

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5875007号
(P5875007)

(45) 発行日 平成28年3月2日 (2016.3.2)

(24) 登録日 平成28年1月29日 (2016.1.29)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	
C 1 2 N 5/073 (2010.01)	C 1 2 N 5/073	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z
請求項の数 11 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-541844 (P2012-541844)	(73) 特許権者	504159235
(86) (22) 出願日	平成23年10月31日 (2011.10.31)		国立大学法人 熊本大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/075041		熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号
(87) 国際公開番号	W02012/060315	(73) 特許権者	511031618
(87) 国際公開日	平成24年5月10日 (2012.5.10)		L S I P ファンド運営合同会社
審査請求日	平成26年4月28日 (2014.4.28)		東京都千代田区丸の内一丁目7番12号
(31) 優先権主張番号	特願2010-246161 (P2010-246161)	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成22年11月2日 (2010.11.2)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 腸細胞の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導する工程 (A) ; 及び
前記胚性内胚葉を (2' Z, 3' E) - 6 - プロモインジルビン - 3' - オキシム (B I O) 及び (N - [(3, 5 - ジフルオロフェニル) アセチル] - L - A l a - 2 - フェニル - L - G l y - t e r t - ブチル - O H (D A P T) の存在下で培養することにより、前記胚性内胚葉から腸細胞を分化誘導する工程 (B) :
を含む、腸細胞の製造方法。

【請求項 2】

E - カドヘリン (E C D) 及び C X C R 4 に対する蛍光標識抗体を用いたフローサイト
メトリーにより、工程 (A) において得られた細胞培養物から胚性内胚葉細胞を分離し、
工程 (B) において該分離した胚性内胚葉細胞を用いる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (A) において、支持細胞の存在下、かつアクチビン及び／又は b F G F の存在下
で前記多能性幹細胞を培養することにより、該多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘
導する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

支持細胞が、中胚葉に由来する細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

支持細胞が、M 1 5 細胞、M E F 細胞又は S T 2 細胞である、請求項 3 又は 4 に記載の

10

20

方法。

【請求項 6】

工程 (B) において、前記胚性内胚葉を M15 細胞又は ME F 細胞の存在下で培養する、請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記多能性幹細胞が、胚性幹細胞、又は人工多能性幹細胞である、請求項 1～6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞またはマウス胚性幹細胞である、請求項 1～7 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 から 8 の何れか 1 項に記載の方法によって多能性幹細胞から腸細胞へと分化誘導する際に、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養し、被験物質の非存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度と、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度とを比較することを含む、多能性幹細胞から腸細胞へと分化誘導を促進又は阻害する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 10】

被験物質が成長因子又は低分子化合物である、請求項 9 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 11】

腸細胞で発現するマーカー転写産物の量もしくは蛋白量、またはその両方を指標として、腸細胞へと分化誘導の程度を測定する、請求項 9 又は 10 に記載のスクリーニング方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腸細胞の製造方法に関する。より詳細には、本発明は、多能性幹細胞を出発材料として腸細胞を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(誘導多能性幹細胞)(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)などの多能性幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力を有する細胞であり、ほぼ無限に増殖する能力を有する。近年、特に再生医療の分野において、このような多能性幹細胞を出発材料として、胃、脾臓、肝臓、腸等の各種臓器に適用できる組織及び細胞の製造方法の開発が求められている。より具体的には、新生児医療の進展により、未熟児の救命率が急速に向上しているが、先天性の消化管低形成症を有する小児に対して有効な再生医療技術の必要性が高まっている。また、消化器系悪性腫瘍、該疾患の手術後の狭窄や線維化、逆流性食道炎、潰瘍性大腸炎やクローン病といった慢性炎症性腸疾患に伴う組織破壊による消化管機能不全においても、腸上皮化生や消化管粘膜の不可逆的な構造変化が生じるため、再生医療による治療の必要性が求められている。このような消化器系疾患に対する再生医療による治療を可能とするために、多能性幹細胞を出発材料とした腸管細胞の効率的な製造方法の開発が急務となっている。

30

40

【0003】

例えば、胚性幹細胞から内胚葉系細胞へと分化誘導する方法として、中胚葉に由来する細胞を支持細胞として用い、該支持細胞の存在下で胚性幹細胞を培養することにより、内胚葉系細胞へと分化誘導する方法が知られている(特許文献1参照)。特許文献1には、肝臓、肺、小腸等の内胚葉由来器官の成熟細胞へと分化誘導することが記載されているものの、開示される方法によって成熟した各種腸細胞を効率的に分化誘導することは不可能である。

【0004】

また、イン・ビボでの初期胚の誘導を模倣するかの如く、イン・ビトロにおいて、M15

50

細胞の単層上でES細胞を培養することにより、ES細胞を、中内胚葉、胚性内胚葉、そして、最終的には領域特異的な胚性内胚葉に由来する各種器官に連続的に誘導する技術が確立されている（非特許文献1及び2参照）。これらの技術では、肝臓細胞、肺細胞、膵臓細胞などの分化誘導に成功したことが確認されている。特に、非特許文献2には、肝臓細胞、肺細胞、膵臓細胞に加えて、Cdx2を発現する腸前駆細胞も生じたことが記載されている。しかしながら、これら従来技術により、より成熟した各種腸細胞を大量かつ効率的に製造することは困難である。

【0005】

上記の通り、多能性幹細胞から各種成熟型腸細胞を大量かつ効率的に分化誘導する技術の開発は依然として進んでおらず、多能性幹細胞を出発材料とした腸細胞の効率的な製造方法は存在しないのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開WO2006/126574号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K. and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13, 731-46.

【非特許文献2】Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K. and Kume, S. (2008b). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells* 26, 874-85.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、多能性幹細胞を出発材料とした腸細胞を製造する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、多能性幹細胞である胚性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導した後に、該胚性内胚葉をBIO（(2'Z,3'E)-6-プロモインジルビン-3'-オキシム）及びDAPT（N-[(3,5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-Ala-2-フェニル-L-Gly-tert-ブチル-OH）の存在下で培養することにより、成熟した各種腸細胞を分化誘導できることを見出した。本発明は、係る知見により完成されたものである。

【0010】

すなわち、本発明は以下に関する。

(1) 多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導する工程(A)；及び前記胚性内胚葉を(2'Z,3'E)-6-プロモインジルビン-3'-オキシム(BIO)及びN-[(3,5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-Ala-2-フェニル-L-Gly-tert-ブチル-OH(DAPT)の存在下で培養することにより、前記胚性内胚葉から腸細胞を分化誘導する工程(B)；を含む、腸細胞の製造方法。

(2) E-カドヘリン(ECD)及びCXCR4に対する蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリーにより、工程(A)において得られた細胞培養物から胚性内胚葉細胞を分離し、工程(B)において該分離した胚性内胚葉細胞を用いる、(1)に記載の方法。

(3) 工程(A)において、支持細胞の存在下、かつアクチビン及び／又はbFGFの存在下で前記多能性幹細胞を培養することにより、該多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分

10

20

30

40

50

化誘導する、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 支持細胞が、中胚葉に由来する細胞である、(3)に記載の方法。

(5) 支持細胞が、M15細胞、MEF細胞又はST2細胞である、(3)又は(4)に記載の方法。

(6) 工程(B)において、前記胚性内胚葉をM15細胞又はMEF細胞の存在下で培養する、(1)～(5)の何れか1項に記載の方法。

(7) 前記多能性幹細胞が、胚性幹細胞、又は人工多能性幹細胞である、(1)～(6)の何れか1項に記載の方法。

(8) 前記多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞またはマウス胚性幹細胞である、(1)～(7)の何れか1項に記載の方法。

(9) (1)から(8)の何れか1項に記載の方法により得られる、多能性幹細胞から分化誘導された腸細胞。

(10) (1)から(8)の何れか1項に記載の方法によって多能性幹細胞から腸細胞へと分化誘導する際に、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養し、被験物質の非存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度と、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度とを比較することを含む、多能性幹細胞から腸細胞へと分化誘導を促進又は阻害する物質をスクリーニングする方法。

(11) 被験物質が成長因子又は低分子化合物である、(10)に記載のスクリーニング方法。

(12) 腸細胞で発現するマーカー転写産物の量もしくは蛋白量、またはその両方を指標として、腸細胞へと分化誘導の程度を測定する、(10)又は(11)に記載のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明の製造方法によれば、多能性幹細胞から、腸の吸収腸細胞、パネート細胞、杯細胞、腸内分泌細胞などの各種成熟型腸細胞を大量かつ効率的に製造することができる。本発明によれば、上記の通り各種成熟型腸細胞を製造することが可能であり、それら腸細胞は再生医療の分野において実践的に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1Aは、実験系の模式図である。最初に、ES細胞を、M15上で、アクチビン及びbFGFの存在下で、次に分化の20日目までBIO及びDAPTに切り替えて培養することにより、胚性内胚葉への分化を誘導した。図1Bは、M15細胞上で、BIO及びDAPTを各種の組み合わせで加えて分化させたES細胞(分化12日目)に関し、リアルタイムPCR分析の結果を示す。BIO及びDAPTの組合せによって、腸前駆細胞マーカーCdx2及びIfabpの発現が同時に増強される。図1Cは、抗Cdx2抗体を用いて免疫染色した、分化した12日目のES細胞の写真である。M15細胞上で培養した場合、BIO及びDAPTの存在下で、高い割合のES細胞がCdx2発現細胞に変化することが示されている。図1Dは、M15細胞上でBIO及びDAPTの存在下で培養したES細胞に関し、各種腸マーカーのタイム・コースによる発現をRT-PCRにより解析した結果を示す。FI、胎仔腸；AI、成体腸。DW、cDNAなしのネガティブコントロール。腸マーカーであるCdx2及びビリン(Villin)；並びに腸細胞マーカーであるIfabp、Isx、及びラクターゼが、BIO及びDAPTの存在下で、かつM15細胞上で分化させたES細胞において誘導された。

【図2】図2Aは、M15細胞上でBIO及びDAPTの存在下で培養したES細胞から、4日目に胚性内胚葉(Cxcr4+/ECD+)細胞(四角)を、フローサイトメトリーを用いて選別した結果を示す。図2Bは、胚性内胚葉細胞をM15細胞上で再培養し、11日間の再培養後(15日目の細胞と等しい)の細胞に関し、Cdx2及びビリン(Villin)の発現を解析した結果を示す。これらの細胞は、Cdx2発現細胞(左)及びビリン発現腸細胞(右)に分化していた。図2Cは、前方後方の特異性を示すマーカーパネルの発現パターンを検証し、胚性内胚

10

20

30

40

50

葉をパターン形成する際のBIO及びDAPTの効果を評価した結果を示す。BIO及びDAPTを未添加の場合、又は低濃度で加えた場合、前方マーカーPax8が誘導された。Cdx2及びIfabpが、中程度の濃度（1/30-1）のBIO及びDAPTで誘導された。BIO及びDAPTを高濃度で加えた場合にのみ、Hoxc8（後方マーカー）が発現した。図2Dは、Pax8及びHoxc8の発現に対するBIO及びDAPTの添加の効果を調べた結果を示す。Hoxc8（後方マーカー）が高濃度のBIOで誘導された。図2Eは、BIO及びDAPTの段階的濃度に応じた腸領域形成の仮説の模式図である。

【図3】図3Aは、実験の概要を示す図である。ES細胞を4日間にわたりM15細胞上で分化させた。4日目に、胚性内胚葉細胞を単離し、MEF細胞上に再プレATINGし、BIO及びDAPTの存在下で培養した。図3Bは、ES細胞由来の胚性内胚葉細胞を、M15細胞の代わりに、MEF細胞又はPA6細胞上で再培養した後にCdx2の発現を調べた結果を示す。胚性内胚葉細胞をMEF細胞上で再培養した場合、Cdx2を発現する分化細胞が観察された。図3Cは、M15細胞又はMEF細胞上で培養した胚性内胚葉細胞に関し、各種腸マーカーの発現をRT-PCRにより分析した結果を示す。Cdx2、Ifabp、Isx、ビリン(Villin)、及びラクターゼ(lct)が、M15細胞又はMEF細胞上で培養された胚性内胚葉細胞において誘導されることが示された。図3Dは、MEF細胞上での培養時の、Cdx2発現細胞の出現のタイム・コース分析の結果を示す。Cdx2発現細胞が、MEF細胞上での分化の12日目から相当量で観察された。図3Eは、各種腸マーカー発現のタイム・コース分析の結果を示す。分化が開始する時を0日と定義した。Tff3、杯細胞マーカー；リゾチーム(Lyz1)、パネート細胞マーカー；Sst、腸内分泌マーカー。

【図4】図4は、MEF細胞上で分化させたES細胞について、各種マーカーの発現を調べた結果を示す。図4Aでは、ES細胞由来の腸細胞は、Cdx2/ECD/HNF4a陽性細胞であることが示されている。図4Bでは、これらの細胞ではGlut2も発現していることが示されている。図4Cは、該細胞の集団はクロロディン7を発現したことを示す。図4Dは、パネート細胞（リゾチーム発現）、及び内分泌マーカー（クロモグラニンA(Chga)、ソマトスタチン(sst))を発現する細胞が誘導されたことを示す。

【図5】図5は、MEF細胞（図5E及びF）又はM15細胞（図5G～I）上で分化させたES細胞について、各種マーカーの発現を調べた結果を示す。図5Eは、ムチン2(Muc2)、DBA発現細胞も誘導されたことを示す。図5Fは、Sox9発現細胞がビリン(Villin)発現細胞の中に存在することを示す。図5Gは、腸細胞（アルカリホスファターゼ活性）が誘導されたことを示す。図5H及びIは、杯細胞（PAS及びAlucianブルー染色陽性）も誘導されたことを示す。

【図6】図6Aは、ヒトES細胞khES-3から、BIO及びDAPTの存在で、M15細胞上で、25日目に、Cdx2を発現する腸細胞が誘導された結果を示す。図6Bは、ヒトES細胞khES-3に関し、各種腸マーカーの発現について、RT-PCRによりタイム・コース分析した結果を示す。BIO及びDAPTの存在下で、かつM15細胞上で分化誘導を行ったkhES-3細胞において、腸マーカー、Cdx2、ビリン(Villin)；腸細胞マーカー、Ifabp、Isx；杯細胞マーカー、Tff3；パネート細胞マーカー、リゾチーム(Lyz1)；及び腸内分泌マーカー、Sst、Sct、Syp、Sst、Gastが発現した。図6C及びDは、分化したkhES-3細胞は、アルカリホスファターゼ活性(C)を示し、PAS染色(D)陽性であったことを示す。

【図7】図7Aは、各種マーカーについて、M15細胞上で分化させたES細胞にBIO及びDAPTを添加したものと、FGF2(bFGF)を添加したものとを比較した結果を示す。BIO及びDAPTの添加によって、ES細胞から腸細胞(enterocyte)、杯細胞(goblet cell)、パネート細胞(paneth cell)、及び腸内分泌細胞(enteroendocrine cell)の分化細胞型が誘導された。BIO及びDAPTの代わりに、256ng/mlのFGF2(bFGF)によって腸分化(intestine)が誘導されたが、分化細胞マーカーの発現はより小さな程度であることが判る。図7Aは、15日目の分化細胞を用いてRT-PCR分析を行った結果を示している。図7Bは、胚性内胚葉に対する各種FGFの効果調べた結果を示す。アクチビン及びbFGFを用いて4日間にわたりM15細胞上で培養したES細胞から胚性内胚葉を選別し、選別した細胞をMEF細胞上に再プレATINGした。FGF4、5、7、8b、9、10、及びFGF18を添加し、ES細胞のCdx2発現腸細胞への分

10

20

30

40

50

化を亢進させる、これら FGF の潜在能力を調査した。図 7 B は、分化 12 日目に行った免疫組織化学的検査の結果を示す。図 7 C 及び D は、BIO 及び DAPT 添加の効果に対する、SU5402 (FGF 受容体アンタゴニスト)、LY29402 (PI3K 阻害剤)、及び U0126 (MAPK 阻害剤) の影響を調べた結果を示す。BIO 及び DAPT による ES 細胞からの腸分化が、SU5402 (FGF 受容体アンタゴニスト) 及び LY29402 (PI3K 阻害剤) により部分的に阻害されたが、U0126 (MAPK 阻害剤) では阻害されなかった。図 7 C 及び D には、Cdx2 の発現について、12 日目の分化した ES 細胞での RT-PCR 分析 (C) 及び抗 Cdx2 抗体を用いた免疫組織化学的検査 (D) により分析した結果が示されている。図 7 に示す結果に関する実験では、ES 細胞を、M15 細胞上で、アクチビン及び bFGF を用いて 4 日間培養し、その後に M15 細胞 (図 7 A) 又は MEF 細胞 (図 7 B、C、D) 上でのコントロール (2000KSR) を用いて、又は、BIO 及び DAPT (BIO&DAPT) の存在下で、阻害剤 (SU5402、LY29402、又は U0126) を伴うか、又は伴わない培養を 12 日目まで続けた。

10

【図 8】実施例 2 における試験例 1 及び 2 の結果を示す図である。

【図 9】実施例 2 における試験例 3 の結果を示す図である。

【図 10】実施例 2 における試験例 4 の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の腸細胞の製造方法は、多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導する工程 (A) ; 及び前記胚性内胚葉を (2'Z,3'E)-6-プロモインジルビン-3'-オキシム (BIO) 及び N - [(3 , 5 - ジフルオロフェニル) アセチル] - L - A l a - 2 - フェニル - L - G l y - t e r t - ブチル - O H (D A P T) の存在下で培養することにより、該前記胚性内胚葉から腸細胞を分化誘導する工程 (B) を含むことを特徴とする。

20

【0014】

本発明において、「多能性幹細胞」とは、試験管内などの人工的に構成された条件下 (in vitro) で増殖能を持ち、生体の全ての組織の細胞に分化が可能な細胞を言う。本発明では、多能性幹細胞として、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞を用いることが好ましく、胚性幹細胞を用いることがより好ましい。

【0015】

(胚性幹細胞)

本発明で用いる胚性 (ES) 細胞は、哺乳動物由来の ES 細胞であればよく、その種類などは特に限定されず、例えば、マウス、サル又はヒト由来の ES 細胞などを使用することができる。ES 細胞としては、例えば、その分化の程度の確認を容易とするために、Pdx1 遺伝子付近にレポーター遺伝子を導入した細胞を用いることができる。例えば、Pdx1 座に LacZ 遺伝子を組み込んだ 129/Sv 由来 ES 細胞株又は、Pdx1 プロモーター制御下の GFP レポータートランスジーンをもつ ES 細胞 SK7 株などを使用することができる。あるいは、Hnf3 β 内胚葉特異的エンハンサー断片制御下の mRFP1 レポータートランスジーン及び Pdx1 プロモーター制御下の GFP レポータートランスジーンを有する ES 細胞 PH3 株を使用することもできる。また、本発明では、マウス由来のものであればマウス ES 細胞株 R1、ヒト由来のものであればヒト ES 細胞株である KhES-1、KhES-2、及び KhES-3 を用いることができ、このうち、マウス ES 細胞株 R1 又はヒト ES 細胞株 KhES-3 を好ましく用いることができる。

30

40

【0016】

哺乳動物由来の ES 細胞の培養方法は常法により行うことができ、例えば、必要によりフィーダー細胞としてマイトマイシン C 処理マウス胚線維芽細胞 (MEF) の存在下において、1000 ユニット / ml 白血球抑制因子 (LIF; Chemicon)、15% ノックアウト血清リプレースメント (KSR; Gibco)、1% ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone)、100 μ M 非必須アミノ酸 (NEAA; Invitrogen)、2mM L-グルタミン (L-Gln; Invitrogen)、1mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、50 ユニット / ml ペニシリンおよび 50 μ g / ml ストレプトマイシン (PS; Invitrogen)、及び 100 μ M β -メルカプトエタノール (β -ME; Sigma) を含むグラスゴー最小必須培地 (Invitrogen) 中で維持することができる。

【0017】

50

(人工多能性幹細胞)

本発明で用いる人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞は、体細胞を初期化することにより製造することができる。ここで用いる体細胞の種類は特に限定されず、任意の体細胞を用いることができる。即ち、本発明で言う体細胞とは、生体を構成する細胞の内生殖細胞以外の全ての細胞を包含し、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。体細胞の由来は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、両生類の何れでもよく特に限定されないが、好ましくは哺乳動物 (例えば、マウスなどのげっ歯類、またはヒトなどの霊長類) であり、特に好ましくはマウス又はヒトである。また、ヒトの体細胞を用いる場合、胎児、新生児又は成人の何れの体細胞を用いてもよい。

【0018】

10

本発明で言うiPS細胞は、所定の培養条件下 (例えば、ES細胞を培養する条件下) において長期にわたって自己複製能を有し、また所定の分化誘導条件下において外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有する幹細胞のことを言う。また、本発明における人工多能性幹細胞はマウスなどの試験動物に移植した場合にテラトーマを形成する能力を有する幹細胞でもよい。

【0019】

体細胞からiPS細胞を製造するためには、まず、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を体細胞に導入する。初期化遺伝子とは、体細胞を初期化してiPS細胞とする作用を有する初期化因子をコードする遺伝子である。初期化遺伝子の組み合わせの具体例としては、以下の組み合わせをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

20

(i) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子

(ii) Oct遺伝子、Sox遺伝子、NANOG遺伝子、LIN28遺伝子

(iii) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子、hTERT遺伝子、SV40 large T遺伝子

(iv) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子

【0020】

Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子及びMyc遺伝子にはそれぞれ、複数のファミリー遺伝子が含まれている。それぞれのファミリー遺伝子の具体例としては、国際公開WO 2007/069666号公報の明細書の第11頁から第13頁に記載されているものを用いることができる。具体的には、以下の通りである。

30

【0021】

Oct遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Oct3/4 (NM_002701)、Oct1A (NM_002697)、及びOct6 (NM_002699)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはOct3/4である。Oct3/4はPOUファミリーに属する転写因子であり、未分化マーカーとして知られており、また多能性維持に関与しているとの報告もある。

【0022】

Klf遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Klf1 (NM_006563)、Klf2 (NM_016270)、Klf4 (NM_004235)、及びKlf5 (NM_001730)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはKlf4である。Klf4 (Kruppel like factor-4) は腫瘍抑制因子として報告されている。

40

【0023】

Sox遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、例えば、Sox1 (NM_005986)、Sox2 (NM_003106)、Sox3 (NM_005634)、Sox7 (NM_031439)、Sox15 (NM_006942)、Sox17 (NM_0022454)、及びSox18 (NM_018419)を挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはSox2である。Sox2は初期発生過程で発現し、転写因子をコードする遺伝子である。

【0024】

Myc遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、c-Myc (NM_002467)、N-Myc (NM_005378)、及びL-Myc (NM_005376)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accessi

50

on 番号を示す)。好ましくは、c-Myc である。c-Mycは細胞の分化及び増殖に関与する転写制御因子であり、多能性維持に関与しているとの報告がある。

【0025】

上記した遺伝子は、ヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する遺伝子であり、本発明において任意の哺乳類動物由来（例えばヒト、マウス、ラット、サルなどの哺乳類動物由来）の遺伝子を用いることができる。また、野生型の遺伝子に対して、数個（例えば1～30個、好ましくは1～20、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1から3個）の塩基が置換、挿入及び／又は欠失した変異遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能を有する遺伝子を使用することもできる。

【0026】

本発明では特に好ましくは、初期化遺伝子として、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子の組み合わせを用いることができる。

【0027】

初期化遺伝子を体細胞に導入する方法は、導入された初期化遺伝子が発現して体細胞の初期化を達成できる限り特に限定されない。例えば、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を含む発現ベクターを用いて該初期化遺伝子を体細胞に導入することができる。ベクターを用いて2種類以上の初期化遺伝子を体細胞に導入する場合には、一つの発現ベクターに2種類以上の初期化遺伝子を組み込んで、該発現ベクターを体細胞に導入してもよいし、1種類の初期化遺伝子を組み込んだ発現ベクターを2種類以上用意して、それらを体細胞に導入してもよい。

【0028】

発現ベクターの種類は特に限定されず、ウイルスベクターでもプラスミドベクターでもよいが、好ましくはウイルスベクターであり、特に好ましくは導入した初期化遺伝子が体細胞の染色体に組み込まれるようなウイルスベクターである。本発明で使用するウイルスベクターとしては、レトロウィルスベクター（レンチウィルスベクターを含む）、アデノウィルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクターなどを挙げることができる。上記の中でも好ましくはレトロウィルスベクターであり、特に好ましくはレンチウィルスベクターである。

【0029】

組み換えウイルスベクターを作製するために用いるパッケージング細胞としては、ウィルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損するタンパク質を補給できる細胞であれば任意の細胞を用いることができる。例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス線維芽細胞NIH3T3に基づくパッケージング細胞を用いることができる。

【0030】

組換えウイルスベクタープラスミドをパッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法は、特に限定されず、リン酸カルシウム法、リポフェクション法又はエレクトロポレーション法などの公知の遺伝子導入法で行うことができる。

【0031】

ES細胞の未分化性及び多能性を維持可能な培地は当業界で公知であり、適当な培地を組み合わせるにより、本発明の人工多能性幹細胞を分離及び培養することができる。即ち、本発明の人工多能性幹細胞を培養するための培地としては、ES培地、ES培地に10ng/ml FGF-2 (bFGF) を添加後にマウス胚性線維芽細胞を24時間培養した上清であるMEF馴化ES培地（以下MEF馴化ES培地）などをあげることができる。本発明の人工多能性幹細胞を培養するための培地には、各種の成長因子、サイトカイン、ホルモンなど（例えば、FGF-2 (bFGF)、TGFβ-1、アクチビンA、ノギン (Noggin)、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3等のヒトES細胞の増殖・維持に関与する成分）を添加してもよい。また、分離された人工多能性幹細胞の分化能及び増殖能は、ES細胞について知られている確認手段を利用することにより確認することができる。

10

20

30

40

50

【0032】

(多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞への分化誘導)

本発明において、「胚性内胚葉細胞」(definitive Endoderm)とは、食道、胃、小腸および大腸を含む全腸管、並びに肺、肝臓、胸腺、副甲状腺、甲状腺、胆嚢、および膵臓などの腸管に由来する器官に分化し得る細胞を意味し、具体的には、マーカー遺伝子となるE-カドヘリン(E-cadherin;ECD)及びCXCR4、あるいはE-カドヘリンおよびCD55が陽性である内胚葉細胞を言う(Shiraki N, Harada S, Ogaki S, Kume K. and Kume S. Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker. Cell Struct. Funct. 35, 73-80, 2010;特願2009-225758)。

【0033】

10

本発明において、多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導する工程(A)は、特に限定されるものではなく、各種公知の方法により行うことができる。例えば、特表2007-516728等に記載の方法を用いることが可能であるが、以下に、好ましい方法について説明する。

【0034】

本発明の工程(A)では、上記多能性幹細胞を、適切な支持細胞の存在下かつアクチビン及び／又は塩基性線維芽細胞成長増殖因子(bFGF)の存在下において培養することにより、所望の胚性内胚葉細胞を分化誘導することができる。

【0035】

本発明で用いられる上記支持細胞としては、多能性幹細胞を胚性内胚葉細胞へと分化誘導できる細胞であれば、特に限定されるものではないが、好ましくは、中胚葉に由来する細胞を支持細胞として用いることができる。そのような支持細胞の具体例としては、M15細胞、MEF細胞、ST2細胞などが挙げられる。また、支持細胞は、マイトマイシンC処理又は放射線照射により細胞増殖を失わせたものを用いることができる。

20

【0036】

本発明で用いるM15細胞(mouse, mesonephros)は、登録番号ECACC 95102517として、細胞バンク(CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire))に登録されている。M15細胞は文献(Larsson, S. H., Charlieu, J. P., Miyagawa, K., et al. (1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. Cell 81, 391-401)の記載に従って入手可能である。M15についてのバンク情報を以下に記載する。

30

【0037】

Version 4.200201

M15 (mouse, mesonephros)

ECACC 95102517

Morphology: Epithelial

Mouse mesonephric epithelium, polyoma virus large T transformed

Depositor: Prof V van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh, UK (Originator)

No restrictions. Patent: None Specified By Depositor

40

Properties: Products: WT1 (expressed gene) Applications: Gene expression and protein studies connected to kidney development and Wilms' tumourigenesis.

Available in the following LABORATORY:

CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)

DMEM + 2mM Glutamine + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Split confluent cultures 1:5 to 1:10 i.e. seeding at 5x1,000 to 1x10,000 cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37C [cell growth impaired at lower densities]. Karyotype: Hyperdiploid

Hazard: CZ-II

The WT1-expressing mesonephric cell line M15 (alias Mesol5) was established from

50

mouse mesonephros transgenically expressing the large T protein of polyoma virus under the control of the early viral enhancer. As a tumour suppresser gene with a key role in urogenital development, WT1 is implicated as predisposition gene in the pathogenesis of Wilms' tumour (WT).

Further information

Research council deposit: Yes

Price_code: C

Bibliographic references:

Cell 1995;81:391

By Beatrice...

TITLE:M15

DATE:2005/04/24 00:32

URL:<http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3312.html>

European Collection of Cell Cultures,

Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK

June Poulton

European Collection of Cell Cultures

Health Protection Agency,

Porton Down

SP40JG Salisbury, Wiltshire UK

Phone: +44-1980-612512

Fax: +44-1980-611315

E-mail: ecacc@hpa.org.uk

URL: <http://www.ecacc.org.uk/>

【0038】

MEF細胞（ICRマウスより）は、ATCCにカタログ番号ATCC#SCRC-1046として登録されている。また、MEF細胞は、文献（Nagy A, et al. Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Third Edition Cold Spring Harbor Press; 2003）の記載に従って入手可能である。

【0039】

ST2細胞は、RCB0224として、独立行政法人理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンターに登録されている。また、ST2細胞は、文献（Ogawa, M., Nishikawa, S., Ikuta, K., Yamamura, F., Naito, M., Tkahashi, K. and Nishikawa, S. EMBO J 1988; 7: 1337-1343）の記載に従って入手可能である。

【0040】

これらのフィーダー細胞は、血清などを補充した動物細胞用の通常の培地（例えば、RPMI培地、DMEM培地）を用いて常法に従って培養することができる。

【0041】

本発明の工程（A）において、上記支持細胞の存在下で多能性幹細胞を培養する方法は特に限定されないが、例えば、上記支持細胞をフィーダー細胞として使用し、多能性幹細胞を共培養することができる。具体的には、上記フィーダー細胞（支持細胞）を予め一層に生着させたプレートに、アクチビン及び／又はbFGFを含む適切な培地を用いて、多能性幹細胞を播種し、共培養することができる。数日間、該共培養を行うことにより、多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導することができる。

【0042】

本発明の工程（A）において用いられる培地については、DMEM培地、RPMI培地等の通常の動物細胞用培地を用いることが可能であり、培地中にアクチビン及び／又はbFGFを添加して用いられ得る。また、工程（A）において用いられる培地は、必要に応じて、ウシ胎児血清などの血清、ロックアウト血清リプレースメント（KSR）、グルコース等の任意の成分を含んでいても良い。また、アクチビンとしては、アクチビンAを用い

10

20

30

40

50

ることが好ましい。培地中のアクチビンの濃度については、胚性内胚葉細胞が分化誘導され得る限り特に限定されるものではないが、例えば、5～300 ng/mL、好ましくは10～200 ng/mLとすることができる。培地中のbFGFの濃度についても、胚性内胚葉細胞が分化誘導され得る限り特に限定されるものではないが、例えば、5～300 ng/mL、好ましくは10～200 ng/mLとすることができる。

【0043】

本発明の工程（A）において、多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞が分化誘導されたか否かは、上述のECD及びCXCR4が発現を調べることにより確認することができる。また、必要に応じて、工程（A）で得られた培養物から、胚性内胚葉細胞を分離し、分離した胚性内胚葉細胞を本発明の工程（B）に供試することもできる。具体的には、ECD及びCXCR4に対する蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリーにより、胚性内胚葉細胞を分離することができる。

10

【0044】

（胚性内胚葉細胞から腸細胞への分化誘導）

本発明の工程（B）では、(2'Z,3'E)-6-ブロモインジルビン-3'-オキシム((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime) (BIO)、及びN-[(3,5-ジフルオロフェニル) アセチル] - L - Ala - 2 - フェニル - L - Gly - tert - ブチル - OH ((3,5-Difluorophenylacetyl)-Ala-Phg-Obu') (DAPT)の存在下で、工程（A）で得られた胚性内胚葉細胞を培養することにより、胚性内胚葉細胞から腸細胞を分化誘導する。具体的には、BIO及びDAPTの存在下で、胚性内胚葉細胞を、数日間（例えば、1～30日間、1～20日間、1～16日間）培養すると、Cdx2、Ifabp、Isx、Villin1（ビリン1）、ラクターゼ(Lactase)、Glut2などの腸細胞マーカー遺伝子の発現が認められる細胞が出現する。すなわち、本発明の工程（B）によれば、各種腸細胞マーカー遺伝子の発現が認められる腸細胞の分化誘導が可能となる。培地中のBIO及びDAPTの濃度は、胚性内胚葉細胞から腸細胞が分化誘導できる範囲であればよく、特に限定されるものではない。培地中のBIOの濃度は、例えば1～500 μMの範囲、好ましくは1～100 μM、より好ましくは1～50 μM、さらに好ましくは1～20 μM、さらにより好ましくは1～10 μMの範囲とすることができる。一方、培地中のDAPTの濃度は、例えば1～500 μMの範囲、好ましくは1～100 μM、より好ましくは1～50 μM、さらに好ましくは1～20 μMの範囲とすることができる。また、工程（B）において、BIO及びDAPTに加えて、胚性内胚葉細胞から腸細胞への分化誘導を活性化させるさらなる物質を培地中に添加することもできる。このような物質の例としては、FGFシグナル伝達を活性化する物質、BMPシグナル伝達を活性化する物質、ヘッジホッグ(Hh)シグナル伝達を活性化する物質などが挙げられる。FGFシグナル伝達を活性化する物質の具体例としてはFGF2、BMPシグナル伝達を活性化する物質の具体例としてはBMP4、ヘッジホッグ(Hh)シグナル伝達を活性化する物質の具体例としてはSAG(Smoothed Agonist; N-Methyl-N'-(3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclohexane, SAG_{1,3})がそれぞれ挙げられる。これらの物質は、マウスES細胞を出発材料とした場合に特に腸細胞への分化誘導を促進できることから、マウスES細胞を出発材料として用いた場合にこれらの物質を用いることが好ましく、その場合それらの物質を単独又は組合せて用いることができる。

20

30

40

【0045】

また、工程（B）では、上記胚性内胚葉細胞を、支持細胞としてM15細胞又はMEF細胞の存在下で培養することが好ましい。上記BIO及びDAPTの存在下で、かつこれらの支持細胞の存在下で胚性内胚葉細胞を培養した場合、上記腸細胞のマーカー遺伝子をより強く発現する各種腸細胞分化種が得られるからである。

【0046】

また、本発明により製造した腸細胞には、Tff3（杯細胞マーカー）、ムチン2(Muc2)（杯細胞マーカー）、DBA(Dolichos biflorus agglutinin)（杯細胞マーカー）、リゾチーム（パネート細胞マーカー）、Sox9（パネート細胞マーカー）、ソマトス

50

タチン(Sst) (腸内分泌細胞マーカー)、クロモグラニンA (腸内分泌細胞マーカー)、ガストリン (腸内分泌細胞マーカー)、シナプトフィジン (腸内分泌細胞マーカー)、Sst (腸内分泌細胞マーカー)、Sct (腸内分泌細胞) などの各腸細胞型のマーカーの発現が認められる細胞が含まれる。すなわち、本発明によれば、腸細胞系統の全ての細胞型を製造することが可能である。従って、本発明の方法では、工程 (B) により腸細胞を分化誘導させた後に、上述の腸細胞のマーカー遺伝子、及び／又は腸細胞系統の各種細胞型のマーカー遺伝子の発現をmRNA及び／又はタンパク質レベルで検出する工程を設けてもよい。このようなマーカー遺伝子の発現を検出する方法としては、RT-PCR法、ウェスタンブロットティング法などの各種公知の手法を採用することができる。さらに、本発明の方法では、フローサイトメトリー (FACS解析) などの各種公知の手法を用いて、分化誘導させた腸細胞ないし各種腸細胞をそれぞれ分離する工程をさらに設けてもよい。

10

【0047】

工程 (B) に関し、用いられる培地の種類、胚性内胚葉の培養条件、M15細胞又はMEF細胞の培養方法等は、上記工程 (A) に準じたものを採用することができる。

【0048】

上記の通り、本発明の製造方法によれば、腸細胞系統の全ての細胞型を製造することができるため、それら各種腸細胞は、各種消化器系悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病等の疾患に対する再生医療に用いることができる。また、本発明により製造した各種腸細胞は、医薬品の毒性試験 (安全性試験) や薬効・薬理試験に用いることもできる。

20

【0049】

さらに本発明によれば、多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞を分化誘導する工程 (A) ; 及び前記胚性内胚葉をBIO及びDAPTの存在下で培養することにより、該前記胚性内胚葉から腸細胞を分化誘導する工程 (B) によって腸細胞を製造する際に、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養し、被験物質の非存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度と、被験物質の存在下で多能性幹細胞を培養した場合における腸細胞への分化誘導の程度とを比較することを含む、多能性幹細胞から腸細胞へと分化誘導を促進又は阻害する物質をスクリーニングする方法が提供される。被験物質としては、成長因子又は低分子化合物などを使用することができる。この際、腸細胞で発現するマーカーの転写産物や蛋白量を指標として、腸細胞への分化誘導の程度を測定することが可能である。

30

【0050】

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、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

【実施例】

【0051】

[実施例1]

(A) 材料及び方法

(1) 細胞株

本実施例では、マウスのES細胞として、R1細胞株を使用した。R1細胞株を、白血病抑制因子 (LIF)、10%ウシ胎児血清 (FBS)、100 μ M非必須アミノ酸 (NEAA)、2mM L-Gln、50単位/mLペニシリン及び50 μ g/mLストレプトマイシン (PS)、ならびに100 μ M β -メルカプトエタノールが添加された2000mg/LグルコースDMEM中のマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) のフィーダー上で維持した。

40

MEFは、胎生期 (E) 12.5~14.5のマウス胎児から単離した。

【0052】

中腎細胞株M15は、T. Noce博士 (慶応大学) 及びM. Rassoulzadegan博士 (University of Nice-Sophia Antipolis, Antipolis, France) から分与されたものである。R1 ES細胞は、Andras Nagy博士から分与されたものである。MEF細胞及びM15細胞をマイトマイシンC (Sigma) で処置し、そして過去に報告されている通りに使用した (Shiraki, N., Higuchi,

50

Y., Harada, S., Umeda, K., Isagawa, T., Aburatani, H., Kume, K. and Kume, S. (2009). Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 694-9; Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K. and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13, 731-46; Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K. and Kume, S. (2008). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells* 26, 874-85.)。

【0053】

(2) マウスES細胞の腸分化

ES細胞を、10%ウシ胎児血清及び4500mg/mlグルコースを含むDMEM培地中で20ng/mlアクチビン及び50ng/ml bFGFを加えたM15細胞上で5日間にわたり培養し、胚性内胚葉(definitive endoderm)についてフローサイトメトリーを使用して分析した。腸分化のために、ES細胞を、M15細胞又はMEF細胞上で、BIO及びDAPTの存在で、又はBIO及びDAPTを伴わず、しかし、bFGFを伴い、10%KSRを伴う培地中で、グルコース濃度2000mg/mlでさらに培養した。

【0054】

(3) ヒトES細胞の維持

ヒトES細胞 (KhES-3) (PMID: 16707099) は、中辻博士と末盛博士 (京都大学) から分与されたものであり、日本政府のhES細胞ガイドラインに従って使用した。未分化hES細胞を、MEFのフィーダー層上で、20%KSR、L-Gln、NEAA、及びβ-MEが添加されたKnockout DMEM /F12 (Invitrogen) 中で、3%CO₂下で維持した。hES細胞を継代するために、hES細胞コロニーを、20% KSR及び1mM CaCl₂を含むPBS中の0.25%トリプシン及び0.1mg/mlコラーゲナーゼIVを用いて、それらを37℃で5分間処理し、続いて培養液を加え、穏やかに数回ピペット操作することによりES細胞塊を小片 (5~20個の細胞) に脱凝集させることによりフィーダー層から剥離させた。

【0055】

(4) ヒトES細胞の腸分化

分化誘導では、ヒトES細胞を、Y27632 (Wako) を用いて24時間にわたり前処理し、予めM15細胞でコーティングされた24ウェルプレートにおいて、1ウェル当たり50,000個の細胞をプレーティングした。ES細胞を0.25%トリプシン-EDTA (Invitrogen) を用いて分離し、ES維持培地を含むY27632中で1日間培養した。プレーティングから1日後、細胞をPBSにより洗浄し、培地を分化培地に変えた。細胞を、第1の分化培地 [2%B27 (Invitrogen)、NEAA、L-Gln、PS、及びβ-MEが添加されたRPMI1640 (Invitrogen)] 中で0~10日目に培養し、第2の分化培地 (10%KSR、NEAA、L-Gln、PS、及びβ-MEが添加されたDMEM) に10日目に切り替え、35日目まで培養した。アクチビンA (100ng/ml) を分化の0~10日目に加え、BIO及びDAPTを10~35日目に加えた。培地を、2日ごとに、増殖因子が添加された新鮮培地と交換した。

【0056】

(5) 増殖因子及び阻害剤

特記なき場合、以下の濃度を使用した。BIO (Calbiochem) 5μM; DAPT (Peptide Inst.) 10μM; 組換えヒトアクチビンA (R&D Systems)、20ng/ml。ヒトbFGF (Peprotech)、U0126 (Sigma)、LY294002 (Calbiochem)、SU5402 (Calbiochem)、10μg/ml; FGF2 (ヒトbFGF) (Peprotech)、256ng/ml; FGF4 (Peprotech)、FGF5 (Sigma)、FGF7 (R&D Systems)、FGF8 (Cosmo Bio)、FGF9 (Peprotech)、FGF10 (R&D Systems)、及びFGF18 (Sigma)、50ng/ml。

【0057】

(6) フローサイトメトリー分析及び選別された細胞の再培養

細胞をCell Dissociation Buffer (Invitrogen) を用いて分離し、1×10⁶個細胞/50μlに調整し、適切な抗体で染色した。抗体として、ビオチン又はAlexa 488抱合抗Eカドヘリンモノクローナル抗体ECCD2、フィコエリトリン (PE) 抱合抗Cxcr4 mAb 2B11 (BD Pharming

10

20

30

40

50

en)を使用した。染色された細胞を、FACS Aria (BD Pharmingen) を用いて精製した。データをBD FACSDivaソフトウェアプログラム (BD Pharmingen) を用いて記録し、Flowjoプログラム (Tree Star) を用いて分析した。

【0058】

(7) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析

RNAを、TRI Reagent (Sigma) 又はRNeasyマイクロキット (Qiagen) を使用してES細胞から抽出し、次にDNase (Sigma) を用いて処理した。3 μ g のRNAを、MMLV逆転写酵素 (Toyobo) 及びオリゴdTプライマー (Toyobo) を用いて逆転写した。プライマー配列及びサイクル数を表1に示す。各サイクルのPCR条件は、最初は96℃で1分間の変性、2サイクル目からは、96℃で30秒間の変性、60℃で2秒間のアニーリング、そして72℃で20秒間の伸長とした。最終サイクルでは72℃で7分間の伸張とした。RT-PCR産物を5%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、SYBR Green I (Molecular Probes) を用いて染色し、Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) を使用して可視化した。

10

【0059】

【表 1】

マウス・プライマー	配列	サイクル数	
Pax8-U	TGCCTTTCCCATGCTGCCTCCGTGTA(配列番号1)	27	
Pax8-D	GGTGGGTGGTGCCTTGGCCTTGATGTAG(配列番号2)		
Cdx2-U	TGGTGTACACAGACCATCAGC(配列番号3)	25	
Cdx2-D	CCTTGGCTCTGCGGTTCT(配列番号4)		
Ifabp-U	GGAAAGGAGCTGATTGCTGTCC(配列番号5)	25	
Ifabp-D	CTTTGACAAGGCTGGAGACCAG(配列番号6)		
Isx-U	AGTTTGCCAGACCACAAAG(配列番号7)	25	
Isx-D	CAGGGTAATGGGTGAAGTGG(配列番号8)		
Hoxc8-U	GTCTCCCAGCCTCATGTTTC(配列番号9)	27	
Hoxc8-D	TGGAACCAAATCTTCACTTGTC(配列番号10)		10
Villin-U	GTTATGAGCCCGAAAGTGA(配列番号11)	25	
Villin-D	AGAGAAGGCAGCTGGAGTCA(配列番号12)		
Lactase (Lct)-U	CCCATCTTCAAAAACGGAGA(配列番号13)	27	
Lactase (Lct)-D	CCCTATCGGCATCAAAAGAC(配列番号14)		
β-actin-U	GTGATGGTGGGAATGGGTCA(配列番号15)	18	
β-actin-D	TTTGATGTACGCACGATTTCC(配列番号16)		
Tff-3-U	CATCCTGTGCAGTGGTCCT(配列番号17)	25	
Tff-3-D	GCACCATACATTGGCTTGG(配列番号18)		
Lysozyme (Lyz1)-U	GAGACCGAAGCACCAGCTATG(配列番号19)	25	
Lysozyme (Lyz1)-D	CGGTTTTGACATTGTGTTCCG(配列番号20)		
Sst-U	CCGTCAGTTTCTGCAGAAGT(配列番号21)	23	
Sst-D	CAGGGTCAAGTTGAGCATCG(配列番号22)		
Secretin (Sct)-U	GTTGCAGCATTTGTCACACC(配列番号23)	25	
Secretin (Sct)-D	TGAACGATCAACAGCAGACC(配列番号24)		
Synaptophysin (Syp)-U	GGTTCCGGAGTGGGCAGGTTTG(配列番号25)	25	20
Synaptophysin (Syp)-D	GGGGCGTGGGGTGAATCAG(配列番号26)		
Gast-U	ACCAATGAGGACCTGGAACA(配列番号27)	25	
Gast-D	TCCTACTGGTCTTCTCAGCA(配列番号28)		
Cck-U	ATGAAGAGCGGCGTATGTCT(配列番号29)	25	
Cck-D	CGATGGGTATTGCTAGTCCTC(配列番号30)		
ヒト・プライマー	配列	サイクル数	
hODX2-U	GGAACCTGTGCGAGTGGATG(配列番号31)	25	
hODX2-D	AGGTGGTGGGGCTTGGCGGGGCG(配列番号32)		
hVILLIN-U	ACTTCTATGGGGGCGACTG(配列番号33)	25	
hVILLIN-D	ATGCGTCCCTTGAAGATGG(配列番号34)		
hIFABP-U	GATAAACTAAAAGCATAGGCTGCATATG(配列番号35)	25	
hIFABP-D	TCAAAATCAGAATGGCAATTATCTCT(配列番号36)		
hISX-U	CAGGAGGCTCTGAGAGGACA(配列番号37)	25	
hISX-D	ATCTGTGCAGAAGGGATGCT(配列番号38)		
hLCT-U	GCTGCACCGTTAGAGATGAC(配列番号39)	25	30
hLCT-D	CGGTTTTTGCTCCCTTAACA(配列番号40)		
hTFF3-U	CCCAAGGAGTGCAACAACC(配列番号41)	25	
hTFF3-D	GGGACAGAAAAGCTGAGATGA(配列番号42)		
hLYZ-U	GATGGCTACAGGGGAATCAG(配列番号43)	25	
hLYZ-D	TAACTGCTCCTGGGGTTTG(配列番号44)		
hGAST-U	TGGCTGGAGGAAGAAGAAGA(配列番号45)	25	
hGAST-D	TCAGTTTTTCAGGGGACAGG(配列番号46)		
hSYP-U	CTCCACTCCTCCCACTCTG(配列番号47)	25	
hSYP-D	ACTCCACACCTCCTCTCCAA(配列番号48)		
hSST-U	GATGCTGTCTGCGGCTCC(配列番号49)	25	
hSST-D	TGCCATAGCCGGGTTTGA(配列番号50)		
hFOXA2-U	GCAGATACCTOCTACTACCA(配列番号51)	25	
hFOXA2-D	GAAGCAGGAGTCTACACAGT(配列番号52)		
hGAPDH-U	CGAGATCCCTCCAAAATCAA(配列番号53)	20	40
hGAPDH-D	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA(配列番号54)		

96°C 1min

96°C 30sec

60°C 2sec

72°C 20sec

72°C 7min

4°C-

【0060】

(8) 抗体

使用した抗体は以下の通りである。

- ・マウス抗Cdx2 (BioGenex, San Ramon, CA)
- ・ラット抗マウスEカドヘリン (TaKaRa BIO INC., Japan)
- ・ヤギ抗HNF4a (Santa cruz Biotechnology Inc)
- ・マウス抗ビリン (BD Transduction Laboratories)
- ・ウサギ抗リゾチーム (Diagnostic Biosystems)
- ・ウサギ抗クロモグラニンA (Epitomics, Inc.)
- ・ビオチン抱合ドリコスマメ凝集素 (DBA) レクチン (SIGMA)
- ・ヤギ抗ソマトスタチン (Santa cruz Biotechnology Inc.)
- ・マウス抗Muc2 (visionbiosystems novocastra)
- ・ウサギ抗Sox9 (Millipore)
- ・ウサギ抗クロードン7 (Abcam)
- ・ウサギ抗Glut-2 (Chemicon)

10

【0061】

(9) アルカリホスファターゼ活性の測定

培養細胞を4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定した。0.1% Tween-20 (TBST) を含むリン酸緩衝食塩水で20分間洗浄後、発色反応を、NTMT (100mMTris-HCl [pH 9.5]、100mM NaCl、50mM MgCl₂、0.1% Tween-20、2mMレバミソール) 中の35 µg/ml ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)、17.5 µg/ml 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて行った。

【0062】

20

(10) PAS染色及びAlucianブルー染色

培養細胞を4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定した。PAS染色溶液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 又はAlucianブルー8GX (SIGMA) を製造業者の説明書に従って使用した。

【0063】

(B) 結果

(1) 古典的Wntシグナル伝達 (canonical Wnt signaling) の活性化及びNotchシグナル伝達の阻害によって、M15細胞上でのES細胞の腸分化が増強される。
本発明者らは、以前に、M15細胞上でES細胞を培養した際、ESが胚性内胚葉運命 (definitive endoderm fate) に、次に胚性内胚葉系統の種々の細胞型 (Caudal型ホメオボックス2 (Cdx2) 発現腸細胞を含む) に分化することを示した。Cdx2は、腸特異的転写因子の一種であり、腸細胞のマーカー遺伝子として有用である (Silberg, D. G., Swain, G. P., Suh, E. R. and Traber, P. G. (2000). Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. Gastroenterology 119, 961-71.)。

30

【0064】

胚性内胚葉が腸細胞系列へ分化するための最適条件を調査するために、胚性内胚葉細胞が誘導された後にES細胞培養に化学物質を添加することにより、いくつかの培養条件を試験した (図1A)。定量PCRによりアッセイし、(2',3'E)-6-ブromoインジルビン-3'-オキシム (BIO) (GSK3βの阻害剤、あるいは古典的Wntシグナル伝達の活性化因子) 又は(3,5-ジフルオロフェニルアセチル)-Ala-Phg-OBu' (DAPT) (Notchシグナル伝達の阻害剤として機能するガンマ-セクレターゼ阻害剤) が、腸脂肪酸結合タンパク質 (Ifabp) 発現を分化の20日目 (d20) に誘導することが見出された (図1B)。腸脂肪酸結合タンパク質 (Ifabp) は、腸細胞のマーカー遺伝子として有用である (Green, R. P., Cohn, S. M., Sacchettini, J. C., Jackson, K. E. and Gordon, J. I. (1992). The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product. DNA Cell Biol 11, 31-41.)。さらに、BIO及びDAPTの同時添加によってCdx2及びIfabpの発現が劇的に増加することが見出された (図1B、C)。M15細胞上で培養されたES細胞におけるBIO及びDAPTの存在での種々の腸マーカーの時間的発現を検証した (図1D)。ビリン1 (Villin) (Maunoury, R., Robine, S., Pringault, E., Leonard, N., Gaillard, J. A. and L

40

50

ouvard, D. (1992). Developmental regulation of villin gene expression in the epithelial cell lineages of mouse digestive and urogenital tracts. *Development* 115, 717-28.) の発現が5日目に誘導され、Cdx2発現が分化の10日目に実質的なレベルで誘導された。さらに、15日目にIfabpの誘導が、20日目でラクターゼ (Lct) (Bosse, T., Fialkovich, J. J., Piaseckyj, C. M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R. J., Montgomery, R. K. and Krasinski, S. D. (2007). Gata4 and Hnflalpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1302-14.) 及び腸特異的ホメオボックス (Isx) (Choi, M. Y., Romer, A. I., Hu, M., Lepourcelet, M., Mechoor, A., Yesilaltay, A., Krieger, M., Gray, P. A. and Shivdasani, R. A. (2006). A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development* 133, 4119-29.) の発現が認められた。RT-PCR分析と相関して、Cdx2発現の免疫組織化学分析により、BIO及びDAPTの存在で、高い割合のES細胞がCdx2発現細胞に変化することが認められた。

【0065】

(2) BIO及びDAPTの添加によって、胚性内胚葉が後方化する。

誘導された腸細胞が胚性内胚葉に由来するか否かを検証するために、フローサイトメトリーにより、分化の4日目に胚性内胚葉を回収し (図2A)、これらの細胞を15日目まで再培養した。胚性内胚葉細胞は、さらに、BIO及びDAPTの添加時に、Cdx2又はビリン発現腸細胞に分化した (図2B)。この結果により、Cdx2及びビリン発現腸細胞が、胚性内胚葉に由来するものであることが明らかとなった。

【0066】

次に、領域特異的な前方・後方マーカを示すマーカパネルの発現に対する段階的濃度のBIO及びDAPTの効果を試験した。BIO及びDAPTが未添加の場合、或いは低濃度で加えた場合では、甲状腺領域の前方マーカである、ペアードボックス遺伝子8 (Pax8) (Mansouri, A., Chowdhury, K. and Gruss, P. (1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19, 87-90.) の発現が認められた。Cdx2及びIfabpは、中程度の濃度のBIO及びDAPTで誘導された。Isx及びホメオボックスC8 (Hoxc8) (Kawazoe, Y., Sekimoto, T., Araki, M., Takagi, K., Araki, K. and Yamamura, K. (2002). Region-specific gastrointestinal Hox code during murine embryonal gut development. *Dev Growth Differ* 44, 77-84.) は、高濃度のBIO及びDAPTで誘導された (図2C)。

これらの結果により、腸領域化はBIO及びDAPTの段階的な濃度により特定されることが示唆された。

【0067】

次に、さらに、BIO (5 μ M) 又はDAPT (10 μ M) を用いてES細胞を処理し、Pax8及びHoxc8の発現に対する、もう片方の因子 (BIO又はDAPT) の段階濃度での効果を試験した。BIO (5 μ M) の存在下で、高DAPT濃度によって前方マーカPax8がオフになり、後方マーカHoxc8が誘導された (図2D)。一方で、ES細胞をDAPT (10 μ M) 及び段階濃度のBIOで処理した場合、高BIO濃度によってPax8がオフになり、Hoxc8がオンになった。これらの結果は、Notchシグナル伝達が阻害された場合、BIOによる古典的シグナル伝達の活性化によって、胚性内胚葉の前方分化が阻害され、かつ後方分化が亢進されたことを実証している (図2E)。

【0068】

(3) MEF細胞は、BIO及びDAPTの存在下でのES細胞の腸系統への分化を誘導する際に、M15細胞よりも強力である。

次に、M15細胞に対して、MEF細胞又はPA6細胞上での胚性内胚葉の培養を比較することにより、それぞれの支持細胞について腸分化の効果を試験した。ES細胞をM15細胞上で、かつアクチビン及びbFGFの存在下で4日間にわたり培養することにより、胚性内胚葉細胞を得て、次いでフローサイトメトリーにより選別した。選別した胚性内胚葉細胞を、BIO及びDAPTの存在下で、M15細胞、MEF細胞、又はPA6細胞上で15日目まで再培養した (図3A

）。Cdx2を発現する分化細胞が、MEF細胞を使用した場合にも観察されたが、P A 6細胞では認められなかった（図3 B）。RT-PCR分析によって、M15細胞の場合と比較した結果、MEF細胞上で増殖させた場合には、誘導される腸マーカーのさらに強い発現が認められた（図3 C）。Cdx2の発現が、分化の12日目から高レベルで検出された（図3 D）。他のマーカーとして、トレフォイルファクター3（Tff3、杯細胞マーカー）；リゾチーム（Lyz1、パネート細胞マーカー）；ソマトスタチン（Sst、腸内分泌マーカー）；及びLctなども12日目又は15日目から検出された（図3 E）（Hocker, M. and Wiedenmann, B. (1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859, 160-74.; Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A. B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639-44.）。

【0069】

（4）ES細胞由来の腸細胞の特性

次に、ES細胞から分化した腸細胞型について調査した。Cdx2発現腸細胞は、Eカドヘリン（上皮マーカー）の発現により示される上皮細胞である（Lugo-Martinez, V. H., Petit, C. S., Fouquet, S., Le Beyec, J., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., Cardot, P. and Thenet, S. (2009). Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G235-44.）。Cdx2発現細胞は、また、肝細胞核因子4アルファ（HNF4a）（内胚葉マーカー）（Cattin, A. L., Le Beyec, J., Barreau, F., Sain-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F. J., Robine, S., Pincon-Raymond, M., Cardot, P., Lacasa, M. et al. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* 29, 6294-308.）、及びGlut2（吸収腸細胞マーカー）（Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellert, G. L., Thorens, B., Leturque, A. and Brot-Laroche, E. (2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol* 552, 823-32.）、又はクロードイン7（タイトジャンクションマーカー）（Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T. and Sawada, N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 54, 933-44.）を共発現する（図4 A～C）。さらに、他のマーカーについても検証した。パネート細胞（リゾチーム発現）、及び、クロモグラニンA及びソマトスタチンなどの内分泌マーカーを発現する細胞が誘導された（図4 D）。これらの細胞は、また、ムチン2（van Klinken, B. J., Einerhand, A. W., Duits, L. A., Makkink, M. K., Tytgat, K. M., Renes, I. B., Verburg, M., Buller, H. A. and Dekker, J. (1999). Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. *Am J Physiol* 276, G115-24.）及びレクチンDBA（ドリコスマメ凝集素）（杯細胞マーカー）（Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M. and Doi, K. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp Anim* 45, 155-60.）、並びに転写調節因子Sox9（パネート細胞マーカー）（Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J. H., Hamilton, S. R., Adams, H. P., Zhang, J., Clevers, H. and de Crombrughe, B. (2007). SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 133, 539-46.）を発現し、分化したES細胞中でも検出された（図5 E、F）。腸細胞がアルカリホスファターゼ活性により特徴付けられた（図5 G）。杯細胞は、PAS陽性（図5 H）及びAlucianブルー染色（図5 I）により特徴付けられた。これらの特徴は全て、本実施例の培養中で生成されたES細胞由来の腸細胞において確認される。これらの結果は、ES細胞が、腸細胞系統の全ての細胞型（腸細胞の吸収細胞及びパネート細胞の分泌細胞、杯細胞、ならびに内分泌細胞を含む

）に分化誘導されることを示している。

【0070】

（5）ヒトES細胞の腸細胞への分化は、古典的Wntシグナル伝達の活性化及びNotchシグナル伝達の阻害により増強される。

次に、ヒトES細胞が、マウスES細胞と同様に、BIO及びDAPTの添加により腸細胞に方向付けることができるか否かを調べた。この試験例では、khES-3（ヒトES細胞株）（Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N. (2006). Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 926-32.）を使用した。アクチビン（100 μ M）を用いてKhES-3を10日間にわたり培養した後、khES-3が胚性内胚葉に分化した。次に、KhES-3の培養物にBIO及びDAPTを加え、35日目まで培養を続けた。次いで、免疫組織化学的解析又はRT-PCRによりアッセイした。Cdx2を発現するkhES-3が、免疫組織化学的解析（図6A）により25日目に、及びRT-PCR（図6B）により15日目という早期に検出された。RT-PCRにより、腸細胞（hVillin, hIfabp, hIsx）、杯細胞（hTff3）（Suemori, S., Lynch-Devaney, K. and Podolsky, D. K. (1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11017-21.）、パネート細胞（hLyz）（Ouellette, A. J. (1997). Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. *Gastroenterology* 113, 1779-84.）、内分泌細胞（ガストリン、hGast；シナプトフィシン、hSyp；ソマトスタチン、hSst）（Hocker, M. and Wiedenmann, B. (1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859, 160-74.; Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A. B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639-44.）の分子マーカーも検出され、これら分子マーカーの発現が誘導されることも明らかとなった（図6B）。分化したkhES-3細胞はPAS染色陽性であり、機能的な杯細胞が誘導されることが明らかとなった。

【0071】

（6）腸系列へのES細胞分化がFGFシグナル伝達により増強され、MAPKではなく、PI3Kを通じて媒介される。

M15細胞及びMEF細胞の両方が実質的なレベルでFGF2（bFGF）を発現することは既に公知である。したがって、次に、腸分化に対するFGF2（bFGF）の効果を試験した。フローサイトメトリーにより回収した胚性内胚葉細胞を、BIO及びDAPTの代わりに、FGF2（bFGF）の存在下で再培養した。RT-PCRによる分析によって、BIO及びDAPTの存在下で培養した場合には、腸細胞（Ifabp, Isx）、杯細胞（Tff3）、パネート細胞（Lyz1）、及び腸内分泌細胞（Sct（Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalt, V., Citadelle, D., Kellett, G. L., Thorens, B., Leturque, A. and Brot-Laroche, E. (2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol* 552, 823-32.）、Syp, Sst, Gast）の分子マーカーが発現されることが証明された。しかし、BIO及びDAPTなしに、FGF2（bFGF）だけの存在下で培養した場合には、これらのマーカーはずっと低いレベルで誘導された。従って、コレシストキニン（Cck）を除く腸細胞の大半の分化マーカーを誘導するために、BIO及びDAPTの同時添加はFGF2（bFGF）よりも効果がある（図7A）。

【0072】

次に、分化の4日目から、各種FGFをES細胞培養に添加することにより、各種FGFの効果を試験した。FGF2（bFGF）の添加によってCdx2を発現する腸細胞が誘導された。FGF4は、Cdx2を発現する細胞を誘導するために、FGF2（bFGF）より効果的であった。FGF7、9、10、及び18もES細胞の腸分化を誘導したが、その程度はより低いものであった（図7B）。しかし、これらのFGFの添加は、腸分化において、BIO及

びDAPTの添加ほど効果的ではない。この結果は図7Aと矛盾しない。

【0073】

次に、BIO、DAPT、及びFGFシグナル伝達の間における関係を精査した。FGF受容体のアンタゴニストSU5402、及びPI3Kの阻害剤LY294002を使用した。SU5402によるFGFシグナル伝達の遮断、又はLY294002によるPI3Kの遮断によって、BIO及びDAPT媒介性の腸分化が部分的に阻害された(図7C及びD)。これらの結果により、FGFシグナル伝達が特にPI3Kを通じてWnt及びNotchシグナル伝達と協同的に機能し、腸分化を媒介することが証明された。

【0074】

(C) 考察

腸上皮では、腸幹細胞(ISC)及び陰窩中に存在する前駆細胞が、活発に増殖し、分化細胞を提供する。腸細胞、絨毛中に存在する杯細胞及び腸内分泌細胞、ならびに陰窩基底部に位置するパネート細胞など、4種類の非増殖性の最終分化した上皮細胞が存在する(Barker, N., van de Wetering, M. and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22, 1856-64.)。

【0075】

本実施例において、ES細胞に由来する胚性内胚葉細胞をM15細胞又はMEF細胞上で培養することにより、BIOの添加による古典的Wntシグナル伝達経路の活性化及びDAPTの添加によるNotch経路の阻害によって、同時に、腸管内胚葉での後方マーカーの発現が誘導され、腸分化が亢進されることが確かめられた。M15細胞及びMEF細胞から放出されたFgfは、腸の特徴の確立を助長する(図7)。従って、本実施例の結果は、FGF、Wnt、及びNotchシグナル伝達が協同的に機能し、腸系列へのES細胞の分化を促進させることも示している。

【0076】

FGFが、用量依存的な様式で、ヒトES細胞由来の胚性内胚葉の異なる前腸系統への特定化に関与していることが知られている(Ameri, J., Stahlberg, A., Pedersen, J., Johansson, J. K., Johannesson, M. M., Artner, I. and Semb, H. (2010). FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells* 28, 45-56.)。高いFGF2(bFGF)レベルで、中腸内胚葉の小腸前駆細胞への特定化が、Pdx1+膵臓前駆細胞の代わりに増加することが知られている(上記Ameriらの文献)。

【0077】

また、古典的Wnt経路によって、陰窩中での未熟細胞の増殖、及びパネート細胞の成熟が活性化されることが報告されている(van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T. et al. (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 7, 381-6.)。また、Notchシグナル伝達の活性化は、腸前駆細胞プールを増幅させ、杯細胞及び腸内分泌細胞の分化を阻害できることが知られている(Zecchini, V., Domaschenz, R., Winton, D. and Jones, P. (2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev* 19, 1686-91.)。また、共通するNotch経路の転写調節因子CSL/RBP-Jの条件付き除去後、増殖性陰窩細胞が、有糸分裂後の杯細胞へ迅速かつ大規模に変換されることが観察されている(van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959-63.)。さらに、類似の表現型が、ガンマ-セクレターゼ阻害剤を用いてNotchカスケードを遮断することにより得られたことが知られている(上記van Esら文献)。

【0078】

このように、陰窩及び腺腫における未分化の増殖性細胞の維持には、Notchカスケード及びWntカスケードの協奏的活性化が必要となる。

【0079】

[実施例2]

実施例2は、本発明の方法において、BIO及びDAPTに加えて各種シグナル伝達系の阻害剤又は活性化剤をさらに添加した例を示す。

【0080】

(1) 試験例1：各種阻害剤の添加

マウスES細胞を出発材料として用いた場合において、BIO及びDAPTに加えて、さらにどのようなメカニズムにより腸分化が誘導されているのかを明らかにするために、各種シグナル伝達系の阻害剤を添加して、腸マーカーであるCdx2遺伝子の発現が下がる条件について検討を行った。

【0081】

阻害剤としては、BMPシグナル阻害剤であるノギン (Noggin) 500 ng/ml (R&D systems)若しくはドルソモルフィン(dorsomorphin) 200 nM (SIGMA-ALDRICH)；レチノイン酸シグナルの阻害剤であるLE540 1 μ M (Wako)；ヘッジホッグシグナルの阻害剤であるKAAD-シクロパミン(KAAD-Cyclopamine) 250nM (Calbiochem)；又はCxcr4の阻害剤であるAMD3100 10 μ M (SIGMA-ALDRICH)を添加した。実施例1に記載の通り、マウスES細胞をM15細胞上で胚性内胚葉まで分化誘導した後に、フローサイトメトリーを用いて胚性内胚葉を分取しMEF細胞上に再培養した。その後、上記分取した胚性内胚葉を、実施例1に記載の方法に準じて、BIO (5 μ M) 及びDAPT (10 μ M) 並びに上記阻害剤の存在下で、8日間(培養12日目)培養し、実施例1に記載の方法により細胞からRNAを抽出し、腸マーカーであるCdx2遺伝子の発現についてリアルタイムPCRにより解析した。リアルタイムPCRは、実施例1で用いたプライマー・ペア (表1参照)、Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo)、及び7500 Fast Real-time PCR system (ABI社)を用いて行った。PCRの反応サイクルは表1に示す通りである。結果を図8Aに示す。

その結果、ノギン (Noggin)、ドルソモルフィン (dorsomorphin) 又はKAAD-シクロパミン(KAAD-Cyclopamine)を添加することによりCdx2の発現が低下した。すなわち、マウスES細胞を出発材料とした場合には、BMPシグナル伝達系、及びヘッジホッグ (Hh) シグナル伝達系が腸分化を促進的に制御していることが示唆された。

【0082】

(2) 試験例2：各種活性化剤の添加

上記阻害剤を用いた実験により、FGFシグナル伝達系(SU5402添加実験)や、BMPシグナル伝達系ないしHhシグナル伝達系が腸への分化に関与していることが判明した。

そこで、次はFGFシグナル伝達系、BMPシグナル伝達系、及びHhシグナル伝達系の活性化実験を行った。マイクロアレイデータにおいてMEF細胞ではFGF2及びBMP4が発現していることを考慮して、FGFシグナル伝達系及びBMPシグナル伝達系の活性化のためにFGF2(PEPROTECH) 50ng/mL、及びBMP4(R&D systems) 25 ng/mLを用いた。Hhシグナル伝達系の活性化については、SAG (MERCK) (smoothend agonist; smo) 300 nMを用いた。

【0083】

分化誘導実験のために、以下の通り無フィーダー系で分化誘導を行った。まず、マウスES細胞をゼラチン・コート・ディッシュに6900細胞/ cm^2 で播種した。ES細胞は、NEAA、L-Gln、PS、 β -ME、インシュリン(Sigma-Aldrich) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、トランスフェリン(Sigma-Aldrich) 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、セレン (Sigma-Aldrich) 6.7pg/ mL 、0.25%のアルブマックス(Albmax)(Invitrogen)、及び組換えヒトアクチビンA (R&D Systems, Minneapolis, MN) 10ng/ mL を添加した、4500mg/Lのグルコースを含有するDMEM培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, Glasgow, UK)で、7日間培養し、次いで、培地を、グルコース2000mg/ mL 、BIO (5 μ M) 及びDAPT (10 μ M) を含有し、かつ各活性化剤ないし成長因子を添加した10%KSRに置換した。その後、さらに培養を続け、培養10日目と15日目に、実施例1に記載の通り細胞を分離し、フローサイトメトリーを用いてCdx2陽性細胞の割合を評価した。フローサイトメトリー (FACS) 解析は、BD Cytotfix /CytopermTM Kit (BD Biosciences) を用い、製造元のマニュ

アルに従って行った。その結果を図8 Bに示す。

【0084】

図8に示される通り、培養10日目においてコントロール(BIO,DAPTのみ添加したもの)については30%程度がCdx2陽性であった。一方、FGF2を添加したものについては40%となり有意にCdx2陽性細胞数について上昇がみられた。また、SAG (Smoothened Agonist)を添加するとCdx2陽性数が低下するが、これはBMP4を添加することにより改善された。培養15日目においてはコントロールでは20%程度Cdx2陽性だが、先ほどと同様にFGF2を添加すると60%程度がCdx2陽性となりさらに効率よく分化することが示された。また、FGF2に加えてBMP4もしくはSAGを添加することでさらに効率よく分化することが判明した。この結果より、マウスES細胞からの腸への分化についてはFGF2が促進的に働き、さらに培養後期においてBMP4またはSAGによりBMPシグナル伝達系又はHhシグナル伝達系が活性化されて、さらに分化が促進されることが明らかとなった。

10

【0085】

(3) 試験例3: ヒトES細胞における各種活性化剤の添加

ヒトES細胞について、同様に無フィーダー系でFGF2、BMP4及び／又はSAGを添加することによりCDX2陽性細胞への分化効率が改善するかの検討を行った。

【0086】

まず、分化誘導実験のために、ヒトES細胞をゼラチン・コート・ディッシュに69000細胞/cm²で播種した。ES細胞は、NEAA、L-Gln、PS、β-ME、インシュリン(Sigma-Aldrich) 10μg/mL、組換えヒトアクチビンA (R&D Systems, Minneapolis, MN) 100ng/mL、及びB27サプリメント(Invitrogen)を添加した、RPMI 1640培地(Invitrogen)で、7日間培養した。次いで、培地を、グルコース2000mg/mL、BIO(5μM)、DAPT(10μM)、及び試験例2に記載の濃度の各活性化剤ないし成長因子を添加した10%KSRに置換した。その後、さらに培養を続け、培養9日目と20日目に、実施例1に記載の通り細胞を分離し、フローサイトメトリーを用いてCdx2陽性細胞の割合を評価した。フローサイトメトリー(FACS)解析は、BD Cytotfix /CytopermTM Kit (BD Biosciences) を用い、製造元のマニュアルに従って行った。その結果を図9に示す。

20

【0087】

培養9日目においてはどの条件にも差は無かったが、培養20日目において、Fgf2を添加したものについてはCDX2陽性細胞の割合が低下した。この結果よりヒトES細胞においてはFGFシグナルが腸への分化を抑制的に働き、マウスES細胞とは腸への分化メカニズムが異なっていることが示唆された。

30

【0088】

(4) 試験例4: ヒトES細胞におけるFGF2濃度の影響

高濃度のFGF2がヒトES細胞からCDX2陽性細胞への分化に重要であるという過去の報告があることから、同様の結果が得られるかについて試験した。最終濃度250ng/mLのFGF2を用いた。試験例3の方法に準じて、ゼラチン・コート・ディッシュ上でヒトES細胞を内胚葉まで分化誘導した後(培養7日目)に、BIO(5μM)及びDAPT(10μM)に加えて、FGF2を0、50、及び250 ng/mLでそれぞれ添加し、9日目、あるいは20日目まで培養し、フローサイトメトリーによりCdx2陽性細胞の割合を評価した。フローサイトメトリー(FACS)解析は、BD Cytotfix /CytopermTM Kit (BD Biosciences) を用い、製造元のマニュアルに従って行った。その結果を図10に示す。

40

【0089】

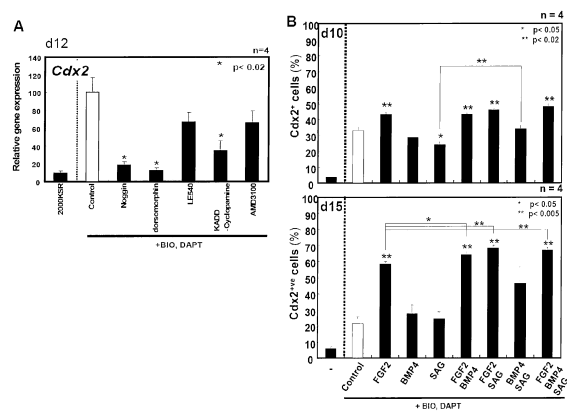
図10に示される通り、培養9日目においては250 ng/mLでFGF2を添加したものについてCDX2陽性細胞の割合が低下することを確認した(図10 A)。また、培養20日目においては、Fgf2の濃度依存的にCDX2陽性細胞の割合が低下している(図10 B)。この結果は、図9の結果に相応し、改めてFGF2が分化誘導後期(9~20日目の期間)において、腸への分化に対して抑制的に働くことを確認した。

【0090】

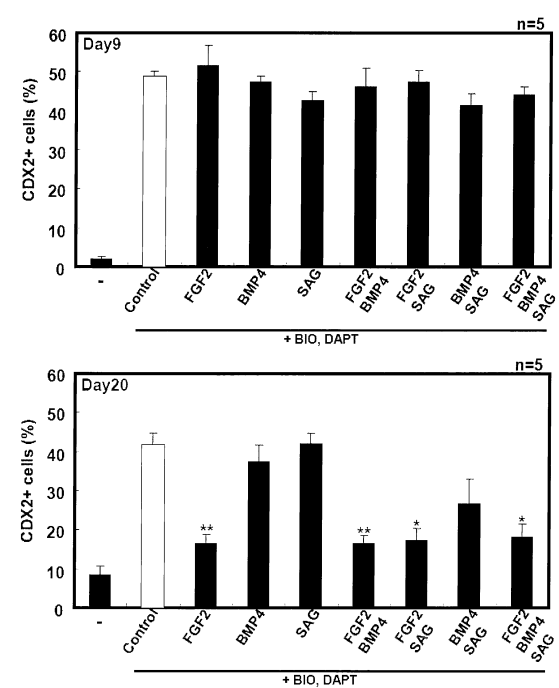
50

本実施例の結果によれば、FGF、Wnt、BMP、Hh、及びNotchシグナル伝達の操作によって、腸の機能的な成熟細胞型の分化が可能であることが証明された。これらの知見によれば、本発明が、発生生物学及び再生医療の分野において高い産業上の利用可能性を有することは明らかである。

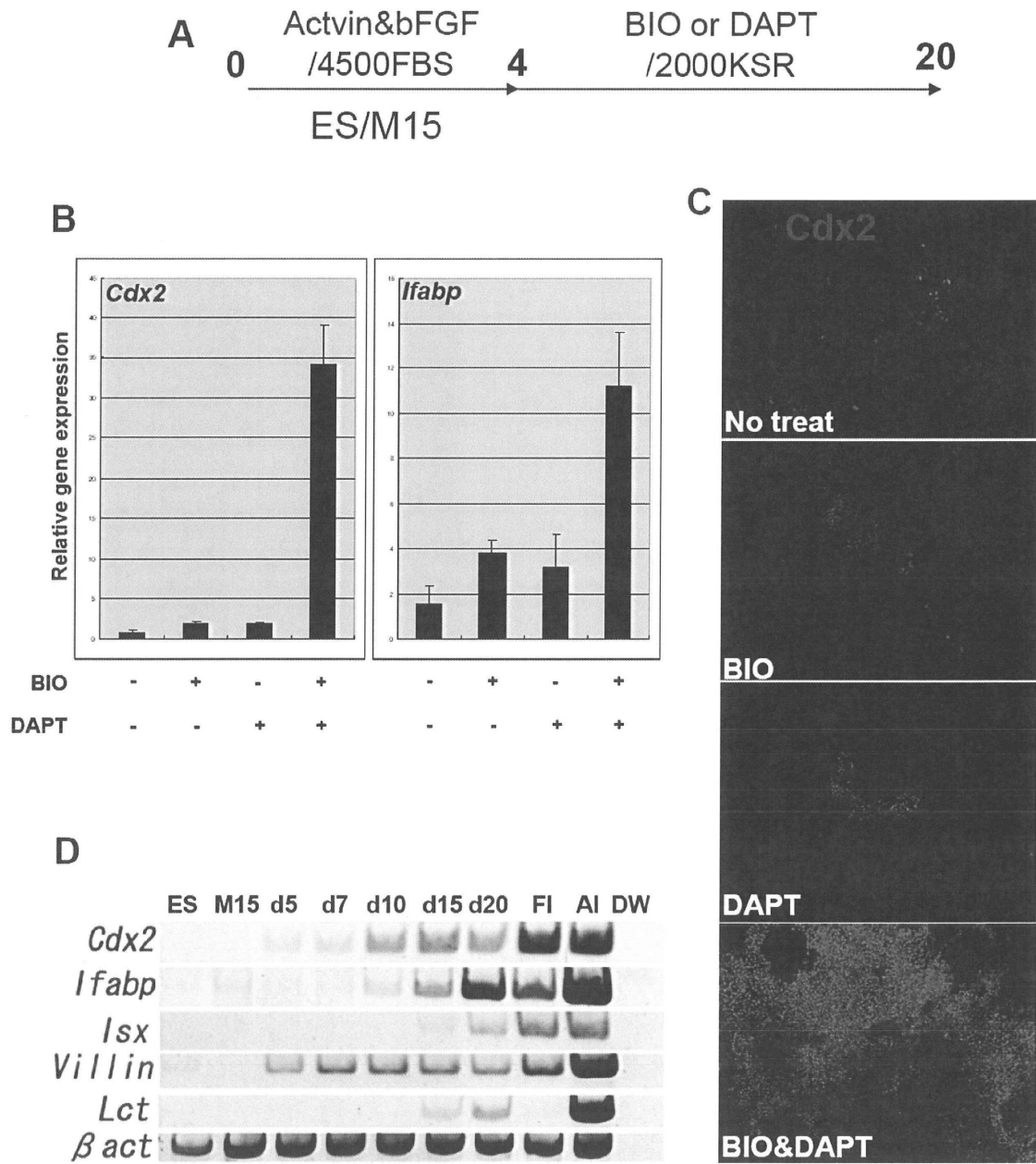
【図 8】



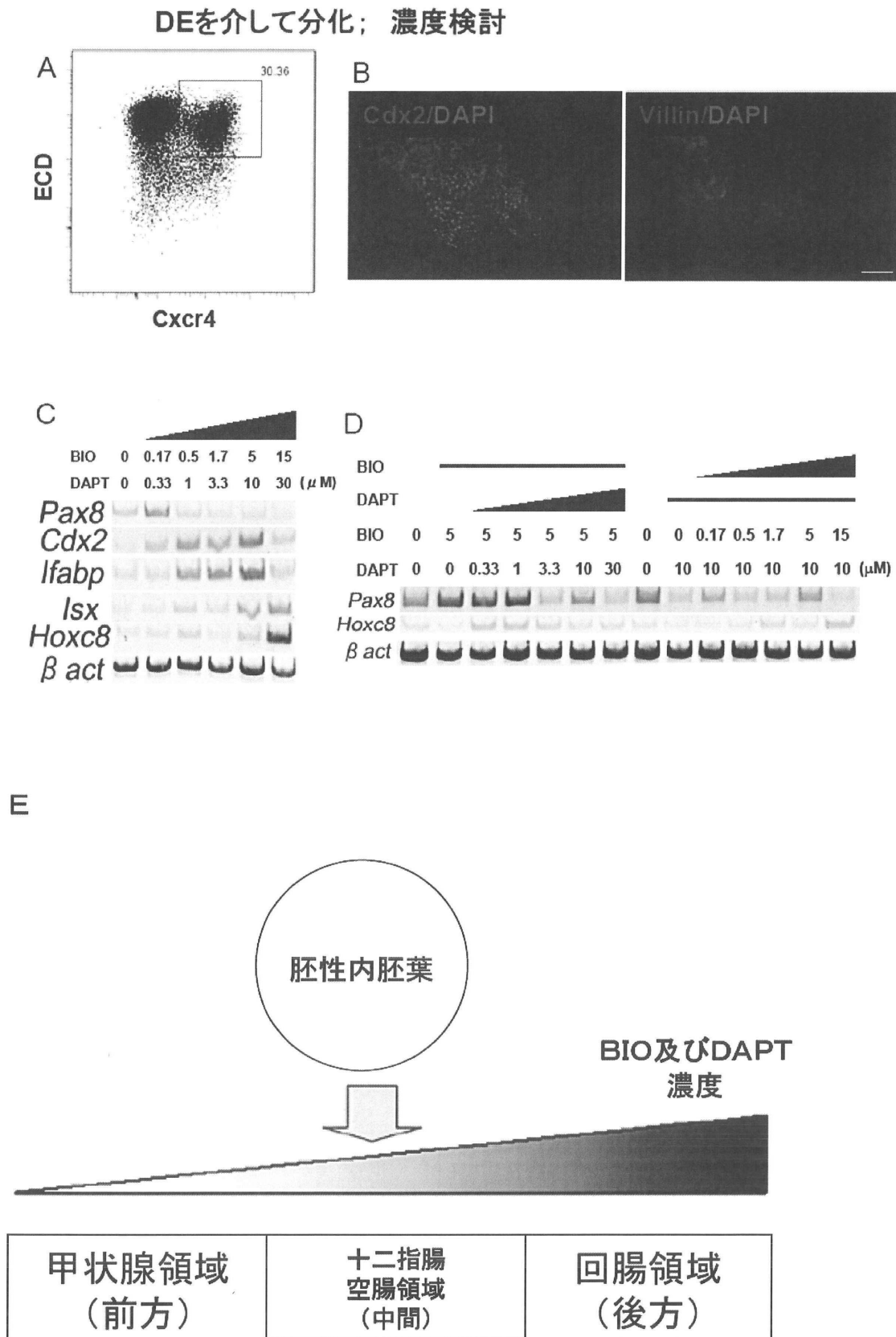
【図 9】



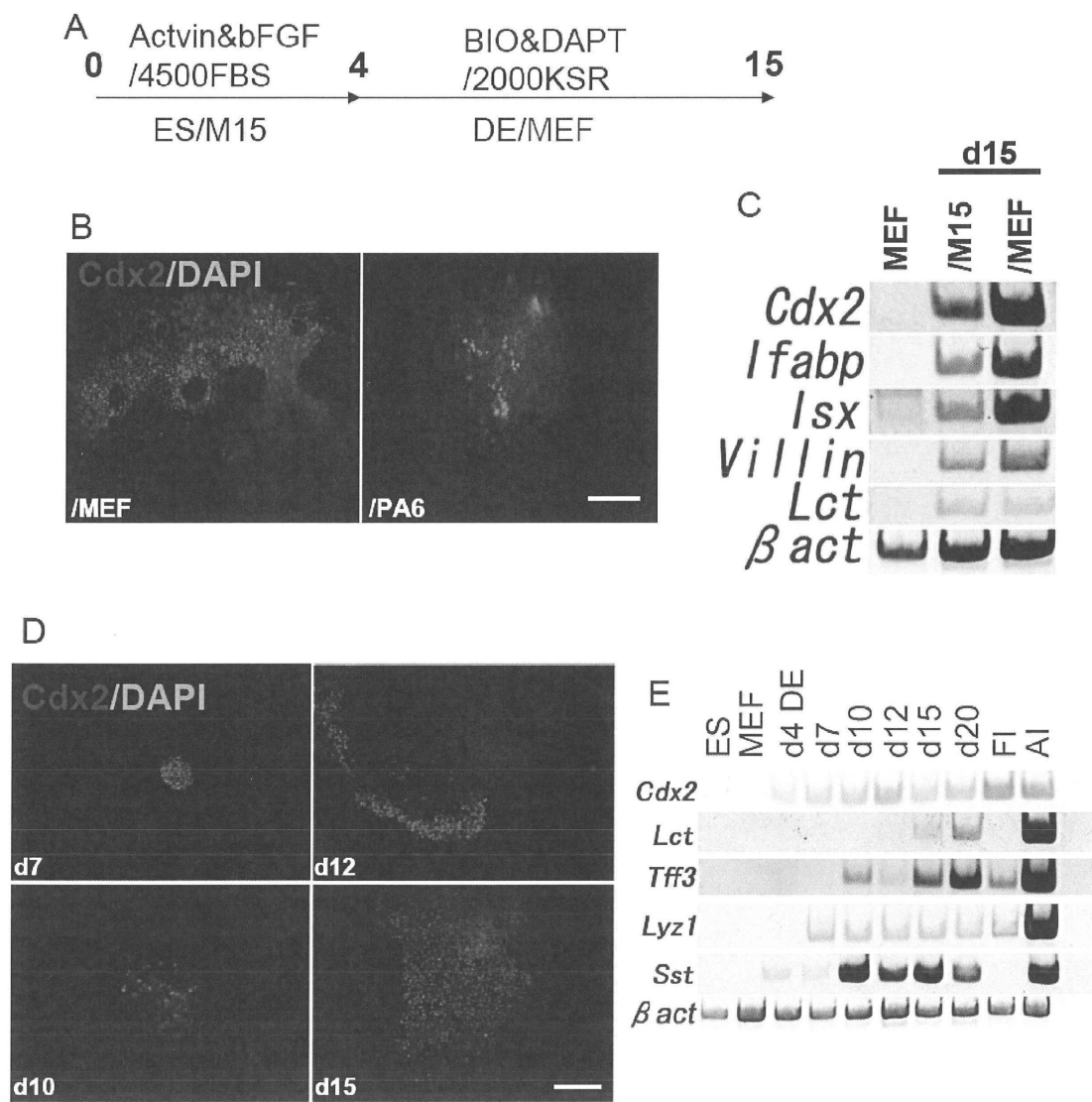
【図 1】



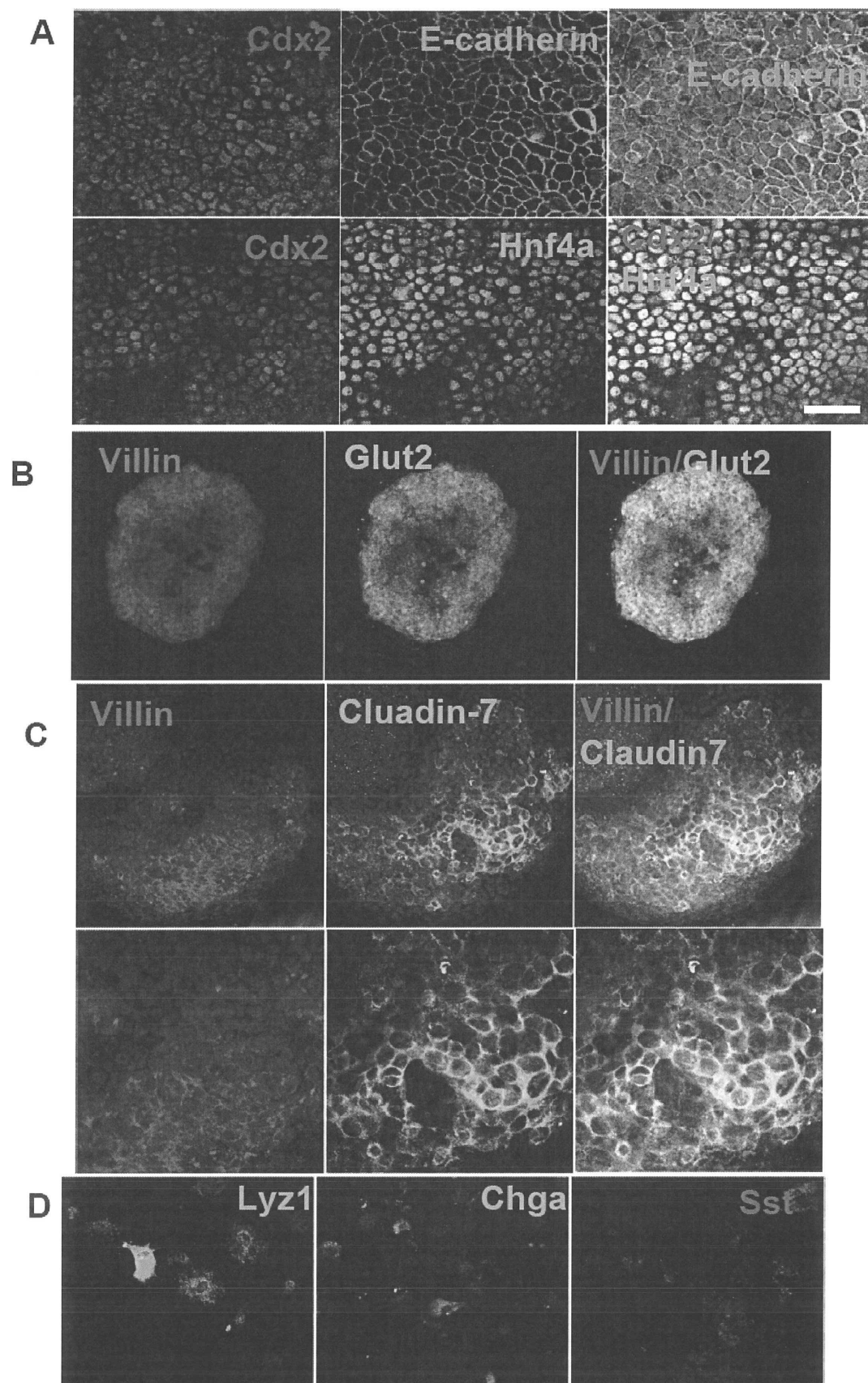
【図 2】



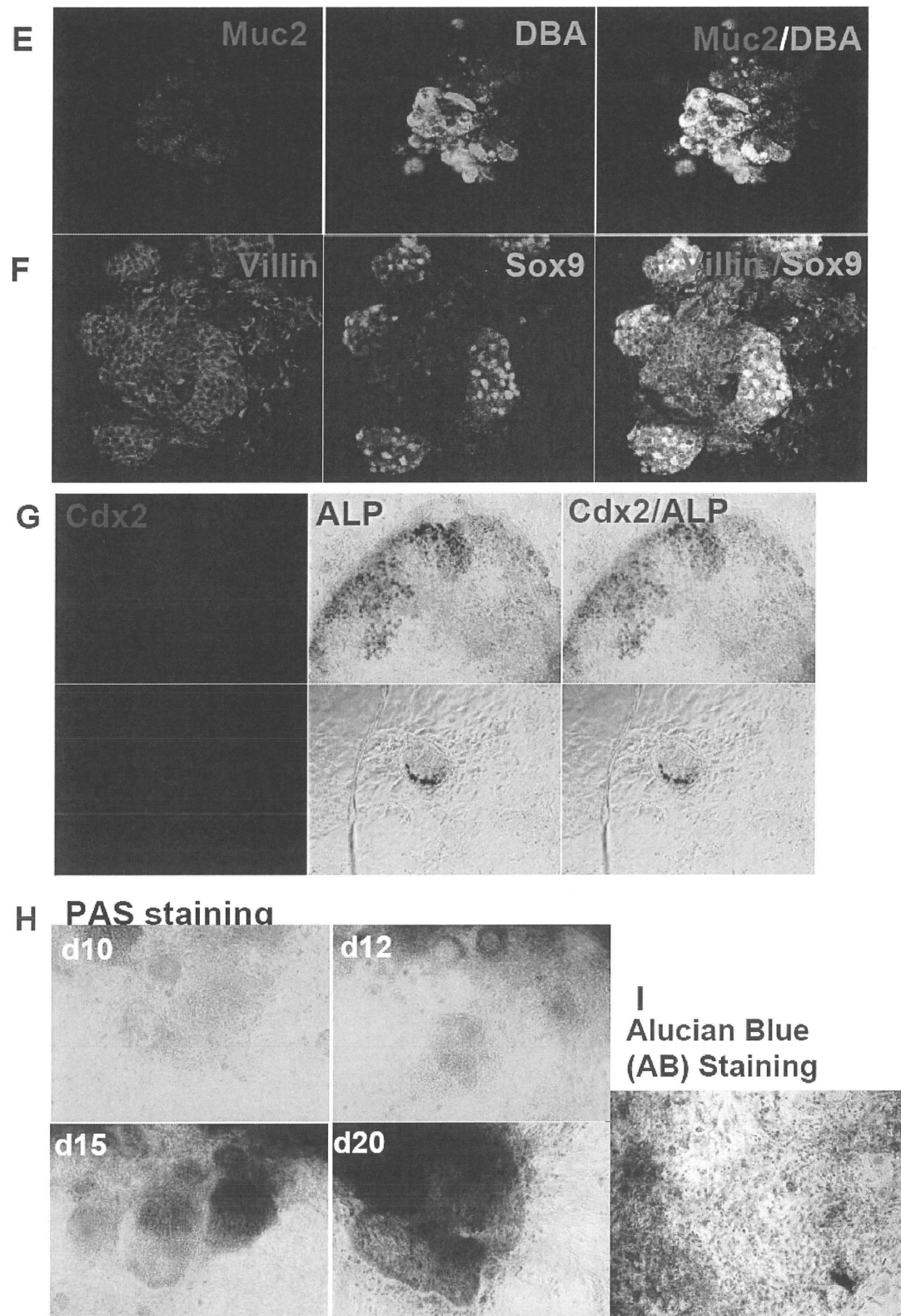
【図 3】



【図 4】



【図 5】



hES

d0-10 Actvin100/RPMI.B29
d10-30 BIO&DAPT/2000KSR

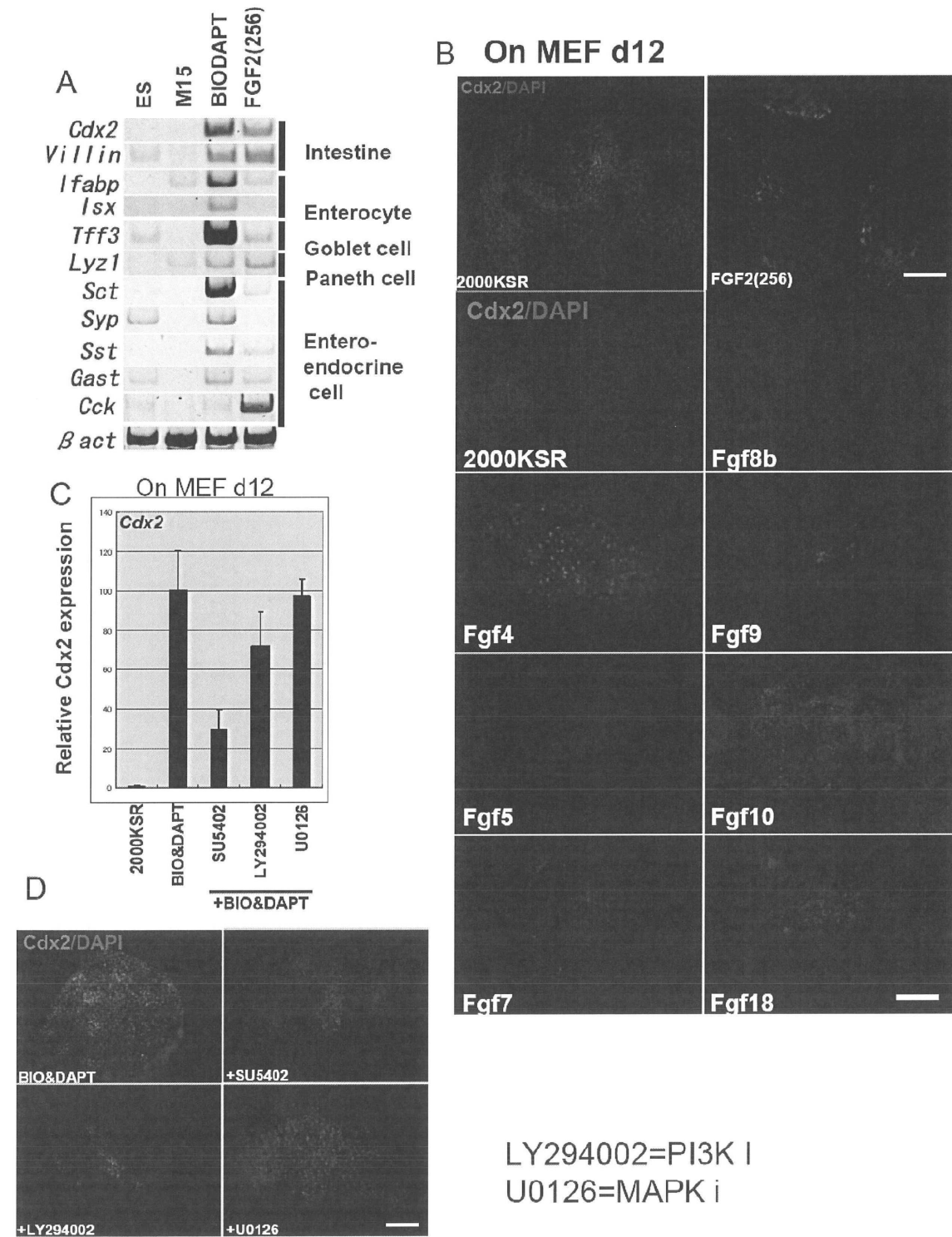
Cdx2/DAPI

d30

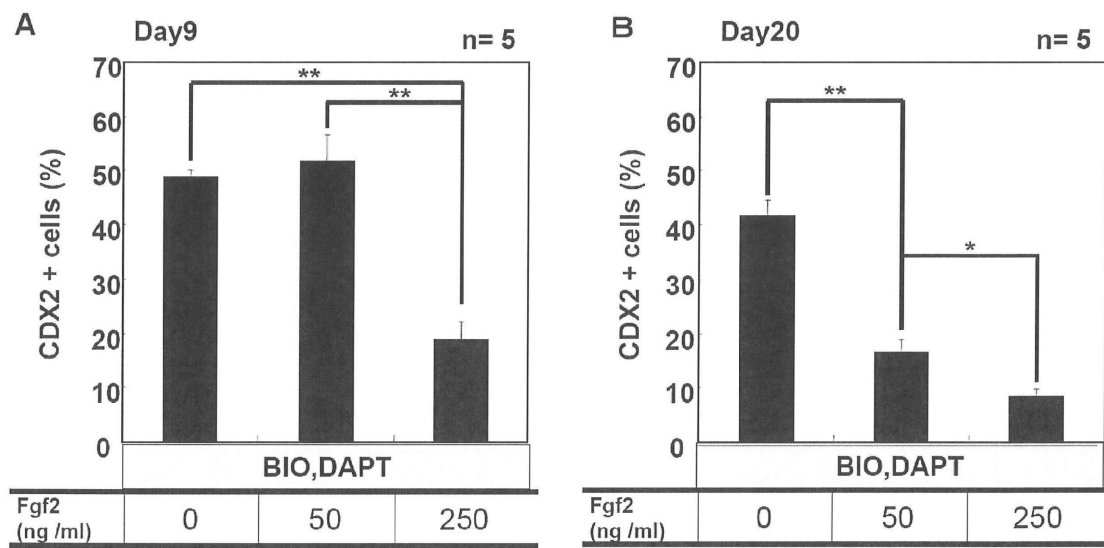
Cdx2/ALP

PAS

【図 7】



【図 10】



【配列表】

0005875007000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/68 (2006.01) G 0 1 N 33/68

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 条 昭苑

熊本県熊本市中央区本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

(72)発明者 大垣 総一郎

熊本県熊本市中央区本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

(72)発明者 白木 伸明

熊本県熊本市中央区本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

(72)発明者 条 和彦

熊本県熊本市中央区本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第2010/051223 (WO, A1)

国際公開第2008/013664 (WO, A2)

国際公開第2010/011352 (WO, A2)

UEDA T. et al., Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells., Biochem Biophys Res Commun., 2010年 1月, Vol.391, No.1, p.38-42

TORIHASHI S., Gut-like structures from mouse embryonic stem cells as an in vitro model for gut organogenesis preserving developmental potential after transplantation, Stem Cells, 2006年, Vol.24, No.12, p.2618-2626

MATSUURA R. et al., Crucial transcription factors in endoderm and embryonic gut development are expressed in gut-like structures from mouse ES cells, Stem Cells, 2006年, Vol.24, No.3, p.624-630

ISHIKAWA T. et al., Characterization of in vitro gutlike organ formed from mouse embryonic stem cells., Am J Physiol Cell Physiol., 2004年, Vol.286, No.6, p.C1344-C1352

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28

C12Q 1/02

C12Q 1/68

G01N 33/50

G01N 33/15

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

PubMed

Science Direct