

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-506153

(P2019-506153A)

(43) 公表日 平成31年3月7日(2019.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/071 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-535116 (P2018-535116)  
 (86) (22) 出願日 平成29年1月6日 (2017.1.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月23日 (2018.8.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/012631  
 (87) 国際公開番号 W02017/120543  
 (87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)  
 (31) 優先権主張番号 62/276,814  
 (32) 優先日 平成28年1月8日 (2016.1.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596060697  
 マサチューセッツ インスティテュート  
 オブ テクノロジー  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021  
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア  
 ヴェニュー・77  
 (71) 出願人 515251735  
 ザ プリガム アンド ウィミンズ ホス  
 ピタル, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
 115 ボストン, フランシス ストリー  
 ト 75  
 (74) 代理人 100095832  
 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分化した腸内分泌細胞およびインスリン産生細胞の作製

## (57) 【要約】

出生後幹細胞を含む集団などの哺乳動物出生後細胞集団を、ChgAを上方制御し、かつ出生後幹細胞の分化を促進する複数の小分子で処理して腸内分泌細胞を形成することにより、該細胞集団から腸内分泌細胞(EEC)の集団が得られる。ChgAの上方制御は、得られた細胞集団中のCGAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイにより測定した場合に、少なくとも約1.5%となるようなものである。該出生後細胞を腸内分泌細胞に分化させるために使用され得る小分子としては、Wnt活性化剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤、成長因子、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、Tgf-阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つが挙げられ得る。また、哺乳動物細胞の集団のインスリン発現は、該集団を、インスリン発現を増加させる複数の小分子で処理することにより増加される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物出生後細胞集団から腸内分泌細胞(EEC)の集団を得るための方法であって、該方法が、哺乳動物出生後細胞集団を、ChgAを上方制御する複数の小分子で処理して、該出生後細胞集団中の出生後細胞を分化させ、細胞の集団を得、その結果該得られた細胞集団中のChgAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイで測定した場合、少なくとも約1.5%となる工程を含む、方法。

## 【請求項 2】

該出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

該出生後細胞が多能性子孫細胞である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

ChgAを発現する細胞の画分が少なくとも約5%である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

ChgAを発現する細胞の画分が少なくとも約10%である、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

ChgAを発現する細胞の画分が少なくとも約50%である、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

ChgAを発現する細胞の画分が、約60%～約100%の範囲内にある、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

ChgAの発現レベルが、mRNA ChgA発現アッセイで測定した場合、出生後細胞集団中のChgAを発現する細胞の数の少なくとも10倍である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

得られた集団中のChgAを発現する細胞の数が、出生後細胞集団中のChgAを発現する細胞の数の少なくとも約100倍である、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

得られた集団中のChgAを発現する細胞の数が、出生後細胞集団中のChgAを発現する細胞の数の約1000倍～100000倍の範囲内にある、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

腸内分泌細胞が、GLP-1、GIP、5HT、SST、ガストリン、CCK、SCT、NTS、PYY、ガストリンおよびグレリンの少なくとも1つを発現する腸内分泌細胞型を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

該複数の小分子が、Wnt活性化剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤、成長因子、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せの少なくとも1つを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 13】

該方法が、哺乳動物出生後細胞集団と1つ以上の第1の小分子を接触させる第1の段階：および哺乳動物出生後細胞集団と1つ以上の第2の小分子を接触させる第2の段階を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 14】

該1つ以上の第1の小分子が、Notch阻害剤およびWnt活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含み、該1つ以上の第2の小分子が、Notch阻害剤、ならびにEGFR阻害剤およびMEK/ERK阻害剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 1 3 記載の方法。

## 【請求項 15】

10

20

30

40

50

該1つ以上の第1の小分子が、R-Spondin1およびDAPT、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含み、該1つ以上の第2の小分子が、DAPTおよびPD0325901、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項14記載の方法。

【請求項16】

該1つ以上の第2の小分子がWnt阻害剤をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項17】

該Wnt阻害剤がWnt-C59を含む、請求項16記載の方法。

【請求項18】

該1つ以上の第1の小分子または該1つ以上の第2の小分子が、EGFおよびNogginの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む成長因子をさらに含む、請求項14記載の方法。

10

【請求項19】

該1つ以上の第1の小分子が、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、およびCa<sup>2+</sup>/Neuro D1活性化剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項20】

該1つ以上の第1の小分子が、ツバスタチンA、トラニルシプロミンおよびISX-9の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項19記載の方法。

20

【請求項21】

該1つ以上の第2の小分子が、Tgf- 阻害剤、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項22】

該1つ以上の第2の小分子が、616452、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】

該1つ以上の第2の小分子が、ヒストンメチル化阻害剤、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項24】

該1つ以上の第2の小分子が、トラニルシプロミン(Trancylpromine)、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項23記載の方法。

30

【請求項25】

該第1の段階が、出生後細胞集団と、Ngn3を上方制御して細胞中のNgn3発現を増加させる1つ以上の第1の小分子を接触させることを含み、該第2の段階が、出生後細胞集団と、Ngn3を下方制御して細胞中のNgn3発現を減少させる1つ以上の第2の小分子を接触させることを含み、請求項13記載の方法。

【請求項26】

該哺乳動物出生後細胞集団の少なくとも約2%が腸内分泌細胞に転換される、請求項1記載の方法。

40

【請求項27】

該哺乳動物出生後細胞集団の少なくとも約70%が腸内分泌細胞に転換される、請求項26記載の方法。

【請求項28】

該哺乳動物出生後細胞集団が、上皮幹細胞、胃幹細胞、腸幹細胞、造血幹細胞、乳房幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞および神経幹細胞の少なくとも1つを含む、請求項1記載の方法。

【請求項29】

該哺乳動物出生後細胞集団がLgr5+腸幹細胞を含む、請求項28記載の方法。

50

- 【請求項 3 0】  
該哺乳動物出生後細胞集団が細胞のインビトロ集団である、請求項 1 記載の方法。
- 【請求項 3 1】  
該哺乳動物出生後細胞集団が細胞培養培地中に分散される、請求項 2 8 記載の方法。
- 【請求項 3 2】  
哺乳動物出生後細胞集団が細胞のインビボ集団である、請求項 1 記載の方法。
- 【請求項 3 3】  
出生後細胞または腸内分泌細胞を含む哺乳動物細胞の集団のインスリン発現を増加させるための方法であって、該方法が、  
インスリン活性アッセイにおいて、活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%となるように、該哺乳動物細胞集団を、細胞集団中のインスリン発現を増加させる複数の小分子で処理する工程を含む、方法。 10
- 【請求項 3 4】  
該出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 3 5】  
該出生後細胞が出生後多能性子孫細胞である、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 3 6】  
活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分が少なくとも約20%である、請求項 3 3 記載の方法。 20
- 【請求項 3 7】  
活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分が約20%～約100%の範囲内にある、請求項 3 6 記載の方法。
- 【請求項 3 8】  
該得られた細胞が、mRNAインスリンアッセイにより測定した場合に、Hprt mRNAの発現レベルに対応するベースラインと比較して、少なくとも約1倍～2倍であるインスリンの発現を有する、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 3 9】  
該複数の小分子が、DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含む、請求項 3 3 記載の方法。 30
- 【請求項 4 0】  
該複数の小分子が、616452、ISX-9、ならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2'デオキシシチジンの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含む、請求項 3 9 記載の方法。
- 【請求項 4 1】  
該複数の小分子が、Wnt活性化剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤、成長因子、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含む、請求項 3 9 記載の方法。 40
- 【請求項 4 2】  
得られた細胞の少なくとも約1%がインスリン産生細胞である、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 4 3】  
得られた細胞の約1%～約20%がインスリン産生細胞である、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 4 4】  
該哺乳動物細胞集団が、Lgr5+幹細胞、多能性子孫細胞、および分化した腸内分泌細胞の少なくとも1つを含む、請求項 3 3 記載の方法。
- 【請求項 4 5】  
該方法が、  
該哺乳動物細胞集団と、1つ以上の第1の小分子を接触させる第1の段階； 50

該哺乳動物細胞集団と、1つ以上の第2の小分子を接触させる第2の段階；および  
該哺乳動物細胞集団と、1つ以上の第3の小分子を接触させる第3の段階  
を含む、請求項33記載の方法。

【請求項46】

第1の段階が、該細胞と、Notch阻害剤、Wnt活性化剤およびDNAメチル化阻害剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含む1つ以上の第1の小分子を接触させることを含み、第2の段階が、該細胞と、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、Tgf-阻害剤、およびNeuroD1活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含む1つ以上の第2の小分子を接触させることを含み、第3の段階が、該細胞と、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤およびTgf-阻害剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む1つ以上の第3の小分子を接触させることを含み、請求項45記載の方法。

10

【請求項47】

該1つ以上の第1の小分子が、R-Spondin 1、DAPTならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2'デオキシシチジンの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含み、該1つ以上の第2の小分子が、DAPT、Wnt-C59、616452およびISX-9、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩を含み、該1つ以上の第3の小分子が、DAPT、Wnt-C59、616452およびPD0325901、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項46記載の方法。

【請求項48】

第1の段階が、該細胞と、EGFおよびNogginの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む成長因子を接触させることをさらに含む、請求項46記載の方法。

20

【請求項49】

第1の段階が、該細胞と、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、およびCa<sup>2+</sup>流入/NeuroD1活性化剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを接触させることさらにを含む、請求項46記載の方法。

【請求項50】

第1の段階が、該細胞と、ツバスタチン、トラニルシプロミン、およびISX-9の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを接触させることを含む、請求項49記載の方法。

30

【請求項51】

第2の段階が、該細胞と、ヒストンメチル化阻害剤、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを接触させることをさらに含む、請求項46記載の方法。

【請求項52】

第2の段階が、該細胞と、トラニルシプロミン(trancylpromine)、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを接触させることをさらに含む、請求項46記載の方法。

【請求項53】

該哺乳動物細胞集団が、上皮幹細胞、胃幹細胞、腸幹細胞、造血幹細胞、乳房幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞および神経幹細胞の少なくとも1つを含む、請求項33記載の方法。

40

【請求項54】

該哺乳動物細胞集団がLgr5+腸幹細胞を含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

該哺乳動物細胞集団が細胞のインビトロ集団である、請求項53記載の方法。

【請求項56】

該哺乳動物細胞集団が細胞培養培地中に分散される、請求項53記載の方法。

【請求項57】

50

該哺乳動物細胞集団が細胞のインビボ集団である、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 8】

複数の小分子を用いた処理により出生後幹細胞から由来する腸内分泌細胞を有する細胞集団であって、該腸内分泌細胞の画分が全細胞集団の少なくとも約1%である、細胞集団。

【請求項 5 9】

該腸内分泌細胞が5-HTまたはGLP-1を発現する、請求項 5 8 記載の細胞集団。

【請求項 6 0】

該細胞集団が未分類の集団である、請求項 5 8 記載の細胞集団。

【請求項 6 1】

腸内分泌細胞の画分が少なくとも約5%である、請求項 5 8 記載の細胞集団。 10

【請求項 6 2】

腸内分泌細胞の画分が少なくとも約10%である、請求項 6 1 記載の細胞集団。

【請求項 6 3】

腸内分泌細胞の画分が約20%～約100%の範囲内にある、請求項 6 2 記載の細胞集団。

【請求項 6 4】

該細胞が凍結保存される、請求項 5 8 記載の細胞集団。

【請求項 6 5】

インスリン産生細胞を有する細胞集団であって、該インスリン産生細胞の画分が全細胞集団の少なくとも約0.05%である、細胞集団。

【請求項 6 6】 20

インスリン産生細胞の画分が少なくとも約1%である、請求項 6 5 記載の細胞集団。

【請求項 6 7】

該インスリン産生細胞が出生後幹細胞に由来する、請求項 6 5 記載の細胞集団。

【請求項 6 8】

哺乳動物出生後細胞の集団を腸内分泌細胞に分化させるためのキットであって、該キットが、

細胞培養培地；

哺乳動物出生後細胞集団；および

得られた細胞集団中のChgAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイで測定した場合、少なくとも約1.5%となるように、ChgAを上方制御して、出生後細胞を分化させる複数の小分子

を含む、キット。 30

【請求項 6 9】

該哺乳動物出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 6 8 記載のキット。

【請求項 7 0】

該出生後細胞が多能性子孫細胞である、請求項 6 8 記載のキット。

【請求項 7 1】

該キットが、

Notch阻害剤およびWnt活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む小分子の第1の組；ならびに 40

Notch阻害剤、ならびにEGFR阻害剤およびMEK/ERK阻害剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む小分子の第2の組

を含む、請求項 6 8 記載のキット。

【請求項 7 2】

哺乳動物出生後細胞および出生後幹細胞から分化した腸内分泌細胞の少なくとも1つを含む哺乳動物細胞の集団からインスリン産生細胞を得るためのキットであって、該キットが、

細胞培養培地；

哺乳動物細胞集団；および 50

インスリン-GFPプロモーターアッセイにおいて、活性化されたインスリンGFPプロモーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%となるように、該細胞集団中のインスリン発現を増加させる複数の小分子を含む、キット。

【請求項 7 3】

該哺乳動物出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 7 2 記載のキット。

【請求項 7 4】

該哺乳動物出生後細胞が多能性子孫細胞である、請求項 7 2 記載のキット。

【請求項 7 5】

該キットが、

10

DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の組合せ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 7 2 記載のキット。

【請求項 7 6】

細胞培養培地、哺乳動物細胞集団、および該哺乳動物細胞から腸内分泌細胞を得るための指示書をさらに含む、請求項 7 2 記載のキット。

【請求項 7 7】

不十分な内分泌細胞または腸内分泌細胞生成物を特徴とする疾患状態の治療を必要とする哺乳動物における、不十分な内分泌細胞または腸内分泌細胞生成物を特徴とする疾患状態を治療する方法であって、該方法が、

20

哺乳動物の該細胞集団中のChgAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイで測定した場合、少なくとも約1.5%となるように、哺乳動物の細胞集団中の出生後細胞においてChgAを上方制御して、出生後細胞を腸内分泌細胞に分化させる複数の小分子を、該哺乳動物に投与する工程

を含む、方法。

【請求項 7 8】

該出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

該出生後細胞が多能性子孫細胞である、請求項 7 または 7 7 記載の方法。

【請求項 8 0】

30

該複数の小分子が、Wnt活性化剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤、成長因子、HDAC(6)阻害剤、ヒストンメチル化(LSD1)阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 7 7 ~ 7 9 いずれか記載の方法。

【請求項 8 1】

該出生後細胞が、腸幹細胞、胃幹細胞、上皮幹細胞、造血(hematopoetic)幹細胞、乳房幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞および神経幹細胞の少なくとも1つである、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 8 2】

該疾患状態が、肥満、糖尿病、過敏性腸症候群、感染性腸炎および炎症性腸疾患の少なくとも1つである、請求項 7 7 記載の方法。

40

【請求項 8 3】

不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態の治療を必要とする哺乳動物において、不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態を治療する方法であって、該方法が、

インスリン-GFPプロモーターアッセイにおいて、活性化されたインスリンGFPプロモーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%となるように、哺乳動物の細胞集団中のインスリン発現を増加させる複数の小分子を、該哺乳動物に投与する工程

を含み、該細胞集団が、出生後細胞または腸内分泌細胞を含む、方法。

【請求項 8 4】

該出生後細胞が出生後幹細胞である、請求項 8 3 記載の方法。

50

## 【請求項 8 5】

該出生後細胞が出生後多能性子孫細胞である、請求項 8 3 記載の方法。

## 【請求項 8 6】

該複数の小分子が、DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 8 3 記載の方法。

## 【請求項 8 7】

該複数の小分子が、616452、ISX-9、ならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2'デオキシシチジンの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 8 3 記載の方法。

10

## 【請求項 8 8】

該疾患状態が、肥満およびI型糖尿病の少なくとも1つである、請求項 8 3 記載の方法。

## 【請求項 8 9】

DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せ；ならびに薬学的に許容され得る賦形剤を含む、組成物。

## 【請求項 9 0】

616452、ISX-9、ならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2'デオキシシチジンの少なくとも1つ、またはそれらの誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 8 9 記載の組成物。

20

## 【請求項 9 1】

細胞の集団を得るための方法であって、該方法は、

- a) 哺乳動物出生後細胞の集団を提供する工程；
  - b) 該哺乳動物出生後細胞集団を、ChgAを上方制御する少なくとも1つの小分子で処理して、処理後細胞集団を得る工程
- を含む、方法。

## 【請求項 9 2】

該処理後細胞集団が腸内分泌細胞を含む、請求項 9 1 記載の方法。

## 【請求項 9 3】

該処理後細胞集団がChgA-陽性細胞を含む、請求項 9 1 記載の方法。

30

## 【請求項 9 4】

該処理後細胞集団が少なくとも約1.5%のChgA-陽性細胞集団を含む、請求項 9 3 記載の方法。

## 【請求項 9 5】

該ChgA-陽性細胞集団をChgA免疫染色(Immunostaining)アッセイにより測定する、請求項 9 4 記載の方法。

## 【請求項 9 6】

該ChgA-陽性細胞集団をChgA免疫染色(Immunostaining)アッセイにより測定する、請求項 9 4 記載の方法。

40

## 【請求項 9 7】

該哺乳動物出生後細胞集団がインビトロ集団である、請求項 1 または 9 1 記載の方法。

## 【請求項 9 8】

該インビトロ集団が細胞培養培地に分散される細胞を含む、請求項 9 7 記載の方法。

## 【請求項 9 9】

該インビトロ集団が類器官を含む、請求項 9 7 記載の方法。

## 【請求項 1 0 0】

該哺乳動物出生後細胞集団がインビボ集団またはエキソビボ集団である、請求項 1 または 9 1 記載の方法。

## 【請求項 1 0 1】

50

該哺乳動物細胞集団がインビトロ集団である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

該インビトロ集団が、細胞培養培地中に分散される細胞を含む、請求項 1 0 1 記載の方法。

【請求項 1 0 3】

該インビトロ集団が類器官を含む、請求項 1 0 1 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

該哺乳動物細胞集団がインビボ集団またはエキソビボ集団である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 1 0 5】

該複数の小分子が、単回投与で哺乳動物に投与される、請求項 7 7 または 8 3 記載の方法。

【請求項 1 0 6】

出生後細胞の腸内分泌細胞への分化が、複数の小分子の投与後にインサイチュで起こる、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 1 0 7】

該複数の小分子が、MAO阻害剤の少なくとも1つ、またはその誘導体もしくは薬学的に許容され得る塩をさらに含む、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 1 0 8】

インスリン発現の増加が、複数の小分子の投与後にインサイチュで起こる、請求項 8 3 記載の方法。

【請求項 1 0 9】

不十分な内分泌細胞または腸内分泌細胞の生成物を特徴とする疾患状態の治療を必要とする哺乳動物において、不十分な内分泌細胞または腸内分泌細胞の生成物を特徴とする疾患状態を治療する方法であって、該方法が、

該哺乳動物に細胞集団を投与する工程を含み、ここで、該細胞集団が、該細胞集団中の出生後細胞においてChgAを上方制御する複数の小分子によりエキソビボで処理されて、出生後細胞が腸内分泌細胞に分化され、その結果、該細胞集団中のChgAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイで測定した場合に、少なくとも約1.5%となるように、方法。

【請求項 1 1 0】

不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態の治療を必要とする哺乳動物において、不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態を治療する方法であって、該方法が、

該哺乳動物に、出生後細胞、腸内分泌細胞、またはそれらの組合せを含む細胞集団を投与する工程を含み、ここで、該細胞集団が、インスリン-GFPプロモーターアッセイにおいて、細胞集団中の活性化されたインスリンGFPプロモーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%となるように、該細胞集団中でインスリン発現を増加させる複数の小分子によりエキソビボで処理される、方法。

【請求項 1 1 1】

該複数の小分子が多段階プロセスで投与される、請求項 1、3 3、7 7、8 3、9 1、1 0 9 および 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本願は、2016年1月8日に出願された米国仮特許出願第62/276,814号の利益を主張する。上記出願の全教示は、参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所により認められた助成金番号R01 DE013023の下、政府の支援

10

20

30

40

50

によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

腸内分泌系は、多様なホルモンを使用して、体内での広範な生理学的応答を微妙に調節することにより体が栄養物にどのように応答するかを調整し、そのため胃腸(GI)障害、糖尿病および肥満などの消化および代謝性の疾患において重要な役割を担う。腸内分泌細胞(EEC)は体内で最大の内分泌系を形成する(Gribble and Reimann, 2015)。EECは個々に、腸上皮を通して陰窩-絨毛軸(crypt-villus axis)に沿って分散されるが、インビボにおいては少ない割合(約1%)で存在するだけである(Gunawardene et al., 2011)。EECの重要な機能は、管腔内容物、特に栄養物を感知すること、および食物摂取、エネルギー恒常性およびブドウ糖耐性を調節する多様なホルモン(例えばGLP-1)の分泌により応答することである(Furness, 2013)。EECはGLP-1、PYYおよびGLP-2などのホルモンを分泌することにより胃バイパス手術において重要な役割を担うことも示唆される(Mumphrey, 2013)。したがって、EECは、糖尿病および肥満における治療標的である。さらに、増大する証拠(mounting evidence)により、先天性免疫におけるEECの免疫制御機能が示される(Moran, 2008)。EECは、機能的Toll様受容体(TLR)を発現し、共生細菌により産生された代謝物に直接応答する(Bogunovic, 2007)。最近の証拠はまた、EECは、炎症の間に数およびホルモン分泌の変化により免疫細胞機能を直接調整し得ることを示唆する(Worthington, 2015)。EECはまた、代謝性疾患(例えば糖尿病および肥満)、ならびに過敏性腸症候群、感染性腸炎および炎症性腸疾患などの胃腸病状において決定的な役割を果たすと考えられる(Moran, 2008 and Manocha and Kahn, 2012)。したがって、疾患介入の調査および開発のためにEECには大きな利益がある。

10

20

【0004】

しかしながら、腸内分泌細胞の研究は、インビトロでEECを培養する能力の相対的な欠如、ならびに腸上皮におけるEECの散乱分布およびEECの相対的な希少性(1%)により阻害されている。特に、EECの分化および機能を制御するシグナルの知識は、かなりわかっていない。さらに、EECの直接インビトロ研究は、EECが分裂しない最終的に分化した細胞になるために、可能ではない。したがって、消化管上皮におけるEECの散乱分布および希少性(1%)のために、インサイチュでEECの機能および制御を研究することは困難である(Sternini, Anselmi and Rosengut, 2008 and Gunawardene, Corfe and Staton, 2011)。

30

【0005】

したがって、代謝および消化の疾患の調査を可能にするためのインビトロEEC培養のための必要性が残っている。EECの機能を調節し、疾患状態の治療の発見および実行における使用のためなどの特異的EECサブタイプを得る能力のための必要性もある。

【発明の概要】

【0006】

発明の概要

本開示の局面は、出生後幹細胞集団などの哺乳動物出生後細胞集団を、ChgAを上方制御し、かつ細胞の分化を促進して腸内分泌細胞を形成する複数の小分子で処理することにより、出生後幹細胞集団などの哺乳動物出生後細胞集団から腸内分泌細胞(EEC)の集団を得ることを含む。ChgAの上方制御は、得られた細胞集団中のCGAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイにより測定した場合に少なくとも約1.5%となるものである。出生後幹細胞を腸内分泌細胞に分化させるために使用され得る小分子としては、Wnt活性化剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤、成長因子、HDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、Tgf-阻害剤およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つが挙げられ得る。

40

【0007】

本開示の局面はまた、哺乳動物細胞の集団を、該細胞がインスリン発現を増加することを誘導する複数の小分子で処理することにより哺乳動物細胞の集団のインスリン発現を増加させるための方法を含む。該インスリン発現のレベルは、インスリン-GFPレポーターを

50

使用したインスリン活性アッセイにおいて、活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%であるように該細胞集団中で増加され得る。インスリン発現を増加するように処理され得る哺乳動物細胞としては、出生後幹細胞、出生後多能性子孫細胞および腸内分泌細胞などの出生後細胞または腸内分泌細胞が挙げられ得る。細胞においてインスリンの発現を増加させるための処理に使用され得る小分子としては、DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤およびNeuroD1活性化剤が挙げられ得る。

【0008】

本明細書に記載されるEECおよび/またはインスリン産生細胞により疾患状態を治療するための方法および/または組成物も、本開示の局面に従って含まれる。また、得られたEECおよび/またはインスリン産生細胞に対応する細胞の集団も、該EECおよび/またはインスリン産生細胞の調製における使用のための小分子を含むキットと同様に、本開示の局面に従って含まれる。

10

【図面の簡単な説明】

【0009】

前述のものは、添付の図面において示されるように、本発明の例示態様の以下のより具体的な記載から明らかであり、図面中、同様の参照記号は、異なる図面を通じて同じ部分を指す。図面は、必ずしも同じ縮尺ではなく、その代り、本発明の態様の例示に重きが置かれる。

【図1】図1は、Notch阻害剤を使用したISCからの腸内分泌細胞(EEC)の分化の増加を示す。

20

【図2】図2は、培養された腸幹細胞におけるChgAのmRNA発現を示す。

【図3】図3は、EEC分化を増加させる小分子に対する96ウェルスクリーニングプラットフォームを示す。

【図4】図4は、小分子スクリーニング結果からの陽性ヒットを示す。

【図5】図5は、小分子およびEND条件下で分化した腸幹細胞を使用した陽性ヒットの検証を示す。

【図6】図6は、EEC分化を特異的に増加させるMAPK/ERKまたはEGFR阻害剤を示す。

【図7】図7は、EEC分化の際に小分子ゲフィチニブ(Ge)、AS703026 (As)またはPD0325901 (Pd)がNgn3発現を減少させること、およびR-Spondin 1がNgn3発現を促進することを示す。

30

【図8】図8は、最適化された分化プロトコルを示す。

【図9】図9は、EEC分化の際の24時間でのNgn3発現を示す。

【図10】図10は、分化の際の3日目でのEECの重要なマーカーの発現を示す。

【図11】図11は、EEC分化の際の重要な遺伝子の時間経過試験を示す。

【図12】図12は、分化の5日後にEECマーカーChgA発現が増加する2工程プロトコルを示す。

【図13】図13は、分化の5日後にEECマーカーChgAを染色することによりEEC分化が増加する2工程プロトコルを示す。スケールバー：50 μm。

【図14】図14は、さらなる小分子による分化プロトコルの向上を示す。

【図15】図15は、分化プロトコルの工程1において添加した場合にツバスタチンA(Tu)がEEC分化を増加させることを示す。

40

【図16】図16は、分化における両方の工程で添加した場合にトラニルシプロミンがEEC分化を増加させたことを示す。

【図17】図17は、EGFの除去によりEECの分化がさらに増加したことを示す。

【図18】図18は、向上した分化プロトコルを示す。

【図19】図19は、ISCからの高度に効率的なEEC分化を示す。スケールバー：20 μm。

【図20】図20は、ISCから生成される機能的L細胞(GLP-1)を示す。

【図21】図21は、Wnt-C59およびISX-9ならびにそれらの組合せを含むさらなる因子がEEC分化を増加させることを示す。

【図22】図22は、複数の条件下での機能的EECマーカーの発現を示す。

50

- 【図23】図23は、ISCからのEEC分化のための分化プロトコルを示す。
- 【図24】図24は、5-アザ(5)、616452(6)およびWnt-C59(C)の組合せが5日目に、分化した腸幹細胞においてインスリン-GFP発現を誘導することを示す。
- 【図25】図25は、インスリン-GFP発現の誘導の5日目における5-アザの用量応答を示す。
- 【図26】図26は、インスリン-GFP発現の誘導の5日目における616452の用量応答を示す。
- 【図27】図27は、培養5日後にISX-9(1)がインスリン-GFP発現をさらに増加させたことを示す。
- 【図28】図28は、インスリン-GFP発現の誘導の5日目におけるISX-9の用量応答を示す。
- 【図29】図29は、培養5日後の複数の条件における細胞のインスリン-GFP発現のFACS分析を示す。
- 【図30】図30は、7日目に薬物なしまたは薬物ありで処理した細胞のGFPおよび明視野を示す。
- 【図31】図31は遺伝子発現データを示す。
- 【図32】図32は、グルコースの低(2mM)および高(20mM)濃度による細胞の処理が異なるレベルのインスリン放出を誘導することを示す。
- 【図33】図33は、分化プロトコルのフロー図を示す。
- 【図34】図34は、WntおよびNotch経路により調節されたインビボEEC分化のモデルを示す。
- 【図35】図35は、NotchおよびEGFR/MEK/ERK阻害ならびにWnt不活性化(R-Spondin1除去(withdraw)による)の組合せが、ChgAに対する免疫染色により決定した場合にISCのEEC方向への特異化(specification)を誘導することを示す。
- 【図36】図36は、EGFおよび/またはNogginの該組み合わせからの除去により高レベルのChgA発現が誘導され、一方でWnt経路阻害剤IWP2(またはI)またはGSK3阻害剤CHIR99021(またはC)の添加によりEECへの分化はさらには増加されなかったことを示す。
- 【図37】図37は、複数の分化条件における細胞コロニーの形態を示す。
- 【図38】図38は、複数の分化条件における細胞コロニーの形態を示す。Notch、MEK阻害およびWnt不活性化(D.Pd条件)ならびにNotch/MEK/Wnt阻害(D.Pd.C59条件)の条件における死細胞を有するコロニーの顕著な管腔に注意。一方で2工程分化条件(ENRD-END.Pd)はより少ない細胞死を誘導した。
- 【図39A】図39は、さらなる小分子がEEC分化を増加させることを示す。図39A、工程1におけるツバスタチンA(Tu)の添加ありまたはなしの複数の条件において分化した細胞についてのGip、Gcg、CckのmRNA発現。
- 【図39B-D】図39B、工程1、工程2または両方の工程において添加したトラニルシプロミン(Tc)ありまたはなしの複数の条件における細胞分化についてのGip、GcgおよびCckのmRNA発現。図39C、トラニルシプロミンについてのEECマーカー(ChgA、Gcg、Gip、Tph1)の用量依存的誘導。図39D、複数の条件において分化した細胞についての複数のEECマーカー(Gip、Gcg、Cck)のmRNA発現。
- 【図39E】図39E、複数の条件において分化した細胞についてのLyz1のmRNA発現。
- 【図40A】図40A~40Dは、プロトコル最適化によりISCからのEECの高効率分化が生じることを示す。図40A、複数の時点におけるWnt経路阻害剤Wnt-C59(C59)およびTgf-経路阻害剤レブソックス(Repsox)(Rep)の添加ありまたはなしでの杯細胞(Muc2)、パーネト細胞(Lyz1)およびEEC(ChgA、Gcg、Gip、Cck、Tph1、Sst、SctおよびPyy)についてのマーカーのmRNA発現。S1、S2は2工程分化プロトコルの工程1および工程2を示す。0時間または12時間は、C59の添加の時点を示す。ENRは、自発的分化のための対照として使用した。
- 【図40B】図40B、2-工程分化プロセスにおける複数の遺伝子の時間経過試験。
- 【図40C】図40C、複数の遺伝子の対応するピークレベル(2日目でSox9、Math1、Ngn3およびNeuroD1、5日目でChgA、図40D参照)と比較した該複数の遺伝子の発現レベル。
- 【図40D】図40A~40Dは、プロトコル最適化によりISCからのEECの高効率分化が生じる

ことを示す。図40A、複数の時点におけるWnt経路阻害剤Wnt-C59 (C59)およびTgf- 経路阻害剤レブソックス (Rep)の添加ありまたはなしでの杯細胞(Muc2)、パーネト細胞(Lyz1)およびEEC (ChgA、Gcg、Gip、Cck、Tph1、Sst、SctおよびPyy)についてのマーカーのmRNA発現。S1、S2は2工程分化プロトコルの工程1および工程2を示す。0時間または12時間は、C59の添加の時点を示す。ENRは、自発的分化のための対照として使用した。図40B、2-工程分化プロセスにおける複数の遺伝子の時間経過試験。図40C、複数の遺伝子の対応するピークレベル(2日目でSox9、Math1、Ngn3およびNeuroD1、5日目でChgA、図40D参照)と比較した該複数の遺伝子の発現レベル。図40E、分化したEEC細胞の免疫染色。

【図40E】図40E、分化したEEC細胞の免疫染色。

【図41A】図41A~41Cは、プロトコル最適化によりISCからのEECの高効率分化が生じることを示す。図41A、レブソックスありまたはなしでの条件における複数の遺伝子のmRNA発現。使用した基底条件はENR.D.Tu.Tc-D.Pd.Tc.C59であった。レブソックスは工程2で添加した。

【図41B】図41B、示される条件における複数の遺伝子のmRNA発現。

【図41C】図41C、分化した細胞コロニーの形態。矢印は、コロニーから放出された死細胞を示す。

【図42】図42は、レブソックスおよびFGF10が、段階1で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加したことを示す。

【図43】図43は、より長い5アザ処理がインスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図44】図44は、段階2におけるWnt-C59の遅延添加がインスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図45】図45は、BayK 8644が、段階1で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図46】図46は、インスリン発現の促進におけるBayK 8644の用量依存的活性を示す。

【図47】図47は、BayK 8644が、段階1~3で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図48】図48は、インスリン発現の促進におけるDAPTの用量依存的活性を示す。

【図49】図49は、10X1がインスリンおよびNkx6.1発現を増加させたことを示す。

【図50】図50は、インスリンおよびNkx6.1発現の促進におけるレブソックスの用量応答を示す。

【図51】図51は、インスリンおよびNkx6.1発現の促進におけるISX9の用量応答を示す。

【図52】図52は、インスリンおよびNkx6.1発現の促進におけるWnt-C59の用量応答を示す。

【図53】図53は、DMH-1が、段階2~3で添加された場合に、インスリンおよびNkx6.1発現レベルを増加させたことを示す。

【図54】図54は、デキサメタゾンが、段階2~3で添加された場合に、インスリンおよびNkx6.1発現レベルを増加させたことを示す。

【図55】図55は、T3が、段階3で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図56】図56は、T3およびN-アセチルシステイン(N-AIc)が、段階3で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図57】図57は、CHIR99021 (CHIR)が、段階3で添加された場合に、インスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図58】図58は、Exendin-4およびオーロラキナーゼ阻害剤II、ならびにホルスコリンがインスリンmRNA発現を増加させたことを示す。

【図59】図59は、インスリンmRNA発現の促進においてGC1がT3にとって代わり得ることを示す。

【図60】図60は、インスリン-GFP発現および胃腸幹細胞から因子の組合せを使用して得られた島様構造の形態を示す。

【図61】図61は、細胞培養プロセスの図を示す。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0010】

## 定義

本願において、そうではないと記載されなければ、「または」の使用は「および/または」を意味する。本願において使用される場合、用語「含む(comprise)」ならびに「含む(comprising)」および「含む(comprises)」などのその用語の変形は、他の添加物、成分、整数または工程を除外することを意図しない。本願において使用される場合、用語「約(about)」および「約(approximately)」は同等のものとして使用される。本願において使用される約(about)/約(approximately)を伴うかまたは伴わない任意の数字は、当業者に理解される任意の通常の変動をカバーすることを意味する。特定の態様において、用語「約(approximately)」または「約(about)」は、そうではないと記載されない限りまたは文脈からそうではないと明らかでない限りは、記載された参照値のいずれかの方向(より多いまたはより少ない)に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれ以下以内にある値の範囲をいう(かかる数があり得る値の100%を超える場合を除く)。

10

## 【0011】

「投与」は、被験体に物質を導入することをいう。いくつかの態様において、投与は経口であるかまたは注射による。特定の態様において、「投与されるようにする(causing to be administered)」は、第1の成分がすでに投与された後の第2の成分の投与をいう(例えば異なる時点でおよび/または異なる行為者による)。

20

## 【0012】

「抗体」は、免疫グロブリンポリペプチド、または免疫原結合能力を有するその断片をいう。

## 【0013】

本明細書で使用する場合、「アゴニスト」は、標的遺伝子、タンパク質、または経路それぞれの発現または活性の増加を引き起こす薬剤である。そのため、アゴニストは、標的遺伝子またはタンパク質にこの生理学的な効果を直接または間接的に生じさせるいくつかの様式で、その同族の(cognate)受容体に結合して活性化し得る。アゴニストはまた、経路構成要素の活性を調節することにより、例えば経路の負の制御因子の活性を阻害することにより経路の活性を増加し得る。そのため、「Wntアゴニスト」は、Wnt経路の活性を増加する薬剤として定義され得、該活性は、細胞中の増加したTCF/LEF媒介性の転写により測定され得る。そのため、「Wntアゴニスト」は、Wntファミリータンパク質、細胞内ベータカテニン分解の阻害剤、およびTCF/LEFの活性化剤のいずれかおよび全てを含むFrizzled受容体ファミリーメンバーに結合して活性化する真のWntアゴニストであり得る。「Notchアゴニスト」は、の転写活性を測定することにより決定され得る、Notch経路の活性を増加する薬剤として定義され得る。

30

## 【0014】

「アンタゴニスト」は、受容体に結合して、次いで他の分子による結合を低減または排除する薬剤をいう。

## 【0015】

特定の細胞型に関して本明細書で使用する場合、「細胞密度」は、代表的な顕微鏡検査試料中の面積当たりのその細胞型の平均数である。該細胞型としては、限定されないが、Lgr5<sup>+</sup>細胞、腸内分泌細胞またはインスリン産生細胞が挙げられ得る。該細胞密度は、所定の試料、器官または組織中の所定の細胞型により評価され得る。

40

## 【0016】

「細胞分化」は、細胞が特殊化されて、出生後幹細胞のより特殊化された機能を有する細胞への変換などの特異的な機能を実行するプロセスをいう。一態様において、Lgr5<sup>+</sup>腸幹細胞は腸内分泌細胞に分化する。

## 【0017】

本明細書で使用する場合、「ChgA免疫染色アッセイ」は、免疫染色法により、細胞集団

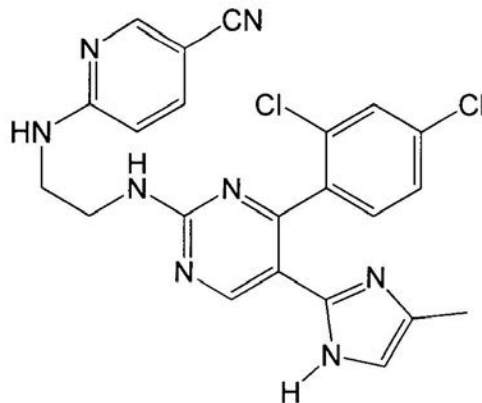
50

中のChgAを発現する細胞の画分を決定するために使用されるアッセイである。ChgA免疫染色アッセイの一例において、細胞集団が処理される細胞培養培地を除去し、試料をPBSで洗浄する。マトリゲル中で培養された類器官または細胞コロニーは、4% PFAを添加して室温で20分間インキュベートすることにより直接固定される。次いでマトリゲルを機械的に破壊し、細胞を、BSA-被覆Eppendorfチューブに移す。試料をPBSで洗浄し、0.25% Triton X-100で30分間浸透化し、クロモグラニンAに対する一次抗体(例えば、抗クロモグラニンA、sc-13090, Santa Cruz)および適切な二次抗体(例えば、Alexa Fluorコンジュゲート二次抗体、例えばAlexa Fluor 594コンジュゲートロバ抗ウサギ抗体、A-21207; Life Technologies)で染色する。共焦点顕微鏡検査により画像を取得する。

【0018】

「CHIR99021」は、化学式 $C_{22}H_{18}Cl_2N_8$ および以下の別名：CT 99021; 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-ピリジニル]アミノ]エチル]アミノ]-3-ピリジンカルボニトリルを有する化学組成物である。その化学構造は以下のとおりである：

【化1】



【0019】

「相補的な核酸配列」は、相補的なヌクレオチド塩基対で構成される別の核酸配列とハイブリダイズし得る核酸配列をいう。

【0020】

特定の細胞型に関して本明細書で使用される場合、「断面細胞密度」は、代表的な顕微鏡検査試料中の組織を通る断面の面積当たりのその細胞型の平均数である。

【0021】

「減少(decreasing)」および「減少する(decrease)」は、例えば参照のレベルと比較して、少なくとも5%、例えば5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の減少をいい、例えば参照のレベルと比較して、少なくとも1倍、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍またはそれ以上の減少が挙げられる。

【0022】

「EGFR阻害剤」は、上皮成長因子受容体を阻害する物質である。EGFR阻害剤の例としては、特に、エルロチニブHCl (OSI-744)、ゲフィチニブ(ZD1839)、ラパチニブ(GW-572016)ジトシレート、アフアチニブ(BIBW2992)、ネラチニブ(HKI-272)、カネルチニブ(Canertinib)(CI-1033)、ラパチニブ、AG-490 (チルホスチンB42)、CP-724714、ダコミチニブ(PF299804, PF299)、WZ4002、AZD8931 (サピチニブ(Sapitinib))、CUDC-101、AG-1478 (チルホスチンAG-1478)、PD153035 HCl、ペリチニブ(Pelitinib)(EKB-569)、AC480 (BMS-599626)、AEE788 (NVP-AEE788)、OSI-420、WZ3146 WZ8040、AST-1306、ロシレチニブ(Rociletinib)(CO-1686, AVL-301)、ゲニスチン、バルリチニブ(Varlitinib)、イコチニブ、TAK-285、WHI-P154、PD168393、CNX-2006、チルホスチン9、AG-18、ポジオチニブ(Pozitotinib)(HM781-36B)、AZD3759、オシメルチニブ(AZD9291)、アフアチニブ(BIBW2992)ニマレイン酸

10

20

30

40

50

塩、エルロチニブ、オルムチニブ(olmutinib)(HM61713, BI 1482694)、CL-387785 (EKI-785)、NSC228155、AZ5104、AG490、AG 494、AG 555、AG 556、AG 825、AG 879、AG 99、AP 24534、AV 412、BIBU 1361、BIBX 1382、BMS 599626、カネルチニブ、CGP 52411、GW 583340、HDS 029、HKI 357、イレッサ、JNJ 28871063、ラベズスチンA、2,5-ジヒドロキシ桂皮酸メチル、PD 158780、PF 6274484、PKI 166、R 1530、RAF 265およびXL 184が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

「排除する」は、検出可能でないレベルまで減少させることを意味する。

【 0 0 2 4 】

「腸内分泌細胞」は、胃腸管および膵臓の特殊化された内分泌細胞である細胞をいい、腸管、胃および膵臓内に見られ得る。

該腸内分泌細胞は、体内の最大の内分泌系を形成し、管腔内容物、特に栄養物を感知し得、食物摂取、エネルギー恒常性およびブドウ糖耐性を調節する多様なホルモン(例えばGLP-1)の分泌により応答し得る。腸内分泌細胞の特定の型は、しばしば、特にGLP-1、5HT、SST、ガストリン、CCK、SCT、NTS、PYY、ガストリンおよびグレリンを発現する細胞などの特定の腸内分泌細胞サブセット内のホルモンの発現に従って分類される。腸内分泌の異なるサブセットは、しばしばK細胞、I細胞、L細胞、G細胞、腸クロム親和細胞、N細胞およびS細胞とも称されるが、該細胞のホルモン発現は、上述の細胞サブタイプを同定するためにますます使用されている。腸内分泌細胞は、本明細書に記載されるmRNA ChgA発現アッセイおよびChgA免疫染色アッセイなどのアッセイにより検出され得るChgAマーカの発現により同定され得る。

【 0 0 2 5 】

「植え込む」または「植え込み」は、目的の組織の既存の細胞との接触による、インビボでの目的の組織中への幹細胞または前駆細胞の組み込みの過程をいう。

【 0 0 2 6 】

「上皮前駆細胞」は、上皮細胞を生じる細胞系統になるよう限定される能力を有する多能性細胞をいう。

【 0 0 2 7 】

「上皮幹細胞」は、上皮細胞を生じる細胞系統を含む複数の細胞系統になるよう付される(committed)能力を有する多能性細胞をいう。

【 0 0 2 8 】

「断片」は、例えばポリペプチドまたは核酸分子の部分をいう。この部分は、例えば参照核酸分子またはポリペプチドの完全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含む。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100、200、300、400、500、600、700、800、900もしくは1000のヌクレオチドまたはアミノ酸を含み得る。

【 0 0 2 9 】

「成長因子」は、細胞成長、増殖または分化を刺激し得る物質をいう。

【 0 0 3 0 】

本明細書において交換可能に使用されるように、「GSK3ベータ」、「GSK3 」および「GSK3B」は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3ベータの頭字語である。

【 0 0 3 1 】

「GSK3ベータ阻害剤」は、GSK3ベータの活性を阻害する物質である。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用する場合、「HDAC」はヒストンデアセチラーゼの頭字語である。

【 0 0 3 3 】

「HDAC阻害剤」はHDACの活性を阻害する物質である。

【 0 0 3 4 】

「ヒストンメチル化阻害剤」は、ヒストンメチル化を阻害する物質である。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

「ハイブリダイズ」は、ストリンジェンシーの適切な条件下で、相補的なヌクレオチド塩基の間で二本鎖分子を形成する対形成(例えば、DNA中アデニン(A)はチミン(T)と塩基対を形成し、同様にグアニン(G)はシトシン(C)と塩基対を形成する)をいう。(例えばWahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507参照)。

【0036】

「阻害剤」は、例えば標的遺伝子、タンパク質または経路の発現または活性の減少を引き起こす薬剤をいう。例えば、「Wnt阻害剤」は、Wntシグナル伝達経路の活性の減少を引き起こす薬剤をいい、例えば、Wnt受容体阻害剤、Wnt受容体アンタゴニスト、Wnt分泌を阻害するPorcupine阻害剤、もしくはタンキラーゼ阻害剤、またはカテニン相互作用に干渉する薬物であり得る。「アンタゴニスト」は阻害剤であり得るが、より具体的には、受容体に結合し、次いで他の分子による結合を減少または排除する薬剤である。

10

【0037】

「増加(increasing)」および「増加する(increase)」は、例えば参照のレベルと比較して、少なくとも5%、例えば5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、100%またはそれ以上の増加をいい、例えば参照標準のレベルと比較して(as compared to the level of a as compared to the level of a reference standard)、少なくとも1倍、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍またはそれ以上の増加を含む。

【0038】

本明細書で使用する場合、「インスリン活性アッセイ」は、インスリン遺伝子転写、翻訳またはインスリン放出が細胞集団中で活性化されている程度を決定するために使用されるアッセイである。例示的なインスリン活性アッセイにおいて、初期の細胞は、B6.Cg-Tg(Ins1-EGFP)1Hara/Jマウス(MIT-GFPマウスとも称される、Jackson lab stock no.: 006864)などのインスリン-GFPマウスの腸から単離される。腸陰窩は、腸の近位半分から単離される。約200の陰窩を40  $\mu$ lのマトリゲルに閉じ込め、500  $\mu$ lの陰窩培養培地(培地補助物(1X N2、1X B27、2mM Glutamax、10mM HEPES、1mM N-アセチルシステインおよび100U/mlペニシリン/100  $\mu$ g/mlストレプトマイシン)を有するAdvanced DMEM/F12)を有し、成長因子(50ng/ml EGF、100ng/ml Nogginおよび500ng/ml R-Spondin1)および小分子(5  $\mu$ M CHIR99021および1.25mM VPA)を補充した24ウェルプレート中で培養して、腸幹細胞の富化された集団を得る。次いで細胞を1~2回継代して、アッセイのための開始細胞集団を作製する。薬剤がインスリン遺伝子転写、翻訳またはインスリン放出を活性化する能力を試験するために、細胞を、適切な培養培地(例えば、前述の陰窩培養培地)、成長因子および/または他の試験される薬剤と共にインキュベートする。陰窩培養培地および評価される薬剤を含む適切な培養培地をそれぞれのウェルに添加して、2日毎に培地を交換して、細胞と共に2~10日間インキュベートする。インスリン-GFP陽性細胞の画分(すなわち、インスリン-GFPレポーターが活性化される細胞)は、総細胞集団中に存在するGFP+細胞集団の画分を測定するためにフローサイトメーターを使用して定量され得る。また、細胞集団の平均インスリン活性は、適切な参照またはハウスキーピング遺伝子を使用して(例えば、ベースラインとしてHprtのmRNA発現を使用して)標準化した集団のインスリンの平均mRNA発現レベルを測定することにより測定され得る。

20

30

40

【0039】

「腸幹細胞」は、拘束されて、腸内分泌細胞、腸細胞(enterocyte cell)、杯細胞およびパーネト細胞などの腸細胞(interstitial cell)を生じる細胞系統を含む複数の細胞系統になるよう付される能力を有する腸系統の多能性細胞をいう。

【0040】

「単離される」は、天然の状態で見られるような通常では物質に付随する成分を様々な程度で含まない該物質をいう。「単離」は、元の供給源または周囲からの分離の程度を示す。

【0041】

50

「Lgr5」は、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体5の頭字語であり、Gタンパク質共役受容体49(GPR49)またはGタンパク質共役受容体67(GPR67)としても知られる。これは、ヒトにおいてLgr5遺伝子によりコードされるタンパク質である。

【0042】

本明細書で使用する場合、「Lgr5+細胞」または「Lgr5-陽性細胞」は、Lgr5を発現する細胞である。本明細書で使用する場合、「Lgr5-細胞」はLgr5+ではない細胞である。

【0043】

「哺乳動物」は、限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ヒツジ、サル、ヤギ、ウサギ、ハムスター、ウマ、ウシまたはブタを含む任意の哺乳動物をいう。

【0044】

「多能性子孫細胞」は、すでに幹細胞よりも特異的な細胞をいい、これは、該細胞は特定の型の細胞に分化する傾向を有することを意味するが、依然として複数の、異なるが限定された細胞型に分化する能力を有する細胞をいう。多能性子孫細胞は、幹細胞から分化しているが、まだ「標的」細胞型に分化していない多能性細胞であり得る。

【0045】

「MEK/ERK阻害剤」は、MEK/ERKシグナル伝達経路を阻害する物質である。MEK阻害剤の例としては、アルクチゲニン(Arctigenin)、BIX 02189、10Z-ヒメニアルジシン、PD 0325 901、PD 184352、PD 198306、PD 334581、PD 98059、SL 327、U0126、セルメチニブ(selumetinib)(AZD6244)、トラメチニブ(GSK1120212)、PD184352 (CI-1040)、PD98059、ピマセルチブ(AS-703026)、BIX 02188、TAK-733、AZD8330、ビニメチニブ(Binimetinib)(MEK162、ARRY-162、ARRY-438162)、PD318088、レファメチニブ(Refametinib)(RDEA119、Bay 86-9766)、BI-847325、コピメチニブ(GDC-0973、RG7420)、GDC-0623およびAPS-2-79が挙げられる。ERK阻害剤の例としては、SCH772984、DEL-22379、VX-11e、ERK5-IN-1、XMD8-92、SC1 (プルリポチン(pluripotin))、ウリキセルチニブ(urixetinib)(BVD-523、VRT75227、FR 180204、GDC-0994、BIX 02189、TCS ERK 11e、TMCBおよびエイコサペンタエン酸が挙げられる。

【0046】

「mRNA ChgA発現アッセイ」は、細胞集団中の相対的なChgA mRNA発現レベルを決定するために使用されるアッセイをいう。例えば、該アッセイは、出生後幹細胞の試験されない集団と比較して、試験される薬剤での処理後の分化した細胞集団のChgA mRNA発現レベルを決定し得る。mRNA ChgA発現アッセイの例において、細胞を回収して、RNA抽出キット(例えばRNeasy Miniキット、Qiagen)を使用して、該細胞からRNAを抽出する。次いでChgA発現レベルを、1工程qPCRキット(例えばQuantiTech Probe PCRキット、Qiagen)、ならびにChgAプライマーおよびプローブ(例えば、市販のマウスChgA用Taqmanプローブ、Life Technologies)を使用して定量的リアルタイムPCRにより評価する。

【0047】

「mRNAインスリン発現アッセイ」は、細胞集団の相対的インスリンmRNA発現レベルを決定するために使用されるアッセイをいう。例えば、該アッセイは、細胞の処理されない集団と比較して、細胞内のインスリンの発現を増加するように処理された細胞集団中で発現されたインスリンmRNAレベルを決定し得る。例示的mRNAインスリン発現アッセイにおいて、細胞を回収して、RNA抽出キット(例えばRNeasy Miniキット、Qiagen)を使用して該細胞からRNAを抽出する。次いで、1工程qPCRキット(例えば、QuantiTech Probe PCRキット、Qiagen)、ならびにIns1またはIns2プライマーおよびプローブ(例えば、マウスIns1およびIns2用の市販のTaqManプローブ、Life Technologies)を使用して、定量的リアルタイムPCRによりインスリン発現レベルを評価する。相対的インスリンmRNA発現は、ベースラインまたは他のマーカー、例えばHprt mRNA発現レベルまたは他のベースラインマーカーに対して決定され得る。

【0048】

「NeuroD1活性化剤」は、NeuroD1を活性化する物質である。

【0049】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「非ヒト哺乳動物」は、ヒトではない任意の哺乳動物をいう。

【0050】

「Notch阻害剤」は、Notchシグナル伝達経路の阻害剤をいう。

【0051】

「Ngn3」は、内分泌前駆細胞中で発現され、腸内分泌分化に関連するタンパク質であるニューロゲニン-3をいう。

【0052】

本明細書で使用される場合、「Ngn3アッセイ」は、分化プロトコルに供される細胞などの細胞中のNgn3の発現の程度を決定するために使用されるアッセイである。例示的Ngn3アッセイにおいて、RNAを、分化プロトコルに従って培養された細胞から単離して、市販のプライマーおよびプローブ(例えばTaqmanプローブ)を使用して定量的リアルタイムPCRを行い、細胞中のNgn3発現の程度を決定する。

10

【0053】

本明細書の関連のある文脈で使用する場合、用語、細胞の「数」は、0、1またはそれ以上の細胞であり得る。

【0054】

「類器官」または「上皮類器官」は、器官または器官の一部に類似し、その特定の器官に関連する細胞型を有する細胞のクラスター(cluster)または凝集物をいう。

【0055】

細胞の「集団」は、1より多い任意の数の細胞をいい、さらには少なくとも $1 \times 10^3$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^4$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^5$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^6$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^7$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^8$ 細胞、少なくとも $1 \times 10^9$ 細胞、または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 細胞をいう。

20

【0056】

「出生後細胞」は、非胚性細胞をいう。出生後細胞としては、出生後幹細胞、出生後前駆細胞および出生後多能性子孫細胞、ならびにこれらの細胞から分化した1つ以上の細胞、例えば腸内分泌細胞(EEC)の少なくとも1つが挙げられ得る。

【0057】

「出生後幹細胞」は、自己複製する能力複数の細胞系統に分化する能力を有する非胚性幹細胞をいう。出生後幹細胞は、成体幹細胞または体細胞性幹細胞とも称され得る。出生後幹細胞としては、腸幹細胞、上皮幹細胞、造血幹細胞、乳房幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞および神経幹細胞が挙げられ得る。

30

【0058】

本明細書で使用する場合、「前駆細胞」は、特定の細胞の型に分化する傾向を有する、幹細胞と同様の細胞をいうが、すでに幹細胞よりも特異的であり、その「標的」細胞に分化するように強制される。

【0059】

「参照」は、標準または対照条件(例えば試験剤または試験剤の組合せで処理されない)を意味する。

【0060】

用語「試料」は、得られる、提供されるおよび/または分析に供される体積または質量をいう。いくつかの態様において、試料は、組織試料、細胞試料、液体試料等であるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、試料は被験体(例えばヒトまたは動物被験体)から得られる(またはそれらである)。いくつかの態様において、組織試料は、脳、毛髪(毛根を含む)、頬スワブ、血液、唾液、精液、筋肉、または任意の内部臓器由来のもの、またはこれらのいずれか1つと関連のある癌、前癌もしくは腫瘍の細胞であるかあるいはそれらを含む。限定されないが、液体は、尿、血液、腹水、胸膜液、脊髄液等であり得る。体組織としては限定されないが、脳、皮膚、筋肉、子宮内膜、子宮、および頸部の組織、またはこれらのいずれか1つに関連する癌、前癌もしくは腫瘍の細胞が挙げられ得る。

40

50

## 【0061】

「自己複製(Self-renewal)」は、幹細胞が分裂して、母細胞のものとは区別できない発生能力を有する1つ(非対称的分裂)または2つ(対照的分裂)の娘細胞を生成する過程をいう。自己複製は、増殖および未分化状態の維持の両方を含む。

## 【0062】

本明細書で言及する場合、「小分子」は、生物学的経路の調節に関与し得、かつ非核酸である有機化合物をいい、典型的には非ペプチド性で非オリゴマーであり、1500ダルトン未満の分子量を有し得る。

## 【0063】

「幹細胞」は、自己複製する能力および複数の細胞系統に分化する能力を有する多能性細胞をいう。

## 【0064】

本明細書で使用する場合、「幹細胞マーカー」は、幹細胞中で特異的に発現される遺伝子産物(例えばタンパク質、RNA等)として定義され得る。幹細胞マーカーの1つの型は、幹細胞同一性の維持を直接および特異的に支持する遺伝子産物である。例としてはLgr5およびSox2が挙げられる。さらなる幹細胞マーカーは、文献中に記載されたアッセイを用いて同定され得る。遺伝子が幹細胞同一性の維持に必要であるかどうかを決定するために、機能獲得型(gain-of-function)および機能欠損型(loss-of-function)の試験を使用し得る。機能獲得型試験において、特定の遺伝子産物(幹細胞マーカー)の過剰発現は幹細胞同一性の維持を補助する。一方で、機能欠損型試験において、幹細胞マーカーの除去により、幹細胞同一性の消失が引き起こされるか、または幹細胞の分化が誘導された。別の型の幹細胞マーカーは、幹細胞のみで発現されるが、幹細胞の同一性を維持するための特定の機能を必ずしも有さない遺伝子である。この種類のマーカーは、分類された幹細胞と非幹細胞の遺伝子発現のサインをマイクロアレイおよびqPCRなどのアッセイにより比較することにより同定され得る。この種類の幹細胞マーカーは、文献中に見られ得る(例えばLiu Q. et al., *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Mar;60:99-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582750>)。あり得る幹細胞マーカーとしてはCcdc121、Gdf10、Opcml、Phex等が挙げられる。所定の細胞または細胞集団中のLgr5またはSox2などの幹細胞マーカーの発現は、qPCR、免疫組織化学、ウエスタンブロットおよびRNAハイブリダイゼーションなどのアッセイを使用して測定され得る。幹細胞マーカーの発現はまた、所定の幹細胞マーカー、例えばLgr5-GFPまたはSox2-GFPの発現を示し得るレポーターを発現するトランスジェニック細胞を使用して測定され得る。次いでフローサイトメトリー分析を使用してレポーター発現の活性を測定し得る。蛍光顕微鏡検査を使用しても、レポーターの発現を直接視覚化することができる。幹細胞マーカーの発現はさらに、包括的な遺伝子発現プロファイル分析のためのマイクロアレイ分析を使用して決定され得る。所定の細胞集団または精製された細胞集団の遺伝子発現プロファイルを、幹細胞の遺伝子発現プロファイルと比較して、2つの細胞集団間の類似性を決定し得る。幹細胞機能は、コロニー形成アッセイまたはスフィア(sphere)形成アッセイ、自己複製アッセイおよび分化アッセイにより測定し得る。コロニー(またはスフィア)形成アッセイにおいて、適切な培養培地中で培養した場合、幹細胞は、細胞培養表面(例えば細胞培養皿)上でコロニーを形成し得るかもしくは細胞培養基質(例えばマトリゲル)中に埋め込まれ得るべきであるか、または懸濁液中で培養した場合はスフィアを形成し得るべきである。コロニー/スフィア形成アッセイにおいて、単一の幹細胞を適切な細胞培養培地中に低細胞密度で播種し、所定の期間(7~10日)増殖させる。次いで、形成されたコロニーを、計数し、起源細胞の幹細胞性の指標として幹細胞マーカー発現についてスコア化する。次いで、任意に、形成されるコロニーを採取して継代し、その自己複製および分化の能力を試験する。自己複製アッセイにおいて、適切な培養培地中で培養した場合、細胞は、少なくとも1回(例えば1、2、3、4、5、10、20等)の細胞分裂にわたり幹細胞マーカー(例えばLgr5)発現を維持するべきである。

## 【0065】

「被験体」としてはヒトおよび哺乳動物(例えばマウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌお

10

20

30

40

50

よびウマ)が挙げられる。多くの態様において、被験体は哺乳動物、特に霊長類、とりわけヒトである。いくつかの態様において、被験体は、例えば畜牛、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ等の家畜；例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ等の家禽；ならびにイヌおよびネコなどの飼いならされた動物、特にペットである。いくつかの態様において(例えば、特に研究の文脈で)、被験体哺乳動物は、例えばげっ歯類(例えばマウス、ラット、ハムスター)、ウサギ、霊長類または例えば同系交配のブタ等のブタである。

【0066】

「相乗作用(synergy)」または「相乗効果(synergistic effect)」は、別々に得られる効果のそれぞれの合計より高い、相加効果より高い効果である。

【0067】

本明細書で使用する場合、「Tgfベータ阻害剤」(Tgf- 阻害剤)は、Tgfベータ経路の活性を低減する物質である。Tgfベータ阻害剤の例はTgfベータ受容体阻害剤であり得、限定されないが、Alk4、Alk7およびAlk5/Tgfベータ-RIが挙げられ得る。

【0068】

「組織」は、一緒になって特定の機能を実行する同じ起源由来の同様の細胞の集合である。

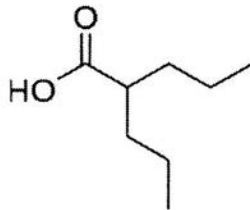
【0069】

本明細書において細胞集団に関して使用する場合、「処理すること」は、集団に物質を送達して結果に影響を及ぼすことを意味する。インビトロ集団の場合、該物質は、直接的に(または間接的にも)集団に送達され得る。インビボ集団の場合、該物質は、宿主被験体への投与により送達され得る。

【0070】

「バルプロ酸」(VPA)は、化学式 $C_8H_{16}O_2$ および以下の別名2-プロピルペンタン酸を有する。バルプロ酸のナトリウム塩はまたVPAの代わりに使用され得、用語「VPA」は、本明細書においてVPAまたはその薬学的に許容され得る塩、例えばナトリウム塩をいうために交換可能に使用される。その化学構造は以下のとおりである：

【化2】



【0071】

物質または組成物に関して本明細書で使用される場合、「Wnt活性化」は、Wntシグナル伝達経路の活性化である。

【0072】

本明細書で使用される場合、「Wnt活性化剤」は、Wntシグナル伝達経路を活性化する物質をいう。

【0073】

本明細書で使用する場合、「Wnt阻害剤」は、Wntシグナル伝達経路を阻害する物質をいい、例えばWnt受容体阻害剤、Wnt受容体アンタゴニスト、Wnt分泌を阻害するPorcupine阻害剤、もしくはタンキラーゼ阻害剤、またはカテニン相互作用に干渉する薬物であり得る。Wnt阻害剤の例としては、Wnt-C59、IWP-2、IWR-1-endo、AZ6102、FH535、WIK14、ICG-001、XAV-939、PRI-724、LGK-974、YA1797K、KY02111、Cardionogen 1およびIWP 12等が挙げられる。

【0074】

句「薬学的に許容され得る」は、本明細書において、正常な医学的判断の範囲内で、過

10

20

30

40

50

度の毒性、刺激、アレルギー応答または他の問題もしくは合併症を有することなく、妥当な利益/リスク比と釣り合ったヒトおよび動物の組織との接触における使用に適するこれらの化合物、物質、組成物および/または剤型をいうように使用される。

【0075】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容され得る担体、希釈剤または賦形剤」としては、限定されることなく、ヒトまたは家庭動物における使用に許容され得るような、米国食品医薬品局により承認された任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動化剤(glidant)、甘味剤、希釈剤、保存剤、色素/着色剤、矯味矯臭増加剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定化剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤が挙げられる。薬学的に許容され得る担体の例としては、限定されないが、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロースならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのその誘導體；トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバター、ワックス、動物性および植物性脂肪、パラフィン、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；ラッカセイ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝化剤；アルギン酸；発熱原非含有水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール、リン酸緩衝溶液；ならびに医薬製剤中に使用される任意の他の適合性の物質が挙げられる。

10

20

【0076】

「薬学的に許容され得る塩」としては、酸付加塩および塩基付加塩の両方が挙げられる。

【0077】

「薬学的に許容され得る酸付加塩」は、遊離塩基の生物学的有効性および特性を維持し、生物学的に望ましくないかまたは他の望ましくないものではなく、限定されないが、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸、ならびに限定されないが、例えば、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ショウノウ酸、ショウノウ-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、炭酸、桂皮酸、クエン酸、サイクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、蟻酸、フマル酸、ガラクター酸、ゲンチシン酸、グルコヘpton酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、2-オキソ-グルタル酸、グリセロリン酸、グリコール酸、馬尿酸、イソブチル酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、バルミチン酸、パモ酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸、ピルピン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、チオシアン酸、トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、ウンデシレン酸等の有機酸と形成されるこれらの塩をいう。

30

40

【0078】

「薬学的に許容され得る塩基付加塩」は、遊離酸の生物学的有効性および特性を維持し、生物学的に望ましくないかまたは他の望ましくないものではないこれらの塩をいう。これらの塩は、無機塩基または有機塩基の遊離酸への付加により調製される。無機塩基に由来する塩としては、限定されないが、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウムの塩等が挙げられる。例えば、無機塩としては、限定されないが、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウムの塩が挙げられる。有機塩基に由来する塩としては、限定されないが、第1級、第2級および第3級のアミン、天然に存在する置換アミンを含む置換ア

50

ミン、環状アミンおよび塩基性イオン交換樹脂、例えばアンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、デアノール(deaonl)、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン(hydrabamine)、コリン、ベタイン、ベネタミン(benethamine)、ベンザチン(benzathine)、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などの塩が挙げられる。特定の態様で使用される有機塩基の例としては、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリンならびにカフェインが挙げられる。

10

## 【0079】

湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、ならびに着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤および矯味矯臭剤および香料剤、保存剤および酸化防止剤も該組成物(例えば、医薬組成物)中に存在し得る。

## 【0080】

薬学的に許容され得る酸化防止剤の例としては、(1) 例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等の水溶性酸化防止剤；(2) 例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、トコフェロール等の油溶性酸化防止剤；および(3) 例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等の金属キレート剤が挙げられる。

20

## 【0081】

詳細な説明

本開示の例示態様の記載を以下に示す。

## 【0082】

本開示は、出生後細胞集団の腸内分泌細胞(EEC)への分化を引き起こす経路および機構を活性化および/または非活性化し得る複数の小分子で処理することにより、出生後幹細胞集団などの哺乳動物出生後細胞集団から腸内分泌細胞(EEC)を形成する方法に関する。小分子により影響を受ける経路および機構としては、限定されないが、Wntシグナル伝達経路、Notchシグナル伝達経路、EGFR経路、MEK/ERFシグナル伝達経路、成長因子により影響を受ける機構、ヒストンメチル化経路、Tgf-シグナル伝達経路およびNeuroD1経路が挙げられ得る。特に、本開示の局面は、出生後幹細胞などの出生後細胞のEECへの分化を促進し得る小分子の組合せ、および特定のEEC細胞型への分化のシグナルを出す小分子の組合せを提供する。

30

## 【0083】

本開示はまた、哺乳動物細胞の集団を、該細胞において増加したインスリン発現をもたらす経路および機構を活性化および/または非活性化し得る複数の小分子で処理することにより、該集団におけるインスリン発現を増加させるための方法に関する。小分子で処理される細胞は、出生後細胞(例えば出生後幹細胞または多能性子孫細胞)または上述の方法により出生後幹細胞などの出生後細胞から分化されたEECなどの腸内分泌細胞のいずれかであり得る。インスリン産生を増加するための小分子により影響を受ける経路および機構としては、限定されないが、上述のEEC分化について記載されたシグナル伝達経路、例えばWntおよびNotchシグナル伝達経路など、および特にDNAメチル化経路、Tgf-シグナル伝達経路およびNeuroD1経路を阻害および/または活性化するように作用する小分子を含むシグナル伝達経路のいずれかが挙げられ得る。特に、本開示の局面は、細胞においてインスリン発現を促進する小分子の組合せ、および処理された集団中の細胞をインスリン産生細胞になるように誘導する小分子の組合せを提供する。

40

## 【0084】

出生後幹細胞などの出生後細胞をEECに分化させることにおいて、細胞の分化により分

50

化マーカー-ChgAの発現を上方制御するような複数の小分子が提供される。ChgAの発現は、小分子により処理された細胞集団中でChgAを発現する細胞の画分が、ChgA免疫染色アッセイにおいて測定された場合に、少なくとも約1.5%となるように上方制御される。ChgA免疫染色アッセイにより測定した際のChgAを発現する細胞の画分は、さらに少なくとも約10%、さらに少なくとも約50%であり得、例えば細胞の画分は、約60%~約100%の範囲にある。一態様において、ChgAを発現する細胞の画分は、約1.5%~約100%の範囲にあり得る。さらに、mRNA ChgA発現アッセイで測定すると、分化した細胞集団中のChgA mRNA発現は、初期の出生後細胞集団中のChgA mRNA発現の少なくとも約10倍であり得る。ChgA mRNA発現は、初期の出生後細胞集団中のChgA mRNA発現の少なくとも100倍でさえあり得、初期の出生後細胞集団中のChgA mRNA発現の約1000倍~1,000,000倍の範囲でさえあり得る。一態様において、ChgA mRNA発現は、初期の出生後細胞集団中のChgAを発現する細胞の数の約10~約1,000,000倍の範囲であり得る。

10

20

30

40

50

#### 【0085】

小分子を使用したEECを形成するための細胞の分化は、腸内分泌細胞の高度に純粋な集団を提供し得、有意な数の出生後幹細胞などの出生後細胞は腸内分泌細胞に変換される。腸EECは、粘膜に、主に、そのより深い側半分(deeper half)に限定され、典型的に上皮細胞集団全体のわずかに少数、例えば1%未満のみを構成するために、出生後幹細胞を大量にEECに変換するこの能力は重要である。対照的に、本明細書に記載される小分子での処理は、EECについてのChgAマーカーを発現する細胞の割合が、全細胞集団の中少なくとも2%、および該細胞集団のさらに90%~100%ほど高く、例えば全細胞集団の約60%~約90%、およびさらに全細胞集団の約70%~約80%となるように、出生後細胞を腸内分泌細胞に変換する。本明細書に開示されるように、約80%のEECを有する最終細胞集団が達成される(例えば、図40参照)。一態様において、得られた細胞集団中ChgAを発現する細胞の割合は、初期の出生後細胞集団と比較して増加し、少なくとも0.1%~少なくとも1%のChgA発現細胞の画分の増加であり、さらに少なくとも約5%の増加、例えば少なくとも約10%の増加、およびさらに少なくとも約50%、例えば少なくとも約100%の増加である。

#### 【0086】

小分子により処理される出生後細胞としては、非胚性幹細胞である出生後幹細胞、例えば自己増殖する能力および複数の細胞系統に分化する能力を有する成体幹細胞が挙げられ、多能性子孫細胞および/または前駆細胞も挙げられ得る。出生後幹細胞としては、しばしば保存されたシグナル伝達および発生の経路を有する腸幹細胞、上皮幹細胞、造血幹細胞、乳房幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞および神経幹細胞が挙げられ得る。一態様において、出生後幹細胞は腸幹細胞であり、マーカー-Lgr5により同定され得る。Lgr5は、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質連結受容体5であり、Gタンパク質連結受容体49(GPR49)またはGタンパク質連結受容体67(GPR67)としても公知であり、ヒトにおいて、Lgr5遺伝子にコードされる。細胞を小分子で処理してインスリン発現を増加させる場合、処理される細胞は、これらの出生後幹細胞および/またはさらに特異化された細胞、例えば多能性子孫細胞および/または前駆細胞および/または腸内分泌細胞のいずれかであり得る。

#### 【0087】

細胞の集団の複数の小分子での処理は、細胞のインスリン発現の有意な増加を提供するためにも実施され得る。一態様において、インスリン発現は、インスリン活性アッセイで測定した場合に、処理された細胞において活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分が少なくとも約1%、およびさらに少なくとも約20%となるように小分子での処理により増加され得る。一態様において、活性化されたインスリンGFPレポーターを有する細胞の画分は、約20%~約100%の範囲である。異なる種類の測定によると、複数の小分子での処理は、mRNAインスリン発現アッセイにより決定した場合、初期細胞集団と比較してインスリン発現を、ベースラインレベルよりも実質的に大きいレベルまで増加することができ得る。例えば、Hprt mRNA(qPCRにおける発現レベルについての参照遺伝子として)との比較において、mRNAインスリン発現アッセイは、Hprt mRNAレベルを使用した標準と比較して(島細胞のインスリンレベルは典型的にHprtレベルの約100倍である)少なくとも

約1倍およびさらに少なくとも約2倍の範囲にあるmRNAインスリン発現レベルを提供し得るので、細胞はインスリン発現細胞に成功裡に変換されていることが示される。本明細書の図31に示されるように、qPCRにおいて幹細胞試料について任意の対照Ct値を設定した場合(インスリンmRNAが幹細胞試料において設定したCt値以上で検出可能でない場合)、幹細胞における発現と比較して、 $2 \times 10^7$ 倍のインスリン発現の増加が達成され得る。さらに、mRNAインスリン発現アッセイにより測定した場合のインスリンmRNA発現レベルは、島細胞におけるインスリンmRNAレベルと比較すると、少なくとも約0.01%、例えば少なくとも約0.1%、さらに少なくとも約1%、少なくとも約10%まで、さらに島と比較すると100%または200%のインスリンmRNA活性を提供すると考えられる。一態様によると、細胞集団を複数の小分子による処理に供することは生じる細胞集団を提供し得、ここで得られる細胞の少なくとも約1%がインスリン産生細胞であり、得られた細胞集団中のインスリン産生細胞の数が全細胞集団の約1%~約20%の範囲になりさえし得る。

10

**【0088】**

複数の小分子でのEECの集団の処理はまた、例えばL細胞、K細胞、I細胞、G細胞、EC細胞、N細胞およびS細胞を含むサブセット集団を生成するように実施され得る。

**【0089】**

小分子により処理される哺乳動物細胞の集団は、インビトロ集団、例えば細胞培養培地に分散される細胞の集団であり得る。細胞のインビトロ集団はまた、器官または器官の一部に類似する細胞クラスターまたは凝集物であり、かつその特定の器官に関連する細胞型を有する類器官の形態であり得る(Sato, 2009)。代替的に、小分子により処理される哺乳動物細胞の集団は、インビボ集団、例えば疾患状態を治療するためのヒトまたは他の哺乳動物のインビボ処理であり得る。別の代替において、小分子により処理される哺乳動物細胞の集団は、エキソビボ集団、例えばヒトまたは他の哺乳動物(例えば、治療の必要があるヒトまたは他の哺乳動物)から得られる(例えば、単離される、由来する)細胞の集団であり得る。出生後幹細胞などの出生後細胞からのEECの分化のための一態様について提唱される機構を図34に提供する。なんら特定の理論に制限されることなく、現在では、WntおよびNotch経路ならびに任意に他の経路を制御することにより、EECは、幹細胞から特異化され得ると考えられる。特に、示されるような機構において、Notch経路を阻害しながらWnt経路を活性化し、次いでNotchおよびWntの経路の両方を阻害してEECを形成することが提供される。他の機構および/または経路はまた、下記のように、EECに向かう経路(杯細胞、腸細胞、パーネト細胞等とはまた異なる)に沿った分化をさらに特異化するために活性化および/または阻害され得、他の機構および/または経路はまた、特定の型のEECおよび/またはEEC機能をさらに特異化するために使用され得る。例えば、図34はWnt阻害を示すが、いくつかの態様においては、Wnt阻害剤の添加を必要とせずEECへの分化を提供することが可能であり得る。また、図34は、EECを得るための2段階の方法を示すが、特定態様はまた、処理のただ1つの段階、またはさらにEECを達成するための処理の3以上の段階を提供し得る。特異化され得る特定の型のEECとしては、特に、GLP-1、5HT、SST、ガストリン、CCK、SCT、NTS、PYYおよびグレリンを発現する細胞が挙げられ得る。

20

30

**【0090】**

本明細書に記載のような哺乳動物細胞のインスリン産生を増加させる方法の態様において、哺乳動物細胞の処理は、出生後幹細胞からEECなどの、図34に示されるものと同様の経路に沿った分化を生じ得、ここで得られた細胞は、増加されたインスリン産生を提供する細胞であり、および/または該処理は、EEC自体に対して実施されこれらの細胞を増加したインスリン産生を有する細胞に変換し得る。すなわち、細胞のインスリン産生を増加させるための処理は、出生後幹細胞のEECへの分化と同時に、該分化の前または後に実施され得るか、または幹細胞とEECの間の分化段階において細胞に対して、出生後幹細胞またはEEC自体に対して同様に実施され得る。したがって、インスリン産生を増加させるための処理は、出生後幹細胞(例えば、Lgr5+細胞)、前駆細胞および分化した腸内分泌細胞の少なくとも1つを含む哺乳動物細胞集団に対して実施され得る。

40

**【0091】**

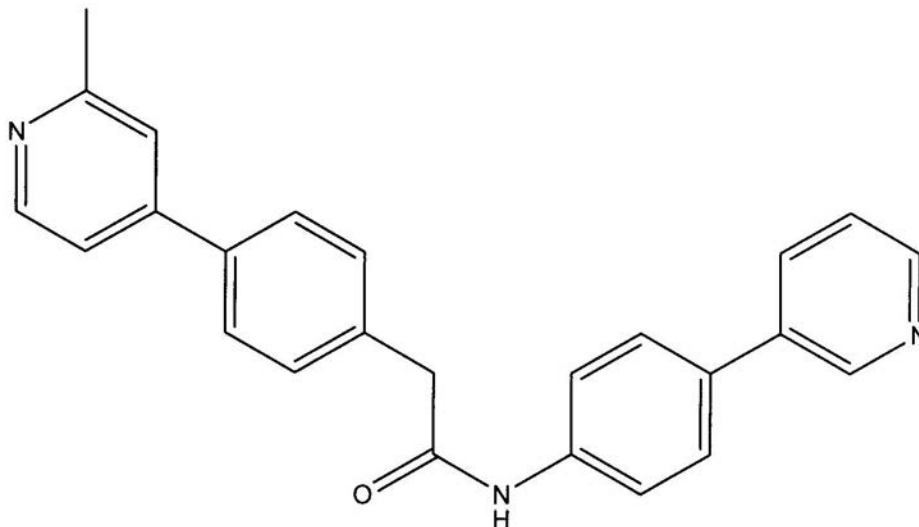
50

図34はまた、EEC、腸細胞、杯細胞、パーネット細胞および幹細胞などの異なる型の腸細胞ならびに腸の陰窩に見られるようなかかる細胞の一般的な構成を示す。この図は、上述のように、腸内分泌(EEC)細胞は典型的に、かかる陰窩に局在し、全細胞の少ない割合(<1%)でそこに存在するのみであることを示すので、細胞のEEC集団を得るためのインビトロ方法の非存在下では疾患治療のための機構を試験することが困難であった。

【0092】

上述のように、一態様において、出生後細胞集団(例えば出生後幹細胞集団)を処理してEECへの分化を達成するためおよび/または細胞集団を処理してそのインスリン発現を増加させるために提供される複数の小分子としては、Wnt経路を活性化および/または阻害するように作用する小分子が挙げられる。Wntシグナル伝達経路は、Wntタンパク質リガンドのFrizzledファミリー受容体への結合により活性化されるシグナルの伝達経路(signal transduction pathway)である。処理の一部として提供され得るWnt活性化剤としては、例えばCHIR99021、LY2090314、NP031112(チデグルシブ)、リチウム、A1070722、SKL2001およびWntシグナル伝達経路を活性化し得る他の薬剤の少なくとも1つなどのR-Spondin 1、Wnt3a、Gsk阻害剤の少なくとも1つが挙げられ得る。一態様において、複数の小分子の一部として提供されるWnt活性化剤は、R-Spondinファミリーに属するタンパク質であるR-Spondin 1であり得る。処理の一部として提供され得るWnt阻害剤としては、例えば、Wnt-C59、Dkkファミリータンパク質(例えばDkk-1、Dkk2、Dkk3およびDkk4の少なくとも1つ)、sFRP(例えばsFRP-1およびsFRP-2の少なくとも1つ)、OMP-18R5などのWnt受容体に対する抗体、LGK974、CWP232291、PRI-724、IQR-1、IWP2、IWP-L6、ICG-001、WIKI4、Ky02111、FH535、XAV939、NSC668036、FJ9、3289-8625などの他の小分子Wnt阻害剤、および他のものの少なくとも1つが挙げられ得る(Kahn, 2014)。一態様において、処理のための複数の小分子の一部として提供されるWnt阻害剤はWnt-C59であり得、以下の化学構造：

【化3】



を有する。Wnt活性化剤および/またはWnt阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

【0093】

Wnt活性化剤として適切であり得るWntアゴニストのさらなる例は以下の表に見られ得る。

【0094】

【表 1 - 1】

表-Wnt アゴニスト

欄 A	欄 B
Wnt リガンド	Wnt1/Int-1
	Wnt-2/Irp (Int-I-関連タンパク質)
	Wnt-2b/13
	Wnt-3/Int-4
	Wnt-3a
	Wnt-4
	Wnt-5a
	Wnt-5b
	Wnt-6
	Wnt-7a
	Wnt-7b
	Wnt-8a/8d
	Wnt-8b
	Wnt-9a/14
	Wnt-9b/14b/15
	Wnt-10a
	Wnt-10b/12
	Wnt-11
	Wnt-16
Wnt 関連タンパク質	R-Spondin 1/2/3/4
	Norrin
GSK3b 阻害剤	
その他の Wnt 調節因子	
	(ヘテロ)アリアルピリミジン
	Wnt アゴニスト
	IQ 1
	DCA
	QS 11
	WASP-1, ZINC00087877
	WAY 316606, HCl
	WAY-262611, HCl
	HLY78
	SKL2001
	Cpd1
	Cpd2
	cmpd 109
	ISX 9
	Cmpd 71
	Cmpd 2
	セルメチニブ(Selumetinib) (AZD6244)

10

20

30

40

【表 1 - 2】

欄 A	欄 B
Wnt リガンド	Wnt1/Int-1
	ラジシコール (Radicicol)
	(ヘテロ)アリアルピリミジン
	Wnt アゴニスト
	WAY 316606, HCl
	WAY-262611, HCl
	SKL2001
	ISX 9

10

## 【 0 0 9 5 】

一態様において、出生後細胞集団を処理してEECへの分化を達成するため、および/または細胞集団を処理してそのインスリン発現を増加させるために提供される複数の小分子としては、Notch経路を阻害するように作用する小分子が挙げられる。処理の一部として提供され得るNotch阻害剤としては、例えば、DAPT；LY411575；MDL-28170；RO4929097；L-685458 ((5S)-(t-ブトキシカルボニルアミノ)-6-フェニル-(4R)ヒドロキシ-(2R)ベンジルヘキサノイル)-L-leu-L-phe-アミド)；BMS-708163(アバガセスタット(Avagacestat))；BMS-299897 (2-[(1R)-1-[(4-クロロフェニル)スルホニル](2,5-ジフルオロフェニル)アミノ]エチル-5-フルオロベンゼンブタン酸)；M-0752；YO-01027；MDL28170 (Sigma)；LY411575 (N-2((2S)-2-(3,5-ジフルオロフェニル)-2-ヒドロキシエタノイル)-N1-((7S)-5-メチル-6-オキソ-6,7-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,d]アゼピン-7-イル)-1-アラニンアミド)；ELN-46719 (LY411575の2-ヒドロキシ-吉草酸アミドアナログ)；PF-03084014 ((S)-2-((S)-5,7-ジフルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-3-イルアミノ)-N-(1-(2-メチル-1-(ネオペンチルアミノ)プロパン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)；コンパウンドE (Compound E) ((2S)-2-[(3,5-ジフルオロ(Difluoro)フェニル)アセチル]アミノ)-N-[(3S)-1-メチル-2-オキソ-5-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-3-イル]プロパンアミド)；およびセマガセスタット(Semagacestat)(LY450139)；(2S)-2-ヒドロキシ-3-メチル-N-((1S)-1-メチル-2-[(1S)-3-メチル-2-オキソ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン-1-イル]アミノ]-2-オキソエチル)ブタンアミド)の少なくとも1つが挙げられ得る。一態様において、複数の小分子の一部として提供され得るNotch阻害剤は、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t-ブチルエステルとしても知られるDAPTであり得る。Notch阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

20

30

## 【 0 0 9 6 】

処理のために提供される複数の小分子としてはまた、MEK/ERK経路を阻害するように作用する小分子が挙げられ得る。該小分子としては、コアRas-Raf-MEK-ERKシグナル伝達カスケードの阻害剤、ならびにこのコアのシグナル伝達カスケードの上流または下流のタンパク質の阻害剤、例えばEGF受容体(EGFR)阻害剤が挙げられ得る。処理のために提供されるMEK/ERK阻害剤としては、例えば、PD0325901、AZD8330 (ARRY-424704)、レファメチニブ(Refametinib)(BAY 86-9766、RDEA119)、コビメチニブ(GDC-0973、XL-518、RG7421)、E6201、MEK162 (ARRY-438162)、ピマセルチブ(Pimasertib)(AS703026、MSC1936369B)、RO4987655 (CH4987655)、RO5126766 (CH5126766)、セルメチニブ(AZD6244、ARRY-142,886)、TAK-733、トラメチニブ(GSK1120212)、およびGDC-0623、WX-554の少なくとも1つが挙げられ得(Zhao and Adjei, 2014)、また、および/または代替的には、エルロチニブ、ゲフィ

40

50

チニブ、ラパチニブ、アファチニブ、ネラチニブ、AZ5104、アファチニブ、PD 153035、CL-387785、AST-1306、PD 168393、カネルチニブなどのEGFR阻害剤、および他のEGFR阻害剤、ならびにRasおよびRaf阻害剤が挙げられ得る。一態様において、複数の小分子の一部として提供されるMEK/ERK阻害剤は、N-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシル]-3,4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-ベンズアミドとしても知られるPD0325901であり得る。MEK/ERK阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

【0097】

処理のために提供される複数の小分子としてはまた、上皮成長因子(EGF)およびNogginの少なくとも1つなどの種々の成長因子に対応する小分子が挙げられ得る。一態様において、処理のための小分子の一部として提供される成長因子としてはEGFおよび/またはNogginが挙げられる。該成長因子の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。別の態様において、複数の小分子としては、HDAC阻害剤(ヒストンデアセチラーゼ阻害剤)が挙げられ得る。処理のための複数の小分子の一部として提供され得るHDAC阻害剤としては、特に、ツバスタチンA(Tubastatin A)、ACY1215、バルプロ酸、SAHA、トリコスタチンA、SHBA、CBHA、LAQ-824、PDX-101、LBH-589、ITF2357、PCI-24781、コンパウンド7 (ChemieTek)、JNK-24681585(キシノスタット) SB939(ブラシノスタット)、4SC-201(レスミノスタット)、テフィノスタット(Tefinostat)(CHR-2845)、CHR-3996、CG200745、デブシペプチド(ロミデプシン)、酪酸塩、MS-275、MGCD0103およびC1994が挙げられ得る。一態様において、処理のために提供されるHDAC阻害剤は、N-ヒドロキシ-4-(2-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-ピリド[4,3-b]インドール-5-イルメチル)ベンズアミド塩酸塩とも称されるツバスタチンAであり得る。HDAC阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

【0098】

HDAC阻害剤のさらなる例は以下の表に見られ得る。

【0099】

10

20

【表 2 - 1】

表-HDAC 阻害剤

欄 A	欄 B
分類	薬剤
ヒドロキサム酸塩	トリコスタチン A (TSA)
ヒドロキサム酸塩	SAHA (ゾリンザ, ボリノスタット)
ヒドロキサム酸塩	4-ヨード-SAHA
ヒドロキサム酸塩	SBHA
ヒドロキサム酸塩	CBHA
ヒドロキサム酸塩	LAQ-824
ヒドロキサム酸塩	PDX-101 (ベリノスタット (belinostat))
ヒドロキサム酸塩	LBH-589 (パノビノスタット (panobinostat))
ヒドロキサム酸塩	ITF2357 (ジビノスタット (Givinostat))
ヒドロキサム酸塩	PCI-34051
ヒドロキサム酸塩	PCI-24781 (アベキシノスタット (Abexinostat))
ヒドロキサム酸塩	ツバスタチン A
ヒドロキサム酸塩	CUDC-101
ヒドロキサム酸塩	コンパウンド7
ヒドロキサム酸塩	オキサムフラチン (Oxamflatin)
ヒドロキサム酸塩	ITF2357
ヒドロキサム酸塩	ブフェキサマク
ヒドロキサム酸塩	APHA コンパウンド8
ヒドロキサム酸塩	JNJ-26481585 (キシノスタット (Quisinostat))
ヒドロキサム酸塩	スペロイルアニリド-d5 ヒドロキサム酸
ヒドロキサム酸塩	HDAC 阻害剤 XXIV
ヒドロキサム酸塩	ツバシン (Tubacin)
ヒドロキサム酸塩	ブチリルヒドロキサム酸
ヒドロキサム酸塩	1-ナフトヒドロキサム酸
ヒドロキサム酸塩	MC 1568
ヒドロキサム酸塩	SB939 (プラシノスタット (Pracinostat))
ヒドロキサム酸塩	4SC-201 (レスミノスタット (Resminostat))
ヒドロキサム酸塩	テフィノスタット (Tefinostat) (CHR-2845)
ヒドロキサム酸塩	CHR-3996
ヒドロキサム酸塩	CG200745
環状ペプチド	デプシペプチド (ロミデプシン, FK-228, FR 901228)
環状ペプチド	トラポキシニン A
環状ペプチド	HC 毒素
脂肪酸	バルプロ酸
脂肪酸	VAHA
脂肪酸	酪酸フェニル
脂肪酸	酪酸塩
脂肪酸	AN-9
ベンズアミド	MS-275 (エンチノスタット)
ベンズアミド	MGCD0103 (モセチノスタット)

10

20

30

40

【表 2 - 2】

欄 A	欄 B
分類	薬剤
ベンズアミド	CI994 (タセジナリン; PD-123654; GOE-5549; アセチルジナリン(Acetyldinaline))
ベンズアミド	BML-210
ヒドロキサム酸塩	M 344
ベンズアミド	シダミド(Chidamide)
ヒドロキサム酸塩	4-(ジメチルアミノ)-N-[6-(ヒドロキシアミノ)-6-オキソヘキシル]-ベンズアミド
種々のもの(Miscellaneous)	ルテオリン
チオールのプロドラッグ	PTACH
種々のもの	L-カルニチン
種々のもの	塩化ビフェニル-4-スルホニル
種々のもの	SIRT1/2 阻害剤 VII
ヒドロキサム酸塩	(S)-HDAC-42
ヒドロキサム酸塩	インドール-3-アセトアミド
種々のもの	NSC 3852
種々のもの	PPM-18
種々のもの	ラトジャドン(Ratjadone)A, 合成
ベンズアミド	N-(2-アミノフェニル)-N'-フェニルヘプタンジアミン
種々のもの	ジヒドロクラミドシン(Dihydrochlamydocin)
種々のもの	7-アミノインドール
種々のもの	アピシジン(Apicidin)
種々のもの	パルテノリド
ヒドロキサム酸塩	HNHA
種々のもの	スプリトマイシン(Splitomicin)
ベンズアミド	RGFP109
ベンズアミド	RGFP136
ベンズアミド	RGFP966
ベンズアミド	4SC-202
ヒドロキサム酸塩	ACY1215
種々のもの	ME-344
種々のもの	スルフォラファン
CF3 メチルケトン	6H
CF3 メチルケトン	27
アリアルケトン	25
非古典的	5
	ネクスツラスタット(Nexturastat)A
	ドロキシノスタット(Droxinostat)
	AR-42
	ロミデブシン (FK228, デブシペプチド)
	スクリプタイド(Scriptaid)
	フェニル酪酸ナトリウム
	TMP269

10

20

30

40

【表 2 - 3】

欄 A	欄 B
分類	薬剤
	タイランデプシン(Thailandepsin)A
	BRD9757
	LMK235
	HPOB
	CAY10603
	タスキニモド(Tasquinimod)
	HDAC6 阻害剤 III
	HDAC 阻害剤 XXIV
	HDAC 阻害剤 IV
	HDAC 阻害剤 XIX
	HDAC 阻害剤 XXII
	HDAC 阻害剤 VII
	HDAC 阻害剤 II
	HDAC 阻害剤 VI
	(-)-デプデシン(Depudecin)
	KD 5170
	TC-H 106
	TCS HDAC6 20b
	ピロキサミド(Pyroxamide)
	シダミド
	HDAC-IN-1
	HC 毒素
ヒドロキサム酸塩	<b>SAHA (ゾリンザ, ボリノスタット)</b>
ヒドロキサム酸塩	LBH-589 (パノビノスタット)
ヒドロキサム酸塩	JNJ-26481585 (キシノスタット)
環状ペプチド	デプシペプチド (ロミデプシン, <b>FK-228, FR 901228</b> )
ベンズアミド	MGCD0103 (モセチノスタット)
チオールのプロドラッグ	PTACH
種々のもの	ラトジャドン A, 合成
種々のもの	アピシジン
CF3 メチルケトン	27
非古典的	5
	ネクストラスタット A
	ドロキシノスタット
	スクリプタイド
	BRD9757
	HPOB
	CAY10603
	HDAC6 阻害剤 III
ヒドロキサム酸塩	ACY1215

10

20

30

40

【表 2 - 4】

欄 A	欄 B
分類	薬剤
ヒドロキサム酸塩	ツバスタチン A
ヒドロキサム酸塩	ツバシン
ヒドロキサム酸塩	トリコスタチン A (TSA)

## 【 0 1 0 0 】

処理のための複数の小分子の一部として提供され得るヒストンメチル化阻害剤(例えば、ヒストンデメチラーゼ(HDM)阻害剤)としては、特に、トラニルシプロミン(Tranylcypromine)、GSK-2879552、GSK-LSD1、SP-2509、GSK J4、2,4-ピリジンジカルボン酸、ML324、IOX 1、OG-L002、CBB1007、GSK J1、GSK J2、およびGSK J5の少なくとも1つが挙げられ得る。一態様において、処理のために提供されるヒストンメチル化阻害剤はトラニルシプロミンであり得る。ある態様において、処理のために提供されるヒストンメチル化阻害剤は、リジン特異的ヒストンデメチラーゼ(LSD1)であり得る。ヒストンメチル化阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。ヒストンメチル化阻害剤の例としては：JmjC-ドメインデメチラーゼ：Jmjd2、Jmjd2C、Jmjd3；リジン特異的デメチラーゼ：トラニルシプロミン(LSD1)、RN 1 (LSD 1)、GSK2879552 (LSD1)、CBB1003 (LSD1)、OG-L002 (LSD1)、CBB1007 (LSD1)、2,4-ピリジンジカルボン酸(LSD)、SP2509 (LSD1)、ORY-1001 (RG-6016)、GSK LSD1 (LSD1)などのLSD1阻害剤；Jmjd：ダミノジッド(Jmjd)、GSK J1 (Jmjd3/UTX)、GSK J4 (Jmjd3)、IOX 1 (Jmjd)、JIB 04 (Jmjd)、NSC 636819 (KDM4 A/KDM4B)、TC-E 5002 (KDM2/7)、パルギリン、ML324 (Jmjd2)が挙げられる。

10

20

## 【 0 1 0 1 】

処理のための複数の小分子の一部として提供され得るTgf- 阻害剤としては、616452 (レブソックス)、LY-364947、SB-505124、A-83-01、SB-431542、TGF- RIキナーゼ阻害剤V II、SB-525334、TGF- RIキナーゼ阻害剤IX、GW788388、LY2109761、ガルニセルチブ(LY2157299)、EW-7197、ピルフェニドン、K02288、D 4476、R 268712、A77-01、およびSM16、ならびにTgf- 受容体に対する抗体の少なくとも1つが挙げられ得る。一態様において、処理のために提供されるTgf- 阻害剤は、レブソックスとも称され、化学式2-[3-(6-メチル-2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-1,5ナフチリジンを含む616452であり得る。ヒストンメチル化阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

30

## 【 0 1 0 2 】

Tgf- 阻害剤のさらなる例は以下の表に見られ得る。

## 【 0 1 0 3 】

【表 3 - 1】

## TGF-β 阻害剤

分類	薬剤	別名
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	LY-364947	616451, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 I, CAS 396129-53-6, [3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノニル(quinonyl))]-1H-ピラゾール, ALK5 阻害剤 I, LY-364947, HTS-466284
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	レプソックス (Repsox)	616452, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 II, CAS 446859-33-2, 2-(3-(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
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-505124	616453, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 III, CAS 356559-13-22-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-4-イル-2-tert-ブチル-1H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン, HCl, ALK5 阻害剤 III, SB-505124, HCl
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	A-83-01	616454, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IV - CAS 909910-43-6, 3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾール, A-83-01, ALK5 阻害剤 IV
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SD-208	616456, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 V, CAS 627536-09-8, 2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)プテリジン-4-イル)ピリジン-4-イルアミン, SD-208, ALK5 阻害剤 V
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-431542	616461, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VI, SB431542 - CAS 301836-41-9, 4-[4-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド, 二水和物, 4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド, 二水和物
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VII	616458, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VII - CAS 666729-57-3, 1-(2-((6,7-ジメトキシ-4-キノリル)オキシ)-(4,5-ジメチルフェニル)-1-エタノン, ALK5 阻害剤 VII
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-525334	616459, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VIII - CAS 356559-20-1, SB-525334, 6-(2-tert-ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル)-キノキサリン, ALK5 阻害剤 VIII
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IX	616463, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IX, 4-((4-((2,6-ジメチルピリジン-3-イル)オキシ)ピリジン-2-イル)アミノ)ベンゼンスルホンアミド, ALK5 阻害剤 IX
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	GW788388	4-(4-(3-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)ピリジン-2-イル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)ベンズアミド
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	LY2109761	7-(2-モルホリノエトキシ)-4-(2-(ピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	ガルニセルチブ	4-(2-(6-メチルピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-

10

20

30

【表 3 - 2】

分類	薬剤	別名
	(Galunisertib) (LY2157299)	4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン-6-カルボキサミド
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	EW-7197	N-(2-フルオロフェニル)-5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル-1H-イミダゾール-2-メタンアミン
Tgfb 産生阻害剤	ピルフェニドン	2(1H)-ピリジノン, 5-メチル-1-フェニル-
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	K02288	3-[(6-アミノ-5-(3,4,5-トリメトキシフェニル)-3-ピリジニル]フェノール
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	D 4476	4-[4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシン-6-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
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	R 268712	4-[2-フルオロ-5-[3-(6-メチル-2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]フェニル]-1H-ピラゾール-1-エタノール
その他	ITD 1	4-[1,1'-ビフェニル]-4-イル-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-2,7,7-トリメチル-5-オキソ-3-キノリンカルボン酸エチルエステル
Smad3 阻害剤	SIS3	1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジメトキシ-2-[(2E)-3-(1-フェニル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)-1-オキソ-2-プロペニル]-イソキノリン塩酸塩
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	A77-01	4-[5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル]キノリン
その他	アシアチコシド (Asiaticoside)	
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SM16	4-[5-(ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)-4-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル]ピシクロ [2.2.2]オクタン-1-カルボキサミド
Tgf-ベータ抗体	ID11	
Tgf-ベータ抗体	2G7	
Tgf-ベータ抗体	GC-1008	フレソリムマブ(Fresolimumab)
Tgf-ベータ抗体	CAT-152	レルデリミマブ(Lerdelimimab)
Tgf-ベータ抗体	CAT-192	メテリムマブ(Metelimumab)
TGF-ベータ受容体抗体	PF-03446962	
Tgf-ベータ抗体	SR-2F	
Tgf-ベータ抗体	2G7	
Tgf-ベータ抗体	LY2382770	
Tgf-ベータ抗体	IMC-TR1	
Tgf-ベータ抗体	STX-100	
TGF-ベータアンタゴニスト	TGF-PRII:Fc	
組み換えタンパク質	ベータグリカン /TGF-PRIII	
オリゴヌクレオチド阻害剤	AP12009	トラベデルセン(Trabedersen), アンチセンス分子
オリゴヌクレオチド阻害剤	AP11014	

10

20

30

【表 3 - 3】

分類	薬剤	別名
オリゴヌクレオチド 阻害剤	AP15012	
	LY-550410	
	LY-580276	
	LY-364947	
	LY-2109761	
	LY-2157299	ガルニセルチブ
	LY-573636	TGF b 阻害剤であるか/はい
	SB- 505124	
	SB-431542	
	SB-525234	
	SD-208	
	SD-093	
	Ki-26894	
	NPC-30345	
	SX-007	
	IN-1130	
	ピロール-イミダゾ ールポリアミド	EW-7203
EW-7195		構造
EW-7197		
GW6604		
米国特許第 7,087,626 号		薬剤としてのピロール誘導体
米国特許第 6,476,031 号		医薬としてのキナゾリン誘導体
米国特許第 7,723,486 号,およ び EP 0945464		TGF-β に対する抗体
ペプチド	Trx-xFoxH1b	Smad-相互作用ペプチドアダプター
ペプチド	Trx-Lef1	
ペプチド	ジスターチド (Distertide) (pl44)	
ペプチド	pl7	
ペプチド	LSKL	
ジヒドロピルリ(pyrrli) ピラゾール系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照	
	イミダゾール系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照
	ピラゾロピリジン系 骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照

10

20

30

【表 3 - 4】

分類	薬剤	別名
ピラゾール系骨格		米国特許 US 8298825 B1 参照
イミダゾピリジン系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照	
トリアゾール系骨格		米国特許 US 8298825 B1 参照
ピリドピリミジン系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照	
ピロロピラゾール系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照	
イソチアゾール系骨格	米国特許 US 8298825 B1 参照	
オキサゾール系骨格		米国特許 US 8298825 B1 参照
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	レプソックス	616452, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 II, CAS 446859-33-2, 2-(3-(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
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	ガルニセルチブ (LY2157299)	4-(2-(6-メチルピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン-6-カルボキサミド
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	EW-7197	N-(2-フルオロフェニル)-5-(6-メチル-2-ピリジニル)-4-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル-1H-イミダゾール-2-メタンアミン
Tgfb 産生阻害剤	ビルフェニドン LY-2157299	2(1H)-ピリジノン, 5-メチル-1-フェニル- ガルニセルチブ
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-505124	616453, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 III, CAS 356559-13-22-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-4-イル-2-tert-ブチル-1H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン, HCl, ALK5 阻害剤 III, SB-505124, HCl
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-525334	616459, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VIII - CAS 356559-20-1, SB-525334, 6-(2-tert-ブチル-5-(6-メチル-ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル)-キノキサリン, ALK5 阻害剤 VIII
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IX	616463, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IX, 4-((4-((2,6-ジメチルピリジン-3-イル)オキシ)ピリジン-2-イル)アミノ)ベンゼンスルホンアミド, ALK5 阻害剤 IX
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	R 268712	4-[2-フルオロ-5-[3-(6-メチル-2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]フェニル]-1H-ピラゾール-1-エタノール
	SB- 505124	ピリジン, 2-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-2-(1,1-ジメチルエチル)-1H-イミダゾール-5-イル]-6-メチル-, 塩酸塩 (1:1)
	SD-208	
	IN-1130	
	EW-7197	
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	A-83-01	616454, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 IV - CAS

10

20

30

【表 3 - 5】

分類	薬剤	別名
		909910-43-6, 3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾール, A-83-01, ALK5 阻害剤 IV
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	SB-431542	616461, TGF-β RI キナーゼ阻害剤 VI, SB431542 - CAS 301836-41-9, 4-[4-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド, 二水和物, 4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド, 二水和物
Tgf-ベータ-R1 阻害剤	R 268712	4-[2-フルオロ-5-[3-(6-メチル-2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]フェニル]-1H-ピラゾール-1-エタノール

40

50

## 【0104】

処理のための複数の小分子の一部として提供され得るNeuroD1活性化剤としては、ISX-9および他のイソキサゾール分子が挙げられ得る(Schneider, 2008)。一態様において、処理のために提供されるNeuroD1活性化剤は、化学式N-シクロプロピル-5-(2-チエニル)-3-イソキサゾールカルボキサミドを有するISX-9であり得る。Neuro D1活性化剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。

## 【0105】

処理のために提供される複数の小分子としては、1つ以上のモノアミンオキシダーゼ(MAO)阻害剤も挙げられ得る。MAO阻害剤の例としては、特に、メシル酸サフィナミド、メシル酸ラサギリン、トランシルプロミン、モクロベミド(Ro 111163)、イサチン、8-(3-クロロスチリル)カフェイン、塩酸ピフェメラン、(R)-(-)-デプレニル塩酸塩、ハルマン、塩酸ラザベミド、メシル酸ピルリンドール、RN 1二塩酸塩、およびメシル酸テトリンドールが挙げられる。

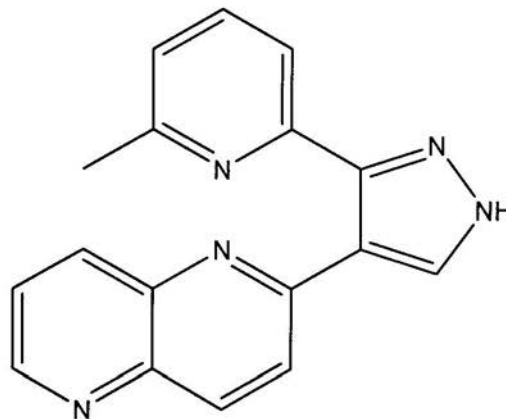
## 【0106】

処理のために提供される複数の小分子はまた、1つ以上のBMP受容体(ALK2を含む)阻害剤が挙げられ得る。BMP受容体(ALK2を含む)阻害剤の例としては、DMH-1、DMH2、ドルソモルフィン(Dorspmorphin)、K 02288、LDN 193189およびML 347が挙げられる。

## 【0107】

インスリン発現を増加させるための細胞の処理において、細胞のインスリン発現を増加させることに有効であることが示されている複数の小分子は、DNAメチル化阻害剤、Tgf-阻害剤およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つを含む複数の小分子である。一態様において、全ての3つの小分子は、細胞集団におけるインスリン産生を増加させるための処理の一部として一緒に提供される。Tgf-阻害剤およびNeuroD1活性化剤は、上述のもの、および/またはそれらの誘導体および/または薬学的に許容され得るその塩のいずれかであり得、特に616452およびISX-9に対応し得る。616452(レブソックス)の構造は以下のとおりである：

## 【化4】



## 【0108】

DNAメチル化阻害剤は、特に、5-アザシチジン、5-アザ-2-デオキシシチジン、RG 108、SGI 1027、ナナオマイシンA、ゼブラリン、ロメグアトリブ、SGI-110、およびナナオマイシンの少なくとも1つを含み得る。DNAメチル化阻害剤の例は、それぞれが参照により本明細書に具体的に援用される米国特許第8,207,142号、カナダ国特許第2,454,147号およびWO 2012/087889に記載される。一態様において、DNAメチル化阻害剤は5-アザシチジンを含む。DNAメチル化阻害剤の誘導体および/または薬学的に許容され得る塩も提供され得る。DNAメチル化阻害剤(例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)阻害剤)のさらなる例としては：DNAアナログ5-アザシチジン、ゼブラリン、デシタピン；DNMT阻害剤：カフェー酸プラム(Caffeic acid purum)、クロロゲン酸、(-)-没食子酸エピガロカテキン(EGCG)、

ヒドララジン、プロカインアミド、プロカイン、プサムマプリン(Psammaplin)A、RG108、フィセチン、ロメグアトリブ、SGI 1027、5-ヨードツベルシジン、6-チオグアニン、MG98、DC-05、およびDC-517が挙げられる。

【 0 1 0 9 】

以下の表1は、分子、本明細書記載に他に使用されるそれらの略語、および本明細書に記載されるインビトロ実験に使用される場合のそれぞれの試薬の終濃度の例のリストを表す。

【 0 1 1 0 】

【表 4】

表 1. 試験に使用される成長因子および小分子の概要

試薬名	略語	終濃度	
EGF	E	50ng/ml	
Noggin	N	100ng/ml	
R-Spondin1	R	500ng/ml	20
CHIR99021	Chir, C	5 $\mu$ M	
バルプロ酸ナトリウム塩	VPA, V	1.25mM	
DAPT	D	5 $\mu$ M	
ツバスタチン A	Tu	10 $\mu$ M	
トラニルシプロミン	Tranyl, Ty	2 $\mu$ M	30
ISX-9	ISX, I	10 $\mu$ M	
Wnt-C59	C59, C	5 $\mu$ M	
PD0325901	Pd	1 $\mu$ M	
616452/レプソックス	6	5 $\mu$ M	
5-アザシチジン	5-Aza, 5	1 $\mu$ M	40

【 0 1 1 1 】

一態様によると、複数の小分子を使用して実施される処理は、いくつかの段階、例えば第1および第2の段階、またはさらにそれより多くの段階で実施され得る。処理に使用される段階の数は、実施される分化および/またはインスリン発現を増加する方法に従って、ならびに使用されている小分子の種類および活性化および/または阻害される経路に関して選択され得る。例えば、出生後幹細胞などの出生後細胞をEECに分化させるための処理の方法において、第1の段階は、出生後細胞集団と、Ngn3を上方制御する1つ以上の第1の小分子を接触させるために実施され得、第2の段階において、出生後細胞集団を、Ngn3を下方制御して細胞中のNgn3発現を減少させる1つ以上の第2の小分子と接触させ得る。本態様による第1および第2の段階は、出生後幹細胞などの出生後細胞のEECの形成に向かう分

10

20

30

40

50

化を促進させ得る。インスリンを増加させる方法の態様において、第1～第3の段階は、細胞を処理してインスリンを上方制御し、かつ発現を増加させるために実施され得る。

【0112】

一局面によると、出生後幹細胞などの出生後細胞をEECに分化させるための処理は、第1の段階および第2の段階を含み得、第1の段階は、該細胞と、Notch阻害剤およびWnt活性化剤を含む第1の小分子を接触させることを含み、第2の段階は、該細胞と、Notch阻害剤ならびにEGFR阻害剤およびMEK/ERK阻害剤の少なくとも1つを含む第2の小分子を接触させることを含み。例えば、第1の段階は、R-Spondin1およびDAPTを提供し得、第2の段階はDAPTおよびPD0325901を提供し得る。第2の段階はまた、任意に、Wnt-C59などのWnt阻害剤を含み得る。第1および第2の段階はまた、EGFおよび/またはNogginなどの1つ以上の成長因子を含み得る。

10

【0113】

さらに別の局面によると、第1の段階はさらに、該細胞と、ツバスタチンA、トラニルシプロミンおよびISX-9の少なくとも1つなどのHDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つを接触させることを含み。第2の段階はさらに、該細胞と、616452などのTgf- 阻害剤を接触させることおよび/または該細胞と、トラニルシプロミンなどのヒストンメチル化阻害剤を接触させることを含み得る。

【0114】

一態様において、細胞集団中のインスリン発現を増加させるための処理は第1、第2および第3の段階を含み得、第1の段階は、該細胞と、Notch阻害剤、Wnt活性化剤およびDNAメチル化阻害剤を含む第1の小分子を接触させることを含み、第2の段階は、該細胞と、Notch阻害剤、任意にWnt阻害剤、Tgf- 阻害剤およびNeuroD1活性化剤を含む第2の小分子を接触させることを含み、第3の段階は、該細胞と、Notch阻害剤、任意にWnt阻害剤、MEK/ERK阻害剤およびTgf- 阻害剤を含む第3の小分子を接触させることを含み。例えば、第1の段階は、R-Spondin1、DAPT、ならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2-デオキシシチジンの少なくとも1つを提供し得るが、第2の段階は、DAPT、Wnt-C59、616452およびISX-9を提供し得、第3の段階は、DAPT、Wnt-C59、6116452、およびPD0325901を提供し得る。第1、第2および/または第3の段階はまた、EGFおよび/またはNogginなどの1つ以上の成長因子を含み得る。

20

【0115】

さらに別の局面によると、第1の段階は、該細胞と、ツバスタチンA、トラニルシプロミンおよびISX-9の少なくとも1つなどのHDAC阻害剤、ヒストンメチル化阻害剤、およびNeuroD1活性化剤の少なくとも1つを接触させることをさらに含む。第2の段階は、該細胞と、トラニルシプロミンなどのヒストンメチル化阻害剤を接触させることをさらに含み得る。

30

【0116】

本明細書に記載されるように、小分子は、出生後幹細胞などの出生後細胞のEECへの分化および/またはインスリンの増加した発現を提供するために、異なる組み合わせ、および処理の異なる段階で提供され得る。処理のための小分子の組合せのいくつかの態様は以下に記載される。

【0117】

一局面によると、分化の方法は、出生後幹細胞などの哺乳動物出生後細胞を、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、MEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)を含む複数の小分子により処理することを含み得る。該処理は、単一の相で実行され得る。

40

【0118】

別の局面によると、分化の方法は、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt活性化剤(例えば、R-Spondin1)、および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)を含む小分子の第1の組を用いる第1の段階、ならびにNotch阻害剤(例えば、DAPT)、MEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)、および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)を用いる第2の段階を含み得る。

50

## 【0119】

別の局面によると、分化の方法は、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt活性化剤(例えば、R-Spondin1)、および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)、HDAC阻害剤(例えば、ツバスタチンA)およびヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)を含む小分子の第1の組を用いる第1の段階、ならびにNotch阻害剤(例えば、DAPT)、MEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)、およびヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)を用いる第2の段階を含み得る。

## 【0120】

別の局面によると、分化の方法は、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt活性化剤(例えば、R-Spondin1)、および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)、HDAC阻害剤(例えば、ツバスタチンA)およびヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)を含む小分子の第1の組を用いる第1の段階、ならびにNotch阻害剤(例えば、DAPT)、MEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)、ヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)、およびWnt阻害剤(例えば、WNT-C59)を用いる第2の段階を含み得る。

10

## 【0121】

別の局面によると、分化の方法は、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt活性化剤(例えば、R-Spondin1)、および1つ以上の成長因子(例えば、EGFおよびNoggin)、HDAC阻害剤(例えば、ツバスタチンA)、ヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)、およびNeuroD1活性化剤(例えば、ISX9)を含む小分子の第1の組を用いる第1の段階、ならびにNotch阻害剤(例えば、DAPT)、MEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)、ヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)、Wnt阻害剤(例えば、WNT-C59)、およびTgf-阻害剤(例えば、616452)を用いる第2の段階を含み得る。

20

## 【0122】

一態様において、細胞集団内のインスリンを増加させるための方法は、該細胞と、DNAメチル化阻害剤(例えば、5-アザシチジンおよび/または5-アザ2-デオキシシチジン)、Tgf-阻害剤(例えば、616452)、およびNeuroD1活性化剤(例えば、ISX-9)を含む小分子を接触させることを含み得る。該細胞集団は、単一の段階で該分子と接触され得るか、または複数の段階で該分子の1つ以上と接触され得る。

## 【0123】

さらに別の局面において、細胞集団においてインスリンを増加させるための方法は、第1の段階において、該細胞と、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt活性化剤(例えば、R-Spondin1)、およびDNAメチル化阻害剤(例えば、5-アザシチジンおよび/または5-アザ2-デオキシシチジン)を接触させること、第2の段階において、該細胞と、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt阻害剤(例えば、Wnt-C59)、Tgf-阻害剤(例えば、616452)、およびNeuroD1活性化剤(例えば、ISX-9)を接触させること、ならびに第3の段階において、該細胞と、Notch阻害剤(例えば、DAPT)、Wnt阻害剤(例えば、Wnt-C59)、Tgf-阻害剤(例えば、616452)、およびMEK/ERK阻害剤(例えば、PD0325901)を接触させることを含む3段階プロセスを含む。第1の段階においてEGFおよびNogginなどの成長因子も提供され得、第1および第2の段階においてヒストンメチル化阻害剤(例えば、トラニルシプロミン)が提供され得る。第1の段階においてHDAC阻害剤(例えば、ツバスタチンA)および/またはNeuroD1活性化剤(例えば、ISX-9)も提供され得る。

30

40

## 【0124】

出生後幹細胞などの出生後細胞の処理を実施して細胞を腸内分泌細胞に分化させることにより、比較的高いEECの含量を有する細胞集団が得られ得る。一局面によると、出生後幹細胞などの出生後細胞由来の腸内分泌細胞を有する細胞集団は、複数の小分子による処理により提供され得、ここで画分、腸内分泌細胞は、総細胞集団の少なくとも約1%である。別の局面において、細胞集団中の腸内分泌細胞の画分は、全細胞集団の少なくとも約10%、例えば20%~100%であり得る。細胞集団の細胞はまた、さらなるインビトロまたはインビボ適用における使用のために凍結保存され得る。該細胞集団は未分類であり、これは該細胞集団は細胞の該密度を達成するために過剰または他に分類されていないことを意味す

50

る。一局面によると、分化した細胞は、本明細書に含まれる実施例に示されるように、5-HTおよび/またはGLP-1を発現し得ることがある。

【0125】

また、本明細書に記載されるインスリン産生を増加させる方法は、インスリン産生細胞の比較的高い画分、例えば全細胞集団の少なくとも約0.05%およびさらに全細胞集団の少なくとも約1%であるインスリン産生細胞の画分を有する細胞集団を生じ得る。

【0126】

本明細書に記載される細胞を処理するための方法は、該処理方法について標的化される細胞集団および複数の小分子と共に、マトリゲルなどの細胞培養培地を提供するキットの使用により実施され得る。該キットはまた、該キットを使用するための指示書、および該処理方法の実行を容易にするための他の用具を含み得る。一態様において、キットは、細胞培養培地、出生後幹細胞などの哺乳動物出生後細胞、およびChgAを上方制御し、かつ該出生後細胞を分化させる複数の小分子を含む。別の態様において、キットは、細胞培養培地、哺乳動物細胞、および細胞中のインスリン産生を増加させる複数の小分子を含む。

【0127】

本開示の局面はさらに、本明細書に記載される処理方法を使用する、ヒトなどの哺乳動物における疾患状態の治療に関する。一局面によると、肥満、糖尿病、過敏性腸症候群、感染性腸炎および炎症性腸疾患の少なくとも1つなどの、不十分な内分泌または腸内分泌細胞産物を特徴とする疾患状態が治療される。別の局面において、肥満および1型糖尿病の少なくとも1つなどの、不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態が治療される。該疾患状態の治療は、上述の小分子および/または小分子組合せのいずれかに対応する複数の小分子を、かかる治療を必要とする哺乳動物に投与することを經由して達成される。ある態様において、複数の小分子における小分子の全てが、かかる治療を必要とする哺乳動物(例えば、ヒト)に同時に(例えば、単一投与工程で)投与(例えば、送達)される。別の態様において、複数の小分子における小分子は、かかる治療を必要とする哺乳動物(例えば、ヒト)に複数の投与(例えば、多工程プロセスの一部として)において投与(例えば、送達)される。

【0128】

いくつかの態様において、複数の分子は、インピボで被験体の上皮に送達され、それによりインサイチュでの細胞分化が誘導される。特定の態様において、該複数の分子は、複数の組織(例えば、胃、小腸、結腸、口腔粘膜)に送達される。

【0129】

さらに別の局面によると、薬学的に許容され得る賦形剤と共に複数の小分子を提供することにより、複数の小分子を含む医薬組成物が調製され得る。一態様において、該小分子は、該小分子が(例えば経口的に)投与された場合に、標的領域に到達するまで小分子の分解が阻害されるように、保護剤を提供し得る医薬組成物の一部として調製され得る。例えば、該剤は、該複数の小分子が胃を通過して治療が生じ得る腸まで到達し得るような保護コーティングを提供し得る。かかる剤は、ポロキサマーなどのポリマー材料を含み得、また身体の標的領域での該小分子の放出を提供するために、オイドラギットなどのpH感受性ポリマーを含み得る。該剤はまた、例えば小分子の放出の開始を調節するように、または標的領域での小分子の放出の持続時間を調節するように、1つ以上の小分子の放出が調節されるようなものであり得る。また、該剤は、スクラルファートなどの胃または腸を被覆し得る他の化合物を含み得る。医薬組成物は、例えば丸薬、ゲルキャップ、液剤等により経口的に投与され得るが、デバイス(例えば、ステント)を介した、ならびに坐剤、浣腸および/またはパッチによる他の投与方法が含まれ得る。別の態様において、本明細書に記載の方法により得られた細胞集団は、注入、注射における、移植体上、担体物質中または担体物質上などの細胞療法により投与され得、免疫隔離(例えば、同種異系移植)であり得る物質またはデバイスと組み合わせられ得る。

【0130】

一態様において、不十分なインスリン産生を特徴とする疾患状態の治療のための医薬組

10

20

30

40

50

成物は、DNAメチル化阻害剤、Tgf- 阻害剤、およびNeuroD1活性化剤、および/またはそれらの誘導体および/または薬学的に許容され得る塩を、薬学的に許容され得る賦形剤と組み合わせて含み得る。例えば、該組成物は、616452、ISX-9、ならびに5-アザシチジンおよび5-アザ-2'デオキシシチジンの少なくとも1つ、および/またはそれらの誘導体および/または薬学的に許容され得る塩を、薬学的に許容され得る賦形剤と組み合わせて含み得る。該組成物製剤は、該製剤が、治療されている哺乳動物における疾患状態の治療に有効である治療有効量の小分子組合せを提供するように、さらに工夫される。

#### 【0131】

別の局面において、本発明は、移植を必要とする被験体(例えば、ヒト)への移植のための細胞の集団を調製する方法に関する。この局面の一態様において、該方法は、a) (例えば、被験体由来の組織から)Lgr5+細胞を含む細胞の集団を単離する工程；b) wnt活性化、notch阻害、Tgf 阻害、および後成的制御(例えば、LSD1阻害および/またはHDAC阻害)、またはそれらの任意の組合せから選択される1つ以上のプロセスを標的化する1つ以上の分子により該細胞を処理する工程；ならびにc) wnt阻害、EGFR阻害、MEK阻害、ERK阻害、後成的制御(例えば、LSD1阻害)、モノアミンオキシダーゼ(MAO)阻害、およびnotch阻害、またはそれらの任意の組合せから選択される1つ以上のプロセスを標的化する1つ以上の分子により細胞を処理する工程を含む。工程b)およびc)のそれぞれについて、該細胞は、種々の時間の間、例えば、約4、8、24、48、96または192時間等あるいはそれら以上該分子で処理され得る。一般的に、工程b)およびc)に使用される分子(1つまたは複数)は、それらのIC50値の約10、25、50、100、500または1000%あるいはそれら以上で使用される。工程b)およびc)において細胞を処理するために複数の分子を使用する場合、該分子は、同時に(例えば、一工程で)または別々に(例えば、連続的に)投与され得る。

#### 【0132】

別の態様において、移植のために細胞の集団を調製する方法は、前駆細胞(例えばTA細胞(transit amplifying cell))の集団を、先の段落の工程b)および/またはc)に従って処理する工程を含む。この態様によると、該方法は、工程b)およびc)の両方を含み得るか、または該方法は工程b)なしで工程c)を含み得る。分子をインビボ集団に投与する場合、該方法は、工程b)およびc)の両方、または工程c)なしで工程b)、または工程b)なしで工程c)を含み得る。

#### 【0133】

さらなる態様において、移植のために細胞の集団を調製する方法は、d)被験体に処理された細胞の集団を送達する工程をさらに含む。

#### 【0134】

いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞集団は、種々の目的(例えば、EECおよびそれらのサブセット集団の効率の増強のため、EECおよびそれらのサブセットの集団の大きさおよび機能をインビボで調節するため、インクレチン発現、例えばGLP-1および/またはGLP-2発現、インスリン発現およびセロトニン発現を調節するため、毒性試験のため)のための化合物のスクリーニングのために使用される。

#### 【実施例】

#### 【0135】

実施例  
実施例1  
マウス

Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2, B6.129マウスおよびインスリン-GFP(Ins-GFP, B6.Cg-Tg(Ins1-EGFP)1Hara/J)マウスをJackson Labsから入手し、陰窩細胞単離には6~12週齢のマウスを使用した。動物実験の手順は、MITでの動物管理委員会(Committee on Animal Care (CAC))により承認された。

#### 【0136】

実施例2  
陰窩単離

10

20

30

40

50

以前に記載されたように陰窩を単離した(Yin et al., Nature Methods, 2014)。小腸の前半分を採取し、長手方向に開いて冷PBSで洗浄して管腔内容物を除去した。次いで、ハサミで組織を2mm~4mmの断片に切断して、10mLピペットを使用した上下のピペッティングにより、冷PBSでさらに5~10回洗浄した。組織断片を、PBS中2mM EDTAと、氷上で30分間インキュベートした。EDTAの除去後、組織断片をPBSで洗浄して陰窩を放出させた。次いで陰窩を回収し、洗浄して細胞培養に使用した。放出された陰窩を回収して70µmセルストレイナーに通した。単離した陰窩をマトリゲルに埋め込み、24ウェルプレート中ウェルの中心で培養(plate)した。

【0137】

実施例3

細胞培養

単離された陰窩または単一細胞を前記のように培養した。200~300個の陰窩を40µlのマトリゲルと混合して、24ウェルプレート中ウェルの中心で培養した。マトリゲルの重合後、成長因子(EGF、Noggin、R-Spondin 1)および小分子(CHIR99021およびVPA)を含む500µlの陰窩培養培地(N2、B27、Glutamax、HEPESおよびN-アセチルシステインを有するAdvanced DMEM/F12)を提供した。細胞分化実験のために、細胞培養培地を、表2に記載の成長因子および小分子を含む培地に変えて、下記の分化プロトコルを続けた。培地は使用した分化条件に応じて1~2日毎に変えた。

【0138】

【表5】

表2: 試験に使用される小分子および成長因子

名称	略語	濃度	会社	カタログ番号
EGF	<i>E</i>	50 ng/ml	ThermoFisher	PHG0311
Noggin	<i>N</i>	100 ng/ml	Peptotech	250-38
R-Spondin 1	<i>R</i>	500 ng/ml	Peptotech	120-38
CHIR99021	<i>C</i>	4 µM	Selleckchem	S1263
VPA (バルプロ酸 (Vaproic Acid)ナトリウム塩)	<i>V</i>	1.5 mM	Sigma	P4543
DAPT	<i>D</i>	5 µM	Selleckchem	S2215
IWP 2	<i>I</i>	2 µM	Tocris	3533
レプソックス	<i>Rep</i>	5 µM	Tocris	3742
ツバスタチン A	<i>Tu</i>	10 µM	Selleckchem	S8049
トラニルシプロミン	<i>Tc</i>	1.5 µM	Tocris	3852
PD0325901	<i>Pd</i>	1 µM	Selleckchem	S1036
AS-703026	<i>As</i>	1 µM	Cayman	11226
ゲフィチニブ	<i>Ge</i>	1 µM	Cayman	13166
Wnt-C59	<i>C59</i>	5 µM	Selleckchem	S7037

【0139】

実施例4

免疫染色

分化した細胞コロニーを緩やかにピペッティングして1.5mlタンパク質Lobind Eppendorfチューブに回収した。細胞培養培地を除去して試料をPBSで洗浄した。マトリゲル中で培養した類器官または細胞コロニーを、4% PFAを直接添加して固定し、室温で10~30分間インキュベートした。次いで、マトリゲルを機械的に破壊して、細胞をBSA被覆Eppendorfチューブに移した。試料をPBSで洗浄して、0.25% Triton X-100で30分間浸透化させ、一次

10

20

30

40

50

抗体および二次抗体で染色した。使用した抗体を表3に挙げる。共焦点顕微鏡検査(Zeiss LSM 710)または倒立顕微鏡(EVOS; Advanced Microscopy Group)により画像を取得した。

【 0 1 4 0 】

【表 6】

表 3: 試験に使用される抗体

抗体	販売者	種	カタログ	
			番号	希釈
ChgA	Santa Cruz	ヤギ	sc-1488	1:100
ChgA	Santa Cruz	ウサギ	sc-13090	1:100
GIP	Santa Cruz	ヤギ	sc-23554	1:100
GLP-1	Abcam	ウサギ	ab22625	1:100
5-HT	Immunostar	ウサギ	20080	1:400
SST	Santa Cruz	ヤギ	sc-7819	1:200
Secretin	Santa Cruz	ヤギ	sc-21023	1:50
CCK-8	Immunostar	ウサギ	20078	1:200
抗ウサギ	Invitrogen	ロバ	A-21206	1:400
抗ヤギ	Invitrogen	ロバ	A-11055	1:400
抗ヤギ	Invitrogen	ロバ	A-11058	1:400
抗ウサギ	Invitrogen	ロバ	A-21207	1:400

10

20

【 0 1 4 1 】

実施例5

RNA抽出およびqPCR

類器官または分化した細胞を採取して、製造業者の指示書に従ってRNeasy Micro Kit (Qiagen)を使用し、RNAを抽出した。市販のプライマーおよびTaqManプローブ(Life Technologies)を使用して、QuantiTect Probe PCRキット(Qiagen)により定量的リアルタイムPCRを行なった。

【 0 1 4 2 】

実施例6

GLP-1分泌/放出アッセイ

細胞を1.5ml Eppendorfチューブに回収して基本アッセイ培地(10mM HEPES、0.1%脂肪酸非含有BSAを補充したHBSS、グルコースなし、pH7.4)で洗浄した。細胞を基本培地中2時間、300rpmのサーモミキサー中でインキュベートした。次いで細胞を洗浄して、1mg/mlジプロチンA (Sigma-Aldrich)を含む50  $\mu$ lの基本培地中で1時間インキュベートして、上清を回収した。次いで細胞を1mg/mlジプロチンAおよび10mMグルコースを含む50  $\mu$ lの基本培地中で1時間インキュベートして、上清を回収した。24ウェルプレート由来の類器官を1.5 mlタンパク質Lobind Eppendorfチューブ(チューブ当たり1ウェル)に回収して、基本培地(10mmol/L HEPES、0.1%脂肪酸非含有BSAを補充したハックス平衡塩溶液(Life Technologies)、グルコースなし、PH7.4)中で2時間、1分間当たり300回転の、サーモミキサー中でインキュベートした。次いで類器官を洗浄して、1mg/mlジプロチンA (Sigma-Aldrich)を含む100  $\mu$ lの基本溶液中で一時間インキュベートし、上清を回収して類器官をさらに、1mg/mlジプロチンAおよび10mMグルコースを含む100  $\mu$ lの基本溶液中で一時間インキュベートした。次いで細胞および類器官をCellytic Mバッファ(Sigma-Aldrich)に溶解した。上清中のGLP-1濃度はELISA (Multi-Species GLP-1 total ELISA, Millipore)により決定した。細胞溶解物中のDNA含量は、PicoGreen Kitを使用して定量し、GLP-1含量を標準化するために使用した。

30

40

【 0 1 4 3 】

実施例7

50

### インスリン放出アッセイ

細胞を1.5ml Eppendorfチューブに回収し、0.25% BSAを補充してグルコースを含まないクレブス・リンゲルバッファ(KRB)で洗浄した。次いで細胞を、2mMまたは20mMのいずれかのグルコースを含むKRBと、37℃で1時間インキュベートした。上清を回収し、HTRFインスリンアッセイ(Cisbio)を使用してインスリンを測定した。

【0144】

### 実施例8

Notch阻害剤はISCからの腸内分泌細胞(EEC)分化を増加させる(図1)

腸幹細胞を、類器官を形成するように3Dマトリゲル中で培養し得、ここで幹細胞は自発的に分化してEECを含む全腸上皮細胞型を生成する。図1に示すように、小分子セクレターゼインヒビター(DAPT)によるNotch阻害により、EEC分化が増加し、約5%~10%の幹細胞がEECになる。ここで図1は、類器官培養条件(ENR)下またはNotch阻害剤DAPT(ENRD)条件の存在下でのEECマーカーChgAの免疫染色である。DAPIは核染色のために使用した。

10

【0145】

### 実施例9

EEC分化のためのスクリーニング系(図2)

分化効率をさらに増加させるために、幹細胞増殖および分化系において使用したような成長因子とWnt/Notch調節因子の複数の組合せを試験して、最高の分化効率を有する基本的な組合せを同定した。図2に示すように、EGF、NogginおよびDAPT(END)の組合せであるが、R-spondin1または他のWnt活性化剤/阻害剤を含まない組合せは、高レベルのChgA拡大を誘導した。図2において、成長因子EGF(E)、Noggin(N)、R-spondin1(R)、ならびにWnt活性化剤CHIR99021(C)、VPAおよびWnt阻害剤IWP-2(I)、またはNotch阻害剤DAPT(D)の分化組合せを含む複数の条件下で培養した腸幹細胞についてChgAのmRNA発現を測定した。

20

【0146】

結論において、小分子スクリーニングのための基本条件としてEND条件を使用した。

【0147】

### 実施例10

EEC分化を増加させる小分子に対する96ウェルスクリーニングプラットフォーム(図3)

図3に示すように、小分子ライブラリーをスクリーニングするためのEEC分化の指標としてのChgA発現に対するqPCRと共に96ウェルスクリーニング系をさらに使用し、図3では、Lgr5腸幹細胞を増殖させ、96ウェルプレートに継代した。次いで細胞をEGF、NogginおよびDAPT(END)、ならびに小分子と共に培養した。分化の2~3日後、細胞を溶解して、qRT-PCRによりChgA発現を測定した。

30

【0148】

### 実施例11

陽性スクリーニングヒット(図4)

例示的なスクリーニング結果を図4に示すように記録した。EGFR阻害剤ゲフィチニブおよびMEK/ERK経路阻害剤AS703026はChgA発現を増加させた。

【0149】

40

### 実施例12

陽性ヒットの検証(図5)

24ウェルプレート培養および分化系を使用して小分子をさらに検証した。EGFR阻害剤(例えば、ゲフィチニブ)またはMEK/ERK阻害剤(例えば、AS703026およびPD0325901)は、ChgA発現の促進において同様の活性を有し、杯細胞マーカー(Muc2)およびパーネット細胞マーカー(Lyz1)の発現は同様には増加せず、図5に示されるようなEECの方向への特異的な誘導が示唆された。図5において、腸幹細胞は、小分子を添加したEND条件下で分化した。杯細胞(Muc2)、腸内分泌細胞(ChgA)およびパーネット細胞(Lyz1)を含む分泌細胞系統のマーカーの発現を測定した。

【0150】

50

ChgAに対する免疫染色によりEEC生成も確認した(図35)。この条件において、NotchおよびEGFR/MEK/ERK阻害およびWnt不活性化(R-Spondin1除去による)の組合せを使用して、ISCのEEC方向への特異化を誘導した。該組合せからEGFおよび/またはNogginをさらに除去することにより、より高レベルのChgA発現が誘導されたが(図36)、より高い細胞アポトーシスレベルがこれらの条件において観察された(図37)。Wnt経路阻害剤IWP 2 (またはI)またはGSK3 阻害剤CHIR99021 (またはC)の添加は、EECへの分化をさらには増加させなかった(図36)。

【 0 1 5 1 】

#### 実施例13

MAPK/ERKまたはEGFR阻害剤はEEC分化を特異的に増加させる(図6)

10

腸幹細胞を複数の条件下で培養し、小分子AS703026 (As)、ゲフィチニブ(Ge)およびPDO325901 (Pd)は特異的に、腸内分泌細胞マーカーChgAの発現を増加させた。

【 0 1 5 2 】

#### 実施例14

小分子(例えば、As、GeおよびPd)はEEC分化の際にNgn3発現を減少させ、R-Spondin1はNgn3発現を促進させる(図7)

分泌細胞分化の際に、Ngn3は、EECの特異化に必須であることが示された。Ngn3陽性分泌前駆細胞がEECに分化するという以前の推測があった(Genes Dev. 2002)。腸幹細胞のインビトロ分化の間のNgn3発現レベルの調査により、驚くべきことに、図7に示すように、R-spondin1の除去によりNgn3発現の強い減少が誘導され、一方でゲフィチニブ(Ge)、AS703026 (As)またはPDO325901 (Pd)の添加によりNgn3発現がさらに減少され、これは、R-Spondin 1の存在下では有意ではないということが明らかになった。図7において、腸幹細胞を複数の条件下で2日間培養してNgn3のmRNAレベルを測定した。

20

【 0 1 5 3 】

#### 実施例15

最適化された分化プロトコル(図8)

Wntシグナル伝達(R-Spondin1の供給下)はEECの初期の特異化を助長(encourage)してNgn3発現を促進するが、その後、EECの成熟の間に、Ngn3発現は続いて下方制御される。これはEEC特異化の間のNgn3の一過的な(transit)発現と一致する(Genes Dev. 2002)。したがって、Ngn3発現およびその後のEEC分化の増加を目的とする2工程分化プロトコルを試験した。、図8に示すように、R-Spondin 1およびNotch阻害剤DAPTによる初期(第1)誘導工程を、Ngn3の上方制御を可能にするように追加して、その後Wnt活性化なしで小分子(例えば、Pd)を用いる第2の工程によりEECを最終的に分化させた。図8において、R-spondin1の存在を有する初期工程を、工程1にけるNgn3発現を増加させるために分化プロトコルに追加した。

30

【 0 1 5 4 】

#### 実施例16

EEC分化の間の24時間でのNgn3発現(図9)

複数の条件下で24時間後にNgn3発現を測定した。図9に示されるように、R-spondin1およびNotch阻害剤DAPTの存在下でNgn3発現は大きく誘導された。図9においてR-Spondin 1およびNotch阻害剤DAPTの組合せはNgn3発現を増加させた。

40

【 0 1 5 5 】

#### 実施例17

分化の間の3日目のEECの重要なマーカーの発現(図10)

図10に示されるように、さらに2日間、培養培地をWntアゴニストまたはR-Spondin 1なしおよびPdありの条件に切り替えることにより、R-spondin1ありまたはPdなしの条件と比較して、Ngn3発現レベルが減少し、ChgA発現が上方制御されることが示された。図10において、2工程分化プロトコルにより、3日目にNgn3発現が減少され、ChgA発現が増加された。さらに図10に示されるように、後期EECマーカーNeuroD1も増加された。

【 0 1 5 6 】

50

## 実施例18

EEC分化の間の重要な遺伝子の時間経過試験(図11、12および13)

EECマーカー発現の時間経過試験により、2工程分化プロトコルは、第1の工程においてNgn3レベルを効率的に増加させ、第2の工程の間にNgn3レベルを減少させChgAレベルを増加させることが示唆された。Ngn3およびChgAと比較して、NeuroD1は中間の変化の傾向を示し、Ngn3後であるが、ChgA前にNeuroD1が発現したことが示唆された。図11に示されるように、該2工程プロトコルは、処理の5日後に、最高のChgA発現を誘導し、図12(2工程プロトコルは分化の5日後にEECマーカーChgA発現を増加させた)および図13(2工程プロトコルは分化の5日後にEECマーカーChgAを染色することによりEEC分化を増加させた)に示されるように、直接Wnt、NotchおよびMEK/ERK不活性化(D.PdまたはD.Pd.C59 条件)よりも少ない細胞アポトーシスを伴って(図38)、ISCからのEEC分化を効率的に誘導した。

10

【0157】

## 実施例19

さらなる小分子による分化プロトコルのさらなる向上(図14)

EECの分化の促進のための第1の工程の間のNgn3レベルを増加させる努力において、Ngn3発現を増加させる因子を、ENRD条件下でのさらなるスクリーニングにより同定した。80より多くの小分子および成長因子をスクリーニングし、図14に示されるように、ツバスタチンAおよびトラニルシプロミンがNgn3発現を増加させることが見出された。図14において、分化の2日後、トラニルシプロミン(Tranyl)は、Ngn3およびChgAレベルの両方を増加させ、一方でツバスタチンAはNgn3レベルを増加させたが、ChgAレベルを減少させた。しかしながら、トラニルシプロミンもChgA発現を増加させたが、ツバスタチンAはChgA発現を減少させたことに注意(これも図14に示される)。

20

【0158】

## 実施例20

分化プロトコルの工程1において添加された場合ツバスタチンA (Tu)はEEC分化を増加させる(図15)

ツバスタチンAを工程1において適用したが、トラニルシプロミンは分化の間に両方の工程に適用した。これらの条件下、杯細胞(Muc2)、腸内分泌細胞(ChgA)、パーネト細胞(Lyz1)およびK細胞(Gip)を含む細胞についてマーカーのmRNA発現の図15に示され、杯細胞(Muc2)、腸内分泌細胞(ChgA)、パーネト細胞(Lyz1)、K細胞(Gip)、L細胞(Gcg)およびI細胞(Cck)を含む複数の細胞型のマーカーのmRNA発現の図16に示され、かつ図39A~39Cに示されるように、両方の化合物は、2工程分化プロトコルの5日後にEECマーカーChgA発現を増加させ、K細胞(Gip)、L細胞(Gcg)およびI細胞(Cck)についてのマーカーの発現も増加された。

30

【0159】

図16においてさらに示されるように、トラニルシプロミンの添加も杯細胞(Muc2)およびパーネト細胞(Lyz1)マーカーの発現を有意に減少させ、EEC分化の特異的な誘導が示唆されることは注意するに値する。

【0160】

## 実施例21

EGFの除去はEECの分化をさらに増加させた(図17)

また、Pd/AsがEGF経路の下流標的の1つであるMEK/ERK経路を標的化するので、分化におけるEGFの効果を試験した。図17および図39Dに示されるように、培地からのEGFの除去により、EECマーカー(すなわちChgA、Gip、GcgおよびCCK)発現がさらに増加された。図17において、腸幹細胞は、5日間の複数の条件において分化して、ChgA、Gip、GcgおよびCckなどの腸内分泌細胞についてのマーカーはqPCRにより測定したが、細胞生存の促進におけるEGFの役割(例えば、PI3K)のためのものであるが、両方の工程においてEGFを除去した場合、分化した細胞コロニーの管腔においてより多くの死細胞が存在する傾向があった。そのため、分化プロセスの第1の工程においてEGFは維持された。工程2におけるNogginの効果は重要ではなかったので、これは組成物から除去した。

40

【0161】

50

## 実施例22

## 向上した分化プロトコル(図18)

腸幹細胞から生成されたEECを特徴づけるために、図18において同定されて示される条件を使用して、該細胞を分化させた。

【0162】

## 実施例23

## ISCからの非常に効率的なEEC分化(図19)

EECについてのマーカーに対して免疫蛍光染色を行った。腸類器官培養(ENR条件)において、ごくわずかな細胞だけがEECに分化し、これは、図19の上部パネルに示されるように類器官内のChgA+またはGLP-1+細胞の数で示され、ここで、ISCは、ENRCV条件下で拡大され、示されるような条件においてさらに分化した。腸内分泌細胞(例えば、ChgA)またはEECの複数のサブタイプについてのマーカーに対する免疫染色も行った。核染色についてDAPIを使用した。これらの所見は以前の報告(Diabetes, 2014)と一致した。制御された分化条件下で、細胞のほとんどは5日間の分化プロトコルの後にEECに変化し、EECサブタイプの生成も上昇された(図19参照)。興味深いことに、ほとんどのEECは、セロトニン分泌細胞であるようであり、これは強力な5-HT染色により示される(図19参照)。分化したL細胞からのGLP-1放出をさらに試験した。他のEECサブタイプも、GLP-1、GIPおよびSSTなどのマーカーの陽性染色により同定されるように、より高い頻度で存在した。分化プロトコルは、類器官からのGLP-1分泌を有意に増加させ、10mMのグルコース刺激は、図20に示されるように、GLP-1分泌の5倍の増加を誘導し(ISCから生成される機能的L細胞(GLP-1))、ここで、示される条件で培養した細胞においてGLP-1の分泌を測定し、これらのEECは成熟して機能的であることが示唆された(図40C)。

【0163】

EEC分化において、誘導の第1の工程においてWntシグナル伝達活性が必要であるが、EEC特異化の第2の工程においては必要ではない。本明細書に記載される2工程分化プロトコルにおいて、Wnt活性化を伴う第1の工程はNgn3発現を増加させたが、これは、工程2においてさらにWntリガンドを分泌してWnt経路を活性化し得るパーネット細胞分化も誘導した。これは、初期のWnt不活性化工程がそもそもパーネット細胞の生成を妨げた(図39E)END.Pd条件と比較して、より高いレベルのパーネット細胞マーカーLyz1発現と一致する。したがって、工程2において小分子阻害剤(Wnt-C59またはC59)によるWntシグナル伝達の阻害を試験した。C59はパーネット細胞マーカーLyz1発現を効果的に減少させ、C59が工程2においてパーネット細胞分化を防いだことを示唆した。そして、C59はさらにChgA発現を増加させ、より高いレベルのEEC分化を示した(図40A)。工程2におけるC59の12~24時間遅らせた添加は、工程1におけるより高いレベルのNgn3誘導のために、ChgA発現の可能性をさらに増加させる(図40A)。同様に、Tgf-阻害剤(レプソックス、Rep)の添加は、ChgA発現を大きく促進させ、杯細胞マーカーMuc2発現を大きく減少させた(図40A, 図41A)。Repはまた、ENR条件における発現レベルに対して120x (Tph1)、300x (Sct)、430x (Cck)、800x (Gip)、15,000xまで(Pyy)の範囲で、成熟EECマーカー(Gcg、Gip、Cck、Tph1、Sst、Sct、Pyy)の発現を大きく増加させた。工程1においてレプソックスを添加することは、両方の工程における添加と同等なレベルのChgAを誘導することに十分であるが、成熟EECマーカーの発現は大きく低減されることが見出され(図41B)、Tgf-阻害はEEC特異化およびさらなる成熟の両方を誘導することが示唆された。興味深いことに、レプソックスの添加は、コロニーによる管腔からのアポトーシス細胞の排出(図41C)および高純度のEEC細胞コロニーの形成を誘導する。

【0164】

最適化された分化を使用して(図40B)、分化プロセスの間の重要な分化遺伝子の発現の変化を試験した(図40C)。幹細胞遺伝子Lgr5は、パーネット細胞分化またはNotch下方制御における増加のためのものであるが、2日目にわずかに上方制御された(Tian et al., 2015)。Sox9発現はISCおよびEEC分化の制御に関与し(Formeister et al., 2009)、部分的にNgn3発現の誘導により、膵臓内分泌細胞分化において重要な役割を果たす。Sox9は最初に上

10

20

30

40

50

方制御され、次いで2日目から下方制御され始め、Lgr5と同様の発現パターンを示すことが見出された。Sox9発現は、Lgr5と比較して比較的高レベルで維持され、EECにおけるその発現と一致した(Formeister et al., 2009)。活性化されたNotchシグナル伝達の下流遺伝子であるHes1の発現は下方制御された。Math1/Atoh1、Ngn3およびNeuroD1などの複数のNotch標的遺伝子の発現は同様に制御され、これは、初期の上方制御段階およびその後の下方制御段階を含んだ。そして、ChgAの発現は連続的に増加され、徐々に増加されるEEC分化と一致した。興味深いことに、これらの遺伝子がピークレベルに達する(Sox9、Math1、Ngn3、NeuroD1について2日目およびChgAについて5日目)上方制御速度は異なり、Sox9、Math1、Ngn3、NeuroD1およびChgAの順であった(図40D)。このことは、これらの遺伝子の天然の遺伝子制御プロセスを反映するようである。

10

## 【0165】

本発明者らの培養において生成される異なるEECサブタイプを同定するために免疫蛍光染色を行った。高頻度の複数のEECサブタイプがコロニー内に存在することが見出され(図40E)、これはGIP、GLP1、セロトニン、CCK、SCTおよびSSTについての陽性染色により同定された。興味深いことに、分化したEECコロニーにおいてChgA陽性細胞の2つの集団が見出され、ChgAが高度に発現される集団がセロトニン発現細胞と共局在し、ChgA低集団がGLP-1、GIP、CCK、SSTおよびSCT発現細胞と共局在した(図40E)。

## 【0166】

## 実施例24

さらなる因子がEEC分化を増加させる(図21)

20

図21に示されるように、EEC分化をさらに増加させ得るさらなる分子を同定した。図21において、Wnt-C59およびISX-9ならびにそれらの組合せを含む小分子は、分化した細胞のChgA発現をさらに増加させた。対照：前記分化条件。

## 【0167】

## 実施例25

複数の条件下での機能的EECマーカーの発現(図22)

参照遺伝子Hprtに対する相対的な発現を示す図22のように、Tgf- 阻害剤616452は、特にGip、Gcg、Cck、Pyyなどの機能的EECマーカーの発現を大きく増加させることが見出されたが、ISX9はそれらの発現を減少させた。このように、ISCからのEEC分化についての分化プロトコルを示す図23のように、後の段階で616452を含みISX9を除去するように分化プロトコルを調整した。

30

## 【0168】

## 実施例26

ChgA陽性EEC細胞のインスリン産生細胞への変換

5-Aza (5)、616452 (6)およびWnt-C59 (C)の組合せは5日目で分化した腸幹細胞においてインスリン-GFP発現を誘導する(図24)

EECおよびインスリン産生ベータ細胞は多くの類似性を共有するので、最近のデータは、さらなる小分子によりEECがインスリン産生細胞に変換され得ることを示す。インスリン-GFPトランスジェニックマウスから単離されたインスリン-GFP細胞を使用して、インスリン産生を誘導し得る小分子を同定した。ISCからのEECの分化の際に、インスリン-GFP陽性細胞は、Tgf- 阻害剤616452の存在下で培養した場合、約1%の細胞がGFP陽性になることが観察された。24ウェルプレートの1ウェル中のGFP+細胞割合およびGFP+細胞数の定量のFACS分析を示す図24のように、Wnt阻害剤Wnt-C59およびDNAメチル化阻害剤5-Aza (5-アザシチジン)のさらなる添加はその後、インスリン-GFP+細胞の割合を増加させた。顕著なことに、56Cの組合せ(5-Aza、616452、Wnt-C59)は、最高数のGFP+細胞を生じる(図24参照)。

40

## 【0169】

## 実施例27

インスリン-GFP発現の誘導における5日目の5-Azaの用量応答およびインスリン-GFP発現の誘導における5日目の616452の用量応答(図25)

50

小分子5-Azaおよび616452も培養中に細胞死を誘導したので、5-Aza(図25参照)および616452(図26参照)の最適濃度を決定した。これにより、今後の実験において0.5~1 μMの5-Azaおよび5 μMの616452を使用した。

【0170】

#### 実施例28

培養の5日後にISX-9 (I)はインスリン-GFP発現をさらに増加させた(図27)

該組み合わせにおけるISX9 (I)の添加も、GFP+細胞数をさらに増加させることが見出され(図27参照)、図28に示されるように10 μMの濃度を使用した。図28において、インスリン-GFP発現の5日目の誘導におけるISX-9についての用量応答データを示す。

【0171】

#### 実施例29

複数の条件での培養の5日後における細胞のインスリン-GFP発現のFACS分析(図29)

転換の2つの工程においてWntシグナル伝達も試験した。CHIR99021を添加することによる工程1におけるWnt活性化の増加はGFP発現を増加させなかったが、R-Spondin1およびWnt-C59の組合せは、図29に示されるように、該系におけるGFP+細胞の最高数を生じる。図29において、N：なし、CHIR：CHIR99201、およびC59：Wnt-C59である。

【0172】

#### 実施例30

薬物なしまたは有りて処理した細胞の7日目のGFPおよび明視野(図30)

実施例29と同様の条件下、分化の7日後、図30に示されるように20%までの細胞がインスリン-GFPを発現した。図30において、対照は、EEC分化条件で培養した細胞である。(1日目ENR.D.Tu.Tyおよび2日目からD.Pd.Ty.C59)。添加した薬物は5-Aza、616452およびISX9を含み、Pdは2日目に変えて4日目に添加し、スケールバー：200 μmである。

【0173】

#### 実施例31

プロセスにおける遺伝子発現(図31)

図31に示されるように、細胞は、Pdx1、Ngn3、Mafa、NeuroD1、Nkx6.1およびNkx2.2などのインスリン発現に重要である主要な転写因子の発現を示し、インスリンmRNA発現を大きく増加させた。図31において、対照条件は、ENR.D.Tu.Ty.5Aza.616452.ISX9であり、2日目から5Azaを除去し、薬物処理について細胞は最初にENR.D.Tu.Ty.5Aza.616452.ISX9で培養し、2日目にD.Ty.616452.ISX9.C59条件に変更し、4日目にPd0325901を添加し、0日目に全ての細胞をENR.CV条件下で培養した。

【0174】

#### 実施例32

低(2mM)および高(20mM)濃度のグルコースによる細胞の処理により異なるレベルのインスリン放出が誘導される(図32)

分化した細胞からのインスリンの放出を試験した。図32に示されるように、グルコースによる細胞の処理により、用量依存的なインスリン放出が誘導され、これらの細胞は機能的かつグルコースに応答性であることが示唆された。

【0175】

#### 実施例33

分化プロトコルのフロー図(図33)

青色および緑色の因子は重要な因子を表す。橙色は補助的な因子を示す。図33に示されるように、分化の際の重要な事象およびそれぞれの段階の重要なマーカーも列挙する。

【0176】

#### 実施例34

WntおよびNotch経路により制御されるインビボEEC分化のモデル(図34)

Notch経路の活性は、トランス活性化またはシス阻害により調節される。Notch経路は隣接する細胞(すなわち、パーネト細胞、EECおよび杯細胞などの分泌細胞、または分泌細胞前駆体)上のNotch受容体とNotchリガンド(DLL)の結合により活性化される。これらの細胞

10

20

30

40

50

との接触を失うことにより、Notch不活性化がもたらされ、これはシス阻害によりさらに増強される。Wnt経路は、粘膜固有層中の細胞または陰窩の基部に位置するパーネト細胞由来のWntリガンド勾配により活性化される。陰窩を基部に残すことにより、Wnt不活性化がもたらされる。Notch不活性化もWntシグナル伝達経路の抑制解除をもたらし、一方でWnt経路の減弱化はNotch阻害と関連する表現型を救出する。(Tian et al., Cell Reports, 2015)。EEC分化について、Notch不活性化はAtoh1発現を誘導し、さらにWnt経路が(適度に)活性化される場合にNgn3上方制御を誘導した(すなわち、WntがNotch不活性化の前に非活性化される場合、Ngn3ではなくAtoh1が誘導され、杯細胞分化がもたらされる)。Wnt不活性化の際にNgn3陽性細胞はさらにEECに分化する。そして、Notch不活性化の際の連続的に(強力な)Wnt活性化によりパーネト細胞の運命がもたらされる。図34に示されるように、5

10

【0177】

実施例35

高効率腸内分泌細胞分化の一時的に組み合わされた化学制御。

上述の試験において、EECの特異化において重要な役割を果たすいくつかのシグナル伝達経路を同定した。Notch経路は、吸収性または分泌性の分化を決定することが示されており、その不活性化は、杯細胞、パーネト細胞、刷子細胞(tufts cell)および腸内分泌細胞を含む分泌細胞の特異化に必要である。分化の道筋をさらに下ると、Wnt経路は杯細胞およびパーネト細胞の運命決定において重要な役割を果たし、その活性化はパーネト細胞の運命を誘導し、その不活性化は杯細胞の運命を誘導する。EEC分化におけるWntの役割はあまり明らかにはなっていない。本明細書に記載されるように、Wnt活性化はEECの特異化のためのNgn3発現に重要であり、その後のWnt不活性化はEECのさらなる分化および複数のEECサブタイプの成熟を補助する(図34)。

20

【0178】

インビボにおける腸幹細胞の分化は動的なプロセスであり、ここで細胞は、分化の間に上方へと移動する(パーネト細胞を除く)。陰窩-絨毛軸に沿ったシグナル伝達勾配は、分化/移動プロセスの間の幹細胞および前駆細胞を分化させるための運命決定に影響を及ぼす。幹細胞/前駆細胞の特異化は陰窩基部上で開始され、ここで細胞膜に結合した(パーネト細胞による分泌される)Wntリガンドは、細胞分裂により希釈され、R-Spondin/Lgrシグナル伝達モジュールは、幹細胞がニッチ細胞-パーネト細胞と接触したままである場合、Wnt活性化を長くする(Farin et al, 2016, Nature)。この機構は、Notch不活性化の際のNgn3発現の誘導を可能にする。そのため、Wnt/Notch不活性化の配列およびレベルは、分泌前駆体の運命決定において役割を果たすようである。そして、分泌前駆細胞の位置は、相応じて細胞による選択を補助する。例えば、低レベルのWnt活性化の存在下でのNotchのより早期の不活性化は、(例えば、+4位置での)Ngn3の誘導のためにEEC運命に有利であり得、Notchシグナル伝達の不活性化前のWntシグナル伝達のより早期の不活性化は、(例えば、+4を超える位置で)低レベルのNgn3誘導のために杯細胞分化を促進し得、一方で強力なWntシグナル伝達の活性化およびNotch不活性化は、(例えば陰窩において)パーネト細胞運命に有利である。そのため、腸幹細胞からのEECおよび他の腸上皮細胞型の分化は、空間的および時間的に正確に制御されるプロセスである。

30

40

【0179】

WntおよびNotch経路はEECを含む幹細胞の分化において助けとなる役割を果たし、他のシグナル伝達経路も分化プロセスに関与する。本明細書に記載されるように、EGFR/MEK/ERKシグナル伝達カスケードの阻害は、EEC分化のレベルを増加して、Tgf- $\beta$ の阻害もEEC特異化および成熟を大きく促進した。後成的な制御もHDACおよびヒストン脱メチル化などの分化プロセスに参加する。これらの経路の特異的な組合せは、ISCおよび前駆体の運命を制御する。

【0180】

50

## 実施例36

胃腸幹細胞のインスリン産生細胞への変換のためのプロトコルに基づいて、具体的に段階1として0~1日目、段階2として1~3日目、段階3として3~5日目がある、3段階プロセスを開発した。段階3後、細胞は、Ins-EGFP発現およびインスリンmRNA発現についてのqPCRにより示されるように有意なレベルのインスリン発現を示す。任意に、細胞は、段階4として1~2週間さらに培養され得る。それぞれの段階について、小分子(および/または成長因子)の特定の組合せの組を添加した。目的は、新規の小分子(または成長因子)をスクリーニングおよび試験することにより、それぞれの段階についてのインスリン発現、具体的にはインスリンmRNA発現を増加するためのリプログラミングプロトコルを最適化することであった。

10

## 【0181】

レブソックス(616452)を以前は段階2~3で添加した。段階1からレブソックス(616452)を添加し始めた場合(すなわち、段階1~3で添加)、インスリンmRNA(Ins2)は、レブソックスを段階2~3で添加した場合と比較して増加されたことが見出された。FGF10(段階1で添加)と組み合わせた場合、図42に示されるように、インスリン発現はさらに増加された。

## 【0182】

5Aza(5-アザ-2'-デオキシシチジン)の処理時間を段階1のみから段階1および段階2に延長した場合、インスリンmRNA発現がわずかに増加されたことが見出された(図43)。

20

## 【0183】

段階2において、Wnt-C59の添加を12時間遅らせた場合、インスリンmRNA発現が増加された。この遅延されたWnt阻害は、細胞におけるNgn3発現のより高いレベルを可能にし得(Ngn3発現はWnt活性を必要とするので)、さらにインスリンmRNA発現を増加させる(図44)。

## 【0184】

L型Ca<sup>2+</sup>チャンネル活性化剤である別の小分子BayK 8644は、図45に示されるように、段階1で添加された場合にインスリンmRNA発現を増加させた。

## 【0185】

BayK 8644は、2 μMで使用された場合に最高の(highest)活性を示した(図46)。

## 【0186】

BayK 8644処理は、段階1~3で添加された場合に最高の活性を示した(図47)。

30

## 【0187】

DAPTの最適濃度は5 μMであった(図48)。

## 【0188】

Nkx6.1はインスリン発現および島機能のための重要な転写因子である。Nkx6.1発現およびインスリン発現を増加させる能力についてさらなる因子を試験した。

## 【0189】

ヒストンデメチラーゼJMJD阻害剤であるIOX1は、5~10 μMで使用された場合に、インスリンおよびNkx6.1発現を増加させた(図49)。

## 【0190】

インスリンおよびNkx6.1発現の促進における最適濃度を同定するためにレブソックスおよびISX9の効果も試験した。インスリンおよびNkx6.1発現の促進においてレブソックスの最適用量は10~15 μMであり、ISX9の最適用量は10~20 μMであることが見出された(図50~51)。

40

## 【0191】

Wnt-C59について、最適用量は5 μMであった(図52)。

## 【0192】

また、骨形成因子(BMP)ALK2受容体阻害剤DMH-1は、段階2~3で添加された場合に、Nkx6.1およびインスリンの発現を増加させることが見出された(図53)。

## 【0193】

また、デキサメタゾンも、段階2~3で添加された場合に、Nkx6.1およびインスリン発現

50

を増加させた(図54)。

【0194】

ビタミンCは、段階2~3で添加された場合に、有利な効果を有した。

【0195】

さらなる小分子(成長因子)の段階3においてインスリン発現を促進する能力をさらに試験した。

【0196】

小分子T3(トリヨードサイロニン)を段階3で添加した場合、該分子はインスリンmRNA発現を大きく増加させた。しかし、図55に示されるように、ビタミンC (pVc)はかかる効果を示さなかった。

【0197】

同様に、図56に示されるように、N-アセチルシステイン (2mM)を含むさらなる分子も、インスリンmRNA発現を増加させ、T3と組み合わせると、インスリン発現をさらに増加させた。

【0198】

図57に示されるように、段階3においてWnt-C59をCHIR99021 (CHIR)に切り替えることにより、インスリンmRNAは大きく増加されることも見出された。CHIRとT3を組み合わせた場合、インスリンmRNAはさらに増加された。

【0199】

図58に示されるように、インスリンmRNA発現を増加させるために、Exendin-4 (Ex4)およびオーロラキナーゼ阻害剤II(AKi)を含むさらなる小分子または因子を同定した。ホルスコリン (50~100 μM)は、段階3で添加された場合に細胞生存を向上させることも見出された。

【0200】

また、T3と入れ替えるために甲状腺ホルモンベータ受容体アゴニストGC-1を使用して、インスリンmRNA発現の促進において同様の効果が示された(図59)。

【0201】

これらの同定された因子の組合せを使用することにより、インスリン発現およびインスリン-GFP発現は、腸幹細胞から5日のうちに誘導された。図60に示されるように、該細胞の連続的な培養によりインスリン発現レベルがさらに増加され、島様細胞コロニーがもたらされた。

【0202】

島様インスリン発現細胞コロニーの培養を継続することについて、ホルスコリンの添加が細胞生存を増加させることが見出された。図61に示されるように、DAPT、PD0325901、BayK8644、DMH-1を含む因子は大きな影響なく除去され得た。

【0203】

EEC分化のためのさらなるデータ。

【0204】

本明細書に記載される観察に基づいて、EEC分化のための改変されたフロー図を以下に記載されるように開発した(図61)。

【0205】

主な違い：

1. 1日目の代わりに0日目からレブソックス(616452)を添加し始める。
2. ISX-9を任意のものに変更して、EEC-V6.docxに記載されるプロトコルには使用しなかった。
3. レブソックスはEEC-V6.docxに記載されるようにEEC分化を大きく増加させるので、これを必須の因子に変更した。
4. Wnt-C59は0日目から36時間の時点で添加した。

【0206】

前述の記載より、本明細書に記載される開示を種々の使用および条件に適合させるため

10

20

30

40

50

に、本明細書に記載される開示に対して変形および改変がなされ得ることが明らかである。方法および材料は、本開示における使用のために本明細書に記載され、当該技術分野で公知の他の適切な方法および材料も使用し得る。材料、方法および例は、例示のみのものであり、限定を意図するものではない。かかる態様も以下の特許請求の範囲の範囲内にある。本明細書中の変数の任意の定義における要素の列挙の記載は、任意の単一要素または列挙される要素の組合せ(または下位の組合せ)としてのかかる変数の定義を含む。本明細書中の態様の記載は、任意の単一の態様または任意の他の態様もしくはそれらの一部との組合せとしてのかかる態様を含む。本明細書において引用される全ての特許、公開された出願および参照文献の教示は、それらの全体において参照により援用される。本発明は、その例示態様に関して具体的に示され記載されているが、添付の特許請求の範囲に包含される発明の範囲から逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更が本発明においてなされ得ることが当業者に理解されよう。

10

**【0207】**

参照文献および均等物による援用

本明細書に引用される全ての特許、公開された出願および参照文献の教示は、それらの全体において参照により援用される。

**【0208】**

本発明は、その例示態様に関して具体的に示され、記載されているが、添付の特許請求の範囲に包含される発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更が本発明においてなされ得ることが当業者には理解されよう。

20

**【0209】**

参照文献

## 【表 7】

- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003-1007.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* *143*, 1518-1529 e1517.
- Formeister, E.J., Sionas, A.L., Lorange, D.K., Barkley, C.L., Lee, G.H., and Magness, S.T. (2009). Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *296*, G1108-1118. 10
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.J., Bravo, D.M., and Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 729-740.
- Gribble, F.M., and Reimann, F. (2015). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*.
- Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol* *92*, 219-231.
- Lee, C.S., Perreault, N., Brestelli, J.E., and Kaestner, K.H. (2002). Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* *16*, 1488-1497. 20
- Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* *340*, 1190-1194.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature* *469*, 415-418.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262-265. 30
- Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C.W., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., and Klein, O.D. (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep* *11*, 33-42.
- VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A., *et al.* (2012). Notch signaling modulates

## 【表 8】

- proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139, 488-497.
- Yin, X., Farin, H.F., van Es, J.H., Clevers, H., Langer, R., and Karp, J.M. (2014). Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods* 11, 106-112.
- Mumphrey, M.B., et al., *Roux-en-Y gastric bypass surgery increases number but not density of CCK-, GLP-1-, 5-HT-, and neurotensin-expressing enteroendocrine cells in rats.* *Neurogastroenterol Motil*, 2013. 25(1): p. e70-9. 10
- Moran, G.W., et al., *Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders?* *Therap Adv Gastroenterol*, 2008. 1(1): p. 51-60.
- Bogunovic, M., et al., *Enteroendocrine cells express functional Toll-like Receptors.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 292(6): p. G1770-83.
- Worthington, J.J., *The intestinal immunoendocrine axis: novel cross-talk between enteroendocrine cells and the immune system during infection and inflammatory disease.* *Biochem Soc Trans*, 2015. 43(4): p. 727-33.
- Manocha, M. and W.I. Khan, *Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies.* *Clin Transl Gastroenterol*, 2012. 3: p. e13. 20
- Sternini, C., L. Anselmi, and E. Rozengurt, *Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing.* *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008. 15(1): p. 73-8.
- van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium.* *Annu Rev Physiol*, 2009. 71: p. 241-60.
- Petersen, N., et al., *Generation of L cells in mouse and human small intestine organoids.* *Diabetes*, 2014. 63(2): p. 410-20.
- Beucher, A., et al., *The homeodomain-containing transcription factors Arx and Pax4 control enteroendocrine subtype specification in mice.* *PLoS One*, 2012. 7(5): p. e36449. 30

【 図 1 】

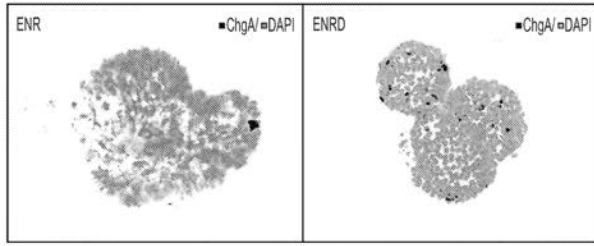


FIG. 1

【 図 2 】

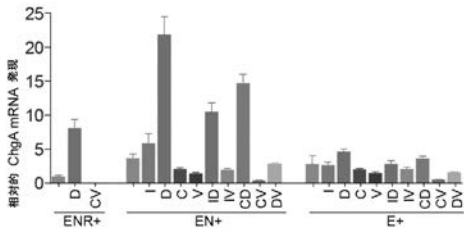


FIG. 2

【 図 3 】

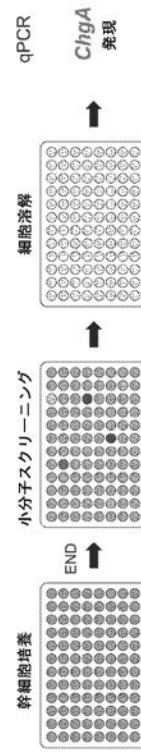


FIG. 3

【 図 4 】

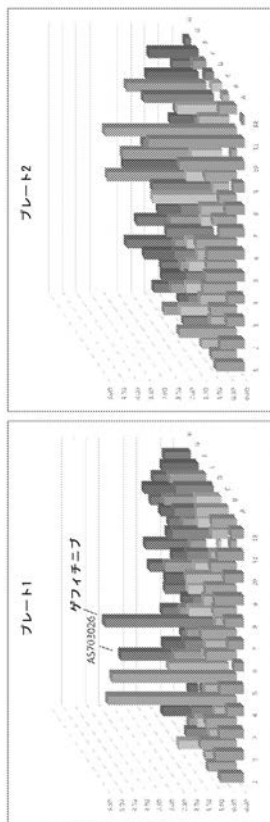


FIG. 4

【 図 5 】

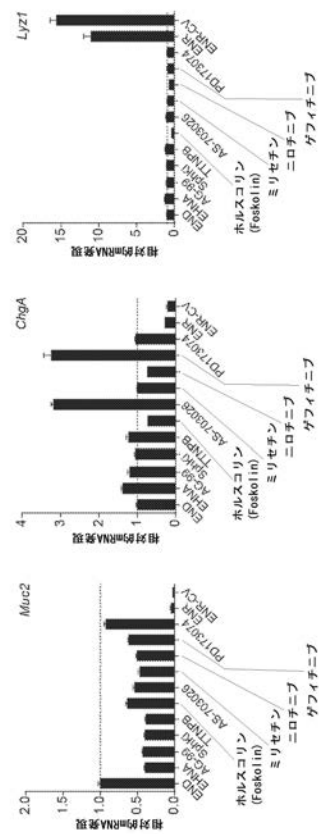


FIG. 5

【 図 6 】

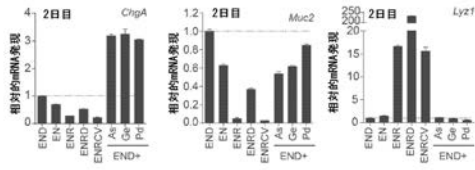


FIG. 6

【 図 7 】

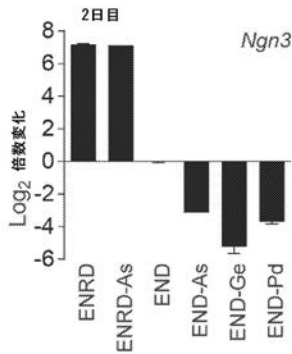


FIG. 7

【 図 8 】

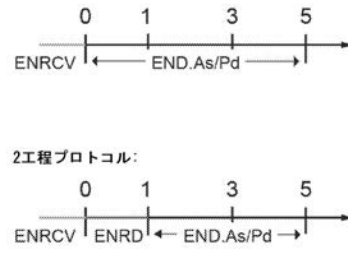


FIG. 8

【 図 9 】

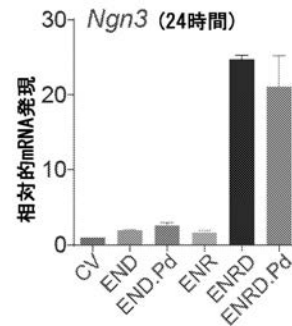


FIG. 9

【 図 1 0 】

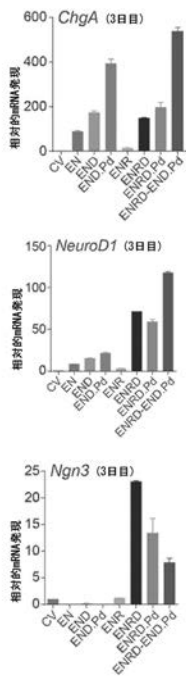


FIG. 10

【 図 1 1 】

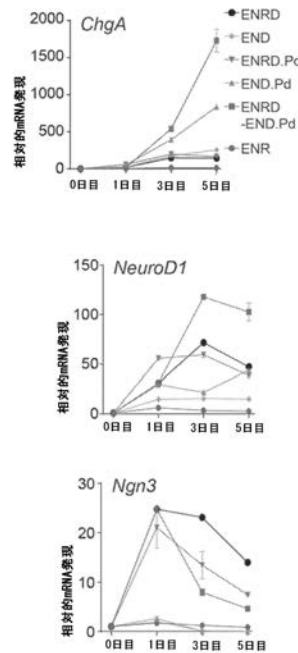


FIG. 11

【 図 1 2 】

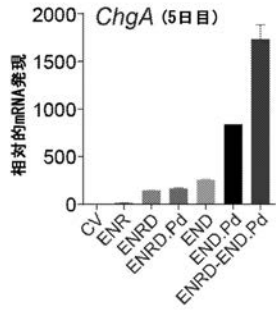


FIG. 12

【 図 1 4 】

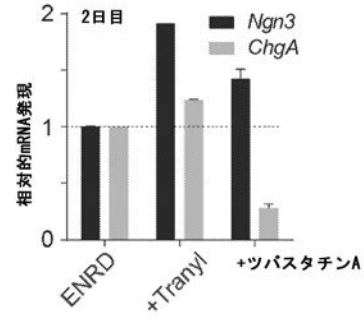


FIG. 14

【 図 1 3 】

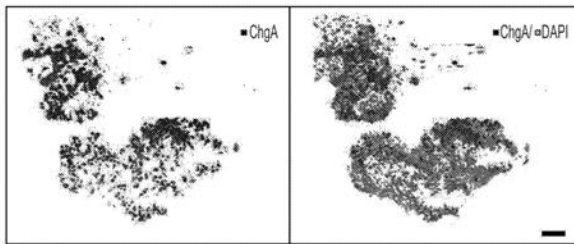


FIG. 13

【 図 1 5 】

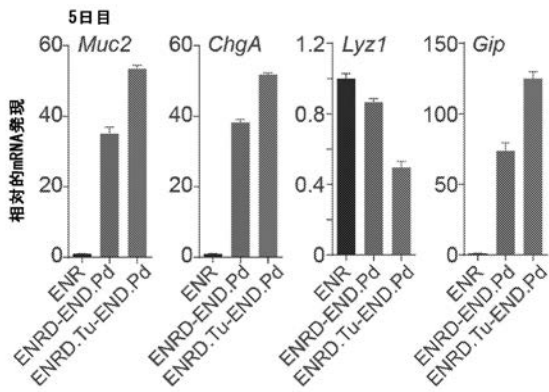


FIG. 15

【 図 1 6 】

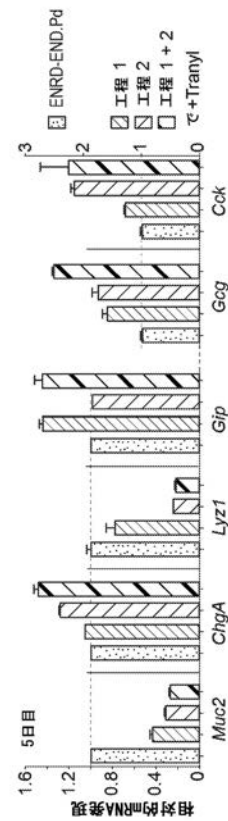


FIG. 16



【 図 2 3 】

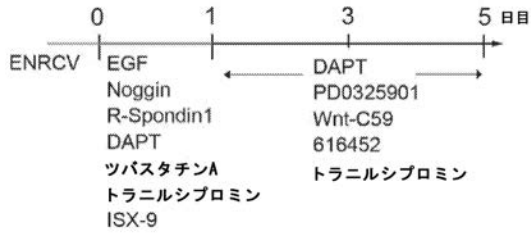


FIG. 23

【 図 2 5 】

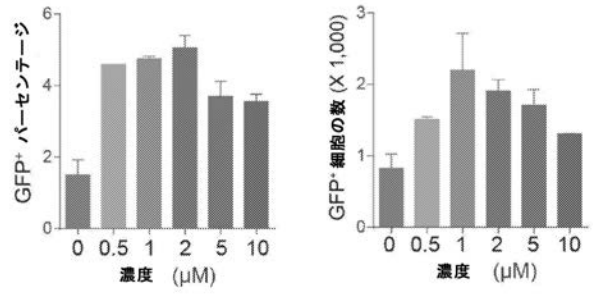


FIG. 25

【 図 2 4 】

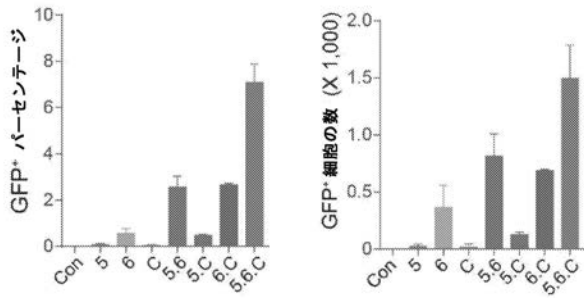


FIG. 24

【 図 2 6 】

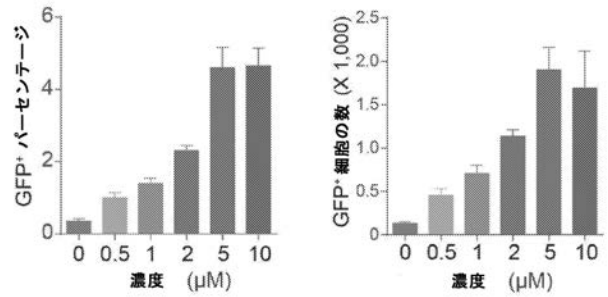


FIG. 26

【 図 2 7 】

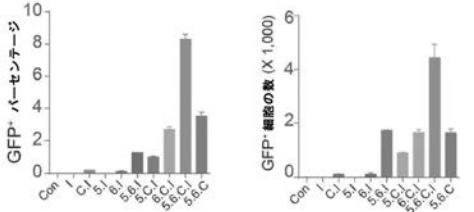


FIG. 27

【 図 2 9 】

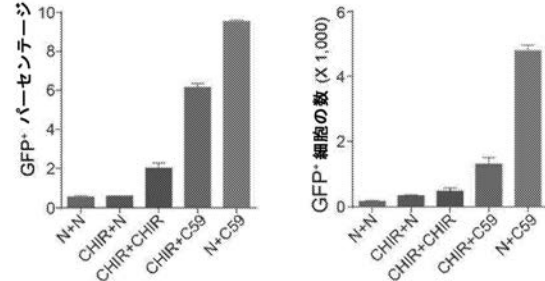


FIG. 29

【 図 2 8 】

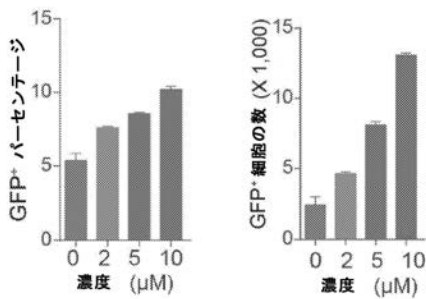


FIG. 28

【 図 3 0 】

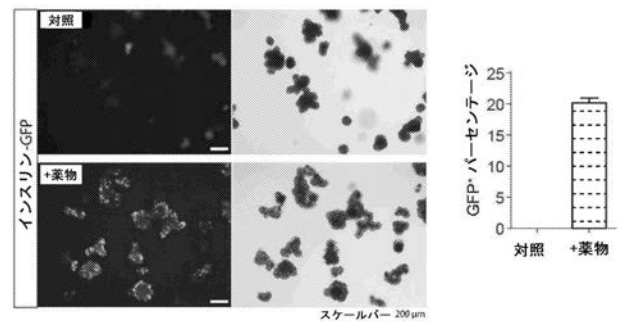


FIG. 30

【 図 3 1 】

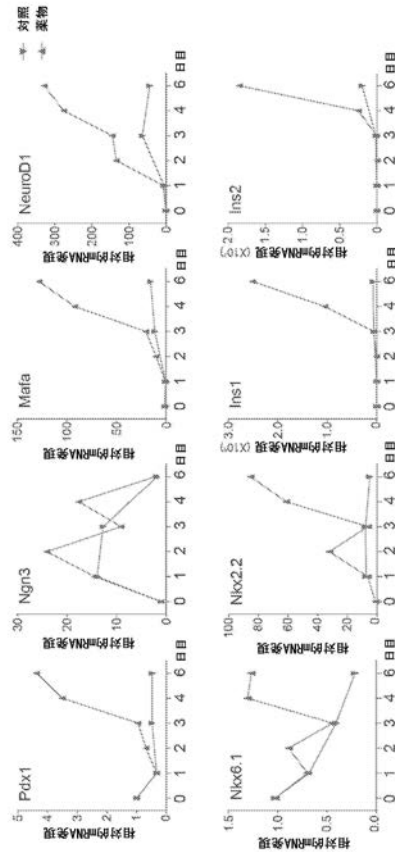


FIG. 31

【 図 3 3 】

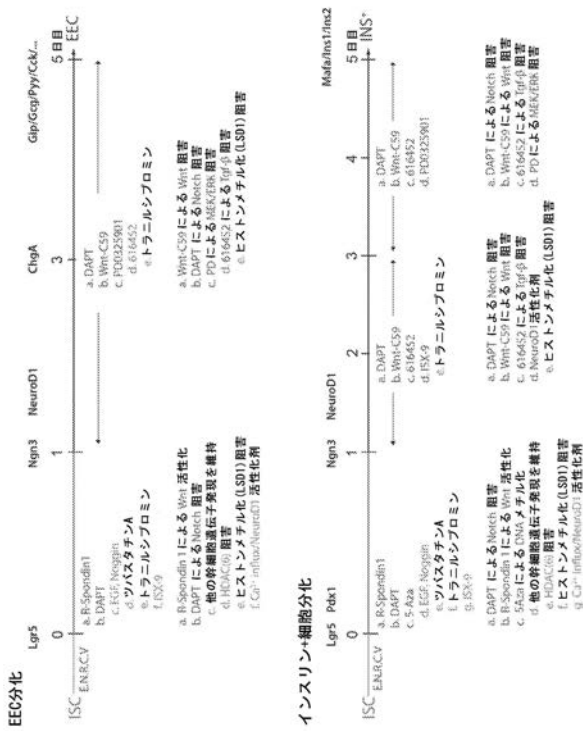


FIG. 33

【 図 3 2 】

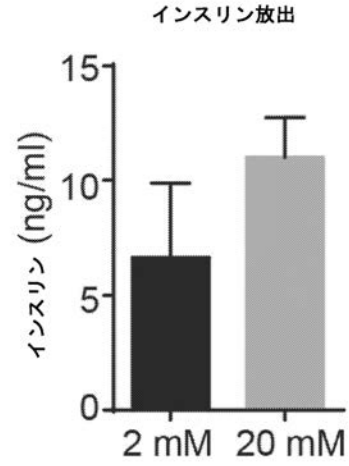


FIG. 32

【 図 3 4 】

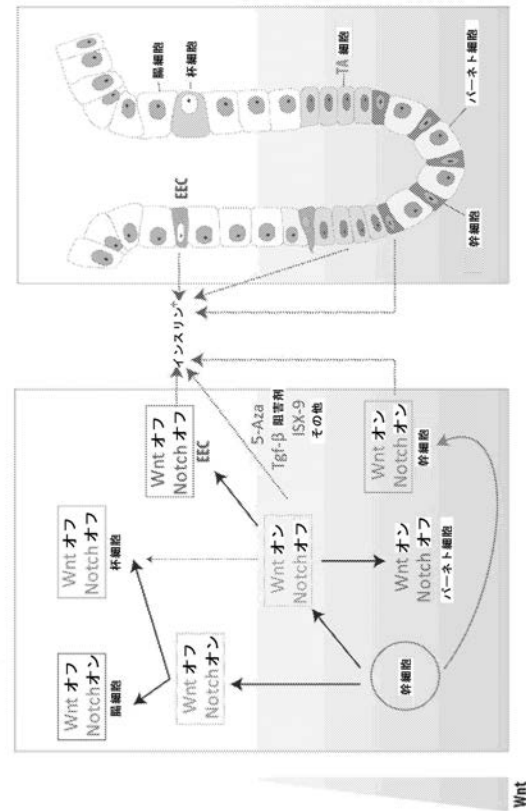


FIG. 34

【 図 3 5 】

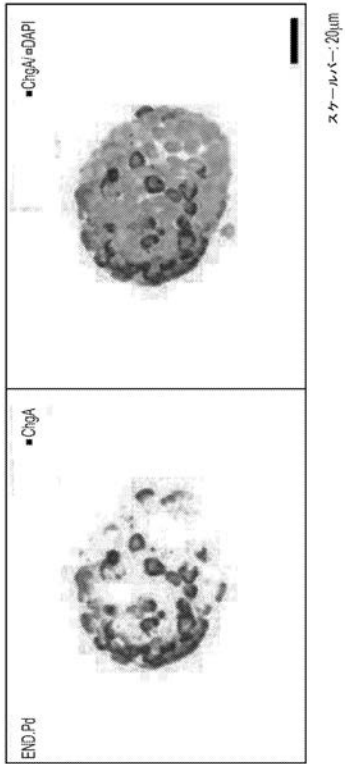


FIG. 35

【 図 3 6 】

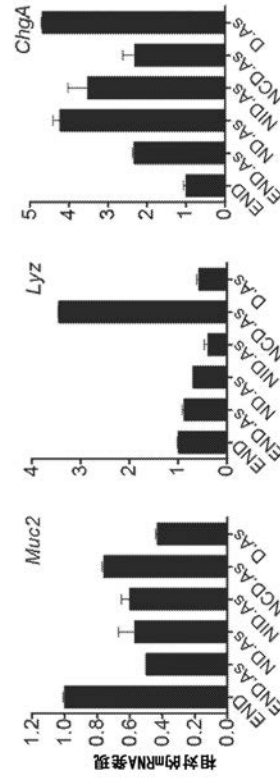


FIG. 36

【 図 3 7 】

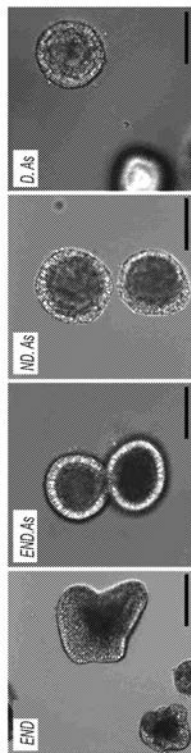


FIG. 37

【 図 3 8 】

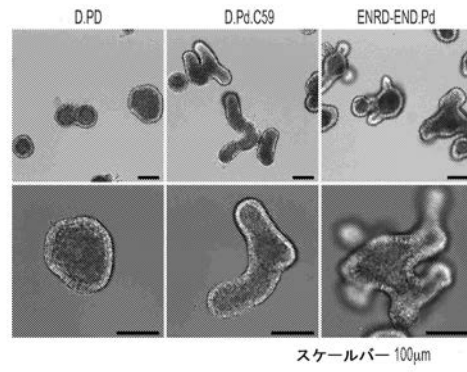


FIG. 38

【 図 3 9 A 】

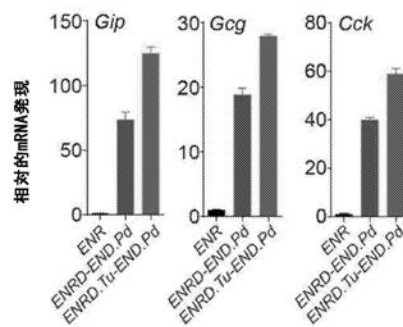


FIG. 39A

【 図 3 9 B - D 】

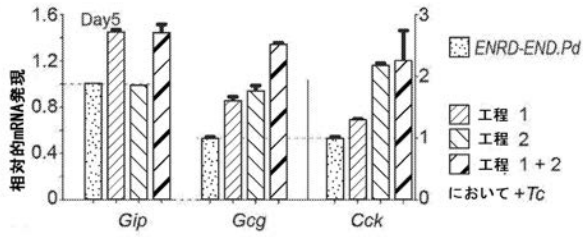


FIG. 39B

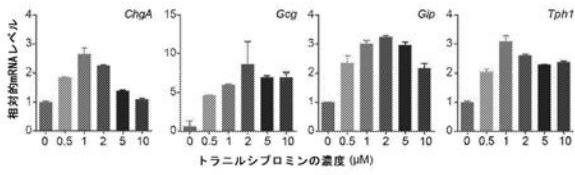


FIG. 39C

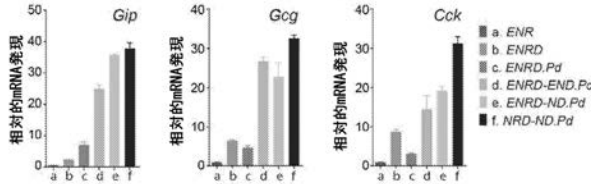


FIG. 39D

【 図 3 9 E 】

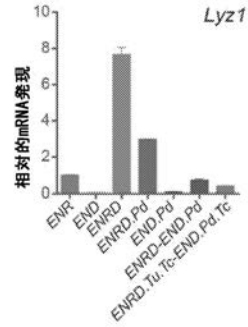


FIG. 39E

【 図 4 0 A 】

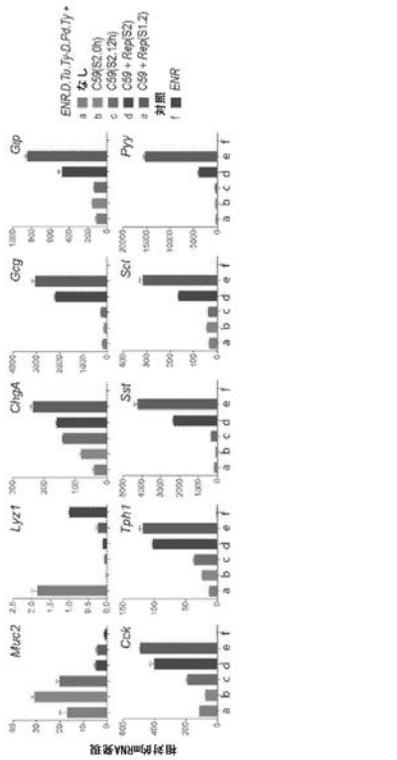


FIG. 40A

【 図 4 0 B 】



FIG. 40B

【 図 4 0 C 】

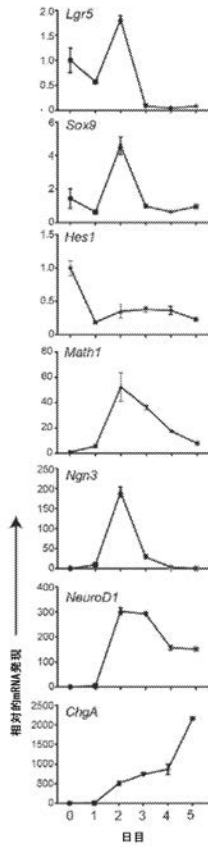


FIG. 40C

【 図 4 0 D 】

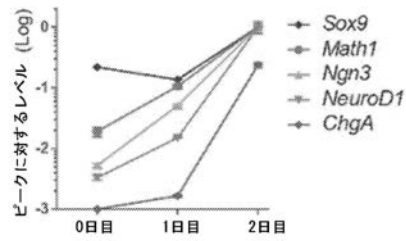


FIG. 40D

【 図 4 0 E 】

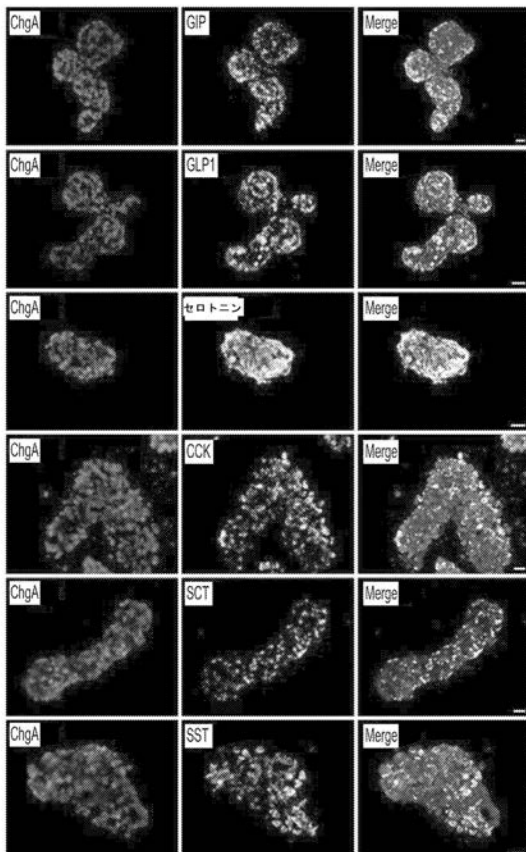


FIG. 40E

【 図 4 1 A 】

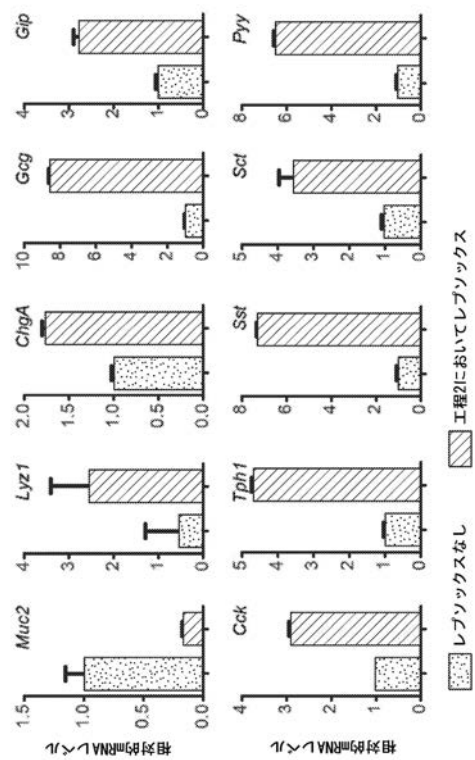


FIG. 41A

【 図 4 1 B 】

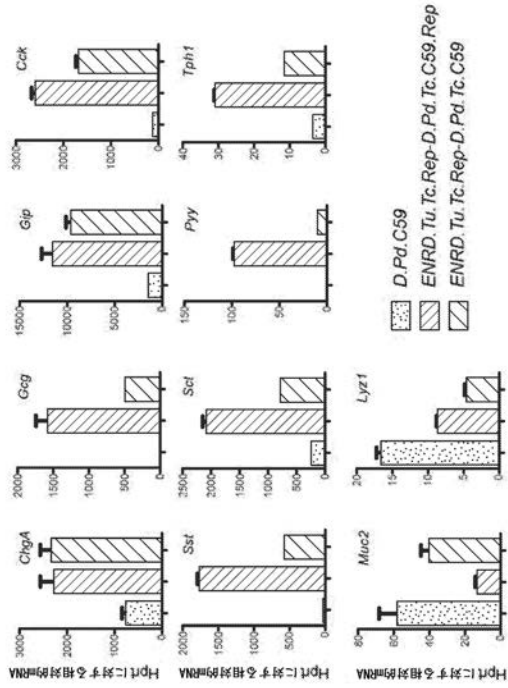


FIG. 41B

【 図 4 1 C 】

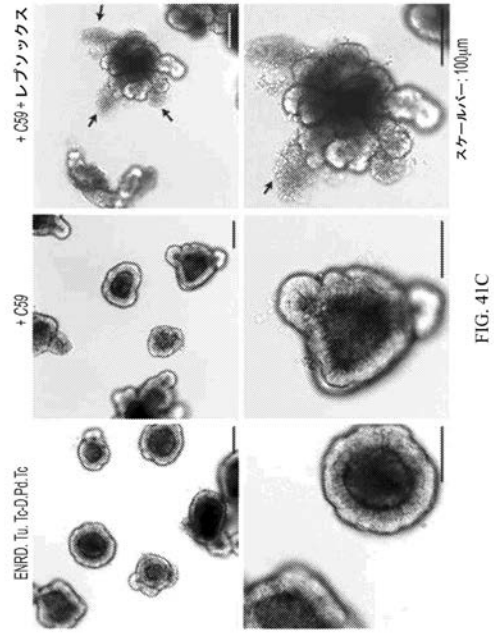


FIG. 41C

【 図 4 2 】

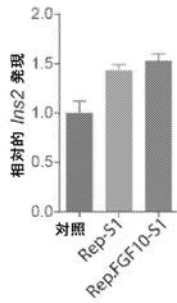


FIG. 42

【 図 4 4 】

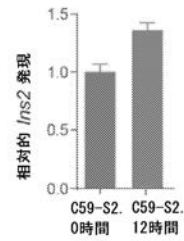


FIG. 44

【 図 4 3 】

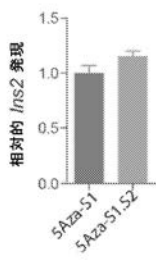


FIG. 43

【 図 4 5 】

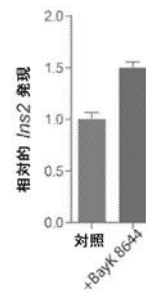


FIG. 45

【 図 4 6 】

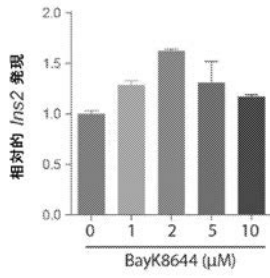


FIG. 46

【 図 4 7 】

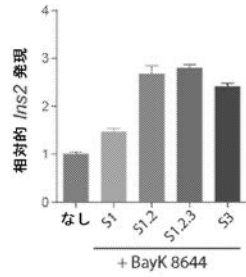


FIG. 47

【 図 4 8 】

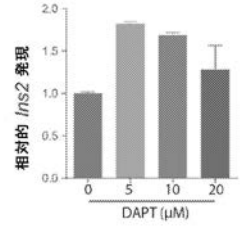


FIG. 48

【 図 4 9 】

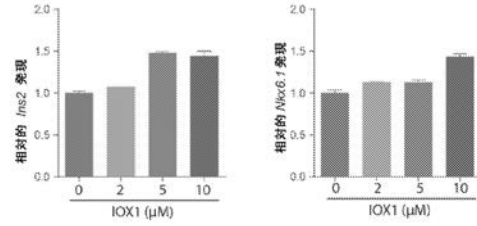


FIG. 49

【 図 5 0 】

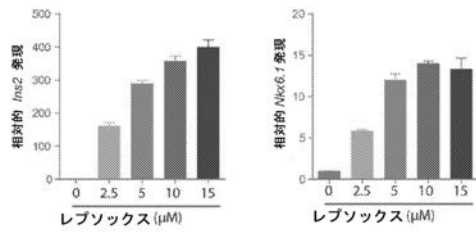


FIG. 50

【 図 5 2 】

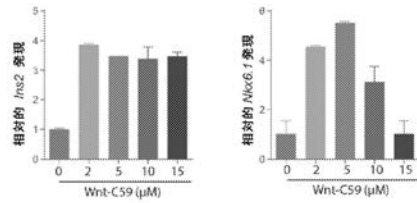


FIG. 52

【 図 5 1 】

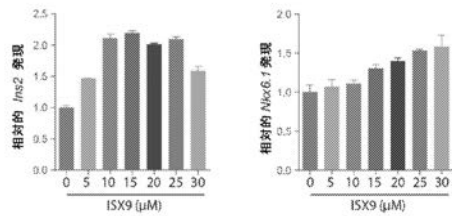


FIG. 51

【 図 5 3 】

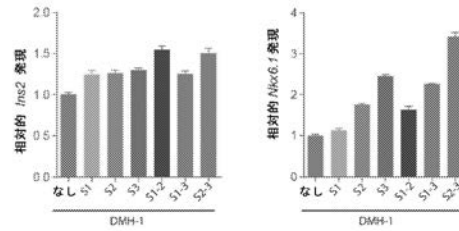


FIG. 53

【 図 5 4 】

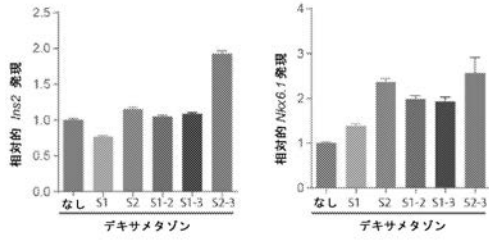


FIG. 54

【 図 5 5 】

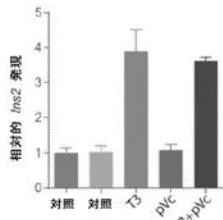


FIG. 55

【 図 5 6 】

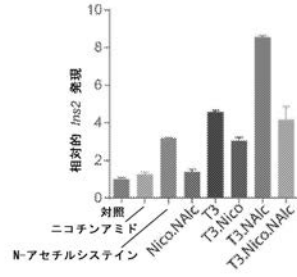


FIG. 56

【 図 5 7 】

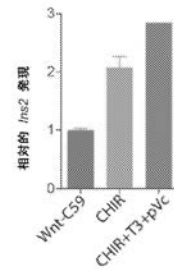


FIG. 57

【 図 5 8 】

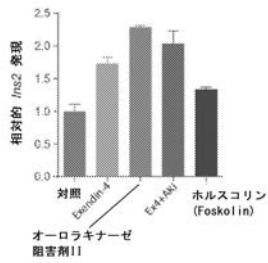


FIG. 58

【 図 5 9 】

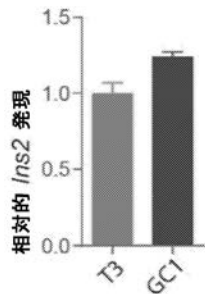


FIG. 59

【 図 6 0 】

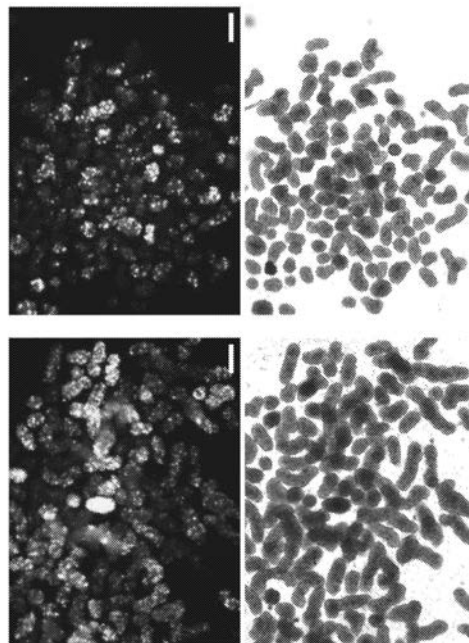


FIG. 60

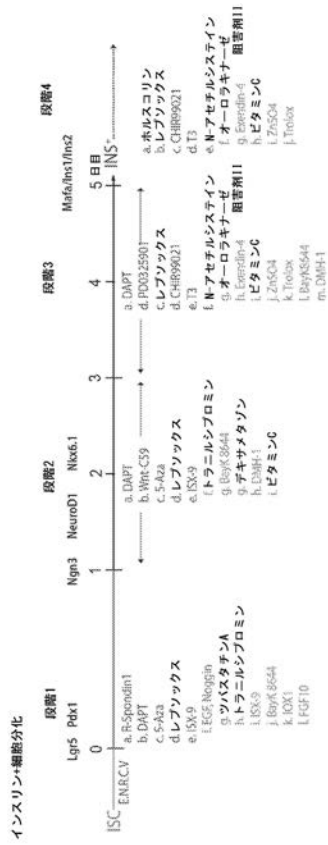


FIG. 61

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/012631
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N5/071 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/159356 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 2 October 2014 (2014-10-02) abstract page 2, paragraph 14 page 5, paragraph 34 page 6, paragraphs 40,41 page 18, paragraph 109 page 21, paragraph 125 page 22, paragraph 127 page 27, line 25 - line 29 page 28, line 14 - line 18 figure 12A  ----- -/--	1-111
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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  4 April 2017		Date of mailing of the international search report  18/04/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Grötzingler, Thilo

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/012631

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 636 731 A1 (UNIV KUMAMOTO NAT UNIV CORP [JP]) 11 September 2013 (2013-09-11) abstract page 3, paragraph 9 page 5, paragraph 11 page 8, paragraph 42 page 15, paragraphs 72,73 -----	1-111
X A	WO 2011/143511 A2 (UNIV COLUMBIA [US]; TALCHAI CHUTIMA [US]; ACCILI DOMENICO [US]) 17 November 2011 (2011-11-17) abstract page 10, paragraph 34 page 12, paragraph 39 page 13, paragraph 42 -----	33, 58-67, 72-74 1-32, 34-57, 68-71, 75-111

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/012631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014159356 A1	02-10-2014	AU 2014240603 A1	05-11-2015
		CA 2905842 A1	02-10-2014
		CN 105358677 A	24-02-2016
		EP 2970890 A1	20-01-2016
		JP 2016510999 A	14-04-2016
		KR 20160006167 A	18-01-2016
		US 2016194604 A1	07-07-2016
		WO 2014159356 A1	02-10-2014
EP 2636731 A1	11-09-2013	CA 2821562 A1	10-05-2012
		CN 103459591 A	18-12-2013
		EP 2636731 A1	11-09-2013
		JP 5875007 B2	02-03-2016
		KR 20130101557 A	13-09-2013
		US 2014199700 A1	17-07-2014
		WO 2012060315 A1	10-05-2012
WO 2011143511 A2	17-11-2011	CN 103429739 A	04-12-2013
		EP 2569430 A2	20-03-2013
		JP 5866106 B2	17-02-2016
		JP 2013534514 A	05-09-2013
		JP 2016127830 A	14-07-2016
		US 2013216554 A1	22-08-2013
		US 2017044532 A1	16-02-2017
		WO 2011143511 A2	17-11-2011

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 2 0 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 31/4375 (2006.01)	A 6 1 K 31/4375	
A 6 1 K 31/42 (2006.01)	A 6 1 K 31/42	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
A 6 1 K 35/38 (2015.01)	A 6 1 K 35/38	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 K 31/444 (2006.01)	A 6 1 K 31/444	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 38/05 (2006.01)	A 6 1 K 38/05	
A 6 1 K 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 31/16	
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18	
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K 31/437	
A 6 1 K 31/13 (2006.01)	A 6 1 K 31/13	
A 6 1 K 35/36 (2015.01)	A 6 1 K 35/36	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/48 (2015.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 K 35/44	
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	G 0 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6897 Z	
	C 1 2 Q 1/686 Z	
	C 1 2 Q 1/6851 Z	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 カーブ, ジェフリー, マイケル  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6 ブルックリン, ナンバー 2, ギブズ ストリート 1 5

(72) 発明者 ランガー, ロバート, サミュエル  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9 ニュートン, モントベール ロード 9 8

(72) 発明者 イン, シアオレイ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 6 9 クインシー, アpartment 7, グリーンリフ ストリート 5 9

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42 QQ49 QR32 QR41

	QR48	QR55	QR62	QR72	QR77	QS25	QS34	QS36	QX02	
4B065	AA90X	AA90Y	AC20	BB04	BB19	BC50	CA24	CA44	CA46	
4C084	AA02	AA17	AA19	AA20	BA01	BA08	BA14	BA22	BA23	DB52
	DB53	MA02	MA16	MA27	MA31	MA32	MA34	MA52	MA63	MA66
	MA67	NA05	NA14	ZA661	ZA681	ZA701	ZB111	ZB321	ZC202	ZC351
	ZC412	ZC751								
4C086	AA01	AA02	BC17	BC67	CB05	CB09	EA17	GA04	GA09	MA01
	MA02	MA04	NA05	NA14	ZA66	ZA68	ZA70	ZB11	ZB32	ZC20
	ZC35	ZC41	ZC75							
4C087	AA01	AA02	AA03	BB44	BB45	BB48	BB50	BB57	BB63	BB64
	MA02	NA05	NA14	ZA66	ZA68	ZA70	ZB11	ZB32	ZC20	ZC35
	ZC41	ZC75								
4C206	AA01	AA02	FA29	HA16	KA01	MA01	MA02	MA04	NA05	NA14
	ZA66	ZA68	ZA70	ZB11	ZB32	ZC20	ZC35	ZC41	ZC75	

专利名称(译)	制备分化的肠内分泌和胰岛素生成细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019506153A</a>	公开(公告)日	2019-03-07
申请号	JP2018535116	申请日	2017-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 布赖汉姆妇女医院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 布里格姆和有限元医院，公司		
[标]发明人	カープジェフリーマイケル ランガーロバートサミュエル インシアオレイ		
发明人	カープ,ジェフリー,マイケル ランガー,ロバート,サミュエル イン,シアオレイ		
IPC分类号	C12N5/071 C12N5/10 A61P3/10 A61P43/00 A61K45/00 A61P3/04 A61P1/04 A61P1/00 A61P31/00 A61P29/00 A61K31/4375 A61K31/42 A61K31/7068 A61K35/38 A61K35/545 A61K31/444 A61K38/16 A61K38/05 A61K31/16 A61K38/18 A61K31/437 A61K31/13 A61K35/36 A61K35/28 A61K35/48 A61K35/ /44 A61K35/30 A61K45/06 G01N33/53 C12Q1/6897 C12Q1/686 C12Q1/6851		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P29/00 A61P31/00 C12N5/0613 C12N5/0679 C12N2500/38 C12N2500/62 C12N2501/01 C12N2501/065 C12N2501/11 C12N2501/119 C12N2501/15 C12N2501/ /155 C12N2501/335 C12N2501/395 C12N2501/415 C12N2501/42 C12N2501/71 C12N2501/72 C12N2501/727 C12N2501/999 C12N2502/23 C12N2533/90 C12N5/0678 C12N2501/13 G01N33/5008		
FI分类号	C12N5/071 C12N5/10 A61P3/10 A61P43/00.105 A61K45/00 A61P3/04 A61P1/04 A61P1/00 A61P31/ /00 A61P29/00 A61K31/4375 A61K31/42 A61K31/7068 A61K35/38 A61K35/545 A61K31/444 A61K38/ /16 A61K38/05 A61K31/16 A61K38/18 A61K31/437 A61K31/13 A61K35/36 A61K35/28 A61K35/48 A61K35/44 A61K35/30 A61P43/00.121 A61K45/06 G01N33/53.Y G01N33/53.M C12Q1/6897.Z C12Q1/ /686.Z C12Q1/6851.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/ /QQ49 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AC20 4B065/ /BB04 4B065/BB19 4B065/BC50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA14 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/ /DB52 4C084/DB53 4C084/MA02 4C084/MA16 4C084/MA27 4C084/MA31 4C084/MA32 4C084/MA34 4C084/MA52 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C084/ /ZA681 4C084/ZA701 4C084/ZB111 4C084/ZB321 4C084/ZC202 4C084/ZC351 4C084/ZC412 4C084/ /ZC751 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC17 4C086/BC67 4C086/CB05 4C086/CB09 4C086/EA17 4C086/GA04 4C086/GA09 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ /ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA70 4C086/ZB11 4C086/ZB32 4C086/ZC20 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB44 4C087/BB45 4C087/BB48 4C087/ /BB50 4C087/BB57 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA70 4C087/ZB11 4C087/ZB32 4C087/ZC20 4C087/ZC35 4C087/ZC41 4C087/ /ZC75 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/FA29 4C206/HA16 4C206/KA01 4C206/MA01 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/NA14 4C206/ZA66 4C206/ZA68 4C206/ZA70 4C206/ZB11 4C206/ /ZB32 4C206/ZC20 4C206/ZC35 4C206/ZC41 4C206/ZC75		
优先权	62/276814 2016-01-08 US		
其他公开文献	JP2019506153A5		

## 摘要(译)

哺乳动物产后细胞群（例如包含产后干细胞的那些）会上调ChgA，并通过用多种促进产后干细胞分化形成肠内分泌细胞的小分子进行处理，从该人群获得肠内分泌细胞（EEC）的人群。ChgA上调使得通过ChgA免疫染色测定法测得所得细胞群中表达CGA的细胞比例至少约为1.5%。

可用于将产后细胞分化为肠内分泌细胞的小分子包括Wnt激活剂，Notch抑制剂，Wnt抑制剂，MEK / ERK抑制剂，生长因子，HDAC抑制剂，组蛋白甲基化。可以提及抑制剂，Tgf-β抑制剂和NeuroD1激活剂中的至少一种。而且，通过用增加胰岛素表达的多个小分子处理该群体，来增加哺乳动物细胞群体中的胰岛素表达。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2019-506153 (P2019-506153A)
		(43) 公表日 平成31年3月7日 (2019.3.7)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P</b> 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P</b> 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K</b> 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 75 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2018-535116 (P2018-535116)	(71) 出願人 596060697	
(86) (22) 出願日 平成29年1月6日 (2017.1.6)		マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
(85) 翻訳文提出日 平成30年8月23日 (2018.8.23)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 39ケンブリッジ、マサチューセッツ・ア ヴェニュー・77
(86) 国際出願番号 PCT/US2017/012631		
(87) 国際公開番号 W02017/120543		
(87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)	(71) 出願人 515251735	
(31) 優先権主張番号 62/276,814		ザ フリガム、アンド ウィミンズ ホス ピタル、インコーポレイテッド
(32) 優先日 平成28年1月8日 (2016.1.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 115 ポストン、フランシス ストリ ート 75
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100095832	
		弁理士 細田 芳徳
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 分化した腸内分泌細胞およびインスリン産生細胞の作製		