

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-521469

(P2015-521469A)

(43) 公表日 平成27年7月30日(2015.7.30)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0797 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 0 2 T 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2015-517358 (P2015-517358)	(71) 出願人	504006021
(86) (22) 出願日	平成25年6月11日 (2013. 6. 11)		ロンザ ウォカズビル インコーポレー
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月26日 (2015. 1. 26)		ティッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/045184		アメリカ合衆国 メリーランド州 ウォー
(87) 国際公開番号	W02013/188407		カズビル ビッグス フォード ロード
(87) 国際公開日	平成25年12月19日 (2013. 12. 19)		8 8 3 0
(31) 優先権主張番号	61/658, 061	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成24年6月11日 (2012. 6. 11)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト人工多能性幹細胞からの運動ニューロン前駆細胞 (MNP) のインビトロ分化およびMNPの凍結保存法

(57) 【要約】

ヒト胚幹細胞 (hESC) および人工多能性幹細胞 (iPSC) の運動ニューロン前駆細胞 (MNP) への開始および分化のための方法を開示する。MNPを凍結保存する方法もまた開示する。これらの方法は詳しくは、後の治療応用のために、MNPの単純で効率的で大規模に実現可能で再現可能な作製、およびその後の凍結維持に関する。これらの方法は、hESCおよびiPSCの様々な株からMNPを産生するために用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、インビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞（MNP）を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞（hESC）またはヒト人工多能性幹細胞（iPSC）を、フィーダー細胞上で培養する段階；

採取前の24時間、hESC培地とMNP誘導培地の混合物をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェア培養物を約10～12日間腹側化する段階；

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経ロゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経ロゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階と、Matrigelコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いてMNPを約4～5日間発達させる段階；

トリプシンを用いてマトリクスコーティングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによってMNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

【請求項 2】

採取したMNPの純度が少なくとも75～95%である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

フィーダー細胞が、マウス胚性線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、またはヒト包皮線維芽細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/mlであり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μMである、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

hESC培地とMNP誘導培地の混合物が約1：1の比率である、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

hESC培地、Knockout DMEM、20% KOSR、アミノ酸、および増殖因子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

MNP誘導培地、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物を含み、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27が添加されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

以下の段階を含む、MNPを凍結保存する方法：

(a) 採取したMNPを含む上清を遠心分離する段階；

(b) 得られたMNPの沈降物を凍結培地中で再浮遊させる段階と、クライオバイアルに入れアリコートにする段階；

(c) MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーに移す段階；

(d) 速度制御フリーザーにおいてMNPを含むクライオバイアルをプログラムされた凍結

10

20

30

40

50

ロセスに供する段階；および

(e) 長期間保存するために、プログラムされた凍結後に、MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーから液体窒素デュワーに移す段階。

【請求項10】

回収した凍結保存MNPの生存率が融解後約85~95%である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

採取したMNPの純度が凍結保存前に少なくとも80~90%である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

凍結培地が、DMSOと予め調合した、最適化されcGMP準拠産生され無タンパク質かつ無血清の凍結培地である、請求項9に記載の方法。

10

【請求項13】

凍結培地がCryoStor CS10である、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

以下のパラメータをさらに含む、請求項9に記載の方法：

(a) プログラム可能な速度制御フリーザーを用いてクライオバイアルを5 に平衡化する段階；

(b) フリーザーチャンバー温度が約5~-10 に達するまで、フリーザーを0.5~2 /分の速度で冷却する段階；

(c) フリーザーチャンバーが約-35 ~-50 の温度に達するまで、フリーザーを20~30 /分の速度で冷却する段階；

20

(d) フリーザーチャンバーを、5 /分~20 /分の速度で-10 ~-20 に加温する段階；

(e) フリーザーチャンバーを、0.5~2 /分の速度で-30 ~-50 に冷却する段階；

(f) フリーザーチャンバーを、5 /分~15 /分の一定速度で-70 ~-100 に冷却する段階；および

(g) フリーザーからMNPを含むクライオバイアルを取り出す段階と、液体窒素での保存に移す段階。

【請求項14】

以下の段階を含む、cGMPに従ってインビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞(MNP)を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞(hESC)またはヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を、フィーダーを含まない条件で、およそ60~80%コンフルエンスに達するように少なくとも5日間培養する段階；

30

採取前の24時間のあいだ、無血清で異種由来成分を含まずかつ既知成分の培地をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

無タンパク質の酵素性ではない継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェアを約10~12日間腹側化する段階；

40

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経口ゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経口ゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階；

無タンパク質の既定のマトリクスコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

；

FGF-2を添加した異種由来成分を含まない既知組成のMNP誘導培地を用いてMNPを約4~5日間発達させる段階；

無タンパク質の既知組成の継代溶液を用いて、無タンパク質の既定のマトリクスコーテ

50

イングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによって、MNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

【請求項 15】

採取したMNPの純度が少なくとも60～90%である、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/mlであり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

FGF-2がcGMP準拠グレードの材料である、請求項14に記載の方法。

【請求項 18】

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μMである、請求項14に記載の方法。

【請求項 19】

既知組成で異種由来材料を含まない培地とMNP誘導培地の混合物が約50：50の比率である、請求項14に記載の方法。

【請求項 20】

既知組成で異種由来材料を含まない培地が、ビタミン、組換え型アルブミン、非必須アミノ酸、およびcGMP準拠グレードの増殖因子を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 21】

MNP誘導培地が、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物であり、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27が添加されている、請求項14に記載の方法。

【請求項 22】

B27、インスリン、FGF-2、およびトランスフェリンがcGMP準拠グレードの材料である、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

培養する段階が少なくとも5日間である、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2012年6月11日に提出された"METHOD OF IN VITRO DIFFERENTIATION OF MOTOR NEURON PROGENITORS (MNPS) FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND CRYOPRESERVATION OF MNPS,"と題する米国特許仮出願第61/658,061号に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)株およびヒト胚幹細胞(hESC)株からの運動ニューロン前駆細胞(MNP)の産生に関する。より詳しくは、本発明は、様々なhESC株およびiPSC株から75～90%より高い純度の機能的MNPを産生させる方法を提供する。本発明はまた、MNPの凍結保存にも関する。より詳しくは、本発明は、融解後に、非常に生存率が高くかつ機能的な細胞の、90%より多くの回収を可能にするMNPの凍結保存法を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ニューロンは、その構造および機能に基づいて分類されうる。構造学上の分類は、ニューロンの細胞体から伸びる突起の数に基づく。これに対し、機能的分類は、ニューロンが

10

20

30

40

50

神経インパルスを伝達する方向に基づく。運動ニューロン(MN)は、脳および脊髄からエフェクター(筋肉または腺のいずれかでありうる)に神経インパルスを伝達する(すなわち、中枢神経系から遠ざかる)遠心性ニューロンである。MNのサテライト形状の細胞体は、1本の長い軸索(エフェクターとの神経筋接合部を形成する)および細胞体から突出するいくつかのより短い樹状突起につながっている。神経学および新薬開発の研究施設は、従来、MN機能の研究、ならびに筋萎縮性側索硬化症(ALSまたはルー・ゲーリグ病としても知られる)および脊髄性筋萎縮などの関連疾患の研究を齧歯類モデルに依存してきた。しかし、hESCおよびiPSCが利用できることなどの幹細胞研究の最近の進歩により、MNおよび関連疾患を研究するためのヒトモデルを開発する機会が与えられている。

【0004】

hESCおよびiPSCに関する現在のMN分化プロトコールは、胚様体形成、および間質フィーダー細胞の共培養によるかまたは選択的生存条件による方向性の分化に依存している。現在のMN作製法(Hu et al. 2010; Karumbayaram et al. 2009, Bounltng et al. 2011; US S2011/0091927A1; Nature Biotechnology 29:279-286 2011)は、互いに似通っており、一般的に全てがレチノイン酸の存在下およびsonic hedgehog経路の誘導下でhESCまたはiPSCのいずれかから胚様体または凝集体を作製する段階を含む。次に、MNの生存を促進するために、凝集体を神経栄養因子と共に培養において維持する。Okano and Shimazaki (US 7,294,510)は、胚様体を形成するためにnogginを用いてES細胞を神経幹細胞に分化させる別の方法を記述している。次に、胚様体を、レチノイン酸を用いずに線維芽細胞増殖因子およびsonic hedgehogタンパク質の存在下で浮遊培養に供して、神経幹細胞の形成を誘導する。最終的に、神経幹細胞は、神経膠細胞が混入することなく、運動ニューロンおよびGABA作動性ニューロンのみへと分化する。胚様体/凝集体形成を用いない他の方向性の分化法(Karumbayaram et al. 2009) Stem Cells; 27(4) 806-811; 2009もMNの作製の成功を示したが、効率は非常に低かった。

【0005】

現在の方法は、複雑で、冗長であり、得られる収率は低い。Zhang and Li (US 7,588,937)もまた、開始時点でマウス胚性線維芽細胞フィーダー上で生育するhESCを用いることによる脊髄運動ニューロンの産生法を記述している。これらの細胞は、浮遊培養で胚様体を形成し、レチノイン酸、およびレチノイン酸とsonic hedgehogとの併用を用いて、ロゼット構造で分化し続ける。この方法によるMNPの収率は、約20~50%の純度であった。米国特許第8,137,971号は、hESCからMNを作製するために今のところ利用可能な最も効率的な方法を開示している。しかし、この方法は、フィーダー細胞を含まない条件でhESCを培養する。MNPを効率よく産生するために十分な神経の誘導を一貫して達成することは難しい。さらに、この方法は、1つのhESC細胞株について成功しており、およそ65%の純度でMNPを産生する。それゆえ、このプロセスは、示されるほど効率的ではない。他の研究(Hu et al. 2010; Karumbayaram et al. 2009, Bounltng et al. 2011; PNAS 107(9) 4335-4340; 2010; Stem Cells; 27(4) 806-811; 2009; Nature Biotechnology 29:279-286 2011)は、MNPを多数のiPSC株から産生できることを証明することに成功している。しかし、これらの研究は非常にばらつきが大きく、非効率的である。現在のところ、iPSCからMNPを再現よく産生するために、単純で、効率的で大規模に実現可能な最適化されたプロセスはない。それゆえ、hESCおよびiPSCの様々な株からMNPを産生するための単純かつ効率的な方法が必要である。加えて、後の治療応用のために、大規模に実現可能で再現可能であるMNPを産生する方法が必要である。

【0006】

加えて、MNPが効率的に回収されるMNPの凍結保存に関して利用可能な方法はない。現行のMNPの凍結保存法は、B27を添加した無血清の基本培地と共に高濃度のDMSOを用いており、凍結は、Nalgene(登録商標)「Mr. Frosty」(Sigma-Aldrichから入手可能)などの凍結容器を用いて、イソプロパノールの存在下で、-80℃まで約-1℃/分の遅い冷却速度を提供する機械的-80℃フリーザーによって行われ、その後、凍結容器を液体窒素中に入れる。この単純な凍結法は、MNPおよび他の細胞タイプの凍結保存に関して奏功するが、融解

10

20

30

40

50

後のMNPの回収は、必ずしも一貫しておらず、決して90%より高い細胞生存率に達することはない。これは、凍結容器が冷却速度の制御を有しないという事実による可能性がある。この冷却速度は、機械的-80フリーザーがその温度を維持する能力に依存している。さらに、同様に、フリーザーの棚での位置および棚のある場所によって温度の変動が存在することから、フリーザー内での位置にも依存する。それゆえ、凍結細胞を一貫して高い生存率および機能性を有するように融解することができるMNPの凍結保存法が必要である。

【発明の概要】

【0007】

したがって、本発明の目的は、ヒト多能性細胞（hESCおよびiPSCを含む）からMNPを産生する、単純で、効率的で、大規模に実現可能で、および再現可能な方法を提供することである。

10

【0008】

本発明のさらなる目的は、凍結細胞を高い生存率および機能性で融解することができるMNPの凍結保存法を提供することである。

【0009】

本発明のさらなる目的は、多能性幹細胞全般に、特に人工多能性幹細胞に応用することができる方法を提供することである。

【0010】

本発明のさらなる目的は、細胞の起源によらず応用可能な普遍的方法を提供することである。

20

【0011】

本発明のさらなる目的は、MNPのより高い頑健性および生存率を提供することである。

【0012】

本発明のさらなる目的は、回収したMNPの、90%より高い生存率を提供することである。

【0013】

本発明のさらなる目的は、細胞の集塊を減少させることである。

【0014】

本発明のさらなる目的は、凍結細胞を高い回収率で融解することができるMNPの凍結保存法を提供することである。

30

【0015】

本発明のさらなる目的は、iPSCおよびhESCを培養するためにマウス胚性線維芽細胞（MEF）フィーダー細胞の使用を含む方法を提供することである。

【0016】

1つの代表的な態様において、マウス胚性線維芽細胞上で少なくとも6~7日間生育させたhESCまたはiPSCを採取することによって、インビトロでMNPを産生する方法が提供され、これらの未分化のhESCまたはiPSCは、無血清の運動ニューロン誘導培地を含む超低接着性のフラスコに播種して約5日間培養することによって神経化される。誘導培地は、増殖因子、非必須アミノ酸、L-グルタミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、およびB27を含む古典的な培地であり、スフェアを作製するためにbFGFおよびレチノイン酸が添加されている。ニューロスフェアの形成を促進するために、低濃度のbFGFを添加した誘導培地を用いて、培養スフェアを約10日間腹側化する。浮遊培養ニューロスフェアを、より小さいスフェアへと機械的に解離させ、接着表面上で神経ロゼットまたは初期MNPとして約5日間発達させる。その後、接着した初期MNPを、トリプシン溶液を用いて解離させ、MNP細胞をさらに濃縮するために誘導培地を含むゼラチンコーティングフラスコに移す。非接着細胞を、ゼラチンコーティングフラスコから集めて、誘導培地を含むMatrigel（登録商標）などのマトリクスコーティングフラスコ中で接着細胞として再播種し、繰り返し培養して、誘導培地を約5~6日間毎に交換する。次に、接着した後期MNPを、トリプシン溶液を用いてマトリクスコーティングフラスコから採取する。MNP細胞をさらに濃縮して、

40

50

混入細胞を除去するために、得られた細胞浮遊液をゼラチンコーティングフラスコに移す。ゼラチンコーティングフラスコ由来の非接着MNPを集めて、大きい細胞塊を遠心管に沈降させる。大きい細胞塊を沈降させた後、MNPを遠心管の上清から集めて、凍結保存MNPとして保存することができる。

【0017】

1つの代表的な態様のある局面において、bFGFの濃度は、未分化hESCまたはiPSCの播種の初日から培養7日目までは誘導培地中で10 ng/mlで用いられ、培養8日目からMNPの採取まではbFGF濃度を5 ng/mlに減少させる。

【0018】

1つの代表的な態様のある局面において、レチノイン酸の濃度は、培養1日目から7日まで10 μMで用いられる。

【0019】

別の代表的な態様において、採取したMNP含有上清を遠心分離して、得られたMNPの細胞沈降物を、DMSOと予め調合した、冷却された無タンパク質かつ無血清の凍結培地に、クライオバイアル中で浮遊させる。そのような凍結培地の例には、BioLife of Seattle, WAによるCRYOSTORE (登録商標) CS10溶液を挙げうる。例として、10% DMSOもまた細胞を凍結するために用いられ、最適化されうる。クライオバイアルを、速度制御フリーザーに移して、プログラムされた凍結プロセスに供する。その後、クライオバイアルを、速度制御フリーザーから、長期保存のために液体窒素デュワーに移す。

【0020】

典型的に、凍結保存幹細胞を再構成すると、融解後に生存しているのは細胞の70%以下である。本明細書において開示されるMNPの凍結保存のさらなる局面は、再構成時に70%またはそれより多くの、および詳しくは90%またはそれより多くの細胞が融解後生存していることである。

【0021】

これらおよび他の目的は、本発明において達成される。本発明は、様々なhESCおよびiPSC株からMNPを分化させるための、単純で、非常に効率的で大規模に実現可能で、および再現可能な方法を提供することによって、治療応用のためにMNPを産生する現行の方法の主要な欠点を克服する。本明細書において開示される1つの発明は、iPSCおよびhESCを培養するためにマウス胚性線維芽細胞 (MEF) フィーダー細胞を用いることである。hESCを、本来の手法で、未分化状態でのhESCの持続的生育を可能にするMEF層上で誘導および培養した (Amit et al 2003; *Biology of Reprod* 68:2150-2156)。インビトロにおいて、hESCは、MEFフィーダー層の非存在下で培養すると分化する傾向があった (Thomson et al 1998 *Science* 282 (5391) 1145-7)。フィーダー細胞はまた、ヒト包皮線維芽細胞または成人ファローピウス型上皮細胞などのいくつかのヒト細胞タイプにも由来している (Amit et al 2003 *Biology of Reproduct* 22(5) 1231-8; Richard et al 2002 *Nat Biotech* 20 (9) 933-6; Richards et al 2003. *Stem Cells* 21(5)546-56; Hovatta et al 2003. *Human Reproduction* 18(7) 1404-9; Choo et al 2004. *Biotech and Bioengineering* 88(3) 3 21-33)。しかし、異なるタイプのヒトフィーダー細胞がhESCの未分化での生育を支持する能力は多様である (Richards et al 2003 *Stem Cells* 21(5)546-56; Eiselleova et al 2008. *J of Devel Biol* 52(4) 353-63)。アクチビンAおよび塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、幹細胞の多能性状態を維持する上で重要な要因である (Eiselleova et al 2008. *J of Devel Biol* 52(4) 353-6315; Xiao et al 2006. *Stem Cells* 24(6) 1476-86)。マウスフィーダー細胞は、ヒトフィーダー細胞より多くのアクチビンAを発現するが、ヒトフィーダー細胞と同様にbFGFを発現しない (Eiselleova et al 2008. *J of Devel Biol* 52(4) 353- 6315)。ヒトフィーダー細胞と比較すると、MEFはいくつかのhESC細胞株の未分化状態での生育をより良好に支持するように思われるが、ヒトフィーダー細胞ではより自発的な分化およびより低い割合のSSEA3陽性細胞が観察されうる (Eiselleova et al 2008. *J of Devel Biol* 52(4) 353-6315)。培養フィーダー細胞は、多数の特徴付けされていない増殖因子、サイトカイン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、様々なタイ

10

20

30

40

50

ブのコラーゲン、ニドゲン、およびラミニンなどの細胞外マトリクス（ECM）成分を分泌する。フィーダー細胞によって分泌されるこれらの前述のECMタンパク質、増殖因子、およびサイトカインは、hESC/iPSCが接着するための足場をhESC/iPSCに提供し、かつhESC/iPSCが増殖してその多能性を維持するためのシグナルを提供する。本発明者らは、フィーダー細胞を用いることによって、これらの細胞が、運動ニューロン分化プロセスのその後の神経化および腹側化のステップに関してより良好な条件でプライミングされるようにiPSCおよびhESCの多能性状態が維持されることを、予想外に見いだした。現在利用可能な技術に対するこの重要な方法論の変化によって、神経化能が改善され、それによってMNPの機能的でより均一な集団が得られる。加えて、本発明の方法は、多様なiPSCおよびhESC細胞株のために用いることができ、高純度のMNPを一貫した収量で得ることができる。したがって、本発明の方法は、マトリクスゲルなどのフィーダー細胞を含まない条件下でhESCを培養する段階を必要とする現行の技術（米国特許第8,137,971号）に対して有意な改善を有する。

10

【0022】

本発明はまた、長期保存から融解後の細胞回収を改善するために、既知組成の凍結保護剤の使用および速度制御フリーザーの使用を含む、MNPを非常に効率的に凍結保存する方法も紹介する。先行技術に対する後者の改善により、MNPの長期保存が可能となり、これは後の応用においてより大きい実験的柔軟性を提供する。分化プロセスの際の凍結保存により、MNPを商業的製造するための効率が高くなる。

20

【0023】

このように、以下のその詳細な説明がよりよく理解されうるために、および当技術分野に対する本発明の貢献がよりよく認識されうるよう、本発明の特徴をどちらかといえば広く概説してきた。当然、以下にさらに詳述される本発明の追加の特徴が存在する。実際に、前述の一般的説明および以下の詳細な説明はいずれも、例示的および説明的であり、特許請求される本発明のさらなる説明を提供すると意図されると理解されるべきである。

【0024】

この点において、本発明の少なくとも1つの態様を詳細に説明する前に、本発明は、その応用が、以下の説明に記載されるかまたは図面に例示される構築の詳細および成分の組み合わせに限定されないと理解される。本発明は、他の態様を行うことができ、様々なやり方で実践および行うことができる。同様に、本明細書において用いられるフレーズおよび用語は、説明目的のためであり、制限すると解釈すべきではないと理解されるべきである。

30

【0025】

そのため、当業者は、本開示に基づく概念が、本発明のいくつかの目的を行うために、他の方法、システム、キット、および組成物を設計するための基礎として容易に利用されることを認識するであろう。それゆえ、同等の構築物は、それらが本発明の主旨および範囲から逸脱しない限り、それらも本発明に含まれることは重要である。

【0026】

添付の図面は、本発明のさらなる理解を提供するために含まれ、本明細書に組み入れられて、本明細書の一部を構成し、本発明のいくつかの態様を例示して、説明と共に本発明の原理を説明するために役立つ。

40

【図面の簡単な説明】**【0027】**

【図1】 MNP製造プロセスを例証する。

【図2】 図2A~Eは、(A) MEFフィーダー上での培養iPSC；(B) 8日目の、尾側化後の浮遊培養条件でのニューロスフェア；(C) 18日目の、腹側化後の浮遊培養でのニューロスフェア；(D) 初期MN前駆細胞の遊走を示す、接着基質上に播種されたニューロスフェア；および(E) 初回精製後の、初期MN前駆細胞の発達を示す。

【図3】 図3A~Cは、28日目の、凍結保存前のMNPの特徴の画像を提供する：(A) MNP特異的マーカーIslet 1；(B) MNP特異的マーカーHB9；および(C) ニューロフィラメントタ

50

ンパク質 (Tuj1)。

【図4】図4A~Cは、凍結保存後、および融解後3日目の、PDL/ラミニンコーティング表面に再播種したMN前駆細胞の画像を示す：(A)分岐した形態を有する、凍結保存後に融解したMN前駆細胞；(B)ニューロフィラメント (Tuj1、緑色) およびGFAP (赤色)、およびDAPI核染色 (青色)；ならびに (C) MN前駆細胞のHB9 (赤色) 転写因子マーカーおよびニューロフィラメント (Tuj1、緑色)。

【図5】ラミニンコーティング段階におけるB27の非存在下および存在下でのMNPの成熟を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

10

発明の詳細な説明

本明細書において、hESCおよびiPSCの様々な株からのMNPの産生法を提供する。

【0029】

その例が添付の図面に例示される、本発明の代表的な態様をより詳細に参照する。

【0030】

材料および装置のリスト

以下は、本発明において用いられる材料、試薬、および装置のリストである。当業者は、本発明の材料、試薬、および装置が、例として提供されるに過ぎず、同様に機能する材料、試薬、および装置を、過度の実験を行うことなく、リストに記載の材料、試薬、および装置の代わりに用いることができることを理解する。装置のリスト：層流バイオセーフティキャビネットクラスII、遠心分離器、水浴槽、インキュベータ、冷蔵庫、第一のフリーザー、第二のフリーザー、ピペットエイドまたはピペットボール、マルチチャンネルピペッター、マルチチャンネルアスピレータ、顕微鏡、種々のピペッターおよびピペットチップ、血球計算盤、NucleoCounter (登録商標) (Lonza)、セルスクレイパー (Corning 3010)、T-25フラスコ (Corning 430639)、T-75フラスコ (Corning 430641)、T-75超低接着フラスコ (Corning 3814)、15 ml遠心管 (BD Falcon 352097)、50 ml遠心管 (BD Falcon 352098)、吸引ピペット (BD Falcon 357558)、種々の血清ピペット (BD Falcon 356543、357551、357525、357550)、50 ml Steriflip (登録商標) チューブ (Millipore SCGP00525)、50 ml 試薬リザーバー、精密天秤、種々のNalgene (登録商標) ボトル (Fisher Scientific 339072、2923145、0292500A、および0292500B)、クライオバイアル (Corning 430659)、Technicloth (登録商標) ワイプ、トリパンブルー溶液、70% イソプロパノール、2% Bacdown (登録商標) (Fisher Scientific 04-355-13)、細胞培養用水 (Lonza)、hESC培地、MNP基本培地、MNP播種用培地、MNP維持培地、10 μg/ml bFGF保存液 (BioSource PHG0263 (1 mg粉末))、レチノイン酸 (Sigma-Aldrich R2625)、TrypLE (登録商標) 溶液 (Gibco 12605-010)、DPBSおよび1 mM EDTA中で調合した組換え型ブタトリプシン、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、L-グルタミンを含むおよび/または含まない低浸透圧培地、またはhESCおよびiPSC用Hepes緩衝液、ポリ-D-リジン (Sigma-Aldrich P740 5-5MG)、ラミニン溶液 (Roche 11243217001)、高グルコースDMEM (Thermo Fisher SH30 08101)、凍結乾燥IV型コラーゲン (Gibco 17104-019)、DMSOと予め調合した、最適化されcGMP準拠産生され無タンパク質かつ無血清の凍結培地、ラミニン希釈標準液、ポリ-D-リジン保存液、ポリ-D-リジン希釈標準液、コラゲナーゼIV希釈標準液、およびレチノイン酸保存液。

20

30

40

【0031】

少なくとも1つの態様において、水浴は約37 °Cである。

【0032】

少なくとも1つの態様において、インキュベータは、5% ± 2% CO₂ および湿潤大気を伴って37 °C ± 2 °C を維持することができる。

【0033】

少なくとも1つの態様において、冷蔵庫は約2~8 °C を維持することができる。

【0034】

50

少なくとも1つの態様において、第一のフリーザーは、約-20~-30 を維持することができる。

【0035】

少なくとも1つの態様において、第二のフリーザーは、約-78~-82 を維持することができる。

【0036】

少なくとも1つの態様において、hESC培地は、20%KOSR、glutamax、非必須アミノ酸、およびbFGFならびにメルカプトエタノールを添加したKnockout DMEM、古典的な高グルコースDMEMと、インスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27 (NSF1) を添加したDMEM/F12との50:50混合物などのMNP誘導培地である。混合した後、培地は14日以内に使用した。

10

【0037】

少なくとも1つの態様において、MNP基本培地は、L-グルタミンを含むまたは含まない、B27 (NSF1)、非必須アミノ酸、インスリン、トランスフェリン、セレン、Hepes、塩化マグネシウム、硫酸亜鉛、および硫酸銅を添加した古典的な高グルコースDMEMである。混合後、培地は14日以内に使用した。

【0038】

少なくとも1つの態様において、MNP播種培地は、B27 (NSF1) およびL-グルタミンを添加したMNP基本培地である。

【0039】

少なくとも1つの態様において、MNP維持培地は、B27 (NSF1) を添加したMNP基本培地である。

20

【0040】

少なくとも1つの態様において、低浸透圧培地は、KnockOut DMEM/F12 (Gibco 12660-012) である。

【0041】

少なくとも1つの態様において、DMSOと予め調合した、最適化されcGMP準拠産生され無タンパク質かつ無血清の凍結培地は、CryoStor (登録商標) CS10 (BioLife (登録商標) 溶液、210102) である。

【0042】

少なくとも1つの態様において、ラミニン標準希釈液は、ラミニン保存液300 μ lをMNP基本培地 (15 μ g/ml) 10 ml中で混合することによって希釈したラミニン保存液 (500 μ g/ml) である。

30

【0043】

少なくとも1つの態様において、滅菌クライオバイアル10個にラベルをつけて、使用前の30分間、-20 で保存した。Sigmaのポリ-D-リジン粉末5 mgを、層流フード内で細胞培養用水10 ml中で少なくとも30分間再水和させた。再水和させたポリ-D-リジン保存液 (50 μ g/ml) を1 ml/バイアルのアリコートにして、コーティングに必要となるまでこのアリコートは-20 で保存した。

【0044】

少なくとも1つの態様において、ポリ-D-リジン保存液の1 mlアリコートを融解して、これをPBS 9 ml中で混合することによって希釈した。ポリ-D-リジンの標準希釈溶液 (50 μ g/ml) をコーティングのために用いた。

40

【0045】

少なくとも1つの態様において、コラゲナーゼIV標準希釈液は、1 mg/mLコラゲナーゼ溶液 (T-75フラスコに関して7.5 mlおよびT-25フラスコに関して2.5 ml) の0.1 ml/cm²である。計算されたコラゲナーゼ溶液量に2を乗じることによって、適当なミリグラム量のコラゲナーゼ粉末を、精密天秤を用いて量りとった。量りとったコラゲナーゼを50 mlチューブに移して、低浸透圧DMEM/F12培地、たとえば、Life Technologies社のKnockout (商標) DMEM/F12の計算量を添加した。コラゲナーゼが全て完全に溶解するまでかき混ぜるこ

50

とによって溶液を十分に混合して、使用前に0.22 μ mフィルターを通して濾過した。溶液を4 で保存して、1週間以内に使用した。

【0046】

少なくとも1つの態様において、レチノイン酸のアリコート調製の際には、材料を光に長い間あてないように注意した。1つの態様において、アリコートを層流フード内で、フードの照明を消して可能な限り迅速に調製した。レチノイン酸の100 mgバイアルを消毒して、それを層流フード内に入れた。ガラスバイアルの先端を注意深く切って、医療廃棄物用容器の中に捨てた。1 mlシリンジフィルターを用いて、ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液1 mlを加えて、レチノイン酸粉末を溶解した。混合物を50 mlチューブに移して、ガラスバイアルをDMSO各1 mlによって3回すすいだ。すすぎ液を、レチノイン酸混合物を含む50 mlチューブに移した。さらにDMSO 12.6 mlをチューブに添加して、数回上下にピペティングすることによって十分に混合した。これによって、20 mMレチノイン酸保存液が作製された。200 μ lピペットを用いて、保存液の100 μ lアリコートを、500 μ lの褐色チューブ中で作製して、チューブを直ちに-80 のフリーザーに入れた。

10

【実施例】

【0047】

実施例1

hESCの分化

材料および実験設計

運動ニューロン分化の開始0日目

20

ヒトESCまたはiPSCを、T75フラスコ中でhESC増殖培地 (Knockout DMEM/F12、20% KSR、Glutamax、NEAA、BME、およびbFGF) を用いてMEFフィーダー細胞と共培養した (図2A)。細胞密度がおよそ80%コンフルエンスに達した時に、hESCを開始した。T75フラスコの使用済み培地を、10 ng/ml bFGFを添加したhESC培地とMNP誘導培地の1:1混合物30 mlに交換した。24時間後、hESC/iPSCコロニーを、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/ml) を用いて解離させて、解離した細胞を、10 ng/ml bFGFおよび10 μ Mレチノイン酸を添加したMNP誘導培地に浮遊させた。次に、細胞浮遊液を超低接着T-75フラスコに移した。

【0048】

細胞凝集体を壊さぬよう、培地を7日間毎日優しく交換した (図2B)。細胞浮遊液を、使用済み培地と共に50 ml遠心管に移した。細胞凝集体 (スフェア) を沈降させて、いかなるスフェアも失うことなく、使用済み培地および細胞の破片を注意深く吸引した。

30

【0049】

8日目からは、レチノイン酸を培地から除去して、bFGF濃度を5 ng/mlに減少させた。多数のニューロスフェアが形成されたが、いくつかは、他の細胞に接着して、より大きい細胞スフェアを形成する傾向を有する (図2C)。同じ手順を用いて、しかし非ニューロスフェアを除去するためにより短い沈降時間で、培地を20日目まで1日おきに交換した。

【0050】

20日目に、使用済み培地と共にスフェアを50 ml遠心管に移した。スフェアを約30秒間沈降させて、使用済み培地を吸引した。スフェアを、新しい培地5~7 mlに浮遊させ、約15~30秒間沈降させて、使用済み培地を吸引した。この洗浄段階を2回繰り返した。スフェアを10 ml血清ピペットによって優しくピペティングして凝集体を破壊し、Matrigel (登録商標) コーティングT-75フラスコに移して、均一に分布させた後、インキュベータに入れた。

40

【0051】

ニューロスフェアはMatrigel (登録商標) コーティング表面に接着し、スフェアからの細胞の遊走および単極性のまたは双極性の伸長を有する細胞の観察が可能であった (図2D)。培地を1日おきに交換した。

【0052】

5日後、培養物をTrypLE溶液によって解離させた。細胞が解離した後、各T-75フラスコに、bFGFを添加したMNP誘導培地15 mlを加えて、細胞凝集体を優しくつぶして、残りのス

50

フェアを破壊した。細胞浮遊液を200 × gで3分間遠心沈降させた。細胞を、bFGFを添加した新しいMNP誘導培地10 mlに浮遊させて、浮遊液をゼラチンコーティングT-75フラスコに移した。T-75フラスコを37 °Cで15分間、動かさないようにインキュベートした。インキュベーション後、全ての非接着細胞をT-75フラスコから集めて、別のゼラチンコーティングT-75フラスコに移した。T-75フラスコを37 °Cで15分間、動かさないようにインキュベートした。全ての非接着細胞をT-75フラスコから集めて、細胞浮遊液を2つのMatrigel（登録商標）コーティングT-75フラスコ（約20 ml/T-75フラスコ）、およびMatrigel（登録商標）を予めコーティングした1つの4ウェルチャンバースライドガラスに均一に分配した。播種したフラスコおよびチャンバーをインキュベータに入れた。

【0053】

10

培地を1日おきに交換した。28日目に、スライドガラスを4%パラホルムアルデヒドによって固定して、ニューロンマーカーTuj1、およびHb9、Islet1を含む特異的運動ニューロンマーカーによって染色した。

【0054】

30日目に、trypLEを用いて25日目のMNPに関して先の章で記述した方法と同じ方法を用いることによって、MNP（図2E）を採取して、非MNP細胞を除去するためにゼラチンコーティングフラスコを用いることによって精製した。MNPをゼラチンコーティングフラスコから非接着細胞として集めた。細胞数および生存率は、NucleoCounterを用いることによって決定した。

【0055】

20

結果

脊椎動物における運動ニューロンの作製は、以下の段階を伴う：外胚葉細胞の神経化、神経外胚葉細胞の尾側化、および尾側化神経前駆細胞の腹側化。図1は、MNP分化プロセスの概要を提供する。神経化を開始するために、既知組成の混合物、すなわち古典的高グルコースDMEMと、インスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27（NSF1）を添加したDMEM/F12との50：50混合物を導入する。次に、hES細胞/iPSCの物理的環境を、接着性のフィーダー細胞条件から非接着性の凝集体条件（浮遊培養）へと変化させて、細胞浮遊液を低接着容器中でさらに20日間培養した。

【0056】

レチノイン酸（RA）を用いることによって尾側化および腹側化を誘導した。細胞凝集体をRAによって1日目から7日目まで処置した。RA処置後、bFGF濃度を5 ng/mlに減少させて、培地交換の頻度を毎日供給から2日間供給スケジュールへと延ばした。これは、神経前駆細胞からのオートクライン因子の蓄積を促進しうる。理論に拘束されたくはないが、オートクライン因子は運動ニューロン分化にとって重要であると考えられる。

30

【0057】

ニューロスフェアの形成後、さらに発達させるために浮遊液をMatrigel（登録商標）コーティング表面に播種した。この期間中、いくつかの平坦な細胞と共にスフェア形成物（ロゼット）から遊走した放射状の配置を有する伸長した細胞も同様に生育するであろう。混入細胞が接着するゼラチンコーティング表面での陰性吸着を用いることによって、初期MNPを精製することができ、MNPを非接着細胞として分離した。

40

【0058】

発達および精製後、凍結保存の前にニューロンマーカーおよびMNP特異的マーカーによってMNPの特徴を調べる。その結果から、28日目に大多数の細胞がHB9、Islet1およびTuj1を発現することが示された（図3）。Oct4などのPSCマーカーおよび神経膠細胞マーカーGFAPは、検出されなかった。中胚葉マーカーSMAの発現は非常に少なかった。

【0059】

実施例2

MNPの採取および凍結保存

材料および実験設計

30日目または31日目に、4つのT-75フラスコを、フラスコあたり7 mlの0.1%ゼラチン溶

50

液でコーティングして、インキュベータ内で30分間インキュベートした。MNP誘導培地およそ150 mlを予め加温した。T-75フラスコからの使用済み培地を吸引して、フラスコをPBS各15 mlによって1回洗浄した。TrypLE溶液5 mlを添加して、3~10分間インキュベートした。ほとんどの細胞が解離するまでフラスコを3分毎に調べた。MNP誘導培地10 mlを各フラスコに添加して、浮遊液を50 ml遠心管に移した。各T-75フラスコをさらに培地10 mlによってすすぎ、溶液を50 mlチューブに移した。チューブを200×gで、室温で3分間遠心分離した。上清を吸引して、細胞沈降物を培地20 mlに浮遊させて、浮遊液をゼラチンコーティングT-75フラスコに移した(10 ml/フラスコ)。遠心管をMNP誘導培地4 mlによってすすいで、溶液をゼラチンコーティングT-75フラスコに移した。T-75フラスコを37℃で15分間、動かさないようにインキュベートした。インキュベーション後、全ての非接着細胞をT-75フラスコから集めて別のゼラチンコーティングT-75フラスコに移し、フラスコを培地3~5 mlによって優しくすすぎ、この溶液をゼラチンコーティングT-75フラスコに移した。T-75フラスコを37℃で15分間、動かさないようにインキュベートした。インキュベーション後、全ての非接着細胞をT-75フラスコから集めて、50 mlチューブに移した。より大きい細胞塊を、チューブの底に3分間沈降させた。上清(溶液の>95%)を新しいチューブに移して、NucleoCounter(登録商標)を用いて細胞を計数した。チューブを200×gで3~5分間、室温で遠心沈降させた。上清を吸引して、冷却CryoStor(登録商標)溶液10 mlを細胞沈降物に徐々に加え、細胞沈降物を優しく浮遊させた。再度、NucleoCounter(登録商標)を用いて計数するために、浮遊液約100~200 µlを採取した。細胞の計数を待つあいだ、残りの細胞液は氷中に置いた。より多くのCryoStor(登録商標)溶液を添加することによって、生存細胞濃度を600万個/mlに調節して、浮遊液1 mlを各クライオバイアルに入れてアリコートとした。プログラム可能な速度制御フリーザーを用いて、以下のパラメータを用いてMNPを凍結した。凍結サイクルが完了した後、凍結プログラムの完了直後にクライオバイアルを液体窒素デュワーに移した。

10

20

30

40

【0060】

結果

-80℃ 機械的フリーザーと共に凍結容器を用いる典型的な方法によるMNPの凍結保存に関するこれまでの研究は、融解後に一貫しない回収および約70~80%の細胞生存率を示した。説明として可能性があるのは、凍結保護剤が利用されていないこと、および-80℃の機械的フリーザー内での位置などの多数の理由により冷却速度が一貫しないことである。凍結保存プロセスの際のMNPの回収を改善するために、冷却速度が確実に一貫するようにするため、凍結保護剤を速度制御フリーザーと共に調べた。トレハロース、マンニトール、およびヘタスターチなどのいくつかの凍結保護剤を、DMSOと併用して用いて、CryoStor CS10(表1)と比較した。凍結前の細胞数を表1に示し、全ての試験条件は、凍結前に約90%の細胞生存率を有した。細胞およそ 6×10^6 個を各クライオバイアルにおいて凍結した。クライオバイアルを全て、表2に示される凍結パラメータによってプログラム可能な速度制御フリーザーを用いて凍結した。凍結保存MNPを液体窒素下で保存した後、37℃の水浴を用いることによって細胞を液体窒素での保存から急速に融解した。細胞数をNucleoCounterによって決定して、生存率を計算した。結果は、CryotoRが他の試験条件より良好な成績を示したこと、および細胞生存率が、融解後一貫して85%より高かったことを示した(表3)。融解したMNPのIsl1およびHB9発現などの運動ニューロンマーカーは、凍結/融解を受けなかったMNP(データは示していない)と比較して正常であった(図4B、図4C)。

【0061】

(表1) MNPを凍結保存するための凍結培地の試験

試験条件	成分	凍結前の 1 mLあたりの 細胞数	凍結前の 生存率
対照	MNP 基本培地+B27 および 10% DMSO	生存: 6.18×10^6 全体: 6.7×10^6	92%
KOSR	MNP 基本培地+ 25% KOSR+B27 および 10% DMSO	生存: 6.19×10^6 全体: 6.7×10^6	92.3%
トレハロース/ マンニトール	MNP 基本培地+5%トレハロース+5% マンニトール+B27 および 10% DMSO	生存: 7.1×10^6 全体: 7.65×10^6	93%
ヘタスターチ	MNP基本培地 +6%ヘタスターチおよび 10% DMSO	生存: 5.98×10^6 全体: 6.4×10^6	93%
CryoStor	登録商標製剤	生存: 5.72×10^6 全体: 6×10^6	95%

10

【 0 0 6 2 】

(表2) MNPを凍結保存するための凍結パラメータ

条件	温度	速度
1. 保持	5°C	
2. 冷却	-5-10°C	0.5-2°C/分
3. 上昇	-35-50°C	10-30°C/分
4. 上昇	-10-20°C	5-20°C/分
5. 冷却	-30-50°C	0.5-2°C/分
6. 上昇	-70-90°C	5-15°C/分
7. 保持	-70-90°C	

20

30

【 0 0 6 3 】

実施例3

運動ニューロンの播種

材料および実験設計

プレートのコーティング

各96ウェルプレートは、ポリ-D-リジン標準希釈液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 mlを必要とした。ポリ-D-リジン標準希釈液の必要量を、滅菌試薬リザーバーに移した。マルチチャンネルピペッターを用いて、96ウェルプレートの各ウェルを、ポリ-D-リジン標準希釈液100 μl によってコーティングして、プレートをインキュベータ内に終夜入れた。インキュベーション後、マルチチャンネルアスピレータを用いてポリ-D-リジン溶液を吸引した。ウェルあたり100 μl のPBSによってウェルを2回すすいだ。プレートの蓋を外して、層流フード内で少なくとも1時間乾燥させると、ラミネンコーティングの準備が整った。ラミネン標準希釈液 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の必要量をMNP基本培地 (B27/NSF1を含まない) 中で調製した。マルチチャンネルピペッターを用いて、ラミネン標準希釈液75 μl をウェルに添加した。プレートを37°Cで少なくとも1時間、6時間を超えないようインキュベートした。ラミネン溶液を吸引した後、細胞を播種する準備が整った。細胞を播種する前にウェルあたり100 μl の培地によってウェルを1回すすいだ。

40

【 0 0 6 4 】

50

MNPの融解

1つのアンブルを37℃水浴中で融解した。凍結保存からの細胞の良好な回収を確保するために、細胞浮遊液を急速に融解したが、37℃で維持することはなくあるいは37℃より上にはしなかった。浮遊液を融解直後に、細胞を15 mlチューブに移して、加温した播種用培地（NFS1およびグルタミンを添加したMNP基本培地）9 mlを、約2分間滴下して加えた。チューブを室温で5分間、200 × gで遠心分離した。上清を吸引して、細胞を新しい播種用培地2 mlに浮遊させて、細胞浮遊液200 μlをNucleoCounter（登録商標）において計数した。細胞数は、ウェルあたり生存細胞40,000個必要であり、播種のために必要な細胞浮遊液を計算した。播種用培地300 μlあたり生存細胞40,000個の最終濃度を有するように計算した細胞浮遊液を浮遊させた。細胞浮遊液を滅菌リザーバーに移して、マルチチャンネルピペットを用いてMNPのウェルあたり細胞浮遊液300 μlを添加した。96ウェルプレートを入れた。プレートを少なくとも24時間、動かさないように放置した。播種の48時間後、マルチチャンネルピペッターを用いて、使用済み培地200 μlを各ウェルから除去して、新しいMNP維持培地200 μlを添加した。供給手順は非常に優しく行った。接着細胞を乱さないように特に注意した。QC試験に合格したプレートは、後続の使用の準備が整うまで記述のように1日おきに培地を交換した。

10

【0065】

結果

これまでの結果から、MNPが成熟プロセスの際に、約7～10日後に集塊を形成する傾向を有することが示された。この集塊の問題の主な理由は不明であった。MNP播種のための96ウェルプレートのポリ-D-リジンおよびラミニンのコーティング手順を分析し、ラミニンコーティング段階はB27を含む培地を用いた。この段階によって、ポリ-D-リジン表面との結合に関して互いに競合するB27とラミニンの混合物が作製され、MNPの播種のための不均一な表面を生じる。ニューロンが一般にラミニンおよびポリ-D-リジン表面上で播種されることは周知である。本発明者らの仮説は、ラミニンコーティング段階に存在するB27がMNP集塊を引き起こすという点である。成熟MNP実験を、ラミニン単独またはラミニン+B27混合物によってコーティングしたポリ-D-リジンを用いて行った。培養物を、成熟プロセスの際の様々な時点でモニターした。結果から、10日後、ラミニン+B27の培養において集塊形成プロセスが出現し始めたことが示された（図5D）。17～21日後では、ラミニン+B27のMNP培養において集塊形成がより明白になった（図5F）ものの、ラミニンコーティング単独の培養では集塊は検出されなかった（図5Cおよび図5E）。これらの結果は、B27が成熟プロセスの際のMNP集塊形成の原因であるという本発明者らの仮説と一貫する。

20

30

【0066】

実施例4

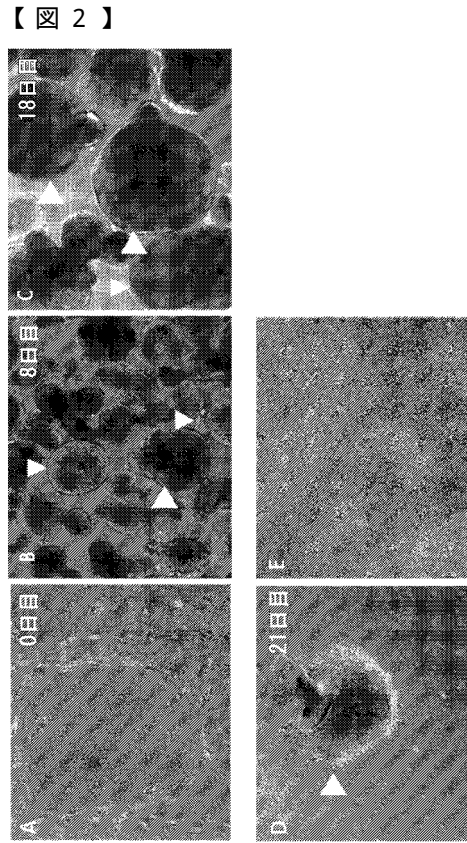
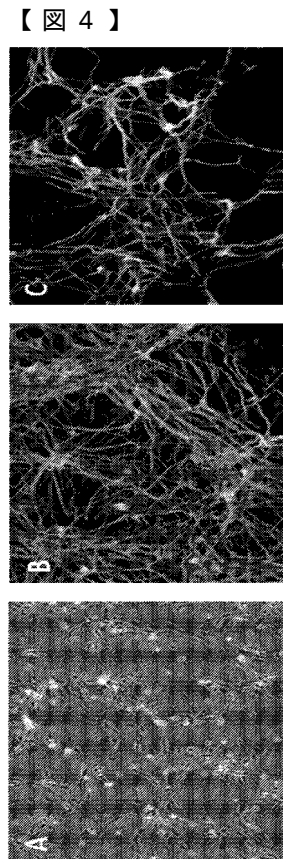
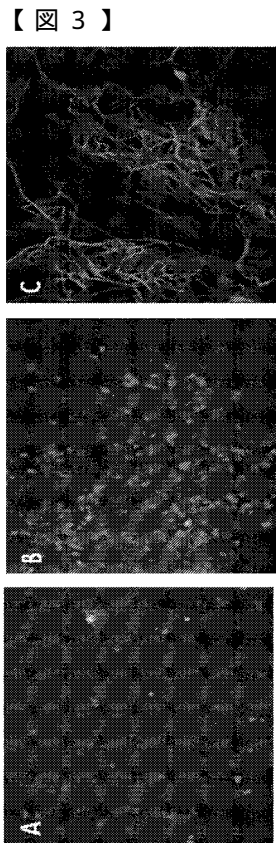
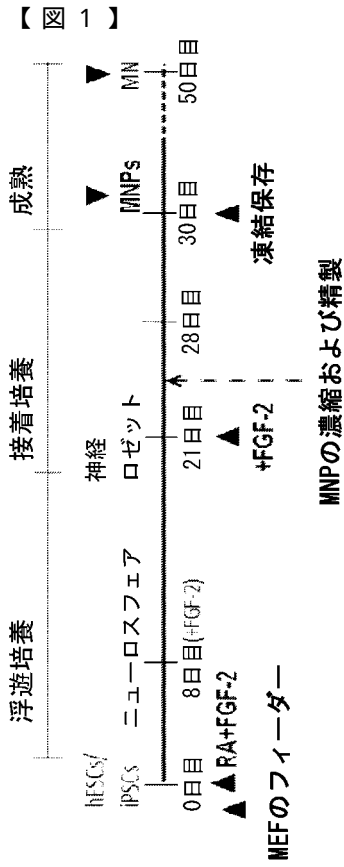
記録保管

非臨床MNPを開始する毎に、0日目にバッチの記録を開始して、生産部門が維持した。品質記録を、品質記録の保持に関する内部標準操作手順に明示されているように、GMPおよびISOの要件のために保存した。適用可能なISO標準に従ったおよび/またはこれを参照とした。

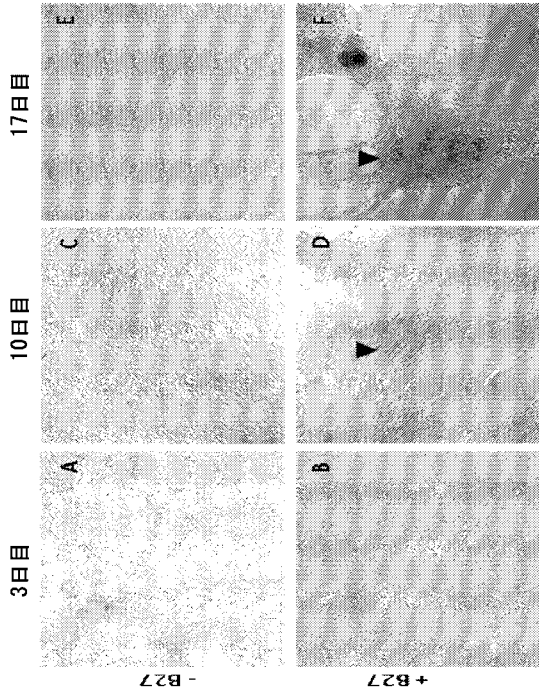
【0067】

本発明のいくつかの態様を記述してきたが、前述は単なる例示に過ぎず、制限的でなく、例として提示されていることは当業者には明らかであるはずである。多数の改変および他の態様は、当業者の範囲内であり、本発明およびその任意の同等物の範囲内に入ることが企図される。本発明に対する変更は、当業者に容易に明らかとなり、本発明はそれらの代替物を含むと意図されると認識されうる。さらに、多数の改変が当業者に容易に想起されることから、例示および記述される構築および操作そのものに本発明を限定すると望んでおらず、したがって、全ての適した改変およびその同等物は、本発明の範囲内に入ると再分類されうる。本明細書において引用した各々の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

61500270007



PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2013/045184 10.01.2014

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 361430.01138	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 13/45184	International filing date (<i>day/month/year</i>) 11 June 2013 (11.06.2013)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 11 June 2012 (11.06.2012)
Applicant YANG, FAN		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed.

a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

IN VITRO DIFFERENTIATION OF MOTOR NEURON PROGENITORS FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND CRYOPRESERVATION

5. With regard to the abstract,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

as suggested by the applicant.

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. none of the figures is to be published with the abstract.

24. 4. 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT **PCT/US2013/045184-10-01-2014**

International application No.

PCT/US 13/45184

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Group I: claims 1-8 and 14B-23, drawn to a method of producing high purity motor neuron progenitor cells (MNP) in vitro.
Group II: claims 9-14A, drawn to a method of cryopreserving MNP.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The inventions of Groups I do not include the inventive concept of cryopreserving MNP, as required by Group II.

- Please see extra sheet for continuation -

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 14B-23

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT **PCT/US2013/045184 10 01 2014**

International application No.

PCT/US 13/45184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/02, C12N 5/071 (2013.01) USPC - 435/383 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/383 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/374, 435/384, 435/395, 435/397, 435/368 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: Motor neuron, embryonic stem cell, pluripotent stem cells, FGF2, bFGF, retinoic acid, low adherent, negative adsorption, gelatin-coated, neural rosette, cryopreservation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 8,137,971 B2 (Poole) 20 March 2012 (20.03.2012) col 1, in 59-67, col 3, in 81 to col 4, in 23, col 4, in 38-51, col 17, in 28-48, col 19, in 42-67, col 21, in 30-51, col 22, in 18-26, 41-65, col 23, in 1-20, Table 3	1-8, 14B-23
Y	WO 2011/047289 A1 (Sabaawy) 21 April 2011 (21.04.2011) pg 5, in 10-13, pg 7, in 3-5	1-8, 14B-23
Y	US 2005/0003544 A1 (Goldman et al.) 06 January 2005 (06.01.2005) whole doc.	1-8, 14B-23
Y	US 7,294,510 B2 (Okano et al.) 13 November 2007 (13.11.2007) whole doc.	1-8, 14B-23
Y	US 2008/0227137 A1 (Zhang et al.) 18 September 2008 (18.09.2008) whole doc.	1-8, 14B-23
Y	US 2006/0073587 A1 (Stice et al.) 06 April 2006 (06.04.2006) whole doc.	1-8, 14B-23
Y	US 7,285,415 B2 (Keirstead et al.) 23 October 2007 (23.10.2007) whole doc.	1-8, 14B-23
Y	Novitch et al. 'A Requirement for Retinoic Acid-Mediated Transcriptional Activation in Ventral Neural Patterning and Motor Neuron Specification' Neuron vol 40, 81-95; 25 September 2003 (25.09.2003) whole doc.	1-8, 14B-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 December 2013 (21.12.2013)		Date of mailing of the international search report 10 JAN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT **PCT/US2013/045184 10-01-2014**

4

International application No.

PCT/US 13/45184

continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions of Group II do not include the inventive concept of a method for producing high purity motor neuron progenitor cells (MNPs) in vitro, as required by Group I.

Common Technical Features

The inventions of Groups I and II share the technical feature of motor neuron progenitor cells (MNPs). However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 8,137,971 B2 (Poole). Poole discloses a method of producing high purity motor neuron progenitor cells (MNPs) in vitro (col 1, ln 59-67, The invention provides isolated population of human late stage MNP cells having a purity of between 65% and 99% late stage motor neuron progenitor cells). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヤン ファン
アメリカ合衆国 メリーランド州 フレデリック イーグル ロック レーン 1800

(72)発明者 トラン ヒュアン
アメリカ合衆国 メリーランド州 ボイズ クレストマウント ロード 18513

(72)発明者 フェルナー トーマス
アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサースバーグ メイン ストリート 623 アパートメント エイ

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 BB19 BB20 BB31 BB32 BC41
BC50 BD14 CA44