

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和7年6月19日(2025.6.19)

【国際公開番号】WO2022/265086

【出願番号】特願2023-530419(P2023-530419)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0793(2010.01)

C 1 2 N 5/074(2010.01)

C 1 2 N 5/0735(2010.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

A 6 1 P 9/00(2006.01)

A 6 1 P 25/00(2006.01)

A 6 1 P 25/02(2006.01)

A 6 1 K 35/30(2015.01)

A 6 1 L 27/38(2006.01)

A 6 1 K 35/545(2015.01)

10

【F I】

C 1 2 N 5/0793

C 1 2 N 5/074 Z N A

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/68

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 25/02

A 6 1 K 35/30

A 6 1 L 27/38 3 0 0

A 6 1 K 35/545

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月10日(2025.6.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

支持細胞の非存在下、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを製造する方法であって、
 (1) 多能性幹細胞を、b F G F が実質的に含まれず、かつ T G F シグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養する工程と、
 (2) 工程(1)で得られた細胞を、神経細胞へと分化誘導する工程とを含む、方法。

40

【請求項2】

工程(2)が、
 (2a) 工程(1)で得られた細胞を、T G F シグナル阻害剤、及び W n t シグナル伝達阻害剤を含む培養液中で浮遊培養して、細胞塊を得る工程と、
 (2b) 工程(2a)で得られた細胞塊を、T G F シグナル阻害剤及び W n t シグナル

50

伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中で浮遊培養して、大脳オルガノイドを得る工程とを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (2 a) の浮遊培養が静置培養である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (2 b) の浮遊培養が振とう培養である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (1) の培養期間が 3 日間未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (1) の培養期間が 1 2 時間以上 2 日間以下である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

工程 (1) の培養液が、S B 4 3 1 5 4 2、A - 8 3 - 0 1、及び X A V - 9 3 9 からなる群から選ばれる T G F シグナル阻害剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (1)、工程 (2 a)、及び工程 (2 b) における培養液が、無血清培養液である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞又はヒト胚性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

20

(3) 工程 (2) で得られた複数の細胞塊から、細胞塊の形状、内部構造、サイズ、表面の色彩若しくは模様、及び遺伝子発現からなる群から選ばれる 1 以上を指標とし、大脳オルガノイドを選別する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される細胞培養物であって、複数の球状の細胞塊を含み、

前記複数の球状の細胞塊に占める大脳オルガノイドの割合が 4 0 % 以上である、細胞培養物。

【請求項 12】

前記大脳オルガノイドに占める大脳皮質様構造物の割合が 4 0 % 以上である、請求項 1 1 に記載の細胞培養物。

30

【請求項 13】

大脳オルガノイドが、更に以下の (1) ~ (5) :

(1) 球状の細胞塊であること、

(2) 細胞塊の内部に、大脳皮質様構造物を有すること、

(3) 表面に色素沈着を有さないこと、

(4) 細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、及びバルーン状形状のいずれも有さないこと、並びに、

(5) N E U R O D 6、N E U R O D 2、S S T R 2、T B R 1、Z B T B 1 8、N H L H 1、I G F B P L 1、N R N 1、R T N 1、T H S D 7 A、N R X N 1、B H L H E 2、C A L B 2、K H D R B S 3、C C S A P、P D E 1 A、N E U R O D 1、N P T X 1、N X P H 4、N T S、N E U R O G 2、O L F M 1、P R D M 8、C O R O 2 B、T P 5 3 I 1 1、Z F P M 2、P C D H 9、N E L L 2、S R R M 4、S C G 3、D C C、E P B 4 1 L 3、S L C 1 7 A 7、S T 1 8、N S G 2、E M X 1、C A P 2、S Y T 4、N S M F、A N K 3、M Y T 1 L、F S T L 5、C E L F 4、B 3 G A T 1、E P H A 5、N H L H 2、及び D L L 3 からなる群から選ばれる少なくとも 1 つのマーカーを発現していること

40

から選択される、1 以上の特徴を有する細胞塊である、請求項 1 2 に記載の細胞培養物。

【請求項 14】

(a) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の 1 0 % 以下であり、

50

(b) 神経細胞マーカー、皮質V/V I層マーカー、及び前脳マーカーからなる群から選ばれる1つ以上のマーカーが陽性である細胞数が全細胞数の70%以上であり、且つ
 (c) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないことを特徴とする、大脳皮質細胞塊。

【請求項15】

前記(a)の増殖性マーカーがKi67であり、

前記(b)の神経細胞マーカーがIII-Tubulinであり、皮質V/V I層マーカーがCtip2であり、前脳マーカーがFOXG1である、
 請求項14に記載の大脳皮質細胞塊。

【請求項16】

(d) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーをさらに発現している、請求項14に記載の大脳皮質細胞塊。

【請求項17】

SLC17A7を発現している、請求項16に記載の大脳皮質細胞塊。

【請求項18】

GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、請求項15に記載の大脳皮質細胞塊。

【請求項19】

支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳皮質細胞塊を製造する方法であって、

(i) 多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る工程と、
 (ii) 工程(i)で得られた大脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤を含む培養液中で培養して、大脳皮質細胞塊を得る工程と
 を含む、方法。

【請求項20】

前記工程(i)において、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法により多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

(A) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の5%以下であり、
 (B) 神経細胞マーカー、皮質V/V I層マーカー、及び前脳マーカーから選ばれる1つ以上のマーカー陽性細胞数が全細胞数の70%以上であり、且つ
 (C) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないことを特徴とする、高純度大脳皮質細胞塊。

【請求項22】

前記(A)の増殖性マーカーがKi67であり、

前記(B)の神経細胞マーカーがIII-Tubulinであり、皮質V/V I層マーカーがCtip2であり、前脳マーカーがFOXG1である、
 請求項21に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

【請求項23】

(D) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC

10

20

30

40

50

、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子を発現している、請求項2_1に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

【請求項24】

SLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を発現している、請求項2_3に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

【請求項25】

GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、請求項2_1に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

10

【請求項26】

支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から高純度大脳皮質細胞塊を製造する方法であって、

(i) 多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る工程と、

(ii) 工程(i)で得られた大脳オルガノイドを、培養液中で培養する工程と、

(iii) 工程(ii)で得られた細胞培養物を、単細胞又は2~5個の細胞の集合体(Cell clump)にまで分散させる工程と、

(iv) 工程(ii)で得られた細胞培養物又は工程(iii)で得られた細胞集団を、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養して、細胞塊を得る工程と

20

を含み、前記工程(ii)の培養液及び/又は前記工程(iv)の培養液は、Notchシグナル阻害剤を含む、方法。

【請求項27】

前記工程(i)において、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法により多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る、請求項2_6に記載の方法。

【請求項28】

工程(ii)に付与する大脳オルガノイドが、神経細胞への分化誘導開始から28日後~44日後の大脳オルガノイドである、請求項1_9又は2_6に記載の方法。

【請求項29】

工程(ii)の培養期間が2~6日間である、請求項1_9又は2_6に記載の方法。

30

【請求項30】

工程(iv)の培養期間が2~14日間である、請求項1_9又は2_6に記載の方法。

【請求項31】

前記Notchシグナル阻害剤は、セクレターゼ阻害剤である、請求項1_9又は2_6に記載の方法。

【請求項32】

前記セクレターゼ阻害剤がN-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester(DAPT)又はCompound Eである、請求項3_1に記載の方法。

【請求項33】

請求項2_1に記載の高純度大脳皮質細胞塊を含む細胞集団であって、前記高純度大脳皮質細胞塊のサイズ、形状又は構成細胞組成が均一である、細胞集団。

40

【請求項34】

請求項1_4~1_8のいずれか1項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項2_1~2_5のいずれか1項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項3_3に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項35】

請求項1_4~1_8のいずれか1項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項2_1~2_5のいずれか1項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項3_3に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を含む、移植用組織。

50

【請求項 3 6】

請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項 3 3 に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を有効成分として含む、脳血管障害治療薬。

【請求項 3 7】

(a a) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、G A D 2、C O L 1 A 1、T Y R、T T R 及び H O X A 2 からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子又は該遺伝子によりコードされるタンパク質もしくはその断片の発現量を測定する工程、及び

(b b) 工程 (a a) の測定結果に基づき、前記遺伝子の発現量が基準値以下である場合に、前記大脳オルガノイド又は前記大脳皮質細胞塊に含まれる目的外細胞の量が基準以下であると評価する工程、

を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法。

10

【請求項 3 8】

(A A) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、N E U R O D 6、N E U R O D 2、S S T R 2、T B R 1、Z B T B 1 8、N H L H 1、I G F B P L 1、N R N 1、R T N 1、T H S D 7 A、N R X N 1、B H L H E 2 2、C A L B 2、K H D R B S 3、C C S A P、P D E 1 A、N E U R O D 1、N P T X 1、N X P H 4、N T S、N E U R O G 2、O L F M 1、P R D M 8、C O R O 2 B、T P 5 3 I 1 1、Z F P M 2、P C D H 9、N E L L 2、S R R M 4、S C G 3、D C C、E P B 4 1 L 3、S L C 1 7 A 7、S T 1 8、N S G 2、E M X 1、C A P 2、S Y T 4、N S M F、A N K 3、M Y T 1 L、F S T L 5、C E L F 4、B 3 G A T 1、E P H A 5、N H L H 2、及び D L L 3 からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定する工程、及び

(B B) 工程 (A A) の測定結果に基づき、前記遺伝子の発現量が基準値以上である場合に、前記大脳オルガノイド又は前記大脳皮質細胞塊に含まれる目的細胞の量が基準以上であると評価する工程、

を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法。

20

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 6

30

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 6】

〔神経幹細胞〕

本明細書において「神経幹細胞」は、神経系細胞への分化が運命づけられているが、複数の神経系細胞へ分化する能力を有し増殖性を保っている幹細胞を意味し、神経前駆細胞への分化能、及び大脳皮質細胞への分化能を共に有する細胞である。中間体フィラメントタンパク質（ネスチン、ビメンチン等）、転写因子 S O X 1、S O X 2、P A X 6 等の原始的神経外胚葉及び神経幹細胞のマーカー等によって同定されうる。本明細書における神経幹細胞には、放射状グリア（Radial Glia）が含まれる。

40

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 2】

非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器として、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメ

50

タクリル酸 (poly-HEMA)、非イオン性の界面活性ポリオール (Pluronic F-127等) 又はリン脂質類似構造物 (例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー (Lipidure (登録商標))) によるコーティング処理した培養容器を使用することができる。浮遊培養、とくにSFE Bq法において用いられる培養容器として、Prime Surface (登録商標) (タンパク質低吸着処理96穴プレート、住友ベークライト製) が挙げられる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

10

【補正の内容】

【0076】

<ROCK阻害剤>

ROCK阻害剤は、Rho-associated coiled-coilキナーゼ (ROCK) の阻害剤であり、ROCKの機能を抑制する物質である限り特に限定されない。ROCK阻害剤としては、Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride)、H-1152 ((S)-4-Methyl-5-((2-methyl-1,4-diazepan-1-yl)sulfonyl)isoquinoline dihydrochloride)、Fasudil (HA-1077; 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)homopiperazine Hydrochloride)、Wf-536 (4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-(pyridin-4-yl)benzamide)、Thiazovivin (N-Benzyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)thiazole-4-carboxamide)、Ripasudil (4-Fluoro-5-[[2S]-hexahydro-2-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl]sulfonyl]isoquinoline)、GSK429286 (4-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-N-(6-Fluoro-1H-indazol-5-yl)-2-methyl-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxamide)、RKI-1447 (N-[(3-Hydroxyphenyl)methyl]-N'-[4-(4-pyridinyl)-2-thiazolyl]urea)、Azaindole 1 (6-chloro-N4-[3,5-difluoro-4-[(3-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)oxy]phenyl]pyrimidine-2,4-diamine)、HA-1100 (1-[[1,2-Dihydro-1-oxo-5-isoquinolinyl]sulfonyl]hexahydro-1H-1,4-diazepine)、Y-39983 (4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-ylbenzamide)等が挙げられる。ROCK阻害剤として、好ましくはY-27632が挙げられる。

20

30

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

1つの培養コンパートメント中に播く細胞の数は、1つの培養コンパートメントにつき1つの細胞塊が形成され、且つ本発明の方法によって、該細胞塊において、前脳細胞への分化誘導が可能であれば、特に限定されないが、1つの培養コンパートメントにつき、工程(1)で得られる細胞を、通常細胞数が約 1×10^3 ~ 約 5×10^4 個、好ましくは約 1×10^3 ~ 約 2×10^4 個、より好ましくは約 2×10^3 ~ 約 1.2×10^4 個播く。そして、細胞を迅速に凝集させることにより、1つの培養コンパートメントにつき、通常約 1×10^3 ~ 約 5×10^4 個、好ましくは約 1×10^3 ~ 約 2×10^4 個、より好ましくは約 2×10^3 ~ 約 1.2×10^4 個の細胞塊が1個形成される。

40

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

50

【補正の内容】

【0123】

工程(2a)で用いられる培養液、すなわち、細胞塊の形成時及び細胞塊の浮遊培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されず、上述の定義における、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

10

【補正の内容】

【0125】

細胞塊の形成時に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、上述のものを使用できるが、例えば、KSR(knockout serum replacement)(Invitrogen社製)、Chemically-defined Lipid concentrate(Gibco社製)、Glutamax(Gibco社製)が挙げられる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0127

【補正方法】変更

20

【補正の内容】

【0127】

または、細胞塊の形成時に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、上述のものを使用できるが、例えば、KSR(Gibco社製)、Chemically-defined Lipid concentrate(Gibco社製)、Glutamax(Gibco社製)が挙げられる。具体的には、それぞれの製品の使用マニュアルに従った適量の血清代替物(例えば、1~30%のKSR)を含む培地を用いることができる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0165

【補正方法】変更

30

【補正の内容】

【0165】

大脳オルガノイドを選別するための各指標は、一般的な大脳オルガノイドの定義に従うものであることが好ましく、例えば、以下の(1)~(5)の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ又は4つを満たす細胞塊を大脳オルガノイドと判定してもよい。

(1) 球状の細胞塊であること、

(2) 細胞塊の内部に、大脳皮質様構造物を有すること、

(3) 細胞塊の表面に色素沈着を有しないこと、

(4) 細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、バルーン状形状を有しないこと、並びに、

(5) 細胞塊が、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBP1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つ、少な

40

50

くとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの遺伝子を発現していること。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0170

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0170】

上記(1)における球状及び上記(2)における大脳皮質様構造物は上記のとおりである。ここにおいて、球状ではあるが大脳皮質様構造物を持たない細胞塊の代表例は、図31において、「Potato-like」、又は「Jelly-like」と称される細胞塊である。

10

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0250

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0250】

本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊は、直径(円相当径)が約100 μ m~1000 μ m、好ましくは約300 μ m~600 μ mの球状様の細胞塊であってよい。細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個、好ましくは約 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個であってよい。または、本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊は、直径(円相当径)が約100 μ m~5000 μ m、好ましくは約300 μ m~2000 μ mの球状の細胞塊であってよい。細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個、好ましくは約 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 個であってよい。

20

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0301

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0301】

30

(ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)の維持培養)

hiPSCは、ラミニン511のE8フラグメントであるiMatrix-511(株式会社ニッピ)を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるように6ウェルプレートに添加しコーティングしたプレート上にてStemFit(登録商標)AK02N培地又はAK03N培地(以下、「StemFit」という場合がある;味の素ヘルシーサプライ社製)を用いて維持培養した。継代は、hiPSCを $0.5 \times \text{Tryple Select}$ を用いて、細胞を37で8分間処理し、単細胞に分離後、 $1 \sim 1.5 \times 10^4$ 細胞の細胞密度で6ウェルプレートに播種した。継代は7日ごとに行った。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0338

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0338】

40

工程(iii)において、上記工程(ii)で得られた大脳皮質細胞塊を、 $0.5 \times \text{Tryple Select}$ 、 0.25 mM EDTA 溶液中で37、20分間インキュベートし、さらに、工程(2b)の培地に 25 U/mL DNase I を添加した溶液中で37、10分間インキュベートした。その後、ピペティングを行って単細胞に分散させたのち、分散された細胞を、工程(2b)の培地に 10 ng/mL GDNF 、 20 ng/mL BDNF 、 $200 \mu\text{M}$ アスコルビン酸、 $400 \mu\text{M}$ dibutyryl

50

l - c A M P、50 μ M Y - 27632を添加した培地に懸濁した。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0355

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0355】

<実施例6> 工程(2)の工程(i i) - (i v)の効果2:移植片の増大抑制効果

図17の(A)の分化誘導スキームで得られた大脳皮質細胞塊をScidマウス(日本クレア)の脳へ定位脳移植法によって 1.5×10^5 細胞を移植し、移植3か月後に、4%パラホルムアルデヒドによって脳を灌流固定し、35 μ m厚の凍結切片を作成した。作成した脳切片を用いて、Ku80の免疫染色でヒト細胞の生着を評価した。免疫染色した移植片の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を図19に示す。

10

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0363

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0363】

<実施例7> 神経分化準備ありで誘導したオルガノイドに対するDAPIの効果の検討 - Day7 ~ Day35までは、実施例1の図3のスキームと同じ方法で培養した。「神経分化準備あり」(工程(1)あり)では、工程(1)にStemFitのC液非添加培地(=bFGF不含培地)に5 μ M SB431542を添加したものを使用し、「神経分化準備なし」(工程(1)なし)では、StemFit培地を用いた。その後、実施例4の工程(i i)に記載の方法で大脳皮質細胞塊を誘導し、免疫染色で評価を行った。また、実施例4の工程(i i i)、工程(i v)に記載の方法で単細胞に分散後、再凝集して、高密度大脳皮質細胞塊を誘導し、フローサイトメトリーで解析を行った。

20

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0379

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0379】

上記12回の分化誘導で得られた大脳オルガノイドを観察した結果、7つの形態学的なグループ、すなわち、ロゼット構造を細胞塊全体に含む大脳オルガノイド(ロゼット構造; Rosette)、透明度が低く明瞭な構造が認められないオルガノイド(じゃがいも状組織; Potato-like)、風船状の構造が付随したオルガノイド(風船状組織; Balloon)、繊維状の構造が付随したオルガノイド(綿状組織; Cotton-like)、透明度が高く、内部に嚢胞状の構造が見られるオルガノイド(透明性組織; Transparent)、黒色又は茶色の色素沈着が見られるオルガノイド(色素; Pigment)、透明度が高く、明瞭な構造が見られないオルガノイド(ゼリー状組織; Jelly-like)に分類できると考えられた(図31)。上記形態分類に従って、統計した結果を図32、表5に示す。

30

40

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0385

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0385】

個々の細胞の遺伝子発現の類似性や相違性をUMA P法により得られた2次元データを

50

視覚化することにより評価した。具体的には、上記PCAにより、数万個の細胞はそれぞれその遺伝子発現データに基づく50次元のデータ（主成分）によって表現されているが、UMAP法により類似性や相違性を維持しながら2次元のデータに圧縮され、平面上のプロットに変換される。UMAP法により得られたプロットでは、それぞれの点は、個々の細胞を示し、遺伝子発現パターンが類似した細胞ほど近い位置にプロットされる。類似性が特に大きな細胞が多数存在するとそれらの点がごく近くに集まった塊状の構造が現れる。このような構造を構成する細胞群は、酷似した遺伝子発現を示す細胞、すなわち同種又はごく近縁の細胞種であると解釈される（Nature Biotechnology volume 37, pages 38-44 (2019)）。

【手続補正18】

10

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0396

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0396】

Neural Crestのクラスターでは、Neural crest cell (NCC)の分化過程で発現が認められる様々な遺伝子の発現が認められた (Simoes-Costa M et al., Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe, Development, 2015)。“Neural crest - 1”のクラスターでは、NCCの起源である、Neural Plate Borderで発現が見られるZIC遺伝子群、Msx1などの発現が認められた。“Neural crest - 2”のクラスターでは、NCCへの分化初期で発現が見られる、Smadシグナル下流のID遺伝子群やEpithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 関連遺伝子 (LGALS1、TWIST1、PRRX1、GPC3 (Fazilaty H et al., A gene regulatory network to control EMT programs in development and disease, 2019)の発現が見られた。“Neural crest - 3”では、NCCのMigration期に発現する、SOX10、TFAP2Aなどの発現が見られた。

20

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0403

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0403】

大脳皮質神経細胞 (Cortical Neuron)のマーカーとして同定した、VGLUT1、EMX1は、Rosettesのオルガノイドで発現が認められた。GABAergic neuronのマーカーとして同定したDLX2、GAD2は、じゃがいも状 (Potato-like)のオルガノイドで高く発現が認められた。MelanocyteのマーカーであるTYRは、Pigmentのオルガノイドで高く発現が見られた。CNS FibroblastのマーカーであるCOL1A1は、風船状組織と綿状組織で発現が見られた。Caudal NeuronのマーカーのHOXA2はゼリー状組織で発現が見られた。

30

40

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0404

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0404】

9-5. シングルセル遺伝子発現解析による、大脳オルガノイド及び大脳皮質細胞塊の解析

- Day 7 ~ Day 35まで実施例1と同じ方法で培養した。3回の分化誘導回で得ら

50

れたオルガノイドから、Rosettesのオルガノイドを目視で選別した。その後、実施例4の工程(i i)に記載の方法で、大脳オルガノイドをDAPTで3日間処理し、大脳皮質細胞塊を誘導した(“DAPT+”)。対照群として、工程(i i)でDAPT非添加の群を作成した(大脳オルガノイド: “DAPT-”)。

これらの細胞を用いて、9-2と同じ方法でシングルセル遺伝子発現解析を行った。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0414

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0414】

また、表6に記載の、大脳皮質神経前駆細胞(放射状グリア)(Radial Glia (RG))、GABA作動性神経細胞(GABAergic neuron)、脈絡叢(Choroid plexus (ChP))、中枢神経系線維芽細胞(CNS fibroblast)、神経堤細胞(Neural Crest)、血管内皮細胞(Vascular Endothelial cells)又は尾側神経細胞(Caudal Neuron)に発現する遺伝子群(以下目的外細胞遺伝子群という)は、本発明の大脳皮質細胞塊又は高純度大脳皮質細胞塊における目的外細胞のマーカースとして、目的外細胞が基準以下であることを調べるために利用できることがわかった。

【手続補正22】

20

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0416

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0416】

具体的には、放射状グリアのマーカースとして同定されたLHX2、SOX2、及びPAX6、GABA作動性神経細胞のマーカースとして同定されたGAD2、DLX1、DLX2、DLX5、及びDLX6、脈絡叢のマーカースとして同定されたTTR、TRPM3、中枢神経系線維芽細胞のマーカースとして同定されたCOL1A1、神経堤細胞のマーカースとして同定されたZIC遺伝子群、Msx1、Smadシグナル下流のID遺伝子群、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 関連遺伝子(TWIST1、PRRX1、GPC3、Sox10、及びTFAP2)、血管内皮細胞のマーカースとして同定されたKDR(VEGFR-2)、PECAM1及びCDH5(VE-Cadherin)をはじめとする多数のvascular endothelial cellのマーカース、並びに尾側神経細胞のマーカースとして同定されたTUBB3の他、尾側の領域化を制御する多数のHOX遺伝子から選ばれる、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つの遺伝子の発現量が実質的に発現していないか、又は基準以下であることを指標として評価することができる。また、表6に記載のマーカースの使用方法はこれらに限られず、用途に応じて適宜マーカースを選択し発現を測定することにより、様々な目的に使用することができる。

30

40

50