

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6756610号
(P6756610)

(45) 発行日 令和2年9月16日 (2020.9.16)

(24) 登録日 令和2年8月31日 (2020.8.31)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074
C 1 2 N 5/0797 (2010.01)	C 1 2 N 5/0797
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 25 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-510827 (P2016-510827)	(73) 特許権者	500213834
(86) (22) 出願日	平成26年4月28日 (2014.4.28)		メモリアル スローン ケタリング キヤ ンサー センター
(65) 公表番号	特表2016-518137 (P2016-518137A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
(43) 公表日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/035760	(73) 特許権者	511040838
(87) 国際公開番号	W02014/176606		コーネル ユニバーシティ
(87) 国際公開日	平成26年10月30日 (2014.10.30)		CORNELL UNIVERSITY
審査請求日	平成29年4月27日 (2017.4.27)		アメリカ合衆国, ニューヨーク州 148 50, イサカ, スイート 310, パイン ツリー ロード 395, コーネル セ ンター フォー テクノロジー, エンター プライズ アンド コマーシャライゼーショ ン
(31) 優先権主張番号	61/816,624		
(32) 優先日	平成25年4月26日 (2013.4.26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多分化能細胞および多能性細胞の分化を方向付けることによって発生させる皮質介在ニューロン
およびその他のニューロン細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を誘導するための *in vitro* における方法であって、該方法は、

ヒト多能性細胞、ヒト多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも1つの *Small Mothers Against Decapentaplegic* (SMAD) シグナル伝達阻害剤と接触させるステップと、

該細胞を、*Wnt* / β -カテニンシグナル伝達をアンタゴナイズする少なくとも1つの *Wingless* (*Wnt*) アンタゴニストと接触させるステップと、

該細胞を、少なくとも1つの *Sonic Hedgehog* (SHH) シグナル伝達活性化因子と接触させて、*FOXG1* を発現する分化細胞を取得するステップとを含み、

ここで、該細胞の該少なくとも1つの SHH シグナル伝達活性化因子との最初の接触は、該細胞の該少なくとも1つの SMAD シグナル伝達阻害剤との最初の接触から6日目以後である、

in vitro における方法。

【請求項 2】

前記分化細胞を成熟させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記1つまたは複数の出発細胞が、ヒト胚性幹細胞、ヒト成体幹細胞、ヒト神経幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞からなる群から選択される、少なくとも1つの細胞のクラスを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤と接触させる前記ステップおよび前記少なくとも1つのWntアンタゴニストと接触させる前記ステップを同時または逐次的に実行し、各ステップの持続期間が、5日間～30日間の間である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤が、SB431542、LDN-193189、ノギン、PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、レルデリムマブ、メテリムマブ、GC-I008、AP-12009、AP-11014、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452（ALK阻害剤であるRepSox）、SD-208、SMI6、NPC-30345、Ki26894、SB-203580、SD-093、アクチビン-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、これらの誘導体およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤が、SB431542およびLDN-193189を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

SB431542が、前記細胞を含む培養培地中に0.1 μM～1 mMの間の範囲内の濃度で提供される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

LDN-193189が、前記細胞を含む培養培地中に1 nM～10 μMの間の範囲内の濃度で提供される、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達アンタゴニストが、XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、Dkk-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-5、SFRP-3、SFRP-4、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-C59、LGK974、IWP-L6、これらの誘導体およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記Wntシグナル伝達アンタゴニストが、XAV939を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

XAV939が、前記細胞を含む培養培地中に10 nM～500 μMの間の範囲内の濃度で提供される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子が、スーズンドアゴニスト（SAG）、SAG類似体、SHH、組換えSHH、C25-SHH、C24-SHH、プルモルファミン、Hgg-Ag、これらの誘導体およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子が、組換えSHHおよびプルモルファミンの両方を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

10

20

30

40

50

前記組換えSHHが、前記細胞を含む培養培地中に5 ng/mL～5 μg/mLの間の範囲内の濃度で提供される、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

プルモルファミンが、前記細胞を含む培養培地中に0.1 μM～20 μMの間の範囲内の濃度で提供される、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記細胞の前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子との接触を、その開始から5～30日で終了する、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記細胞の前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子との最初の接触が、前記細胞の前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害因子との最初の接触から8～18日であり、前記細胞の前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子との接触を、その開始から8～16日で終了する、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項18】

前記分化細胞が、SST、PV、GABA、カルビンディン、LHX6、OLIG2、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1およびこれらの組合せからなる群から選択される1つまたは複数のマーカーをさらに発現する、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記Wntアンタゴニストと接触させる前記ステップを、前記細胞の前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害因子との最初の接触から5日以内に、好ましくは、0～1日で開始する、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項20】

SB431542を、前記細胞を含む培養培地中に0.1 μM～100 μMの間の範囲内の濃度で提供する、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

LDN-193189を、前記細胞を含む培養培地中に1 nM～1 μMの間の範囲内の濃度で提供する、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

XAV939を、前記細胞を含む培養培地中に0.2 μM～200 μMの間の範囲内の濃度で提供する、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項23】

前記細胞の前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子との最初の接触が、前記細胞の前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害因子との最初の接触から20日目以前である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記細胞の前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子との最初の接触が、前記細胞の前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害因子との最初の接触から8日目～18日目である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

40

前記培養培地が、Essential 6培地およびKSRベースの培地からなる群から選択される、請求項7、8、11、14、15および22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】

【0001】

政府の資金提供を受けた研究および開発

本開示に記載される研究は、一部において、アメリカ国立衛生研究所からの補助金交付番号2R01MH06691および1RC1MH089690によって資金提供を受けた

50

。米政府は、本開示について特定の権利を有する。

【0002】

関連出願との相互参照

PCT国際特許出願として2014年4月28日に出願された本出願は、その全体が参考として援用される2013年4月26日に出願された米国仮特許出願第61/816,624号に対する利益を主張する。

【0003】

発明の背景

技術分野

本開示は一般に、幹細胞および神経前駆細胞の*in vitro*における分化、障害および疾患を研究するための、*in vitro*における細胞ベースのモデル系の開発、ならびにニューロン細胞の方向付けられた分化を介して*in vitro*で発生させた細胞の投与による障害および疾患の処置に関する。より具体的に、本開示は、例えば、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン、ならびにこれらの前駆体細胞を含む、ニューロン細胞およびニューロン細胞の前駆体細胞を発生させるための*in vitro*における方法、およびこれらを含む組成物を提供する。このようなニューロン細胞は、ニューロン細胞を発生させるために幹細胞を含む多分化能、多能性、および／または全能性細胞を、SMADおよびWntシグナル伝達阻害剤および／またはアンタゴニストと接触させ、かつ、1つまたは複数のSHHシグナル伝達経路の活性化因子と、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるのに要求される時点において、これに要求される持続期間にわたり接触させることにより発生させる。本明細書で開示される*in vitro*における方法により発生させた、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンは、神経変性障害および神経精神障害ならびに神経変性疾患および神経精神疾患を処置するのに治療的に使用することができ、このような神経変性障害および神経精神障害ならびに神経変性疾患および神経精神疾患を研究するためモデル系として使用することができ、かつ、このような障害および疾患を処置するための治療用候補化合物をスクリーニングおよび同定するために使用することができる。

【背景技術】

【0004】

関連技術の記載

神経学的障害の処置は従来、1つまたは複数の低分子の*in vivo*における投与を含んだ。これらの治療アプローチが*in vivo*において神経学的障害に罹患した患者にもたらす有効性は、残念ながら、極めて微弱なものであった。

【0005】

ニューロン組織、最も具体的には、脳内のニューロン組織は、シナプス可塑性およびリモデリング能を呈示する。しかし、これらの特性は、神経学的障害のための治療レジメンの開発のために満足に利用されていない。初代ヒトニューロンは、存命中のドナーから得るのが困難であり、成熟ニューロンは、有糸分裂後のものであるため、*in vitro*において治療的利益を達成するために要求される細胞数をもたらすのに要求される時間枠で培養することができない。

【0006】

幹細胞を含む、全能性、多能性、および多分化能細胞は、神経学的障害および疾患を含む、障害および疾患を研究し、障害および疾患の処置のための細胞ベースの療法を開発するための強力なツールである。胚性幹細胞(ESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)などの多能性幹細胞(PSC)を含む多能性細胞は、中枢神経系(CNS)の細胞系統に分化させることができる。

【0007】

したがって、*in vitro*で、例えば、ESCおよび／またはiPSCから発生さ

せたCNS細胞は、神経変性障害および神経精神障害ならびに神経変性疾患および神経精神疾患を含む障害および疾患の処置のための治療レジメンにおいて使用しうることが示唆されている。in vitroにおけるある特定の態様のニューロン特化を方向付けるためのプロトコールが記載されている。例えば、ヒトESC(hESC)のニューロン変換は、接着性のhESCを2つのSMADシグナル伝達阻害剤(ノギンおよびSB431542(アクチビン/ノーダルシグナル伝達の阻害剤))と接触させることにより達成されている(Chambersら、Nat Biotechnol、27巻:275~280頁(2009年))。

【0008】

hPSCを使用する初期研究は、パーキンソン病における中脳ドーパミンニューロン(Kriksら、Nature、480巻:547~551頁(2011年); Soldnerら、Cell、136巻:964~977頁(2009年); およびSoldnerら、Cell、146巻:318~331頁(2011年))または筋萎縮性側索硬化症(Dimosら、Science、321巻:1218~1221頁(2008年))および脊髄筋萎縮症(Ebertら、Nature、457巻:277~280頁(2009年))における運動ニューロンなど、ニューロン細胞の特定のサブセットと関連する神経変性障害に焦点を当てていた。

【0009】

統合失調症(Brennandら、Nature、473巻:221~225頁(2011年))および多様な自閉症関連症候群(Marchettoら、Cell、143巻:527~539頁(2010年); およびPascaraら、Nat Med、17巻:1657~1662頁(2011年))など、他の複合的な神経障害についても、同様のアプローチが示唆されている。パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、または脊髄筋萎縮症(SMA)と異なり、統合失調症および自閉症関連症候群と関連するニューロンの特定のサブセットは、よく規定されていないままであり、これらの神経障害を処置するための治療レジメンおよびこれらの神経障害を研究するためのモデル系の開発を妨げている。

【0010】

皮質介在ニューロンなどの抑制性ニューロンは、統合失調症および自閉症において、特に重要な役割を果たしう(Insell、Nature、468巻:187~193頁(2010年); およびLewisら、Nat Rev Neurosci、6巻:312~324頁(2005年))。ヒト皮質投射ニューロンをESCから産生するためのプロトコールは、最近記載されている(Espuny-Camachoら、Neuron、77巻:440~456頁(2013年); ならびにShiら、Nat Neurosci、15巻:477~486頁およびS471頁(2012年))。

【0011】

皮質介在ニューロンおよびそれらの前駆体細胞は、成体大脳皮質への移植後において、遊走し、成熟し、機能する驚嘆すべき能力を有する。これらの細胞は、皮質活性を正常に制御するので、病巣起源の慢性発作のための細胞ベースの療法においてそれらを使用することが提起されている。特に、難治性の発作障害の場合、細胞ベースの療法は、手術による介入に対する代替法として提起されている。このような細胞はまた、投薬で難治性の発作およびパーキンソン病などの前脳障害のための細胞ベースの療法においても使用され得ると予期されている。このような療法は、活性を抑制するこれらの細胞の本来的能力を活用するように使用することもでき、治療剤(すなわち、GABA、神経ペプチドY、アデノシンを含む発作を抑制する薬剤)を発現させる遺伝子操作後における薬物送達系として使用することもできる。

【0012】

皮質介在ニューロンならびに視床下部ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロンおよびこれらの前駆体細胞など前脳系統の他のニューロンは、in vitroで産生するのが困難であるが、治療的にも、疾患モデルとしても大きな潜在的可能性を有する。

視床下部ニューロンは、内分泌関連障害、睡眠障害（例えば、ナルコレプシー）、および摂食異常と関連する障害に主に関与する。視索前野コリン作動性ニューロンは、アルツハイマー病（AD）で失われる記憶機能を果たす。皮質介在ニューロン、ならびに視床下部ニューロンおよび視索前野コリン作動性ニューロンなど、前脳システムの他のニューロンの移植は、それぞれ、内分泌、睡眠、および摂食障害を処置するための、ならびにADを処置するための著明な潜在的治療可能性を有する。

マウス皮質介在ニューロンは、Lhx6::GFPレポーターマウスESC系を使用して導出されているが、皮質介在ニューロン発生の効率は低かった（Marooら、J Neurosci、30巻：4667～4675頁（2010年））。ヒト皮質介在ニューロンの発生上の起源は、いまだ確立されておらず、介在ニューロン特化は、哺乳動物の種間で異なりうるということが報告されている（Letinicら、Nature、417巻：645～649頁（2002年）；ならびにYuおよびZecevic、J Neurosci、31巻：2413～2420頁（2011年））。さらに、長期間を要するin vivoにおける皮質介在ニューロンの発生は、ヒト細胞による、in vitroにおける分化の達成に対して、難題を提示してきた。したがって、Marooらにより記載された条件を、ヒトESCおよび／または他の多能性幹細胞からのヒト皮質介在ニューロンの発生に適用しうるのかどうかは、依然として不確定である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Chambersら、Nat Biotechnol、27巻：275～280頁（2009年）

【非特許文献2】Kriksら、Nature、480巻：547～551頁（2011年）

【非特許文献3】Soldnerら、Cell、146巻：318～331頁（2011年）

【非特許文献4】Dimosら、Science、321巻：1218～1221頁（2008年）

【非特許文献5】Ebertら、Nature、457巻：277～280頁（2009年）

【非特許文献6】Brennandら、Nature、473巻：221～225頁（2011年）

【非特許文献7】Marchettoら、Cell、143巻：527～539頁（2010年）

【非特許文献8】Pascaら、Nat Med、17巻：1657～1662頁（2011年）

【非特許文献9】Insel、Nature、468巻：187～193頁（2010年）

【非特許文献10】Lewisら、Nat Rev Neurosci、6巻：312～324頁（2005年）

【非特許文献11】Espuny-Camachoら、Neuron、77巻：440～456頁（2013年）

【非特許文献12】Shiら、Nat Neurosci、15巻：477～486頁およびS471頁（2012年）

【非特許文献13】Marooら、J Neurosci、30巻：4667～4675頁（2010年）

【非特許文献14】Letinicら、Nature、417巻：645～649頁（2002年）

【非特許文献15】YuおよびZecevic、J Neurosci、31巻：2413～2420頁（2011年）

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

本開示は、前脳分化は、増強することができ、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン、ならびにこれらの前駆体細胞を含む、中枢神経系（CNS）のある特定のニューロンは、ある特定の全能性、多能性、および／または多分化能細胞（例えば、ヒト胚性幹細胞（hESC）および／またはヒト人工多能性幹細胞（hiPSC））を、1つまたは複数のWntアンタゴニストと組み合わせた、1つ、2つ、またはそれより多くのSMAD転写因子阻害剤と、ニューロン前駆体細胞を発生させるのに適切な濃度で、これに適切な持続期間にわたり接触させることにより、*in vitro*で効率的に誘導することができ、これらのニューロン前駆体細胞を、適切な濃度の1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と、幹細胞の分化および／またはニューロン細胞の発生の開始の後の適切な時点において、適切な持続期間にわたり接触させ、これにより、ニューロン細胞内で、皮質介在ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、視床下部ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、および／または視索前野コリン作動性ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数の産生を誘導するという発見に基づく。加えて、皮質投射ニューロンおよびその前駆体細胞は、SHH活性化因子と接触させるステップを欠く同様の方法により発生させることができる。

10

【0015】

20

本明細書で詳細に記載されるこれらの発見および他の発見に基づき、ある特定の実施形態では、本開示は、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー1つまたは複数を含むニューロン細胞を含むニューロン細胞を発生させるための*in vitro*における方法を提供する。また、本明細書で開示される方法により発生させた、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのほか、皮質投射ニューロンを含むニューロン細胞、ならびに前出のうちのいずれかの前駆体細胞のほか、このようなニューロン細胞のうちの1つまたは複数を含む組成物も提供される。さらに、1つ、好ましくは2つまたはそれより多くのSMAD阻害剤、および1つまたは複数のWntアンタゴニストを含む組成物、ならびに1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子を含む、薬学的に適切な組成物および処方物を含む、組成物および処方物のほか、1つ、2つ、またはそれより多くのSMAD阻害剤、1つまたは複数のWntアンタゴニスト、および1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と、任意選択で、前出の種類の1つもしくは複数のニューロンまたはこれらの前駆体細胞を調製するための使用のための指示書とを含むキットが提供される。

30

【0016】

ある特定の実施形態では、本開示は、皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を含むニューロンを含む、ニューロンを発生させるための*in vitro*における方法であって、（a）全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞を、1つ、2つ、またはそれより多くのSMAD阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、全能性、多能性、および／または多分化能細胞からのニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、（b）ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとによる、全能性細胞、多能性細胞、または多分化能細胞の分化を含む*in vitro*における方法を提供する。

40

【0017】

これらの方法のある特定の態様では、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を生産するニューロン前駆体細胞を、ニュー

50

ロン前駆体細胞の成熟に助力する条件に晒す。他の態様では、ニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに／または全能性、多能性、および／もしくは多分化能細胞を、1つ、2つ、もしくはそれより多くのSMA D阻害剤および／または1つもしくは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させる。

【0018】

これらの方法の関連する態様では、ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップを、全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞を、1つ、2つ、またはそれより多くのSMA D阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を作製するステップの、約4日後～約20日後、または約6日後～約20日後、または約8日後～約20日後、または約8日後～約18日後に開始する。

10

【0019】

ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約16日間の期間にわたる。ニューロン細胞をSHHの活性化因子と接触させる時間は、1つまたは複数のSHH活性化因子と接触させるステップが実行される培養培地により決定することができる。培養培地は、例えば、上記で開示した通り、とりわけ、Essential 6培地およびKSRベースの培地を含みうる。実際には、SHH活性化因子は、除去する（例えば、培地の交換により）必要がなく、細胞は、培養物中で、数週間または数カ月間にわたり増殖させることができる。

20

【0020】

特に、皮質介在ニューロンおよび／またはその前駆体細胞を、培養物中で、数週間～数カ月間にわたり維持することができる。皮質介在ニューロンおよび／またはその前駆体細胞を、培養物中またはin vivoで、何カ月間にもわたり維持することができる。

【0021】

これらの方法のさらなる態様では、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の各々は、SST、PV、GABA、カルビンディン、LHX6、RAX、FOXA2、FOXG1、OLIG2、MASH1、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、およびCHAT、ならびにこれらの組合せからなる群から選択することができる。

30

【0022】

他の実施形態では、本開示は、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるためのinvitroにおける方法であって、ニューロン細胞を、全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞の分化により発生させ、(a) 1つもしくは複数の全能性細胞、1つもしくは複数の多能性細胞、および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 1つ、2つ、またはそれより多くのSMA D阻害剤、および(ii) 1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、(b) ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含むinvitroにおける方法を提供する。

40

【0023】

これらの方法のある特定の態様では、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞の成熟に助力する条件に晒す。他の態様では、ニューロン前駆体細胞を、

50

ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに／または全能性、多能性、および／もしくは多分化能細胞を、1つ、2つ、もしくはそれより多くのSMA D阻害剤および／または1つもしくは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させる。他の一部の実施形態では、i n v i t r oにおけるニューロン細胞の成熟を加速するように胚性マウス皮質細胞を使用して、皮質フィーダー環境を創出した。

【0024】

これらの方法の他の態様では、ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップを、全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞を、1つ、2つ、またはそれより多くのSMA D阻害剤および1つまたは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させるステップの、約1日後～約4日後に開始して、視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を産生する。ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約20日間の期間にわたりうる。SHH活性化因子との接触はより長期でも、有害ではない。

【0025】

これらの方法のさらなる態様では、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の各々は、NGF I-B、c-f o s、CRF、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）、RAX、POMC、ヒボクレチン、バソプレッシン、オキシトシン、nNOS、およびNADPH、ならびにこれらの組合せからなる群から選択することができる。

【0026】

さらに他の実施形態では、本開示は、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生するニューロン細胞を発生させるためのi n v i t r oにおける方法であって、ニューロン細胞を、全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞の分化により発生させ、（a）1つもしくは複数の全能性細胞、1つもしくは複数の多能性細胞、および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、（i）1つ、2つ、またはそれより多くのSMA D阻害剤、および（i i）1つまたは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、（b）ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含むi n v i t r oにおける方法を提供する。

【0027】

これらの方法のある特定の態様では、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生するニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞の成熟に助力する条件に晒す。他の態様では、ニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに／または全能性、多能性、および／もしくは多分化能細胞を、1つ、2つ、もしくはそれより多くのSMA D阻害剤および／または1つもしくは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させる。

【0028】

これらの方法の他の態様では、ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップを、全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMA D阻害剤および1つまたは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させるステップの、約4日後～約8日後に開始して、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を産生する。ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ

るステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約24日間の期間にわたる。

【0029】

これらの方法のさらなる態様では、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の各々は、ChAT、NGF、ACh、VAcHT、LHX8、ISL1、およびp75、ならびにこれらの組合せからなる群から選択することができる。

【0030】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法の他の態様では、1つまたは複数の全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞は、ヒト細胞であるかまたはマウス細胞である。これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のさらに他の態様では、1つまたは複数の全能性細胞、多能性細胞、および／または多分化能細胞は、胚性幹細胞、成体幹細胞、神経幹細胞、人工多能性細胞、操作多能性細胞、初代前駆細胞、誘導前駆細胞、および操作前駆細胞からなる群から選択することができる。

【0031】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のさらなる態様では、SMAD阻害剤と接触させるステップおよび／またはWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させるステップは、同時に実行することもでき、逐次的に実行することもできる。接触させるステップは、約5日間～約30日間の持続期間にわたる。これらの方法の関連する態様では、1つまたは複数のWntアンタゴニストと接触させるステップを、全能性、多能性、および／または多分化能細胞を、1つ、2つ、またはそれより多くのSMADシグナル伝達阻害剤および／またはWntシグナル伝達経路の1つもしくは複数のアンタゴニストと接触させるステップの、0日後～約5日後または0日後～約1日後に開始することができる。

【0032】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、SMAD阻害剤は、SB431542、LDN-193189、ノギン PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、レルデリムマブ、メテリムマブ、GC-I008、AP-12009、AP-11014、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452（ALK阻害剤であるRepSox）、SD-208、SMI6、NPC-30345、Ki26894、SB-203580、SD-093、アクチビン-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、ならびにこれらの誘導体および／または改変体であって、これらの各誘導体および／または改変体が、1つまたは複数のSMAD阻害活性を保有する誘導体および／または改変体からなる群から選択することができる。例えば、2つまたはそれより多くのSMADシグナル伝達阻害剤は、二重SMAD阻害剤であるSB431542およびLDN-193189、またはこれらの機能的な誘導体および／もしくは改変体を含みうる。SB431542は、in vitro培養物中で、約0.1 μM～約1 mMまたは約0.1 μM～約100の最終濃度で、全能性、多能性、および／または多分化能細胞と接触させることができる。LDN-193189は、in vitro培養物中で、約1 nM～約10 μMまたは約1 nM～約1 μMの最終濃度で、全能性、多能性、および／または多分化能細胞と接触させることができる。

【0033】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のまたさらなる態様では、Wntシグナル伝達アンタゴニストは、XAV939、DKK1、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-5、SFRP-3、SFRP-4、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-C59、LGK974、IWP-L6、ならびにこれらの誘導体および／または改変体であって、これらの各誘導体および／

10

20

30

40

50

または改変体が、1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニスト活性を保有する誘導体および／または改変体からなる群から選択される少なくとも1つでありうる。例えば、Wntシグナル伝達アンタゴニストは、XAV939またはその機能的な誘導体および／もしくは改変体を含みうる。XAV939は、*in vitro*培養物中に、約10nM～約500μMまたは約0.2μM～約200μMの最終濃度の、多能性および／または多分化能細胞と接触させることができる。

【0034】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、SHHシグナル伝達活性化因子は、スムーズド(Smoothed)アゴニスト(SAG)、SAG類似体、SHH、C25-SHH、C24-SHH、プルモルファミン、Hg-Ag、ならびにこれらの誘導体および／または改変体であって、これらの各誘導体および／または改変体が、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子活性を保有する誘導体および／または改変体からなる群から選択することができる。例えば、SHHシグナル伝達活性化因子は、組換えSHHおよび／もしくはプルモルファミン、またはこれらの機能的な誘導体および／もしくは改変体を含みうる。組換えSHHを、*in vitro*培養物中で、約5ng/mL～約5μg/mLの最終濃度で、全能性、多能性、および／または多分化能細胞と接触させることができる。プルモルファミンは、*in vitro*培養物中に、約0.1μM～約20μMの最終濃度の、多能性および／または多分化能細胞と接触させることができる。

10

【0035】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、ニューロン前駆体細胞は、NKX2.1、NKX2.2、LHX6、LHX8、FOXA2、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SIX6、SIX3、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、およびNKX6.2からなる群から選択される、1つまたは複数のマーカーを含む。

20

【0036】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、1つ、2つ、またはそれより多くのSMAD阻害剤；1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニスト；および／あるいは1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、マウス皮質錐体ニューロン、例えば、マウスESCから導出されるマウス皮質錐体ニューロンなどのフィーダー細胞の存在下で実行することができる。

30

【0037】

さらなる実施形態では、本開示は、皮質介在ニューロン細胞および／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の*in vitro*で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro*で分化させたニューロン細胞が、(a)多分化能細胞、多能性細胞、および／または全能性細胞を、1つ、2つ、またはそれより多くのSMADシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(b)多分化能細胞、多能性細胞、および／または全能性細胞を、1つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(c)多分化能細胞、多能性細胞、および／または全能性細胞から発生させた神経前駆細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、組成物を提供する。

40

【0038】

これらの実施形態のある特定の態様では、組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、皮質介在ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含む。

【0039】

これらの実施形態の関連する態様では、組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混

50

合物であって、NKX2.1+ / PV+皮質介在ニューロンが、組成物中の細胞総数のうちの少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%を占める混合物を含む。

【0040】

これらの実施形態の他の関連する態様では、組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性抑制性介在ニューロンが、組成物中の皮質介在ニューロンの総数のうちの少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%を占める混合物を含む。

10

【0041】

これらの組成物のある特定の態様では、皮質介在ニューロンおよび/または介在ニューロン前駆体細胞は、例えば、CT-2または緑色蛍光タンパク質 (GFP) などの検出マーカーを発現するトランス遺伝子を含みうる。

【0042】

なおさらなる実施形態では、本開示は、視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro* で分化させたニューロン細胞が、(a) 多分化能細胞、多能性細胞、および/または全能性細胞を、2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(b) 多分化能細胞、多能性細胞、および/または全能性細胞を、1つまたは複数の Wnt シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(c) 多分化能細胞、多能性細胞、および/または全能性細胞から発生させたニューロン前駆細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、組成物を提供する。

20

【0043】

これらの実施形態のある特定の態様では、組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、視床下部ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含む。

30

【0044】

さらに他の実施形態では、本開示は、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro* で分化させたニューロン細胞が(a) 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(b) 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の Wnt シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(c) 多分化能細胞、多能性細胞、および/または全能性細胞から発生させたニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、組成物を提供する。

40

【0045】

これらの実施形態のある特定の態様では、組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、視索前野コリン作動性ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含む。

【0046】

3つの実施形態の組成物の他の態様では、細胞は、ヒトまたはマウスのものであり得る

50

。

【0047】

ある特定の実施形態では、本開示は、ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための *in vitro* における方法であって、該ニューロンは、前脳前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される、1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からの該前脳前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 任意選択で、発生させた該前脳前駆体細胞を、それらのさらなる分化に助力する条件に晒すステップと

を含む *in vitro* における方法を提供する。

【0048】

SMAD阻害剤およびWntアンタゴニストは、上記で記載した通りである。

【0049】

他の実施形態では、本開示は、(1) SMADおよび／もしくはWntシグナル伝達阻害剤および／もしくはアンタゴニストならびに／またはSHHシグナル伝達活性化因子を同定し、特徴付けるための細胞ベースの方法と、(2) SMADおよび／もしくはWntシグナル伝達阻害剤および／もしくはアンタゴニストならびに／またはSHHシグナル伝達活性化因子の組合せを含む組成物と、(3) パーキンソン病、アルツハイマー病、ALS、多系統萎縮症などの神経変性障害および疾患、ならびに統合失調症および自閉症関連障害などの神経精神障害および疾患を含む、神経学的障害および疾患を処置するための方法であって、本明細書で開示される *in vitro* における方法により発生させた、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンを *in vivo* において患者へ投与する工程を含む方法とを提供する。

【0050】

本開示のこれらの態様および他の態様は、多様な実施形態のある特定の態様を例示する、以下の図面と併せると最もよく理解される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための *in vitro* における方法であって、該ニューロンは、皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWntアンタゴニストと接触させて、該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からのニューロン前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 所定の期間にわたる継代培養の後で、該ニューロン前駆体細胞を、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子と接触させて、該前駆体細胞からの、皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を示す少なくとも1つのマーカーを有するニューロンの発生に助力するステップと、

c. 任意選択で、発生させた該介在ニューロンまたは介在ニューロン前駆体細胞を、それらの成熟に助力する条件に晒すステップと
を含む *in vitro* における方法。

(項目2)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための *in vitro* における方法であって、該ニューロンは、視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWnt

10

20

30

40

50

t アンタゴニストと接触させて、該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からのニューロン前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 所定の期間にわたる継代培養の後で、該ニューロン前駆体細胞を、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子と接触させて、該前駆体細胞からの、視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を示す少なくとも1つのマーカーを有するニューロンの発生に助力するステップと、

c. 任意選択で、発生させた該視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を、それらの成熟に助力する条件に晒すステップと
を含む in vitro における方法。

(項目3)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための in vitro における方法であって、該ニューロンは、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも1つ、好ましくは2つのSMA D阻害剤および少なくとも1つのWntアンタゴニストと接触させて、該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からのニューロン前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 所定の期間にわたる継代培養の後で、該ニューロン前駆体細胞を、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化因子と接触させて、該前駆体細胞からの、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を示す少なくとも1つのマーカーを有するニューロンの発生に助力するステップと、

c. 任意選択で、発生させた該視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を、それらの成熟に助力する条件に晒すステップと
を含む in vitro における方法。

(項目4)

該1つまたは複数の出発細胞が、ヒトのものである、項目1、2、または3に記載の方法。

(項目5)

前記1つまたは複数の出発細胞が、マウスのものである、項目1、2、または3に記載の方法。

(項目6)

前記1つまたは複数の出発細胞が、胚性幹細胞、成体幹細胞、神経幹細胞、人工多能性細胞、操作多能性細胞、初代前駆細胞、誘導前駆細胞、および操作前駆細胞からなる群から選択される、少なくとも1つの細胞のクラスを含む、項目1、2、または3に記載の方法。

(項目7)

SMA D阻害剤と接触させる前記ステップおよびWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させる前記ステップを同時または逐次的に実行し、各ステップの持続期間が、約5日間～約30日間の間である、項目1、2、または3に記載の方法。

(項目8)

前記SMA Dシグナル伝達阻害剤が、SB431542、LDN-193189、ノギン、PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、レルデリムマブ、メテリムマブ、GC-I008、AP-12009、AP-11014、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452 (ALK阻害剤であるRepSox)、SD-208、SMI6、NPC-30345、Ki26894、SB-203580、SD-093、アクチビン-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、およびこれらの誘導体からなる群から選択される、項目1、2、または3に記載の

10

20

30

40

50

方法。

(項目 9)

前記 S M A D シグナル伝達阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2 および L D N - 1 9 3 1 8 9 を含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

S B 4 3 1 5 4 2 が、前記細胞を含有する培養培地中に約 0.1 μ M ~ 約 1 mM の間の範囲内の濃度で提供される、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

L D N - 1 9 3 1 8 9 が、前記細胞を含有する培養培地中に約 1 nM ~ 約 10 μ M の間の範囲内の濃度で提供される、項目 9 に記載の方法。

10

(項目 12)

前記 W n t シグナル伝達アンタゴニストが、X A V 9 3 9、D K K 1、D K K - 2、D K K - 3、D k k - 4、S F R P - 1、S F R P - 2、S F R P - 5、S F R P - 3、S F R P - 4、W I F - 1、S o g g y、I W P - 2、I W R 1、I C G - 0 0 1、K Y O 2 1 1、W n t - C 5 9、L G K 9 7 4、I W P - L 6、およびこれらの誘導体からなる群から選択される、項目 1、2、または 3 に記載の方法。

(項目 13)

前記 W n t シグナル伝達アンタゴニストが、X A V 9 3 9 を含む、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

X A V 9 3 9 が、前記細胞を含有する培養培地中に約 10 nM ~ 約 500 μ M の間の範囲内の濃度で提供される、項目 13 に記載の方法。

20

(項目 15)

前記 1 つまたは複数の S H H シグナル伝達活性化因子が、スムーズドアゴニスト (S A G)、S A G 類似体、S H H、C 2 5 - S H H、C 2 4 - S H H、プルモルファミン、H g - A g、およびこれらの誘導体からなる群から選択される、項目 1、2、または 3 に記載の方法。

(項目 16)

前記 1 つまたは複数の S H H シグナル伝達活性化因子が、組換え S H H およびプルモルファミンの両方を含む、項目 15 に記載の方法。

30

(項目 17)

組換え S H H が、前記細胞を含有する培養培地中に約 5 ng/mL ~ 約 5 μ g/mL の間の範囲内の濃度で提供される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

プルモルファミンが、前記細胞を含有する培養培地中に約 0.1 μ M ~ 約 20 μ M の間の範囲内の濃度で提供される、項目 16 に記載の方法。

(項目 19)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の少なくとも 4 日後かつ最大で 20 日後に開始する、項目 1 に記載の方法。

(項目 20)

前記ステップ (b) を、その開始の約 5 ~ 約 30 日後に終了する、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 21)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の約 8 ~ 約 18 日後の間に開始し、該ステップ (b) の開始の約 8 ~ 約 16 日後の間に終了する、項目 1 に記載の方法。

(項目 22)

皮質介在ニューロンを示す前記 1 つまたは複数のマーカーが、S S T、P V、G A B A、カルビンディン、L H X 6、R A X、F O X A 2、F O X G 1、O L I G 2、N K X 6、2、V G L U T 1、M A P 2、C T I P 2、S A T B 2、T B R 1、D L X 2、A S C L 1、C h A T、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 1 に記載の方法

50

。

(項目 2 3)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の少なくとも 1 日後かつ最大で 4 日後に開始する、項目 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記ステップ (b) を、その開始の約 5 ～ 約 3 0 日後に終了する、項目 2 に記載の方法

。

(項目 2 5)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の約 1 ～ 約 4 日後の間に開始し、該ステップ (b) の開始の約 8 ～ 約 2 0 日後の間に終了する、項目 2 に記載の方法。

10

(項目 2 6)

視床下部ニューロンを示す前記 1 つまたは複数のマーカーが、NGF I - B、c - f o s、CRF、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、RAX、POMC、ヒポクレチン、NADPH、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 2 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の少なくとも 4 日後かつ最大で 1 0 日後に開始する、項目 3 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記ステップ (b) を、その開始の約 5 ～ 約 3 0 日後に終了する、項目 3 に記載の方法

20

。

(項目 2 9)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の約 4 ～ 約 8 日後の間に開始し、該ステップ (b) の開始の約 8 ～ 約 2 4 日後の間に終了する、項目 3 に記載の方法。

(項目 3 0)

視索前野コリン作動性ニューロンを示す前記 1 つまたは複数のマーカーが、ChAT、NGF、Ach、VACHT、LHX8、Isl1、p75、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 3 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記ニューロン前駆体細胞が、NKX2. 1、NKX2. 2、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、およびNKX6. 2 からなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーを含む、項目 1、2、または 3 に記載の方法。

30

(項目 3 2)

前記ステップ (a) および (b) のうちの 1 つまたは複数と、存在する場合、任意選択の前記ステップ (c) とを、フィーダー細胞の存在下で実行する、項目 1、2、または 3 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記フィーダー細胞が、マウス皮質錐体ニューロンである、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記マウス皮質錐体ニューロンが、マウスESCから導出される、項目 3 3 に記載の方法。

40

(項目 3 5)

皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を示す 1 つまたは複数のマーカーを含み、多分化能細胞または多能性細胞を、少なくとも 2 つのSMADシグナル伝達阻害剤、1 つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤、および 1 つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることにより産生される *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物。

(項目 3 6)

前記細胞のうちの少なくとも 3 0 %、または該細胞のうちの少なくとも 4 0 %、または該細胞のうちの少なくとも 5 0 %、または該細胞のうちの少なくとも 6 0 %、または該細胞

50

胞のうちの少なくとも70%、または該細胞のうちの少なくとも80%、または該細胞のうちの少なくとも90%、または該細胞のうちの少なくとも95%が、皮質介在ニューロンである、項目35に記載の組成物。

(項目37)

前記細胞のうちの少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%が、NKX2.1+/PV+皮質介在ニューロンである、項目35に記載の組成物。

(項目38)

前記皮質介在ニューロンのうちの少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%が、 γ -アミノ酪酸(GABA)作動性抑制性介在ニューロンである、項目35に記載の組成物。

10

(項目39)

視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、多分化能細胞または多能性細胞を、少なくとも2つのSMADシグナル伝達阻害剤、1つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤、および1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることにより産生される*in vitro*で分化させたニューロン細胞を含む組成物。

(項目40)

前記細胞のうちの少なくとも30%、または該細胞のうちの少なくとも40%、または該細胞のうちの少なくとも50%、または該細胞のうちの少なくとも60%、または該細胞のうちの少なくとも70%、または該細胞のうちの少なくとも80%、または該細胞のうちの少なくとも90%、または該細胞のうちの少なくとも95%が、視床下部ニューロンである、項目39に記載の組成物。

20

(項目41)

視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、多分化能細胞または多能性細胞を、少なくとも2つのSMADシグナル伝達阻害剤、1つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤、および1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることにより産生される*in vitro*で分化させたニューロン細胞を含む組成物。

30

(項目42)

前記細胞のうちの少なくとも30%、または該細胞のうちの少なくとも40%、または該細胞のうちの少なくとも50%、または該細胞のうちの少なくとも60%、または該細胞のうちの少なくとも70%、または該細胞のうちの少なくとも80%、または該細胞のうちの少なくとも90%、または該細胞のうちの少なくとも95%が、視索前野コリン作動性ニューロンである、項目41に記載の組成物。

(項目43)

前記細胞が、ヒトのものである、項目35、39、41に記載の組成物。

(項目44)

前記細胞が、マウスのものである、項目35、39、41に記載の組成物。

40

(項目45)

前記Wntアンタゴニストと接触させる前記ステップを、ステップ(a)の開始後5日以内に、好ましくは、ステップ(a)の開始の0~1日後に開始する、項目7に記載の方法。

(項目46)

SB431542を、前記細胞を含有する培養培地中に約0.1 μ M~約100 μ Mの間の範囲内の濃度で提供する、項目10に記載の方法。

(項目47)

LDN-193189を、前記細胞を含有する培養培地中に約1 nM~約1 μ Mの間の範囲内の濃度で提供する、項目11に記載の方法。

50

(項目 48)

XAV939を、前記細胞を含有する培養培地中に約0.2 μM～約200 μMの間の範囲内の濃度で提供する、項目14に記載の方法。

(項目 49)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の少なくとも6日後かつ最大で20日後に開始する、項目19に記載の方法。

(項目 50)

前記ステップ (b) を、前記ステップ (a) の開始の少なくとも8日後かつ最大で18日後に開始する、項目19に記載の方法。

(項目 51)

前記培養培地が、Essential 6培地およびKSRベースの培地からなる群から選択される、項目19に記載の方法。

(項目 52)

前記皮質介在ニューロンまたは介在ニューロン前駆体細胞が、検出マーカーを発現するトランス遺伝子で改変されている、項目35に記載の組成物。

(項目 53)

前記検出マーカーが、CT-2およびGFPからなる群から選択される、項目53に記載の組成物。

(項目 54)

前記皮質介在ニューロン前駆体細胞が、培養物中で、数週間～数カ月間にわたり維持されうる、項目20に記載の方法。

(項目 55)

前記皮質介在ニューロンが、培養物中または*in vivo*で、何カ月間にもわたり維持されうる、項目20に記載の方法。

(項目 56)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための*in vitro*における方法であって、該ニューロンが、前脳前駆細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、血清を補充した培養培地中で、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からの該前脳前駆細胞の発生に助力するステップと、

b. 任意選択で、発生させた該前脳前駆細胞を、ニューロンへのそれらのさらなる分化に助力する条件に晒すステップとを含む*in vitro*における方法。

(項目 57)

前脳前駆細胞視索前野コリン作動性ニューロンを示す前記1つまたは複数のマーカーが、FOXG1、PAX6、EMX2、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目56に記載の方法。

(項目 58)

ステップ (a) において、前記細胞を、XAV939、LDN-193189およびSB431542と接触させる、項目56に記載の方法。

(項目 59)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための*in vitro*における方法であって、該ニューロンが、皮質投射ニューロンまたは皮質投射ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、SHH活性化因子の非存在下における該多

10

20

30

40

50

能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からの該皮質投射ニューロンまたは皮質投射ニューロン前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 任意選択で、発生させた該皮質投射ニューロンまたは皮質投射ニューロン前駆体細胞を、SHH活性化因子の非存在下においてそれらのさらなる成熟に助力させるステップと

を含む *in vitro* における方法。

(項目 60)

ヒト多能性細胞または多分化能細胞の分化を介してニューロンを発生させるための *in vitro* における方法であって、該ニューロンが、皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を示す1つまたは複数のマーカーを含み、該方法は、

a. 多能性細胞、多分化能細胞、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の出発細胞を、少なくとも2つのSMAD阻害剤および少なくとも1つのWntアンタゴニストと接触させて、SHH活性化因子の非存在下における該多能性細胞もしくは多分化能細胞またはこれらの混合物からの該皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞の発生に助力するステップと、

b. 任意選択で、発生させた該皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞を、SHH活性化因子の非存在下においてそれらのさらなる成熟に助力させるステップと

を含む *in vitro* における方法。

(項目 61)

前脳前駆体細胞の皮質への遊走をモジュレートするための候補薬剤をスクリーニングする方法であって、該方法は、

a. 1つまたは複数の *in vitro* で分化させた前脳前駆体細胞を動物の腹側終脳に注射するステップと、

b. 薬剤を該動物に投与するステップと、

c. 該薬剤が、前脳前駆体細胞の皮質への遊走をモジュレートするかどうかを決定するステップと

を含む方法。

(項目 62)

ポリヌクレオチドを動物の皮質に送達する方法であって、該方法は、

a. 該ポリヌクレオチドを含有する少なくとも1つの分化させた前脳前駆体細胞を哺乳動物の腹側終脳に、*in vitro* で注射するステップと、

b. 該少なくとも1つの細胞が、該哺乳動物の皮質に遊走するかどうかを検出するステップと、

c. 遊走した該少なくとも1つの細胞が、該ポリヌクレオチドを含有するかどうかを決定するステップと

を含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1Aは、二重SMAD阻害パラダイムを使用して、前方神経前駆細胞を発生させる、分化プロトコルの概略表示を提示する図である。NSB：ノギン (n o g g i n) + SB431542である。LSB：LDN193189 + SB31542である。図1B、1C、1F、1G、および1Hは、hESC細胞系であるHES-3 (NKX2.1::GFP) から導出されたデータを提示する図であり、図1Dは、hESC細胞系であるWA-09/H9に由来するデータを提示する図であり、図1Eは、hESC細胞系であるWA-09/H9ならびにhiPSC細胞系であるSeV6およびC72に由来するデータを提示する図である。まとめると、これらのデータは、Wntの阻害およびSHHシグナル伝達の活性化により、前脳運命の効率の高い導出およびNKX2.1の誘導がもたらされることを実証する。P：プルモルファミンであり、S：ソニックヘッジホッグである。図1Bおよび1Cは、DKK1つまたはXAV939 (Wntシグナル伝達アン

10

20

30

40

50

タゴニスト)を二重SMA D阻害プロトコルへと追加することにより、FOXG1+細胞の百分率の有意な増大がもたらされた(図1B)が、PAX6発現の喪失はもたらされなかった(図1C)ことを示す棒グラフである。ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用、 $^{**}p<0.01$; $^{***}p<0.001$ 。図1Dは、分化10日目(XLSB誘導)における、FOXG1およびPAX6の発現についての免疫蛍光画像である。図1Eは、XLSBが、ヒト多能性幹細胞(hiPSC細胞系であるSeV6、C72;n=4)内で、頑健な終脳特化を、同等な効率で誘導することを示す棒グラフである。(B)のスケールバーは、当たり125/lmを表す。図1Fは、SHHをXLSBと組み合わせることにより、NKX2.1::GFPを発現する前駆細胞の産生が有意に増強されたことを示す棒グラフである。図1Gは、分化4日目から始めて、1μMのプルモルファミンを、5nMのSHH(Sonic C24II)へと添加したところ、分化10日目においてSHHと比較した場合に、NKX2.1::GFP発現の相乗的増大($^{***}p<0.001$)が呈示されたことを示す棒グラフである。SHHおよびプルモルファミンの濃度範囲を、分化18日目に比較した。ANOVAの後でシェッフェ検定を使用して、SHHを用いないものと比較した場合に、共処理は、極めて高い濃度のSHH単独またはプルモルファミン単独に対して大きく優位であった($^{***}p<0.001$)。図1Hは、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用して、SHHまたはプルモルファミンを用いない分化0~18日目の細胞と比較した場合に、最初のSHH誘導のタイミングを、分化2~10日目の間に始めるように遅延させても、分化18日目に測定したNKX2.1::GFPの誘導に対するプルモルファミンの効能の相乗作用に劇的な影響を及ぼさなかった($^{**}p<0.001$)ことを示す棒グラフである。

【0052】

【図2】図2は、SHH曝露のタイミングにより、NKX2.1::GFPを発現する前駆細胞の領域的独自性が決定されることを実証するデータを提示する図である。図2Aは、公表されたデータに基づく前脳パターン化マーカーの発現とともに、ヒト前脳のモデル(カーネギー発生段階14(CS14)における矢状面図)を示す図である(Kerwinら、J Anat、217巻:289~299頁(2010年))。図2B~2Eは、NKX2.1、OLIG2、およびPAX6の産生を示す、カーネギー発生段階15(CS15)におけるヒト前脳の冠状(斜方)半断面を示す図である。NKX2.1およびOLIG2が、腹側前脳全体にわたり、多様な領域内で産生されたのに対し、PAX6の産生は、背側前脳および眼に限局された。これらのタンパク質の産生は、OLIG2およびNKX2.1を共発現した神経節隆起中(図2C)を除いて、重なり合わなかった。図2Bのスケールバーは、1Lm当たり200を表す。図2Fは、異なる期間にわたり、XLSBプロトコルと組み合わせて使用した、SHH処理およびプルモルファミン処理についての概略表示である。図2Gは、分化6~18日目SHH処理群(欄2の顕微鏡写真)および分化10~18日目SHH処理群(欄3の顕微鏡写真)におけるNKX2.1::GFP系におけるOLIG2およびFOXG1についての免疫蛍光画像であり、ここで、分化2~18日目SHH処理群(欄1の顕微鏡写真)と比較した場合のFOXG1を共発現するNKX2.1::GFP+細胞の百分率の有意な増大は分化18日目に測定した。分化10~18日目SHH処理群はまた、分化2~18日目SHH処理群と比較した場合のOLIG2を共発現するNKX2.1::GFP+細胞の導出の増強($^{*}p<0.05$ 、 $^{***}p<0.001$ 、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用)も実証した。FOXG1、NKX2.1、およびOLIG2の発現は、神経節隆起に特徴的なパターンを証拠立てた(Tekki-Kessarisら、Development、128巻:2545~2554頁(2001年))。これらの免疫蛍光データを定量化した。これを、図2Hの棒グラフに提示する。図2Iは、分化18日目にNKX2.1::GFPの発現についてソートした細胞に由来するマイクロアレイ遺伝子発現データであり、分化10~18日目SHH処理群を、SHH非処理群(例えば、対照)と比較している。図2Jは、分化18日目にNKX2.1::GFPの発現についてソートした細胞に由来するマイクロアレイ遺伝子発現データであり、分化10~18日目SHH処理群を、分化2~18日目

SHH処理群と比較している。図2Kは、分化18日目にNKX2.1::GFPの発現についてソートした細胞に由来するマイクロアレイ遺伝子発現データであり、分化10～18日目SHH処理群を、分化6～18日目SHH処理群と比較している。分化10～18日目SHH処理群においてより高レベルで発現した遺伝子、および分化10～18日目SHH処理群においてより低レベルで発現した遺伝子が示される。全ての変化は、 $p < 0.001$ で有意である。

【0053】

【図3】図3は、FOXA2が、hPSC由来のNKX2.1+系統内およびヒト神経節隆起内で一過性発現することを示す例示的データを提示する図である。図3Aは、分化18日目において、分化したNKX2.1::GFP発現細胞をソートし、次いで、SHHの非存在下で、さらに2週間にわたり細胞を培養した後におけるFOXA2発現の時間経過を示す図である。FOXA2との共標識の百分率は、2週間の経過にわたり低下する。図3Bは、分化10～18日目SHH処理群についての、代表的な免疫細胞化学画像を示す図である。分化18日目におけるFOXG1の発現ならびにFOXA2およびGFPの共発現である。図3Cは、FOXG1、NKX2.1、およびFOXA2の発現を示す、発生しつつあるマウス脳の胚生11.5日目における冠状切片(D'Amatoら、Proc Natl Acad Sci USA、84巻:4322～4326頁(1987年))を示す図である。間脳(Di)内のFOXG1の発現は見られず、終脳(Tel)内のFOXA2発現も見られない。NKX2.1は、内側神経節隆起(MGE)内および視床下部(HYP)内では発現するが、フロアプレート(FP)内では発現せず、FOXA2との共標識も示さない。図3Dは、免疫組織化学解析のために切片化されたカーネギー発生段階15(CS15;妊娠約5.5週)のヒト胚を示す図である。図3Eおよび3Fは、FOXA2およびNKX2.1の発現を実証するヒトS15前脳の隣接する冠状(斜方)半断面を示す図である。FOXA2が、神経節隆起内で特異的に発現されると考えられる(図3E)のに対し、NKX2.1は、腹側前脳の多様な領域内で発現される(図3F)。図3Eおよび3Fは、ヒトとマウスとの間のFOXA2発現における差異を実証し、これは腹側前脳内でNKX2.1前駆細胞を発生させる代替的機構を示唆する。しかし、*in vitro*で示される(図3A)通り、かつ、より後期のヒト胚についての*in situ*ハイブリダイゼーション解析により示唆される(Allen Brain Atlas、human.brain-map.org)通り、これらのNKX2.1細胞内のFOXA2発現は、一過性でありうる。

【0054】

【図4】図4は、循環神経前駆細胞からニューロン前駆体細胞への転換およびそれらの遊走能の評価を示す例示的データを提示する図である。図4A～4Cは、分化18日目において、上記の3つのSHH処理群由来の細胞を、NKX2.1::GFP発現についてのFACSにかけ、これを再播種し、表示するマーカーとの共標識について評価したことを示す図である。3つの群全てについて、前駆細胞マーカー(上パネル:ネスチン;Ki67)との共標識における減殺、およびニューロン分化のマーカーにおける増大(下パネル:GABA;TUn;ダブルコルチン(DCX);カルビンディン)が見られた。図4Dは、分化2～18日目SHH処理群における、視床下部で濃縮されるタンパク質RAXの増大、および分化10～18日目SHH処理群における、内側神経節隆起(MGE)で濃縮されるタンパク質LHX6の増大を示すウェスタンブロットである。解析の前に、細胞を、NKX2.1::GFPについてソートした。図4E～4Gは、分化32日目において、分化10～18日目SHH処理群に由来するNKX2.1::GFP+細胞の多くはまた、DLX2およびASCL1も発現したことを示す図である。図4H～4Nは、分化32日目にソートしたNKX2.1::GFP+細胞の、E13.5マウス冠状薄片培養物のMGEへの移植についての例示的データを提示する図である。図4Hは、移植部位および遊走を定量化するための帯域を実証する冠状半断面についての概略を示す図である。図4Iおよび4Jは、分化2～18日目SHH処理群および分化6～18日目SHH処理群のいずれにおいても、帯域1へと遊走した細胞は極めて少数であり、帯域2へと遊走した細胞

胞はさらに少数であったことを示す図である。図4 Kおよび4 Lは、分化10～18日目SHH処理群により、皮質および線条体領域への有意かつ頑健な遊走が裏付けられたことを示す図であり、多くのGFP+細胞が、遊走細胞と符合する二極形態を呈示する（図4 L）。図4 M～4 Nは、分化10～18日目SHH処理群について、GFP+細胞が検出および定量化された領域を示す図である。図4 M：移植後日数（DPT）2日である（* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用）。図4 N：移植後日数（DPT）6日である（* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用）。図4 Oおよび4 Pは、分化10～18日目SHH処理群由来の32日目にソートしたNKX2.1：GFP+細胞の、新生仔マウスの新皮質への移植を示す図である。固定した切片を、生後30日目に評価した。分化10～18日目SHH処理群由来のMGE様細胞とは著しく対照的に（図4 P）、分化2～18日目SHH処理群（図4 O）も、分化6～18日目SHH処理群（データは示さない）も、移植部位からの広範な遊走をもたらさなかった。

【0055】

【図5】図5は、成体マウス皮質内のNKX2.1：GFP+ニューロン前駆体細胞の分布を示す例示的データを提示する図である。NKX2.1：GFP発現細胞を、分化32日目にソートし、成体IL2RG免疫不全マウスへと移植した。分化2～18日目SHH処理群（図5 A）および分化5、6～18日目SHH処理群（図5 B）が、30日後の皮質内でGFP発現領域を示したことは、GFP細胞体が、移植コアから移出しなかったことを意味する。分化10～18日目SHH処理群（図5 C）は、GFP発現細胞が、移植コアから移出し、皮質実質の全体にわたり分布することを示した。加えて、分化10～18日目SHH処理群由来のGFP発現細胞は、皮質層の全体にわたり分布し、ニューロン形態を提示する（図5 D）。

【0056】

【図6】図6は、新生仔マウス新皮質への移植後における、NKX2.1-GFP+細胞による分化の緩徐なペースを示す例示的データを提示する図である。分化32日目における、分化10～18日目SHH処理群由来のNKX2.1-GFP系の移植の例（例えば、「MGE様プロトコル」）が示される。細胞を、GFPを決定するためのFACSにかけ、次いで、遺伝子的免疫不全マウスの新生仔新皮質へと移植し、6週間後に、固定した切片中で評価した。図6 Aは、GFP免疫蛍光標識の低倍率図である。スケールバーは100 μm である。四角く囲った領域は、3個の細胞を示し、図6 A1においてより高倍率で示す。in vivoにおける分化の6週間後であってもなお、これらの細胞の大半は、比較的未分化の外見であって、しばしば成長円錐（矢印）を先端に有する二極性または単極性の突起を伴う外見を有し続けることに注目されたい。スケールバーは20 μm である。図6 Bは、ヒト特異的な細胞マーカーであるSC121およびGFPについての免疫蛍光画像（図6 B（SC121/GFP）、図6 B1（GFP）、図6 B2（SC121））である。全てのGFP+細胞は、SC121を発現し、ほぼ全てということはないが大半のこの年齢のSC121細胞は、GFPを発現する（矢印を参照されたい）。移植の2週間後においてもまた、同様の低百分率のSC121+/GFP-細胞が見られる（データは示さない）。スケールバーは35 μm であり、図6 B1～B3：スケールバーは40 μm である。図6 Cおよび6 C1は、GABA（赤色）およびGFP（緑色）についての免疫蛍光を用いた同じ切片図である。強く共標識された2つの細胞を、矢印で指し示す。GABAの免疫検出は、切片内によく透過しないので、細胞体が切片の切り口から5ミクロン以内に位置するGFP+細胞だけを選択的にカウントすることにより、共標識を定量した。このアプローチにより、2つの6週間後の移植片に由来する細胞51個中46個（90.2%）が強く共標識された。スケールバーは40 μm である。図6 Dは、GFP-NKX2.1およびニューロン前駆体細胞のマーカーであるDCXについての免疫蛍光画像；疑似カラーのCy5シグナル）を示す図である。全てのGFP+細胞は、NKX2.1発現核（矢印）を有し、また、DCXについての共標識を有する。スケールバーは40 μm である。

【0057】

【図7】図7は、NKX2.1+細胞の、生理学的に活性のニューロンへの成熟を示す例示的データを提示する図である。図7Aは、胚生13.5日目(E13.5)マウスからの皮質興奮性ニューロン培養物の調製を示す図であり、この上に分化32日目のFACSによりソートしたヒトNKX2.1::GFP+細胞を播種した。図7B~7Eは、*in vitro*日数(DIV)30日において、分化10~18日目SHH処理群由来の培養物が、GABAを共発現するNKX2.1::GFP+細胞について濃縮されていたことを示す図である(図7B;図7Cで定量; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用)。これに対し、分化6~18日目SHH処理群は、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)とのNKX2.1::GFP共標識について濃縮されていた(図7D;図7Eで定量; * $p < 0.05$, ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用)。図7Fは、28 DIVにおいて記録した、分化10~18日目SHH処理群ニューロンのスパイクパターンを示す図である。活動電位は、底部に示されるプロトコールにより誘発させた。図7Gは、28 DIVにおいて記録した、分化6~18日目SHH処理群ニューロンについてのスパイクパターンを示す図である。活動電位は、底部に示されるプロトコールにより誘発させた。図7Hは、GABA_A受容体アンタゴニストであるビククリンの非存在下において、GABA作動性ニューロンについて濃縮された培養物(分化10~18日目SHH処理群)から記録された自発的スパイクを示す図である。図7Iは、GABA_A受容体アンタゴニストであるビククリンの非存在下において、コリン作動性ニューロンについて濃縮された培養物(分化6~18日目SHH処理群)から記録された自発的スパイクを示す図である。図7Jは、GABA_A受容体アンタゴニストであるビククリンの存在下において、GABA作動性ニューロンについて濃縮された培養物(分化10~18日目SHH処理群)から記録された自発的スパイクを示す図である。図7Kは、GABA_A受容体アンタゴニストであるビククリンの存在下において、コリン作動性ニューロンについて濃縮された培養物(分化6~18日目SHH処理群)から記録された自発的スパイクを示す図である。ビククリンが、分化6~18日目SHH処理群における自発的発火活性に対してほとんど影響を及ぼさなかったことは、マウスフィーダー細胞またはこのプロトコールにより発生させたヒトNKX2.1::GFP+細胞のいずれかに由来するGABA作動性細胞の欠如と符合する。

【0058】

【図8】図8は、NKX2.1::GFP+GABA作動性介在ニューロンは、興奮性シナプス入力および抑制性シナプス入力の両方を受容することを示す例示的データを提示する図である。図8A~8Eは、NKX2.1::GFP+、小胞GABAトランスポーター(VGAT;図8A)、およびシナプス後GABA作動性マーカーであるゲフィリン(図8A)を示す、焦点面をずらしたz積層化共焦点画像を示す図である。ゲフィリンと共標識されたこのGFP+細胞の樹状突起は、VGATを発現するシナプス前終末を受容しつつある(矢印)。加えて、GFP+軸索突起は、GFP陰性でゲフィリンを発現するシナプス後突起に隣接して、VGAT+シナプス前終末を形成した(アステリスク)。図8Fは、全細胞パッチクランプにより、分化10~18日目SHH処理群のNKX2.1::GFP+ニューロンから記録される自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)が明らかにされることを示す図であり、これはGABA_A受容体アンタゴニストであるビククリンを添加することにより可逆的に遮断される。図8G~8Kは、NKX2.1::GFP、小胞グルタミン酸トランスポーター1(VGLUT1;図8G)、およびシナプス後マーカーであるPSD-95(図8G)を示す、焦点面をずらしたz積層化共焦点画像を示す図である。このGFP+細胞は、PSD-95と共標識された樹状突起であって、VGLUT1を発現するシナプス前終末に隣接する樹状突起を有する。VGLUT1を発現するGFP陰性細胞の存在(図8Gの矢印)により、培養物中の興奮性グルタミン酸作動性ニューロンの存在が確認された。図8Lは、自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)が、分化10~18日目SHH処理群のNKX2.1::GFP+ニューロンにおいて検出されたことは、グルタミン酸作動性シナプス入力の見かけの存在と符合することを示す

図である。全ての細胞は、分化32日目におけるNKX2.1::GFPについてのFACSの後に、マウス皮質フィーダー上に播種した。

【0059】

【図9】図9Aは、分化10～18日目SHH処理群のニューロンから記録された自発性IPSCおよび微小IPSCの例を提示する図である。図9Bは、平均sIPSC（グレー；n=150）と、平均mIPSC（黒色；n=56）との例示的重合せを提示する図である。マウス皮質フィーダー細胞上に播種したニューロンを、分化26～30日目に記録した。図9Cは、IPSC（グレー）およびmIPSC（黒色）についての例示的な累積確率ヒストグラムを提示する図である。図9Dは、分化30日目における、ヒトESC由来の皮質前駆体細胞内のsIPSP（グレー；ニューロンマーカー（MAP2）、星状細胞マーカー（GFAP）、GABA、および皮質マーカー（SATB2、TBR1）の周波数を比較する、群分けした例示的データを提示する図である。全ての細胞は、分化32日目におけるNKX2.1::GFPについてのFACSの後に、マウスまたはヒトESC由来の皮質フィーダー上に播種した。

10

【0060】

【図10】図10は、初代マウス皮質フィーダー細胞と対比したヒトESC由来の皮質フィーダー細胞の代表的な表現型特徴付けからのデータを提示する図である。全体的に、初代マウス皮質フィーダーとhESC由来の皮質フィーダーの間では、同等なマーカー発現が見られた。図10A～10Dは、FACSを媒介する皮質ニューロン前駆体細胞の単離であって、CD24の発現ならびにCD44およびCXCR4（CD184）の発現の欠如に基づく単離からのデータを示す図である。図10E～10Lは、分化30日目における、hESC由来の皮質前駆体細胞内の、ニューロンマーカー（MAP2）、星状細胞マーカー（GFAP）、GABA、および皮質マーカー（SATB2、TBR1）の発現についての免疫細胞化学解析からの画像を示す図である。図10M～10Tは、E13.5マウス皮質培養物中のニューロンマーカー（MAP2）、星状細胞マーカー（GFAP）、GABA、および皮質マーカー（SATB2、TBR1）の発現についての免疫細胞化学解析からの画像を示す図である。

20

【0061】

【図11】図11は、NKX2.1+皮質介在ニューロンからの代表的な電流クランプ記録を提示する図である。図11A～11Cは、推定大脳皮質投射ニューロンについて濃縮された、マウス皮質フィーダー細胞（図11Aおよび図11B）またはヒトESC由来ニューロン（図11C）について記録した、分化10～18日目SHH処理群由来のGFP陽性ニューロンからの代表的な出力波形記録を示す図である。脱分極電圧応答は、下方に出力波形の各セットを示すプロトコールを使用して誘発した。全ての記録について、保持電位は、-60mVであった。全ての細胞は、分化32日目におけるNKX2.1::GFPについてのFACSの後に、マウス皮質フィーダーまたはヒトESC由来の皮質フィーダー上に播種した。

30

【0062】

【図12】図12は、マウス皮質フィーダー上で30 DIVにわたり増殖させたNKX2.1::GFP+細胞についての神経化学プロファイリングを示す例示的データを提示する図である。細胞は、表示のマーカーについての免疫蛍光により標識し、結果は、グラフにおいて定量化した（図12A～12E：平均±SEM；* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用；（*）6～18群と直接比較した場合にp<0.05；標準的なシェッフェ検定では、p値は有意性に到達しなかった：p=0.08）。細胞の標識の代表的画像を、図12F～12Jに示す。SHH2～18条件では、細胞の大半は、TH（図12Aおよび12F）およびnNOS（図12Bおよび12G）と共標識された。10～18条件では、GFP+細胞の多くは、カルビンディン（Calb：図12Cおよび12H）、ソマトスタチン（SST；図12Dおよび12I）、およびパルブアルブミン（PV；図12Eおよび12J）と共標識された。それらの各々は、ヒトでは、成熟皮質介在ニューロンの部分集団内に存在

40

50

する。全ての細胞を、32日目におけるNKX2.1::GFPについてのFACSの後に、マウス皮質フィーダー上に播種した。(図12F~12J)中のスケールバーは、50mmを表す。

【発明を実施するための形態】

【0063】

詳細な説明

本開示は、前脳ニューロン分化は、増強することができ、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンを含む、中枢神経系(CNS)のある特定のニューロンは、ある特定の多能性および／または多分化能細胞(例えば、ヒト胚性幹細胞(hESC)および／またはヒト人工多能性幹細胞(hiPSC))を、1つまたは複数のWntアンタゴニストと組み合わせ、1つ、好ましくは2つまたはそれより多くのSMAD転写因子阻害剤と、ニューロン前駆体細胞を発生させるのに適切な濃度で、これに適切な持続期間にわたり接触させることにより、*in vitro*で効率的に誘導することができ、これらのニューロン前駆体細胞を、適切な濃度の1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と、適切な持続期間にわたり接触させ、これにより、皮質介在ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、視床下部ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、および／または視索前野コリン作動性ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数の産生を誘導するという発見に基づく。

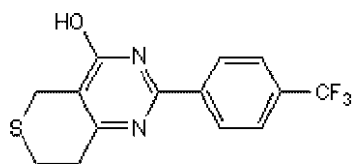
【0064】

NKX2.1::GFP hESCレポーター細胞系を使用して、適時のSHHシグナル伝達の活性化と併せて、細胞をXAV939で処理すると、3つの異なる腹側前脳前駆体細胞集団を導出することが発見された。本明細書で開示される通り、ヒト多能性幹細胞(PSC)およびヒト胚のいずれにおける結果も、腹側前脳内でのヒトFOXA2の一過性の発現を含む、マウス前脳の発達とヒト前脳の発達との間の差異を明らかにする。成熟した機能的特性ならびにバルブアルブミンおよびソマトスタチンを含む後期皮質介在ニューロンマーカーの発現は、*in vivo*におけるこれらの細胞の発達が長期間を要するにも拘らず、*in vitro*における、hiPSCの、ヒト皮質介在ニューロンへの分化を証拠立てた。SHHシグナル活性化のタイミングを調整することにより、ニューロン分化を、視床下部ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロンの産生に方向付けることがさらに発見された。

【0065】

XAV939とは、名称が3, 5, 7, 8-テトラヒドロ-2-[4-(トリフルオロメチル)フェニル]-4H-チオピラノ[4, 3-d]ピリミジン-4-オンであり、化学式がC₁₄H₁₁F₃N₂O Sである、市販の低分子である。XAV939の構造を、下記に挙げる。XAV929は、タンキラーゼ(TNKs)阻害剤であり、β-カテニンの分解の刺激およびアキシンの安定化を介して、Wntシグナル伝達をアンタゴナイズする。XAV939は、μ-カテニン依存性結腸癌細胞系であるDLD-1の増殖を阻害する。

【化1】



【0066】

したがって、本開示は、様々な安定的ニューロン細胞(例えば、皮質介在ニューロン細胞、視床下部細胞、および視索前野コリン作動性ニューロン)を、ヒト多能性幹細胞の制御された誘導、ならびにこのような幹細胞の、1つまたは複数のSMAD阻害剤および／

またはWntアンタゴニストにより方向付けられた分化から生じるニューロン細胞の制御された誘導であって、移植用の移植片のために、または神経学的障害および疾患についての研究プラットフォームとしてのほか、治療用薬物候補の同定および特徴付けのために利用すると有利でありうる、皮質介在ニューロン細胞、視床下部細胞、および／または視索前野コリン作動性ニューロンを含む細胞の集団を形成する誘導を介して発生させるための、幹細胞および前駆細胞など、多能性および／または多分化能細胞の方向付けられた分化を誘導するための方法を提供する。

【0067】

本明細書では、神経細胞の方向付けられた分化を制御するのに使用されうる、多様な分化誘導剤および実験プロトコールが提供される。本明細書では、NKX2.1::GFPhESCreポーター細胞系において、ヒト皮質介在ニューロンの非常に効率的な導出が開示される。SMADおよびWnt阻害効果を活用して、幹細胞のニューロン前駆体細胞への分化を導くことに加えて、本開示は、SHH活性化のタイミングおよび持続期間を操作して、これにより、3つの異なるGFPhニューロン細胞集団であって、各々が特異的なマーカープロファイル、例えば、特異的な転写プロファイルのほか、対応する神経伝達物質の表現型および遊走挙動を呈示する、GFPhニューロン細胞集団の発生を達成することについてさらに記載する。

【0068】

本明細書でさらに開示される通り、*in vivo*のマウス皮質環境における分化は、皮質介在ニューロンのシナプス入力および電気生理学的特性を呈示する、パルブアルブミンおよびソマトスタチンを発現するニューロンをもたらす。こうして、SHHを媒介するシグナル伝達は、ヒト腹側前脳の発達の*in vitro*における細胞ベースのモデルであって、皮質介在ニューロンモデルを含み、効果的な細胞療法を開発するために、薬物スクリーニングのために、かつ、ヒト神経変性病態およびヒト神経精神病態を研究するために利用されうるモデルの作製を可能とするのに十分に詳細に規定されている。

【0069】

本明細書で詳細に記載されるこれらの発見および他の発見に基づき、ある特定の実施形態では、本開示は、

(1) 皮質介在ニューロンまたは皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を含むニューロンを含む、ニューロンを発生させるための*in vitro*における方法であって、

a. 多能性細胞および／または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMAD阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、該多能性および／または多分化能細胞からのニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、

b. ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップと
による多能性細胞または多分化能細胞の分化を含む*in vitro*における方法；

(2) 視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるための*in vitro*における方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞または多分化能細胞の分化により発生させ、

a. 1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 2つまたはそれより多くのSMAD阻害剤、および(ii) 1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、

b. ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップと
を含む*in vitro*における方法；

10

20

30

40

50

(3) 視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるための *in vitro* における方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞および／または多分化能細胞の分化により発生させ、

a. 1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 2つまたはそれより多くの SMAD 阻害剤、および (ii) 1つまたは複数の Wnt シグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、

b. ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップと

を含む *in vitro* における方法；

(4) 皮質介在ニューロン細胞および／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro* で分化させたニューロン細胞が、

a. 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

b. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の Wnt シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

c. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させるステップ

により産生される、組成物；

(5) 視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro* で分化させたニューロン細胞が、

a. 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

b. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の Wnt シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

c. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させるステップ

により産生される、組成物；

(6) 視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の *in vitro* で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro* で分化させたニューロン細胞が、

a. 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

b. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の Wnt シグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、

c. 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させるステップ

により産生される、組成物；

(7) SMAD および Wnt シグナル伝達阻害剤および／またはアンタゴニストならびに SHH の活性化因子を同定し、特徴付けるための細胞ベースの方法；

(8) SMAD および Wnt シグナル伝達阻害剤および／またはアンタゴニストならびに SHH シグナル伝達活性化因子の組合せを含む組成物；

(9) 前脳細胞を発生させるための *in vitro* における方法；

(10) パーキンソン病、アルツハイマー病、ALS、多系統萎縮症などの神経変性障害

10

20

30

40

50

および疾患、ならびに統合失調症および自閉症関連障害などの神経精神障害および疾患を含む神経学的障害および疾患を処置するための方法であって、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンを *in vivo* において患者に投与するステップを含む方法を提供する。

【0070】

本明細書でより詳細に記載される通り、本明細書で開示される方法および組成物は、新規に発見され、本明細書で開示される、SMAD阻害とWntアンタゴニズムとの関係であって、多分化能、多能性、および／または全能性細胞などの細胞の分化を誘導してニューロン前駆体細胞を発生させ、このようなニューロン前駆体細胞を、皮質介在ニューロンもしくはその前駆体細胞、視床下部細胞もしくはその前駆体細胞、および／または視索前野コリン作動性細胞もしくはその前駆体細胞のマーカ1つまたは複数を有するニューロン細胞を発生させるように、ニューロン細胞をSHHの活性化因子と、活性化因子の濃度およびタイミングの特定の条件下で接触させることによって皮質介在ニューロン、視床下部、および視索前野コリン作動性系統内の細胞へとさらに分化させることにおける、SMAD阻害とWntアンタゴニズムとの関係に基づく。

【0071】

本明細書では、本開示のこれらの態様および他の態様であって、(1)ニューロン細胞を、人工多能性幹細胞(iPSC)および胚性幹細胞(ESC)、特に、ヒトiPSC(hiPSC)およびヒトESC(hESC)を含むヒト細胞を含む多分化能、多能性、および／または全能性細胞から発生させるための方法；(2)皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン系統の細胞を発生させるのに利用されると有利でありうる例示的なSMAD阻害剤、Wntアンタゴニスト、およびSHH活性化因子；(4)ニューロン細胞を、多分化能、多能性、および／または全能性細胞から発生させるための適切な条件、ならびに皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン系統の細胞を発生させるために適切な条件；(4)皮質介在ニューロン細胞および前駆体細胞のマーカ、視床下部細胞および前駆体細胞のマーカ、ならびに視索前野コリン作動性細胞および前駆体細胞のマーカ、ならびに細胞内のこのようなマーカを検出するための方法；(5) *in vivo* における患者への送達に適切な医薬組成物および処方物を含む組成物および処方物であって、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロン系統のうちの1つまたは複数の細胞を含む組成物および処方物；(6)多分化能、多能性、および／または全能性細胞の *in vitro* 培養物中で、ニューロン細胞の発生を誘導するのに使用することができ、このようなニューロン細胞の培養物中で、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン系統の細胞の発生を誘導するのに使用することができる、SMAD阻害剤、Wntアンタゴニスト、およびSHH活性化因子の適切な組合せおよび濃度を含む組成物およびキット；ならびに(7)皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロン系統の細胞を投与することにより、神経変性障害もしくは疾患または神経精神障害もしくは疾患に罹患している患者および／またはこれを発症する危険性がある患者を処置するための細胞療法ベースの方法を含む態様が、さらに詳細に記載される。

【0072】

定義

本明細書で使用される場合、以下の用語（およびその同族語）は、文脈によりそうでないことが要求されない限りにおいて、以下でそれらに帰せられた意味を有する。

【0073】

「シグナル伝達タンパク質」への言及における「シグナル伝達」という用語は、膜受容体タンパク質へのリガンド結合または他の何らかの刺激により、直接的または間接的に活性化されるかまたは他の形で影響を受ける（例えば、阻害される）タンパク質を指す。シグナル伝達タンパク質の例は、SMAD、Wnt、およびSHH複合体タンパク質を含む

。用語は、細胞の応答と直接連関しない、リガンド-受容体間相互作用を含む。したがって、リガンドにより活性化された受容体は、リガンドが細胞の挙動に対して最終的な生理学的効果を及ぼす前に、細胞内部の他のタンパク質とまず相互作用する可能性がある。一連の複数の相互作用する細胞内タンパク質の挙動は、受容体の活性化または阻害の後で変化することが多い。受容体の活性化により誘導される細胞変化のセット全体は、シグナル伝達機構またはシグナル伝達経路と呼ばれ、この用語の意味の中に含まれる。本明細書で使用される場合、以下の用語（およびその同族語）は、文脈によりそうでないことが要求されない限りにおいて、以下でそれらに帰せられた意味を有する。

【0074】

「SMAD (small mothers against decapentaplegic)」または「SMAD」という用語は、幹細胞の方向付けられた細胞分化をモジュレートすることが可能なシグナル伝達分子のクラスを指す。SMADとは、細胞外シグナルを、トランスフォーミング増殖因子ベータリガンドから核に伝達し、そこで、下流の遺伝子転写を活性化させる細胞内タンパク質であり、幹細胞の方向付けられた分化をモジュレートすることが可能なシグナル伝達分子のクラスのメンバーである。

【0075】

「ウィングレス」または「Wnt」という用語は、それらのシグナル伝達が、 β -カテニンを伴うかまたは伴わずに媒介される、FrizzledおよびLRP Derailed/RYK受容体など、WntファミリーのリガンドおよびWntファミリーの受容体から構成されるシグナル経路を指す。

【0076】

本明細書で使用される場合、「ソニックヘッジホッグ」または「SHH」という用語は、ヘッジホッグと呼ばれる、哺乳動物のシグナル伝達経路ファミリー内の3つのタンパク質のうちの1つ（他の2つは、インディアンヘッジホッグ（IHH）およびデザートヘッジホッグ（DHH）である）を指す。SHHは、四肢の指の成長および脳の組織化など、脊椎動物の器官形成の調節において役割を果たすと考えられている。したがって、ソニックヘッジホッグタンパク質は、拡散して、濃度勾配を形成し、その濃度に応じて、発生しつつある胚細胞に異なる影響を及ぼすモルフォゲンである。SHHはまた、成体幹細胞の細胞分裂も制御する可能性があり、一部のがんの発達に関与している。SHHは、細胞運命の決定、組織化の再構築、極性、形態、増殖、および分化を含む胚発生中の多様な過程の調節と関連する（BertrandおよびDahmane、Trends Cell Biol.、2006年、16巻：597～605頁）。

【0077】

SMADシグナル伝達またはWntシグナル伝達阻害剤など、シグナル伝達分子またはシグナル伝達分子の経路の阻害への言及における「阻害剤」という用語は、分子または経路のシグナル伝達機能に干渉する（すなわち、低減させるか、または抑制するか、または消失させるか、または遮断する）化合物または他の分子（例えば、低分子、ペプチド、ペプチド模倣体、天然化合物、siRNA、アンチセンス核酸、アプタマー、または抗体）を指す。言い換えると、阻害剤とは、名指されたタンパク質（シグナル伝達分子、名指されたシグナル伝達分子と関連する任意の分子、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β （GSK3 β ）など、名指された関連分子）（例えば、本明細書で記載されるシグナル伝達分子を含むがこれに限定されない）の任意の活性を、一例では、SMADシグナル伝達に直接接触すること、SMAD mRNAに接触すること、SMADのコンフォメーション変化を引き起こすこと、SMADタンパク質レベルを低下させること、またはSMADの、シグナル伝達パートナー（例えば、本明細書で記載されるシグナル伝達パートナーを含む）との相互作用に干渉すること、およびSMAD標的遺伝子（例えば、本明細書で記載されるSMAD標的遺伝子）の発現に影響を及ぼすことを介して変化させる、任意の化合物または分子である。阻害剤はまた、上流のシグナル伝達分子を妨害することにより、SMADの生物学的活性を間接的に調節する分子も含む（例えば、細胞外ドメイン内のシグナル伝達分子であり、シグナル伝達分子および効果の例として、骨形態形成タンパク質を封

10

20

30

40

50

鎖するノギン、ALK受容体1、2、3、および6の活性化を阻害し、これにより、下流におけるSMADの活性化を防止する効果が挙げられる。同様に、Chordin、Cerberus、Follistatinは、SMADシグナル伝達の細胞外活性化因子を同様に封鎖する。また、膜貫通タンパク質であるBambiも、細胞外TGFβシグナル伝達分子を封鎖する偽受容体として作用する。アクチビン、nodal、TGFβ、およびBMPを遮断する抗体は、SMADシグナル伝達の細胞外活性化因子を中和するなどの使用のために企図されている）。したがって、一実施形態では、本開示の阻害剤は、デフォルトから非デフォルト細胞型への分化を誘導する（変更する）、または変化させる、例えば、少なくとも3つの阻害剤を含む本開示の方法のうちの1つにより、非デフォルトの神経前駆細胞が産生された。好ましい実施形態では、本明細書で開示される阻害剤は、細胞の分化を、本明細書で開示される皮質介在ニューロンを産生するための非デフォルト細胞型など、本明細書で記載される非デフォルト細胞型に方向付けるために、デフォルトのシグナル伝達を「変化させる」か、または「低下させる」か、または「遮断する」。したがって、本開示の阻害剤は、例えば、本開示の皮質介在ニューロンをもたらす一助となるシグナル分子活性を増大または減少させるための、天然または合成の生物学的化合物の場合もあり、低分子の場合もある。阻害剤は、名指されたシグナル伝達分子の上流の分子に結合し、影響を及ぼし、これが、名指された分子の阻害を引き起こすことにより誘導される阻害に加えて、競合的阻害（活性部位に、別の公知の結合化合物の結合を排除または低減するように結合する）およびアロステリック阻害（化合物の、そのタンパク質の活性部位に対する結合に干渉するよう、タンパク質に、タンパク質のコンフォメーションを変化させるように結合する）との関連でも記載される。

10

20

【0078】

「LSB」という用語は、細胞内のトランスフォーミング増殖因子ベータ（TGFβ）／アクチビン－Nodalシグナル伝達およびSMAD（small mothers against decapentaplegic）シグナル伝達からなるシグナル伝達を低下させるかまたは遮断することが可能な2つの化合物LDN-193189およびSB431542の組合せを指す。

【0079】

「XLSB」という用語は、3つの化合物の組合せであって、それらのうちの最初の2つの化合物が、細胞内のトランスフォーミング増殖因子ベータ（TGFβ）／アクチビン－Nodalシグナル伝達およびSMAD（small mothers against decapentaplegic）シグナル伝達からなるシグナル伝達を低下させるかまたは遮断することが可能なLDN-193189およびSB431542を含み、それらのうちの最後の化合物が、Wntシグナル伝達を阻害することが可能なタンキラーゼ阻害剤であるXAV939である組合せを指す。

30

【0080】

「SHHシグナル伝達経路活性化因子」という用語は、SHHシグナル伝達経路を活性化する物質を指すことを意図する。それがSHHが媒介するシグナル伝達経路を増強するのであれば、SHHシグナル伝達経路活性化因子に特定の限定が付与されることはない。SHHシグナル伝達経路は、2つの膜貫通タンパク質である、Ptc（Patched）およびSmo（Smoothened）を伴う。本発明で有用なSHHシグナル伝達経路活性化因子の例は、ヘッジホッグファミリーに属するタンパク質（例えば、精製SHH、組換えSHH）、SHH受容体の活性化因子（例えば、プルモルファミン、Hg-Agなど）、Ptcの、Smoとの相互作用の阻害剤、Smo受容体の活性化因子、Ci/Gliファミリーのレベルを上昇させる物質、Ci/Gli因子の細胞内分解の阻害剤、およびトランスフェクションによりもたらされるShh過剰発現構築物またはCi/Gli過剰発現構築物を含む。一部の好ましい実施形態では、本開示における「SHHシグナル伝達経路活性化因子」は、組換えSHHおよびプルモルファミンを含む。

40

【0081】

分化する細胞系内の細胞に関して使用される場合、「分化」という用語は、細胞が、1

50

つの細胞型（例えば、分化可能な多分化能、全能性、または多能性細胞）から、完全分化細胞など、別の細胞型に分化する過程を指す。より一般に、「分化」という用語は、特化していない幹細胞または前駆体細胞が、脳細胞、心臓細胞、肝細胞、または筋細胞など、特化細胞または完全分化細胞の特徴を獲得する過程を指す。分化は、通常は、細胞表面内に埋め込まれたタンパク質を伴うシグナル伝達経路を介した、細胞遺伝子の、細胞外の物理的および化学的条件との相互作用により制御される。

【0082】

「方向付けられた分化」という用語は、本開示に従う皮質介在ニューロン細胞など、特定の（例えば、所望の）細胞型への分化を誘導するための幹細胞および前駆体細胞の培養条件の操作を指す。

10

【0083】

「分化剤」という用語は、特化していない状態、例えば、幹細胞の状態の、より特化した細胞運命（例えば、中枢神経系細胞、神経細胞、前脳ニューロン細胞、皮質介在ニューロンなど）への移行を促進する、低分子、増殖因子タンパク質、および他の増殖条件のうちの1つまたは複数の使用を指す。言い換えると、分化剤とは、幹細胞を、体細胞をもたらす細胞経路に傾倒させる特性を有する物質である。例えば、このような化合物として、Wnt活性化剤またはSMAD阻害剤が挙げられうるがこれらに限定されない。

【0084】

細胞への言及における「分化の誘導」という用語は、デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）を、非デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）に変化させることを指す。したがって、「幹細胞における分化の誘導」とは、細胞を、遺伝子型（すなわち、マイクロアレイなどの遺伝子解析により決定される場合の遺伝子発現の変化）および／または表現型（すなわち、NKX2.1などのタンパク質の発現の変化）など、幹細胞と異なる特徴を伴う子孫細胞に分裂するように誘導することを指す。

20

【0085】

本発明のこの態様の一部の実施形態では、細胞の集団は、分化形質転換細胞の集団、好ましくは、ヒト分化形質転換細胞の集団でありうる。分化形質転換細胞は、その表現型が、必ずしも多能性表現型または多分化能表現型に戻ることなく、異なる組織の成熟細胞の表現型に分化形質転換または再方向付けがなされた1つの組織型の成熟分化細胞を包摂する。分化形質転換を起こし細胞には、任意の体細胞のほか、成体幹細胞が含まれる。当技術分野では、細胞を分化形質転換する方法が公知である（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Thomas KuntzigerおよびPhilippe Collas、Transdifferentiation、HANDBOOK OF STEM CELLS、147巻（Robert Lanza編、2004年）を参照されたい）。分化形質転換された神経前駆細胞およびニューロン前駆細胞を産生する方法は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Levesqueらによる、米国特許第6,949,380号、同第6,087,168号、および同第7,041,507号；ならびにSuhらによる、米国特許公開第20060099190号、およびDezawaによる、同第2006/0251624号において記載されている。

30

【0086】

細胞を本明細書で開示されるとおりの分子または物質との「接触」という用語は、文脈により要求されうる通りに、分子または物質を培養培地中に入れること、または分子を細胞内に導入することなどにより、分子または物質を、それが細胞に作用することを可能とする場所に置くことを指す。分子は、低分子化合物、ポリヌクレオチド、ポリペプチド（例えば、精製タンパク質および／または組換えタンパク質）でありうる。加えて、接触はまた、細胞内の遺伝子の発現の誘導、例えば、細胞に分子をコードする核酸を含有するベクターをトランスフェクトすることを含む。接触は、任意の適切な方法を使用して達成することができ、細胞外の場合もあり、細胞内の場合もある。例えば、一実施形態では、接触は、化合物／物質を、それ自体として細胞内に導入することによるものであるか、またはその化合物もしくは物質を発現させるように、細胞を遺伝子改変することによるもので

40

50

ある。接触は、細胞を、分子または分子を含有するビヒクルに曝露させる方法、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、トランスフェクションにより細胞に送達する方法を含む、様々な方法で達することができる。接触はまた、接触が、細胞外膜上で生じるように、化合物または物質を細胞培養物に添加することにより達成することもできる。接触はまた、組換えタンパク質の産生により、所与の細胞内で達成することもできる。

【0087】

本明細書で使用される場合、「分化～日目」という用語は、幹細胞培養物を分化誘導剤分子に接触させた後における、24時間（すなわち、1日）間隔を有する時系列を指す。例えば、このような誘導剤分子として、Wnt阻害剤およびSMAD阻害剤分子が挙げられうるがこれらに限定されない。培養物を誘導剤分子と接触させる日を、分化1日目として言及する。例えば、分化2日目とは、幹細胞培養物を分化誘導剤分子に接触させた24～48時間後の間の任意の時点を表す。

10

【0088】

「分化誘導分子」という用語は、ある特定の培養条件下で、多分化能、全能性、または多能性細胞の、例えば、ニューロン細胞への分化を引き起こす特性を有する分子を指す。このような誘導化合物は、Wnt阻害剤またはSMAD阻害剤またはSHH活性化因子を含みうるが、これらに限定されない。

【0089】

細胞分化経路への言及における「デフォルト」または「受動的」という用語は、ある特定の分子で処理しない場合、すなわち、通常の細胞培養条件下において、より特化していない細胞が、培養物中で、ある特定の分化細胞型となる経路を指す。言い換えると、デフォルト細胞は、細胞を、分化細胞型を変化させることが可能な分子（すなわち、モルフォゲン）に接触させない場合に結果として生じる。これに対し、細胞への言及における「非デフォルト」とは、デフォルト細胞と異なる結果として生じる分化細胞型を指す。すなわち、非デフォルト細胞とは、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、または視索前野ニューロンなどを含む本開示の細胞など、非デフォルト条件から生じる分化細胞型である。

20

【0090】

「ALK」または「未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase）」または「未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ」または「Kil-1」という用語は、膜会合型チロシンキナーゼ受容体を指す。

30

【0091】

「PAX（paired box）遺伝子6」または「PAX6」という用語は、非デフォルトの神経前駆細胞のマーカーを指す。

【0092】

「幹細胞」という用語は、全能性または多能性または多分化能であり、1つまたは複数の異なる細胞型に分化することが可能な細胞を指す。この用語は、胚性幹細胞として限定されず、器官から単離された幹細胞、例えば、皮膚幹細胞、および人工多能性幹細胞（iPSC）を含む。「全能性」という用語は、分化した生物内の任意の細胞型のほか、胎盤など、胚体外素材の細胞へ分化する細胞の能力を指す。本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞」または「iPSC」という用語は、胚性幹細胞と類似するが、体細胞（例えば、成体細胞）を、胚性幹細胞（ESC）の「幹細胞性」、すなわち、異なる分化経路に傾倒させるように導かれるそれらの能力を維持するのに重要な因子を発現するように強いることにより、胚性幹細胞様状態に入るように再プログラム化する場合に創出される種類の多能性幹細胞を指す。本明細書で使用される場合、細胞への言及における「前駆細胞」という用語は、該細胞が、もはや多能性幹細胞でないが、また、いまだ完全に傾倒した細胞でもない、中間の細胞段階を指す。本開示における前駆細胞は、体細胞に含まれる。

40

【0093】

「多能性」という用語は、任意の最終分化細胞型に分化することが可能な細胞系を指す

50

。

【0094】

「多分化能」という用語は、少なくとも2つの最終分化細胞型に分化することが可能な細胞系を指す。

【0095】

「胚性幹細胞」という用語は、培養物中で長期にわたり分化することなく分裂することが可能であり、3つの一次胚葉の細胞および組織に発達することが可能な着床前期または初期胚（例えば、胚盤胞期までであり、胚盤胞期を含む）に由来する原始（未分化の）細胞を指す。胚性幹細胞はまた、胚または胎盤または臍帯から単離することもできる。

【0096】

「胚性幹細胞系」という用語は、数日間、数カ月間、またはさらに数年間にわたり分化させずに増殖させることを可能とする *in vitro* 条件下で培養された胚性幹細胞の集団を指す。

【0097】

「人工多能性幹細胞」または「iPSC」という用語は、胚性幹細胞と類似する、ある特定の胚遺伝子（OCT4、SOX2、およびKLF4トランス遺伝子など）（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、TakahashiおよびYamanaka、Cell、126巻：663～676頁（2006年）を参照されたい）を、体細胞に導入することにより形成される多能性幹細胞の種類を指す。体細胞の例には、骨髄細胞、上皮細胞、線維芽細胞、造血細胞、肝細胞、腸細胞、間葉細胞、骨髄前駆体細胞および脾臓細胞が含まれるがこれらに限定されない。代替的に、iPSCは、体細胞を、胚性幹細胞（ESC）の「幹細胞性」、すなわち、異なる分化経路に傾倒するように導かれるそれらの能力を維持するのに重要な因子を発現させるように強いることにより、胚性幹細胞様状態に入るように再プログラム化することにより產生することができる。

【0098】

当技術分野では、幹細胞、特に、ヒト胚性幹細胞を培養するための方法が公知であり、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、全てがThomsonおよびLudwigによる、WO2006/029297、WO2006/019366、およびWO2006/029198、ならびにBergendahlおよびThomsonによる、WO2008/089351において記載されている。

【0099】

「神経細胞培養物」という用語は、FOXA2、SHH、Netrin-1、F-Spondinの発現を含むがこれらに限定されない特徴を提示する細胞系を指す。

【0100】

「細胞培養物」という用語は、任意の *in vitro* における細胞培養物を指す。この用語には、連続細胞系（例えば、不死表現型を伴う）、初代細胞培養物、有限細胞系（例えば、非形質転換細胞）、および、胚、多能性幹細胞、卵母細胞、および胚を含むが、これら限定されない *in vitro* で維持された他の任意の細胞集団（とりわけ、ニューロン）が含まれる。

【0101】

「*in vitro*」という用語は、人工的な環境および人工的な環境内で生じる過程または反応を指す。*in vitro* 環境は、試験管および細胞培養物からなりうるがこれらに限定されない。「*in vivo*」という用語は、天然の環境（例えば、動物または細胞）および天然の環境内で生じる過程または反応を指す。

【0102】

細胞または細胞の領域への言及における「前駆体細胞」という用語は、適切な条件下で、すなわち、適正な増殖因子、化合物、細胞外シグナル、細胞内シグナルなどと接触させた場合に発達する（分化する）細胞または細胞の領域の種類を指す。例えば、「ニューロン前駆体細胞」とは、ニューロンとなるよう傾倒しているが、複数種類のニューロン、例えば、皮質介在ニューロンまたは視床下部ニューロンなどに発達する潜在的可能性を有す

10

20

30

40

50

る細胞を指す。

【0103】

「マーカー」または「細胞マーカー」という用語は、個々に、または2つもしくはそれより多くの超えるマーカーの組合せのメンバーとして、特定の細胞または細胞型を識別する遺伝子またはタンパク質などの分子的または形態的形質を指す。したがって、マーカーは、指定されたマーカー群により、細胞または細胞型を、別の細胞または細胞型から識別しうるようなマーカーの「パターン」または組合せを指す場合がある。例えば、前脳細胞は、前脳細胞を弁別する、マーカー1つまたは複数、すなわち、FOX A 2 陽性およびNKX 2. 1 陽性を発現する。

【0104】

「前脳 (forebrain)」または「前脳 (prosencephalon)」という用語は、脳の最吻側（最前方）部分を指し、中枢神経系 (CNS) の初期発生中における、脳の1つの主要部分である。前脳は、間脳（腹側視床、視床、視床下部、視床腹部、視床上部、および視蓋前域）と終脳（大脳）とに分かれる。

【0105】

「終脳」という用語は、成熟大脳が発生する脳の胚構造を指す。哺乳動物では、背側終脳または脳外套は、大脳皮質に発生し、腹側終脳または外套下部は、大脳基底核となる。背側終脳の例示的なマーカーは、EMX 2 およびPAX 6 を含み、腹側終脳の例示的なマーカーは、NKX 2. 1、NKX 2. 2、ASCL 1、SIX 6、OLIG 2、およびNKX 6. 2 を含む。

【0106】

「大脳皮質」という用語は、ヒトおよび他の哺乳動物の大脳（脳）の神経組織の最も外側の層構造を指す。

【0107】

「介在ニューロン」という用語は、神経シグナルを標的ニューロンから受容し、神経シグナルをシナプス後ニューロンに伝達するニューロンとして定義される。介在ニューロンのシグナル伝達は、出力ニューロンとのその直接的なシナプス接続を介する場合もあり、1つまたは複数の介在ニューロンを通す伝達を介する場合もある。

【0108】

「皮質介在ニューロン」という用語は、パルブアルブミン (PV) を発現する介在ニューロン、CCK を発現する介在ニューロン、VIP を発現する介在ニューロン、およびSOM を発現する介在ニューロンを含むがこれらに限定されない、皮質の介在ニューロンを指す。これらのマーカーに加えて、皮質介在ニューロンについての他の例示的なマーカーとして、GABA が挙げられる。

【0109】

「皮質介在ニューロン前駆体細胞」という用語は、適切な条件下で皮質介在ニューロンに分化しうる完全に分化していないニューロン細胞を指す。例えば、皮質介在ニューロン前駆体細胞として、NKX 2. 1 + 腹側前脳前駆細胞、OLIG 2 + 神経節隆起に由来する細胞、ならびにOLIG 2、MASH 1、およびNKX 6. 2 を発現するニューロン前駆細胞が挙げられる。

【0110】

「精製された」、「精製する」、「精製」、「単離された」、「単離する」、「単離」という用語、および本明細書で使用されるこれらの文法的同等物は、試料に由来する少なくとも1つの夾雑物の量の低減を指す。例えば、ある細胞型は、望ましくない細胞型の量の、少なくとも10%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%、そして最も好ましくは少なくとも90%の低減により精製され、例えば、混合細胞培養物中に存在する細胞などの、非前脳細胞から単離された分化前脳細胞などである。したがって、細胞型の精製は、「濃縮」、すなわち、細胞培養物中のその細胞型の量および／または百分率における増大を結果としてもたらす。

。

10

20

30

40

50

【0111】

本明細書で使用される「*in vitro*」という用語は、人工的な環境および人工的な環境内で生じる過程または反応を指す。例示される *in vitro* 環境は、試験管および細胞培養物を含むがこれらに限定されない。

【0112】

本明細書で使用される「*in vivo*」という用語は、天然の環境（例えば、動物にまたは細胞）および胚発生、細胞分化、神経管の形成など天然の環境内で生じる過程または反応を指す。

【0113】

本明細書で開示される任意の細胞に言及する場合の「～から導出された」または「～から確立された」または「～から分化させた」という用語は、細胞系内、組織（解離胚など）内、または体液中の親細胞から、以下に限定されないが、単一細胞単離、*in vivo* における培養、処理および／または突然変異誘発、例えば以下を使用するもの、タンパク質、化学物質、放射線、ウイルスによる感染、モルフォゲンなど、DNA配列のトランスフェクション、培養した親細胞中に含まれる任意の細胞の選択（継代培養によるなど）など、任意の操作を使用して得られた（例えば、単離された、精製されたなど）細胞を指す。導出された細胞は、増殖因子、サイトカインへの応答、サイトカイン処理の選択的進行、接着、接着の欠如、ソーティング手順などにより、混合集団から選択することができる。

10

【0114】

本明細書で使用される場合、「培養細胞」という用語は一般に、*in vitro* で維持された細胞を指す。培養細胞は、「細胞系」および「初代培養細胞」を含む。この用語には、連続細胞系（例えば、不死表現型を伴う）、初代細胞培養物、有限細胞系（例えば、非形質転換細胞）、および胚、多能性幹細胞を含む *in vitro* で維持された他の任意の細胞集団（とりわけ、ニューロン）が含まれる。多くの培養細胞は、*in vitro* で増殖しうるが、一部の培養細胞、例えば、ニューロンは、*in vitro* で増殖することが可能ではない。

20

【0115】

「単層」、「単層培養物」、および「単層細胞培養物」という用語は、基材に接着しており、細胞1個の厚さである層として増殖する細胞、言い換えると、「付着させた細胞」を指す。単層は、フラスコ、試験管、カバーガラス（例えば、シェルバイアル）、ローラーボトルなどを含むがこれらに限定されない、任意の形式で増殖させることができる。「フィーダー細胞」という用語は、隣接する細胞に、付着する分子および／または増殖因子を提供するために使用される細胞を指し、例えば、共培養物中で、多能性幹細胞を維持するのに使用される。例えば、フィーダー細胞集団は、胚性マウス皮質細胞または胚性ヒト皮質細胞を含みうる。フィーダー細胞は一般に、単層（すなわち、「フィーダー細胞層」）を形成し、または懸濁液中に存在する場合もある。一部の実施形態では、これらのフィーダー細胞は、マウス胚性線維芽細胞を含む。

30

【0116】

「培養培地」および「細胞培養培地」という用語は、*in vitro* における細胞（すなわち、細胞培養物、細胞系など）の成長を支援するのに適切な培地を指す。用語を任意の特定の培養培地に限定することは意図されない。例えば、定義は、成長培地のほか、維持培地も包摂することが意図される。実際、この用語は、目的の細胞培養物および細胞の成長のために適切な任意の培養培地を包摂することが意図される。培養培地の非限定的な例は、Essential 6、Essential 8、KSRベースのMEF馴致培地、およびmTESrである。

40

【0117】

「細胞」という用語は、単一の細胞のほか、細胞の集団（すなわち、複数の細胞）も指す。集団は、ニューロン細胞の集団または未分化の胚性細胞の集団など、1つの細胞型を含む純粋な集団でありうる。代替的に、集団は、複数の細胞型、例えば、混合細胞集団を

50

含みうる。単数形の「細胞」の使用は、集団内の細胞の数を限定することを意味せず、例えば、細胞の混合集団は、少なくとも1個の分化細胞を含みうる。

【0118】

本明細書で使用される場合、「疾患」または「障害」という用語は、ヒトを含む生存動物の正常状態の機能障害であって、生命機能の働きを妨げるまたは改変する機能障害を指す。本開示の文脈では、「疾患」および「障害」という用語は、神経系（すなわち、脳、脊髄、または他の神経）の生化学的または電気的異常を含む、神経学的疾患および障害を指す。本開示のある特定の態様では、神経学的疾患および障害として、ニューロンの構造または機能の進行性の喪失と関連する疾患および障害を含むがこれらに限定されない、神経変性疾患および障害、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病（HD）、多系統萎縮症（MSA）、および多発性硬化症（MS）などが挙げられるが、これらは1つまたは複数の神経変性過程を特徴とする。本開示の他の態様では、神経学的疾患および障害として、例えば、不安障害、双極性障害、統合失調症、神経性無食欲および神経性過食症、自閉症および関連障害などの、気分の変化、現実感の認知異常、人格の変化、および摂食障害と関連する疾患および障害を含むがこれらに限定されない、神経精神疾患および障害が挙げられる。本開示のさらなる態様では、神経学的疾患および障害として、全前脳症または小頭症を含むがこれらに限定されない、神経発達障害が挙げられる。

10

【0119】

処置されていない対象と比べて、処置された対象における任意の症状の発現に言及する場合の、「低減させる」、「阻害する」、「減弱させる」、「抑制する」、「減少させる」、「防止する」という用語および文法的同等物（「低度の」、「少量の」などを含む）は、処置された対象における症状の量および／または大きさが、処置されていない対象、任意の医療従事者により臨床的に関連があると認識される任意の量だけ低度であることを意味する。一実施形態では、処置された対象における症状の量および／または大きさは、処置されていない対象における症状の量および／または大きさより少なくとも10%低度、少なくとも25%低度、少なくとも50%低度、少なくとも75%低度、および／または少なくとも90%低度である。

20

【0120】

本明細書で使用される場合、「患者」という用語は、ヒトまたは動物（例えば、哺乳動物、例えば、非ヒト霊長動物、齧歯動物など）であり、入院している必要はない。例えば、外来患者、自宅療養者は「患者」である。患者は、任意の年齢のヒトまたは非ヒト動物を含むことが可能であり、したがって、成人および若齢者（すなわち、小児）の両方を含む。「患者」という用語は、医療処置を必要とすることを含意するとは意図されず、したがって、患者は、自発的または非自発的に、それが臨床上のものであれ、基礎科学研究の支援のためのものであれ、実験の一部をなし得る。したがって、「対象」という用語と「患者」という用語とは、互換的である。

30

【0121】

本明細書で使用される場合、「有機低分子」という用語は、薬科学にいて一般に使用される有機分子と同等のサイズの任意の分子を指す。この用語は、生体高分子（例えば、タンパク質、核酸など）を除外する。好ましい有機低分子は、約10Da～約5000Da、より好ましくは最大2000Da、最も好ましくは最大約1000Daのサイズの範囲である。

40

【0122】

「活性化因子」または「活性化すること」という用語は、本開示の細胞の方向付けられた分化を結果としてもたらす分子を活性化する特性を有する化合物を指す。

【0123】

本明細書で使用される場合、「アンタゴニスト」という用語は、結合し、アゴニストが媒介する生化学的応答を遮断するかまたは減衰させる化合物を指す。本開示の方法への言及において、「アンタゴニスト」とは、結合し、Wntシグナル伝達の構成要素である

50

アゴニストが媒介する生化学的応答を遮断するかまたは減衰させる化合物を指す。Wntアンタゴニストは、受容体に結合するが、正常な生物学的応答を引き起こさない薬剤を含む。したがって、アンタゴニストは、例えば、標的遺伝子の転写を抑制するように、Patchedの生体活性を強化または反復させる。本明細書で使用される「Wntアンタゴニスト」という用語は、Wntタンパク質の正常な機能を直接阻害することにより作用しうる任意の薬剤だけでなく、Wntシグナル伝達経路を阻害し、したがって、Wntの機能を反復させる任意の薬剤も指す。Wntシグナル伝達アンタゴニストの例は、XAV939（Huangら、Nature、461巻：614～620頁（2009年））、ビタミンA（レチノイン酸）、リチウム、フラボノイド、Dickkopf1（Dkk1）、インスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP）（WO2009/131166）、およびβ-カテニンに対するsiRNAを含む。

10

【0124】

分子の「誘導体」という用語は、目的の分子と実質的に同様であるかまたは実質的に同一な様式で機能するような、目的の分子と十分に類似する構造を有する分子を指す。例えば、化合物の誘導体は、アシル化、メチル化、アルカリ修飾、酸修飾、および無機塩修飾、酸化、スルホン化、フェノール化、ヒドロキシメチル化、ならびにプロテアーゼ修飾、パパインおよびウレアーゼ修飾、ならびにキモトリプシン修飾を含む酵素修飾法を含む様々な方法により修飾されている可能性がある。例えば、ポリペプチドの誘導体には、1つまたは複数のアミノ酸を変化させた変異体ポリペプチドが含まれる。

【0125】

20

本明細書で使用される場合、「操作された」細胞という用語は、改変体NKX2.1をコードする核酸など、所望の核酸が導入された細胞を指すことを意図する。操作された細胞は、導入された核酸を含有しない自然発生の細胞から弁別される。本開示の核酸として、天然の供給源から得られた核酸、化学合成された核酸、または組換え技術の技法により産生された核酸が挙げられる。

【0126】

皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのマーカーを産生するニューロン細胞を発生させるためのin vitroにおける方法

本開示は、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー1つまたは複数を含むニューロン細胞を含む、ニューロン細胞を発生させるためのin vitroにおける方法を提供する。本方法は、多能性細胞および／または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMADシグナル伝達阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップを含み、このニューロン前駆体細胞は、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることにより、このニューロン前駆体細胞を、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー1つまたは複数を含むニューロン細胞に分化するように誘導することができる。

30

【0127】

ある特定の実施形態では、本開示は、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を生産するニューロン細胞を発生させるためのin vitroにおける方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞または多分化能細胞の分化により発生させ、（a）1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、（i）2つまたはそれより多くのSMADシグナル伝達阻害剤、および（ii）1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、（b）ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含む方法を提供する。

40

【0128】

50

他の実施形態では、本開示は、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるための *in vitro* における方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞または多分化能細胞の分化により発生させ、(a) 1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤、および (ii) 1つまたは複数の Wnt シグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、(b) ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含む方法を提供する。

10

【0129】

さらなる実施形態では、本開示は、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるための *in vitro* における方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞および／または多分化能細胞の分化により発生させ、(a) 1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 2つまたはそれより多くの SMAD シグナル伝達阻害剤、および (ii) 1つまたは複数の Wnt シグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、(b) ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数の SHH シグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含む方法を提供する。

20

【0130】

一部の実施形態では、多能性細胞および／または多分化能細胞の、SHH 活性化因子への曝露であって、異なるニューロン細胞型（すなわち、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、視索前野コリン作動性ニューロン）を産生するための曝露の開始および／または持続期間は、使用される培養培地に応じて重なり合う可能性がある。一部の実施形態では、SMAD/Wnt 阻害の開始後における SHH 活性化の開始を、SMAD シグナル阻害剤/Wnt アンタゴニスト導入の約4～約20日後、一般に、約6～15日後の間に行って皮質介在ニューロンを産生し得るが、また、SHH 活性化の開始を、例えば、SMAD/Wnt 導入の約4～約8日後に行って視索前野コリン作動性ニューロンを産生し得る。これらの時間的間隔は、培養条件に応じて、とりわけ、使用される培養培地に応じて、ある程度変動する。したがって、視床下部ニューロンを作製する場合、SHH への曝露は、SMAD 阻害剤/Wnt アンタゴニストの添加と同時にあるかまたはこの直後、あるいは Pax6 または FoxG1 の発現の前という早期に開始することができる。コリン作動性ニューロンを作製する場合、SHH は、SMAD/Wnt 阻害の2日後に開始することもでき、これらのマーカーの発現の3日前まで、または3日後までに開始することもできる。これに対し、介在ニューロンを作製する場合、SHH への曝露は、これらのマーカーの発現の少なくとも2日後に開始することができ、これらのマーカーの発現の10日後までに開始することができ、14日後でもなお開始することができる。したがって、これらのマーカーの発現は、SHH への曝露をいつ始めるのかについての代替的指針として使用することができる。

30

40

【0131】

介在ニューロンまたは視床下部ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロンを作製する場合、SHH 活性化因子への曝露の持続期間は、5～約30日間またはこれより長期であることが可能であり、一般に、約8～約16日間の間でありうる。具体的な組合せは、例えば、皮質介在ニューロンでは、SMAD/Wnt 阻害の8～18日後に SHH 活性化因子を開始し、その8～16日後または8～20日間後に終了する（培地を交換する）を含む。視床下部ニューロンでは、SMAD/Wnt 阻害の1～4日後に SHH 活性化因子を開始し、その5～30日後または8～16日間後に終了する。前脳基底部視索

50

前野コリン作動性ニューロンでは、S M A D / W n t 阻害の4～8日後にS H H活性化因子を開始し、その8～24日後に終了する。

【0132】

S H H活性化因子への長期にわたる曝露は一般に、無害である。細胞は、S H Hの存在下で、長期にわたり増殖させることができる。例えば、一般に、X L S Bパラダイム下では、前脳前駆体細胞のうちの90%が、20日後までに、領域的にパターン化される。別の形で述べると、S H Hの存在下における前脳前駆体細胞は、背側皮質投射ニューロンへはパターン化されず、パターン化されなかった前駆細胞は、20日後までに、無視できるレベルに減弱される。細胞が、任意の系統についてN K X 2. 1陽性となったら、S H Hを、培養培地中に残したまま、これらの系統のうちのいずれかの前駆体細胞を増殖させることができる。例えば、介在ニューロン前駆体細胞は、生着または発生もしくは疾患についての*i n v i t r o*におけるモデル化などの使用まで、数カ月間（例えば、250～300日間またはこれを超える期間）にわたり維持することができる。

10

【0133】

ニューロンを、数カ月間など、長期にわたり、外因性因子を用いずに、培養物中で維持することができる。

【0134】

本明細書で使用される場合、「シグナル伝達」という用語については、既に定義した。本明細書で開示される通り、S M A DおよびW n tシグナル伝達経路は、多能性幹細胞もしくは多分化能幹細胞または多能性前駆細胞もしくは多分化能前駆細胞など、多能性細胞または多分化能細胞の、ニューロン前駆体細胞への分化の媒介において重要であり、S H Hシグナル伝達カスケードは、ニューロン前駆体細胞の、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性(c h o r i o n i c)ニューロンのマーカー1つまたは複数を産生するニューロン細胞への分化の媒介において重要である。

20

【0135】

幹細胞の、前脳ニューロン前駆体細胞への分化

本明細書で開示される通り、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンは、1つまたは複数のS H Hシグナル伝達活性化因子を伴うニューロン前駆体細胞の分化を誘導することにより発生させることができる。前方／前脳運命は、h P S Cのニューロン分化中におけるデフォルトのプログラムとして特定され得る(C h a m b e r s ら、N a t B i o t e c h n o l、27巻：275～280頁(2009年)；E i r a k u ら、C e l l S t e m C e l l、3巻：519～532頁(2008年)；E s p u n y - C a m a c h o ら、N e u r o n、77巻：440～456頁(2013年)；およびG a s p a r d ら、N a t u r e、455巻：351～357頁(2008年))。全ての細胞または細胞系が、神経および前方運命を、同等の効率で成立させるわけではない(K i m ら、C e l l S t e m C e l l、8巻：695～706頁(2011年)；およびW u ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、104巻：13821～13826頁(2007年))。細胞を分化させることにより分泌されるパターン化因子として、例えば、線維芽細胞増殖因子(F G F)、W n t、およびレチノイドが挙げられ、これらの因子は、前脳の誘導を抑制し、これにより、尾側の細胞運命の誘導を誘発しうる。

30

40

【0136】

したがって、本開示の方法は、多分化能および／または多能性細胞を、1つまたは複数のS M A Dシグナル伝達阻害剤および1つまたは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニストの組合せと接触させることによって、多分化能および／または多能性細胞の分化を誘導することにより、ニューロン前駆体細胞の発生を達成する。

【0137】

ノギンとS B 4 3 1 5 4 2 (N S Bとしてもまた公知である)との組合せを利用して、F O X G 1 + / P A X 6 + 前駆体細胞の頑健な誘導を達成する、二重S M A D阻害プロトコールによるh E S Cのニューロン分化が、C h a m b e r s ら、N a t B i o t e c

50

h n o l、27巻：275～280頁（2009年）において記載されている。

【0138】

本明細書で開示される通り、ALK2／3阻害剤（例えば、LDN-193189）とSB431542（LSBとしてもまた公知である）との組合せはまた、FOXG1を発現する細胞の百分率の対応する低減を伴うが、PAX6発現の誘導において有効である。図1Bおよび1Cを参照されたい。しかし、LSBで処理された培養物中のFOXG1発現は、例えば、組換えDKK1および／またはタンキラーゼ阻害剤（すなわち、XAV939）など、1つまたは複数の強力な標準的Wntシグナル伝達の阻害剤を添加することにより、大幅に増強された。図1B～1D；Huangら、Nature、461巻：614～620頁（2009年）を参照されたい。さらに、XAV939が媒介するFOXG1発現の誘導は、複数の独立の試験したhESC（HES-3およびWA-09）および試験したヒトiPSC（C72およびSeV6）にわたり一貫していた（Papapetrouら、Proc Natl Acad Sci USA、106巻：12759～12764頁（2009年）；およびKriksら、Nature、480巻：547～551頁（2011年））。図1E。

10

【0139】

これらの観察に部分的に基づき、本開示は、多分化能および／または多能性細胞の分化を誘導することにより、ニューロン前駆体細胞を発生させるのに、1つまたは複数のSMADシグナル伝達阻害剤を、1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと組み合わせて利用する方法を提供する。本明細書で開示される通り、DKK1、XAV939、LDN-193189、およびSB431542を含むがこれらに限定されない、WntアンタゴニストとSMAD阻害剤との多様な組合せの使用により、ヒトESCおよびヒトiPSC系の範囲にわたる、前脳運命の迅速で頑健な誘導が可能となる。

20

【0140】

多分化能、多能性、および全能性細胞

本開示の方法は、ある特定の多分化能、多能性、および／または全能性細胞を含む未分化および／または傾倒していない細胞は、1つまたは複数のSMAD阻害剤および1つまたは複数のWntアンタゴニストの組合せと接触させることにより、ニューロン細胞を発生させるように誘導するという観察に部分的に基づく。本開示の一部として、このようなニューロン細胞は、SHH活性化因子の性質および濃度の両方のほか、SHH活性化因子と接触させる持続期間を含む、接触させるタイミングを含む、適切な条件下で、ニューロン細胞を、SHHの1つまたは複数の活性化因子と接触させることにより、皮質ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野皮質ニューロンを発生させるようにさらに誘導しうることが発見された。

30

【0141】

「全能性」、「多分化能」、「前駆細胞」という用語については、上記で記載した。本開示における前駆細胞は、体細胞に含まれる。前駆細胞は、多分化能細胞である。全能性、多能性、および多分化能細胞は、1つまたは複数の異なる細胞型に分化することが可能な「幹細胞」でありうる。「幹細胞」、「胚性幹細胞」、「人工多能性幹細胞」という用語については、上記で記載した。

40

【0142】

ヒト多能性幹細胞（hPSC）は、脳の発達および疾患のモデル化に関与すると考えられる。一般に、ヒト皮質は、2つの異なる種類のニューロン集団である、投射ニューロンおよび局所介在ニューロンを含む。皮質介在ニューロンは、神経伝達物質であるGABAを発現する多彩な細胞型のクラスを含む。皮質介在ニューロンの機能不全は、統合失調症、自閉症、およびてんかんを含む神経精神疾患に関与している。

【0143】

ヒト多能性幹細胞（hPSC）は、ヒトの発生および疾患を研究するために使用されており、再生医療における適用のためにも使用されている。多くの神経変性障害および神経精神障害のための有効な療法、ならびにin vitroにおけるニューロン特化を効率

50

的に方向付けるプロトコルの利用可能性の欠如を踏まえ、中枢神経系系統に分化させた hPSC の使用は特別な関心の対象となっている (Chambers ら、Nat Biotechnol、27 巻: 275~280 頁 (2009 年))。

【0144】

hPSC を使用する初期研究は、パーキンソン病における中脳ドーパミンニューロン (PD; Kriks ら、Nature、480 巻: 547~551 頁 (2011 年); Soldner ら、Cell、136 巻: 964~977 頁 (2009 年); および Soldner ら、Cell、146 巻: 318~331 頁 (2011 年))、または筋萎縮性側索硬化症 (ALS; Dimos ら、Science、321 巻: 1218~1221 頁 (2008 年)) および脊髄筋萎縮症 (SMA; Ebert ら、Nature、457 巻: 277~280 頁 (2009 年)) における運動ニューロンなど、特定のニューロン型に影響を及ぼすことが公知の神経変性障害に主に向けたものであった。

10

【0145】

より最近の研究は、統合失調症 (Brennan ら、Nature、473 巻: 221~225 頁 (2011 年)) または自閉症関連症候群 (Marchetto ら、Cell、143 巻: 527~539 頁 (2010 年); および Pasca ら、Nat Med、17 巻: 1657~1662 頁 (2011 年)) など、複合的な神経障害に取り組むことができる可能性を示唆する。PD、ALS、または SMA の場合と異なり、統合失調症または自閉症をモデル化するために極めて重要なニューロン型は、それほど十分には規定されておらず、これらの研究では、ニューロン垂型の独自性を方向付けるための試みはな

20

【0146】

しかし、皮質介在ニューロンなどの抑制性ニューロンは、統合失調症または自閉症において役割を果たしうる (Insel、Nature、468 巻: 187~193 頁 (2010 年); および Lewis ら、Nat Rev Neurosci、6 巻: 312~324 頁 (2005 年))。既に、Lhx6::GFP レポーターマウス ESC 細胞系を使用する皮質介在ニューロンの導出は、実証された (Maroof ら、J Neurosci、30 巻: 4667~4675 頁 (2010 年))。しかし、皮質介在ニューロン発生の効率は低く、これらの条件が、ヒト皮質介在ニューロンを hPSC から発生させるために適用しうるのかどうかは、不確定であった。ヒト皮質介在ニューロンの発生上の起源は、研究により議論が分かれることから、介在ニューロン特化は、哺乳動物の種間で著しく異なりうることを示唆されるので、in vitro におけるヒト皮質介在ニューロンの発達のモデル化は、特に興味深い難題である (Letinic ら、Nature、417 巻: 645~649 頁 (2002 年); ならびに Yu および Zevcic、J Neurosci、31 巻: 2413~2420 頁 (2011 年))。さらに、複数の皮質介在ニューロン型の、長期間を要する in vivo における発生 (Anderson ら、Neuroscience、67 巻: 7~22 頁 (1995 年)) は、in vitro に

30

40

【0147】

一部の実施形態では、本開示は、ヒト胚性幹細胞 (ESC) (例えば、WA-09/H9) の使用に関する。他の一部の実施形態では、本開示は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) (例えば、SeV6、C72) の使用に関する。

【0148】

他の一部の実施形態では、本開示は、成体幹細胞の使用に関する。一部の好ましい実施形態では、成体幹細胞は、ヒト神経幹細胞である。神経幹細胞 (NSC) は、神経系の主要な表現型を発生させる自己再生する多分化能細胞である。神経幹細胞は、1 つは特化していない娘細胞であり、1 つは特化した娘細胞である、2 つの娘細胞への非対称性の細胞

50

分裂を起こす。NSCは主に、ニューロン、星状細胞、および希突起膠細胞に分化する（AlenziおよびBahkali、African J Biotechnol、10巻（86号）：19929～40頁（2011年））。

【0149】

幹細胞間の主要な顕著な差異は、一つには、分化するその能力が限定された成体幹細胞があり、一つには、多能性である胚性幹細胞（ESC）がある。ESCは、特定の細胞運命に限定されておらず、むしろ任意の細胞型に分化する能力を有する（Clarkeら、Science、288巻（5471号）：1660～63頁（2000年））。ESCは、自己複製する能力を有する、胚盤胞の内部細胞塊から導出される（AlenziおよびBahkali、African J Biotechnol（2011年））。

10

【0150】

神経幹細胞は、分化するそれらの能力が限定されているため、成体幹細胞であると考えられる。NSCは、成体の生涯全体にわたり、神経発生の過程を介して発生する（Paspalaら、Neurology India、59巻（4号）：558～65頁（2011年））。ニューロンは、中枢神経系（CNS）内では分裂しないので、NSCは、失われたかもしくは傷害されたニューロン、または多くの場合、グリア細胞をさえ置きかえるように分化しうる。NSCは、胎芽期胚神経上皮の残存物である側脳室のSVZ内のほか、海馬歯状回内でも、新たなニューロンに分化する。成体NSCはまず、1990年代初頭に、マウス線条体から単離された。成体NSCは、in vitroで培養する場合、多分化能ニューロスフェアを形成することが可能である。ニューロスフェアは、自己再生し、増殖する特化細胞を産生しうる。これらのニューロスフェアは、特化ニューロン、グリア細胞、および希突起膠細胞を形成するように分化しうる（Paspalaら、Neurology India、59巻（4号）：558～65頁（2011年））。培養されたニューロスフェアを、免疫欠損新生仔マウスの脳に移植したところ、生着、増殖、および神経分化を示した。

20

【0151】

他の一部の実施形態では、本開示は、前駆細胞の使用に関する。一部の好ましい実施形態では、前駆細胞は、ヒト神経前駆細胞である。成体において、神経幹細胞は、前脳脳室帯内で存続し、様々な、より限局された前駆細胞表現型をもたらす。成体ヒト脳の主要な前駆細胞プールは、脳室帯ニューロン前駆細胞、海馬ニューロン前駆細胞、および脳実質グリア前駆細胞を含む（Goldmanら、Novartis Found Symp、265巻：66～80頁（2005年））。これらの表現型の各々は、その常在前駆細胞の有糸分裂活性および派生物の両方を緊密に調節する、局所環境的ニッチ内に存在する。例えば、脳室帯ニューロン前駆細胞は、皮質介在ニューロンにさらに分化しうる。

30

「SMAD（small mothers against decapentaplegic）」の阻害剤

【0152】

SMAD（small mothers against decapentaplegic）とは一般に、幹細胞の方向付けられた細胞分化をモジュレートすることが可能なシグナル伝達分子のクラスを指す。SMADとは、細胞外シグナルを、トランスフォーミング増殖因子ベータリガンドから核に伝達し、核において下流の遺伝子転写を活性化させる細胞内タンパク質であり、幹細胞の方向付けられた分化をモジュレートすることが可能なシグナル伝達分子のクラスのメンバーである。

40

【0153】

「阻害剤」という用語については、上記で記載した。

【0154】

本明細書で開示される方法への言及において、SMADシグナル伝達阻害剤は、SMADおよび／もしくはSMADと会合する分子、またはSMADシグナル伝達の他の構成分子と相互作用し、これらの活性を低減または遮断する化合物を含む。阻害剤は、SMADに直接結合し、SMADにおけるコンフォメーション変化を引き起こすことが可能であり

50

、S M A Dをコードする遺伝子またはS M A D標的遺伝子の発現を低減または防止することが可能であり、S M A Dタンパク質レベルを減少させることが可能であり、かつ／またはS M A Dの、1つまたは複数のシグナル伝達パートナーとの相互作用に干渉しうる。

【0155】

阻害剤としてまた、上流のシグナル伝達分子を妨害することにより、S M A Dの生物学的活性を間接的に調節する分子も挙げられる（例えば、細胞外ドメイン内のものであり、シグナル伝達分子および効果の例は、骨形態形成タンパク質を封鎖するノギン、A L K受容体1、2、3、および6の活性化を阻害し、これにより、下流のS M A Dの活性化を防止することを含む。同様に、C h o r d i n、C e r b e r u s、F o l l i s t a t i nは、S M A Dシグナル伝達の細胞外活性化因子を同様に封鎖する。また、膜貫通タンパク質であるB a m b iも、細胞外T G F β シグナル伝達分子を封鎖する偽受容体として作用する。

10

【0156】

アクチビン、n o d a l、T G F β 、およびB M Pを遮断する抗体は、S M A Dシグナル伝達の細胞外活性化因子を中和するなどの使用のために企図されている）。したがって、一実施形態では、本開示の阻害剤は、デフォルトから非デフォルト細胞型への分化を誘導する（変更する）、または変化させる、例えば、少なくとも3つの阻害剤を含む本開示の方法のうちの1つにより、非デフォルトの神経前駆細胞が産生された。

【0157】

本明細書で開示される阻害剤は、細胞の分化を、本明細書で開示されるとおりの皮質介在ニューロンを産生するための非デフォルト細胞型など、本明細書で記載される非デフォルト細胞型に方向付けるために、デフォルトのシグナル伝達を「変化させる」か、または「低下させる」か、または「遮断する」。したがって、本開示の阻害剤は、例えば、本開示の皮質介在ニューロンを産生する一助となるシグナル分子活性を増大または減少させるための、天然または合成の生物学的化合物の場合もあり、低分子の場合もある。

20

【0158】

阻害剤は、名指されたシグナル伝達分子の上流の分子に結合し、影響を及ぼし、これが、名指された分子の阻害を引き起こすことにより誘導される阻害に加えて、競合的阻害（活性部位に、別の公知の結合化合物の結合を排除または低減させるように結合する）およびアロステリック阻害（化合物の、そのタンパク質の活性部位に対する結合に干渉するよう、タンパク質に、タンパク質のコンフォメーションを変化させるように結合する）との関連において記載される。

30

【0159】

本明細書で開示される方法において利用されると有利でありうるS M A D阻害剤は、当業者に周知であり、たやすく入手可能なS M A D阻害剤を含む。ヒトE S Cおよびi P S Cの神経細胞変換のために利用されているS M A D阻害剤については、C h a m b e r s ら、N a t B i o t e c h n o l、27巻：275～280頁（2009年）において記載されている。

【0160】

本明細書で開示される方法および組成物において使用されうる、例示的なS M A D阻害剤として、S B 4 3 1 5 4 2、L D N-1 9 3 1 8 9、ノギン、P D 1 6 9 3 1 6、S B 2 0 3 5 8 0、L Y 3 6 4 9 4 7、A 7 7-0 1、A-8 3-0 1、B M P 4、G W 7 8 8 3 8 8、G W 6 6 0 4、S B-5 0 5 1 2 4、レルデリムマブ、メテリムマブ、G C-I 0 0 8、A P-1 2 0 0 9、A P-1 1 0 I 4、L Y 5 5 0 4 1 0、L Y 5 8 0 2 7 6、L Y 3 6 4 9 4 7、L Y 2 1 0 9 7 6 1、S B-5 0 5 1 2 4、E-6 1 6 4 5 2（A L K阻害剤であるR e p S o x）、S D-2 0 8、S M I 6、N P C-3 0 3 4 5、K i 2 6 8 9 4、S B-2 0 3 5 8 0、S D-0 9 3、アクチビン-M 1 0 8 A、P 1 4 4、可溶性T B R 2-F c、D M H-1、ドルソモルフィン二塩酸塩と命名された化合物、ならびにこれらの誘導体および／または改変体が挙げられる、これらの各誘導体および／または改変体は、1つまたは複数のS M A D阻害活性を保有する。

40

50

【0161】

(a) TGFβ／アクチビン／Nodal経路の阻害剤

SMADシグナル伝達経路の阻害は、TGFβ／アクチビン／Nodal経路およびBMP経路の阻害を含む。

【0162】

例示的なTGFβ／アクチビン経路の阻害剤として、TGFベータ受容体阻害剤、SMAD2／3リン酸化の阻害剤、SMAD2／3とSMAD4との相互作用の阻害剤、ならびにSMAD6およびSMAD7の活性化因子／アゴニストが挙げられるがこれらに限定されない。さらに、下記に記載される区分は、単に構成上の目的のためのものであり、当業者には、化合物は、経路内の1つまたは複数の点に影響を及ぼす可能性があり、したがって、化合物は、規定された区分のうちの複数において機能しうることが公知である。

10

【0163】

TGFベータ受容体（例えば、ALK5）阻害剤として、TGFベータ受容体（例えば、ALK5）に対する抗体、そのドミナントネガティブの改変体、およびその発現を抑制するアンチセンス核酸が挙げられうる。例示的なTGFβ受容体／ALK5阻害剤として、SB431542（例えば、Inmanら、Molecular Pharmacology、62巻（1号）：65～74頁（2002年）を参照されたい）；3-（6-メチル-2-ピリジニル）-N-フェニル-4-（4-キノリニル）-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド（例えば、Tojoraら、Cancer Science、96巻（11号）：791～800頁（2005年）を参照されたい；例えば、Toicris Bioscienceから市販されている）としてもまた公知のA-83-01；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、Wnt3a／BIO（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Daltonら、WO2008/094597を参照されたい）、BMP4（Dalton、前出を参照されたい）、GW788388（- {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）（例えば、Gellibertら、Journal of Medicinal Chemistry、49巻（7号）：2210～2221頁（2006年）を参照されたい）、SM16（例えば、Suzukiら、Cancer Research、67巻（5号）：2351～2359頁（2007年）を参照されたい）、IN-1130（3-（（5-（6-メチルピリジン-2-イル）-4-（キノキサリン-6-イル）-1H-イミダゾール-2-イル）メチル）ベンズアミド）（例えば、Kimら、Xenobiotica、38巻（3号）：325～339頁（2008年）を参照されたい）、GW6604（2-フェニル-4-（3-ピリジン-2-イル-1H-ピラゾール-4-イル）ピリジン）（例えば、de Gouvillierら、Drug News Perspective、19巻（2号）：85～90頁（2006年）を参照されたい）、SB-505124（2-（5-ベンゾ [1, 3] ジオキソール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル）-6-メチルピリジン塩酸塩）（例えば、DaCostaら、Molecular Pharmacology、65巻（3号）：744～752頁（2004年）を参照されたい）、およびピリミジン誘導体（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2008/006583に列挙されているものを参照されたい）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

40

【0164】

さらに、「ALK5阻害剤」は、非特異的なキナーゼ阻害剤を包摂することを意図しないが、「ALK5 10阻害剤」は、例えば、SB-431542など、ALK5に加えて、ALK4および／またはALK7を阻害する阻害剤を包摂することが理解されるべきである。例えば、Inmanら、J Mol Pharmacol、62巻（1号）：65～74頁（2002年）を参照されたい。本開示の範囲を限定することを意図しないが、ALK5阻害剤は、間葉-上皮転換／移行（MET）過程に影響を及ぼすと考えられる。TGFβ／アクチビン経路は、上皮-間葉移行（EMT）を駆動する。したがって、TG

50

F β /アクチビン経路を阻害することにより、MET（すなわち、再プログラム化）過程を促進することができる。

【0165】

阻害剤の具体例として、SU5416；2-（5-ベンゾ[1,3]ジオキサール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル）-6-メチルピリジン塩酸塩（SB-505124）；レルデリムマブ（lerdelimumb）（CAT-152）；メテリムマブ（CAT-192）；GC-1008；ID11；AP-12009；AP-11014；LY550410；LY580276；LY364947；LY2109761；SB-505124；SB-431542；SD-208；SMI6；NPC-30345；Ki26894；SB-203580；SD-093；Gleevec；3,5,7,2',4'-ペンタヒドロキシフラボン（entahydroxyflavone）（Morin）；アクチビン-M108A；P144；可溶性TBR2-Fc；およびTGF β 受容体をターゲティングする、アンチセンスがトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、Wrzesinskiら、Clinical Cancer Research、13巻（18号）：5262～5270頁（2007年）；Kaminskaら、Acta Biochimica Polonica、52巻（2号）：329～337頁（2005年）；およびChangら、Frontiers in Bioscience、12巻：4393～4401頁（2007年）を参照されたい。

10

【0166】

SMAD2/3リン酸化の阻害剤として、SMAD2またはSMAD3に対する抗体、そのドミナントネガティブの改変体、およびそれをターゲティングするアンチセンス核酸が挙げられうる。阻害剤の具体例として、PD169316；SB203580；SB-431542；LY364947；A77-01；および3,5,7,2',4'-ペンタヒドロキシフラボン（Morin）が挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Wrzesinski、前出；Kaminska、前出；Shimanukiら、Oncogene、26巻：3311～3320頁（2007年）；およびKatokaら、EP1992360を参照されたい）。

20

【0167】

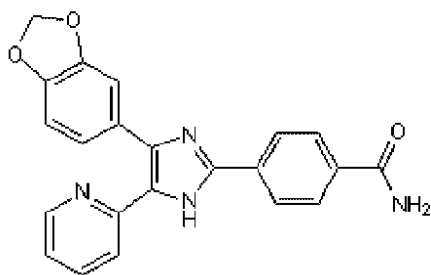
SB-431542（すなわち、CAS：301836-41-9；IUPAC：4-[4-（1,3-ベンゾジオキサール-5-イル）-5-（2-ピリジニル）-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド）とは、トランスフォーミング増殖因子 β （TGF β ）/アクチビン-Nodalシグナル伝達を低下または遮断することが可能な、市販の低分子SMAD阻害剤である。

30

【0168】

SB431542の構造を下記に挙げる。

【化2】



40

【0169】

SMAD2/3とSMAD4との相互作用の阻害剤として、SMAD2、SMAD3、および/またはSMAD4に対する抗体、これらのドミナントネガティブの改変体、およびこれらをターゲティングするアンチセンス核酸が挙げられうる。SMAD2/3とSMAD4との相互作用の阻害剤の具体例として、Trx-SARA、Trx-xFoxH1

50

b、および *Trx-Lef1* が挙げられるがこれらに限定されない（例えば、*Cui* ら、*Oncogene*、24 巻：3864～3874 頁（2005 年）；および *Zhao* ら、*Molecular Biology of the Cell*、17 巻：3819～153831 頁（2006 年）を参照されたい）。

【0170】

（b）BMP 阻害剤

例示的な BMP 経路の阻害剤として、ノギン、BMP 受容体阻害剤、SMAD1/5/8 リン酸化の阻害剤、SMAD1/5/8 と SMAD4 との相互作用の阻害剤、ならびに SMAD6 および SMAD7 の活性化因子／アゴニストが挙げられるがこれらに限定されない。下記に記載される区分は、単に構成上の目的のためのものであり、当業者には、化合物は、経路内の 1 つまたは複数の点に影響を及ぼす可能性があり、したがって、化合物は、規定された区分のうちの複数において機能しうることが公知である。

10

【0171】

SMAD1/5/8 リン酸化の阻害剤として、SMAD1、SMAD5、または SMAD8 に対する抗体、そのドミナントネガティブの改変体、それをターゲティングするアンチセンス核酸および低分子が挙げられるがこれらに限定されない。阻害剤の具体例として、LDN-193189 およびドルソモルフィン（例えば、*Stemgent* から市販されている）が挙げられる。

【0172】

BMP 受容体阻害剤として、BMP 受容体に対する抗体、そのドミナントネガティブの改変体、それをターゲティングする siRNA またはアンチセンス核酸または低分子が挙げられるがこれらに限定されない。阻害剤の具体例として、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、および LDN-193189（例えば、*Tocris Biosciences* から市販されている）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0173】

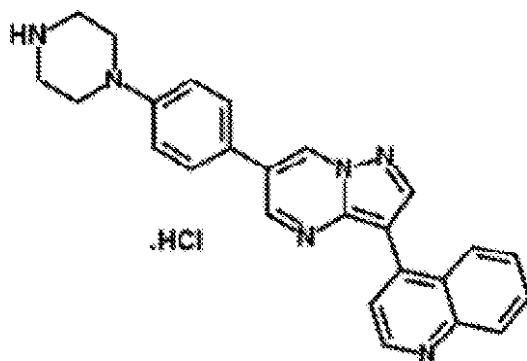
LDN193189（すなわち、DM-3189、IUPAC：4-（6-（4-（ピペラジン-1-イル）フェニル）ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル）キノロン）とは、市販の低分子 SMAD シグナル伝達阻害剤である。LDN193189 はまた、ALK2、ALK3、ALK6、タンパク質チロシンキナーゼ（PTK）の非常に強力な低分子阻害剤であり、I 型 TGFβ 受容体の ALK1 および ALK3 ファミリーのメンバーのシグナル伝達を阻害し、結果として骨形態形成タンパク質（BMP）である、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、およびアクチビンサイトカインシグナル、ならびに後続の Smad1、Smad5、および Smad8 の SMAD リン酸化を含む、複数の生物学的シグナルの伝達の阻害をもたらす（*Yu* ら、*Nat Med*、14 巻：1363～1369 頁（2008 年）；および *Ctmy* ら、*Bioorg Med Chem Lett*、18 巻：4388～4392 頁（2008 年））。

30

【0174】

LDN193189 の構造を下記に挙げる。

【化3】



40

50

【0175】

(c) 二重SMA D阻害剤

SMA Dシグナル伝達阻害剤は、二重SMA D阻害剤であるSB431542およびLDN-193189、またはこれらの機能的な誘導体および／もしくは改変体を含む。本明細書で使用される場合、「LSB」および「XLSB」という用語については、既に「定義」節で記載した。二重SMA D阻害剤は、分化の効率を実質的に増大させる。

【0176】

本開示の方法に従い、SB431542を、多能性および／または多分化能細胞と、*in vitro*培養物中において、約0.1 μM～約1 mMの最終濃度で接触させることができる。LDN-193189を、多能性および／または多分化能細胞と、*in vitro*培養物中において、約1 nM～約10 μMの最終濃度で接触させることができる。

10

【0177】

ウィングレス (Wnt) シグナル伝達のアンタゴニスト

「ウィングレス」または「Wnt」とは、β-カテニンを伴うかまたは伴わずに媒介される、FrizzledおよびLRP Derailed / RYK受容体など、WntファミリーのリガンドおよびWntファミリーの受容体から構成されるシグナル経路を指す。Wntタンパク質は、腫瘍形成、ならびに細胞運命および胚発生中のパターン化の調節を含む、複数の発生上の過程に関与している。

【0178】

Wnt経路は、Wntタンパク質活性の下流または上流のタンパク質のうちのいずれかを含む。例えば、これには、LRP5、LRP6、Dkk、GSK-3、Wnt10B、Wnt6、Wnt3 (例えば、Wnt3A)、Wnt1つまたは本明細書で論じられる他のタンパク質のうちのいずれか、およびこれらのタンパク質をコードする遺伝子が含まれる。

20

【0179】

Wnt経路はまた、LRP5またはHBM経路、Dkk経路、p-カテニン経路、MAPKAPK2経路、OPG / RANK経路など、Wntの下流の経路も含む。「LRP5経路」および「IBM経路」とは、LRP5またはHBM変異体およびLRP5またはHBM変異体の下流のタンパク質を含む、任意のタンパク質 / 遺伝子を意味する。「β-カテニン経路」とは、β-カテニンおよびβ-カテニンの下流のタンパク質を含む、任意のタンパク質 / 遺伝子を意味する。「MAPKAPK2経路」とは、MAPKAPK2およびMAPKAPK2の下流のタンパク質を含む、任意のタンパク質 / 遺伝子を意味する。「OPG / RANKL経路」とは、OPG / RANKLならびにOPGおよびRANKLの下流のタンパク質を含む、任意のタンパク質 / 遺伝子を意味する。「Dkk経路」とは、Wnt経路の一部である、Dkk-1とLRP5および／またはLRP6との相互作用に関与する任意のタンパク質 / 遺伝子を含むことを意図する。Dkk-1は、LRP5活性を阻害する。

30

【0180】

本明細書で使用される場合、「アンタゴニスト」という用語については、既に記載した。本明細書で使用される場合、「Wntアンタゴニスト」という用語は、Wntタンパク質の正常な機能を直接阻害することにより作用しう任意の薬剤だけでなく、Wntシグナル伝達経路を阻害し、したがって、Wntの機能を反復する任意の薬剤も指す。Wntシグナル伝達アンタゴニストの例として、XAV939 (Huangら、Nature、461巻：614～620頁 (2009年))、ビタミンA (レチノイン酸)、リチウム、フラボノイド、Dickkopf1 (Dkk1)、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) (WO2009 / 131166)、およびβ-カテニンに対するsiRNAが挙げられる。

40

【0181】

例示的なWntアンタゴニストとして、XAV939、IWP-2、DKK1 (Dickkopfタンパク質1)、およびIWR1が挙げられるがこれらに限定されない。さら

50

なるWnt阻害剤として、IWR化合物、IWP化合物、ならびにWO09155001およびChenら、Nat Chem Biol、5巻：100～7頁（2009年）において記載されている他のWnt阻害剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【0182】

XAV939とは、タンキラーゼ（TNKS）1および2の強力な低分子阻害剤であり、それぞれ、11および4nMのIC₅₀値を有する（Huangら、Nature、461巻：614～620頁（2009年））。TNKS活性を阻害することにより、XAV939は、アキシン-GSK3β複合体のタンパク質レベルを上昇させ、SW480細胞内のβ-カテニンの分解を促進する。公知のWntシグナル伝達アンタゴニストとしてまた、Dickkopfタンパク質、分泌型Frizzled関連タンパク質（sFRP）、Wnt阻害因子1（WIF-1）、およびSoggyも挙げられる。Dickkopf関連タンパク質ファミリー（Dkk-1～Dkk-4）のメンバーは、リンカー領域により隔てられた、2つのシステインリッチドメインを有する分泌型タンパク質である。Dkk-3およびDkk-4はまた、1つのプロキネチシンドメインも有する。Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3、およびDkk-4は、LRP5/6に結合し、LRP5/6の、Wnt-Frizzled複合体との相互作用を防止することにより、標準的なWntシグナル伝達アンタゴニストとして機能する。Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3、およびDkk-4はまた、細胞表面のKremen-1つまたはKremen-2にも結合し、LRP5/6の内部化を促進する。Dkk-3のアンタゴニスト活性は、実証されていない。Dkkタンパク質は、成体組織および胚組織において異なる発現パターンを有し、組織の発達および形態発生に対して広範にわたる影響を及ぼす。

【0183】

Dkkファミリーはまた、Dkk-3と相同であるが、他のファミリーメンバーとは相同でないSoggyも含む。sFRPとは、膜結合型Frizzledに類似する5つのWnt結合糖タンパク質のファミリーである。Wnt阻害剤の最大のファミリーであるsFRPは、sFRP1、sFRP2、およびsFRP5からなる第1の群と、sFRP3およびsFRP4を含む第2の群との2つの群を含有する。sFRPはいずれも、分泌型であり、固有の遺伝子に由来し、いずれも、Frizzledファミリーの選択的スプライシング形態ではない。各sFRPは、N末端システインリッチドメイン（CRO）を含有する。他のWntシグナル伝達アンタゴニストとして、Wntタンパク質に結合し、それらの活性を阻害する分泌型タンパク質である、WIF-1（Wnt阻害因子1）が挙げられる。

【0184】

一部の実施形態では、本開示は、SMADおよびWntシグナル伝達経路の阻害剤および／またはアンタゴニストに関する。SMAD阻害剤として、SB431542、LDN-193189、ノギン、PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、レルデリムマブ、メテリムマブ、GC-I008、AP-12009、AP-11014、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、SB-431542、SD-208、SMI6、NPC-30345、Ki26894、SB-203580、SD-093、アクチビン-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、およびこれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。Wntアンタゴニストとして、XAV939、DKK1、sFRP-1、sFRP-2、sFRP-5、sFRP-3、sFRP-4、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、およびこれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。

【0185】

これらの方法の一部の態様では、SB431542とLDN193189とを組み合わせ使用して、SMADシグナル伝達経路を阻害することができる。他の態様では、XAV939を利用して、Wntシグナル伝達経路をアンタゴナイズすることができる。

【0186】

これらの方法の他の態様では、細胞培養物中のXAV939の濃度は、約0.2 μM～20 μMであることが可能であり、細胞培養物中のLDN193189の濃度は、約10 nM～約1000 nMであることが可能であり、細胞培養物中のSB431542の濃度は、約1 μM～約100 μMであることが可能である。例えば、XAV939の濃度は、約2 μMであることが可能であり、LDN193189の濃度は、約100 nMであることが可能であり、SB431542の濃度は、約10 μMであることが可能である。

【0187】

これらの方法のさらなる態様では、幹細胞を、XAV939、LDN193189、および／またはSB431542と、約5日間～約40日間の持続期間にわたり接触させることにより、前脳前駆細胞を発生させる。関連する態様では、幹細胞を、XAV939、LDN193189、および／またはSB431542と、約10日間～約25日間の持続期間にわたり接触させることにより、前脳前駆細胞を発生させる。

【0188】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のさらなる態様では、Wntシグナル伝達アンタゴニストは、XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、Dkk-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-5、SFRP-3、SFRP-4、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-C59、LGK974、IWP-L6、ならびにこれらの誘導体および／または改変体からなる群から選択することができ、これらの各誘導体および／または改変体は、1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニスト活性を保有する。例えば、Wntシグナル伝達アンタゴニストは、XAV939またはその機能的な誘導体および／もしくは改変体を含みうる。XAV939は、*in vitro*培養物中で、約10 nM～約500 μMの最終濃度において、多能性および／または多分化能細胞と接触させることができる。

【0189】

KSR培地、NaHCO₃、N2Bサプリメント（Stem Cell Technologies）を含むN2培地（DMEM/F12）、ならびにB27（Gibco）およびN2サプリメント（Invitrogen）を含むNeurobasal培地を含む、様々な細胞培養培地およびサプリメントを使用して、幹細胞を、前脳前駆細胞へと分化させることができる（Kriksら、Nature、480巻：547～551頁（2011年））。一部の実施形態では、既に記載されている通り、細胞を、マウス胚性線維芽細胞（MEF）上で維持し、分化のためのAccutase（Innovative Cell Technologies）または継代培養のためのDispaseで解離させる（Chambersら、Nat Biotechnol、27巻：275～280頁（2009年））。

【0190】

皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのマーカーを産生するニューロン細胞を発生させるように方向付けられた分化

本明細書では、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および／または視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー1つまたは複数の含むニューロン細胞を発生させるための*in vitro*における方法が提供される。ニューロン前駆体細胞は、多能性細胞または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMADシグナル伝達阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、多能性細胞または多分化能細胞の分化を誘導して、ニューロン前駆体細胞を発生させることにより発生させ、次いで、これらを、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、視索前野コリン作動性ニューロン、またはこれらの前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の産生を誘導することができる。

【0191】

ソニックヘッジホッグ（Sonic Hedgehog）（SHH）活性化因子

SHHシグナル伝達経路は、細胞運命の決定、組織化の再構築、極性、形態、増殖、および分化を含む胚発生中の多様な過程の調節と関連する（BertrandおよびDahmane、Trends Cell Biol、16巻：597～605頁（2006年））。ソニックヘッジホッグ（SHH）とは、ヘッジホッグと呼ばれる、哺乳動物のシグナル伝達経路ファミリー内の3つのタンパク質のうちの1つであり、他のものは、インディアンヘッジホッグ（IHH）およびデザートヘッジホッグ（DHH）である。SHHシグナル伝達経路は、2つの膜貫通タンパク質である、Ptc（Patched）およびSmo（Smoothened）を伴う。SHHの非存在下では、Ptcは、Smoと相互作用し、これを阻害する。SHHがPtcに結合すると、Ptcの、Smoとの相互作用が変化し、Smoがもはや阻害されなくなり、Ci/Gliタンパク質の核への移入、および標的遺伝子のための転写活性化因子としての作用がもたらされる。それがSHHが媒介するシグナル伝達経路を増強するのであれば、SHHシグナル伝達経路活性化因子へと特定の限定が付与されることはない。

10

【0192】

本明細書で使用される場合、「ソニックヘッジホッグ」または「SHH」という用語については、「定義」節で既に記載した。

【0193】

高用量のSHHによる、hESCの処理は、DKK1の誘導を阻害し、これにより、フロアプレート様細胞の発生を促進することにより、FOXG1などの前脳マーカーを抑制することが報告されている（Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻：336～347頁（2010年））。しかし、皮質介在ニューロンの発生は、NKX2.1+前駆細胞段階における、強力なSHHの活性化を要求する。Xuら、J Neurosci、24巻：2612～2622頁（2004年）；およびXuら、Neuron、65巻：328～340頁（2010年）を参照されたい。

20

【0194】

腹側前脳前駆細胞集団の転写因子マーカーであるNKX2.1を使用して、分化をモニタリングすることができる（Sussellら、Development、126巻：3359～3370頁（1999年）；およびXuら、J Neurosci、24巻：2612～2622頁（2004年））。本開示の一部として、Wntシグナル伝達の阻害により、FOXG1の産生が増強され、その後、制御された、SHHが媒介する多分化能および多能性細胞の、NKX2.1+前脳前駆細胞運命への分化を誘導することにより、腹側化が促進されることが発見された。図1Aを参照されたい。腹側運命の誘導は、XAV939、LDN-193189、SB431542（XLSB）、およびSHHの組合せを使用することによりさらに特徴付けられた。図1Aを参照されたい。NKX2.1::GFPノックインレポーターhESC細胞系を使用して、組換えSHH（R&D Systems、C-2511）および／またはプルモルファミンによるSHH経路の活性化後における分化10日目までに、GFPの誘導を観察した（図1F；Goulbumら、2011年）。NKX2.1::GFPの最大の誘導は、1μMのプルモルファミンと、5nMのSHHとの組合せによる処理後の分化18日目において観察された。図1G。

30

【0195】

hESC由来のフロアプレート細胞の導出についての先行研究は、SHHによる早期処理（例えば、分化1日目における）は、FOXA2の効率的な誘導を結果としてもたらすことを示唆した（Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻：336～347頁（2010年））。しかし、本明細書で提示されるデータは、細胞をSHHと、分化後期で（例えば、分化10日目において）接触させることにより、FACSにより測定される場合、頑健なNKX2.1::GFP発現が誘導されることを実証している。図1H。したがって、本明細書で開示される通り、SHHと組み合わせたXLSBにより、NKX2.1+前駆細胞の発生が、高効率で誘導されることが発見された。

40

【0196】

DKK1など、Wnt阻害分子の使用は、マウスおよびヒトESCの分化中において終

50

脳前駆細胞および視神経前駆細胞を発生させるために、既に提起されている (L a m b a r a、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、103巻:12769~12774頁(2006年);M e y e r r a、S t e m C e l l s、29巻:1206~1218頁(2011年);およびW a t a n a b e r a、N a t N e u r o s c i、8巻:288~296頁(2005年))。また、1つまたは複数のSHH活性化因子は、前脳の誘導を増強しうることも示されている。例えば、二重SMAD阻害プロトコルを使用して、前脳の誘導を増強するために、SHH活性化因子であるXAV939(タンキラーゼ阻害剤)で、組換えDKK1を置きかえることができる(H u a n g r a、N a t u r e、461巻:614~620頁(2009年))。

【0197】

SHHは、hESC由来の神経上皮前駆細胞が、中型有棘線条体投射ニューロンを発生させることが可能なGSX2陽性でNKX2.1陰性の前駆細胞へと分化することを誘導するSHH濃度を使用することにより、in vitroにおける腹側前脳特化をモジュレートしうるということが報告されている(M a r a、C e l l S t e m C e l l、10巻:455~464頁(2012年))。SHH用量に加えて、SHH処理のタイミングが、hESCベースのフロアプレートの形成と比べて、腹側細胞運命特化の効率に影響を及ぼすこともさらに報告された(F a s a n o r a、C e l l S t e m C e l l、6巻:336~347頁(2010年))。

【0198】

これらの観察に部分的に基づき、本開示は、ニューロン細胞、特に、皮質介在ニューロンおよびその前駆体細胞、視床下部ニューロンおよびその前駆体細胞、ならびに視索前野コリン作動性ニューロンおよびその前駆体細胞を発生させるための方法を提供する。本開示のこれらの態様によれば、このようなニューロン細胞系統および集団の発生は、本明細書で開示される通りに発生させたニューロン前駆体細胞などのニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と、多分化能および/または多能性細胞を、1つまたは複数のSMADシグナル伝達阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後の所定の時点において、皮質介在ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、視床下部ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数、および/または視索前野コリン作動性ニューロンもしくはその前駆体細胞のマーカー1つもしくは複数の産生を誘導するのに十分な持続期間にわたり接触させることにより達成される。

【0199】

本明細書で使用される場合、「活性化因子」または「活性化すること」という用語については、「定義」節で既に記載した。より具体的に、かつ、本開示の方法への言及において、「活性化因子」という用語は、SHHシグナル伝達を促進および/または増強し、これにより、ニューロン前駆体細胞を、皮質介在ニューロンもしくはその前駆体細胞、視床下部ニューロンもしくはその前駆体細胞、および/または視索前野コリン作動性ニューロンもしくはその前駆体細胞へと分化するように誘導する化合物を指す。

【0200】

本明細書で使用される場合、「SHHシグナル伝達経路活性化因子」という用語については、「定義」節で既に記載した。本開示で有用なSHHシグナル伝達経路活性化因子の例として、ヘッジホッグファミリーに属するタンパク質(例えば、SHH)、Ptcの、Smoとの相互作用の阻害剤、Smo受容体の活性化因子、Shh受容体の活性化因子(例えば、H g - A g、プルモルファミンなど)、Ci/Gliファミリーのレベルを上昇させる物質、Ci/Gli因子の細胞内分解の阻害剤、およびトランスフェクションからもたらされるSHH過剰発現構築物またはCi/Gli過剰発現構築物が挙げられる。

【0201】

本方法の一部の態様では、SHHシグナル伝達経路活性化因子(例えば、SHH+プルモルファミン)を、培養の全持続期間または部分的持続期間にわたり細胞培養物へと添加する。一部の実施形態では、細胞培養物中のSHH活性化因子の濃度は、SHH(または

10

20

30

40

50

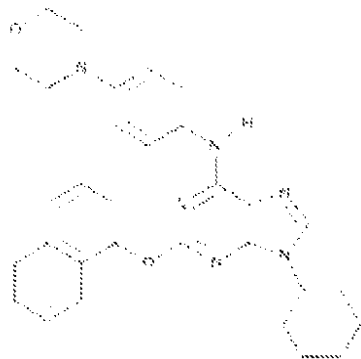
組換えSHH)について、約10 ng/mL～約5000 ng/mLであり、プルモルファミンについて約0.1 μM～約20 μMである。一部の好ましい実施形態では、細胞培養物中のSHH活性化因子の濃度は、SHH(または組換えSHH)について、約50 ng/mL～約500 ng/mLであり、プルモルファミンについて約0.5 μM～約4 μMである。

【0202】

プルモルファミンとは、名称が9-シクロヘキシル-N-[4-(モルホリニル)フェニル]-2-(1-ナフタレニルオキシ)-9H-プリン-6-アミンであり、化学式がC₃₁H₃₂N₆O₂である、市販の低分子である。プルモルファミンの構造を下記に挙げる。プルモルファミンは、ヘッジホッグシグナル伝達経路の7回膜貫通Smoothened受容体に結合し、これを活性化する。

10

【化4】



20

【0203】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、SHHシグナル伝達活性化因子は、スムーズドアゴニスト(SAG)、SAG類似体、SHH、C25-SHH、C24-SHH、プルモルファミン、Hgg-Ag、ならびにこれらの誘導体および/または改変体からなる群から選択することができ、これらの各誘導体および/または改変体は、1つまたは複数のSMAD阻害活性を保有する。例えば、SHHシグナル伝達活性化因子は、組換えSHHおよびプルモルファミンまたはこれらの機能的な誘導体および/もしくは改変体を含みうる。組換えSHHは、*in vitro*培養物中で、約5 ng/mL～約5 μg/mLの最終濃度において、多能性および/または多分化能細胞と接触させることができる。プルモルファミンは、*in vitro*培養物中で、約0.1 μM～約20 μMの最終濃度において、多能性および/または多分化能細胞と接触させることができる。

30

【0204】

本明細書で提示されるデータは、SHHによる分化の活性化のタイミングの差異が、前方-後方独自性が多様な異なる腹側前駆細胞の発生を誘発するのに肝要であることを実証している。視床下部原基のマーカーを発現させるhESC由来の前駆細胞の導出における、SHHシグナル伝達の早期の活性化は、FGF-8の存在を必要とする(Krinksら、Nature、480巻:547～551頁(2011年))。これに対し、本明細書で記載される一部の実施形態では、FGF-8の添加が、視床下部前駆細胞運命を方向付けるのに必要でないことが実証される。

40

【0205】

ニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに/または多能性および/または多分化能細胞を、1つもしくは複数のSMAD阻害剤および/または1つもしくは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることができる。例えば、ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、多能性細胞および/または多分化能細胞を、1

50

つまたは複数のSMA D阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた、約4日後～約20日後または約8日後～約18日後に開始することができる。ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約16日間の期間にわたる。

【0206】

皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンのマーカー

本明細書で使用される場合、「マーカー」または「細胞マーカー」という用語については、「定義」節で既に記載されており、特定の細胞または細胞型を識別する遺伝子またはタンパク質を指す。細胞のマーカーは、1つのマーカーに限定されなくてもよい。マーカーとは、指定されたマーカー群により、細胞または細胞型を、別の細胞または細胞型から識別しうるような、マーカーの「パターン」を指す場合がある。例えば、本開示の前脳細胞は、前脳細胞を弁別する、1つまたは複数のマーカー、すなわち、FOXA2陽性およびNKX2.1陽性を発現させる。本明細書で使用される場合、「前脳 (forebrain)」または「前脳 (prosencephalon)」という用語については、「定義」節で既に記載されており、脳の最吻側 (最前方) 部分を指し、中枢神経系 (CNS) の初期発生の間における、脳の1つの主要部分である。前脳は、間脳 (腹側視床、視床、視床下部、視床腹部、視床上部、および視蓋前域) と終脳 (大脳) とに分かれる。

【0207】

皮質介在ニューロンおよび／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカーについては記載されており、当業者にたやすく入手可能であり、例えば、SST、PV、GABA、カルビンディン、LHX6、RAX、FOXA2、FOXG1、OLIG2、MASH1、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、およびCHATが挙げられる。

【0208】

他の実施形態では、本開示は、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を生産するニューロン細胞を発生させるためのin vitroにおける方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞または多分化能細胞の分化により発生させ、(a) 1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、(i) 2つまたはそれより多くのSMA D阻害剤、および(ii) 1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、(b) ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数の生産を誘導するステップとを含む方法を提供する。

【0209】

視床下部ニューロンおよび／または視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を生産するニューロン前駆体細胞は、ニューロン前駆体細胞の成熟に助力する条件に晒すことができる。例えば、ニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに／または多能性および／または多分化能細胞を、1つもしくは複数のSMA D阻害剤および／または1つもしくは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることができる。他の一部の実施形態では、in vitroにおけるニューロン細胞の成熟を加速するように胚性マウス皮質細胞を使用して、皮質フィーダー環境を創出した。

【0210】

ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、例えば、多能性細胞および／または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMA D阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、

視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞を産生するステップの、約1日後～約4日後に開始することができる。ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約20日間の期間にわたりうる。

【0211】

視床下部ニューロンおよび視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカについては記載されており、当業者にたやすく入手可能であり、NGF、BDNF、c-fos、CRF、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）、RAX、POMC、ヒポクレチン、およびNADPHが挙げられる。

【0212】

さらなる実施形態では、本開示は、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカ1つまたは複数を産生するニューロン細胞を発生させるための*in vitro*における方法であって、ニューロン細胞を、多能性細胞および／または多分化能細胞の分化により発生させ、（a）1つもしくは複数の多能性細胞および／または1つもしくは複数の多分化能細胞を、（i）2つまたはそれより多くのSMAD阻害剤、および（ii）1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞の発生を誘導するステップと、（b）ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させ、これにより、ニューロン前駆体細胞内で、視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカ1つまたは複数の産生を誘導するステップとを含む方法を提供する。

【0213】

視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカを産生するニューロン前駆体細胞は、ニューロン前駆体細胞の成熟に助力する条件に晒すことができる。

【0214】

ニューロン前駆体細胞を、ニューロン前駆体細胞を発生させた後、ならびに／または多能性および／または多分化能細胞を、2つもしくはそれより多くのSMAD阻害剤および／または1つもしくは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させた後における、所定の期間にわたる継代培養の後で、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させることができる。

【0215】

ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、多能性細胞および／または多分化能細胞を、1つまたは複数のSMAD阻害剤および1つまたは複数のWntシグナル伝達アンタゴニストと接触させて、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞を産生するステップの、約4日後～約8日後に開始することができる。ニューロン前駆体細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、約5日間～約30日間、または約8日間～約24日間の期間にわたりうる。

【0216】

視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカは公知であり、当業者にたやすく入手可能である。このような視索前野コリン作動性ニューロンおよび／または視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカとして、例えば、ChAT、NGF、ACh、VACHT、LHX8、Isl1、およびp75が挙げられる。

【0217】

多能性細胞および／または多分化能細胞は、ヒト細胞の場合もあり、マウス細胞の場合もあり、胚性幹細胞、成体幹細胞、神経幹細胞、人工多能性細胞、操作多能性細胞、初代前駆細胞、誘導前駆細胞、および操作前駆細胞からなる群から選択しうるということが理解される。

【0218】

SMA D阻害剤と接触させるステップおよび／またはW n tシグナル伝達アンタゴニストと接触させるステップは、同時に実行することもでき、逐次的に実行することもできる。接触は、約5日間～約30日間の持続期間にわたる。

【0219】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、ニューロン前駆体細胞は、NKX2.1、NKX2.2、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、およびNKX6.2からなる群から選択される、1つまたは複数のマーカーを含む。

10

【0220】

これらの3つの実施形態のうちのいずれかによる方法のなおさらなる態様では、1つまたは複数のSMA D阻害剤、1つまたは複数のW n tシグナル伝達アンタゴニスト、および／または1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップは、マウス皮質錐体ニューロン、例えば、マウスESCから導出されるマウス皮質錐体ニューロンなどのフィーダー細胞の存在下で実行することができる。

【0221】

一部の実施形態では、本開示による方法を使用して、皮質介在ニューロンおよびそれらの前駆細胞を含む様々な細胞を、当技術分野の最新技術で得ることができない量および純度で産生することができる。一部の実施形態で、本開示の方法を使用することにより得られた、多数の純粋で機能的な皮質介在ニューロンを使用して、統合失調症または自閉症、および他の神経学的疾患について研究することができる。同様に、これらの細胞はまた、薬物スクリーニングおよび細胞療法においても使用することができる。

20

【0222】

腹側前駆体細胞を発生させるための方法

ある特定の実施形態では、本開示は、腹側前駆細胞を発生させるための方法であって、細胞を、ソニックヘッジホッグ(SHH)などの腹側化因子へと曝露するステップを含む方法を提供する。代替的に、細胞は、Shhを模倣する薬剤またはSHHのアゴニストに曝露される。

【0223】

本開示の一部の実施形態では、SHH経路の活性化を、SMA DおよびW n tの阻害を開始した少なくとも8日後かつ最大で18日後に開始して、皮質介在ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。一部の実施形態では、SHH経路の活性化は、その開始の約5日後～約30日後に終了する。一部の実施形態では、SHH活性化因子は、培養細胞へと、約30日間～約60日間というより長い持続期間にわたり添加することができる。一部の好ましい実施形態では、SHH経路の活性化を、SMA DおよびW n tの阻害を開始した約8日後～約18日後の間に開始し、その開始の約8日後～約16日後の間に終了して、皮質介在ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。

30

【0224】

本開示の他の一部の実施形態では、SHH経路の活性化を、SMA DおよびW n tの阻害を開始した少なくとも1日後かつ最大で4日後に開始して、視床下部ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。一部の実施形態では、SHH経路の活性化は、その開始の約5日後～約30日後に終了する。一部の実施形態では、SHH活性化因子は、培養細胞へと、約30日間～約60日間というより長い持続期間にわたり添加することができる。一部の好ましい実施形態では、SHH経路の活性化を、SMA DおよびW n tの阻害を開始した約1日後～約4日後の間に開始し、その開始の約8日後～約20日後の間に終了して、視床下部ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。

40

【0225】

本開示の他の一部の実施形態では、SHH経路の活性化を、SMA DおよびW n tの阻害を開始した少なくとも4日後かつ最大で10日後までに開始して、視索前野コリン作動

50

性ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。一部の実施形態では、SHH経路の活性化は、その開始の約5日後～約30日後に終了するが、より長期にわたり維持することもできる。一部の実施形態では、SHH活性化因子は、培養細胞へと、約30日間～約60日間というより長い持続期間にわたり添加することができる。一部の実施形態では、SHH経路の活性化を、SMADおよびWntの阻害を開始した約4日後～約8日後の間に開始し、その開始の約8日後～約24日後の間に終了して、視索前野コリン作動性ニューロンまたはそれらの前駆体細胞を産生する。

【0226】

本開示の一部の実施形態では、単離した細胞集団を、未成熟介在ニューロン前駆体細胞へと分化させた後で、精製および濃縮した未成熟介在ニューロン前駆体細胞の集団を回収する。この回収手順は、未成熟介在ニューロン前駆体細胞内だけで機能し、他の細胞型内では機能しないエンハンサー／プロモーターを活用するプロモーターベースの分離手順により実行することが好ましい。

10

【0227】

本開示で記載される方法により産生した皮質介在ニューロンの独自性は、細胞の分子シグネチャーおよび形態シグネチャーにより確認することができる。SST、PV、GABA、カルビンディン、LHX6、RAX、FOXA2、FOXG1、OLIG2、MASH1、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、CHAT、およびこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、皮質介在ニューロンおよびそれらの前駆体細胞のいくつかの分子マーカーが記載されている。WondersおよびAnderson、Nat Rev Neurosci、7巻：687～696頁（2006年）を参照されたい。

20

【0228】

本開示で記載される方法により産生した視床下部ニューロンの独自性は、細胞の分子シグネチャーおよび形態シグネチャーにより確認することができる。NGFIB、c-fos、CRF、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）、RAX、POMC、ヒポクレチン、NADPH、およびこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、視床下部ニューロンおよびそれらの前駆体細胞のいくつかの分子マーカーが記載されている（Cheng MF、Front Neuroendocrinol.、2013年8月、34巻（3号）：167～78頁を参照されたい）。

30

【0229】

本開示で記載される方法により産生した視索前野コリン作動性ニューロンの独自性は、細胞の分子シグネチャーおよび形態シグネチャーにより確認することができる。CHAT、NGF、Ach、VACHT（Bruehl-Jungerman Eら、Behav Brain Res、2011年8月10日；221巻（2号）：379～88頁を参照されたい）、LHX8、Isl1、p75、およびこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、視索前野コリン作動性ニューロンおよびそれらの前駆細胞のいくつかの分子マーカーが記載されている。

【0230】

NKX2.1前駆体細胞のニューロン分化および遊走特性

40

神経節隆起に由来する皮質介在ニューロンは、皮質回路内の興奮と抑制との平衡化に関与しうる。加えて、皮質介在ニューロンはまた、発生上の可塑性の制御においても役割を果たし、てんかんから自閉症および統合失調症の範囲にわたる多様な病態において機能不全性となりうる（Barabanら、Proc Natl Acad Sci USA、106巻：15472～15477頁（2009年）；Eaglesonら、Autism Res、4巻：68～83頁（2011年）；Insel、Nature、468巻：187～193頁（2010年）；Lewisら、Nat Rev Neurosci、6巻：312～324頁（2005年）；およびPenagarikanoら、Cell、147巻：235～246頁（2011年））。

【0231】

50

本明細書で提示されるデータは、分化10～18日目SHH処理前駆体細胞は、マウスの発生中において皮質介在ニューロン前駆細胞ドメインの部分のマーキングすることが公知の転写因子であって、OLIG2、MASH1、およびNKX2.1を含む転写因子の多くを発現させることを示唆する。分化18日目におけるNKX2.1::GFP細胞の大半は、ネスチンおよびKi67の発現により示す場合、前駆細胞の特性を呈示する。しかし、外因性のSHH活性化の非存在下で培養を長期化させたところ、循環NKX2.1::GFP細胞は、徐々に減少した(図4A～4C、上パネル)。例えば、Ki67の比率の減少は、ニューロン前駆体細胞マーカーであるDCXおよびTUJ1を発現する細胞の百分率の増大と並行した(図4A～4C、下パネル)。

【0232】

10

加えて、分化10～18日目SHH処理群および分化2～18日目SHH処理群におけるGFP+細胞の多くは、GABAを発現し、接線方向に遊走する皮質介在ニューロン前駆体細胞ならびに他の集団のマーカーである(Ander sonら、Science、278巻:474～476頁(1997年))、カルビンディン発現の時間依存的増大を示す(図4A～4C、下パネル)。

【0233】

分化32日目におけるウェスタンブロット解析により、マウスにおける有糸分裂後の遊走性の皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカーであるLHX6タンパク質が、分化10～18日目SHH処理群において、選択的に濃縮されることが示されたことは、重要なことである。これに対し、視床下部マーカーであるRAXは、分化2～18日目SHH処理群において、選択的に濃縮された(図4D)。

20

【0234】

さらなる免疫細胞化学データは、分化10～18日目SHH処理NKX2.1::GFP+前駆細胞に由来する大半のニューロン前駆細胞におけるDLX2およびASCL1の発現を示した(図4E～4G)。これらのデータは、外因性のSHHシグナル伝達活性化因子を中止した後において、NKX2.1::GFP+前駆細胞は、皮質介在ニューロンの前駆体細胞を含む、領域特異的な有糸分裂後ニューロンをもたらすことを示唆する。

【0235】

また、ヒトESC由来の推定皮質介在ニューロン前駆体細胞(例えば、分化10～18日目SHH処理群)が、マウス脳(Ander sonら、Science、278巻:474～476頁(1997年))内およびヒト脳(Letinicら、Nature、417巻:645～649頁(2002年))内の初代皮質介在ニューロンについて観察された、以前に観察された特徴的な遊走能力を呈示するのかどうかに関心の対象であった。いずれの種においても、皮質介在ニューロンの主要なサブクラスは、腹側終脳から皮質へと分化しながら、接線方向の遊走を起こすと考えられる(Ander sonら、Science、278巻:474～476頁(1997年))；Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻(9号):2196～2207頁(2009年)；およびLetinicら、Nature、417巻:645～649頁(2002年))。

30

【0236】

NKX2.1::GFP+細胞を、分化32日目において、FACSにより回収し、胚生13.5日目のマウス胚から単離した前脳薄片へと注射した。細胞の注射は、顕微鏡による視覚的誘導下で、内側神経節隆起を注意深く標的とした(図4H)。NKX2.1::GFP+細胞の遊走能力およびそれらの皮質に到達する能力(図4Hの帯域2を参照されたい)を、分化2～18日目SHH処理群、分化6～18日目SHH処理群、および分化10～18日目SHH処理群の間で比較した(図4I～4L)。

40

【0237】

GFP+細胞が、2日目において、注射部位から皮質(帯域2)へと遊走し、注射後6日目において、より顕著となることを観察した(それぞれ、図4Mおよび4N)。分化10～18日目SHH処理群に由来するヒト細胞は、マウス薄片の新皮質部分への遊走の頑健な傾向を示したが、他の2つの処理群に由来するヒト細胞は、これを示さなかった(図

50

4 I～4 N)ことは、注目すべきことである。これらのデータは、分化10～18日目SHH処理細胞が、初代マウスMGE由来の介在ニューロン前駆体細胞について以前に記載された遊走特性を呈示することを示唆する(Lavdasら、J Neurosci、19巻:7881～7888頁(1999年);Sussellら、Development、126巻:3359～3370頁(1999年);およびWichterleら、Nat Neurosci、2巻:461～466頁(1999年))。

【0238】

分化10～18日目処理細胞と対比した分化2～18日目SHH処理細胞の遊走能力は、FACSで単離したNKX2.1::GFP+細胞を、新生仔の遺伝子的免疫不全マウスの新皮質へと移植することにより決定した。移植の4週間後において、分化10～18日目SHH処理細胞は、マウス皮質内の放射面および接平面のいずれにおいても、広範な遊走を示した(図4Oおよび4P)。同様の結果は、成体皮質への移植時にも得られたが、30日目までの、in vivoにおけるNKX2.1::GFP+細胞の全般的遊走は、新生仔への移植と比較して、それほど広範ではなかった(図5)。

【0239】

in vivoにおける介在ニューロン前駆体細胞の成熟の程度を決定するために、分化10～18日目SHH処理群を使用して、形態的外見および移植された細胞内の介在ニューロン関連マーカーの発現を評価した(図5C)。新生仔マウス皮質への移植の1および2カ月後のいずれにおいても、大半のヒト細胞は、二極性または単極性形態を伴う未分化の外見を呈示し、NKX2.1を発現し続けた。さらに、多極性形態を伴う移植細胞を含む本質的に全ての移植細胞が、ニューロン前駆体細胞マーカーであるDCXを発現した。移植されたヒト介在ニューロン前駆体細胞のうちの大多数が、GABAを発現した(例えば、46/51のGFP+細胞が、切片表面で観察可能である)。これに対し、NKX2.1系統の介在ニューロンの主要なサブクラスにおいて検出される2つのタンパク質である、パルプアルブミン(PV)またはソマトスタチン(SST)についての共標識は存在しなかった。この結果は、移植の6週間後までであっても、NKX2.1-GFP+細胞が、成熟介在ニューロンへとまだ分化していないことを示す。

【0240】

開示される方法の機構を理解することは必要でないが、マウス宿主皮質における移植されたGFP+細胞の分化の見かけの欠如は、マウス皮質介在ニューロン内で生じる場合、NKX2.1が、成熟後に下方調節され(Marinら、J Soc Neurosci、20巻:6063～6076頁(2000年))、より分化した細胞によるGFP発現の喪失が結果としてもたらされるためでありうるということが考えられる。例えば、切片が、ヒト特異的な汎ニューロンマーカーであるSC121の発現について試験された(Kellyら、Proc Natl Acad Sci USA、101巻:11839～11844頁(2004年))。予測される通り、全てのGFP+細胞はまた、SC121も発現した(図6)。しかし、移植の6週間後においてもなお、SC121を発現するが、GFPを発現しないヒト細胞は、10%未満であった(すなわち、例えば、2つの6週間移植植物からカウントしたGFP+細胞372個のうち25個)。まとめると、ヒト介在ニューロン前駆体細胞の、長期間を要する、in vivoにおける成熟のペースに従う傾向におそらく起因して、移植研究は、移植の最初の2カ月以内では、成熟介在ニューロンの分化を結果としてもたらさなかった。

【0241】

in vitroにおける皮質介在ニューロンの表現型成熟およびシナプス成熟
皮質介在ニューロン発生については、マウス胚MGE由来の前駆細胞を、主にマウス皮質錐体ニューロンおよびグリアから構成される「フィーダー培養物」上に播種した共培養系を使用して研究されている(Xuら、J Neurosci、24巻:2612～2622頁(2004年))。ヒト介在ニューロンの成熟の態様が、この系では、異種移植片と比べて加速されるのかどうかを決定するために、NKX2.1::GFP+細胞を、分化32日目において、FACSにより回収し、解離させたマウス胚皮質の培養物上に再播

種した（図7A）。皮質細胞は、腹側由来の皮質介在ニューロンの背側新皮質への遊走の前の段階である、胚生13.5日目のマウス胚から単離した（Andersonら、Science、278巻：474～476頁（1997年））。

【0242】

したがって、この共培養系は、グルタミン酸作動性皮質錐体ニューロンの存在下で発達しつつある、ヒトNKX2.1+細胞による正常な発達の態様を模倣する。研究は、3つのSHH処理レジメンの各々から導出したGFP+細胞を使用して、並行して実施した（図7B～7E）。

【0243】

in vivo 研究とは対照的に、分化2～18日目SHH処理群に由来するGFP+細胞（「視床下部様」）のうちの40%および分化6～18日目SHH処理群に由来するGFP+細胞のうちの15%と対比して、分化10～18日目SHH処理群に由来するGFP+細胞（「MGE様」）のうちのおよそ80%が、GABAを発現したことは、注目すべきことである。さらに、分化6～18日目SHH処理群は、終脳（FOXG1+）細胞およびコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）において濃縮されたが、介在ニューロン前駆体細胞のLHX6において濃縮されなかった（図4Dを参照されたい）。

【0244】

分化10～18日目SHH処理細胞に由来するGFP+細胞は、分化6～18日目SHH処理細胞と比べて、GABAニューロンについて濃縮された。これらの細胞が、GABA作動性シナプス伝達を起こすニューロンをもたらすのかどうかを決定することが関心の対象であった。識別したGFP+細胞についての全細胞パッチクランプによる電気生理学的研究は、分化10～18日目SHH処理細胞および分化6～18日目SHH処理細胞のいずれにおいても、自発的発火を示した（図7F～7K）。しかし、GABA受容体アンタゴニストであるピククリンに応答して、NKX2.1::GFP+細胞の発火率のモジュレーションを示したのは、分化10～18日目SHH処理群だけであった（図7J）。皮質フィーダー細胞は、分化10～18日目SHH処理群および分化6～18日目SHH処理群のいずれにおいても、極めて少数のマウス介在ニューロンを含有したに過ぎないので、これらの結果は、hPSC由来のGABA作動性ニューロンが、抑制性シナプスの出力を媒介することを示す。したがって、GABA作動性ニューロンがより希少である分化6～18日目SHH処理群では、ピククリン曝露後における発火率は、不変のままであった（それぞれ、図7Cおよび図7K）。

【0245】

分化10～18日目SHH処理群を使用して発生させたNKX2.1::GFP+細胞へのシナプス入力についてさらに解析するために、自発的シナプス後電流および抑制性または興奮性シナプスマーカーの局在化について解析した。マウス皮質フィーダー細胞上で30日間にわたり培養したGFP+細胞は、GABA作動性シナプスのシナプス前終末内に存在する、高レベルの小胞GABAトランスポーター（VGAT）を発現した。GFP+細胞内のVGATの細胞内局在は、GABA作動性シナプス後マーカーであるゲフィリンの発現に緊密に合致した（図8A～8E）。

【0246】

全細胞パッチクランプ解析により、NKX2.1::GFP+細胞は、GABA受容体アンタゴニストであるピククリンを添加することにより可逆的に遮断される、自発性抑制性シナプス後電流（sIPSC）を受容することが実証された（図8F）。GFP+推定樹状突起に隣接した、小胞グルタミン酸トランスポーター1（VGUT1）の発現、およびシナプス後興奮性シナプスマーカーであるPSD-95との共標識の存在により実証される通り、NKX2.1::GFP+細胞は、抑制性入力に加えて、興奮性入力もまた受容する（図8G～8K）。

【0247】

自発性興奮性シナプス後電流（sEPSC）がまた、NKX2.1::GFP+ニューロンにおいてたやすく検出された（図8L）ことは、グルタミン酸作動性シナプス入力の

10

20

30

40

50

存在と符合する。NKX2.1::GFP+細胞における自発的シナプス活性についてのより詳細な解析も提供する(図9;表2Aおよび2B)。

【表A】

A)ヒト皮質フィーダーと対比したマウス皮質フィーダー上における、hESC由来のNKX2.1::GFP+ニューロンの電気生理学的特性(10~18日目および6~18日目群)

	マウスフィーダー上の 10~18日目		マウスフィーダー上の 6~18日目		ヒトフィーダー上の 10~18日目
DIV	14-16	23-30	14-18	23-30	23-30
RMP (mV)	-38.6 ± 2.4	-45.8 ± 1.6**	-39.1 ± 2.4	-42.4 ± 3.6**	-44.8 ± 6.8†
APの振幅 (mV)	57.4 ± 6.3	66.2 ± 4.1	56.2 ± 7.3	64.2 ± 5.8	62.5 ± 5.1
APの立ち上がり 時間 (ms)	1.972 ± 0.07	1.38 ± 0.03**	1.52 ± 0.08	1.11 ± 0.03*	1.8 ± 0.36†
APの半値幅 (ms)	3.95 ± 0.08	2.42 ± 0.12*	3.02 ± 0.05	2.5 ± 0.11*	4.3 ± 0.32††
AHPのピーク (mV)	19.1 ± 3.5	15.6 ± 2.4	11.2 ± 3.5	18.9 ± 2.6	8.8 ± 3.72
Ri (GΩ)	1.5 ± 0.1	0.72 ± 0.05**	0.94 ± 0.05	0.88 ± 0.12	1.86 ± 0.2††
細胞数	8	15	6	12	5

DIV: in vitro日数; Ri: 入力抵抗; AP: 活動電位; AHP: 過分極後

*P<0.01: 対応のないt検定、対応する14~16 DIV群と比較

**P<0.001: 対応のないt検定、対応する14~16 DIV群と比較

†: P<0.001: 対応のないt検定、10~18マウス(20~30 DIV)と比較

††: P<0.0001: 対応のないt検定、10~18マウス(20~30 DIV)と比較

活動電位特性は、電流注入により誘発される場合の閾値で測定した。

【表B】

B)GFP陽性GABA作動性介在ニューロンにおけるGABA作動性シナプス電流の平均特性

	siPSC	miPSC
振幅 (pA)	62.6 ± 5.2	35.1 ± 2.3*
立ち上がり時間 (ms)	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4
減衰時間 (ms)	66.2 ± 5.4	51.2 ± 3.6*
半値幅 (ms)	54.5 ± 5.3	41.3 ± 3.2*
細胞数	8	4

記録は、26~30 DIVにおいて作成した。*P<0.05: 対応のないt検定

【0248】

皮質介在ニューロンは、皮質の発達および機能において異なる役割を有する、ニューロン型の多彩なセットを含む(Batista-Britoら, Curr Top Dev Biol、87巻: 81~118頁(2009年))。このマウス皮質フィーダー系に

における比較的急速な成熟のペースにより、他のより成熟した介在ニューロンマーカーの共発現について評価し、NKX2.1::GFP+細胞におけるGABAおよびCHAT以外の神経伝達物質表現型を規定することが可能となる。

【0249】

例えば、分化2～18日目SHH処理群では、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）を発現するGFP+細胞が大きな百分率で観察された（図12A）。これらのデータは、多くのNKX2.1系統の視床下部ニューロンのドーパミン作動性の性質と符合する（Yeeら、J Comp Neurol、517巻：37～50頁（2009年））。nNOSおよびカルビンディンについての免疫組織化学は、分化2～18日目SHH処理群に由来するGFP+細胞における、高百分率のnNOS細胞を示した一方、高百分率のカルビンディン+ニューロンが、分化10～18日目SHH処理群において存在した（それぞれ、図12Bおよび12C）。また、SSTおよびPVを含む分化した皮質介在ニューロンに特徴的な他のマーカーも発現した（図12Dおよび12E）。また、NKX2.1::GFPと共に共発現された各垂群マーカーも同定した（図12F～12J）。VIPおよびカルレチニンは、これらのニューロン培養物中では発現されなかった。これらのデータは、マウスの発生中における尾側神経節隆起などの特徴を呈示する細胞の欠如を示唆する（Xuら、J Neurosci、24巻：2612～2622頁（2004年））。

【0250】

in vivoにおける皮質介在ニューロンにおいてこのマーカーの発現が、発生上後期の発現であることを踏まえると、NKX2.1+IPV+の導出は、特に注目すべきことであった（Zecevicら、Dev Neurobiol、71巻：18～33頁（2011年））。自動式画像解析（例えば、Operetta（登録商標）High Content スキャナーを使用）によりGFP+IPV+としてカウントされた細胞のサブセットだけが、高レベルのPV発現を示し、介在ニューロン様形態を呈示した（全GFP+細胞のうちの約5%（図12J））。開示の機構を理解することは必要でないものの、選択的な皮質介在ニューロン垂型の導出のさらなる最適化は有用であると考えられるが、データは、マウス胚皮質ニューロンを使用する、本明細書で開示される共培養戦略が、hPSC由来の介在ニューロン（例えば、PV+hPSC由来ニューロン）における垂型特異的な神経化学マーカーの発現を促進させる効果的なプラットフォームをもたらすことを実証している。

【0251】

in vivoにおけるNKX2.1-GFP+推定介在ニューロン前駆体細胞の成熟が長期間を要することを踏まえると、共培養物系において、介在ニューロン様分化の形態的証拠、マーカーベースの証拠、および生理学的証拠を得ることは、驚くべきことである。ヒト皮質投射ニューロンについて濃縮された培養物上で増殖させた同じGFP+細胞もまた、成熟の加速を示すのかどうかを決定するために、FACSで精製したNKX2.1::GFP+細胞を、ヒト皮質ニューロンと対比してマウス皮質ニューロン上で、並行して共培養した。

【0252】

ヒト皮質フィーダーは、hESCを分化させた（例えば、改変XLSB条件）後で、CD44-/CD184+/CD24+ニューロンについてのFACSを行って得た（Yuanら、PLoS One、6巻：7540頁（2011年））（図10A～10D）。hESC由来ニューロンの皮質独自性を、VGLUT1、MAP2、CTIP2、およびSATB2の発現により確認したところ、極めて少数のGFAP+細胞またはネスチン+細胞しか存在しなかった（図10E～10T）。

【0253】

ヒト皮質フィーダー上に播種したNKX2.1+細胞の電気生理学的成熟と対比して、マウス皮質フィーダー上に播種したNKX2.1+細胞の電気生理学的成熟では、記録が、マウスフィーダー条件について14～16 DIV、20～30 DIVのいずれかにおいて得たものであろうと、ヒト皮質フィーダー条件について20～30 DIVにおい

て得たものであろうと、一貫した差異が観察された（表2 Aおよび2 B）。マウス皮質フィーダー細胞上に播種した、分化10～18日目SHH処理群および分化6～18日目SHH処理群のいずれについての基本的な電気生理学的特性の解析も、分化のより後期時点において、より成熟した特徴を示した。時間と共に、静止膜電位（RMP）の有意な過分極、ならびに入力抵抗の減少が見られた。加えて、立ち上がり時間および半値幅の減少により証拠立てられる通り、活動電位は速く狭くなった。これに対し、ヒト皮質フィーダー細胞上の20～30 DIVに記録された、10～18日目SHH処理群に由来するGFP+ニューロンは、マウス皮質フィーダー細胞上に播種した、より若齢の14～16 DIVニューロンにおいて見られた測定値と同等の、比較的未成熟な特徴を保持した。例えば、ヒト皮質フィーダー細胞を使用した場合の分化10～18日目SHH処理細胞内のRMP、活動電位の立ち上がり時間、活動電位の半値幅、および入力抵抗は、同じDIV範囲で記録された場合のマウス皮質フィーダー細胞と比較した場合に、有意に異なった。多様な条件下における定性的発火特性を示す試料出力波形を収集した（図11）。

10

【0254】

これらのデータは、機能的な成熟のペースが、局所環境の影響を受けることを示唆する。機構に依存せずに、これらのデータは、本明細書で記載される、マウス皮質細胞フィーダー共培養条件が、機能的*in vitro*研究を実施するのに適切なhESC由来の皮質介在ニューロンの効率的な成熟を可能とすることを実証する。

【0255】

*in vitro*で発生させた、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンを含む組成物

20

さらなる実施形態では、本開示は、皮質介在ニューロン細胞および／または皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の*in vitro*で分化させたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro*で分化させたニューロン細胞が、（a）多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くのSMA Dシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、（b）多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数の阻害剤と接触させるステップ、（c）多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、組成物を提供する。

【0256】

30

本明細書で開示される組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、皮質介在ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含みうる。

【0257】

組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、NKX2.1+／PV+皮質介在ニューロンが、組成物中の細胞総数のうちの少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%を占める混合物を含みうる。

40

【0258】

組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、γ-アミノ酪酸（GABA）作動性抑制性介在ニューロンが、組成物中の皮質介在ニューロンの総数のうちの少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%を占める混合物を含みうる。

【0259】

関連する実施形態では、本開示は、視床下部ニューロンまたは視床下部ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の*in vitro*で分化さ

50

せたニューロン細胞を含む組成物であって、*in vitro*で分化させたニューロン細胞が、(a) 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くのSMA Dシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(b) 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(c) 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、組成物を提供する。

【0260】

組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、視床下部ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含みうる。

10

【0261】

組成物は、視索前野コリン作動性ニューロンまたは視索前野コリン作動性ニューロン前駆体細胞のマーカー1つまたは複数を産生する1つまたは複数の*in vitro*で分化させたニューロン細胞であり、(a) 多分化能細胞または多能性細胞を、2つまたはそれより多くのSMA Dシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(b) 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数のWntシグナル伝達阻害剤と接触させるステップ、(c) 多分化能細胞または多能性細胞を、1つまたは複数のSHHシグナル伝達活性化因子と接触させるステップにより産生されている、*in vitro*で分化させたニューロン細胞を含みうる。

20

【0262】

組成物は、2つまたはそれより多くの細胞の混合物であって、視索前野コリン作動性ニューロンが、細胞総数のうちの少なくとも約30%、または細胞総数のうちの少なくとも約40%、または細胞総数のうちの少なくとも約50%、または細胞総数のうちの少なくとも約60%、または細胞総数のうちの少なくとも約70%、または細胞総数のうちの少なくとも約80%、または細胞総数のうちの少なくとも約90%、または細胞総数のうちの少なくとも約95%を占める混合物を含みうる。

【0263】

皮質介在ニューロンまたは介在ニューロン前駆体細胞は、例えば、CT-2または緑色蛍光タンパク質(GFP)など、検出マーカーを発現するトランス遺伝子で改変されていてもよい。これらの検出マーカーは、本開示のこの態様から逸脱することなく、他の検出マーカーと互換しうることが理解される。

30

【0264】

本発明の皮質介在ニューロン前駆体細胞は、成熟介在ニューロンの形態的特性、神経化学的特性、および電気生理学的特性を呈示する機能的介在ニューロンをもたらす。未成熟介在ニューロン前駆体細胞調製物は、それらの*in vivo*におけるニューロン環境を模倣する制御された培養条件下で(例えば、本明細書の実施例で記載される通り、フィーダー細胞の存在下で培養される)*in vitro*において成熟しうる。代替的に、未成熟介在ニューロン前駆体細胞は、移植され、哺乳動物対象(例えば、ヒト対象)の脳皮質内に遊走した後、成熟する。本明細書で実証される通り、本発明の未成熟介在ニューロン前駆体細胞は、脳皮質へと移植されると、非放射状に(すなわち、接線方向に)広範に遊走する。遊走する際に、皮質介在ニューロン前駆体細胞は、急速スパイク活動電位の放電パターンを呈示する、パルブアルブミンおよびKv3.1を発現する介在ニューロンへと成熟する。代替的に、本発明の皮質介在ニューロン前駆体細胞は、ソマトスタチンを発現する介在ニューロンに成熟し、これは、介在ニューロンのこの亜群の、特徴的なリバンウンド発火パターン、順応性発火パターン、急速でないスパイク発火パターンを呈示する。これらの、ソマトスタチンを発現する介在ニューロンは、神経ペプチドYをさらに発現しうる。

40

50

【0265】

皮質介在ニューロン前駆体細胞は、約 -40 mV ～約 -70 mV の平均静止膜電位を有する介在ニューロンへと成熟する。時間と共に、平均静止膜電位は、約 -55 mV ～約 -70 mV の範囲でより過分極化する。

【0266】

障害および疾患を処置するための方法

*in vitro*における、ニューロン細胞の、幹細胞または前駆細胞からの導出は、著明な臨床的含意を有し、また、疾患のモデル化および薬物スクリーニングのためにも重要である。本発明のこの方法に従う処置のために適切な状態として、てんかんまたは乳児けいれんなどの発作障害；自閉症、統合失調症、不安障害、および摂食障害などの神経精神障害；全前脳症または小頭症などの神経発達障害；ならびにパーキンソン病が挙げられるが、これらに限定されない。*hPSC*を使用した初期研究は、パーキンソン病における中脳ドーパミンニューロン（PD；Kriksら、*Nature*、480巻：547～551頁（2011年）；Soldnerら、*Cell*、136巻：964～977頁（2009年）；およびSoldnerら、*Cell*、146巻：318～331頁（2011年））、または筋萎縮性側索硬化症（ALS；Dimosら、*Science*、321巻：1218～1221頁（2008年））および脊髄筋萎縮症（SMA；Ebertら、*Nature*、457巻：277～280頁（2009年））における運動ニューロンなど、特定のニューロン型に影響を及ぼすことが公知の神経変性障害に主に向けたものであった。より最近の研究では、統合失調症（Brennanら、*Nature*、473巻：221～225頁（2011年））または自閉症関連症候群（Marchettoら、*Cell*、143巻：527～539頁（2010年）；およびPascaraら、*Nat Med*、17巻：1657～1662頁（2011年））など、複合的な神経障害に取り組むことができる可能性が示唆される。

【0267】

本開示の細胞は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Gageらによる、米国特許第5,082,670号および同第5,650,148号；ならびにJohéらによる、米国特許公開第20060141622号において記載されている通りに、脳実質内移植または脳室内移植を介して送達することができる。脳実質内移植は、未成熟介在ニューロン前駆体細胞を、宿主脳実質内に注射することにより達成することもでき、外科手段によって空隙を用意して宿主脳実質を露出させ、次いで、細胞移植片を、空隙へと留置することにより達成することもできる。いずれの方法も、移植時に、移植された細胞と宿主脳組織との脳実質内並置をもたらす、いずれも、移植片と宿主脳組織との間の解剖学的統合を促進する。代替的に、移植片は、脳室内、例えば、大脳脳室内または硬膜下、例えば、宿主脳の表面上であって、介在する軟膜またはくも膜および軟膜により宿主脳実質から隔てられている表面上に配置することもできる。脳室への移植は、ドナー細胞の注射により達成することもでき、細胞を、30%のコラーゲンなどの基材中で増殖させて、固形組織のプラグを形成し、次いで、これを、脳室へと植え込んで、移植片の転位を防止することにより達成することもできる。硬膜下移植のためには、硬膜内にスリットを設けた後で、脳の表面付近に細胞を注射することができる。移植片が、宿主脳の不可欠の一部となり、宿主の生涯にわたり存続することが要求される場合、これは、重要である。

【0268】

生存問題にかかわらず、本開示で記載されるニューロン細胞および前駆体細胞の移植は、それらの*in vivo*における成熟の後で研究されうる多数の細胞の移植の成功を結果としてもたらす。

【0269】

神経変性障害および疾患を処置するための方法

ある特定の実施形態では、本開示は、例えば、パーキンソン病（PD）およびアルツハイマー病（AD）を含む神経変性と関連する障害および疾患を処置するための方法であって、本明細書で開示される方法により発生させた皮質介在ニューロンを、PDまたはAD

に罹患した患者へ *in vivo* において投与するステップを含む、方法を提供する。

【0270】

本明細書で記載される分化6～18日目SHH処理群データのNKX2.1::GFP+前駆細胞におけるコリン作動性ニューロンの主要な分化は、認知機能の喪失と関連する障害のモデル化および処置のための基盤を提供する。例えば、アルツハイマー病では、前脳基底部コリン作動性ニューロンは、疾患の初期において、ニューロンの中で最も損傷を受けやすい(Whitehouseら、Science、215巻:1237～1239頁(1982年))。

【0271】

NKX2.1::GFPレポーターhESCの使用により、6日目またはこれより後にSHH処理を開始する場合の、分化プロトコルの最適化、およびほぼ全てのhESC後代細胞の、FOXG1+1NKX2.1+腹側前脳運命への効率的な変換が可能となった(Goulburnら、Stem Cells、29巻:462～473頁(2011年))。皮質介在ニューロンの前駆体細胞の遊走能力のために、本開示は、単独の、または成熟皮質介在ニューロンの投与と組み合わせた、皮質介在ニューロン前駆体細胞の投与による治療的利点を企図する。

【0272】

本明細書で提示されるデータは、hESC由来の腹側前脳前駆細胞およびCS15ヒト前脳組織における、FOXA2のヒト特異的な発現を含む、ヒト前脳の発生とマウス前脳の発生との間の複数の差異を明らかにした。理論により束縛されることを望むわけではないが、一過性のFOXA2発現は、ヒト発生中においてSHHシグナル伝達が長期的に必要とされることと関連しうると考えられる。したがって、ヒトにおける長期間を要する前脳の発生、およびヒトとマウスとの間の脳サイズの差異は、SHH依存性前駆細胞の長期にわたる増殖に依存しうる。

【0273】

皮質介在ニューロンの発生における種特異的な差異が報告されており、これは妊娠中期におけるヒト胎児皮質内のASCL1+細胞の存在に部分的に基づく(Letinicら、Nature、417巻:645～649頁(2002年))。したがって、多くの、またはさらに大半の、ヒト皮質介在ニューロンが、皮質自体の中で発生すると考えられる(Letinicら、Nature、417巻:645～649頁(2002年))。これに対し、マウスにおける研究により、全てではないが大半のマウス皮質介在ニューロンは、皮質下領域に由来することが実証されている。Fogartyら、J Neurosci、27巻:10935～10946頁(2007年); Miyoshiら、J Neurosci、30巻:1582～1594頁(2010年); およびXuら、J Neurosci、24巻:2612～2622頁(2004年)。

【0274】

本開示の一部として、NKX2.1の発現は、CS15ヒト胚の腹側前脳内および背側前脳内に限局されることが裏付けられた。さらに、本明細書で提示されるデータは、hESC由来の皮質介在ニューロン前駆体細胞が、接線方向の遊走能を呈示することを裏付ける。

【0275】

マウス皮質介在ニューロン前駆体細胞とは対照的に、本開示の一部として、hESC由来の皮質介在ニューロンは、NKX2.1を持続的に発現させることが発見された(Marinら、J Soc Neurosci、20巻:6063～6076頁(2000年))。これらのデータは、ヒト新皮質における*in vivo*の知見であって、有糸分裂後NKX2.1+ニューロンの存在を明らかにした知見と符合する(Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻(9号):2196～2207頁(2009年))。しかし、線条体介在ニューロンは、NKX2.1の発現を保持しながら、マウスにおける皮質介在ニューロンのマーカーを共有するので、本明細書で提示されるデータは、本発明者らによるヒトESC由来細胞のサブセットが、線条体介在ニューロンに対応す

る可能性を排除しない (Marinら、J Soc Neurosci、20巻：6063～6076頁 (2000年))。

【0276】

精神障害および疾患を処置するための方法

他の実施形態では、本開示は、例えば、統合失調症および自閉症関連障害を含む、精神障害および疾患を処置するための方法を提供する。

【0277】

PD、ALS、またはSMAの場合と異なり、統合失調症または自閉症をモデル化するために極めて重要なニューロン型は、それほど十分には規定されておらず、これらの研究では、ニューロン亜型の独自性を方向付けるための試みもなされていない。ヒトESC由来の皮質投射ニューロンを導出するためのプロトコルの確立において、最近大きな進歩がなされている (Espuny-Camachoら、Neuron、77巻：440～456頁 (2013年)；およびShiら、Nat Neurosci、15巻：477～486、S471頁 (2012年))。

【0278】

しかし、皮質介在ニューロンなどの抑制性ニューロンは、統合失調症または自閉症において特に重要な役割を果たしうる (Insel、Nature、468巻：187～193頁 (2010年)；およびLewisら、Nat Rev Neurosci、6巻：312～324頁 (2005年))。本発明者らは依然に、Lhx6::GFPRポーターマウスESC細胞系を使用する皮質介在ニューロンの導出を実証した (Marooら、J Neurosci、30巻：4667～4675頁 (2010年))。しかし、皮質介在ニューロン発生の効率は低く、これらの条件を、ヒト皮質介在ニューロンをPSCから発生させるために適用しうるのかどうかは、不確定であった。ヒト皮質介在ニューロンの発生上の起源は、研究により議論が分かれることから、介在ニューロン特化は、哺乳動物の種間で著しく異なりうることを示唆されるので、in vitroにおけるヒト皮質介在ニューロンの発生のモデル化は、特に興味深い難題である (Letinicら、Nature、417巻：645～649頁 (2002年)；ならびにYuおよびZecovic、J Neurosci、31巻：2413～2420頁 (2011年))。さらに、複数の皮質介在ニューロン型の、長期間を要するin vivoにおける発生 (Andersonら、Neuroscience、67巻：7～22頁 (1995年)) は、in vitroにおいてヒト細胞を使用するそれらの分化のモデル化について、別の難題を表す。

【0279】

ヒト精神疾患をモデル化および処置するための現在のパラダイムは、患者特異的なiPSC由来ニューロンを利用する (Brennandら、Nature、473巻：221～225頁 (2011年)；Cheungら、Hum Mol Genet、20巻：2103～2115頁 (2011年)；Chiangら、Mol Psychiatry、16巻：358～360頁 (2011年)；Marchettoら、Cell、143巻：527～539頁 (2010年)；およびPascaraら、Nat Med、17巻：1657～1662頁 (2011年))。しかし、これらの公表された研究は、ニューロン亜型の独自性が不明であり、亜型特異的なシナプス特性および機能的特性の特徴付けが限定的である、混合神経細胞培養物中で実施された。統合失調症における介在ニューロン関連Erbb4受容体など、遺伝子欠損を、精神障害と関連させようとする試みでは、死後知見の集約が利用されている (Fazzariら、Nature、464巻：1376～1380頁 (2010年))。

【0280】

本明細書で開示される通り、本開示は、ヒト精神障害および疾患についてのモデルとして使用することが可能であり、このような精神障害および疾患を処置するための治療レジメンにおいても使用されうる成熟皮質介在ニューロンの精製された集団を提供する。さらに、本明細書で提示されるデータは、発生上の合図に対してのタイミングを計った曝露の

10

20

30

40

50

後における、皮質介在ニューロンの非常に効率の高い導出が可能であることを実証する。

【0281】

理論により束縛されることを望まないが、推定hESC由来GABA作動性介在ニューロンは、他のヒト介在ニューロンおよび興奮性マウス投射ニューロンからのシナプス入力を受容すると考えられる。皮質介在ニューロンの神経化学特性を呈示する細胞は、マウス皮質培養物上に播種して30日以内に、かなり成熟した生理学的特性を成立させる。マウス皮質培養物上におけるNKX2.1::GFP+ニューロンの、*in vitro*における成熟の加速機構は現在のところ知られていないが、本明細書で提示されるデータからは、種特異的なタイミング因子の関与が導出される。本明細書で開示されるデータは、シナプスが活性な皮質介在ニューロンは、*in vitro*において導出することができ、統合失調症および自閉症を含むがこれらに限定されない精神障害における皮質介在ニューロン病態をモデル化および処置するために有用でありうることをさらに実証する。

10

【0282】

統合失調症におけるPV介在ニューロンの機能不全の含意を踏まえると、これらの培養物における、hESC由来のPVを発現するニューロンの発生、およびスパイクングが比較的急速な非適応型ニューロンの存在は、特に興味深い(BeasleyおよびReynolds *Schizophrenia Res*, 24巻: 349~355頁(1997年); ならびにWooら、*Am J Psychiatry*, 154巻: 1013~1015頁(1997年))。急速スパイクングPV+皮質介在ニューロンは、霊長動物の出生前発生の後期において観察され、成年初期まで成熟し続ける(Andersonら、*Neuroscience*, 67巻: 7~22頁(1995年); およびInsel、*Nature*, 468巻: 187~193頁(2010年))。多様な病態下におけるPV+ニューロンの役割を踏まえると、本明細書で提示されるデータは、このような機能不全性ニューロン状態のモデル化、ならびに皮質介在ニューロンおよび/またはその前駆体細胞の投与によるこれらの機能不全性ニューロン状態の処置を支援する。

20

【0283】

したがって、これらの実施形態のある特定の態様では、本開示は、ソマトスタチン+およびPV+細胞などの濃縮された皮質介在ニューロン亜群の発生を提供する。MGE前駆細胞は、SHHシグナル伝達の制御下にある可能性があり、SHHシグナル伝達レベルが高ければ、ソマトスタチン+細胞の発生を促進し、SHHシグナル伝達レベルがより低ければ、PV+ニューロンの発生を促進する(Xuら、*Neuron*, 65巻: 328~340頁(2010年))。

30

【0284】

ニューロン組織を再生させるための方法

一部の実施形態では、本開示は、再生医療における適用のための、精製ヒト*in vitro*導出皮質介在ニューロンモデルを発生させるための方法を提供する。本明細書で提示されるデータは、新生仔マウス皮質への移植後における、hESC由来の皮質介在ニューロンの遊走能力を例示する。したがって、本開示で産生される皮質介在ニューロンおよびそれらの前駆体細胞は、再生医療において使用することができる。

【0285】

疾患についての複数の成体CNSモデルへの移植研究では、i) 病理学的発作活動をモジュレートすること(Barabanら、*Proc Natl Acad Sci USA*, 106巻: 15472~15477頁(2009年)); ii) パーキンソン病の態様を処置すること(Martinez-Cerdenoら、*Cell Stem Cell*, 6巻: 238~250頁(2010年)); およびiii) 生後脳内の学習および可塑性を誘導することにおいて、精製された皮質介在ニューロン移植片を使用することにより解決しうる問題が同定されている(Southwellら、*Science*, 327巻: 1145~1148頁(2010年))。以前に報告されている移植研究の1つの具体的な難題は、移植されたhPSC由来の皮質介在ニューロン前駆体細胞の*in vivo*における長期間を要する成熟である。長期にわたる成体マウス皮質への移植研究により、

40

50

移植の3カ月後において、未成熟な成長円錐を保持し、限定的な統合を示す（データは示さない）、NKX2.1+推定介在ニューロン前駆体細胞による緩徐な成熟速度が確認される。

【0286】

結果として、以前に報告されているデータは、迅速な機能的な統合および表現型の成熟をたやすく達成した、本明細書で開示される、*in vitro*における共培養研究と対照的である。一部の実施形態では、本開示は、発達の多様な態様を研究するのに使用される、異なる腹側前脳ニューロン型の発生のための枠組みを提供する。一実施形態では、枠組みは、多種多様な神経精神疾患に関与している特定のニューロン型の機能不全について研究するための *in vitro* プラットフォームを含む。

10

【0287】

ニューロン細胞およびその組成物の *in vivo* における投与

皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性 (*cholinergic*) ニューロンを含む、本開示のニューロン細胞は、細胞の移植を達成するための慣用的な手段により、*in vivo* において患者へと投与することができる。例えば、ニューロン細胞は、髄腔内注射などの注射により移植することができる。移植の適切な方法は、植え込まれたニューロン細胞の、中枢神経系の所望の領域へのホーミングおよび生着をモニタリングすることにより決定することができる。

【0288】

非自己細胞は、*in vivo* に投与されると免疫反応を誘導しうるので、非自己ニューロン細胞の拒絶の可能性を低減するための複数の手法を講じることができる。これらは、細胞の特権的な部位への投与、または、代替的に、レシピエントの免疫系の抑制、自己免疫性障害の発症を制御するのに示され得る抗炎症処置の提供、および／もしくは移植の前における、非自己／半自己細胞の、免疫隔離性の半透膜への封入を含む。封入法として、小型の球形ビヒクルを伴うマイクロカプセル化、およびより大きなフラットシートまたは中空繊維膜を伴うマクロカプセル化が挙げられる (Uludagら、*Adv Drug Deliv Rev*、42巻：29～64頁(2000年))。

20

【0289】

マイクロカプセルを調製するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Luら、*Biotechnol Bioeng*、70巻：479～83頁(2000年)；ChangおよびPrakash、*Mol Biotechnol*、17巻：249～60頁(2001年)；ならびにLuら、*J Microencapsul*、17巻：245～51頁(2000年)により開示されている方法を含む。例えば、マイクロカプセルは、改変コラーゲンを、2-ヒドロキシエチルメチルアクリレート (HEMA)、メタクリル酸 (MAA)、およびメチルメタクリレート (MMA) のターポリマーシェールと複合体化させ、2～5 μm のカプセル厚をもたらすことにより調製することができるが、負に帯電させた平滑表面を付与し、血漿タンパク質の吸着を最小化するために、これらのマイクロカプセルはさらに、さらなる2～5 μm のターポリマーシェールとともに封入することができる (Chiaら、*Biomaterials*、23巻：849～56頁(2002年))。

30

40

【0290】

他のマイクロカプセルは、アルギン酸、海洋性多糖、またはこれらの誘導体に基づく (Sambanis、*Diabetes Technol Ther*、5巻：665～8頁(2003年))。例えば、マイクロカプセルは、塩化カルシウムの存在下における、ポリアニオンである、アルギン酸ナトリウムおよびセルロース硫酸ナトリウムと、ポリカチオンである、ポリ(メチレン-*c*-*o*-*g*-アニジン) 塩酸塩との、高分子電解質複合体化により調製することができる。

【0291】

細胞の封入は、より小型のカプセルを使用する場合に改善されることが理解される。したがって、品質管理、力学的安定性、拡散特性、および封入された細胞の *in vitro*

50

o 活性は、カプセルサイズを1mm～400μmに縮減した場合に改善された（Canappleら、J Biomater Sci Polym Ed、13巻：783～96頁（2002年））。さらに、7nmの小ささまで十分に制御した小孔サイズ、調整した表面化学、精密なマイクロアーキテクチャーを有する、ナノ小孔バイオカプセルを利用して、移植中に細胞を免疫隔離することができる（Williams、Med Device Technol、10巻：6～9頁（1999年）；Desai、Expert Opin Biol Ther、2巻：633～46頁（2000年））。

【0292】

本明細書で開示されるニューロン細胞のin vivoにおける投与と併せて使用される免疫抑制剤の例として、メトトレキサート、シクロホスファミド、シクロスポリン、シクロスポリンA（cyclosporin A）、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン（スルファサラゾピリン）、金塩、D-ペニシラミン、レフルノミド、アザチオプリン、アナキンラ、インフリキシマブ（REMICADE（商標））、エタネルセプト、TNFアルファ遮断剤、炎症性サイトカインをターゲティングする生物学的薬剤、および非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）が挙げられるがこれらに限定されない。NSAIDの例として、アセチルサリチル酸、サリチル酸コリンマグネシウム、ジフルニサル、サリチル酸マグネシウム、サルサレート、サリチル酸ナトリウム、ジクロフェナク、エトドラク、フェノプロフェン、フルビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ケトロラック、メクロフェナメート、ナプロキセン、ナブメトン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、Cox-2阻害剤、およびトラマドールが挙げられるがこれらに限定されない。

【0293】

本開示のニューロン細胞集団は、培養培地から単離し、薬学的に許容される担体ならびに／あるいは細胞の生着および／もしくは機能性を促進する1つまたは複数のさらなる薬剤（例えば、免疫抑制剤および抗生剤）と組み合わせることができる。このようなニューロン細胞集団は、滅菌生理食塩水および水性緩衝液など、薬学的に許容される担体または希釈剤中で、in vivoに投与することができる。当技術分野では、このような担体および希釈剤の使用が周知である。

【0294】

本開示のニューロン細胞組成物は、所望の場合、ニューロン細胞を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有しうる、FDAで承認されたキットなど、パックまたはディスペンサーデバイス中で提示することができる。パックは、例えば、ブリスターパックなど、金属箔またはプラスチックフォイルを含みうる。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための指示書を添付することができる。パックまたはディスペンサーデバイスにはまた、医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関により規定された形式の通知であって、ヒトまたは動物への投与のための組成物の形態についての規制機関による承認を反映する通知も添付することができる。このような通知は、例えば、米国食品医薬品局により承認された処方薬のための表示または承認された製品添付文書を含みうる。

【0295】

薬学的に許容される担体中に製剤化したニューロン細胞の調製物を含む組成物もまた調製し、適切な容器内に入れて、上記でさらに詳述した通りの適応状態の処置について表示することができる。本開示の方法に従い調製された細胞は、患者へと直接投与してもよく、スキャホールドに播種してもよく、かつ／また細胞を適切な担体または賦形剤と混合して医薬組成物中に製剤化してもよい。

【0296】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」とは、生理学的に適切な担体および賦形剤など、他の化学的成分を伴う、本明細書で記載されるニューロン細胞のうちの1つまたは複数の調製物を指す。医薬組成物の目的は、ニューロン細胞の患者へのin vivoにおける投与を容易にすることである。

【0297】

本明細書で使用される場合、「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句は、互換的に使用され、患者に重大な刺激を引き起こさず、投与された細胞の生物学的活性および特性を無効化しない、担体または希釈剤を指す。「佐剤」という用語は、「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句により包摂される。

【0298】

本明細書で使用される場合、「賦形剤」という用語は、医薬組成物へと添加されて、ニューロン細胞の投与をさらに容易とする不活性の物質を指す。適切な賦形剤の例として、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、多様な糖および各種のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ならびにポリエチレングリコールが挙げられる。

10

【0299】

ニューロン細胞の製剤化および投与のための技法は、参照により本明細書に組み込まれる、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、(Mack Publishing Co.、Easton、PA)内に見出すことができる。

【0300】

*in vivo*への投与のための適切な経路は、処置される疾患または障害に依存し、例えば、髄腔内注射、静脈内注射、または腹腔内注射でありうる。代替的に、医薬組成物は、例えば、医薬組成物の、患者の脊柱および／または脳を含む、中枢神経系の組織領域など、所望の組織領域への直接的な注射により、全身投与することもできる。

20

【0301】

本開示に従う使用のための医薬組成物は、ニューロン細胞を、薬学的に使用されうる調製物に加工するのを容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体を使用して、慣用的な方式で製剤化することができる。適正な処方物は、所望の投与経路に依存する。

【0302】

注射のために、医薬組成物のニューロン細胞は、水溶液中、好ましくはハanks液、リンゲル液、および／または生理的な塩の緩衝液など、生理学的に適合性の緩衝液中で製剤化することができる。血液脳関門など、透過すべき障壁に適切な浸透剤を、処方物中使用することができる。当技術分野では、このような浸透剤は周知であり、たやすく入手可能である。

30

【0303】

本開示の文脈における使用のために適切な医薬組成物として、ニューロン細胞が、意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物が挙げられる。より具体的に、「治療有効量」とは、本明細書で論じられる通りの、神経変性疾患、神経精神疾患、もしくは他の神経学的疾患などの、神経学的障害もしくは疾患の症状を防止、緩和、もしくは改善し、かつ／または処置される患者の生存を延長するのに有効なニューロン細胞の量を意味する。治療有効量の決定は、とりわけ、本明細書で提供される詳細な開示に照らせば、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【0304】

本開示の方法において使用される任意の調製物について、投与量または治療有効量は、*in vitro*における細胞培養アッセイから推定することができる。例えば、用量は、動物モデルにおいて、所望の濃度を達成するように処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

40

【0305】

本明細書で記載されるニューロン細胞の毒性および治療有効性は、標準的な薬学的手順により、*in vitro*または実験動物において決定することができる。これらの *in vitro*における細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ある範囲の投与量をヒトにおける使用のために製剤化する際に使用することができる。投与量は、援用される剤形および活用される投与経路に応じて変動しうる。正確な処方物、投与経路

50

、および投与量は、個別の医師が、患者の状態に照らして選択することができる（Finglerら、「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、1章、1部（1975年））。

【0306】

処置すべき神経学的疾患または障害の重症度および応答性に応じて、投与は、単回投与の場合もあり、複数回投与の場合もあり、処置コースは、数日間～数週間にわたり持続するか、あるいは治癒が施される、または障害もしくは疾患状態の減退が達成されるまで持続する。投与すべき組成物の量は、当然ながら、処置される患者、罹患の重症度、投与方式、および処方医の判断に依存する。本明細書で使用される場合、「方法」という用語は、化学技術分野、薬学技術分野、生物学技術分野、生化学技術分野、および医療技術分野の従事者に公知であるか、または彼らによって公知の方式、手段、技法、および手順からたやすく開発される方式、手段、技法、および手順を含むがこれらに限定されない、所与の課題を達成するための方式、手段、技法、および手順を指す。

10

【0307】

本明細書で使用される場合、「処置すること」という用語は、状態を失効化させること、状態を実質的に阻害すること、状態の進行を緩徐化すること、もしくは状態の進行を逆転させること、状態の臨床的もしくは美容的症状を実質的に改善すること、または状態の臨床的もしくは美容的症状の出現を実質的に防止することを含む。

【実施例】

【0308】

20

（実施例1）

SMA Dシグナル伝達の阻害とWntシグナル伝達の阻害との組合せによる、前脳神経前駆細胞の誘導

本実施例では、神経前駆細胞の発生を、SMA DおよびWntシグナル伝達の阻害と、SHHシグナル伝達の活性化との組合せにより、達成しうることが実証される。

【0309】

皮質介在ニューロンの発達および他のニューロン細胞のモデル化における最初のステップは、前脳型神経前駆細胞の頑健な誘導である。前方／前脳運命の特化は、hPSCの神経分化中におけるデフォルトのプログラムであると考えられる（Chambersら、Nat Biotechnol、27巻：275～280頁（2009年）；Eirakuら、Cell Stem Cell、3巻：519～532頁（2008年）；Espuny-Camachoら、Neuron、77巻：440～456頁（2013年）；Gaspardら、Nature、455巻：351～357頁（2008年））。しかし、全ての細胞系が、神経および前方運命を、同等の効率で成立させるわけではない（Kimら、Cell Stem Cell、8巻：695～706頁（2011年）；およびWuら、Proc Natl Acad Sci USA、104巻：13821～13826頁（2007年））。線維芽細胞増殖因子（FGF）、Wnt、またはレチノイドなどの分化培養物中で分泌されるパターン化因子は、前脳の誘導を抑制し、尾側の細胞運命の誘導を誘発しうる。本発明者らは最近、早期における高用量のSHH処理も、hESC由来のフロアプレート様細胞の導出を結果としてもたらすDKK1の誘導の阻害を介して、FOXG1などの前脳マーカーを抑制することについて報告した（Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻：336～347頁（2010年））。これは、NKX2.1+前駆細胞段階において強力なSHH活性化が必要であると考えられる皮質介在ニューロンの導出に関する懸念である（Xuら、J Neurosci、24巻：2612～2622頁（2004年）；およびXuら、Neuron、65巻：328～340頁（2010年））。本実施例において、本発明者らは、WNTシグナル伝達の薬学的阻害は、FOXG1の誘導を改善することが可能であり、その後、NKX2.1+前脳前駆細胞運命への制御されたSHH媒介腹側化を可能とするのかどうかについて調べた。図1A。

30

40

【0310】

50

ヒトESC（細胞系WA-09、HES-3（NKX2.1::GFP）およびiPS細胞（C72、SeV6）を、以前に記載されている通りに、マウス胚性線維芽細胞（MEF）上で維持し、分化のためにAccutase（Innovative Cell Technologies）または継代培養のためにDispaseで解離させた（Chambersら、Nat Biotechnol、27巻：275～280頁（2009年））。分化のために使用した培地は、既に記載されている（Kriksら、Nature、480巻：547～551頁（2011年））通り、KSR培地、N2培地（NaHCO₃、N2Bサプリメント（Stem Cell Technologies）を含むDMEM/F12）、ならびにB27（Gibco）およびN2サプリメント（Invitrogen）を含むNeurobasal培地を含んだ。使用した低分子化合物は、XAV939（2μM；Stemgent）、LDN193189（100nM；Stemgent）、SB431542（10μM；Tocris）、およびプルモルファミン（1～2μM；Calbiochem）、アスコルビン酸（200μM）、およびジブチリル環状AMP（dbcAMP、200μM；いずれもSigma製）を含んだ。組換え増殖因子：SHH（C25II；50～500ng/ml）、ノギン（125ng/ml）、DKK1（250ng/ml）、およびBDNF（10ng/ml）は、R&D Systemsから購入し、またはFGF2（10ng/ml）についてはPromegaから購入し、手稿に表示の濃度で使用した。

【0311】

皮質フィーダー細胞培養物は、以前に記載されている通り（Xuら、Neuron、65巻：328～340頁（2010年））に、背側皮質を、E13.5マウス脳の250μm冠状薄片から解離させることにより調製し、培養した。ヒト皮質フィーダー調製物のために、8～10日目において、SHHアンタゴニストであるシクロパミン（cyclopamine）（5μM）を添加して、細胞を、XLSBが媒介する神経誘導に供した。18日目において、細胞を、Accutaseで解離させ、再播種した（80,000～100,000細胞/cm²）。32日目において、FACSを使用して、CD44-FITC陰性（Abcam）、CD24-PE陽性（BD Pharmingen）、およびCD184-APC陽性（R&D Systems）である細胞（Yuanら、PLoS One、6巻：7540頁（2011年））を精製した。次いで、さらなる研究のために、精製した細胞を、20,000細胞/cm²で、マトリゲルでコーティングされたウェル上に播種した。NKX2.1::GFP+細胞を、4,000細胞/cm²で、4～7日間前に調製した皮質フィーダー培養物上に播種した。細胞が70～80%コンフルエントに到達した、共培養の5～7日後、有糸分裂阻害剤であるマイトマイシンC（1μM；Sigma）を、培養物へと、2時間にわたり添加し、その後、新鮮な培地で置きかえた。

【0312】

培養物を、リン酸緩衝生理食塩液中の4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡法のために処理した。一次抗体を検出するために使用した二次抗体は、種特異的なAlexa色素コンジュゲート（Invitrogen）であった。一次抗体について、本発明者らは、ウサギFOXG1（Eseng Laiからの贈呈）；マウスPAX6（DSHB）；マウスNKX2.1（Labvision）；ヤギNKX2.1（C-20、Santa Cruz）；ウサギOLIG2（Chemicon）；ヤギFOXA2（Santa Cruz）；ウサギLHX6（Abcam）；マウスRAX（Abnova）；ウサギGAPDH（Thermo Scientific）；ヤギDCX（Santa Cruz）；マウスTUJ1（Covance）；ウサギGABA（Sigma）；マウスネスチン（Thermo Scientific）；ウサギKI67（Labvision）；マウスKI67（Dako）；ウサギカルビンディン（Chemicon）；マウスカルレチニン（Swant）；ニワトリGFP（Abcam）；ヤギChat（Chemicon）；ラットソマトスタチン（Chemicon）；マウスTH（Abcam）；ウサギNOS（Swant）；マウスパルプアルブミン（Che

m i c o n) ; マウス P S D - 9 5 (Z y m e d) ; モルモット V G L U T 1 (S y n a p t i c s y s t e m s) ; ウサギ V G A T (S y n a p t i c s y s t e m s) ; およびマウスグフィリン (S y n a p t i c S y s t e m s) に対する抗体を使用した。

【0313】

F O X G 1 および P A X 6 の定量化：20倍の対物レンズを使用して、25の視野を、3つのウェルおよび4つの独立の分化試験からイメージングした。D A P I + 核の数を分母として使用し、F O X G 1 + 核または P A X 6 + 核のいずれかを分子に使用した。N K X 2 . 1 : : G F P の共標識：20倍の対物レンズを使用して、25～30の視野を、4つの独立の分化物に由来する4つのウェルからイメージングした。N K X 2 . 1 : : G F P + 細胞の数を分母として使用し、分子は解析する各マーカーを選択した。各マーカーの対照として、一次抗体の非存在下における二次抗体を、シグナルの特異性を示すための陰性対照として使用した。

10

【0314】

全ての実験について、解析は、少なくとも3つの独立の実験から導出した。統計学的解析は、ANOVAの後でダネット検定を使用して実施して、あらかじめ規定した対照条件と比較した場合の、処理の影響を定量化した。

【0315】

ノギン+ S B 4 3 1 5 4 2 (N S B) を使用した、二重 S M A D 阻害プロトコール (C h a m b e r s ら、N a t B i o t e c h n o l、27巻：275～280頁(2009年)) を介する、h E S C の神経分化により、F O X G 1 + / P A X 6 + 前駆体細胞が頑健に誘導された。前方神経前駆細胞を発生させるための、二重 S M A D 阻害パラダイムにおける分化プロトコールを図1Aに示す (N S B : ノギン+ S B 4 3 1 5 4 2 ; L S B : L D N 1 9 3 1 8 9 + S B 3 1 5 4 2 である)。ノギンを、A L K 2 / 3 阻害剤である L D N - 1 9 3 1 8 9 (L S B) で置きかえても、P A X 6 発現は同等に良好であったが、F O X G 1 を発現する細胞の百分率は低減する傾向を示した (図1Bおよび1C ; * * p < 0 . 0 1 ; * * * p < 0 . 0 0 1、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用)。組換え D K K 1 つまたはタンキラーゼ阻害剤である X A V 9 3 9 を添加する (H u a n g ら、N a t u r e、461巻：614～620頁(2009年))。標準的なWntシグナル伝達の強力な阻害剤の両方が、L S B で処理した培養物における F O X G 1 発現を大幅に増強した。図1B～1D。

20

30

【0316】

図1Dは、X L S B 処理の後10日目における、F O X G 1 および P A X 6 発現についての代表的な免疫蛍光画像を示す図である。X A V 9 3 9 の、F O X G 1 誘導に対する効果が、複数の独立の h E S C 細胞系 (H E S - 3 および W A - 0 9) およびヒト i P S C 細胞系 (C 7 2 細胞系 (P a p a p e t r o u ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、106巻：12759～12764頁(2009年))、S e V 6 (K r i k s ら、N a t u r e、480巻：547～551頁(2011年)) にわたり一貫した (図1E) ことは、重要なことである。図1Eは、X L S B を使用する、頑健な終脳特化が、ヒト人工多能性幹細胞 (h i P S C 細胞系である S e V 6、C 7 2 ; n = 4) において、同等な効率で達成されたことを実証する。3つの低分子 (X A V 9 3 9、L D N - 1 9 3 1 8 9、および S B 4 3 1 5 4 2 ; これらを集散的に X L S B と言及する) を使用することにより、前脳運命の迅速で頑健な誘導が、ヒト E S C およびヒト i P S C にわたり可能となる。

40

【0317】

S H H 活性化因子の存在下における X L S B による腹側運命の誘導について調べた (図1A)。図1F～1Hは、S H H シグナル伝達を、X L S B プロトコールへと追加することにより、N K X 2 . 1 : : G F P を発現する前駆細胞の産生が有意に増強されたことを示す。既に確立された N K X 2 . 1 : : G F P ノックインレポーター h E S C 細胞系 (G o u l b u r n ら、S t e m C e l l s、29巻：462～473頁(2011年))

50

を使用したところ、GFPの誘導が、組換えSHH (R&D Systems、C-25 I I) およびsmoothenedの活性化因子であるプルモルファミンによるSHH経路の活性化後の10日目までに観察された(図1F)。NKX2.1::GFPの最大の誘導は、1μMのプルモルファミンおよび5nMのSHHによる処理(本明細書では「SHH」と言及する)の18日目において見出された(図1G)。

【0318】

図1Fに提示するデータは、4日目から添加した5nMのSHH (Sonic C24 I I) および1μMのプルモルファミンにより、10日目に、NKX2.1::GFP産生の誘導における相乗効果が呈示されたことを実証する(*** $p < 0.001$ 、SHHと比較)。18日目におけるSHHおよびプルモルファミンの濃度範囲を、図1Gにおいて比較した。共処置は、極めて高い濃度のSHH単独またはプルモルファミン単独に対して非常に優位であった(*** $p < 0.001$ 、SHHなしの場合と比較、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用)。図1Hは、SHH曝露のタイミングを、分化の約2日後から約10日後に遅延させることは、18日目において測定したNKX2.1::GFPの誘導の効率に劇的な影響を及ぼさなかったことを実証する(*** $p < 0.001$ 、0~18と比較、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用。P: プルモルファミン、S: ソニックヘッジホッグ)。転写因子であるNKX2.1は、腹側前脳前駆細胞集団のマーカーである(Sussellら、Development、126巻: 3359~3370頁(1999年); およびXuら、J Neurosci、24巻: 2612~2622頁(2004年))。

【0319】

本実施例で提示されるデータにより、組換えDKK1などのWNT活性の阻害剤を使用して、マウスおよびヒトESCの分化の間の終脳前駆細胞および視神経前駆細胞の発生を誘導しうることが確認される(Lambaら、Proc Natl Acad Sci USA、103巻: 12769~12774頁(2006年); Meyerら、Stem Cells、29巻: 1206~1218頁(2011年); およびWatanabeら、Nat Neurosci、8巻: 288~296頁(2005年))。

【0320】

さらに、本明細書で実証される通り、二重SMAD阻害プロトコールにおいて、タンキラーゼ阻害剤であるXAV939 (Huangら、Nature、461巻: 614~620頁(2009年))で、組換えDKK1を置きかえることができる。3つの低分子(すなわち、XLSB)の使用により、複数の細胞系における頑健な誘導が結果としてもたらされる。本開示の一部として、XLSBは、皮質介在ニューロンの発生のほか、広範にわたる他の前脳細胞型を誘導するために利用すると有利でありうるということが裏付けられた。

【0321】

hESC由来のフロアプレート細胞の導出についての先行研究により、SHHによる早期処理(分化の1日目)は、FOXA2の効率的な誘導のために極めて重要であることが実証された(Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻: 336~347頁(2010年))。本明細書で開示される通り、分化後期において(XLSBプロトコールの10日目)SHHへと曝露した細胞は、FACSにより測定する場合、NKX2.1::GFPを誘導するのにコンピテントなままであった。図1H。したがって、XLSBとSHHとを組み合わせ、NKX2.1+前駆細胞の高効率の発生を誘導することができる。

【0322】

(実施例2)

SHH活性化のタイミングを変化させることによる、異なる腹側前駆細胞集団の誘導

本実施例では、ニューロン細胞のSHH活性化のタイミングを変化させることにより、異なる腹側前駆細胞集団を発生させることが実証される。

【0323】

実施例1により、NKX2.1の効率的な誘導は、大部分がSHH曝露のタイミングと

は独立であることから、タイミングが、発生するNKX2.1+神経前駆細胞の亜型に影響を及ぼすのかどうかという疑問が提起された。齧歯動物の場合と同様、NKX2.1は、FOXG1+終脳内ならびにFOXG1陰性腹側間脳内のいずれにおいても、ヒトの早期神経発生時に発現する。図2Aは、公表されたデータに基づく前脳パターン化マーカーの発現とともに、ヒト前脳のモデル（カーネギー発生段階14（CS14）における矢状面図）を示す図である（Kerwinら、J Anat、217巻：289～299頁（2010年）；ならびにRakicおよびZecevic、Cereb Cortex、13巻：1072～1083頁（2003年））。マウス胚発生中において、終脳（FOXG1+）内のNKX2.1の発現は、腹側（皮質下）ドメインに局限される。これに対し、ヒト胎児組織における報告により、NKX2.1は、腹側前脳に局限されず、そうではなくて、背側前脳および皮質原基へと拡大する可能性があることが示唆された（RakicおよびZecevic、Cereb Cortex、13巻：1072～1083頁（2003年）；ならびにYuおよびZecevic、J Neurosci、31巻：2413～2420頁（2011年））。しかし、これらの研究は大部分、妊娠中期のヒト胎児についての解析に基づいていた（Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻（9号）：2196～2207頁（2009年））。これは、NKX2.1+細胞が背側前脳内で実際に誘導されたのか、腹側ドメイン内での誘導の後で背側に遊走したのかを弁別することを困難とする。

10

【0324】

初期ヒト胚（カーネギー発生段階15；受胎の約38日後）において免疫細胞化学解析を実施することにより、本発明者らは、発生しつつあるマウスCNSと同等な、NKX2.1の発現の腹側前脳への局限を観察した（図2B～2E）。図2B～2Eは、カーネギー発生段階15（CS15）におけるヒト前脳の冠状（斜方）半断面により、NKX2.1、OLIG2、およびPAX6の発現が実証されることを示す。NKX2.1およびOLIG2が、腹側前脳全体にわたる多様な領域内で発現するのに対し、PAX6は、背側前脳および眼に局限される。これらのタンパク質の発現は、OLIG2とNKX2.1とが共発現される神経節隆起内（図2C）を除いて重なり合わない。図2Bのスケールバーは、200μmを表す。ヒト胚腹側前脳内のNKX2.1ドメインを、OLIG2+神経節隆起と、OLIG2陰性視索前野領域原基とにさらに細分した（図2C、2D）。本実施例についての分化パラダイムを、図2Fに示す。

20

30

【0325】

中絶されたヒト胎児に由来する組織は、Department of Gynecology、University Bern、Switzerlandから得た。研究は、The Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Bern、SwitzerlandおよびThe Ethics Committee of the State Bern、Switzerlandにより承認された（第52／91号、第71／94号、第188／95号）。説明同意文書は、中絶を望む女性により提出された。

【0326】

全ての細胞は、Accutase（Stem cell technologies）を30分間にわたり使用して解離させ、次いで、Y27632（10μM；Tocris）を含むNeurobasal／B27中に再懸濁させ、BD FACS Aria II（生細胞についてのSSCゲーティング／FSCゲーティング／DAPI陰性除外ゲーティング）でソートした。ソート後解析のために、データは、FlowJo（TreeStar）ソフトウェアを使用して加工した。

40

【0327】

全RNAを、分化18日目において、FACSによりソートしたNKX2.1::GFP+細胞であって、3つの異なる分化条件に由来する細胞、およびGFPを発現するいずれの細胞も含有しない「SHHなし」条件に由来する細胞（Trizol、Sigma）から単離した。3回反復の各群試料を、Illuminaビーズアレイ（Illumin

50

a HT-12)のために、製造元の指定に従い、MSKCC Genomics Core facilityにより、加工した。

【0328】

in vitroにおけるSHH曝露のタイミングが、結果として得られるhPSC由来のNKX2.1::GFP+細胞の領域的独自性に影響を及ぼすのかどうかについて取り組むため、ソートした細胞の独自性を、2~18日目、6~18日目、または10~18日目いずれかのSHH処理の後の分化18日目において観察した(図2F)。早期SHH曝露(2~18日間)が、NKX2.1::GFPの頑健な誘導にも拘らず、FOXG1の誘導を抑制した(図2G、左パネル)ことは、フロアプレートの誘導についてのかつての結果(Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻:336~347頁(2010年))と符合する。図1Hを参照されたい。分化18日目におけるNKX2.1::GFP系におけるOLIG2およびFOXG1についての免疫蛍光を、図2Gおよび2Hに提示する。

【0329】

図2Hで定量化される通り、6日目以後におけるSHHによる処理(6~18および10~18群)は、FOXG1を共発現するNKX2.1::GFP+細胞の百分率を有意に増大させる。10日目以後におけるSHHによる処理(10~18群)は、OLIG2を共発現させるNKX2.1::GFP+細胞の導出を増強した(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$ 、2~18と比較、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用)。FOXG1、NKX2.1およびOLIG2の発現は、神経節隆起に特徴的なパターンを示す(Tekki-Kessarisら、Development、128巻:2545~2554頁(2001年))。これに対し、6~18および10~18処理群のいずれも、FOXG1の発現を示したが、OLIG2の発現は異なった(図2G、中パネルおよび右パネル)。本発明者らは、FOXG1とOLIG2との示差的な発現が、初期ヒト発生中に観察される異なるNKX2.1+前駆体細胞ドメインを反映し(図2A~2E)、マウス前脳の発生中におけるOlig2+ドメインを模倣すると仮定する(Flamesら、J Neurosci、27巻:9682~9695頁(2007年))。6~18および10~18プロトコルにおけるNKX2.1::GFP+細胞のうちの90%超はFOXG1を共発現し、10~18プロトコルにおけるGFP+細胞のうちのほぼ80%はOLIG2を共発現した。図2H。

【0330】

SHH曝露のタイミングの、特定の腹側前駆体細胞集団の導出に対する影響について、グローバルトランスクリプトーム解析によりさらに検討した(図2I~2K、全ての生データは、GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>: 受託番号ペンディングにおいて入手可能である)。図2I~2Kは、分化18日目にNKX2.1::GFPの発現についてソートした細胞からのマイクロアレイデータを示し、遺伝子発現レベルを、10~18日目SHHプロトコルとSHHなしの場合との間(図2I)、10~18日目プロトコルと2~18日目プロトコルとの間(図2J)、および10~18日目プロトコルと6~18プロトコルとの間(図2K)で比較する。赤色バーは、SHH 10~18プロトコルにおいてより高レベルで発現された遺伝子を示し、青色バーは、10~18日目プロトコルにおいてより低レベルで発現された遺伝子を示す。全ての変化は、 $p < 0.001$ で有意である(さらなる詳細を参照されたい)。

【0331】

10~18日目培養物を、非処理培養物(SHHなし)と対比する直接的な比較により、EMX2およびPAX6などの背側前脳マーカーを犠牲にして誘導されたNKX2.1、NKX2.2、ASCL1、SIX6、OLIG2、およびNKX6.2など、腹側特化マーカーの頑健な誘導が確認された(図2I)。FOXG1およびOTX2など、一般的な前脳マーカーの発現には、差異が見られなかった(図2I)ことから、いずれの集団も、前脳の独自性を有するという考えが支援される。10~18日目処理培養物の、2~

18日目処理培養物との比較(図2J)により、FOXG1など、前脳マーカーの発現の、RAXなど、間脳マーカーと対比した差異が例示された。これに対し、6~18日目処理培養物と対比された10~18日目処理培養物が示す前脳マーカー発現の差異は、それほど顕著ではなかった(図2K)。全体的に、本発明者らのデータは、SHH処理の時期が、hPSC由来のNKX2.1前駆体細胞の領域的独自性に有意に影響を及ぼすことを実証する。

【0332】

遺伝子発現データからの1つの驚くべき知見は、10~18日目群を含む、全てのSHH処理培養物におけるFOX A2の誘導であった(図2I)。補足図1(図3)は、FOX A2が、hPSC由来のNKX2.1+系統およびヒト神経節隆起において一過性に発現されることを示す。図3Aは、18日目において、分化したNKX2.1::GFP発現細胞をソートし、次いで、SHHシグナル伝達の非存在下で、さらに2週間にわたり細胞を培養した後におけるFOX A2発現の時間経過を示す。FOX A2との共標識の百分率は、2週間の経過にわたり低下する。図3Bは、10~18日目処理培養物についての、代表的な免疫細胞化学画像を示す。分化18日目におけるFOXG1の発現ならびにFOX A2およびGFPの共発現である。図3Cは、FOXG1(赤色)、NKX2.1(緑色)、およびFOX A2の発現を示す、発生しつつあるマウス脳の胚生11.5日目における冠状切片を示す(D'Amatoら、Proc Natl Acad Sci U S A、84巻:4322~4326頁(1987年))。間脳(Di)においてFOXG1の発現は見られず、終脳(Tel)においてFOX A2発現は見られない。

【0333】

NKX2.1は、内側神経節隆起(MGE)および視床下部(HYPO)において発現されるが、フロアプレート(FP)において発現されず、FOX A2と共標識されない。図3Dは、免疫組織化学解析のために切片化されたカーネギー発生段階15(CS15;妊娠約5.5週)のヒト胚を示す。E、F)FOX A2およびNKX2.1の発現を実証するヒトCS15前脳の隣接する冠状(斜方)半断面である。FOX A2が、神経節隆起において特異的に発現されると認められる(図3E)のに対し、NKX2.1は、腹側前脳の多様な領域において発現される(図3F)。図3は、ヒトとマウスとの間のFOX A2発現の差異を実証し、腹側前脳においてNKX2.1前駆細胞を発生させる代替的機構を示唆する。しかし、*in vitro*で示される通り(図3A)、かつ、後期ヒト胚についての*in situ*ハイブリダイゼーション解析により示唆される通り(Allen Brain Atlas、<http://human.brain-map.org/>)、これらのNKX2.1細胞におけるFOX A2発現は、一過性でありうる。

【0334】

こうして、大部分が発生しつつあるCNS内のフロアプレートに局限されると考えられるマーカーであるFOX A2の発現が、分化18日目に、3つのSHH処理パラダイム全てのNKX2.1::GFP+細胞において確認された(図3Aおよび3B)。FOX A2発現が、SHHシグナル伝達の強力な外因性の活性化の後における*in vitro*のアーチファクトを表しうるのであるかどうか、またはFOX A2発現が、*in vivo*における発生中に終脳において生じているのかどうかについて取り組むため、本発明者らは、発生しつつあるマウスおよびヒト前脳において組織学的解析を実施した。マウス胚(E11.5)において、マウス前脳におけるFOX A2発現は、FOXG1およびNKX2.1ドメインから隔離されていた(図3C)。しかし、一次ヒト前脳組織(CS15胚)におけるFOX A2についての免疫組織化学解析により、終脳NKX2.1+神経節隆起原基における発現が確認された(図3D~3F)。これらのデータは、少なくとも一過性のFOX A2発現が、ヒト腹側前脳の発生中に生じることを示唆し、これは、*in vitro*におけるhPSC分化データと符合する。

【表 S 1】

表S1
示差的に発現された転写物の倍数変化および有意性

10～18日目 対 SHHなし			10～18日目 対 2～18日目			10～18日目 対 6～18日目		
プローブ セット	倍数変化	p値	プローブ セット	倍数変化	p値	プローブ セット	倍数変化	p値
SIX6	7.88	6.35E-09	ZIC2	9.25	1.56E-09	SOX21	3.14	3.37E-07
NKX2-1	6.92	3.49E-10	FOXG1	8.70	6.70E-05	SP8	2.81	1.40E-08
LIPA	6.47	8.53E-09	PCSK5	3.39	3.35E-05	PCDH19	2.65	2.29E-06
IFIT1	5.73	5.21E-09	ZIC3	3.19	2.25E-04	FOXG1	2.39	6.69E-05
SNORD3A	5.37	4.69E-07	NDP	3.12	2.76E-04	OTX2	2.38	5.20E-08
OLIG1	4.70	2.51E-07	WNT5B	2.66	2.90E-04	C14ORF23	2.37	5.84E-06
NKX2-2	4.62	8.69E-09	PLCH1	2.56	1.52E-05	SHISA2	2.36	6.36E-05
PTCH1	3.98	2.07E-06	KCNK12	2.54	2.74E-04	PCSK5	2.19	1.67E-05
OLIG2	3.90	1.15E-05	CDH11	2.44	4.13E-05	MYCN	2.19	1.14E-05
NKX2-2	3.74	2.12E-07	MYCN	2.41	2.16E-06	FRZB	2.12	6.43E-05
HES1	3.46	2.42E-09	REC8	2.08	1.04E-04	DOCK11	2.11	2.29E-04
ASCL1	3.00	1.42E-06	HCRT	2.08	3.20E-04	FOXO1	2.08	1.74E-04
FOXA2	2.63	6.86E-07	LMO2	2.06	2.05E-05	ALCAM	2.03	3.61E-04
SEMA3A	-2.00	4.75E-04	KLF6	-2.21	4.29E-06	DCX	-2.11	2.73E-04
SEMA3C	-2.14	4.49E-06	EFNB2	-2.24	2.35E-04	CHRNA3	-2.69	2.69E-06
MEIS1	-2.14	1.05E-04	APOE	-2.41	8.27E-05	GAP43	-2.96	5.08E-06
DLX5	-2.22	2.04E-05	RAX	-2.57	2.70E-05	CTGF	-3.06	1.94E-05
NR2F2	-2.64	2.63E-06	LAMB1	-2.64	1.10E-05	ANKRD1	-3.60	1.35E-06
EVH1	-2.68	3.30E-06	GAP43	-2.76	2.45E-04	POU3F1	-3.70	3.79E-07
PDGFC	-2.80	4.38E-06	CTGF	-4.43	9.83E-07	SYT4	-4.35	4.97E-08
DCT	-3.52	9.43E-11	ANKRD1	-4.46	1.28E-07	GRP	-4.59	4.02E-08
PAX6	-4.64	2.32E-08	HEY1	-4.48	2.55E-04	EMP1	-4.68	5.10E-06
GAS1	-5.43	9.25E-08	LEFTY2	-4.67	2.27E-06	NKX2-2	-4.74	7.66E-09
CCL2	-5.85	7.78E-08	EPCAM	-4.93	6.11E-05	STMN2	-5.50	2.16E-09
EMX2	-6.08	1.00E-10	COL1A1	-4.98	4.33E-08	VGF	-5.86	1.97E-09
ALDH1A1	-8.99	9.36E-11	EMP1	-6.14	8.08E-06	MMP7	-6.62	4.37E-09

【0335】

*in vitro*における腹側前脳特化中のSHH投与量の重要性は、hESC由来の神経上皮前駆細胞を、GSX2陽性でNKX2.1陰性の前駆細胞であって、中型有棘線条体投射ニューロンを発生させるように誘導されうる前駆細胞へと方向付けるために、中程度のSHHレベルを使用することにより実証された(Maら、Cell Stem Cell、10巻：455～464頁(2012年))。皮質投射ニューロンマーカーとして、PAX6、TBR2、TBR1、SATB2、CTIP2、VGLUT1、FEZF2、SF6C、およびグルタミン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0336】

hESCベースのフロアプレートの誘導について以前に実証された通り、SHH用量に加えて、SHH処理のタイミングもまた、腹側細胞運命への特化の効率に影響を及ぼしうる(Fasanoら、Cell Stem Cell、6巻：336～347頁(2010年))。SHH活性化のタイミングの差異だけで、前方-後方独自性が多様である、異なる腹側前駆細胞の発生を誘発するのに十分であることは、注目すべきことである。視床下部原基のマーカーを発現するhESC由来の前駆細胞の導出は、FGF8の存在下における、SHHシグナル伝達の早期の活性化の後で報告されている(Kriksら、Nature、480巻：547～551頁(2011年))。

【0337】

本明細書で開示される、2～18日目プロトコルのデータは、これらの知見を拡張し、FGF8の添加が視床下部前駆細胞運命を方向付けるためにそれほど重要ではないこと

を示唆する。6～18日目群から導出されるNKX2.1::GFP+前駆細胞において観察される、主要なコリン作動性ニューロンの運命は、認知機能の喪失と関連する障害のモデル化および処置のために援用することができる。例えば、アルツハイマー病では、前脳基底部分コリン作動性ニューロンは、疾患の初期において、ニューロンの中で最も損傷を受けやすい(Whitehouseら、Science、215巻:1237～1239頁(1982年))。

【0338】

本明細書で開示される通り、NKX2.1::GFPレポーターhESC細胞系(Goulburnら、Stem Cells、29巻:462～473頁(2011年))の使用により、6日目またはこれより後にSHH処理を開始する場合の、プロトコルの最適化、およびほぼ全てのhESC後代細胞の、FOXG1+/NKX2.1+腹側前脳運命への効率的な変換が可能となった。

【0339】

本明細書で提示されるデータは、SHH活性化のタイミングを利用して、ニューロン細胞から発生させた、NKX2.1+神経前駆細胞の重型を制御しうることを実証する。NKX2.1は、ヒトFOXG1陽性終脳ならびにヒトFOXG1陰性腹側間脳細胞において、早期神経発生中に産生されうることが示唆されている。例えば、図2AおよびKerwinら、J Anat、217巻:289～299頁(2010年);ならびにRakicおよびZecevic、Cereb Cortex、13巻:1072～1083頁(2003年)を参照されたい。マウス胚発生中において、終脳(FOXG1+)におけるNKX2.1の発現は、腹側(皮質下)ドメインに局限される。これに対し、ヒト胎児組織において、NKX2.1の発現は、腹側前脳に局限されず、そうではなくて、背側前脳および皮質原基へと拡大することが報告されている(RakicおよびZecevic、Cereb Cortex、13巻:1072～1083頁(2003年);ならびにYuおよびZecevic、J Neurosci、31巻:2413～2420頁(2011年))。しかし、これらのヒト研究は大部分妊娠中期の胎児についての解析に基づいていた。これは、NKX2.1+細胞が背側前脳において直接的に誘導されたのか、腹側ドメインにおける誘導の後で背側に遊走したのかを確認することを困難とする(Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻(9号):2196～2207頁(2009年))。

【0340】

本明細書で開示される通り、初期ヒト胚(カーネギー発生段階15;受胎の約38日後)において免疫細胞化学解析を実施したところ、NKX2.1の発現は、腹側前脳に局限されることが観察された。例えば、図2B～2Eを参照されたい。したがって、本明細書で開示されるヒトデータは、マウス研究から導出されたデータと同等である。本データにより、ヒト胚腹側前脳内のNKX2.1ドメインは、OLIG2+神経節隆起と、OLIG2陰性視索前野領域原基とにさらに細分されることがさらに実証された。例えば、図2Cおよび2Dを参照されたい。

【0341】

分化2～18日目SHH処理群と、分化6～18日目SHH処理群と、分化10～18日目SHH処理群とを比較することにより、hPSC由来のNKX2.1::GFP+細胞の領域的独自性を評価した。図2F。これらのデータにより、SMAD阻害剤によるフロアプレートの誘導についての以前の研究から導出される結果が確認される(Fasanolaら、Cell Stem Cell、6巻:336～347頁(2010年))。早期のSHH曝露(すなわち、分化2～18日目SHH処理群)は、NKX2.1::GFPの頑健な誘導にも拘らず、FOXG1誘導の抑制を呈示した。それぞれ、図2G、左パネル、および図1Hを参照されたい。

【0342】

これに対し、分化6～18日目および分化10～18日目SHH処理群の両方が、FOXG1の発現を呈示したが、OLIG2の発現は異なった。図2G、中パネルおよび右パ

10

20

30

40

50

ネルを参照されたい。理論により束縛されることを望まないが、FOXG1とOLIG2との示差的な発現が、初期ヒト発生中に観察される異なるNKX2.1+前駆体細胞ドメインを反映し(図2A~E)、マウス前脳の発生中におけるOlig2+ドメインを模倣すると考えられる(Flamesら、J Neurosci、27巻:9682~9695頁(2007年))。分化6~18日目SHH処理群および分化10~18日目SHH処理群におけるNKX2.1::GFP+細胞のうちの90%超はFOXG1を共発現し、分化10~18日目SHH処理群におけるGFP+細胞のうちのほぼ80%はOLIG2を共発現した。図2Hを参照されたい。

【0343】

SHH曝露のタイミングの、特定の腹側前駆体細胞集団の導出に対する影響について、グローバルトランスクリプトーム解析によりさらに検討した。図2I~2Kおよび表1を参照されたい。

【表1】

表1
SHH処理のタイミングについてのグローバルトランスクリプトーム解析

10~18日目 対 SHHなし			10~18日目 対 2~18日目			10~18日目 対 6~18日目		
プローブセット	倍数変化	p値	プローブセット	倍数変化	p値	プローブセット	倍数変化	p値
SOX8	7.87888	8.35E-08	EN2	9.25428	1.58E-08	SOX21	3.13584	3.37E-07
NKX2-1	8.92728	3.40E-18	FOXG1	8.88831	8.78E-05	SP8	2.80878	1.48E-08
LPA	8.46827	8.53E-09	PCSK5	3.38548	3.35E-05	FOXP19	2.85859	2.29E-05
FTI1	8.72857	5.21E-08	EN3	3.18514	0.000228	FOXG1	3.38842	8.88E-08
SNORD34	8.3888	4.88E-07	NDF	3.12388	0.000278	OTX2	2.38288	8.28E-08
OLIG1	4.70298	2.51E-07	ANTSR	2.88888	0.00029	OLIG2	2.37433	8.84E-08
NKX2-2	4.62431	8.98E-09	PLCH1	2.58483	1.52E-05	SHISA2	2.35185	8.78E-05
PTCH1	3.88485	2.07E-08	KCNK12	2.63873	0.008274	PCSK3	2.18368	1.87E-05
OLIG2	3.88888	1.18E-08	CDH11	2.48838	4.13E-05	MYCN	2.18188	1.14E-05
NKX2-2	3.74188	2.42E-07	MYCN	2.48788	2.18E-05	FRZB	2.11983	8.43E-05
HES1	3.48284	2.42E-08	ROR8	2.87818	0.000184	DOCK1	2.10788	0.000228
ASCL1	2.88882	1.42E-08	ICRT	2.87748	0.00032	FOXG1	2.08114	0.000174
FOXG1	2.8282	8.95E-07	LMC2	2.85918	2.95E-05	ALCAM	2.88848	0.000381
SEMA3A	-2.8003	0.000478	RLF8	-2.21322	4.29E-08	DCX	-2.11114	0.000273
SEMA3C	-2.13847	4.48E-08	EPN82	-2.23578	0.000235	CHRNA3	-2.88142	2.88E-08
MEIS1	-2.14263	0.000185	APOE	-2.48952	8.27E-05	GAP43	-2.85957	5.88E-05
OLX5	-2.21798	2.04E-05	RAX	-2.57187	2.78E-05	CTGF	-3.05732	1.84E-05
NPZF2	-2.8352	2.83E-08	LAMB1	-2.84818	1.18E-05	ANKRD1	-3.6828	1.35E-06
EV1	-2.87548	3.30E-08	GAP43	-2.78483	0.000245	FOXP1	-3.88884	3.78E-07
PDGFC	-2.80284	4.88E-08	CTGF	-4.4333	8.83E-07	SYT4	-4.3542	4.87E-08
DOT	-3.51574	8.43E-11	ANKRD1	-4.45888	1.28E-07	GRP	-4.5884	4.62E-08
PAX6	-4.82536	2.32E-08	HEY1	-4.47756	0.000255	EMP1	-4.88853	5.18E-08
AS1	-5.42817	9.25E-08	LEFTY2	-4.88804	2.27E-08	NKX2-2	-4.73857	7.88E-08
COL2	-5.84818	7.78E-08	EPCAM	-4.93135	8.11E-05	BTBD12	-5.80274	2.18E-08
EMX2	-6.88337	1.00E-18	COL1A1	-4.9844	4.33E-08	VGF	-5.85728	1.87E-08
ALDH1A1	-8.98783	9.36E-11	EMP1	-6.14487	8.66E-06	MMP7	-8.81875	4.37E-08

【0344】

分化10~18日目SHH処理群を、非処理培養物(例えば、SHH処理なし)と対比する直接的な比較により、EMX2およびPAX6などの背側前脳マーカーを犠牲にして誘導されたNKX2.1、NKX2.2、ASCL1、SIX6、OLIG2、およびNKX6.2など、腹側特化マーカーの頑健な誘導が確認された。図2Iを参照されたい。FOXG1およびOTX2など、一般的な前方マーカーの発現には、有意な差異が観察されなかった。図2Iを参照されたい。これらのデータは、両方の細胞集団の前脳独自性を支援する。

【0345】

分化10~18日目SHH処理群の、分化2~18日目SHH処理群との比較により、FOXG1など、前方マーカーの発現の、RAXなど、間脳マーカーの発現と対比した差異が例示された。図2J。これに対し、分化10~18日目SHH処理群と分化6~18

日目SHH処理群との比較は、前脳マーカー発現の差異が、それほど顕著ではないことを明らかにした。図2Kを参照されたい。これらのデータは、SHH処理のタイミングが、hPSC由来のNKX2.1前駆体細胞の領域的独自性に有意に影響を及ぼすことを実証する。

【0346】

遺伝子発現データにより、分化10～18日目SHH処理群を含む、全てのSHH処理培養物において、FOXA2の誘導が実証された。図2Iを参照されたい。発生しつつあるCNS内の、フロアプレートマーカーであるFOXA2の発現は、分化の18日目において、3つのSHH処理群全てに由来するNKX2.1::GFP+細胞において確認された。図3Aおよび3Bを参照されたい。

10

【0347】

FOXA2発現が、SHHシグナル伝達の強力な外因性の活性化の後における*in vitro*のアーチファクトを表しうるのかどうか、またはFOXA2発現が、*in vivo*における発生中に終脳において生じているのかどうかについて取り組むため、胚生11.5日目のマウス胚において発生しつつあるマウスおよびヒト前脳における組織学的解析を実施した。本明細書で提示されるデータにより、マウス前脳内のFOXA2発現は、FOXG1およびNKX2.1ドメインから隔離されていることが実証された。図3Cを参照されたい。一次ヒト前脳組織(CS15胚)におけるFOXA2についての免疫組織化学解析により、終脳NKX2.1+神経節隆起原基における発現が確認された。図3D～3Fを参照されたい。これらのデータは、一過性のFOXA2発現が、ヒト腹側前脳の発生中に生じることを実証し、これらのデータは、*in vitro*におけるhPSC分化データと符合する。

20

【0348】

(実施例3)

前脳神経前駆細胞の、ニューロン細胞への方向付けられた分化およびこれらのニューロン細胞の遊走特性

本実施例は、前脳神経前駆細胞の方向付けられた分化による、ニューロン細胞の発生を実証する。

【0349】

神経節隆起に由来する皮質介在ニューロンは、皮質回路内の興奮と抑制との平衡において、特に重要である。さらに、皮質介在ニューロンは、発生上の可塑性の制御において鍵となる役割を果たし、てんかん、自閉症、および統合失調症を含む多様な病態において機能不全である(Barabanら、Proc Natl Acad Sci USA、106巻:15472～15477頁(2009年); Eaglesonら、Autism Res、4巻:68～83頁(2011年); Insel、Nature、468巻:187～193頁(2010年); Lewisら、Nat Rev Neurosci、6巻:312～324頁(2005年); およびPenagarikanoら、Cell、147巻:235～246頁(2011年))。

30

【0350】

10～18日目処理前駆体細胞は、OLIG2、MASH1、およびNKX6.2を含む転写因子であって、マウスの発生中において皮質介在ニューロン前駆細胞ドメインのマーカーである転写因子の多くを発現する。分化18日目におけるNKX2.1::GFP細胞の大半は、前駆細胞の特性を呈示するが、これは、ネスチンおよびKi67の発現により証拠立てられる。

40

【0351】

本明細書で実証される通り、外因性のSHH活性化の非存在下で培養を長期化させたと、循環NKX2.1::GFP細胞は、徐々に減少した。図4A～4C、上パネル。18日目において、表示の3つのプロトコルに由来する細胞を、NKX2.1::GFPの産生についてのFACSにかけ、次いで、再播種し、皮質介在ニューロンマーカーとの共標識について評価した。図4A～4C。3つのプロトコル全てが、前駆細胞マーカー

50

ーの産生の低減およびニューロン分化のマーカー（すなわち、GABA、TUJ1、ダブルコルチン（DCX）、およびカルビンディン）の産生の増大を呈示した。

【0352】

Ki67の比率の減少は、ニューロン前駆体細胞マーカーであるDCXおよびTUJ1を発現する細胞の百分率の増大と並行した。図4A～4C、下パネル。さらに、10～18日目および2～18日目条件下のGFP+細胞の多くは、GABAを発現し、接線方向に遊走する皮質介在ニューロン前駆体細胞ならびに他の集団のマーカーである、カルビンディンの発現の時間依存性増大を示した（図4A～4C、下パネル；Andersonら、Science、278巻：474～476頁（1997年））。

【0353】

分化32日目におけるウェスタンブロット解析により、内側神経節隆起（MGE）で濃縮されるLHX6タンパク質であって、マウスにおける有糸分裂後の遊走性の皮質介在ニューロン前駆体細胞のマーカーであるLHX6タンパク質が、10～18日目条件下で選択的に濃縮される一方、視床下部マーカーであるRAXは、2～18日目条件下で選択的に濃縮されることが示された。図4D。さらなる免疫細胞化学データは、10～18日目のNKX2.1：GFP+前駆細胞に由来する大半のニューロン前駆細胞におけるDLX2およびASCL1の発現を明らかにした。図4E～4G。32日目において、10～18条件によるNKX2.1：GFP+細胞の多くもまた、DLX2およびASCL1を発現したことから、外因性のSHHシグナル伝達活性化因子を中止した後において、NKX2.1：GFP+前駆細胞は、皮質介在ニューロンの前駆体細胞を含む、領域特異的な有糸分裂後ニューロンをもたらしたことが示唆される。図4E～4G。

【0354】

ヒトESC由来の推定皮質介在ニューロン前駆体細胞（10～18日目群）を、マウス脳（Andersonら、Science、278巻：474～476頁（1997年））およびヒト脳（Letinicら、Nature、417巻：645～649頁（2002年））における初代皮質介在ニューロンについて観察される、特徴的な遊走能力について評価した。

【0355】

細胞を、Ripabuffer（50mMのトリス-HCl pH8.0、120mMのNaCl、5mMのEDTA、0.5%のNP-40、およびプロテアーゼ阻害剤の錠剤）で溶解した。タンパク質濃度は、Bradford Assay（Bio-Rad）により測定した。免疫ブロットのために、全細胞抽出物（試料1例当たり 4×10^6 個の細胞）を、Laemmli試料緩衝液中で、5分間にわたり煮沸した後、iBlotエレクトロブロット装置（Invitrogen）を使用して、MOPS SDSランニングバッファー中の4～12%ビスートリスゲル上、100Vで2時間にわたる電気泳動により分離した。

【0356】

iBlotゲル転写デバイス（Invitrogen）を使用して、タンパク質を、ニトロセルロース膜へと転写した。非特異的なタンパク質結合は、膜を3%のBSAおよびPBS-T（0.1%のTween-20）でブロッキングすることにより防止した。膜は、3%のBSAおよびPBS-T中、4度で一晩にわたり、一次抗体（LHX6（1：500；Abcam）、RAX（1：250；Abnova）、GAPDH（1：10,000；Thermo Scientific）と共にインキュベートした。PBS-T（0.1%のTween-20）による5回の洗浄の後、ブロットを、それぞれの二次抗体（ウサギ（1：10,000）、マウス（1：20,000）と共に、室温でインキュベートした。ECLキットである、Western Lightning Plus-ECL、を、製造元の指示書（PerkinElmer）に従い、検出のために使用した。二次抗体は全て、Jackson ImmunoResearchから購入した。ECLキットである、Western Lightning Plus-ECL、を、製造元の指示書（PerkinElmer）に従い、検出のために使用した。

【0357】

厚さ250 μmの終脳冠状薄片を、記載される（Andersonら、Development、128巻：353～363頁（2001年））通りに調製および培養した。薄片は、5 ng/mlの組換えヒトFGF2（Promega）を含むNeurobasal/B27中で維持した。初期（分化の32～39日目）hESC由来NKX2.1：：GFP+細胞を、FACSにより単離し、次いで、卵母細胞マイクロインジェクター（Nanoinjector II；Drummond）を使用して、MGEの脳室周囲領域へと注意深く注射した。脳半球の薄片1つ当たりおよそ5000個の細胞を注射した。培養物を、2または6日間にわたり維持した後、免疫染色のために固定および加工した。細胞をカウントするために、帯域1を、外側神経節隆起の脳室内帯域から脳外套－外套下間境界部へと広がる領域と規定した。帯域2は、外側皮質から、新皮質を通り、皮質半球までの領域と規定した。

10

【0358】

NOD-SCID IL2RG-/-マウス新生仔の体性感覚新皮質をターゲティングする移植は、以前に記載されている通りに実行した（Wondersら、Dev Biol、314巻：127～136頁（2008年））。50～80×10³個の細胞を、以下のブレグマからの座標（A：2.0 mm、L：2.5 mm、D：1.0 mm）の皮質板へと、皮質層3～6をターゲティングして注射した。動物の管理は、WCMCおよび米国立保健研究所における試験実施施設用ガイドラインに従った。

【0359】

20

マウスおよびヒトの両方において、皮質介在ニューロンの主要なサブクラスは、腹側終脳から皮質への途上で、接線方向の遊走を起こす（Andersonら、Science、278巻：474～476頁（1997年）；Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻（9号）：2196～2207頁（2009年）；およびLetinicら、Nature、417巻：645～649頁（2002年））。分化32日目におけるNKX2.1：：GFP+細胞は、FACSにより回収し、胚生13.5日目のマウス胚から単離された前脳薄片へと注射した。細胞の注射は、顕微鏡による視覚的誘導下で、内側神経節隆起を注意深く標的とした。

【0360】

図4Hは、移植部位および遊走を定量するための帯域を示す冠状半断面の概略を提示する。NKX2.1：：GFP+細胞の遊走能力およびそれらの皮質に到達する能力（図4Hの帯域2を参照されたい）を、3つの処理群（SHH処理の2～18日目、6～18日目、および10～18日目；図4I～4L）の間で比較した。2～18および6～18条件の両方において、帯域1へと遊走した細胞は極めて少数であり、帯域2へと遊走した細胞はさらに少数であった（図4K）。皮質および線条体領域への有意で頑健な遊走を示したのは、10～18日目条件だけであり、多くのGFP+細胞は、遊走細胞と符合する二極形態を呈示した（図4L）。

30

【0361】

注射後2日目（図4M）において、GFP+細胞が、注射部位から皮質（帯域2）へと遊走し、6日目（図4N）において、より顕著となることを観察した（* p<0.05；** p<0.01、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用）。10～18処理に由来するヒト細胞は、マウス薄片の新皮質部分への遊走の頑健な傾向を示したが、他の2つの処理群は、これを示さなかった（図4I～4N）ことは、注目すべきことである。これらのデータは、10～18日目処理細胞が、初代マウスMGE由来の介在ニューロン前駆体細胞について以前に記載された遊走特性を呈示することを示唆する（Lavdasら、J Neurosci、19巻：7881～7888頁（1999年）；Sussellら、Development、126巻：3359～3370頁（1999年）；およびWichterleら、Nat Neurosci、2巻：461～466頁（1999年））。10～18日目処理細胞と対比して2～18日目処理細胞の遊走能力をさらに調査するために、本発明者らは、FACSで単離したNKX2.1：：GFP+細胞を、新生仔の

40

50

遺伝子的免疫不全マウスの新皮質へと移植した。図4 O～4 Pは、32日目にソートしたNKX2.1::GFP+細胞(10～18日目プロトコル)の、新生仔マウスの新皮質への移植、その後の生後30日目に固定した切片におけるそれらの評価を示す。SHH 10～18プロトコルに由来するMGE様細胞(図4 P)とは著しく対照的に、SHH 2～18プロトコル(図4 O)も、SHH 6～18プロトコル(図示しない)も、移植部位からの広範な遊走を結果としてもたらさなかった。移植の4週間後において、本発明者らは、マウス皮質内の放射面および接平面の両方において、広範な遊走を観察したが、10～18日目群(図4 Oおよび4 P)に限られた。

【0362】

同様の結果は、成体皮質への移植時にも得られた(図5)が、30日目までの、*in vivo*におけるNKX2.1::GFP+細胞の全般的遊走は、新生仔移植と比較して、それほど広範ではなかった。図5は、成体マウス皮質内のNKX2.1::GFP+ニューロン前駆体細胞の分布を示す。NKX2.1::GFP発現細胞を、分化32日目にソートし、成体IL2RG免疫不全マウスへと移植した。2～18条件(図5 A)および6～18条件(図5 B)は、30日後に皮質においてGFP発現領域をもたらししたが、GFP細胞体は、移植コアから移出しなかった。GFP発現細胞が、移植コアから移出し、皮質実質の全体にわたり分布したのは、10～18条件(図5 C)に限られた。加えて、10～18条件に由来するGFP発現細胞は、皮質層の全体にわたり分布し、ニューロン形態を示す(図5 D)。

【0363】

*in vivo*における介在ニューロン前駆体細胞の成熟の程度を決定するために、本発明者らは、10～18日目群に由来する移植された細胞における形態的外見および介在ニューロン関連マーカーの発現を評価した(図6)が、これにより、新生仔マウス新皮質への移植後における、Nkx2.1-GFP+細胞による分化の緩徐なペースが実証される。32日目まで「MGE様プロトコル」(SHH 10～18)により分化させ、次いで、GFPについてのFACSにかけ、遺伝子的免疫不全マウスの子仔新皮質へと移植し、6週間後に、固定した切片について評価した、Nkx2.1-GFP系の移植(方法を参照されたい)の例が示される。図6 Aは、GFP免疫蛍光標識についての低倍率図を示す。スケールバーは100 μm である。四角く囲った領域は3個の細胞を示し、パネル内でより高倍率で示す(図6 A1)。*in vivo*における分化の6週間後であってもなお、これらの細胞の大半は、しばしば先端が成長円錐(矢印)であり、二極性または単極性突起を有する比較的未分化の外見を有し続けることに注目されたい。スケールバーは20 μm である。図6 Bは、ヒト特異的な細胞マーカーであるSC121(図6 B、6 B1、および6 B3)およびGFP(図6 B、6 B1、および6 B2)についての免疫蛍光を示す。全てのGFP+細胞は、SC121を発現し、ほぼ全てということはないが大半のこの年齢のSC121細胞は、GFPを発現する(矢印)。移植の2週間後において、同様の低百分率のSC121+/GFP-細胞が見られる(示さない)通り、これらの細胞が、Nkx2.1およびGFPの下方調節を表すのか、FACSを通過したGFP-細胞を表すのかは不明である(図6 B:スケールバー=35 μm 、図6 B1～6 B3:スケールバー=40 μm)。図6 Cは、GABAおよびGFPについての免疫蛍光を用いた同じ切片図を示す。強く共標識された2つの細胞を、矢印で指し示す。GABAの免疫検出は、切片内によく浸透しないので、細胞体が切片の切り口から5ミクロン以内に位置するGFP+細胞だけを選択的にカウントすることにより、共標識を定量した。このアプローチにより、2つの6週間後移植片に由来する細胞51個中46個(90.2%)が、強く共標識された。スケールバーは40 μm である。図6 Dは、GFP、Nkx2.1、およびニューロン前駆体細胞のマーカーであるDCX(青色;疑似カラーのCy5シグナル)についての免疫蛍光を示す。全てのGFP+細胞は、Nkx2.1発現核(矢印)を有し、また、DCXについて共標識されている。スケールバーは40 μm である。

【0364】

移植(新生仔マウス皮質)の1および2カ月後のいずれにおいても、大半のヒト細胞は

、二極性または単極性形態を有する未分化の外見を呈示し、NKX2.1を発現し続けた。さらに、多極性形態を有する移植細胞を含む本質的に全ての移植細胞が、ニューロン前駆体細胞マーカーであるDCXを発現した(図6)。齧歯動物において生じる通り、ヒト介在ニューロン前駆体細胞のうちの大多数が、GABAを発現した(46/51のGFP+細胞が、切片表面に位置した;図6)。これに対し、Nkx2.1系統の介在ニューロンの主要なサブクラスにおいて検出される2つのタンパク質である、パルブアルブミン(PV)またはソマトスタチン(SST)についての共標識は存在しなかった。この結果は、移植の6週間後までであってさえ、Nkx2.1-GFP+細胞が、成熟介在ニューロンへとまだ分化していないことを指し示す(図6)。

【0365】

マウス宿主皮質における、移植されたGFP+細胞の分化の見かけの欠如に対する1つの説明は、マウス皮質介在ニューロンにおいて生じるように、NKX2.1が、成熟後に下方調節され(Marinら、J Soc Neurosci、20巻:6063~6076頁(2000年))、より分化した細胞によるGFP発現の喪失が結果としてもたらされるということでありうる。この可能性について調べるため、切片を、ヒト特異的な汎ニューロンマーカーであるSC121の発現について検討した(Kellyら、Proc Natl Acad Sci USA、101巻:11839~11844頁(2004年))。予測される通り、全てのGFP+細胞はまた、SC121を発現した(図6)。しかし、移植の6週間後においてもなお、SC121を発現するが、GFPを発現しないヒト細胞は、10%未満(2つの6週間移植体からカウントしたGFP+細胞372個のうち25個)であった。まとめると、ヒト介在ニューロン前駆体細胞の、長期間を要する、in vivoにおける成熟のペースに従う傾向におそらく起因して、移植研究は、移植の最初の2カ月以内では、成熟介在ニューロンの分化を結果としてもたらさなかった。

【0366】

本開示は、マウス前脳の発達と対比した、ヒト前脳の発達における複数の驚くべき差異を指摘する。1つの差異は、hESC由来の腹側前脳前駆細胞およびCS15ヒト前脳組織におけるFOX A2のヒト特異的な発現であった。本発明者らは、長期間を要する前脳の発達、および脳サイズの明白な差異が、SHH依存性前駆細胞の長期にわたる増殖に依存しうることを踏まえると、一過性のFOX A2発現は、ヒト発生中においてSHHシグナル伝達を長期的に必要とすることと関連しうると推測する。将来、この仮説にさらに取り組むには、ヒト腹側前脳の発生中におけるFOX A2発現の時間経過を確立し、FOX A2が、フロアプレートなど、他のFOX A2+ CNSドメインにおいて一般に観察されるようなSHH発現と関連しうるのかどうかを決定することが重要である(PlaczekおよびBriscoe、Nat Rev Neurosci、6巻:230~240頁(2005年))。過去の研究は、皮質介在ニューロンの発生における種間の差異が、妊娠中期におけるヒト胎児皮質内のASCL1+細胞の存在に部分的に基づくことを報告している(Letinicら、Nature、417巻:645~649頁(2002年))。これらのデータにより、多くの、そして、おそらく、大半のヒト皮質介在ニューロンは、皮質自体の中で生じるという仮説がもたらされた(Leticinら、Nature、417巻:645~649頁(2002年))。これに対し、マウスにおける研究は、全てではないにせよ大半の皮質介在ニューロンが皮質下起源であることを実証した(Fogartyら、J Neurosci、27巻:10935~10946頁(2007年);Miyoshiら、J Neurosci、30巻:1582~1594頁(2010年);およびXuら、J Neurosci、24巻:2612~2622頁(2004年))。本発明者らによる研究は、とりわけこの問題に取り組むことに向けたわけではないが、本発明者らは、CS15ヒト胚における腹側前脳内の限局的なNKX2.1の発現、および背側前脳における発現の完全な欠如を見出した(また、Allen Brain Atlas、<http://human.brain-map.org/>も参照されたい)。さらに、本発明者らによる薄片培養アッセイ、およびin vivoの発生し

つつあるマウス皮質における、hESC由来の皮質介在ニューロンの遊走する能力は、ヒト皮質介在ニューロン前駆細胞が、マウスにおけるそれらの対応物と同様の、接線方向の遊走能を有することを示唆する。hESC由来の皮質介在ニューロンにおける別の興味深い特徴は、NKX2.1の持続的な発現であった。これに対し、マウス皮質介在ニューロン前駆体細胞では、NKX2.1は、マウス皮質介在ニューロン前駆体細胞がMGEから移出して、皮質へと移入する時点までに消失する(Marinら、J Soc Neurosci、20巻：6063～6076頁(2000年))。本発明者らによるin vitroデータは、有糸分裂後NKX2.1+ニューロンの存在を示す、ヒト新皮質におけるin vivoの知見と符合する(Fertuzinhosら、Cereb Cortex、19巻(9号)：2196～2207頁(2009年))。しかし、線条体介在ニューロンは、NKX2.1の発現を保持しながら、マウスにおける皮質介在ニューロンのマーカーを共有する(Marinら、2000年)ので、本発明者らのデータは、本発明者らによるヒトESC由来細胞のサブセットが、線条体介在ニューロンに対応する可能性を排除しない。

10

【0367】

統合失調症など、ヒト精神疾患のモデル化の現在のパラダイムは、患者特異的なiPSC由来ニューロンの使用を特色としている(Brennandら、Nature、473巻：221～225頁(2011年)；Cheungら、Hum Mol Genet、20巻：2103～2115頁(2011年)；Chiangら、Mol Psychiatry、16巻：358～360頁(2011年)；Marchettoら、Cell、143巻：527～539頁(2010年)；およびPascaraら、Nat Med、17巻：1657～1662頁(2011年))。しかし、これらの公表された研究は、ニューロン垂型の独自性が不明であり、垂型特異的なシナプス特性および機能的特性の特徴付けが限定的であった、混合神経細胞培養物において実施された。統合失調症における介在ニューロン関連Erbb4受容体など、遺伝子欠損を、精神障害と関連させようとする死後知見の集約がなされている(Fazzariら、Nature、464巻：1376～1380頁(2010年))。したがって、ヒト疾患をモデル化するためには、成熟皮質介在ニューロンの精製された集団へのアクセスが不可欠である。本発明者らによる結果は、発生上の合図に対するタイミングを計った曝露の後における、皮質介在ニューロンの非常に効率の高い導出が可能であることを実証する。本発明者らは、推定hESC由来GABA作動性介在ニューロンは、他のヒト介在ニューロンおよび興奮性マウス投射ニューロンの両方からのシナプス入力を受容することを見出す。加えて、皮質介在ニューロンの神経化学特性を伴う細胞は、マウス皮質培養物上に播種して30日以内に、かなり成熟した生理学的特性を成立させる。

20

30

【0368】

(実施例4)

前脳ニューロン前駆体細胞の表現型成熟およびシナプス成熟

本実施例では、前脳ニューロン前駆体細胞の表現型成熟およびシナプス成熟が実証される。

【0369】

皮質介在ニューロン発生については、マウス胚MGE由来の前駆細胞を、主にマウス皮質錐体ニューロンおよびグリアから構成される「フィーダー培養物」上に播種した共培養系を使用して研究されている(Xuら、J Neurosci、24巻：2612～2622頁(2004年))。

40

【0370】

ヒト介在ニューロンの成熟の態様が、この系では、異種移植片と比べて加速されるのかどうかを決定するために、NKX2.1::GFP+細胞は、分化32日目において、FACSにより回収し、解離させたマウス胚皮質の培養物上に再播種した(図4A)。この図は、ヒトNKX2.1::GFP+細胞(32日目におけるFACSの後における)を播種した、皮質興奮性ニューロン培養物の、胚生13.5日目(E13.5)マウスから

50

の調製を示す。

【0371】

全細胞電圧クランプ記録および全細胞電流クランプ記録は、以前に記載された（Yingら、Eur J Neurosci、23巻：465～480頁（2006年）；YingおよびGoldstein、J Neurophysiol、93巻：1935～1948頁（2005年）；ならびにYingら、J Neurosci、27巻：8719～8732頁（2007年））ように、そして方法を本研究のために若干改変して実施した。略述すると、4倍の対物レンズおよび40倍の水浸対物レンズを装備したNikon顕微鏡（ECLIPSE FN1）を使用して、ニューロンを可視化し、落射蛍光法を使用して、GFP陽性ニューロンを同定した。ニューロンは、23～24℃で記録した。入力抵抗は、小電流パルス（-2または5 pA、500ミリ秒）を細胞内注入することにより誘発された電圧応答から測定した。電気シグナルは、Clampex 10.2ソフトウェア（Molecular Devices、Foster City、CA）を使用するインターフェースへと接続されたMulticlamp 700B増幅器を使用して得た。液間電位は、オフラインで計算および補正した（YingおよびGoldstein、J Neurophysiol、93巻：1935～1948頁（2005年））。

10

【0372】

記録の間、ニューロンは、126のNaCl、26のNaHCO₃、3.6のKCl、1.2のNaH₂PO₄、1.2のMgCl₂、2のCaCl₂、および17のグルコース（mM単位）を含有する新たに調製されたACSFで持続的に灌流し、溶液を、95%のO₂～5%のCO₂で飽和させた。EPSCについての、全ての電流クランプ記録ならびに電圧クランプ記録のためのピペット溶液は、135のK-グルコン酸、5のNaCl、10のHEPES、0.5のEGTA、3のK₂-ATP、0.2のNa-GTP、および10のNa₂-ホスホクレアチン（mM単位）を含有し、KOHで7.3にpH調整した。IPSCの電圧クランプ記録については、ピペット溶液は130のCH₃SO₃Na、8.3のCH₃SO₃Na、1.7のNaCl、1のCaCl₂、10のEGTA、2のMg₂-ATP、0.3のNa-GTP、10のHEPES（mM単位）を含有し、pHは、CsOHで7.2に調整した（YingおよびGoldstein、J Neurophysiol、93巻：1935～1948頁（2005年））。電圧クランプ実験のための浴溶液は、電流クランプ記録のための浴溶液と同じであった。短い電流パルスを適用して、閾値（1倍）～閾上（4倍または5倍）の強度における発火特性について調べた。薬物は、少なくとも2分間にわたる灌流により適用した。（-）-ビククリンメトクロリドは、Tocris製であり、テトロドトキシン（TTX）は、Alomone Labs（Jerusalem、Israel）製であり、他の全ての化合物は、Sigma（St. Louis、MO）から得た。データの加工および解析は、既に記載されている通り、MiniAnalysis（Synaptosoft、Decatur、GA）およびClampfit 10（Molecular Devices）を使用して実施した（Yingら、Eur J Neurosci、23巻：465～480頁（2006年）；およびYingら、2007年）。

20

30

40

【0373】

皮質細胞は、腹側由来の介在ニューロンの背側新皮質への移入の前の段階（Andersonら、Science、278巻：474～476頁（1997年））である、E13.5マウス胚から単離した。したがって、この共培養物系は、グルタミン酸作動性皮質錐体ニューロンの存在下で発生しつつある、ヒトNKX2.1+細胞による正常な発生の態様を模倣する。研究は、3つのSHH処理レジメンの各々から導出されたGFP+細胞を使用して、並行して実施した（図7）。

【0374】

図7B～7Eは、in vitroの30日後（DIV）において、SHH 10～18条件に由来する培養物が、GABAを共発現するNKX2.1::GFP+細胞につい

50

て濃縮されることを示す（図7B；図7Cで定量化した； $* p < 0.05$ ； $** p < 0.01$ 、ANOVAの後でシェッフェ検定を使用）。これに対し、SHH 6～18条件だけは、NKX2.1::GFPの、コリンアセチルトランスフェラーゼ（CHAT）との共標識について濃縮された（図7D；図7Eで定量化した； $* p < 0.05$ 、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用）。図7Fおよび7Gは、28 DIVにおいて記録した、10～18日目SHH（図7F）ニューロンおよび6～18日目SHH（図7G）ニューロンについてのスパイクパターンを示す。活動電位は、下方に示すプロトコールにより誘発した。図7H～7Kは、自発的スパイクが、GABA受容体アンタゴニストであるピククリンの非存在下（図7Hおよび7I）および存在下（図7Jおよび7K）において、GABA作動性（10～18日目SHH）ニューロンおよびコリン作動性（6～18日目SHH）ニューロンについて濃縮される培養物から記録されたことを示す。ピククリンが、6～18条件における自発的発火活性に対してほとんど影響を及ぼさなかったことは、マウスフィーダー細胞またはこのプロトコールにより発生させたヒトNKX2.1::GFP+細胞に由来するGABA作動性細胞の欠如と符合する。

【0375】

in vivo 研究とは対照的に、2～18「視床下部様」培養物に由来するGFP+細胞のうちの40%、および6～18培養物に由来するGFP+細胞のうちの15%と対比して、10～18処理「MGE様」培養物に由来するGFP+細胞のうちのおよそ80%が、GABAを発現したことは、注目すべきことである。同様に、終脳（FOXG1+）細胞については濃縮されるが、介在ニューロン前駆体細胞のLHX6を発現する細胞については濃縮されない（図3Dを参照されたい）6～18培養物は、NKX2.1系統のニューロンの他の主要な神経伝達物質で規定されるサブクラス、コリンアセチルトランスフェラーゼ（CHAT）を発現する細胞について有意に濃縮された。本発明者らは、次に、10～18日目処理培養物（GABAの乏しい6～18培養物と比べて、GABAニューロンについて濃縮された）に由来するGFP+細胞が、GABA作動性シナプス伝達を起こすニューロンをもたらすかどうかを決定した。同定されたGFP+細胞についての、全細胞パッチクランプ電気生理学的試験（図7F～7K）は、10～18日目および6～18日目処理培養物のいずれにおいても、自発的発火を示した（図7Hおよび7I）。しかし、GABA-A受容体アンタゴニストであるピククリンに応答して、NKX2.1::GFP+細胞の発火率のモジュレーションを示したのは、10～18日目群だけであった（図7J）。皮質フィーダーは、極めて少数のマウス介在ニューロンしか含有しなかった（10～18日目および6～18日目共培養条件のいずれにおいても）ので、これらの結果は、hPSC由来のGABA作動性ニューロンが、抑制性シナプスの出力を媒介することを指し示す（図8もまた、参照されたい）。したがって、GABA作動性ニューロンがより希少である6～18日目培養物（図7C）では、ピククリン曝露後における発火率は、不変のままであった（図7K）。

【0376】

10～18日目プロトコールを使用して発生させたNKX2.1::GFP+細胞へのシナプス入力をさらに解析するために、本発明者らは、自発的シナプス後電流および抑制性または興奮性シナプスマーカーの局在について検討した。マウス皮質フィーダー上で30日間にわたり培養したGFP+細胞は、GABA作動性シナプスのシナプス前終末内に存在する、高レベルの小胞GABAトランスポーター（VGAT）を発現した。

【0377】

図8は、NKX2.1::GFP+GABA作動性介在ニューロンが、興奮性および抑制性シナプス入力の両方を受容することを示す。図8A～8Eは、NKX2.1::GFP+、小胞GABAトランスポーター（VGAT）、およびシナプス後GABA作動性マーカーであるゲフィリンを示す、焦点面をずらしたz積層化共焦点画像を示す。図8A。ゲフィリンと共標識されたこのGFP+細胞の樹状突起は、VGATを発現するシナプス前終末を受容している（矢印）。加えて、GFP+軸索突起は、GFP陰性でゲフィリンを発現するシナプス後突起に隣接したVGAT+シナプス前終末を形成した（アステリス

ク)。

【0378】

図8Fは、全細胞パッチクランプにより、NKX2.1::GFP+ニューロン (SHH 10~18プロトコル) から記録される自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) であって、GABA-A受容体アンタゴニストであるビククリンを添加することにより可逆的に遮断されるsIPSCが明らかにされることを示す。図8G~8Kは、NKX2.1::GFP、小胞グルタミン酸トランスポーター1 (VGUT1; 図8G)、およびシナプス後マーカーであるPSD-95 (図8C) を示す、焦点面をずらしたz積層化共焦点画像である。このGFP+細胞は、VGUT1を発現するシナプス前終末に隣接する、PSD-95で共標識された樹状突起を有する。VGUT1を発現させるGFP 10
陰性細胞の存在 (図8Gの矢印) により、培養物中の興奮性グルタミン酸作動性ニューロンの存在が確認されることに注目されたい。図8Lは、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) が、NKX2.1::GFP+ニューロン (10~18) において検出されたことは、グルタミン酸作動性シナプス入力の見かけの存在と符合することを示す。

【0379】

全ての細胞を、32日目のNKX2.1::GFPについてのFACSの後において、マウス皮質フィーダー上に播種した。GFP+細胞内のVGATの細胞内局在は、GABA作動性シナプス後マーカーであるゲフィリンの発現に緊密に合致した (図8A~8E)。全細胞パッチクランプ解析により、NKX2.1::GFP+細胞が、GABA-A受容体アンタゴニストであるビククリンを添加することにより可逆的に遮断される、自発性 20
抑制性シナプス後電流 (sIPSC; 図5F) を受容することが実証された。GFP+推定樹状突起に隣接した小胞グルタミン酸トランスポーター1 (VGUT1) の発現、およびシナプス後興奮性シナプスマーカーであるPSD-95との共標識の存在により実証される通り、NKX2.1::GFP+細胞は、抑制性入力に加えて、興奮性入力も受容する (図8G~8K)。自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC; 図8L) もまた、NKX2.1::GFP+ニューロンにおいてたやすく検出されたことは、グルタミン酸作動性シナプス入力の存在と符合する。NKX2.1::GFP+細胞における自発的シナプス活性についてのより詳細な解析は、図9および表2B中で提供する。

【0380】

図9Aは、10~18日目群のニューロンから記録された自発性かつ微小IPSCの例を示す。図9Bは、平均sIPSC (グレー; n=150) と、平均mIPSC (黒色; n=56) との重合せを示す。ニューロンは、マウス皮質フィーダー上の26~30日目に記録した。図9Cは、IPSC (グレー) およびmIPSC (黒色) についての累積確率ヒストグラムを示す。図9Dは、分化30日目における、ヒトESC由来の皮質前駆体細胞におけるsIPSP (グレー; ニューロンマーカー (MAP2)、星状細胞マーカー (GFAP)、GABA、および皮質マーカー (SATB2、TBR1)) の周波数を比較する、群分けしたデータを示す。全ての細胞は、32日目のNKX2.1::GFP 30
についてのFACSの後において、マウス皮質フィーダーまたはヒトESC由来の皮質フィーダー上に播種した。

【表 2 A】

表2A
ヒト皮質フィーダーと対比したマウス皮質フィーダー上における、hESC由来の
NKX2.1::GFP+ニューロンの電気生理学的特性
(10~18日目および6~18日目群)

DIV	マウスフィーダー上の 10~18日目		マウスフィーダー上の 6~18日目		ヒトフィーダー上の 10~18日目
	14-16	20-30	14-16	20-30	20-30
RMP (mV)	-38.6 ± 2.4	-65.6 ± 1.6**	-36.1 ± 2.4	-62.6 ± 3.6**	-44.8 ± 6.6†
APの振幅 (mV)	57.4 ± 8.3	66.2 ± 4.1	56.2 ± 7.3	64.2 ± 5.1	62.5 ± 5.1
APの立ち上がり 時間 (ms)	1.472 ± 0.07	1.08 ± 0.03**	1.52 ± 0.08	1.11 ± 0.09*	1.9 ± 0.38†
APの半値幅 (ms)	3.05 ± 0.06	2.42 ± 0.12*	3.02 ± 0.05	2.5 ± 0.11*	4.8 ± 0.32††
AHPのピーク (mV)	10.1 ± 3.5	15.6 ± 2.4	11.2 ± 3.5	16.3 ± 2.6	8.8 ± 3.72
R _i (GΩ)	1.5 ± 0.1	0.72 ± 0.05**	0.94 ± 0.05	0.68 ± 0.12	1.66 ± 0.2††
細胞数	8	15	8	12	5

DIV: in vitro 日数; R_i: 入力抵抗; AP: 活動電位; AHP: 過分極後

*P<0. 01: 対応のないt検定、対応する14~16 DIV群と比較

**P<0. 001: 対応のないt検定、対応する14~16 DIV群と比較

†: P<0. 001: 対応のないt検定、10~18マウス(20~30 DIV)と比較

††: P<0. 0001: 対応のないt検定、10~18マウス(20~30 DIV)と比較

活動電位特性は、電流注入により誘発される場合の閾値で測定した。

10

20

30

【表 2 B】

表2B
GFP陽性GABA作動性介在ニューロン内の
GABA作動性シナプス電流の平均特性

	sIPSC	mIPSC
振幅 (pA)	62.6 ± 5.2	35.1 ± 2.3*
立ち上がり時間 (ms)	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4
減衰時間 (ms)	66.2 ± 5.4	51.2 ± 3.6 *
半値幅 (ms)	54.5 ± 5.3	41.3 ± 3.2*
細胞数	8	4

記録は、26～30 DIVにおいて作成した。*P<0. 05、対応のない検定

【0381】

皮質介在ニューロンは、皮質の発達および機能において異なる役割を有するニューロン型の多彩なセットを含む (B a t i s t a - B r i t o ら、C u r r T o p D e v B i o l、87巻：81～118頁 (2009年))。本発明者らによるマウス皮質フィーダー系における比較的急速な成熟のペースにより、他のより成熟した介在ニューロンマーカーの共発現について評価し、NKX2. 1：：GFP+細胞におけるGABAおよびCHAT以外の神経伝達物質表現型を規定することが可能となった。

【0382】

図6は、マウス皮質フィーダー上で30 DIVにわたり増殖させたNKX2. 1：：GFP+細胞についての神経化学プロファイルを示す。細胞は、表示のマーカーについての免疫蛍光により標識し、結果を、グラフ中で定量化した (A～E；* p<0. 05、* * p<0. 01、* * * p<0. 001、ANOVAの後で、シェッフェ検定を使用：(*) p<0. 05、6～18群と直接比較した場合；標準的なシェッフェ検定では、p値は有意性に到達しなかった：p=0. 08)。パネル (図6F～6J) は、細胞標識の代表的な画像を示す。SHH 2～18条件では、細胞の大半は、チロシンヒドロキシラーゼ (TH；図6A、6F) およびnNOS (図6B、6G) と共標識された。10～18条件では、GFP+細胞の多くは、それらの各々が、ヒトでは、成熟皮質介在ニューロンの部分集団において存在する、カルビンディン (Calb；図6C、6H)、ソマトスタチン (SST；図6D、6I)、およびパルブアルブミン (図6E、6J) と共標識された。全ての細胞を、32日目におけるNKX2. 1：：GFPについてのFACSの後に、マウス皮質フィーダー上に播種した。

【0383】

2～18日目群では、THを発現するGFP+細胞の大きな百分率が観察され (図6A) たが、これは、多くのNKX2. 1系統の視床下部ニューロンのドーパミン作動性の性質と符合する (Y e e ら、J C o m p N e u r o l、517巻：37～50頁 (2009年))。nNOSおよびカルビンディンについての免疫組織化学は、2～18日目群に由来するGFP+細胞において、高百分率のnNOS細胞を示した一方、高百分率のカルビンディン+ニューロンが、10～18日目群において存在した (図6B、6C)。

【0384】

10～18日目群ではまた、SSTおよびPV (図6D、6E) を含む、分化した皮質

介在ニューロンに特徴的な他のマーカーの発現も観察された。NKX2.1::GFPと共発現した、各亜群マーカーについての代表的画像を図6F～6Jにおいて提示する。VIPを発現するニューロンも、カルレチニンを発現するニューロンも観察されなかったことから、マウスの発生中において、尾側神経節隆起の特徴を呈示する細胞の非存在が示唆される(Xuら、J Neurosci、24巻:2612～2622頁(2004年))。

【0385】

in vivoにおいて皮質介在ニューロンにおけるこのマーカーの発現が、発生上後期の発現であることを踏まえると、NKX2.1+/PV+の導出は、特に注目すべきことであった(Zeczevicら、Dev Neurobiol、71巻:18～33頁(2011年))。自動式画像解析(Operetta High Contentスキャナー)によりGFP+/PV+としてカウントされた細胞のサブセットだけが、高レベルのPV発現を示し、介在ニューロン様形態を呈示した(全GFP+細胞のうちの約5%(図6J))。

【0386】

これらの結果は、選択的な皮質介在ニューロン亜型の導出をさらに最適化する必要性を強調する。しかし、PV+hPSC由来ニューロンが発生したという事実は、マウス胚皮質ニューロンを使用する共培養戦略が、hPSC由来の介在ニューロンにおいて亜型特異的な神経化学マーカーの発現を促進する有益なプラットフォームを表すことを示唆する。

【0387】

in vivoにおけるNkx2.1-GFP+推定介在ニューロン前駆体細胞の成熟が長期間を要することを踏まえ、本発明者らは、共培養物系において、介在ニューロン様分化の形態的証拠、マーカーベースの証拠、および生理学的証拠を得たことに驚いた。ヒト皮質投射ニューロンについて濃縮された培養物上で増殖させた同じGFP+細胞もまた、成熟の加速を示すのかどうかを決定するために、本発明者らは、FACSで精製したNKX2.1::GFP+細胞を、マウス皮質ニューロン上対ヒト皮質ニューロン上いずれかにおいて、並行して共培養する試験を実施した。図10は、初代マウス皮質フィーダー細胞と対比したヒトESC由来の皮質フィーダー細胞の表現型特徴付けを示す。図10A～10Dは、CD24の発現ならびにCD44およびCXCR4(CD184)の発現の欠如に基づく皮質ニューロン前駆体細胞のFACSを媒介する単離を示す。図10E～10Lは、分化30日目のhESC由来の皮質前駆体細胞におけるニューロンマーカー(MAP2)、星状細胞マーカー(GFAP)、GABA、および皮質マーカー(SATB2、TBR1)の発現についての免疫細胞化学解析を示す。図10M～10Tは、E13.5マウス皮質培養物におけるニューロンマーカー(MAP2)、星状細胞マーカー(GFAP)、GABA、および皮質マーカー(SATB2、TBR1)の発現についての免疫細胞化学解析を示す。全体的に、本発明者らは、初代マウス皮質フィーダーとhPSC由来の皮質フィーダーとの間で、同等なマーカー発現を観察した。

【0388】

ヒト皮質フィーダーは、hESCを分化させた(改変XLSB条件、方法を参照されたい)後で、CD44-/CD184+/CD24+ニューロンについてのFACS(Yuanら、PLoS One、6巻:7540頁(2011年))を行って得た(図10A～10D)。hESC由来ニューロンの皮質ニューロンの独自性を、VGLUT1、MAP2、CTIP2、およびSATB2の発現により確認したところ、極めて少数のGFAP+細胞またはネスチン+細胞しか存在しなかった(図10Eおよび10T)。興味深いことに、本発明者らは、表2Aにおいて示される通り、ヒト皮質フィーダー上に播種されたNKX2.1+細胞の電気生理学的成熟と対比した、マウス皮質フィーダー上に播種されたNKX2.1+細胞の電気生理学的成熟の一貫した差異を観察した。

【0389】

記録は、マウスフィーダー条件については、14～16 DIVまたは20～30 DIVにおいて、ヒト皮質フィーダー条件については、20～30 DIVにおいて得た。

マウスフィーダー上に播種した、10～18および6～18群のいずれについての基本的な電気生理学的特性の解析も、分化のより後期時点において、より成熟した特徴を示した。時間と共に、静止膜電位(RMP)の有意な過分極、ならびに入力抵抗(Ri)の減少が見られた。加えて、活動電位は、立ち上がり時間および半値幅の減少により証拠立てられる通り、急速で狭くなった。これに対し、ヒトフィーダー層上に播種した20～30日後に記録された、10～18日目条件によるGFP+ニューロンは、マウスフィーダー層上に播種した、より若齢の14～16 DIVニューロンにおいて見られる測定値と同等な、比較的未成熟な特徴を保持した。皮質フィーダー条件下におけるRMP、活動電位の立ち上がり時間、活動電位の半値幅、および入力抵抗は、同じDIV範囲で記録した、マウスフィーダー上の10～18ニューロンと比較して有意に異なった。多様な条件下における定性的発火特性を示す試料出力波形を、NKX2.1+皮質介在ニューロンからの代表的な電流クランプ記録を提示する図11に示す。図11A～11Cは、推定大脳皮質投射ニューロンについて濃縮された、マウスフィーダー(図11Aおよび11B)上またはヒトESC由来ニューロン(図11C)上で記録した、10～18日目処理群に由来するGFP陽性ニューロンからの代表的な出力波形記録を示す。脱分極電圧応答は、出力波形の各セットの下方に示したプロトコルを使用して誘発した。全ての記録について、保持電位は、-60mVであった。全ての細胞を、32日目のNKX2.1::GFPについてのFACSの後において、マウス皮質フィーダーまたはヒトESC由来の皮質フィーダー上に播種した。

【0390】

本開示は、提起された培養系により、統合失調症および自閉症などの精神障害における皮質介在ニューロン病態をモデル化するために鍵となる前提条件である、シナプスが活性な皮質介在ニューロンを、*in vitro*においてもたらしうることを実証する。統合失調症におけるPV介在ニューロンの機能不全の含意を踏まえると、これらの培養物中の、hESC由来のPVを発現するニューロンの発生、およびスパイクキングが比較的急速な非適応型ニューロンの存在は、特に興味深い(BeasleyおよびReynolds Schizophrenia Res、24巻:349～355頁(1997年);ならびにWooら、Am J Psychiatry、154巻:1013～1015頁(1997年))。急速スパイクキングPV+皮質介在ニューロンは、霊長動物の出生前発生の後期において観察され、成年初期まで成熟し続ける(Andersonら、Neuroscience、67巻:7～22頁(1995年);およびInsel、Nature、468巻:187～193頁(2010年))。多様な病態下におけるPV+ニューロンの重要な役割を踏まえると、本発明者らによるデータは、このような状態の疾患モデル化が、本発明者らの分化戦略を使用して実施可能であることを示唆する。将来に向けた別の鍵は、PV+細胞と対比したソマトスタチン+細胞など、特定の皮質介在ニューロン亜群の濃縮された発生を可能とするプロトコルの開発である。MGE前駆細胞における本発明者らによる以前の結果は、この決定もまた、SHHシグナル伝達の制御下にある可能性があり、より高レベルであれば、ソマトスタチン+ニューロンを促進し、より低レベルであれば、PV+ニューロンを促進することを指し示す(Xuら、Neuron、65巻:328～340頁(2010年))。最後に、*in vitro*で導出されたヒト皮質介在ニューロンの、再生医療における適用のために、完全な*in vivo*における潜在的 가능성을扱うには、将来の研究が必要となる。本開示は、新生仔マウス皮質への移植時における、hESC由来の皮質介在ニューロンの、注目すべき遊走能力を例示する。病理学的発作活動をモジュレートすること(Barabanら、Proc Natl Acad Sci USA、106巻:15472～15477頁(2009年))、パーキンソン病の態様を処置すること(Martinez-Cerdenoら、Cell Stem Cell、6巻:238～250頁(2010年))、および生後脳内で学習および可塑性を誘導すること(Southwellら、Science、327巻:1145～1148頁(2010年))における、皮質介在ニューロン移植片の使用の潜在的 가능성을踏まえると、疾患についての複数の成体CNSモデルへの移植研究は、特に興味深い。このような

移植研究についての1つの具体的な難題は、移植されたhPSC由来の皮質介在ニューロン前駆体細胞の*in vivo*における長期間を要する成熟である。長期にわたる予備的な、成体マウス皮質への移植研究により、それらの持続的な緩徐な成熟速度が確認され、NKX2.1+推定介在ニューロン前駆体細胞は、移植の3カ月後において、未成熟な成長円錐を保持し、限定的な統合を示す（データは示さない）。これらのデータは、迅速な機能的な統合および表現型の成熟がたやすく達成された、本発明者らの*in vitro*における共培養物による研究と対照的である。まとめると、本研究は、発達の多様な態様を研究するのに使用される可能性があり、多種多様な神経精神疾患に關与している特定のニューロン型の機能不全について研究するための強力な*in vitro*プラットフォームとして用いることができる、異なる腹側前脳ニューロン型の発生についての枠組みを提供する。

10

【0391】

まとめると、本開示は、機能的な成熟のペースが、局所環境の影響を受けることを示唆する。明らかに、ヒトフィーダー細胞と対比した、マウスフィーダー細胞の存在下における、より迅速な成熟速度の機構は、いまだ決定されていない。皮質ニューロンの種特異的な成熟速度により、皮質介在ニューロンの成熟のタイミングが誘発されるという可能性もある（例えば、活性を調節することにより）が、単純に、ヒトフィーダー中と対比して、マウスフィーダー中には、成熟を促進する星状細胞がより多いという可能性もある（Johnsonら、J Neurosci、27巻：3069～3077頁（2007年））。将来の研究は、本発明者らによる知見をさらに補強するように、ヒト胚起源の初代皮質ニューロンとの共培養を含むべきである。機構に依存せずに、本発明者らによるデータは、マウスによる共培養条件が、機能的*in vitro*研究を実施のために適切なhESC由来の皮質介在ニューロンの効率的な成熟を可能とすることを実証する。

20

【0392】

（実施例5）

（予測的実施例（prophetic））

*in vitro*で分化させた皮質介在ニューロンを使用して、薬物をスクリーニングするための方法

本実施例は以下を示す。

【0393】

神経変性および神経精神疾患のための細胞ベースの薬物スクリーニングは、初代ニューロンの不足およびニューロンを細胞系で置き換えることの困難により制限されている。大半のニューロンは、有糸分裂後であり、したがって、HTSに適する量で産生することが困難である。しかし、本開示により実証される通り、ESCおよびiPSCなどのヒト幹細胞は、ニューロンへと分化させることができ、したがって、ニューロンを使用する薬物スクリーニングを、より利用しやすいものとする。

30

【0394】

iPSCは、例えば、本明細書で開示され、そうでなくとも、当技術分野で公知の方法により、ヒト線維芽細胞から得ることができる。心筋細胞（例えば、Van Oorsc hot AAら、Panminerva Med.、2010年6月、52巻（2号）：97～110頁を参照されたい）、肝細胞（例えば、Alaimo G.ら、J Cell Physiol.、2013年6月、228巻（6号）：1249～54頁を参照されたい）、腎細胞（例えば、De Chiara L.ら、J Am Soc Nephrol.、2014年2月、25巻（2号）：316～28頁を参照されたい）、膵臓ベータ細胞（例えば、Roche E.ら、J Stem Cells.、2012年；7巻（4号）：211～28頁を参照されたい）、白血球（例えば、de Pooter RFら、Methods Mol Biol.、2007年、380巻：73～81頁を参照されたい）を含む、様々な体細胞をもたらす分化プロトコルが公知である。

40

【0395】

加えて、本開示は、SMAD/Wnt阻害とSHH活性化との組合せを使用して、幹細

50

胞を、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンへと分化させることを裏付ける。これらのニューロンは、精製し、ハイスループットスクリーニングなど、公知のスクリーニング法を使用して、候補薬物をスクリーニングするために使用することができる。

【0396】

細胞をスクリーニングのために準備できたら、それらを播種して、多様な播種密度および細胞培養容器について調べることができる。例えば、これらの細胞は、6ウェルプレート上、24ウェルプレート上、96ウェルプレート上、384ウェルプレート上、または薬物スクリーニングを容易にする他の任意のプラットフォーム上に播種することができる。適切なHTSフォーマットを選択したら、栄養素の中止の開始時点および持続期間も最適化される。

10

【0397】

ニューロンを含む、幹細胞由来の体細胞に基づく薬物スクリーニングについては記載されている。例えば、Yangら、Cell Stem Cell、12巻：713～726頁（2013年）を参照されたい。略述すると、低分子生存スクリーニングは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対抗する薬物を探索するために、野生型のSOD1マウス胚性幹細胞および突然変異体のSOD1マウス胚性幹細胞の両方に由来する運動ニューロン（MN）を使用して実行された。マウスESCは、MNへと分化させられ、96ウェルプレート内または384ウェルプレート内に播種された。加えて、分化の30日後における、ヒトESCに由来するヒトMNおよびヒトiPSCに由来するヒトMNも使用された。低分子スクリーニングのために、解離されたばかりの細胞は、ウェル1つ当たりGFP+細胞8,000個（384ウェルプレート）またはGFP+細胞30,000個（96ウェルプレート）の密度で播種された。4日後、栄養素が除去され、個々の化合物がウェルに添加された。一次スクリーニングのため、各化合物は、3つの濃度（0.1mM、1mM、および10mM）で2回反復で調べられた。さらなる72時間後（7日目）、細胞は固定および染色され、全ウェル内の残りのGFP+細胞をカウントすることにより、生存するMNの数が解析された。生存は、栄養素なしで維持された培養物と比較した倍数増大として測定される。この方法を使用して、Yangおよび同僚は、ケンパウロンという化合物が、MNの健全な生存を延長する目覚ましい能力を有することを発見した。

20

【0398】

本開示で記載されているin vitro分化法と、HTSプラットフォームとを組み合わせることにより、薬物スクリーニングを、神経変性および神経精神疾患において顕著な役割を果たす、皮質介在ニューロン、視床下部ニューロン、および視索前野コリン作動性ニューロンに対して実施することができる。例えば、ヒト皮質介在ニューロンを本開示に従い産生し、これらの細胞は薬物スクリーニングにおいて調べることができ、播種して、多様な播種密度および細胞培養容器について調べることができる。例えば、細胞は、6ウェルプレート上、24ウェルプレート上、96ウェルプレート上、384ウェルプレート上、または薬物スクリーニングを容易にする他の任意のプラットフォーム上に播種することができる。適切なHTSフォーマットを選択したら、栄養素の中止の開始時点および持続期間も最適化される。

30

40

【0399】

薬物スクリーニングにおける使用のための分子は、インハウスで設計することもでき、市販品を購入することもできる、低分子化合物ライブラリーを含む様々な供給源に由来しうる。皮質介在ニューロンの場合、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患のための公知の薬物分子であって、生体分子および低分子を含む薬物分子について調べることができる。このような分子を、薬物スクリーニングの有効性を最適化するために、異なる細胞密度と組み合わせた、異なる濃度でスクリーニングすることができる。例えば、Yangらは、約5000の低分子のコレクションをスクリーニングして、ALS薬を探索した。一次スクリーニングのため、各化合物を、3つの濃度（0.1mM、1mM、および10mM）で2回反復で調べた。さらなる72時間後（7日目）、MN細胞は固定

50

、染色され、生存について評価された（Y a n g ら、同上）。

【0400】

処置を意図する疾患のほか、これらの化合物／分子の、これらの細胞に対する意図される効果に応じて、候補化合物（低分子であれ、生物学的薬剤であれ）への曝露後における皮質介在ニューロンの表現型変化を選択することができる。これらの表現型の変化として、とりわけ、細胞の生存、細胞の形態的变化、細胞によるある特定の因子の分泌、ある特定の細胞表面分子の発現、細胞と他の細胞および／または固体支持体との相互作用、細胞の光学的特性、電気的特性、および化学的特性の変化、細胞の蛍光シグナル（例えば、細胞にGFP-プロジェリンなどの蛍光タンパク質をトランスフェクトする場合）、ならびに疾患マーカーの減衰または消失が挙げられるがこれらに限定されない。本開示で記載される方法の1つの適用は、パーキンソン病およびアルツハイマー病などの神経変性疾患にとって鍵となるニューロン細胞の健全な生存を延長しうる薬物をスクリーニングすることである。したがって、薬物スクリーニングは、皮質介在ニューロンの生存を促進する化合物を選択するように設計することができる。PDの場合、ESCまたはiPSCに由来する皮質介在ニューロンを培養し、播種し、化合物へと曝露し、それらの生存率を評価することができる。さらに、さらなるマーカーを、細胞生存に加えて、薬物スクリーニングのための基礎として活用することができる。例えば、皮質介在ニューロンの公知の細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーを、薬物スクリーニングのための基準として使用することができる。1つまたは複数のこれらの機能的マーカーの発現を緩徐化しうるか、停止させるか、または逆転させる化合物は、これらの神経変性疾患を処置する一助となりうる薬物の候補となりうる。

10

20

【0401】

ヒットとは、上記で記載した1つまたは複数の皮質介在ニューロン関連マーカーシグネチャーを効果的に逆転させる化合物／分子として定義することができる。例えば、細胞の生存を評価項目として使用する場合、細胞の適切な形態的特徴を保存しながら、生存細胞（例えば、皮質介在ニューロン）の数を実質的に増大させる分子を選択することができる。

【0402】

一次スクリーニングから選択した候補化合物は、任意選択で、再度調べることができ、用量反応アッセイおよび毒性アッセイを含むがこれらに限定されない、さらなる試験に供することができる。リード化合物を選択することができ、所望の特徴を改善し、かつ／または副作用を低減するように、構造的に改変することができる。リード化合物に対する他の改善は、吸収の増大、半減期の延長、細胞に対するアフィニティーの増大、ならびに局所および／または全身送達の増強を含みうる。リード化合物およびその改変された改変体について、適切な細胞培養物における研究および動物モデル系における研究を含む前臨床研究においてさらに研究することができ、好適な治療的プロファイルおよび毒性プロファイルを呈示する化合物は、ヒト臨床試験において、さらなるin vivo試験に供することができる。

30

【表 3】

表3
本研究において使用される一次抗体、それらの供給源、およびそれらの濃度のリスト

抗体	種	希釈率	供給源	型番
ASCL1	マウス	1/250	BD Pharmingen	556604
カルビンディン	ウサギ	1/3000	Swant	CB38a
カルレチニン	マウス	1/2000	Swant	6B3
CHAT	ヤギ	1/100	Millipore	AB144P
DLX2	ウサギ	1/200	J. Rubenstein からの贈呈	該当なし
ダブルコルチン	ヤギ	1/100	SCBT	sc-8067
FOXA2	ヤギ	1/200	SCBT	sc-6554
FOXG1	ウサギ	1/500	Neuracell	NC-FAB
FOXG1	ウサギ	1/1000	Eseng Lai からの贈呈	該当なし
GABA	ウサギ	1/4000	Sigma Aldrich	A2052
GAPDH	ウサギ	1/10000	Thermo Scientific	PA1-16780
ゲフィリン	マウス	1/2000	Synaptic Systems	147011
GFAP	ヤギ	1/300	SCBT	sc-6170
GFP	ニワトリ	1/1000	Abcam	ab13970
KI67	ウサギ	1/1000	Thermo Scientific	RM-9106
KI67	マウス	1/200	DAKO	MIB-1
LHX6	ウサギ	1/500	Abcam	ab22885
MAP2	ニワトリ	1/10000	Abcam	AB5392
ネスチン	マウス	1/500	Neuromics	MO15012
Nkx2.1 (TTF1)	ウサギ	1/1000	Epitomics	2044-1
Nkx2.1 (TTF1)	ヤギ	1/100	SCBT	sc-8762
NOS	ウサギ	1/1000	Immunostar	24287
OLIG2	ウサギ	1/1000	Millipore	AB9610
バルブアルブミン	マウス	1/2000	Millipore	MAB1572
バルブアルブミン	ウサギ	1/2000	Swant	PV25
PAX6	マウス	1/250	DSHB	PAX6
PAX6	ウサギ	1/1000	Covance	PRB-278P
PSD-95	ウサギ	1/2000	Zymed	51-6900
RAX	マウス	1/250	Abnova	H00008575-B01
SATB2	マウス	1/100	Abcam	ab51502
SC121	マウス	1/1000	Stemcells	AB-121-U-050
ソマトスタチン	ラット	1/250	Millipore	MAB354
TBR1	ウサギ	1/1000	Abcam	ab31940
TH	マウス	1/1000	Immunostar	22941
TuJ1	マウス	1/500	Covance	MMS-435P
VGAT	ウサギ	1/2000	Synaptic Systems	131003
VGLUT1	モルモット	1/5000	Millipore	AB5905
VIP	ウサギ	1/1000	Immunostar	20077

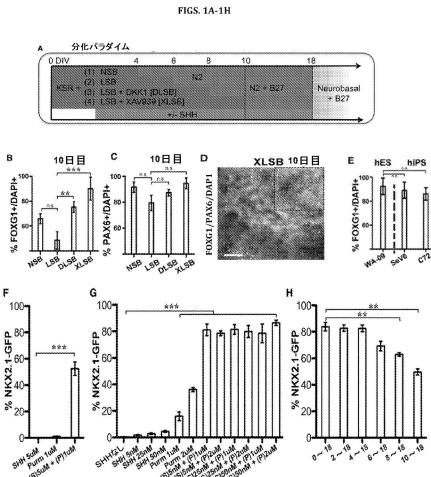
10

20

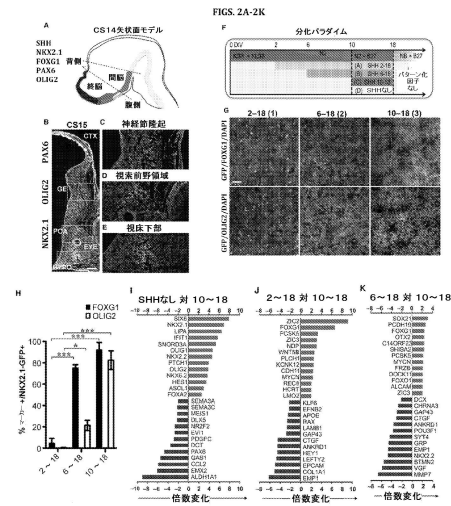
30

40

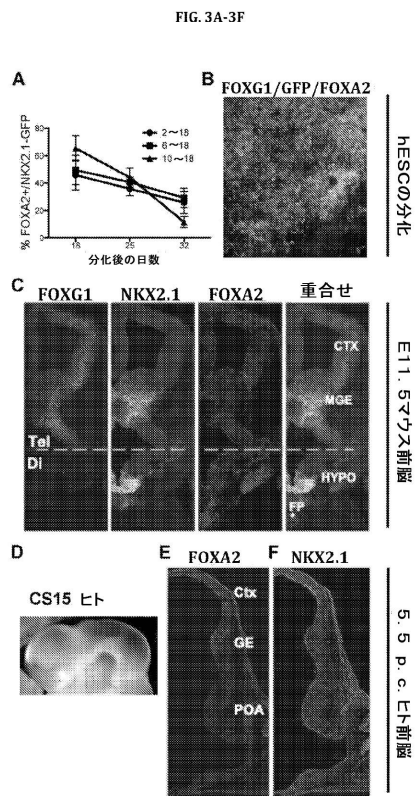
【図 1】



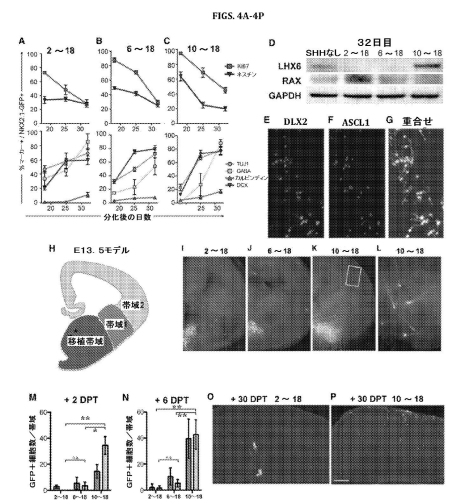
【図 2】



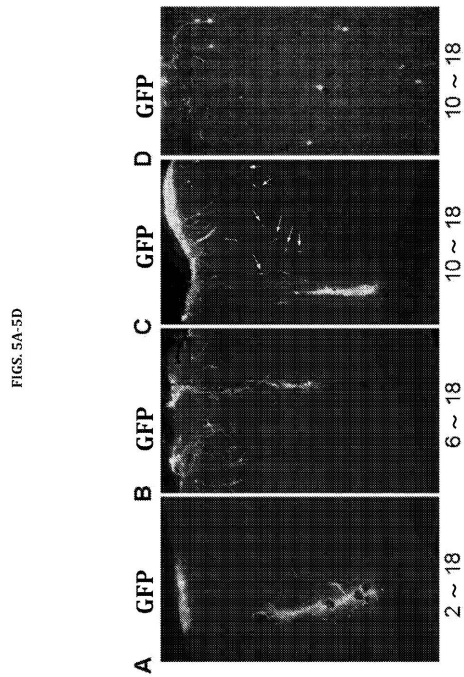
【図 3】



【図 4】

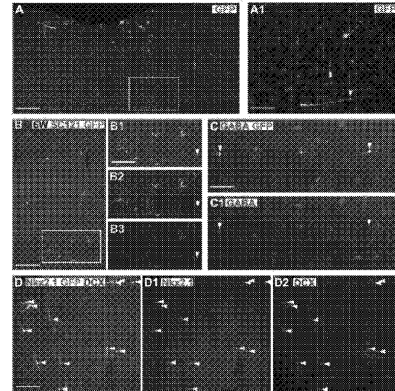


【図 5】



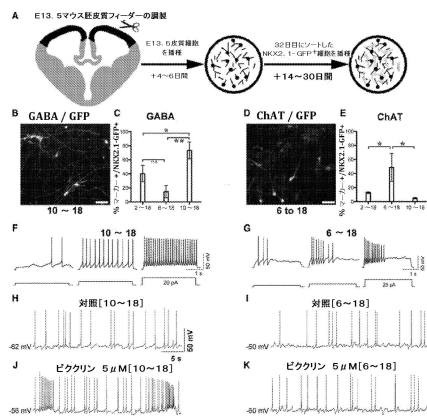
【図 6 A - 6 D 2】

FIGS. 6A-6D2



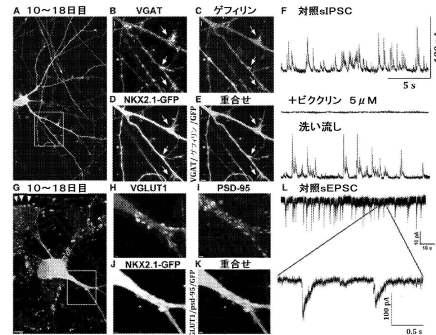
【図 7】

FIGS. 7A-7K



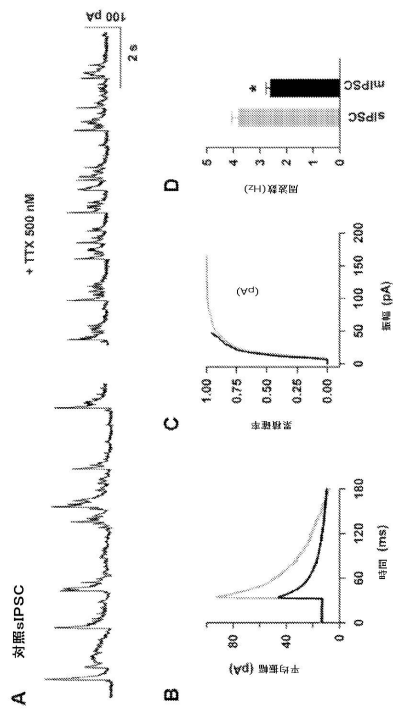
【図 8】

FIGS. 8A-8L



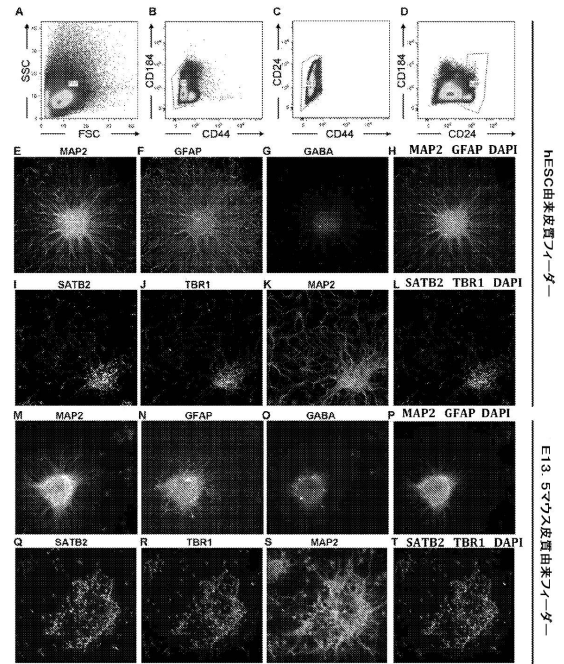
【図 9】

FIGS. 9A-9D



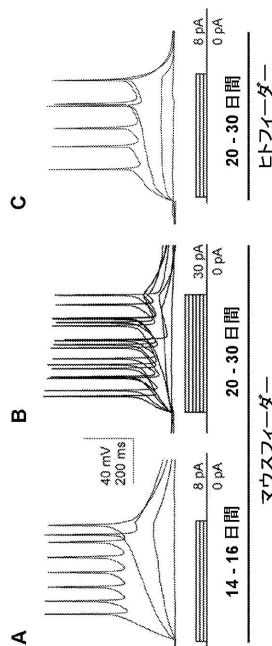
【図 10】

FIGS. 10A-10T



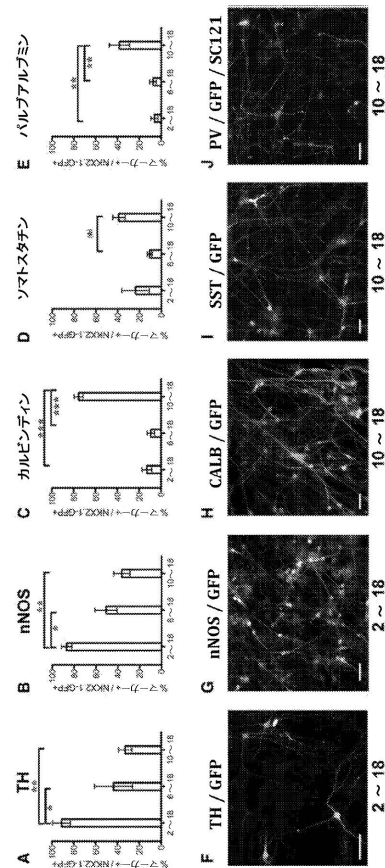
【図 11】

FIGS. 11A-11C



【図 12】

FIGS. 12A-12J



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 35/30 (2015.01) A 6 1 K 35/30
A 6 1 L 27/38 (2006.01) A 6 1 L 27/38 3 0 0
A 6 1 P 21/00 (2006.01) A 6 1 P 21/00
- (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
- (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
- (72)発明者 スチューダー, ローレンツ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, イー. 6 8 ティーエイチ ス
 トリート 4 1 5
- (72)発明者 マルーフ, アシフ エム.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 7 2 0, ボウイー, バッカス ドライブ 1 2 1 0 6
- (72)発明者 アンダーソン, スチュアート
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 1 0 4 - 5 1 2 7, フィラデルフィア, シビック セ
 ンター プールバード 3 6 1 5, アーク 5 1 7, ユーペン スクール オブ メディシン
 , チルドレンズ ホスピタル オブ フィラデルフィア 気付

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 5 4 5 7 (WO, A 1)
 国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 8 1 7 0 (WO, A 1)
 特表 2 0 1 1 - 5 0 4 7 5 3 (JP, A)
 特表 2 0 1 0 - 5 3 6 3 5 7 (JP, A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 0 2 8 9 7 (US, A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 4 8 5 4 9 (US, A 1)
 Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2011, Vol.108, No.48, pp.19240
 -19245
 Cell Stem Cell, 2010, Vol.6, pp.336-347

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 5 / 0 0
 PubMed