

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6677634号
(P6677634)

(45) 発行日 令和2年4月8日 (2020. 4. 8)

(24) 登録日 令和2年3月17日 (2020. 3. 17)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/39 (2015. 01)	A 6 1 K 35/39
C 1 2 N 5/071 (2010. 01)	C 1 2 N 5/071
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)	A 6 1 L 27/00
A 6 1 P 5/50 (2006. 01)	A 6 1 P 5/50
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)	A 6 1 P 3/10

請求項の数 28 (全 177 頁)

(21) 出願番号	特願2016-519628 (P2016-519628)	(73) 特許権者	507044516
(86) (22) 出願日	平成26年6月11日 (2014. 6. 11)		プレジデント アンド フェローズ オブ
(65) 公表番号	特表2016-531087 (P2016-531087A)		ハーバード カレッジ
(43) 公表日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/041992		138, ケンブリッジ, クインシー
(87) 国際公開番号	W02014/201167		ストリート 17
(87) 国際公開日	平成26年12月18日 (2014. 12. 18)	(74) 代理人	100095832
審査請求日	平成29年5月30日 (2017. 5. 30)		弁理士 細田 芳徳
(31) 優先権主張番号	61/972, 212	(72) 発明者	ピーターソン, クイン ピー.
(32) 優先日	平成26年3月28日 (2014. 3. 28)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		478, ベルモント, マートル スト
(31) 優先権主張番号	61/833, 898		リート 32
(32) 優先日	平成25年6月11日 (2013. 6. 11)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SC-β細胞及び組成物並びにその生成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 非天然の幹細胞系 β細胞が、1つ以上の結晶インスリン顆粒を含み；

(b) 前記非天然の幹細胞系 β細胞が、下記遺伝子：INS、PDX1及びNKX6-1を発現しており；

(c) 前記非天然の幹細胞系 β細胞が、1回目のグルコースチャレンジに対して、in vitroでのグルコース刺激インスリン分泌応答を示し；

(d) 前記非天然の幹細胞系 β細胞が、ソマトスタチン及びグルカゴンの一方又は両方を発現しない、

非天然の幹細胞系 β細胞を含む組成物であって、該組成物は in vitroの細胞クラスタの形態にある、組成物。

【請求項 2】

1回目のグルコースチャレンジ、2回目のグルコースチャレンジ及び3回目のグルコースチャレンジが連続的に適用された場合、前記非天然の幹細胞系 β細胞が、1回目のグルコースチャレンジ、2回目のグルコースチャレンジ及び3回目のグルコースチャレンジに対して、in vitroでのグルコース刺激インスリン分泌応答を示す、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

前記非天然の幹細胞系 β細胞が、MAFA、PAX6、ニューロD1、GCK、SLC2A1、PCSK1、KCNJ11、ABCC8、SNAP25、RAB3A、GAD2

10

20

、PTPRN、NKX2-2及びPAX4からなる群から選択される、少なくとも1つの遺伝子をさらに発現している、請求項1記載の組成物。

【請求項4】

前記非天然の幹細胞系β細胞が、第2のグルコース濃度と比較して、少なくとも1.1の比で、第1のグルコース濃度に対する応答において、インスリンを分泌し、前記第1のグルコース濃度が、前記第2のグルコース濃度より高い、請求項1記載の組成物。

【請求項5】

前記非天然の幹細胞系β細胞が、モノホルモン性である、請求項1記載の組成物。

【請求項6】

前記非天然の幹細胞系β細胞が少なくとも20mM グルコースに曝された場合、前記非天然の幹細胞系β細胞により分泌されたインスリンが、30分のインキュベーションにおいて、細胞1000個あたりに、少なくとも0.5μIUである、請求項1記載の組成物。

10

【請求項7】

前記非天然の幹細胞系β細胞からのインスリン分泌が、抗糖尿病剤に対する応答において亢進する、請求項1記載の組成物。

【請求項8】

前記非天然の幹細胞系β細胞が、サイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す、請求項1記載の組成物。

【請求項9】

前記非天然の幹細胞系β細胞が、天然のβ細胞の遺伝子発現プロファイルとは異なる遺伝子発現プロファイルを有する、請求項1記載の組成物。

20

【請求項10】

細胞集合における細胞の少なくとも10%が、前記非天然の幹細胞系β細胞である、請求項1に規定される1つ以上の非天然の幹細胞系β細胞を含む細胞集合を含む組成物。

【請求項11】

前記細胞集合が、さらに、インスリン陽性内分泌細胞を含む、請求項10記載の組成物。

【請求項12】

前記細胞集合が、下記：

- a. C-ペプチド陰性／グルカゴン陽性の細胞；
- b. C-ペプチド陰性／ソマトスタチン陽性の細胞；
- c. グルカゴン陽性／ソマトスタチン陰性の細胞；
- d. グルカゴン陰性／ソマトスタチン陽性の細胞；または、
- e. それらの任意の組合せの1つを含む、請求項10記載の組成物。

30

【請求項13】

前記細胞集合の少なくとも3%が、C-ペプチド陰性／グルカゴン陽性の細胞またはグルカゴン陽性／ソマトスタチン陰性の細胞である、請求項12記載の組成物。

【請求項14】

請求項12に規定される細胞集合を含む人工膵島または膵臓。

【請求項15】

40

甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ及び形質転換成長因子β（TGF-β）シグナル伝達経路阻害剤を含む培養培地中において、始原細胞のクラスターを懸濁培養することにより、前記始原細胞をインスリン発現細胞に分化させることを含み、前記始原細胞がPDX1陽性及びNKX6-1陽性であり、前記培養培地が、レチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータ、ソニックヘッジホッグシグナル伝達経路のアンタゴニスト、γセクレターゼ阻害剤、及びEGFファミリー由来の増殖因子をさらに含む、始原細胞のインスリン発現細胞への分化方法。

【請求項16】

前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、トリヨードチロニンである、請求項15記載の方法。

50

【請求項 17】

前記トリヨードチロニンの濃度が、少なくとも $0.1 \mu\text{M}$ である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記 TGF- β シグナル伝達経路阻害剤が、Akt5 阻害剤 II である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 19】

前記 Akt5 阻害剤 II の濃度が、少なくとも 100 nM である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記 Akt5 阻害剤 II の濃度が、 $100 \mu\text{M}$ 以下である、請求項 18 記載の方法。

10

【請求項 21】

前記培養が、前記培養培地を、少なくとも 2 日に 1 回交換することを含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 22】

前記培養が、少なくとも 7 日間継続する、請求項 15 記載の方法。

【請求項 23】

前記培養培地が、血清を含まない培養培地である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 24】

前記始原細胞が、低接着基材の存在下で培養される、請求項 15 記載の方法。

20

【請求項 25】

前記始原細胞が、ヒト始原細胞である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 26】

インスリン発現細胞を甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ及び形質転換成長因子 β (TGF- β) シグナル伝達経路阻害剤と接触させることにより、インスリン発現細胞を膵臓 β 細胞に分化させることをさらに含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 27】

1 回目のグルコースチャレンジ及び 2 回目のグルコースチャレンジが連続的に適用された場合、前記膵臓 β 細胞が、1 回目のグルコースチャレンジ及び 2 回目のグルコースチャレンジに対して、*in vitro* でのグルコース刺激インスリン分泌応答を示す、請求項 26 記載の方法。

30

【請求項 28】

1 回目のグルコースチャレンジ、2 回目のグルコースチャレンジ及び 3 回目のグルコースチャレンジが連続的に適用された場合、前記膵臓 β 細胞が、1 回目のグルコースチャレンジ、2 回目のグルコースチャレンジ及び 3 回目のグルコースチャレンジに対して、*in vitro* でのグルコース刺激インスリン分泌応答を示す、請求項 26 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

この出願は、2013 年 6 月 11 日付けで出願された米国仮出願第 61/833,898 号及び 2014 年 3 月 28 日付けで出願された米国仮出願第 61/972,212 号の利益を主張する。その内容は、その全体が参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

今日まで研究において、連続的に変化するグルコースレベルに対する応答において、適切な量のインスリンを分泌しない、異常にのみ機能するインスリン発現細胞、または、マウス宿主への移植後 3 ヶ月でのみ、機能性インスリン発現細胞に成熟し得る膵臓始原細胞が生成されている (Cheng et al., 2012; D'Amour et al., 2005; D'Amour et al., 2006; Kroon et

50

al., 2008; Nostro et al., 2011; Rezania et al., 2012; Schulz et al., 2012; Xie et al., 2013)。「グルコース刺激インスリン分泌」(GSIS)アッセイにおける高レベルのグルコースに対する応答において、高レベルのインスリンを放出し、それを繰り返し行い得る、正常な膵島または散在した成体β細胞とは対照的に、既存の方法により生成されたhPSC系インスリン発現細胞は、種々の濃度のグルコースの添加に対する応答において、適切にインスリンを分泌できない。したがって、正常な膵島または成熟した成体β細胞の表現型を示す、hPSC由来の細胞の取得方法についての必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

in vitroでのグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答を示す、幹細胞系β細胞(SC-β)。

(項目2)

前記SC-β細胞が、成熟している、項目1記載の細胞。

(項目3)

前記SC-β細胞が、in vivoでのGSIS応答を示す、項目1から2のいずれか一項に記載の細胞。

(項目4)

前記SC-β細胞が、少なくとも1回のグルコースチャレンジに対して、GSIS応答を示す、項目1から3のいずれか一項に記載の細胞。

(項目5)

前記SC-β細胞が、少なくとも2回の連続的なグルコースチャレンジに対して、GSIS応答を示す、項目1から4のいずれか一項に記載の細胞。

(項目6)

前記SC-β細胞が、少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対して、GSIS応答を示す、項目1から5のいずれか一項に記載の細胞。

(項目7)

前記GSIS応答が、前記細胞をヒトまたは動物に移植した直後に観察される、項目1から6のいずれか一項に記載の細胞。

(項目8)

前記GSIS応答が、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約24時間以内に観察される、項目1から7のいずれか一項に記載の細胞。

(項目9)

前記GSIS応答が、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約2週間以内に観察される、項目1から8のいずれか一項に記載の細胞。

(項目10)

低グルコース濃度と比較して、高グルコース濃度に対する応答において分泌されたインスリンの割合により特徴付けられる前記細胞の刺激指数が、内在性の成熟膵臓β細胞の刺激指数に類似している、項目1から9のいずれか一項に記載の細胞。

(項目11)

前記刺激指数が、1以上または1.1以上または1.3以上または2以上または2.3以上または2.6以上である、項目1から10のいずれか一項に記載の細胞。

(項目12)

前記SC-β細胞が、サイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す、項目1から11のいずれか一項に記載の細胞。

(項目13)

前記サイトカインが、インターロイキン-1β(IL-β)、インターフェロン-γ(

10

20

30

40

50

I N F - γ)、腫瘍壊死因子 - α (T N F - α) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 4)

前記 S C - β 細胞からのインスリン分泌が、抗糖尿病剤に対する応答において亢進する、項目 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 5)

前記抗糖尿病剤が、インクレチン模倣物、スルホニル尿素、メグリチニド及びそれらの組合せからなる群から選択される分泌促進物質を含む、項目 1 4 記載の細胞。

(項目 1 6)

前記 S C - β 細胞が、モノホルモン性である、項目 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 7)

前記 S C - β 細胞が、内在性の成熟膵臓 β 細胞の形態に類似する形態を示す、項目 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 8)

前記 S C - β 細胞が、内在性の成熟膵臓 β 細胞のインスリン顆粒に類似する、電子顕微鏡観察下における封入結晶インスリン顆粒を示す、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 9)

前記 S C - β 細胞が、低速の複製を示す、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 0)

前記 S C - β 細胞が、内在性の成熟膵臓 β 細胞の G S C F に類似するグルコース刺激 C a ²⁺ 流動 (G S C F) を示す、項目 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 1)

前記 S C - β 細胞が、少なくとも 1 回のグルコースチャレンジに対して、G S C F 応答を示す、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 2)

前記 S C - β 細胞が、少なくとも 2 回のグルコースチャレンジに対して、G S C F 応答を示す、項目 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 3)

前記 S C - β 細胞が、少なくとも 3 回のグルコースチャレンジに対して、G S C F 応答を示す、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 4)

前記 S C - β 細胞が、亢進したカルシウム流動を示す、項目 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 5)

前記亢進したカルシウム流動が、増大した量の流入または、高グルコース濃度に対して低い流入比を含む、項目 2 4 記載の細胞。

(項目 2 6)

前記 S C - β 細胞が、インスリン、C - ペプチド、P D X 1、M A F A、N K X 6 - 1、P A X 6、ニューロ D 1、グルコキナーゼ (G C K)、S L C 2 A 1、P C S K 1、K C N J 1 1、A B C C 8、S L C 3 0 A 8、S N A P 2 5、R A B 3 A、G A D 2、P T P R N、N K X 2 - 2、P a x 4 からなる群から選択される、内在性の成熟膵臓 β 細胞に固有の少なくとも 1 つのマーカーを発現している、項目 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 2 7)

前記 S C - β 細胞が、

a) i) グルカゴン (G C G) 及び

i i) ソマトスタチン (S S T) からなる群から選択されるホルモン；または、

10

20

30

40

50

- b) i) アミラーゼ及び
i i) カルボキシペプチダーゼ A (C P A 1) からなる群から選択される腺細胞
マーカー；
- c) i) G C G、
i i) A r x、
i i i) I r x 1 及び I R からなる群から選択される α 細胞マーカー；並びに、
- d) i) C F T R 及び
i i) S o x 9 からなる群から選択される管細胞マーカー、からなる群から選択
される少なくとも 1 つのマーカーを発現していない、項目 1 から 2 6 のいずれか一項に記
載の細胞。 10
- (項目 2 8)
前記 S C - β 細胞が、インスリン陽性内分泌細胞または、N k x 6 - 1 陽性膵臓始原細
胞、P d x 1 陽性膵臓始原細胞及び多能性幹細胞からなる群から選択されるその前駆体か
ら、i n v i t r o において分化されている、項目 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の
細胞。
- (項目 2 9)
前記多能性幹細胞が、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される、項
目 2 8 記載の細胞。
- (項目 3 0)
前記 S C - β 細胞がヒトである、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の細胞。 20
- (項目 3 1)
前記 S C - β 細胞が、遺伝子組み換えされていない、項目 1 から 3 0 のいずれか一項に
記載の細胞。
- (項目 3 2)
前記 S C - β 細胞が、遺伝子組み換えされている、項目 1 から 3 1 のいずれか一項に記
載の細胞。
- (項目 3 3)
前記 S C - β 細胞あたりに産生されるインスリンが、高グルコース濃度での 3 0 分のイ
ンキュベートにおいて、細胞 1 0 0 0 個あたりに、0. 5 と 1 0 μ I U との間である、項
目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。 30
- (項目 3 4)
前記 S C - β 細胞あたりに産生されるインスリンが、高グルコース濃度での 3 0 分のイ
ンキュベートにおいて、細胞 1 0 0 0 個あたりに、約 2. 5 μ I U である、項目 1 から 3
3 のいずれか一項に記載の細胞。
- (項目 3 5)
前記インキュベートが、e x v i v o において生じる、項目 3 3 または 3 4 記載の細
胞。
- (項目 3 6)
項目 1 から 3 5 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞株。
- (項目 3 7)
前記細胞株が、インスリンを安定的に発現している、項目 3 6 記載の細胞株。 40
- (項目 3 8)
前記細胞が、少なくとも 3 0 回の継代まで、明らかな形態変化をすることなく、凍結、
解凍及び、約 2 4 と 4 4 時間との間の倍加時間で増幅されることができる、項目 3 6 また
は 3 7 記載の細胞株。
- (項目 3 9)
細胞クラスター形成を促進する条件下において、インスリン陽性内分泌細胞を含む細胞
集合を、a) 形質転換成長因子 β (T G F - β) シグナル伝達阻害剤及び b) 甲状腺ホル
モンシグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも 2 つの β 細胞成熟因子と接触させて
、前記集合中の少なくとも 1 つのインスリン陽性内分泌細胞の S C - β 細胞への i n v 50

i t r o成熟を誘導することを含み、前記 S C-β細胞が、i n v i t r oでの G S I S 応答を示す、

インスリン陽性内分泌細胞からの S C-β細胞の生成方法。

(項目 4 0)

前記 S C-β細胞が、少なくとも 1 回のグルコースチャレンジに対する応答を示す、項目 3 9 記載の方法。

(項目 4 1)

前記 S C-β細胞が、少なくとも 2 回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す、項目 3 9 または 4 0 記載の方法。

(項目 4 2)

前記 S C-β細胞が、少なくとも 3 回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す、項目 3 9 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記 S C-β細胞の形態が、内在性の成熟 β細胞の形態に類似している、項目 3 9 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記 S C-β細胞が、i n v i v oでのグルコース刺激インスリン分泌 (G S I S) 応答を示す、項目 3 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記 G S I S 応答が、前記 S C-β細胞を対象に移植した直後に観察される、項目 3 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記 G S I S 応答が、前記 S C-β細胞を対象に移植した約 2 4 時間以内に観察される、項目 3 9 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記 G S I S 応答が、前記 S C-β細胞を対象に移植した約 2 週間以内に観察される、項目 3 9 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記細胞集合を、1 0 0 n M-1 0 0 μ Mの間の濃度で、前記 T G F-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目 3 9 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記細胞集合を、1 0 μ Mの濃度で、前記 T G F-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目 3 9 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

T G F-βシグナル伝達経路が、T G F-β受容体 I 型キナーゼシグナル伝達を含む、項目 3 9 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記 T G F-βシグナル伝達経路阻害剤が、A l k 5 阻害剤 I I を含む、項目 3 9 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記 T G F-βシグナル伝達経路阻害剤が、A l k 5 阻害剤 I I の類似体または誘導体を含む、項目 3 9 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記細胞集合を、0 . 1 μ M-1 0 μ Mの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 3 9 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記細胞集合を、1 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 3 9 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、トリヨードチロニン (T 3) を

10

20

30

40

50

含む、項目 3 9 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記細胞集合を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 3 9 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない、項目 5 6 記載の方法。

(項目 5 8)

前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 5 6 記載の方法。

(項目 5 9)

前記細胞集合を、1 0 n M - 1 μ M の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 5 7 記載の方法。

(項目 6 0)

前記細胞集合を、1 0 0 n M の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 5 8 または 5 9 記載の方法。

(項目 6 1)

前記プロテインキナーゼ阻害剤が、スタウロスポリンを含む、項目 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

さらに、前記細胞集合を、少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子と接触させることを含む、項目 3 9 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子が、囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) 阻害剤を含む、項目 6 2 記載の方法。

(項目 6 4)

前記細胞集合を、1 0 0 n M - 1 0 0 μ M の間の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる、項目 6 2 または 6 3 記載の方法。

(項目 6 5)

前記細胞集合を、1 0 n M - 1 0 μ M の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる、項目 6 2 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記 C F T R 阻害剤が、G l y - H 1 0 1 を含む、項目 6 2 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子が、O - G l c N A c a s e 阻害剤を含む、項目 6 2 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 8)

前記細胞集合を、1 0 0 n M - 1 0 0 μ M の間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる、項目 6 7 記載の方法。

(項目 6 9)

前記細胞集合を、1 0 n M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる、項目 6 7 または 6 8 記載の方法。

(項目 7 0)

前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤が、T h i a m e t G を含む、項目 3 9 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記細胞集合が、適切な培養培地中で培養される、項目 3 9 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記適切な培養培地が、臍島培地 (C M R L S) または C M R L S の成分を添加した、

10

20

30

40

50

Connought Medical Research Laboratories

1066を含む、項目71記載の方法。

(項目73)

前記CMRLSが、血清と共に添加される、項目72記載の方法。

(項目74)

前記CMRLSが、10% ウシ胎児血清と共に添加される、項目72または73記載の方法。

(項目75)

前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目39から74のいずれか一項に記載の方法。

(項目76)

前記細胞集合が、前記細胞集合中の少なくとも1つの前記インスリン陽性内分泌細胞の少なくとも1つのSC-β細胞へのin vitro成熟を誘導するのに十分な期間、懸濁培養において維持される、項目39から75のいずれか一項に記載の方法。

(項目77)

前記期間が、少なくとも7日を含む、項目76記載の方法。

(項目78)

前記期間が、7日と21日との間を含む、項目76または77記載の方法。

(項目79)

前記期間が、7日と14日との間を含む、項目76から78のいずれか一項に記載の方法。

(項目80)

前記期間が、10日と14日との間を含む、項目76から79のいずれか一項に記載の方法。

(項目81)

前記期間が、14日を含む、項目76から80のいずれか一項に記載の方法。

(項目82)

前記β細胞成熟因子が、2日に1回補充される、項目77から81のいずれか一項に記載の方法。

(項目83)

前記細胞集合中の少なくとも1%の前記インスリン陽性内分泌細胞が誘導されて、SC-β細胞に成熟する、項目39から82のいずれか一項に記載の方法。

(項目84)

前記集合中の少なくとも99%の前記インスリン陽性内分泌細胞が誘導されて、SC-β細胞に成熟する、項目39から83のいずれか一項に記載の方法。

(項目85)

前記集合中の得られた細胞の少なくとも30%が、SC-β細胞を含む、項目39から84のいずれか一項に記載の方法。

(項目86)

前記SC-β細胞が、C-ペプチド、インスリン、NKX6-1、Pdx1を発現しており、NKX6-1とC-ペプチドとを共発現している、項目39から85のいずれか一項に記載の方法。

(項目87)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、Pdx1及びNKX6-1も発現している、項目39から86のいずれか一項に記載の方法。

(項目88)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される、項目39から87のいずれか一項に記載の方法。

(項目89)

10

20

30

40

50

前記 S C - β 細胞が、ヒト細胞を含む、項目 3 9 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法

。

(項目 9 0)

i n v i t r oにおける前記 S C - β 細胞の生成が、規模を拡大できる、項目 3 9 から 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 1)

項目 3 9 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生された S C - β 細胞の単離された集合。

(項目 9 2)

その中に封入された、項目 9 1 記載の S C - β 細胞の単離された集合を含むマイクロカプセル。

(項目 9 3)

項目 3 9 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生された S C - β 細胞の集合を含む組成物。

(項目 9 4)

項目 3 9 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生された S C - β 細胞の単離された集合を含むアッセイ。

(項目 9 5)

β 細胞の増殖、β 細胞の複製、β 細胞の死、β 細胞の機能、免疫攻撃に対する β 細胞の感受性または脱分化もしくは分化に対する β 細胞の感受性からなる群から選択される、β 細胞の運命を促進または阻害する、1 つ以上の候補剤を特定するのに使用するための、項目 9 4 記載のアッセイ。

(項目 9 6)

少なくとも 1 つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の、少なくとも 1 つの S C - β 細胞への分化を促進する、1 つ以上の候補剤を特定するのに使用するための、項目 9 4 記載のアッセイ。

(項目 9 7)

項目 3 9 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生された S C - β 細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、

それを必要とする対象の処置方法。

(項目 9 8)

前記 S C - β 細胞が、マイクロカプセルに封入されている、項目 9 7 記載の方法。

(項目 9 9)

前記 S C - β 細胞が、前記 S C - β 細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される、項目 9 7 または 9 8 記載の方法。

(項目 1 0 0)

前記 S C - β 細胞が、i P S 細胞の集合から産生され、前記 i P S 細胞が、前記 S C - β 細胞が投与される前記同じ対象から得られた細胞から得られる、項目 9 7 から 9 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目 9 7 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記糖尿病が、I 型糖尿病、I I 型糖尿病、1 . 5 型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目 1 0 1 記載の方法。

(項目 1 0 3)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目 9 7 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 4)

それを必要とする対象に投与するための、項目 3 9 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

方法により産生されたSC-β細胞の単離された集合の使用。

(項目105)

前記SC-β細胞の単離された集合が、マイクロカプセルに封入されて、前記対象に投与される、項目104記載の使用。

(項目106)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目104または105記載の使用。

(項目107)

前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目104から106のいずれか一項に記載の使用。

10

(項目108)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目104または105記載の使用。

(項目109)

インスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導するための、a) Alk5阻害剤、b) トリヨードチロニン(T3)、場合により、c) スタウロスポリン、及び場合により、d) CMRL5を含み、前記SC-β細胞が、*in vitro*及び/または*in vivo*の両方でのGSI5応答を示す、

培養培地。

(項目110)

20

細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) 繊維芽細胞成長因子(FGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子、b) ソニックヘッジホッグ経路阻害剤を含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子、及び場合により、c) 低濃度のレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路アクチベータと、少なくとも5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することを含み、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、NKX6-1を発現している、

Pdx1陽性膵臓始原細胞からのNKX6-1陽性膵臓始原細胞の製造方法。

(項目111)

前記細胞集合を、1ng/mL-100ng/mLの間の濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる、項目110記載の方法。

30

(項目112)

前記細胞集合を、50ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる、項目110または111記載の方法。

(項目113)

前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子が、ケラチノサイト成長因子(KGF)を含む、項目110から112のいずれか一項に記載の方法。

(項目114)

前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子が、FGF2、FGF8B、FGF10及びFGF21からなる群から選択される、項目110から113のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目115)

前記細胞集合を、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させない、項目110から114のいずれか一項に記載の方法。

(項目116)

前記細胞集合を、0.01μM-1.0μMの間の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目110から115のいずれか一項に記載の方法。

(項目117)

前記細胞集合を、0.1μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目110から116のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 1 1 8)

前記 R A シグナル伝達経路アクチベータが、R A を含む、項目 1 1 0 から 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 9)

前記細胞集合を、0. 1 μ M と 0. 5 μ M との間の濃度で、前記 S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 1 1 0 から 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 0)

前記細胞集合を、0. 2 5 μ M の濃度で、前記 S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 1 1 0 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 1)

前記 S H H 経路阻害剤が、S a n t 1 を含む、項目 1 1 0 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

さらに、少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子に、前記細胞集合を曝すことを含む、項目 1 1 0 から 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子が、E G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子を含む、項目 1 2 2 記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記細胞集合が、2 n g / m L - 2 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子に曝される、項目 1 2 3 記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記細胞集合が、2 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子に曝される、項目 1 2 3 または 1 2 4 記載の方法。

(項目 1 2 6)

E G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子が、ベタセルリン及び E G F からなる群から選択される、項目 1 2 3 から 1 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 7)

前記細胞集合が、適切な培養培地中で培養される、項目 1 1 0 から 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 8)

前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目 1 1 0 から 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 9)

前記 β 細胞成熟因子が、2 日に 1 回補充される、項目 1 1 0 から 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 0)

プロテインキナーゼ C のアクチベータが、5 日の間、前記懸濁培養に添加されない、項目 1 1 0 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 1)

プロテインキナーゼ C のアクチベータが、5 日の前に、前記懸濁培養から除去される、項目 1 1 0 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 2)

前記プロテインキナーゼ C のアクチベータが、P d b U を含む、項目 1 1 0 または 1 3 1 記載の方法。

(項目 1 3 3)

B M P シグナル伝達経路阻害剤が、5 日の間、前記懸濁培養に添加されない、項目 1 1 0 から 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 4)

B M P シグナル伝達経路阻害剤が、5 日の前に、前記懸濁培養から除去される、項目 1

10

20

30

40

50

10から132のいずれか一項に記載の方法。

(項目135)

前記BMPシグナル伝達経路阻害剤が、LDN193189を含む、項目133または134記載の方法。

(項目136)

前記集合中の少なくとも10%の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞が誘導されて、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化する、項目110から135のいずれか一項に記載の方法。

(項目137)

前記集合中の少なくとも95%の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞が誘導されて、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化する、項目110から136のいずれか一項に記載の方法。

(項目138)

前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、Pdx1、NKX6-1及びFoxA2を発現している、項目110から137のいずれか一項に記載の方法。

(項目139)

前記Pdx1陽性膵臓始原細胞が、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される、項目110から138のいずれか一項に記載の方法。

(項目140)

項目110から139のいずれか一項に記載の方法により得られたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合。

(項目141)

その中に封入された、項目140記載のNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含むマイクロカプセル。

(項目142)

項目110から139のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含む組成物。

(項目143)

項目110から139のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含むアッセイ。

(項目144)

少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞またはその前駆体の、NKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を促進する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用するための、項目143記載のアッセイ。

(項目145)

項目110から139のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、それを必要とする対象の処置方法。

(項目146)

前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される、項目145記載の方法。

(項目147)

前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、マイクロカプセルに封入される、項目145または146記載の方法。

(項目148)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目145から147のいずれか一項に記載の方法。

(項目149)

10

20

30

40

50

前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目148記載の方法。

(項目150)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目145から147のいずれか一項に記載の方法。

(項目151)

SC-β細胞に分化させるための、項目110から139のいずれか一項に記載の方法により産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合の使用。

(項目152)

それを必要とする対象に投与するための、項目110から139のいずれか一項に記載の方法により産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合の使用。

10

(項目153)

前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合が、マイクロカプセルに封入されて、前記対象に投与される、項目152記載の使用。

(項目154)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目152または153記載の使用。

(項目155)

前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目154記載の使用。

20

(項目156)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目152または153記載の使用。

(項目157)

細胞クラスター形成を促進する条件下において、NKX6-1陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及びb) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子と接触させて、前記集合中の少なくとも1つのNKX6-1陽性膵臓始原細胞の、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導することを含み、前記インスリン陽性膵臓始原細胞が、インスリンを発現している、

30

NKX6-1陽性膵臓始原細胞からのインスリン陽性内分泌細胞の製造方法。

(項目158)

前記細胞集合を、1 μM-100 μMの間の濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目157記載の方法。

(項目159)

前記細胞集合を、10 μMの濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目157または158記載の方法。

(項目160)

TGF-βシグナル伝達経路が、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む、項目157から159のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目161)

前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤が、Alk5阻害剤IIを含む、項目157から160のいずれか一項に記載の方法。

(項目162)

前記細胞集合を、0.1 μM-10 μMの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目157から161のいずれか一項に記載の方法。

(項目163)

前記細胞集合を、1 μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目157から162のいずれか一項に記載の方法。

(項目164)

50

前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、トリヨードチロニン（T3）を含む、項目157から163のいずれか一項に記載の方法。

（項目165）

さらに、前記細胞集合を、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させることを含む、項目157から164のいずれか一項に記載の方法。

（項目166）

前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子が、γ-セクレターゼ阻害剤を含む、項目165記載の方法。

（項目167）

前記細胞集合を、0.1 μM-10 μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる、項目166記載の方法。

（項目168）

前記細胞集合を、1 μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる、項目166または167記載の方法。

（項目169）

前記γ-セクレターゼ阻害剤が、XXIを含む、項目166から168のいずれか一項に記載の方法。

（項目170）

前記γ-セクレターゼ阻害剤が、DAPTを含む、項目166から169のいずれか一項に記載の方法。

（項目171）

前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子が、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子を含む、項目165から170のいずれか一項に記載の方法。

（項目172）

前記細胞集合を、2 ng/mL-200 ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる、項目171記載の方法。

（項目173）

前記細胞集合を、20 ng/mLの濃度で、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させる、項目171または172記載の方法。

（項目174）

前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子が、ベタセルリンを含む、項目171から173のいずれか一項に記載の方法。

（項目175）

前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子が、EGFを含む、項目171から173のいずれか一項に記載の方法。

（項目176）

前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子が、低濃度のレチノイン酸（RA）シグナル伝達経路アクチベータを含む、項目165から175のいずれか一項に記載の方法。

（項目177）

前記細胞集合を、0.01 μM-1.0 μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目176記載の方法。

（項目178）

前記細胞集合を、0.1 μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目176または177記載の方法。

（項目179）

前記RAシグナル伝達経路アクチベータが、RAを含む、項目176から178のいずれか一項に記載の方法。

（項目180）

前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子が、ソニックヘッジホッグ（SHH）経路阻害剤を含む、項目165から179のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- (項目 1 8 1)
前記細胞集合を、0.1 μ M と 0.5 μ M との間の濃度で、前記 SHH 経路阻害剤と接触させる、項目 1 8 0 記載の方法。
- (項目 1 8 2)
前記細胞集合を、0.25 μ M の濃度で、前記 SHH 経路阻害剤と接触させる、項目 1 8 0 または 1 8 1 記載の方法。
- (項目 1 8 3)
前記 SHH 経路阻害剤が、Sant1 を含む、項目 1 8 0 から 1 8 2 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 8 4)
前記細胞集合を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 1 5 8 から 1 8 3 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 8 5)
前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない、項目 1 8 4 記載の方法。
- (項目 1 8 6)
前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 1 8 4 記載の方法。
- (項目 1 8 7)
前記細胞集合を、10 nM – 1 μ M の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 1 8 6 記載の方法。
- (項目 1 8 8)
前記細胞集合を、100 nM の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 1 8 6 または 1 8 7 記載の方法。
- (項目 1 8 9)
前記プロテインキナーゼ阻害剤が、スタウロスポリンを含む、項目 1 8 6 から 1 8 8 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 9 0)
さらに、前記細胞集合をグルコースに曝すことを含む、項目 1 5 7 から 1 8 9 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 9 1)
前記細胞集合が、1 mM – 50 mM の間の濃度で、グルコースに曝される、項目 1 9 0 記載の方法。
- (項目 1 9 2)
前記細胞集合が、25 mM の濃度で、グルコースに曝される、項目 1 9 0 または 1 9 1 記載の方法。
- (項目 1 9 3)
前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目 1 8 7 から 1 9 2 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 9 4)
前記細胞集合が、前記集合中の少なくとも 1 つの前記 NKX6-1 陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導するのに十分な期間、懸濁培養において維持される、項目 1 8 7 から 1 9 3 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 1 9 5)
前記期間が、少なくとも 7 日である、項目 1 9 4 記載の方法。
- (項目 1 9 6)
前記 β 細胞成熟因子が、前記懸濁培養に、2 日に 1 回補充される、項目 1 9 4 または 1 9 5 記載の方法。
- (項目 1 9 7)
前記集合中の少なくとも 15 % の前記 NKX6-1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、イ

10

20

30

40

50

ンスリン陽性内分泌細胞に分化する、項目 1 5 7 から 1 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 8)

前記集合中の少なくとも 9 9 % の前記 NK X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、インスリン陽性内分泌細胞に分化する、項目 1 5 7 から 1 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 9)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、P d x 1、NK X 6 - 1、NK X 2 - 2、M a f b、g l i s 3、S u r 1、K i r 6 . 2、Z n t 8、S L C 2 A 1、S L C 2 A 3 及び／またはインスリンを発現している、項目 1 5 7 から 1 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0 0)

前記 NK X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞が、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される、項目 1 5 7 から 1 9 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0 1)

項目 1 5 7 から 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合。

(項目 2 0 2)

その中に封入された、項目 2 0 1 記載のインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を含むマイクロカプセル。

(項目 2 0 3)

項目 1 5 7 から 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の集合を含む組成物。

(項目 2 0 4)

項目 1 5 7 から 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、

それを必要とする対象の処置方法。

(項目 2 0 5)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、前記インスリン陽性内分泌細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される、項目 2 0 4 記載の方法。

(項目 2 0 6)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、マイクロカプセルに封入される、項目 2 0 4 または 2 0 5 記載の方法。

(項目 2 0 7)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目 2 0 4 から 2 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0 8)

前記糖尿病が、I 型糖尿病、I I 型糖尿病、1 . 5 型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目 2 0 7 記載の方法。

(項目 2 0 9)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目 2 0 4 から 2 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 1 0)

項目 1 5 7 から 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法により産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合の、S C - β 細胞に分化させるための使用。

(項目 2 1 1)

項目 1 5 7 から 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法により産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合の、それを必要とする対象に投与するための使用。

(項目 2 1 2)

前記インスリン陽性内分泌細胞の単離された集合が、マイクロカプセルに封入されて、

10

20

30

40

50

前記対象に投与される、項目 2 1 1 記載の使用。

(項目 2 1 3)

前記対象が、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する、項目 2 1 1 または 2 1 2 記載の使用。

(項目 2 1 4)

前記糖尿病が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、1. 5 型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される、項目 2 1 3 記載の使用。

(項目 2 1 5)

前記対象が、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する、項目 2 1 1 または 2 1 2 記載の使用。

(項目 2 1 6)

NKX6-1 陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への *in vitro* 分化を誘導するための、a) TGF- β シグナル伝達経路阻害剤、b) TH 経路アクチベータ並びに、i) XXI、ii) ベタセルリン、iii) 低濃度の RA シグナル伝達経路アクチベータ及び iv) SHH 経路阻害剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの更なる β 細胞成熟因子を含む、

培養培地の使用。

(項目 2 1 7)

細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (TGF- β) シグナル伝達経路阻害剤、ii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC- β 細胞への *in vitro* 成熟を誘導することを含み、前記 SC- β 細胞が、*in vitro* での GSI 応答を示す、SC- β 細胞の生成方法。

(項目 2 1 8)

前記 SC- β 細胞が、*in vivo* での GSI 応答を示す、項目 2 1 7 記載の方法。

(項目 2 1 9)

前記 GSI 応答が、(i) 前記 SC- β 細胞を対象に移植した直後；(ii) 対象への移植の約 24 時間以内；または、(iii) 対象への移植の約 2 週間以内に観察される、項目 2 1 7 または 2 1 8 記載の方法。

(項目 2 2 0)

前記 SC- β 細胞が、(i) 少なくとも 1 回のグルコースチャレンジ；(ii) 少なくとも 2 回の連続的なグルコースチャレンジ；または、(iii) 少なくとも 3 回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す、項目 2 1 7 から 2 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 1)

前記 SC- β 細胞の形態が、内在性の β 細胞の形態に類似している、項目 2 1 7 から 2 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 2)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、100 nM-100 μ M の間の濃度で、前記 TGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目 2 1 7 から 2 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 3)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、10 μ M の濃度で、前記 TGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目 2 1 7 から 2 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 4)

TGF- β シグナル伝達経路が、TGF- β 受容体 I 型キナーゼシグナル伝達を含む、

10

20

30

40

50

項目 2 1 7 から 2 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 5)

前記 T G F - β シグナル伝達経路阻害剤が、A l k 5 阻害剤 I I を含む、項目 2 1 7 から 2 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 6)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、0 . 1 μ M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 1 7 から 2 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 7)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 μ M の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 1 7 から 2 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 8)

前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、トリヨードチロニン (T 3) を含む、項目 2 1 7 から 2 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2 9)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない、項目 2 1 7 から 2 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3 0)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 2 1 7 から 2 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3 1)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M - 1 μ M の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 2 3 0 記載の方法。

(項目 2 3 2)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 2 3 0 または 2 3 1 記載の方法。

(項目 2 3 3)

前記プロテインキナーゼ阻害剤が、スタウロスポリンを含む、項目 2 3 0 から 2 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3 4)

さらに、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) 阻害剤と接触させることを含む、項目 2 1 7 から 2 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3 5)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M と 1 0 0 μ M との間の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる、項目 2 3 4 記載の方法。

(項目 2 3 6)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M と 1 0 μ M との濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる、項目 2 3 4 または 2 3 5 記載の方法。

(項目 2 3 7)

前記 C F T R 阻害剤が、G l y - H 1 0 1 を含む、項目 2 3 4 から 2 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3 8)

さらに、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させることを含む、項目 2 1 7 から 2 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 2 3 9)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M と 1 0 0 μ M との間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる、項目 2 3 8 記載の方法。

(項目 2 4 0)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M と 1 0 μ M との間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる、項目 2 3 8 または 2 3 9 記載の方法。

(項目 2 4 1)

前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤が、T h i a m e t G を含む、項目 2 3 9 から 2 4 0 記載の方法。

10

(項目 2 4 2)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、適切な培養培地中で培養される、項目 2 1 7 から 2 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4 3)

前記適切な培養培地が、臍島培地 (C M R L S) または C M R L S の成分を添加した、C o n n o u g h t M e d i c a l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s 1 0 6 6 を含む、項目 2 4 2 記載の方法。

(項目 2 4 4)

前記 C M R L S が、血清と共に添加される、項目 2 4 3 記載の方法。

20

(項目 2 4 5)

前記 C M R L S が、1 0 % ウシ胎児血清と共に添加される、項目 2 1 7 または 2 1 9 記載の方法。

(項目 2 4 6)

さらに、S a n t 1 を含む、項目 7 2 - 7 4 及び 2 4 3 - 2 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4 7)

さらに、X X I を含む、項目 7 2 - 7 4 及び 2 4 3 - 2 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4 8)

さらに、S S P を含む、項目 7 2 - 7 4 及び 2 4 3 - 2 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 2 4 9)

前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目 2 1 7 から 2 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5 0)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n v i t r o 成熟を誘導するのに十分な期間、懸濁培養中で維持される、項目 2 1 7 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 2 5 1)

前記期間が、少なくとも 7 日を含む、項目 2 5 0 記載の方法。

(項目 2 5 2)

前記期間が、7 日と 2 1 日との間を含む、項目 2 5 0 または 2 5 1 記載の方法。

(項目 2 5 3)

前記期間が、7 日と 1 4 日との間を含む、項目 2 5 0 から 2 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5 4)

前記期間が、1 4 日を含む、項目 2 5 0 から 2 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5 5)

50

前記懸濁培養が、2日に1回補充される、項目250から254のいずれか一項に記載の方法。

(項目256)

生成された前記細胞の少なくとも30%が、SC-β細胞を含む、項目217から255のいずれか一項に記載の方法。

(項目257)

前記SC-β細胞が、C-ペプチド、インスリン、NKX6-1、Pdx1を発現しており、NKX6-1とC-ペプチドとを共発現している、項目217から256のいずれか一項に記載の方法。

(項目258)

前記SC-β細胞が、ヒト細胞を含む、項目217から257のいずれか一項に記載の方法。

(項目259)

in vitroにおける前記SC-β細胞の生成が、規模を拡大できる、項目217から258のいずれか一項に記載の方法。

(項目260)

前記インスリン陽性内分泌細胞が、細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及びii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導することにより得られ、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び/またはインスリンを発現している、項目217から259のいずれか一項に記載の方法。

(項目261)

前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、100nM-100μMの間の濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目260記載の方法。

(項目262)

前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、10μMの濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる、項目260または261記載の方法。

(項目263)

TGF-βシグナル伝達経路が、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む、項目260から262のいずれか一項に記載の方法。

(項目264)

前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤が、Alk5阻害剤I1を含む、項目260から263のいずれか一項に記載の方法。

(項目265)

前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、0.1μM-10μMの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目260から264のいずれか一項に記載の方法。

(項目266)

前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、1μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目260から265のいずれか一項に記載の方法。

(項目267)

前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、トリヨードチロニン(T3)を含む、項目260から266のいずれか一項に記載の方法。

(項目268)

10

20

30

40

50

さらに、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、i) S H H 経路阻害剤、i i) R A シグナル伝達経路アクチベータ、i i i) γ -セクレターゼ阻害剤、i v) 上皮成長因子 (E G F) ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、及び場合により、v) プロテインキナーゼ阻害剤の、少なくとも 1 つと接触させることを含む、項目 2 6 0 から 2 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 6 9)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0. 1 μ M と 0. 5 μ M との間の濃度で、前記 S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 2 6 8 記載の方法。

(項目 2 7 0)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0. 2 5 μ M の濃度で、S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 2 6 8 または 2 6 9 記載の方法。

10

(項目 2 7 1)

前記 S H H 経路阻害剤が、S a n t 1 を含む、項目 2 6 8 から 2 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 2)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0. 0 1 μ M - 1. 0 μ M の間の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 3)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0. 1 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 2 7 4)

前記 R A シグナル伝達経路アクチベータが、R A を含む、項目 2 6 8 から 2 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 5)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0. 1 μ M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記 γ -セクレターゼ阻害剤と接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 6)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 μ M の濃度で、前記 γ -セクレターゼ阻害剤と接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 2 7 7)

前記 γ -セクレターゼ阻害剤が、X X I を含む、項目 2 6 8 から 2 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 8)

前記 γ -セクレターゼ阻害剤が、D A P T を含む、項目 2 6 8 から 2 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7 9)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、2 n g / m L - 2 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 2 8 0)

前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、2 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 2 6 8 から 2 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8 1)

前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、ベタセルリンを含む、項目 2 6 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8 2)

50

前記 EGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、EGF を含む、項目 268 から 281 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 283)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない、項目 268 から 282 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 284)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 268 から 283 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 285)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞を、10 nM-1 μM の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 284 記載の方法。

(項目 286)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞を、100 nM の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる、項目 284 または 285 記載の方法。

(項目 287)

前記プロテインキナーゼ阻害剤が、スタウロスポリンを含む、項目 284 から 286 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 288)

さらに、前記細胞集合をグルコースに曝すことを含む、項目 260 から 287 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 289)

前記細胞集合が、1 mM-50 mM の間の濃度で、グルコースに曝される、項目 288 記載の方法。

(項目 290)

前記細胞集合が、25 mM の濃度で、グルコースに曝される、項目 288 または 289 記載の方法。

(項目 291)

前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目 260 から 290 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 292)

前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞が、少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞の、前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導するのに十分な期間、懸濁培養において維持される、項目 260 から 291 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 293)

前記期間が、少なくとも 7 日である、項目 292 記載の方法。

(項目 294)

前記懸濁培養が、2 日に 1 回補充される、項目 292 または 293 記載の方法。

(項目 295)

少なくとも 15 % の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞が誘導されて、Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化する、項目 260 から 294 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 296)

少なくとも 99 % の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞が誘導されて、Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化する、項目 260 から 295 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 297)

細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1 陽性膵臓始原細胞を、i) EGF ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、ii) 少なくとも 1 つの SHH 経路阻害剤、及び場合により、iii) 低濃度の RA シグナル伝達経路アクチベータと、5 日の

10

20

30

40

50

期間接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導することにより得られ、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞が、P d x 1 及び N K X 6 - 1 を発現している、項目 2 6 0 から 2 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9 8)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、1 n g / m L - 1 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 2 9 7 記載の方法。

(項目 2 9 9)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、5 0 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 2 9 7 または 2 9 8 記載の方法。

10

(項目 3 0 0)

前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、ケラチノサイト成長因子 (K G F) を含む、項目 2 9 7 から 2 9 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 1)

前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、F G F 2、F G F 8 B、F G F 1 0 及び F G F 2 1 からなる群から選択される、項目 2 9 7 から 3 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 2)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M と 0 . 5 μ M との間の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 2 9 7 から 3 0 1 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 3 0 3)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0 . 2 5 μ M の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる、項目 2 9 7 から 3 0 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 4)

前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤が、S a n t 1 を含む、項目 2 9 7 から 3 0 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 5)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0 . 0 1 μ M - 1 . 0 μ M の間の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 9 7 から 3 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 3 0 6)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる、項目 2 9 7 から 3 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 7)

前記 R A シグナル伝達経路アクチベータが、R A を含む、項目 2 9 7 から 3 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0 8)

さらに、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、E G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子と接触させることを含む、項目 2 9 7 から 3 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 3 0 9)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、2 n g / m L - 2 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 3 0 8 記載の方法。

(項目 3 1 0)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、2 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる、項目 3 0 8 または 3 0 9 記載の方法。

(項目 3 1 1)

前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、ベタセルリンを含む、

50

項目 3 0 8 から 3 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 2)

前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子が、E G F を含む、項目 3 0 8 から 3 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 3)

前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞が、適切な培養培地中で培養される、項目 2 9 7 から 3 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 4)

前記細胞クラスター形成を促進する条件が、懸濁培養を含む、項目 2 9 7 から 3 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 5)

前記懸濁培養が、2 日に 1 回補充される、項目 3 1 4 記載の方法。

(項目 3 1 6)

プロテインキナーゼ C のアクチベータが、5 日の間、前記懸濁培養に添加されない、項目 2 9 7 から 3 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 7)

プロテインキナーゼ C のアクチベータが、5 日の前に、前記懸濁培養から除去される、項目 2 9 7 から 3 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1 8)

前記プロテインキナーゼ C のアクチベータが、P d b U を含む、項目 3 1 6 または 3 1 7 記載の方法。

(項目 3 1 9)

B M P シグナル伝達経路阻害剤が、5 日の間、前記懸濁培養に添加されない、項目 2 9 7 から 3 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 0)

B M P シグナル伝達経路阻害剤が、5 日の前に、前記懸濁培養から除去される、項目 2 9 7 から 3 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 1)

前記 B M P シグナル伝達経路阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9 を含む、項目 3 1 9 または 3 2 0 記載の方法。

(項目 3 2 2)

前記集合中の少なくとも 1 0 % の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する、項目 2 9 7 から 3 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 3)

少なくとも 9 5 % の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する、項目 2 9 7 から 3 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 4)

a) 集合中の多能性幹細胞を、P d x 1 陽性膵臓始原細胞に分化させること；

b) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、i) F G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、i i) 少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤、及び場合により、i i i) R A シグナル伝達経路アクチベータと、2 日に 1 回、5 日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化させることであって、前記 N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞が、P d x 1 及び N K X 6 - 1 を発現している前記分化；

c) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、i) T G F - β シグナル伝達経路阻害剤、b) T H シグナル伝達

10

20

30

40

50

経路アクチベータ、及び場合により、c) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、ii) RAシグナル伝達経路アクチベータ、iii) γ -セクレターゼ阻害剤並びにvi) 上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子と、2日に1回、5日と7日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることであって、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Maf b、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、

10

d) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (TGF- β)シグナル伝達経路阻害剤、ii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii) プロテインキナーゼ阻害剤と、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC- β 細胞への*in vitro*成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC- β 細胞に分化させることであって、前記SC- β 細胞が、*in vitro*でのGSSIS応答を示す前記分化を含む、

20

多能性細胞からのSC- β 細胞の生成方法。

(項目325)

a) 集合中の少なくとも一部の多能性細胞を、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させること；

b) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i) KGF、ii) Sant1、及び場合により、iii) 低濃度のRAと、2日に1回、5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞に分化させることであって、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、Pdx1及びNKX6-1を発現している前記分化；

30

c) 前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) Alk5阻害剤II、ii) T3、及び場合により、iii) Sant1、iv) RA、v) XXI及びvi) ベタセルリンと、2日に1回、5日と7日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることであって、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Maf b、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、

40

d) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) Alk5阻害剤II、ii) T3、及び場合により、iii) スタウロスポリンと、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC- β 細胞への*in vitro*成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC- β 細胞に分化させることであって、前記SC- β 細胞が、*in vitro*でのGSSIS応答を示す前記分化を含む、

多能性細胞からのSC- β 細胞の生成方法。

50

(項目 3 2 6)

前記 SC-β 細胞が、*in vivo*での G S I S 応答を示す、項目 3 2 4 または 3 2 5 記載の方法。

(項目 3 2 7)

さらに、R o c k 阻害剤の存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、前記細胞の生存率及び／または分化効率を改善する、項目 3 2 4 から 3 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2 8)

さらに、アクチビン A の存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、前記細胞の生存率及び／または分化効率を改善する、項目 3 2 4 から 3 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 3 2 9)

さらに、ニコチンアミドの存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、前記細胞の生存率、分化効率を改善し、及び／または、S O X 2 発現を下方制御する、項目 3 2 4 から 3 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3 0)

さらに、スタウロスポリンの存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、純粋に近い内分泌集合を生成し、及び／または、N K X 6 - 1 / C - ペプチド + 細胞を増加させる、項目 3 2 4 から 3 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 3 3 1)

さらに、A l k 5 i 及び T 3 との組合せでの X X I の存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、N K X 6 - 1 + 内分泌細胞を増加させる、項目 3 2 4 から 3 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3 2)

さらに、A l k 5 i 及び T 3 との組合せでの γ - セクレターゼ阻害剤の存在下において、幹細胞を培養することを含み、前記培養が、N K X 6 - 1 + 内分泌細胞を増加させる、項目 3 2 4 から 3 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3 3)

多能性幹細胞から *in vitro*において分化させた SC-β 細胞を含み、前記 SC-β 細胞が、*in vitro*での G S I S 応答を示す、人工臍島。

30

(項目 3 3 4)

多能性幹細胞から *in vitro*において分化させた SC-β 細胞を含み、前記 SC-β 細胞が、*in vitro*での G S I S 応答を示す、人工臍臓。

一部の態様では、本開示は、幹細胞系 β 細胞 (SC-β) を提供する。

【0004】

一部の実施形態では、前記細胞は、成熟している。一部の実施形態では、前記細胞は、*in vitro*でのグルコース刺激インスリン分泌 (G S I S) 応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、*in vivo*での G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、*in vitro*及び *in vivo*でのグルコース刺激インスリン分泌 (G S I S) 応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも 1 回のグルコースチャレンジに対して、G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも 2 回の連続的なグルコースチャレンジに対して、G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも 3 回の連続的なグルコースチャレンジに対して、G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した直後に観察される。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約 2 4 時間以内に観察される。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約 2 週間以内に観察される。一部の実施形態では、低グルコース濃度と比較して、高グルコース濃度に対する応答において分泌されたインスリンの割合により特徴付けられる前記細胞の刺激指数は、内在性の成熟臍臓 β 細胞の刺激指数に類似している。一部の実施形態では、前記刺激指数は、1 以上または 1 .

40

50

1以上または1.3以上または2以上または2.3以上または2.6以上である。一部の実施形態では、前記細胞は、サイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す。一部の実施形態では、前記サイトカインは、インターロイキン-1 β (IL- β)、インターフェロン- γ (INF- γ)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)及びそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、前記細胞からのインスリン分泌は、抗糖尿病剤に対する応答において亢進する。一部の実施形態では、前記抗糖尿病剤は、インクレチン模倣物、スルホニル尿素、メグリチニド及びそれらの組合せからなる群から選択される分泌促進物質を含む。一部の実施形態では、前記細胞は、モノホルモン性である。一部の実施形態では、前記細胞は、内在性の成熟膵臓 β 細胞の形態に類似する形態を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、内在性の成熟膵臓 β 細胞のインスリン顆粒に類似する、電子顕微鏡観察下における封入結晶インスリン顆粒を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、低速の複製を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、内在性の成熟膵臓 β 細胞のGSCFに類似するグルコース刺激Ca²⁺流動(GSCF)を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも1回のグルコースチャレンジに対して、GSCF応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも2回のグルコースチャレンジに対して、GSCF応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも3回のグルコースチャレンジに対して、GSCF応答を示す。一部の実施形態では、前記細胞は、亢進したカルシウム流動を示す。一部の実施形態では、前記亢進したカルシウム流動は、増大した量の流入または、高グルコース濃度に対して低い流入比を含む。一部の実施形態では、前記細胞は、インスリン、C-ペプチド、PDX1、MAFA、NKX6-1、PAX6、ニューロD1、グルコキナーゼ(GCK)、SLC2A1、PCSK1、KCNJ11、ABCC8、SLC30A8、SNAP25、RAB3A、GAD2、PTPRN、NKX2-2、Pax4からなる群から選択される、内在性の成熟膵臓 β 細胞に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。一部の実施形態では、前記細胞は、a) i) グルカゴン(GCG)及びii) ソマトスタチン(SST)からなる群から選択されるホルモン、または、b) i) アミラーゼ及びii) カルボキシペプチダーゼA(CPA1)からなる群から選択される腺細胞マーカー；c) i) GCG、ii) Arx、iii) Irx1及びIrx2からなる群から選択される α 細胞マーカー；並びに、d) i) CFTR及びii) Sox9からなる群から選択される管細胞マーカー、からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを発現していない。一部の実施形態では、前記細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または、Nkx6-1陽性膵臓始原細胞、Pdx1陽性膵臓始原細胞及び多能性幹細胞からなる群から選択されるその前駆体から、in vitroにおいて分化されている。一部の実施形態では、前記多能性幹細胞は、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記細胞はヒトである。一部の実施形態では、前記細胞は、遺伝子組み換えされていない。一部の実施形態では、前記細胞は、遺伝子組み換えされている。一部の実施形態では、前記細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での30分のインキュベーションにおいて、細胞1000個あたりに、0.5と10 μ IUとの間である。一部の実施形態では、前記細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での30分のインキュベーションにおいて、細胞1000個あたりに、約2.5 μ IUである。一部の実施形態では、前記インキュベーションは、ex vivoにおいて生じる。

【0005】

一部の態様では、本開示は、SC- β 細胞を含む細胞株を提供する。一部の実施形態では、前記細胞株は、インスリンを安定的に発現している。一部の実施形態では、前記細胞は、少なくとも30回の継代まで、明らかな形態変化をすることなく、凍結、解凍及び、約24と44時間との間の倍加時間で増幅されることができる。

【0006】

一部の態様では、本開示は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、インスリン陽性内分泌細胞を含む細胞集合を、a) 形質転換成長因子 β (TGF- β) シグナル伝達阻害剤及びb) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも2つの

10

20

30

40

50

β細胞成熟因子と接触させて、前記集合における少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導することを含む、インスリン陽性内分泌細胞からのSC-β細胞の生成方法を提供する。

【0007】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも1回のグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも2回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞の形態は、内在性の成熟β細胞の形態に類似している。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、*in vitro*及び／または*in vivo*でのグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答を示す。一部の実施形態では、前記GSIS応答は、前記SC-β細胞を対象に移植した直後に観察される。一部の実施形態では、前記GSIS応答は、前記SC-β細胞を対象に移植した約24時間以内に観察される。一部の実施形態では、前記GSIS応答は、前記SC-β細胞を対象に移植した約2週間以内に観察される。一部の実施形態では、前記細胞集合を、100nM-100μMの間の濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、10μMの濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤IIを含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤IIの類似体または誘導体を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.1μM-10μMの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、1μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン(T3)を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記細胞集合を、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、10nM-1μMの間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、100nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合を、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、100nM-100μMの間の濃度で、前記CFTR阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、10nM-10μMの間の濃度で、前記CFTR阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記CFTR阻害剤は、Gly-H101を含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、O-GlcNAcase阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、100nM-100μMの間の濃度で、前記O-GlcNAcase阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、10nM-10μMの濃度で、前記O-GlcNAcase阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記O-GlcNAcase阻害剤は、Thiamet Gを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、適切な培養培地中で培養される。一部の実施形態では、前記適切な培養培地は、臍島培地(CMRLS)またはCMRLSの成分を添加した、Connought Medical Research Laboratories 1066を含む。一部の実施形態では、前記CMRLSは、血清と共に添加される。一部の実施形態では、前記CMRLSは、10%ウシ胎児血清と共に添加される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、前記細胞集合中の少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞の少

10

20

30

40

50

なくとも1つのSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導するのに十分な期間、懸濁培養において維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも7日を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7日と21日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7日と14日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、10日と14日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、14日を含む。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、2日に1回補充される。一部の実施形態では、前記細胞集合中の少なくとも1%の前記インスリン陽性内分泌細胞が誘導されて、SC-β細胞に成熟する。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも99%の前記インスリン陽性内分泌細胞が誘導されて、SC-β細胞に成熟する。一部の実施形態では、前記集合中の得られた細胞の少なくとも30%は、SC-β細胞を含む。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、C-ペプチド、インスリン、NKX6-1、Pdx1を発現しており、NKX6-1とC-ペプチドとを共発現している。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、Pdx1及びNKX6-1も発現している。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、*in vitro*における前記SC-β細胞の生成は、規模を拡大できる。

10

【0008】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたSC-β細胞の単離された集合を提供する。

20

【0009】

一部の態様では、本開示は、その中に封入された、SC-β細胞の単離された集合を含むマイクロカプセルを提供する。

【0010】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたSC-β細胞の集合を含む組成物を提供する。

【0011】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたSC-β細胞の単離された集合を含むアッセイを提供する。

【0012】

30

一部の実施形態では、前記アッセイは、β細胞の増殖、β細胞の複製、β細胞の死、β細胞の機能、免疫攻撃に対するβ細胞の感受性または脱分化もしくは分化に対するβ細胞の感受性からなる群から選択される、β細胞の運命を促進または阻害する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用するためのものである。一部の実施形態では、前記アッセイは、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の、少なくとも1つのSC-β細胞への分化を促進する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用するためのものである。

【0013】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたSC-β細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、それを必要とする対象の処置方法を提供する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、マイクロカプセルに封入される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、前記SC-β細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、iPS細胞の集合から産生され、前記iPS細胞は、前記SC-β細胞が投与される前記同じ対象から得られた細胞から得られる。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

40

【0014】

50

一部の態様では、本開示は、それを必要とする対象に投与するための、請求項41から102のいずれか一項に記載の方法により産生されたSC-β細胞の単離された集合の使用に関する。

【0015】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞の単離された集合は、マイクロカプセルに封入されて、前記対象に投与される。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

10

【0016】

一部の態様では、本開示は、a) Alk5阻害剤、b) トリヨードチロニン(T3)、場合により、c) スタウロスポリン、及び場合により、d) CMRLSまたはCMRLSの成分を含む、培養培地を提供する。

【0017】

一部の態様では、本開示は、インスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導するために前記培養培地を使用し、前記SC-β細胞が、*in vitro*及び／または*in vivo*の両方でのGSI応答を示す、前記使用を含む。

【0018】

一部の態様では、本開示は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) 繊維芽細胞成長因子(FGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子、b) ソニックヘッジホッグ経路阻害剤を含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子、及び場合により、c) 低濃度のレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路アクチベータと、少なくとも5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することを含み、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、NKX6-1を発現している、Pdx1陽性膵臓始原細胞からのNKX6-1陽性膵臓始原細胞の製造方法を提供する。

20

【0019】

一部の実施形態では、前記細胞集合を、1 ng/mL-100 ng/mLの間の濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、50 ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子(KGF)を含む。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、FGF2、FGF8B、FGF10及びFGF21からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記細胞集合を、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させない。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.01 μM-1.0 μMの間の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.1 μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、RAを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.1 μMと0.5 μMとの間の濃度で、SHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.25 μMの濃度で、前記SHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記SHH経路阻害剤は、Sant1を含む。前記方法は、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子に、前記細胞集合を曝すことを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、2 ng/mL-200 ng/mLの間の濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子に曝される。一部の実施形態では、前記細胞集合は、20 ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子に曝される。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子は、ベタセルリン及びEG

30

40

50

Fからなる群から選択される。一部の実施形態では、前記細胞集合は、適切な培養培地中で培養される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、2日に1回補充される。一部の実施形態では、プロテインキナーゼCのアクチベータは、5日の間、前記懸濁培養に添加されない。一部の実施形態では、プロテインキナーゼCのアクチベータは、5日の前に、前記懸濁培養から除去される。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼCのアクチベータは、P d b Uを含む。一部の実施形態では、BMPシグナル伝達経路阻害剤は、5日の間、前記懸濁培養に添加されない。一部の実施形態では、BMPシグナル伝達経路阻害剤は、5日の前に、前記懸濁培養から除去される。一部の実施形態では、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤は、LDN193189を含む。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも10%の前記P d x 1陽性膵臓始原細胞は誘導されて、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化する。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも95%の前記P d x 1陽性膵臓始原細胞は誘導されて、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化する。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、P d x 1、NKX6-1及びFoxA2を発現している。一部の実施形態では、前記P d x 1陽性膵臓始原細胞は、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される。

10

【0020】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法により得られたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を提供する。

20

【0021】

一部の態様では、本開示は、その中に封入された、NKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含むマイクロカプセルを提供する。

【0022】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含む組成物を提供する。

【0023】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含むアッセイを提供する。

【0024】

一部の実施形態では、前記アッセイは、少なくとも1つのP d x 1陽性膵臓始原細胞またはその前駆体の、NKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を促進する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用するためのものである。

30

【0025】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、それを必要とする対象の処置方法を提供する。

【0026】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、マイクロカプセルに封入される。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

40

【0027】

一部の態様では、本開示は、SC-β細胞に分化させるための、請求項113から142のいずれか一項に記載の方法により産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合の使用に関する。

【0028】

50

一部の態様では、本開示は、それを必要とする対象に投与するための、本願明細書に記載された方法により産生されたNKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合の使用を含む。

【0029】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合は、マイクロカプセルに封入されて、前記対象に投与される。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

10

【0030】

一部の態様では、本開示は、a) KGF、b) SNT1、及び場合により、c) RAを含み、PdbU及びLDN193189を実質的に含まない、培養培地を提供する。一部の実施形態では、本開示は、Pdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への*in vitro*分化を誘導するための、請求項160記載の培養培地の使用を含む。

【0031】

一部の態様では、本開示は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、NKX6-1陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) TGF- β シグナル伝達経路阻害剤及びb) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも2つの β 細胞成熟因子と接触させて、前記集合中の少なくとも1つのNKX6-1陽性膵臓始原細胞の少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導することを含み、前記インスリン陽性膵臓始原細胞が、インスリンを発現している、NKX6-1陽性膵臓始原細胞からのインスリン陽性内分泌細胞の製造方法を提供する。一部の実施形態では、前記細胞集合を、100nM-100 μ Mの濃度で、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、10 μ Mの濃度で、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、TGF- β シグナル伝達経路は、TGF- β 受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤IIを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.1 μ M-10 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、1 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン(T3)を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合を、少なくとも1つの更なる β 細胞成熟因子と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なる β 細胞成熟因子は、 γ -セクレターゼ阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.1 μ M-10 μ Mの濃度で、前記 γ -セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、1 μ Mの濃度で、前記 γ -セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 γ -セクレターゼ阻害剤は、XXIを含む。一部の実施形態では、前記 γ -セクレターゼ阻害剤は、DAPTを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なる β 細胞成熟因子は、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、2ng/mL-200ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、20ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、EGFを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なる β 細胞成熟因子は、低濃度のレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路アクチベータを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、0.01 μ M-1.0 μ Mの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触

20

30

40

50

させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、 $0.1\ \mu\text{M}$ の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、RAを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なる β 細胞成熟因子は、ソニックヘッジホッグ（SHH）経路阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、 $0.1\ \mu\text{M}$ と $0.5\ \mu\text{M}$ との間の濃度で、前記SHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、 $0.25\ \mu\text{M}$ の濃度で、前記SHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記SHH経路阻害剤は、Sant1を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、 $10\ \text{nM}$ – $1\ \mu\text{M}$ の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、 $100\ \text{nM}$ の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合をグルコースに曝すことを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、 $1\ \text{mM}$ – $50\ \text{mM}$ の間の濃度で、グルコースに曝される。一部の実施形態では、前記細胞集合は、 $25\ \text{mM}$ の濃度で、グルコースに曝される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、前記集合中の少なくとも1つの前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導するのに十分な期間、懸濁培養において維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも7日である。一部の実施形態では、前記 β 細胞成熟因子は、前記懸濁培養に、2日に1回補充される。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも15%の前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は誘導されて、インスリン陽性内分泌細胞に分化する。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも99%の前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は誘導されて、インスリン陽性内分泌細胞に分化する。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される多能性幹細胞の集合から産生される。

【0032】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を提供する。

【0033】

一部の態様では、本開示は、その中に封入された、インスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を含むマイクロカプセルを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の集合を含む組成物を提供する。

【0034】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を含む組成物を、対象に投与することを含む、それを必要とする対象の処置方法を提供する。

【0035】

一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、前記インスリン陽性内分泌細胞が投与される前記同じ対象から得られた多能性幹細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、マイクロカプセルに封入される。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

【0036】

一部の態様では、本開示は、SC-β細胞に分化させるための、本願明細書に記載された方法により産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合の使用を含む。

【0037】

一部の態様では、本開示は、それを必要とする対象に投与するための、本願明細書に記載された方法により産生されたインスリン陽性内分泌細胞の単離された集合の使用を含む。

【0038】

一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞の単離された集合は、マイクロカプセルに封入されて、前記対象に投与される。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する。一部の実施形態では、前記糖尿病は、I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病及び糖尿病前症からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記対象は、代謝異常を有するか、または、代謝異常になる増大したリスクを有する。

【0039】

一部の態様では、本開示は、a) TGF-βシグナル伝達経路阻害剤、b) TH経路アクチベータ並びに、i) XXI、ii) ベタセルリン、iii) 低濃度のRAシグナル伝達経路アクチベータ及びiv) SHH経路阻害剤からなる群から選択される少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含む、培養培地を提供する。

【0040】

一部の態様では、本開示は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への*in vitro*分化を誘導するための請求項221の培養培地の使用を含む。

【0041】

一部の態様では、本開示は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子β (TGF-β)シグナル伝達経路阻害剤、ii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導することを含み、前記SC-β細胞が、*in vitro*及び/または*in vivo*においてGSI応答を示す、SC-β細胞の生成方法を提供する。

【0042】

一部の実施形態では、前記GSI応答は、(i) 前記SC-β細胞を対象に移植した直後；(ii) 対象への移植の約24時間以内；または、(iii) 対象への移植の約2週間以内に観察される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、(i) 少なくとも1回のグルコースチャレンジ；(ii) 少なくとも2回の連続的なグルコースチャレンジ；または、(iii) 少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞の形態は、内在性のβ細胞の形態に類似している。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、100nM-100μMの間の濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、10μMの濃度で、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤Iを含む。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、0.1μM-10μMの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン (T3) を含む。

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M - 1 μ M の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) 阻害剤と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M と 1 0 0 μ M との間の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M と 1 0 μ M との濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 C F T R 阻害剤は、G l y - H 1 0 1 を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M と 1 0 0 μ M との間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M と 1 0 μ M との間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤は、T h i a m e t G を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞は、適切な培養培地中で培養される。一部の実施形態では、前記適切な培養培地は、臍島培地 (C M R L S) または C M R L S の成分を添加した、C o n n o u g h t M e d i c a l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s 1 0 6 6 を含む。一部の実施形態では、前記 C M R L S は、血清と共に添加される。一部の実施形態では、前記 C M R L S は、1 0 % ウシ胎児血清と共に添加される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞は、少なくとも一部の P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n v i t r o 成熟を誘導するのに十分な期間、懸濁培養中で維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも 7 日を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7 日と 2 1 日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7 日と 1 4 日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、1 4 日を含む。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2 日に 1 回補充される。一部の実施形態では、生成された前記細胞の少なくとも 3 0 % は、S C - β 細胞を含む。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、C - ペプチド、インスリン、N K X 6 - 1、P d x 1 を発現しており、N K X 6 - 1 と C - ペプチドとを共発現している。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、i n v i t r o における前記 S C - β 細胞の生成は、規模を拡大できる。

【0043】

一部の実施形態では、前記インスリン陽性の内分泌細胞は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の臍臓始原細胞を、i) T G F - β シグナル伝達経路阻害剤及び i i) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、少なくとも一部の P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の臍臓始原細胞の、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導することにより得られ、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞は、P d x 1、N K X 6 - 1、N K X 2 - 2、M a f b、g l i s 3、S u r 1、K i r 6 . 2、Z n t 8、S L C 2 A 1、S L C 2 A 3 及び／またはインスリンを発現している。

【0044】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 0 0 n M - 1 0 0 μ M の間の濃度で、前記 T G F - β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 0 μ M の濃度で、前記 T G F - β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、T G F - β シグナル伝達経路は、T G F - β 受容体 I 型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記 T G F - β シグナル伝達経路阻害剤は、A l k 5 阻害剤 I I を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 μ M の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン (T 3) を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、i) S H H 経路阻害剤、i i) R A シグナル伝達経路アクチベータ、i i i) γ - セクレターゼ阻害剤、i v) 上皮成長因子 (E G F) ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、及び場合により、v) プロテインキナーゼ阻害剤の少なくとも 1 つと接触させることを含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M と 0 . 5 μ M との間の濃度で、前記 S H H 経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 2 5 μ M の濃度で、S H H 経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 S H H 経路阻害剤は、S a n t 1 を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 0 1 μ M と 1 . 0 μ M との間の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータは、R A を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、0 . 1 μ M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記 γ - セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 μ M の濃度で、前記 γ - セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 γ - セクレターゼ阻害剤は、X X I を含む。一部の実施形態では、前記 γ - セクレターゼ阻害剤は、D A P T を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、2 n g / m L - 2 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、2 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、E G F を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 0 n M - 1 μ M の間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、1 0 0 n M の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合をグルコースに曝すことを含む。一部の実施形態では、前記細胞集合は、1 m M - 5 0 m M の間の濃度で、グルコースに曝される。一部の実施形態では、前記細胞集合は、2 5 m M の濃度で、グルコースに曝される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞は、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞の、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する

10

20

30

40

50

のに十分な期間、懸濁培養において維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも7日である。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2日に1回補充される。一部の実施形態では、少なくとも15%の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は誘導されて、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化する。一部の実施形態では、少なくとも99%の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は誘導されて、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化する。

【0045】

一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、及び場合により、iii) 低濃度のRAシグナル伝達経路アクチベータと、5日の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞のPdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導することにより得られ、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は、Pdx1及びNKX6-1を発現している。

【0046】

一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、1 ng/mL-100 ng/mLの間の濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、50 ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子(KGF)を含む。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、FGF2、FGF8B、FGF10及びFGF21からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、0.1 µMと0.5 µMとの間の濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、0.25 µMの濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤は、Sant1を含む。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、0.01 µM-1.0 µMの間の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、0.1 µMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、RAを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、2 ng/mL-200 ng/mLの間の濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、20 ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、EGFを含む。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、適切な培養培地中で培養される。一部の実施形態では、前記細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2日に1回補充される。一部の実施形態では、プロテインキナーゼCのアクチベータは、5日の間、前記懸濁培養に添加されない。一部の実施形態では、プロテインキナーゼCのアクチベータは、5日の前に、前記懸濁培養から除去される。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼCのアクチベータは、PdbUを含む。一部の実施形態では、BMPシグナル伝達経路阻害剤は、5日の間、前記懸濁培養に添加されない。一部の実施形態では、BMPシグナル伝達経路阻害剤は、5日の前に、前記懸濁培養から除去される。一部の実施形態では、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤は、LDN193189を含む。一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも10%の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は誘

10

20

30

40

50

導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する。一部の実施形態では、少なくとも 95% の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞は誘導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する。

【0047】

一部の態様では、本開示は、a) 集合中の多能性幹細胞を、P d x 1 陽性膵臓始原細胞に分化させること；b) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、i) F G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、i i) 少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤、及び場合により、i i i) R A シグナル伝達経路アクチベータと、2 日に 1 回、5 日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、
 少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化させることであって、前記 N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞が、P d x 1 及び N K X 6 - 1 を発現している前記分化；c) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、i) T G F - β シグナル伝達経路阻害剤、b) T H シグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、c) 少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤、i i) R A シグナル伝達経路アクチベータ、i i i) γ -セクレターゼ阻害剤並びに v i) 上皮成長因子 (E G F) ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子と、2 日に 1 回、5 日と 7 日との間の期間接触させて、少なくとも一部の
 前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞の P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記
 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることであって、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、P d x 1、N K X 6 - 1、N K X 2 - 2、M a f b、g l i s 3、S u r 1、K i r 6. 2、Z n t 8、S L C 2 A 1、S L C 2 A 3 及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、d) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (T G F - β) シグナル伝達経路阻害剤、i i) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、i i i) プロテインキナーゼ阻害剤と、2 日に 1 回、7 日と 14 日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n
 v i t r o 成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、S C - β 細胞に分化させることであって、前記 S C - β 細胞が、i n v i t r o 及び／または i n v i v o における G S I S 応答を示す前記分化を含む、多能性細胞からの S C - β 細胞の生成方法を提供する。

【0048】

一部の実施形態では、本開示は、a) 集合中の少なくとも一部の多能性細胞を、P d x 1 陽性膵臓始原細胞に分化させること；b) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、i) K G F、i i) S a n t 1、及び場合により、i i i) 低濃度の R A と、2 日に 1 回、5 日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも 1 つの P d x 1 陽性膵臓始原細胞の N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する
 方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化させることであって、前記 N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞が、P d x 1 及び N K X 6 - 1 を発現している前記分化；c) 前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、i) A l k 5 阻害剤 I I、i i) T 3、及び場合により、i i i) S a n t 1、i v) R A、v) X X I 及び v i) ベタセルリンと、2 日に 1 回、5 日と 7 日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞の、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に
 分化させることであって、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分

泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、d)細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i)Alk5阻害剤I1、ii)T3、及び場合により、iii)スタウロスポリンと、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン産生の内分泌細胞のSC-β細胞へのin vitro成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC-β細胞に分化させることであって、前記SC-β細胞が、in vitro及び／またはin vivoにおけるGSI応答を示す前記分化を含む、多能性細胞からのSC-β細胞の生成方法を提供する。

10

【0049】

一部の態様では、本開示は、多能性幹細胞からin vitroにおいて分化させたSC-β細胞を含む人工膵島を提供する。

【0050】

一部の態様では、本開示は、多能性幹細胞からin vitroにおいて分化させたSC-β細胞を含む人工膵臓を提供する。

【0051】

特に断らない限り、本発明の実施には、当該分野の技能の範囲内にある、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換え核酸（例えば、DNA）技術、免疫学及びRNA干渉（RNAi）の従来技術が、典型的に使用されるであろう。特定のこれらの技術の非限定的な説明は、下記刊行物：Ausubel, F., et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, all John Wiley & Sons, N.Y., edition as of December 2008; Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. and Lane, D., Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R. I., 「Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique」, 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005に見出される。治療剤及びヒトの疾患に関する非限定的な情報は、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., McGraw Hill, 2005、Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange; 10th ed. (2006) or 11th edition (July 2009)に見出される。遺伝子及び遺伝子障害に関する非限定的な情報は、McKusick, V. A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition) または、より最新のオンラインデータベース: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (商標). McKusick-Nathans Institute of G

20

30

40

50

genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), as of May 1, 2010, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>、及び、Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), a database of genes, inherited disorders and traits in animal species (other than human and mouse), at <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>に見出される。本願明細書において言及される全ての特許、特許出願及び他の刊行物（例えば、科学論文、本、ウェブサイト及びデータベース）は、その全体が参照により組み込まれる。本明細書と前記組み込まれた参考文献のいずれかとの間で矛盾がある場合には、本明細書（例えば、その任意の補正を含む、前記補正は、組み込まれた参考文献に基づいている場合がある。）が、コントロールするであろう。特に断らない限り、用語の標準的な技術的に受け入れられた意味が、本願明細書において使用される。種々の用語の標準的な略称が、本願明細書において使用される。

10

【0052】

本特許または出願ファイルは、着色された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許または特許出願の公報のコピーは、請求及び必要な料金の支払いに基づいて、官庁により提供されるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1A及び1Bは、先に公開されたコントロールの分化法と新規な直接分化法との間の比較を示す。図1Aは、先に公開されたコントロールの分化法と比較した、hPSCからINS+細胞を生成するための本開示の典型的な直接分化法を比較する模式図を示す。図1Bは、先に公開されたコントロールの分化法を使用して、OCT4、SOX17及びPDX1でそれぞれ染色された、未分化のHUES8（上段）、DEへの分化（中断）及びPP1への分化（下段）の組織学的切片を図示する。スケールバー=100 μ m。

【図2】図2A、2B及び2Cは、*in vitro*において生成した幹細胞系 β （SC- β ）細胞が、複数回の連続的な高グルコースチャレンジに対する応答において、初代ヒト β 細胞と同様に、インスリンを分泌することを図示する。図2A、2B及び2Cは、2、20、2、20、2及び20mM グルコースで連続的にチャレンジされた、SC- β （図2A）、初代 β 細胞（図2B）及びPH細胞（図2C）から分泌されたヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。連続的な低/高グルコースチャレンジ後、細胞を、30mM KClで脱分極した。

30

【図3】図3A、3B及び3Cは、複数回の連続的な高グルコースチャレンジに対する応答において、初代 β 細胞と同様に、インスリンを分泌する、*in vitro*系SC- β 細胞の更なる生物学的反復を図示する。左側のパネルは、図2におけるのと同じである。細胞SC- β 細胞（SC- β ；図3A）、初代 β 細胞（1° β ；図3B）及びPH細胞（図3C）を、2、20、2、20、2及び20mM グルコース及び30mM KClで連続的に負荷し、ヒトインスリンを、ELISAで測定した。

40

【図4】図4A、4B、4C、4D及び4Eは、複数回の連続的な高グルコースチャレンジに対する応答において、SC- β 細胞が、初代 β 細胞と同様に、細胞質Ca²⁺を流動することを図示する。図4Aは、Fluo-4 AM染色を使用して、細胞質Ca²⁺の集合レベル及び1つの細胞レベルでの検出の模式図である。集合レベルでの測定を、個々のクラスター全体（模式図中の大きな赤の円で表示）において行い、インタクトなクラスター内の個々の細胞（小さな赤の円で表示）を、1つの細胞分析用に分析した。図4Bは、2、20、2、20、2及び20mM グルコース及び30mM KClで連続的にチャレンジされた、SC- β 細胞、初代 β 細胞及びPH細胞についての、動的に規格化された

50

Fluo-4 蛍光強度の集合測定を示すグラフである。図 4 C は、1 つの細胞分析に使用した Fluo-4 AM 染色の蛍光画像を示す。図 4 D は、3 回（黄色）、2 回（オレンジ色）、1 回（青色）及び 0 回（赤色）のグルコースチャレンジにตอบสนองした、1 つの細胞の位置を示す代表的な画像を示す。図 4 E は、20 mM グルコースにตอบสนองした、SC-β 細胞（n = 156）、初代 β 細胞（n = 114）及び PH 細胞（n = 138）の頻度のグラフによる定量化を示す。スケールバー = 100 μm。

【図 5】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E 及び 5 F は、タンパク質及び遺伝子発現レベルにおいて、SC-β がヒト β 細胞マーカーを発現していることを図示する。図 5 A は、C-ペプチド（緑色）、NKX6-1（赤色）及びソマトスタチン（灰色）で染色した細胞の免疫組織化学的画像を示す。図 5 B は、C-ペプチド（緑色）及び PDX1（赤色）で染色した細胞の免疫組織化学的画像を示す。図 5 C は、対応する DAPI 染色（青色）を伴う、C-ペプチド（緑色）及びグルカゴン（赤色）で染色した細胞の免疫組織化学的画像を示す。図 5 D は、C-ペプチド及び NKX6-1 で染色した細胞の、代表的なフローサイトメトリのドットプロット及び集合割合を示す。図 5 E は、INS について分取した、未分化 HUES8、PH 細胞、胎児 β 細胞及び成体初代 β 細胞（Hrvatine et al. (Hrvatine et al., 2014) からのデータ）、並びに、INS 及び NKX6-1 について分取した SC-β 細胞（SC-β）のマイクロアレイにより測定された全ての遺伝子に基づく階層クラスタリング分析を示す。図 5 F は、全てのサンプルにわたる最も高い分散を有する、100 個の遺伝子のヒートマップを示す。CP = C-ペプチド、SST = ソマトスタチン、GG = グルカゴン。スケールバー = 100 μm。

【図 6】図 6 は、DAPI（青色）、インスリン（緑色）、C-ペプチド（赤色）で染色した SC-β 細胞クラスターの組織像を図示する。スケールバー = 100 μm。

【図 7】図 7 A、7 B 及び 7 C は、SC-β 細胞の更なる組織学的染色を図示する。図 7 A は、C-ペプチド（緑色）及び ISL1（赤色）での染色を図示する。図 7 B は、C-ペプチド（緑色）及び MAF A（赤色）での染色を図示する。図 7 C は、C-ペプチド（緑色）及び MAF B（赤色）での染色を図示する。スケールバー = 100 μm。

【図 8】図 8 A、8 B 及び 8 C は、C-ペプチド及び SST（図 8 A）、C-ペプチド及び GG（図 8 B）並びに SST 及び GG（図 8 C）で染色した SC-β 細胞及び PH 細胞の、代表的なフローサイトメトリのドットプロット及び集合割合を示す。

【図 9】図 9 A、9 B 及び 9 C は、SC-β 細胞顆粒が、初代ヒト β 細胞顆粒に構造的に類似することを図示する。図 9 A は、代表的な結晶化インスリン顆粒（赤色）、初期のインスリン顆粒（黄色）及び混合型の内分泌顆粒（青色）を強調表示した顆粒の電子顕微鏡画像を示す。スケールバー = 500 nm。図 9 B は、（図 9 A）中で強調表示した顆粒のより高い拡大画像を示す。スケールバー = 500 nm。図 9 C は、インスリン（小さい方の 5 nm の黒色ドット）及び／またはグルカゴン（大きい方の 15 nm の黒色ドット）を含む顆粒を示す、免疫金染色で標識した細胞の電子顕微鏡画像を示す。代表的な免疫金粒子を、赤色の矢印（インスリン）及び青色の矢印（グルカゴン）で強調表示する。スケールバー = 100 nm。

【図 10】図 10 A 及び 10 B は、in vitro において hiPSC から生成した幹細胞系 β（SC-β）細胞が、複数回の連続的な高グルコースチャレンジに対する応答において、初代ヒト β 細胞と同様に、インスリンを分泌することを図示する。図 10 A 及び 10 B は、2、20、2、20、2 及び 20 mM グルコースで連続的にチャレンジされた、非糖尿病細胞（図 10 A）及び 1 型糖尿病細胞（図 10 B）から生成した SC-β から分泌されたヒトインスリンの ELISA 測定を示すグラフである。

【図 11】図 11 A、11 B、11 C、11 D、11 E 及び 11 F は、複数の hiPSC 株からの C-ペプチド及び NKX6-1 で染色した細胞の、代表的なフローサイトメトリのドットプロット及び集合割合を示す。図 11 A、11 B 及び 11 C は、非糖尿病 hiPSC 株からの C-ペプチド及び NKX6-1 で染色した細胞の、代表的なフローサイトメトリのドットプロット及び集合割合を示す。図 11 D、11 E 及び 11 F は、1 型糖

10

20

30

40

50

尿病h i P S C株からのCーペプチド及びNKX6-1で染色した細胞の、代表的なフローサイトメトリのドットプロット及び集合割合を示す。

【図12】図12A、12B、12C及び12Dは、移植されたSC-β細胞が、in vivoにおいて素早く機能することを図示する。図12Aは、(最後のin vitro工程において1週間培養された)SC-β細胞、初代ヒトβ細胞(1°β)またはPH細胞を移植された、個々のマウスの血清からのヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。移植後2週間のマウスのグルコース注射前(白色のバー)及び同注射後30分(黒色のバー)で、測定を行った。図12Bは、移植片の存在を確認するために、Cーペプチド(緑色)及びPDX1(赤色)で染色した移植細胞(図12A)の免疫組織化学的画像を示す。図12Cは、膵臓前駆細胞を移植された個々のマウスの血清からのヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。移植後2週間のマウスのグルコース注射前(白色のバー)及び同注射後30分(黒色のバー)で、測定を行った。図12Dは、最後のin vitro工程中に2週間培養したSC-β細胞を移植された個々のマウスの血清からのヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。移植後2週間のマウスのグルコース注射後30分(黒色のバー)で、測定を行った。nd=未測定。スケールバー=100µm。

【図13】図13A及び13Bは、2週間前に、マウスに移植されたSC-β細胞及びPH細胞の更なる組織学的断片を図示する。図13Aは、DAPI(青色)、Cーペプチド(緑色)及びGCG(赤色)で染色した移植片の低拡大画像を示す。スケールバー=200µm。図13Bは、Cーペプチド(緑色)及びGCG(赤色)で染色した移植片のより高い拡大画像を示す。スケールバー=100µm。

【図14A】図14A、14B及び14Cは、SC-β細胞がin vivoにおいてより多くのインスリンを分泌するのを可能にする、分化の最終工程における培地の使用を説明する。図14Aは、分化過程の種々の工程における、種々の培地の使用を示す模式図である。図14Bは、分化の最終工程において、更なる因子、例えば、Sant1、XXI及びSSPをCMRL培地に添加することで、高グルコースチャレンジと低グルコースチャレンジとの間の刺激指数により測定した場合、SC-β細胞によるより良好なグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答が生じることを示す。図14Cは、分化の最終工程において、更なる因子、例えば、Sant1、XXI及びSSPをCMRL培地に添加することで、一定量の放出されたインスリンにより測定した場合、SC-β細胞によるより良好なグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答が生じることを示す。

【図14B-C】図14A、14B及び14Cは、SC-β細胞がin vivoにおいてより多くのインスリンを分泌するのを可能にする、分化の最終工程における培地の使用を説明する。図14Aは、分化過程の種々の工程における、種々の培地の使用を示す模式図である。図14Bは、分化の最終工程において、更なる因子、例えば、Sant1、XXI及びSSPをCMRL培地に添加することで、高グルコースチャレンジと低グルコースチャレンジとの間の刺激指数により測定した場合、SC-β細胞によるより良好なグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答が生じることを示す。図14Cは、分化の最終工程において、更なる因子、例えば、Sant1、XXI及びSSPをCMRL培地に添加することで、一定量の放出されたインスリンにより測定した場合、SC-β細胞によるより良好なグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)応答が生じることを示す。

【図15A-C】図15A、15B、15C、15D、15E、15F、15G、15H及び15Iは、生成したSC-β細胞の生存及び品質を向上させ得る、プロトコルに対する改良を図示する。図15Aは、前記プロトコルの模式的説明である。図15Bは、前記改良プロトコルを使用して、どれだけ多くの純粋なNKX6.1+内分泌クラスターを生成し得るかを示す(図15B)。図15Cは、工程3-5においてRock阻害剤を使用することにより、細胞生存をどの程度改善し得るかを説明する。図15Dは、ニコチンアミドと共にアクチビンAを使用することにより、どの程度、SOX2を下方制御し、細胞生存を改善し得るかを説明する。図15Eは、SOX2及びNKX6-1が、互いに排他的であることを示す。図15Fは、工程6においてスタウロスポリンを使用することによ

り、純粋に近い内分泌集合をどの程度生じるかを説明する。図15Gは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、どの程度より高い割合のNKX6-1/C-ペプチド+細胞が生じるかを説明する。図15Iは、工程5-6においてAlk5i及びT3との組合せでXXIを使用することにより、Alk5i及びT3のみ(図15H)を使用するのと比較した場合、ニューロD+集合をどの程度増加させるかを説明する。

【図15D-E】図15A、15B、15C、15D、15E、15F、15G、15H及び15Iは、生成したSC-β細胞の生存及び品質を向上させ得る、プロトコルに対する改良を図示する。図15Aは、前記プロトコルの模式的説明である。図15Bは、前記改良プロトコルを使用して、どれだけ多くの純粋なNKX6.1+内分泌クラスターを生成し得るかを示す(図15B)。図15Cは、工程3-5においてRock阻害剤を使用することにより、細胞生存をどの程度改善し得るかを説明する。図15Dは、ニコチンアミドと共にアクチビンAを使用することにより、どの程度、SOX2を下方制御し、細胞生存を改善し得るかを説明する。図15Eは、SOX2及びNKX6-1が、互いに排他的であることを示す。図15Fは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、純粋に近い内分泌集合をどの程度生じるかを説明する。図15Gは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、どの程度より高い割合のNKX6-1/C-ペプチド+細胞が生じるかを説明する。図15Iは、工程5-6においてAlk5i及びT3との組合せでXXIを使用することにより、Alk5i及びT3のみ(図15H)を使用するのと比較した場合、ニューロD+集合をどの程度増加させるかを説明する。

【図15F-G】図15A、15B、15C、15D、15E、15F、15G、15H及び15Iは、生成したSC-β細胞の生存及び品質を向上させ得る、プロトコルに対する改良を図示する。図15Aは、前記プロトコルの模式的説明である。図15Bは、前記改良プロトコルを使用して、どれだけ多くの純粋なNKX6.1+内分泌クラスターを生成し得るかを示す(図15B)。図15Cは、工程3-5においてRock阻害剤を使用することにより、細胞生存をどの程度改善し得るかを説明する。図15Dは、ニコチンアミドと共にアクチビンAを使用することにより、どの程度、SOX2を下方制御し、細胞生存を改善し得るかを説明する。図15Eは、SOX2及びNKX6-1が、互いに排他的であることを示す。図15Fは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、純粋に近い内分泌集合をどの程度生じるかを説明する。図15Gは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、どの程度より高い割合のNKX6-1/C-ペプチド+細胞が生じるかを説明する。図15Iは、工程5-6においてAlk5i及びT3との組合せでXXIを使用することにより、Alk5i及びT3のみ(図15H)を使用するのと比較した場合、ニューロD+集合をどの程度増加させるかを説明する。

【図15H-I】図15A、15B、15C、15D、15E、15F、15G、15H及び15Iは、生成したSC-β細胞の生存及び品質を向上させ得る、プロトコルに対する改良を図示する。図15Aは、前記プロトコルの模式的説明である。図15Bは、前記改良プロトコルを使用して、どれだけ多くの純粋なNKX6.1+内分泌クラスターを生成し得るかを示す(図15B)。図15Cは、工程3-5においてRock阻害剤を使用することにより、細胞生存をどの程度改善し得るかを説明する。図15Dは、ニコチンアミドと共にアクチビンAを使用することにより、どの程度、SOX2を下方制御し、細胞生存を改善し得るかを説明する。図15Eは、SOX2及びNKX6-1が、互いに排他的であることを示す。図15Fは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、純粋に近い内分泌集合をどの程度生じるかを説明する。図15Gは、工程6においてスタウロスポリンを使用することにより、どの程度より高い割合のNKX6-1/C-ペプチド+細胞が生じるかを説明する。図15Iは、工程5-6においてAlk5i及びT3との組合せでXXIを使用することにより、Alk5i及びT3のみ(図15H)を使用するのと比較した場合、ニューロD+集合をどの程度増加させるかを説明する。

【図16】図16A、16B、16C、16D、16E、16F、16G、16H及び16Iは、糖尿病治療または創薬プラットフォームとしてのSC-β細胞の臨床的有用性を説明する。図16Aは、糖尿病の処置または機能もしくは複製を改善する薬剤のスクリー

10

20

30

40

50

ニングのための、SC-β細胞の有用性の模式図である。図16Bは、試験した糖尿病剤及びその一般的な治療分類を列記した表である。図16Cは、2及び20mM グルコースにおいて、示した薬剤で処置された、播種したSC-β細胞から分泌されたヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。示したp値は、薬剤とコントロールとの間で、20mM グルコースにおけるインスリン値を比較する。図16Dは、処理することなく、DAPI（青色）、C-ペプチド（緑色）及びKi67（赤色）で染色した、分散及び播種したSC-β細胞の免疫蛍光画像である。図16Eは、DAPI（青色）、C-ペプチド（緑色）及びKi67（赤色）で染色した、プロラクチンで48時間処理し、分散及び播種したSC-β細胞の免疫蛍光画像である。図16Fは、C-ペプチドとKi67とを共発現している細胞の機能のグラフによる定量化を示す。 $* p < 0.05$ 。図16Gは、SC-β細胞（ $n=6$ ）またはPH細胞（ $n=6$ ）を移植したAkitaマウスの絶食時血中グルコース測定を図示するグラフである。 $* p < 0.05$ は、同日での2つの細胞群と比較する。図16Hは、SC-β細胞またはPH細胞を移植した進行性の糖尿病Akitaマウスからの血中グルコース測定を図示するグラフである。2週間前に移植したマウスのグルコース注射前（白色のバー）及び同注射の20分後（黒色のバー）で、測定を行った。グルコース測定は、550mg/dLで飽和させた。 $* p < 0.05$ は、グルコース注射後の同じタイミングでの2つの細胞群と比較する。図16Iは、グルコース注射後20分でのAkitaマウスの血清からのヒトインスリンのELISA測定を示すグラフである。移植後2週間において、グルコースでマウスをチャレンジした。 $* p < 0.05$ は、前記2つの細胞群と比較する。スケールバー=50μm。

【図17】図17は、SC-β細胞（ $n=6$ ）またはPH細胞（ $n=6$ ）を移植したAkitaマウスの体重を図示するグラフである。 $* p < 0.05$ は、18日及び28日時点での2つの細胞群と比較する。

【発明を実施するための形態】

【0054】

本開示の態様は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体（例えば、iPS細胞、hESC、成体型内胚葉細胞、原腸管細胞、Pdx1陽性膵臓始原細胞、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞、Ngn3陽性内分泌始原細胞等）から、幹細胞系β（SC-β）細胞（例えば、成熟得膵臓β細胞）を生成するための組成物、方法、キット及び作用剤、並びに、それらの組成物、方法、キット及び作用剤により産生された、細胞療法、アッセイ（例えば、薬剤スクリーニング）及び種々の処置方法に使用するためのSC-β細胞に関する。

【0055】

さらに、本開示の態様は、選択マーカを使用することなく、形態学的評価基準並びに、機能的特徴、例えば、インスリンを発現し、1回以上のグルコースチャレンジに対する応答においてインスリンを分泌し、成熟したGSIIS応答を示し、*in vivo*において膵臓における膵島に組織化し、典型的には、直径約9-15μmの小型スピンドル様細胞を有する能力に基づいて検出可能な、前記SC-β細胞の特定方法に関する。

【0056】

さらに、本開示の態様は、β細胞成熟因子の特定方法に関する。特定のβ細胞成熟因子が当該分野において公知のアッセイを使用して機能し得るかどうかを、当業者であれば認識するであろうし、または、容易に確認可能であろう。例えば、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体をSC-β細胞に変換する、β細胞成熟因子の能力は、本願明細書に開示されたアッセイを使用して評価され得る。他の都合の良いアッセイは、検出可能なマーカ、例えば、ルシフェラーゼをコードする核酸配列に操作可能に連結されたβ細胞マーカ結合部位を含むレポータ構築物の転写を活性化する能力を測定することを含む。1つのアッセイには、候補となるβ細胞成熟因子が、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞になるか、または、β細胞のマーカを発現しているか、または、本願明細書に開示された成熟β細胞の機能的特徴を示すかどうかを決定することを含む。β細胞マーカのこのような発現の決定は、任意の適切な方

法、例えば、免疫ブロットを使用して決定され得る。このようなアッセイは、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体をSC-β細胞に直接変換する作用剤の活性を特定または確認するのに、容易に採用され得る。

【0057】

本願明細書に記載された本発明の方法に基づいて生成された、*in vitro*において成熟したSC-β細胞（すなわち、膵臓β細胞）は、多くの利点、例えば、それらが、*in vitro*でのグルコース刺激インスリン分泌を行い、遺伝子発現及び超微細構造により、ヒト膵島β細胞に類似し、ヒトインスリンを分泌し、マウスに移植された際に高血糖を改善し、細胞療法（例えば、追加的及び／または機能性のβ細胞を必要とする対象への移植）用の新たなプラットフォーム、（例えば、インスリン産生／分泌、生存、脱分化等のための）薬剤スクリーニング、（例えば、正常なβ細胞と糖尿病のβ細胞との間の機能における差異を決定する）研究及び（例えば、膵島を復元する第1の細胞種としての前記SC-βを使用する）再生医学を提供することを説明している。

【0058】

定義

【0059】

便宜上、本明細書、実施例及び添付の特許請求の範囲において、本願明細書に使用される特定の用語を、ここにまとめる。特に断らない限り、本願明細書に使用される全ての技術的及び科学的用語は、この発明が属する当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有する。

【0060】

「分化した細胞」の用語は、その用語が本願明細書において規定される場合、その天然型において多能性でない、任意の初代細胞を意味する。すなわち、前記「分化した細胞」の用語は、細胞分化過程において、ほとんど特定化されていない細胞種の細胞（例えば、幹細胞、例えば、誘導多能性幹細胞）から得られた、より特定化された細胞種の細胞を意味する。理論に拘束されるものではないが、一連の正常な個体発生において、多能性幹細胞は、まず、膵臓細胞を形成可能な内胚葉細胞及び他の内胚葉細胞種に分化し得る。さらに、内胚葉細胞の分化は、膵臓経路をもたらす。この場合、約98%の前記細胞が、外分泌腺、小管またはマトリクス細胞になり、約2%が、内分泌細胞になる。初期の内分泌細胞は、膵島前駆体である。ついで、前記前駆体は、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンまたは膵臓ポリペプチドを分泌するインスリン産生細胞（例えば、機能性内分泌細胞）に、さらに分化し得る。内胚葉細胞は、内胚葉起源の他の細胞、例えば、肺、肝臓、腸、胸腺等にも分化し得る。

【0061】

本願明細書で使用する場合、「体細胞」の用語は、生殖系細胞とは対照的に、臓器の本体を形成する任意の細胞を意味する。哺乳類において、生殖系細胞（「生殖体」としても公知）は、受精中に融合して、受精卵と呼ばれる細胞を産生する精子と卵子である。前記受精卵から、哺乳類の胚全体に発達する。哺乳類の身体における全ての他の細胞種（精子及び卵子を除く、前記細胞から、（生殖母細胞）及び未分化の幹細胞が形成される。）は、体細胞である。内臓、皮膚、骨、血液及び結合組織は全て、体細胞から構成される。一部の実施形態では、前記体細胞は、「非胚性体細胞」である。前記非胚性体細胞は、胚に存在せず、胚から得られた、*in vitro*において、このような細胞の増殖を生じない体細胞を意味する。一部の実施形態では、前記体細胞は、「成体体細胞」である。前記成体体細胞は、胚以外の臓器または胎児に存在し、前記胚から得られるか、または、*in vitro*においてこのような細胞の増殖を生じる細胞を意味する。特に断らない限り、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のインスリン産生、グルコース応答性細胞への変換方法は、*in vivo*及び*in vitro*の両方で行われ得る（ここで、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が対象内に存在する場合には、*in vivo*が実用的である。培養中に維持されている単離された、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を使用する場合、*in*

v i t r o が実用的である。) 。

【0062】

本願明細書で使用する場合、「成体細胞」の用語は、胚性発達後の身体全体を通して見出される細胞を意味する。

【0063】

本願明細書で使用する場合、前記「内胚葉細胞」の用語は、非常に初期の胚における3つの主な生殖細胞層の1つに由来する細胞を意味する（他の2つの生殖細胞層は、中胚葉及び外胚葉である。）。内胚葉は、前記3層の最も内側である。内胚葉細胞は分化して、まず、胚性消化管を生じ、ついで、気道及び消化管（例えば、腸）の裏打ち、肝臓並びに膵臓を生じる。

10

【0064】

本願明細書で使用する場合、「内胚葉起源の細胞」の用語は、内胚葉細胞から発達または分化した、任意の細胞を意味する。例えば、内胚葉起源の細胞としては、肝臓、肺、膵臓、胸腺、消化管、胃及び甲状腺の細胞があげられる。理論に拘束されるものではないが、肝臓及び膵臓の前駆体（膵臓前駆体とも呼ばれる）は、内胚葉細胞から胚性前腸に発達する。その仕様後まもなく、肝臓及び膵臓の前駆体は、かなり異なった細胞機能及び再生能を速やかに取得する。これらの変化は、脊椎動物において非常に保存された、誘導シグナル及び遺伝子調節因子により引き出される。臓器の当該発達及び再生は、肝不全及びI型糖尿病の治療的処置において、肝細胞及び膵臓β細胞に対する強力な要求により刺激される。種々のモデル生物及びヒトにおける研究から、肝臓及び膵臓の細胞の分化を引き出し、種々の幹細胞種及び始原細胞種からの肝細胞及びβ細胞の分化を促進する方法のためのガイダンスを提供する、進化的に保存された誘導シグナル及び転写因子ネットワークが証明されている。

20

【0065】

本願明細書で使用する場合、「成体型内胚葉」の用語は、内胚葉細胞から分化した細胞を意味する。前記細胞は、S C - β 細胞（例えば、膵臓β細胞）に分化し得る。成体型内胚葉細胞は、マーカーであるS o x 1 7を発現している。成体型内胚葉細胞に固有の他のマーカーとしては、制限されず、M I X L 2、G A T A 4、H N F 3 b、G S C、F G F 1 7、V W F、C A L C R、F O X Q 1、C X C R 4、サーベラス、O T X 2、グースコイドタンパク質、C - K i t、C D 9 9、C M K O R 1及びC R I P 1があげられる。特に、本願明細書において、成体型内胚葉細胞は、S o x 1 7を発現しており、一部の実施形態では、S o x 1 7及びH N F 3 Bを発現しており、明らかなレベルのG A T A 4、S P A R C、A P FまたはD A Bを発現していない。成体型内胚葉細胞は、マーカーであるP d x 1について陽性ではない（例えば、それらは、P d x 1陰性である。）。成体型内胚葉細胞は、肝臓、肺、膵臓、胸腺、腸、胃及び甲状腺の細胞を含む細胞に分化する能力を有する。前記成体型内胚葉のS o x 1 7及び他のマーカーの発現は、当業者に公知の任意の方法、例えば、抗-S o x 1 7抗体を使用する免疫化学または定量R T - P C Rにより評価され得る。

30

【0066】

「膵臓内胚葉」の用語は、複数の膵臓の系統、例えば、膵臓β細胞に分化可能であるが、非膵臓の系統に分化する能力をもはや有さない、内胚葉起源の細胞を意味する。

40

【0067】

本願明細書で使用する場合、「原腸管細胞」または「腸管細胞」の用語は、内胚葉細胞から分化した細胞を意味する。前記細胞は、S C - β 細胞（例えば、膵臓β細胞）に分化し得る。原腸管細胞は、少なくとも1つの下記マーカー：H N F 1 - β、H N F 3 - βまたはH N F 4 - αを発現している。原腸管細胞は、肺、肝臓、膵臓、胃及び腸の細胞を含む細胞に分化する能力を有する。原腸管のH N F 1 - β及び他のマーカーの発現は、当業者に公知の任意の方法、例えば、抗-H N F 1 - β抗体を使用する免疫化学により評価され得る。

【0068】

50

「膵臓前駆体」、「膵臓内分泌前駆体」、「膵臓前駆体」または「膵臓内分泌前駆体」の用語は、本願明細書において互換的に使用され、膵臓内分泌細胞、膵臓外分泌細胞または膵臓管細胞を形成可能な、膵臓ホルモン発現細胞になり得る幹細胞を意味する。これらの細胞は、少なくとも1種類の膵臓細胞、例えば、インスリンを産生するベータ細胞；グルカゴンを産生するアルファ細胞；ソマトスタチンを産生するデルタ細胞（またはD細胞）及び／または、膵臓ポリペプチドを産生するF細胞への分化にゆだねられる。このような細胞は、少なくとも1つの下記マーカー：NGN3、NKX2.2、ニューロD、ISL-1、Pax4、Pax6またはARXを発現し得る。

【0069】

本願明細書で使用する場合、「Pdx1陽性膵臓前駆体」の用語は、SC-β細胞、例えば、膵臓β細胞に分化する能力を有する、膵臓内胚葉（PE）細胞である細胞を意味する。Pdx1陽性膵臓前駆体は、マーカーであるPdx1を発現している。他のマーカーとしては、制限されず、CdcplまたはPtf1aまたはHNF6またはNRx2.2があげられる。前記Pdx1の発現は、当業者に公知の任意の方法、例えば、抗-Pdx1抗体を使用する免疫化学または定量RT-PCRにより評価され得る。

10

【0070】

本願明細書で使用する場合、「pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓前駆体」の用語は、インスリン産生細胞、例えば、膵臓β細胞に分化する能力を有する、膵臓内胚葉（PE）細胞である細胞を意味する。pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓前駆体は、マーカーであるPdx1及びNKX6-1を発現している。他のマーカーとしては、制限されず、CdcplまたはPtf1aまたはHNF6またはNRx2.2があげられる。前記NKX6-1の発現は、当業者に公知の任意の方法、例えば、抗-NKX6-1抗体を使用する免疫化学または定量RT-PCRにより評価され得る。

20

【0071】

本願明細書で使用する場合、「Ng n 3陽性内分泌前駆体」の用語は、転写因子であるニューロゲニン-3（Ng n 3）を発現している、膵臓内分泌細胞の前駆体を意味する。始原細胞は、多能性幹細胞より分化されており、ごくわずかな細胞種に分化し得る。特に、Ng n 3陽性内分泌始原細胞は、5つの膵臓内分泌細胞種（α、β、δ、ε及びPP）に分化する能力を有する。前記Ng n 3の発現は、当業者に公知の任意の方法、例えば、抗-Ng n 3抗体を使用する免疫化学または定量RT-PCRにより評価され得る。

30

【0072】

「ニューロD」及び「ニューロD1」の用語は、互換的に使用され、膵臓内分泌細胞において発現されるタンパク質及びそれをコードする遺伝子を特定する。

【0073】

「インスリン陽性β様細胞」及び「インスリン陽性内分泌細胞」の用語は、膵臓β細胞を示す少なくとも1つのマーカーを提示し、インスリンを発現しているが、内在性のβ細胞に固有のGSI S応答を欠く細胞（例えば、膵臓内分泌細胞）を意味する。

【0074】

インスリン陽性内分泌細胞に関する用語としての「その前駆体」は、前記前駆細胞を前記インスリン陽性内分泌細胞に分化させるのに適した条件下で培養された場合、インスリン陽性内分泌細胞、例えば、多能性幹細胞、成体型内胚葉細胞、原腸管細胞、膵臓始原細胞または内分泌始原細胞等に分化可能な任意の細胞を意味する。

40

【0075】

「幹細胞系β細胞」、「SC-β細胞」、「機能性β細胞」、「機能性膵臓β細胞」及び「成熟SC-β細胞」の用語は、膵臓β細胞を示す少なくとも1つのマーカー（例えば、PDx-1またはNKX6-1）提示し、インスリンを分泌し、内在性の成熟β細胞に固有のGSI S応答を提示する細胞（例えば、膵臓β細胞）を意味する。一部の実施形態では、前記「SC-β細胞」は、成熟膵臓β細胞を含む。開始点としての任意の細胞（本発明がこの方法に限定されることを意図しない場合、例えば、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、始原細胞、部分的に再プログラムされた体細胞（例えば、誘導多能性幹細胞と前記

50

体細胞との間の中間状態に部分的に再プログラムされた体細胞及びそれが得られる体細胞)、多能性細胞、全能細胞、前述の細胞のいずれかの分化転換版等を使用し得る。)を使用して、本開示の方法が任意のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から、SC-β細胞を得られる場合には、前記SC-β細胞は、(例えば、直接的に)幹細胞に由来する必要がないことを理解されたい。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、複数回のグルコースチャレンジ(例えば、少なくとも1回、少なくとも2回または少なくとも3回以上の連続的なグルコースチャレンジ)に対する応答を示す。一部の実施形態では、前記応答は、複数回のグルコースチャレンジに対する内在性の膵島(例えば、ヒト膵島)の応答に類似する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞の形態は、内在性のβ細胞の形態に類似する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性のβ細胞のGSIIS応答に類似する、*in vitro*でのGSIIS応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性のβ細胞のGSIIS応答に類似する、*in vivo*でのGSIIS応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性のβ細胞のGSIIS応答に類似する、*in vitro*及び*in vivo*の両方でのGSIIS応答を示す。前記SC-β細胞のGSIIS応答は、前記SC-β細胞を宿主(例えば、ヒトまたは動物)に移植した2週間以内に観察され得る。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、分泌性顆粒内にインスリンをパッケージする。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、封入結晶インスリン顆粒を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、2より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、サイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞からのインスリン分泌は、公知の抗糖尿病剤(例えば、分泌促進物質)に対する応答において亢進する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、モノホルモン性である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、他のホルモン、例えば、グルカゴン、ソマトスタチンまたは膵臓ポリペプチドを異常に共発現していない。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、低速の複製を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、グルコースに対する応答において、細胞内Ca²⁺を増大させる。本願明細書で使用する場合、「外分泌細胞」の用語は、外分泌腺、すなわち、管を介してその分泌を排出する腺の細胞を意味する。特定の実施形態では、外分泌細胞は、膵臓外分泌細胞を意味する。前記膵臓外分泌細胞は、小腸内に分泌される酵素を産生する膵臓細胞である。これらの酵素は、食物が消化管を通過する際に、食物を消化するのに役立つ。膵臓外分泌細胞は、ランゲルハンス膵島としても公知である。前記膵島は、2つのホルモンである、インスリン及びグルカゴンを分泌する。膵臓外分泌細胞は、複数の細胞種:(ホルモンであるグルカゴンを産生する)アルファ-2細胞;または(ホルモンであるインスリンを産生する)β細胞;及び(調節剤であるソマトスタチンを産生する)アルファ-1細胞の1つであり得る。本願明細書で使用する場合、非インスリン産生外分泌細胞は、アルファ-2細胞またはアルファ-1細胞を意味する。前記膵臓外分泌細胞の用語は、血流内に分泌されるホルモン(例えば、β細胞から産生される)インスリン、(アルファ-2細胞により産生される)グルカゴン、(デルタ細胞により産生される)ソマトスタチン及び(F細胞により産生される)膵臓ポリペプチド)を産生する膵臓細胞を意味する、「膵臓内分泌細胞」を包含することに留意されたい。

【0076】

本願明細書で使用する場合、「インスリン産生細胞」の用語は、膵臓前駆体またはその前駆体から分化した細胞を意味する。前記細胞は、インスリンを分泌する。インスリン産生細胞は、その用語が本願明細書において記載された場合、膵臓β細胞及び、構成的または誘導性的方法において、インスリンを合成し(すなわち、インスリン遺伝子を転写し、プロインスリンmRNAを翻訳し、前記プロインスリンmRNAをインスリンタンパク質に修飾し)、発現させ(すなわち、前記インスリン遺伝子により運ばれる形質を現し)、または、分泌する(細胞外空間にインスリンを放出する)膵臓β様細胞(すなわち、インスリン陽性内分泌細胞)を含む。例えば、本発明の方法に基づいて、インスリン陽性内分泌

10

20

30

40

50

泌細胞またはその前駆体をSC-β細胞に分化させることにより産生された前記インスリン産生細胞の集合は、内在性のβ細胞に固有の膵臓β細胞またはβ様細胞（例えば、少なくとも1つまたは少なくとも2つ少なくとも2つを有する細胞）であり、内在性の成体β細胞に類似するGSIIS応答を示す。本組成物及び方法の新規性は、自然にインスリンを産生する集合における細胞（例えば、β細胞）の存在により否定されない。例えば、本願明細書に開示された方法により産生されたインスリン産生細胞の集合が、成熟膵臓β細胞またはSC-β細胞を含み得ること、及び、非インスリン産生細胞（すなわち、それらがインスリンを産生または分泌しないことを除いて、β細胞様表現型の細胞）も含み得ることも考慮される。

【0077】

10

本願明細書で使用する場合、「内在性のβ細胞」、「内在性の成熟膵臓β細胞」または「内在性の膵臓β細胞」の用語は、膵臓のインスリン産生細胞または膵臓β細胞（β細胞）表現型の細胞を意味する。前記膵臓β細胞の表現型は、当業者に周知であり、例えば、グルコースレベルの上昇に対する応答におけるインスリン分泌、c-ペプチド、Pdx1ポリペプチド及びGlut2等のマーカーの発現並びに区別できる形態学的特徴、例えば、*in vivo*での膵臓における膵島への組織化を含み、典型的には、直径約9-15 μmの小型スピンドル様細胞を有する。

【0078】

本願明細書で使用する場合、「SC-β細胞」、「膵臓β様細胞」及び「成熟膵臓β様」の用語は、内在性の膵臓β細胞により発現されるインスリン量の少なくとも15%、または、内在性膵臓β細胞により分泌されるインスリン量の少なくとも約20%または少なくとも約30%または少なくとも約40%または少なくとも約50%または少なくとも約60%または少なくとも約70%または少なくとも約80%または少なくとも約90%または少なくとも約100%または100%より多く、例えば、少なくとも約1.5倍または少なくとも約2倍または少なくとも約2.5倍または少なくとも約3倍または少なくとも約4倍または少なくとも約5倍または約5倍より多く発現するか、あるいは、内在性の膵臓β細胞の少なくとも1つまたは少なくとも2つの特徴、例えば、制限されず、グルコースに対する応答におけるインスリン分泌並びにβ細胞マーカー、例えば、c-ペプチド、Pdx1及びglut-2の発現を示す、本願明細書に記載された方法により産生された細胞を意味する。一実施形態では、前記SC-β細胞は、不死化細胞（すなわち、培養において無限に増殖する）ではない。一実施形態では、前記SC-β細胞は、形質転換細胞、例えば、形質転換特性、例えば、ソフトアガーでの増殖または接触阻害が存在しないことを示す細胞ではない。

20

30

【0079】

「β細胞マーカー」の用語は、制限されず、タンパク質、ペプチド、核酸、タンパク質及び核酸の多形、スプライス変異体、タンパク質または核酸のフラグメント、エレメント並びに、膵臓β細胞に特異的に発現されるか、または、存在する他の検体を意味する。典型的なβ細胞マーカーとしては、制限されず、膵臓及び十二指腸ホメオボックス1（Pdx1）ポリペプチド、インスリン、c-ペプチド、アミリン、E-カドヘリン、Hnf3β、PC1/3、B2、Nkx2.2、NKX6-1、GLUT2、PC2、ZnT-8、Isl1、Pax6、Pax4、ニューロD、Hnf1b、Hnf-6、Hnf-3ベータ及びMafA並びに、Zhang et al., *Diabetes*, 50(10):2231-6 (2001)に記載されたものがあげられる。一部の実施形態では、前記β細胞マーカーは、核3-細胞マーカーである。一部の実施形態では、前記β細胞マーカーは、Pdx1またはPH3である。

40

【0080】

「膵臓内分泌マーカー」の用語は、制限されず、タンパク質、ペプチド、核酸、タンパク質及び核酸の多形、スプライス変異体、タンパク質または核酸のフラグメント、エレメント並びに、膵臓内分泌細胞に特異的に発現されるか、または、存在する他の検体を意味する。典型的な膵臓内分泌細胞マーカーとしては、制限されず、Ng2、ニューロD

50

及び I s l e t - 1 があげられる。

【0081】

本願明細書で使用する場合、「非インスリン産生細胞」の用語は、構成的にまたは誘導により、インスリンを本質的に合成、発現または分泌しない、内胚葉起源の任意の細胞を意味する。このため、本願明細書で使用する場合、前記「非インスリン産生細胞」の用語は、膵臓β細胞を除外する。本発明の方法に使用され得る非インスリン産生細胞の例としては、膵臓非β細胞、例えば、アミラーゼ産生細胞、腺房細胞、管状腺ガン細胞株の細胞（例えば、CD18、CD11及びCapan-I細胞（Busik et al., 1997; Schaffert et al. 1997を参照のこと。））があげられる。内胚葉起源の非膵臓細胞、例えば、非膵臓幹細胞及び他の内分泌及び外分泌臓器の細胞、例えば、肝臓細胞、胸腺細胞、甲状腺細胞、腸細胞、肺細胞及び脳下垂体細胞等も使用され得る。一部の実施形態では、非インスリン産生内胚葉細胞は、哺乳類細胞、またはさらにより具体的に、ヒト細胞であり得る。哺乳類の膵臓非膵島、膵臓アミラーゼ産生細胞、膵臓腺房細胞を使用する本方法の例は、本願明細書において提供される。

10

【0082】

「表現型」の用語は、実際の遺伝子型に関わらず、特定の設定の環境条件及び要因下において、細胞または生物を規定する、1つまたは数多くの総合的な生物学的特徴を意味する。

【0083】

本願明細書で使用する場合、「多能性」の用語は、種々の条件下において、2つ以上の分化した細胞種に分化する、好ましくは、3つ全ての生殖細胞層に固有の細胞種に分化する能力を有する細胞を意味する。多能性細胞は、第一に、例えば、ヌードマウステラトーマ形成アッセイを使用して、2つ以上の細胞種、好ましくは、3つ全ての胚葉に分化する、その能力により特徴付けられる。多能性は、胚性幹（ES）細胞マーカーの発現によっても証明されるが、多能性についての好ましい試験は、3つの胚葉のいずれかの細胞に分化する能力の説明である。単にこのような細胞をクラスタリングすること自体は、それらが多能性であるとは表現しないことに、留意されるべきである。再プログラムされた多能性細胞（例えば、本願明細書においてその用語が定義されている、iPS細胞）は、初代の親細胞に対する増殖能を失うことなく、長期にわたる継代能の特徴も有する。前記親細胞は、一般的に、培養において制限された回数でのみの分割能を有する。

20

30

【0084】

本願明細書で使用する場合、「iPS細胞」及び「誘導多能性幹細胞」の用語は、互換的に使用され、非多能性細胞、典型的には、成体体細胞から、例えば、1つ以上の遺伝子の強制的な発現を誘導することにより、（例えば、誘導され、または、完全な回復により）人工的に得られた多能性幹細胞を意味する。

【0085】

「始原（progenitor）」細胞または「前駆体（precursor）」細胞の用語は、本願明細書において互換的に使用され、分化により生じ得る細胞に対して、より原始的な（すなわち、完全に分化した細胞より、発生経路または発達に沿った初期段階にある）細胞表現型を有する細胞を意味する。多くの場合、始原細胞も、顕著または非常に高い増殖能を有する。始原細胞は、発達経路及び細胞が発達及び分化する環境に応じて、複数の区別できる分化した細胞種または1つの分化した細胞種を生じ得る。

40

【0086】

本願明細書で使用する場合、「幹細胞」の用語は、増殖可能であり、分化した娘細胞または分化可能な娘細胞を順番に生じ得る、数多くの母細胞を生成する能力を有する、より始原細胞を生じさせ得る、未分化の細胞を意味する。前記娘細胞自体は誘導されて増殖し、1つ以上の成熟細胞種に連続的に分化する子孫を産生し得るが、親の発達能を有する1つ以上の細胞を維持することもできる。前記「幹細胞」の用語は、特定の環境下において、より特定化または分化した表現型に分化する能力または可能性を有し、特定の環境下において、実質的に分化することなく増殖する能力を維持する前駆体の部分集合を意味する

50

。一実施形態では、前記幹細胞の用語は、一般的には、胚性細胞及び組織の進行性多様性において生じる際に、多くの場合、子孫（子孫）が、分化により、例えば、完全に個々の特長を獲得することにより、種々の方向に特定化する、天然由来の母細胞を意味する。細胞分化は、多くの細胞分割を介して典型的に生じる、複雑なプロセスである。分化した細胞は、それ自体が多能性細胞等から得られる多能性細胞から得られる。これらの多能性細胞はいずれも、幹細胞であると考えられる場合があるが、細胞種の範囲はそれぞれ、かなりの変化を生じ得る。一部の分化した細胞は、より高い発達能の細胞を生じる能力も有する。このような能力は、天然由来でもよいし、または、種々の因子による処理に基づいて人工的に誘導されてもよい。多くの生物学的事例において、幹細胞も、「多能性」である。それらが、2つ以上の区別できる細胞種の子孫を産生し得るためである。ただし、この細胞種は、「幹細胞性」を必要としない。自己複製は、幹細胞の定義における他の分類の部分であり、この文書において使用される場合、必須である。理論的には、自己複製は、2つの主要な機構のいずれかにより生じ得る。幹細胞は、幹細胞の状態を維持している1つの娘と、いくつかの区別できる他の特異的機能及び表現型を現す他の娘とを伴って、非対称に分割し得る。あるいは、集合における一部の幹細胞は、2つの幹細胞に対称的に分割するため、全体として前記集合の一部の幹細胞を維持し得る。一方、前記集合における他の細胞は、分化した子孫のみを生じる。形式的には、幹細胞として開始する細胞が、分化した表現型に向かって進行するが、その場合、当業者に「脱分化」または「再プログラミング」または「レトロ分化」と多くの場合呼ばれる用語である、幹細胞の表現型に戻る、及び、同表現型を再表現する可能性ある。本願明細書で使用する場合、「多能性幹細胞」の用語は、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、胎盤幹細胞等を含む。

10

20

【0087】

細胞の個体発生について、形容詞としての「分化した」または「分化している」は、「分化した細胞」が、比較した細胞より、発達経路をさらに下がって進行している細胞であることを意味する相対的な用語である。このため、幹細胞は、系統制限前駆体細胞（例えば、中胚葉幹細胞）に分化し得る。次に、前記前駆体細胞は、前記経路をさらに下った、他の種類の前駆体細胞（例えば、心筋細胞前駆体）、ついで、最終段階の分化した細胞に分化し得る。前記最終段階の分化した細胞は、特定組織種において、特徴的な役割を果たし、更なる増殖能を維持している場合もあるし、または、同能力を維持していない場合もある。

30

【0088】

「胚性幹細胞」の用語は、胚盤胞の内部細胞集団における多能性幹細胞を意味するのに使用される（米国特許第5,843,780号、同第6,200,806号明細書を参照のこと。）。このような細胞は、体細胞核移植から得られる胚盤胞の内部細胞集合から同様に得ることができる（例えば、米国特許第5,945,577号、同第5,994,619号、同第6,235,970号明細書を参照のこと。）。胚性幹細胞を区別する特徴は、胚性幹細胞の表現型を規定する。したがって、胚性幹細胞の1つ以上の固有の特長を有する場合、細胞は、胚性幹細胞の表現型を有する。これにより、その細胞は、他の細胞とは区別され得る。典型的な区別できる胚性幹細胞の特長としては、制限されず、遺伝子発現プロファイル、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件に対する応答性等があげられる。

40

【0089】

「成体幹細胞」または「ASC」の用語は、非胚性組織、例えば、胎児、若年及び成体組織から得られた、任意の多能性幹細胞を意味するのに使用される。幹細胞は、広い各種の成体組織、例えば、血液、骨、骨髓、脳、嗅上皮、皮膚、脾臓、骨格筋及び心筋から単離される。これらの幹細胞はそれぞれ、遺伝子発現、要因応答性及び培養における形態に基づいて特徴付けられ得る。典型的な成体幹細胞としては、神経幹細胞、神経冠幹細胞、中胚葉幹細胞、造血幹細胞及び脾臓幹細胞があげられる。上記されたように、幹細胞は、実質的に全ての組織に存在することが見出されてきた。したがって、本発明は、幹細胞集合が実質的に任意の動物組織から単離され得ることを理解する。

50

【0090】

「膵臓」の用語は、消化酵素及びホルモンを分泌する腺器官を意味する。ヒトでは、膵臓は、長さ約7インチ（17.8cm）及び幅1.5インチ（3.8cm）の黄色がかった臓器である。膵臓は、胃の下にあり、胃の下端（幽門）から肛門開口に延びる消化管の筋肉のホース様部分である小腸に連結されている。ほとんどの膵臓組織は、肝臓からの胆汁と共に、総管を通して十二指腸に流れる、透明な流体（膵液）を産生する細胞のブドウに似たクラスターからなる。胆汁には、腸内酵素と共に、タンパク質、炭水化物及び脂肪それぞれの消化を完了させる、3つの消化酵素：トリプターゼ、アミラーゼ及びリパーゼが含まれる。膵臓の前記酵素産生細胞の中でも分散しているものが、内分泌細胞の小さな群であり、ランゲルハンス膵島と呼ばれ、2つのホルモンであるインスリン及びグルカゴン
10

膵臓の膵島は、複数種の細胞：ホルモンであるグルカゴンを産生するアルファ α 2細胞；ホルモンであるインスリンを産生する β 細胞（本願明細書において、「膵臓 β 細胞」とも呼ばれる）；及び、調節剤であるソマトスタチンを産生するアルファ α 1細胞を含む。これらのホルモンは、血流に直接分泌され、それらは互いに、血中のグルコースレベルを調節する。インスリンは、血糖レベルを低下させ、肝臓におけるグリコーゲン（保存型炭水化物）の量を増大させる。グルカゴンは、反対の作用を有する。正常に機能するインスリン分泌細胞の機能不全は、糖尿病（diabetes）または糖尿病（diabetes mellitus）をもたらす。

【0091】

本願明細書で使用する場合、「再プログラミング」の用語は、体細胞の分化状態に変えるまたは戻すプロセスを意味する。前記細胞は、前記再プログラミング前に、部分的または最終的のいずれかに分化されていることができる。再プログラミングは、体細胞の分化状態の多能性細胞への完全な復帰を包含する。分化のこのような完全な復帰により、誘導多能性（iPS）細胞が産生される。本願明細書で使用する場合、再プログラミングは、細胞の分化状態の部分的な復帰、例えば、多能性状態への復帰または、多能性もしくは多分化能のいずれでもないが、分化した細胞の1つ以上の特異的特徴を失っており、それから、例えば、異なる体細胞種への分化した細胞の直接的な再プログラミングを生じる細胞である体細胞への復帰を包含する。再プログラミングは、一般的には、核酸修飾（例えば、メチル化）、クロマチン凝集、後天的変化、ゲノム刷り込み等の少なくとも一部の遺伝性パターンの変換、例えば、復帰を含む。前記変換は、接合体が成体に発生する細胞分化
20

中に生じるものである。

【0092】

本願明細書で使用する場合、「作用剤」の用語は、任意の化合物または物質、例えば、制限されず、小分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬剤、イオン等を意味する。「作用剤」は、任意の化学物質、実体または部分、例えば、制限されず、合成及び天然由来のタンパク質性及び非タンパク質性の実体であり得る。一部の実施形態では、作用剤は、核酸、核酸類似物、タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマー、核酸のオリゴマー、アミノ酸または炭水化物、例えば、制限されず、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リボタンパク質、アプタマー並びにそれらの修飾及び組合せである。特定の実施形態では、作用剤は、化学部分を有する小分子である
40

。例えば、化学部分は、置換または非置換のアルキル、芳香族またはヘテロシクリル部分、例えば、マクロライド、レプトマイシン及び関連する天然物またはその類似体を含む。化合物は、所望の活性及び／または特性を有することが公知であることができ、または、種々の化合物のライブラリから選択されることができる。

【0093】

本願明細書で使用する場合、「接触させること」（すなわち、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、 β 細胞成熟因子または β 細胞成熟因子の組合せと接触させること）の用語は、前記 β 細胞成熟因子と細胞とを共に、in vitroにおいてインキュベートすること（例えば、培養中に前記 β 細胞成熟因子を細胞に添加すること）を含むことを意図する。一部の実施形態では、前記「接触させること」の用語は、
50

対象において本質的に起こり得る本願明細書に開示された化合物への細胞の *in vivo* における暴露（すなわち、自然な生理学的プロセスの結果として起こり得る暴露）を含むことを意図しない。SC-β細胞の産生に関連する実施形態におけるように、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、β細胞成熟因子と接触させる工程は、任意の適切な方法において行われ得る。例えば、前記細胞は、接着培養または懸濁培養において処理され得る。一部の実施形態では、前記細胞は、細胞クラスター形成を促進する条件で処理される。本開示は、細胞クラスター形成を促進する任意の条件を考慮する。細胞クラスター形成を促進する条件の例としては、制限されず、低付着組織培養プレート、スピナーフラスコ、aggrewellプレートにおける懸濁培養があげられる。一部の実施形態では、本発明者らは、クラスターが10% 血清を含む培地において安定なままであることを観察した。一部の実施形態では、前記クラスター形成を促進する条件は、低血清培地を含む。

10

【0094】

β細胞成熟因子と接触した前記細胞を、別の作用剤、例えば、成長因子もしくは他の分化剤または、前記細胞を安定化する、もしくは、前記細胞をさらに分化させる環境とも、同時または連続的に接触させ得ることが理解される。

【0095】

同様に、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、少なくとも1つのβ細胞成熟因子と接触させ、ついで、少なくとも別のβ細胞成熟因子と接触させ得る。一部の実施形態では、前記細胞を、少なくとも1つのβ細胞成熟因子と接触させ、前記接触が時間的に空けられる。一部の実施形態では、細胞を、少なくとも1つのβ細胞成熟因子と実質的に同時に接触させる。一部の実施形態では、前記細胞を、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個のβ細胞成熟因子と接触させる。

20

【0096】

本願明細書において「細胞培養培地」と呼ばれる（本願明細書において、「培養培地」または「培地」とも呼ばれる）用語は、細胞の生存性を維持し、増殖を支持する栄養を含む、細胞を培養するための培地である。前記細胞培養培地は、適切な組合せにおいて、下記のもの：塩、バッファー、アミノ酸、グルコースまたは他の糖、抗生物質、血清または血清代替品及び他の成分、例えば、ペプチド成長因子等のいずれかを含み得る。特定の細胞種に通常使用される細胞培養培地は、当業者に公知である。

30

【0097】

「細胞株」の用語は、1つの祖先細胞または祖先細胞の、規定され及び／もしくは実質的に同一の集合から典型的に得られた、主にまたは実質的に同一の細胞の集合を意味する。前記細胞株は、長期にわたる期間（例えば、数ヶ月、数年、無期限）、培養において維持されているか、または、同維持を可能であり得る。前記細胞は、前記細胞の無期限の培養寿命を付与する形質転換の同時または誘導法を受けてもよい。なお、細胞株は、当該分野において認識されるそれら全ての細胞株を含む。細胞は、変異及びあるいは後天的変化を経時的に取得することが理解されるであろう。これにより、細胞株の個々の細胞の少なくとも一部の特性は、互いに異なる場合がある。一部の実施形態では、細胞株は、本願明細書に記載されたSC-β細胞を含む。

40

【0098】

「外来性」の用語は、その天然ソース以外の細胞または生物に存在する物質を意味する。例えば、「外来性核酸」または「外来性タンパク質」の用語は、生物系、例えば、細胞または生物内に人の手による方法により導入された、核酸またはタンパク質を意味する。同核酸またはタンパク質は、前記生物系には、通常見出されないか、または、より少量が見出される。物質が細胞内、または、前記物質を受け継ぐ前記細胞の祖先に導入される場合、物質は、外来性であると考えられるであろう。対照的に、「内在性」の用語は、生物系に本来備わっている物質を意味する。

【0099】

50

「発現」の用語は、RNA及びタンパク質を産生すること、必要に応じて、タンパク質を分泌すること、例えば、該当する場合、制限されず、転写、翻訳、フォールディング、修飾及びプロセッシングを含む、細胞プロセスを意味する。「発現産物」としては、遺伝子から転写されたRNA及び遺伝子から転写されたmRNAの翻訳により得られたポリペプチドがあげられる。

【0100】

本願明細書で使用する場合、「遺伝子組み換えされた」または「遺伝子操作された」細胞の用語は、外来性核酸がヒトの手による方法により導入されている細胞（または、前記核酸の少なくとも一部を受け継いでいる、このような細胞の子孫）を意味する。前記核酸は、例えば、前記細胞に対して外来性である配列を含んでもよい。前記核酸は、生来の配列（すなわち、前記細胞に本来見られる配列）であるが、非天然由来の配置（例えば、異なる遺伝子からのプロモータに連結されたコード領域）または生来の配列の変形型等を含んでもよい。前記核酸の前記細胞への輸送方法は、任意の適切な技術により達成され得る。適切な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション及びウイルスベクターを使用する形質導入または感染があげられる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはその部分は、前記細胞のゲノム内に組み込まれる。前記核酸は、前記ゲノムからその後除去され、または、切除され得る。ただし、このような除去または切除は、修飾されていないが、その他の方法で同等の細胞に対して、前記細胞における検出可能な変化をもたらすという条件である。遺伝子組換えされた、の用語は、直接細胞内への修飾RNA（例えば、合成の修飾RNA）の導入を含むことを意図する。このような合成の修飾RNAは、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる急速な分解を防止する修飾、及び、前記RNAに対する細胞本来の免疫またはインターフェロン応答を防止または低減させる修飾を含む。修飾としては、制限されず、例えば、（a）末端修飾、例えば、5'端修飾（リン酸化、脱リン酸化、接合、逆位結合等）、3'端修飾（接合、DNAヌクレオチド、逆位結合等）、（b）塩基修飾、例えば、修飾塩基、安定化塩基、不安定化塩基もしくは塩基対がパートナーの伸長レパートリを有する塩基もしくはコンジュゲート塩基による置換、（c）糖修飾（例えば、2'位または4'位）または糖の置換、並びに、（d）ヌクレオシド間リンケージ修飾、例えば、ホスホジエステル結合の修飾もしくは置換があげられる。このような修飾が翻訳と干渉する（すなわち、前記修飾を欠くのにに対して翻訳の50%以上の低下例えば、ウサギ網状赤血球における*in vitro*翻訳アッセイ）限りにおいて、前記修飾は、本願明細書に記載された方法及び組成物に適切でない。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、ニューロゲニン3を発現するように遺伝子組み換えされる。一部の実施形態では、前記SC-β細胞の遺伝子組換えは、ニューロゲニン3をコードする合成の修飾mRNAを導入することを含む。ニューロゲニン3をコードする合成の修飾RNAによるSC-β細胞の遺伝子組換えは、前記細胞からのインスリン産生を増大させると考えられる。任意のインスリン産生細胞のこのような遺伝子組換えは、その細胞における遺伝子産生を増大させると期待されると予測される。

【0101】

一部の態様では、本開示は、インスリンの遺伝子座において、検出可能なマーカーを含むように遺伝子組み換えされたSC-β細胞を提供する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、検出可能なマーカーにより、前記インスリンの遺伝子座の両対立遺伝子を置換するように修飾される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、前記検出可能なマーカーを前記インスリンの遺伝子座内に挿入するように遺伝子組み換えされる。これにより、前記検出可能なマーカーは、グルコースチャレンジに対する応答において、前記SC-β細胞中でインスリンと共に発現される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、インスリンに代えて、前記インスリンの遺伝子座内に前記検出可能なマーカーを挿入するように遺伝子組み換えされる。これにより、前記検出可能なマーカーは、グルコースチャレンジに対する応答において、前記SC-β細胞中でインスリンに代えて発現される。任意の検出可能なマーカー、例えば、蛍光タンパク質（例えば、GFP）をコードする核酸

等が、前記インスリンの遺伝子座内に挿入され得ることが考慮される。このような遺伝子組み換えされたSC-β細胞が、例えば、作用剤に対する応答において、前記検出可能なマーカーについてアッセイすることにより、インスリン発現及び／またはβ細胞からの分泌を刺激する作用剤を特定する、種々のスクリーニング法に使用され得ることを、当業者であれば理解するであろう。例えば、（例えば、GFPにより）両対立遺伝子においてインスリン遺伝子を置換するように遺伝子組み換えされたSC-β細胞を、試験剤及び、GFPの発現がβ細胞におけるインスリン遺伝子発現を活性化する可能性がある候補剤であると考えられるため、前記SC-β細胞を蛍光させるそれらの作用剤と接触させ得る。すなわち、前記検出可能なマーカーは、このような遺伝子組み換えされたSC-β細胞におけるインスリン発現用の代用マーカーとして使用され得る。

10

【0102】

本願明細書で使用する場合、「同一性」の用語は、2つ以上の核酸またはポリヌクレオチドの配列が同じである程度を意味する。所望の配列と第2の配列との間の評価ウィンドウにわたる、例えば、所望の配列長にわたるパーセント同一性は、前記配列を整列させ、ギャップの導入により同一性を最大化させる同一残基を対向させる前記評価ウィンドウ内の残基（ヌクレオチドまたはアミノ酸）数を決定し、前記ウィンドウ内にある前記所望の配列または前記第2の配列（より長い方）の残基総数で割り、100を掛けることにより算出され得る。特定のパーセント同一性を達成するのに必要とされる同一残基の数を算出する際に、少数は、最も近い整数に四捨五入される。パーセント同一性は、当該分野において公知の各種のコンピュータプログラムを使用して算出され得る。例えば、コンピュータプログラム、例えば、BLAST2、BLASTN、BLASTP、ギャップBLASTにより、アライメントが生成され、所望の配列間のパーセント同一性が提供される。Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993において改良された、Karlin and Altschulのアルゴリズム（Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-2268, 1990）が、Altschul et al. (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)のNBLAST及びXBLASTのプログラムに組み込まれている。比較目的でギャップアライメントを得るために、ギャップBLASTが、Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)に記載されたように使用される。BLAST及びギャップBLASTのプログラムを使用する場合、前記各プログラムのデフォルトパラメータが使用されてもよい。PAM250またはBLOSUM62マトリクスが使用されてもよい。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）から公衆に利用可能である。これらのプログラムについては、「ncbi.nlm.nih.gov」のURLワールド・ワイド・ウェブアドレスを有するウェブサイトを参照のこと。具体的な実施形態では、パーセント同一性は、NCBIにより提供されたデフォルトパラメータによるBLAST2を使用して算出される。

20

30

【0103】

40

本願明細書で使用する場合、「単離された」または「部分的に精製された」の用語は、核酸またはポリヌクレオチドの場合において、その天然ソースにおいて見出された場合、前記核酸またはポリヌクレオチドと共に存在する、及び／または、分泌されたポリペプチドの場合、細胞により発現または分泌された際、前記核酸またはポリヌクレオチドと共に存在するであろう、少なくとも1つの他の成分（例えば、核酸またはポリヌクレオチド）から分離された核酸またはポリヌクレオチドを意味する。化学的に合成された核酸もしくはポリヌクレオチド、または、in vitro転写／翻訳を使用して合成されたものは、「単離されている」と考えられる。

【0104】

本願明細書で使用する場合、「単離された細胞」の用語は、それが本来見出される生物

50

から取り出されている細胞またはこのような細胞の子孫を意味する。場合により、前記細胞は、例えば、他の細胞の存在下において、*in vitro*で培養されている。場合により、前記細胞は、その後、第2の生物内に導入されるか、または、それ（または、それに由来する細胞）が単離された生物内に再導入される。

【0105】

本願明細書で使用する場合、細胞の単離された集合に関する「単離された集合」の用語は、細胞の混合または異種集合から取り出され、分離されている細胞集合を意味する。一部の実施形態では、単離された集合は、前記細胞が単離または濃縮される異種集合と比較して、実質的に純粋な細胞集合である。

【0106】

特定の細胞集合に関する「実質的に純粋」の用語は、総細胞集合を構成する細胞に関して、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、及び最も好ましくは、少なくとも約95%純粋な細胞集合を意味する。すなわち、SC-β細胞の集合に関して、「実質的に純粋」または「本質的に精製された」の用語は、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定されたSC-β細胞でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、SC-β細胞の増殖した集合が、SC-β細胞の実質的に純粋な集合である、SC-β細胞の集合の増殖方法を包含する。

【0107】

同様に、インスリン陽性内分泌細胞の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定されたインスリン陽性内分泌細胞でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、インスリン陽性内分泌細胞の増殖した集合が、インスリン陽性内分泌細胞の実質的に純粋な集合である、インスリン陽性内分泌細胞の集合の増殖方法を包含する。

【0108】

同様に、Ng n 3陽性内分泌前駆体の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定されたNg n 3陽性内分泌前駆体またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、Ng n 3陽性内分泌前駆体の増殖した集合が、Ng n 3陽性内分泌前駆体の実質的に純粋な集合である、Ng n 3陽性内分泌前駆体の集合の増殖方法を包含する。

【0109】

同様に、P d x 1陽性、NK X 6-1陽性の膵臓前駆体の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定されたP d x 1陽性、NK X 6-1陽性の膵臓前駆体またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、P d x 1陽性、NK X 6-1陽性の膵臓前駆体の増殖した集合が、P d x 1陽性、NK X 6-1陽性の膵臓前駆体の実質的に純粋な集合である、P d x 1陽性、NK X 6-1陽性の膵臓前駆体の集合の増殖方法を包含する。

【0110】

同様に、P d x 1陽性膵臓前駆体の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定されたP d x 1陽性膵臓前駆体またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、P d x 1陽性膵臓前駆体の増殖した集合

が、P d x 1 陽性膵臓前駆体の実質的に純粋な集合である、P d x 1 陽性膵臓前駆体の集合の増殖方法を包含する。

【0111】

同様に、原腸管細胞の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定された原腸管細胞またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、原腸管細胞の増殖した集合が、原腸管細胞の実質的に純粋な集合である、原腸管細胞の集合の増殖方法を包含する。

【0112】

同様に、成体型内胚葉細胞の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定された成体型内胚葉細胞またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、成体型内胚葉細胞の増殖した集合が、成体型内胚葉細胞の実質的に純粋な集合である、成体型内胚葉細胞の集合の増殖方法を包含する。

【0113】

同様に、多能性細胞の「実質的に純粋」または「本質的に精製された」集合に関して、約20%以下、より好ましくは約15%、10%、8%、7%以下、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%以下または1%未満の、本願明細書において前記用語により規定された多能性細胞またはその子孫でない細胞を含む細胞集合を意味する。一部の実施形態では、本発明は、多能性細胞の増殖した集合が、多能性細胞の実質的に純粋な集合である、多能性細胞の集合の増殖方法を包含する。

【0114】

「濃縮すること」または「濃縮された」の用語は、本願明細書において互換的に使用され、1種類の細胞の収率（割合）が、開始時の培養物または調製物におけるその種の細胞の割合を、少なくとも10%上回って増加していることを意味する。

【0115】

「複製」もしくは「自己複製」または「増殖」の用語は、本願明細書において互換的に使用され、長期間及び／または何ヶ月から何年にもわたって、同じ非特定化細胞種に分割することにより、自身を複製する幹細胞の能力を意味するのに使用される。一部の例では、増殖は、1つの細胞の2つの同一の娘細胞への繰り返しの分割による細胞の増殖を意味する。

【0116】

本願明細書で使用する場合、「系統」の用語は、共通する祖先を有する細胞または共通する発達運命を有する細胞を説明する。例えば、内胚葉起源のものまたは「内胚葉系統」である細胞について、これは、前記細胞が、内胚葉細胞から得られ、内胚葉系統の制限された経路、例えば、成体型内胚葉細胞を生じ、次に、前記成体型内胚葉細胞が、肝臓細胞、胸腺、膵臓、肺及び消化管に分化し得る、1つ以上の発達系統経路に沿って分化し得ることを意味する。

【0117】

本願明細書で使用する場合、「異種」の用語は、異なる種から得られた細胞を意味する。

【0118】

本願明細書で使用する場合、「マーカー」は、細胞の特徴及び／または表現型を説明するのに使用される。マーカーは、所望の特徴を含む細胞の選択に使用され得る。マーカーは、具体的な細胞に伴って変化するのであろう。特定の細胞種の細胞の形態学的、機能的または生化学的（酵素的）特徴または前記細胞種により発現される分子に関わらず、マーカーは固有である。好ましくは、このようなマーカーは、タンパク質であり、より好ましくは、抗体または当該分野において利用可能な他の結合分子についてのエピトープを有する

10

20

30

40

50

。ただし、マーカーは、細胞に見出される任意の分子、例えば、制限されず、タンパク質（ペプチド及びポリペプチド）、脂質、多糖類、核酸及びステロイドからなる場合がある。形態学的特徴または特性の例としては、制限されず、形状、サイズ及び核／細胞質比があげられる。機能的特徴または特性の例としては、制限されず、特定の基材への付着能、特定の染料の包含または排出能、特定の条件下での遊走能及び特定の系統に沿った分化能があげられる。マーカーは、当業者に利用可能な任意の方法により検出されてもよい。マーカーは、形態学的特徴が存在しなくてもよいし、または、タンパク質、脂質等が存在しなくてもよい。マーカーは、ポリペプチド及び他の形態学的特徴の有無の固有の特徴のパネルの組合せであり得る。

【0119】

10

「調整する」の用語は、当該分野におけるその使用と矛盾なく使用される、すなわち、所望のプロセス、経路または現象における定性的もしくは定量的変化、変更または修飾を生じさせるか、または、容易にすることを意味する。このような変化は、制限されず、種々の成分の相対強度もしくは活性における増大、減少もしくは変化、または、プロセス、経路もしくは現象の分岐であり得る。「調整物質」は、所望のプロセス、経路または現象における定性的もしくは定量的変化、変更または修飾を生じさせるか、または、容易にする作用剤である。

【0120】

本願明細書で使用する場合、「DNA」の用語は、デオキシリボ核酸として規定される。

20

【0121】

「ポリヌクレオチド」の用語は、本願明細書において、ヌクレオシドのポリマーを示す「核酸」と互換的に使用される。典型的には、この発明のポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により連結された、DNAまたはRNA（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン及びデオキシシチジン）において天然に見出されるヌクレオシドから構成される。ただし、前記用語は、天然由来の核酸において見出されるか否かに関わらず、化学的または生物学的に修飾された塩基、修飾骨格等を含むヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体を含む分子を包含する。このような分子は、特定の用途に好ましい場合がある。この出願において、ポリヌクレオチドに言及される場合、DNA、RNAの両方並びに一本鎖及び二本鎖状（及び、各一本鎖分子の相補鎖）の両方のいずれかのケースで提供されることが理解される。本願明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド材料自体及び／または特定の核酸を生化学的に特徴付ける配列情報（すなわち、塩基についての略称として使用される文字の連続）を意味し得る。本願明細書において表現されたポリヌクレオチド配列は、特に断らない限り、5'から3'の方向に表現される。

30

【0122】

本願明細書で使用する場合、「ポリペプチド」の用語は、アミノ酸のポリマーを意味する。「タンパク質」及び「ポリペプチド」の用語は、本願明細書において互換的に使用される。ペプチドは、比較的短いポリペプチドであり、典型的には、長さが約2個と60個の間のアミノ酸である。本願明細書において典型的に使用されるポリペプチドは、タンパク質に最も一般的に見出されるアミノ酸、例えば、20個のL-アミノ酸を含む。ただし、当該分野において公知の他のアミノ酸及び／またはアミノ酸類似体を使用され得る。ポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸は、例えば、化学的実体、例えば、炭水化物基、リン酸基、脂肪酸基、コンジュゲート用のリンカーの付加、官能化等により修飾されてもよい。それに共有的または非共有的に会合した非ポリペプチド部分を有するポリペプチドであっても、「ポリペプチド」と考えられる。典型的な修飾としては、グリコシル化及びパルミトイル化があげられる。ポリペプチドは、天然ソースから精製され、組換えDNA技術により産生され、化学的手段、例えば、従来の固相ペプチド合成等により合成されてもよい。本願明細書で使用する場合、「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」の用語は、ポリペプチド材料自体及び／またはポリペプチドを生化学的に特徴付ける配列情報（す

40

50

なわち、アミノ酸名についての略称として使用される文字または3文字コードの連続)を意味し得る。本願明細書において表現されたポリペプチド配列は、特に断らない限り、N-末端からC-末端方向に表現される。

【0123】

ポリペプチドへの言及における「変異体」の用語は、例えば、全長ポリペプチドに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%同一なポリペプチドであり得る。前記変異体は、全長ポリペプチドのフラグメントであり得る。前記変異体は、天然由来のスプライス変異体であり得る。前記変異体は、前記ポリペプチドのフラグメントに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%同一なポリペプチドであり得る。この場合、野生型の全長ポリヌクレオチドまたは所望の活性、例えば、SC-β細胞またはSC-β細胞が得られるインスリン陽性内分泌細胞もしくはその前駆体の存在を検出する能力を有するそのドメインである限り、前記フラグメントは、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%または99%である。一部の実施形態では、前記ドメインは、配列中の任意のアミノ酸位置で開始し、C-末端に向かって伸びる、長さが少なくとも100、200、300または400個のアミノ酸である。タンパク質の活性を除去または実質的に低下させる当該分野において公知の変異は、避けるのが好ましい。一部の実施形態では、前記変異体は、全長ポリペプチドのN-及び/またはC-末端部分を欠いている。例えば、いずれかの末端から10、20または50個までのアミノ酸が欠けている。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、成熟(全長)ポリペプチドの配列を有する。前記成熟ポリペプチドは、1つ以上の部分、例えば、正常な細胞内タンパク質分解処理中(例えば、同時翻訳処理または翻訳後処理中)に除去されるシグナルペプチドを有しているポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、前記タンパク質がそれを天然に発現する細胞からそれを精製すること以外で産生される場合、前記タンパク質は、キメラポリペプチドである。前記キメラポリペプチドは、2つ以上の異なる種由来の部分を含むことを意味する。一部の実施形態では、前記タンパク質がそれを天然に発現する細胞からそれを精製すること以外で産生される場合、前記タンパク質は、誘導体である。前記誘導体は、前記タンパク質が、それらの配列がタンパク質の生物学的活性を実質的に低下させない限り、前記タンパク質に関連しない更なる配列を含むことを意味する。

【0124】

本願明細書で使用する場合、「機能性フラグメント」の用語は、フラグメントである前記ポリペプチドよりサイズが小さいが、フラグメントである前記ポリペプチドと実質的に一致するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。この場合、前記機能性フラグメントのポリペプチド配列は、フラグメントである前記ポリペプチドとしての、少なくとも約50%または60%または70%または80%または90%または100%または100%より高い、例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍より高い、有効生物学的作用にある。機能性フラグメントのポリペプチドは、低下した抗原性、(転写因子におけるとしての)増大したDNA結合性または(RNAの安定性または分解を調節するのにおけるとしての)変化したRNA結合性を含み得る、更なる機能を有してもよい。

【0125】

「ベクター」の用語は、DNA配列が宿主細胞内への導入用に挿入され得る、キャリアDNA分子を意味する。好ましいベクターは、それらに結合した核酸の自律複製及び/または発現を可能なものである。それらに操作可能に結合した遺伝子の発現を管理可能なベクターは、本願明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。このため、「発現ベクター」は、宿主細胞中において所望の遺伝子の発現に必要とされる必須調節領域を含む専用ベクターである。一部の実施形態では、前記所望の遺伝子は、前記ベクター中の別の配列に操作可能に結合している。ベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターが使用されるであろう。前記ウイルスベクターは、複製欠損であることが好ましい。前記複製欠損は、例えば、複製用にコードする全てのウイルス核酸を除去することにより達成され得る。複製欠損ウイルスベクターは、その感染特性も保

持し、アデノウイルスベクターを複製するのと類似する方法で細胞に入るであろう。ただし、一旦前記細胞に入ると、複製欠損ウイルスベクターは、再生または増殖しない。ベクターは、リポソーム及びナノ粒子並びにDNA分子を細胞に輸送する他の手段も包含する。

【0126】

「操作可能に結合している」の用語は、コード配列の発現を達成するために、コード配列の発現に必須の調節配列が、前記コード配列に対する適切な位置において、DNA分子中に配置されることを意味する。この同じ定義は、発現ベクターにおけるコード配列及び転写制御エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサ及び末端エレメント）の配置に適用される場合がある。前記「操作可能に結合している」の用語は、発現されるべきポリヌクレオチド配列の前に、適切な開始シグナル（例えば、ATG）を有し、正確な読み枠を維持して、発現制御配列の制御下において前記ポリヌクレオチド配列の発現及び前記ポリヌクレオチド配列によりコードされた所望のポリペプチドの産生を可能にすることを含む。

10

【0127】

「ウイルスベクター」の用語は、細胞内への核酸構築物のキャリアとしての、ウイルスベクターまたはウイルス関連ベクターの使用を意味する。構築物は、非複製欠損のウイルスゲノム様アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）または単純ヘルペスウイルス（HSV）等、例えば、細胞への感染または形質導入用のレトロウイルス及びレンチウイルスベクターに組み込まれ、パッケージされ得る。前記ベクターは、細胞ゲノム内に組み込まれてもよいし、または、組み込まれなくてもよい。前記構築物は、必要に応じて、トランスフェクション用のウイルス配列を含んでもよい。あるいは、前記構築物は、エピソーム複製可能なベクター、例えば、EPV及びEBVベクター内に組み込まれてもよい。

20

【0128】

「調節配列」及び「プロモータ」の用語は、本願明細書において互換的に使用され、それらに操作可能に結合しているタンパク質コード配列の転写を誘導または制御する核酸配列、例えば、開始シグナル、エンハンサ及びプロモータを意味する。一部の例では、組換え遺伝子の転写は、発現が意図されている細胞種における前記組換え遺伝子の発現を制御する、プロモータ配列（または、他の転写調節配列）の制御下にある。前記組換え遺伝子は、天然由来の形態のタンパク質の転写を制御する、それらの配列と同じかまたは異なる転写調節配列の制御下にあり得る。一部の例では、前記プロモータ配列は、細胞の合成機構により認識され、または、合成機構に導入され、特定の遺伝子の転写を開始するのに必要とされる。

30

【0129】

本願明細書で使用する場合、「転写因子」の用語は、DNA結合ドメインを使用して、DNAの特定部位に結合し、DNAからRNAへの遺伝情報の移送（または転写）を制御する系の一部であるタンパク質を意味する。本願明細書で使用する場合、「増殖すること」及び「増殖」は、細胞分割による集合における細胞数の増加（増殖）を意味する。細胞増殖は、一般的には、環境、例えば、成長因子及び他の分裂促進物質への応答における、複数のシグナル形質移入経路の協調的な活性化を生じさせると理解される。細胞増殖は、細胞増殖を阻止するか、または、負に影響を及ぼす、細胞内または細胞外のシグナル及び機構の作用からの開放によっても促進される場合がある。

40

【0130】

「選択マーカー」の用語は、発現された場合、選択性の表現型、例えば、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤に対する耐性（例えば、抗生物質耐性）、栄養原栄養性または、特定のタンパク質を発現している細胞と発現していない細胞とを区別する基礎として使用され得る特定タンパク質の発現を細胞に付与する、遺伝子、RNAまたはタンパク質を意味する。発現が容易に検出され得るタンパク質、例えば、蛍光もしくは発光タンパク質または基質と作用して、発色、蛍光もしくは発光物質を産生する酵素（「検出可能なマーカー」）が、選択マーカーの部分集合を構成する。多能性細胞に選択的または排他的に通常発現

50

される遺伝子に本来備わっている発現制御エレメントに結合している選択マーカーの存在は、多能性状態に再プログラムされている体細胞を特定及び選択するのを可能にする。各種の選択マーカー遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子（neo）、ピューロマイシン耐性遺伝子（puro）、グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、アデノシンジアミナーゼ（ada）、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ（PAC）、ヒグロマイシン耐性遺伝子（hyg）、多剤耐性遺伝子（mdr）、チミジンキナーゼ（TK）、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T）及びhis D遺伝子を使用され得る。検出可能なマーカーとしては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、ブルー、サファイア、イエロー、レッド、オレンジ及びシアン蛍光タンパク質並びにこれらのいずれかの変異体があげられる。発光タンパク質、例えば、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルまたはウミシイタケのルシフェラーゼ）も有用である。当業者に証明されるであろうように、本願明細書で使用する場合、前記「選択マーカー」の用語は、遺伝子または前記遺伝子の発現産物、例えば、コードされたタンパク質を意味し得る。

10

【0131】

一部の実施形態では、前記選択マーカーは、それを発現していないか、または、著しく低いレベルでそれを発現している細胞に対して、それを発現している細胞において、増殖及び／または生存の優位性を付与する。このような増殖及び／または生存の優位性は、前記細胞が特定の条件、すなわち、「選択条件」下に維持される場合に、典型的に生じる。効果的な選択を確保するために、細胞集合は、前記マーカーを発現していない細胞が増殖しない、及び／もしくは、生存しない、並びに、前記集合から除去される、または、その数が前記集合の非常に少ない割合のみに減少するような、条件下及び十分な期間維持され得る。前記マーカーを発現しない細胞をほとんどまたは完全に除去するための選択条件下において細胞集合を維持することにより、増殖及び／または生存の優位性を付与するマーカーを発現している細胞の選択方法は、本願明細書において、「ポジティブ選択」と呼ばれる。前記マーカーは、「ポジティブ選択に有用」と言われる。ネガティブ選択及びネガティブ選択に有用なマーカーも、本願明細書に記載された特定の方法の対象である。このようなマーカーの発現は、前記マーカーを発現していないか、または、著しく低いレベルでそれを発現している（または、考えられる別の方法、前記マーカーを発現していない細胞は、前記マーカーを発現している細胞に対して、増殖及び／または生存の優位性を有する。）細胞に対して、前記マーカーを発現している細胞において、増殖及び／または生存の不利益を付与する。したがって、前記マーカーを発現している細胞は、十分な期間選択条件に維持された場合、細胞集合からほとんどまたは完全に除去される。

20

30

【0132】

本願明細書で使用する場合、「レポータ遺伝子」は、細胞内に遺伝的に導入され、前記幹細胞の表現型に追加する任意の遺伝子を包含する。この発明に開示されたレポータ遺伝子は、蛍光、発光、酵素的及び耐性遺伝子を包含し、当業者により容易に検出され得る他の遺伝子も包含することを意図する。本発明の一部の実施形態では、レポータ遺伝子は、特定の幹細胞、心血管幹細胞及びその分化した子孫の特定用マーカーとして使用される。レポータ遺伝子は、前記レポータ遺伝子の発現を測定することによりモニターされる1つ以上の条件に応じた方法で、その発現を調節する配列に遺伝的に操作可能に結合している。一部の場合には、前記レポータ遺伝子の発現は、生きた細胞において測定されてもよい。生きた細胞でのレポータ遺伝子アッセイが使用される場合、レポータ遺伝子発現は、複数の時点、例えば、2、3、4、5、6、8または10回以上の時点でモニターされ得る。一部の場合には、生きた細胞でのレポータアッセイが使用される場合、レポータ遺伝子の発現は、少なくとも約10分から約24時間、例えば、20分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間、18時間の頻度、または、約10分から約24時間の間の任意の整数からの別の頻度でモニターされる。

40

【0133】

50

「対象」及び「個体」の用語は、本願明細書において、互換的に使用され、細胞が取得され得る、及び／または、本願明細書に記載された細胞による処置、例えば、予防的処置が提供される、動物、例えば、ヒトを意味する。特定の動物、例えば、ヒトの対象に特異的なそれらの感染、症状または疾患状態の処置について、前記対象の用語は、その特定の動物を意味する。本願明細書において互換的に使用される「非ヒト動物」及び「非ヒト哺乳類」としては、哺乳類、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ及び非ヒト霊長類があげられる。前記「対象」の用語は、任意の脊椎動物、例えば、制限されず、哺乳類、爬虫類、両生類及び魚類も包含する。ただし、有利に、前記対象は、哺乳類、例えば、ヒトまたは他の哺乳類、例えば、飼育哺乳類、例えば、イヌ、ネコ、ウマ等または生産哺乳類、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ等である。

10

【0134】

「糖尿病」及び「糖尿病」の用語は、本願明細書において、互換的に使用される。世界保健機関は、糖尿病について、絶食時の血漿グルコース濃度 7.0 mmol/L (126 mg/dL) (全血 6.1 mmol/L または 110 mg/dL) 以上、または、2時間グルコースレベル 11.1 mmol/L 以上 (200 mg/dL 以上) の診断値を定義している。糖尿病を示唆するまたは糖尿病の高いリスクを示す他の値としては、上昇した動脈圧 $140/90 \text{ mmHg}$ 以上；上昇した血漿トリグリセリド (1.7 mmol/L ; 150 mg/dL) 及び／もしくは低HDL-コレステロール (男性について 0.9 mmol/L 、 35 mg/dL 未満；女性について 1.0 mmol/L 、 39 mg/dL 未満)；中心性肥満 (男性：腹囲尻囲比 0.90 超；女性：腹囲尻囲比 0.85 超) 並びに／または肥満度指数 30 kg/m^2 超；微量アルブミン尿 (この場合、尿アルブミン排出速度 $20 \mu\text{g/分}$ 以上、または、アルブミン：クレアチニン比 30 mg/g 以上) があげられる。前記糖尿病の用語は、全ての型の糖尿病、例えば、I型、II型及び1.5型を包含する。

20

【0135】

単離された細胞に適用される場合、「処置する」、「処置すること」、「処置」等の用語は、任意の種類のプロセスもしくは条件に前記細胞を供すること、または、任意の種類の層さもしくは手法を前記細胞に行うことを含む。対象に適用される場合、前記用語は、個体に対する医療的または外科的手当、ケアまたは管理を提供することを意味する。前記個体は、通常、病気であるか、もしくは、怪我をしているか、または、集団の平均的なメンバーに対して病気になるリスクが高く、このような手当、ケアまたは管理を必要とする。

30

【0136】

本願明細書で使用する場合、前記「処置すること」及び「処置」の用語は、対象が疾患の少なくとも1つの兆候の減少または前記疾患の改善、例えば、有益または所望の臨床的結果を得られるように、有効量の組成物を対象に投与することを意味する。この発明の目的で、有益または所望の臨床的結果としては、制限されず、検出可能であるか否かに関わらず、1つ以上の兆候の改善、疾患の程度の減弱、疾患の安定した (すなわち、悪化しない) 状態、疾患進行の遅延もしくは鈍化、前記疾患状態の改善もしくは緩和並びに軽減 (部分的または総合的を問わず) があげられる。処置することは、処置を受けない場合に予測される生存と比較して、延長した生存を意味し得る。このため、処置が、前記疾患症状を改善し得るが、前記疾患について完全に治癒しない場合があることを、当業者は理解する。本願明細書で使用する場合、前記「処置」の用語は、予防を含む。あるいは、処置は、前記疾患の進行が低下される、または、停止する場合、「有効」である。「処置」は、処置を受けない場合に予測される生存と比較して、延長した生存も意味し得る。処置を必要とする者としては、心臓症状を有すると既に診断された者、並びに、遺伝的感受性または他の要因、例えば、体重、食事及び健康によりおそらく心臓症状に発展する可能性がある者があげられる。

40

【0137】

本願明細書で使用する場合、「投与すること」、「導入すること」及び「移植すること

50

」の用語は、所望の部位に導入された細胞の少なくとも部分的な局在もたらす方法または経路により、本発明の細胞（例えば、SC-β細胞）の対象への配置について、互換的に使用される。前記細胞、例えば、SC-β細胞（例えば、膵臓β細胞または膵臓β様細胞）は、膵臓に直接埋め込まれることができ、あるいは、前記対象における所望の位置への送達をもたらす任意の適切な経路により投与されることができる。この場合、少なくとも一部の埋め込まれた細胞または前記細胞の成分は、生きてままである。対象への投与後の前記細胞の生存期間は、数時間、例えば、24時間の短さから数日または数年の長さであり得る。一部の例では、前記細胞は、非膵臓部位、例えば、肝臓に投与されることもでき、または、例えば、埋め込まれた細胞を埋込み位置に維持し、前記埋め込まれた細胞の移動を防止するカプセル（例えば、マイクロカプセル）において皮下にも投与されることができる。

10

【0138】

本願明細書で使用する場合、「非経口投与」及び「非経口的に投与された」の表現は、経腸及び局所投与以外の、通常注射による投与方式を意味し、制限されず、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、心室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、脊椎内、胸骨内の注射及び注入があげられる。本願明細書で使用する場合、「全身性投与」、「全身に投与された」、「末梢投与」及び「末梢投与された」の表現は、心血管幹細胞及び／もしくはその子孫並びに／または化合物及び／もしくは他の材料の、中枢神経系内に直接以外の投与を意味する。したがって、それは、動物の臓器に入るため、代謝等のプロセスの対象であり、例えば、皮下投与である。

20

【0139】

「組織」の用語は、特定の専門の機能を共に行う、特定化した細胞のグループまたは層を意味する。「組織特異的」の用語は、特定の組織に由来する細胞ソースを意味する。

【0140】

「減少する」、「低下した」、「低下」、「減少」または「阻害する」の用語は全て、本願明細書において、統計学的に有意な量での減少を意味するのに一般的に使用される。ただし、疑義が生じるのを避けるために、「低下した」、「低下」、「減少する」または「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%までの減少、例えば、少なくとも約20%または少なくとも約30%または少なくとも約40%または少なくとも約50%または少なくとも約60%または少なくとも約70%または少なくとも約80%または少なくとも約90%までの減少、または、100%以下及び100%を含む減少（すなわち、参照サンプルと比較した不存在レベル）、または、参照レベルと比較して10-100%の間の任意の減少を意味する。

30

【0141】

「増大した」、「増大する」もしくは「向上する」または「活性化する」の用語は全て、本願明細書において、統計学的に有意な量での増大を意味するのに一般的に使用される。何等かの疑義が生じるのを避けるために、前記「増大した」、「増大する」もしくは「向上する」または「活性化する」の用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増大、例えば、少なくとも約20%または少なくとも約30%または少なくとも約40%または少なくとも約50%または少なくとも約60%または少なくとも約70%または少なくとも約80%または少なくとも約90%の増大、または、100%以下及び100%を含む増大、または、参照レベルと比較して10-100%の間の任意の増大、または、少なくとも約2倍または少なくとも約3倍または少なくとも約4倍または少なくとも約5倍または少なくとも約10倍の増大、または、参照レベルと比較して2倍と10倍との間の任意の増大を意味する。

40

【0142】

「統計学的に有意」または「有意に」の用語は、統計学的有意性を意味し、一般的には、正常を下回るまたはより低い濃度の前記マーカーの2つの標準偏差（2SD）を意味する。前記用語は、差異が存在することの統計的証拠を意味する。前記用語は、帰無仮説が

50

実際に真である場合、帰無仮説を拒絶する決定を行う確率として定義される。前記決定は、多くの場合、p 値を使用してなされる。

【0143】

本願明細書で使用する場合、「含むこと」または「含む」の用語は、本発明に必須の組成物、方法及びその各成分への言及に使用されるが、必須であるかどうかに関わらず、特定されていない構成要素の内包に開かれている。

【0144】

本願明細書で使用する場合、「本質的になる」の用語は、所定の実施形態に必要とされるそれらの構成要素を意味する。前記用語は、本発明のその実施形態の基本的及び新規または機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない、更なる構成要素の存在を容認する。

10

【0145】

「からなる」の用語は、本願明細書に記載された組成物、方法及びその各成分を意味し、実施形態のその説明に列挙されていない任意の構成要素に対して排他的である。

【0146】

この明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形の「a」、「an」及び「the」は、他の方法で明確に規定しない限り、複数の指示対象を含む。このため、例えば、「方法(the method)」への言及は、1つ以上の方法及び／または本願明細書に記載された種類の工程を含み、このことは、この開示等を読むことに基づいて、当業者に明らかとなるであろう。

【0147】

20

幹細胞

【0148】

幹細胞は、有糸細胞分裂により自身を再生する能力を保持し、種々の範囲の特定化した細胞種に分化し得る細胞である。2つの広い種類の哺乳類幹細胞は、胚盤胞に見出される胚性幹(ES)細胞及び成体組織に見出される成体幹細胞である。発生中の胚において、幹細胞は、全ての特定化した胚性組織に分化し得る。成体の生物では、幹細胞及び始原細胞は、身体の修復系として役割を果たし、特定化した細胞を補充し、再生臓器、例えば、血液、皮膚または消化管組織の正常なターンオーバーを維持する。多能性幹細胞は、3つの胚葉のいずれかから得られた細胞に分化し得る。

【0149】

30

特定の実施形態が、SC-β細胞(例えば、成熟膵臓β細胞またはβ様細胞)またはその前駆体を産生するための幹細胞の使用に言及して、以下に記載されているが、生殖系細胞が、本願明細書に記載された例示となるプロトコルに類似するプロトコルを使用して、少なくとも1つのSC-β細胞を提供するために、前記幹細胞に代えて、または、前記幹細胞と共に使用されてもよい。適切な生殖系細胞は、例えば、最後の月経期後の約8-11週で採取されたヒト胎児材料に存在する原生殖系細胞から調製され得る。例示となる生殖系細胞の調製法は、例えば、Shamblo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998及び米国特許第6,090,622号明細書に記載されている。

【0150】

40

ES細胞、例えば、事実上無限の複製能及びほとんどの細胞種に分化する可能性を有するヒト胚性幹細胞(hESC)またはマウス胚性幹細胞(mESC)は、原理的には、臨床治療用の分化した細胞を生成する、無限の開始材料を提供する(<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report.htm>, 2006)。ES細胞の1つの可能性のある用途は、まず、例えば、hESCから内胚葉、例えば、成体型内胚葉を産生し、ついでさらに、前記成体型内胚葉を少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に分化させ、ついでさらに、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体をSC-β細胞に分化させることにより、I型糖尿病の細胞置換療法用の新たな膵臓β細胞を生成することである。

50

【0151】

hESCは、例えば、Cowan et al. (N Engl. J. Med. 350:1353, 2004) 及び Thomson et al. (Science 282:1145, 1998) に記載され、他の霊長類由来の胚性幹細胞である、アカゲザルの幹細胞 (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995)、マーモセットの幹細胞 (Thomson et al., Biol. Reprod. 55:254, 1996) 及びヒト胚性生殖系 (hEG) 細胞 (Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998) も、本願明細書に記載された方法に使用され得る。mESCは、例えば、Tremml et al. (Curr Protoc Stem Cell Biol. Chapter 1:Unit 1C.4, 2008) に記載されている。前記幹細胞は、例えば、単分化能、全能性、多分化能、多能性であり得る。一部の例では、少なくとも1つの胚葉または3つ全ての胚葉から得られる子孫を産生可能な霊長類起源の任意の細胞が、本願明細書に開示された方法に使用され得る。

10

【0152】

特定の例では、ES細胞は、例えば、Cowan et al. (N Engl. J. Med. 350:1353, 2004) 及び米国特許第5,843,780号明細書並びに、Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995に記載されているように単離され得る。例えば、hESC細胞は、Thomson et al. (米国特許第6,200,806号明細書; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 及び、Reubinoff et al., Nature Biotech. 18:399, 2000に記載された技術を使用して、ヒト胚盤胞細胞から調製され得る。hESCに同等の細胞種としては、その多能性誘導体、例えば、WO01/51610 (Bresagen) に概説された原外胚葉様 (EPL) 細胞等があげられる。hESCは、ヒト着床前胚からも得ることができる。あるいは、in vitro受精 (IVF) 胚が使用されることができ、または、1つの細胞のヒト胚は、胚盤胞段階に増殖されることができる (Bongso et al., Hum Reprod 4:706, 1989)。胚は、G1.2及びG2.2培地中で前記胚盤胞段階に培養される (Gardner et al., Fertil. Steril. 69:84, 1998)。透明帯は、プロナーゼ (Sigma) に対する簡易な暴露により、発生した胚盤胞から除去される。内部細胞集団は、免疫手術により単離され得る。前記免疫手術では、胚盤胞は、1:50希釈のウサギ抗-ヒト脾臓細胞抗血清に30分間曝され、ついで、DMEM中で3回、5分間洗浄され、1:5希釈のモルモット補体 (Gibco) に、3分間曝される (Solter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975)。さらに、DMEM中で2回洗浄した後、溶解した栄養外胚葉細胞は、穏やかなピペティングによりインタクトな内部細胞集団 (ICM) から除去される。前記ICMは、mEFフィーダ層上に播種される。9日から15日後、内部細胞集団由来の増殖は、1mM EDTAを含む、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対する暴露により、ディスパーゼまたはトリプシンに対する暴露により、または、マイクロピペットによる機械的分離のいずれかにより、塊に分離され、ついで、新たな培地中でmEF上に再度播種され得る。未分化の形態を有する増殖コロニーは、マイクロピペットにより個々に選択され、機械的に塊に分離され、再度播種され得る。ES様形態は、明らかに高い核/細胞質比及び顕著な核を有する、小型のコロニーとして特徴付けられる。ついで、得られたhESCは、1-2週間毎に、例えば、簡易なトリプシン化、ダルベッコPBS (2mM EDTA含有) への暴露、IV型コラゲナーゼ (約200 U/mL; Gibco) への暴露により、または、マイクロピペットによる個々のコロニーの選択により、ルーチンに分割される。一部の例では、約50個から100個の細胞の

20

30

40

50

塊サイズが最適である。mESC細胞は、例えば、Conner et al. (Curr. Prot. in Mol. Biol. Unit 23.4, 2003)に記載された技術を使用して調製され得る。

【0153】

胚性幹細胞は、霊長類種のメンバーの胚盤胞から単離され得る（米国特許第5,843,780号明細書；Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995）。ヒト胚性幹（hES）細胞は、Thomson et al（米国特許第6,200,806号明細書；Science 282:1145, 1998；Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998）及びReubinoff et al, Nature Biotech. 18:399, 2000に記載された技術を使用して、ヒト胚盤胞細胞から調製され得る。hES細胞に同等の細胞種としては、その多能性誘導体、例えば、WO01/51610（Bresagen）に概説された原外胚葉様（EPL）細胞等があげられる。

【0154】

あるいは、一部の実施形態では、hES細胞は、ヒト着床前胚から得ることができる。あるいは、in vitro受精（IVF）胚が使用されることができ、または、1つの細胞のヒト胚は、胚盤胞段階に増殖されることができ（Bongso et al., Hum Reprod 4:706, 1989）。胚は、G1.2及びG2.2培地中で前記胚盤胞段階に培養される（Gardner et al., Fertil. Steril. 69:84, 1998）。透明帯は、プロナーゼ（Sigma）に対する簡易な暴露により、発生した胚盤胞から除去される。内部細胞集団は、免疫手術により単離される。前記免疫手術では、胚盤胞は、1:50希釈のウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に30分間曝され、ついで、DMEM中で3回、5分間洗浄され、1:5希釈のモット補体（Gibco）に、3分間曝される（Solter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975）。さらに、DMEM中で2回洗浄した後、溶解した栄養外胚葉細胞は、穏やかなピペッティングによりインタクトな内部細胞集団（ICM）から除去される。前記ICMは、mEFフィーダ層上に播種される。

【0155】

9日から15日後、内部細胞集団由来の増殖は、1mM EDTAを含む、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対する暴露により、ディスパーゼまたはトリプシンに対する暴露により、または、マイクロピペットによる機械的分離のいずれかにより、塊に分離され、ついで、新たな培地中でmEF上に再度播種される。未分化の形態を有する増殖コロニーは、マイクロピペットにより個々に選択され、機械的に塊に分離され、再度播種される。ES様形態は、明らかに高い核／細胞比及び顕著な核を有する、小型のコロニーとして特徴付けられる。ついで、得られたES細胞は、1-2週間毎に、例えば、簡易なトリプシン化、ダルベッコPBS（2mM EDTA含有）への暴露、IV型コラゲナーゼ（約200U/mL；Gibco）への暴露により、または、マイクロピペットによる個々のコロニーの選択により、ルーチンに分割され得る。約50個から100個の細胞の塊サイズが最適である。

【0156】

一部の実施形態では、ヒト胚性生殖系（hEG）細胞は、本願明細書に開示された方法に使用されて、原内胚葉細胞に分化させ得る多能性幹細胞である。hEG細胞は、最後の月経期後の約8-11週で採取されたヒト胎児材料に存在する原生殖系細胞から調製して使用され得る。適切な調製法は、Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998及び米国特許第6,090,622号明細書に記載されている。同文献は、参照によりその全体が本願明細書により組み込まれる。

【0157】

簡潔に、生殖隆起を処理して、脱凝集した細胞を形成する。EG増殖培地は、DMEMであり、DMEMは、4500mg/L D-グルコース、2200mg/L mM NaHCO₃；15% ES級ウシ胎児血清(BRL)；2mM グルタミン(BRL)；1mM ピルビン酸ナトリウム(BRL)；1000-2000U/mL ヒト組換え白血病抑制因子(LIF、Genzyme)；1-2ng/mL ヒト組換えbFGF(Genzyme)；及び、10μM フォースコリン(10% DMSO中)を含む。LIF、bFGFまたはフォースコリンを含まない改良EG増殖培地中で3日間培養し、5000ラッドのγ-照射により不活性化した、フィーダ細胞(例えば、STO細胞、ATCC No. CRL1503)の部分コンフルエント層を含む96ウェル組織培養プレートを準備する。約0.2mLの原生殖系細胞(PGC)懸濁液を、各ウェルに添加する。最初の継代を、EG増殖培地中で7-10日後に行い、各ウェルを、照射されたSTOマウス繊維芽細胞で予め準備した24ウェル培養皿の1つのウェルに移す。前記細胞を、EG細胞と一致する細胞形態が観察されるまで、典型的には、7-30日または1-4回の継代まで、毎日培地を交換して培養する。

10

【0158】

特定の例では、前記幹細胞は、本願明細書に記載された方法に基づいて、少なくとも1つのβ細胞成熟因子に曝される前は、未分化であり得る(例えば、特定の系統にゆだねられていない細胞)。一方、他の例では、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子への暴露前に、前記幹細胞を1つ以上の中間細胞種に分化させるのが望ましい場合がある。例えば、前記幹細胞は、それらを胚または成体起源の分化した細胞と区別するのに使用され得る、未分化細胞の形態学的、生物学的または物理的特徴を示す場合がある。一部の例では、未分化細胞は、高い核/細胞質比及び顕著な核を有する細胞のコロニーにおける、二次元の顕微鏡視野において明らかである場合がある。前記幹細胞はそれ自体でもよく(例えば、任意の未分化細胞が実質的に存在しない)、または、分化した細胞の存在下で使用されてもよい。特定の例では、前記幹細胞は、前記幹細胞が増殖及び場合により分化するように、適切な栄養及び場合により他の細胞の存在下で培養されてもよい。例えば、胚性繊維芽細胞または繊維芽細胞様細胞が、前記幹細胞の増殖を支援するために、前記培養中に存在してもよい。前記繊維芽細胞は、幹細胞増殖の1つの段階中に存在してもよいが、全ての段階に必要なわけではない。例えば、前記繊維芽細胞は、初期の培養段階で幹細胞培養に添加され、1つ以上のその後の培養段階では、前記幹細胞に添加されなくてもよい。

20

30

【0159】

本発明の全ての態様に使用される幹細胞は、任意の種類組織(例えば、胚性組織、例えば、胎児もしくは前胎児組織または成体組織)から得られた任意の細胞であり得る。この場合、幹細胞は、種々の細胞種の子孫、例えば、3つの胚葉(内胚葉、中胚葉及び外胚葉)の少なくとも1つの全ての誘導体を産生する適切な条件下において可能となる特徴を有する。これらの細胞種は、確立された細胞株の形態で提供されてもよいし、または、それらは、初代胚性組織から直接得てもよく、分化に直ちに使用されてもよい。NIHのヒト胚性幹細胞レジストリに列記された細胞、例えば、hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03、hESBGN-04(BresaGen, Inc.)；HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6(ES Cell International)；Miz-hES1(MizMedi Hospital-Seoul National University)；HSF-1、HSF-6(University of California at San Francisco)；及びH1、H7、H9、H13、H14(Wisconsin Alumni Research Foundation(WiCell Research Institute))が含まれる。一部の実施形態では、成熟インスリン陽性細胞への化学的に誘導された分化に使用されるヒト幹細胞または多能性幹細胞のソースは、ヒト胚を破壊することを含まなかった。

40

【0160】

50

別の実施形態では、前記幹細胞は、組織、例えば、固体組織から単離され得る。一部の
実施形態では、前記組織は、皮膚、脂肪組織（例えば、脂肪組織）、筋肉組織、心臓また
は心臓組織である。他の実施形態では、前記組織は、例えば、制限されず、臍帯血、胎盤
、骨髄または軟骨である。

【0161】

所望の幹細胞としては、Thomson et al. (1998) Science
282:1145に記載されたヒト胚性幹(hES)細胞；他の霊長類由来の胚性幹細胞
、例えば、アカゲザルの幹細胞(Thomson et al. (1995) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 92:7844)、マーモセットの幹細胞(Thomson et al. (1996) Biol. Reprod. 55:2
54)；及びヒト胚性生殖系(hEG)細胞(Shambloft et al., P
roc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998
)により例示された、種々の種類の胚性細胞もあげられる。系統関連幹細胞、例えば、中
胚葉幹細胞及び他の初期心原性細胞も対象である(Reyes et al. (2001)
Blood 98:2615-2625; Eisenberg & Bader (19
96) Circ Res. 78(2):205-16等を参照のこと。)。前記幹細胞
は、任意の哺乳類種、例えば、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯類、例えば
、マウス、ラット、ハムスター、霊長類等から得られてもよい。一部の実施形態では、ヒ
ト胚は、本願明細書に開示された方法及び組成物に使用される多能性細胞のソースのため
に破壊されなかった。

【0162】

ES細胞は、それらが特定の分化系統にゆだねられていない時点では、未分化であると
考えられる。このような細胞は、それらを胚または成体起源の分化した細胞から区別する
形態学的特徴を提示する。未分化ES細胞は、当業者に容易に認識され、典型的には、明
らかに高い核／細胞質比及び顕著な核を有する細胞コロニーにおける、2次元の顕微鏡視
野において明らかである。未分化ES細胞は、未分化細胞の存在を検出するマーカーとし
て使用され得る遺伝子を発現している。そのポリペプチド産物は、ネガティブ選択用のマ
ーカーとして使用され得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0224411号明
細書；Bhattacharya (2004) Blood 103(8):2956-6
4；及び上記Thomson (1998)を参照のこと。それぞれは、参照により本願明
細書に組み込まれる。ヒトES細胞株は、未分化の非ヒト霊長類ES細胞及びステージ特
異的胚性抗原(SSEA)-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81及
びアルカリホスファターゼを含むヒトEC細胞を特徴付ける、細胞表面マーカーを発現し
ている。g l o b o シリーズ糖脂質GL7は、SSEA-4エピトープを有し、g l o b
o シリーズ糖脂質GbSにシアル酸を添加することにより形成される。前記g l o b o シ
リーズ糖脂質GbSは、SSEA-3エピトープを有する。このため、GL7は、SSEA
-3及びSSEA-4の両方に対する抗体と反応する。前記未分化ヒトES細胞株は、
SSEA-1で染色しないが、分化した細胞は、SSEA-Iで強力に染色される。hE
S細胞の未分化状態での増殖方法は、WO99/20741、WO01/51616及び
WO03/020920に記載されている。

【0163】

内皮、筋肉及び／または神経の幹細胞の適切なソースからの細胞の混合物は、哺乳類の
ドナーから当該分野において公知の方法により回収され得る。適切なソースは、造血微小
環境である。例えば、好ましくは、動態化した（すなわち、動員された）循環末梢血液が
、対象から取り出される。あるいは、骨髄が、自家移植を受けている哺乳類、例えば、ヒ
ト患者から取得されてもよい。一部の実施形態では、幹細胞は、例えば、米国特許第7,
390,484号及び同第7,429,488号明細書に開示された、Cyt o r i からの
CELUTION (商標) SYSTEMを使用して、対象の脂肪組織から取得され得る
。同特許は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

【0164】

一部の実施形態では、ヒト臍帯血細胞（HUCBC）が、本願明細書に開示された方法に有用である。ヒトUBC細胞は、造血系及び間葉系始原細胞の豊富なソースとして認識されている（Broxmeyer et al., 1992 Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 89:4109-4113）。以前は、臍帯血及び胎盤血は、小児の誕生時に通常廃棄される廃棄物と考えられていた。臍帯血細胞は、移植可能な幹細胞及び始原細胞のソースとして、及び、悪性疾患（すなわち、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群及び神経芽細胞腫）及び非悪性疾患、例えば、ファンコニー貧血及び再生不良性貧血の処置用の骨髄再構築性細胞のソースとして使用される（Kohli-Kumar et al., 1993 Br. J. Haematol. 85:419-422; Wagner et al., 1992 Blood 79:1874-1881; Lu et al., 1996 Crit. Rev. Oncol. Hematol 22:61-78; Lu et al., 1995 Cell Transplantation 4:493-503）。HUCBCの別の利点は、胎児細胞に非常に類似する、これらの細胞の未熟な免疫性である。前記未熟な免疫性は、宿主による拒絶に対するリスクを顕著に低下させている（Taylor & Bryson, 1985 J. Immunol. 134:1493-1497）。ヒト臍帯血は、組織培養において増殖され得る、中胚葉及び造血始原細胞並びに内皮細胞前駆体を含む（Broxmeyer et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4109-4113; Kohli-Kumar et al., 1993 Br. J. Haematol. 85:419-422; Wagner et al., 1992 Blood 79:1874-1881; Lu et al., 1996 Crit. Rev. Oncol. Hematol 22:61-78; Lu et al., 1995 Cell Transplantation 4:493-503; Taylor & Bryson, 1985 J. Immunol. 134:1493-1497; Broxmeyer, 1995 Transfusion 35:694-702; Chen et al., 2001 Stroke 32:2682-2688; Nieda et al., 1997 Br. J. Haematology 98:775-777; Erices et al., 2000 Br. J. Haematology 109:235-242）。臍帯血中の造血始原細胞の総量は、骨髄と同じか、または、上回る。さらに、非常に増殖性の造血細胞が、HUCBC中に骨髄より8倍多く、造血マーカー、例えば、CD14、CD34及びCD45を発現している（Sanchez-Ramos et al., 2001 Exp. Neur. 171:109-115; Bicknese et al., 2002 Cell Transplantation 11:261-264; Lu et al., 1993 J. Exp Med. 178:2089-2096）。

【0165】

別の実施形態では、多能性細胞は、造血微小環境、例えば、好ましくは、哺乳類の末梢血の単核画分からの循環末梢血、臍帯血、骨髄、胎児肝臓または卵黄囊における細胞である。前記幹細胞、特に、神経幹細胞は、中枢神経系、例えば、髄膜からも得ることができる。

【0166】

別の実施形態では、多能性細胞は、胚様体に存在する。前記胚様体は、簡易なプロテアーゼ消化によりES細胞を収集し、未分化のヒトESCの小さな塊が懸濁培養中で増殖するのを可能にすることにより形成される。分化は、順化培地の回収により誘導される。得られた胚様体は、半固体基材上に播種される。分化した細胞の形成は、約7日から約4週間後に観察される場合がある。幹細胞のin vitro培養からの生きた分化中の細胞は、部分的に分離した胚様体または細胞凝集を提供する類似する構造体により選択される。所望の細胞を含む凝集体は、前記凝集体における細胞接触に対して細胞を実質的に維持する方法を使用して、表現型の特性について選択される。

【0167】

別の実施形態では、前記幹細胞は、再プログラムされた幹細胞、例えば、体細胞または分化した細胞から得られた幹細胞であり得る。このような実施形態では、脱分化した幹細胞は、例えば、制限されず、新生細胞、腫瘍細胞及びガン細胞、あるいは、誘導再プログラム細胞、例えば、誘導多能性幹細胞またはiPS細胞であり得る。

【0168】

クローニング及び細胞培養

【0169】

本願明細書に記載された技術に使用され得る分子遺伝学及び遺伝子工学についての例示となる方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook et al., Cold Spring Harbor); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller & Calos eds.); 及び Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. eds., Wiley & Sons) の最新版に見出され得る。細胞生物学、タンパク質化学及び抗体技術は、例えば、Current Protocols in Protein Science (J. E. Colligan et al. eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology (J. S. Bonifacino et al., Wiley & Sons) 及び Current protocols in Immunology (J. E. Colligan et al. eds., Wiley & Sons.) に見出され得る。遺伝子操作の例示となる試薬、クローニングベクター及びキットは、例えば、BioRad、Stratagene、Invitrogen、ClonTech及びSigma-Aldrich Co. から市販されている場合がある。

【0170】

適切な細胞培養法は、例えば、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R. I. Freshney ed., Wiley & Sons); General Techniques of Cell Culture (M. A. Harrison & I. F. Rae, Cambridge Univ. Press) 及び Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (K. Turkse n ed., Humana Press) の最新版に一般的に記載されている細胞培養法に見出され得る。適切な組織培養サプライ及び試薬は、例えば、Gibco/BRL、Nalgene-Nunc International、Sigma Chemical Co. 及び ICN Biomedicals から市販されている。

【0171】

多能性幹細胞は、分化を促進することなく、増殖を促進する培養条件を使用して、当業者により培養中において連続的に増殖され得る。典型的な血清含有ES培地は、80% DMEM (例えば、Knock-Out DMEM、Gibco)、20% 所定の牛胎児血清 (FBS、Hyclone) または血清代替品 (WO 98/30679)、1% 非必須アミノ酸、1mM L-グルタミン及び0.1mM β-メルカプトエタノールで構成される。使用直前に、ヒトbFGFが、4ng/mLに添加される (WO 99/20741、Geron Corp.)。伝統的に、ES細胞は、フィーダ細胞、典型的には、胚性または胎児組織から得られた繊維芽細胞の層上で培養される。

【0172】

Geronの科学者は、多能性SCが、フィーダ細胞なしでも、未分化状態で維持され得ることを見出した。フィーダフリー培養のための環境としては、適切な細胞基材、特に、細胞外マトリクス、例えば、マトリゲル (登録商標) またはラミニンがあげられる。典型的には、酵素消化により、細胞が完全に分散される前に停止させる (例えば、コラゲナ

10

20

30

40

50

ーゼ I V で約 5 分)。ついで、約 10 個から 2,000 個の細胞の塊が、さらに分散されることなく、前記基材上に直接播種される。

【0173】

フィーダフリー培養は、分化することなく細胞の増殖を支持する因子を含む栄養培地により支持される。このような因子は、このような因子を分泌する細胞、例えば、照射された（約 4,000 ラッド）初代マウス胚性繊維芽細胞、テロメル化されたマウス繊維芽細胞または p P S 細胞から得られた繊維芽細胞様細胞と前記培地を培養することにより、前記培地中に導入されてもよい。培地は、血清フリー培地、例えば、20% 血清代替品及び 4 ng/mL b F G F を添加した KO DMEM 中に、約 $5-6 \times 10^4$ 個/cm² の密度で、フィーダを播種することにより順化され得る。1-2 日間で馴化された培地に、さらに、b F G F が添加され、多能性 S C 培養を 1-2 日間支持するのに使用される。フィーダフリー培養法の特徴は、国際公開第 01/51616 号パンフレット；及び Xu et al., Nat. Biotechnol. 19:971, 2001 において、さらに検討されている。

10

【0174】

顕微鏡観察下において、E S 細胞は、高い核/細胞質比、顕著な核及び、ほとんど識別できない細胞間結合による小型のコロニーについて現れる。霊長類の E S 細胞は、ステージ特異的胚性抗原（S S E A）3 及び 4 並びに T r a - 1 - 6 0 及び T r a - 1 - 8 1 と指定された抗体を使用して検出可能なマーカーを発現している（Thomson et al., Science 282:1145, 1998）。マウス E S 細胞は、S S E A - 1 についてのポジティブコントロールとして、並びに、S S E A - 4、T r a - 1 - 6 0 及び T r a - 1 - 8 1 についてのネガティブコントロールとして使用され得る。S S E A - 4 は、ヒト胎児性ガン（h E C）細胞に一貫して存在する。多能性 S C の i n v i t r o における分化は、S S E A - 4、T r a - 1 - 6 0 及び T r a - 1 - 8 1 の発現の損失及び S S E A - 1 の増大した発現をもたらす。S S E A - 1 の増大した発現は、未分化の h E G 細胞にも見出される。

20

【0175】

幹細胞系 β 細胞（S C - β ）

【0176】

一部の態様では、本開示は、幹細胞系 β 細胞（S C - β ）を提供する。本願明細書に開示された S C - β 細胞は、天然の β 細胞の多くの識別特性を共有するが、特定の態様（例えば、遺伝子発現プロファイル）において異なる。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、非天然である。本願明細書で使用する場合、「非天然」は、前記 S C - β 細胞が、特定の態様において、天然に存在する β 細胞、すなわち、天然の β 細胞とかなり異なることを意味する。ただし、これらの顕著な差は、典型的には、特定の機能的差異を示す前記 S C - β 細胞をもたらし得る、構造的特徴に関係するが、例えば、S C - β 細胞の遺伝子発現パターンは、天然の β 細胞と異なると理解されるべきである。前記 S C - β 細胞は、天然の β 細胞に類似する方法で挙動するが、天然の β 細胞と比較して、特定の機能が変化している（例えば、改善されている）場合がある。例えば、図 2 E に示されたように、天然の β 細胞の頻度と比較して、S C - β 細胞は、より高い頻度で、20 mM グルコースに応答する。S C - β 細胞と天然の β 細胞との間の差異は、本願明細書に開示されたデータに基づいて、当業者に明らかであろう。

30

40

【0177】

本開示の S C - β 細胞は、正常な β 細胞の機能に重要な β 細胞の多くの特徴的特性を共有する。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、i n v i t r o でのグルコース刺激インスリン分泌（G S I S）応答を示す。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、i n v i v o での G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、i n v i t r o 及び i n v i v o での G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、内在性の成熟膵臓 β 細胞の G S I S 応答に類似する。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、少なくとも 1 回のグルコースチャレンジに対して、G S I S 応

50

答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも2回の連続的なグルコースチャレンジに対して、GSI S応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対して、GSI S応答を示す。一部の実施形態では、前記GSI S応答は、複数回のグルコースチャレンジに対して、内在性のヒト膵島のGSI S応答に類似する。一部の実施形態では、前記GSI S応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した直後に観察される。一部の実施形態では、前記GSI S応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約24時間以内に観察される。一部の実施形態では、前記GSI S応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約1週間以内に観察される。一部の実施形態では、前記GSI S応答は、前記細胞をヒトまたは動物に移植した約2週間以内に観察される。一部の実施形態では、低グルコース濃度と比較して、高グルコース濃度に対する応答において分泌されたインスリンの割合により特徴付けられる前記細胞の刺激指数は、内在性の成熟膵臓β細胞の刺激指数に類似している。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1以上の刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1.1より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、1.1以上の刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、2より大きい刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、2以上の刺激指数を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9または5.0以上の刺激指数を示す。

10

20

【0178】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、サイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、インターロイキン-1β (IL-β)、インターフェロン-γ (INF-γ)、腫瘍壊死因子-α (TNF-α) 及びそれらの組合せからなる群から選択されるサイトカインに対する応答において、サイトカイン誘導性アポトーシスを示す。

【0179】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞からのインスリン分泌は、公知の抗糖尿病剤（例えば、ex vivoもしくはin vitroにおいてβ細胞に作用する抗糖尿病剤及び／または一般的にin vivoにおける抗糖尿病剤）に対する応答において亢進する。本開示は、任意の公知の抗糖尿病剤を考慮する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞からのインスリン分泌は、分泌促進物質に対する応答において亢進する。一部の実施形態では、前記分泌促進物質は、インクレチン模倣物、スルホニル尿素、メグリチニド及びそれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0180】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、モノホルモン性である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性の成熟膵臓β細胞の形態に類似する形態を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、結晶インスリン顆粒を封入する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性の成熟膵臓β細胞のインスリン顆粒に類似する、電子顕微鏡観察下における封入結晶インスリン顆粒を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、低速の複製を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、低速の複製を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、低速であるが、プロラクチンによる処理に対する応答において、C-ペプチド及びKi67で染色することにより測定した場合、向上した速度の複製を示す。

40

【0181】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、グルコースに対する応答において、細胞内Ca²⁺を増大させる。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性の成熟膵臓β細胞のGSCFに類似するグルコース刺激Ca²⁺流動 (GSCF) を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、複数回のグルコースチャレンジに対する内在性の成熟膵

50

臓β細胞の前記G S C Fに類似する方法で、少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対するG S C F応答を示す。

【0182】

一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、インスリン、C-ペプチド、P D X 1、M A F A、N K X 6-1、P A X 6、ニューロD 1、グルコキナーゼ（G C K）、S L C 2 A 1、P C S K 1、K C N J 1 1、A B C C 8、S L C 3 0 A 8、S N A P 2 5、R A B 3 A、G A D 2及びP T P R Nからなる群から選択される、内在性の成熟膵臓β細胞に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

【0183】

一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、a) i) グルカゴン（G C G）及びi i) ソマトスタチン（S S T）からなる群から選択されるホルモン；b) i) アミラーゼ及びi i) カルボキシペプチダーゼA（C P A 1）からなる群から選択される腺細胞マーカー、c) i) G C G、A r x、I r x 1及びI r x 2からなる群から選択されるα細胞マーカー；d) i) C F T R及びi i) S o x 9からなる群から選択される管細胞マーカー、からなる群から選択される少なくとも1つのマーカー（例えば、内在性の成熟膵臓β細胞により発現されないマーカー）を発現していない。

【0184】

前記S C-β細胞は、本発明が、前記S C-β細胞が得られる開始細胞により限定されることを意図しない場合、任意の開始細胞からi n v i t r oにおいて分化される。典型的な開始細胞としては、制限されず、インスリン陽性内分泌細胞またはその任意の前駆体、例えば、N k x 6-1陽性膵臓始原細胞、P d x 1陽性膵臓始原細胞並びに多能性幹細胞、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞があげられる。一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、再プログラムされた細胞、部分的に再プログラムされた細胞（すなわち、誘導多能性細胞とそれが得られる体細胞との間の中間状態で存在するような、部分的に再プログラムされた、体細胞、例えば、繊維芽細胞）、分化転換された細胞から、i n v i t r oにおいて分化される。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたS C-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から、i n v i t r oにおいて分化され得る。一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、N k x 6-1陽性膵臓始原細胞、P d x 1陽性膵臓始原細胞及び多能性幹細胞からなる群から選択される前駆体から、i n v i t r oにおいて分化される。一部の実施形態では、前記多能性幹細胞は、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、前記S C-β細胞または前記S C-β細胞が得られる前記多能性幹細胞は、ヒトである。一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、ヒトである。

【0185】

一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、遺伝子組み換えされていない。一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、細胞の遺伝子組換えの不存在下において、天然のβ細胞と共通して共有する特徴を取得する。一部の実施形態では、前記S C-β細胞は、遺伝子組み換えされている。

【0186】

一部の実施形態では、前記S C-β細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での30分の（例えば、e x v i v oでの）インキュベートにおいて、細胞1000個あたりに、少なくとも0.5 μ I Uである。

【0187】

一部の実施形態では、前記S C-β細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での30分のインキュベートにおいて、細胞1000個あたりに、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8または少なくとも9 μ I Uである。一部の実施形態では、前記S C-β細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での30分のインキュベートにおいて、細胞1000個あたりに、0.5 μ I Uと10 μ I Uとの間である。一部の実施形態では、前記S C-β細胞あたりに産生されるインスリンは、高グルコース濃度での3

0 分のインキュベートにおいて、細胞 1 0 0 0 個あたりに、約 2 . 5 μ I U である。

【0188】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載された S C - β 細胞を含む細胞株を提供する。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、インスリンを安定的に発現している。一部の実施形態では、前記 S C - β 細胞は、少なくとも 3 0 回の継代まで、明らかな形態変化をすることなく、凍結、解凍及び、2 4 と 4 4 時間との倍加時間で増幅されることができる。

【0189】

S C - β 細胞の生成

【0190】

本開示の態様は、S C - β 細胞（例えば、膵臓 β 細胞）を生成することに関する。一般的には、少なくとも 1 つの前記 S C - β 細胞またはその前駆体、例えば、本願明細書に開示された方法に基づいて産生される膵臓前駆体は、種々の細胞の混合物または組合せ、例えば、P d x 1 陽性膵臓前駆体、P d x 1 と N K X 6 - 1 とを共発現している膵臓前駆体、N g n 3 陽性内分泌始原細胞、インスリン陽性内分泌細胞（例えば、 β 様細胞）及びインスリン陽性内分泌細胞及び／または他の多能性細胞もしくは幹細胞等の細胞の混合物を含み得る。

【0191】

前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体は、幹細胞または多能性細胞を、所望の段階の分化に分化させる、任意の適切な培養プロトコルに基づいて産生され得る。一部の実施形態では、前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体は、前記少なくとも 1 つの多能性細胞を、前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体に分化させるのに適した期間及び条件下において、少なくとも 1 つの多能性細胞を培養することにより産生される。

【0192】

一部の実施形態では、前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体は、S C - β 細胞またはその前駆体の実質的に純粋な集合である。一部の実施形態では、S C - β 細胞またはその前駆体の集合は、多能性細胞または分化した細胞の混合物を含む。一部の実施形態では、S C - β 細胞またはその前駆体の集合は、胚性幹細胞または多能性細胞もしくは i P S 細胞を実質的に含まないか、または、欠いている。

【0193】

一部の実施形態では、体細胞、例えば、繊維芽細胞は、対象から、例えば、組織生検、例えば、皮膚生検等として単離され、更なる分化のための誘導多能性幹細胞に再プログラムされて、本願明細書に記載された組成物及び方法において使用するための、少なくとも 1 つの前記 S C - β 細胞またはその前駆体を産生し得る。一部の実施形態では、体細胞、例えば、繊維芽細胞は、当業者に公知の方法により、培養中で維持され、一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により、S C - β 細胞に変換される前に増殖される。

【0194】

一部の実施形態では、前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体は、当業者に公知の方法により、培養中で維持され、一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により S C - β 細胞に変換される前に増殖される。

【0195】

さらに、少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体、例えば、膵臓前駆体は、任意の哺乳類種由来であり得る。非限定的な例としては、マウス、ウシ、サル、ブタ、ウマ、ウシまたはヒトの細胞があげられる。明確かつ単純にするために、本願明細書における方法の説明は、哺乳類の少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体を意味するが、本願明細書に記載された方法は全て、他の細胞種の少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体に容易に適用され得る。一部の実施形態では、前記少なくとも 1 つの S C - β 細胞またはその前駆体は、ヒト個体から得られる。

【0196】

多能性幹細胞の成体型内胚葉細胞への分化の誘導

【0197】

本開示の態様は、成体型内胚葉細胞を含む。本願明細書において有用な成体型内胚葉細胞は、任意のソースから得ることができ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて生成されることができる。一部の態様では、多能性幹細胞、例えば、iPSCまたはhESCは、内胚葉細胞に分化される。一部の態様では、前記内胚葉細胞は、原腸管細胞、Pdx1陽性膵臓始原細胞、NKX6-1陽性膵臓始原細胞、Ngn3陽性内分泌始原細胞またはインスリン陽性内分泌細胞にさらに分化され、続けて、SC-β細胞に誘導または成熟される。

【0198】

一部の実施形態では、前記幹細胞は、新たな基材上に播種されてもよいし、または、前記培地が交換されて、分化を阻害する細胞外マトリクスまたは可溶性因子を除去してもよい。これは、「直接分化法」と呼ばれる場合があり、国際公開第01/51616号パンフレット及び米国特許出願公開第2002/0019046号明細書に一般的な用語として記載されている。同特許は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。残留したフィーダ細胞により引き起こされる分化過程における可能性のある複雑性を避けるために、幹細胞のフィーダフリー培養で開始する前記直接分化法が通常好ましい。別のアプローチは、未分化の幹細胞を懸濁培養に入れることである。前記懸濁培養は、多くの場合、それらを、分化した細胞の凝集体及び未分化細胞の凝集体を形成させるであろう。例えば、幹細胞は、簡易なコラゲナーゼ消化により収集され、クラスターに分離され、非接着細胞培養プレートにおいて継代され得る。前記凝集体は、数日毎に栄養を供給され、ついで、適切な期間、典型的には、4-8日後に収集され得る。条件に応じて、凝集は、一般的には、実質的な頻度の内胚葉細胞を含む細胞種の異種集合を形成することにより開始する。ついで、前記凝集体は、分散され、分化過程の次の段階のために、ラミニンまたはフィブロネクチン等の基材上に、再度播種されるか、または、例えば、非接着プレート及び適切な培地を使用して、懸濁培養中で継代され得る。

【0199】

直接分化または凝集体における分化は、適切なマーカー、例えば、米国特許第7,326,572号明細書に列記されたものを使用して、内胚葉細胞の存在についてモニターされ得る。一部の好ましい実施形態では、分化は、Sox17等のマーカーを使用して、内胚葉細胞の存在についてモニターされ得る。十分な割合の内胚葉が得られると、細胞は、再度播種され、または、他の方法で操作されて、分化の別の段階を開始し得る。特定の状況において、細胞が微小集団クラスター（例えば、50個から5,000個の細胞）に維持される場合、細胞の分化または維持が向上され得る。本開示で考慮される分化の更なる段階は、図1に示される。

【0200】

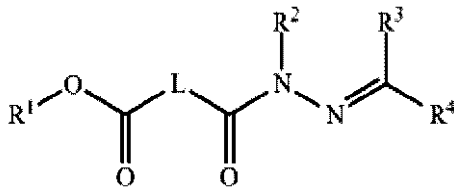
一部の実施形態では、成体型内胚葉細胞は、多能性幹細胞を、米国特許第8,507,274号明細書（「274特許」）に記載された式（I）の化合物と接触させること（例えば、培養すること）により産生される。同特許は、参照により本願明細書に組み込まれる。前記274特許に記載された式（I）の化合物は、細胞透過性小分子であり、シグナル伝達経路、遺伝子発現または代謝を調節することにより、細胞プロセスを調節することができ、幹細胞の分化プロトコルに効果的に使用されている。小分子は、高品質及び純粋に合成され、都合よく供給または除去されることができ、治療用途に有用な大きな可能性を提供する。高スループットスクリーニングが、ES細胞の自己再生（Chen et al., 2006; Desbordes et al., 2008）、マウスES細胞（Wu et al., 2004）または神経始原細胞（Diamandis et al., 2007）の心原性仕様及び特定細胞種、特に、神経及び筋肉の細胞の誘導（Ding and Schultz, 2004に概説）を支持し得る新規な小分子を特定するのに行われている。前記274特許からの式（I）の化合物は、多能性幹細胞を成体型内胚葉細胞に分化させるのに使用され得るのが期待される。

【0201】

一部の実施形態では、前記「274特許からの式(I)の化合物は、

【0202】

【化1】



10

【0203】

式(I)を含む。

【0204】

式中、

【0205】

R¹及びR²は、独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクリルまたはシクリルであり、それぞれ、場合により、置換されていることができ、及び／または、骨格中において、1つ以上のO、N、S、S(O)及びC(O)で中断されていることができ；

20

【0206】

R³及びR⁴は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、シクリルまたはシクリルであり、それぞれ、場合により、置換されていることができ、または、R³及びR⁴は、それらが付着している炭素とまとまって、ヘテロシクリルの場合により置換されているシクリルを形成し；及び、

【0207】

Lは、C₁-C₁₀アルキレニル、C₂-C₁₀アルケニレニルまたはC₂-C₁₀アルキニレニルであり、それぞれ、場合により、置換されていることができ、及び／または、骨格中において、1つ以上のO、N、S、S(O)及びC(O)で中断されていることができる。

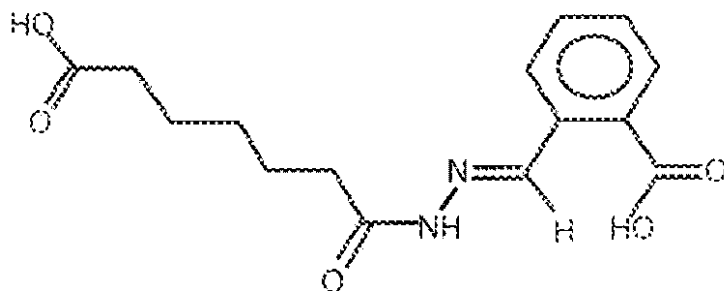
30

【0208】

一部の実施形態では、前記「274特許からの式(I)の化合物は、以下のIDE1を含む。

【0209】

【化2】



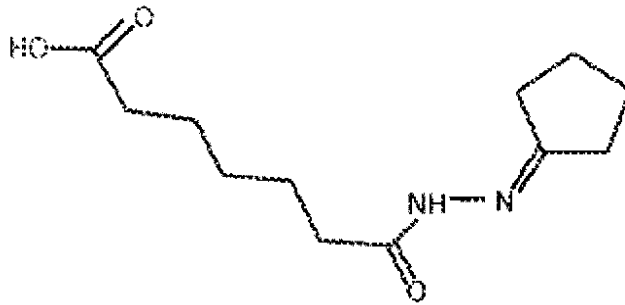
40

【0210】

一部の実施形態では、前記「274特許からの式(I)の化合物は、以下のIDE2を含む。

【0211】

【化 3】



10

【0212】

前記「274特許」には、次に、得られた成体型内胚葉細胞の特定を確認するための方法、及び、成体型内胚葉を単離、分取、増殖及び更なる分化をするための方法が記載されている。前記成体型内胚葉は全て、当業者に理解されるであろうように、本願明細書に記載された組成物及び方法に使用され得る。

【0213】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の多能性細胞を、成体型内胚葉細胞に分化させることにより、例えば、多能性細胞の集合を、i) TGF- β スーパーファミリーからの少なくとも1つの成長因子及びii) WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、少なくとも一部の前記多能性細胞の成体型内胚葉細胞への分化を誘導することにより、成体型内胚葉細胞を得ることができる。この場合、前記成体型内胚葉細胞は、成体型内胚葉に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

20

【0214】

本開示は、前記多能性幹細胞を誘導して、成体型内胚葉細胞に分化させる前記TGF- β スーパーファミリーからの任意の成長因子（例えば、単独で、または、WNTシグナル伝達経路アクチベータとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、アクチビンAを含む。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、成長分化因子8（GDF8）を含む。

【0215】

本開示は、前記多能性幹細胞を誘導して、成体型内胚葉細胞に分化させる任意のWNTシグナル伝達経路アクチベータ（例えば、単独で、または、前記TGF- β スーパーファミリーからの成長因子との組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、CHIR99021を含む。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、Wnt3a組換えタンパク質を含む。

30

【0216】

使用される作用剤（例えば、成長因子）の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、10 ng/mL-1000 ng/mLの間の濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、100 ng/mLの濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mLまたは90 ng/mLの濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、91 ng/mL、92 ng/mL、93 ng/mL、94 ng/mL、95 ng/mL、96 ng/mL、97 ng/mL、98 ng/mLまたは99 ng/mLの濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、110 ng/mL、120 ng/mL、130 ng/mL、140 ng/mL、150 ng/mL、160 ng/mL、170 ng/mL、180 ng/mLまたは190 ng/mL

40

50

Lの濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、101 ng/mL、102 ng/mL、103 ng/mL、104 ng/mL、105 ng/mL、106 ng/mL、107 ng/mL、108 ng/mLまたは109 ng/mLの濃度で、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。

【0217】

一部の実施形態では、前記多能性細胞を、1.4 μ g/mL-140 μ g/mLの間の濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、14 μ g/mLの濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、2 μ g/mL、3 μ g/mL、4 μ g/mL、5 μ g/mL、6 μ g/mL、7 μ g/mL、8 μ g/mL、9 μ g/mL、10 μ g/mL、11 μ g/mL、12 μ g/mLまたは13 μ g/mLの濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、15 μ g/mL、16 μ g/mL、17 μ g/mL、18 μ g/mL、19 μ g/mL、20 μ g/mL、21 μ g/mL、22 μ g/mL、23 μ g/mL、24 μ g/mL、25 μ g/mL、26 μ g/mL、27 μ g/mL、28 μ g/mL、29 μ g/mLまたは30 μ g/mLの濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、13.1 μ g/mL、13.2 μ g/mL、13.3 μ g/mL、13.4 μ g/mL、13.5 μ g/mL、13.6 μ g/mL、13.7 μ g/mL、13.8 μ g/mLまたは13.9 μ g/mLの濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記多能性細胞を、14.1 μ g/mL、14.2 μ g/mL、14.3 μ g/mL、14.4 μ g/mL、14.5 μ g/mL、14.6 μ g/mL、14.7 μ g/mL、14.8 μ g/mLまたは14.9 μ g/mLの濃度で、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

【0218】

一般的には、前記多能性細胞は、少なくとも一部の前記多能性細胞の成体型内胚葉細胞への分化を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される（例えば、懸濁培養）。典型的に適切な培養培地は、以下の表1に示される。

【0219】

【表1】

表1

作用剤	量
MCDB 131	1 L
グルコース	0.44
NaHCO ₃	2.46 g
F Δ F-B Δ S Δ	20 g
ITS-X	20 μ L
GlutaMax	10 mL
ビタミンC	0.044 g
ヘパリン	0 g
P/S	10 mL

【0220】

一部の実施形態では、多能性細胞を成体型内胚葉細胞に分化させるのに適した培養培地は、S1培地を含む。

【0221】

一部の実施形態では、前記多能性細胞を接触させることは、懸濁培養中で達成される。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、スピナーフラスコ中で維持される。一部の実施形態では、前記期間は、3日である。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子及びWNTシグナル伝達経路アクチベータは、前記懸濁培養に初日に添加される。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、前記懸濁培養中に2日目に補充される。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、前記懸濁培養中に2日目に補充されない。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、前記懸濁培養から2日目に除去される。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、前記懸濁培養中に2日目に補充され、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、2日目に、前記懸濁培養から除去されるか、または、前記懸濁培養中に補充されない。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子または前記WNTシグナル伝達経路アクチベータのいずれも、前記懸濁培養中に3日目に補充されない。一部の実施形態では、前記TGF- β スーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子及び前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは両方とも、前記懸濁培養から3日目に除去される。

10

【0222】

前記方法は、細胞集合中の少なくとも1つの多能性細胞の成体型内胚葉細胞への分化を誘導可能である。一般的には、任意の多能性細胞が、本願明細書に記載された方法を使用して、成体型内胚葉細胞に分化され得る。一部の実施形態では、前記多能性細胞は、誘導多能性幹細胞を含む。一部の実施形態では、前記多能性細胞は、胚性幹細胞を含む。一部の実施形態では、前記多能性細胞は、ヒト細胞を含む。

20

【0223】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の多能性細胞を成体型内胚葉細胞に分化させることは、多能性細胞の集合を、i) アクチビンA及びii) CHIR99021と接触させて、前記集合中の少なくとも一部の多能性細胞の成体型内胚葉細胞への分化を誘導する方法により達成される。この場合、前記成体型内胚葉細胞は、成体型内胚葉に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

【0224】

成体型内胚葉細胞を産生するための他の方法は、当該分野において公知であり、例えば、米国特許出願公開第2006/0003446号(G. Keller, et al.) ; 同第2006/0003313号(K. D'Amour, et al.,)、同第2005/0158853号(K. D'Amour, et al.,)及び同第2005/0260749号明細書(Jon Odorico, et al.,)で説明された方法があげられる。同特許の関連部分は、参照により本願明細書に組み込まれる。

30

【0225】

一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、Nodal、Tmprss2、Tmem30b、St14、Spink3、Sh3gl2、Ripk4、Rab15、Npnt、Clc6、Cldn8、Cacna1b、Bnip1、Anxa4、Emb、FoxA1、Sox17及びRbm35aからなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを発現している。この場合、前記少なくとも1つのマーカーの発現は、それが得られる前記多能性細胞に対して、前記成体型内胚葉細胞中において、統計学的に有意な量で上方制御される。一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、Gata4、SPARC、AFP及びDab2からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを、それが得られる前記多能性細胞に対して、統計学的に有意な量で発現していない。一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、Zic1、Pax6、Flk1及びCD31からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを、それが得られる前記多能性細胞に対して、統計学的に有意な量で発現していない。

40

50

【0226】

一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、それが得られる前記多能性細胞に対して、統計学的に有意な量で、より高いレベルの *Smad2* のリン酸化を有する。一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、*in vivo* において、消化管を形成する能力を有する。一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、腸細胞に固有の形態を有する細胞に分化し得る。この場合、腸細胞に固有の形態を有する細胞は、*FoxA2* 及び／またはクラウディン6を発現している。一部の実施形態では、本願明細書に開示された方法により産生された成体型内胚葉細胞は、内胚葉起源の細胞にさらに分化され得る。

10

【0227】

一部の実施形態では、多能性細胞の集合は、任意の分化前、または、分化の第1段階中に、少なくとも1つのβ細胞成熟因子の存在下において培養される。任意の多能性幹細胞、例えば、ヒト多能性幹細胞もしくはヒト*iPS*細胞または本願明細書に記載された多能性幹細胞のいずれかまたは他の適切な多能性幹細胞を使用し得る。一部の実施形態では、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子は、多能性幹細胞の集合の培養培地中に存在することができ、または、前記多能性幹細胞の集合の増殖（例えば、複製または増殖）中に、ボラスで、または、周期的に添加されてもよい。特定の例では、多能性幹細胞の集合は、任意の分化前に、少なくとも1つのβ細胞成熟因子に曝され得る。他の例では、多能性幹細胞の集合は、分化の第1段階中に、少なくとも1つのβ細胞成熟因子に曝されてもよい。

20

【0228】

成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化の誘導

【0229】

本開示の態様は、原腸管細胞を含む。本願明細書において有用な原腸管細胞は、任意のソースから得られ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて生成され得る。一部の態様では、成体型内胚葉細胞は、原腸管細胞に分化される。一部の態様では、前記原腸管細胞は、例えば、*Pdx1* 陽性膵臓始原細胞、*NKX6-1* 陽性膵臓始原細胞、*Ngn3* 陽性内分泌始原細胞、インスリン陽性内分泌細胞にさらに分化され、続けて、*SC-β* 細胞に誘導または成熟する。

30

【0230】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の成体型内胚葉細胞を、原腸管細胞に分化させることにより、例えば、成体型内胚葉細胞を、繊維芽細胞成長因子（*FGF*）ファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させて、少なくとも一部の前記成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化を誘導することにより、原腸管細胞を得ることができる。この場合、前記原腸管細胞は、原腸管細胞に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

【0231】

本開示は、成体型内胚葉細胞を誘導して、原腸管細胞に分化させる前記 *FGF* ファミリーからの任意の成長因子（例えば、単独で、または、他の因子との組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記 *FGF* ファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子（*KGF*）を含む。一部の実施形態では、前記 *FGF* ファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、*FGF2* を含む。一部の実施形態では、前記 *FGF* ファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、*FGF8B* を含む。一部の実施形態では、前記 *FGF* ファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、*FGF10* を含む。一部の実施形態では、前記 *FGF* ファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、*FGF21* を含む。

40

【0232】

使用される成長因子の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、*5 ng/mL* - *500 ng/mL* の間の濃

50

度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL または 40 ng/mL の濃度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、60 ng/mL、65 ng/mL、70 ng/mL、75 ng/mL、80 ng/mL、85 ng/mL、90 ng/mL、95 ng/mL または 100 ng/mL の濃度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、41 ng/mL、42 ng/mL、43 ng/mL、44 ng/mL、45 ng/mL、46 ng/mL、47 ng/mL、48 ng/mL または 49 ng/mL の濃度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、51 ng/mL、52 ng/mL、53 ng/mL、54 ng/mL、55 ng/mL、56 ng/mL、57 ng/mL、58 ng/mL または 59 ng/mL の濃度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を、50 ng/mL の濃度で、前記 FGF ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。

10

【0233】

一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞は、適切な培養培地中で培養される。

【0234】

一般的には、前記成体型内胚葉細胞は、少なくとも一部の前記成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される（例えば、懸濁培養）。典型的に適切な培養培地は、以下の表 2 に示される。

20

【0235】

【表 2】

表 2

作用剤	量
MCDB 131	1 L
グルコース	0.44 g
NaHCO ₃	1.23 g
FAF-BSA	20 g
ITS-X	20 uL
Glutamax	10 mL
ビタミン C	0.044 g
ヘパリン	0 g
P/S	10 mL

30

【0236】

一部の実施形態では、成体型内胚葉細胞を原腸管細胞に分化させるのに適した培養培地は、S2 培地を含む。

40

【0237】

一部の実施形態では、前記成体型内胚葉細胞を接触させることは、懸濁培養中で達成される。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、スピナーフラスコ中で維持される。一部の実施形態では、前記期間は、2 日と 5 日との間である。一部の実施形態では、前記期間は、3 日である。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2 日 1 回補充される。

【0238】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の前記成体型内胚葉細胞を原腸管細胞に分化させることにより、例えば、前記成体型内胚葉細胞を KGF と接触させて、少なくとも一部の前記成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化を誘導することにより、成体型内胚葉細胞を得ることができる。この場合、前記原腸管細胞は、成体型内胚葉に固有の少なく

50

とも1つのマーカーを発現している。

【0239】

原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化の誘導

【0240】

本開示の態様は、Pdx1陽性膵臓始原細胞を含む。本願明細書において有用なPdx1陽性膵臓始原細胞は、任意のソースから得られ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて生成され得る。一部の態様では、原腸管細胞は、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化される。一部の態様では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、例えば、NKX6-1陽性膵臓始原細胞、Ngn3陽性内分泌始原細胞、インスリン陽性内分泌細胞にさらに分化され、続けて、SC-β細胞に誘導または成熟する。

10

【0241】

一部の態様では、集合中の少なくとも一部の原腸管細胞を、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させることにより、例えば、原腸管細胞を、i) 少なくとも1つの骨形態形成タンパク質(BMP)シグナル伝達経路阻害剤、ii) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、iii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、iv) 少なくとも1つのレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路アクチベータ；及びv) 少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータと接触させて、少なくとも一部の前記原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、Pdx1陽性膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、Pdx1を発現している。

【0242】

20

本開示は、原腸管細胞を誘導して、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のBMPシグナル伝達経路阻害剤(例えば、単独で、または、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、少なくとも1つのSHH経路阻害剤、少なくとも1つのレチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータ及び少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータとの任意の組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤は、LDN193189を含む。

【0243】

本開示は、原腸管細胞を誘導して、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、前記FGFファミリーからの任意の成長因子(例えば、単独で、または、少なくとも1つのBMPシグナル伝達経路阻害剤、少なくとも1つのSHH経路阻害剤、少なくとも1つのレチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータ及び少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータとの任意の組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子(KGF)を含む。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、FGF2、FGF8B、FGF10及びFGF21からなる群から選択される。

30

【0244】

本開示は、原腸管細胞を誘導して、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のSHH経路阻害剤(例えば、単独で、または、少なくとも1つのBMPシグナル伝達経路阻害剤、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、少なくとも1つのレチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータ及び少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータとの任意の組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記SHH経路阻害剤は、Sant1を含む。

40

【0245】

本開示は、原腸管細胞を誘導して、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のRAシグナル伝達経路アクチベータ(例えば、単独で、または、少なくとも1つのBMPシグナル伝達経路阻害剤、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、少なくとも1つのSHH経路阻害剤及び少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータとの任意の組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、レチノイン酸を含む。

【0246】

50

本開示は、原腸管細胞を誘導して、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のPKCアクチベータ（例えば、単独で、または、少なくとも1つのBMPシグナル伝達経路阻害剤、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、少なくとも1つのSHH経路阻害剤及び少なくとも1つのRAシグナル伝達経路アクチベータとの任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記PKCアクチベータは、PdbUを含む。一部の実施形態では、前記PKCアクチベータは、TPBを含む。

【0247】

使用される作用剤（例えば、成長因子）の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、20nM–2000nMの間の濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、3040nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nMまたは190nMの濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、191nM、192nM、193nM、194nM、195nM、196nM、197nM、198nMまたは199nMの濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1000nM、1100nM、1200nM、1300nM、1400nM、1500nM、1600nM、1700nM、1800nMまたは1900nMの濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、270nM、280nMまたは290nMの濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、200nMの濃度で、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。

【0248】

一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、5ng/mL–500ng/mLの間の濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mLまたは40ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mLまたは100ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mLまたは49ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mLまたは59ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、50ng/mLの濃度で、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。

【0249】

一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0.1μMと0.5μMとの間の濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0.11μM、0.12μM、0.13μM、0.14μM、0.15μM、0.16μM、0.17μM、0.18μM、0.19μM、0.2μM、0.21μM、0.22μM、0.23μMまたは0.24μMの濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0.26μM、0.27μM、0.28μM、0.29μM、0.30μM、0.31μM、0.32μM、0

． 3 3 μM 、0． 3 4 μM 、0． 3 5 μM 、0． 3 6 μM 、0． 3 7 μM 、0． 3 8 μM 、0． 3 9 μM 、0． 4 0 μM 、0． 4 1 μM 、0． 4 2 μM 、0． 4 3 μM 、0． 4 4 μM 、0． 4 5 μM 、0． 4 6 μM 、0． 4 7 μM 、0． 4 8 μM 、0． 4 9 μM の濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0． 2 5 μM の濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。

【0250】

一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0． 0 1 μM －1． 0 μM の間の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0． 0 2 μM 、0． 0 3 μM 、0． 0 4 μM 、0． 0 5 μM 、0． 0 6 μM 、0． 0 7 μM 、0． 0 8 μM または0． 0 9 μM の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0． 2 0 μM 、0． 3 0 μM 、0． 4 0 μM 、0． 0 5 μM 、0． 6 0 μM 、0． 7 0 μM 、0． 8 0 μM または0． 9 0 μM の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、0． 1 μM の濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

【0251】

一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、5 0 nM－5 0 0 0 nMの間の濃度で、PKCアクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、1 0 0 nM、1 5 0 nM、2 0 0 nM、2 5 0 nM、3 0 0 nM、3 5 0 nM、4 0 0 nM、4 5 0 nM、4 6 0 nM、4 7 0 nM、4 8 0 nMまたは4 9 0 nMの濃度で、前記PKCアクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、4 9 1 nM、4 9 2 nM、4 9 3 nM、4 9 4 nM、4 9 5 nM、4 9 6 nM、4 9 7 nM、4 9 8 nMまたは4 9 9 nMの濃度で、前記PKCアクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、6 0 0 nM、7 0 0 nM、8 0 0 nM、9 0 0 nM、1 0 0 0 nM、1 1 0 0 nM、1 2 0 0 nM、1 3 0 0 nM、1 4 0 0 nM、1 5 0 0 nM、1 6 0 0 nM、1 7 0 0 nM、1 8 0 0 nM、1 9 0 0 nMまたは2 0 0 0 nMの濃度で、前記PKCアクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、5 0 1 nM、5 0 2 nM、5 0 3 nM、5 0 4 nM、5 0 5 nM、5 0 6 nM、5 0 7 nM、5 0 8 nMまたは5 0 9 nM、5 1 0 nM、5 2 0 nM、5 3 0 nM、5 4 0 nM、5 5 0 nM、5 6 0 nM、5 7 0 nM、5 8 0 nMまたは5 9 0 nMの濃度で、前記PKCアクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記原腸管細胞を、5 0 0 nMの濃度で、前記PKCアクチベータと接触させる。

【0252】

一般的には、前記原腸管細胞は、少なくとも一部の前記原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される（例えば、懸濁培養）。典型的に適切な培養培地は、以下の表3に示される。

【0253】

【表 3】

表 3

作用剤	量
MCDB 131	1 L
グルコース	0.44 g
NaHCO ₃	1.23
F12-BSA	20 g
ITS-X	5 mL
GlutaMax	10 mL
ビタミンC	0.044 g
ヘパリン	0 g
P/S	10 mL

10

【0254】

一部の実施形態では、S3培地が、原腸管細胞を膵臓始原細胞に分化させるのに適した培養培地として使用され得る。

【0255】

一部の実施形態では、前記原腸管細胞を接触させることは、懸濁培養中で達成される。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、スピナーフラスコ中で維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも2日である。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、毎日補充される。

20

【0256】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の前記原腸管細胞をPdx1陽性膵臓始原細胞に分化させることにより、例えば、前記原腸管細胞を、i) LDN193189、ii) KGF、iii) Sant1; iv) RA及びv) PdbUと接触させて、少なくとも一部の前記原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、原腸管細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、Pdx1を発現している。

【0257】

Pdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1+膵臓始原細胞への分化の誘導

30

【0258】

本開示の態様は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞を含む。本願明細書において有用なNKX6-1陽性膵臓始原細胞は、任意のソースから得られ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて生成され得る。一部の態様では、Pdx1陽性膵臓始原細胞は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化される。一部の態様では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、例えば、Ng3陽性内分泌始原細胞またはインスリン陽性内分泌細胞にさらに分化され、続けて、SC-β細胞に誘導または成熟する。

【0259】

一部の態様では、Pdx1陽性膵臓始原細胞からのNKX6-1陽性膵臓始原細胞の製造方法は、（例えば、細胞クラスター形成を促進する条件下で）Pdx1陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) 繊維芽脂肪成長因子（FGF）ファミリーからの少なくとも1つの成長因子、b) ソニックヘッジホッグ経路阻害剤を含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子、及び場合により、c) 低濃度のレチノイン酸（RA）シグナル伝達経路アクチベータと、少なくとも5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することを含み、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、NKX6-1を発現している。

40

【0260】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件下で、Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つ

50

のSHH経路阻害剤、及び場合により、iii) 低濃度のRAシグナル伝達経路アクチベータと、5日の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は、Pdx1及びNKX6-1を発現している。

【0261】

一部の実施形態では、Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤及びiii) RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞は、Pdx1及びNKX6-1を発現している。

10

【0262】

一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、多能性細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、iPS細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、ESC細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、成体型内胚葉細胞の集合から産生される。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、原腸管細胞の集合から産生される。

20

【0263】

本開示は、Pdx1陽性膵臓始原細胞を誘導して、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化させる、FGFファミリーからの任意の成長因子（例えば、単独で、または、少なくとも1つのSHH経路阻害剤、または場合により、少なくとも1つのレチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータとの任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子（KGF）を含む。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子は、FGF2、FGF8B、FGF10及びFGF21からなる群から選択される。

30

【0264】

本開示は、Pdx1陽性膵臓始原細胞を誘導して、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のSHH経路阻害剤（例えば、単独で、または、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子または少なくとも1つのレチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータとの任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記SHH経路阻害剤は、Sant1を含む。

【0265】

本開示は、Pdx1陽性膵臓始原細胞を誘導して、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化させる、任意のRAシグナル伝達経路アクチベータ（例えば、単独で、または、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子及び少なくとも1つのSHH経路阻害剤との任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、レチノイン酸を含む。

40

【0266】

一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合（例えば、Pdx1陽性膵臓始原細胞）を、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させることを含む。本開示は、（例えば、FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、少なくとも1つのSHH経路阻害剤、及び場合により、少なくとも1つのRAシグナル伝達経路アクチベ

50

ータとの任意の組合せと共に) P d x 1 陽性膵臓始原細胞の N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞への分化を促進する前記 E G F ファミリーからの任意の成長因子の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、E G F を含む。

【0267】

使用される作用剤(例えば、成長因子)の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、1 n g / m L - 1 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、5 n g / m L、1 0 n g / m L、1 5 n g / m L、2 0 n g / m L、2 5 n g / m L、3 0 n g / m L、3 5 n g / m L または 4 0 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、6 0 n g / m L、6 5 n g / m L、7 0 n g / m L、7 5 n g / m L、8 0 n g / m L、8 5 n g / m L、9 0 n g / m L、9 5 n g / m L または 1 0 0 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、4 1 n g / m L、4 2 n g / m L、4 3 n g / m L、4 4 n g / m L、4 5 n g / m L、4 6 n g / m L、4 7 n g / m L、4 8 n g / m L または 4 9 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、5 1 n g / m L、5 2 n g / m L、5 3 n g / m L、5 4 n g / m L、5 5 n g / m L、5 6 n g / m L、5 7 n g / m L、5 8 n g / m L または 5 9 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、5 0 n g / m L の濃度で、前記 F G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。

【0268】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 1 μ M と 0. 5 μ M との間の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 1 1 μ M、0. 1 2 μ M、0. 1 3 μ M、0. 1 4 μ M、0. 1 5 μ M、0. 1 6 μ M、0. 1 7 μ M、0. 1 8 μ M、0. 1 9 μ M、0. 2 μ M、0. 2 1 μ M、0. 2 2 μ M、0. 2 3 μ M または 0. 2 4 μ M の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 2 6 μ M、0. 2 7 μ M、0. 2 8 μ M、0. 2 9 μ M、0. 3 0 μ M、0. 3 1 μ M、0. 3 2 μ M、0. 3 3 μ M、0. 3 4 μ M、0. 3 5 μ M、0. 3 6 μ M、0. 3 7 μ M、0. 3 8 μ M、0. 3 9 μ M、0. 4 0 μ M、0. 4 1 μ M、0. 4 2 μ M、0. 4 3 μ M、0. 4 4 μ M、0. 4 5 μ M、0. 4 6 μ M、0. 4 7 μ M、0. 4 8 μ M、0. 4 9 μ M の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 2 5 μ M の濃度で、前記少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤と接触させる。

【0269】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 0 1 μ M - 1. 0 μ M の間の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 0 2 μ M、0. 0 3 μ M、0. 0 4 μ M、0. 0 5 μ M、0. 0 6 μ M、0. 0 7 μ M、0. 0 8 μ M または 0. 0 9 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 2 0 μ M、0. 3 0 μ M、0. 4 0 μ M、0. 0 5 μ M、0. 6 0 μ M、0. 7 0 μ M、0. 8 0 μ M または 0. 9 0 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、0. 1 μ M の濃度で、前記 R A シグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

【0270】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、2 n g / m L - 2 0 0 n g / m L の間の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、3 n g / m L、4 n g / m L、5 n g / m L、6 n g / m L、7 n g / m L、8 n g / m L、9 n g / m L、1 0 n g / m L、1 1 n g / m L、1 2 n g / m L、1 3 n g / m L、1 4 n g / m L、1 6 n g / m L、1 7 n g / m L、1 8 n g / m L または 1 9 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、3 0 n g / m L、3 5 n g / m L、4 0 n g / m L、4 5 n g / m L、5 0 n g / m L、5 5 n g / m L、6 0 n g / m L、6 5 n g / m L、7 0 n g / m L、7 5 n g / m L、8 0 n g / m L、8 5 n g / m L、9 0 n g / m L、9 5 n g / m L または 1 0 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、2 1 n g / m L、2 2 n g / m L、2 3 n g / m L、2 4 n g / m L、2 5 n g / m L、2 6 n g / m L、2 7 n g / m L、2 8 n g / m L または 2 9 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、2 0 n g / m L の濃度で、前記 E G F ファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子と接触させる。

10

【0271】

一般的には、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞は、前記集合中の少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される。典型的に適切な培養培地は、上記表 3 に示される。一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、スピナーフラスコ中で維持される。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも 5 日である。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2 日 1 回補充される。一部の実施形態では、前記 β 細胞成熟因子は、2 日 1 回補充される。

20

【0272】

一部の実施形態では、プロテインキナーゼ C のアクチベータは、前記懸濁培養に 5 日の間添加されない。一部の実施形態では、プロテインキナーゼ C のアクチベータは、前記懸濁培養から 5 日の前に除去される。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ C のアクチベータは、P d b U を含む。一部の実施形態では、B M P シグナル伝達経路阻害剤は、前記懸濁培養に 5 日の間添加されない。一部の実施形態では、B M P シグナル伝達経路阻害剤は、前記懸濁培養から 5 日の前に除去される。一部の実施形態では、前記 B M P シグナル伝達経路阻害剤は、L D N 1 9 3 1 8 9 を含む。

30

【0273】

一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも 1 0 % の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する。一部の実施形態では、少なくとも 9 5 % の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞が誘導されて、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化する。

【0274】

一般的には、任意の P d x 1 陽性膵臓始原細胞は、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞に分化し得る。一部の実施形態では、前記 N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞は、P d x 1、N K X 6 - 1 及び／または F o x A 2 を発現している。

40

【0275】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件下で、P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、i) F G F ファミリーからの少なくとも 1 つの成長因子、i i) 少なくとも 1 つの S H H 経路阻害剤、及び場合により、i i i) 低濃度の R A シグナル伝達経路アクチベータと、5 日の期間接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記 P d x

50

1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞は、Pdx1 及び NKX6-1 を発現している。

【0276】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件下で、前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、及び場合により、iii) RAシグナル伝達経路アクチベータと、2日1回、5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞のNKX6-1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞を、Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞に分化させることにより、NKX6-1 陽性膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記NKX6-1 陽性膵臓始原細胞は、Pdx1 及びNKX6-1 を発現している。

10

【0277】

一部の実施形態では、集合中の少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞を、Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性の膵臓始原細胞に分化させることにより、例えば、前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、及び場合により、iii) RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、前記集合中の少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性膵臓始原細胞のNKX6-1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導することにより、NKX6-1 陽性膵臓始原細胞を得ることができる。この場合、前記NKX6-1 陽性膵臓始原細胞は、Pdx1 及びNKX6-1 を発現している。

20

【0278】

NKX6-1 + 膵臓始原細胞のインスリン+内分泌細胞への分化の誘導

【0279】

本開示の態様は、インスリン陽性内分泌細胞を含む。本願明細書において有用なインスリン陽性内分泌細胞は、任意のソースから得られ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて産生され得る。一部の態様では、NKX6-1 陽性膵臓始原細胞は、インスリン陽性内分泌細胞に分化される。一部の態様では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、例えば、SC-β細胞への誘導または成熟によりさらに分化される。

【0280】

一部の態様では、NKX6-1 陽性膵臓始原細胞からのインスリン陽性内分泌細胞の製造方法は、（例えば、細胞クラスター形成を促進する条件下で）NKX6-1 陽性膵臓始原細胞を含む細胞集合を、a) TGF-βシグナル伝達阻害剤及びb) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子と接触させて、前記集合中の少なくとも1つのNKX6-1 陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導することを含む。この場合、前記インスリン膵臓始原細胞は、インスリンを発現している。

30

【0281】

本開示は、前記NKX6-1 陽性膵臓始原細胞の分化を誘導して、インスリン陽性内分泌細胞に分化させる、任意のTGF-βシグナル伝達経路阻害剤（例えば、単独で、または、他のβ細胞成熟因子、例えば、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤I1を含む。

40

【0282】

本開示は、前記NKX6-1 陽性膵臓始原細胞の分化を誘導して、インスリン陽性内分泌細胞に分化させる、任意の甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ（例えば、単独で、または、他のβ細胞成熟因子、例えば、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤との組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン（T3）を含む。

50

【0283】

一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合（例えば、NKX6-1陽性膵臓始原細胞）を、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させることを含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) SHH経路阻害剤、ii) RAシグナル伝達経路アクチベータ、iii) γ-セクレターゼ阻害剤、iv) 上皮成長因子（EGF）ファミリーからの少なくとも1つの成長因子、及び場合により、v) プロテインキナーゼ阻害剤の、少なくとも1つと接触させることを含む。

【0284】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、γ-セクレターゼ阻害剤を含む。本開示は、集合中のNKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導可能な任意のγ-セクレターゼ阻害剤（例えば、単独で、または、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータのいずれかとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記γ-セクレターゼ阻害剤は、XXIを含む。一部の実施形態では、前記γ-セクレターゼ阻害剤は、DAPTを含む。

10

【0285】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子を含む。本開示は、集合中のNKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導可能な、EGFファミリーからの任意の成長因子（例えば、単独で、または、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータのいずれかとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、前記EGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子は、EGFを含む。

20

【0286】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、低濃度のレチノイン酸（RA）シグナル伝達経路アクチベータを含む。本開示は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞の分化を誘導して、インスリン陽性内分泌細胞に分化させる、任意のRAシグナル伝達経路アクチベータ（例えば、単独で、または、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータのいずれかとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、RAを含む。

30

【0287】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、ソニックヘッジホッグ（SHH）経路阻害剤を含む。本開示は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞の分化を誘導して、インスリン陽性内分泌細胞に分化させる、任意のSHH経路阻害剤（例えば、単独で、または、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータのいずれかとの組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記SHH経路阻害剤は、Sant1を含む。

40

【0288】

一部の実施形態では、細胞集合（例えば、NKX6-1陽性膵臓始原細胞）は、グルコースに曝される。

【0289】

一部の実施形態では、前記細胞集合を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記細胞集合を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。本開示は、集合中のNKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導可能な、任意のプロテインキナーゼ阻害剤（例えば、単独で、または、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ

50

タのいずれかとの組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。

【0290】

一部の実施形態では、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i)少なくとも1つのSHH経路阻害剤、ii)RAシグナル伝達経路アクチベータ、iii)γ-セクレターゼ阻害剤、iv)TGF-βシグナル伝達経路阻害剤、v)THシグナル伝達経路アクチベータ及びvi)上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子と接触させて、少なくとも一部のPdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導することにより、インスリン陽性内分泌細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性内分泌細胞は、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している。

10

【0291】

使用される作用剤(例えば、成長因子)の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。

【0292】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、100nM-100μMの間の濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、10μMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、100nM、200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nMまたは900nMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μMまたは9μMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、9.1μM、9.2μM、9.3μM、9.4μM、9.5μM、9.6μM、9.7μM、9.8μMまたは9.9μMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、11μM、12μM、13μM、14μM、15μM、16μM、17μM、18μMまたは19μMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、10.1μM、10.2μM、10.3μM、10.4μM、10.5μM、10.6μM、10.7μM、10.8μMまたは10.9μMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。

20

30

【0293】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.1μM-10μMの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、1μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μMまたは0.9μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、1.1μM、1.2μM、1.3μM、1.4μM、1.5μM、1.6μM、1.7μM、1.8μMまたは1.9μMの濃度で、前記γ甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μMまたは9μMの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

40

【0294】

50

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.1μM-10μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、1μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μMまたは0.9μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、1.1μM、1.2μM、1.3μM、1.4μM、1.5μM、1.6μM、1.7μM、1.8μMまたは1.9μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μMまたは9μMの濃度で、前記γ-セクレターゼ阻害剤と接触させる。

10

【0295】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、2ng/mL-200ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mLまたは19ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、45ng/mL、50ng/mL、55ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mLまたは100ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、25ng/mL、26ng/mL、27ng/mL、28ng/mLまたは29ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、20ng/mLの濃度で、前記EGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子と接触させる。

20

【0296】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.01μM-1.0μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.06μM、0.07μM、0.08μMまたは0.09μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.20μM、0.30μM、0.40μM、0.05μM、0.60μM、0.70μM、0.80μMまたは0.90μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.1μMの濃度で、前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

30

40

【0297】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.01μM-1.0μMの濃度で、低濃度のRAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.06μM、0.07μM、0.08μMまたは0.09μMの濃度で、低濃度の前記RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.20μM、0.30μM、0.40μM、0.05μM、0.60μM、0.70μM、0.80μMまたは0.90μMの濃度で、前記低濃度のRAシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.1μMの濃度で、低濃度の前記RAシ

50

グナル伝達経路アクチベータと接触させる。

【0298】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.1 μMと0.5 μMとの間の濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.11 μM、0.12 μM、0.13 μM、0.14 μM、0.15 μM、0.16 μM、0.17 μM、0.18 μM、0.19 μM、0.2 μM、0.21 μM、0.22 μM、0.23 μMまたは0.24 μMの濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.26 μM、0.27 μM、0.28 μM、0.29 μM、0.30 μM、0.31 μM、0.32 μM、0.33 μM、0.34 μM、0.35 μM、0.36 μM、0.37 μM、0.38 μM、0.39 μM、0.40 μM、0.41 μM、0.42 μM、0.43 μM、0.44 μM、0.45 μM、0.46 μM、0.47 μM、0.48 μM、0.49 μMの濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、0.25 μMの濃度で、前記少なくとも1つのSHH経路阻害剤と接触させる。

10

【0299】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、10 nM-1 μMの間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、100 nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nMまたは90 nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、110 nM、120 nM、130 nM、140 nM、150 nM、160 nM、170 nM、180 nMまたは190 nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nMまたは900 nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。

20

【0300】

一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、1 mM-50 mMの間の濃度で、グルコースと接触させる。一部の実施形態では、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞を、25 mMの間の濃度で、グルコースと接触させる。

30

【0301】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) TGF-βシグナル伝達経路阻害剤、b) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、c) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、i i) RAシグナル伝達経路アクチベータ、i i i) γ-セクレターゼ阻害剤及びv i) 上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子と、2日1回、5日と7日の間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることにより、前記インスリン陽性内分泌細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞は、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Maf b、glis 3、Sur 1、Kir 6. 2、Znt 8、SLC 2 A 1、SLC 2 A 3及び／またはインスリンを発現している。

40

【0302】

一部の実施形態では、例えば、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、i i) RAシグナル伝達経路アクチベータ、i i i) γ-セクレターゼ阻害剤、v i) TGF-βシグナル伝達経路阻害剤、v) THシグナル伝達経路アクチベータ及び上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも

50

1つの成長因子と接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導することで、集合中の少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることにより、前記インスリン陽性内分泌細胞を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1、インスリン陽性の内分泌細胞は、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している。

【0303】

一般的には、前記細胞集合は、前記集合中の少なくとも1つの前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性内分泌細胞への分化を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される。典型的な培養培地は、表4に示される。

【0304】

【表4】

表4

作用剤	濃度
MCDB131	1 L
グルコース	3.6 g
NaHCO ₃	1.754 g
FAF-BSA	20 g
ITS-X	5 mL
Glutamax	10 mL
ビタミンC	0.044 g
ヘパリン	10 mg
P/S	10 mL

【0305】

一部の実施形態では、BE5培地は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞をインスリン陽性内分泌細胞に分化させるのに適した培養培地として使用され得る。一部の実施形態では、適切な培養培地は、表5に示される。

【0306】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記期間は、C-ペプチドとNkx6-1とを共発現している細胞の数を最大化させるのに十分な期間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも5日である。一部の実施形態では、前記期間は、5日と7日との間である。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも7日である。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、毎日補充される（例えば、β細胞成熟因子を含む）。一部の実施形態では、5日と7日との間の期間により、C-ペプチドとNkx6-1とを共発現している細胞の数が最大化される。

【0307】

一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも15%の前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が誘導されて、インスリン陽性内分泌細胞に分化する。

【0308】

一部の実施形態では、前記集合中の少なくとも99%の前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が誘導されて、インスリン陽性内分泌細胞に分化する。

【0309】

インスリン+内分泌細胞のSC-β細胞への成熟の誘導

【0310】

本開示の態様は、SC-β細胞を含む。本願明細書において有用なSC-β細胞は、任意のソースから得られ、または、任意の適切なプロトコルに基づいて生成され得る。一部

の態様では、インスリン陽性内分泌細胞は誘導されて、SC-β細胞に成熟する。

【0311】

一部の態様では、本開示は、インスリン陽性内分泌細胞からの、成熟したグルコース応答性β細胞の生成方法を提供する。前記方法は、（例えば、細胞クラスター形成を促進する条件下で）インスリン陽性内分泌細胞を含む細胞集合を、a) 形質転換成長因子β (TGF-β) シグナル伝達阻害剤、b) 甲状腺ホルモン (TH) シグナル伝達経路アクチベータを含む少なくとも2つのβ細胞成熟因子と接触させて、前記集合中の少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への *in vitro* 成熟を誘導することを含む。

【0312】

本開示の態様は、形状及び機能において、内在性の成熟β細胞と類似するが、それにも関わらず、天然のβ細胞と区別されるSC-β細胞を生成することを含む。前記SC-β細胞は、少なくとも1回のグルコースチャレンジに対する応答を示し得る。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも2回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、少なくとも3回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、複数回のグルコースチャレンジに対する内在性のヒト膵島の応答に類似する、複数回の（例えば、連続的な）グルコースチャレンジに対する応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、2回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答において、インスリンを放出または分泌可能である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、3回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答において、インスリンを放出または分泌可能である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、4回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答において、インスリンを放出または分泌可能である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、5回の連続的なグルコースチャレンジに対する応答において、インスリンを放出または分泌可能である。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、絶え間なく連続するグルコースチャレンジに対する応答において、インスリンを放出または分泌する。一部の実施形態では、細胞は、本願明細書における実施例に記載されたように、それらが細胞内Ca²⁺を繰り返し増大させるかどうかを決定することにより、それらが連続的なグルコースチャレンジに応答するかどうかを決定するために、アッセイされ得る。

【0313】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞の形態は、内在性のβ細胞の形態に類似する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、*in vitro*でのグルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) 応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、*in vivo*でのGSIS応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、*in vitro*及び／または*in vivo*でのGSIS応答を示す。一部の実施形態では、前記*in vitro*及び／または*in vitro*でのGSIS応答は、内在性の成熟β細胞のGSIS応答に類似する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性のβ細胞のGSIS応答に類似する*in vitro*での (GSIS) 応答を示す。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、内在性のβ細胞のGSIS応答に類似する*in vivo*でのGSIS応答を示す。前記GSIS応答は、ヒトまたは動物の対象に移植した直後に観察される場合がある。一部の実施形態では、前記GSIS応答は、前記SC-β細胞をヒトまたは動物の対象に移植した2週間以内に観察される。一部の実施形態では、前記GSIS応答は、前記SC-β細胞をヒトまたは動物の対象に移植した2週間以内に観察される。一部の実施形態では、前記SC-β細胞のGSIS応答は、前記SC-β細胞をヒトまたは動物の対象に移植した、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月までに、または、1年以上までに観察される。

【0314】

一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、成熟した内在性の膵臓β細胞の少なくとも

10

20

30

40

50

1つのマーカーを提示する。典型的なマーカーとしては、制限されず、Pdx1、HNF6、Ptf1a、Sox9、FoxA2、Nkx2.2、Ngn3及びNKX6-1があげられる。一部の実施形態では、HNF6、Ptf1a、Sox9、FoxA2、Nkx2.2、Ngn3及びNKX6-1からなる群から選択される前記マーカーの発現は、前記SC-β細胞が得られる前記多能性幹細胞（例えば、胚性幹細胞または誘導多能性細胞）に対して、前記SC-β細胞中で、統計学的に有意な量で上方制御される。

【0315】

本開示は、インスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞に分化及び／または成熟させる、任意のTGF-βシグナル伝達経路阻害剤（例えば、単独で、または、少なくとも1つの甲状腺ホルモン（TH）シグナル伝達経路アクチベータ、または場合により、プロテインキナーゼ阻害剤との任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β受容体I型キナーゼシグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤Iを含む。

10

【0316】

本開示は、インスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞に分化及び／または成熟させる、任意の甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ（例えば、単独で、または、少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤、または場合により、プロテインキナーゼ阻害剤との任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、T3を含む。

20

【0317】

一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の細胞を、場合により、プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させない。一部の実施形態では、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。本開示は、インスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞に分化及び／または成熟させる、任意のプロテインキナーゼ阻害剤（例えば、単独で、または、少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータとの任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。

30

【0318】

一部の実施形態では、前記方法は、前記細胞集合（例えば、インスリン陽性内分泌細胞）を、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させることを含む。

【0319】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、CFTR阻害剤と接触させることを含む。本開示は、インスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞に分化及び／または成熟させる、任意のCFTR阻害剤（例えば、単独で、または、少なくとも1つのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、プロテインキナーゼ阻害剤との任意の組合せで）の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記CFTR阻害剤は、Gly-H101を含む。

40

【0320】

一部の実施形態では、前記少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子は、O-GlcNAcase阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記方法は、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、O-GlcNAcase阻害剤と接触させることを含む。本開示は、インスリン陽性内分泌細胞を誘導して、SC-β細胞に分化及び／または成熟させる、任意のO-GlcNAcase（例えば、単独で、または、少なく

50

とも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤及び／または甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、プロテインキナーゼ阻害剤との任意の組合せで)の使用を考慮する。一部の実施形態では、前記O-GlcNAcase阻害剤は、Thiamet Gを含む。

【0321】

使用される作用剤(例えば、成長因子)の濃度が変化し得ることを、当業者であれば理解するであろう。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、100nM-100 μ Mの間の濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、10 μ Mの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nMまたは900nMの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ Mまたは9 μ Mの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ Mまたは9.9 μ Mの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、11 μ M、12 μ M、13 μ M、14 μ M、15 μ M、16 μ M、17 μ M、18 μ Mまたは19 μ Mの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、10.1 μ M、10.2 μ M、10.3 μ M、10.4 μ M、10.5 μ M、10.6 μ M、10.7 μ M、10.8 μ Mまたは10.9 μ Mの濃度で、前記少なくとも1つのTGF- β シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。

【0322】

一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、0.1 μ M-10 μ Mの間の濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、1 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ Mまたは0.9 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ Mまたは1.9 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ Mまたは9 μ Mの濃度で、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータと接触させる。

【0323】

一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、10nM-1 μ Mの間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、100nMの間の濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nMまたは90nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nMまたは190nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞を、200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nMまたは900nMの濃度で、前記プロテインキナーゼ阻害剤と接触させる。

【0324】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M - 1 0 0 μ M の間の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記 C F T R 阻害剤と接触させる。

【0325】

一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 0 n M - 1 0 0 μ M の間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる。一部の実施形態では、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、1 0 n M - 1 0 μ M の間の濃度で、前記 O - G l c N A c a s e 阻害剤と接触させる。

10

【0326】

一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (T G F - β) シグナル伝達経路阻害剤、i i) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、i i i) プロテインキナーゼ阻害剤と、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n v i t r o 成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、S C - β 細胞に分化させることにより、S C - β 細胞を得ることができる。この場合、前記 S C - β 細胞は、i n v i t r o 及び／または i n v i v o の両方における G S I S 応答を示す。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、内在性の β 細胞の G S I S 応答に類似する。

20

【0327】

一部の実施形態では、例えば、前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (T G F - β) シグナル伝達経路阻害剤、i i) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、i i i) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン産生の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n v i t r o 成熟を誘導することで、集合中の少なくとも一部の P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、S C - β 細胞に分化させることにより、S C - β 細胞を得ることができる。この場合、前記 S C - β 細胞は、内在性の β 細胞の G S I S 応答に類似する、i n v i t r o 及び／または i n v i v o の両方における G S I S 応答を示す。

30

【0328】

一部の態様では、本開示は、細胞クラスター形成を促進する条件下において、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (T G F - β) シグナル伝達経路阻害剤、i i) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、i i i) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、S C - β 細胞への i n v i t r o 成熟を誘導することを含み、前記 S C - β 細胞が、i n v i t r o 及び／または i n v i v o の両方における G S I S 応答を示す、S C - β 細胞の生成方法を提供する。一部の実施形態では、前記 G S I S 応答は、内在性の β 細胞の G S I S 応答に類似する。

40

【0329】

一部の態様では、本開示は、a) 集合中の多能性幹細胞を、P d x 1 陽性膵臓始原細胞に分化させること；b) 細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、i) F G F ファミリーからの少なくとも1つの成長因子、i i) 少なくとも1つの S H H 経路阻害剤、及び場合により、i i i) R A シグナル伝達経路アクチベータと、2日に1回、5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞の N K X 6 - 1 陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記 P d x 1 陽性膵臓始原細胞を、P d x 1 陽性、N K X 6 - 1 陽性の

50

膵臓始原細胞に分化させることであって、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、Pdx1及びNKX6-1を発現している前記分化；c)細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i)TGF-βシグナル伝達経路阻害剤、b)THシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、c)少なくとも1つのSHH経路阻害剤、iii)RAシグナル伝達経路アクチベータ、iii)γ-セクレターゼ阻害剤並びにvi)上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子と、2日に1回、5日と7日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることであって、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、d)細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i)形質転換成長因子β(TGF-β)シグナル伝達経路阻害剤、ii)甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii)プロテインキナーゼ阻害剤と、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC-β細胞へのin vitro成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC-β細胞に分化させることであって、前記SC-β細胞が、in vitro及び／またはin vivoにおけるGSI応答を示す前記分化を含む、多能性細胞からのSC-β細胞の生成方法を提供する。一部の実施形態では、GSI応答は、内在性のβ細胞のGSI応答に類似する。

【0330】

一部の態様では、本開示は、a)集合中の少なくとも一部の多能性細胞を、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させること；b)細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i)KGF、ii)Sant1、及び場合により、iii)低濃度のRAと、2日に1回、5日の期間接触させて、前記集合中の少なくとも1つの前記Pdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性膵臓始原細胞に分化させることであって、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞が、Pdx1及びNKX6-1を発現している前記分化；c)前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i)Alk5阻害剤I1、ii)T3、及び場合により、iii)Sant1、iv)RA、v)XXI及びvi)ベタセルリンと、2日に1回、5日と7日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることであって、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び／またはインスリンを発現している前記分化；並びに、d)細胞クラスター形成を促進する条件下において、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i)Alk5阻害剤I1、ii)T3、及び場合により、iii)スタウロスポリンと、2日に1回、7日と14日との間の期間接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC-β細胞へのin vitro成熟を誘導する方法により、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC-β細胞に分化させることであって、前記SC-β細胞が、内在性のβ細胞のGSI応答に類似する、in vitro及び／またはin vivoにおけるGSI

S 応答を示す前記分化を含む、多能性細胞からの SC-β 細胞の生成方法を提供する。

【0331】

一般的には、前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞は、少なくとも一部の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の SC-β 細胞への *in vitro* 成熟を誘導するのに十分な期間、適切な培養培地中で維持される。典型的に適切な培養培地は、上記表 4 及び以下の表 5 に示される。

【0332】

【表 5】

表 5

CMRL 臍島培地 (「CMRLS」)
CMRL 1066 添加 cat # 99-603-CV Mediatech 10% Hyclone FBS を添加

10

【0333】

一部の実施形態では、前記適切な培養培地は、臍島培地 (CMRLS) 添加した、C o n n o u g h t M e d i c a l R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s 1066 を含む。一部の実施形態では、前記適切な培養培地は、CMRLS の成分 (補充亜鉛) を含む。一部の実施形態では、前記適切な培養培地は、表 3 に示される。一部の実施形態では、前記 CMRLS は、血清 (例えば、ヒト) と共に添加される。一部の実施形態では、前記 CMRLS は、血清代替品 (例えば、KOSR) と共に添加される。一部の実施形態では、前記 CMRLS は、ウシ胎児血清と共に添加される。一部の実施形態では、前記 CMRLS は、10% ウシ胎児血清と共に添加される。一部の実施形態では、インスリン陽性内分泌細胞を SC-β 細胞に分化させるのに適した培養培地は、S3 培地を含む。一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。一部の実施形態では、前記期間は、少なくとも 7 日を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7 日と 21 日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、7 日と 14 日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、10 日と 14 日との間を含む。一部の実施形態では、前記期間は、14 日を含む。一部の実施形態では、前記懸濁培養は、2 日に 1 回補充される (例えば、前記 β 細胞成熟因子を含む)。

20

30

【0334】

一部の実施形態では、少なくとも 1%、少なくとも 2%、少なくとも 3%、少なくとも 4%、少なくとも 5%、少なくとも 6%、少なくとも 7%、少なくとも 8%、少なくとも 9%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50% の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が誘導されて、SC-β 細胞に成熟する。一部の実施形態では、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 99% の前記 Pdx1 陽性、NKX6-1 陽性、インスリン陽性の内分泌細胞が誘導されて、SC-β 細胞に成熟する。一部の実施形態では、生成された細胞の少なくとも 30% が、SC-β 細胞を含む。一部の実施形態では、前記 SC-β 細胞は、C-ペプチド、インスリン、NKX6-1、Pdx1 を発現しており、NKX6-1 と C-ペプチドとを共発現している。

40

【0335】

一部の実施形態では、前記 SC-β 細胞は、ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、前記 SC-β 細胞の *in vitro* での生成は、規模を拡大できる。

【0336】

細胞の単離された集合

【0337】

本開示の態様は、本願明細書に記載された方法に基づいて産生された細胞の単離された

50

集合に関する。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、本願明細書に記載された少なくとも2つのβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、本願明細書に記載された少なくとも3つのβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、本願明細書に記載された少なくとも4つのβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、本願明細書に記載された少なくとも5つのβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10個の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子と接触させることにより産生される。

10

【0338】

一部の態様では、本開示は、成体型内胚葉細胞の単離された集合を提供する。例えば、多能性細胞の集合を、i) TGF-βスーパーファミリーからの少なくとも1つの成長因子及びii) Wntシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、前記集合中の少なくとも一部の多能性細胞の成体型内胚葉細胞への分化を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部の多能性細胞を、成体型内胚葉細胞に分化させることにより、成体型内胚葉細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記成体型内胚葉細胞は、成体型内胚葉に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

20

【0339】

一部の態様では、本開示は、原腸管細胞の単離された集合を提供する。例えば、前記成体型内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子(FGF)からの少なくとも1つの成長因子と接触させて、少なくとも一部の前記成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部の成体型内胚葉細胞を、原腸管細胞に分化させることにより、原腸管細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記原腸管細胞は、成体型内胚葉に固有の少なくとも1つのマーカーを発現している。

30

【0340】

一部の態様では、本開示は、Pdx1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を提供する。例えば、前記原腸管細胞を、i) 少なくとも1つの骨形態形成タンパク質(BMP)シグナル伝達経路阻害剤、ii) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、iii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、iv) 少なくとも1つのレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路アクチベータ；及びv) 少なくとも1つのプロテインキナーゼCアクチベータと接触させて、少なくとも一部の前記原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部の原腸管細胞を、Pdx1陽性膵臓始原細胞に分化させることにより、Pdx1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞は、Pdx1を発現している。

40

【0341】

一部の態様では、本開示は、NKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を提供する。例えば、前記Pdx1陽性膵臓始原細胞を、i) FGFファミリーからの少なくとも1つの成長因子、ii) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、及び場合により、iii) RAシグナル伝達経路アクチベータと接触させて、前記集合中の少なくとも1つのPdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部のPdx1陽性膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞に分化させることにより、NKX6-1陽性膵臓始原細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記NKX6-1陽性膵臓始原細胞は、Pdx1及びNK

50

X6-1を発現している。

【0342】

一部の態様では、本開示は、インスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を提供する。例えば、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、i) TGF-βシグナル伝達阻害剤、ii) THシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、i) 少なくとも1つのSHH経路阻害剤、ii) RAシグナル伝達経路アクチベータ、iii) γ-セクレターゼ阻害剤、iv) 及びvi) 上皮成長因子(EGF)ファミリーからの少なくとも1つの成長因子からなる群から選択される、少なくとも1つの更なるβ細胞成熟因子と接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞の、Pdx1陽性、NKX6-1、インスリン陽性の内分泌細胞への分化を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部のPdx1陽性、NKX6-1陽性の膵臓始原細胞を、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞に分化させることにより、インスリン陽性内分泌細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記Pdx1陽性、NKX6-1、インスリン陽性の内分泌細胞は、Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3及び/またはインスリンを発現している。

10

【0343】

一部の態様では、本開示は、SC-β細胞の単離された集合を提供する。例えば、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子β(TGF-β)シグナル伝達阻害剤、ii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC-β細胞へのin vitro成熟を誘導する方法で、集合中の少なくとも一部のPdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、SC-β細胞に分化させることにより、SC-β細胞の単離された集合を得ることができる。この場合、前記SC-β細胞は、in vitro及び/またはin vivoでのGSIIS応答を示す。一部の実施形態では、前記GSIIS応答は、内在性のβ細胞のGSIIS応答に類似する。

20

【0344】

本開示の態様は、本願明細書に記載された細胞(例えば、SC-β細胞)の単離された集合を含むマイクロカプセルを含む。マイクロカプセルは、当該分野において周知である。マイクロカプセルの適切な例は、文献(例えば、Jahansouz et al., 「Evolution of β-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Islet Cell Transplantation」Journal of Transplantation 2011; Volume 2011, Article ID 247959; Orive et al., 「Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics」, Advanced Drug Delivery Reviews (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.009>; Hernandez et al., 「Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery」, Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62: 711-730; Murua et al., 「Cell microencapsulation technology: Towards clinical application」, Journal of Controlled Release 2008; 132: 76-83; 及び、Zanin et al., 「The development of encapsulated cell technologies as therapies for neurological and sensory diseases」, Journal of Controlled Release 2012; 160: 3-13)に記載されている

30

40

50

。マイクロカプセルは、各種の方法で製剤化され得る。典型的なマイクロカプセルは、外側のアルギン酸塩膜により覆われた、ポリカチオン層に囲まれたアルギン酸塩コアを含む。前記ポリカチオン膜は、半透過性膜を形成する。前記半透過性膜は、安定性及び生体適合性を付与する。ポリカチオンの例としては、制限されず、ポリ-L-リジン、ポリ-L-オルニチン、キトサン、ラクトース修飾キトサン及び光重合性生体材料があげられる。一部の実施形態では、前記アルギン酸塩コアは、例えば、RGD配列（アルギニン、グリシン、アスパラギン酸）を有するオリゴペプチドに共有結合しているアルギン酸塩コアを含む足場を生じるように修飾される。一部の実施形態では、前記アルギン酸塩コアは、例えば、向上した安定性の化学酵素的に改変されたアルギン酸塩を有する共有的に強化されたマイクロカプセルを生じるように修飾される。一部の実施形態では、前記アルギン酸塩コアは、例えば、アクリレート官能性リン脂質の *in situ* 重合により構築させた膜類似物フィルムを生じるように修飾される。一部の実施形態では、マイクロカプセルは、エピメラーゼを使用して酵素的に修飾されたアルギン酸塩から構成される。一部の実施形態では、マイクロカプセルは、前記マイクロカプセル膜の隣接する層間に共有結合を含む。一部の実施形態では、前記マイクロカプセルは、フェノール部分と結合しているアルギン酸塩を含むサブミクロサイズカプセルを含む。一部の実施形態では、前記マイクロカプセルは、アルギン酸塩-アガロースを含む足場を含む。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、アルギン酸塩内に封入される前に、PEGで修飾される。一部の実施形態では、細胞、例えば、SC-β細胞の単離された集合は、光反応性リボソーム及びアルギン酸塩に封入される。前記マイクロカプセルに使用される前記アルギン酸塩は、他の適切な生体材料、例えば、制限されず、PEG、キトサン、PES中空繊維、コラーゲン、ヒアルロン酸、RGDを含むデキストラン、EHD及びPEGDA、PMBV及びPVA、PGSSAS、アガロース、ゼラチンを含むアガロース、PLGA及びこれらの多層の実施形態と置き換えられ得る。

【0345】

一部の実施形態では、本願明細書に記載された方法に基づいて産生された細胞集合を含む組成物は、膵臓膵島細胞の1つ以上の内分泌ポリペプチドを産生するように設計された機械的装置における機能性コンポーネントとしても使用され得る。その最も単純な形態では、前記装置は、細胞集合の通過を防止して、それらを前記装置に維持するが、前記細胞集合により分泌されたインスリン、グルカゴンまたはソマトスタチンを通過させる半透過膜の後ろに、（例えば、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の集合から産生された）膵臓ベータ細胞の集合を含む。これは、典型的には、分化を阻害する細胞相互作用を可能にする細胞クラスターの状態において、マイクロカプセル化された膵臓ベータ細胞の集合を含む。例えば、米国特許第4,391,909号明細書には、インスリンサイズのタンパク質を透過するが、100,000mol.wtを超える分子を透過しないように架橋されている、3,000mol.wtより大きい多糖類ポリマーで構成された楕円形状の半透過膜に封入された膵島細胞が記載されている。米国特許第6,023,009号明細書には、アガロース及びアガロペクチンから形成された半透過膜に封入された膵島細胞が記載されている。この性質のマイクロカプセルは、糖尿病患者の身体腔内に投与されるのに採用され、組織適合性の問題または細菌に対する感受性を低下させる特定の利益を有すると考えられる。

【0346】

本願明細書に記載された方法に基づいて、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から産生された膵臓ベータ細胞の集合を含み、糖尿病患者への埋込み用または体外治療用のいずれかに使用するための、より精巧な装置も考慮される。米国特許第4,378,016号明細書には、体外セグメント、皮下セグメント及び、ホルモン産生細胞を収容する取り替え可能なエンベロープを含む人工的な内分泌腺が記載されている。米国特許第5,674,289号明細書には、半透過膜により、周囲の組織に対して開かれた1つ以上の血管新生化チャンバに対して分離された、膵島チャンバを有するバイオ人工膵臓が記載されている。有用な装置は、典型的には、膵島細胞を収容するように採用されたチャンバ、

及び、前記膵島細胞からの分泌タンパク質を回収し、例えば、循環グルコースレベルの前記膵島細胞へのシグナル伝達帰還を可能にする場合もある、半透過膜により前記膵島細胞から分離されたチャンバを有する。

【0347】

本開示の態様は、本願明細書に記載された細胞（例えば、SC-β細胞）の単離された集合を含むアッセイを含む。一部の実施形態では、前記アッセイは、β細胞の増殖、β細胞の複製、β細胞の死、β細胞の機能、免疫攻撃に対するβ細胞の感受性または脱分化もしくはは分化に対するβ細胞の感受性からなる群から選択される、β細胞の運命を促進または阻害する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用され得る。一部の実施形態では、前記アッセイは、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を促進する、1つ以上の候補剤を特定するのに使用され得る。一部の実施形態では、前記アッセイは、β細胞を刺激して、インスリンを産生させるか、または、インスリンの産生もしくは分泌を増大させる、1つ以上の候補剤を特定するのに使用され得る。

【0348】

本開示は、本願明細書に記載された方法に基づいて、SC-β細胞が、疾患（例えば、糖尿病、肥満またはβ細胞関連障害）を患う個体から抽出または単離された細胞から得られたIPS細胞から生成され、それらのSC-β細胞が、疾患を有していない健常な個体由来の正常なβ細胞と比較されて、（例えば、後天的及び／または遺伝的な）疾患用のマーカーとして有用であり得る、前記SC-β細胞と正常なβ細胞との間の差異を特定する方法を考慮する。一部の実施形態では、β細胞は、糖尿病の個体から得られ、正常なβ細胞と比較され、ついで、前記β細胞は、IPS細胞に再プログラムされる。前記IPS細胞は、（例えば、前糖尿病性）マーカーを特定するために、前記糖尿病の個体から得られたβ細胞には存在するが、前記正常なβ細胞には存在しない遺伝的及び／または後天的マーカーについて分析される。一部の実施形態では、糖尿病患者から得られた前記IPS細胞及び／またはSC-β細胞は、作用剤（例えば、糖尿病の表現型に關与する遺伝子を調節可能な作用剤）をスクリーニングするのに使用される。

【0349】

インスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への分化方法

【0350】

本願明細書に記載された方法を使用して、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の変換によりSC-β細胞を生成することは、数多くの利点を有する。まず、本開示の方法は、自家SC-β細胞の生成を可能にするものである。前記自家SC-β細胞は、個体に特異的であり、個体と遺伝的に一致する。一般的には、自家細胞は、おそらく、非自家細胞より、免疫拒絶に対する対象にほとんどならない。前記細胞は、個体からの体細胞（例えば、繊維芽細胞）を誘導多能性状態に再プログラムし、ついで、前記多能性細胞を培養して、少なくとも一部の前記多能性細胞を、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に分化させ、続けて、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、前記個体内に移植し、これにより、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が、*in vivo*において、SC-β細胞に成熟するか、または、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞のSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導することにより、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体、例えば、膵臓前駆体から得られる。

【0351】

一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が得られる対象は、哺乳類の対象、例えば、ヒトの対象である。一部の実施形態では、前記対象は、β細胞障害を患う。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病を患う。一部の実施形態では、前記対象は、糖尿病前症を患う。このような実施形態では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、本願明細書に記載された方法により、*ex vivo*において、SC-β細胞に分化され、ついで、前記細胞が収集された前記対象に、前記β細胞障害（例えば、糖尿病）について前記対象を処置する方法で投与

され得る。

【0352】

一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、対象内（*in vivo*）に配置され、本願明細書に記載された方法により、*in vivo*においてSC-β細胞になるように変換される。一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への*in vivo*における変換は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ以上の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子を含む組成物を、対象に投与することにより達成され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への*in vivo*における変換は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子を含む組成物を、対象に投与することにより達成され得る。

10

【0353】

一部の実施形態では、接触させることは、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、前記1つ以上のβ細胞成熟因子培養培地中で維持することにより行われてもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、遺伝子操作され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、本願明細書に開示された1つ以上のβ細胞マーカーを発現する、例えば、膵臓及び十二指腸ホメオボックス1（*Pdx1*）ポリペプチド、インスリン、c-ペプチド、アミリン、E-カドヘリン、*Hnf3β*、*PCI/3*、*B2*、*Nkx2.2*、*NKX6-1*、*GLUT2*、*PC2*、*ZnT-8*またはそれらに実質的に同等のアミノ酸配列、または、それらの機能性フラグメントもしくは機能性変異体から選択された、少なくとも1つのポリペプチドを発現するように遺伝子操作され得る。

20

【0354】

前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が、*in vitro*条件下で維持される場合、従来の組織培養条件及び方法を使用することができ、同条件及び方法は、当業者に公知である。種々の細胞の単離及び培養方法は、当業者の能力の十分範囲内である。

【0355】

本開示の方法では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、一般的には、標準的な条件の温度、pH及び他の環境条件、例えば、5-10% *CO2*を含む雰囲気における37℃での組織培養プレートの接着細胞等において培養され得る。前記細胞及び／または前記培養培地は、本願明細書に記載されたSC-β細胞への変換を達成するように適切に修飾される。特定の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体、例えば、膵臓前駆体は、細胞外マトリクスの1つ以上の特徴に類似する、または、1つ以上の細胞外マトリクスもしくは基底膜成分を含む材料上、または、同材料の存在下において培養され得る。一部の実施形態では、マトリゲル（商標）が使用される。他の材料としては、タンパク質またはその混合物、例えば、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチン等があげられる。本発明の特定の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、細胞のフィード層の存在下において培養され得る。このような細胞は、例えば、マウスまたはヒト起源のものであり得る。それらは、照射され、化学不活性化剤、例えば、マイトマイシンcによる処理により化学的に不活性化され、または、必要に応じてその増殖を阻害する他の方法で処理されることもできる。他の実施形態では、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、フィード細胞なしに培養される。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、細胞クラスター形成を促進する条件下において培養される。本願明細書で使用する場合、「細胞クラスター形成を促進する条件」は、前記細胞のSC-β細胞への分化中に、細胞のクラスター形成を刺激する任意の条件を意味する。一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件は、懸濁培養を含む。Boret

30

40

50

t i 及び G o o c h (T i s s u e E n g . 2 0 0 6 A p r ; 1 2 (4) : 9 3 9 - 4 8) により、最少接着条件（低血清培地、低接着基材）での培養が、i n v i t r o における成体の膵管上皮細胞のベータ細胞への分化転換において、細胞クラスター形成を刺激したことが報告されている。したがって、理論に拘束されるものではないが、一部の実施形態では、細胞クラスター形成を促進する条件は、接着条件、例えば、低血清培地、低接着基材を最少に含む。

【0356】

特定の例では、前記β細胞成熟因子は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、有効量の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子に曝し、または、同β細胞成熟因子と接触させることにより、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の分化を誘導して、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、少なくとも1つのSC-β細胞（例えば、成熟膵臓β細胞）に分化させるのに使用され得る。

10

【0357】

したがって、本願明細書には、本願明細書に記載された方法により調製された細胞及び組成物が含まれる。前記β細胞成熟因子の正確な量及び種類は、前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の数、所望の分化段階及び行われた先の分化段階の回数に応じて変化し得る。

【0358】

特定の例では、β細胞成熟因子は、有効量で存在する。本願明細書で使用する場合、「有効量」は、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の集合中の少なくとも10%または少なくとも20%または少なくとも30%の前記細胞の、SC-β細胞への分化のために存在するべき化合物の量を意味する。

20

【0359】

更なる例では、β細胞成熟因子は、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の培養培地に存在し得る。あるいは、前記β細胞成熟因子は、増殖の一部の段階中に、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に添加されてもよい。

【0360】

SC-β細胞の存在の確認及び特定

30

【0361】

本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子に対する暴露による、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の分化の誘導により産生されたSC-β細胞、例えば、成熟膵臓β細胞の存在を確認する、当業者に一般的な任意の手段を使用し得る。

【0362】

一部の実施形態では、β細胞マーカー、例えば、化学的に誘導されたSC-β細胞の存在は、内在性のβ細胞を示す1つ以上のマーカーの有無を検出することにより行われ得る。一部の実施形態では、前記方法は、成熟β細胞のマーカーの陽性発現（例えば、存在）を検出することを含み得る。一部の実施形態では、前記マーカーは、試薬、例えば、NKX6-1及びC-ペプチドの検出用試薬を使用して検出され得る。特に、本願明細書におけるSC-β細胞は、NKX6-1及びC-ペプチドを発現しており、未成熟なβ細胞を示す他のマーカー（例えば、MafB）を顕著なレベルで発現していない。マーカー用の試薬は、例えば、前記マーカーに対する抗体、または、RT-PCRもしくはPCR反応、例えば、半定量もしくは定量RT-PCRもしくはPCR反応用のプライマーであり得る。このようなマーカーは、SC-β細胞が産生されているかどうかを評価するのに使用され得る。前記抗体または他の検出試薬は、検出に使用するための標識、例えば、放射線、蛍光（例えば、GFP）または発色標識に結合し得る。前記検出試薬がプライマーである場合、乾燥調製物、例えば、凍結乾燥された調製物または溶液で供給され得る。

40

【0363】

50

少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への進行は、成熟β細胞に固有のマーカの発現を決定することによりモニターされ得る。一部の方法において、特定のマーカの発現は、前記マーカの有無を検出することにより決定される。あるいは、前記特定のマーカの発現は、前記マーカが細胞培養物または細胞集合の細胞に存在するレベルを測定することにより決定され得る。特定の方法では、SC-β細胞に固有のマーカの発現、及び、前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体、例えば、前記インスリン陽性内分泌細胞が得られる多能性幹細胞もしくは胚臓始原細胞に固有のマーカの顕著な発現の欠落が決定される。

【0364】

インスリン陽性内分泌細胞からのSC-β細胞（例えば、成熟胚臓β細胞）の産生をモニターすることに関して記載されたように、定量または半定量技術、例えば、プロット転写法及び免疫細胞化学法は、当業者に一般的に公知の方法を使用して、マーカ発現を測定するのに使用され得る。あるいは、マーカ発現は、当該分野において通常公知の方法による定量PCR等の技術の使用により、正確に定量され得る。さらに、ポリペプチドレベルにおいて、胚臓胚島ホルモン発現細胞のマーカの多くが、分泌タンパク質であることが理解されるであろう。なお、細胞外マーカ含量を測定するための技術、例えば、ELISAが使用されてもよい。

【0365】

SC-β細胞は、前記SC-β細胞が誘導される前記多能性幹細胞に固有のマーカの下方制御によっても特徴付けられ得る。例えば、多能性幹細胞から得られたSC-β細胞は、前記SC-β細胞が得られる前記多能性幹細胞における発現に対して、成熟において、前記多能性幹細胞のマーカである、アルカリホスファターゼ（AP）、NANOG、OCT-4、SOX-2、SSEA4、TRA-1-60またはTRA-1-81の統計学的に有意な下方制御により特徴付けられ得る。多能性幹細胞により発現される他のマーカとしては、制限されず、アルカリホスファターゼ（AP）；ABCG2；ステージ特異的胚性抗原-1（SSEA-1）；SSEA-3；SSEA-4；TRA-1-60；TRA-1-81；Tra-2-49/6E；ERAS/ECATS、E-カドヘリン；βIII-チューブリン；α-平滑筋アクチン（α-SMA）；繊維芽細胞成長因子4（Fgf4）、CripTo、Dax1；ジnkフィンガータンパク質296（Zfp296）；N-アセチルトランスフェラーゼ-1（Nat1）；ES細胞関連転写1（ECAT1）；ESG1/DPPAS/ECAT2；ECAT3；ECAT6；ECAT7；ECAT8；ECAT9；ECAT10；ECAT15-1；ECAT15-2；Fth117；Sal14；未分化胚性細胞転写因子（Utf1）；Rex1；p53；G3PDH；テロメラーゼ、例えば、TERT；サイレントX染色体遺伝子；Dnmt3a；Dnmt3b；TRIM28；F-box含有タンパク質15（Fbx15）；Nanog/ECAT4；Oct3/4；Sox2；Klf4；c-Myc；Esrrb；TDGF1；GABRB3；Zfp42、FoxD3；GDF3；CYP25A1；発生多能性関連2（DPPA2）；T細胞リンパ腫ブレークポイント1（Tcl1）；DPPA3/Stella；DPPA4；Dnmt3L；Sox15；Stat3；Grb2；SV40大型T抗原；HPV16 E6；HPV16 E7、β-カテニン及びBmi1並びに、多能性についての他の一般的なマーカ等があげられる。これらの少なくとも1つ以上は、前記SC-β細胞が得られる前記多能性幹細胞と比較して、成熟において、統計学的に有意な量で下方制御される。

【0366】

本発明は、本願明細書において成熟β細胞マーカとして列記されたそれらのマーカに限定されず、本発明は、細胞表面マーカ、抗原及び他の遺伝子産物、例えば、EST、RNA（例えば、マイクロRNA及びアンチセンスRNA）、DNA（例えば、遺伝子及びcDNA）並びにそれらの一部等のマーカも包含する。

【0367】

SC-β細胞の濃縮、単離及び精製

【0368】

本発明の別の態様は、細胞の異種集合、例えば、SC-β細胞及び、前記SC-β細胞が得られるインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を含む細胞の混合集合からの、SC-β細胞の集合の単離に関する。上記方法のいずれかにより産生されたSC-β細胞の集合は、前記SC-β細胞が得られるインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に存在せず、前記SC-β細胞に存在する任意の細胞表面マーカーを使用することにより、濃縮、単離及び／または精製され得る。このような細胞表面マーカーは、SC-β細胞に特異的な親和性タグとも呼ばれる。SC-β細胞に特異的な親和性タグの例は、SC-β細胞の細胞表面に存在するが、他の細胞種（例えば、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体）に実質的に存在しないマーカー分子、例えば、ポリペプチドに特異的な、抗体、リガンドまたは他の結合剤である。一部の方法では、SC-β細胞（例えば、ヒトSC-β細胞）上の細胞表面抗原に結合する抗体が、本願明細書に記載された方法により産生された、（例えば、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子と接触させることにより）化学的に誘導されたSC-β細胞の濃縮、単離または精製のための親和性タグとして使用される。このような抗体は、公知であり、市販されている。

10

【0369】

SC-β細胞の濃縮、単離及び／または精製用の抗体を使用するための方法を、当業者であれば容易に理解するであろう。例えば、一部の実施形態では、抗体等の試薬は、SC-β細胞を含む細胞集合とインキュベートされる。この場合、前記細胞集合は、細胞間及び基材との接着を減少させるように処理されている。ついで、前記細胞集合は、洗浄、遠心分離及び再懸濁される。一部の実施形態では、前記抗体が標識により予め標識されている場合、細胞懸濁液は、一次抗体に結合可能な二次抗体、例えば、FITCコンジュゲート抗体とインキュベートされる。ついで、前記SC-β細胞は、洗浄、遠心分離及び、バッファー中で再懸濁される。ついで、前記SC-β細胞の懸濁液は、蛍光活性化細胞ソータ（FACS）を使用して、分析及び分取される。抗体が結合した、蛍光を発する再プログラムされた細胞は、結合していない、蛍光していない細胞（例えば、未成熟なインスリン産生細胞）から分離して収集される。これにより、前記細胞懸濁液中に存在する他の細胞、インスリン陽性内分泌細胞もしくはその前駆体または未成熟なインスリン産生細胞（例えば、他の分化した細胞種）からの、SC-β細胞の単離がもたらされる。

20

【0370】

本願明細書に記載された方法の別の実施形態では、SC-β細胞を含む単離された細胞組成物は、別の親和性に基づく方法を使用することにより、または、SC-β細胞に特異的な同じもしくは異なるマーカーを使用する分取の更なるラウンドにより、さらに精製され得る。例えば、一部の実施形態では、まず、FACS分取が、NKX6-1を単独で、または、C-ペプチドの発現と共にのいずれかで、あるいは、前記細胞集合中でそれらのマーカーの1つを発現していない細胞（例えば、ネガティブ細胞）からの本願明細書に開示されたβ細胞マーカーと共に発現しているSC-β細胞を単離するのに使用される。第2のFACSソーティング、例えば、前記第1のソートとは異なるマーカーについて陽性の細胞を単離するFACSを使用して、再度陽性細胞を分取することにより、前記細胞集合が再プログラムされた細胞に濃縮される。

30

40

【0371】

別の実施形態では、FACSソーティングは、ほとんどのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に存在するが、SC-β細胞に存在しないマーカーについてのネガティブ分取により、細胞を分離するのに使用される。

【0372】

本願明細書に記載された方法の一部の実施形態では、SC-β細胞は、抗体を使用することなく、蛍光標識され、ついで、蛍光活性化細胞ソータ（FACS）を使用することにより、非標識細胞から単離される。このような実施形態では、GFP、YFPをコードする核酸、または、発現可能な蛍光マーカー遺伝子をコードする別の核酸、例えば、ルシフェラーゼをコードする遺伝子が、上記された方法を使用して再プログラムされた細胞を標

50

識するのに使用される。例えば、一部の実施形態では、まず、GFPをコードする核酸またはその生物学的に活性なフラグメントの少なくとも1つのコピーが、SC-β細胞に化学的に誘導される、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞内の、SC-β細胞中に表れるプロモータ、例えば、インスリンプロモータの下流に、導入される。これにより、GFP遺伝子産物またはその生物学的に活性なフラグメントの発現が、前記インスリンプロモータの制御下にあることになる。

【0373】

直前に記載された手法に加えて、化学的に誘導されたSC-β細胞は、細胞単離用の他の技術によっても単離され得る。さらに、SC-β細胞は、前記SC-β細胞の選択的生存または選択的増殖を促進する増殖条件において、連続的な継代培養法により、濃縮または単離されることもできる。このような方法は、当業者に公知であり、例えば、インスリン、TGF-βファミリーのメンバー、例えば、アクチビンA、TGF-β1、2及び3、骨形態形成タンパク質(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12及び-13)、繊維芽細胞成長因子-1及び-2、血小板由来成長因子-AA及び-BB、血小板リッチ血漿、インスリン様成長因子(IGF-I、II)、成長分化因子(GDF-5、-6、-7、-8、-10、-11、-15)、血管内皮細胞由来成長因子(VEGF)、肝細胞成長因子(HGF)、プレイオトロフィン、エンドセリン、上皮成長因子(EGF)、ベタセルリン等の作用剤の使用を含み得る。他の医薬化合物としては、例えば、ニコチンアミド、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)及びII、GLP-1及び2ミメティボディ、エキセンディン-4、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン

10

20

【0374】

本願明細書に記載された方法を使用して、SC-β細胞の濃縮、単離及び／または精製された集合が、(本願明細書に記載された方法により多能性幹細胞から分化された)インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から、*in vitro*において産生され得る。一部の実施形態では、好ましい濃縮、単離及び／または精製法は、ヒトインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体からの、ヒトSC-β細胞の*in vitro*産生に関する。前記ヒトインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、ヒト多能性幹細胞またはヒト誘導多能性幹(iPS)細胞から分化される。このような実施形態では、SC-β細胞が、iPS細胞から先に得られた、成体型内胚葉細胞から先に得られた、インスリン陽性内分泌細胞から分化される場合、前記SC-β細胞は、前記iPS細胞を生成するのに取得された細胞の対象に対して自家であり得る。

30

【0375】

本願明細書に記載された方法を使用して、SC-β細胞の単離された細胞集合は、前記インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の細胞集合と比較して、SC-β細胞含量において、少なくとも約2倍から約1000倍に濃縮される。一部の実施形態では、SC-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の集合と比較して、少なくとも約5倍から約500倍で濃縮され得る。他の実施形態では、SC-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の集合と比較して、少なくとも約10倍から約200倍に濃縮され得る。さらに他の実施形態では、SC-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の集合と比較して、少なくとも約20倍から約100倍に濃縮され得る。さらに他の実施形態では、SC-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の集合と比較して、少なくとも約40倍から約80倍に濃縮され得る。特定の実施形態では、SC-β細胞は、インスリン陽性内分泌細胞または前駆体の集合の前記化学的誘導前の集合と比較して、少なくとも約2倍から約20倍に濃縮され得る。

40

【0376】

SC-β細胞を含む組成物

【0377】

50

本発明の一部の実施形態は、SC-β細胞を含む、細胞組成物、例えば、細胞培養物または細胞集合に関する。この場合、前記SC-β細胞は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から得られる。一部の実施形態では、前記細胞組成物は、インスリン陽性内分泌細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞組成物は、NKX6-1 膵臓始原細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞組成物は、Pdx1 陽性膵臓始原細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞組成物は、原腸管細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞組成物は、成体型内胚葉細胞を含む。

【0378】

特定の実施形態に基づいて、前記化学的に誘導されたSC-β細胞は、哺乳類の細胞である。好ましい実施形態では、このようなSC-β細胞は、ヒトSC-β細胞である。一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞は、成体型内胚葉細胞、例えば、ヒト成体型内胚葉細胞から得られる。特定の実施形態に基づいて、前記化学的に誘導されたPdx1 陽性膵臓前駆体は、哺乳類の細胞である。好ましい実施形態では、このようなPdx1 陽性膵臓前駆体は、ヒトPdx1 陽性膵臓前駆体である。

【0379】

本発明の他の実施形態は、本願明細書に開示された方法により產生されたSC-β細胞を含む、組成物、例えば、単離された細胞集合または細胞培養物に関する。一部の実施形態では、本発明は、本願明細書に開示された方法により產生された、化学的に誘導されたSC-β細胞を含む、組成物、例えば、単離された細胞集合または細胞培養物に関する。このような実施形態では、前記SC-β細胞は、前記SC-β細胞集合中の総細胞の、約90%未満、約85%未満、約80%未満、約75%未満、約70%未満、約65%未満、約60%未満、約55%未満、約50%未満、約45%未満、約40%未満、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約12%未満、約10%未満、約8%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満を構成する。一部の実施形態では、前記組成物は、前記細胞集合中の総細胞の約90%より多くを構成するSC-β細胞の集合を含む。例えば、前記細胞集合中の総細胞の、少なくとも約95%または少なくとも約96%または少なくとも約97%または少なくとも約98%または少なくとも約99%または少なくとも約100%が、SC-β細胞である。

【0380】

本発明の特定の他の実施形態は、SC-β細胞と、前記SC-β細胞が得られるインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体との組合せを含む、組成物、例えば、単離された細胞集合または細胞培養物に関する。一部の実施形態では、前記SC-β細胞が得られる前記インスリン陽性内分泌細胞は、前記単離された細胞集合または培養物中の総細胞の、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満を構成する。

【0381】

本発明の更なる実施形態は、主要な細胞種として、化学的に誘導されたSC-β細胞を含む、本願明細書に記載された方法により產生された組成物、例えば、単離された細胞集合または細胞培養物に関する。一部の実施形態では、本願明細書に記載された方法及びプロセスにより、少なくとも約99%、少なくとも約98%、少なくとも約97%、少なくとも約96%、少なくとも約95%、少なくとも約94%、少なくとも約93%、少なくとも約92%、少なくとも約91%、少なくとも約90%、少なくとも約89%、少なくとも約88%、少なくとも約87%、少なくとも約86%、少なくとも約85%、少なくとも約84%、少なくとも約83%、少なくとも約82%、少なくとも約81%、少なくとも約80%、少なくとも約79%、少なくとも約78%、少なくとも約77%、少なくとも約76%、少なくとも約75%、少なくとも約74%、少なくとも約73%、少なくとも約72%、少なくとも約71%、少なくとも約70%、少なくとも約69%、少なくとも約68%、少なくとも約67%、少なくとも約66%、少なくとも約65%、少なくとも約64%、少なくとも約63%、少なくとも約62%、少なくとも約61%、少なくと

も約60%、少なくとも約59%、少なくとも約58%、少なくとも約57%、少なくとも約56%、少なくとも約55%、少なくとも約54%、少なくとも約53%、少なくとも約52%、少なくとも約51%または少なくとも約50%のSC-β細胞を含む、単離された細胞培養物及び／または細胞集合を産生される。

【0382】

別の実施形態では、細胞（または細胞培養物）の単離された細胞集合または組成物は、ヒトSC-β細胞を含む。他の実施形態では、本願明細書に記載された方法及びプロセスにより、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約24%、少なくとも約23%、少なくとも約22%、少なくとも約21%、少なくとも約20%、少なくとも約19%、少なくとも約18%、少なくとも約17%、少なくとも約16%、少なくとも約15%、少なくとも約14%、少なくとも約13%、少なくとも約12%、少なくとも約11%、少なくとも約10%、少なくとも約9%、少なくとも約8%、少なくとも約7%、少なくとも約6%、少なくとも約5%、少なくとも約4%、少なくとも約3%、少なくとも約2%または少なくとも約1%のSC-βを含む単離された細胞集合が産生され得る。好ましい実施形態では、単離された細胞集合は、ヒトSC-β細胞を含み得る。一部の実施形態では、前記細胞培養物または集合中のSC-β細胞の割合は、前記培養物中に残存しているフィーダ細胞に関わらず算出される。

10

【0383】

本発明のさらに他の実施形態は、SC-β細胞と、それらに分化されるインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体との混合物を含む、組成物、例えば、単離された細胞集合または細胞培養物に関する。例えば、約95個のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体毎に、少なくとも約5個のSC-β細胞を含む、細胞培養物または細胞集合が産生され得る。他の実施形態では、約5個のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体毎に、少なくとも約95個のSC-β細胞を含む、細胞培養物または細胞集合が産生され得る。さらに、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に対する、他の割合のSC-β細胞を含む細胞培養物または細胞集合が考慮される。例えば、約1,000,000個または少なくとも100,000個または少なくとも10,000個または少なくとも1,000個または500個または少なくとも250個または少なくとも100個または少なくとも10個のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体毎に、少なくとも約1つのSC-β細胞を含む組成物が産生され得る。

20

30

【0384】

本発明の更なる実施形態は、内在性のβ細胞の少なくとも1つの特徴を提示する、ヒト細胞、例えば、ヒトSC-β細胞を含む、組成物、例えば、細胞培養物または細胞集合に関する。

【0385】

本発明の好ましい実施形態は、SC-β細胞の細胞培養物及び／または細胞集合は、非組換え細胞であるヒトSC-β細胞を含む。このような実施形態では、前記細胞培養物及び／または細胞集合は、組換えヒトSC-β細胞を欠いているか、または、実質的に含まない。

40

【0386】

β細胞成熟因子

【0387】

本開示の態様は、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、β細胞成熟因子と接触させて、例えば、SC-β細胞（例えば、成熟膵臓β細胞）への前記インスリン陽性内分泌細胞の成熟またはその前駆体の分化を誘導することを含む。前記「β細胞成熟因子」の用語は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への変換を促進または同変換に関与する作用剤を意味する。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、多能性細胞（例えば、iPSCまたはhESC）の成体型内胚葉細胞への分化を誘導する。一部の実施形態で

50

は、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、成体型内胚葉細胞の原腸管細胞への分化を誘導する。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、原腸管細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、Pdx1陽性膵臓始原細胞のNKX6-1陽性膵臓始原細胞への分化を誘導する。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、NKX6-1陽性膵臓始原細胞のインスリン陽性分泌細胞への分化を誘導する。一部の実施形態では、前記β細胞成熟因子は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、インスリン陽性分泌細胞のSC-β細胞への成熟を誘導する。

10

【0388】

一般的には、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子は、単独で、または、他のβ細胞成熟因子との組合せで使用されて、本願明細書に開示された方法に基づいてSC-β細胞を生成し得る。一部の実施形態では、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10個の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子が、SC-β細胞の生成方法に使用される。

【0389】

形質転換成長因子β (TGF-β) スーパーファミリー

【0390】

20

本開示の態様は、β細胞成熟因子としての形質転換成長因子β (TGF-β) スーパーファミリーからの成長因子の使用に関する。前記「TGF-βスーパーファミリー」は、公知のTGFβファミリーメンバーの構造的及び機能的特徴を有するタンパク質を意味する。前記TGFβファミリーのタンパク質は、構造的及び機能的な観点の両方から十分特徴付けられる。前記TGFβシリーズのタンパク質としては、インヒビン（例えば、インヒビンA及びインヒビンB）、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB及びアクチビンAB）、MIS (Mullerian阻害性物質)、BMP (骨形態形成タンパク質)、dpp (デカペンタプレジック)、Vg-1、MNSF (モノクローナル非特異的抑制因子) 等があげられる。このファミリーのタンパク質の活性は、種々の細胞質における特定の受容体への特異的な結合性に基づいている。このファミリーのメンバーは、特にC-末端において、配列同一性の領域を共有する。前記領域は、その機能に関連する。前記TGFβファミリーは、100個より多くの区別できるタンパク質を含み、全てが、アミノ酸配列同一性の少なくとも1つの領域を共有する。前記ファミリーのメンバーとしては、制限されず、そのGenBankアクセッション番号により特定された下記タンパク質があげられる。

30

P07995, P18331, P08476, Q04998,
P03970, P43032, P55102, P27092, P42917,
P09529, P27093, P04088, Q04999, P17491,
P55104, Q9WUK5, P55103, O88959, O08717,
P58166, O61643, P35621, P09534, P48970,
Q9NR23, P25703, P30884, P12643, P49001,
P21274, O46564, O19006, P22004, P20722,
Q04906, Q07104, P30886, P18075, P23359,
P22003, P34821, P49003, Q90751, P21275,
Q06826, P30885, P34820, Q29607, P12644,
Q90752, O46576, P27539, P48969, Q26974,
P07713, P91706, P91699, P27091, O42222,
Q24735, P20863, O18828, P55106, Q9PTQ2,
O14793, O08689, O42221, O18830, O18831,
O18836, O35312, O42220, P43026, P43027,
P43029, O95390, Q9R229, O93449, Q9Z1W4,

40

50

Q9BDW8, P43028, Q7Z4P5, P50414, P17246,
 P54831, P04202, P01137, P09533, P18341,
 O19011, Q9Z1Y6, P07200, Q9Z217, O95393,
 P55105, P30371, Q9MZE2, Q07258, Q96S42,
 P97737, AAA97415. 1, NP-776788. 1, NP-058
 824. 1, EAL24001. 1, 1S4Y, NP-001009856. 1,
 NP-032406. 1, NP-999193. 1, XP-519063. 1,
 AAG17260. 1, CAA40806. 1, NP-001009458. 1,
 AAQ55808. 1, AAK40341. 1, AAP33019. 1, AAK2
 1265. 1, AAC59738. 1, CAI46003. 1, B40905, 10
 AAQ55811. 1, AAK40342. 1, XP-540364. 1, P55
 102, AAQ55810. 1, NP-990727. 1, CAA51163. 1
 , AAD50448. 1, JC4862, PN0504, BAB17600. 1
 , AAH56742. 1, BAB17596. 1, CAG06183. 1, CA
 G05339. 1, BAB17601. 1, CAB43091. 1, A36192
 , AAA49162. 1, AAT42200. 1, NP-789822. 1, A
 AA59451. 1, AAA59169. 1, XP-541000. 1, NP-9
 90537. 1, NP-002184. 1, AAC14187. 1, AAP833
 19. 1, AAA59170. 1, BAB16973. 1, AAM66766. 1
 , WFPGBB, 1201278C, AAH30029. 1, CAA49326 20
 . 1, XP-344131. 1, AAH48845. 1, XP-148966. 3
 , I48235, B41398, AAH77857. 1, AAB26863. 1
 , 1706327A, BAA83804. 1, NP-571143. 1, CAG
 00858. 1, BAB17599. 1, BAB17602. 1, AAB6146
 8. 1, PN0505, PN0506, CAB43092. 1, BAB1759
 8. 1, BAA22570. 1, BAB16972. 1, BAC81672. 1,
 BAA12694. 1, BAA08494. 1, B36192, C36192,
 BAB16971. 1, NP-034695. 1, AAA49160. 1, CA
 A62347. 1, AAA49161. 1, AAD30132. 1, CAA582
 90. 1, NP-005529. 1, XP-522443. 1, AAM27448 30
 . 1, XP-538247. 1, AAD30133. 1, AAC36741. 1,
 AAH10404. 1, NP-032408. 1, AAN03682. 1, XP
 -509161. 1, AAC32311. 1, NP-651942. 2, AAL5
 1005. 1, AAC39083. 1, AAH85547. 1, NP-57102
 3. 1, CAF94113. 1, EAL29247. 1, AAW30007. 1,
 AAH90232. 1, A29619, NP-001007905. 1, AAH
 73508. 1, AAD02201. 1, NP-999793. 1, NP-990
 542. 1, AAF19841. 1, AAC97488. 1, AAC60038.
 1, NP 989197. 1, NP-571434. 1, EAL41229. 1,
 AAT07302. 1, CAI19472. 1, NP-031582. 1, AA 40
 A40548. 1, XP-535880. 1, NP-037239. 1, AAT7
 2007. 1, XP-418956. 1, CAA41634. 1, BAC3086
 4. 1, CAA38850. 1, CAB81657. 2, CAA45018. 1,
 CAA45019. 1, BAC28247. 1, NP-031581. 1, NP
 -990479. 1, NP-999820. 1, AAB27335. 1, S453
 55, CAB82007. 1, XP-534351. 1, NP-058874. 1
 , NP-031579. 1, 1REW, AAB96785. 1, AAB4636
 7. 1, CAA05033. 1, BAA89012. 1, 1ES7, AAP20
 870. 1, BAC24087. 1, AAG09784. 1, BAC06352.
 1, AAQ89234. 1, AAM27000. 1, AAH30959. 1, C 50

AG01491. 1, NP-571435. 1, 1REU, AAC60286. 1
 , BAA24406. 1, A36193, AAH55959. 1, AAH546
 47. 1, AAH90689. 1, CAG09422. 1, BAD16743. 1
 , NP-032134. 1, XP-532179. 1, AAB24876. 1,
 AAH57702. 1, AAA82616. 1, CAA40222. 1, CAB9
 0273. 2, XP-342592. 1, XP-534896. 1, XP-534
 462. 1, 1LXI, XP-417496. 1, AAF34179. 1, AA
 L73188. 1, CAF96266. 1, AAB34226. 1, AAB338
 46. 1, AAT12415. 1, AAO33819. 1, AAT72008. 1
 , AAD38402. 1, BAB68396. 1, CAA45021. 1, AA 10
 B27337. 1, AAP69917. 1, AAT12416. 1, NP-571
 396. 1, CAA53513. 1, AAO33820. 1, AAA48568.
 1, BAC02605. 1, BAC02604. 1, BAC02603. 1, B
 AC02602. 1, BAC02601. 1, BAC02599. 1, BAC02
 598. 1, BAC02597. 1, BAC02595. 1, BAC02593.
 1, BAC02592. 1, BAC02590. 1, AAD28039. 1, A
 AP74560. 1, AAB94786. 1, NP-001483. 2, XP-5
 28195. 1, NP-571417. 1, NP-001001557. 1, AA
 H43222. 1, AAM33143. 1, CAG10381. 1, BAA311
 32. 1, EAL39680. 1, EAA12482. 2, P34820, AA 20
 P88972. 1, AAP74559. 1, CAI16418. 1, AAD305
 38. 1, XP-345502. 1, NP-038554. 1, CAG04089
 . 1, CAD60936. 2, NP-031584. 1, B55452, AAC
 60285. 1, BAA06410. 1, AAH52846. 1, NP-0315
 80. 1, NP-036959. 1, CAA45836. 1, CAA45020.
 1, Q29607, AAB27336. 1, XP-547817. 1, AAT1
 2414. 1, AAM54049. 1, AAH78901. 1, AAO25745
 . 1, NP-570912. 1, XP-392194. 1, AAD20829. 1
 , AAC97113. 1, AAC61694. 1, AAH60340. 1, AA
 R97906. 1, BAA32227. 1, BAB68395. 1, BAC028 30
 95. 1, AAW51451. 1, AAF82188. 1, XP-544189.
 1, NP-990568. 1, BAC80211. 1, AAW82620. 1,
 AAF99597. 1, NP-571062. 1, CAC44179. 1, AAB
 97467. 1, AAT99303. 1, AAD28038. 1, AAH5216
 8. 1, NP-001004122. 1, CAA72733. 1, NP-0321
 33. 2, XP-394252. 1, XP-224733. 2, JH0801,
 AAP97721. 1, NP-989669. 1, S43296, P43029,
 A55452, AAH32495. 1, XP-542974. 1, NP-032
 135. 1, AAK30842. 1, AAK27794. 1, BAC30847.
 1, EAA12064. 2, AAP97720. 1, XP-525704. 1, 40
 AAT07301. 1, BAD07014. 1, CAF94356. 1, AAR2
 7581. 1, AAG13400. 1, AAC60127. 1, CAF92055
 . 1, XP-540103. 1, AAO20895. 1, CAF97447. 1,
 AAS01764. 1, BAD08319. 1, CAA10268. 1, NP-
 998140. 1, AAR03824. 1, AAS48405. 1, AAS484
 03. 1, AAK53545. 1, AAK84666. 1, XP-395420.
 1, AAK56941. 1, AAC47555. 1, AAR88255. 1, E
 AL33036. 1, AAW47740. 1, AAW29442. 1, NP-72
 2

813. 1, AAR08901. 1, AAO15420. 2, CAC59700. 1, AAL26886. 1, AAK71708. 1, AAK71707. 1, CAC51427. 2, AAK67984. 1, AAK67983. 1, AAK28706. 1, P07713, P91706, P91699, CAG02450. 1, AAC47552. 1, NP-005802. 1, XP-343149. 1, AW34055. 1, XP-538221. 1, AAR27580. 1, XP-125935. 3, AAF21633. 1, AAF21630. 1, AAD05267. 1, Q9Z1W4, NP-031585. 2, NP-571094. 1, CAD43439. 1, CAF99217. 1, CAB63584. 1, NP-722840. 1, CAE46407. 1, XP-417667. 1, BAC53989. 1, BAB19659. 1, AAM46922. 1, AAA81169. 1, AAK28707. 1, AAL05943. 1, AAB17573. 1, CAH25443. 1, CAG10269. 1, BAD16731. 1, EAA00276. 2, AAT07320. 1, AAT07300. 1, AAN15037. 1, CAH25442. 1, AAK08152. 2, 2009388A, AAR12161. 1, CAG01961. 1, CAB63656. 1, CAD67714. 1, CAF94162. 1, NP-477340. 1, EAL24792. 1, NP-001009428. 1, AAB86686. 1, AAT40572. 1, AAT40571. 1, AAT40569. 1, NP-033886. 1, AAB49985. 1, AAG39266. 1, Q26974, AAC77461. 1, AAC47262. 1, BAC05509. 1, NP-055297. 1, XP-546146. 1, XP-525772. 1, NP-060525. 2, AAH33585. 1, AAH69080. 1, CAG12751. 1, AAH74757. 2, NP-034964. 1, NP-038639. 1, O42221, AAF02773. 1, NP-062024. 1, AAR18244. 1, AAR14343. 1, XP-228285. 2, AAT40573. 1, AAT94456. 1, AAL35278. 1, AAL35277. 1, AAL17640. 1, AAC08035. 1, AAB86692. 1, CAB40844. 1, BAC38637. 1, BAB16046. 1, AAN63522. 1, NP-571041. 1, AAB04986. 2, AAC26791. 1, AAB95254. 1, BAA11835. 1, AAR18246. 1, XP-538528. 1, BAA31853. 1, AAK18000. 1, XP-420540. 1, AAL35276. 1, AAQ98602. 1, CAE71944. 1, AAW50585. 1, AAV63982. 1, AAW29941. 1, AAN87890. 1, AAT40568. 1, CAD57730. 1, AAB81508. 1, AAS00534. 1, AAC59736. 1, BAB79498. 1, AAA97392. 1, AAP85526. 1, NP-999600. 2, NP-878293. 1, BAC82629. 1, CAC60268. 1, CAG04919. 1, AAN10123. 1, CAA07707. 1, AAK20912. 1, AAR88254. 1, CAC34629. 1, AAL35275. 1, AAD46997. 1, AAN03842. 1, NP-571951. 2, CAC50881. 1, AAL99367. 1, AAL49502. 1, AAB71839. 1, AAB65415. 1, NP-624359. 1, NP-990153. 1, AAF78069. 1, AAK49790. 1, NP-919367. 2, NP-001192. 1, XP-544948. 1, AAQ18013. 1, AAV38739. 1, NP-851298. 1, CAA67685. 1, AAT67171. 1, AAT37502. 1, AAD27804. 1, AAN76665. 1, BAC11909. 1, XP-421648. 1, CAB63704. 1, NP-037306. 1, A55706, AAF02780. 1, CAG09623. 1, NP-06

7589.1, NP-035707.1, AAV30547.1, AAP49817.1, BAC77407.1, AAL87199.1, CAG07172.1, B36193, CAA33024.1, NP-001009400.1, AAP36538.1, XP-512687.1, XP-510080.1, AAH05513.1, 1KTZ, AAH14690.1, AAA31526.1.

【0391】

少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、TGF-βスーパーファミリーからの任意の成長因子が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

10

【0392】

前記TGF-βからの前記成長因子は、天然から得ることができ、または、組換え体であることができる。一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、アクチビンAを含む。前記「アクチビンA」の用語は、アクチビンAのフラグメント及び誘導体を含む。典型的なアクチビンAの配列は、米国特許出願公開第2009/0155218号明細書（「218公報」）に、配列番号1として開示されている。アクチビンAの他の非限定的な例は、前記「218公報」の配列番号2-16に提供される。アクチビンAをコードする核酸の非限定的な例は、前記「218公報」の配列番号33-34に提供される。一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、前記「218公報」の配列番号1に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

20

【0393】

一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、成長分化因子8（GDF8）を含む。前記「GDF8」の用語は、GDF8のフラグメント及び誘導体を含む。前記GDF8ポリペプチドの配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、ヒトGDF8ポリペプチド配列（GenBankアクセッション EAX10880）に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

30

【0394】

一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、GDF8に密接に関連する成長因子、例えば、成長分化因子11（GDF11）を含む。前記GDF11のポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記成長因子は、ヒトGDF11のポリペプチド配列（GenBankアクセッション AAF21630）に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

40

【0395】

特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、TGF-βスーパーファミリーからの少なくとも1つの成長因子を除外する。

【0396】

一部の実施形態では、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、前記TGF-βスーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子に類似する作用剤により置き換えられ得る。前記TGF-βスーパーファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子に類似する典型的な作用剤としては、制限されず、IDE1及びIDE2があげられる。

50

【0397】

TGF-βシグナル伝達経路阻害剤

【0398】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのTGF-βシグナル伝達経路阻害剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、任意のTGF-βシグナル伝達経路阻害剤が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、TGF-βシグナル伝達経路阻害剤を除外する。

【0399】

一部の実施形態では、TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β受容体I型キナーゼ(TGF-βRI)シグナル伝達を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤II(CAS 446859-33-2、TGF-βRIキナーゼのATP競合阻害剤、RepSoxとしても公知、IUPAC名: 2-[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル]-1,5-ナフチリジン)を含む。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、Alk5阻害剤IIの類似体または誘導体である。

【0400】

一部の実施形態では、前記Alk5阻害剤IIの類似体または誘導体は、米国特許出願公開第2012/0021519号明細書に記載された式Iの化合物である。同特許は、その全体が参照により本願明細書に組み込まれる。

【0401】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、米国特許出願公開第2010/0267731号明細書に記載されたTGF-β受容体阻害剤である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、米国特許出願公開第2009/0186076号及び同第2007/0142376号明細書に記載されたALK5阻害剤を含む。

【0402】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、A83-01である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、A83-01でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、A83-01を除外する。

【0403】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、SB431542である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、SB431542でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、SB431542を除外する。

【0404】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、D4476である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、D4476でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、D4476を除外する。

【0405】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、GW788388である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、GW788388でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、GW788388を除外する。

【0406】

一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、LY364947である。一部の実施形態では、前記TGF-βシグナル伝達経路阻害剤は、LY364947でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、LY364

10

20

30

40

50

947を除外する。

【0407】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、LY580276である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、LY580276でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、LY580276を除外する。

【0408】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SB525334である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SB525334でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、SB525334を除外する。

10

【0409】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SB505124である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SB505124でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、SB505124を除外する。

【0410】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SD208である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、SD208でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、SD208を除外する。

20

【0411】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、GW6604である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、GW6604でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、GW6604を除外する。

【0412】

一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、GW788388である。一部の実施形態では、前記TGF- β シグナル伝達経路阻害剤は、GW788388でない。一部の実施形態では、本願明細書に記載された組成物及び方法は、GW788388を除外する。

30

【0413】

上記された化合物の選択から、下記のことを種々のソースから得ることができる。Sigma, P. O. Box 14508, St. Louis, Mo., 63178-9916から入手できる、LY-364947、SB-525334、SD-208及びSB-505124; Calbiochem (EMD Chemicals, Inc.), 480 S. Democrat Road, Gibbstown, N. J., 08027から入手できる、616452及び616453; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex, TW8 9GS, United Kingdomから入手できる、GW788388及びGW6604; Lilly Research, Indianapolis, Ind. 46285から入手できる、LY580276; 並びに、Biogen Idec, P. O. Box 14627, 5000 Davis Drive, Research Triangle Park, N. C., 27709-4627から入手できる、SM16。

40

【0414】

WNTシグナル伝達経路

【0415】

本開示の態様は、 β 細胞成熟因子としてのWNTシグナル伝達経路アクチベータの使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC- β 細胞への分化を誘導可能な、任意のWNTシグナル伝達経路アクチベータが、単独で、または

50

、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

【0416】

一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、CHIR99021を含む。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、CHIR99021の誘導体、例えば、CHIR99021の塩、例えば、CHIR99021の三塩酸塩、塩酸塩を含む。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、Wnt3a組換えタンパク質を含む。一部の実施形態では、前記WNTシグナル伝達経路アクチベータは、グリコゲン合成酵素キナーゼ3（GSK3）阻害剤を含む。典型的なGSK3阻害剤としては、制限されず、3F8、A1070722、AR-A014418、BIO、BIO-アセトキシム、FRATide、10Z-Hymenialdisine、インジルピン-3'オキシム、ケンパウロン、L803、L803-mts、炭酸リチウム、NSC693868、SB216763、SB415286、TC-G24、TCS2002、TCS21311、TWS119及びこれらのいずれかの類似体または誘導体があげられる。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、WNTシグナル伝達経路アクチベータを除外する。

10

【0417】

繊維芽細胞成長因子（FGF）ファミリー

【0418】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのFGFファミリーからの成長因子の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、FGFファミリーからの任意の成長因子が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、FGFファミリーからの成長因子を除外する。

20

【0419】

一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ケラチノサイト成長因子（KGF）を含む。前記KGFのポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記成長因子は、ヒトKGFのポリペプチド配列（GenBankアクセッション AAB21431）に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

30

【0420】

一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、FGF2を含む。前記FGF2のポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記成長因子は、ヒトFGF2のポリペプチド配列（GenBankアクセッション NP_001997）に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

40

【0421】

一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、FGF8Bを含む。前記FGF8Bのポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記FGFファミリーからの前記成長因子は、ヒトFGF8Bのポリペプチド配列（GenBankアクセッション AAB40954）に対して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0422】

50

一部の実施形態では、前記 FGFファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、FGF10 を含む。前記 FGF10 のポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記 FGFファミリーからの前記成長因子は、ヒト FGF10 のポリペプチド配列 (GenBank アクセション CAG46489) に対して、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 99% 以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0423】

一部の実施形態では、前記 FGFファミリーからの前記少なくとも 1 つの成長因子は、FGF21 を含む。前記 FGF21 のポリペプチド配列は、当業者に利用可能である。一部の実施形態では、前記 FGFファミリーからの前記成長因子は、ヒト FGF21 のポリペプチド配列 (GenBank アクセション AAQ89444.1) に対して、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 99% 以上同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0424】

骨形態形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達経路阻害剤

【0425】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としての BMP シグナル伝達経路阻害剤の使用に関する。BMP シグナル伝達ファミリーは、前記 TGF-β スーパーファミリーの種々の部分集合である (Seibald et al., Biol. Chem., 385:697-710, 2004)。20 個を超える公知の BMP リガンドが、3 つの区別できる I 型 (BMPRII, ActRIIa 及び ActRIIb) 並びに、少なくとも 3 つの I 型 (ALK2, ALK3 及び ALK6) の受容体により認識される。二量体リガンドは、二量体ヘテロマーの構築を促進し、構成的に活性な I 型受容体セリン/スレオニンキナーゼが I 型受容体セリン/スレオニンキナーゼをリン酸化するのを可能にする。活性化された I 型受容体は、BMP 応答性 (BR-) SMAD エフェクタ (SMAD1, 5 及び 8) をリン酸化して、TGF シグナル伝達も促進する、SMAD4、co-SMAD との複合体において、核内移行を促進する。さらに、BMP シグナルは、SMAD 依存法で、細胞内エフェクタ、例えば、MAPK p38 を活性化し得る (Nohe et al., Cell Signal 16:291-299, 2004)。可溶性 BMP アンタゴニスト、例えば、ノギン、コーディン、gremlin 及びフォリスタチンは、リガンド隔離により、BMP シグナル伝達を制限する。

【0426】

少なくとも 1 つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体の SC-β 細胞への分化を誘導可能な、任意の BMP シグナル伝達経路阻害剤が、単独で、または、1 つ以上の他の β 細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。本願明細書に記載された任意の態様における特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、BMP シグナル伝達経路阻害剤を除外する。

【0427】

一部の実施形態では、前記 BMP シグナル伝達経路阻害剤は、LDN193189 (LDN193189、1062368-24-4、LDN-193189、DM3189、DM-3189 としても公知、IUPAC 名: 4-[6-(4-ピペラジン-1-イルフェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]キノロン) を含む。

【0428】

一部の実施形態では、前記 BMP シグナル伝達経路阻害剤は、LDN193189 の類似体もしくは誘導体、例えば、塩、水和物、溶媒和物、エステル、または、LDN193189 のプロドラッグを含む。一部の実施形態では、LDN193189 の誘導体 (例えば、塩) は、LDN193189 の塩酸塩を含む。

【0429】

一部の実施形態では、前記BMPシグナル伝達経路阻害剤は、米国特許出願公開第2011/0053930号明細書からの式Iの化合物を含む。

【0430】

ソニックヘッジホッグ(SHH)シグナル伝達経路

【0431】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのSHHシグナル伝達経路阻害剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、任意のSHHシグナル伝達経路阻害剤が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

10

【0432】

一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、Sant1を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、SANT2を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、SANT3を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、SANT4を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、Cur61414を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、フォスコリンを含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、トマチジンを含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、AY9944を含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、トリパラノールを含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、(米国特許出願公開第2004/0060568号明細書に開示された)化合物Aまたは化合物Bを含む。一部の実施形態では、前記SHHシグナル伝達経路阻害剤は、米国特許出願公開第2006/0276391号明細書に開示された、ヘッジホッグシグナル伝達経路を遮断するステロイド系アルカロイド(例えば、シクロパミンまたはその誘導体)を含む。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、SHHシグナル伝達経路阻害剤を除外する。

20

【0433】

レチノイン酸シグナル伝達経路

【0434】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのレチノイン酸シグナル伝達の調節剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を、単独あるいは1つまたは複数の他のβ細胞変異体要素と一緒にのいずれかで誘導可能な、レチノイン酸シグナル伝達の任意の調節剤が、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

30

【0435】

一部の実施形態では、前記レチノイン酸シグナル伝達の調節剤は、レチノイン酸シグナル伝達のアクチベータを含む。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、レチノイン酸を含む。一部の実施形態では、前記RAシグナル伝達経路アクチベータは、レチノイン酸受容体アゴニストを含む。典型的なレチノイン酸受容体アゴニストとしては、制限されず、CD1530、AM580、TTNPB、CD437、Ch55、BMS961、AC261066、AC55649、AM80、BMS753、タザロテン、アダパレン及びCD2314があげられる。

40

【0436】

一部の実施形態では、前記レチノイン酸シグナル伝達の調節剤は、前記レチノイン酸シグナル伝達の阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記レチノイン酸シグナル伝達経路阻害剤は、DEAB(IUPAC名: 2-[2-(ジエチルアミノ)エトキシ]-3-プロップ-2-エニルベンズアルデヒド)を含む。一部の実施形態では、前記レチノイン酸シグナル伝達経路阻害剤は、DEABの類似体または誘導体を含む。

【0437】

50

一部の実施形態では、前記レチノイン酸シグナル伝達経路阻害剤は、レチノイン酸受容体アンタゴニストを含む。一部の実施形態では、前記レチノイン酸受容体アンタゴニストは、(E)-4-[2-(5,6-ジヒドロ-5,5-ジメチル-8-フェニル-2-ナフタレニル)エテニル]安息香酸、(E)-4-[[(5,6-ジヒドロ-5,5-ジメチル-8-フェニルエチニル)-2-ナフタレニル]エテニル]安息香酸、(E)-4-[2-[5,6-ジヒドロ-5,5-ジメチル-8-(2-ナフタレニル)-2-ナフタレニル]エテニル]-安息香酸及び(E)-4-[2-[5,6-ジヒドロ-5,5-ジメチル-8-(4-メトキシフェニル)-2-ナフタレニル]エテニル]安息香酸を含む。一部の実施形態では、前記レチノイン酸受容体アンタゴニストは、BMS 195614 (CAS# 253310-42-8)、ER50891 (CAS# 187400-85-7)、BMS 493 (CAS# 170355-78-9)、CD2665 (CAS# 170355-78-9)、LE135 (CAS# 155877-83-1)、BMS 453 (CAS# 166977-43-1) または MM11253 (CAS# 345952-44-5) を含む。

【0438】

特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、レチノイン酸シグナル伝達の調節剤を除外する。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、レチノイン酸シグナル伝達経路アクチベータを除外する。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、レチノイン酸シグナル伝達経路阻害剤を除外する。

【0439】

プロテインキナーゼC

【0440】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのプロテインキナーゼCアクチベータの使用に関する。プロテインキナーゼCは、プロテインキナーゼ酵素の最も大きなファミリーの1つであり、各種のアイソフォームから構成される。従来のアイソフォームとしては、βI、βII、γがあげられる；新規なアイソフォームとしては、δ、ε、η、θがあげられる；異型のアイソフォームとしては、ξ及びι/λがあげられる。PKC酵素は、主に細胞質に存在するが、活性化された際に膜に移行する。細胞質では、PKCは、他のキナーゼまたは自己リン酸化によりリン酸化されている。活性化されるためには、一部のPKCアイソフォーム（例えば、PKC-ε）は、ジアシルグリセロール（「DAG」）結合部位またはホスファチジルセリン（「PS」）結合部位に結合する分子が必要である。他のものは、任意の二次結合メッセンジャを全く必要とせずに活性化され得る。前記DAG部位に結合するPKCアクチベータとしては、制限されず、ブリオスタチン、ピコログ、ホルボールエステル、アプリアトキシン及びグニジマクリンがあげられる。前記PS部位に結合するPKCアクチベータとしては、制限されず、多不飽和脂肪酸及びその誘導体があげられる。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、任意のプロテインキナーゼCアクチベータが、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

【0441】

一部の実施形態では、前記PKCアクチベータは、PdbUを含む。一部の実施形態では、前記PKCアクチベータは、TPBを含む。一部の実施形態では、前記PKCアクチベータは、シクロプロパン化多不飽和脂肪酸、シクロプロパン化単不飽和脂肪酸、シクロプロパン化多不飽和脂肪アルコール、シクロプロパン化単不飽和脂肪アルコール、シクロプロパン化多不飽和脂肪酸エステル、シクロプロパン化単不飽和脂肪酸エステル、シクロプロパン化多不飽和脂肪酸硫酸塩、シクロプロパン化単不飽和脂肪酸硫酸塩、シクロプロパン化多不飽和脂肪酸リン酸塩、シクロプロパン化単不飽和脂肪酸硫酸塩、マクロ環状ラクトン、DAG誘導体、イソプレノイド、オクチドリダクタムV、グニジマクリン、イリパリダル、インゲノール、ナフタレンスルホンアミド、ジアシルグリセロールキナーゼ阻

害剤、繊維芽細胞成長因子 18 (FGF-18)、インスリン成長因子、国際公開第 2013/071282 号パンフレットに記載されたホルモン及び成長因子アクチベータを含む。一部の実施形態では、前記ブリオスタチンは、ブリオスタチン-1、ブリオスタチン-2、ブリオスタチン-3、ブリオスタチン-4、ブリオスタチン-5、ブリオスタチン-6、ブリオスタチン-7、ブリオスタチン-8、ブリオスタチン-9、ブリオスタチン-10、ブリオスタチン-11、ブリオスタチン-12、ブリオスタチン-13、ブリオスタチン-14、ブリオスタチン-15、ブリオスタチン-16、ブリオスタチン-17 またはブリオスタチン-18 を含む。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、プロテインキナーゼ C アクチベータを除外する。

【0442】

γ-セクレターゼ阻害剤

【0443】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としての γ-セクレターゼ阻害剤の使用に関する。少なくとも 1 つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体の SC-β細胞への分化を誘導可能な、任意の γ-セクレターゼ阻害剤が、単独で、または、1 つ以上の他の β細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。数多くの γ-セクレターゼ阻害剤が公知である。一部の実施形態では、前記 γ-セクレターゼ阻害剤は、XXI を含む。一部の実施形態では、前記 γ-セクレターゼ阻害剤は、DAPT を含む。更なる典型的な γ-セクレターゼ阻害剤としては、制限されず、米国特許第 7,049,296 号、同第 8,481,499 号、同第 8,501,813 号明細書及び国際公開第 2013/052700 号パンフレットに記載された γ-セクレターゼ阻害剤があげられる。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、γ-セクレターゼ阻害剤を除外する。

【0444】

甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ

【0445】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としての甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータの使用に関する。少なくとも 1 つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の SC-β細胞への分化を誘導可能な、任意の甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータが、単独で、または、1 つ以上の他の β細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。本願明細書に記載された任意の態様における特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータを除外する。本願明細書に記載された任意の態様における特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、本願明細書に記載された T3 または T3 の類似体を除外する。

【0446】

一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、トリヨードチロニン (T3) を含む。一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、T3 の類似体または誘導體を含む。T3 の典型的な類似体としては、制限されず、選択的及び非選択的甲状腺模倣物、TRβ 選択的アゴニスト GC-1、GC-24、4-ヒドロキシ-PCB106、MB07811、MB07344、3,5-ジヨードチロプロパノ酸 (DITPA)；選択的 TR-β アゴニスト GC-1；3-ヨードチロナミン (T(1)AM) 及び 3,3',5-トリヨードチロ酢酸 (Triac) (ホルモンであるチロキシシン (T4) の生体活性代謝産物)；KB-2115 及び KB-141；チロナミン；SKF-L-94901；DIBIT；3'-AC-T2；(チロキシシン [T4] 及びトリヨードチロニン [T3] のアラニン鎖における酸化的脱アミノ化及び脱カルボキシル化による) テトラヨードチロ酢酸 (Tetrac) 及びトリヨードチロ酢酸 (Triac)、(T4 及び T3 の脱ヨード化による) 3,3',5'-トリヨードチロニン (rT3)、(T4、T3 及び rT3 の脱ヨード化による) 3,3'-ジヨードチロニン (3,3'-T2) 及び 3,5-ジヨードチロニン (T2) 並びに (T4 及び T

10

20

30

40

50

3の脱ヨード化及びアミノ酸の脱カルボキシル化による) 3-ヨードチロニン (T 1 A M) 及びチロニン (T O A M) 並びに、T Hの構造類似体、例えば、3, 5, 3'-トリヨードチロプロパン酸 (T r i p r o p)、3, 5-ジブロモ-3-ピリダジノン-1-チロニン (L-940901)、N-[3, 5-ジメチル-4-(4'-ヒドロキシ-3'-イソプロピルフェノキシ)-フェニル]-オキシム酸 (C G S 2 3 4 2 5)、3, 5-ジメチル-4-[(4'-ヒドロキシ-3'-イソプロピルベンジル)-フェノキシ] 酢酸 (G C-1)、3, 5-ジクロロ-4-[(4-ヒドロキシ-3-イソプロピルフェノキシ) フェニル] 酢酸 (K B-141) 及び3, 5-ジヨードチロプロパン酸 (D I T P A) があげられる。

【0447】

10

一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、T 3のプロドラッグまたはプロホルモン、例えば、T 4甲状腺ホルモン (例えば、チロキシンまたは、L-3, 5, 3', 5'-テトラヨードチロニン) を含む。

【0448】

一部の実施形態では、前記甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータは、米国特許第7, 163, 918号明細書に記載されたヨードチロニン組成物である。

【0449】

上皮成長因子 (E G F) ファミリー

【0450】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのE G Fファミリーからの成長因子の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のS C-β細胞への分化を誘導可能な、E G Fファミリーからの任意の成長因子が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。一部の実施形態では、前記E G Fファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、ベタセルリンを含む。一部の実施形態では、E G Fファミリーからの少なくとも1つの成長因子は、E G Fを含む。上皮成長因子 (E G F) は、大型の一体化膜タンパク質前駆体からタンパク質分解的に開裂される、53個のアミノ酸のサイトカインである。一部の実施形態では、前記E G Fファミリーからの前記成長因子は、米国特許第7, 084, 246号明細書に開示されたヒト野生型E G Fポリペプチド配列に対して、少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する変異型E G Fポリペプチド、例えば、単離された上皮成長因子ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、前記E G Fファミリーからの前記成長因子は、米国特許第8, 247, 531号明細書に開示された、E G F受容体に結合し、同受容体を刺激する操作されたE G F変異体を含む。一部の実施形態では、前記E G Fファミリーからの前記少なくとも1つの成長因子は、前記E G Fファミリーにおけるシグナル伝達経路を活性化する作用剤により置き換えられる。一部の実施形態では、前記E G Fファミリーからの前記成長因子は、E G Fを模倣する化合物を含む。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、E G Fファミリーからの成長因子を除外する。

20

30

【0451】

プロテインキナーゼ阻害剤

40

【0452】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのプロテインキナーゼ阻害剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のS C-β細胞への分化を誘導可能な、任意のプロテインキナーゼ阻害剤が、単独で、または、他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

【0453】

一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンを含む。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、スタウロスポリンの類似体を含む。スタウロスポリンの典型的な類似体としては、制限されず、R o-31-8220、ビ

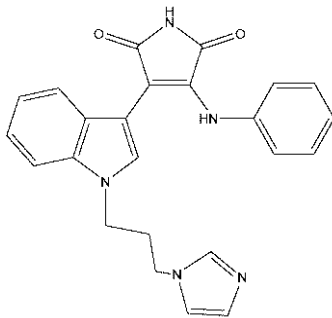
50

スインドリルマレイミド (Bis) 化合物、10'-{5''-[(メトキシカルボニル) アミノ] -2''-メチル} -フェニルアミノカルボニルスタウロスポリン、スタラログ (例えば、Lopez et al., 「Staurosporine-derivative inhibitors broaden the scope of analog-sensitive kinase technology」, J. Am. Chem. Soc. 2013; 135 (48): 18153-18159 を参照のこと。) 及び cgp41251 があげられる。

【0454】

一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、PKC β 阻害剤である。一部の実施形態では、前記プロテインキナーゼ阻害剤は、下記構造を有する PKC β 阻害剤または下記化合物の誘導体、類似体もしくは変異体である。

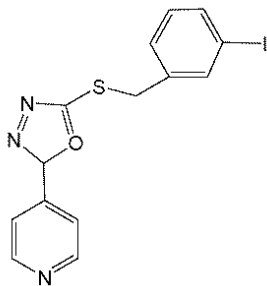
【化4】



【0455】

一部の実施形態では、前記 PKC β 阻害剤は、下記構造を有する GSK-2 化合物または下記化合物の誘導体、類似体もしくは変異体である。

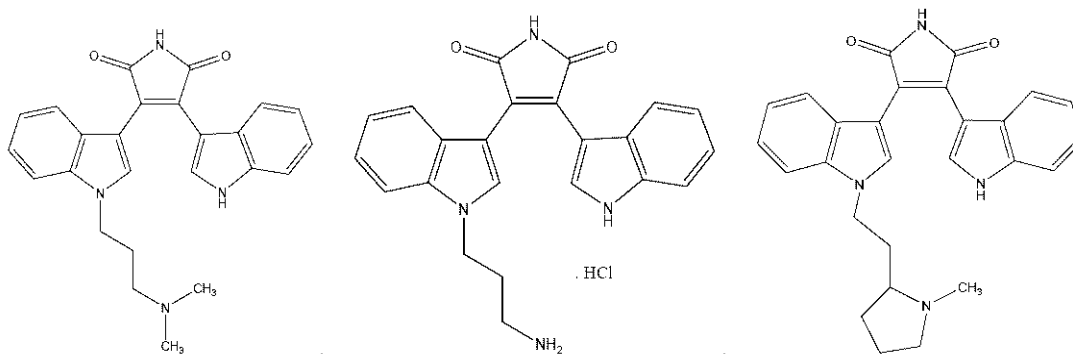
【化5】



【0456】

一部の実施形態では、前記 PKC 阻害剤は、ビスインドリルマレイミドである。典型的なビスインドリルマレイミドとしては、制限されず、ビスインドリルマレイミド I、ビスインドリルマレイミド II、ビスインドリルマレイミド III、塩酸塩または誘導体、類似体もしくは変異体があげられる。一部の実施形態では、それらの誘導体または変異体または類似体は、

【化6】



10

20

30

40

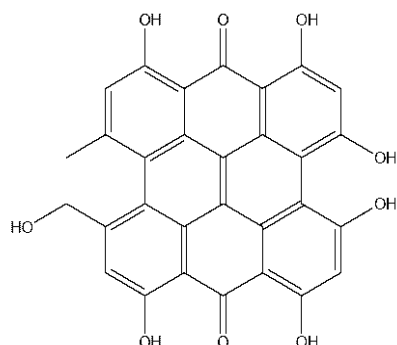
50

から選択される化合物から選択される化合物の類似体の誘導体または変異体から選択される。

【0457】

一部の実施形態では、前記PKC阻害剤は、シュードヒペリシンまたは下記化合物の誘導体、類似体もしくは変異体である。

【化7】

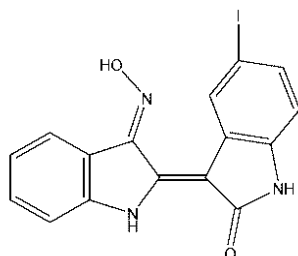


10

【0458】

一部の実施形態では、前記PKC阻害剤は、インドルビン-3-モノオキシム、5-インドまたは下記化合物の誘導体、類似体もしくは変異体である。

【化8】



20

【0459】

特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、プロテインキナーゼ阻害剤を除外する。

30

【0460】

嚢胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）阻害剤

【0461】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのCFTR阻害剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、任意のCFTR阻害剤が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。

【0462】

本願明細書において有用な数多くのCFTR阻害剤が、当業者に利用可能である。典型的なCFTR阻害剤としては、制限されず、米国特許出願公開第2007/007811号明細書に開示された、LPA2受容体アゴニストであるCFTR阻害剤、米国特許第7,888,332号明細書に開示された、ヒドラジン含有CFTR阻害剤、及び、国際公開第2008/121877号パンフレットに開示されたCFTR阻害剤、米国特許出願公開第2008/0269206号明細書に開示されたCFTR阻害剤化合物があげられる。一部の実施形態では、前記CFTR阻害剤は、グリシン・ヒドラジン空隙閉鎖CFTR阻害剤を含む。一部の実施形態では、前記CFTR阻害剤は、Gly-H101を含む。一部の実施形態では、前記CFTR阻害剤は、Gly-H101の誘導体または類似体を含む（例えば、Muanprasat et al., 「Discovery of Glycine Hydrazide Pore-occluding CFTR

40

50

Inhibitors」, J. Gen. Physiol 2004;124(2):125-137を参照のこと。)。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、CFT R阻害剤を除外する。

【0463】

O-GlcNAcase阻害剤

【0464】

本開示の態様は、β細胞成熟因子としてのO-GlcNAcase阻害剤の使用に関する。少なくとも1つのインスリン産生内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化を誘導可能な、任意のO-GlcNAcase阻害剤が、単独で、または、1つ以上の他のβ細胞成熟因子との組合せでのいずれかで、本願明細書に記載された方法、組成物及びキットに使用され得ることが考慮される。本願明細書において有用な数多くのO-GlcNAcase阻害剤が、当業者に利用可能である。典型的なO-GlcNAcase阻害剤としては、制限されず、透過性グリコシダーゼ阻害剤（例えば、国際公開第2013/169576号及び同第2013/166654号パンフレットを参照のこと。）及び選択的グリコシダーゼ阻害剤（例えば、国際公開第2013/000084号及び同第2013/000085号パンフレットを参照のこと。）があげられる。一部の実施形態では、前記O-GlcNAcase阻害剤は、Thiamet Gを含む。特定の実施形態では、本願明細書に開示された方法、組成物及びキットは、O-GlcNAcase阻害剤を除外する。

【0465】

混合組成物

【0466】

本発明の別の態様は、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体と、例えば、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体がSC-β細胞になる分化を誘導する少なくとも1つのβ細胞成熟因子との混合物に関する。

【0467】

本発明の別の態様は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体（例えば、SC-β細胞に分化させるためのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の集合）と、少なくとも1つのβ細胞成熟因子とを含む反応混合物等の組成物に関する。あるいは、本発明は、(i)インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体の集合のSC-β細胞への分化の化学的誘導により産生されたSC-β細胞の集合と、(ii)少なくとも1つのβ細胞成熟因子とを含む反応混合物に関する。

【0468】

一部の実施形態では、前記反応混合物に添加された前記少なくとも1つのβ細胞成熟因子の濃度は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が、本願明細書に記載されたSC-β細胞に分化するのを誘導するのに十分な用量である。

【0469】

一部の実施形態では、前記組成物は、約25 nMから10 μMの間または約25 nMから50 nMまたは約50 nMから100 nMまたは約100 nMから200 nMまたは約200 nMから約500 nMまたは約500 nMから約1 μMまたは約1 μMから2 μMまたは約2 μMから5 μMまたは約5 μMから10 μMの間の濃度の、少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含む。

【0470】

一部の実施形態では、組成物または混合物は、少なくとも約5 nM、少なくとも約7 nM、少なくとも約10 nM、少なくとも約12 nM、少なくとも約15 nM、少なくとも約17 nM、少なくとも約20 nM、少なくとも約25 nM、少なくとも約30 nM、少なくとも約35 nM、少なくとも約40 nM、少なくとも約45 nM、少なくとも約50 nM、少なくとも約100 nMまたは少なくとも約200 nMまたは少なくとも約300 nMまたは少なくとも約400 nMまたは少なくとも約500 nMまたは500 nMを超える濃度、または、10-500 nMの間の任意の整数または5-50 nMの間の任意の

整数または50-100 nMの間の任意の整数または100 nM-200 nMの間の任意の整数または200 nM-500 nMの間の任意の整数の濃度の、少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、組成物または混合物は、少なくとも約0.1 μMまたは少なくとも約0.2 μMまたは少なくとも約0.3 μMまたは少なくとも約0.4 μMまたは少なくとも約0.5 μMまたは少なくとも約1 μM、少なくとも約1.5 μM、少なくとも約2 μM、少なくとも約2.5 μM、少なくとも約3 μM、少なくとも約3.5 μM、少なくとも約4 μM、少なくとも約4.5 μM、少なくとも約5 μM、少なくとも約6 μM、少なくとも約7 μM、少なくとも約8 μM、少なくとも約9 μMまたは少なくとも約10 μMまたは10 μMを超える濃度、または、0.1-0.5 μMの間の任意の整数または約0.5-10 μMの間の任意の整数または0.1-10 μMの間の任意の整数または0.5-5 μMの間の任意の整数または5 μM-10 μMの間の任意の整数の濃度の、少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含む。

10

【0471】

組成物及びキット

【0472】

本願明細書において、本願明細書に記載された細胞（例えば、SC-β細胞または成熟膵臓β細胞）を含む組成物が記載される。一部の実施形態では、前記組成物は、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子及び／または細胞培養培地も含む。本願明細書において、本願明細書に記載された化合物を含む組成物（例えば、本願明細書に記載された1つ以上の化合物を含む細胞培養培地）も記載される。本願明細書において、キットが記載される。

20

【0473】

本発明の別の態様は、本願明細書に開示された方法を実施し、本願明細書に開示されたSC-β細胞または成熟膵臓β細胞を調製するためのキットに関する。一態様では、キットは、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体と、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子とを含み、場合により、前記キットは、さらに、本願明細書に記載された方法を使用して、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、SC-β細胞の集合に変換するための説明書を含み得る。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも2つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも3つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも4つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも5つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも6つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも7つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも8つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも9つのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、少なくとも10個のβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、多能性細胞を成体型内胚葉細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、成体型内胚葉細胞を原腸管細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、原腸管細胞をPdx1陽性膵臓始原細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子を含む。一部の実施形態では、前記キットは、NKX6-1陽性膵臓始原細胞をインスリン陽性内分泌細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子を含む。前記キットは、インスリン陽性内分泌細胞をSC-β細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子を含む。

30

40

【0474】

一部の実施形態では、前記キットは、例えば、多能性細胞を成体型内胚葉細胞に分化させる、成体型内胚葉細胞を原腸管細胞に分化させる、原腸管細胞をPdx1陽性膵臓始原細胞に分化させる、NKX6-1陽性膵臓始原細胞をインスリン陽性内分泌細胞に分化させる、及び、インスリン陽性内分泌細胞をSC-β細胞に分化させるためのβ細胞成熟因子の任意の組合せを含む。

【0475】

50

一実施形態では、前記キットは、例えば、前記多能性幹細胞を、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に分化させ、その後、SC-β細胞に分化させるのを化学的に誘導する、式(I)の化合物の有効性または能力を評価またはモニターするための、ポジティブコントロールとして使用される目的で、多能性幹細胞を含み得る。したがって、前記キットは、コントロールの多能性幹細胞の集合（ポジティブコントロール）、及び、所望の多能性幹細胞（例えば、ユーザの好ましい多能性幹細胞、例えば、iPS細胞）の集合の、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞もしくはその前駆体またはSC-β細胞への分化を誘導するのに十分な量の少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含み得る。

【0476】

一部の実施形態では、前記キット中の化合物は、防水性または気密性容器中に提供され得る。一部の実施形態では、前記容器は、前記キットの他のコンポーネントを実質的に含まない。前記化合物は、2つ以上の容器に供給され得る。例えば、前記化合物は、多能性幹細胞を成体型内胚葉細胞に誘導し、その後に、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に誘導し、その後に、SC-β細胞に誘導する、所定数の反応、例えば、1、2、3回以上の別々の反応に十分な試薬を有する容器中に供給され得る。β細胞成熟因子は、任意の状態、例えば、液体、乾燥または凍結乾燥の状態を提供され得る。本願明細書に記載された化合物（例えば、β細胞成熟因子）は、実質的に純粋であり、及び／または、無菌であるのが好ましい。本願明細書に記載された化合物が溶液で提供される場合、前記溶液は、好ましくは、水溶液であり、無菌の水溶液が好ましい。本願明細書に記載された化合物が乾燥状態で提供される場合、一般的には、再構成は、適切な溶媒の添加による。前記溶媒、例えば、滅菌水またはバッファーが、場合により、前記キットに提供され得る。

【0477】

一部の実施形態では、前記キットは、さらに場合により、情報材料を含む。前記情報材料は、本願明細書に記載された方法及び／または本願明細書に記載された方法についての本願明細書に記載された化合物の使用に関する、記述的な説明、マーケティング及び他の材料であり得る。

【0478】

前記キットの情報材料は、その説明または情報材料に限定されない。一実施形態では、前記情報材料は、前記化合物の製造、前記化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは製造場所の情報等についての情報を含み得る。一実施形態では、前記情報材料は、前記化合物の投与方法に関する。さらに、前記キットの情報材料は、その形式に限定されない。多くの場合、前記情報材料、例えば、説明書は、印刷物、例えば、印刷文書、図及び／または写真、例えば、ラベルまたは印刷されたシートで提供される。ただし、前記情報材料は、他の形式、点字、コンピュータ読み取り可能な材料、ビデオ記録またはオーディオ記録でも提供され得る。別の実施形態では、前記キットの情報材料は、コンタクト情報、例えば、実アドレス、eメールアドレス、ウェブサイトまたは電話番号である。この場合、前記キットのユーザは、本願明細書に記載された化合物、及び／または、本願明細書に記載された方法におけるその使用についての重要な情報を得ることができる。当然、前記情報材料は、任意の組合せの形式で提供されることもできる。

【0479】

一実施形態では、前記情報材料は、本願明細書に記載された化合物（例えば、β細胞成熟因子）を、本願明細書に記載された方法を行うのに適した方法、例えば、適切な用量、投与形態または投与方式（例えば、本願明細書に記載された用量、投与形態または投与方式）で、(in vitroにおける細胞またはin vivoにおける細胞に)投与するための説明書を含み得る。別の実施形態では、前記情報材料は、本願明細書に記載された化合物を、適切な対象、例えば、ヒト、例えば、本願明細書に記載された障害を有するか、または、同障害のリスクにあるヒト、または、in vitroにおける細胞に投与するための説明書を含み得る。

【0480】

本願明細書に記載された化合物に加えて、前記キットの組成物は、他の成分、例えば、溶媒またはバッファー、安定剤、保存剤、香味料（例えば、苦味アンタゴニストまたは甘味料）、芳香剤または化粧成分、及び／または、例えば、（例えば、*in vitro*において）多能性幹細胞を誘導するための、または、本願明細書に記載された症状もしくは障害を処置するための更なる作用剤を含み得る。あるいは、前記他の成分は、前記キットに含まれるが、本願明細書に記載された化合物とは異なる組成物または容器に存在し得る。このような実施形態では、前記キットは、本願明細書に記載された化合物と、前記他の成分とを混合するための、または、本願明細書に記載された化合物を、前記他の成分と共に使用するための説明書、例えば、投与前に前記2つの作用剤を混合することについての説明書を含み得る。

10

【0481】

本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子は、任意の状態、例えば、液体、乾燥または凍結乾燥の状態で提供され得る。本願明細書に記載された化合物は、実質的に純粋であり、及び／または、無菌であるのが好ましい。本願明細書に記載された化合物が溶液で提供される場合、前記溶液は、好ましくは、水溶液であり、無菌の水溶液が好ましい。本願明細書に記載された化合物が乾燥状態で提供される場合、一般的には、再構成は、適切な溶媒の添加による。前記溶媒、例えば、滅菌水またはバッファーが、場合により、前記キットに提供され得る。

【0482】

前記キットは、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子を含む組成物の1つ以上の溶液を含む。一部の実施形態では、前記キットは、前記組成物及び情報材料用の、別々の容器（例えば、前記2つの作用剤用の2つの別々の容器）、デバイダまたは区画を含む。例えば、前記組成物は、ボトル、バイアルまたはシリンジに収容されることができ、前記情報材料は、プラスチック製のスリーブまたはポケットに収容されることができる。他の実施形態では、前記キットの別々の構成要素は、1つの分割できない容器内に収容される。例えば、前記組成物は、前記情報材料がラベルの形式でそれに貼り付けられている、ボトル、バイアルまたはシリンジに収容される。一部の実施形態では、前記キットは、複数（例えば、パック）の個々の容器を含み、それぞれに、本願明細書に記載された化合物の1つ以上の単回投与形態（例えば、本願明細書に記載された投与形態）が収容される。例えば、前記キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパッケージまたは

20

30

【0483】

前記キットは、場合により、前記組成物の投与に適した装置、例えば、シリンジ、吸入器、ピペット、鉗子、計量スプーン、滴ビン（例えば、点眼器）、スワブ（例えば、コットンスワブまたは木製スワブ）または任意のこのような送達装置を含む。好ましい実施形態では、前記装置は、医療用埋込み装置であり、例えば、外科的挿入用にパッケージされている。

【0484】

前記キットは、SC-β細胞用のマーカー、例えば、本願明細書に記載されたマーカーの検出用コンポーネント、例えば、陽性のSC-β細胞の検出用の試薬も含み得る。または、一部の実施形態では、前記キットは、SC-β細胞のネガティブ選択の目的のためのSC-β細胞のネガティブマーカーの検出用、または、これらのネガティブマーカーを発現していない細胞（例えば、SC-β細胞）の特定用の試薬も含み得る。前記試薬は、例えば、前記マーカーに対する抗体、または、RT-PCRもしくはPCR反応、例えば、半定量もしくは定量RT-PCRもしくはPCR反応用のプライマーであり得る。このようなマーカーは、iPS細胞が産生されているかどうかを評価するのに使用され得る。前記検出試薬が抗体である場合、乾燥調製物、例えば、凍結乾燥された調製物または溶液の状態で供給され得る。前記抗体または他の検出試薬は、検出に使用するための標識、例

40

50

えば、放射線、蛍光（例えば、GFP）または発色標識に結合していることができる。前記検出試薬がプライマーである場合、乾燥調製物、例えば、凍結乾燥された調製物または溶液の状態で供給され得る。

【0485】

前記SC-β細胞の核型の分析を行うのが望ましい場合がある。したがって、前記キットは、核型決定用のコンポーネント、例えば、プローブ、染料、基質、酵素、抗体または細胞から核型を調製するのに有用な他の試薬を含み得る。

【0486】

前記キットは、例えば、陽性細胞種コントロールとして使用するための、同じ種類のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から得られたSC-β細胞、例えば、成熟膵臓β細胞を含み得る。

10

【0487】

前記キットは、前記キットに含まれる2つ以上の前記コンポーネントを使用するための情報材料、例えば、説明書も含み得る。

【0488】

前記情報材料は、本願明細書に記載された方法及び／または本願明細書に記載された方法に基づいて多能性幹細胞を分化させるための本願明細書に記載された化合物の使用に関する、記述的な説明、マーケティング及び他の材料であり得る。一実施形態では、前記情報材料は、前記化合物の製造、前記化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは製造場所の情報等についての情報を含み得る。一実施形態では、前記情報材料は、本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子の存在下において、インスリン陽性内分泌細胞の集合を培養するための方法に関する。

20

【0489】

細胞の投与方法

【0490】

一実施形態では、本願明細書に記載された細胞、例えば、SC-β細胞の集合は移植可能であり、例えば、SC-β細胞の集合は、対象に投与され得る。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合を投与される前記対象は、（例えば、自家細胞療法用の）SC-β細胞に分化させるのに使用される多能性幹細胞が得られたのと同じ対象である。一部の実施形態では、前記対象は、異なる対象である。一部の実施形態では、糖尿病、例えば、I型糖尿病を患う対象または正常な対象である。例えば、移植用の細胞（例えば、SC-β細胞の集合を含む組成物）は、臓器移植等の移植に適した形態であり得る。

30

【0491】

前記方法は、前記細胞を、それを必要とする対象、例えば、哺乳類の対象、例えば、ヒトの対象に投与することを、さらに含み得る。前記細胞のソースは、哺乳類、好ましくは、ヒトであり得る。前記細胞のソースまたはレシピエントは、非ヒトの対象、例えば、動物モデルであることもできる。前記「哺乳類」の用語は、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ヤギ、ウマ、サル、イヌ、ネコ、及び好ましくは、ヒトを含む生物を含む。同様に、移植可能な細胞は、これらの生物、例えば、非ヒトのトランスジェニック生物のいずれかから得ることができる。一実施形態では、前記移植可能な細胞は、遺伝子組み換えされており、例えば、前記細胞は、外来性の遺伝子を含むか、または、内在性の遺伝子を不活性化もしくは変化させるように遺伝子組み換えされている。

40

【0492】

SC-β細胞の集合を含む組成物は、埋込み可能な装置を使用して、対象に投与される。埋込み可能な装置及び関連する技術は、当該分野において公知であり、送達システムとして有用である。この場合、本願明細書に示された化合物または組成物の連続的または持続性放出の送達が望ましい。さらに、前記埋込み可能な装置の送達システムは、標的特定の部位（例えば、局所部位または臓器）への化合物または組成物の送達に有用である。Negrin et al., Biomaterials, 22(6):563(2001)。別の送達方法による持続性放出技術も、この発明に使用され得る。例えば、ポ

50

リマー技術、徐放性技術及び封入技術に基づく持続性放出配合（例えば、ポリマー、リポソーム）も、本願明細書に示された化合物及び組成物の送達に使用され得る。

【0493】

インスリン産生、グルコース応答性細胞の集合を含む薬学的組成物

【0494】

対象に投与するために、本願明細書に開示された方法により産生された細胞集合、例えば、（少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞を少なくとも1つのβ細胞成熟因子（例えば、任意の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ以上の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子）と接触させることにより産生された）SC-β細胞の集合が、例えば、薬学的に許容され得る組成物において、対象に投与され得る。これらの薬学的に許容され得る組成物は、1つ以上の薬学的に許容され得るキャリア（添加剤）及び／または希釈剤と共に配合された、治療的に有効量の上記されたSC-β細胞の集合を含む。

10

【0495】

以下に詳細に記載されるように、本発明の薬学的組成物は、固体または液体の状態での投与、例えば、下記：（1）経口投与、例えば、水薬（水溶液もしくは非水性溶液または懸濁液）、ロゼンジ、糖衣錠、カプセル、丸剤、錠剤（例えば、頬、舌下及び全身での吸収を目的としたもの）ボラス、粉末、顆粒、舌への塗布用のペースト；（2）非経口投与、例えば、無菌の溶液もしくは懸濁液または徐放性配合としての、例えば、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による；（3）局所塗布、例えば、クリーム、軟膏または持続放出パッチまたは皮膚に塗布されるスプレー；（4）腔内または直腸内、例えば、ペッサリー、クリームまたは泡；（5）舌下；（6）眼；（7）経皮；（8）経粘膜；または（9）経鼻に採用されたもの用に専用に配合され得る。さらに、化合物は、患者に埋め込まれることができ、または、薬剤送達システムを使用して注射されることができる。例えば、Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol.

20

Toxicol. 24:199-236 (1984); Lewis, ed. 「Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals」(Plenum Press, New York, 1981)；米国特許第3,773,919号；及び同第353,270,960号明細書を参照のこと。

【0496】

本願明細書で使用する場合、前記「薬学的に許容され得る」の用語は、通常の医療的判断の範囲内にあり、合理的な利益／リスク比に相応の、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答または他の問題もしくは合併症なしに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適した、それらの化合物、材料、組成物及び／または投与形態を意味する。

30

【0497】

本願明細書で使用する場合、「薬学的に許容され得るキャリア」の用語は、1つの臓器または身体の一部から別の臓器または身体の部分に、目的の化合物を運搬または輸送するのに関与する、薬学的に許容され得る材料、組成物または媒体、例えば、液体または固体の充填材、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルクマグネシウム、カルシウムもしくは亜鉛のステアリン酸塩またはステアリン酸）または溶媒封入材料を意味する。各キャリアは、前記配合の他の成分と適合性であり、患者に対して傷害性でないという意味で、「許容可能」であるべきである。薬学的に許容され得るキャリアとして役立ち得る材料のいくつかの例としては、（1）糖、例えば、ラクトース、グルコース及びスクロース；（2）デンプン、例えば、トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン；（3）セルロース及びその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース及び酢酸セルロース；（4）粉末状のトラガント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルク；（8）賦形剤、例えば、ココアバター及び坐剤ワックス；（9）オイル、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油；（10）グリコール、例えば、プロピレングリコー

40

50

ル；（１１）ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）；（１２）エステル、例えば、オレイン酸エチル及びラウリル酸エチル；（１３）アガー；（１４）緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；（１５）アルギン酸；（１６）発熱原を含まない水；（１７）等張性生理食塩水；（１８）リンゲル液；（１９）エチルアルコール；（２０）ｐＨ緩衝液；（２１）ポリエステル、ポリカーボネート及び／またはポリ酸無水物；（２２）充填材、例えば、ポリペプチド及びアミノ酸；（２３）血清成分、例えば、血清アルブミン、ＨＤＬ及びＬＤＬ；（２２） C_2-C_{12} アルコール、例えば、エタノール；並びに（２３）薬学的配合に使用される他の非毒性の適合性物質があげられる。湿潤剤、着色剤、剥離剤、コーティング剤、甘味料、着香剤、芳香剤、保存剤及び抗酸化剤も、前記配合に存在し得る。前記用語、例えば、「賦形剤」、「キャリア」、「薬学的に許容され得るキャリア」等は、本願明細書において互換的に使用される。

10

【０４９８】

細胞集合に関して本願明細書で使用する場合、「治療的に有効量」の表現は、任意の医療的処置に適用可能な合理的な利益／リスク比において、動物中の細胞の少なくとも部分集合において、所望の治療的効果をいくらか生じさせるのに有効な、細胞集合中の関連する細胞、例えば、ＳＣ－β細胞もしくは成熟膵臓β細胞、または、本発明のＳＣ－β細胞を含む組成物の量を意味する。例えば、１型、１．５型または２型の糖尿病の少なくとも１つの兆候、例えば、グリコシル化ヘモグロビンレベル、絶食時血中グルコースレベル、低インスリン血症等における、統計学的に有意な測定可能な変化を生じさせるのに十分な量のＳＣ－β細胞の集合が、対象に投与される。治療的に有効量の決定は、当業者の能力の範囲内で十分である。一般的には、治療的に有効量は、対象の既往歴、年齢、症状、性別並びに対象における臨床症状の重症度及び種類、並びに、他の薬学的に活性な作用剤の投与により変化し得る。

20

【０４９９】

本願明細書で使用する場合、「投与する」の用語は、所望の効果が生じるように、所望の部位に、前記組成物の少なくとも部分的な配置をもたらし方法または経路により、対象への組成物の配置を意味する。本願明細書に記載された化合物または組成物は、当該分野において公知の任意の適切な経路、例えば、制限されず、経口または非経口の経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、肺、鼻、直腸及び局所（例えば、頬及び舌下）の投与で投与され得る。

30

【０５００】

投与の典型的な方式としては、制限されず、注射、注入、点眼、吸入または経口摂取があげられる。「注射」としては、制限されず、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、心室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、脳脊髄内及びストランド内の注射及び注入があげられる。好ましい実施形態では、前記組成物は、静脈内注入または注射により投与される。

【０５０１】

疾患または障害の「処置」、「予防」または「改善」は、このような疾患または障害の開始を遅延または予防すること、このような疾患または障害に関連する症状の進行、深刻化または悪化、進行または重症化を、反転、緩和、改善、防止、遅延または停止させることを意味する。一実施形態では、前記疾患または障害の兆候は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％または少なくとも５０％で緩和される。

40

【０５０２】

糖尿病の処置は、標準的な医療的方法により決定される。糖尿病処置の目標は、可能な限り安全に、糖レベルを低下させて、正常に近づけることである。共通して設定される目標は、食前に、１デシリットルあたりに８０－１２０ミリグラム（ｍｇ／ｄｌ）であり、就寝時に、１００－１４０ｍｇ／ｄｌである。特定の内科医は、他の要因、例えば、多くの場合、患者が低血糖反応をどの程度有するかに応じて、患者に対して異なる目標を設定

50

する場合がある。有用な医療的試験としては、血糖レベルを決定するための患者の血液及び尿における試験、グリコシル化ヘモグロビンレベル（HbA1c；過去2－3ヶ月にわたる平均血中グルコースレベルの測定、正常範囲は、4－6％である。）についての試験、コレステロール及び脂肪レベルについての試験並びに尿タンパク質レベルについての試験があげられる。このような試験は、当業者に公知の標準的な試験である（例えば、American Diabetes Association、1998を参照のこと。）。

。連続的な処置プログラムは、そのプログラムにおいて、糖尿病に関する合併症、例えば、目の疾患、腎臓疾患または神経疾患を患者がほとんど患っていないことによって決定され得る。

【0503】

対象における糖尿病の開始を遅延させることは、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも20年、少なくとも30年、少なくとも40年以上の間、及び、前記対象の寿命全体を含み得る間、糖尿病の少なくとも1つの兆候、例えば、高血糖、低インスリン血症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症、失明、記憶喪失、腎不全、心血管疾患（例えば、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、アテローム硬化症及び高血圧）、神経症、自律神経機能不全、高血糖性高浸透圧昏睡またはそれらの組合せの開始の遅延を意味する。

【0504】

特定の実施形態では、前記対象は、哺乳類、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。前記「患者」及び「対象」の用語は、本願明細書において互換的に使用される。好ましくは、前記対象は、哺乳類である。前記哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、1型糖尿病、2型糖尿病または糖尿病前症の動物モデルを提供する対象として有利に使用され得る。さらに、本願明細書に記載された方法は、家畜動物及び／またはペットを処置するのに使用され得る。対象は、オスまたはメスであり得る。対象は、糖尿病（例えば、1型または2型）、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を患うか、または、有すると予め診断または特定されている者、及び場合により、前記糖尿病、前記糖尿病に関連する1つ以上の合併症または前記糖尿病前症の症状の処置を予め受ける必要がなかった者であり得る。対象は、糖尿病または糖尿病前症を患っていない者であることもできる。対象は、糖尿病、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を患っていると診断または特定されているが、糖尿病、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状についての1つ以上の処置を受けた結果として、公知の糖尿病リスク要因における改善を示す者であることもできる。あるいは、対象は、糖尿病、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を有すると予め診断されていない者であることもできる。例えば、対象は、糖尿病、糖尿病に関連する合併症または糖尿病前症の症状についての1つ以上のリスク要因を示す者、または、糖尿病リスク要因を示さない対象、または、糖尿病、1つ以上の糖尿病関連の合併症または糖尿病前症の症状について無症候である対象であることもできる。対象は、糖尿病または糖尿病前症を患うか、または、糖尿病または糖尿病前症になるリスクにある者であることもできる。対象は、本願明細書に記載された、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を有すると診断または特定された者であることもできる。あるいは、対象は、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を有すると予め診断または特定されていない者であることができる。

【0505】

本願明細書で使用する場合、「SC-β細胞を必要とする対象」の表現は、糖尿病（例えば、1型、1.5型または2型）、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状を患うもしくは有すると診断または特定され、糖尿病（例えば、1型、1.5型または2型）、糖尿病に関連する1つ以上の合併症または糖尿病前症の症状になるリスクにあると診断または特定された対象を意味する。

【0506】

SC-β細胞の集合を必要とする対象は、糖尿病の診断に使用される任意の方法を使用して特定され得る。例えば、1型糖尿病は、グリコシル化ヘモグロビン（A1C）試験、ランダム血中グルコース試験及び／または絶食時血中グルコース試験を使用して診断され得る。糖尿病診断用のパラメータは、当該分野において公知であり、多大な努力を必要とすることなく、当業者に利用可能である。

【0507】

一部の実施形態では、本発明の方法は、さらに、更なるSC-β細胞を必要とすると特定された対象を選択することを含む。SC-β細胞の集合を必要とする対象は、示された兆候、例えば、1型、1.5型または2型糖尿病の兆候に基づいて選択され得る。糖尿病の典型的な兆候としては、制限されず、多渴（多飲症）、頻尿（多尿症）、過度の空腹（過食症）、過度の疲労、体重減少、高血糖、低レベルのインスリン、高血糖（例えば、250mg超、300mg超の糖レベル）、尿中に存在するケトンの存在、疲労、乾燥肌及び／もしくは痒み肌、視力障害、切り傷もしくは傷の回復鈍化、通常より易感染、足の冷え及び刺痛、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症、失明、記憶喪失、腎不全、心血管疾患（例えば、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、アテローム硬化症及び高血圧）神経症、自律神経機能不全、高血糖性高浸透圧昏睡並びにそれらの組合せがあげられる。

【0508】

一部の実施形態では、対象に投与するためのSC-β細胞の集合を含む組成物は、さらに、薬学的に活性な薬剤、例えば、糖尿病の処置について及び／または抗高血糖活性を有することについて当該分野において公知のそれらの薬剤、例えば、ジペプチジルペプチダーゼ4（DPP-4）の阻害剤（例えば、アログリプチン、リナグリプチン、サキサグリプチン、シタグリプチン、ビルダグリプチン及びベルベリン）、ピグアニド（例えば、メトホルミン、ブホルミン及びフェンホルミン）、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）調節剤、例えば、チアゾリジンジオン（TZD）（例えば、ピオグリタゾン、リボグリタゾン、ロシグリタゾン及びトログリタゾン）、二重PPARアゴニスト（例えば、アレグリタザール、ムラグリタザール及びてさぐりタザール）、スルホニル尿素（例えば、アセトヘキサミド、カルブタミド、クロルプロパミド、グリクラジド、トルブタミド、トラザミド、グリベンクラミド（グリブリド）、グリピジド、グリキドン、グリコピラミド及びグリメピリド）、メグリチニド（「グリニド」）（例えば、ナテグリニド、レバグリニド及びミチグリニド）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）及び類似体（例えば、エキセンディン-4、エキセナチド、リラグルチド、アルビグルチド）、インスリン及びインスリン類似体（例えば、インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルリシン、インスリングルラルギン、インスリンデテミル、エクスベラ及びNPHインスリン）、アルファ-グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、ミグリトール及びボグリボース）、アミリン類似体（例えば、プラムリンチド）、ナトリウム依存性グルコース共輸送体T2（SGLT T2）阻害剤（例えば、ダブグリフロジン、レモグリフロジン及びセルグリフロジン）並びに他のもの（例えば、ベンフォアレックス及びトルレスタット）を含み得る。

【0509】

1型糖尿病では、β細胞は、継続的な自己免疫応答により、不必要に破壊される。このため、この自己免疫応答は、このような自己免疫応答を阻害または遮断する化合物の使用により弱められ得る。一部の実施形態では、対象に投与するためのSC-β細胞の集合を含む組成物は、さらに、免疫応答調節剤である薬学的に活性な薬剤を含む。本願明細書で使用する場合、前記「免疫応答調節剤」の用語は、対象における自己免疫応答を阻害する化合物（例えば、小分子、抗体、ペプチド、核酸または遺伝子治療試薬）を意味する。理論に拘束されるものではないが、免疫応答調節剤は、炎症性サイトカイン（例えば、IL-12、IL-23またはIL-27）またはSTAT-4の活性、活性化または発現を阻害することにより、自己免疫応答を阻害する。典型的な自己免疫応答調節剤としては、制限されず、米国特許第6,774,130号明細書に記載されたリソフィリン（LSF

10

20

30

40

50

）並びにL S F類似体及び誘導体からなる群のメンバーがあげられる。同特許の内容は、その全体が参照により本願明細書に組み込まれる。

【0510】

S C-β細胞を含む組成物は、薬学的に活性な薬剤またはそれを含む組成物の投与と、同時または異なるタイミングで対象に投与され得る。異なるタイミングで投与される場合、対象に投与するためのS C-β細胞の集合及び／または薬学的に活性な薬剤を含む前記組成物は、他方の投与の5分、10分、20分、60分、2時間、3時間、4時間、8時間、12時間、24時間以内に投与され得る。S C-β細胞の集合を含む組成物及び薬学的に活性な薬剤を含む組成物が、異なる薬学的組成物において投与される場合、投与経路は異なり得る。一部の実施形態では、対象は、S C-β細胞を含む組成物を投与される。他の実施形態では、対象は、薬学的に活性な薬剤を含む組成物を投与される。別の実施形態では、対象は、薬学的に活性な薬剤と混合された、S C-β細胞の集合を含む組成物を投与される。別の実施形態では、対象は、S C-β細胞の集合を含む組成物及び薬学的に活性な薬剤を含む組成物を投与される。この場合、投与は、実質的に同時または互いに連続的であり得る。

10

【0511】

S C-β細胞の集合を含む組成物の投与の毒性及び治療の有効性は、例えば、LD50（集合の50％に対する致死量）及びED50（集合の50％において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により決定され得る。大きな治療指数を示すS C-β細胞の集合を含む組成物が好ましい。

20

【0512】

S C-β細胞の集合を含む組成物の量は、複数の十分確立された動物モデルを使用して試験され得る。

【0513】

非肥満の糖尿病（NOD）マウスは、数週齢で現れるインスリン炎をもたらす遺伝子欠損を有する（Yoshida et al., Rev. Immunogenet. 2:140, 2000）。60-90％のメスは、20-30週で臨床的糖尿病に進行する。免疫関連病理は、ヒトのI型糖尿病における病理に類似すると考えられる。I型糖尿病の他のモデルは、遺伝子導入及びノックアウト変異を有するマウスである（Wong et al., Immunol. Rev. 169:93, 1999）。近年、自発性I型糖尿病用のラットモデルが、Lenzen et al.により報告されている（Diabetologia 44:1189, 2001）。高血糖は、ストレプトゾトシンの1回の腹腔内注射により（Soria et al., Diabetes 49:157, 2000）、または、ストレプトゾトシンの連続的な低用量により（Ito et al., Environ. Toxicol. Pharmacol. 9:71, 2001）、マウスにおいて（500mg グルコース/dL超）誘導されることもできる。埋め込まれた膵島細胞の有効性を試験するために、前記マウスは、正常レベル（200mg/dL未満）へのグルコースの回復についてモニターされる。

30

【0514】

より大型の動物は、慢性高血糖の症状を追跡するのに良好なモデルを提供する。イヌは、膵臓を除去することにより（J. Endocrinol. 158:49, 2001）、または、ガラクトースを与えられることにより（Kador et al., Arch. Ophthalmol. 113:352, 1995）、インスリン依存性を与えられ得る。ケースホンド犬におけるI型糖尿病の遺伝モデルも存在する（Am. J. Pathol. 105:194, 1981）。イヌモデルについての初期の研究（Banting et al., Can. Med. Assoc. J. 22:141, 1922）は、1925年2月にストックホルムへの長い海洋旅行をしたカナダ人夫婦によりもたらされた。

40

【0515】

実例として、パイロット研究は、下記動物：a）非糖尿病ヌード（T細胞欠損）マウス

50

；b) ストレプトゾトシン処理により糖尿病性を付与されたヌードマウス；及びc) 部分的な膵臓切除による膵島再生プロセスにあるヌードマウス内に、SC-β細胞の集合を埋め込むことにより行われ得る。移植された細胞数は、肝臓または膵臓における、腎被膜下に埋め込まれた、約1000-2000個の正常なヒトβ細胞に相当する。非糖尿病マウスについては、エンドポイントにおいて、移植片の生存（組織学的試験）並びに生化学的分析、RIA、ELISA及び免疫組織化学によるインスリン産生の決定を評価し得る。ストレプトゾトシン処理された動物及び部分的に膵臓切除された動物は、生存、代謝調節（血中グルコース）及び体重増についても評価され得る。

【0516】

一部の実施形態では、細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータは、ヒトにおいて使用するための範囲を公式化するのに使用され得る。このような化合物の用量は、好ましくは、ほとんど毒性を有さないか、または、毒性を有さないED50を含む、循環濃度の範囲内にある。前記用量は、使用される投与形態及び採用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。

【0517】

治療的に有効量の、SC-β細胞の集合を含む組成物は、細胞培養アッセイから最初に推定されることもできる。用量は、血漿中の循環性グルコースへの応答に適した濃度でのインスリン分泌を達成する、*in vivo*での動物モデルにおいて公式化され得る。あるいは、任意の特定の用量の効果が、適切なバイオアッセイによりモニターされ得る。

【0518】

処置の持続期間及び頻度に関して、前記処置が治療的利益を提供している時を決定し、用量を増大または減少させるかどうか、投与頻度を増加または減少させるかどうか、処置を中断するかどうか、処置を再開するかどうか、または、処置計画に他の変更を加えるかどうかを決定するために、対象をモニターするのは、当業者にとって典型的なことである。投与スケジュールは、数多くの臨床的要因、例えば、ポリペプチドに対する対象の感受性に応じて、1週間1回から毎日に変動し得る。望ましい用量は、一度に投与されることができ、または、部分用量、例えば、2-4回の部分用量に分割され、一定期間にわたって、例えば、日による適切な間隔または他の適切なスケジュールで投与されることができ、このような部分用量は、単位投与形態として投与され得る。一部の実施形態では、投与は、長期、例えば、週または月の期間にわたって、毎日1回以上の投与である。投与スケジュールの例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月または6ヶ月以上にわたって、毎日、1日2回、1日3回、1日4回以上の投与である。

【0519】

本発明の別の態様では、前記方法は、本願明細書に開示されたSC-β細胞の単離された集合の使用を提供する。本発明の一実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の単離された集合は、薬学的組成物の製造、処置を必要とする対象、例えば、糖尿病を有するか、または、糖尿病になるリスクにある対象、例えば、制限されず、先天的及び後天的糖尿病を有する対象への移植における使用に使用され得る。一実施形態では、SC-β細胞の単離された集合は、遺伝子組み換えされていてもよい。別の態様では、前記対象は、糖尿病及び／または代謝異常を有するか、または、糖尿病及び／または代謝異常のリスクにあり得る。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の単離された集合は、自家及び／または同種であり得る。一部の実施形態では、前記対象は、哺乳類である。他の実施形態では、前記哺乳類は、ヒトである。

【0520】

本願明細書に開示されたSC-β細胞の単離された集合の使用は、既存の方法を越えた利点を提供する。前記SC-β細胞の集合は、SC-β細胞の単離された集合を投与される対象から取得または収集された、幹細胞、例えば、iPS細胞から得られたインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から分化され得るためである。当業者に一般的に公知の方法により、幹細胞からインスリン陽性内分泌細胞に分化され、ついで、本願明細書に記

10

20

30

40

50

載された方法により、対象への移植用の膵臓β様細胞または膵臓β細胞の特徴を有する細胞、特に、他の系から得られた細胞のリスク及び限界を有さない成熟膵臓β様細胞の実質的に純粋な集合にさらに分化され得る、SC-β細胞の再生可能なソースを提供するのは非常に有益である。

【0521】

別の実施形態では、SC-β細胞の単離された集合（例えば、成熟膵臓β細胞またはβ様細胞）は、インスリン産生細胞、例えば、膵臓β細胞または膵臓β様細胞への分化のための特性、または、内胚葉起源の細胞の膵臓β細胞への発達の経路を研究するためのモデルとして使用され得る。

【0522】

10

一部の実施形態では、前記インスリン陽性内分泌細胞またはSC-β細胞は、マーカーが発現または分泌される際に、発現されるプロモータに操作可能に結合しているマーカー、例えば、インスリンプロモータに操作可能に結合し得るマーカーを含むように、遺伝子組み換えされてもよい。これにより、前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が、インスリンを発現及び分泌するSC-β細胞に分化する際、前記マーカーが発現される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、膵島β細胞または膵臓β様細胞に分化する細胞の分化経路を研究するためのモデルとして使用され得る。

【0523】

他の実施形態では、前記インスリン産生、グルコース応答性の細胞は、膵臓における、並びに、糖尿病及び代謝異常の進行における膵島β細胞の役割を研究するためのモデルとして使用され得る。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、正常な対象または（例えば、早期発症インスリン依存型糖尿病（NIDDM）及び4型の若年発症成人型糖尿病（MODY4）をもたらず遺伝子であるPdx1における）変異及び／もしくは多形を有する対象由来であり得る。前記SC-β細胞は、Pdx1における変異または多形を有する糖尿病の対象を処置するのに使用され得る、小分子及び他の治療剤を特定するのに使用され得る。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、糖尿病を有する対象の治療的処置において、対象に投与される前に、前記Pdx1遺伝子における多形を訂正するように遺伝子組み換えされていてもよい。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、変異及び／または多形を有するように遺伝子組み換えされていてもよい。

20

【0524】

30

本発明の一実施形態は、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合を含む有効量の組成物を、糖尿病及び／または代謝異常を有する対象に投与することを含む、対象における糖尿病または代謝異常の処置方法に関する。更なる実施形態では、本発明は、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合を含む組成物を、糖尿病を有するか、または、糖尿病になる増大したリスクを有する対象に、上昇した血中グルコースレベルに対する応答においてインスリンを産生するのに十分有効な量で投与することを含む、糖尿病の処置方法を提供する。

【0525】

上記方法の一実施形態では、前記対象は、ヒトであり、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、本発明は、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合が、対象の膵臓に直接投与されるか、または、全身に投与されることを考慮する。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、対象中の任意の適切な位置に、例えば、血管または肝臓、または、投与された前記SC-β細胞の集合が対象における上昇したグルコースレベルに対する応答においてインスリンを分泌し得る任意の適切な部位にカプセル状で投与され得る。

40

【0526】

本発明は、遺伝子欠損、物理的傷害、環境的損傷または調整、悪病、肥満及び、当業者に一般的に公知の他の糖尿病のリスク要因の結果として生じた、糖尿病または代謝異常を有する対象の処置方法も対象にする。SC-β細胞の集合を含む組成物を投与された対象の処置の有効性は、臨床的に許容された基準及び試験によりモニターされ得る。前記評準

50

及び試験としては、例えば、(i) 糖化ヘモグロビン (A1C) 試験 (前記試験は、赤血球中の酸素運搬タンパク質であるヘモグロビンに付着した血糖の割合を測定することにより、過去2から3ヶ月についての対象の平均血糖レベルを示す。血糖レベルが高いほど、より多くのヘモグロビンに糖が付着している。2回の別々の試験において、6.5パーセント以上のA1Cレベルは、対象が糖尿病を有することを示す。6-6.5%の試験値は、対象が糖尿病前症を有することを示唆する。)、(ii) ランダム血糖試験 (血液サンプルが対象からランダムなタイミングで採取されるであろう。1デシリットルあたりに200ミリグラム (mg/dL) - 1リットルあたりに11.1ミリモル (mmol/L) 以上のランダム血糖レベルは、対象が糖尿病を有することを示す。)、(iii) 絶食時血糖試験 (血液サンプルが、一晩絶食した後の対象から採取される。70と99mg/dL (3.9と5.5mmol/L) の間の絶食時血糖レベルは、正常である。対象の前記絶食時血糖レベルが、2回の別々の試験において126mg/dL (7mmol/L) 以上である場合、前記対象は、糖尿病を有する。100から125mg/dL (5.6から6.9mmol/L) の血糖レベルは、対象が糖尿病前症を有することを示す。)、(iv) 経口グルコース負荷試験 (血液サンプルは、対象が、少なくとも8時間または一晩絶食し、糖液を摂取した後について採取されるであろう。血糖レベルは、2時間後に測定されるであろう。140mg/dL (7.8mmol/L) 未満の血糖レベルは、正常である。140から199mg/dL (7.8から11mmol/L) の血糖レベルは、糖尿病前症と考えられる。これは、耐糖能異常 (IGT) と呼ばれる場合がある。200mg/dL (11.1mmol/L) 以上の血糖レベルは、糖尿病を示し得る。) があげられる。

10

20

【0527】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合の、それを必要とする対象への投与の効果は、改善した運動耐性または他のクオリティオブライフ測定及び低下した死亡率に関連する。SC-β細胞の集合による細胞療法の効果は、手術後数日から数週間の経過にわたって証明され得る。ただし、有益な効果は、手術後数時間の早さで観察される場合があり、数年間持続する場合がある。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合による細胞療法の効果は、手術後2週間以内に生じる。

【0528】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、このような処置を必要とするヒト患者または他の対象における組織の再構成または再生に使用されてもよい。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合の組成物は、それらを意図した組織部位に移植または移動させ、機能的に失われた領域を再構成または再生するのに可能にする方法で投与され得る。膵臓または代替的な所望の位置においてβ細胞の集合を再構成可能な細胞を投与するのに採用された、専用の装置が利用可能である。したがって、前記SC-β細胞は、注射によりレシピエントの対象の膵臓に投与されてもよいし、または、筋肉内注射により投与されてもよい。

30

【0529】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合を含む組成物は、臨床治療、調査、開発及び商業目的における各種の用途を有する。治療目的で、例えば、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、任意の認知される必要性、例えば、代謝機能の先天異常、疾患状態 (例えば、糖尿病) の影響または著しい傷害 (すなわち、膵臓に対する障害または膵島β細胞に対する損失もしくは傷害) の結果のために、血中グルコースレベルにおける上昇に対する応答において、インスリン産生を亢進させるのに投与され得る。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、傷を負ったまたは他の方法で不健康な組織に対する機能を回復させるのに役立つだけでなく、傷を負った組織の再モデル化を促進するのに、対象に投与される。

40

【0530】

治療的投与のための細胞組成物の適切性を決定するために、前記SC-β細胞の集合は、まず、適切な動物モデルにおいて試験され得る。あるレベルにおいて、細胞は、in

50

v i v oにおける生存するその能力及びその表現型を維持するその能力を評価される。S C-β細胞を含む細胞組成物は、免疫不全動物（例えば、ヌードマウスまたは化学的にまたは放射線により免疫不全にされた動物）に投与され得る。再成長期間後に、組織が回収され、投与された細胞またはその子孫が未だに存在しているかどうかの評価される。

【0531】

これは、検出可能な標識（例えば、緑色蛍光タンパク質またはβ-ガラクトシダーゼ）を発現している；予備標識されている（例えば、BrdUまたは[3H]チミジン）細胞を投与することにより、または、（例えば、ヒト特異的抗体を使用して）構成的細胞マーカーのその後の検出により行われ得る。投与された前記S C-β細胞の集合の存在及び表現型は、ヒト特異的抗体を使用した免疫組織化学法もしくはELISAにより、または、公開された配列データに基づいて、ヒトのポリヌクレオチドを特異的に増幅させる、プライマー及びハイブリダイゼーション条件を使用したR T-P C R分析により評価され得る。

10

【0532】

米国特許第6, 187, 991号明細書（同特許は、参照により本願明細書に組み込まれる。）に開示された糖尿病を試験するための数多くの動物モデル、並びに、げっ歯類モデル；NOD（非肥満マウス）、BB-DBマウス、KDPラット及びTCRマウス並びに、Rees et al., Diabet Med. 2005 April; 22 (4): 359-70; Srinivasan K, et al., Indian J Med. Res. 2007 March; 125 (3): 451-7; Chatzigeorgiou A, et al., In Vivo. 2009 March-April; 23 (2): 245-58（同文献は、参照により本願明細書に組み込まれる。）に記載された糖尿病の他の動物モデルが、このような試験に利用可能であり、当該分野において公知である。

20

【0533】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたS C-β細胞の集合は、任意の生理学的に許容され得る賦形剤において投与されてもよい。この場合、前記S C-β細胞は、複製、増殖及び／または移植に適した部位にたどり着き得る。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたS C-β細胞の集合は、注射、カテーテル等により導入され得る。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたS C-β細胞の集合は、液体窒素の温度で凍結されることができ、長期間保存されることができ、解凍時に使用可能である。凍結される場合、S C-β細胞の集合は、通常、10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640培地に保存されるであろう。解凍されると、前記細胞は、本願明細書に開示されたS C-β細胞の培養に関連する成長因子及び／またはフィーダ細胞の使用により増殖され得る。

30

【0534】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたS C-β細胞の集合は、ヒトへの投与用に十分無菌条件下で調整された等張性賦形剤を含む薬学的組成物の形態で供給され得る。医薬品の一般原則について、読み手は、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; 及び、Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000に言及される。本願明細書に開示されたS C-β細胞の集合を含む組成物における、細胞賦形剤及び任意の付随的要素の選択は、投与に使用される経路及び装置に基づいて採用されるであろう。一部の実施形態では、S C-β細胞の集合を含む組成物は、前記S C-β細胞の移植または機能的な移動を容易にする、1つ以上の他の成分も含むことができ、または、同成分を伴うこともできる。適切な成分としては、前記S C-β細胞または補完的細胞種、特に内皮細胞の付着を支持または

40

50

促進するマトリクスタンパク質があげられる。別の実施形態では、前記組成物は、吸収性または生分解性のマトリクス足場を含んでもよい。

【0535】

一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、インスリン産生細胞、例えば、膵臓β細胞に有用な遺伝子、例えば、個体における遺伝子欠損の修復、選択マーカー等、または、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌またはその前駆体から分化された非インスリン産生細胞に対する選択に有用な遺伝子、もしくは、埋め込まれたSC-β細胞の選択的自殺に有用な遺伝子を導入するために、遺伝子組み換えされてもよい。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、生存の向上、増殖の制御等のために、遺伝子組み換えされていることもできる。一部の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、適切なベクターによるトランスフェクションもしくは形質移入、相同組換えまたは他の適切な技術により遺伝子組み換えされ得る。これにより、それらは、所望の遺伝子を発現する。一実施形態では、SC-β細胞の集合は、テロメラーゼ触媒成分(TERT)をコードする遺伝子により、内在性プロモータ下において生じるのを超えるテロメラーゼ発現を増大させる異種プロモータ下において、典型的にトランスフェクションされる(国際公開第98/14592号パンフレットを参照のこと。同公報は、参照により本願明細書に組み込まれる。)。他の実施形態では、より高い純度のSC-β細胞の集合を提供する選択マーカーが導入される。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、8-16時間間にわたって、ベクター含有上清を使用して、遺伝子組み換えされ、ついで、増殖培地に1-2日間変更される。遺伝子組み換えされたSC-β細胞は、薬剤選択剤、例えば、ピューロマイシン、G418またはブラスチジンを使用して選択され、ついで、再度培養され得る。

【0536】

遺伝子治療は、遺伝子産物を置き換え、組織の再生を促進し、疾患を処置し、または、対象への埋め込み後の前記細胞の生存を改善する(すなわち、拒絶を防止する)ためのいずれかで、細胞を修飾するのに使用され得る。

【0537】

別の実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、組織再生に関与する、または、投与部位への治療的遺伝子を送達する、その能力を向上させるためにも遺伝子組み換えされ得る。ベクターは、所望の遺伝子について公知のコード配列を使用して設計される。前記遺伝子は、分化した細胞種において、pan-specificまたは特異的に活性のいずれかにおけるプロモータに操作可能に結合される。特に所望のものは、1つ以上の種々の種類の成長因子、例えば、ソマトスタチン、グルカゴン及び他の因子を発現するように遺伝子組み換えされている細胞である。

【0538】

本願明細書に開示された目的のSC-β細胞内に外来性遺伝子を輸送するのに有用な多くのベクターが利用可能である。前記ベクターは、エピソームでもよく、例えば、プラスミド、ウイルス系ベクター、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス等でもよいし、または、相同組換えまたはランダムインテグレーション、例えば、ウイルス系ベクター、例えば、MMLV、HIV-1、ALV等により目的細胞のゲノム内に組み込まれてもよい。一部の実施形態では、レトロウイルスと適切なパッケージング細胞株との組合せも、用途を見出し得る。この場合、カプシドタンパク質は、本願明細書に開示されたSC-β細胞に感染するのに機能するであろう。通常、SC-β細胞及びウイルスは、培養培地中で、少なくとも24時間培養されるであろう。一部の実施形態では、ついで、前記SC-β細胞は、前記培養培地中で、短い間隔、一部の用途では、例えば、24-73時間または少なくとも2週間増殖されてもよく、分析前に5週間以上増殖されてもよい。一般的に使用されるレトロウイルスベクターは、「欠陥がある」、すなわち、増殖性感染に必要とされるウイルスタンパク質を産生できない。前記ベクターの複製は、前記パッケージング細胞株における増殖を必要とする。

【0539】

前記レトロウイルスの宿主細胞特異性は、エンベロープタンパク質である env (p120) により決定される。前記エンベロープタンパク質は、前記パッケージング細胞株により提供される。エンベロープタンパク質には、少なくとも3種類、エコトロピック、アンホトロピック及びゼノトロピックが存在する。エコトロピックエンベロープタンパク質でパッケージされたレトロウイルス、例えば、MMLVは、大部分のマウス及びラットの細胞種に感染可能である。エコトロピックパッケージング細胞株としては、BOSC23があげられる (Pear et al. (1993) P. N. A. S. 90:8392-8396)。アンホトロピックエンベロープタンパク質、例えば、4070Aを有するレトロウイルス (上記 Danos et al) は、大部分の哺乳類細胞種、例えば、ヒト、イヌ及びマウスに感染可能である。アンホトロピックパッケージング細胞株としては、PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); GRIP (Danos et al. (1988) PNAS 85:6460-6464) があげられる。ゼノトロピックエンベロープタンパク質、例えば、AKR envでパッケージされたレトロウイルスは、マウスを除く大部分の哺乳類細胞種に感染可能である。一部の実施形態では、前記ベクターは、例えば、リコンビナーゼ系、例えば、Cre/Loxを使用して、後に除去されるべき遺伝子、または、例えば、選択毒性、例えば、ヘルペスウイルスTK、Bcl-Xs等を可能にする遺伝子を含むことにより壊されたそれらを発現する細胞を含んでもよい。

10

20

【0540】

適切な誘導性プロモータは、所望の目的細胞種、トランスフェクションされた細胞またはその子孫のいずれかにおいて活性化される。転写活性により、転写は、前記目的の細胞における基底レベルを上回って、少なくとも約100倍で、より一般的には、少なくとも約1000倍で向上されるであろうことが意図される。種々のプロモータが、種々の細胞種において誘導されることが公知である。

【0541】

本発明の一態様では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の集合は、全身的または目的の解剖学的部位への投与に適している。SC-β細胞の集合は、例えば、対象の膵臓内もしくは膵臓付近に移植されることができ、または、全身的に投与され、例えば、制限されず、動脈内もしくは静脈内に投与されてもよい。別の実施形態では、本発明のSC-β細胞の集合は、膵臓または分泌系に埋め込まれるのに適切であろう種々の方法、例えば、制限されず、非経口、例えば、静脈内及び動脈内投与、髄腔内投与、心室内投与、実質内投与、頭蓋内、嚢内、線条体内及び黒質内の投与で投与され得る。場合により、SC-β細胞の集合は、免疫抑制剤との組合せで投与される。

30

【0542】

一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、SC-β細胞の集合は、患者個体の臨床症状、投与の部位及び方法、投与スケジュール、患者の年齢、性別、体重並びに医療従事者に公知の他の要因を考慮して、医療の品質管理に関する基準に基づいて投与及び投薬され得る。このため、本願明細書での目的について、薬学的に「有効な量」は、当該分野において公知のように、このような考慮により決定される。前記量は、改善、例えば、制限されず、改善した生存率、より急速な回復、または、当業者による適切な測定として選択された場合、兆候及び他の兆候の改善もしくは除去を達成するのに有効でなければならない。SC-β細胞の集合は、下記場所：診療所、病院、救急部門、病棟、集中治療室、手術室、カテーテル法室、放射線室で、対象に投与され得る。

40

【0543】

他の実施形態では、SC-β細胞の集合は、後の埋め込み／注入のために保存される。SC-β細胞の集合は、2つ以上のアリコートまたはユニットに分割されてもよい。これにより、一部のSC-β細胞の集合は、後の適用に保持され、一部は、前記対象に直ちに適用される。米国特許出願公開第20030054331号明細書及び国際公開第030

50

24215号パンフレットに開示されたように、細胞バンクにおける全部または一部の前記細胞の中程度から長期間の保存も、本発明の範囲内である。同特許は、その全体が参照により組み込まれる。処理の最後に、濃縮された細胞は、当業者に公知の任意の手段によりレシピエント内に配置するための送達装置、例えば、シリンジ内に充填され得る。

【0544】

一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、単独で、または、他の細胞、組織、組織断片、成長因子、例えば、VEGF及び他の公知の血管新生もしくは血管原性の成長因子、生物学的に活性もしくは不活性な化合物、吸収性プラスチック足場または、前記集合の送達、有効性、耐容性もしくは機能を向上させることを意図した他の添加剤との組合せで適用され得る。一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、構造的または治療的目的を引き出すために、細胞の機能を変化、向上または追加するように、DNAの挿入または細胞培養中での置換により修飾されることもできる。例えば、幹細胞についての遺伝子輸送技術は、(Morizono et al., 2003; Mosca et al., 2000)に開示されたように、当業者に公知であり、ウイルストランスフェクション技術、及びより具体的には、(Walther and Stein, 2000)及び(Athanasopoulos et al., 2000)に開示されたアデノ関連ウイルス遺伝子輸送技術をあげることができる。非ウイルス系技術も、(Murarnatset al., 1998)に開示されたように行われてもよい。

【0545】

別の態様では、一部の実施形態において、SC-β細胞の集合は、血管新生促進性成長因子をコードする遺伝子と組み合わせられ得る。抗アポトーシス因子または作用剤をコードする遺伝子も適用され得る。前記遺伝子（または、遺伝子の組合せ）の追加は、当該分野において公知の任意の技術、例えば、制限されず、アデノウイルス形質移入である、「遺伝子銃」、リポソーム媒介性形質移入及びレトロウイルスまたはレンチウイルス媒介性遺伝子移入、プラスミドアデノ関連ウイルスによることができる。細胞は、形質移入が継続または開始し得るように、経時的に前記細胞に対して遺伝子を放出及び／または提示可能な遺伝子送達媒体を有するキャリア材料と共に、埋め込まれ得る。特に、前記細胞及び／または前記細胞を含む組織が、前記細胞及び／または組織が得られた患者以外の患者に投与される場合、1つ以上の免疫抑制剤が、前記細胞及び／または組織を受けている患者に投与されて、移植拒絶を減少させ、好ましくは、防止してもよい。本願明細書で使用する場合、前記「免疫抑制薬または作用剤」の用語は、正常な免疫機能を阻害または妨害する、医薬品を含むことを意図する。本願明細書に開示された方法に適した免疫抑制剤の例としては、T細胞／B細胞の同時刺激経路を阻害する薬剤、例えば、米国特許出願公開第2002/0182211号明細書に開示された、CTLA4及びB7経路を介したT細胞とB細胞との結合を妨害する薬剤があげられる。同公報は、参照により本願明細書に組み込まれる。一実施形態では、免疫抑制剤は、シクロスポリンAである。他の例としては、ミオフェニレートモフェチル、ラパマイシン及び抗-胸腺細胞グロブリンがあげられる。一実施形態では、前記免疫抑制薬は、少なくとも1つの他の治療剤と共に投与される。前記免疫抑制薬は、投与経路に適合した形式で投与され、所望の治療効果を達成するのに十分な用量で対象に投与される。別の実施形態では、前記免疫抑制薬は、本発明の心血管幹細胞に対する耐容性を誘導するのに十分な期間、一時的に投与される。

【0546】

有効量のSC-β細胞の集合を含む薬学的組成物も、本発明により考慮される。これらの組成物は、場合により、薬学的に許容され得るキャリア、添加剤または賦形剤との組合せで、有効数のSC-β細胞を含む。本発明の特定の態様では、SC-β細胞の集合は、移植を必要とする対象に、滅菌生理食塩水において投与される。本発明の他の態様では、SC-β細胞の集合は、Hanks平衡化食塩水(HBSS)またはIsolyte S、pH7.4において投与される。他のアプローチ、例えば、血清を含まない細胞培地の使用も使用され得る。一実施形態では、SC-β細胞の集合は、血漿またはウシ胎児血清及びDMSOにおいて投与される。前記対象へのSC-β細胞の集合の全身性投与は、特

定の兆候において好ましい場合がある。一方、病気及び／または傷害の組織の部位または近くへの直接的な投与が、他の兆候において好ましい場合がある。

【0547】

一部の実施形態では、SC-β細胞の集合は、場合により、所望の目的、例えば、対象への投与前のSC-β細胞の集合の再構成または解凍（凍結されている場合）について記載された説明書と共に、適切な容器に梱包され得る。

【0548】

一実施形態では、本願明細書に開示されたSC-β細胞の単離された集合は、分化剤と共に投与される。一実施形態では、前記SC-β細胞は、対象内への投与のために、前記分化剤と組み合わせられる。別の実施形態では、前記細胞は、前記分化剤とは別々に、前記対象に投与される。場合により、前記細胞が前記分化剤とは別々に投与される場合、前記細胞と前記分化剤との投与において、時間的な分離が存在する。前記時間的な分離は、時間にして約1分未満から時間にして約数時間または数日の範囲であり得る。最適なタイミング及び投与順の決定は、当業者により容易かつルーチンに決定される。

【0549】

糖尿病の診断

【0550】

1型糖尿病は、膵臓のインスリン産生β細胞の破壊をもたらす自己免疫疾患である。インスリンの欠損は、腎臓閾値（多くは約190-200mg/dl）を上回って尿に表れ始める絶食時血中グルコースの増大を引き起こす（非糖尿病の人間では、約70-120mg/dL）。世界保健機関は、糖尿病について、絶食時の血漿グルコース濃度7.0mmol/l（126mg/dl）（全血 6.1mmol/lまたは110mg/dl）以上、または、2時間グルコースレベル11.1mmol/L以上（200mg/dL以上）の診断値を定義している。

【0551】

1型糖尿病は、各種の診断試験を使用して診断され得る。前記試験としては、制限されず、下記：（1）糖化ヘモグロビン（A1C）試験、（2）ランダム血中グルコース試験及び／または（3）絶食時血中グルコース試験があげられる。

【0552】

前記糖化ヘモグロビン（A1C）試験は、過去2から3ヶ月にわたる、対象の平均血中グルコースレベルを反映する血液試験である。前記試験は、ヘモグロビンに付着した血中グルコースの割合を測定する。前記割合は、血中グルコースレベルと相関する（前記血中グルコースレベルが高いほど、より多くのヘモグロビンが糖化されている。）。2回の別々の試験において、6.5%以上のA1Cレベルは、糖尿病を示す。6と6.5%との間の結果は、糖尿病前症と考えられる。前記糖尿病前症は、糖尿病になる高いリスクを示す。

【0553】

前記ランダム血中グルコース試験は、糖尿病を有すると疑われた対象から、ランダムなタイミングで血液サンプルを取得することを含む。血中グルコース値は、1デシリットルあたりのミリグラム（mg/dL）または1リットルあたりのミリモル（mmol/L）で表現され得る。200mg/dL（11.1mmol/L）以上のランダム血中グルコースレベルは、特に、糖尿病の兆候及び症候、例えば、頻尿及び多渴のいずれかと組み合わせられた場合、対象がおそらく糖尿病を有することを示す。

【0554】

前記絶食時血中グルコース試験について、血液サンプルが、一晩絶食した後に取得される。100mg/dL（5.6mmol/L）未満の絶食時血中グルコースレベルは、正常と考えられる。100から125mg/dL（5.6から6.9mmol/L）の絶食時血中グルコースレベルは、糖尿病前症と考えられる。一方、2回の別々の試験において126mg/dL（7mmol/L）以上のレベルは、糖尿病を示す。

【0555】

1型糖尿病は、C-ペプチドアッセイを使用して、2型糖尿病と区別することもできる。前記アッセイは、内在性のインスリン産生の測定である。（グルタミン酸脱炭酸酵素、インスリノーマ関連ペプチド-2またはインスリンに対する）抗-膵島抗体の存在、または、グルコース耐性試験により決定されるインスリン抵抗性の欠落も、1型を示す。多くの2型糖尿病が内部的にインスリンを産生し続け、全てがある程度のインスリン抵抗性を有するためである。

【0556】

GAD65抗体についての試験が、免疫系が1型糖尿病の病因に関与しているのが明らかであるために、1型と2型との糖尿病の間を区別するための改善された試験として提案されている。

10

【0557】

一部の実施形態では、本発明は、本願明細書に開示された方法により産生されたSC-β細胞の集合を、このような治療を必要とする対象における膵臓機能を保存するのに使用するための組成物を提供する。必要に応じて、膵臓の内分泌（インスリン、グルカゴンまたはソマトスタチン）の不十分な産生または分泌を正確に制御できないことに関する任意の症状が、この発明に基づいて調製された細胞（例えば、SC-β細胞の集合）による処置に考慮され得る。特に対象となるものは、I型（インスリン依存性）糖尿病の処置である。

【0558】

外来性インスリンの投与における確立された長期依存性及び許容可能なリスクプロファイルに基づく処置を必要とする対象が選択され得る。前記対象は、体重1kgあたりに、約10,000個のSC-β細胞または同等の細胞を受容する。前記細胞が自家でない場合、同種ミスマッチを克服するために、前記対象は、手術前に、免疫抑制剤、例えば、FK506及びラパマイシン（経口）及びダクリズマブ（静脈内）で処置され得る。SC-β細胞の集合を含む組成物は、門脈中にカテーテルにより注入され得る。ついで、前記対象は、肝機能を決定する、腹部超音波及び血液試験に供され得る。日量のインスリン要求を追跡し、前記対象は、必要に応じて、2回目の移植を提供される。追跡モニタリングとしては、薬剤レベル、免疫機能、全体的な健康状態及び、患者がインスリン独立性のままであるかどうかについての頻繁な血液試験があげられる。

20

【0559】

糖尿病患者の管理に対する一般的なアプローチは、標準的な教科書、例えば、the Textbook of Internal Medicine, 3rd Edition, by W. N. Kelley ed., Lippincott-Raven, 1997;並びに、専門の参考文献、例えば、Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text 2nd Edition, by D. Leroith ed., Lippincott Williams & Wilkins 2000; Diabetes (Atlas of Clinical Endocrinology Vol. 2) by C. R. Kahn et al. eds., Blackwell Science 1999;及び、Medical Management of Type 1 Diabetes 3rd Edition, McGraw Hill 1998に提供される。I型糖尿病の処置についての膵島細胞の使用は、Cellular Inter-Relationships in the Pancreas: Implications for Islet Transplantation, by L. Rosenberg et al., Chapman & Hall 1999;及び、Fetal Islet Transplantation, by C. M. Peterson et al. eds., Kluwer 1995において、長く検討されている。

30

40

【0560】

通常、対象の選択、投与方式及びSC-β細胞の集合の投与量についての最終的な責任は、管理医師の責任である。商業的配布の目的で、本願明細書に開示されたSC-β細胞

50

の集合は、典型的には、ヒトへの投与用に十分な無菌条件下で調整された等張性賦形剤を含む薬学的組成物の形式で供給される。この発明は、その製造、配布または使用中の任意のタイミングで存在するSC-β細胞の集合のセットを含む。前記SC-β細胞の集合のセットは、この開示に記載され、成体型内胚葉細胞のPdx1陽性膵臓始原細胞になる分化、及び例えば、インスリン産生細胞、例えば、成熟膵臓β細胞または成熟膵臓β様細胞（前記用語は、本願明細書において定義されている。）へのその後の分化に、制限されず例示された、2つ以上の細胞集合の任意の組合せを含む。一部の実施形態では、前記SC-β細胞の集合を含む細胞組成物は、他の細胞種、例えば、場合により、同じゲノムを共有する他の分化した細胞種との組合せで投与され（例えば、対象内に埋め込まれ）得る。前記セット中の各細胞種は、まとめて、または、同じ施設または同じ実体もしくははビジネス関係を共有する異なる実体の管理下において異なる場所において、別々の容器に梱包され得る。

10

【0561】

細胞組成物の医薬品における一般原理について、読み手は、Cell Therapy : Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morslyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996に言及される。前記組成物は、場合により、所望の目的、例えば、糖尿病の処置について記載された説明書と共に、適切な容器に梱包される。

【0562】

20

一部の実施形態では、SC-β細胞の集合を含む組成物は、膵臓膵島細胞の1つ以上の内分泌ポリペプチドを産生するように設計された機械的装置の機能コンポーネントとしても使用され得る。その最も単純な形態では、前記装置は、前記細胞集合の通過を防止し、それらを前記装置に保持するが、前記細胞集合により分泌されたインスリン、グルカゴンまたはソマトスタチンの通過を許容する、半透過性膜の内側にSC-β細胞の集合を収容する。これには、典型的には、脱分化を防止する細胞の相互作用を許容する、細胞クラスターの形態でマイクロカプセル化されたSC-β細胞の集合が含まれる。例えば、米国特許第4,391,909号明細書には、インスリンサイズのタンパク質を透過するが、100,000mol.wtを超える分子を透過しないように架橋している、3,000mol.wtより大きい多糖類ポリマーで構成された楕円形状の半透過膜に封入された膵島細胞が記載されている。米国特許第6,023,009号明細書には、アガロース及びアガロペクチンから形成された半透過膜に封入された膵島細胞が記載されている。この性質のマイクロカプセルは、糖尿病患者の身体腔内に投与されるのに採用され、組織適合性の問題または細菌に対する感受性を低下させる特定の利益を有すると考えられる。

30

【0563】

SC-β細胞の集合を含み、糖尿病患者への埋込み用または体外治療用のいずれかに使用するための、より精巧な装置も考慮される。米国特許第4,378,016号明細書には、体外セグメント、皮下セグメント及び、ホルモン産生細胞を収容する取り替え可能なエンベロープを含む人工的な内分泌腺が記載されている。米国特許第5,674,289号明細書には、半透過膜により、周囲の組織に対して開かれた1つ以上の血管新生化チャンバに対して分離された、膵島チャンバを有するバイオ人工膵臓が記載されている。有用な装置は、典型的には、膵島細胞を収容するように採用されたチャンバ、及び、前記膵島細胞からの分泌タンパク質を回収し、例えば、循環グルコースレベルの前記膵島細胞へのシグナル伝達帰還を可能にする場合もある、半透過膜により前記膵島細胞から分離されたチャンバを有する。

40

【0564】

SC-β細胞または膵臓β細胞の産生を増大させるβ細胞成熟因子の特定方法

【0565】

本願明細書において、SC-β細胞（例えば、膵臓β細胞）の産生を増大させるβ細胞成熟因子または薬剤の特定方法が記載される。特定の例では、高含量及び／または高スル

50

ーブットのスクリーニング法が提供される。前記方法は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、少なくとも1つの化合物（例えば、ライブラリ化合物または本願明細書に記載された化合物）に曝すこと、及び、前記化合物が前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体からSC-β細胞、例えば、成熟膵臓β細胞の産生を増大させるかを決定することを含む。細胞は、本願明細書に記載された1つ以上のマーカーを使用して、SC-β細胞（例えば、成熟膵臓β細胞）と特定され得る。一部の例では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、前記ライブラリへの暴露前に分化されてもよい。他の例では、2つ以上の化合物が、前記スクリーニングアッセイにおいて、個々にまたはまとめてのいずれかで使用されてもよい。更なる例では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、マルチウェルプレートに入れられてもよく、ライブラリ化合物が、前記マルチウェルプレートの種々のウェルに、前記ライブラリの種々のメンバーを入れることによりスクリーニングされてもよい。ライブラリのこのようなスクリーニングにより、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体から、SC-β細胞、例えば、成熟膵臓β細胞を生成可能な化合物が素早く特定され得る。

10

【0566】

一部の実施形態では、前記方法は、さらに、前記SC-β細胞、例えば、膵臓β細胞の集合を単離することを含む（例えば、この場合、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、50%、75%以上の対象細胞種）。

【0567】

20

一部の実施形態では、前記方法は、さらに、本願明細書に開示された方法により産生されたSC-β細胞を、対象（例えば、糖尿病、例えば、I型、II型または1.5型の糖尿病を有する対象）内に埋め込むことを含む。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、対象から得られた幹細胞から得られる。一部の実施形態では、前記SC-β細胞は、対象とは異なるドナー、例えば、対象の親類からの幹細胞から得られる。

【0568】

一態様では、本発明は、本願明細書に記載された方法により調製されたSC-β細胞、例えば、成熟膵臓β細胞を特徴とする。別の態様では、本発明は、本願明細書に記載された方法により調製されたSC-β細胞を含む組成物を特徴とする。

【0569】

30

別の態様では、本発明は、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体；本願明細書に記載された少なくとも1つのβ細胞成熟因子；並びに、前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体及び前記少なくとも1つのβ細胞成熟因子を使用して、SC-β細胞（例えば、成熟膵臓β細胞）を産生するための説明書を含むキットを特徴とする。一部の実施形態では、前記キットは、さらに、成熟β細胞についてのマーカー、例えば、本願明細書に記載されたマーカーの検出用コンポーネント、例えば、β細胞成熟のマーカーの検出用試薬、例えば、前記マーカーに対する抗体；並びに、コントロールとして使用するための成熟膵臓β細胞を含む。

【0570】

一部の実施形態では、前記キットは、さらに、内胚葉細胞、例えば、成体型内胚葉細胞を、第2細胞種の細胞、例えば、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体に分化させるコンポーネント；並びに、本願明細書に記載された内胚葉細胞（例えば、前記成体型内胚葉細胞）及び前記コンポーネントを使用して、前記第2種の細胞、例えば、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を産生するための説明書を含む。一部の実施形態では、前記キットは、さらに、前記第2細胞種の細胞についてのマーカー、例えば、本願明細書に記載されたマーカーの検出用コンポーネント、例えば、Pdx1の検出用試薬、例えば、前記マーカーに対する抗体；並びに、例えば、コントロールとして使用するための、前記第2細胞種の細胞、例えば、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を含む。

40

【0571】

50

一態様では、本発明は、少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を提供すること、及び、少なくとも1つのβ細胞成熟因子への前記幹細胞の暴露に基づいて、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体をSC-β細胞（例えば、成熟膵臓β細胞）に分化させる、少なくとも1つのβ細胞成熟因子（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子）を提供することを含む、インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体のSC-β細胞への分化の促進方法の特徴とする。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、哺乳類由来である。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、マウスまたはヒト由来である。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、胚性幹細胞（例えば、哺乳類の胚性幹細胞、例えば、マウスまたはヒトの胚性幹細胞）を培養して得られる。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、誘導多能性幹細胞（例えば、哺乳類のiPSC細胞、例えば、マウスまたはヒトのiPSC細胞）を培養して得られる。

10

【0572】

一部の実施形態では、複数のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、例えば、前記複数のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体を、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ以上の、本願明細書に記載されたβ細胞成熟因子と接触させることにより、複数の成熟膵臓β細胞またはSC-β細胞に分化される。

20

【0573】

一部の実施形態では、前記複数のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、前記β細胞成熟因子に、約1、2、3、4、6、8、10、12、14、16日以上の間、曝される。一部の実施形態では、前記複数のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、約25nM、50nM、100nM、150nM、200nM、250nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μMまたは10μMの濃度で、前記β細胞成熟因子に曝される。一部の実施形態では、前記複数のインスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体は、約250nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nMの濃度で、前記β細胞成熟因子に曝される。一部の実施形態では、約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を超える前記インスリン陽性内分泌細胞またはその前駆体が、前記成熟膵臓β細胞またはSC-β細胞に分化される。

30

【0574】

一部の態様では、本開示は、本願明細書に記載されたSC-β細胞を使用して構築された人工膵島を提供する。一部の態様では、人工膵島は、例えば、本願明細書に記載された方法に基づいて、多能性幹細胞から、*in vitro*分化された1つ以上のSC-β細胞を含む。

【0575】

一部の態様では、本開示は、多能性幹細胞から、*in vitro*分化されたSC-β細胞を含む人工膵臓を提供する。

【0576】

40

前述の発明を実施するための形態及び下記実施例は、単に例示であり、本発明の範囲を限定すると解釈されるものではないことが理解される。開示された実施形態に対する種々の変更及び修飾は、当業者に明らかであろうし、本開示の精神及び範囲から逸脱することなくなされ得る。さらに、特定された全ての特許、特許出願及び刊行物は、例えば、本開示に関連して使用されるであろうこのような刊行物に記載された方法論を説明及び開示する目的で、参照により本願明細書に明確に組み込まれる。これらの刊行物は、本出願の出願日前におけるその開示についてのみ提供される。この関連において、本発明者らが、従来の発明または任意の他の理由により、先立つこのような開示に権限を与えないとの容認と解釈されるべきでない。これらの文書の内容に関するデータまたは代表例に関する全ての記述は、本出願人に利用可能な情報を基礎づけており、これらの文書のデータまたは内

50

容の正確性に関する任意の容認と解釈されない。

【実施例】

【0577】

実施例

【0578】

実施例1－機能性膵臓β細胞の*in vitro*生成

【0579】

概要

【0580】

幹細胞からのインスリン産生膵臓β細胞の*in vitro*生成は、糖尿病における創薬及び細胞移植治療のための前例のない細胞ソースを提供するであろう。ただし、ヒト多能性幹細胞(hPSC)から以前生成されたインスリン産生細胞は、本物のβ細胞の多くの特徴、例えば、*in vitro*及び／または*in vivo*における機能を欠いている。本願明細書に記載された研究は、*in vitro*においてhPSCからSC-β細胞を生成する、規模を拡大可能な典型的な分化プロトコルを説明する。驚くべきことに、かつ、予想外に、これらのSC-β細胞は、複数回の連続的なグルコースチャレンジ、Ca²⁺流動に対する応答において、成体β細胞に匹敵する量のインスリンを分泌し、β細胞に見出されるマーカーを発現し、インスリンを分泌顆粒内にパッケージする。概念の証明として、SC-β細胞は、公知の糖尿病剤及び*in vitro*における増殖性刺激にも応答する。さらに、前記SC-β細胞は、移植直後に、マウス血清中において、高レベルのヒトインスリンを分泌し、これらの細胞移植により、糖尿病マウスにおける高血糖が、直ちに改善される。本願明細書に記載された研究により、糖尿病の処置及び*in vitro*でのβ細胞研究及び薬剤スクリーニングのための幹細胞系β細胞(すなわち、SC-β細胞)の使用における主要な進歩が提供される。

【0581】

下記研究から、本願明細書に記載された方法に基づいて産生されたSC-β細胞の複数の利点が説明される。例えば、前記SC-β細胞は、*in vitro*でのグルコース刺激インスリン分泌を行い、遺伝子発現及び超微細構造によりヒト膵島β細胞に類似し、ヒトインスリンを分泌し、マウスに移植された場合、高血糖を改善し、細胞療法(例えば、追加的及び／または機能性β細胞を必要とする対象への移植)、(例えば、インスリン産生／分泌、生存、脱分化等のための)薬剤スクリーニング、研究(例えば、正常なβ細胞と糖尿病のβ細胞との間の機能における差異の決定)及び、再生医学(例えば、膵島再構成における第1細胞種としての前記SC-β細胞の使用)の新規なプラットフォームを提供する。

【0582】

序論

【0583】

ヒト多能性幹細胞(hPSC)の発見は、疾患の処置または薬剤スクリーニングのために、いつか細胞及び組織が再生され、細胞及び組織を置き換え得る可能性にドアを開いた。過去10年における研究は、他の方法では取得が困難であったであろう細胞、例えば、ニューロンまたは心筋細胞を生成する戦略の開発を通してその目標に近い分野を活動していた(Krinks et al., 2011; Shiba et al., 2012)。これらの細胞は、動物モデルにも移植されており、一部の例では、幹細胞系心筋細胞による不整脈の抑制(Shiba et al., 2012)、オリゴデンドロサイト始原細胞による脊椎損傷後の運動回復(Keirstead et al., 2005)または盲目のげっ歯類モデルへの網膜上皮細胞の移植後の視力改善(Lu et al., 2009)等の有益な作用を伴って、宿主内に移植可能である。

【0584】

幹細胞系組織により処置可能な場合がある最も早く進行する疾患の1つは、糖尿病である。国際糖尿病基金に基づけば、世界中で3億人を超える人々が、糖尿病を患っている。

1型糖尿病では、膵臓の膵島において、 β 細胞の自己免疫破壊を生じている。一方、より一般的な2型糖尿病では、末梢組織のインスリン抵抗性及び β 細胞の機能不全を生じている。これらの患者、特に、1型糖尿病を患っている者は、新規な機能性 β 細胞の移植により治癒する可能性がある。死後硬直したヒトの膵島の移植は、この戦略により、5年以上の間、患者がインスリン独立性になり得ることを説明しているが、このアプローチは、ドナーであるヒト膵島の不足により非常に限定的である（Bellin et al., 2012）。幹細胞由来のヒト β 細胞の限りない供給の登場は、この治療を何百万の新たな患者に広げ得る。 β 細胞は、生成される必要があるのが1つの細胞種のみであり、それらの細胞を免疫保護装置（例えば、本願明細書に記載されたマイクロカプセル）内において、身体のどこかに配置することができるとして、または、血管へのアクセスを有する材料として、再生医療についての理想的な試験症例である。

10

【0585】

β 細胞の機能及び増殖を改善し得る新規な薬剤を特定する薬学的スクリーニングも、死後硬直した膵島の限定的な供給、死亡例におけるバリエーションによる高い変動性、ドナーの遺伝的バックグラウンド及びその単離における他の要因により妨げられる。このため、SC- β 細胞の一致した均一な供給は、糖尿病用の独特で価値ある創薬プラットフォームを提供し得る。

【0586】

今日の研究により、*in vitro*において、hPSCから β 細胞株を生成することに向かう相当な進歩がなされている。現在、成体型内胚葉及びその後の膵臓前駆体は、高い効率で分化され得る（Kroon et al., 2008; D'Amour et al., 2006; D'Amour et al., 2005; Rezania et al., 2012）。重要なことに、これらの細胞は、さらに、げっ歯類への移植後3から4ヶ月以内に、機能性 β 細胞に分化し得る（Kroon et al., 2008; Rezania et al., 2012）。このことは、十分な時間及び適切な刺激が提供されれば、 β 細胞に発達する発達可能性を含むことを示している。運悪く、前記細胞が*in vivo*において受ける数ヶ月の長い過程は、ブラックボックスのままである。この過程がヒト患者において機能するであろうかは不明である。他の研究は、*in vitro*においてヒト膵臓前駆体からインスリン産生細胞を生成することに焦点が当てられてきた。しかしながら、今日生成されている細胞は、本物の β 細胞ではない。これらの細胞は、*in vitro*でのグルコース刺激インスリン分泌を行えず、適切な β 細胞マーカー、例えば、NKX6-1もしくはPDX1を発現できず、他のホルモン、例えば、グルカゴンを異常に共発現してしまい、*in vivo*における移植後に機能できず、または、これらの異常な特徴の組合せを示す、のいずれかである（D'Amour et al., 2006; Cheng et al., 2012; Narayanan et al., 2013; Xie et al., 2013; Nostro et al., 2011）。

20

30

【0587】

本願明細書に記載された研究は、*in vitro*において、hPSCからの機能性ヒト β 細胞の実質的に限りない、規模を拡大可能な産生のための戦略を提供する。3次元細胞培養系における組合せにおいて、シグナル伝達経路の連続的な調節を使用することにより、重要な β 細胞マーカーを共発現しており、 β 細胞の超微細構造特性を示す、モノホルモン性のインスリン産生細胞（SC- β 細胞）が生成され得る。さらに、これらの細胞は、*in vitro*及び*in vivo*の両方において、ヒト膵島の機能を模倣する。最後に、前記細胞は、糖尿病用の*in vitro*での薬剤スクリーニング及び*in vivo*での移植治療の二重の目的で、その有用性の概念における証明を説明する。

40

【0588】

結果

【0589】

hPSCからのグルコース知覚性インスリン分泌 β 細胞の*in vitro*生成

50

【0590】

*in vitro*においてhPSCから機能性β細胞を生成するための典型的な方法を、図1Aに概説する。多量のβ細胞を産生するために、 10^8 個を超えるhPSC及び後の分化した細胞種を生成し得る、規模を拡大できる懸濁系培養システムを使用した(Schulz et al., 2012)。先の刊行物(Schulz et al., 2012; Rezania et al., 2012)から採用したプロトコルを使用して、直径約100–200 μmのHUES8ヒト胚性幹細胞のクラスターを、高純度の成体型内胚葉に誘導し(95%超のSox17+)、その後、初期膵臓前駆体に誘導した(90%超のPDX1+) (図1B)。次に、高レベルのNKX6-1+/PDX1+を共発現している膵臓前駆体クラスター(60%超のNKX6-1+/PDX1+細胞)を生成する、FGFファミリーメンバーであるKGF、ヘッジホッグ阻害剤であるSant1及び低濃度のレチノイン酸との培養における、延長した時間を使用する方法を特定した(図1A)。これらの膵臓前駆体のマウスへの移植により、*in vivo*において3–4ヶ月後に、機能性β細胞を生じることが報告されている(Rezania et al., 2012)。これを、*in vitro*における機能性β細胞のこの生成を再現するプロトコルを開発するための開始点として使用した。

10

【0591】

ついで、先に公開されたプロトコル(コントロールの分化)または新たに開発したプロトコル(新規な分化)のいずれかを使用して、NKX6-1+/PDX1+膵臓始原細胞を、C-ペプチド発現内分泌細胞に分化させた。前記コントロールの分化プロトコルにより、数ヶ月の経過にわたって、モノホルモン性のINS+及びINS+/GCG+またはINS+/SST+のポリホルモン性(PH)細胞であった細胞を産生した。専門用語であるPHを、この細胞集合を意味するのに使用した。一方、前記新規な分化プロトコルは、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害、レチノイン酸シグナル伝達、ガンマーセレクトアーゼ阻害、TGFβシグナル伝達阻害、EGFシグナル伝達、甲状腺ホルモンシグナル伝達及び膵島培地であるCMRL1066を含む、2–3週間の特有の一連の培養工程を含んだ(Nostro et al., 2011; Rezania et al., 2012; Thowfeequ et al., 2007; Aguayo-Mazzucato et al., 2013; D'Amour et al., 2006)。この新規な分化プロトコルにより産生されたC-ペプチド+細胞は、初代成体β(1°β)細胞と類似すると仮定された。なお、前記C-ペプチド+細胞は、幹細胞-β(SC-β)細胞(すなわち、SC-β細胞)を意味する。

20

30

【0592】

β細胞の重要な機能的特徴は、グルコース刺激インスリン分泌(GSIS)を繰り返す行うその能力である。ほぼ全ての既存の直接分化プロトコルは、*in vitro*におけるGSISを行えないhPSC由来のインスリン発現細胞を生成する(D'Amour et al., 2006)。1回のグルコースチャレンジに対する応答においていくらかインスリンを分泌し得る細胞を調製し得る、内皮前駆体株を開始集合として使用する、1つのプロトコルが報告されている(Cheng et al., 2012)。対照的に、本願明細書に記載された方法を使用して生成されたSC-β細胞は、少なくとも3回の連続的な高グルコースチャレンジに対して応答し得る。これらの細胞は、初代成体β細胞に類似するパターンで、高レベルのインスリンを分泌した。一方、前記コントロールプロトコルからのPH細胞は、グルコースに対して応答できなかった(図2A–2C及び図3A–2C)。低グルコース(2 mM)に対して高グルコース(20 mM)で分泌されたインスリンの割合により算出される刺激指数は、初代成体β細胞と比較してSC-β細胞について同様であり、それぞれ、 2.3 ± 0.9 及び 2.3 ± 1.4 であった。さらに、SC-β細胞及び初代成体β細胞の両方が応答しなかった高グルコースチャレンジが、小さな割合で存在した。さらに、SC-β細胞による20 mM グルコースに対する応答において、細胞1個あたりに分泌されたインスリン量は、初代成体β細胞により分泌された量と区別できず、それぞれ、 2.6 ± 1.6 及び $2.5 \pm 1.2 \mu\text{IU}/10^3$ 個であっ

40

50

た。まとめると、このデータから、前記新規な分化プロトコルを使用して生成したSC-β細胞の*in vitro*機能は、その本物の初代成体β細胞の対照に非常に類似する。

【0593】

前記新規な分化プロトコルを使用して生成したSC-β細胞の*in vitro*機能を、細胞内 Ca^{2+} の変化を測定することにより、その後確認した。β細胞は、グルコースレベルの変化を、カルシウムのシグナル伝達により知覚する。グルコースレベルの上昇は、インスリン放出の引き金を担う、カルシウムイオンの流入を引き起こす膜の脱分化をもたらす(Mohammed et al., 2009)。このため、細胞クラスターにおけるカルシウム流入を、蛍光性のカルシウムインジケータ染料であるFluo-4AMで染色し、蛍光顕微鏡法を使用して、リアルタイムにモニターした(図4A)。この方法により、集合及び1つの細胞の両レベルでのカルシウム流動の分析が可能となり、SC-β細胞及び初代成体β細胞の両方が、類似する方法において、細胞内 Ca^{2+} を繰り返し増大させることにより、連続的なグルコースチャレンジに応答したことが示された。前記応答は、正常なGSISと一致する。一方、前記コントロールの分化プロトコルにより生成したPH細胞は、その異常なGSISと一致する異常なカルシウム応答を示した(図4B)。1つの細胞分析を行った場合、個々のSC-β細胞及び初代成体β細胞のほとんどが、カルシウムの流動により、2-3回の連続的なグルコースチャレンジに応答した。一方、PH細胞はほとんど、1回もチャレンジに応答しなかった(図4C-4E)。げっ歯類のβ細胞と異なり、ヒトβ細胞は、高グルコースに対する応答において、ある程度同期不全を示すことが公知である(Rutter and Hodson, 2013)。これらのデータから、前記SC-βクラスター内の集合全体及び個々の細胞が、単離された膵島内のβ細胞と同様に機能することが示され、さらに、前記新規な分化プロトコルを使用して生成された前記SC-β細胞が、*in vitro*において機能するとの結論を支持することが示される。

【0594】

初代ヒトβ細胞に類似する、hPSC由来の幹細胞系β細胞

【0595】

SC-β細胞が初代成体β細胞と同様に*in vitro*において機能することを観察した後、ついで、前記2つの細胞集合を、タンパク質発現、遺伝子発現及び超微細構造により分析した。大部分の先に報告されたhPSC系インスリン産生細胞とは異なり、これらのSC-β細胞は、正常なβ細胞マーカーであるPDX1及びNKX6-1の両方を発現している(図5A及び5B)。非β細胞ホルモンが稀に観察されたが、NKX6-1/C-ペプチド共陽性細胞とは共局在していない(図5C)。SC-β細胞は、インスリン及びC-ペプチドの両方について陽性に染色される。C-ペプチドは、プロインスリン処理の化学量論量の副産物である。このことは、前記インスリン染色が、細胞内在性のインスリン産生に由来すること(図6)、及び、ISL1、MAFA及びMafbで染色されること(図7A-7C)を示す。フローサイトメトリーにより定量から、本願明細書に記載された方法が、死後硬直したヒト膵島において見出されるのと同様の割合で、40% NKX6-1/C-ペプチドを産生し得ることが証明される(図5D)。さらに、総C-ペプチド+細胞の8%のみが、グルカゴンを共発現しており、4%が、ソマトスタチンを共発現している(図8A-8C)。ある研究では、ほとんどがモノホルモン性細胞であることが先に報告されているが、それらの細胞は、重要なβ細胞特定マーカーであるNKX6-1を発現し、または、*in vivo*において機能することが示されなかった(Cheng 2012)。近年の研究では、より高いレベルのNKX6-1を生成する直接的な分化プロトコルにより、膵臓前駆体移植についてのより良好な移植結果がもたらされることが示されている(Rezania et al., 2013)。さらに、順化ノックアウト研究では、NKX6-1発現が成体マウスの膵島におけるβ細胞機能に必須であることが示されている。このことは、我々の細胞におけるこれらの因子の共発現が、その機能性を説明するのに役立つ場合があることを示唆している(Taylor et al., 2013)。

【0596】

複数の重要なβ細胞マーカーの改善されたタンパク質発現により、これらの細胞の転写ネットワークが、ヒトの膵島β細胞の転写ネットワークとより良好に一致することが示された。近年の研究では、先のプロトコルにより生成されたINS+PH細胞が成体の膵島INS+β細胞と類似しないことが証明されている(Hrvatine et al., 2014; Xie et al., 2013)。先に公開されたプロトコルにより生成された、分取したINS+細胞のマイクロアレイ分析から、それらは、同じ方法により分取した機能性の成体ヒトβ細胞よりむしろ、胎児β細胞とクラスター形成したことが示された。

【0597】

本開示のSC-β細胞と成体ヒト膵島とを比較するために、同じ方法を使用して、INS+/NKX6-1+細胞を分取し、マイクロアレイにより全体的な遺伝子発現分析を行った。先に公開された幹細胞系INS+PH細胞とは異なり、本願明細書に記載されたSC-β細胞は、胎児β細胞またはINS+PH細胞より、ヒト成体β細胞と密にクラスター形成した(図5E)。さらに、これらのデータから、標準的なβ細胞遺伝子、例えば、PDX1、MNX1及びNKX2-2の発現が、先のINS+PH細胞より、SC-β細胞と成体ヒトβ細胞との間で類似したことが示された。データセットにおいて上位100個の最も差動的に発現された遺伝子の分析から、SC-β細胞及び成体ヒトβ細胞が、先のPHまたは胎児β細胞より、互いに類似したことが示された(図5F)。SC-β細胞とヒト成体β細胞との間に差異が残っている。この差異は、分化の後段階中に、培養培地の組成に対する更なる小さな変更により改善され得る。

【0598】

SC-β細胞の遺伝子及びタンパク質の発現パターンが初代ヒトβ細胞の発現パターンと類似するため、SC-β細胞も、本物のβ細胞がするのと同様に、適切な分泌顆粒内にそのインスリンタンパク質をパッケージしているであろうことが假定された。β細胞は、最初ハローを有する淡い灰色であり、さらに、明るいハローを有する暗い結晶化多角形顆粒に成熟する分泌顆粒内に、インスリンをパッケージする(図9A)。幹細胞から生成されたINS+細胞の先の研究では、これらの細胞がポリホルモン性で、アルファ様顆粒のみを有することが証明された。前記顆粒は、暗いハローを有する区別できる丸い顆粒である(D'Amour et al., 2006; Kroon et al., 2008)。これらの結果、異常なポリホルモン性及びアルファ様顆粒のみを有し、あるとしても、β細胞顆粒をほとんど有さないINS+細胞を産生した前記コントロールプロトコルについて要約された(図9A)。一方、本願明細書に記載された方法では、プロトタイプのβ細胞顆粒内にインスリンタンパク質をパッケージ及び結晶化したSC-β細胞が生成される(図9A)。インスリン顆粒の進行及び成熟、結晶化インスリン顆粒の両方が、初代ヒトβ細胞とSC-β細胞との両方において観察された(図9B)。これらの顆粒におけるタンパク質含量物を確認するために、免疫金標識を、インスリン及びグルカゴンに対する粒子により行った。一方、前記PH細胞顆粒は、異常にインスリン及びグルカゴンの両タンパク質を含んでいた。初代ヒトβ細胞及びSC-β細胞の顆粒は、インスリンのみを含んでいた(図9C)。このため、SC-β細胞の超微細構造は、成体ヒトβ細胞の同構造に類似する。

【0599】

hiPSCからのグルコース知覚性インスリン分泌β細胞のin vitro生成

【0600】

上記されたように、hPSCから機能性β細胞を発達させるのに使用した前記新規な分化プロトコルを、さらに、in vitroにおいて、hiPSC株から機能性β細胞を生成するのに使用した。非糖尿病または1型糖尿病患者のいずれかから増殖させた皮膚繊維芽細胞を使用して、Harvard iPSC Coreにおいて、前記hiPSC株を生成した。胚から生成されたhPSCとは対照的に、前記hiPSC株を、ヒト組織から生成した。前記ヒト組織は、機能性β細胞が疾患を有する患者、すなわち、1型糖尿病

を有する患者から直接発達され得ることを示す。

【0601】

得られたβ細胞を、グルコースチャレンジに供して、グルコース刺激インスリン分泌（G S I S）を繰り返し行うその能力を決定した。本願明細書に記載された方法を使用して生成された複数のβ細胞が、少なくとも3回の連続的な高グルコースチャレンジに対して応答し得ることが見出された（図10A-10B）。この特定の実験では、非糖尿病細胞株（1013-3FA）から得られたh i P S C-β細胞を、1型糖尿病細胞株（1031SeVA）から得られたh i P S C-β細胞と比較した。高グルコース（20mM）と低グルコース（2mM）とで分泌されたインスリン比により算出される刺激指数は、前記1型糖尿病細胞株から得られたβ細胞と比較して、前記非糖尿病細胞株から得られたβ細胞についてより高かった。さらに、2mMまたは20mM グルコースチャレンジのいずれに対する反応でも、細胞あたりに分泌されたインスリン量は、前記非糖尿病細胞株から得られたβ細胞についてよりも、前記1型糖尿病細胞株から得られたβ細胞について多かった。まとめると、これらのデータから、1型糖尿病細胞株から得られたh i P S C-β細胞のi n v i t r oにおける機能は、非糖尿病細胞の対照に類似することが示唆される。

10

【0602】

h i P S C-β細胞がi n v i t r oにおいてグルコースに対して応答性であることを観察した後に、次に、本発明者らは、非糖尿病と1型糖尿病との細胞集合が、タンパク質発現、遺伝子発現及び超微細構造により、どの程度類似するかを分析した。3種類の非糖尿病細胞株と3種類の1型糖尿病細胞株とを、NKX6-1/C-ペプチドの発現を決定するのに使用した。h P S Cの場合、これらのh i P S C-β細胞は、正常なβ細胞マーカーであるPDX1及びNKX6-1の両方を発現していた（図11A-11F）。フローサイトメトリーによる定量から、本願明細書に記載された方法が、死後硬直したヒト膵島に見出された割合と同様に、約40%のNKX6-1/C-ペプチドを産生し得ることが証明される（図5D）。

20

【0603】

移植後の幹細胞系β細胞のi n v i v oにおける機能

【0604】

これまで記載されたデータは、i n v i t r oにおける機能性ヒトβ細胞の生成と一致している。i n v i v oにおいて機能するその能力をさらに試験するために、これらの細胞を、免疫不全状態のマウスの腎被膜下に移植した（図12A-12D及び表S1）。

30

【表 S 1】

表 S 1. SC-β細胞、初代β細胞及びPH細胞を移植したマウスの血清からのヒトインスリンのELISA測定

細胞種	ヒトインスリン(μIU/mL)			細胞種	ヒトインスリン(μIU/mL)			細胞種	ヒトインスリン(μIU/mL)		
	ms#	0'	30'		ms#	0'	30'		ms#	0'	30'
SC-β細胞	1	2.2	1.1	1°β細胞	1	1.1	2.8	PH細胞	1	nd	0.4
	2	5.1	2.5		2	1.4	2.0		2	nd	0.1
	3	1.8	4.0		3	0.5	2.4		3	nd	0.1
	4	1.3	3.2		4	0.7	1.4		4	nd	0.4
	5	2.1	2.4		5	1.1	1.7		5	nd	0.4
	6	nd	8.5		6	-0.4	-0.1		6	0.1	0.1
	7	nd	7.5		7	1.4	3.9		7	0.2	0.2
	8	nd	5.9		8	nd	5.1 *		8	0.0	0.3
	9	nd	5.9		9	nd	13.0 *		9	0.0	-0.2
	10	nd	2.9		10	nd	5.1 *		10	0.5	1.2
	11	1.4	5.3		11	nd	1.5 *		11	nd	0.7
	12	1.7	2.6		12	nd	4.4		12	nd	1.0
	13	2.3	4.3		13	nd	7.0		13	nd	1.6
	14	0.9	1.4		14	nd	2.2		14	nd	1.1
	15	nd	3.3		15	nd	3.2		15	0.3	0.6
	16	nd	3.5		16	nd	3.9		16	0.1	0.2
	17	nd	4.3		17	1.0	0.6		17	2.6	0.1
	18	nd	3.2		18	0.9	1.7				
	19	nd	45.0 #		19	5.9	2.6				
	20	nd	36.1 #		20	1.6	2.3				
	21	nd	14.8 #		21	1.0	1.7				
	22	nd	67.5 #								
	23	nd	57.7 #								
	24	nd	3.0								
	25	nd	2.8								
	26	nd	5.6								
	27	nd	7.5								
	28	nd	7.8								
	29	nd	6.4								
	30	5.0	11.4								
	31	4.3	5.1								
	32	3.8	2.5								

nd = 未測定

最終工程中に *in vitro* において2週間培養；他の全てのSC-β細胞は1週間培養

【0605】

成体ヒト膵島を移植する場合、ヒトインスリンは、これらのマウスの血清中において2週間以内に検出可能である。逆に、先に公開された膵臓前駆体をマウスに移植した場合、移植後2週間でインスリンは検出されない (Kroon et al., 2008; Schulz et al., 2012; Rezania et al., 2012)。前記細胞が3-4ヶ月の長さを必要とする代わりに、*in vivo*における成熟期がほとんど理解されていない。一方、ヒト膵島と同様に、SC-β細胞は、移植後2週間以内に、グルコースチャレンジに対する応答において、宿主の血流中に高レベルのインスリンを分泌する (図12A)。コントロールとして、先に公開されたプロトコルを使用した生成されたPH細胞も移植し、これらの細胞は、*in vivo*でのグルコースに対する応答において、明らかなレベルのインスリンを分泌しなかったことが見出された (図12A)。さらに、生成された膵臓前駆体が、先に公開されたように、2週間以内に *in vivo*において、明らかなインスリンを産生できないことも確認された (図12C)。

【0606】

本物のβ細胞でない一部のインスリン産生細胞は、応答性β細胞よりもむしろ、インスリンペレットのように機能して、動物の血流中に未制御な方法において、インスリンを分泌し得る。SC-β細胞が高レベルのインスリンを分泌するだけでなく、マウスの血流中におけるヒトインスリン量を、機能的に応答性的方法で分泌するかどうかを試験するために、急性グルコースチャレンジの前後両方で測定した。ヒト膵島移植及びSC-β細胞移植の両方について、12匹の試験したマウスのうち9匹が、移植後2週間で、*in vivo*における機能的なグルコース刺激インスリン分泌を示した (図12A)。

【0607】

最後の *in vivo*でのGSI Sチャレンジを行った後、これらの動物を犠牲にし、移植した腎臓を、分析用に取り出した。これらの腎臓の組織切片から、前記腎被膜下にヒト細胞の大きな移植片の存在が証明された。これらの移植片の免疫蛍光染色から、SC-β細胞及びヒト膵島移植片の両方が、高レベルのインスリン産生細胞を含んでいたことが

示された（図12B）。それらのINS+細胞は、機能性β細胞について期待されたのと同様に、標準的なβ細胞転写因子であるPDX1も共発現していた。インスリン及びグルカゴン染色分析から、前記SC-β細胞が移植後にモノホルモン性を維持していたことがさらに証明された（図13A-13B）。免疫蛍光及びフローサイトメトリー分析により観察されたように、GCG+細胞の小さい集合も、このプロトコルにおいて生成されている（図7及び図10）。それらの細胞は、移植後の*in vivo*においても観察される（図13）。

【0608】

特にAlk5阻害剤及びT3ホルモンを含むCMRL培地を添加した培地を、最後の分化工程に使用した場合、*in vitro*でのインスリン分泌が経時的に増大したことが、さらに観察された。このため、SC-β細胞を、さらに1週間（この最後の工程の培地において1週間に代えて2週間）、*in vitro*において培養し、それらが、*in vivo*においてインスリンをより分泌するであろうかどうかが見えるかも観察した。これらの熟成した細胞を移植した後、予想外に、同じ数のより若い移植されたSC-β細胞より、10倍高いレベルのインスリンが観察された（図12D）。このため、ヒトSC-β細胞により*in vivo*において達成可能なレベルのインスリン機能は、ヒト膵島の移植により達成されたレベルと同様であった。まとめると、これらの移植データから、提供された死後硬直した膵島の変動性及び限られた供給、または、移植された幹細胞系膵臓前駆体からのほとんど理解されておらず、ほとんど制御できない*in vivo*成熟期に頼らずに、SC-β細胞は、細胞移植のための代替的な臨床的選択肢を提供し得ることが示唆される。

【0609】

培養培地

【0610】

少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞のSC-β細胞への*in vitro*成熟を誘導するために、前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、適切な培養培地に十分な期間維持する。本発明では、上記したように、Alk5阻害剤及びT3ホルモンを含むCMRL培地を使用することにより、*in vitro*で培養されたSC-β細胞が、*in vivo*においてより多くのインスリンを分泌するのを可能にしたことが見出された。一方、分化の最後の工程（ステージ6）（図14A）において、前記CMRL培地に更なる因子を添加することにより、高グルコースチャレンジと低グルコースチャレンジとの間の刺激指数または放出されたインスリン量のいずれかにより測定した場合、SC-β細胞による、より良好なグルコース刺激インスリン分泌（GSIS）応答を生じることも見出された。このような更なる因子としては、制限されず、Sant1、XXI及びSSPをあげることができる。高グルコース（15mM）と低グルコース（2.5mM）とで分泌されたインスリン比により算出した場合、前記刺激指数は、CMRL培地のみ、Alk5阻害剤及びT3ホルモンを含むCMRL培地またはAlk5阻害剤及びT3ホルモンを含むS3培地中で維持されたそれらのSC-β細胞より、Alk5阻害剤及びT3ホルモン及びSant1、XXIまたはSSPのいずれかを含むCMRL培地中で維持されたSC-β細胞について高かった（図14B）。さらに、分泌されたインスリン量は、CMRL培地のみ、Alk5阻害剤及びT3ホルモンを含むCMRL培地またはAlk5阻害剤及びT3ホルモンを含むS3培地中で維持されたそれらのSC-β細胞より、Alk5阻害剤、T3ホルモン及びSant1、XXIまたはSSPのいずれかを含むCMRL培地中で維持されたSC-β細胞について多かった（図14C）。まとめると、これらのデータから、最後の分化工程に重要なCMRL培地中でSC-β細胞を維持して、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC-β細胞への成熟を誘導することだけでなく、前記CMRL培地への特定の因子、例えば、Sant1、XXIまたはSSPの更なる添加が、前記細胞のグルコース刺激インスリン分泌（GSIS）を向上させるであろうことも示唆される。

【0611】

細胞の生存及び機能の向上

【0612】

幹細胞分野についての1つの課題は、薬剤スクリーニング、疾患のモデリングまたは治療的使用に有用であり得る、十分な量のSC-β細胞を生成することである。例えば、hES細胞は、培養するのが技術的に困難であり、細胞剥離及び解離に基づいてアポトーシスを受けやすく、特に完全な解離後に大規模な細胞死を受け、低いクローニング効率を有する(Watanabe, K. et al., Nature Biotechnology 25, 681-686 (2007))。結果として、得られた生きたSC-β細胞の量は少ない場合がある。図15Aに示した方法における工程3と6との間のプロトコルを改良することにより、治療的に有用であり得るより多くのSC-β細胞をもたらす、より純粋なNKX6.1+内分泌クラスターを生成し得る(図15B)。

10

【0613】

例えば、工程3-5において、細胞生存を、rho関連プロテインキナーゼ阻害剤またはRock阻害剤を添加することにより改善し得る。Rock阻害剤の添加は、解離誘導性アポトーシスを防止するため、そのクローニング効率を向上させることにより、ES細胞の生存を向上させると考えられる(Watanabe et al.)。Rock阻害剤の例としては、制限されず、Y-27632、Fasudil/HA1077及びH-1152があげられる。本発明では、Rock阻害剤で前記細胞を処理することにより、細胞生存が改善されるのが示された(図15C)。

20

【0614】

Rock阻害剤で前記細胞を処理することに加えて、工程3-4における細胞を、アクチピンAを単独で、または、ニコチンアミドとの組合せで処理し得る。アクチピンA及びニコチンアミドは両方とも、細胞生存を改善するのが示されている。それらが細胞生存を改善する1つの方法は、多能性幹細胞についてのマーカーであるSOX2を、約81%から約47%下方制御することによる(図15D)。SOX2及びNKX6-1が相互に排他的であるため(図15E)、SOX2の下方制御は、成熟膵臓β細胞についてのマーカーであるNKX6-1の上方制御をもたらす。

【0615】

工程5-6において、スタウロスポリンで細胞を処理することにより、細胞生存を、さらに向上させ得る。スタウロスポリンは、神経細胞、グリア及び幹細胞様ニューロスフェア分化のアクチベーターであることが公知であり、アポトーシスを誘導するとも考えられている(Schumacher, et al., Mol. Cell. Neurosci. 2003; 23(4): 669-680)。本発明において、前記スタウロスポリンの添加により、膵臓内分泌細胞マーカーであるクロモグラニンAの割合を向上させること(図15F)、及び、NKX6-1、C-ペプチド+細胞の割合を向上させること(図15G)により、純粋に近い内分泌集合がもたらされる。

30

【0616】

最後に、β細胞成熟を改善する、XXI、γ-セクレターゼ阻害剤との組合せで、Alk5i、T3を含む培養培地で細胞を処理することにより、細胞生存を、さらに向上させ得る。図15H及び15Iに示したように、工程5及び6における前記培地へのXXIの添加は、ニューロD1+集合を増加させ得る。

40

【0617】

まとめると、これらのデータから、前記プロセス全体を通した種々の段階において、前記細胞に特定の化合物を添加することが、細胞生存を改善するのに重要であり、治療的に有用なSC-β細胞に分化し得る細胞集合を濃縮するのにも重要であることが示唆される。

【0618】

トランスレーショナル生物学についてのSC-β細胞の有用性

【0619】

50

幹細胞分野についての主な課題は、薬剤スクリーニング、疾患モデリングまたは治療的使用に有用な、その正常に発達した対照に十分近い分化した細胞種を生成することである。本願明細書で検討された新規な分化プロトコルを使用して生成されたSC-β細胞は、初代ヒトβ細胞に類似する方法で、*in vitro*及び*in vivo*の両方において機能するとみなされる。したがって、これらの細胞は、トランスレーショナル医療に有用であり得ることが仮定される（図16A）。

【0620】

2型糖尿病を処置するための最も一般的な治療戦略の1つは、経口抗糖尿病剤の投与である。これらの医薬品の多くは、β細胞に直接作用して、インスリン分泌を増大させる。例えば、スルホニル尿素の薬剤は、カリウムチャネルを遮断することにより、内在性インスリンの分泌を増大させる（Modi, 2007）。β細胞における現在の薬剤スクリーニングは、げっ歯類膵島、形質転換細胞株または、非常に変動性に限られた供給の死後硬直したヒト膵島に限られている。げっ歯類の代謝がヒトの代謝と部分的にしか類似しないことを考えれば、分析用のヒトβ細胞の信頼性のある一致した供給は、非常に価値があるであろう。ここで、本発明者らは、SC-β細胞を*in vitro*での治療的スクリーニングに使用し得るかどうかを研究した。

【0621】

まず、本発明者らは、SC-β細胞が、複数の異なる分類からの既存の抗糖尿病剤に応答し得るかどうかを試験した（図16B）。LY2608204は、臨床試験中のグルコキナーゼアクチベータである。一方、リラグルチド、トルブタミド及びナテグリニドはそれぞれ、GLP-1アゴニスト及び分泌促進物質（スルホニル尿素及びメグリチニド）の例である。これらは、臨床的に使用されている（Matschinsky, 2009; Modi, 2007; Vetere et al., 2014）。実際に、SC-β細胞は、グルコースチャレンジ後の*in vitro*でのインスリン分泌を増大させることにより、これらの薬剤による処置に対して応答する傾向を示した（図16C）。これらのデータは、SC-β細胞が将来の薬剤スクリーニングについての新規なプラットフォームを提供し得る、概念の最初の証明を提供する。

【0622】

次に、本発明者らは、SC-β細胞がβ細胞複製をモデル化し得るかどうかを試験した。患者のβ細胞集合が増大することは、β細胞あたりに産生されるインスリン量を増大させる必要なく、合計でより多くのインスリンを産生することにより、血糖コントロールを改善し得る。今日、げっ歯類または細胞株モデルにおいてβ細胞複製を促進させている薬剤がヒトβ細胞に転用されているものはほとんどない。β細胞複製のホルモンコントロールは、ヒトの妊娠における膵島集合の研究、及びプロラクチン処理を使用するげっ歯類の研究から示唆されている（Parsons et al., 1992; Labriola et al., 2007; Brelje et al., 2004）。本発明者らは、プロラクチンによる処理により、SC-β細胞集合におけるβ細胞複製が増大され得るかどうかを試験した。プロラクチンと共にSC-β細胞を培養した後に、C-ペプチド及び増殖マーカーであるKi67について、細胞を染色及び固定した（図16D及び16E）。初代ヒトβ細胞も同様にした。Ki67+増殖性SC-β細胞のベースライン数は、非常に少なかった（ $0.20 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-ペプチド+）（図16F）。未処理及びプロラクチン処理細胞の定量から、プロラクチンの下流に、増大した増殖が向かう傾向が証明された（ $0.39 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-ペプチド+）。このことは、SC-β細胞が、複製スクリーニングにおいて、増殖刺激に応答可能である場合があることを示唆している（図16F）。

【0623】

最後に、本発明者らは、SC-β細胞が、糖尿病を処置するための細胞療法として直接有用であり得るかどうかを試験した。2型糖尿病とは異なり、新たな医薬品によるβ細胞の機能またはβ細胞の複製を向上させることは、膵臓β細胞が自己免疫攻撃により壊される1型糖尿病を有する患者には、おそらくほとんど治療的利益がない。これらの患者は、

Edmonton移植プロトコルによる、ドナー同種膵島により、失われたβ細胞を置き換えることにより、効果的に処置され得る（Shapiro et al., 2006）。

【0624】

この種の重篤な糖尿病の1つの有用なモデルは、Akitaマウスである。Akitaマウスは、インスリン遺伝子中に、タンパク質のミスフォールド、完全かつ不可逆的なβ細胞不全及び、進行的により重篤な高血糖をもたらす変異を有する。Akitaマウスは、腎被膜へのマウスまたはヒト膵島の移植により、正常血糖に回復され得る（Pearson et al., 2008）。したがって、本願明細書に記載された方法に基づいて生成されたSC-β細胞を、それらが、糖尿病性高血糖を制御するのにも機能し得るかを見る試験をした。その結果から、先のプロトコルのPH INS+細胞ではなく、SC-β細胞の、若いAkitaマウスへの移植は、これらの動物において観察された進行的に悪化する高血糖を急速に反転させたことが示された（図16G）。SC-β細胞を移植されたマウスの絶食時血中グルコース測定は、平均200mg/dl未満であった。一方、コントロールのPH細胞を移植されたマウスは、移植されていないAkitaマウスについて観察されたのと同様に（Pearson et al., 2008）、400mg/dlを上回る進行的により高い血中グルコースレベルを示した（図16G）。予測された通り、ヒトインスリンレベルは、SC-β細胞を移植された動物で高く、PH細胞を移植されたコントロール動物ではほとんど検出できなかった（図16H）。SC-β細胞を移植された前記マウスは、コントロールマウスより良好な体重維持も示した。このことは、インスリン機能が正常化したことを示す（図17）。このため、SC-β細胞は、ほぼ移植直後から、糖尿病マウスモデルにおいて、インスリンを分泌可能であり、進行性の高血糖を停止及び反転可能である。

【0625】

議論

【0626】

本願明細書に記載された研究から、機能性ヒトβ細胞が、in vitroにおいて、hPSC及びhiPSCから直接生成され得ることが証明される。まとめると、本願明細書に記載されたデータから、これらの細胞（すなわち、SC-β細胞）は、in vitro及び移植後のin vivoの両方において、初代ヒトβ細胞と同様に機能する。本願明細書に記載された方法に基づいて生成されたSC-β細胞は、β細胞研究及び治療についての複数の新たな機会を提供する。提供される死後硬直した膵島の限られた供給、患者の特徴または単離によるサンプル間の高い変動性及びごく少量のヒトβ細胞のin vitro複製のために、今日におけるヒトβ細胞の供給は厳しく制限されている。この制限は、患者のための移植の選択肢並びに高いスループットの薬剤スクリーニング及び疾患モデリングを制限してきた。1名の68kg（150lb）の患者には、膵島移植により1型糖尿病を効果的に解決するために、おおまかに3億4000万-7億4800万個の移植用の膵島細胞が必要である（McCall and Shapiro, 2012）。本願明細書に記載された戦略は、数億から数十億個のSC-β細胞を一度に増殖させるのを、単独の研究室で実施させるのに、効果的で、非常に規模を拡大できるのの両方である。糖尿病についての先に記載された幹細胞系治療と比較した、SC-β細胞の主な臨床的利点は、これらの細胞が、in vivoにおける更なる分化の、予測できない可能性がある「ブラックボックス」の期間を必要としない、細胞療法のための最初の機会を提供することである。

【0627】

初代ヒトβ細胞とは異なり、SC-β細胞は、任意の所望の遺伝的バックグラウンドの細胞からも生成され得る。現在、糖尿病または他のメタボリックシンドロームを有する患者からのiPS細胞を得ることができ、同iPS細胞を、疾患モデリング及びβ細胞の機能またはストレスもしくは免疫攻撃に対する感受性の研究のために、SC-β細胞に分化させ得る。TALEN及びCRISPR等の技術が、ESまたはiPS細胞のゲノム編集

を可能にし、ゲノムワイド関連研究（GWAS）等の遺伝子解析により特定された変異体を包含及び試験する。同様に、現在、 β 細胞の薬剤応答は、変異体または非変異体の β 細胞の遺伝的に一致したペアの間で比較され得る（Ding et al., 2013）。 β 細胞の機能または薬理遺伝学用の新規な生体マーカーの特定及び試験も、これらの技術の組合せにより可能である。このため、SC- β 細胞は、*in vitro*創薬並びに代謝及び糖尿病における特徴決定についての、新規な、ヒト特異的プラットフォームを提供する。

【0628】

SC- β 細胞の生成は、膵島及び膵臓臓器の将来の生成に向けた、潜在的に有用な一歩も提供する。幹細胞系膵臓細胞の培養中の膵臓のニッチ細胞、例えば、間葉細胞または内皮細胞を包含させることが、有益である場合がある（Sneddon et al., 2012; Lammer et al., 2001）。他の証拠から、アルファ及びデルタ細胞の存在が、正常な β 細胞の機能を正確に調節するのに重要である場合があることが示唆されている（Rodriguez-Diaz et al., 2011）。さらに、膵臓臓器の再生医療は、注意深く特定化された機構において、機能性の内分泌組織及び管組織の包含を潜在的に必要とするであろう。前記SC- β 細胞の生成は、幹細胞生物学を利用することで、臨床的影響を前進させる一歩を提供する。

10

【0629】

実験手順

【0630】

細胞培養

20

【0631】

37℃、5% CO₂及び100%湿度のインキュベータ中の、70 rpmの回転速度に設定された9-ポジション攪拌プレート上に置かれた、500 mlの攪拌フラスコ（Corning, VWR; 89089-814）において、hPSC株を、mTESR1（StemCell Technologies Inc.; 05850）中で、未分化で維持した。HUES8株を、使用した初代株とした。細胞を、Accutaseで分散させ、10 μ M Y27632（Abcam; ab120129）を含むmTESR中に50万個/mlで、単独の細胞として播種した。mTESR1培地を、48時間後に交換した（Y27632を含まない）。培地変更の24時間後に、培養物を分割して、クラスター直径サイズ300 μ m未満を維持した。病原体、核型について、及び、多能性マーカーの維持のために、培養物を定期的に試験した。

30

【0632】

直接的分化に使用した典型的な培地は、下記の通りである。

【0633】

S1培地：MCDB131（Cellgro; 15-100-CV）+8mM D-（+）-グルコース（Sigma; G7528）+2.46 g/L NaHCO₃（Sigma; S3817）+2% FAF-BSA（Proliant; 68700）+ITS-X（Invitrogen; 51500056）1:50.000+2mM Glutamax（Invitrogen; 35050079）+0.25mM ビタミンC（Sigma Aldrich; A4544）+1% Pen/Strep（Cellgro; 30-002-CI）。

40

【0634】

S2培地：MCDB131+8mM D-グルコース+1.23 g/L NaHCO₃+2% FAF-BSA+ITS-X 1:50.000+2mM Glutamax+0.25mM ビタミンC+1% Pen/Strep。

【0635】

S3培地：MCDB131+8mM D-グルコース+1.23 g/L NaHCO₃+2% FAF-BSA+ITS-X 1:200+2mM Glutamax+0.25mM ビタミンC+1% Pen/Strep

50

【0636】

BE5培地：MCDB131+20mM D-グルコース+1.754g/L NaHCO₃+2% FAF-BSA+ITS-X 1:200+2mM Glutamax+0.25mM ビタミンC+1% Pen/Strep+ヘパリン 10μg/ml (Sigma; H3149)。

【0637】

CMRLS：添加済みCMRL1066 (Mediatech; 99-603-CV)+10% FBS (HyClone (商標)、VWR; 16777)+1% Pen/Strep。

【0638】

10

全ての培地を、0.22μmのボルトトップフィルタ (Corning) を通して、ろ過滅菌した。全ての下記培地交換について、小分子及び成長因子を、弱光フード中で、培地交換直前に基本培地に添加した。

【0639】

SC-β細胞分化を開始するために、細胞を、50万個/mlで播種し、分化を、48時間後に開始した。培地交換は、下記の通りである。

【0640】

1日目：S1+100ng/ml アクチビンA (R&D Systems; 338-AC)+3μM Chir99021 (Stemgent; 04-0004-10)。

【0641】

20

2日目：S1+100ng/ml アクチビンA。4、6日目：S2+50ng/ml KGF (Peprotech; AF-100-19)。

【0642】

7、8日目：S3+50ng/ml KGF+0.25μM Sant1 (Sigma; S4572)+2μM レチノイン酸 (RA) (Sigma; R2625)+200nM LDN193189 (7日目のみ) (Sigma; SML0559)+500nM PdbU (EMD Millipore; 524390)。

【0643】

9、11、13日目：S3+50ng/ml KGF+0.25μM Sant1+100nM RA。

30

【0644】

14、16日目：BE5+0.25μM Sant1+50nM RA+1μM XXI (EMD Millipore; 565790)+10μM Alk5i II (Axora; ALX-270-445)+1μM L-3, 3', 5-トリヨードチロニン (T3) (EMD Millipore; 64245)+20ng/ml ベタセルリン (Thermo Fisher Scientific; 50932345)。

【0645】

18、20日目：BE5+25nM RA+1μM XXI+10μM Alk5i II+1μM T3+20ng/ml ベタセルリン。

【0646】

40

21-35日目 (2日置きに培地交換)：CMRLS+10μM Alk5i II+1μM T3。28日目と32日目の間の後にin vitroアッセイにより、細胞を試験した。特に断らない限り、細胞を、28日目に移植した。

【0647】

あるいは、21-35日目：CMRLS+10μM Alk5i II+1μM T3+Sant1。

【0648】

あるいは、21-35日目：CMRLS+10μM Alk5i II+1μM T3+XXI。

【0649】

50

あるいは、21-35日目：CMRLS+10 μ M Alk5i II+1 μ M T3+SSP。

【0650】

先の刊行物に類似するPHプロトコル細胞の生成のために、同じ分化プロトコルを、14日目まで使用した。14日目及び16日目において、S3+1 μ M Alk5i II、200 nM LDN193189及び100 nM RAを、細胞に与えた(Rezania et al., 2012)。18日目以降において、2日に1回、S3+100 nM RAを、細胞に与えた。実験分析まで、細胞を、この培地中で維持した。細胞を、培養物中で維持し、時間の影響を制御するために、前記SC- β 細胞と同じ分化培地中で、同じ日数後に試験した。

【0651】

フローサイトメトリー

【0652】

15 mlのファルコンチューブにおいて、37°Cで10-30分間、TrypLE Express中でのインキュベートにより、細胞を、単独の細胞懸濁液に分散させた。ステージ5において開始して、クラスターを、単独の細胞に十分解離させる。P1000による穏やかな上下のピペッティングにより混合することに基づいて、クラスターが単独細胞に解離するまで、TrypLE Expressで、クラスターをインキュベートするものとする。TrypLE Expressを、3-4倍の培地でクエンチし、細胞を、1000 rpmで5分間遠心沈殿させた。細胞を、PBS中で2回洗浄し、1.7 mlのSafe sealマイクロ遠沈管(Bioscience Inc.; 11510)に移した。100万-1000万個/チューブであるかを確認し、下記において0.5-1 ml容量で使用する。4% パラホルムアルデヒド(PFA)(Electron Microscopy Science Nm; 15710)中に、細胞を再懸濁させ、30分間氷上でインキュベートした。ついで、細胞を、PBS中で3回洗浄し、続けて、ブロッキングバッファー(PBS+0.1% TritonX100(VWR; EM-9400)+5% ロバ血清(Jackson Immunoresearch; 017-000-121)において、1時間氷上でインキュベートした。固定後、細胞は、遠心分離により抵抗性である。以後、全ての遠心分離を、3000 gで3分間行うように固定した。ついで、一次抗体を含むブロッキングバッファーに、細胞を再懸濁させ、4°Cで一晩インキュベートした。

【0653】

一次抗体を、特に断らない限り、1:300で使用した。ヤギ抗-ヒトPDX-1/IPF1(R&D Systems; AF2419)、マウス抗-NKX6-1(University of Iowa, Developmental Hybridoma Bank; F55A12-上清)(1:100)、ウサギ抗-クロモグラニンA(Abcam; ab15160)、ラット抗-インスリン(pro-)/C-ペプチド(Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa; GN-ID4)(グルカゴン及びソマトスタチンの要添加)。細胞を、ブロッキングバッファー中で2回洗浄し、ついで、2次抗体を含むブロッキングバッファー中で、(光から保護して)2時間氷上でインキュベートした。Alexa Fluor 488、647(Life Technologies)またはPE(Thermo Fisher Scientific; NC9774252)にコンジュゲートしている二次抗体を使用して、一次抗体を可視化した。ついで、細胞を、分取バッファー(PBS+0.5% BSA(Sigma; A8412))中で3回洗浄し、最後に、500-700 μ lの分取バッファーに再懸濁させ、40 μ mのナイロンメッシュを通して、FACSチューブ(BD Falcon; 352235)内にろ過し、LSR-II FACS機(BD Biosciences)を使用して、少なくとも30,000イベントの記録で分析した。FlowJoソフトウェアを使用して、結果の分析を行った。

【0654】

免疫蛍光

【0655】

細胞を分散させ、96ウェルプレート上に播種した。1日の培養後、細胞を、PBS中で洗浄し、4% PFAにおいて、RTで20分間固定した。続けて、PBS中で3回洗浄し、細胞を、PBS+0.1% Triton X-100+5% ロバ血清において、RTで1時間ブロッキングした。全ての一次抗体インキュベートを、1:500希釈におけるブロッキング液において、4℃で一晩行った。ヤギ抗-ヒトPDX-1/IPF1、マウス抗-NKX6-1、ウサギ抗-クロモグラニンA、ラット抗-インスリン（pro-）/C-ペプチド、Ki67。翌日、細胞を、PBS中で2回洗浄し、続けて、1:500希釈において、RTで1時間、（光から保護して）二次抗体とインキュベートした。Alexa Fluor 488、594または647（Life Technologies）にコンジュゲートしている二次抗体を使用して、一次抗体を可視化した。続けて、PBS中で3回洗浄し、全ての核を、DAPI（Invitrogen; D1306）で染色することにより可視化した。Olympus IX51顕微鏡またはZeiss LSC 700共焦点顕微鏡を使用して、代表的な画像を撮影した。アレイスキャンセロミクスハイコンテンツスクリーニングシステムを使用して、目的の細胞種の割合を定量した。ここでは、30個の画像を、ウェルあたりに取得し、定量した。抗体染色により標識された細胞及び（DAPI核染色に基づく）総細胞数を定量化して、目的細胞種の割合を得た。

10

20

【0656】

免疫組織化学

【0657】

細胞クラスターまたは臍島を、4% PFAにおけるRTで1時間の浸漬により固定した。ついで、サンプルを、PBSで3回洗浄し、Histogel（商標）に包埋し、組織学的分析用に切片化した。ついで、Histoclear（Thermo scientific; C78-2-G）を使用して、10μmの切片を、脱パラフィン化に供し、再水和させた。抗原回復のために、スライドを、0.1M EDTA（Ambion; AM9261）に浮かべ、圧力鍋（Proteogenix; 2100 Retriever）に、2時間入れた。ついで、PBS+0.1% Triton X-100+5% ロバ血清を使用して、スライドを、RTで1時間ブロッキングし、続けて、一次抗体を含むブロッキング液において、4℃で一晩インキュベートした。下記一次抗体を、特に断らない限り、1:100で使用した。ヤギ抗-ヒトPDX-1/IPF1、マウス抗-NKX6-1、ウサギ抗-クロモグラニンA、ラット抗-インスリン（pro-）/C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン。翌日、細胞を、PBS中で2回洗浄し、続けて、RTで2時間、（光から保護して）二次抗体とインキュベートした。Alexa Fluor 488または594にコンジュゲートしている二次抗体を使用して、一次抗体を可視化した。続けて、PBSで洗浄し、組織学的スライドを、DAPIを含むVectashield封入剤（Vector Laboratories; H-1200）に封入し、カバーガラスでカバーし、ネイルポリッシュで密封した。Olympus IX51顕微鏡またはZeiss LSM 510もしくは710共焦点顕微鏡を使用して、代表的な画像を撮影した。

30

40

【0658】

グルコース刺激インスリン分泌

【0659】

Krebsバッファー（Krb）：128mM NaCl、5mM KCl、2.7mM CaCl₂、1.2mM MgCl₂、1mM Na₂HPO₄、1.2mM KH₂PO₄、5mM NaHCO₃、10mM HEPES（Life Technologies; 15630080）、0.1% BSA（Proliant; 68700）を含むD₂O。溶液を、インキュベータ中で37℃に平衡化した。1ml容量を、下

50

記プロトコルに使用した。約50万個のクラスターとしての細胞を、オートクレーブ済みの1.7mLのSafe sealマイクロ遠沈管に移し、Krb中で2回洗浄した。ついで、クラスターを、2mM グルコースを含むKrb中で、インキュベータにおいて2時間、予備インキュベートして、残留するインスリンを除去した。全てのインキュベートについて、チューブのフタを開けたままにし、空気交換可能なフタで覆うのに、注意する価値がある。クラスターを、Krb中で2回洗浄し、ついで、2mM グルコースを含むKrb中で、正確に30分間インキュベートした。200μlの上清を、インキュベート後に回収した（低グルコースサンプル）。クラスターを、Krb中で2回洗浄し、ついで、20mM グルコースを含むKrb中で、正確に30分間インキュベートした。200μlの上清を、インキュベート後に回収した（高グルコースサンプル）。低及び高グルコースでのチャレンジを、さらに2回繰り返した（合計、3対のチャレンジ）。最後に、クラスターを、Krb中で2回洗浄し、ついで、2mM グルコース+30mM KClを含むKrb中で、正確に30分間インキュベートした。200μlの上清を、インキュベート後に回収した（KCl分極チャレンジサンプル）。前記KClチャレンジ後、Tryp-1eを使用して、クラスターを分散させ、Viace11（製造メーカー）によりカウントして、インスリン分泌量を細胞数で規格化した。

10

【0660】

ついで、ヒト超感度インスリンELISA（ALPCO Diagnostics；80-INSHUU-E01.1）を使用して、分泌されたインスリンを含む上清サンプルを処理した。FLUOstar光学分光計（BMG lantech）により、450nmにおいて、サンプルを測定した。前記ELISAが同じ日に行えなかった場合、サンプルを、-80℃で保存した。ELISAの範囲内のインスリン濃度を得るために、PBS中に、1：100と1：200との間でサンプルを希釈するので、通常十分であった。

20

【0661】

電子顕微鏡観察

【0662】

0.1M カコジル酸ナトリウムバッファー（pH7.4）中に1.25% PFA、2.5% グルタルアルデヒド及び0.03% ピクリン三を含む混合物を使用して、RTで少なくとも2時間、細胞クラスターを固定した。ついで、細胞クラスターを、0.1M カコジル酸塩バッファー中で洗浄し、1% 四酸化オスミウム（OsO4）及び1.5% フェロシアン化カリウム（KFeCN6）を使用して、RTで少なくとも2時間後固定し、0.1M カコジル酸塩バッファー中で洗浄し、1% 四酸化オスミウム（OsO4）／1.5% フェロシアン化カリウム（KFeCN6）を使用して、1時間後固定し、水中で3回洗浄し、1% 酢酸ウラニル水溶液中で1時間染色し、続けて、水中で2回洗浄し、その後、アルコール勾配において、脱水した（各10分；50%、70%、90%、2x10分 100%）。ついで、前記サンプルを、プロピレンオキシド中で、1時間インキュベートし、プロピレンオキシドとTAAB Epon（Marivac Canada Inc. St. Laurent, Canada）との1：1混合物に浸透させた。翌日、前記サンプルを、TAAB Eponに包埋させ、60℃で48時間重合させた。極薄切片（約60nm）を、Reichert Ultracut-Sミクロトームにおいて切り出し、銅の格子状上に載せ、0.2% クエン酸鉛で染色し、JEOL 1200EX透過型電子顕微鏡またはTecnaiG² Spirit BioTWINで調べた。AMT 2k CCDカメラを使用して、画像を記録し、ImageJソフトウェアを使用して分析した。

30

40

【0663】

SCID-ベージュへの移植試験

【0664】

500万個のクラスターとしてのhPSC系細胞を、RPMI1640培地（Life technologies；11875-093）に再懸濁させ、200μLの容量で、PCRチューブにアリコートし、カテーテル内に充填する前に、5から10分間氷上で

50

維持した。細胞充填の準備のために、1 mLのシリンジに連結された、注入設定 $23 \text{ G} \times \frac{3}{4}$ の各カテーテル (Terumo; SB* S23BL) を、1 mLの、5% FBS血清 (Corning; 35-011-CV) 添加RPMI培地で洗浄し、ついで、0.6 mLの血清無添加RPMI培地を充填した。クラスターを、カテーテルニードルの先端から充填し、カテーテルチューブの底及び前記ニードルの上部に、室温で5分間、重力により垂直に沈降させて入れた。細胞調製工程中に、免疫不全 (SCID/ベージュ) マウス (月齢不明?) を、アベルチン 1.25% (250 mg/kg ; $0.5 \text{ mL}/25 \text{ g}$ 1.25% アベルチン/体重) で麻酔した。左心室の術部を剃り、ベタジン及びアルコールで消毒した。約1 cmの切れ目を作り、腎臓を露出させた。腎被膜下にカテーテルニードルを挿入し、500万個の細胞相当のクラスターを含む約 $100 \mu\text{L}$ 容量を注入することにより、クラスターを、腎被膜下に注入した。PDS吸収性縫合糸 (POLY-D-OX; 2016-06) で腹腔を閉じ、手術用クリップ (Kent Scientific Corp; INS750346-2) で皮膚を閉じた。手術/回復期の間、micro-temp循環ポンプ及びブランケット ($\sim 37^\circ\text{C}$) に、マウスを乗せて、麻酔後のマウスの素早い回復を手助けし、 5 mg/kg 用量のカルプロフェンを、手術直後及び最初の投与後24時間で与えた。移植にかかった平均時間は、マウスあたりに約3分であった。傷口のクリップを、手術後14日で除去し、前記マウスを、週に2回モニターした。

10

【0665】

手術から2週間の回復後、グルコース耐性試験 (GTT) を行うことにより、ヒトインスリンの存在及び移植細胞のグルコース応答性を評価した。前記マウスを16時間一晩絶食させた後、 $2 \text{ g D-(+)-グルコース}/1 \text{ kg}$ 体重のIP注射により、GTTを行い、ランセット (Feather; 2017-01) を使用して、顔の血管穿刺により、注射前後に採血した。その後、ヒトインスリンELISAキット (ALPCO Diagnostics; 80-INSHUU-E01.1) を使用して、ヒトインスリンを定量した。前記SCIDマウスから、移植片を切り出し、 4% PFA (Electron Microscopy Science Nm; 15710) 中で固定し、パラフィンに包埋し、組織学的分析用に切片化した。

20

【0666】

カルシウム画像化

30

【0667】

約10から20個のhPSC系クラスターを、マトリゲルでコートした96ウェルプレートに播種し、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 及び 100% 湿度のインキュベータにおいて、24時間付着させた。 2.5 mM グルコースを添加した、予め温めた (37°C) Krebsバッファーで、クラスターを洗浄し、ついで、 2.5 mM グルコース Krebsバッファー中で、 $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -知覚性蛍光プローブであるFluo4-AM (Life Technologies; F14217) と、 37°C のインキュベータにおいて45分間インキュベートした。 2.5 mM グルコース Krebsバッファーで、クラスターを洗浄し、ついで、さらに、 37°C のインキュベータにおいて、さらに15分間インキュベートした。ついで、種々のウェルにおける複数のバッチのクラスターの高解像時系列画像を取得するために、AxioZoom V16顕微鏡 (Carl Zeiss) に、クラスターをすぐに載せた。Fluo-4を、 488 nm で励起した。その放射を、 490 と 560 nm の間で記録した。時系列画像を、17秒毎に、80倍拡大の単独細胞解像において取得した。10個までのウェルを、1つの画像において画像化した。画像化中のグルコースチャレンジの進行及び刺激時間は、下記の通りである。Krebs中の 2 mM グルコースの5分刺激、続けて、Krebsバッファー中の 20 mM グルコースの5分刺激により、画像化を開始した。これらの低グルコース刺激、ついで、高グルコース刺激を、もう2回繰り返した。ついで、Krebsバッファー中の 30 mM KClの5分刺激により、画像化を終了した。画像化時間の合計は、35分であった。前記刺激の間は、画像化を停止し、 2 mM グルコース Krebsバッファーで、クラスターを洗浄し、ついで、次のグル

40

50

コース K r b バッファーを添加した。一連の画像化にわたる前記クラスターの移動を補正する S t a c k R e g 及び画像化全体を通して前記細胞の蛍光強度を測定する R O I マネジャを適用することにより、I m a g e j / F i j i を使用して、35分の画像化中の蛍光強度変化を、単独細胞解像において分析した。V i r t u a l D u b を使用して、5分クリップの7回全ての刺激を、1つの動画にし、データ共有のために y o u t u b e に公開した。

【0668】

細胞内フローサイトメトリー及び遺伝子発現分析

【0669】

H r v a t i n e t a l . , 2014に記載されたように、M A R I S を行った。単独細胞懸濁液において、細胞を収集し、4% P F A において、氷上で固定し、R N a s i n を含むバッファー中で、一次抗体、ついで、二次抗体とインキュベートした。ついで、F A C S により、細胞を分取して、サンプルあたりに少なくとも100,000個の細胞を得た。その後、RNA単離前に、サンプルを、消化バッファー中において、50℃で3時間インキュベートした。N a n o d r o p 1000を使用して、RNA濃度を定量した。少なくとも100ngのトータルRNAからの逆転写により、二本鎖cDNAを生成した。ついで、ビオチン標識ヌクレオチドによる一晚のi n v i t r o 転写により、増幅されたmRNA(cRNA)を生成し、30℃での真空遠心分離により濃縮した。t h e W h o l e - G e n o m e E x p r e s s i o n D i r e c t H y b r i d i z a t i o n キット(I l l u m i n a)を使用して、サンプルあたりに少なくとも750ngのcRNAを、ヒトHT-12 E x p r e s s i o n B e a d C h i p s (I l l u m i n a) にハイブリダイズさせた。I l l u m i n a B e a d s t a t i o n 500上で、クリップをスキャンした。バックグラウンドの差引き及びランク不変正規化により、未処理データを調節した。倍変化を算出する前に、20のオフセットを、全てのプローブセットの平均に追加して、ネガティブなシグナルを削除した。平均シグナル間の差異についてのp-値を、G e n o m e S t u d i o において、t-検定により算出し、I l l u m i n a 専用の偽陽性率(FDR)モデルとの組合せでのB e n j a m i n i - H o c h b e r g 法により、多重仮説検定について補正した。

【0670】

参考文献

A g u a y o - M a z z u c a t o , C . , Z a v a c k i , A . M . , M a r i n e l a r e n a , A . , H o l l i s t e r - L o c k , J . , K h a t t a b i , I . E . , M a r s i l i , A . , W e i r , G . C . , S h a r m a , A . , L a r s e n , P . R . , a n d B o n n e r - W e i r , S . (2013). Thyroid Hormone Promotes Postnatal Rat Pancreatic β -Cell Development and Glucose-Responsive Insulin Secretion Through MAFA. *Diabetes* 62, 1569-580.
B e l l i n , M . D . , B a r t o n , F . B . , H e i t m a n , A . , H a r m o n , J . , B a l a m u r u g a n , A . N . , K a n d a s w a m y , R . , S u t h e r l a n d , D . E . , A l e j a n d r o , R . , a n d H e r i n g , B . J . (2012). Potent Induction of Immunotherapy Promotes Long-Term Insulin Independence After Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *American Journal of Transplantation* 12, 1576-583.
B r e l j e , T . C . , S t o u t , L . E . , B h a g r o o , N . V . , a n d S o r e n s o n , R . L . (2004). Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer a

10

20

30

40

50

nd activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology* 145, 4162-175.

Cheng, X., Ying, L., Lu, L., Galvao, A. M., Mills, J. A., Lin, H. C., Kotton, D. N., Shen, S. S., Nostro, M. C., et al. (2012). Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 371-384.

D'Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazer, S., Kelly, O. G., Kroon, E., and Baetge, E. E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-541.

D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., and Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.

Ding, Q., Lee, Y.-K., Schaefer, E. K., Peters, D., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D., Meissner, T., et al. (2013). A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell* 12, 238-251.

Hrvatin, S., O'Donnell, C. W., Deng, F., Millman, J. R., Pagliuca, F. W., DiIorio, P., Rezania, A., Gifford, D. K., and Melton, D. A. (2014). Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 201400709.

Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience* 25, 4694-4705.

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., and Buch, A. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547-551.

10

20

30

40

50

- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N. G., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443-452.
- Labriola, L., Montor, W. R., Krogh, K., Lojudice, F. H., Genzini, T., Goldberg, A. C., Eliaschewitz, F. G., and Sogayar, M. C. (2007). Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 263, 120-133. 10
- Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564-67.
- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126-135. 20
- Matschinsky, F. M. (2009). Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 399-416. 30
- McCall, M., and Shapiro, A. M. J. (2012). Update on Islet Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007823.
- Modi, P. (2007). Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol* 4, 39-47.
- Mohammed, J. S., Wang, Y., Harvat, T. A., Oberholzer, J., and Eddington, D. T. (2009). Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets. *Lab Chip* 9, 97-106. 40
- Narayanan, K., Lim, V. Y., Shen, J., Tan, Z. W., Rajendran, D., Luo, S. C., Gao, S., Wan, C. A., and Ying, J. (2013). Extracellular matrix-mediated differentiation of human embryonic stem cells: Differentiation to insulin-secreting beta cells. *Tissue Eng Part A* 20, 424-433.
- Nostro, M. C., Sarangi, F., Ogawa, S., Ho 50

- ltzinger, A., Corneo, B., Li, X., Micallef, S. J., Park, I. H., Basford, C., et al. (2011). Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development* 138, 861–871.
- Parsons, J. A., Brelje, T. C., and Sorenson, R. L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459–466.
- Pearson, T., Greiner, D. L., and Shultz, L. D. (2008). Creation of “humanized” mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15, Unit 15.21.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Riedel, M. J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., Gauvin, R., Narayan, K., Karanu, F., et al. (2012). Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice. *Diabetes* 61, 2016–029.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Xu, J., Narayan, K., Fox, J. K., O’Neil, J. J., and Kieffer, T. J. (2013). Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6-1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells* 31, 2432–442.
- Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M. C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M. H., Ricordi, C., Roper, S. D., Berggren, P. O., and Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 17, 888–892.
- Rutter, G. A., and Hodson, D. J. (2013). Minireview: Intra-islet Regulation of Insulin Secretion in Humans. *Molecular Endocrinology* 27, 1984–995.
- Schulz, T. C., Lynn, F. C., Young, H. Y., Agulnick, A. D., Babin, M. J., Baetge, E. E., Bang, A. G., Bhoumik, A., Cepa, I., et al. (2012). A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitor

s from Human Embryonic Stem Cells. PLoS ONE 7, e37004.

Shapiro, A. M., Ricordi, C., Hering, B. J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R. P., Secchi, A., Brendel, M. D., Berney, T., et al. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. N Engl J Med 355, 1318–330.

Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W. Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N. J., Gantz, J., Moyes, K. W., and Reinecke, H. (2012). Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. Nature 489, 322–25.

Sneddon, J. B., Borowiak, M., and Melton, D. A. (2012). Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-attached mesenchyme. Nature 491, 765–68.

Taylor, B. L., Liu, F. F., and Sander, M. (2013). NKX6-1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells. Cell Rep 4, 1262–275.

Thowfeequ, S., Ralphs, K. L., Yu, W. -, Slack, J. M. W., and Tosh, D. (2007). Betacellulin inhibits amylase and glucagon production and promotes beta cell differentiation in mouse embryonic pancreas. Diabetologia 50, 1688–697.

Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S. M., and Wagner, B. K. (2014). Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes. Nature Reviews Drug Discovery

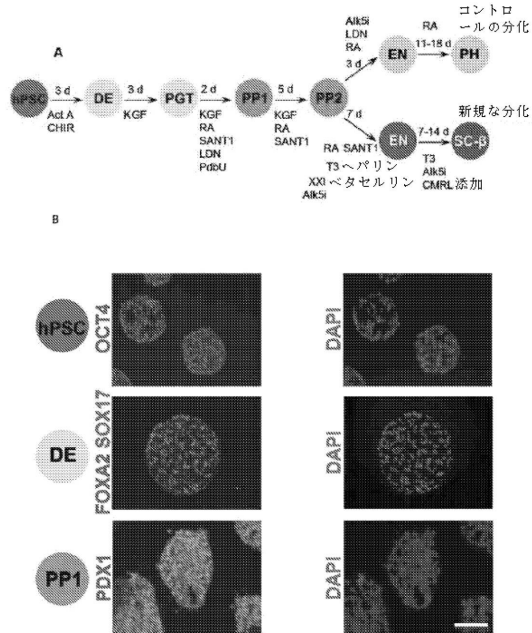
Xie, R., Everett, L. J., Lim, H. W., Patel, N. A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O. G., Wang, A., D'Amour, K. A., et al. (2013). Dynamic Chromatin Remodeling Mediated by Polycomb Proteins Orchestrates Pancreatic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell 12, 224–237.

【0671】

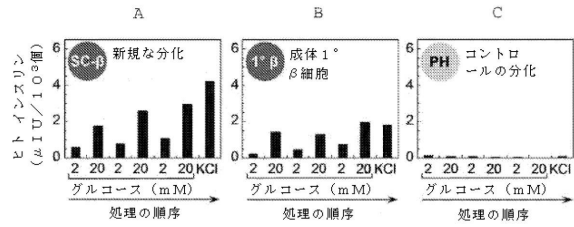
(項目1)

細胞クラスター形成を促進する条件下において、Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞を、i) 形質転換成長因子 β (TGF- β) シグナル伝達経路阻害剤、ii) 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路アクチベータ、及び場合により、iii) プロテインキナーゼ阻害剤と接触させて、少なくとも一部の前記Pdx1陽性、NKX6-1陽性、インスリン陽性の内分泌細胞の、SC- β 細胞へのin vitro成熟を誘導することを含み、前記SC- β 細胞が、in vitroでのGSIS応答を示す、SC- β 細胞の生成方法。

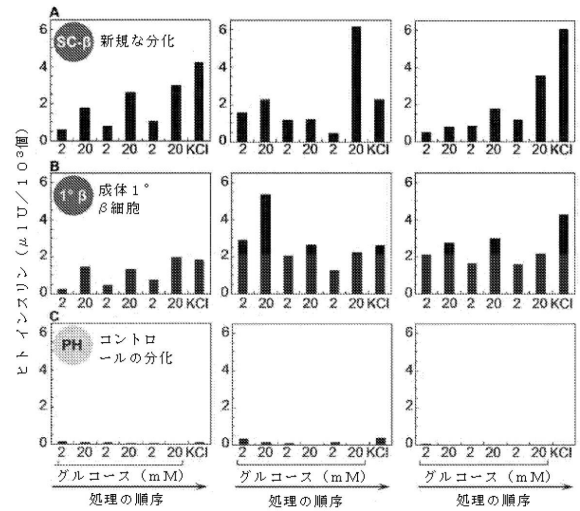
【図 1】



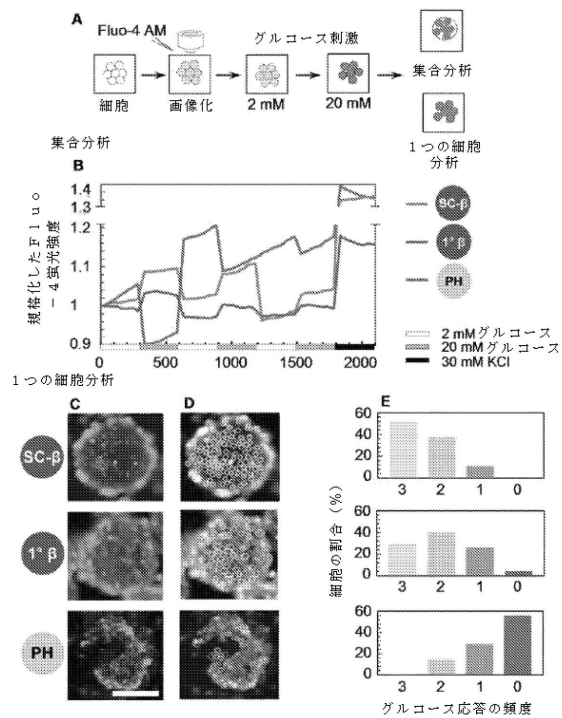
【図 2】



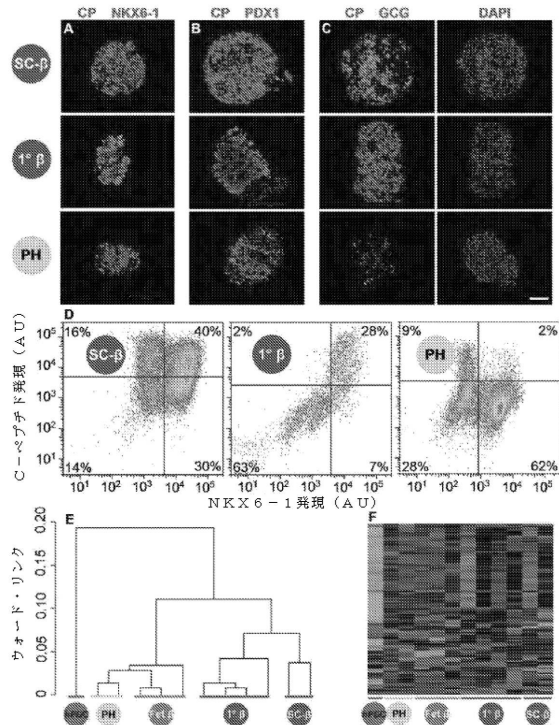
【図 3】



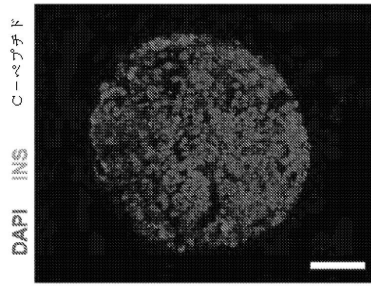
【図 4】



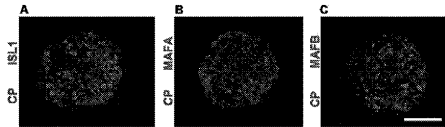
【図 5】



【図 6】

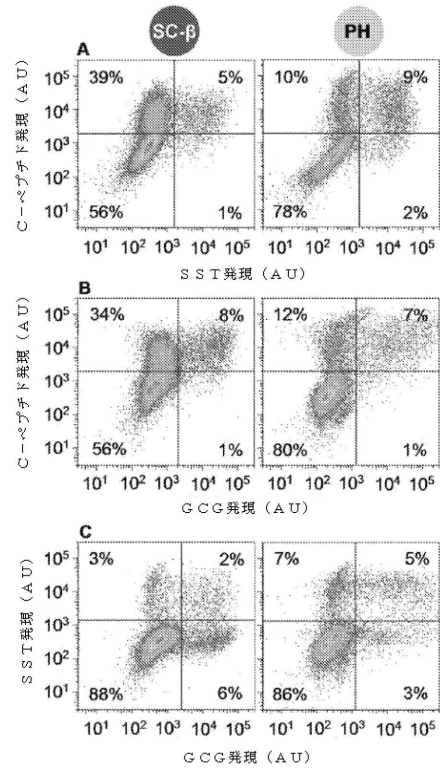


【図 7 A - 7 C】

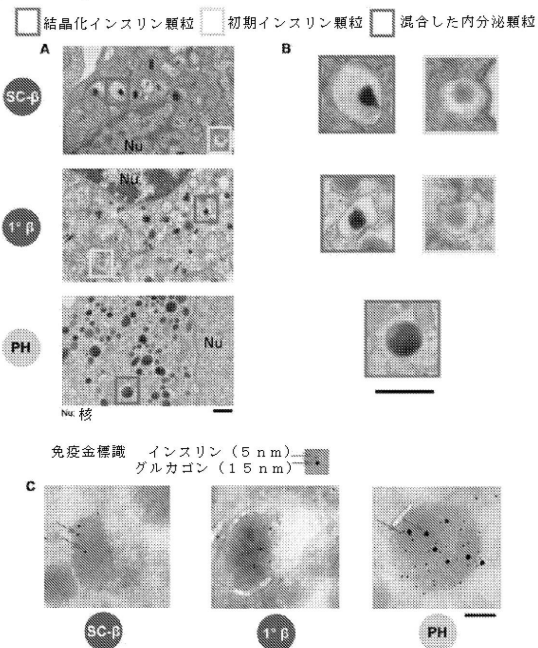


FIGS. 7A-7C

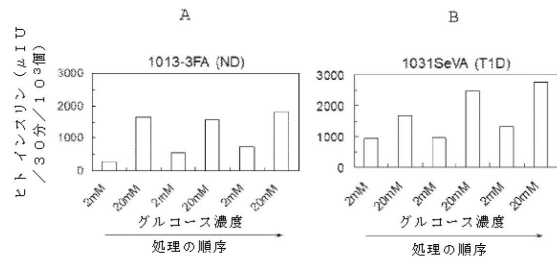
【図 8】



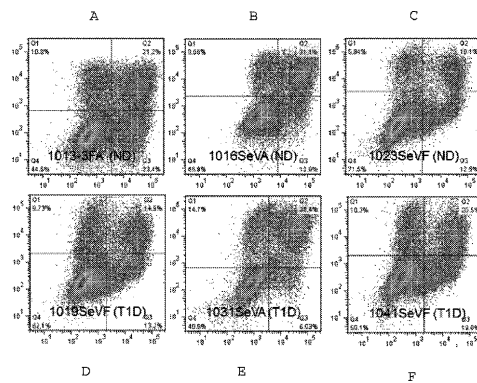
【図 9】



【図 10】

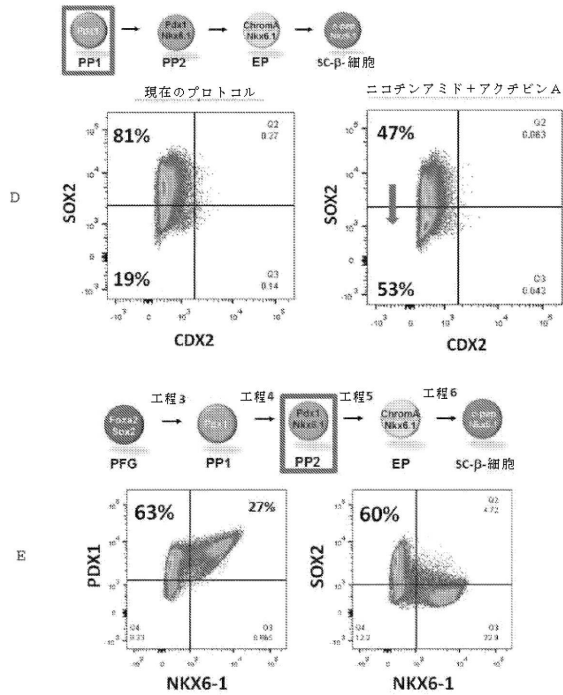


【図 11 A - 11 F】

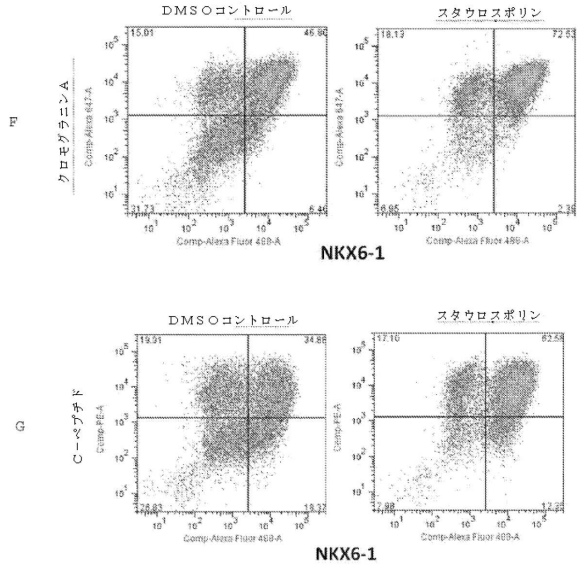


FIGS. 11A-11F

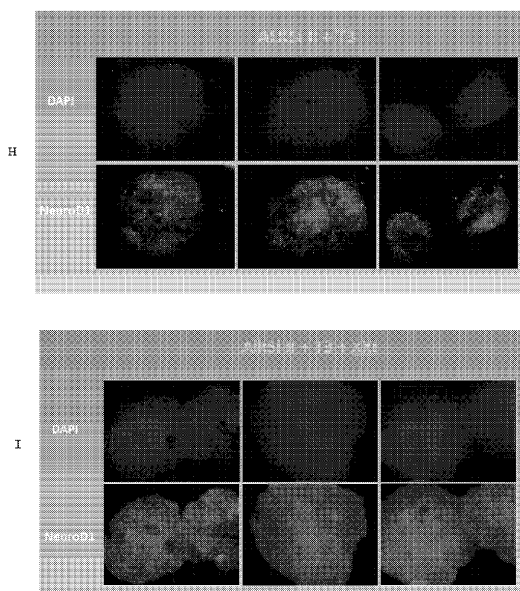
【図 15 D - E】



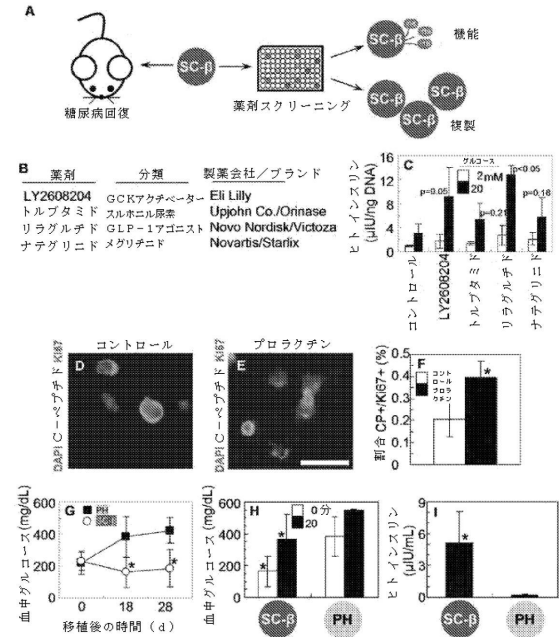
【図 15 F - G】



【図 15 H - I】

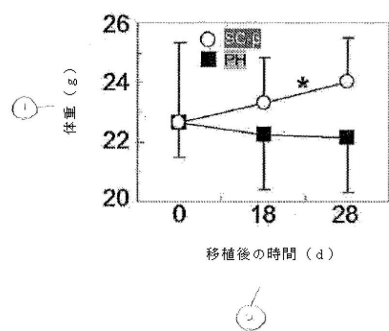


【図 16】



FIGS. 15H-15I

【図 17】



フロントページの続き

- (72)発明者 パリュウカ, フェリシア ジェイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02116, ボストン, コモンウェルス アベニュー
90
- (72)発明者 メルトン, ダグラス エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, スローカム ロード 22
- (72)発明者 ミルマン, ジェフリー アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143, サマビル, ハイランド アベニュー 27
0 アpartment 44
- (72)発明者 シーゲル, マイケル サリス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, ディーン ロード 11
8
- (72)発明者 ギュルトラー, マッズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143, サマビル, ビーコン ストリート 65

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 特表平11-505411 (JP, A)
特表2006-506047 (JP, A)
特表2016-503654 (JP, A)
特表2016-506246 (JP, A)
Cell Stem Cell, 2012年, vol.10, p.371-384
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012年, vol.418, p.765-769

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 35/00 - 35/768
A61L 27/00 - 27/60
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)