗体やそれらのドミナントネガティブ型変異体、ならびにインスリンレセプターやシグナル伝達物質として作用する各種タンパク質のｍＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやｓｉＲＮＡ等もインスリンシグナル阻害剤として使用することができる。インスリンシグナル阻害剤は、商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

【０１７４】

培地にはさらに、ＲＯＣＫ阻害剤、及び／又はＧＳＫ３β阻害剤を含めることができる。培地中のＲＯＣＫ阻害剤、及び／又はＧＳＫ３β阻害剤の量は上記第１の培養において記載した範囲より選択することができ、第１の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なっていてもよい。

【０１７５】

培地にはさらに、ピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン、及びグルコースからなる群から選択される一以上を含めることができる。培地中のピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン、及びグルコースの量は上記第１の培養において記載した範囲より選択することができ、第１の培養にて用いられるのと同じ量であってもよいし、異なっていてもよい。

【０１７６】

第２の培養で用いる培地培地は、哺乳類細胞の培養に使用される基本培地をベースとし上記成分の一又はそれ以上を添加したものを用いることができる。基本培地としては、上記第１の培養において記載したものを用いることができ、第１の培養にて用いられるものと同じ基本培地であってもよいし、異なっていてもよい。好ましくは、ＤＭＥＭ培地であり、より好ましくはピルビン酸塩、Ｌ－アラニルＬ－グルタミン、及びグルコースを上記の量で含むＤＭＥＭ培地である。

【０１７７】

第２の培養の培養期間は少なくとも６時間、好ましくは６～７２時間、さらに好ましくは２４時間～７２時間より選択される範囲とすることができる。培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。培養は２次元培養及び３次元培養のいずれで行ってもよい。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。

第１の培養及び第２の培養の培地には、アクチビンＡを上記低用量にて含めることができる。第１の培養及び第２の培養の培地に含まれるアクチビンＡの量は同じ量であってもよいし、異なっていてもよい。

【０１７８】

第１の培養及び第２の培養の培地にはさらに、ジメチルスルホキシドを添加してもよい。

【０１７９】

多能性幹細胞を、低用量のアクチビンＡの存在下にて培養を行うことによって、あるい

は、多能性幹細胞を、低用量のアクチビンＡの存在下、インスリンが作用する条件下の培地中で第１の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下の培地中で第２の培養を行うことによって、工程６）以降にて、得られる内分泌細胞の割合を高めることができる。

【０１８０】

工程２）原腸管細胞への分化

工程１）で得られた胚体内胚葉細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して原腸管細胞に分化誘導する。培養期間は２日～８日、好ましくは約４日である。

【０１８１】

培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。

【０１８２】

培地は、上記工程１）にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

【０１８３】

増殖因子としては、ＥＧＦ、ＫＧＦ、ＦＧＦ１０が好ましく、ＥＧＦ及び／又はＫＧＦがより好ましく、ＫＧＦがさらに好ましい。

【０１８４】

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約０．１ｎＭ～１０００μＭ、好ましくは約０．１ｎＭ～１００μＭである。ＥＧＦの場合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～３２０ｎＭ）、好ましくは約５～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～１６０ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約１．６～１６０ｎＭ）である。ＦＧＦ１０の場合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．３～１１６ｎＭ）、好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）である。例えば増殖因子としてＫＧＦを使用する場合の濃度は、通常５～１５０ｎｇ／ｍＬ、好ましくは３０～１００ｎｇ／ｍＬ、特に好ましくは約５０ｎｇ／ｍＬである。

【０１８５】

工程３）後方前腸細胞への分化

工程２）で得られた原腸管細胞を、さらに増殖因子、シクロパミン、ノギン等を含む培地で培養し、後方前腸細胞に分化誘導する。培養期間は１日～５日、好ましくは約２日程度である。

【０１８６】

培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。

【０１８７】

培地は、上記工程１）にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

【０１８８】

増殖因子としては、ＥＧＦ、ＫＧＦ、ＦＧＦ１０が好ましく、ＥＧＦ及び／又はＫＧＦがより好ましく、ＫＧＦがさらに好ましい。

【０１８９】

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約０．１ｎＭ～１０００μＭ、好ましくは約０．１ｎＭ～１００μＭである。ＥＧＦの場合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～３２０ｎＭ）、好ましくは約５～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～１６０ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約１．６～１６０ｎＭ）である。ＦＧＦ１０の場

合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．３～１１６ｎＭ）、好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）である。例えば増殖因子としてＫＧＦを使用する場合の濃度は、通常５～１５０ｎｇ／ｍＬ、好ましくは３０～１００ｎｇ／ｍＬ、特に好ましくは約５０ｎｇ／ｍＬである。

【０１９０】

シクロパミンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常０．５～１．５μＭ、好ましくは０．３～１．０μＭ、特に好ましくは約０．５μＭである。

【０１９１】

ノギンの培地中の濃度は、特に限定するものではないが、通常１０～２００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、特に好ましくは約１００ｎｇ／ｍＬである。

【０１９２】

また培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。

【０１９３】

工程４）膵前駆細胞への分化

工程３）で得られた後方前腸細胞を、さらにＣＤＫ８／１９阻害活性を有する因子を含む培地、好ましくはＣＤＫ８／１９阻害活性を有する因子と増殖因子を含む培地で培養し、膵前駆細胞に分化誘導してもよい。培養期間は２日～１０日、好ましくは約５日程度である。

【０１９４】

工程３）で得られた後方前腸細胞を、既報（Ｔｏｙｏｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２０１５）１４，１８５－１９７）に従い、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡで処理後にピペッティングすることにより分散し、０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡを遠心分離して懸濁した後、工程４）の新しい培地に再播種する。

【０１９５】

培地は、工程１）と同様に、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、増殖因子のほか、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。

【０１９６】

ＣＤＫ８／１９阻害活性を有する因子としては、前述した各種化合物又はその塩を用いることができ、用いる化合物又はその塩に応じて、培地への添加量は適宜決定されるが、通常約０．００００１μＭ－５μＭ、好ましくは０．００００１μＭ－１μＭである。ＣＤＫ８／１９阻害活性を有する因子の培地中の濃度としては、ＣＤＫ８／１９に対して５０％以上の阻害活性に達する濃度が好ましい。

【０１９７】

増殖因子としては、ＥＧＦ、ＫＧＦ、ＦＧＦ１０が好ましく、ＫＧＦ及び／又はＥＧＦがより好ましく、ＫＧＦ及びＥＧＦがさらに好ましい。

【０１９８】

増殖因子の培地中の濃度は、用いる増殖因子の種類によって適宜設定されるが、通常約０．１ｎＭ～１０００μＭ、好ましくは約０．１ｎＭ～１００μＭである。ＥＧＦの場合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～３２０ｎＭ）、好ましくは約５～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．８～１６０ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約１．６～１６０ｎＭ）である。ＦＧＦ１０の場合、その濃度は、約５～２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．３～１１６ｎＭ）、好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）、より好ましくは約１０～１０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、約０．６～５８ｎＭ）である。例えば増殖因子としてＫＧＦ及びＥＧＦを使用する場合の濃度は、ＫＧＦは通常通常５～１５０ｎｇ／ｍＬ、好ましくは３０～１００ｎｇ／ｍＬ、特に好ましくは約５０ｎｇ／ｍＬ、ＥＧＦは通常１０～２００ｎｇ／ｍＬ、好ましくは５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、特に好ましくは約１００ｎｇ／ｍＬである。

【０１９９】
工程４）における培養の最初の１日はＲＯＣＫ阻害剤の存在下で行い、以後はＲＯＣＫ阻害剤を含まない培地で培養してもよい。
【０２００】
また、培地にはＰＫＣ活性化剤を含めても良い。ＰＫＣ活性化剤としては、ＰｄＢＵ（ＰＫＣ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ＩＩ）、ＴＰＢ（ＰＫＣ ａｃｔｏｖａｔｏｒ Ｖ）などを使用するが、その限りでない。アクチビンＡの濃度は約０．１～１００ｎｇ／ｍｌ、好ましくは約１～５０ｎｇ／ｍｌ、より好ましくは約３～１０ｎｇ／ｍｌで添加する。
【０２０１】
また、培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。
【０２０２】
いずれの工程においても、培地には、上記した成分のほか、血清代替物（例えば、Ｂ－２７サプリメント、ＩＴＳ－Ｇ）を添加してもよい。また、必要に応じて、アミノ酸、Ｌ－グルタミン、ＧｌｕｔａＭＡＸ（製品名）、非必須アミノ酸、ビタミン、抗生物質（例えば、Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ（本明細書中、ＡＡと称することがある）、ペニシリン、ストレプトマイシン、又はこれらの混合物）、抗菌剤（例えば、アンホテリシンＢ）、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を添加してもよい。培地に抗生物質を添加する場合には、その培地中の濃度は通常０．０１～２０重量％、好ましくは０．１～１０重量％である。
【０２０３】
また細胞培養は、フィーダー細胞を使用せず、接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、ＯｐｔｉＣｅｌｌ（製品名）（Ｎｕｎｃ社）等の細胞培養シートなどの培養容器が使用される。培養容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、コラーゲン、ゼラチン、ポリ－Ｌ－リジン、ポリ－Ｄ－リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル（例：ＢＤマトリゲル（日本ベクトン・デッキンソン社））、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていることが好ましい。培養容器としては、Ｔｙｐｅ Ｉ－ｃｏｌｌａｇｅｎ、マトリゲル、フィブロネクチン、ビトロネクチン又はポリ－Ｄ－リジンなどでコートされた培養容器が好ましく、マトリゲル又はポリ－Ｄ－リジンでコートされた培養容器がより好ましい。
【０２０４】
培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。
【０２０５】
工程５）内分泌前駆細胞への分化
工程４）で得られた膵前駆細胞を、さらに増殖因子を含む培地で培養して内分泌前駆細胞に分化誘導する。培養期間は２日～３日、好ましくは約２日である。
【０２０６】
培地は、上記工程１）にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１４；３２：１１２１－１１３３）に従い、ＳＡＮＴ１、レチノイン酸、ＡＬＫ５インヒビターＩＩ、Ｔ３、ＬＤＮを添加し、さらに、Ｗｎｔ阻害薬、ＲＯＣＫ阻害剤、ＦＧＦ（好ましくはＦＧＦ２）、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。また、培地にはジメチルスルホキシドを添加してもよい。
【０２０７】
また細胞培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート（Ｎｕｎｃ社）等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。
【０２０８】
培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培

養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。
【０２０９】
工程６）インスリン産生細胞への分化
工程５）で得られた内分泌前駆細胞を、さらにＦＧＦＲ１阻害剤を含む培地で培養してインスリン産生細胞に分化誘導する。培養期間は１４日～３０日、好ましくは約１４～２０日である。
【０２１０】
培地は、上記工程１）にて記載される、哺乳類細胞の培養に用いられる基本培地を用いることができる。培地には、既報（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１４；３２：１１２１－１１３３）に従い、ＡＬＫ５インヒビターＩＩ、Ｔ３、ＬＤＮ、γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ阻害剤ＸＸ、γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ阻害剤ＲＯ、Ｎ－システイン、ＡＸＬインヒビター、アスコルビン酸を添加し、さらに、Ｗｎｔ阻害薬、ＲＯＣＫ阻害剤、ＦＧＦ（好ましくはＦＧＦ２）、血清代替物、ビタミン、抗生物質等を適宜添加してもよい。例えば、培地にはＡＬＫ５インヒビターＩＩ、Ｔ３、ＬＤＮ、γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ阻害剤ＲＯ、及びアスコルビン酸を添加してもよく、あるいはＴ３、ＡＬＫ５インヒビターＩＩ、$ZnSO_4$、ヘパリン、Ｎ－アセチルシステイン、Ｔｒｏｌｏｘ、及びＲ４２８を添加してもよい。
【０２１１】
また細胞培養は、フィーダー細胞を使用せず、非接着培養にて行う。培養時には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、多孔プレート（Ｎｕｎｃ社）等あるいはバイオリアクターが使用される。培養容器は、細胞との接着性を低下させるための表面処理されていることが好ましい。
【０２１２】
培養温度は、特に限定されないが、３０～４０℃（例えば、３７℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば５％程度である。
【０２１３】
培地には、ＦＧＦＲ１阻害剤を、ＦＧＦＲ１活性を阻害することが可能な任意の量にて含めることができ、例えば、１０μＭ以下、又は５μＭ以下の量にて、好ましくは５μＭ未満、４μＭ未満、３μＭ未満、２μＭ未満の量にて含めることができる。ＦＧＦＲ１阻害剤の添加量の下限は、特に限定されないが、０．１μＭ以上、好ましくは０．５μＭ以上とすることができる。ＦＧＦＲ１阻害剤の添加量は、好ましくは、５μＭ未満０．１μＭ以上であり、より好ましくは５μＭ未満０．５μＭ以上である。ＦＧＦＲ１阻害剤の存在下における培養は、少なくとも１２時間、好ましくは２４時間以上、２日以上、４日以上、８日以上、１０日以上、又は１５日以上行うことができる。ＦＧＦＲ１阻害剤の存在下における培養は、４日以上行うことが好ましい。例えば、工程６）の最後の約４～１５日、好ましくは最後の約４～７日間について、ＦＧＦＲ１阻害剤の存在下における培養を行うことができる。ＦＧＦＲ１阻害剤による処理期間中も培地の交換は可能であり、培養スケジュールにしたがって、ＦＧＦＲ１阻害剤が添加された交換前と同じ組成を有する培地又は異なる組成を有する培地と交換することができる。
ＦＧＦＲ１阻害剤を含む培地中で、細胞を培養することによって、得られるインスリン産生細胞におけるＫｉ６７陽性細胞の増殖を抑制することができる。
【０２１４】
工程６）で得られたインスリン産生細胞は、使用するまで凍結保存することができる。
【０２１５】
５．膵島様細胞への分化
本発明のインスリン産生細胞は、動物生体内に移植することによって膵島様細胞に分化誘導することができる。
【０２１６】
「動物」は哺乳動物が好ましく、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、モルモット等が挙げられるが、好まし

くはヒトである。
【０２１７】
移植は、細胞を一定の位置で固定できる生体内領域に行うことが好ましく、例えば、動物の皮下、腹腔内、腹膜上皮、大網、脂肪組織、筋肉組織や膵臓、腎臓等の各臓器の被膜下などに行うことできる。移植される細胞数は、移植対象の、年齢、体重、移植部位の大きさ等の要因により変化し得、特に限定されないが、例えば、１０×１０^{4}細胞～１０×１０^{11}細胞程度とすることができる。移植された細胞は、生体内環境において分化誘導され、膵島様細胞へと分化することができる。また、移植される細胞数、移植対象の年齢、体重、移植部位等の要因に応じて変化し得るが、移植してから１週間以降、好ましくは２週間以降には、移植されたインスリン産生細胞は膵島様細胞へと分化・成熟する。得られた膵島様細胞は、その後、回収されてもよいし、そのまま生体内に留置してもよい。
【０２１８】
６．用途
本発明のインスリン産生細胞は、そのまま、または薬理学的に許容される担体等と混合して医薬とすることにより、それを必要とする患者に対して、安全に投与することができる。
【０２１９】
「薬理学的に許容される担体」はインスリン産生細胞と共に生体内への移植を可能とし、移植されたインスリン産生細胞が膵島様細胞へと分化・成熟することを可能とするものであればよく、所望の剤形に応じたものを適宜利用することができる。例えば、「薬理学的に許容される担体」の例として、ハイドロゲルが挙げられる。ハイドロゲルは生体適合性及び／又は生分解性のポリマーからなるものが好ましく、このようなハイドロゲルとしては、アルギン酸、フィブロネクチン、ゼラチン、コラーゲン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸等）、ラミニン、ビトロネクチン、ならびにこれらの塩又はエステルから選択される一又は複数からなるものを利用することができる。例えば、ハイドロゲルとしてアルギン酸塩（例えば、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カルシウム、アルギン酸アンモニウム等）又はアルギン酸エステル（アルギン酸プロピレングリコールとも称される）を用いて調製されたアルギン酸を含むゲル（ＷＯ２０１０／０３２２４２、ＷＯ２０１１／１５４９４１）を好適に利用することができる。ハイドロゲルは、そのゲル中にインスリン産生細胞を分散させて用いることができる。
【０２２０】
また、インスリン産生細胞、又は医薬は、これらを収容可能なデバイス中に含めることができる。デバイスはインスリン産生細胞、又は医薬と共に生体内への移植を可能とし、移植されたインスリン産生細胞が膵島様細胞へと分化・成熟することを可能とするものであればよく、任意の形状及び材質からなるものを利用することができる。例えば、このようなデバイスの例として、生体適合性及び／又は生分解性のポリマー（例えば、ポリグリコール酸、ポリ乳酸等）、セラミックス、金属（例えば、チタン、ステンレス、コバルト、又はそれらの合金等）からなるものを利用することができる。デバイスの形状は特に限定されず、インスリン産生細胞、又は医薬を収容可能なカプセル、バッグ、チャンバー等の形状とすることができる。デバイスはその内部と外部とを連通可能とする多孔質部、孔、通路等を有することが好ましい。
【０２２１】
本発明のインスリン産生細胞又は医薬は、凍結保存された形態で供給することができ、使用時に解凍して用いることができる。
【０２２２】
本発明のインスリン産生細胞又は医薬は、それを必要とする患者の生体内に移植して用いることができる。移植は、細胞を一定の位置で固定できる生体内領域に行うことが好ましく、例えば、皮下、腹腔内、腹膜上皮、大網、脂肪組織、筋肉組織や膵臓、腎臓等の各臓器の被膜下などに行うことできる。好ましくは、侵襲度の低い皮下移植である。移植さ

れるインスリン産生細胞は、治療上有効量を投与すればよく、移植対象の、年齢、体重、移植部位の大きさ、疾患の重篤度等の要因により変化し得、特に限定されないが、例えば、10×10^{4}細胞～10×10^{11}細胞程度とすることができる。

【０２２３】

移植されたインスリン産生細胞は生体内で分化・成熟して膵島様細胞となり、疾患、障害、又は症状を治療又は予防するのに有用な機能を発揮する。すなわち、本発明のインスリン産生細胞又は医薬はプロドラッグとして利用することができる。

【０２２４】

本発明のインスリン産生細胞又は医薬によれば、患者生体内において膵島様細胞を生成することができ、膵島様細胞の分泌するインスリンやグルカゴンの働きにより患者における血糖値（グルコース）のレベルを改善及び／又は維持することができる。

【０２２５】

したがって、本発明のインスリン産生細胞又は医薬は、血糖値のレベルを改善及び／又は維持することが必要とされる疾患、障害、又は症状を治療又は予防するために用いることができる。このような疾患、障害、又は症状としては、患者、特に糖尿病患者における糖尿病、空腹時及び食後グルコースレベルの変調、低血糖症（例えば、糖尿病患者におけるインスリン投与による低血糖症）等が挙げられるが、これらに限定はされない。なお、「治療」とは、疾患、障害、又は症状の治療、治癒、防止もしくは、寛解の改善、又は、疾患、障害、又は症状の進行速度の低減を意味する。また、「予防」とは、疾患、障害、又は症状の発症の可能性、危険性を低下させる、又は疾患、障害、又は症状の発症を遅らせることを意味する。

【０２２６】

患者は哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）であり、好ましくはヒトである。

【０２２７】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【０２２８】

実施例１：インスリン産生細胞の成熟度と増殖性細胞の混入率

１．方法

（１）インスリン産生細胞の作製

Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０４　ｉＰＳ細胞株からインスリン産生細胞への分化誘導は、上記工程１）～６）や既報（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１４；３２：１１２１－１１３３）に従い実施した。

すなわち、ｉＰＳ細胞を１０μＭのＲＯＣＫ阻害剤（Ｙ－２７６３２）を含むｉＰＳ細胞培地に懸濁し、細胞計数装置ＮＣ２００（ＣｈｅｍｏＭｅｔｅｃ社）を用いて計数し、37.5×10^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、２ｍＬ／ｗｅｌｌ（75×10^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）でｉＭａｔｒｉｘをコートしたプレートに播種しインキュベートした。次いで、インスリンが作用する条件下、すなわち、分化誘導因子（ＧＳＫ３β阻害剤（３μＭＣＨＩＲ９９０２１）、低用量（１０ｎｇ／ｍＬ）のアクチビンＡ）を含む培地（ＤＭＥＭ－ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ－ＧｌｕｔａＭＡＸ－ｐｙｒｕｖａｔｅ／２％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ／１％ジメチルスルホキシド）で第１の培養を行い、続いて、インスリンが作用しない条件下、すなわち、分化誘導因子（低用量（１０ｎｇ／ｍＬ）のアクチビンＡ）を含む培地（ＤＭＥＭ－ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ－ＧｌｕｔａＭＡＸ－ｐｙｒｕｖａｔｅ／２％Ｂ２７（インスリンを含まない）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ／１％ジメチルスルホキシド）で第２の培養を行い胚体内胚葉細胞を得た。得られた胚体内胚葉細胞を、５０ｎｇ／ｍＬＫＧＦを含む培地（Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ）、次いで、５０ｎｇ／ｍＬ　ＫＧＦ、１

００ｎｇ／ｍＬノギン、０．５μＭシクロパミン、１０ｎＭ　ＴＴＮＰＢ及び２５０μＭビタミンＣを含む培地（Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ）で培養して得られた後方前腸細胞を回収し、０．１μＭ　ＲＯＣＫ阻害剤、１００ｎｇ／ｍＬ　ＫＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＥＧＦ、１０ｍＭ　ニコチンアミド及び２５０μＭビタミンＣを含む培地（Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ）に懸濁し、１７５×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、３５０×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌでｉＭａｔｒｉｘをコートしたプレートに再播種して培養した。得られた細胞を再度回収し、０．２５μＭ　ＳＡＮＴ－１、５０ｎＭレチノイン酸、１０μＭ　ＡＬＫ５インヒビターＩＩ、１００ｎＭ　ＬＤＮ、１μＭ　Ｔ３、５０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ、１μＭ　ＸＡＶ、１０μＭ　Ｙ－２７６３２を含む培地（Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ）に懸濁し、２０×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、３×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで細胞非接着９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（住友ベークライト）に再播種して培養した。

得られた細胞集団を１０μＭ　ＡＬＫ５インヒビターＩＩ、１μＭ　Ｔ３、１００μＭＬＤＮ、１μＭ　γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ阻害剤（ＲＯ－４９２９０９７）、２５０μＭアスコルビン酸と１μＭ　ＦＧＦ受容体１阻害剤（ＰＤ－１６６８６６）を含む培地（Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ）で培養して、インスリン産生細胞を得た。

【０２２９】

（２）タンパク質発現の評価

Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０４　ｉＰＳ細胞株から作製したインスリン産生細胞及び健常人から単離されたヒト膵島（以下、「ｉｓｌｅｔ」と記載する）のタンパク質発現（インスリン（ＩＮＳ）、ＮＫＸ６．１、グルカゴン（ＧＣＧ）、Ｋｉ６７）をフローサイトメトリーにより測定した。また、対照としてＦＧＦ受容体１阻害剤（ＰＤ－１６６８６６）の処置なしで調製されたインスリン産生細胞のプロトタイプ（以下、「プロトタイプ」と記載する）についても同様に測定した。

【０２３０】

（３）遺伝子発現量の評価

プロトタイプ、インスリン産生細胞及びｉｓｌｅｔの各サンプルより採取した全ＲＮＡ分画から合成したｃＤＮＡを用いてインスリン、グルカゴン及び成熟膵β細胞マーカーとして知られるＭａｆＡ、ＵＣＮ３のｍＲＮＡ発現量を定量ＰＣＲ法により測定した。コントロール遺伝子として同様に測定したＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡの発現量によりノーマライズを行った。

【０２３１】

２．結果

（１）タンパク質発現の評価

フローサイトメトリーによる測定結果を図１に示す。また、インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陽性細胞率、インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陰性細胞率、クロモグラニンＡ陽性細胞率、Ｋｉ６７陽性細胞率を表１に示す。インスリン産生細胞はｉｓｌｅｔと同等もしくはそれ以上のインスリン陽性／ＮＫＸ６．１陽性細胞率を示した。一方で、インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陰性細胞率については、ｉｓｌｅｔと比較し明らかに高いことが確認された。インスリン産生細胞とプロトタイプを比較すると、インスリン産生細胞においてインスリン陽性／ＮＫＸ６．１陽性細胞率、インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陰性細胞率、及びクロモグラニンＡ陽性細胞率が上昇し、Ｋｉ６７陽性細胞率については顕著に減少した。

【０２３２】

【表１】

Cell line	Ff-I14-s04		
Cell type	ﾌﾟﾛﾄﾀｲﾌﾟ	ｲﾝｽﾘﾝ 産生細胞	islet
インスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率	30.8 %	37.8 %	31.8 %
クロモグラニンA陽性細胞率	83.9 %	94.7 %	88.7 %
インスリン陽性/NKX6.1陰性細胞率	21.8 %	28.2 %	2.3 %
Ki67陽性細胞率	5.5 %	0.4 %	n.d.

n.d., not determined

【０２３３】

（２）遺伝子発現量の評価

プロトタイプ、インスリン産生細胞及びｉｓｌｅｔにおけるインスリン、グルカゴン、ＭａｆＡ及びＵＣＮ３の発現レベルを表２及び図２に示す。

上記フローサイトメトリーによるインスリン陽性細胞率、グルカゴン陽性細胞率の結果と一致して、プロトタイプに比べて、インスリン産生細胞においてインスリン、グルカゴン発現量の増加が認められｉｓｌｅｔの～５０％程度のレベルに達した。一方で、インスリン産生細胞におけるＭａｆＡ及びＵＣＮ３の発現レベルはヒト膵島に比べて極めて低いことが判明した。

【０２３４】

【表２】

Cell line	Ff-I14-s04		
Cell type	ﾌﾟﾛﾄﾀｲﾌﾟ	ｲﾝｽﾘﾝ 産生細胞	islet
INS 遺伝子	121	162	326
GCG 遺伝子	2.4	6.9	25.7
MafA 遺伝子	0.01	0.01	0.39
UCN3 遺伝子	0.01	0.02	0.44

【０２３５】

以上の結果は、インスリン産生細胞は膵島と同程度のβ細胞の割合を含む細胞凝集塊であるが、未だ完全に成熟した膵島ではないことを示す。また、インスリン産生細胞は増殖

性を有する目的外細胞（Ｋｉ６７陽性細胞）の混入が極めて少ないことが確認された。
【０２３６】
実施例２：インスリン産生細胞における未分化状態を維持したｉＰＳ細胞の混入率
１．方法
未分化状態を維持したｉＰＳ細胞の高感度検出（Ｈｉｇｈ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｃｕｌｔｕｒｅ ｃｅｌｌ ａｓｓａｙ）
Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０４ ｉＰＳ細胞を分化誘導因子（ＧＳＫ３β阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤及び低用量のアクチビンＡ）を含む培地（ＲＰＭＩ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ／ジメチルスルホキシド）中で培養して得られた胚体内胚葉細胞より、膵前駆細胞（インスリン産生細胞生成過程の中間体細胞）を分化誘導し、６×１０^{5}細胞の膵前駆細胞懸濁液に、０、６（０．００１％）、３０（０．００５％）細胞の未分化状態を維持したｉＰＳ細胞をスパイクし、１０ｃｍディッシュに播種し、未分化状態を維持したｉＰＳ細胞にとって好条件であるＡＫ０３Ｎ培地およびｉＭａｔｒｉｘ－５１１コーティング条件下で７日間培養した。また、同条件において、ｉＰＳ細胞をスパイクしない６×１０^{5}細胞の膵前駆細胞のみも培養した。培養終了後、アルカリホスフォターゼ染色により生成された未分化状態を維持したｉＰＳ細胞のコロニーを視覚化し、その数をカウントした。
【０２３７】
２．結果
結果を図３に示す。６細胞及び３０細胞の未分化状態を維持したｉＰＳ細胞をスパイクした膵前駆細胞培養ディッシュにおいて、それぞれ平均３個及び１６個のコロニーが観察された。一方、スパイクしていない膵前駆細胞培養ディッシュではコロニーはまったく観察されなかった。以上の結果から、現在の分化誘導法で生成された膵前駆細胞およびその後生成されるインスリン産生細胞において、未分化状態を維持したｉＰＳ細胞の混入は０．００１％以下であることが示された。
以上の結果より、インスリン産生細胞には未分化状態を維持したｉＰＳ細胞の混入がない、又は極めて少ないことが確認された。
【０２３８】
実施例３：凍結融解によるインスリン産生細胞への影響
１．方法
（１）インスリン産生細胞の凍結融解後の再凝集
Ｆｆ－Ｉ１４ｓ０４ ｉＰＳ細胞を分化誘導因子（ＧＳＫ３β阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤及び低用量のアクチビンＡ）を含む培地（ＲＰＭＩ／１％Ｂ２７（インスリンを含む）／Ｐｅｎｉｓｉｌｉｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ／ジメチルスルホキシド）中で培養して胚体内胚葉細胞を得たこと以外は実施例１に記載の方法と同じ方法により作製したインスリン産生細胞を市販の凍結保存液（ＣｒｙｏＳｔｏｒ ＣＳ１０（ＢｉｏＬｉｆｅＳｏｌｕｔｉｏｎｓ社））を利用した緩慢凍結法により凍結した。具体的には、１ｍＬの凍結保存液に３×１０^{6}細胞を懸濁し、凍結バイアルに注入した。凍結処理容器（バイセル、日本フリーザー（株））にバイアルを入れ、－８０℃で保存した。
【０２３９】
解凍は、凍結バイアルをＴｈａｗＳＴＡＲ凍結細胞融解ステーション（ＡｓｔｅｒｏＢｉｏ社）で加温し、急速に解凍した。解凍された細胞懸濁液を１０ｍＬの培養液に添加した。遠心分離により上澄みを除去した後、細胞を１０μＭのＲＯＣＫ阻害剤（Ｙ－２７６３２）を含む培地に懸濁し、細胞計数装置ＮＣ２００（ＣｈｅｍｏＭｅｔｅｃ社）を用いて解凍後の生細胞数、細胞生存率を測定した。また、解凍後の細胞を多孔プレート（Ｋｕｒａｒａｙ社）に播種し、３次元培養することにより細胞凝集体を作製した。
【０２４０】
（２）凍結融解後インスリン産生細胞の生体内移植
ストレプトゾトシンによりインスリン欠乏性の糖尿病を誘発させた免疫不全ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの腎被膜下に、凍結融解後にインスリン産生細胞を移植した。移殖後の経過

観察は血中ヒトＣ－ペプチド濃度と血糖値を測定した。

【０２４１】

２．結果

（１）インスリン産生細胞の凍結融解後の再凝集

解凍直後の細胞生存率は８０．９％であった。また、凍結バイアルに注入した細胞の７７．０％の生細胞を回収することができた。３次元培養により４日培養した細胞の位相差顕微鏡像を図４に示す。図４に示す通り、凍結保存を行った細胞は、生存し細胞凝集体を形成する能力を保持する事は明らかである。

【０２４２】

凍結保存前及び解凍・再培養後の細胞について、ＩＮＳ、ＮＫＸ６．１及びＫｉ６７の発現をフローサイトメトリーにより測定した結果を図５に示す。また、インスリン陽性率、Ｋｉ６７陽性細胞率を表３に示す。図５、表３に示す通り、凍結保存前後におけるインスリン陽性細胞率の減少、Ｋｉ６７陽性細胞の増加は無かった。

【０２４３】

【表３】

	凍結保存前	解凍・再培養後
インスリン陽性細胞率	52.7 %	85.7 %
Ki67 陽性細胞率	1.3 %	0.3 %

【０２４４】

（２）インスリン産生細胞の生体内移植

移殖後の経過観察として測定した血中ヒトＣ－ペプチド濃度と血糖値の結果を表４に示す。腎被膜下移植した凍結融解後のインスリン産生細胞は、移植４ヶ月後において血液中にヒトＣ－ペプチド分泌が確認され、高血糖改善作用を示した。

【０２４５】

【表４】

	移植時点	移植４ヶ月後
血中ヒト C-ペプチド濃度 (pM)	n.d.	982.4 (N=1)
血糖値 (mg/dL)	500 (N=1)	117 (N=1)

以上の結果より、インスリン産生細胞は凍結融解しても分化誘導効率が保持されることが確認された。

【０２４６】

実施例４：生体内に移植されたインスリン産生細胞

１．方法

（１）生体内へのインスリン産生細胞の移植

実施例３と同様の方法により作製されたインスリン産生細胞を、ストレプトゾトシン（ＳＴＺ）により糖尿病を誘発した免疫不全ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの腎被膜下、及び糖尿病を自然発症するＡｋｉｔａ遺伝子変異を有するＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの皮下にそれぞれ移植した。皮下への移植には、インスリン産生細胞の担体としてＦｉｂｒｉｎゲルを使

用した。移植後、血液中のヒトＣ－ペプチド（インスリン産生細胞由来インスリンの指標）の濃度及び血糖値を測定し、インスリン産生細胞の生着を評価した。

【０２４７】

（２）グルコース負荷あるいは低血糖に対するインスリン産生細胞の応答の評価

移植されたインスリン産生細胞が生着したマウスを用いて、一過的に血糖値を上昇させるためにグルコース強制経口投与、あるいは低血糖を誘発するためにインスリン製剤グラルギンを皮下投与し、その後のインスリン産生細胞の応答を血中ヒトＣ－ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度を測定して評価した。対照として非移植・非糖尿病ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスを用い、内因性膵島由来のマウスＣ－ペプチドやグルカゴンの血中濃度を測定した。

【０２４８】

２．結果

（１）生体内に移植したインスリン産生細胞の生着評価

移植後の血中ヒトＣ－ペプチド濃度及び血糖値の測定結果を表５に示す。いずれの動物及び移植部位においても移植から３－４ヶ月後には血液中にヒトＣ－ペプチドを検出した。マウスにおいては移植から３ヶ月後までに高血糖が改善し、血糖値は５－６ヶ月後まで正常レベルを維持し、移植したインスリン産生細胞が長期生着していることが示された。

【０２４９】

【表５】

動物ー移植部位	血中ヒトC-ペプチド濃度（pM）		血糖値（mg/dL）		
	移植3-4ヶ月後	5-6ヶ月後	移植時点	3ヶ月後	5-6ヶ月後
STZ NOD/SCID	898±335	915，1060	516±33	113±64	117，91
マウスー腎被膜下	(N=3)	(N=2)	(N=4)	(N=3)	(N=2)
Akita NOD/SCID	2436±516	2195±882	562±31	83±27	61±7
マウスー皮下	(N=4)	(N=4)	(N=4)	(N=4)	(N=3)

N=3以上は平均値±標準偏差、N=2は個体別データ

【０２５０】

（２）グルコース負荷あるいは低血糖に対するインスリン産生細胞の応答の評価

グルコース負荷後の血中ヒトＣ－ペプチド濃度を図６に、グラルギン投与後の血中ヒトＣ－ペプチド濃度及び血中グルカゴン濃度を図７に示す。インスリン産生細胞の移植から３－４．５ヶ月後において、血中ヒトＣ－ペプチド濃度はグルコース負荷により一過的に上昇し、一方でグラルギン投与により低血糖を誘発した際には低下した。これらの変化は非移植・非糖尿病マウスにおける内因性マウスＣ－ペプチドの血中濃度の変化と同様だった。また、インスリン産生細胞の移植マウスでは非移植・非糖尿病マウスに比べて血中グルカゴン濃度が高値を示し、インスリン産生細胞がグルカゴンを血液中に放出していることが示唆された。

【０２５１】

以上の結果から、生体内に移植されたインスリン産生細胞は長期生着し、生体内に移植されたインスリン産生細胞は長期生着し、血糖値の変動に応答して内因性膵島に類似した生理的なインスリン調節作用を発揮することが示された。

【０２５２】

実施例５：皮下に移植されたインスリン産生細胞
１．方法
（１）インスリン産生細胞の生体内移植
ストレプトゾトシンによりインスリン欠乏性の糖尿病を誘発させた免疫不全ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに、アルギン酸ハイドロゲルに分散させたインスリン産生細胞を皮下移植した。移殖後の経過観察は血中ヒトＣ－ペプチド濃度と血糖値を測定することにより実施した。移植３ヶ月後の時点で移植片を摘出した。
【０２５３】
（２）移植片中のタンパク質発現の評価
摘出した移植片を単一細胞化処理後、固定し、インスリン産生細胞のタンパク質発現（インスリン、ＮＫＸ６．１、グルカゴン、クロモグラニンＡ）をフローサイトメトリーにより測定した。また摘出した移植片及び移植時点のインスリン産生細胞を固定、脱水後に凍結切片を作製し、目的タンパク質発現（インスリン、グルカゴン）を免疫組織染色により評価した。
【０２５４】
２．結果
（１）インスリン産生細胞の生体内移植
移殖後の経過観察として測定した血中ヒトＣ－ペプチド濃度と血糖値の結果を表６に示す。皮下移植したインスリン産生細胞は、移植１－３ヶ月後において血液中にヒトＣ－ペプチド分泌が確認され、高血糖改善作用を示した。
【０２５５】
【表６】

	移植時点	移植１ヶ月後	移植３ヶ月後
血中ヒトC-ペプチド濃度 (pM)	n.d.	490.4, 307.6 (N=2)	714.3 (N=1)
血糖値 (mg/dL)	568, 457 (N=2)	238, 196 (N=2)	62 (N=1)

【０２５６】
（２）移植片中のタンパク質発現の評価
インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陽性細胞率、インスリン陽性／ＮＫＸ６．１陰性細胞率、グルカゴン陽性／インスリン陰性細胞率、クロモグラニンＡ陽性率の測定結果を表７、図８に示す。移植時点と比較して、移植３ヶ月後の移植片においてグルカゴン陽性／インスリン陰性細胞率の上昇及びインスリン陽性／ＮＫＸ６．１陰性細胞率の減少が確認された。また移植３ヶ月後の移植片は高い割合のクロモグラニンＡ陽性の内分泌細胞で構成されることが確認された。摘出した移植片の免疫組織染色の結果を図９に示す。移植時点と比較して、移植３ヶ月後の移植片においてグルカゴン単陽性細胞率の上昇が確認され、生体内で成熟した膵島様細胞へ分化したことが示唆された。
【０２５７】

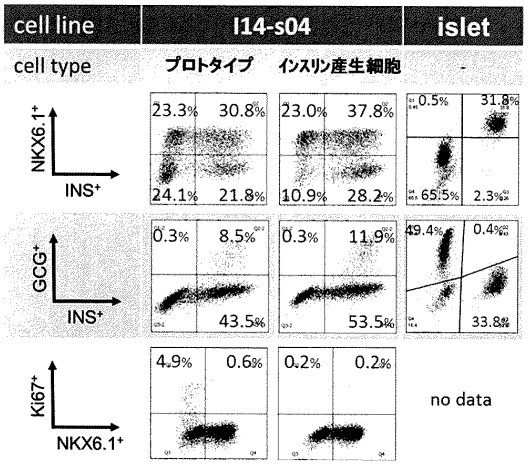
【表７】

	移植時点	移植３ヶ月後
インスリン陽性/NKX6.1陽性細胞率	46.0 %	19.3 %
インスリン陽性/NKX6.1陰性細胞率	32.0 %	7.6 %
グルカゴン陽性/インスリン陰性細胞率	0.1%	32.1 %
クロモグラニンＡ陽性細胞率	n.d.	96.2 %

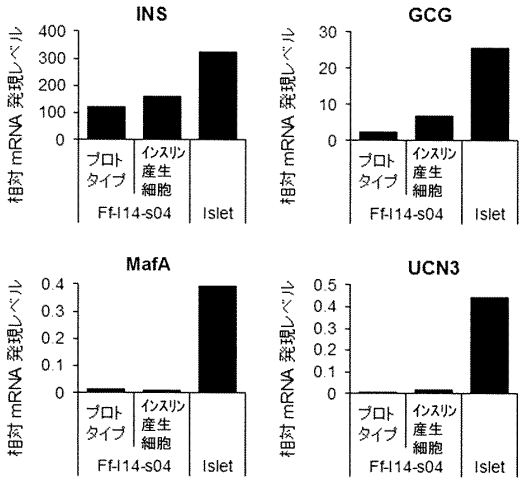
【０２５８】
以上の結果より、糖尿病マウスの皮下に移植されたインスリン産生細胞は、高い内分泌細胞の割合を維持するとともに、成熟したα細胞を含む成熟した膵島様細胞へと生体内で分化することが確認された。
また、生体内で成熟した膵島様細胞は、増殖性を有する目的外細胞（Ｋｉ６７陽性細胞）の混入が極めて少ないこと（例えば３％未満）が確認された。

【図面】

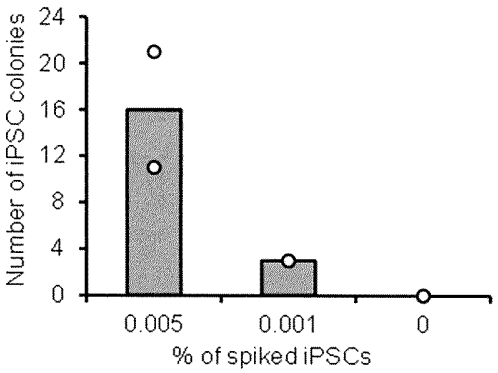
【図１】


cell line
I14-s04
islet
cell type
プロトタイプ
インスリン産生細胞
-
NKX6.1+
INS+
23.3%
30.8%
24.1%
21.8%
23.0%
37.8%
10.9%
28.2%
0.5%
31.8%
65.5%
2.3%
GCG+
INS+
0.3%
8.5%
43.5%
0.3%
11.9%
53.5%
49.4%
0.4%
33.8%
Ki67+
NKX6.1+
4.9%
0.6%
0.2%
0.2%
no data

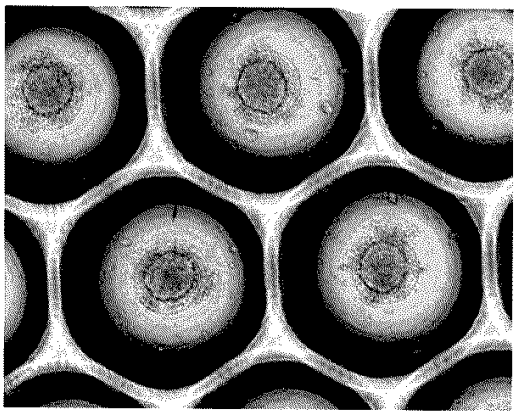
【図２】


INS
GCG
MafA
UCN3
相対 mRNA 発現レベル
プロトタイプ
インスリン産生細胞
Ff-I14-s04
Islet

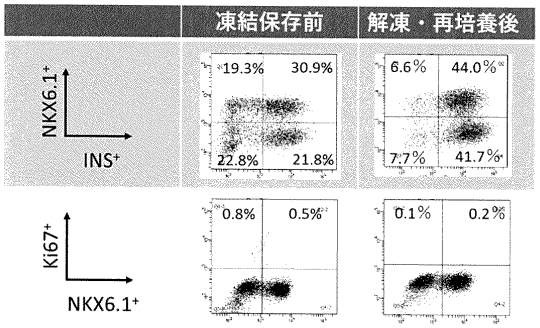
【図３】


Number of iPSC colonies
% of spiked iPSCs
0.005
0.001
0

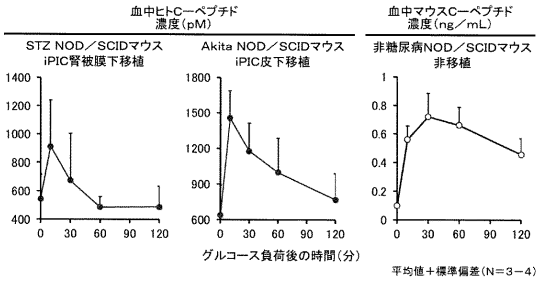
【図４】



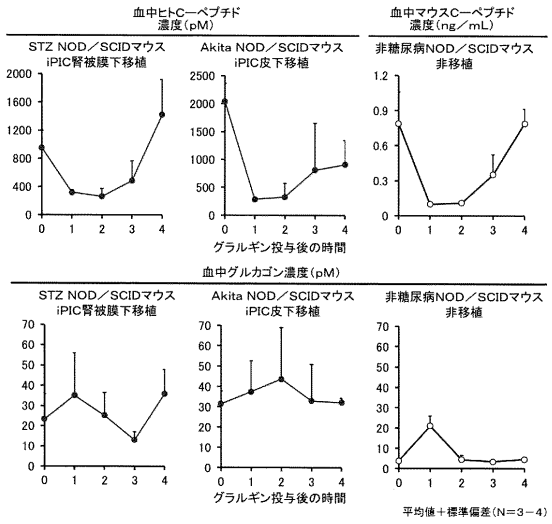
【図５】


凍結保存前
解凍・再培養後
NKX6.1+
INS+
19.3%
30.9%
22.8%
21.8%
6.6%
44.0%
7.7%
41.7%
Ki67+
NKX6.1+
0.8%
0.5%
0.1%
0.2%

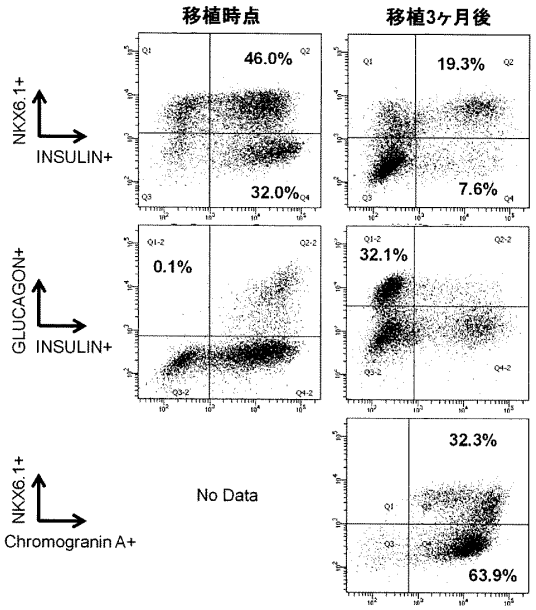
【図６】


血中ヒトC-ペプチド
濃度(pM)
STZ NOD／SCIDマウス
iPIC腎被膜下移植
Akita NOD／SCIDマウス
iPIC皮下移植
血中マウスC-ペプチド
濃度(ng／mL)
非糖尿病NOD／SCIDマウス
非移植
グルコース負荷後の時間(分)
平均値＋標準偏差(N＝3－4)

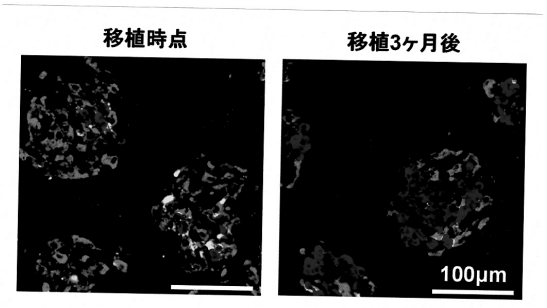
【図７】


血中ヒトC-ペプチド
濃度(pM)
STZ NOD／SCIDマウス
iPIC腎被膜下移植
Akita NOD／SCIDマウス
iPIC皮下移植
血中マウスC-ペプチド
濃度(ng／mL)
非糖尿病NOD／SCIDマウス
非移植
グラルギン投与後の時間
血中グルカゴン濃度(pM)
STZ NOD／SCIDマウス
iPIC腎被膜下移植
Akita NOD／SCIDマウス
iPIC皮下移植
非糖尿病NOD／SCIDマウス
非移植
グラルギン投与後の時間
平均値＋標準偏差(N＝3－4)

【図８】


移植時点
移植3ヶ月後
NKX6.1+
INSULIN+
46.0%
32.0%
19.3%
7.6%
GLUCAGON+
INSULIN+
0.1%
32.1%
NKX6.1+
Chromogranin A+
No Data
32.3%
63.9%

【図９】



フロントページの続き

(72)発明者　山添 則子
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　日吉 秀行
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　持田 泰佑
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　上野 光
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　佐久間 健介
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　山浦 順司
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　松本 寛和
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　豊田 太郎
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内
(72)発明者　小長谷 周平
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内
審査官　太田 雄三

(56)参考文献
国際公開第２０１９／２０８５０５（WO，Ａ１）
特表２０１４－５０１５１８（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５２８０６６（ＪＰ，Ａ）
REZANIA, Alireza et al.，Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells，Nature Biotechnology，2014年，vol. 32, no. 11，p. 1121-1133, Online Methods,，Supplementary information p. 1-38
PAGLIUCA, F.W. et al.，Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro，Cell，2014年10月09日，vol. 159，p. 428-439
YAMASHITA-SUGAHARA, Y. et al.，Scientific Reports，6: 35908 (2016)
RICHARDSON, Thomas, et al.，Alginate Encapsulation of Human Embryonic Stem Cells to Enhance Directed Differentiation to Pancreatic Islet-Like Cells，Tissue Engineering: Part A，2014年，Vol. 20, No. 23 and 24，p. 3198-3211
REZANIA, Alireza et al.，Enrichment of Human Embryonic Stem Cell-Derived NKX6.1-Expressing Pancreatic Progenitor Cells Accelerates the Maturation of Insulin-Secreting Cells In Vivo，STEM CELL，2013年，vol. 31，p. 2432-2442
ROBERT, Thomas et al.，Functional Beta Cell Mass from Device-Encapsulated hESC-Derived Pancreatic Endoderm Achieving Metabolic Control，Stem Cell Reports，2018年03月13日，vol. 10，p. 739-750
Diabetologia，2012年，vol. 55, [Suppl1]，p. S178-S179，Abstract Number: 420

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　５／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）