

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年11月28日(28.11.2013)



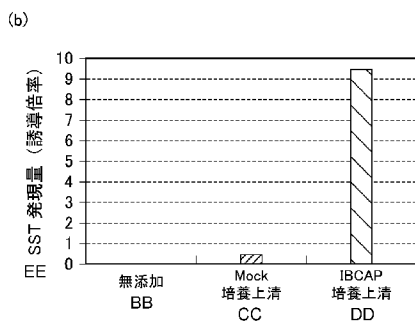
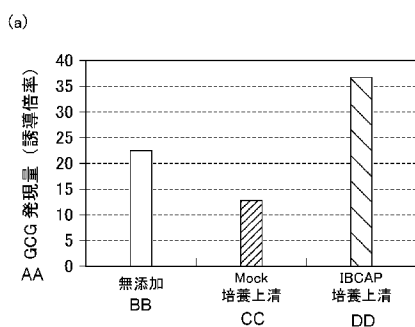
(10) 国際公開番号
WO 2013/176249 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064469
- (22) 国際出願日: 2013年5月24日(24.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-120281 2012年5月25日(25.05.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人埼玉医科大学(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 豊島 秀男(Toyoshima, Hideo); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 岡崎 康司(Okazaki, Yasushi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 横尾 友隆(Yokoo, Tomotaka); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 正林 真之(Shobayashi, Masayuki); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-7-12 サピアタワー Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PANCREATIC HORMONE-PRODUCING CELL, PANCREATIC HORMONE-PRODUCING CELL, AND DIFFERENTIATION/INDUCTION PROMOTER

(54) 発明の名称: 膵臓ホルモン産生細胞の生産方法及び膵臓ホルモン産生細胞、並びに分化誘導促進剤



AA GCG expression amount (fold induction)
 BB Additive-free
 CC Mock culture supernatant
 DD IBCAP culture supernatant
 EE SST expression amount (fold induction)

(57) Abstract: Provided are: a method for producing (a method for differentiating/inducing) a pancreatic hormone-producing cell, which enables the highly efficient differentiation/induction of a pluripotent stem cell or a pancreatic tissue stem/progenitor cell into a pancreatic hormone-producing cell; a pancreatic hormone-producing cell produced by the method; and a differentiation/induction promoter for use in the production method. The method for producing a pancreatic hormone-producing cell according to the present invention is characterized in that a specific differentiation/induction promoter is added to a culture medium in the process of differentiating/inducing of a pluripotent stem cell or a pancreatic tissue stem/progenitor cell into the pancreatic hormone-producing cell. The differentiation/induction promoter to be used is: a polypeptide which comprises an amino acid sequence encoded by DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 or a variant thereof; or a culture supernatant of a cell into which DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 or DNA capable of hybridizing with DNA comprising a nucleotide sequence complementary to the aforementioned DNA under stringent conditions is integrated as a foreign gene.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2013/176249 A1



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

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

多能性幹細胞又は臍臓組織幹／前駆細胞から臍臓ホルモン産生細胞へと高効率に分化誘導することが可能な臍臓ホルモン産生細胞の生産方法 (分化誘導方法) 及び生産された臍臓ホルモン産生細胞、並びにその生産方法に用いられる分化誘導促進剤を提供する。本発明に係る臍臓ホルモン産生細胞の生産方法は、多能性幹細胞又は臍臓組織幹／前駆細胞から臍臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、特定の分化誘導促進剤を培地中に添加することを特徴とする。分化誘導促進剤としては、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA によりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドやその改変体、あるいは配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA、又はこの DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清が用いられる。

明 細 書

発明の名称：

膵臓ホルモン産生細胞の生産方法及び膵臓ホルモン産生細胞、並びに分化誘導促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、誘導多能性幹細胞（以下、「iPS細胞」ともいう。）や胚性幹細胞（以下、「ES細胞」ともいう。）等の多能性幹細胞、あるいは膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞を生産する膵臓ホルモン産生細胞の生産方法及び生産された膵臓ホルモン産生細胞、並びにその生産方法に用いられる分化誘導促進剤に関する。

背景技術

[0002] 膵臓は内分泌細胞と外分泌細胞とを有し、内分泌及び外分泌の両方で重要な役割を担っている器官である。内分泌細胞は膵臓ホルモンを産生・分泌する役割を果たし、 α 細胞からはグルカゴンが、 β 細胞からはインスリンが、 δ 細胞からはソマトスタチンが、PP細胞からは膵ポリペプチドがそれぞれ分泌されることが知られている。特にインスリンは血糖値低下作用を有し、血糖を正しい濃度に保つ重要な役割を果たす。

[0003] 近年、多能性幹細胞や膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞へと分化誘導する方法が数多く報告されている（非特許文献1～4、特許文献1～6等を参照）。このような分化誘導方法によって効率的に膵臓ホルモン産生細胞を得ることができれば、膵島移植の代替となる糖尿病の治療方法に繋がると期待される。さらに、患者本人由来の多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞を得ることにより、拒絶反応の問題も解消し得ると考えられる。

[0004] しかし、これまで報告されている分化誘導方法は、いずれも膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導効率が十分ではなかった。例えば、非特許文献1におけるインスリン産生細胞への分化誘導効率は12%程度である。このため、

多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞へと高効率に分化誘導することが可能な分化誘導方法が望まれている。また、非特許文献3では、マウスES細胞にpdx1遺伝子を導入して培養することによってインスリン産生細胞へと分化誘導しているが、安全性の観点からは、遺伝子導入を伴わない分化誘導方法であることが好ましい。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2007／103282号
特許文献2：国際公開第2005／063971号
特許文献3：国際公開第2009／048675号
特許文献4：国際公開第2007／051038号
特許文献5：国際公開第2006／108361号
特許文献6：国際公開第2008／066199号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：D'Amour, K. A. et al., Nature Biotechnology, 24, pp. 1392-1401 (2006)
非特許文献2：Wei Jiang et al., Cell Research, 17, pp. 333-344 (2007)
非特許文献3：Miyazaki, S. et al., Diabetes, 53, pp. 1030-1037 (2004)
非特許文献4：Yuya Kunisada et al., Stem Cell Research, 8, pp. 274-284 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、このような従来の実情に鑑みてなされたものであり、多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞へと高効率に分化

誘導することが可能な膵臓ホルモン産生細胞の生産方法（分化誘導方法）及び生産された膵臓ホルモン産生細胞、並びにその生産方法に用いられる分化誘導促進剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた。その結果、ヒトTM4SF20として公知のポリペプチド、あるいはヒトTM4SF20をコードするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清を培地に添加することにより、多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞へと高効率に分化誘導することが可能になることを見出した。本発明は、このような知見に基づいて完成されたものであり、より具体的には以下のとおりである。

[0009] [1]

多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞を生産する膵臓ホルモン産生細胞の生産方法であって、

多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、下記（１）～（３）から選ばれる少なくとも１種の分化誘導促進剤を培地中に添加することを特徴とする膵臓ホルモン産生細胞の生産方法、

（１）配列番号１に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（２）配列番号１に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導促進作用を持つポリペプチド、

（３）配列番号１に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清。

[0010] [2]

(A1) TGF- β (トランスフォーミング増殖因子 β) スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で多能性幹細胞を培養する工程、

(B1) 上記工程 (A1) で得られた細胞を FGF (線維芽細胞増殖因子) の存在下で培養する工程、

(C1) 上記工程 (B1) で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程、

(D1) 上記工程 (C1) で得られた細胞を γ -セクレターゼ阻害剤の存在下で培養する工程、及び

(E1) 上記工程 (D1) で得られた細胞を、エキセンジン-4、HGF (肝細胞増殖因子)、IGF-1 (インスリン様増殖因子-1)、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程、を含み、

上記工程 (A1) ~ (E1) の少なくとも1つの工程で上記分化誘導促進剤を培地中に添加する上記 [1] 記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[0011] [3]

(A2) TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子と、Wnt (ウィングレス型MMTV組み込み部位) ファミリーに属する増殖因子及びGSK-3 (グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3) 阻害剤からなる群から選択される少なくとも1種の因子との存在下で多能性幹細胞を培養する工程、

(B2) 上記工程 (A2) で得られた細胞を TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程、

(C2) 上記工程 (B2) で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程、

(D2) 上記工程 (C2) で得られた細胞を、cAMP (環状アデノシン-リン酸) 増加剤、デキサメタゾン、TGF- β 1型受容体阻害剤、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程、を含み、

上記工程 (A2) ~ (D2) の少なくとも1つの工程で上記分化誘導促進

剤を培地中に添加する上記 [1] 記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[0012] [4]

(A 3) T G F - β スーパーファミリーに属する増殖因子、レチノイド、F G F、及びニコチンアミドの非存在下で膵臓組織幹／前駆細胞を培養する工程、

(B 3) 上記工程 (A 3) で得られた細胞を T G F - β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程、

(C 3) 上記工程 (B 3) で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程、

(D 3) 上記工程 (C 3) で得られた細胞を F G F の存在下で培養する工程、及び

(E 3) 上記工程 (D 3) で得られた細胞をニコチンアミドの存在下で培養する工程

を含み、

上記工程 (A 3) ~ (E 3) の少なくとも 1 つの工程で上記分化誘導促進剤を培地中に添加する上記 [1] 記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[0013] [5]

上記 [1] ~ [4] のいずれか 1 項記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法によって人工的に生産された膵臓ホルモン産生細胞。

[0014] [6]

次の (1) ~ (3) の少なくとも 1 種を含み、多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化を誘導する分化誘導促進剤；

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる D N A によりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(2) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる D N A によりコードされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導

促進作用を持つポリペプチド、

(3) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞へと高効率に分化誘導することが可能な膵臓ホルモン産生細胞の生産方法（分化誘導方法）及び生産された膵臓ホルモン産生細胞、並びにその生産方法に用いられる分化誘導促進剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるポリペプチド（IBCAP）の発現ベクターをトランスフェクトした細胞の培養上清を、ヒトiPS細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程の最終段階（工程（D1）、（E1））で添加した場合の、グルカゴン（GCG）及びソマトスタチン（SST）の発現量を示す図である。

[図2]配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるポリペプチド（IBCAP）の発現ベクターをトランスフェクトした細胞の培養上清を、ヒトiPS細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程の初期段階（工程（A1-1）、（A1-1））又は中間段階（工程（B1）、（C1））で添加した場合の、グルカゴン（GCG）及びソマトスタチン（SST）の発現量を示す図である。

[図3]配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるポリペプチド（IBCAP）の発現ベクターをトランスフェクトした細胞の培養上清を、マウス膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程の最終段階（工程（E3））で添加した場合の、マウスインスリン-1（Ins1）の発現量を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法は、多能性幹細胞又は膵臓

組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、特定の分化誘導促進剤を培地中に添加することを特徴とする。以下ではまず、多能性幹細胞、膵臓組織幹／前駆細胞、分化誘導促進剤について順に説明し、次いで、具体的な膵臓ホルモン産生細胞の生産方法（分化誘導方法）について説明する。

[0018] <多能性幹細胞>

多能性幹細胞とは、少なくとも一 종류ずつの三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に属する分化細胞に分化する能力（多分化能）のある自己複製可能な幹細胞のことをいい、例えば、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、胚性癌細胞（EC細胞）、成体多能性幹細胞（APS細胞）等が包含される。本発明に係る生産方法では、その中でも、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）又は胚性幹細胞（ES細胞）を用いることが好ましい。

[0019] iPS細胞とは、体細胞を初期化することによって得られる多能性を有する細胞である。iPS細胞の作製は、京都大学のDr. Yamanakaらのグループ、マサチューセッツ工科大学のDr. Jaenischらのグループ、ウィスコンシン大学のDr. Thomsonらのグループ、ハーバード大学のDr. Hochedlingerらのグループ等を含む複数のグループが成功している。

[0020] iPS細胞の作製に用いる体細胞の種類は特に限定されず、任意の体細胞を用いることができる。すなわち、生体を構成する細胞の内生殖細胞以外の全ての細胞を用いることができ、分化した体細胞であってもよく、未分化の幹細胞であってもよい。体細胞の由来は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、両生類のいずれでもよく特に限定されないが、哺乳動物が好ましく、ヒト又はマウスが特に好ましい。ヒトの体細胞を用いる場合、胎児、新生児、成人のいずれの体細胞を用いてもよい。

[0021] 体細胞からiPS細胞を作製するには、少なくとも1種類の初期化遺伝子を体細胞に導入し、初期化する必要がある。初期化遺伝子とは、体細胞を初

期化して i P S 細胞とする作用を有する初期化因子をコードする遺伝子である。ヒト i P S 細胞を作製する場合の初期化遺伝子の組み合わせとしては、例えば以下の (i) ~ (i v) を挙げることができるが、これらの例に限定されるものではない。

(i) O C T 遺伝子、K L F 遺伝子、S O X 遺伝子、M Y C 遺伝子

(i i) O C T 遺伝子、S O X 遺伝子、N A N O G 遺伝子、L I N 2 8 遺伝子

(i i i) O C T 遺伝子、K L F 遺伝子、S O X 遺伝子、M Y C 遺伝子、h T E R T 遺伝子、S V 4 0 l a r g e T 遺伝子

(i v) O C T 遺伝子、K L F 遺伝子、S O X 遺伝子

[0022] 一方、E S 細胞とは、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊から作製された、多分化能、自己複製能を有する幹細胞である。E S 細胞の由来は、特に限定されないが、哺乳動物が好ましく、ヒト又はマウスが特に好ましい。E S 細胞としては、その分化の程度の確認を容易とするために、例えば P D X 1 遺伝子付近にレポーター遺伝子を導入した細胞を用いることもできる。

[0023] <膵臓組織幹／前駆細胞>

膵臓組織幹／前駆細胞とは、動物の膵臓に存在する、多分化能、自己複製能を有する組織幹／前駆細胞である。膵臓組織幹／前駆細胞の由来は、特に限定されないが、哺乳動物が好ましく、ヒト又はマウスが特に好ましい。膵臓から組織幹／前駆細胞を分離する方法としては、従来公知の方法を任意に採用することができ、特に限定されない。例えば、胎児膵臓では、P D X 1 が膵臓組織幹／前駆細胞のマーカー分子として既知である (J o n s s o n , J . e t a l . , N a t u r e , 3 7 1 , p p . 6 0 6 - 6 0 9 (1 9 9 4) ; O f f i e l d , M . F . e t a l . , D e v e l o p m e n t , 2 2 , p p . 9 8 3 - 9 9 5 (1 9 9 6)) 。胎児の P D X 1 発現細胞は、内分泌細胞、外分泌細胞、及び膵管細胞に分化し、成体膵に存在するあらゆる種類の細胞を生じる。そこで、P D X 1 をマーカー分

子として、膵臓組織幹／前駆細胞を分離することができる。

なお、この膵臓組織幹／前駆細胞は、株化されていないものであってもよく、株化されたものであってもよい。

[0024] <分化誘導促進剤>

本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法で用いられる分化誘導促進剤は、下記(1)～(3)から選ばれる少なくとも1種である。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導促進作用を持つポリペプチド。

(3) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清。

[0025] 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAは、ヒトTM4SF20をコードするDNAとして公知の全長2308bpのものである(NCBI:LOCUS NM_024795)。このDNAのCDSは38..727であり、配列番号3に記載の229個のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている(配列番号2を参照)。本発明に係る生産方法では、このポリペプチドを分化誘導促進剤として用いることができる。

[0026] また、本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法では、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導促進作用が維持されている限り、上述のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド(以下、「改変ポリペプチド」ともいう。)を分化誘導促進剤として用いることもできる。あるアミノ酸配列に対する1又は数個のアミノ酸の置換、欠失、及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列からなるポリペプチドが、その生物学的活性を維持

することは既に知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 5662-5666 (1984); Zoller, M. J. et al., Nucleic Acids Research, 10, pp. 6487-6500 (1982); Wang, A. et al., Science, 224, pp. 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, pp. 6409-6413 (1982) 等を参照)。

[0027] ここで、上述のポリペプチドのアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する場合には、置換前後でアミノ酸側鎖の性質が保存されていることが望ましい。アミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) が挙げられる (括弧内のアルファベットはいずれもアミノ酸を一文字表記したものである)。

[0028] 1若しくは数個のアミノ酸を置換、欠失、及び/又は付加する場合、その数は例えば1~20個であってもよく、1~15個であってもよく、1~10個であってもよく、1~5個であってもよい。

また、改変ポリペプチドと元のポリペプチドとの相同性は、80%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、93%以上がさらに好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

[0029] なお、配列番号3の1~163番目、179~229番目のアミノ酸は、異なる生物種間で高度に保存された部分である。このため、その部分のアミ

ノ酸は、改変前後で保存されていることが好ましい。

[0030] 上述のポリペプチドや改変ポリペプチドは、化学合成してもよいが、遺伝子工学的に取得することもできる。例えば、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として、培養可能な宿主細胞に組み込み、その宿主細胞を培養して遺伝子発現させることで、その培養上清から上述のポリペプチドや改変ポリペプチドを得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等の公知の細胞を適宜使用することができる。動物細胞としては、HEK293細胞、HEK293T細胞、CHO-K1細胞、COS細胞等が挙げられる。

[0031] ここで「ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、特定のDNA（配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNA）をプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を採用することにより取得できるDNAを意味する。例えば、コロニーやプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを使用し、0.7~1.0M塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2×SSC溶液（1×SSCの組成：150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を使用し、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等が挙げられる（必要であれば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.等を参照のこと）。ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列の、プローブとして使用するDNAの塩基配列との相同性は、80%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、93%以上がさらに好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好

ましい。

[0032] これらのポリペプチドや改変ポリペプチドの分離・精製は、例えば、イオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の、ペプチド化学において通常使用される方法によって行うことができる。

[0033] また、本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法では、上述のポリペプチドや改変ポリペプチドを含む培養上清を分化誘導促進剤として用いることもできる。培養上清を分化誘導促進剤として用いる場合、限外濾過等により培養上清を濃縮することが好ましい。さらに、必要に応じて透析を行い、不要な化学物質等を除いてもよい。

[0034] <多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法（膵臓ホルモン産生細胞の生産方法）>

本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法では、多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、上述した分化誘導促進剤を培地中に添加する。多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法としては、従来公知の方法を任意に採用することができ、特に限定されない。分化誘導促進剤としてポリペプチド又は改変ポリペプチドを添加する場合、その濃度は、 $10\sim 200\text{ ng/mL}$ が好ましく、 $50\sim 180\text{ ng/mL}$ がより好ましく、 $60\sim 150\text{ ng/mL}$ がさらに好ましい。また、分化誘導促進剤として培養上清を添加する場合、その濃度は、 $0.5\sim 20\%$ (v/v)が好ましく、 $1\sim 10\%$ (v/v)がより好ましく、 $1.5\sim 5\%$ (v/v)がさらに好ましい。

[0035] 以下、多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法（膵臓ホルモン産生細胞の生産方法）の例として2種類の方法について説明するが、本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法はこの例に限定されるものではない。

[0036] [第1の分化誘導方法]

第1の分化誘導方法は、非特許文献1に記載の方法に準じたものである。

この文献は参照により本願に援用する。

第1の分化誘導方法は、下記の工程(A1)～(E1)を含む。このうち少なくとも1つの工程で、上述した分化誘導促進剤が培地中に添加される。分化誘導促進剤を添加する工程は、工程(A1)～(C1)の少なくとも1つの工程であることが好ましく、工程(B1)～(C1)の少なくとも1つの工程であることがより好ましい。なお、ある工程に分化誘導促進剤を添加する場合、その工程の最初から添加してもよく、工程の途中から添加してもよい。

(A1) TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で多能性幹細胞を培養する工程。

(B1) 上記工程(A1)で得られた細胞をFGFの存在下で培養する工程。

(C1) 上記工程(B1)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程。

(D1) 上記工程(C1)で得られた細胞を γ -セクレターゼ阻害剤の存在下で培養する工程。

(E1) 上記工程(D1)で得られた細胞を、エキセンジン-4、HGF、IGF-1、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程。

[0037] (工程(A1))

工程(A1)では、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で多能性幹細胞を培養する。

[0038] TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子としては、アクチビン、ノーダル、BMP(骨形成タンパク質)等が挙げられ、その中でもアクチビンが好ましい。このようなTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子は、多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞への分化を促進することが知られている(非特許文献1、特許文献1～3等を参照)。アクチビンとしては、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB等が挙げられ、その中でもアクチ

ビンAが好ましい。

TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の濃度は、5~250 ng/mLが好ましく、10~200 ng/mLがより好ましく、50~150 ng/mLがさらに好ましい。

[0039] また、工程(A1)では、Wntファミリーに属する増殖因子を培地中に添加することが好ましい。TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子とともにWntファミリーに属する増殖因子を添加することにより、胚体内胚葉細胞への分化効率を高めることができる。

Wntファミリーに属する増殖因子としては、Wnt1、Wnt3a、Wnt5a、Wnt7a等が挙げられ、Wnt1、Wnt3aが好ましく、Wnt3aがより好ましい。

Wntファミリーに属する増殖因子の濃度は、1~1000 ng/mLが好ましく、10~100 ng/mLがより好ましく、10~50 ng/mLがさらに好ましい。

[0040] なお、工程(A1)では、Wntファミリーに属する増殖因子の代わりに、GSK-3阻害剤(例えば、CHIR)を添加してもよい。GSK-3阻害剤(例えば、CHIR)は、Wntシグナル経路を活性化させることが知られている(J. Biol. Chem. 277(34), pp. 30998-31004(2002))。

[0041] また、工程(A1)では、胚体内胚葉細胞への分化効率を高め得る追加の因子を培地中に添加してもよい。追加の因子としては、例えば、PDGF(血小板由来増殖因子)、EGF(上皮増殖因子)、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)、KGF(ケラチノサイト増殖因子)、HGF、NGF(神経増殖因子)、GDF(増殖分化因子)、GLP(グルカゴン様ペプチド)、ニコチンアミド、エキセンジン-4、レチノイン酸、エタノールアミン、副甲状腺ホルモン、プロゲステロン、アプロチニン、ヒドロコルチゾン、ガストリン、ステロイドアルカロイド、銅キレーター(トリエチレンペンタミン等)、フォルスコリン、酪酸ナトリウム、ノギン、バルプロ酸、トリコスタチ

ンA、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路阻害剤、ヘッジホッグ経路阻害剤等が挙げられる。

[0042] 培養に用いる容器としては、分化誘導能、機能発現能、生存能等の観点から、生体適合材料を用いたスキャフォールドでコートされた培養プレートが好ましい。スキャフォールドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ゼラチン、エンタクチン、ポリオルニチン等が挙げられる。市販品としては、Becton Dickinson製のMATRIGEL™、増殖因子減少MATRIGEL™等が入手可能である。特に、MATRIGEL™でコートされた培養プレートを用いることが好ましい。

[0043] 培養に用いる培地は、動物細胞の培養に用いることのできる基本培地に、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源やその他の成分を添加して作製される。

[0044] 基本培地としては、RPMI 1640培地、DMEM培地、CMRL 1066培地、ハムF12培地、イーグルMEM培地、グラスゴーMEM培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、ウィリアムE培地、フィッシャー培地、マッコイ培地、BME培地、 α MEM培地、BGJb培地、Medium 199培地、あるいはこれらの混合培地等が挙げられる。

[0045] 栄養源としては、グリセロール、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、デンプン、デキストリン等の炭素源；脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール等の炭化水素類；硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源；ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、リン酸塩等の無機塩類；各種ビタミン類；各種アミノ酸類；等が挙げられる。

[0046] その他の成分としては、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質；コレラトキシシン；インスリン；トランスフェリン；亜セレン酸；アルブミン；2-メルカプトエタノール；血清又は血清代替物；等が挙げられる。インスリン、トランスフェリン、及び亜セレン酸としては、Invitroge

n製のITS-X、ITS-A、ITS-G等が市販品として入手可能である。また、血清代替物としては、Invitrogen製のB-27™サプリメント、N-2サプリメント、Knockout™血清代替物等が市販品として入手可能である。

[0047] ここで、工程(A1)における分化効率を高めるためには、培地中のインスリン、IGF等の含有量を十分に低くすることが重要であることが知られている(国際公開第2006/020919号を参照)。このため、工程(A1)では、無血清培地又は低血清培地を用いることが好ましい(非特許文献1、特許文献1~3等を参照)。血清濃度は、0~2%(v/v)が好ましく、0~1%(v/v)がより好ましく、0~0.5%(v/v)がさらに好ましい。

[0048] 好適な実施形態では、アクチビンA、Wnt3a、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、レグルタミン又はレグルタミンを含むジペプチドを添加した、無血清又は低血清のRPMI1640培地が用いられる。

[0049] 工程(A1)の培養期間は例えば1~6日であり、2~4日が好ましい。胚体内胚葉細胞への分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。多能性幹細胞から胚体内胚葉細胞への分化が進行するに従って、幹細胞のマーカ遺伝子であるOCT4、NANOG、SOX2、ECAD等の発現が減少し、胚体内胚葉細胞のマーカ遺伝子であるSOX17、CER、FOX A2、CXCR4等の発現が亢進する。

[0050] なお、胚体内胚葉細胞への分化効率を高めるためには、培地中の血清濃度を低めることが必要であるが、細胞の生存率を高めるためには、培地中の血清濃度を高める方が好ましい。

そこで、工程(A1)を、無血清の第1の培地で培養する工程(A1-1)と、低血清の第2の培地で培養する工程(A1-2)とに分けることが好ましい。

[0051] 工程(A1-1)で用いられる第1の培地は、無血清であるほかは上記と

同様でよい。すなわち、第1の培地は、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子を含有し、その他に、Wntファミリーに属する増殖因子を含有していてもよい。この第1の培地は、Wntファミリーに属する増殖因子を含有する方が好ましい。

[0052] 工程(A1-1)の培養期間は例えば1~3日であり、1~2日が好ましい。この培養により、多能性幹細胞から中内胚葉細胞への分化が進行する。

中内胚葉細胞への分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。多能性幹細胞から中内胚葉細胞への分化が進行するに従って、幹細胞のマーカ-遺伝子であるOCT4、NANOG、SOX2、ECAD等の発現が減少し、中内胚葉細胞のマーカ-遺伝子であるBRA、FGF4、WNT3、NCAD等の発現が亢進する。

[0053] 工程(A1-2)で用いられる第2の培地は、低血清であるほかは上記と同様でよい。すなわち、第2の培地は、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子を含有し、その他に、Wntファミリーに属する増殖因子を含有していてもよい。血清濃度は、0.05~2%(v/v)が好ましく、0.05~1%(v/v)がより好ましく、0.1~0.5%(v/v)がさらに好ましい。

[0054] 工程(A1-2)の培養期間は例えば1~3日であり、1~2日が好ましい。この培養により、中内胚葉細胞から胚体内胚葉細胞への分化が進行する。

上述したとおり、胚体内胚葉細胞への分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。

[0055] なお、得られた細胞は、次の工程(B1)に進む前に、公知の方法で濃縮、単離、及び/又は精製してもよい。

[0056] (工程(B1))

工程(B1)では、工程(A1)で得られた細胞をFGFの存在下で培養

する。

[0057] FGFとしては、FGF-1、FGF-2 (bFGF)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23等が挙げられ、FGF-2 (bFGF)、FGF-5、FGF-7、FGF-10が好ましい。

FGFの濃度は、5~150 ng/mLが好ましく、10~100 ng/mLがより好ましく、20~80 ng/mLがさらに好ましい。

[0058] また、工程(B1)では、ヘッジホッグ経路阻害剤を培地中に添加することが好ましい。FGFとともにヘッジホッグ経路阻害剤を添加することにより、分化効率を高めることができる。

ヘッジホッグ経路阻害剤としては、KAAD-シクロパミン(28-[2-[6-[(3-フェニルプロパノイル)アミノ]ヘキサノイル]アミノ]エチル)-17β, 23β-エポキシベラトラマン-3-オン)、KAAD-シクロパミンの類似体、ジェルビン(17, 23β-エポキシ-3β-ヒドロキシベラトラマン-11-オン)、ジェルビンの類似体、ヘッジホッグ経路遮断抗体等が挙げられ、その中でもKAAD-シクロパミンが好ましい。

ヘッジホッグ経路阻害剤の濃度は、0.01~5 μMが好ましく、0.02~2 μMがより好ましく、0.1~0.5 μmがさらに好ましい。

[0059] 培養に用いる容器は、工程(A1)と同様でよい。培地は、上述した各因子や培地の血清濃度を除き、工程(A1)と同様でよい。培地の血清濃度は、0.1~5% (v/v)が好ましく、0.5~5% (v/v)がより好ましく、1~5% (v/v)がさらに好ましい。

なお、工程(A1)で低血清培地が用いられる場合、工程(B1)では、工程(A1)よりも高い血清濃度の培地を用いることが好ましい。

- [0060] 好適な実施形態では、FGF-10、KAAD-シクロパミン、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、L-グルタミン又はL-グルタミンを含むジペプチドを添加した、低血清のRPMI 1640培地が用いられる。
- [0061] 工程(B1)の培養期間は例えば1~6日であり、2~4日が好ましい。分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。分化が進行するに従って、HNF1B、HNF4A等の遺伝子の発現が亢進する。
- [0062] なお、得られた細胞は、次の工程(C1)に進む前に、公知の方法で濃縮、単離、及び/又は精製してもよい。
- [0063] (工程(C1))
工程(C1)では、工程(B1)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する。
- [0064] レチノイドとしては、レチノール、レチナール、レチノイン酸等が挙げられ、その中でもレチノイン酸が好ましい。
レチノイドの濃度は、0.2~10 μ Mが好ましく、0.4~8 μ Mがより好ましく、1~4 μ Mがさらに好ましい。
- [0065] また、工程(C1)では、ヘッジホッグ経路阻害剤を培地中に添加することが好ましい。レチノイドとともにヘッジホッグ経路阻害剤を添加することにより、分化効率を高めることができる。
ヘッジホッグ経路阻害剤としては、KAAD-シクロパミン、KAAD-シクロパミンの類似体、ジェルビン、ジェルビンの類似体、ヘッジホッグ経路遮断抗体等が挙げられ、その中でもKAAD-シクロパミンが好ましい。
ヘッジホッグ経路阻害剤の濃度は、0.01~5 μ Mが好ましく、0.02~2 μ Mがより好ましく、0.1~0.5 μ Mがさらに好ましい。
- [0066] また、工程(C1)では、FGFを培地中に添加することが好ましい。レチノイドとともにFGFを添加することにより、分化効率を高めることができる。

FGFとしては、FGF-1、FGF-2 (bFGF)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23等が挙げられ、FGF-2 (bFGF)、FGF-5、FGF-7、FGF-10が好ましい。

FGFの濃度は、0.5~50 ng/mLが好ましく、1~25 ng/mLがより好ましく、2~10 ng/mLがさらに好ましい。

[0067] また、工程(C1)では、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子を培地中に添加してもよい。

TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の濃度は、5~250 ng/mLが好ましく、10~200 ng/mLがより好ましく、20~150 ng/mLがさらに好ましい。

[0068] 培養に用いる容器は、工程(B1)と同様でよい。培地は、上述した各因子を除き、基本的に工程(B1)と同様でよい。ただし、培地には、血清の代わりに血清代替物を添加することが好ましい。血清代替物の市販品としては、Invitrogen製のB-27™サプリメント、N-2サプリメント、Knockout™血清代替物等が入手可能であり、その中でもB-27™サプリメントが好ましい。

B-27™サプリメントの濃度は、0.1~10% (v/v) が好ましく、0.2~5% (v/v) がより好ましく、0.4~2.5% (v/v) がさらに好ましい。なお、このB-27™サプリメントは、50倍ストック溶液として市販されているため、B-27™サプリメントの濃度を0.1~10% (v/v) とするには、5~500倍希釈されるように培地中に添加すればよい。

[0069] 好適な実施形態では、レチノイン酸、KAAD-シクロパミン、FGF-10、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、B-27™サプリメ

ントを添加した、無血清のDMEM／ハムF12培地が用いられる。

[0070] 工程(C1)の培養期間は例えば1～6日であり、2～4日が好ましい。

分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。分化が進行するに従って、PDX1、HNF6、HLXB9等の遺伝子の発現が亢進する。

[0071] なお、得られた細胞は、次の工程(D1)に進む前に、公知の方法で濃縮、単離、及び／又は精製してもよい。

[0072] [工程(D1)]

工程(D1)では、工程(C1)で得られた細胞をγ-セクレターゼ阻害剤の存在下で培養する。

[0073] γ-セクレターゼ阻害剤としては、DAPT (N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル-L-アラニル)]-S-フェニルグリシン-tert-ブチルエステル)、L-685458 ([1S-ベンジル-4R-[1-(1S-カルバモイル-2-フェネチルカルバモイル)-1S-3-メチルブチルカルバモイル]-2R-ヒドロキシ-5-フェネチルペンチル]カルバミン酸tert-ブチルエステル)等が挙げられ、その中でもDAPTが好ましい。

γ-セクレターゼ阻害剤の濃度は、1～50 μMが好ましく、2～40 μMがより好ましく、5～20 μMがさらに好ましい。

[0074] また、工程(D1)では、エキセンジン-4を培地中に添加することが好ましい。γ-セクレターゼ阻害剤とともにエキセンジン-4を添加することにより、分化効率を高めることができる。

エキセンジン-4の濃度は、5～150 ng/mLが好ましく、10～100 ng/mLがより好ましく、20～80 ng/mLがさらに好ましい。

[0075] 培養に用いる容器や培地は、工程(C1)と同様でよい。すなわち、培地には血清代替物を添加することが好ましい。

[0076] 好適な実施形態では、DAPT、エキセンジン-4、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、B-27™サプリメントを添加した、無血清の

DMEM／ハムF12培地が用いられる。

[0077] 工程(D1)の培養期間は例えば1～6日であり、2～3日が好ましい。

分化誘導の進行は、形態学的観察によるほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。分化が進行するに従って、NKX6-1、NGN3、PAX4、NKX2-2等の遺伝子の発現が亢進する。

[0078] なお、得られた細胞は、次の工程(E1)に進む前に、公知の方法で濃縮、単離、及び／又は精製してもよい。

[0079] (工程(E1))

工程(E1)では、工程(D1)で得られた細胞を、エキセンジン-4、HGF、IGF-1、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する。

[0080] エキセンジン-4、HGF、IGF-1、及びニコチンアミドとしては、そのうちの2種以上を添加することが好ましく、3種以上を添加することがより好ましい。

エキセンジン-4の濃度は、5～150 nMが好ましく、10～100 nMがより好ましく、20～80 nMがさらに好ましい。

HGFの濃度は、5～150 ng/mLが好ましく、10～100 ng/mLがより好ましく、20～80 ng/mLがさらに好ましい。

IGF-1の濃度は、5～150 ng/mLが好ましく、10～100 ng/mLがより好ましく、20～80 ng/mLがさらに好ましい。

ニコチンアミドの濃度は、1～30 mMが好ましく、3～20 mMがより好ましく、5～15 mMがさらに好ましい。

[0081] 培養に用いる容器や培地は、工程(D1)と同様でよい。すなわち、培地には血清代替物を添加することが好ましい。

[0082] 好適な実施形態では、エキセンジン-4、HGF、IGF-1、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、B-27™サプリメントを添加した、無血清のCMRL1066培地が用いられる。

[0083] 工程（E 1）の培養期間は例えば3～20日であり、3～10日が好ましい。

この工程（E 1）により、膵臓ホルモン産生細胞が得られる。

膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導の進行は、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン等の膵臓ホルモンの産生を確認するほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。分化が進行するに従って、INS、GCG、GHRL、SST、PPY等のうち、少なくとも1つの遺伝子の発現が亢進する。

[0084] [第2の分化誘導方法]

第2の分化誘導方法は、非特許文献4に記載の方法に準じたものである。この文献は参照により本願に援用する。

第2の分化誘導方法は、下記の工程（A 2）～（D 2）を含む。このうち少なくとも1つの工程で、上述した分化誘導促進剤が培地中に添加される。分化誘導促進剤を添加する工程は、工程（C 2）～（D 2）の少なくとも1つの工程であることが好ましく、工程（D 2）であることが特に好ましい。なお、ある工程に分化誘導促進剤を添加する場合、その工程の最初から添加してもよく、工程の途中から添加してもよい。

（A 2）TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子と、Wntファミリーに属する増殖因子及びGSK-3阻害剤からなる群から選択される少なくとも1種の因子との存在下で多能性幹細胞を培養する工程。

（B 2）上記工程（A 2）で得られた細胞をTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程。

（C 2）上記工程（B 2）で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程。

（D 2）上記工程（C 2）で得られた細胞を、cAMP増加剤、デキサメタゾン、TGF- β 1型受容体阻害剤、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程。

[0085] （工程（A 2））

工程 (A2) では、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子と、Wntファミリーに属する増殖因子及びGSK-3阻害剤からなる群から選択される少なくとも1種の因子との存在下で多能性幹細胞を培養する。

[0086] TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子としては、アクチビン、ノーダル、BMP等が挙げられ、その中でもアクチビンが好ましい。アクチビンとしては、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB等が挙げられ、その中でもアクチビンAが好ましい。

TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の濃度は、5~250 ng/mLが好ましく、10~200 ng/mLがより好ましく、50~150 ng/mLがさらに好ましい。

[0087] Wntファミリーに属する増殖因子としては、Wnt1、Wnt3a、Wnt5a、Wnt7a等が挙げられ、Wnt1、Wnt3aが好ましく、Wnt3aがより好ましい。

Wntファミリーに属する増殖因子の濃度は、1~1000 ng/mLが好ましく、10~100 ng/mLがより好ましく、10~50 ng/mLがさらに好ましい。

[0088] GSK-3阻害剤としては、GSK-3 α 阻害剤及びGSK-3 β 阻害剤のいずれを用いてもよいが、GSK-3 β 阻害剤を用いることが好ましい。具体例としては、CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル] アミノ] エチル] アミノ]-3-ピリジンカルボニトリル)、SB415286 (3-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル) アミノ]-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、SB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、インジルビン-3'-モノオキシム (3-[(3E)-3-(ヒドロキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インドール-2-イリデン]-2,3-ジヒドロ-1H-インドール-2-オン)、ケンパウロン (7,8-ジヒ

ドロ-9-ブロモインドロ [3, 2-d] [1] ベンゾアゼピン-6 (5 H)-オン) 等が挙げられ、その中でもCHIR99021が好ましい。

GSK-3阻害剤の濃度は、0.01~20 μ Mが好ましく、0.1~20 μ Mがより好ましく、1~5 μ Mがさらに好ましい。

[0089] また、工程(A2)では、分化効率を高め得る追加の因子を培地中に添加してもよい。追加の因子としては、例えば、PDGF、EGF、VEGF、KGF、HGF、NGF、GDF、GLP、ニコチンアミド、エキセンジン-4、レチノイン酸、エタノールアミン、副甲状腺ホルモン、プロゲステロン、アプロチニン、ヒドロコルチゾン、ガストリン、ステロイドアルカロイド、銅キレーター(トリエチレンペンタミン等)、フォルスコリン、酪酸ナトリウム、ノギン、バルプロ酸、トリコスタチンA、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路阻害剤、ヘッジホッグ経路阻害剤等が挙げられる。

[0090] 培養に用いる容器としては、分化誘導能、機能発現能、生存能等の観点から、生体適合材料を用いたスキャフォールドでコートされた培養プレートが好ましい。スキャフォールドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ゼラチン、エンタクチン、ポリオルニチン等が挙げられる。市販品としては、Becton Dickinson製のMATRIGEL™、増殖因子減少MATRIGEL™等が入手可能である。特に、MATRIGEL™でコートされた培養プレートを用いることが好ましい。

[0091] 培養に用いる培地は、動物細胞の培養に用いることのできる基本培地に、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源やその他の成分を添加して作製される。

[0092] 基本培地としては、RPMI1640培地、DMEM培地、CMRL1066培地、ハムF12培地、イーグルMEM培地、グラスゴーMEM培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、ウィリアムE培地、フィッシャー培地、マッコイ培地、BME培地、 α MEM培地、BGJb培地、Medium199培地、あるいはこれらの混合培地等が挙げられる

- 。
- [0093] 栄養源としては、グリセロール、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、デンプン、デキストリン等の炭素源；脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール等の炭化水素類；硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源；ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、リン酸塩等の無機塩類；各種ビタミン類；各種アミノ酸類；等が挙げられる。
- [0094] その他の成分としては、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質；コレラトキシン；インスリン；トランスフェリン；亜セレン酸；アルブミン；2-メルカプトエタノール；血清又は血清代替物；等が挙げられる。インスリン、トランスフェリン、及び亜セレン酸としては、Invitrogen製のITS-X、ITS-A、ITS-G等が市販品として入手可能である。また、血清代替物としては、Invitrogen製のB-27™サプリメント、N-2サプリメント、Knockout™血清代替物等が市販品として入手可能である。
- [0095] ここで、工程（A2）における分化効率を高めるためには、培地中のインスリン、IGF等の含有量を十分に低くすることが重要であることが知られている。このため、工程（A2）では、無血清培地又は低血清培地を用いることが好ましい。血清濃度は、0～3%（v/v）が好ましく、0～2%（v/v）がより好ましい。
- [0096] 好適な実施形態では、アクチビンA、CHIR99021を添加した低血清のRPMI1640培地が用いられる。
- 工程（A2）の培養期間は例えば1～3日であり、1～2日が好ましい。
- [0097] （工程（B2））
- 工程（B2）では、工程（A2）で得られた細胞をTGF-βスーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する。
- [0098] TGF-βスーパーファミリーに属する増殖因子としては、アクチビン、ノーダル、BMP等が挙げられ、その中でもアクチビンが好ましい。アクチ

ビンとしては、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB等が挙げられ、その中でもアクチビンAが好ましい。

TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の濃度は、5~250 ng/mLが好ましく、10~200 ng/mLがより好ましく、50~150 ng/mLがさらに好ましい。

[0099] 培養に用いる容器や培地は、工程(A2)と同様でよい。すなわち、好適な実施形態では、アクチビンAを添加した低血清のRPMI1640培地が用いられる。

工程(B2)の培養期間は例えば1~4日であり、1~3日が好ましい。

[0100] (工程(C2))

工程(C2)では、工程(B2)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する。

[0101] レチノイドとしては、レチノール、レチナール、レチノイン酸等が挙げられ、その中でもレチノイン酸が好ましい。

レチノイドの濃度は、0.2~10 μ Mが好ましく、0.4~8 μ Mがより好ましく、1~4 μ Mがさらに好ましい。

[0102] また、工程(C2)では、BMP受容体阻害剤を培地中に添加することが好ましい。

BMP受容体阻害剤としては、ドルソモルフィン(6-[4-[2-(1-ピペリジニル)エトキシ]フェニル]-3-(4-ピリジル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン)、LDN-193189(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)キノリン)等が挙げられ、その中でもドルソモルフィンが好ましい。

BMP受容体阻害剤の濃度は、0.2~5 μ Mが好ましく、0.3~3 μ Mがより好ましく、0.5~2 μ Mがさらに好ましい。

[0103] また、工程(C2)では、TGF- β 1型受容体阻害剤を培地中に添加することが好ましい。

TGF- β 1型受容体阻害剤としては、SB431542(4-[4-(

1, 3-ベンゾジオキソル-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル] ベンズアミド)、SB525334 (6-[2-(1, 1-ジメチルエチル)-5-(6-メチル-1, 2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-4-イル] キノキサリン)、LY364947 (4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル] キノリン) 等が挙げられ、その中でもSB431542が好ましい。また、TGF- β 1型受容体阻害剤としては、Calbiochem製のAlk5インヒビター1を用いることも可能である。

TGF- β 1型受容体阻害剤の濃度は、1~50 μ Mが好ましく、2~30 μ Mがより好ましく、5~20 μ Mがさらに好ましい。

[0104] 培養に用いる容器は、工程(B2)と同様でよい。培地は、上述した各因子を除き、基本的に工程(B2)と同様でよい。ただし、培地には、血清の代わりに血清代替物を添加することが好ましい。血清代替物の市販品としては、Invitrogen製のB-27TMサプリメント、N-2サプリメント、KnockoutTM血清代替物等が入手可能であり、その中でもB-27TMサプリメントが好ましい。

B-27TMサプリメントの濃度は、0.1~10% (v/v) が好ましく、0.2~5% (v/v) がより好ましく、0.4~2.5% (v/v) がさらに好ましい。なお、このB-27TMサプリメントは、50倍ストック溶液として市販されているため、B-27TMサプリメントの濃度を0.1~10% (v/v) とするには、5~500倍希釈されるように培地中に添加すればよい。

[0105] 好適な実施形態では、レチノイン酸、ドルソモルフィン、SB431542、B-27TMサプリメントを添加した、無血清のIMEM Zinc Option培地が用いられる。

工程(C2)の培養期間は例えば5~9日であり、6~8日が好ましい。

[0106] (工程(D2))

工程(D2)では、工程(C2)で得られた細胞を、cAMP増加剤、デ

キサメタゾン、TGF- β 1型受容体阻害剤、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する。

[0107] cAMP増加剤、デキサメタゾン、TGF- β 1型受容体阻害剤、及びニコチンアミドとしては、そのうちの2種以上を添加することが好ましく、3種以上を添加することがより好ましい。

[0108] cAMP増加剤としては、フォルスコリン等のアデニル酸シクラーゼ活性化剤；3-イソブチル-1-メチルキサンチン等のホスホジエステラーゼ阻害剤；ジブチリルcAMP等のcAMPアナログ；等が挙げられ、その中でもフォルスコリンが好ましい。

cAMP増加剤の濃度は、1~50 μ Mが好ましく、2~30 μ Mがより好ましく、5~20 μ Mがさらに好ましい。

[0109] デキサメタゾンの濃度は、1~50 μ Mが好ましく、2~30 μ Mがより好ましく、5~20 μ Mがさらに好ましい。

[0110] TGF- β 1型受容体阻害剤としては、SB431542、SB525334、LY364947等が挙げられ、その中でもSB431542が好ましい。また、TGF- β 1型受容体阻害剤としては、Calbiochem製のAkt5インヒビター11を用いることも可能である。

TGF- β 1型受容体阻害剤の濃度は、1~50 μ Mが好ましく、2~30 μ Mがより好ましく、5~20 μ Mがさらに好ましい。

[0111] ニコチンアミドの濃度は、1~30 mMが好ましく、3~20 mMがより好ましく、5~15 mMがさらに好ましい。

[0112] 培養に用いる容器や培地は、工程(C2)と同様でよい。すなわち、培地には血清代替物を添加することが好ましい。

[0113] 好適な実施形態では、フォルスコリン、デキサメタゾン、Akt5インヒビター11、ニコチンアミド、B-27™サプリメントを添加した、無血清のIMEM Zinc Option培地が用いられる。

工程(D2)の培養期間は例えば9~13日であり、10~12日が好ましい。

[0114] この工程（D2）により、膵臓ホルモン産生細胞が得られる。

膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導の進行は、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン等の膵臓ホルモンの産生を確認するほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化が進行するに従って、膵臓ホルモン産生細胞のマーカー遺伝子であるINS、GCG、GHRL、SST、PPY等のうち、少なくとも1つの遺伝子の発現が亢進する。

[0115] <膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法（膵臓ホルモン産生細胞の生産方法）>

本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法では、膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、上述した分化誘導促進剤を培地中に添加する。膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法としては、従来公知の方法を任意に採用することができ、特に限定されない。分化誘導促進剤としてポリペプチド又は改変ポリペプチドを添加する場合、その濃度は、10～200 ng/mLが好ましく、50～150 ng/mLがより好ましく、60～120 ng/mLがさらに好ましい。また、分化誘導促進剤として培養上清を添加する場合、その濃度は、0.5～20%（v/v）が好ましく、1～10%（v/v）がより好ましく、1.5～5%（v/v）がさらに好ましい。

[0116] 以下、膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導方法（膵臓ホルモン産生細胞の生産方法）の一例について説明するが、本発明に係る膵臓ホルモン産生細胞の生産方法はこの例に限定されるものではない。

[0117] 以下の分化誘導方法は、非特許文献2に記載の方法に準じたものである。この文献は参照により本願に援用する。

この分化誘導方法は、下記の工程（A3）～（E3）を含む。このうち少なくとも1つの工程で、上述した分化誘導促進剤が培地中に添加される。分化誘導促進剤を添加する工程は、工程（D3）～（E3）の少なくとも1つの工程であることが好ましく、工程（E3）であることが特に好ましい。な

お、ある工程に分化誘導促進剤を添加する場合、その工程の最初から添加してもよく、工程の途中から添加してもよい。

(A3) TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子、レチノイド、FGF、及びニコチンアミドの非存在下で膵臓組織幹/前駆細胞を培養する工程。

(B3) 上記工程(A3)で得られた細胞をTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程。

(C3) 上記工程(B3)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程。

(D3) 上記工程(C3)で得られた細胞をFGFの存在下で培養する工程。

(E3) 上記工程(D3)で得られた細胞をニコチンアミドの存在下で培養する工程。

[0118] (工程(A3))

工程(A3)では、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子、レチノイド、FGF、ニコチンアミドの非存在下で膵臓組織幹/前駆細胞を培養する。

[0119] 培養に用いる容器としては、分化誘導能、機能発現能、生存能等の観点から、生体適合材料を用いたスキャフォールドでコートされた培養プレートが好ましい。スキャフォールドとしては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ゼラチン、エンタクチン、ポリオルニチン等が挙げられる。市販品としては、Becton Dickinson製のMATRIGEL™、増殖因子減少MATRIGEL™等が入手可能である。特に、MATRIGEL™でコートされた培養プレートを用いることが好ましい。

[0120] 培養に用いる培地は、動物細胞の培養に用いることのできる基本培地に、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源やその他の成分を添加して作製される。

[0121] 基本培地としては、RPMI 1640培地、DMEM培地、CMRL 10

66培地、ハムF12培地、イーグルMEM培地、グラスゴーMEM培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、ウィリアムE培地、フィッシャー培地、マッコイ培地、BME培地、 α MEM培地、BGJb培地、Medium199培地、あるいはこれらの混合培地等が挙げられる。

[0122] 栄養源としては、グリセロール、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、デンプン、デキストリン等の炭素源；脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール等の炭化水素類；硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源；ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、リン酸塩等の無機塩類；各種ビタミン類；各種アミノ酸類；等が挙げられる。

[0123] その他の成分としては、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質；コレラトキシン；インスリン；トランスフェリン；亜セレン酸；2-メルカプトエタノール；アルブミン；血清又は血清代替物；等が挙げられる。インスリン、トランスフェリン、及び亜セレン酸としては、Invitrogen製のITS-X、ITS-A、ITS-G等が市販品として入手可能である。また、血清代替物としては、Invitrogen製のB-27TMサプリメント、N-2サプリメント、KnockoutTM血清代替物等が市販品として入手可能である。

[0124] 好適な実施形態では、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、2-メルカプトエタノール、アルブミンを添加した、無血清のDMEM／ハムF12が用いられる。

インスリンの濃度は、2～30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、5～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましい。トランスフェリンの濃度は、1～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、3～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましい。亜セレン酸の濃度は、1～20 ng/mL が好ましく、5～20 ng/mL がより好ましい。2-メルカプトエタノールの濃度は、50～200 μM が好ましく、50～100 μM がより好ましい。アルブミンの濃度は、1～10 ng/mL が好ましく、2～

5 ng/mLがより好ましい。

工程(A3)の培養期間は例えば1~3日であり、1~2日が好ましい。

[0125] (工程(B3))

工程(B3)では、工程(A3)で得られた細胞をTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する。

[0126] TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子としては、アクチビン、ノーダル、BMP等が挙げられ、その中でもアクチビンが好ましい。アクチビンとしては、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB等が挙げられ、その中でもアクチビンAが好ましい。

TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の濃度は、5~250 ng/mLが好ましく、10~200 ng/mLがより好ましく、50~150 ng/mLがさらに好ましい。

[0127] 培養に用いる容器は、工程(A3)と同様でよい。培地は、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子を添加することを除き、工程(A3)と同様でよい。すなわち、好適な実施形態では、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、2-メルカプトエタノール、アルブミンを添加した、無血清のDMEM/ハムF12が用いられる。

工程(B3)の培養期間は例えば2~6日であり、3~5日が好ましい。

[0128] (工程(C3))

工程(C3)では、工程(B3)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する。

[0129] レチノイドとしては、レチノール、レチナール、レチノイン酸等が挙げられ、その中でも全トランス型レチノイン酸が好ましい。

レチノイドの濃度は、0.2~10 μ Mが好ましく、0.4~8 μ Mがより好ましく、1~4 μ Mがさらに好ましい。

[0130] 培養に用いる容器は、工程(A3)と同様でよい。培地は、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子を添加することを除き、工程(A3)と

同様でよい。

好適な実施形態では、全トランス型レチノイン酸、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、2-メルカプトエタノール、アルブミンを添加した、無血清のDMEM/ハムF12が用いられる。

工程(C3)の培養期間は例えば2~6日であり、3~5日が好ましい。

[0131] (工程(D3))

工程(D3)では、工程(C3)で得られた細胞をFGFの存在下で培養する。

[0132] FGFとしては、FGF-1、FGF-2 (bFGF)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23等が挙げられ、FGF-2 (bFGF)、FGF-5、FGF-7、FGF-10が好ましい。

FGFの濃度は、1~30 ng/mLが好ましく、2~20 ng/mLがより好ましく、5~15 ng/mLがさらに好ましい。

[0133] 培養に用いる容器は、工程(A3)と同様でよい。培地は、FGFを添加することを除き、基本的に工程(C3)と同様でよい。

好適な実施形態では、FGF-2 (bFGF)、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、アルブミンを添加した、無血清のDMEM/ハムF12が用いられる。

工程(D3)の培養期間は例えば1~5日であり、2~4日が好ましい。

[0134] (工程(E3))

工程(E3)では、工程(D3)で得られた細胞をニコチンアミドの存在下で培養する。

ニコチンアミドの濃度は、1~30 mMが好ましく、3~20 mMがより

好ましく、5～15 mMがさらに好ましい。

[0135] また、工程（E3）では、FGFを培地中に添加することが好ましい。

FGFとしては、FGF-1、FGF-2（bFGF）、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23等が挙げられ、FGF-2（bFGF）、FGF-5、FGF-7、FGF-10が好ましい。

FGFの濃度は、1～30 ng/mLが好ましく、2～20 ng/mLがより好ましく、5～15 ng/mLがさらに好ましい。

[0136] 培養に用いる容器は、工程（A3）と同様でよい。培地は、ニコチンアミドを添加することを除き、基本的に工程（D3）と同様でよい。

好適な実施形態では、ニコチンアミド、FGF-2（bFGF）、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、アルブミンを添加した、無血清のDMEM/ハムF12が用いられる。

工程（E3）の培養期間は例えば3～20日であり、3～10日が好ましい。

[0137] この工程（E3）により、膵臓ホルモン産生細胞が得られる。

膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導の進行は、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン等の膵臓ホルモンの産生を確認するほか、RT-PCRにより遺伝子発現を確認することによっても評価することができる。膵臓組織幹/前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化が進行するに従って、膵臓ホルモン産生細胞のマーカー遺伝子であるINS、GCG、GHRH、SST、PPY等のうち、少なくとも1つの遺伝子の発現が亢進する。

[0138] <膵臓ホルモン産生細胞の応用例>

上述のようにして得られた膵臓ホルモン産生細胞は、糖尿病等の治療薬に

応用することができる。例えば、膵臓ホルモン産生細胞がインスリンを産生・分泌する場合には、そのインスリン産生細胞をそのまま、あるいはフィルター濾過により濃縮したペレット等の細胞塊を糖尿病治療薬として用いることができる。この糖尿病治療薬は、DMSO等の保護剤を加え、凍結保存することもできる。なお、より安全に利用するためには、加熱処理、放射線処理、マイトマイシンC処理など、糖尿病治療薬としての機能を残しつつ、病原体のタンパク質が変性する程度の条件下で処理をすることが好ましい。

[0139] インスリン産生細胞を用いた糖尿病治療薬のヒトへの投与形態（移植方法）としては、例えば、ヒト患者の右下腹部に小切開を置き、腸間膜の細い血管を露出して直視下にカテーテルを挿入して細胞を移植する方法、エコーにて肝臓の門脈を同定して、カテーテルを穿刺して細胞を移植する方法、あるいは腹部エコーガイド下に脾臓を直接穿刺することにより脾臓に移植する方法が挙げられる。投与量（移植量）は、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/個体が好ましく、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/個体がより好ましい。なお、投与量（移植量）は、投与される患者の年齢、体重、症状等によって適宜変更することができる。

[0140] また、上述のようにして得られた膵臓ホルモン産生細胞を研究試薬として用いることもできる。例えば、膵臓ホルモン産生細胞を培養している培養容器や、膵臓ホルモン産生細胞を封じ込めたバイオリクター内に新薬を添加することにより、新薬のスクリーニングを行うことができる。

[0141] さらに、上述のようにして得られた膵臓ホルモン産生細胞を用いて、バイオ人工膵臓を製造することも可能である。バイオ人工膵臓としては、中空糸型のバイオリクター（デバイス）と膵臓ホルモン産生細胞とを組み合わせたハイブリッド型の人工膵臓が挙げられる。バイオ人工膵臓には、体外に装着して血管に接続するもの、体内に留置して血管に接続するもの、血管に接続せずに腹腔内に留置するもの、血管に接続せずに皮下に留置するもの等があり、いずれの形態のバイオ人工膵臓にも適用可能である。

実施例

[0142] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載によって何ら限定して解釈されるものではない。

[0143] <実施例1>

(1) 分化誘導促進剤の調製

分化誘導促進剤は以下のようにして調製した。10% FBS (ウシ胎児血清) (ニチレイ、171012)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies Japan、15140-122) を添加したハムF12培地 (Sigma、N6658) で継代培養したCHO-K1細胞を10cmディッシュに 5×10^5 個プレーティングした。その翌日、FuGENE6 (Roche) を使用して、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるポリペプチド (以下、「IBCAP」という。) の発現ベクター (pCAGGS-IBCAP) をCHO-K1細胞にトランスフェクトし、IBCAPを強制発現させた。その48時間後に細胞を1/20濃度に希釈し、10cmディッシュに再度プレーティングした。その翌日、最終濃度 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ のG418 (ナカライテスク、09380-44) を添加し、以後、3~5日おきに培地交換を行い、コロニー形成させた。限界希釈法でクローン化したコロニーを単離し、増殖後、サザンブロット法及びノザンブロット法で遺伝子発現を確認し、安定型IBCAP発現CHO-K1細胞株 (以下、「IBCAP発現Stable CHO細胞」という。) を作製した。

[0144] その後、このIBCAP発現Stable CHO細胞を、1% GLUTAMAX 1 (Life Technologies Japan、35050-061) 及び1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies Japan、15140-122) を添加したCD OptiCHO (Life Technologies Japan、12681-011) に馴化させた。さらに、馴化させたIBCAP発現Stable CHO細胞を、強制通気式CO₂インキュベーター (タイテック、CO₂-BR-43FL、温度: 37°C、振とう速度: 120 rpm、ガ

ス条件：5% CO₂、20 mL/min/フラスコ)にて振とう培養を行い、以後、この細胞を用いて培養上清を作製した。

[0145] 培養上清は、生存率が90%以上あることを確認し、細胞数が 5×10^5 個/mLとなるよう継代し(培養液量：150 mL培養液/500 mLフラスコ)、5日後に回収した(細胞数は約4~ 5×10^5 個/mL)。回収した培養上清はその後、セントリプレップ(Millipore、4302、YM-3)を用いて約10倍に濃縮し(300 mLを約30 mLに濃縮し)、さらに2 Lの30 mM HEPES (pH7.6)に対して3回透析した。そして、透析後の培養上清(以下、「IBCAP培養上清」という。)を分化誘導促進剤として準備した。

[0146] また、Mockコントロールとして、空ベクター(pCAGGS)をCHO-K1細胞にトランスフェクトし、上記と同様にして透析後の培養上清(以下、「Mock培養上清」という。)を準備した。

[0147] (2) ヒトiPS細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞としては、埼玉医科大学のDr. Mitaniから供与されたTIG3/KOSM細胞を用いた。この細胞は、センダイウイルスを用いてTIG-3細胞に4因子(OCT遺伝子、KLF遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子)を導入することにより、産業技術総合研究所にて樹立されたものである(Nishimura, K. et al., J. Biol. Chem., 286, pp. 4760-4771 (2011))。TIG3/KOSM細胞は、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)、20% (v/v) Knockout™血清代替物(Gibco)、1% (v/v) 非必須アミノ酸(Gibco)、2.5 mM L-グルタミン、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(Gibco)、5 ng/mL FGF-2 (R&D Systems)、5 mM 塩化ナトリウムを添加したDMEM/ハムF12培地中で維持した。

[0148] 分化誘導を開始する前日、10 cmディッシュに増やしたTIG3/KOSM細胞を、MATRIGEL™ (Becton Dickinson)で

コートされた6ウェルプレートに 1×10^9 個/ウェルの細胞密度でプレATINGし、STOフィーダー細胞による馴化培地中で一晩培養した。そして、培地を取り除き、CTK (0.25% トリプシン、1mg/mL Collagenase IV、20% KSR、1mM CaCl_2 in PBS) 1mLを添加し、37°Cで5分間処理をし、STOフィーダー細胞を取り除いた後に、ピペティングにより懸濁してTIG3/KOSM細胞を剥がした。その後、剥がしたTIG3/KOSM細胞を15mLチューブにとり、1000rpm (150×g)で5分間遠心後、上清を取り除き、Matrigel™でコートされた6ウェルプレートに 1×10^9 個/ウェルの細胞密度でプレATINGした。

[0149] なお、上記の馴化培地は、以下のようにして調製したものである。すなわち、マイトマイシン処理済みSTO細胞を15cmディッシュに 7.5×10^6 個プレATINGし、翌日、ヒトiPS培地 (FGF-2なし) に培地交換し、1~3時間処理後、再度ヒトiPS培地に交換して24時間培養した。その翌日、上清を回収し、1500rpm (330×g)で10分間遠心することによって細胞を取り除き、-20~-30°Cにてストックした。

[0150] 分化誘導の開始初日に、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2mM L-グルタミン (Gibco)、100ng/mL アクチビンA (Humanzyme)、25ng/mL Wnt3a (ナカライテスク) を添加したAdvanced RPMI 1640培地 (Gibco) に培地交換し、1日間培養した (工程 (A1-1))。次いで、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、0.2% (v/v) FBS (ウシ胎児血清)、2mM L-グルタミン (Gibco)、100ng/mL アクチビンA (Gibco) を添加したAdvanced RPMI 1640培地 (Gibco) に培地交換し、2日間培養した (工程 (A1-2))。

[0151] 次いで、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2% (v/v) FBS、2mM L-グルタミン (Gibco)、5

0 ng/mL FGF-10 (R&D Systems)、0.25 μM KAAD-シクロパミン (ナカライテスク) を添加した Advanced RPMI 1640 培地 (Gibco) に培地交換し、2日間培養した (工程 (B1))。

[0152] 次いで、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2% (v/v) B-27™ サプリメント (Gibco)、2 μM レチノイン酸 (Sigma)、0.25 μM KAAD-シクロパミン (ナカライテスク)、50 ng/mL FGF-10 (R&D Systems) を添加した DMEM/ハム F12 培地 (Gibco) に培地交換し、4日間培養した (工程 (C1))。

[0153] 次いで、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2% (v/v) B-27™ サプリメント (Gibco)、10 μM DAPT (Sigma)、55 nM エキセンジン-4 (Phoenix Pharmaceuticals) を添加し、さらに2% (v/v) IBCAP 培養上清又は Mock 培養上清を添加した DMEM/ハム F12 培地 (Gibco) に培地交換し、3日間培養した (工程 (D1))。

[0154] 最後に、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2% (v/v) B-27™ サプリメント (Gibco)、55 nM エキセンジン-4 (Phoenix Pharmaceuticals)、50 ng/mL HGF (Humanzyme)、50 ng/mL IGF-1 (Humanzyme) を添加し、さらに2% (v/v) IBCAP 培養上清又は Mock 培養上清を添加した CMRL 1066 培地 (Gibco) に培地交換し、6日間培養した (工程 (E1))。

[0155] (3) 定量的 RT-PCR 分析

分化誘導前の TIG3/KOSM 細胞、及び工程 (E1) を経て得られた細胞について、グルカゴン (GCG) 及びソマトスタチン (SST) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で確認した。具体的には、まず、Nucleo Spin™ RNA II (タカラバイオ) を用いて細胞から RNA を抽出

し、Fast SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて定量的RT-PCR分析を行った。プライマー配列を以下に示す。

HsGCG_264F : GCATTTACTTTGTGGCTGGA (配列番号4)

HsGCG_368R : CCTGGGAAGCTGAGAATGAT (配列番号5)

HsSST_206F : CCCCAGACTCCGTCAGTTTC (配列番号6)

HsSST_313R : TCCGTCTGGTTGGGTTTCAG (配列番号7)

[0156] PCR産物は3%アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド、BioDoc-It Imaging System (BMbio) により可視化した。

[0157] 工程(E1)を経て得られた細胞におけるグルカゴン(GCG)及びソマトスタチン(SST)の発現量をそれぞれ図1(a)、(b)に示す。この図1(a)、(b)は、分化誘導前のTIG3/KOSM細胞におけるグルカゴン(GCG)及びソマトスタチン(SST)の発現量を1とした相対値(誘導倍率)で示したものである。

[0158] 図1(a)に示すように、無添加の場合にはグルカゴン(GCG)の誘導倍率が約22.6倍であったのに対し、工程(D1)、(E1)でMock培養上清を添加した場合には約12.8倍であり、IBCAP培養上清を添加した場合には約36.8倍であった。

また、図1(b)に示すように、無添加の場合にはソマトスタチン(SST)の誘導倍率がほぼ0倍であったのに対し、工程(D1)、(E1)でMock培養上清を添加した場合には約0.4倍であり、IBCAP培養上清を添加した場合には約9.5倍であった。

この結果から、工程(D1)、(E1)でIBCAP培養上清を添加する

ことにより、ヒト i P S 細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導効率が向上することが分かる。

[0159] <実施例 2>

I B C A P 培養上清又は M o c k 培養上清を工程 (A 1 - 1)、 (A 1 - 1)、あるいは工程 (B 1)、 (C 1) で添加するとともに、工程 (E 1) の培養期間を 3 日間とするほかは、実施例 1 と同様にして T I G 3 / K O S M 細胞を培養し、グルカゴン (G C G) 及びソマトスタチン (S S T) の遺伝子発現を定量的 R T - P C R で確認した。

[0160] 工程 (E 1) を経て得られた細胞におけるグルカゴン (G C G) 及びソマトスタチン (S S T) の発現量をそれぞれ図 2 (a)、 (b) に示す。この図 2 (a)、 (b) は、分化誘導前の T I G 3 / K O S M 細胞におけるグルカゴン (G C G) 及びソマトスタチン (S S T) の発現量を 1 とした相対値で示したものである。

[0161] 図 2 (a) に示すように、無添加の場合にはグルカゴン (G C G) の誘導倍率が約 1 2 0 . 1 倍であったのに対し、工程 (A 1 - 1)、 (A 1 - 2) で M o c k 培養上清を添加した場合には約 1 0 0 . 7 倍であり、 I B C A P 培養上清を添加した場合には約 1 9 3 . 8 倍であった。また、工程 (B 1)、 (C 1) で M o c k 培養上清を添加した場合には約 3 1 . 2 倍であり、 I B C A P 培養上清を添加した場合には約 2 1 8 . 5 倍であった。

また、図 2 (b) に示すように、無添加の場合にはソマトスタチン (S S T) の誘導倍率が約 1 1 7 . 6 倍であったのに対し、工程 (A 1 - 1)、 (A 1 - 2) で M o c k 培養上清を添加した場合には約 1 6 . 6 倍であり、工程 (A 1 - 1)、 (A 1 - 2) で I B C A P 培養上清を添加した場合には約 6 5 . 2 倍であった。また、工程 (B 1)、 (C 1) で M o c k 培養上清を添加した場合には約 8 . 8 倍であり、 I B C A P 培養上清を添加した場合には約 1 6 4 . 1 倍であった。

この結果から、工程 (A 1 - 1)、 (A 1 - 2) で I B C A P 培養上清を添加する場合と、工程 (B 1)、 (C 1) で I B C A P 培養上清を添加する

場合とのいずれも、ヒト i P S 細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導効率が向上することが分かる。

[0162] <実施例 3>

(1) マウス膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導
マウス膵臓組織幹／前駆細胞としては、埼玉医科大学の Dr. M a t s u m o t o から供与された T e c 3 D R 細胞を用いた。この細胞は、マウス胎児期の膵臓から分離された組織幹／前駆細胞をクローン化することにより樹立されたものである。T e c 3 D R 細胞は、1% (v/v) ペニシリン／ストレプトマイシン (G i b c o)、15% (v/v) F B S、50 μM 2-メルカプトエタノール (G i b c o) を添加した D M E M 培地中で維持した。

[0163] 分化誘導の開始初日に、24 ウェルプレートに T e c 3 D R 細胞を 1×10^5 個／ウェルの細胞密度でプレーティングし、1% (v/v) ペニシリン／ストレプトマイシン (G i b c o)、0.1% (v/v) B S A (ウシ血清アルブミン) (S i g m a)、1% (v/v) I T S - X (G i b c o)、55 μM 2-メルカプトエタノール (G i b c o) を添加した D M E M / ハム F 1 2 培地 (G i b c o) で2日間培養した (工程 (A 3))。

[0164] 次いで、1% (v/v) ペニシリン／ストレプトマイシン (G i b c o)、0.1% (v/v) B S A (S i g m a)、1% (v/v) I T S - X (G i b c o)、55 μM 2-メルカプトエタノール (G i b c o)、50 ng/mL アクチビン A (H u m a n z y m e) を添加した D M E M / ハム F 1 2 培地 (G i b c o) に培地交換し、4日間培養した (工程 (B 3))。

[0165] 次いで、1% (v/v) ペニシリン／ストレプトマイシン (G i b c o)、0.1% (v/v) B S A (S i g m a)、1% (v/v) I T S - X (G i b c o)、55 μM 2-メルカプトエタノール (G i b c o)、1 μM レチノイン酸 (S i g m a) を添加した D M E M / ハム F 1 2 培地 (G i b c o) に培地交換し、4日間培養した (工程 (C 3))。

[0166] 次いで、トリプシン-EDTAで処理することにより培養中の細胞を回収し、24ウェルプレートに 1×10^5 個/ウェルの細胞密度でプレーティングし、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2 mg/mL BSA (Sigma)、1% (v/v) ITS-X (Gibco)、10 ng/mL FGF-2 (ナカライテスク) を添加したDMEM/ハムF12培地 (Gibco) で3日間培養した (工程 (D3)) 。

[0167] 最後に、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、2 mg/mL BSA (Sigma)、1% (v/v) ITS-X (Gibco)、10 ng/mL FGF-2 (ナカライテスク)、10 mM ニコチンアミド (Sigma) を添加したDMEM/ハムF12培地 (Gibco) に培地交換し、5日間培養した。その途中、2~3日経過後に新しい培地に交換した。その後、培地中に2% (v/v) IBCAP培養上清又はMock培養上清を添加し、さらに6日間培養した (工程 (E3)) 。

[0168] (2) 定量的RT-PCR分析

分化誘導前のTec3DR細胞、及び工程 (E3) を経て得られた細胞について、マウスインスリン-1 (Ins1) の遺伝子発現を定量的RT-PCRで確認した。具体的には、まず、NucleoSpin™ RNA I I (タカラバイオ) を用いて細胞からRNAを抽出し、Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて定量的RT-PCR分析を行った。プライマー配列を以下に示す。

MnIns1__qPCR__Fw: CACTTCCTACCCCTGCTGG (配列番号8)

MnIns1__qPCR__Rv: ACGCCAAGGTCTGAAGGTC (配列番号9)

[0169] PCR産物は3%アガロースゲル電気泳動により分離し、エチブジウムブロマイドで染色し、BioDoc-It Imaging System (

B M b i o) により可視化した。

[0170] 工程 (E 3) を経て得られた細胞におけるインスリン-1 (I n s 1) の発現量を図 3 に示す。この図 3 は、分化誘導前の T e c 3 D R 細胞におけるインスリン-1 (I n s 1) の発現量を 1 とした相対値で示したものである。

[0171] 図 3 に示すように、工程 (E 3) で M o c k 培養上清を添加した場合には約 0. 3 倍であり、I B C A P 培養上清を添加した場合には約 1 7. 0 倍であった。

この結果から、工程 (E 3) で I B C A P 培養上清を添加することにより、マウス膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導効率が向上することが分かる。

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞を生産する膵臓ホルモン産生細胞の生産方法であって、

多能性幹細胞又は膵臓組織幹／前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導過程で、下記(1)～(3)から選ばれる少なくとも1種の分化誘導促進剤を培地中に添加することを特徴とする膵臓ホルモン産生細胞の生産方法、

(1) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(2) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導促進作用を持つポリペプチド、

(3) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清。

[請求項2] (A1) TGF- β (トランスフォーミング増殖因子 β) スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で多能性幹細胞を培養する工程、

(B1) 前記工程(A1)で得られた細胞をFGF (線維芽細胞増殖因子) の存在下で培養する工程、

(C1) 前記工程(B1)で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程、

(D1) 前記工程(C1)で得られた細胞を γ -セクレターゼ阻害剤の存在下で培養する工程、及び

(E1) 前記工程(D1)で得られた細胞を、エキセンジン-4、HGF (肝細胞増殖因子)、IGF-1 (インスリン様増殖因子-1

）、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程、を含み、

前記工程（A1）～（E1）の少なくとも1つの工程で前記分化誘導促進剤を培地中に添加する請求項1記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[請求項3]

（A2）TGF- β （トランスフォーミング増殖因子 β ）スーパーファミリーに属する増殖因子と、Wnt（ウィングレス型MMTV組み込み部位）ファミリーに属する増殖因子及びGSK-3（グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3）阻害剤からなる群から選択される少なくとも1種の因子との存在下で多能性幹細胞を培養する工程、

（B2）前記工程（A2）で得られた細胞をTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程、

（C2）前記工程（B2）で得られた細胞をレチノイドの存在下で培養する工程、

（D2）前記工程（C2）で得られた細胞を、cAMP（環状アデノシン-リン酸）増加剤、デキサメタゾン、TGF- β 1型受容体阻害剤、及びニコチンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の因子の存在下で培養する工程、を含み、

前記工程（A2）～（D2）の少なくとも1つの工程で前記分化誘導促進剤を培地中に添加する請求項1記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[請求項4]

（A3）TGF- β （トランスフォーミング増殖因子 β ）スーパーファミリーに属する増殖因子、レチノイド、FGF（線維芽細胞増殖因子）、及びニコチンアミドの非存在下で膵臓組織幹／前駆細胞を培養する工程、

（B3）前記工程（A3）で得られた細胞をTGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子の存在下で培養する工程、

（C3）前記工程（B3）で得られた細胞をレチノイドの存在下で

培養する工程、

(D3) 前記工程 (C3) で得られた細胞を FGF の存在下で培養する工程、及び

(E3) 前記工程 (D3) で得られた細胞をニコチンアミドの存在下で培養する工程

を含み、

前記工程 (A3) ~ (E3) の少なくとも1つの工程で前記分化誘導促進剤を培地中に添加する請求項1記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法。

[請求項5] 請求項1~4のいずれか1項記載の膵臓ホルモン産生細胞の生産方法によって人工的に生産された膵臓ホルモン産生細胞。

[請求項6] 次の(1)~(3)の少なくとも1種を含み、多能性幹細胞又は膵臓組織幹/前駆細胞から膵臓ホルモン産生細胞への分化を誘導する分化誘導促進剤；

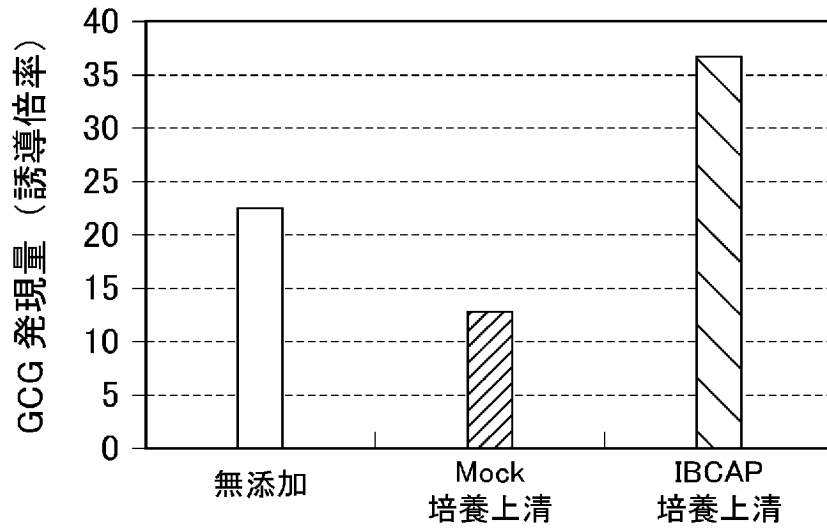
(1) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(2) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAによりコードされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、膵臓ホルモン産生細胞への分化誘導促進作用を持つポリペプチド、

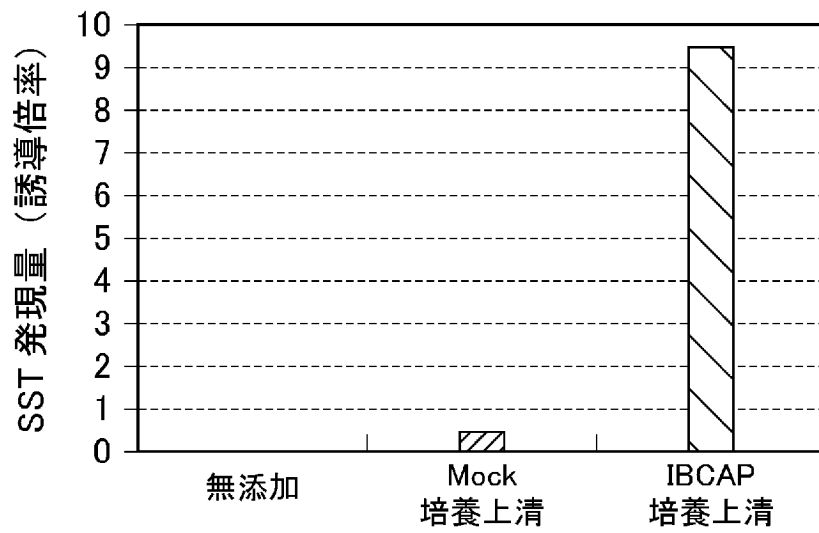
(3) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、又はこのDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを外来遺伝子として組み込んだ細胞の培養上清。

[図1]

(a)

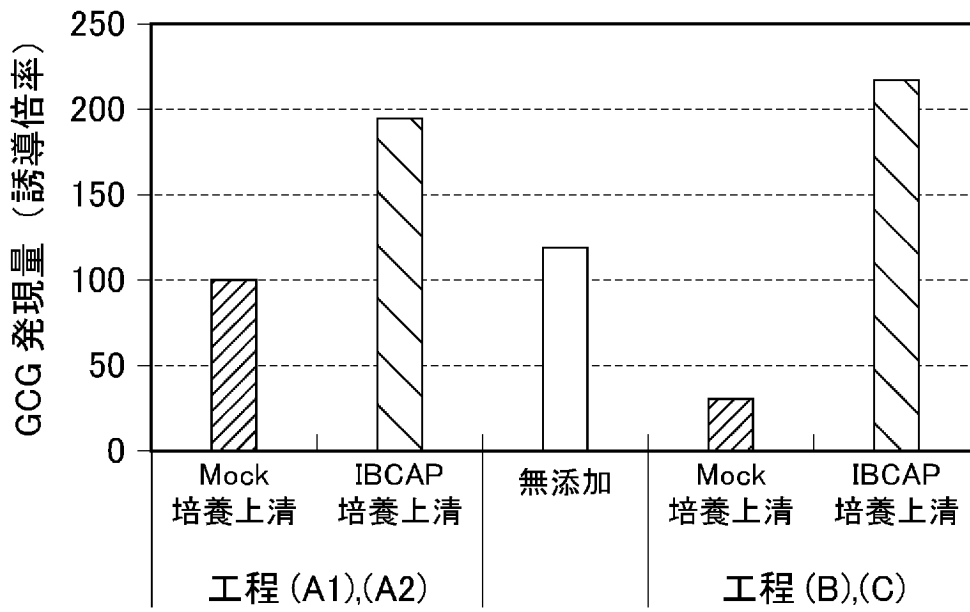


(b)

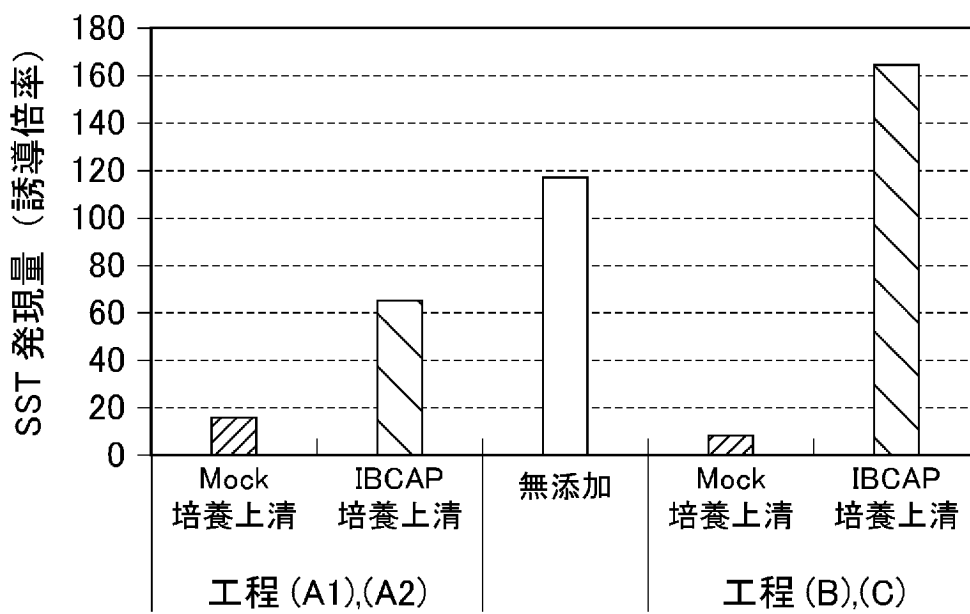


[図2]

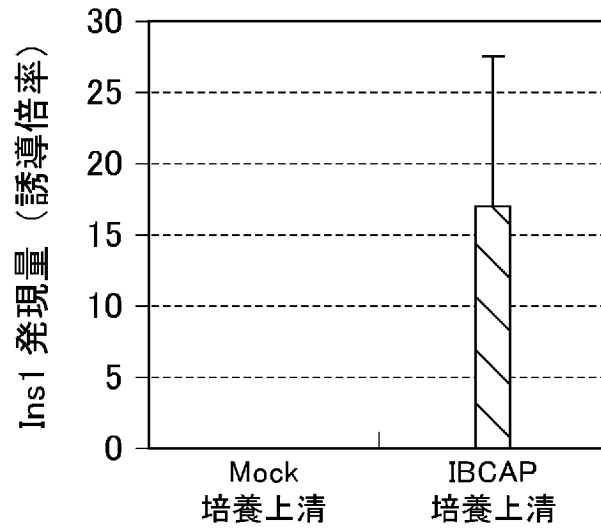
(a)



(b)



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071 (2010.01) i, C12N15/09 (2006.01) n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAM III), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq/SwissProt

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	D'AMOUR, K.A., <i>et al.</i> , Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, Nature Biotechnology, 2006, 24, pp.1392-1401, particularly, summary, fig.1, 5, 6, page 1398, right column, lines 9 to 11, page 1399, the part concerning Cell culture in column of METHODS	1, 2, 5, 6 3, 4
Y A	KUNISADA, Y., <i>et al.</i> , Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells, Stem Cell Research, March 2012, 8 (2), pp.274-284, particularly, summary, page 278, left column, line 19 to right column, line 12, fig.4, page 282, the part concerning Cell culture in column of Materials and Methods	1, 3, 5, 6 2, 4

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2013 (06.06.13)Date of mailing of the international search report
18 June, 2013 (18.06.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064469

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JIANG, W., <i>et al.</i> , <i>In vitro</i> derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells, <i>Cell Research</i> , 2007, 17, pp.333-344, particularly, summary, page 334, the part concerning Human ES Cell culture and differentiation in column of Materials and Methods, fig.1, 6	1, 4-6 2, 3
Y	WO 2009/013794 A1 (Hideo TOYOSHIMA), 29 January 2009 (29.01.2009), entire text; particularly, claims; paragraph [0033]; examples & US 2010/0168026 A1 & EP 2168589 A1 & CA 2694222 A	1-6
Y	JP 2007-209214 A (University of Tsukuba), 23 August 2007 (23.08.2007), entire text; particularly, claims; paragraph [0008]; examples (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq/SwissProt

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	D' AMOUR, K. A., <i>et al.</i> , Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, Nature Biotechnology, 2006, 24, pp.1392-1401,	1, 2, 5, 6
A	特に、要旨、図1、図5、図6、1398頁右欄9-11行、1399頁METHODSの項のうち Cell culture の部分	3, 4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.2013

国際調査報告の発送日

18.06.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英則

4B

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KUNISADA, Y., <i>et al.</i> , Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells, Stem Cell Research, March 2012, 8(2), pp. 274-284,	1, 3, 5, 6
A	特に、要旨、278 頁左欄 19 行-右欄 12 行、図 4、282 頁 Materials and Methods の項のうち Cell culture の部分	2, 4
Y	JIANG, W., <i>et al.</i> , <i>In vitro</i> derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells, Cell Research, 2007, 17, pp. 333-344,	1, 4-6
A	特に、要旨、334 頁 Materials and Methods の項のうち Human ES Cell culture and differentiation の部分、図 1、図 6	2, 3
Y	WO 2009/013794 A1 (豊島 秀男) 2009.01.29, 全文、特に請求の範囲、[0033]、実施例 & US 2010/0168026 A1 & EP 2168589 A1 & CA 2694222 A	1-6
Y	JP 2007-209214 A (国立大学法人 筑波大学) 2007.08.23, 全文、特に特許請求の範囲、【0008】、実施例 (ファミリーなし)	1-6