

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-31644

(P2020-31644A)

(43) 公開日 令和2年3月5日(2020.3.5)

|                                 |                |             |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                    | F I            | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 5/0797 (2010.01)</b> | C 1 2 N 5/0797 | 4 B 0 6 5   |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 5/10   | 4 C 0 8 7   |
| <b>C 1 2 N 5/0735 (2010.01)</b> | C 1 2 N 5/0735 |             |
| <b>A 6 1 K 35/30 (2015.01)</b>  | A 6 1 K 35/30  |             |
| <b>A 6 1 K 35/545 (2015.01)</b> | A 6 1 K 35/545 |             |

審査請求 有 請求項の数 26 O L 外国語出願 (全 69 頁) 最終頁に続く

|                    |                              |          |                       |
|--------------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2019-189273 (P2019-189273) | (71) 出願人 | 506115514             |
| (22) 出願日           | 令和1年10月16日 (2019.10.16)      |          | ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ   |
| (62) 分割の表示         | 特願2019-62646 (P2019-62646)   |          | ティ オブ カリフォルニア         |
|                    | の分割                          |          | アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94   |
| 原出願日               | 平成26年3月14日 (2014.3.14)       |          | 607-5200, オークランド, フラン |
| (31) 優先権主張番号       | 61/783,594                   |          | クリン ストリート 1111, 5番 フ  |
| (32) 優先日           | 平成25年3月14日 (2013.3.14)       |          | ロア                    |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100083806             |
|                    |                              |          | 弁理士 三好 秀和             |
| (特許庁注：以下のものは登録商標)  |                              | (74) 代理人 | 100095500             |
| 1. TRITON          |                              |          | 弁理士 伊藤 正和             |
| 2. MATLAB          |                              | (74) 代理人 | 100111235             |
|                    |                              |          | 弁理士 原 裕子              |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vitro*での内側神経節隆起前駆細胞の作製

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】GABA作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物を提供する。

【解決手段】GABA作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物を提供する方法であって、a) 霊長類多能性幹(pPS)細胞の培養物を提供すること、およびb) 前記培養物に、i) ソニックヘッジホッグ(shh)経路活性化因子とii) SMAD阻害剤とiii) wnt経路阻害剤とiv) Notch経路阻害剤とを含む複数の因子を導入することを含み、ステップa)およびb)が、GABA作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物をもたらす、方法。

【選択図】図1

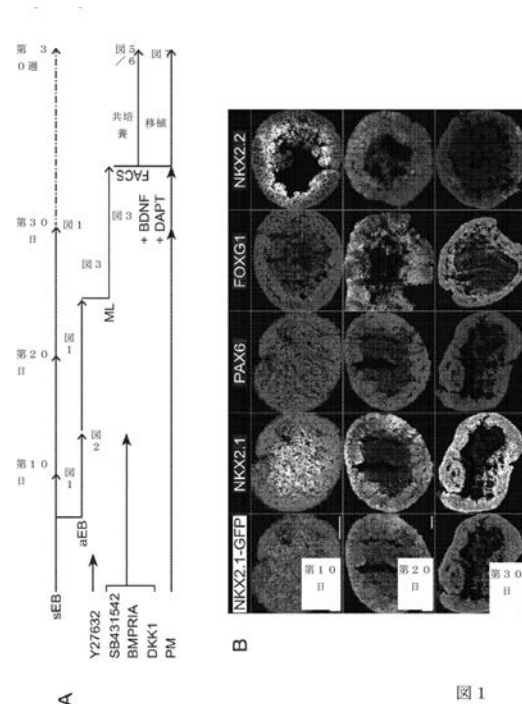


図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

霊長類多能性幹（p P S）細胞からの内側神経節隆起（M G E）前駆細胞の作製方法であって、

ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で前記 p P S 細胞を培養して前記 M G E 前駆細胞を生成することを含む、方法。

## 【請求項 2】

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記 p P S 細胞を培養して胚様体（E B）を生成することを含み、前記 E B が前記 M G E 前駆細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記神経誘導サプリメントが B 2 7 を含む、請求項 1 ～ 2 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4】

前記神経誘導サプリメントが N S 2 1 を含む、請求項 1 ～ 2 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 p P S 細胞がヒト多能性幹（h P S）細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 h P S 細胞がヒト胚性幹（h E S）細胞である、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記 h P S 細胞が人工多能性幹（i P S）細胞である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 p P S 細胞を接着培養で培養する、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 p P S 細胞を浮遊培養で培養する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記 p P S 細胞を培養する前に、前記 p P S 細胞の分化を誘導する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記 p P S 細胞を培養する前に、フィーダー層の非存在下で培養することによって前記 p P S 細胞の分化を誘導する、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記 E B を単離することと、

前記単離した E B を接着基質に播種して接着 E B を得ることと、

前記接着 E B を培養することと

を含む、

請求項 2 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記 E B を単離することと、

前記 E B を機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすることと、

前記分離した細胞を接着基質に播種して接着単層を得ることと、

前記接着単層を培養することと

を含む、

請求項 2 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

前記 E B を単離することと、

前記 E B を機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすることと、

50

前記分離した細胞をフィーダー細胞層上に播種して接着共培養物を得ることと、  
前記接着共培養物を培養することと  
を含む、  
請求項 2 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記 E B、接着 E B、単層または共培養物を単離することと、  
前記 E B、接着 E B、単層または共培養物を機械的または酵素的に分離して単一細胞に  
することと、  
単一細胞を、MGE 前駆細胞の細胞表面マーカーに対する抗体とインキュベートするこ  
とと、  
前記前駆細胞を単離することと  
を含む、  
請求項 2 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記 E B、接着 E B、単層、共培養物、分離した培養物または分取した細胞を単離する  
ことと、  
凍結保護物質を添加することと  
を含む、請求項 2 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 E B、接着 E B、単層、共培養物、分離した培養物または分取した細胞を単離する  
ことと、  
霊長類神経系に細胞懸濁物を移植することと  
を含む、請求項 2 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本願は 2013 年 3 月 14 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 783, 594 号の  
利益を主張するものであり、前述出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦支援による研究に関する記述

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号 MH081880 号の下、  
政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。本発明は、助成金番  
号 RC1 - 00346 号及び同 RB2 - 01602 号の下、カリフォルニア再生医療研究  
所の支援を受けてなされた。

30

【背景技術】

【0003】

緒言

大脳皮質のニューロンの約 20% は抑制性介在ニューロンが占めている。介在ニューロ  
ンの欠損がいくつかの神経障害に関与している。皮質介在ニューロンのほとんどが、発生  
中の腹側終脳領域の内側神経節隆起 (MGE) で生じる。

40

【0004】

マウス MGE 移植片が多数のげっ歯類神経障害モデルを改善することが示されており、  
ヒト MGE 細胞が独特の治療候補となり得ることが示唆される。

【0005】

しかし、MGE の細胞の特徴を有する細胞を効率的に生成する *in vitro* の方法  
はない。

【0006】

したがって、*in vitro* で MGE 前駆細胞を効率的に生成する方法及び MGE 前  
駆細胞が富化された細胞集団が必要とされている。

50

## 【発明の概要】

## 【0007】

*in vitro*でMGE前駆細胞を生成する方法及びシステムならびに富化されたMGE前駆細胞の組成物が提供される。この方法及びシステムにより、機能的なGABA作動性介在ニューロンに分化する機能的なMGE前駆体が効率的に作製される。

## 【0008】

霊長類多能性幹(pPS)細胞から内側神経節隆起(MGE)前駆細胞を作製する方法が提供される。

## 【0009】

ある特定の実施形態では、この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含有する無血清培地でpPS細胞を培養してMGE前駆細胞を生成することを含む。pPS細胞は接着培養または浮遊培養で培養し得る。

10

## 【0010】

ある特定の実施形態では、この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含有する無血清培地でpPS細胞を培養して胚様体(EB)を生成することを含み、ここでは、EBはMGE前駆細胞を含む。

## 【0011】

ある特定の場合には、神経誘導サプリメントはB27であり得る。ある特定の場合には、神経誘導サプリメントはNS21であり得る。

## 【0012】

ある特定の実施形態では、pPS細胞はヒト多能性幹(hPS)細胞であり得る。hPS細胞は、ヒト胚性幹(hES)細胞または人工多能性幹(iPS)細胞であり得る。

20

## 【0013】

ある特定の実施形態では、pPS細胞をソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で培養する前に、pPS細胞の分化を誘導し得る。例えば、pPS細胞培養物の過剰増殖によって、または低接着性の基質を有する培養容器でpPS細胞を浮遊させて培養することによって、フィーダー層の非存在下でpPSを培養することによって、あるいはソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で培養する前にFGFなどの分化因子を添加することによって、pPS細胞の分化を誘導し得る。

30

## 【0014】

ある特定の実施形態では、この方法は、EBを単離すること；単離したEBを接着基質に播種して接着EBを得ること；及び接着EBを培養することを含み得る。

## 【0015】

ある特定の実施形態では、この方法は、EBを単離すること；EBを機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすること；分離した細胞を接着基質に播種して接着単層を得ること；及び接着単層を培養することを含み得る。

## 【0016】

ある特定の実施形態では、この方法は、EBを単離すること；EBを機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすること；分離した細胞をフィーダー細胞層に播種して接着共培養物を得ること；及び接着共培養物を培養することを含み得る。

40

## 【0017】

ある特定の実施形態では、この方法は、EB、接着EB、単層または共培養物を単離すること；EB、接着EB、単層または共培養物を機械的または酵素的に分離して単一細胞にすること；単一細胞をMGE前駆細胞の細胞表面マーカーに対する抗体とインキュベートすること；及び前駆細胞を単離することを含み得る。

## 【0018】

ある特定の実施形態では、この方法は、EB、接着EB、単層、共培養物、分離した培養物または単離した前駆細胞を単離すること；及び不凍化合物などの凍結保護物質、例えば、グリコール(グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール)、ジメチ

50

ルスルホキシド ( D M S O ) またはスクロースなどを添加することを含み得る。

【 0 0 1 9 】

ある特定の場合には、霊長類多能性幹 ( p P S ) 細胞から内側神経節隆起 ( M G E ) 前駆細胞を作製する方法は、無血清培地で p P S 細胞を培養して胚様体 ( E B ) を生成することを含み得、ここでは、E B は M G E 前駆細胞を含み、無血清培地はニックヘッジホッグ経路活性化因子と、R h o 結合キナーゼ阻害剤 ( R O C K ) と、S M A D 阻害剤と、W n t 阻害剤と、B 2 7 とを含む。

【 0 0 2 0 】

上記 p P S 細胞は、ヒト胚性幹 ( h E S ) 細胞または人工多能性幹 ( i P S ) 細胞であり得るヒト多能性幹 ( h P S ) 細胞である。

10

【 0 0 2 1 】

ある特定の場合には、この方法は、E B を単離すること；単離した E B を接着基質に播種して接着 E B を得ること；及び接着 E B を培養することをさらに含み得る。

【 0 0 2 2 】

ある特定の実施形態では、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、S M A D 阻害剤と、W n t 阻害剤と、B 2 7 とを含む無血清培地で接着 E B を培養する。

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施形態では、R O C K 阻害剤を含有しない無血清培地で接着 E B を培養する。

20

【 0 0 2 4 】

抑制性介在ニューロンを作製する方法が提供され、この方法は、上記のように作製した E B 、接着 E B 、単層、共培養物、分離した培養物または選別した細胞を単離すること；単離した細胞の細胞浮遊液を作製し、細胞浮遊液を霊長類の神経系に移植することを含み得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 ( パネル A ~ B ) M G E 様前駆細胞の生成を示す図である。

【 0 0 2 6 】

【 図 2 】 ( パネル A ~ F ) V Z 及び S V Z 放射状グリア幹細胞様の分裂を示す h E S C - M G E 様前駆体を示す図である。

30

【 0 0 2 7 】

【 図 3 】 ( パネル A ~ E ) h E S C - M G E 様前駆体が終脳 G A B A 作動性介在ニューロンの特性を有するニューロンに分化することを示す図である。

【 0 0 2 8 】

【 図 4 】 ( パネル A ~ H ) h E S C - M G E 様 N K X 2 , 1 - G F P + 細胞集団のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを示す図である。

【 0 0 2 9 】

【 図 5 】 ( パネル A ~ J ) h E S C - M G E 様細胞由来 G A B A 作動性介在ニューロンの成熟及び発火特性を示す図である。

40

【 0 0 3 0 】

【 図 6 】 ( パネル A ~ J ) h E S C 由来介在ニューロンの G A B A 作動性シナプス特性を示す図である。

【 0 0 3 1 】

【 図 7 】 ( パネル A ~ H ) マウス脳における h E S C 由来 M G E 様介在ニューロン前駆細胞の成熟及び機能的統合を示す図である。

【 0 0 3 2 】

【 図 8 】 ( パネル A ~ F ) 分化プロトコル及び分化した h E S C の F A C S 解析を示す図である。

【 0 0 3 3 】

【 図 9 】 h E S C 由来細胞が終脳 M G E 様アイデンティティ及び G A B A 作動性ニューロ

50

ン運命を有することを示す図である。

【0034】

【図10】(パネルA～F) hESC由来NKX2.1-GFP+細胞の転写産物発現プロファイリングを示す図である。

【0035】

【図11】hESC由来MGE様細胞のGABA作動性介在ニューロンサブタイプへの成熟を示す図である。

【0036】

【図12】(パネルA～C) ヒト胎児皮質及びMGEならびにヒト胎児MGE由来の培養物における介在ニューロンサブタイプの発生を示す図である。

10

【0037】

【図13】(パネルA～F) hESC由来介在ニューロンの発火特性の成熟を示す図である。

【0038】

【図14】(パネルA～G) マウス脳におけるhESC由来MGE様介在ニューロン及びサブタイプの発火特性の成熟を示す図である。

【0039】

【図15】hESCからの分化過程におけるマーカー発現のまとめを示す図である。

【0040】

【図16】hESC分化プロトコル最適化、動物移植及び腫瘍発生率のまとめを示す図である。

20

【0041】

【図17】in vitroでhESC系ESI17からMGE前駆細胞が分化したことを示す図である。

【0042】

【図18】in vitroでhESC系ESI35からMGE前駆細胞が分化したことを示す図である。

【0043】

【図19】in vitroでhESC系ESI51からMGE前駆細胞が分化したことを示す図である。

30

【0044】

【図20】in vitroでhESC系H9からMGE前駆細胞が分化したことを示す図である。

【0045】

【図21】ナীব型ヒト多能性幹細胞の分化によるMGE前駆細胞の生成を示す図である。

【0046】

【図22】(パネルA～N) hPSCの分化によって生成したMGE前駆細胞に由来する介在ニューロンの選択及び精製へのMGE富化エンハンサー配列の利用を示す図である。

【0047】

【図23】(A列～D列) 長期浮遊培養を用いたMGE由来介在ニューロンの生成を示す図である。

40

【0048】

【図24】(パネルA～E) 多数のBMP及びWNTシグナル伝達経路の小分子阻害剤がhESCからMGE前駆細胞への分化誘導に効果的であることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0049】

定義

本明細書で使用される「胚様体」、「EB」または「EB細胞」は通常、分化を経た多能性幹細胞(例えば、霊長類多能性幹細胞(pPS)、胚性幹(ES)細胞、人工多能性

50

幹 (iPS) 細胞) に由来する未分化細胞と分化細胞の集団からなる形態学的構造体、三次元構造体またはオルガノイド型構造体を指す。EB 形成に適した培養条件下では、ES 細胞が増殖して小型の細胞塊を形成し、分化し始める。分化の第一段階は通常、ヒト細胞の分化の約 1 日～4 日に相当し、この段階では、小型の細胞塊が外側の層に内胚葉細胞層を形成し、「単純な胚様体」と呼ばれる。第二段階は通常、ヒト細胞の分化後約 3 日～20 日に相当し、この段階では、外胚葉細胞及び中胚葉細胞の旺盛な分化ならびに誘導体組織を特徴とする「複雑な胚様体」が形成される。本明細書で使用される「胚様体」または「EB」という用語は、文脈により別の解釈が必要とされない限り、単純な胚様体と複雑な胚様体の両方を包含する。ES/iPS 細胞の培養物中に胚様体が形成されたかどうかは、当業者が例えば、形態の目視検査、細胞マーカーの検出によって日常的な方法で判定できる。細胞 (例えば、ES/iPS 細胞) が約 20 個以上浮遊していれば浮遊胚様体 (sEB) であると見なされる (例えば、Schmitt, R. ら (1991) *Genes Dev.* 5: 728-740; Doetschman, T. C. ら (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45 を参照されたい)。浮遊 EB を接着基質上に播種して接着 EB (aEB) を生成することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0050】

本明細書で使用される「内側神経節隆起 (MGE) 前駆細胞 (1 つまたは複数)」または「MGE 神経前駆細胞」は、発生中の脳の MGE 領域内の細胞によって発現されるマーカーを発現する分裂細胞と分裂終了細胞の集団を指す。MGE 前駆細胞は一般に、ホメオボックス遺伝子 *Nkx2.1*、*LIM*-ホメオボックス遺伝子 *Lhx6*、*Lhx7* または *Lhx8* などのマーカーを発現する。MGE 前駆細胞は、適切な分化条件下で介在ニューロンに分化することができる。

#### 【0051】

「多能性幹細胞」または「多能性細胞」は、しかるべき条件下で 3 つの胚葉 (内胚葉、中胚葉及び外胚葉) すべての誘導体である複数の異なる細胞型の子孫を生じさせる能力を有する細胞を意味する。多能性幹細胞は奇形腫を形成することができる。多能性幹細胞の例には、胚性幹 (ES) 細胞、胚性生殖幹 (EG) 細胞、胚性癌幹 (EC) 細胞及び人工多能性幹 (iPS) 細胞がある。PS 細胞は、例えば、ヒト；霊長類；非ヒト霊長類；イヌ；ネコ；マウス；ウマ；ブタ；トリ；ラクダ；ウシ；ヒツジなどを含めた目的とする任意の生物体に由来するものであり得る。

#### 【0052】

「胚性幹細胞」または「ES 細胞」は、a) 自己複製が可能であり、b) 分化して生物体のあらゆる種類の細胞を生じることが可能であり、かつ c) 発生中の生物体に由来するものであるか、発生中の生物体に由来する樹立された ES 細胞系である細胞を意味する。ES 細胞は、発生中の生物の胞胚の内部細胞塊または胚盤上層に由来し得る。ES 細胞は、発生中の生物体から単一の割球を取り出す単一割球生検 (SBB) によって生じた割球に由来し得る。SBB は一般に、内部細胞塊の単離に代わる非破壊的な方法である。SBB 及び生検割球からの hES 細胞生成については、Cell Stem Cell, 2008 Feb 7; 2(2): 113-7 に記載されている。ES 細胞は、生物体のあらゆる種類の細胞に分化する能力を維持させながら長期間にわたって培養することが可能である。培養時の ES 細胞は通常、核・細胞質比が大きく、境界が明瞭で、核小体が著明な平坦なコロニーとして増殖する。さらに、hES 細胞は SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 及びアルカリホスファターゼを発現するが、SSEA-1 は発現しない。ES 細胞を生成し特徴付ける方法の例が、例えば、米国特許第 7,029,913 号、同第 5,843,780 号及び同第 6,200,806 号にみられ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ES 細胞の例としては、ナイーブ ES 細胞が挙げられる。

#### 【0053】

「胚性生殖幹細胞」、「胚性生殖細胞」または「EG 細胞」は、a) 自己複製が可能であり、b) 分化して生物体のあらゆる種類の細胞を生じることが可能であり、かつ c) 生

殖細胞及び生殖細胞前駆細胞、例えば始原生殖細胞、すなわち精子及び卵子になる細胞に由来する細胞を意味する。胚性生殖細胞（EG細胞）は、上に記載したような胚性幹細胞とほぼ同じ特性を有すると考えられている。EG細胞を生成し特徴付ける方法の例が、例えば、米国特許第7,153,684号；Matsui, Y.ら（1992）Cell 70:841；Shambloott, M.ら（2001）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:113；Shambloott, M.ら（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13726；及びKoshimiz u, U.ら（1996）Development, 122:1235にみられ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0054】

「人工多能性幹細胞」または「iPS細胞」は、a)自己複製が可能であり、b)分化して生物体のあらゆる種類の細胞を生じることが可能であり、かつc)体細胞に由来する細胞を意味する。iPS細胞はES細胞様の形態の細胞であり、核・細胞質比が大きく、境界が明瞭で、核小体が著明な平坦なコロニーとして増殖する。さらに、iPS細胞は、特に限定されないが、アルカリホスファターゼ、SSEA3、SSEA4、Sox2、Oct3/4、Nanog、TRA160、TRA181、TDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT及びzfp42を含めた当業者に公知の鍵となる多能性マーカーを1つまたは複数発現する。iPS細胞は、細胞に「初期化因子」、すなわち、1つまたは複数の例えば、細胞に作用し転写を変化させて細胞を多能性に初期化する生物学的に活性な因子のカクテルを与えることによって生成し得る。iPS細胞を生成し特徴付ける方法の例が、例えば、米国特許出願公開第20090047263号、同第20090068742号、同第20090191159号、同第20090227032号、同第20090246875号及び同第20090304646号にみられ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0055】

「体細胞」は、実験的操作を加えなければ通常は生物体のあらゆる種類の細胞を生じることのない、生物体の任意の細胞を意味する。換言すれば、体細胞とは、十分に分化し、身体の3つの胚葉、すなわち、外胚葉、中胚葉及び内胚葉のすべての細胞を自然に生じることのない細胞のことである。例えば、体細胞にはニューロン及び神経前駆細胞の両方が含まれ、後者は自己複製し、かつ中枢神経系の全部または一部の細胞型を自然に生じることが可能であり得るが、中胚葉系または内胚葉系の細胞を生じることにはできない。

#### 【0056】

「細胞系」という用語は、通常、単一の祖先細胞、あるいは定義されかつ/または実質的に同一な祖先細胞集団に由来し、大部分または実質的に同一な細胞の集団を指す。細胞系は長期間（例えば、数か月、数年、無制限の期間）にわたって培養で維持されてきたか、維持することが可能なものであり得る。

#### 【0057】

「内胚葉」は、動物の胚形成期に形成され、消化管、気道、内分泌腺及び器官、聴覚系の特定の構造ならびに尿路系の特定の構造を生じる胚葉を意味する。

#### 【0058】

「中胚葉」は、動物の胚形成期に形成され、筋肉、軟骨、骨、真皮、生殖器系、脂肪組織、消化管の結合組織、腹膜、尿路系の特定の構造、中皮、脊索及び脾臓を生じる胚葉を意味する。

#### 【0059】

「外胚葉」は、動物の胚形成期に形成され、神経系、歯のエナメル質、表皮、毛、爪及び粘膜組織の内層を生じる胚葉を意味する。

#### 【0060】

「骨形成タンパク質」または「BMP」は、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （TGF $\beta$ ）スーパーファミリーのサブファミリーである増殖因子のファミリーを意味する。BMP（例えば、BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7

10

20

30

40

50

、BMP8a、BMP8b、BMP9/GDF、BMP10、BMP11/GDF11、BMP12/GDF7、BMP13/GDF6、BMP14/GDF5、BMP15/GDF9B)は、骨及び軟骨の形成を誘導する能力があることによって最初に発見された。BMPは、細胞表面にある骨形成タンパク質受容体(BMPR)と呼ばれる特異的受容体相互作用する。BMPRを介したシグナル伝達によりタンパク質のSMADファミリーのメンバーが動員され、次いで標的遺伝子の転写が調節される。BMPシグナル伝達の阻害剤は、当該技術分野で公知のように、当業者が多数の方法、例えば、BMPまたはBMP受容体との結合に関する競合結合アッセイ、機能アッセイ、例えば、下流シグナル伝達タンパク質の活性増強、例えばBR-SmadなどのSMADの核への再局在化及び下流遺伝子標的の転写活性化などの測定によって容易に同定することができる。

10

#### 【0061】

「トランスフォーミング増殖因子ベータ」、「TGF- $\beta$ 」及び「TGF $\beta$ 」は、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )スーパーファミリーのサブファミリーに属するTGF $\beta$ 分泌タンパク質を意味する。TGF $\beta$ (TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3)は、多くの細胞型の増殖、分化、接着及び遊走を調節する多機能性ペプチドである。成熟ペプチドは、ホモ二量体または他のTGF $\beta$ ファミリーメンバーとのヘテロ二量体として存在し得る。TGF $\beta$ は細胞表面のトランスフォーミング増殖因子ベータ受容体(TGF- $\beta$ RまたはTGF $\beta$ R)と相互作用し、両者が結合すると、MAPキナーゼ、Akt、Rho及びRac/cdc42誘導性シグナル伝達経路、細胞構造の再構築及びSMADタンパク質の核局在化ならびに標的遺伝子転写の調節が活性化される。TGF $\beta$ シグナル伝達の阻害剤は、当該技術分野で周知のように、当業者が多数の方法、例えば、TGF $\beta$ もしくはTGF $\beta$ 受容体との結合に関する競合結合アッセイまたは機能アッセイ、例えば、MAPK、Akt、Rho、Rac及びSMAD、例えばAR-Smadなどの下流シグナル伝達タンパク質の活性抑制の測定によって容易に同定することができる。

20

#### 【0062】

「Wnt」は、胚形成及び成熟組織の両方で重要な役割を果たす、高度に保存された分泌シグナル伝達分子ファミリーを意味する。ヒトWnt遺伝子ファミリーには少なくとも19のメンバー(Wnt-1、Wnt-2、Wnt-2B/Wnt-13、Wnt-3、Wnt3a、Wnt-4、Wnt-5A、Wnt-5B、Wnt-6、Wnt-7A、Wnt-7B、Wnt-8A、Wnt-8B、Wnt-9A/Wnt-14、Wnt-9B/Wnt-15、Wnt-10A、Wnt-10B、Wnt-11、Wnt-16)が存在する。Wntタンパク質は、タンパク質のFrizzled(Fz)ファミリーのポリペプチド及びタンパク質の低密度リボタンパク質受容体(LDLR)関連タンパク質(LRP)ファミリーのポリペプチドを含むWnt受容体複合体と結合することによって細胞活性を調節する。Wnt受容体複合体はWnt結合によって活性化されると、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達カスケードを活性化する。このようなカスケードには、古典的Wntシグナル伝達経路；Wnt/平面内細胞極性(Wnt/PCP)経路；及びWnt-カルシウム(Wnt/Ca<sup>2+</sup>)経路が含まれる。

30

#### 【0063】

「非接着条件」下での培養は、細胞がその培養容器、例えば、組織培養プレートまたはフラスコの底面に接着するのを抑制する条件下での培養を意味する。いくつかの場合には、細胞は本来非接着性である、すなわち、マトリックス組成物、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、ポリ-オルニチン、ポリ-リジン、コラーゲンIV、マトリゲル及びポリカーボネート膜でコーティングしなければ表面に接着しない。いくつかの場合には、培養物を攪拌することによって細胞を非接着状態に維持し得る。

40

#### 【0064】

「接着条件」下での培養は、細胞がその培養容器、例えば、組織培養プレートまたはフラスコの底面に接着するのを促進する条件下での培養を意味する。いくつかの場合には、単に培養物を静置状態に維持することによって、細胞が容器に接着するのを誘導し得る。いくつかの場合には、接着を促進するのが望ましい容器の壁面を、細胞が接着し得る組成

50

物、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、ポリ - オルニチン、ポリ - リジン、コラーゲンⅣ、マトリゲル及びポリカルボネート膜でコーティングし得る。

【 0 0 6 5 】

「治療」、「治療すること」などの用語は、明細書では所望の薬理効果及び／または生理学的効果を得ることを一般的に意味するのに用いられる。効果は、疾患またはその症状の全般的または部分的な予防という意味で予防的なものであり得、かつ／あるいは疾患及び／または疾患に起因する有害作用の部分的または全般的治癒という意味で治療的なものであり得る。本明細書で使用される「治療」は哺乳動物の疾患のあらゆる治療を包含し、( a ) 疾患に罹患しやすいと思われるが未だその疾患を有すると診断されていない対象にその疾患が発症するのを予防すること；( b ) 疾患を抑制すること、すなわち、疾患の発現を停止させること；または( c ) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の消退を引き起こすことがこれに含まれる。疾患または損傷の発症前、発症時または発症後に治療剤を投与し得る。患者の望ましくない臨床徴候が安定化または軽減される、進行中の疾患の治療については、特に関心が持たれる。このような治療は罹患組織の機能が完全に喪失する前に実施するのが望ましい。対象となる治療法は、疾患の症候段階において、そしていくつかの場合には疾患の症候的段階の後に、実施するのが望ましい。

10

【 0 0 6 6 】

「個体」、「対象」、「宿主」及び「患者」という用語は本明細書では互換的に使用され、診断、治療または治療が望まれる任意の哺乳動物対象、特にヒトを指す。

20

【 0 0 6 7 】

細胞培養と関連する「培地」という用語または「細胞培養培地」もしくは「細胞培地」という語句は、目的とする細胞集団の培養に適した細胞増殖培地を指す。細胞培養培地の例としては、最小必須培地( MEM )、イーグル培地、ダルベッコ変法イーグル培地( DMEM )、ダルベッコ変法イーグル培地：Nutrient Mixture F - 12 ( DMEM / F 1 2 )、F 1 0 Nutrient Mixture、ハムF 1 0 Nutrient Mix、ハムF 1 2 Nutrient Mixture、Medium 1 9 9、RPMI、RPMI 1 6 4 0、低血清培地、基本培地( BME )、DMEM / F 1 2 ( 1 : 1 )、Neurobasal培地など及びその組合せが挙げられる。サプリメント、分化因子、抗アポトーシス剤などの因子を1つまたは複数添加することによって、培地または細胞培養培地を改変してもよい。

30

【 0 0 6 8 】

細胞または細胞集団と関連する「単離(した)」という用語は、生物体の組織から切り離されている状態など、細胞の本来の環境以外の環境にある細胞を指す。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される「分化因子(1つまたは複数)」という語句は、本開示の細胞を培養するために培地に含ませる薬剤(1つまたは複数)を指し、この薬剤(1つまたは複数)は第一の細胞型から第二の細胞型への分化を促進し、この第二の細胞型は第一の細胞型と比較して分化している。

【 0 0 7 0 】

細胞発生との関連において、「分化した」という形容詞は相対的な用語である。「分化した細胞」とは、比較する細胞よりも発生経路をさらに進んだ細胞のことである。したがって、多能性胚性幹細胞は系列が制限された前駆細胞に分化することができる。次いで、これらの細胞は経路をさらに進んだ細胞または最終段階の分化した細胞、例えばGABA作動性介在ニューロンなどにさらに分化することができる。

40

【 0 0 7 1 】

「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、別の種類の細胞と共培養することでその細胞が増殖できる環境がもたらされるある種の細胞を表すために用いられる用語である。pPS細胞集団を分割した後、pPS細胞の増殖を補助するために新たなフィーダー細胞を加えずに細胞を少なくとも1ラウンド増殖させた場合、そのpPS細胞集団はフィーダー細胞を「実質的に含まない」ことになる。

50

## 【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される「発現」及びその文法的等価物は、マーカーと関連する場合、マーカーの産生及びマーカーのレベルまたは量を指す。例えば、細胞にマーカーの発現もしくはマーカーの存在が認められるか、細胞がマーカー陽性である場合、これはマーカーの発現が陽性対照のレベルと同様のレベルであることを表す。陽性対照のレベルは、そのマーカーが関連する細胞運命を有することが知られる細胞によって発現されるマーカーのレベルによって決定され得る。同様に、マーカーの発現が認められないか、細胞がマーカー陰性である場合、これはマーカーの発現が陰性対照のレベルと同様のレベルであることを表す。陰性対照のレベルは、そのマーカーが関連する細胞運命を有さないことが知られる細胞によって発現されるマーカーのレベルによって決定され得る。したがって、マーカーが存在しないことは、単にマーカーの発現レベルが検出不可能なレベルであることを示すのではなく、ある特定の場合には、細胞がそのマーカーを発現し得るが、その発現が陽性対照に比して低いか、陰性対照のレベルと同様のレベルであることも考えられる。

10

## 【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される「マーカー」は、測定または検出することができる任意の分子を指す。例えば、マーカーとしては、特に限定されないが、遺伝子転写物などの核酸、遺伝子のポリペプチド産物、糖タンパク質、炭水化物、糖脂質、脂質、リボタンパク質、炭水化物または小分子（例えば、分子量が 10,000 amu (Da) 未満の分子）などが挙げられる。

## 【 0 0 7 4 】

「変異体」ポリペプチドは、天然配列のポリペプチドと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% または 99% の配列同一性を有する、生物学的に活性な、以下で定義されるポリペプチドを意味する。このような変異体としては、天然配列の N 末端もしくは C 末端または天然配列内に 1 つまたは複数のアミノ酸残基が付加されたポリペプチド；約 1 ~ 40 個のアミノ酸残基が欠失し、任意選択で 1 つまたは複数のアミノ酸残基で置換されたポリペプチド；生じる生成物が非天然アミノ酸を有するようアミノ酸残基が二重結合により修飾された上記ポリペプチドの誘導体が挙げられる。生物学的に活性な変異体は通常、アミノ酸配列が天然配列のポリペプチドと少なくとも約 90%、少なくとも約 95% または少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有する。変異体ポリペプチドは天然にまたは非天然にグリコシル化されたものであり得る、すなわち、ポリペプチドは、対応する天然のタンパク質にみられるグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する。変異体ポリペプチドは、天然のポリペプチドにはみられない翻訳後修飾を有し得る。

20

30

## 【 0 0 7 5 】

「富化する」または「富化された」という用語は本明細書では互換的に使用され、ある種類の細胞の収率（割合）が、開始時の培養物または調製物中のその種類の細胞の割合よりも少なくとも 10% 増加していることを意味する。

## 【 0 0 7 6 】

「増殖環境」とは、目的とする細胞が *in vitro* で増殖、分化または成熟する環境のことである。環境の特徴には、細胞を培養する培地、存在し得る任意の増殖因子または分化誘導因子及び存在する場合は支持構造体（固体表面の基質）が含まれる。

40

## 【 0 0 7 7 】

詳細な説明

上述の通り、*in vitro* で MGE 前駆細胞を生成する方法及びシステムならびに富化された MGE 前駆細胞の組成物が提供される。この方法及びシステムにより、機能的な GABA 作動性介在ニューロンに分化する機能的な MGE 前駆体が効率的に作製される。

## 【 0 0 7 8 】

本発明をさらに説明する前に、本発明が、記載される特定の実施形態に限定されるわけではなく、したがって当然のことながら、様々なものであり得ることを理解するべきであ

50

る。このほか、本発明の範囲が添付の「特許請求の範囲」によってのみ限定されることから、本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することを目的とし、限定することを意図するものではないことを理解するべきである。

【0079】

数値の範囲が記載される場合、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除いて、その範囲の上限と下限の間に介在する下限の10分の1の単位までの各介在数値及びその記載される範囲内にある他の記載される数値または介在する数値は、いずれも本発明の範囲に包含されることが理解される。このようなより狭い範囲の上限及び下限は、独立してそのより狭い範囲に含まれ得るものであり、同じく本発明に包含され、任意の具体的に除外される限界に従う。記載される範囲に上限及び下限の一方または両方が含まれる場合、その含まれる限界の一方または両方を除外した範囲も本発明に含まれる。

10

【0080】

特に明記されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様ないし同等の任意の方法及び材料を本発明の実施または検討に用いることができるが、好ましい方法及び材料をこれより記載する。本明細書で言及される刊行物はすべて、関連してその刊行物が引用される方法及び/または材料を開示及び説明するために参照により本明細書に組み込まれる。

【0081】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」で使用される単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除いて、複数形の指示対象が含まれることに留意しなければならない。したがって、例えば、「SMAD阻害剤(a SMAD inhibitor)」に言及する場合、複数のこのような阻害剤がこれに含まれ、「ROCK阻害剤(the ROCK inhibitor)」に言及する場合、1つまたは複数のROCK阻害剤及び当業者に公知のその等価物への言及がこれに含まれる、などである。さらに、「特許請求の範囲」は、任意選択の要素がいずれも排除されるよう起草され得ることに留意される。したがって、この記述は、請求項の要素への言及に関連した「単に」、「～のみ」などのような排他的用語の使用または「消極的」限定の使用の先行記載としての役割を果たすことが意図される。

20

【0082】

本明細書で述べられる刊行物は、本願の出願日より前に開示されたため記載されるものである。本明細書に記載されるいかなる事項も、本発明にはこのような刊行物に対して、それが先行発明であるという理由で先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。さらに、記載される刊行日が実際の出願日と異なる可能性があり、これに関して個別に確認を必要する場合もある。

30

【0083】

MGE前駆細胞を生成する方法

ある特定の実施形態では、霊長類多能性幹(pPS)細胞から内側神経節隆起(MGE)前駆細胞を作製する方法が提供される。

【0084】

一般に、MGE前駆細胞の作製方法を開始するまでpPSを未分化の状態で維持する。

40

【0085】

この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地でpPS細胞を培養してMGE前駆細胞を生成することを含み得る。pPS細胞は接着培養または浮遊培養で培養し得る。

【0086】

ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞の作製方法を開始する時点で、pPSは、pPS細胞の付着を促進する接着基質を有する細胞培養容器中に播種した細胞であり、この細胞と、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地とを接触させてMGE前駆細胞を生成する。

50

## 【 0 0 8 7 】

ある特定の実施形態では、この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で p P S 細胞を培養して胚様体 ( E B ) を生成することを含み、ここでは、E B は M G E 前駆細胞を含む。

## 【 0 0 8 8 】

ある特定の実施形態では、M G E 前駆細胞の作製方法を開始する時点で、p P S は、浮遊胚様体の形成を可能にする低接着性の基質を有する培養容器に浮遊状態で播種した細胞であり得る。例示的な方法では、p P S 細胞のコンフルエントな単層培養物を回収し、次いで、非接着性細胞培養プレートに播種して細胞を浮遊状態で維持する。

## 【 0 0 8 9 】

ある特定の場合には、p P S コロニーを優先的に選択するためにコラゲナーゼ I V / ディスパーゼを使用し得る。コロニーをトリプシン処理して単一の細胞にしてから低付着性の丸底プレートに播種して、浮遊 E B を形成させ得る。

## 【 0 0 9 0 】

ある特定の場合には、例えば、ドナー p P S 細胞培養物の過剰増殖によって、または胚様体の形成を可能にする低接着性の基質を有する培養容器で p P S 細胞を浮遊培養することによって、またはフィーダー層の非存在下で p P S を培養することによって p P S 細胞を分化させて、例えば、胚様体または集合体を形成させることによって、分化の過程を誘導することができる。例示的な方法では、p P S 細胞のコンフルエントな単層培養物を回収し、次いで、非接着性細胞培養プレートに播種して細胞を浮遊状態で維持し、定期的に栄養培地で栄養を補給する。

## 【 0 0 9 1 】

上記のものに代えてまたは加えて、細胞が未分化の表現型を維持できないようにする特定の因子を加えて培養することによって分化過程を開始させることができる。最初の分化因子は M G E 前駆細胞系列への分化に制限するものである必要はないが、分化した集団の細胞型の範囲内に M G E 前駆細胞またはその前駆体を含むものであるべきである。

## 【 0 0 9 2 】

ある段階で培養物をより特異的に M G E 前駆細胞系列に方向付けることができる。これは、より特異的に M G E 前駆細胞の生成及び増殖を促進する因子を培地に含ませることによって行うことができる。M G E 前駆細胞の形成及び / または増殖を促進する例示的な因子としては、本明細書に記載される神経誘導サプリメント、s h h シグナル伝達活性化因子、B M P シグナル伝達阻害剤、T G F -  $\beta$  シグナル伝達阻害剤、W n t 阻害剤及び抗アポトーシス剤が挙げられ、いくつかの場合には、F G F シグナル伝達活性化因子 ( 1 つまたは複数 ) がこれに含まれ得る。

## 【 0 0 9 3 】

M G E 前駆細胞を生成するための例示的な方法を以下に記載する。

## 【 0 0 9 4 】

いくつかの場合には、この方法は、s E B を生成する段階及びそれに続く a E B を生成する段階を含み得る。他の場合には、s E B を生成する段階を接着培養に置き換え得る。

## 【 0 0 9 5 】

浮遊胚様体 ( s E B ) の生成

例示的な方法では、浮遊胚様体の形成を可能にする低接着性の基質を有する培養容器中での p P S 細胞の浮遊培養を、s h h 活性化因子と B 2 7 または N S 2 1 などの神経誘導サプリメントとの存在下で実施し得る。培地に s h h 活性化因子及び / または神経誘導サプリメントを添加する前に p P S 細胞をフィーダー層の非存在下で 0 ~ 9 日間、浮遊培養してもよく、例えば、培地に s h h 活性化因子及び / または神経誘導サプリメントを添加する前に p P S 細胞を少なくとも 0 時間、1 時間、3 時間、6 時間、1 2 時間、1 8 時間、2 4 時間、3 6 時間、4 8 時間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間または 9 日間、浮遊培養してもよい。このようにして、本明細書に記載の神経誘導サプリメント及び s h h シグナル伝達活性化因子の存在下で、p P S に s E B の形成を誘

10

20

30

40

50

導する。

【0096】

p P S 細胞を本明細書に記載の神経誘導サプリメント及び s h h シグナル伝達活性化因子の存在下で少なくとも1日、例えば、1～100日、1～60日、1～50日、2～100日、2～50日、3～100日、4～100日、5～10日、7～10日または25～100日の期間浮遊培養して s E B を形成させ得る。p P S 細胞を9日未満の期間浮遊培養して s E B を形成させ得る場合、p P S 細胞の培養開始から0～8日以内に s h h 活性化因子及び/または神経誘導サプリメントを培地に添加して s E B を形成させ得る。

【0097】

ある特定の実施形態では、低接着性の基質を有する培養容器で本明細書に記載の神経誘導サプリメントと s h h シグナル伝達活性化因子とを含む細胞培養培地中、p P S を浮遊培養する。

10

【0098】

p P S 細胞を浮遊培養して s E B を形成させる培地は、本明細書に記載の神経誘導サプリメント及び s h h シグナル伝達活性化因子に加えて、抗アポトーシス剤、S M A D 阻害剤（例えば、T G F -  $\beta$  阻害剤、B M P 阻害剤、アクチビン阻害剤、N o d a l 阻害剤または増殖分化因子（G D F）シグナル伝達経路阻害剤）及び W n t 阻害剤のうちの1つまたは複数を含むし得る。

【0099】

ある特定の場合には、p P S 細胞から M G E 前駆細胞を作製する方法は、抗アポトーシス剤、例えば R O C K 阻害剤を含む培地で p P S 細胞を約1時間～35日間、例えば、少なくとも1時間、少なくとも3時間、少なくとも10時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも2日、少なくとも3日、例えば4日、5日、6日、7日、8日、9日、15日、20日、25日または35日などの間培養することを含み得る。例示的な方法は、抗アポトーシス剤を含む培地に p P S 細胞を浮遊状態で播種し、p P S 細胞を抗アポトーシス剤の存在下で1時間～35日の期間培養することを含み得る。ある特定の場合には、抗アポトーシス剤は p P S 細胞の培養開始時から存在してもよく、また1時間～35日後、例えば1日～7日後、例えば、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後または7日後などに除去してもよい。

20

【0100】

ある特定の場合には、抗アポトーシス剤は p P S が M G E 細胞に分化する間、一時的に存在してもよく、例えば、抗アポトーシス剤は、p P S 細胞を本明細書に記載の神経誘導サプリメント及び s h h シグナル伝達活性化因子に曝露する第1日に培地中に存在してもよい。p P S 細胞の分化は、本明細書に記載の神経誘導サプリメント、s h h シグナル伝達活性化因子及び抗アポトーシス剤の存在下、上記のように1時間～35日間実施してもよく、その後、抗アポトーシス剤の非存在下で培養してもよい。

30

【0101】

ある特定の場合には、p P S 細胞から M G E 前駆細胞を作製する方法は、1つまたは複数の w n t 阻害剤を含む培地で p P S 細胞を培養することを含み得る。W n t シグナル阻害剤は p P S 細胞の培養開始時に既に培地に添加してもよいが、数日間培養した後（例えば、培養から10日以内の時点）に培地に添加してもよい。ある特定の場合には、W n t シグナル阻害剤を p P S 細胞の浮遊培養開始から5日以内、例えば0日以内、1日以内または3日以内などの時点で培地に添加する。w n t 阻害剤は s E B の生成段階全体を通じて存在しても、あるいは5～10日、例えば、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間存在してもよく、その後、w n t 阻害剤（1つまたは複数）の非存在下で培養を継続してもよい。

40

【0102】

ある特定の場合には、p P S 細胞から M G E 前駆細胞を作製する方法は、1つまたは複数の S M A D 阻害剤を含む培地で p P S 細胞を培養することを含み得る。S M A D シグナル阻害剤は p P S 細胞の培養開始時に既に培地に添加してもよいが、数日間培養した後（

50

例えば、培養から10日以内の時点)に培地に添加してもよい。ある特定の場合には、1つまたは複数のSMA Dシグナル阻害剤をp P S細胞の浮遊培養開始から5日以内、例えば0日以内、1日以内または3日以内などの時点で培地に添加する。w n t阻害剤はs E Bの生成段階全体を通じて存在しても、あるいは5~10日の期間存在してもよい。

#### 【0103】

ある特定の場合には、p P Sをs h h活性化因子、本明細書に記載の神経誘導サプリメント及びSMA D阻害剤の存在下で5~15日(例えば、5~10日、例えば5日、6日、7日、8日、9日、10日、12日など)の期間分化させ、その後、SMA D阻害剤(1つまたは複数)の非存在下で分化を継続させ得る。

#### 【0104】

ある特定の実施形態では、霊長類多能性幹(p P S)細胞から内側神経節隆起(M G E)前駆細胞を作製する方法は、無血清培地でp P S細胞を培養してs E Bを生成することを含み得、ここでは、s E BはM G E前駆細胞を含み、無血清培地はソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、抗アポトーシス剤と、SMA D阻害剤と、W n t阻害剤と、B 2 7とを含む。本明細書に記載される方法によって作製されるs E Bは、M G E前駆細胞の集団を含む。

#### 【0105】

ある特定の実施形態では、霊長類多能性幹(p P S)細胞から内側神経節隆起(M G E)前駆細胞を作製する方法は、p P S細胞を無血清培地中、浮遊培養で培養してM G E前駆細胞を生成することを含み得、ここでは、無血清培地はソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、抗アポトーシス剤と、SMA D阻害剤と、W n t阻害剤と、B 2 7とを含む。ある特定の場合には、s E Bを分離し単層として播種し、M G E前駆細胞を含む単層を生成し得る。

#### 【0106】

ある特定の場合には、p P S細胞の分化開始から約5日後にs E Bを分離し単層として播種し得る。例えば、s E Bの形成後1~100日以内、例えば、1~75日以内、1~50日以内、1~30日以内、1~10日以内にs E Bを分離し単層として播種し得る。例示的な場合には、s E Bの形成から約10日後、例えば、10~50日後、10~40日後、10~30日後、10~20日後、10日後、12日後などにs E Bを分離し単層として播種し得る。使用する分化因子及び添加剤、サプリメントまたは因子ならびにその添加/除去のタイミングは上に開示した通りのものであり得る。

#### 【0107】

ある特定の実施形態では、霊長類多能性幹(p P S)細胞から内側神経節隆起(M G E)前駆細胞を作製する方法は、p P S細胞を無血清培地中、接着培養で培養してM G E前駆細胞を生成することを含み得、ここでは、無血清培地はソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、抗アポトーシス剤と、SMA D阻害剤と、W n t阻害剤と、B 2 7とを含む。

#### 【0108】

一般に、本明細書に記載される方法によって作製されるM G E前駆細胞は、N K X 2 . 1などのM G E前駆細胞のマーカーを発現する。

#### 【0109】

ある特定の場合には、M G E前駆細胞を生成する培養を開始した時点のP S細胞は、 $10^3 \sim 10^7$ 細胞/mlの細胞密度で存在する。

#### 【0110】

浮遊培養に使用する培地は、任意の基本培地を用いて調製することができる。培地はB M E培地、B G J b培地、C M R L 1 0 6 6培地、グラスゴーM E M培地、I m p r o v e d M E M Z i n c O p t i o n培地、I M D M培地、M e d i u m 1 9 9培地、イーグルM E M培地、D M E M培地、ハム培地、R P M I 1 6 4 0培地、フィッシャー培地、N e u r o b a s a l培地及びその混合培地などであり得る。本明細書に開示されるように、添加剤、サプリメントまたは因子の添加によって培地を改変してもよい。

#### 【0111】

10

20

30

40

50

p P S を接着培養で培養する方法には接着基質を有する細胞培養容器を使用し得る。使用する分化因子及び添加剤、サプリメントまたは因子ならびにその添加 / 除去のタイミングは上に開示した通りのものであり得る。

【 0 1 1 2 】

接着胚様体 ( a E B ) の生成

ある特定の場合には、上記の方法によって生成した s E B を、s E B の付着を促進する接着基質を有する細胞培養容器に播種して接着 E B を形成させ得る。一般に、本明細書に記載の神経誘導サプリメントと s h h シグナル伝達活性化因子とを含有する培地中、接着基質を有する細胞培養容器に s E B を播種し得る。

【 0 1 1 3 】

p P S 細胞を上記のように接着培養で培養する実施形態では、この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で p P S 細胞を培養して a E B を生成することをさらに含み得、この a E B は M G E 前駆細胞を含む。

【 0 1 1 4 】

接着培養に再播種し培養して a E B を形成させる s E B は、1 ~ 1 0 0 日の期間培養し得る。例示的な方法では、s E B の再播種は、E B を機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にする段階、分離した細胞を接着基質に播種して接着単層を得る段階；及び接着単層を培養して a E B を生成する段階を含み得る。ある特定の方法では、s E B を接着条件でさらに培養する前に分離しない。

【 0 1 1 5 】

ある特定の実施形態では、p P S 細胞から M G E 前駆細胞を生成する方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で p P S 細胞を培養して s E B を生成すること、接着基質を有する細胞培養容器に s E B を播種すること、及び接着基質に播種した s E B をソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で培養して a E B を生成することを含み得、この a E B は M G E 前駆細胞を含む。

【 0 1 1 6 】

ある特定の場合には、a E B を分離し単層として再播種し、この単層をソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で培養して M G E 前駆細胞を生成し得る。

【 0 1 1 7 】

接着培養物を培養して s E B から a E B を生成するための細胞培養培地はほかにも、抗アポトーシス剤、S M A D 阻害剤及び W n t 阻害剤などの因子のうちの 1 つまたは複数を含み得る。この因子は、接着培養開始時に存在してもよく、また接着培養開始から 5 日以内、例えば接着培養開始から 0 時間以内、1 時間以内、3 時間以内、1 0 時間以内、1 日以内、2 日以内または 3 日以内に添加してもよい。この因子は 1 ~ 2 0 日間培養した後に接着培養物から除去してもよい。

【 0 1 1 8 】

ある特定の実施形態では、p P S 細胞から M G E 前駆細胞を生成する方法は、本明細書に記載される方法によって得られた s E B の細胞を、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、神経誘導サプリメントと、W n t 阻害剤と、S M A D 阻害剤とを含む培地中、接着培養で 4 ~ 2 0 日の期間培養した後、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含むが、W n t 阻害剤と S M A D 阻害剤は含まない培地で接着培養物を 8 ~ 2 0 日間培養することを含み得る。

【 0 1 1 9 】

本明細書に記載される方法によって生成した a E B は、M G E 前駆細胞の集団を含む。一般に、本明細書に記載される方法によって作製された a E B 中に存在する M G E 前駆細胞は、N K X 2 . 1 及び F O X G 1 を発現する。ある特定の場合には、本明細書に開示される方法によって作製された M G E 前駆細胞は、N K X 2 . 1、L H X 6、L H X 7 / 8、F O X G 1、O L I G 2、D L X 1 / 2 及び A S C L 1 などの M G E 前駆細胞のマーカー

10

20

30

40

50

ーを1つまたは複数発現し得る。

【0120】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法によって作製されたMGE前駆細胞はほかにも、MGE前駆細胞から分化した細胞、例えば介在ニューロン、例えばGABA作動性介在ニューロンなどの集団を含み得る。

【0121】

一般に、本明細書に記載される方法により、MGE前駆細胞が高効率で生成し、細胞培養物中の細胞の少なくとも50%（例えば、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%）がMGE前駆細胞である細胞培養物が生じる。

【0122】

したがって、この方法は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サブプリメントとを含む無血清培地でpPS細胞を10～100日間（例えば、5～50日間）培養してMGE前駆細胞を生成することを含み得、ここでは、pPS細胞を接着培養または浮遊培養で培養し、pPS細胞をソニックヘッジホッグ経路活性化因子及び神経誘導サブプリメントの存在下で培養する前にその分化を誘導する。したがって、pPS細胞は、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サブプリメントとを含む無血清培地で培養する前に、EBなどの分化した細胞を含み得る。ある特定の場合には、無血清培地は抗アポトーシス剤、SMAD阻害剤及びWnt阻害剤をさらに含み得る。

【0123】

ある特定の場合には、EBから得られたaEBを浮遊培養で再播種してsEBを形成させるか、分離し接着培養で単層として再播種し得る。

【0124】

MGE前駆細胞を生成する方法を用いてpPS細胞を接着培養で培養することについて、以下でさらに説明する。

【0125】

MGE前駆細胞生成のための接着培養

上記のように、ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞を作製する方法を開始する時点で、pPSは、pPS細胞の付着を促進する接着基質を有する細胞培養容器中に播種した細胞であり、この細胞と、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サブプリメントとを含む無血清培地とを接触させてMGE前駆細胞を生成する。

【0126】

ある特定の場合には、接着培養で生成したMGE前駆細胞はaEB中に存在する。

【0127】

いくつかの場合には、本発明の培養方法によって作製されたaEBを分離し単層として再播種し、ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サブプリメントとを含む無血清培地で培養してMGE前駆細胞を生成し得る。aEBは、本明細書に記載されるサブプリメント及び因子中で1～100日の期間維持した後、浮遊培養で再播種しsEBとしてさらに培養するか、分離し接着培養で単層として再播種してもよい。ある特定の場合には、期間は1～75日、1～50日、1～30日、1～10日、例えば、10～50日、10～40日、10～30日、10～20日、5日、10日、20日または30日であり得る。

【0128】

MGE前駆細胞を生成する方法を用いてpPSを接着培養で培養するのに当該技術分野で公知の接着基質及び本明細書に記載の接着基質を使用し得る。

【0129】

pPS細胞をソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サブプリメントとを含む無血清培地と接触させる前に、これを一定期間、接着培養で増殖させ得る。ある特定の場合には、ドナーpPS細胞培養の過剰増殖、フィーダー層の非存在下でpPSを培養すること、またはFGFの存在下でpPS細胞を培養することなどによって、pPS細胞の分化を誘導し得る。上記のものに代えてまたは加えて、細胞が未分化の表現型を維持できないようにする特定の因子を加えて培養することによって分化過程を開始させることができる

10

20

30

40

50

。最初の分化因子はM G E 前駆細胞系列への分化に制限するものである必要はないが、分化した集団の細胞型の範囲内にM G E 前駆細胞またはその前駆体を含むものであるべきである。

【 0 1 3 0 】

ある段階で培養物をより特異的にM G E 前駆細胞系列に方向付けることができる。これは、より特異的にM G E 前駆細胞の生成及び増殖を促進する因子を培地に含ませることによって行うことができる。M G E 前駆細胞の形成及び/または増殖を促進する例示的な因子としては、本明細書に記載される神経誘導サブプリメント、s h h シグナル伝達活性化因子、B M P シグナル伝達阻害剤、T G F -  $\beta$  シグナル伝達阻害剤、W n t 阻害剤及び抗アポトーシス剤が挙げられ、いくつかの場合には、F G F シグナル伝達活性化因子（1つまたは複数）がこれに含まれ得る。

10

【 0 1 3 1 】

M G E 前駆細胞を生成するための例示的な方法を以下に記載する。

【 0 1 3 2 】

培地にs h h 活性化因子及び/または神経誘導サブプリメントを添加する前にp P S 細胞を接着条件で0 ~ 9日間培養してよく、例えば、培地にs h h 活性化因子及び/または神経誘導サブプリメントを添加する前にp P S 細胞を接着条件で少なくとも0時間、1時間、3時間、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間または9日間培養してよい。ある特定の実施形態では、p P S をフィーダー細胞層の非存在下で分化させる。

20

【 0 1 3 3 】

いくつかの場合には、p P S 細胞を培養開始から1 ~ 100日の期間、s h h 活性化因子及び/または神経誘導サブプリメントを含有する培地中、接着条件で培養してM G E 前駆細胞を形成させ得る。

【 0 1 3 4 】

p P S 細胞を接着条件で培養する培地は、本明細書に記載の神経誘導サブプリメント及びs h h シグナル伝達活性化因子に加えて、抗アポトーシス剤、S M A D 阻害剤（例えば、T G F -  $\beta$  阻害剤、B M P 阻害剤、アクチビン阻害剤、N o d a l 阻害剤またはG D F シグナル伝達経路阻害剤）及びW n t 阻害剤のうちの1つまたは複数を含む得る。

30

【 0 1 3 5 】

分化因子の添加及び除去のタイミングは、a E B 形成について上に記載した通りのものであり得る。

【 0 1 3 6 】

ある特定の場合には、p P S 細胞からM G E 前駆細胞を作製する方法は、抗アポトーシス剤、例えばR O C K 阻害剤を含む培地でp P S 細胞を約1時間 ~ 35日間、例えば、少なくとも1時間、少なくとも3時間、少なくとも10時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、例えば4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、15日間、20日間、25日間または35日間などの間培養することを含み得る。例示的な方法は、p P S 細胞を抗アポトーシス剤を含有する培地中、接着培養で播種し、p P S 細胞を抗アポトーシス剤の存在下で1時間 ~ 35日の期間培養することを含み得る。ある特定の場合には、抗アポトーシス剤は、M G E 前駆細胞を生成するためにp P S 細胞の培養を開始する時点から存在してよく、1時間 ~ 35日後、例えば1 ~ 7日後などに除去してよい。

40

【 0 1 3 7 】

ある特定の場合には、p P S 細胞からM G E 前駆細胞を作製する方法は、1つまたは複数のw n t 阻害剤を含む培地でp P S 細胞を培養することを含み得る。W n t シグナル阻害剤はp P S 細胞の培養開始時に既に培地に添加してもよいが、数日間培養した後（例えば、培養から10日以内の時点）に培地に添加してもよい。ある特定の場合には、接着条件でp P S 細胞の培養を開始してから5日以内、例えば0日以内、1日以内または3日以内などの時点でW n t シグナル阻害剤を培地に添加する。w n t 阻害剤は培養全体を通じ

50

て存在しても、あるいは5～10日の期間存在してもよい。

【0138】

ある特定の場合には、p P S細胞からM G E前駆細胞を作製する方法は、1つまたは複数のS M A D阻害剤を含む培地でp P S細胞を培養することを含み得る。S M A Dシグナル阻害剤はp P S細胞の培養開始時に既に培地に添加してもよいが、M G E前駆細胞を生成するために数日間培養した後（例えば、培養から10日以内の時点）に培地に添加してもよい。ある特定の場合には、接着条件でp P S細胞の培養を開始してから5日以内、例えば0日以内、1日以内または3日以内などの時点で1つまたは複数のS M A Dシグナル阻害剤を培地に添加する。w n t阻害剤はM G E前駆細胞を生成する培養全体を通じて存在しても、あるいは5～10日の期間存在してもよい。

10

【0139】

ある特定の実施形態では、霊長類多能性幹（p P S）細胞から内側神経節隆起（M G E）前駆細胞を作製する方法は、p P S細胞を接着条件で培養してM G E前駆細胞を生成することを含み得、ここでは、培地はソニックヘッジホッグ経路活性化因子と、抗アポトーシス剤と、S M A D阻害剤と、W n t阻害剤と、B 2 7とを含む。

【0140】

ある特定の場合には、M G E前駆細胞を生成する培養を開始した時点のP S細胞は、 $10^3 \sim 10^7$ 細胞/mlの細胞密度で存在する。

【0141】

上記のように、p P S細胞からM G E前駆細胞を生成する方法に無血清培地を使用し得る。無血清培地は、未調整または未精製の血清、例えばウシ胎仔血清などを含有しない培地を意味する。無血清培地は、血清代替物、例えば本明細書に記載されるもの、例えばB 2 7またはN S 2 1などを含み得る。

20

【0142】

M G E前駆細胞の培養

本明細書に記載される方法によって生成したs E B及びa E Bを酵素的または機械的に分離し、接着基質を有する細胞培養容器で単層として培養し得る。したがって、s E B及びa E B中に存在するM G E前駆細胞は、単層として培養され得る。

【0143】

ある特定の場合には、M G E前駆細胞の単層培養を1～100日、例えば10～15日の期間実施する。

30

【0144】

M G E前駆細胞の単層培養は、本明細書に記載の神経誘導サプリメントとs h hシグナル伝達活性化因子とを含有する培地で実施してよい。

【0145】

ある特定の場合には、本明細書に記載される方法によって生成したM G E前駆細胞をニューロン、例えば抑制性介在ニューロン、例えばG A B A作動性介在ニューロンなどの生成を促進する培地で培養し得る。したがって、本明細書に記載される方法によって生成されM G E前駆細胞を含むs E B、a E Bならびにs E B及びa E Bを分離して得られた単層と、M G E前駆細胞から分裂終了ニューロンへの分化を促進する培地とを接触させ得る。ある特定の場合には、この培地はS M A D阻害剤を含まないものであり得る。さらに、ある特定の場合には、この培地はS M A D活性化因子を含み得る。したがって、培地は、本明細書に記載されるプロトコルによって生成したM G E前駆細胞中に存在する介在ニューロンの集団を増加させるためS M A D活性化因子を含み得る。例示的なS M A D活性化因子としては、T G F（例えば、T G F  $\beta$  3）、B M P（例えば、B M P 2、B M P 4、B M P 8）、アクチビン、N o d a l、G D F及びI D E 1が挙げられる。

40

【0146】

ある特定の場合には、M G E前駆細胞から介在ニューロンへの分化を促進する培地は、N O T C H阻害剤、B D N F、G D N F、N T 3、N T 4、c a m p、ビタミンC、血清、マトリゲル、インスリン、I G F、S D F 1 a、ニューレグリン1、T G F  $\beta$ を含み得

50

る。

#### 【0147】

MGE 前駆細胞の単層培養により、MGE 前駆細胞の増殖及び/またはMGE 前駆細胞から神経細胞の運命をもつ細胞への分化が生じ得る。ある特定の場合には、神経細胞の運命をもつ細胞に分化するMGE 前駆細胞は、DLX1/2、TUJ、MAP2、GAD1/2及びGABAを発現し、またNKX2.1、ASCL1、LHX6、LHX7/8、DCX、NEUN及びVGATのうちの1つまたは複数を発現し、サブタイプマーカーのカルビンジン、カルレチニン、ソマトスタチン及びパルプアルブミンを発現し得る。

#### 【0148】

ある特定の場合には、本明細書に記載される方法によって生成したMGE 前駆細胞を支持細胞集団と共培養して、MGE 前駆細胞からGABA作動性介在ニューロンなどの介在ニューロンへの分化を誘導し得る。

10

#### 【0149】

未分化状態でのpPS細胞の繁殖

分化を促進せずに増殖を促進する培養条件を用いて、pPS細胞を培養により継続的に繁殖させることができる。例示的なES培地は、DMEM（ノックアウトDMEM、「KO DMEM」）80%、規定のウシ胎仔血清（FBS、HyClone）または血清代替物（例えば、ノックアウト血清代替物（KSR））20%、非必須アミノ酸（NEAA）1%、pen-strep-グルタミン（1mM L-グルタミン）1%、β-メルカプトエタノール0.0008%及びFGF-ベシク（bFGF）10ng/mlで作製される。

20

#### 【0150】

pPS細胞を分化を阻害する環境で培養することによって、未分化の状態で拡大することができる。pPS細胞を従来の方で、マウスの胚組織または胎児組織に由来するフィーダー細胞層上で培養する。培養プレートに放射線照射したマウス胚線維芽細胞（MEF）（照射により増殖は阻害されるが、pPS細胞を補助する因子の合成は可能である）を1ウェル当たり375,000個播種し、これを播種後5時間~10日間使用する。ある特定の実施形態では、このほかヒトフィーダー細胞を用いてもよい。

#### 【0151】

フィーダー細胞がなくてもpPS細胞を未分化の状態で維持することができる。無フィーダー培養の環境には、適切な培養基質、具体的にはマトリゲル（登録商標）またはラミニンなどの細胞外マトリックスが含まれる。1cm<sup>2</sup>当たりの細胞数が15,000個を超えるように（90,000個/cm<sup>2</sup>~170,000個/cm<sup>2</sup>が最適である）pPS細胞を播種する。分化しない細胞増殖を補助する因子を含有する栄養培地によって無フィーダー培養を補助する。このような因子を分泌する細胞、例えば放射線照射した（約4,000rad）初代マウス胚線維芽細胞、テロマー化したマウス線維芽細胞またはpPS細胞に由来するヒトフィーダー細胞などと培地を培養することによって、このような因子を培地に導入し得る。血清代替物20%及びbFGF 4~8ng/mLを添加したKO DMEMなどの無血清培地にフィーダーを約5~6×10<sup>4</sup>個/cm<sup>2</sup>の密度で播種することによって、培地を調整することができる。1~2日間調整した培地にbFGFをさら添加し、1~2日間、pPS細胞培養を補助するのに使用する。無フィーダー培養法の特徴については、国際公開第99/20741号及び同第01/51616号；ならびにXuら, Nat. Biotechnol. 19:971, 2001でさらに論じられており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

#### 【0152】

因子

本開示の方法及び組成物は、様々な因子、例えば神経誘導サプリメント、抗アポトーシス剤、分化因子などの使用を含む。本開示の方法及び組成物で使用する神経誘導サプリメント、抗アポトーシス剤、分化因子の例を以下に記載する。

#### 【0153】

50

### 神経誘導サプリメント

例示的な神経誘導サプリメントとしては、B 2 7、NS 2 1またはこれと同等のサプリメントが挙げられる。

#### 【0154】

ある特定の実施形態では、神経誘導サプリメントはB 2 7であり得る。Life Technologies社からB - 2 7（登録商標）無血清サプリメントを入手することができる。B 2 7サプリメントは、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、インスリン、プロゲステロン、コルチコステロン、トリヨード - 1 - チロニン、酢酸レチノール、DLトコフェロール、DL酢酸トコフェロール、ビオチン、リノール酸、リノレン酸、エタノールアミン、亜セレン酸Na、L - カルニチン、還元グルタチオン、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、D - ガラクトース及びブトレシンを含有する。ある特定の場合には、B 2 7 - ビタミンAを使用し得る。

#### 【0155】

ある特定の場合には、神経誘導サプリメントはNS 2 1であり得る。NS 2 1についてはY . Chenら, J . Neurosci . Methods . , 171 : 239 , 2008に記載されている。Y . Chenらは、NS 2 1が神経培養の面でB 2 7サプリメントと同等であることを示した。NS 2 1の配合表がY . Chenらの文献に記載されており、これを下の表1に再現する。

【表 1】

NS1の配合表

| 最終濃度                                                                             |                  |               |                    |                           |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------|--------------------|---------------------------|
|                                                                                  | $\mu\text{g/ml}$ | $\mu\text{M}$ | ス ト ッ ク<br>(mg/ml) | NS21 400ml 用<br>(最終培地20L) |
| ウシアルブミ<br>ン                                                                      | 2500             | 37            | 粉末として添<br>加        | 50g                       |
| カタラーゼ                                                                            | 2.5              | 0.010         | 粉末として添<br>加        | 50mg                      |
| グルタチオン<br>(還元)                                                                   | 1.0              | 3.2           | 粉末として添<br>加        | 20mg                      |
| インスリン                                                                            | 4.0              | 0.6           | 10                 | 8ml                       |
| スーパーオキ<br>シダーゼジス<br>ムターゼ (S u<br>p e r o x i<br>d a s e d<br>i s m u t a<br>s e) | 2.5              | 0.077         | 粉末として添<br>加        | 50mg                      |
| ホロトランス<br>フェリン                                                                   | 5.0              | 0.062         | 粉末として添<br>加        | 100mg                     |
| T3 (トリヨード<br>ル-1-チロ<br>ニン (t r i i<br>o d o l - 1<br>- t h y r o<br>n i n))      | 0.002            | 0.0026        | 2.0                | 20 $\mu\text{l}$          |
| L-カルニチ<br>ン                                                                      | 2.0              | 12            | 粉末として添<br>加        | 40mg                      |
| エタノールア<br>ミン                                                                     | 1.0              | 16            | 液体(1g/ml)          | 20 $\mu\text{l}$          |
| D (+) -ガラ<br>クトース                                                                | 15               | 83            | 粉末として添<br>加        | 300mg                     |
| ブトレシン                                                                            | 16.1             | 183           | 粉末として添<br>加        | 322mg                     |
| 亜セレン酸ナ<br>トリウム                                                                   | 0.01435          | 0.083         | 1.0                | 280 $\mu\text{l}$         |
| エタノールストック                                                                        |                  |               |                    |                           |
| コルチコステ<br>ロン                                                                     | 0.02             | 0.058         | 2.0                | 0.2ml                     |
| リノール酸                                                                            | 1.0              | 3.5           | 100.0              | 0.2ml                     |
| リノレン酸                                                                            | 1.0              | 3.5           | 100.0              | 0.2ml                     |

10

20

30

40

|                                |        |       |       |        |
|--------------------------------|--------|-------|-------|--------|
| リポ酸（チオクト酸）                     | 0.047  | 0.2   | 4.7   | 0.2ml  |
| プロゲステロン                        | 0.0063 | 0.020 | 3.2   | 0.04ml |
| 酢酸レチノール                        | 0.1    | 0.2   | 20.0  | 0.1ml  |
| 全トランスレチノール（ビタミンA）              | 0.1    | 0.3   | 10.0  | 0.2ml  |
| D, L- $\alpha$ -トコフェロール（ビタミンE） | 1.0    | 2.3   | 100.0 | 0.2ml  |
| D, L- $\alpha$ -酢酸トコフェロール      | 1.0    | 2.1   | 100.0 | 0.2ml  |

10

20

## 【0156】

ある特定の場合には、神経誘導サプリメントは、p P S細胞を培養するための無血清培地中に0.5～10%、例えば0.5～5%などの範囲、例えば0.5%、1%、2%または3%の濃度で存在しうる。

## 【0157】

ある特定の実施形態では、s h h活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む、p P Sを培養してE B生成するための無血清培地は、K S RサプリメントもN 2サプリメントも含まない。ある特定の実施形態では、M G E前駆細胞を生成する方法は、b F G FまたはF G F - 2を含む無血清培地でp P S細胞を培養することを含まない。ある特定の場合には、s E Bまたはa E Bを生成するのに十分な期間、s h h活性化因子と神経誘導サプリメントを含み、K S RサプリメントもN 2サプリメントもb F G FもF G F - 2も含有しない無血清培地でp P S細胞を培養する。

30

## 【0158】

ある特定の場合には、a E Bを生成するのに十分な期間、s h h活性化因子と神経誘導サプリメントとを含み、さらにK S Rサプリメント、N 2サプリメント、b F G F及びF G F - 2のうちの1つまたは複数を含む無血清培地でs E Bをさらに培養し得る。

## 【0159】

ある特定の場合には、s E Bを生成するのに十分な期間、s h h活性化因子と神経誘導サプリメントとを含み、さらにK S Rサプリメント、N 2サプリメント、b F G F及びF G F - 2のうちの1つまたは複数を含む無血清培地でp P S細胞を培養し得る。本明細書に記載されるようにs h h活性化因子及び神経誘導サプリメントと同時に、または本明細書に記載されるようにp P S細胞をs h h活性化因子及び神経誘導サプリメントに曝露してからのおちの時点、例えば5日～2週間後など、例えば1～2週間後などに追加のサプリメントを添加し得る。ある特定の場合には、K S Rサプリメント及び/またはN 2サプリメントは、分化第0日または本明細書に記載されるようにp P S細胞とs h h活性化因子及び神経誘導サプリメントとを接触させたのち、例えば第5日、第7日、第10日、第14日、第21日などに添加されて存在し得る。

40

## 【0160】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される方法で使用される細胞培養培地は、K S RまたはN 2などの血清代替物を含まない。

50

## 【0161】

## 抗アポトーシス剤

本明細書に記載される方法及び組成物の特定の実施形態では、P S 培養細胞の培地中に抗アポトーシス剤が含まれ得る。

## 【0162】

ある特定の場合には、抗アポトーシス剤はR h o 結合タンパク質キナーゼ ( R O C K ) 阻害剤であり得る。ある特定の場合には、R O C K 阻害剤は、Y 2 7 6 3 2、H A - 1 0 0、H - 1 1 5 2、( + ) - トランス - 4 - ( 1 - アミノエチル ) - 1 - ( ピリジン - 4 - イルアミノカルボニル ) シクロヘキサジヒドロクロリド水和物 ( W O 0 0 0 7 8 3 5 1、W O 0 0 0 5 7 9 1 3 に記載されている )、イミダゾピリジン誘導体 ( 米国特許第 7, 3 4 8, 3 3 9 号に記載されている )、置換ピリミジン及びピリジン誘導体 ( 米国特許第 6, 9 4 3, 1 7 2 号に記載されている ) ならびに置換イソキノリン - スルホニル化合物 ( E P 0 0 1 8 7 3 7 1 に記載されている ) または G S K 4 2 9 2 8 6 A、R O C K I I 阻害剤またはチアゾピピンまたはその類似体もしくは誘導体であり得る。

10

## 【0163】

抗アポトーシス剤は、0 . 1  $\mu$  M、0 . 3  $\mu$  M、0 . 5  $\mu$  M、1  $\mu$  M、少なくとも約 1 . 3  $\mu$  M、少なくとも約 1 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 2  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 3  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 8  $\mu$  M、少なくとも約 3  $\mu$  M、少なくとも約 3 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 4  $\mu$  M、少なくとも約 4 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 5  $\mu$  M、少なくとも約 1 0  $\mu$  M、少なくとも約 2 0  $\mu$  M、少なくとも約 3 0  $\mu$  M、少なくとも約 4 0  $\mu$  M または少なくとも約 5 0  $\mu$  M、例えば 0 . 5  $\mu$  M ~ 5 0  $\mu$  M、1  $\mu$  M ~ 2 5  $\mu$  M または 2 . 5  $\mu$  M ~ 2 0  $\mu$  M などの濃度で存在し得る。

20

## 【0164】

## S M A D 阻害剤

本明細書に記載される方法及び組成物の特定の実施形態では、細胞を培養するための培地中に S M A D 阻害剤が存在し得る。いくつかの実施形態では、細胞培養に使用する培地中に S M A D 阻害剤が 1 0 n g / m l、2 0 0 n g / m l、3 0 0 n g / m l、4 0 0 n g / m l、5 0 0 n g / m l、1  $\mu$  g / m l、1 . 5  $\mu$  g / m l、2  $\mu$  g / m l、2 . 5  $\mu$  g / m l または 5  $\mu$  g / m l の濃度、例えば 5 0 0 n g / m l ~ 3  $\mu$  g / m l、例えば 1  $\mu$  g / m l ~ 3  $\mu$  g / m l の濃度で存在し得る。

30

## 【0165】

S M A D 阻害剤は、少なくとも約 0 . 0 1  $\mu$  M、少なくとも約 0 . 0 3  $\mu$  M、少なくとも約 0 . 1  $\mu$  M、少なくとも約 0 . 2  $\mu$  M、少なくとも約 0 . 2 5  $\mu$  M、少なくとも約 0 . 3  $\mu$  M、少なくとも約 1  $\mu$  M、少なくとも約 1 . 3  $\mu$  M、少なくとも約 1 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 2  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 3  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 2 . 8  $\mu$  M、少なくとも約 3  $\mu$  M、少なくとも約 3 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 4  $\mu$  M、少なくとも約 4 . 5  $\mu$  M、少なくとも約 5  $\mu$  M、少なくとも約 1 0  $\mu$  M、少なくとも約 2 0  $\mu$  M、少なくとも約 3 0  $\mu$  M、少なくとも約 4 0  $\mu$  M または少なくとも約 5 0  $\mu$  M、例えば 0 . 5  $\mu$  M ~ 5 0  $\mu$  M、1  $\mu$  M ~ 2 5  $\mu$  M または 5  $\mu$  M ~ 2 0  $\mu$  M の濃度で存在し得る。

40

## 【0166】

ある特定の実施形態では、S M A D 阻害剤は T G F -  $\beta$  シグナル伝達阻害剤であり得る。例えば、S M A D 阻害剤は、A L K 阻害剤あるいは T G F -  $\beta$  1、T G F -  $\beta$  2、T G F -  $\beta$  3、T G F -  $\beta$  受容体 I 及び / または T G F -  $\beta$  受容体 I I と結合する抗体またはそのフラグメントであり得る。ある特定の実施形態では、T G F -  $\beta$  シグナル伝達阻害剤は小分子阻害剤であり得る。ある特定の場合には、T G F -  $\beta$  シグナル伝達阻害剤は、L Y 3 6 4 9 4 7 ( S D 2 0 8 )、S M 1 6、S B - 5 0 5 1 2 4、A L K 5 阻害剤 I I、S B - 4 3 1 5 4 2、L Y 2 1 5 7 2 9 9、L D N - 1 9 3 1 8 9、A 8 3 - 0 1、( + ) - I T D - 1、I T D - 1 ( エチル 4 - ( [ 1, 1' - ビフェニル ] - 4 - イル ) - 2, 7, 7 - トリメチル - 5 - オキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロキノリン - 3 - カルボキシレート ) または I T D t であり得る。

50

## 【 0 1 6 7 】

ある特定の実施形態では、S M A D 阻害剤は、B M P R I A - F c、ノギンまたはその誘導体であり得る。

## 【 0 1 6 8 】

ある特定の実施形態では、S M A D 阻害剤はドルソモルフィンなどのB M P 経路阻害剤であり得る。

## 【 0 1 6 9 】

ある特定の実施形態では、S M A D 阻害剤は、アクチビン阻害剤、N o d a l 阻害剤またはG D F シグナル伝達経路阻害剤であり得る。例示的なアクチビン阻害剤としては、S B 4 3 1 5 4 2、フォリスタチン、A 8 3 0 1、D M H 1、ドルソモルフィン、K 0 2 2 8 8 及びS B 5 0 5 1 2 4 が挙げられる。ある特定の場合には、S B 4 3 1 5 4 2、L e f t y またはC e r e b r u s などのN o d a l 阻害剤（製剤化されている）を使用し得る。ある特定の場合には、S B 4 3 1 5 4 2、D 4 4 7 6、G W 7 8 8 3 8 8、L Y 3 6 4 9 4 7、R e p S o x、S B 5 2 5 3 3 4、S D 2 0 8 を用いてG D F シグナル伝達経路を阻害し得る。

10

## 【 0 1 7 0 】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法に使用される細胞培養培地中に2つ以上のS M A D 阻害剤が含まれ得る。

## 【 0 1 7 1 】

ソニックヘッジホッグシグナル伝達活性化因子

20

本明細書に記載される方法及び組成物の特定の実施形態では、細胞を培養するための培地中にソニックヘッジホッグシグナル伝達活性化因子が存在し得る。ソニックヘッジホッグシグナル伝達活性化因子は、少なくとも約0.01  $\mu$ M、少なくとも約0.03  $\mu$ M、少なくとも約0.1  $\mu$ M、少なくとも約0.2  $\mu$ M、少なくとも約0.25  $\mu$ M、少なくとも約0.3  $\mu$ M、少なくとも約1  $\mu$ M、少なくとも約1.3  $\mu$ M、少なくとも約1.5  $\mu$ M、少なくとも約2  $\mu$ M、少なくとも約2.3  $\mu$ M、少なくとも約2.5  $\mu$ M、少なくとも約2.8  $\mu$ M、少なくとも約3  $\mu$ M、少なくとも約3.5  $\mu$ M、少なくとも約4  $\mu$ M、少なくとも約4.5  $\mu$ M、少なくとも約5  $\mu$ M、少なくとも約10  $\mu$ M、少なくとも約20  $\mu$ M、少なくとも約30  $\mu$ M、少なくとも約40  $\mu$ Mまたは少なくとも約50  $\mu$ M、例えば0.05  $\mu$ M ~ 5  $\mu$ M、0.01  $\mu$ M ~ 2.5  $\mu$ M、0.05  $\mu$ M ~ 2  $\mu$ Mまたは0.1  $\mu$ M ~ 2  $\mu$ Mの濃度で存在し得る。

30

## 【 0 1 7 2 】

ある特定の場合には、ソニックヘッジホッグシグナル伝達活性化因子はs h hまたはその誘導体であり得る。ある特定の場合には、ソニックヘッジホッグシグナル伝達活性化因子は、プルモルファミン、S A G s m o o t h e n e d アゴニスト、H h - A g 1.5またはその誘導体及び類似体などの小分子であり得る。

## 【 0 1 7 3 】

W n t 阻害剤

本明細書に記載される方法及び組成物の特定の実施形態では、細胞を培養するための培地中にW n t シグナル伝達阻害剤が存在し得る。

40

## 【 0 1 7 4 】

W n t 阻害剤はw n t の発現または活性をダウンレギュレートする薬剤である。対象とする薬剤はw n t と直接相互作用し得るもの、例えば薬物、すなわち、小分子、遮断抗体などであっても、w n t 関連タンパク質、例えば、W n t 共受容体L R P 5 / 6 及び膜貫通タンパク質K r e m e n と相互作用するものであってもよい。これまで多数のw n t 阻害剤が記載されており、当該技術分野で公知である。

## 【 0 1 7 5 】

対象とするW n t 阻害剤は、可溶性の細胞外W n t タンパク質と正常細胞の表面に存在するf r i z z l e d 受容体との間の相互作用を阻害するものである。このような薬剤としては、特に限定されないが、w n t 阻害ドメインを含む可溶性f r i z z l e d ポリペ

50

プチド；可溶性 *f r i z z l e d* 関連ポリペプチド；*w n t* 特異的抗体；*f r i z z l e d* 特異的抗体；及び細胞外 *w n t* シグナル伝達を遮断することができるその他の分子が挙げられる。

【0176】

既知の *w n t* 阻害剤には、*D i c k k o p f* (*D k k*) 遺伝子ファミリーのメンバー (*K r u p n i k* ら (1999) *G e n e* 238 (2) : 301 - 13 を参照されたい) が含まれる。ヒト *D k k* 遺伝子ファミリーのメンバーとしては、*D k k - 1*、*D k k - 2*、*D k k - 3* 及び *D k k - 4* ならびに *D k k - 3* 関連タンパク質 *S o g g y* (*S g y*) が挙げられる。

【0177】

その他の *w n t* 阻害剤としては、分泌タンパク質の *W i s e* (*I t a s a k i* ら (2003) *D e v e l o p m e n t* 130 (18) : 4295 - 30) が挙げられる。*W i s e* タンパク質は *W n t* 共受容体、リポタンパク質受容体関連タンパク質 6 (*L R P 6*) と物理的に相互作用し、*L R P 6* との結合に関して *W n t 8* と競合することができる。

【0178】

阻害剤には、元来の阻害剤の誘導体、変異体及び生物学的に活性なフラグメントも含まれる。

【0179】

ある特定の場合には、*W n t* 阻害剤は、*C K I - 7*、*I W P* 類似体、*I W R* 類似体、*X A V 939*、*53 A H*、*W n t - C 59* などの小分子であり得る。

【0180】

ある特定の場合には、*W n t* 阻害剤は、 $10 \text{ ng/ml}$ 、 $200 \text{ ng/ml}$ 、 $300 \text{ ng/ml}$ 、 $400 \text{ ng/ml}$ 、 $500 \text{ ng/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $2 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  または  $5 \mu\text{g/ml}$  の濃度、例えば  $500 \text{ ng/ml} \sim 3 \mu\text{g/ml}$ 、例えば  $1 \mu\text{g/ml} \sim 3 \mu\text{g/ml}$  の濃度で培地中に存在し得る。

【0181】

細胞集団生成の評価

ある特定の場合には、産生された細胞集団を特徴付けるため、本明細書に開示される方法に従って培養する細胞集団をモニターし、培養によって得られた細胞の変化（例えば、本明細書に開示される培養方法の1つまたは複数の時点における）を評価し得る。ある特定の実施形態では、*M G E* 前駆細胞（分裂 *M G E* 前駆細胞及び/または分裂終了介在ニューロン）に特徴的なマーカーの発現を判定することによって、これらの細胞集団の産生を評価し得る。

【0182】

ある特定の場合には、マーカー転写産物またはタンパク質発現の有無を検出することによって特定のマーカー発現を判定する。あるいは、マーカーが細胞培養物または細胞集団の細胞中に存在するレベルを測定することによって、特定のマーカーの発現を判定することができる。このような工程では、マーカー発現の測定は定性的なものであっても定量的なものであってもよい。マーカー遺伝子によって産生されるマーカーの発現を定量化する方法の1つに、定量的 *P C R* (*Q - P C R*) を用いるものがある。*Q - P C R* を実施する方法は当該技術分野で周知である。このほか、当該技術分野で公知の他の方法を用いてマーカー遺伝子発現を定量化することができる。例えば、目的とするマーカー遺伝子産物に特異的な抗体を使用することによって、マーカー遺伝子産物の発現を検出することができる。ある特定の工程では、目的とする細胞集団に特徴的なマーカー遺伝子の発現に加え、*P S* 細胞をはじめとする細胞型に特徴的なマーカー遺伝子の有意な発現の欠如を判定し得る。

【0183】

*M G E* 前駆細胞生成のモニタリングは *N K X 2.1* 遺伝子の発現を判定することによるものであり得る。したがって、本明細書に記載される工程によって作製された *M G E* 前駆細胞は *N K X 2.1* マーカー遺伝子を発現し、これにより *N K X 2.1* 遺伝子産物を産生

10

20

30

40

50

する。本明細書に記載される方法によって作製されたMGE前駆細胞はほかにも、FOXG1を発現し、またLHX6、LHX7/8、OLIG2、ASCL1及びDLX2を発現し得る。さらに、本明細書に記載される方法によって作製されたMGE前駆細胞はPAX6を発現しない。

#### 【0184】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態では、MGE前駆細胞におけるNKX2.1マーカー及び/またはFOXG1マーカーの発現は、非MGE前駆細胞、例えば多能性幹細胞におけるNKX2.1マーカー及び/またはFOXG1マーカーの発現よりも少なくとも約2倍～少なくとも約10,000倍高い。他の実施形態では、MGE前駆細胞におけるNKX2.1マーカー及び/またはFOXG1マーカーの発現は、非MGE前駆細胞、例えば多能性幹細胞におけるNKX2.1マーカー及び/またはFOXG1マーカーの発現よりも少なくとも約4倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約40倍、少なくとも約80倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約500倍、少なくとも約750倍、少なくとも約1000倍、少なくとも約2500倍、少なくとも約5000倍、少なくとも約7500倍または少なくとも約10,000倍高い。

10

#### 【0185】

いくつかの場合には、目的とする細胞の機能分析を実施することによって、MGE前駆細胞（分裂MGE前駆細胞及び/または分裂終了介在ニューロン）生成のモニタリングを行う。例えば、本明細書に記載される方法によって生成したMGE前駆細胞は、*in vivo*または*in vitro*で介在ニューロンを生成し得る。ある特定の場合には、本明細書に開示される方法によって作製されたMGE前駆細胞は、*in vivo*で遊走しニューロンと機能的に統合され得る抑制性GABA作動性介在ニューロンに分化する、介在ニューロンを生成し得る。

20

#### 【0186】

ある特定の場合には、この方法はMGE前駆細胞生成のモニタリングを含まない。

#### 【0187】

細胞集団の富化、単離及び/または精製

上記工程のいずれかによって作製されるMGE前駆細胞（分裂MGE前駆細胞及び/または分裂終了介在ニューロン）などの目的とする細胞集団を、このような細胞に特異的なアフィニティタグを用いて富化、単離及び/または精製することができる。目的とする細胞または細胞集団に特異的なアフィニティタグの例としては、目的とする細胞の表面には存在するが、本明細書に記載される方法によって作製される細胞培養物中にみられ得る他の細胞型には実質的に存在しないポリペプチドなどのマーカー分子に特異的な抗体、リガンドをはじめとする結合物質が挙げられる。

30

#### 【0188】

抗体を作製しこれを細胞の単離に用いる方法は当該技術分野で公知であり、このような方法は、本明細書に記載される抗体及び細胞での使用に実施することができる。ある工程では、目的とする細胞集団が発現するマーカーと結合する抗体を磁気ビーズに付着させた後、酵素処理して細胞間及び基質接着を弱めた細胞培養物中の目的とする細胞に結合させる。次いで細胞/抗体/ビーズ複合体を、ビーズが結合した胚体内胚葉細胞と未結合細胞とを分離するために使用する磁場に曝露する。目的とする細胞が培養物中の他の細胞と物理的に分離された後、抗体の結合を分断し、細胞をしかるべき組織培養培地に再播種する。

40

#### 【0189】

このほか、富化、単離または精製された目的とする細胞集団を得るためのまた別の方法を用いることができる。例えば、いくつかの実施形態では、目的とする細胞が発現するマーカーに対する抗体を、細胞間及び基質接着を弱める処理をした目的とする細胞を含む細胞培養物とインキュベートする。次いで細胞を洗浄し、遠心分離し、再懸濁させる。次い

50

で、細胞浮遊液を二次抗体、例えば一次抗体と結合することができる F I T C コンジュゲート抗体などとインキュベートする。次いで細胞を洗浄し、遠心分離し、緩衝液に再懸濁させる。次いで、蛍光標示式細胞分取器 ( F A C S ) を用いて細胞浮遊液を解析し分取する。抗体結合細胞をマーカー特異的抗体と結合してない細胞から分離して収集することにより、目的とする細胞が単離される。必要に応じて、また別の親和性に基づく方法を用いることによって、あるいは目的とする細胞に特異的な同じまたは異なるマーカーを用いて分取をさらに数ラウンド実施することによって、単離した細胞組成物をさらに精製することができる。ある特定の場合には、大きさに基づいて細胞を分取することによって M G E 前駆細胞を富化し得る。

#### 【 0 1 9 0 】

10

ある特定の場合には、P S 細胞培養物に M G E 前駆細胞系列への分化を誘導した後、M G E 前駆細胞などの目的とする細胞を富化し、他の種類の細胞から単離及び/または精製する。上に記載した富化、単離及び精製方法は、任意の分化段階にあるこのような培養物に用い得ることが理解されよう。

#### 【 0 1 9 1 】

上記方法に加えて、他の細胞単離技術によって M G E 前駆細胞などの目的とする細胞を単離してもよい。さらに、目的とする細胞の選択的生存または選択的拡大を促進する増殖条件での連続継代培養法によって、M G E 前駆細胞などの目的とする細胞を富化または単離してもよい。

#### 【 0 1 9 2 】

20

本明細書に記載される方法を用いて、富化していない細胞集団に比して M G E 前駆細胞などの目的とする細胞が少なくとも約 2 ~ 約 1 0 0 0 倍富化された細胞集団または細胞培養物を作製する。いくつかの実施形態では、M G E 前駆細胞が未処理の細胞集団または細胞培養物に比して少なくとも約 5 ~ 約 5 0 0 倍富化され得る。他の実施形態では、M G E 前駆細胞が未分化の細胞集団または細胞培養物に比して少なくとも約 1 0 ~ 約 2 0 0 倍、少なくとも約 2 0 ~ 約 1 0 0 倍、少なくとも約 4 0 ~ 約 8 0 倍または少なくとも約 2 ~ 約 2 0 倍富化され得る。

#### 【 0 1 9 3 】

本開示の細胞集団の遺伝子型の特性

本開示の細胞集団が単離 P S 細胞または確立された P S 細胞系から誘導されたものであれば、これを元の細胞または細胞系の子孫と見なすことができる。したがって、この細胞集団はそれが由来する細胞と同じゲノムを持つことになる。これは、何らかの核型変化に加えて、P S 細胞とそこから生成した細胞集団との間で染色体 D N A が 9 0 % 超一致することを意味する。組換え法によって処理して導入遺伝子が導入されるか、内在遺伝子がノックアウトされた本開示の細胞集団では、操作されていない遺伝要素がすべて保存されることから、依然としてそれが由来する細胞系と同じゲノムを持つと考えられる。標準的な遺伝的技術によって、本開示の細胞集団及び P S 細胞が同じゲノムを持つことを確認することができる。ほかに、細胞集団が未分化の細胞系から正常な有糸分裂の過程を経て得られるものであれば、同じゲノムを持つと推測することができる。

30

#### 【 0 1 9 4 】

40

ある特定の産業上の利用では、この特徴は本開示の細胞集団の価値ある特性となる。特に、起点となる P S 細胞が入手できれば、その P S 細胞を必要に応じてさらに多くの細胞集団に増殖及び分化させることができるため、遺伝的に適合性のある分化細胞集団をさらに供給できる。さらに、P S 細胞を他の治療上重要な細胞系列に分化させることができる。

#### 【 0 1 9 5 】

本願に記載されている技術は、分化の前後に細胞を拡大することによって、同じゲノムを共有する大きい細胞集団の作製を可能にするものである。1 0 <sup>8</sup> 個、1 0 <sup>10</sup> 個または 1 0 <sup>12</sup> 個の細胞からなる集団が理論的に可能である。このような大きい集団は通常、さらなる培養、薬剤スクリーニングまたは治療的投与に適した別々の容器に分けられる。

50

## 【0196】

本開示のある特定の実施形態は、起点となる細胞（未分化P S細胞系または中間の集団）を、M G E 前駆細胞の特徴を有する1つまたは複数の分化細胞集団とを組み合わせる含む。この集団は同じ容器内にあっても、同じ設備の別々の容器内にあっても、2つの異なる場所にあってもよい。未分化の細胞と分化した細胞は同時に存在してもよく、また本明細書に記載される通りに未分化細胞の培養物をM G E 前駆細胞に分化させる場合などのように、異なる時間に存在してもよい。

## 【0197】

本開示の細胞集団を含む組成物

上記方法によって作製される細胞組成物は、単離M G E 前駆細胞と単離M G E 前駆細胞が富化された細胞集団とを含有する、細胞培養物を含む。

10

## 【0198】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞を含み、培養物中の細胞の少なくとも約50～80%が目的とする細胞である、細胞組成物を作製することができる。本明細書に記載される分化方法により、多能性細胞の約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約95%超を目的とする細胞に変換させることができる。

## 【0199】

目的とする細胞の単離を用いる実施形態では、例えば、目的とする細胞に結合する親和性試薬を使用することによって、実質的に純粋な目的とする細胞集団を回収することができる。

20

## 【0200】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、目的とする細胞を少なくとも約5%～少なくとも約95%含む細胞組成物に関する。いくつかの実施形態では、細胞培養物または細胞集団は哺乳動物細胞を含む。好ましい実施形態では、細胞培養物または細胞集団はヒト細胞を含む。例えば、ある特定の具体的な実施形態は、ヒト細胞を含み、ヒト細胞の少なくとも約5%～少なくとも約95%がM G E 前駆細胞である、細胞組成物に関する。他の実施形態は、ヒト細胞を含み、ヒト細胞の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%または90%超がM G E 前駆細胞である、細胞組成物に関する。

30

## 【0201】

特定の実施形態では、ヒト細胞を含み、ヒト細胞の少なくとも約70%がヒトM G E 前駆細胞である、組成物が提供される。

## 【0202】

別の実施形態では、ヒト細胞を含み、ヒト細胞の少なくとも約80%がヒトM G E 前駆細胞である、組成物が提供される。

40

## 【0203】

ある特定の実施形態では、組成物は多能性幹細胞及び/または抑制性介在ニューロンを含み得る。

## 【0204】

本開示の細胞集団、例えばM G E 前駆細胞を含むs E B、M G E 前駆細胞を含むa E B、M G E 前駆細胞またはM G E 前駆細胞から生成したニューロンなどは、これらの細胞集団を1つまたは複数含む組成物中に存在し得る。

## 【0205】

本開示の細胞集団は、新鮮なまま使用してもよく、また凍結保存などの当該技術分野で認められている方法で1日～10年の期間保管したのちに解凍して使用してもよい。

50

## 【0206】

本明細書に記載されるマーカー及び方法ならびに当該技術分野で公知のマーカー及び方法を用いることによって、上記の方法及びその組成物によって作製された細胞組成物を評価し得る。

## 【0207】

本明細書に記載される方法及び当該技術分野で公知の方法を用いることによって、上記の方法及びその組成物によって作製された細胞組成物を富化、単離または精製し得る。

## 【0208】

本開示の細胞集団の使用

スクリーニングのための細胞集団

本開示の細胞を用いて、MGE前駆細胞及び/またはそれから生成する介在ニューロンなどの細胞の特徴に影響を及ぼす薬剤（小分子、ペプチド、ポリヌクレオチドなど）または環境条件（培養条件または操作など）をスクリーニングすることができる。

## 【0209】

1つの例では、MGE前駆細胞を用いて、介在ニューロンへの成熟を促進する因子または長期培養でMGE前駆細胞増殖及び維持を促進する因子をスクリーニングする。例えば、候補となる分化因子または増殖因子を異なるウェルの細胞に加え、次いで生じた表現型の変化を、細胞をさらに培養するか使用するのに望ましい基準に従って判定することにより、これらの因子を試験する。これにより、MGE前駆細胞及び/またはそれから生成する細胞を生成及び/または維持するための誘導及び培養方法の改善をもたらすことができる。

## 【0210】

本開示の他のスクリーニング方法は、医薬化合物がMGE前駆細胞及び/またはそれから生成する細胞に有害作用を及ぼす可能性を試験することに関する。このタイプのスクリーニングは、化合物がMGE前駆細胞自体に何らかの薬理効果を及ぼすよう設計されている場合のみならず、別の部位に主要な薬理効果を発揮するよう設計された化合物によるMGE前駆細胞に関連した副作用を試験するのにも適切なものである。

## 【0211】

その他のスクリーニング方法は、MGE前駆細胞を用いて、MGE前駆細胞に影響を及ぼす可能性のある小分子薬物の効果を測定することに関する。この目的に向けては、*in vitro*で細胞と被験化合物とを一緒にし、その化合物のMGE前駆細胞に対する効果を判定する。

## 【0212】

薬剤スクリーニングの一般的原理については、米国特許第5,030,015号及びテキスト「*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*」(Academic Press 1997)に記載されている。候補医薬化合物の活性の評価では一般に、本発明の分化した細胞と、単独または他の薬物と組み合わせた候補化合物とを一緒にする。研究者は、(未処置細胞または陰性対照化合物で処置した細胞と比較して)細胞の形態、マーカーまたは機能活性に化合物に帰せられる何らかの変化を判定した後、化合物の効果と観察された変化との相関を明らかにする。

## 【0213】

臨床治療でのMGE前駆細胞

MGE前駆細胞を含む細胞集団、例えばMGE前駆細胞が富化された細胞集団などのほか、本明細書に記載される方法によって作製された精製MGE前駆細胞を多数の臨床応用に使用し得る。

## 【0214】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法を用いて作製されたMGE前駆細胞を、MGE前駆細胞での治療を必要とする対象の治療に使用し得る。

## 【0215】

ある特定の場合には、MGE前駆細胞での治療を必要とする対象は、抑制性介在ニュー

10

20

30

40

50

ロンの活性低下を特徴とする神経障害を有するか、その発症リスクのある患者であり得る。ある特定の場合には、患者は抑制性ニューロンの機能低下及び／または興奮性ニューロンの機能亢進を有し得る。

【0216】

ある特定の場合には、MGE前駆細胞がGABA作動性抑制性介在ニューロンなどの介在ニューロンに分化するのに適した分化条件をもたらす対象の標的部位にMGE前駆細胞を移植し得る。細胞を組織に送達するための当該技術分野の多数の標準的な方法のいずれかによって、例えば、細胞を適切な溶液または固体もしくは半固体担体などの担体中の懸濁物として注入することによって、細胞を移植し得る。適切な溶液としては、生理食塩水、PBS、L15、DMEM、イスコフ培地などが挙げられる。適切な固体担体としては、ビーズ、メッシュフィルターなどのフィルター、膜などが挙げられる。

10

【0217】

ある特定の場合には、MGE前駆細胞を対象の神経系に投与し得る。ある特定の場合には、MGE前駆細胞を対象の神経系の1つまたは複数の部位に移植することによって投与を実施し得る。

【0218】

ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞を対象の神経系の1つまたは複数の部位、例えば中枢神経系、例えば脳、例えば、小脳、大脳皮質、海馬、線条体（例えば、大脳基底核）、視床、視床下部、視床下核など；及び脊髄などに投与し得る。

【0219】

20

ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞の投与によって抑制性ニューロンの機能が回復する。ある特定の場合には、投与は、MGE前駆細胞を対象の脳の第一の部分に投与し、脳の第一の部分から離れた第二の部分の抑制性ニューロンの機能を回復させることを含み得る。

【0220】

ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞を神経障害、例えば発作性障害、例えば、癲癇、ハンチントン病、パーキンソン病、ALS、統合失調症、アルツハイマー病、自閉症、ジスキネジア、慢性疼痛、痙攣、神経因性疼痛、多発性硬化症、外傷性脳損傷、髄鞘形成不全疾患、双極性障害、うつ病及び癌などを有するか、その発症リスクのある対象に投与し得る。

30

【実施例】

【0221】

以下の実施例は、本発明を作製し使用する方法を当業者に十全に開示し説明するために記載されるものであり、本発明者らが自身の発明と見なすものの範囲を限定することを意図するものでもなければ、以下の実験が実施されるすべての実験または唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。用いる数値（例えば、量、温度など）に関しては正確を期するよう努めたが、実験による誤差及び偏差がある程度みられることを明らかにしておかなければならない。特に明示されない限り、一部とは重量部のことであり、分子量とは平均分子量のことであり、温度はセ氏温度で表され、圧力は大気圧またはその付近の圧力である。標準的な略号、例えば、bp、塩基対（1つまたは複数）；kb、キロベース（1つまたは複数）；pl、ピコリットル（1つまたは複数）；sまたはsec、秒（1つまたは複数）；min、分（1つまたは複数）；hまたはhr、時間（1つまたは複数）；aa、アミノ酸（1つまたは複数）；kb、キロベース（1つまたは複数）；bp、塩基対（1つまたは複数）；nt、ヌクレオチド（1つまたは複数）；i.m.、筋肉内の（筋肉内に）；i.p.、腹腔内の（腹腔内に）；s.c.、皮下の（皮下に）；などが使用され得る。

40

【0222】

本発明はその特定の実施形態を参照しながら説明されているが、当業者は、本発明の真の趣旨及び範囲を逸脱することなく、様々な変更を施し得ること、また均等物に置き換え得ることを理解するべきである。さらに、特定の状況、材料、物質の組成、工程、1つま

50

たは複数の工程段階に適合させるため、本発明の目的、趣旨及び範囲に修正を施し得る。このような修正はいずれも、本明細書に添付される特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

#### 【0223】

材料及び方法：

細胞培養及びFACSによる分取

HES-3 hESCを、ノックアウト血清代替物20%、非必須アミノ酸(NEAA)1%、pen-strep-グルタミン1%、2-メルカプトエタノール0.0008%及びFGF-ベシック(Invitrogen)10ng/mLを添加したノックアウトDMEM中、放射線照射したマウス胚線維芽細胞(Millipore)で維持した。hESCコロニーを優先的に選択するコラゲナーゼIV/ディスペーゼ(それぞれ1mg/mL; Invitrogen)によって分化を開始させた。コロニーをトリプシン処理して単一の細胞とし、記載されている通りに(Eiraku, M.ら(2008). Cell Stem Cell 3, 519-532)、Neurobasal-A、B27-ビタミンA(Invitrogen)2%及びFGFを含まないこと以外は同じサプリメントをhESC培地に加えたものからなる最適化B27+5F分化培地#1を入れた低付着性の丸底96ウェルプレート(CorningまたはNOF)に、1ウェル当たり1つのsEBを形成するよう1ウェル当たり約10,000個の細胞を播種した。ほかに、Y27632(10μM)、SB431542(10μM)、ブルモルファミン(1~2μM)(Stemgent)、BMPRIA-Fc(1.5μg/mL)及びDKK1(1μg/mL)(Invitrogen)を添加した。

10

20

#### 【0224】

第7日、Y27632を除去し、培地#1を入れたマトリゲル(BD Biosciences)コートプレートにsEBをまとめて接着播種した。第14日、培地からブルモルファミン以外の因子を除去した。第25日、aEBをトリプシン処理し、分離単層としてマトリゲルまたはポリオルニチン/ラミニンコートプレートに再播種した。第27日~第30日にDAPT(10μM)(Tocris)を添加した。第35日、FACS分取の後、培地#1の皮質グリア細胞上にGFP+細胞を再播種することができた(10~25,000細胞/cm<sup>2</sup>)。グリア細胞は新生仔マウス大脳皮質から調製し、血清を加えて少なくとも3回継代してマウスニューロンを取り除き、コンフルエントの状態ではAra-C(5μM)(Sigma)で前処置したものである。3~4日毎に、培地の半分を培地#2：培地#1にNeurobasal-A、B27+ビタミンA2%(Invitrogen)ならびにNEAA及びブルモルファミンを除去した以外同じサプリメントを加え因子を含まないものと交換し、BDNF(25ng/mL)を添加した(R&D Systems)。培地を3~4日毎に交換した。

30

#### 【0225】

FACS Aria II(BD Biosciences)でFACSによる解析及び分取を実施した。細胞に生細胞のDAPI排除、小さい散乱サイズ、単一細胞、NKX2.1-GFPシグナル及びPSA-NCAM-APCまたは-PE(Miltenyi Biotech)シグナル強度のゲートをかけた。GFP陰性細胞及びアイソタイプ抗体(Santa Cruz)の対照を用いた。Flowjo(TreeStar)ソフトウェアでデータを分析した。生細胞の撮像では、分化は上記のものとはほぼ同じであったが、Aggrewell-800プレート(Stem Cell Technologies)に1ウェル当たり5,000個の細胞を播種し、第4~7日にsEBをまとめて播種した。温度(37℃)及びガス(5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>)制御付きのタイムラプス共焦点顕微鏡(Leica SP5)により撮像を実施した。

40

#### 【0226】

妊娠第二期のヒト胎児大脳皮質またはMGE組織を切り出し、パバイン(Worthington Biochemical)で単一細胞に分離し、分化培2を入れたマトリゲルコートプレートに播種し(約100,000細胞/cm<sup>2</sup>)、コンフルエントの状態で

50

Ara - Cで処理した。1週間培養したMGE細胞または第35日に分取したhESCを大脳皮質培養物に再播種した(約10~20,000細胞/cm<sup>2</sup>)。

#### 【0227】

hESC及びヒト胎児組織で実施した実験はいずれも、承認されたUCSF幹細胞研究監視委員会(Stem Cell Research Oversight committee)及びヒト研究委員会(Committee on Human Research)のプロトコルを順守したものである。

#### 【0228】

##### 移植及び移植片増殖

分取した細胞ペレットから余分な培地を除去して、1000細胞/mlの濃縮細胞懸濁物を作製した。定位油圧インジェクターに載せた勾配付きのガラスマイクロピペット(Wiretrol 5µl, Drummond Scientific Company)に細胞を充填した。P2 CB.17-SCIDの仔イヌ(Charles River)を低体温法により麻酔し、インジェクター台の頭型に位置に合わせて置いた。正中線(矢状洞)から0.9mm、人字縫合から2.6mmの座標を用いて、右大脳皮質に1つの注入部位当たり10~100,000個の細胞を経頭蓋送達した。注入の深さを皮膚表面から0.45mmとした。移植実験はいずれも、UCSF動物管理使用委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)のプロトコルを順守したものである。

#### 【0229】

最初に第35日の単層培養物を、PSANCAMによる選別をせずにNKX2.1-GFP+に関して分取し、新生仔SCIDマウス大脳皮質に注入した。しかし、4か月以内に、注入したマウス脳(12匹中12匹のマウス)の注入部位及び/または注入路付近の軟膜表面に腫瘍様の過剰増殖が認められた(データ不掲載)。これらは多能性細胞に由来する奇形腫ではなく、OCT4+細胞も極性化した神経上皮のロゼットもみられなかった。増殖物には主としてNKX2.1-GFP+神経細胞が含まれていた。腫瘍は注入後(MPI)4か月以上生存し続けるヒト特異的核抗原(HNA)陽性細胞及びKI67+ヒト細胞の核として定義した。最初、第35日の培養物にはKI67、GFAPまたはOLIG2を発現する神経前駆細胞はほとんど含まれていないように思われたため(図3E)、腫瘍の発生は驚きであった。しかし、延長した共培養物にはin vivoの腫瘍形成と一致する病巣増殖(播種細胞2500個当たり約1個の病巣、n=3)が時折検出された。したがって、本発明者らは、このような増殖を阻害するべくプロトコルの最適化を実施した。低密度の単層培養にしたところ、ニューロン分化が促進され、腫瘍発生率が50%(12匹中6匹のマウス)に低下した。注入前にNotchシグナル伝達のγセクレターゼ阻害剤、DAPTを短期間添加してニューロン分化を誘導することによって、腫瘍発生率がさらに33%(9匹中3匹のマウス)に低下した。共培養または移植の前に第35日の培養物をDAPTで前処置し、NKX2.1-GFP+細胞及びPSA-NCAM+細胞両方についてFACS分取を実施したところ、in vitroの病巣増殖(n=3)及びin vivoの腫瘍発生がみられなくなった(6匹中0匹のマウス)のに対して、GFP+細胞及びPSA-NCAM陰性細胞は病巣及び腫瘍を形成し続けた(4匹中3匹のマウス)。注入した個体に関するまとめを記載する(図16)。

#### 【0230】

##### 免疫染色

培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで10~20分間固定した。経心灌流後、マウスの脳を-4で一晩固定し、ビブラトームまたは滑走式ミクロトームによって薄切した(50µm)。EB及びヒト組織はクリオスタットによって薄切した(25µm)。細胞及び切片を次のように染色した:煮沸した0.01Mクエン酸緩衝液(pH=6)で5~10分間の抗原回復、PBS中5%の血清及び0.1%のtriton X100で1時間のブロッキング、一次抗体をブロッキング緩衝液(ただし、GABA抗体にはtritonを含まない緩衝液を使用した)で希釈し-4で一晩、PBS+triton X100で

10

20

30

40

50

3 回洗浄、二次抗体 (Invitrogen) で 2 時間、PBS + triton X 100 で 4 回洗浄。一次抗体を表 2 に記載する。

【表 2】

抗体

| 抗体       | 会社                 | カタログ番号      | 希釈     |
|----------|--------------------|-------------|--------|
| ASCL1    | Cosmo Bio          | SK-T01-003  | 1-500  |
| CALB     | Swat               | CB 38       | 1-2000 |
| CALR     | Swat               | 7699        | 1-2000 |
| CHAT     | Millipore          | AB144P      | 1-300  |
| COUPTFII | Perseus Proteomics | PP-H7147-00 | 1-1000 |
| DARPP32  | Santa Cruz         | sc-11365    | 1-1000 |
| DCX      | Cell Signaling     | 4604S       | 1-500  |
| DLX2     | K.Yoshikawa氏より寄贈   |             | 1-1000 |
| ER81     | Covance            | PRB-362C    | 1-1000 |
| FOXG1    | Y.Sasai氏より寄贈       |             | 1-500  |
| GABA     | Sigma              | A2052       | 1-2000 |
| GFAP     | Millipore          | MAB3402     | 1-500  |
| GFP      | Aves Labs          | GFP-1020    | 1-1000 |
| HNA      | Millipore          | MAB1281     | 1-500  |
| ISLET1   | DSHB               | 39.4D5      | 1-200  |
| KI67     | Abcam              | ab15580     | 1-500  |
| Nカドヘリン   | BD Biosciences     | 561554      | 1-50   |
| NEUN     | Millipore          | MAB377      | 1-150  |
| NEUN     | Millipore          | MAB377B     | 1-150  |
| NKX2.1   | Novacastra         | TTF-1-L-CE  | 1-150  |
| NKX2.1   | Santa Cruz         | sc-13040    | 1-250  |
| NKX2.2   | DSHB               | 74.5A5      | 1-100  |
| OLIG2    | Millipore          | AB9610      | 1-500  |
| PAX6     | Millipore          | AB5409      | 1-250  |
| PV       | Sigma              | P3088       | 1-4000 |
| PV       | Swant              | PV-25       | 1-2000 |
| RAX      | Y.Sasai氏より寄贈       |             | 1-500  |
| RFP      | Clontech           | 632496      | 1-500  |
| RFP      | Chromotek          | 5f8         | 1-1000 |
| SST      | Bachem             | T-4103.0050 | 1-500  |
| TBR1     | Abcam              | ab31940     | 1-500  |
| TH       | Pelfreeze          | P40101-0    | 1-1000 |
| TUJ1     | Covance            | MMS-435P    | 1-1000 |
| VGAT     | Synaptic Systems   | 131003      | 1-500  |

10

20

30

40

RNEasyキット (Qiagen) を用いて細胞ペレットからRNAを調製した。Superscript III-first strandキット (Invitrogen) を用いてcDNAを調製した。リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) にSYBR green master mixを用いて定量的RT-PCRを実施した。逆転写酵素陰性対照を用いた。ゲル電気泳動及び融解曲線分析によりアンプリコン特異性を判定した。プライマー配列を表3に記載する。

【表3】

## プライマー配列

| 遺伝子    | 鎖 | プライマー配列                  |
|--------|---|--------------------------|
| ASCL1  | F | GTCCTGTCGCCACCATCTC      |
| ASCL1  | R | CCCTCCCAACGCCACTGAC      |
| CALB2  | F | TCAGAGATGTCCCGACTCCTG    |
| CALB2  | R | GCCGCTTCTATCCTTGTCGTAA   |
| DLX2   | F | GCCTCAACAACGTCCCTTACT    |
| DLX2   | R | TCACTATCCGAATTTTCAGGCTCA |
| FOXP1  | F | AGAAGAACGGCAAGTACGAGA    |
| FOXP1  | R | TGTTGAGGGACAGATTGTGGC    |
| GAD1   | F | CGAGGACTCTGGACAGTAGAGG   |
| GAD1   | R | GATCTTGAGCCCCAGTTTTCTG   |
| GAPDH  | F | GGTGGTCTCCTCTGACTTCAAC   |
| GAPDH  | R | TTCGTTGTCATACCAGGAAATG   |
| LHX6   | F | TCTGCAAGATGGACTACTTCAGC  |
| LHX6   | R | CTTGGGTTGACTGTCTCTGTTC   |
| NKX2.1 | F | AGACTCGCTCGCTCATTGT      |
| NKX2.1 | R | CTCCATGCCCACTTTCTTGT     |
| NPY    | F | CGCTGCGACACTACATCAAC     |
| NPY    | R | CAGGGTCTTCAAGCCGAGTT     |
| OLIG2  | F | AGCTCCTCAAATCGCATCC      |
| OLIG2  | R | ATAGTCGTCGCAGCTTTCG      |
| POU5F1 | F | GCAAAACCCGGAGGAGGAGTC    |
| POU5F1 | R | CCACATCGGCCTGTGTATATC    |
| PVALB  | F | AAAGAGTGCGGATGATGTGAAG   |
| PVALB  | R | ACCCCAATTTTGCCGTC        |
| SST    | F | GCTGCTGTCTGAACCCAAC      |
| SST    | R | CGTTCTCGGGGTGCCATAG      |
| TUBB3  | F | GCAACTACGTGGGCGACT       |
| TUBB3  | R | CGAGGCACGTACTTGTGAGA     |

## 【0232】

マイクロアレイ解析には、RNAをSouthern California Genotyping Consortiumに委託しIllumina Human HT-12 v4.0 発現ビーズチップとのハイブリダイゼーションを実施した。hESC = 試料1つ及び技術的反復3つ。第20日 = 独立した試料3つ。第35日 = 試料1つ及び技術的反復2つ。第55日 = 試料1つ及び技術的反復1つ。GenomeStudio (Il

lumina) ソフトウェアでデータを分析した。対照のヒト脳参照 RNA 及び / または Array Express に保管されている試料とのハイブリダイゼーションを確認することによって、シグナルを含まないプローブの妥当性を確認した。

#### 【0233】

##### 電気生理学的及び光学的方法

ハウケイ酸ガラスキャピラリー (B - 120 - 69 - 15、Sutter Instruments) で抵抗が 5 ~ 7 MΩ の範囲のパッチ電極を作製した。ピペットの先端に 125 mM K - グルコン酸、15 mM KCl、10 mM HEPES、4 mM MgCl<sub>2</sub>、4 mM Na<sub>2</sub>ATP、0.3 mM Na<sub>3</sub>GTP、10 mM トリス - クレアチンリン酸、0.2 mM EGTA を含有する内液を充填した。

10

#### 【0234】

培養ニューロンでは、バスに常時、145 mM NaCl、3 mM KCl、3 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES、8 mM グルコースを含有する新鮮な記録用培養液を灌流させた。組織チョッパー (Leica VT1200S) で横断スライス (300 μm) を作成し、インキュベーションチャンバで 110 mM コリン Cl、2.5 mM KCl、0.5 mM CaCl<sub>2</sub>、7 mM MgCl<sub>2</sub>、1.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM グルコースを含有する aCSF 中で維持した。スライス記録用培養液は、125 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.3 mM MgCl<sub>2</sub>、1.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM グルコースを含有するものであった。Axon 700B パッチクランプ増幅器及び 1320A インターフェース (Axon Instruments) を用いて記録した。増幅回路を用いてシグナルに 2 kHz のフィルターをかけ、10 kHz でサンプリングし、Clampex 10.2 (Axon Instruments) を用いて分析した。

20

#### 【0235】

GFP 励起帯域通過フィルターを備えた水銀ランプ (75 mW) により光刺激を与え、Maste-8 (A.M.P.I.) により高速シャッター (UNIBLITZ) を介して光パルスを生じさせ、青色光の出力密度 (Boyden, E.S. ら (2005). Nat Neurosci 8, 1263 - 1268) (Nagel, G. ら (2003). Proc Natl Acad Sci USA 100, 13940 - 13945) は電力計 (Coherent Instruments) による測定で 8 ~ 12 mW / mm<sup>2</sup> であった。

30

#### 【0236】

##### 統計分析

データを平均 ± s.e.m で表す。図 3 E のデータは同時発現 / GFP + 細胞の平均 % で表されている。図 4 C ~ 4 H のデータは平均ピーズシグナル強度で表されている。図 5 C のデータは UbC - RFP +、ChR2 - YFP + または TUJ + ニューロンの平均 % で表されている。図 7 D ~ 7 E のデータは HNA + または UbC - RFP + ヒト細胞の平均 % で表されている。統計学的比較では、電気生理学的データに一元配置 ANOVA 及び事後ボンフェローニ検定を用い、免疫染色データに両側 2 試料不等分散スチューデント t 検定を用いた。Imaris (Bitplane) ソフトウェアに MATLAB プラグインを用いて細胞数を計算した。各実験及びマーカーの標本数及び細胞数のまとめを表 4 に記載する。

40

【表 4】

各図面、マーカー及び分化段階の標本数及び細胞数のまとめ。

| 図  | マーカー     | 段階   | 分化実験数／個体  | 陽性細胞 | 総細胞計数 |
|----|----------|------|-----------|------|-------|
| 3E | NKX2.1   | 第5週  | 6         | 1103 | 1219  |
| 3E | FOXG1    | 第5週  | 6         | 946  | 1320  |
| 3E | NKX2.2   | 第5週  | 5         | 138  | 1213  |
| 3E | PAX6     | 第5週  | 2         | 0    | 808   |
| 3E | ASCL1    | 第5週  | 2         | 476  | 622   |
| 3E | COUPTFII | 第5週  | 2         | 7    | 848   |
| 3E | OLIG2    | 第5週  | 2         | 21   | 331   |
| 3E | GFAP     | 第5週  | 3         | 58   | 786   |
| 3E | KI67     | 第5週  | 3         | 33   | 1044  |
| 3E | TUJ      | 第5週  | 9         | 1777 | 2204  |
| 3E | GABA     | 第5週  | 7         | 955  | 1292  |
| 3E | DLX2     | 第5週  | 2         | 391  | 472   |
| 3E | DARPP32  | 第5週  | 2         | 0    | 848   |
| 3E | ER81     | 第5週  | 2         | 4    | 954   |
| 3E | ISLET1   | 第5週  | 4         | 139  | 1467  |
| 3E | CHAT     | 第5週  | 3         | 2    | 2082  |
| 3E | TH       | 第5週  | 3         | 64   | 2082  |
| 3E | TBR1     | 第5週  | 3         | 5    | 1691  |
| 5C | GFP      | 第5週  | 5         | 314  | 342   |
| 5C | GFP      | 第10週 | 3         | 333  | 376   |
| 5C | GFP      | 第20週 | 3         | 416  | 517   |
| 5C | GFP      | 第30週 | 3         | 132  | 211   |
| 5C | GABA     | 第5週  | 3E-第5週と同じ |      |       |
| 5C | GABA     | 第10週 | 4         | 801  | 1113  |
| 5C | GABA     | 第20週 | 1         | 38   | 56    |
| 5C | GABA     | 第30週 | 2         | 140  | 162   |
| 5C | VGAT     | 第5週  | 6         | 553  | 1424  |
| 5C | VGAT     | 第10週 | 2         | 162  | 211   |
| 5C | VGAT     | 第20週 | 3         | 127  | 169   |
| 5C | VGAT     | 第30週 | 1         | 16   | 21    |
| 5C | CALB     | 第5週  | 5         | 488  | 1639  |

## 【0237】

## B27+5F法の開発

本発明者らは、3つの公開されているプロトコル（方法#1、#2及び#3）を、hESCからNKX2.1+MGE前駆細胞を誘導する能力について比較した。第一の方法（#1）ではhESC由来のNKX2.1+及びFOXG1+MGE前駆細胞が約13%の効率で報告されている（Watanabe, K.ら（2007）. Nat Biotechnol 25, 681-686）。この35日間のプロトコルでは、無血清（ノックア

ウト血清代替物 (KSR) - 初期 / B27 - 後期) 添加培地ならびに BMP (BMPRI A - Fc を介する) 及びアクチビン / nodal (SB431542 を介する) シグナル伝達経路の二重 SMAD 阻害を用いて神経外胚葉様分化を方向付けるとともに、WNT 経路阻害 (DKK1 を介する) を用いて胚様体 (EB) の前部前脳様のアイデンティティが特定された。第 24 日 ~ 35 日、阻害剤を除去し、ソニックヘッジホッグ (SHH) を添加して腹側前部前脳様細胞を特定された。第二の方法 (#2) では無血清 (KSR / N2) 添加培地で 28 日後の NKX2.1 + 及び FOXG1 + MGE 前駆細胞が約 84 % の効率で報告されている (Li, X. J. ら (2009). Development 136, 4055 - 4063)。二重 SMAD 阻害は用いていないが、分化の初期 (第 10 日 ~ 第 28 日) に、同時に WNT を阻害する、または WNT を阻害しない SHH 処置を開始している。これらのプロトコルでは FOXG1 + 及び NKX2.1 + 細胞が生成することが報告されているが、腹側終脳 MGE 様対 POA / 中隔様のアイデンティティは検討されていない。

10

20

30

40

50

#### 【0238】

本発明者らが実施したところ、方法 #1 (図 8B)、方法 #2 (不掲載) 及び最適化した方法 #1 (図 9A) では NKX2.1 - GFP + MGE 前駆体様細胞を生成することができなかった。プルモルファミンの代わりに SHH を用いた場合も同じであった。しかし、本発明者らは、ハイブリッド法を用いると、NKX2.1 - GFP + MGE 前駆体様細胞が蛍光標示式細胞分取法 (FACS) による定量化で 12 % の効率で生成することが可能であることを発見した (図 8C)。この 25 日間のハイブリッド法では、無血清 (KSR / B27) 添加培地中、プロトコル全体を通じて二重 SMAD (SB431542 及び BMPRI A - Fc を介する) 阻害及び WNT (DKK1 を介する) 阻害を実施し、第 10 日 ~ 第 25 日に Smoothened アゴニストのプルモルファミンによる同時処置を実施した。B27 / B27 添加培地でもほぼ同じ効率が達成された (不掲載)。本発明者らは、GFP + 細胞誘導が方法 #1 の後期 (第 24 日) の SHH とは対照的な初期 (第 10 日 ~ 第 25 日) に添加すれば NKX2.1 + MGE 前駆細胞の百分率が增大するのではないかという仮説を立てた。しかし、このような修正により KSR / B27 培地での効率が低下した (1.9 %) (図 8D)。

#### 【0239】

しかし、25 日間のプロトコル全体を通じて KSR を B27 に置き換えて培地に添加するとともに、初期に 5 つの因子 [Rho 結合タンパク質キナーゼ (ROCK) 阻害剤 (Y27632)、二重 SMAD 阻害剤 (SB431542 及び BMPRI A - Fc)、WNT 阻害剤 (DKK1) 及び Smoothened アゴニスト (プルモルファミン)] を添加したところ、驚くべきことにほとんどの細胞 (70.2 %) が NKX2.1 - GFP + MGE 前駆細胞になった (図 8E)。さらに、分化の 2 週間後に阻害剤を除去し、プロトコルを第 35 日まで延長したところ、FACS 解析で最大 90.8 % の NKX2.1 - GFP + への分化効率が達成された (図 8F)。このようにして、SHH 経路の初期活性化と、B27 培地、すなわち KSR を含まない培地とを組み合わせること (B27 + 5F 法) により、効率的に hESC からの腹側前脳様分化が方向付けられた。

#### 【0240】

この研究の期間中、3 つ目の方法 (方法 #3) により FGF2 及びレチノイン酸の存在下で HES-3 NKX2.1 GFP / w hESC からの視床下部前脳様分化が 12 ~ 14 % の効率で方向付けられたことが報告されている (Goulburn, A. L. ら (2011). Stem Cells 29, 462 - 473)。SHH は使用していないが、培地が培養物中で SHH 及び WNT 阻害剤の発現を誘導したと思われ、また尾方因子として作用し得るレチノイン酸を使用したにもかかわらず腹側前部の神経運命を促進した。50 日後、一部の細胞が FOXG1 を発現したが、その細胞の効率及び運命は明らかにされなかった。本発明者らが実施したところ、方法 #3 により NKX2.1 - GFP + 細胞が約 7 % の効率で生成した。視床下部様のアイデンティティと同じように、方法 #3

では、第24日のNKX2.1+発現細胞の生成がB27+5F法より少なく、NKX2.2+細胞の生成がB27+5F法より多かった(データ不掲載)。

#### 【0241】

NKX2.1-GFP+細胞の誘導にはSHH経路活性化が必要であった。この研究では、本発明者らは1~2μMのブルモルファミンまたは500ng/mLのSHHを使用した。2~6μMのブルモルファミンでもEB培養物のGFP+分化効率がわずかに上昇したが、このような高濃度では後期段階の単層培養物の生存率が低下した(不掲載)。本発明者らはほかに、WNT阻害が、これまでに示唆されているようにhESC-終脳様アイデンティティに不必要であるかどうかを検討した(Li, X. J. ら(2009). *Development* 136, 4055-4063)。DKK1 WNT阻害剤が存在しない場合、GFP+細胞分化効率は同程度であったが、終脳FOXG1を発現する細胞の数が70%から45%に減少した(不掲載)。WNTに加えて、FGFが神経発生段階で吻側尾側のパターンを決定する重要な因子として作用し(Borello, U. ら(2008). *Neural Dev* 3, 17)(Mason, I. (2007). *Nat Rev Neurosci* 8, 583-596)(Ye, W. ら(1998). *Cell* 93, 755-766)、またFGF8がマウスESCからMGE終脳様への発生に関与することがわかっている(Danjo, T. ら(2011). *J Neurosci* 31, 1919-1933)。本発明者らはわれわれの培養物にFGF8は添加しなかったが、FGF8転写産物の発現を検出し、SHH下流でのその役割との一致が確認された(Gutinin, G. ら(2006). *Development* 133, 2937-2946)(Ohkubo, Y. ら(2002). *Neuroscience* 111, 1-17)。分化開始時から(第0日~25)FGF阻害剤(PD173074)を添加するとFOXG1発現細胞が減少したが(55%)、同阻害剤を第14日に添加(第14日~25)するとFOXG1レベルに何ら影響はみられなかった(不掲載)。したがって、胎児前脳発生の場合と同じように、初期のSHH活性化とともにWNT阻害及びFGFシグナル伝達経路活性化が、hESC由来培養物の腹側終脳様アイデンティティのパターン形成に重要な役割を果たしている。

#### 【0242】

費用対効果の高い細胞作製方法があれば、長期間にわたるプロトコル及び高価な組換えタンパク質ベースの試薬よりも好ましいものとなり、細胞を凍結保存できれば、今後の作業が容易になる。本発明者らはここでは、3種類の小分子(Y27632、SB431542及びブルモルファミン)と2種類の組換えタンパク質(BMPRII-A-Fc及びDKK1)を使用した。現時点で、BMP経路及びWNT経路の阻害には数種類の小分子代替物質が存在する。本発明者らは、ドルソモルフィン(BMP経路阻害剤)及びCKI-7(WNT経路阻害剤)がB27+5F法のタンパク質の代わりになり得ることを発見した(Kim, D. S. ら(2010). *Stem Cell Rev* 6, 270-281)(Osakada, F. ら(2009). *J Cell Sci* 122, 3169-3179)。細胞生存率が約50%低下したが、NKX2.1-GFP+効率は同程度であった(不掲載)。さらに、hESC由来MGE様細胞の約25%が凍結保存及び解凍後も生存し、解凍した細胞は、電気生理学的方法によって確認される機能的特性を有するニューロンに成熟した。

#### 【0243】

臨床使用には、GMPグレードのhPSC系が必要とされ得る。したがって、本発明者らは、cGMPに適合するhESC系(ESI17、ESI35、ESI51及びESI53(Biotime))がNKX2.1+MGE様細胞を生成する能力を検討した。いずれの細胞系もB27+5F法を用いたときのNKX2.1+分化効率がHES-3と同程度であった(実施例8を参照されたい)。この臨床グレードの細胞系にはNKX2.1ノックインレポーターがないため、許容可能な純度閾値を決定するのに必要と作業を必要とし得る。特に残りの不純物が非MGE型GABA作動性介在ニューロンである場合、hESC由来NKX2.1+細胞の純度が75%あれば十分であると考えられる。この可能

性を示唆するように、本発明者らは、HES3 NKX2.1 - GFP陰性ニューロンのほとんどGABAを発現し、一部がTHを発現するが、TBR1またはCHAT興奮性ニューロンマーカーは全く発現しないことを観察した。さらに精製されたNKX2.1 + MGE様細胞の組成物を得るためには、MGE細胞もしくは介在ニューロンを選択するためのMGE特異的細胞マーカーに対する抗体、導入遺伝子（選択マーカー、蛍光、抗生物質耐性、遺伝子過剰発現/阻害）を送達するDNAプラスミド、RNAもしくはウイルス（Potter, G. B.ら（2009）. Mol Cell Neurosci 40, 167 - 186）、FACS/磁気MACSに基づく精製または有糸分裂阻害化合物（AracまたはMitocなど）を使用し得る。

#### 【0244】

##### レンチウイルスの調製

デルタ8.9及びVSVGプラスミドを用いて、自己不活性化レンチウイルスプラスミド、FUGW-Ubc-RFP（RFP二量体2）またはpレンチ-シナプシン-hChR2（H134R）-EYFP-WPRE（Karl Deisseroth氏の好意による寄贈）を293T細胞（ATCC）に共形質導入した。レンチウイルス粒子の上清を収集し、超遠心分離によって濃縮し、一晚、8 µg/mLポリブレン（Millipore）とともに用いて細胞に形質導入した。

#### 【0245】

##### 実施例1：hESC由来終脳MGE様アイデンティティ

hPSC由来NKX2.1 + MGE前駆細胞の同定を容易にするため、NKX2.1の第二のエキソンに挿入されたGFPノックイン構築物を有するHES-3 hESC系（HES-3 NKX2.1<sup>GFP/w</sup>）を用いた（Goulburn, A. L.ら（2011）. Stem Cells 29, 462 - 473）。NKX2.1発現は、発生中の終脳MGE、視索前野（POA）、中隔及び間脳視床下部を含めた神経系において腹側前脳に特異的なアイデンティティを示すものである。本発明者らは、二重SMAD（SB431542及びBMPRIA-Fc）とWNT阻害（DKK1）とを組み合わせ、初期のSHH経路活性化（プルモルファミン）及びB-27添加により、効率がよく再現可能なhESCからの腹側前脳様分化が可能になることを発見した。分化後第20日～第30日の平均NKX2.1 - GFP + 効率は74.9 ± 2.1%であった（n = 25の独立した分化実験）。本発明者らはこのほか、ほかのhPSC系、研究グレードのcGMPに適合するESI-17、35、51及び53（Biotime）、H9（WiCell）、hESC系ならびにヒト成人メラノサイト由来hiPSC系が同程度の効率でNKX2.1 + MGE前駆細胞に分化することを発見した。最適化したB27 + 5因子（B27 + 5F）法については図1A、図8に概要を示す。MGE前駆細胞はMGE様前駆体とも呼ばれる。

#### 【0246】

NKX2.1 - GFP + 細胞の局所的アイデンティティを明らかにするため、本発明者らは、50日間にわたる経時的な浮遊胚様体（sEB）分化及び前脳発生マーカーの免疫染色分析を実施した（図1B及び9）。分化第10日までに時間経過全体を通じてNKX2.1タンパク質と共局在し発現する旺盛なNKX2.1 - GFP発現が検出された。これに対して、背側終脳神経前駆細胞のマーカー、PAX6は検出されなかった。終脳マーカー、FOXG1は第20日までにほとんどの細胞にみられ、高い発現が維持された。この傾向とは逆に、視床下部及びさらに腹尾側の領域のマーカー、NKX2.2の発現は主として第10日から第20日の間に限られた。ほかの腹側終脳前駆体マーカー、OLIG2及びASCL1（MASH1）が第20日～第30日までに誘導された（図9）。ISLET1は外側GE（LGE）及びPOAに強く発現し、MGE内に散在する細胞に発現するが、これは後期（第30日～第40日）の時点で誘導された。細胞は第30日までに、移動ニューロンマーカーのダブルコルチン（DCX）及び神経伝達物質のGABAを発現した。時間経過中、視床下部マーカーのRAXもコリン作動性ニューロンマーカーのCHATも検出されなかった。したがって、hESC由来NKX2.1 - GFP + 細胞は終

10

20

30

40

50

脳 M G E 様前駆体及び G A B A 作動性ニューロン系列であると考えられた。s E B 培養中のマーカー発現のまとめを記載する(図 15)。

#### 【0247】

図 1. h E S C 由来終脳 M G E 様介在ニューロン前駆細胞 (M G E 前駆細胞とも呼ばれる)。(A) M G E 前駆細胞及びこれに由来する G A B A 作動性介在ニューロンを生成するために用いた B 2 7 + 5 F 法ならびに対応する図の概要。略号: s E B = 浮遊胚様体; a E B = 接着胚様体; M L = 単層; F A C S = 蛍光標示式細胞分取法; Y 2 7 6 3 2 = R h o 結合キナーゼ (R O C K) 阻害剤; S B 4 3 1 5 4 2 = T G F  $\beta$  1 アクチビン受容体様キナーゼ阻害剤; B M P R I A = 骨形成タンパク質受容体 1 a F c キメラ; D K K 1 = D i c k k o p f ホモログ 1; P M = ブルモルファミン; B D N F = 脳由来神経栄養因子; D A P T =  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤。このほか、図 8 を参照されたい。(B) s E B の切片及び N K X 2.1 - G F P、P A X 6、F O X G 1 及び N K X 2.2 の発現を示す代表的な免疫蛍光分析。青色: D A P I。スケールバー: 100  $\mu$ m。このほか、図 9 及び図 15 を参照されたい。

10

#### 【0248】

図 8. 図 1 に関連して既に公開されているプロトコルの修正及び B 2 7 培地添加と組み合わせた初期の S H H 経路活性化による N K X 2.1 - G F P + 細胞の誘導を示す、分化 h E S C の F A C S 解析。(A) 方法 # 1 a: K S R - N 2 - B 2 7 添加培地と後期 (第 25 日) P M。(B) 方法 # 1 b: K S R - B 2 7 培地と後期 (第 25 日) P M 処置。(C) 方法 # 1 / 2 ハイブリッド: K S R - B 2 7 培地と中期 (第 10 日) P M 処置。(D) 初期 (第 0 日) に P M 処置を実施した以外は (C) と同じ方法。(E) B 2 7 - B 2 7 培地を用いて 70% の G F P + 効率を導いた以外は (D) と同じ方法。(F) 第 14 日に阻害剤を除去し、第 35 日まで P M 処置を実施して、最大 90% の G F P + 効率を導いた以外は (E): B 2 7 - B 2 7 培地と初期 (第 0 日) P M 添加と同じ方法。薄く着色したヒストグラム = 分化した培養物。着色していないヒストグラム = 未分化の対照培養物。

20

#### 【0249】

図 9. 図 1 及び図 15 に関連した h E S C 由来終脳 M G E 様のアイデンティティ及び G A B A 作動性ニューロン運命。s E B 切片をさらに免疫染色で分析したところ、腹側終脳マーカー O L I G 2 及び A S C L 1 (初期)、I S L E T 1 (後期)ならびに有糸分裂マーカー K I 6 7 (全期間)の誘導がみられた。移動ニューロンマーカー、D C X 及び G A B A は経時的に誘導された。これに対して、視床下部マーカーの R A X 及びコリン作動性ニューロンマーカーの C H A T は分化から 50 日後には検出されなかった。青 = D A P I。

30

#### 【0250】

図 15. 図 1 及び 9 に関連した h E S C からの浮遊胚様体分化時のマーカー発現のまとめ。

#### 【0251】

実施例 2: h E S C 由来 M G E 前駆細胞は V Z 及び S V Z 放射状グリア様幹細胞の挙動を示した

胚神経発生が決定的な特徴には頂底極性の獲得及び放射状グリア神経幹細胞の発生がある (K r i e g s t e i n 及び G o t z, 2003)。h E S C 由来神経口ゼット中の神経上皮前駆体が頂底様極性を示す証拠がある (E l k a b e t z, Y. ら (2008), G e n e s D e v 22, 152 - 165)。第 4 日 ~ 第 7 日に s E B をまとめて播種したところ、接着 E B (a E B) が平らになり、口ゼット構造中に N K X 2.1 - G F P + 細胞の組織化がみられた (図 2 A 及び 2 B)。N - カドヘリン発現が口ゼットの管腔表面に限定されていることから極性が確認され、胚脳の頂端側脳室表面の放射状グリアエンドフィートへの局在と一致していた。K I 6 7 が多くの細胞、特に口ゼット管腔付近の細胞に発現した。これに対して、ニューロンマーカーの A S C L 1 及び D C X は管腔から離れたところで検出された (図 2 B)。

40

#### 【0252】

50

ロゼットを R F P [ ユビキチン C プロモーター - R F P ( U b C - R F P ) ウイルス ] で標識し、ライブタイムラプス撮像によってモニターした。分裂前に脳室帯 ( V Z ) 放射状グリア ( v R G ) 様の分裂間期の核移動 ( I N M ) 挙動を示すロゼット構造中の N K X 2 . 1 - G F P + 及び U b C - R F P + 細胞が検出された ( 図 2 C 及び 2 E ) 。 V R G 様細胞体がロゼット管腔に向かって移動し、鉛直切断面で ( 線維と並行に ) 分裂した。娘細胞が放射状線維を伸長し、鉛直切断面で分裂する胚 v R G に起因する対称的な分裂に類似しているように見えたのは興味深い。

#### 【 0 2 5 3 】

次に本発明者らは、われわれの培養物中に近年記載された ( F i e t z , S . A . ら ( 2 0 1 0 ) . N a t N e u r o s c i 1 3 , 6 9 0 - 6 9 9 ) ( H a n s e n , D . V . ら ( 2 0 1 0 ) . N a t u r e 4 6 4 , 5 5 4 - 5 6 1 ) ヒト富化外側サブ V Z ( S V Z ) 放射状グリア ( o R G ) 様細胞が存在するかどうかを検討した。本発明者らは、ロゼット塊から離れた位置にあり単極性線維を有する N K X 2 . 1 - G F P + 細胞に焦点を当てた ( 図 2 D 及び 2 F ) 。本発明者らは、 G F P + o R G 様細胞が分裂前に有糸分裂細胞体移動 ( M S T ) を示すことを発見した。この細胞体は単極性線維に向かって移動し、水平切断面で ( 線維と垂直に ) 分裂した。以上をまとめると、 h E S C 由来 M G E 様前駆体 ( M G E 前駆細胞とも呼ばれる ) は V Z 及びヒト富化 S V Z 放射状グリア様幹細胞の挙動を再現することができた。

#### 【 0 2 5 4 】

図 2 . h E S C - M G E 様前駆体 ( M G E 前駆細胞とも呼ばれる ) は V Z 及び S V Z 放射状グリア幹細胞様の分裂を示した。 ( A ) 第 4 日 ~ 第 7 日に s E B をまとめて播種し、第 1 4 日に a E B を分析のために固定した ; あるいは a E B に U b C - R F P ウイルスを感染させ、ライブ培養タイムラプス撮像を実施した。 ( B ) 第 1 4 日の N K X 2 . 1 - G F P 発現と一連のマーカー、 N - カドヘリン、 K I 6 7 、 A S C L 1 及び D C X をマージして、また別々に赤色で示した画像。青色 : D A P I 。スケールバー : 5 0 μ m 。 ( C ) R F P 蛍光単独のまたは N K X 2 . 1 - G F P とマージしたロゼット塊。 ( D ) 塊の外側の N K X 2 . 1 - G F P 発現細胞。 C 、 D のスケールバー : 1 0 0 μ m 。 ( E ) v R G 様の I N M 挙動 : ロゼット管腔方向への移動及び鉛直切断面での分裂 ( 星印 ) を示した 3 種類の R F P + 細胞 ( 青色、オレンジ色、及び緑色の矢頭 ) を示す、 ( C ) の囲まれた領域の連続タイムラプス撮像。時間 : 時間。スケールバー : 2 0 μ m 。 ( F ) ( D ) の囲まれた領域の連続タイムラプス。特徴的な単極性の形態を有する G F P + 細胞 ( 白の矢頭及び小さい矢頭で線維を示している ) が o R G 様の M S T 挙動 : 線維方向への移動 ( 4 6 μ m ) 及び水平切断面での分裂 ( 星印 ) を示した。時間 : 時間。スケールバー : 5 0 μ m 。

#### 【 0 2 5 5 】

実施例 3 : h E S C 由来 M G E 様前駆体から G A B A 作動性介在ニューロンが生成した  
本発明者らは、 h E S C 由来培養物のアイデンティティ及び運命をさらに検討した。第 2 5 日の a E B に免疫染色分析を実施した ( 図 3 A 及び 3 B ) 。このほか、第 2 5 日の a E B を分離し、単層 ( M L ) として培養し、第 3 5 日に免疫染色分析を実施し定量化した ( 図 3 C ~ 3 E ) 。第 2 5 日の段階及び第 3 5 日の段階とも、 N K X 2 . 1 - G F P 発現は内因性 N K X 2 . 1 タンパク質を発現する細胞に特異的であった ( 9 1 . 3 ± 1 . 7 % ) ( 図 3 E ) 。第 2 5 日、 N K X 2 . 1 - G F P + 細胞のほとんどに F O X G 1 及び O L I G 2 が発現し、腹側終脳様アイデンティティのさらなる証拠が得られた ( 図 3 B ) 。第 3 5 日までにはほとんどの G F P + 細胞が F O X G 1 を発現し続けた ( 8 1 . 5 ± 3 . 6 % ) が、 O L I G 2 はダウンレギュレートされた ( 6 . 8 ± 3 % ) 。 G F P + 細胞の大部分が、第 3 5 日までにはほかにも A S C L 1 ( 7 9 . 9 ± 6 . 5 % ) 及び D L X 2 ( 7 9 . 8 ± 3 . 7 % ) を発現した。 O L I G 2 は G E 前駆体を示し、 D L X 2 は G A B A 作動性ニューロン系列を示すことから、これらの結果により、第 2 5 日の h E S C 由来 M G E 様前駆体 ( 本明細書では M G E 前駆細胞とも呼ばれる ) が第 3 5 日までには G A B A 作動性ニューロンへの分化を開始することが示唆された。実際、 T U J 1 ( 9 2 ± 2 . 4 % ) 染色によってニューロンアイデンティティが確認された ( 図 3 D 及び 3 E ) 。 G F P + / T U J 1

+細胞のほとんどがGABA(75.8±2.3%)を同時発現した。このほか、第35日までに介在ニューロンサブタイプのマーカー、カルビンジン(CALB1またはCALB)が発現した(31.1±5.4%)が、その他の介在ニューロンサブタイプのマーカー、カルレチニン(CALB2またはCALR)、ソマトスタチン(SST)及びパルプアルブミン(PVALBまたはPV)については、SSTまたはCALRがまれに検出された以外は検出されなかった。

#### 【0256】

少数のGFP+細胞が間脳/オリゴデンドロサイトマーカーのNKX2.2(13.6±4.7%)、神経前駆細胞/グリア細胞マーカーのGFAP(3.9±3.9%)及びKI67(2.8±1.5%)、LGE/POA富化マーカーのISLET1(7.6±3.3%)またはドーパミン作動性ニューロンマーカーのTH(4.4±1.3%)を発現した(図3E)。新皮質マーカーのPAX6、尾側GE(CG E)/背側MGEマーカーのCOUPTFII、線条体中型有棘ニューロンマーカーのDARPP32、淡蒼球投射ニューロンマーカーのER81/ETV1、コリン作動性ニューロンマーカーのCHATまたはグルタミン酸作動性新皮質投射ニューロンサブタイプマーカーのTBR1を発現したGFP+細胞はほとんどみられなかった(図3E)。以上の結果を踏まえると、hESC由来MGE様前駆体はほとんどが分裂終了GABA作動性介在ニューロンに分化したと考えられる。

#### 【0257】

図3. hESC-MGE様前駆体は終脳GABA作動性介在ニューロンの特性を有するニューロンに分化した。(A)第25日に免疫蛍光染色用に固定したaEB。(B)第25日のMGE様前駆細胞がNKX2.1-GFP、NKX2.1、FOXG1、OLIG2、ASCL1及びDLX2を発現した。青色:DAPI。スケールバー:50µm。(C)分離し、MLとして再播種し、第35日の免疫蛍光法のために固定したaEB。(D)第35日の分離細胞がNKX2.1-GFP、TUJ1、ASCL1、GABA及びCALBを発現した。青色:DAPI、スケールバー:50µm。(E)第35日の免疫染色の定量化。NKX2.1-GFP+細胞の大部分がNKX2.1、FOXG1、ASCL1、TUJ、GABA及びDLX2を発現した。データは平均±SEMで表されている。

#### 【0258】

実施例4:hESC由来NKX2.1-GFP+のマイクロアレイプロファイリング

第20日のaEB(青色のバー)もしくは第35日の接着単層(オレンジ色のバー)または予めUbC-RFPウイルスで標識し、第35日にGFPについて分取し、グリア細胞と共培養した第55日の培養物(緑色のバー)から、55日間の分化経過中の未分化hESCとFACS分取NKX2.1-GFP+集団との間のトランスクリプトームの網羅的比較を得るため、本発明者らはマイクロアレイプロファイリングを実施した(図4A)。NKX2.1-GFP+細胞の百分率は、分離した単層培養物(第35日で約81%)または共培養物(第55日で約94%のRFP+細胞)では高いレベルで維持された(図4B)。樹状図によるクラスター分析から、分化したGFP+集団が未分化hESCよりも互い近縁であることがわかった(図10A)。hESC由来GFP+集団のアイデンティティをさらに詳細に調べるため、本発明者らは系列特異的マーカーのパネルを選択し、転写産物のハイブリダイゼーション強度を経時的に評価した(図4C~4H及び図10C~10F)。一部のマーカーについては定量的RTPCRを実施し、アレイのデータを確認した(図10B)。多能性のマーカーが未分化hESCにのみ検出されたのに対して、神経系列のマーカー(HES5、DCX、SYN、SYN1)は分化GFP+細胞で誘導された。グリア細胞、神経堤、ミクログリアのマーカーはいずれも検出されなかった。これとは対照的に、GFP+細胞にはニューロンマーカー(TUBB3、DCX、SYN、SYN1)が発現し、転写産物レベルが経時的に上昇した。次に本発明者らは、中枢神経系(CNS)の前後方向のパターン形成を調べ、前部CNSのマーカー(FOXG1、SIX3、OTX2)の発現を検出した。これまでの結果と同じように、間脳(及びそれよ

10

20

30

40

50

りも尾側の部分)NKX2.2が一過性に発現した後、ダウンレギュレートされた。CNS底板のマーカ、FOX A2が第20日の前駆体に発現したが、その後の時点では検出されなかったのは予想外であった。

#### 【0259】

次に本発明者らは、前脳の小領域を同定するマーカを検討した。NKX2.2の一過性発現を除けば、間脳視床下部のマーカが旺盛に発現することはなかった(図10C)。このほか、背側興奮性ニューロン系列のマーカも検出されなかった(図10D)。代わりに、腹側終脳GABA作動性ニューロン系列マーカ(ASCL1、DLX1、DLX5)がMGEマーカ(NKX2.1、LHX6、LHX8、CXCR7)とともに発現し、その発現強度は全般的には経時的に増大した(図4F及び4H)。非MGE腹側終脳10のマーカは検出されず、NKX2.1+POA/中隔または淡蒼球のマーカも検出されなかった(図10E)。GABA作動性のマーカ(GAD1、SLC32A1、SLC6A1)は確認されたが、グルタミン酸作動性ニューロン、コリン作動性ニューロンのマーカはいずれも発現しなかった(図4G)。ドーパミン作動性ニューロン転写産物(TH)が検出されたが、THタンパク質を発現する多くのニューロンが同定されなかった(図3E)。以上の結果から、GFP+細胞が主としてMGE様GABA作動性ニューロン系列のものであることが示唆された。

#### 【0260】

MGEは、皮質GABA作動性介在ニューロンに加えて線条体GABA作動性介在ニューロン及びGABA作動性淡蒼球投射ニューロンを生成する。GFP+細胞が淡蒼球マーカ20の転写産物もタンパク質も発現しなかったため、本発明者らは、皮質/線条体介在ニューロン系列のマーカをさらに評価した。

#### 【0261】

線条体介在ニューロンがNKX2.1及びLHX8の発現を維持するのに対して、移動皮質介在ニューロンではこれらのマーカが消失し、ZEB2、MAF、ARX、CXCR7及びCXCR4が発現する。皮質様介在ニューロン系列であることを裏付けるように、GFP+細胞に旺盛なCXCR7発現が検出された。後期にZEB2、ARX及びCXCR4転写産物のシグナル増大がみられたが、全体的なレベルは低く、またNKX2.1及びLHX8の発現が継続し、未成熟段階の線条体介在ニューロン様系列及び/または皮質様系列であることが示唆された(図4F及び4H)。最後に、介在ニューロンのサブタイプを示す神経ペプチド及びカルシウム結合タンパク質のうち、SST転写産物のみが第55日に強く検出された(図4H)。以上をまとめると、hESC由来NKX2.1-GFP+集団はMGE様神経前駆細胞ならびにGABA作動性皮質様及び/または線条体様介在ニューロンであった。30

#### 【0262】

図4. hESC-MGE様NKX2.1-GFP+細胞集団のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。(A)マイクロアレイデータの概略図及び説明。未分化hESC(黒色);ならびに第20日のaEBからFACS分取したGFP+細胞(青色)、第35日のML培養物(オレンジ色)及び第55日まで共培養した第35日のGFP+細胞(緑色)。(B)各分化段階及び未分化hESC対照(黒色)の代表的なFACSヒストグラム分析。(C~H)マーカパネルの転写産物ハイブリダイゼーションの平均シグナル強度。IN=介在ニューロン、DA=ドーパミン作動性、ACh=コリン作動性、Glu=グルタミン酸作動性。データは平均±SEMで表されている。このほか図10を参照されたい。40

#### 【0263】

図10. 図4に関連したhESC由来NKX2.1-GFP+細胞の転写産物発現プロファイリング。

(A)マイクロアレイデータの樹状図によるクラスター分析によって、第20日、第35日及び第55日のGFP+集団が未分化hESCよりも互いに近縁であることが確認された。50

(B) 未分化 h E S C ( 黒色のバー ) 及び第 3 週の G F P + 細胞 ( 青色のバー ) の G A P D H 発現に対する定量的 R T P C R 分析。データは平均  $\pm$  S D で表されている。

(C ~ F) マイクロアレイ解析のほかのマーカー。説明：未分化 h E S C ( 黒色 ) の試料、第 20 日の G F P + ( 青色 ) の試料、第 35 日の G F P + ( オレンジ色 ) の試料及び第 55 日の G F P + ( 緑色 ) の試料。パネルは、視床下部 ( C )、皮質興奮性ニューロン系列 ( D )、腹側終脳 ( E ) 及び全般的な胎児発生マーカー ( F )。G P = 淡蒼球、P O A = 視索前野、S e p = 中隔、P N = 投射ニューロン。視床下部及び皮質興奮性ニューロンマーカーは検出されなかった。ほかにも、P O A / S e p、G P 及び M G E 由来 P N マーカー、E T V 1 ならびに G B X 2 が検出されなかった。背側 M G E 及び C G E マーカーの N R 2 F 2 ( C O U P T F I I ) が低レベルで検出され、G F P + 細胞がまれに C O U P T F I I タンパク質を発現したことと一致し ( 図 3 E )、また N K X 6 - 2 も第 20 日にわずかに検出された。ヒト多能性幹細胞に由来する神経細胞の発生段階を推定するのに初期胎児マーカーの D P P A 4、L I N 2 8 及び L I N 2 8 B が用いられてきた ( P a t t e r s o n , M . ら ( 2 0 1 2 ) . C e l l R e s 2 2 , 1 7 8 - 1 9 3 )。ヒト胎児脊髄では、L I N 2 8 発現が 7 g w までにダウレギュレートされるのに対して、D P P A 4 及び L I N 2 8 B は 1 3 g w まで減少しない。本発明者らの培養物では、D P P A 4 及び L I N 2 8 は第 35 日までに検出されず、L I N 2 8 B 発現は第 55 日まで持続した。以上の結果から、第 35 日 ~ 55 日の G F P + 細胞が 7 ~ 1 3 g w の胎児発生段階ほぼ同じであり得ることが示唆される。データは平均  $\pm$  S E M で表されている。

10

20

#### 【 0 2 6 4 】

実施例 5：h E S C 由来 M G E 様細胞の G A B A 作動性介在ニューロンサブタイプへの成熟遅延

次に本発明者らは、N K X 2 . 1 - G F P + M G E 前駆体様細胞によって生成するニューロンサブタイプ及びサブタイプ成熟の発生時系列の両方をより説得力をもって決定することを目指した。第 35 日の F A C S 分取 G F P + 細胞の成熟を検討するため、これを皮質グリア細胞と共培養し ( 図 5 A )、一部の細胞を共培養の前に U b C - R F P ウイルスで標識した。分化後第 5 週、第 10 週、第 20 週及び第 30 週 ( W P D )、培養物を分析用に固定し、ニューロンサブタイプマーカー発現を定量化した ( 図 5 C )。30 W P D 後、R F P + h E S C 由来ニューロンは細胞体の大きさが顕著に大きくなり、G A B A 作動性ニューロン - 特異的マーカーの V G A T ならびに介在ニューロンサブタイプマーカーの S S T、C A L B 及び C A L R を発現した ( 図 5 B )。10 ~ 20 - W P D の培養物の画像を図 11 に示す。5 W P D のほぼすべてのニューロンが N K X 2 . 1 - G F P を発現したが、皮質介在ニューロンと同じく、30 W P D までに N K X 2 . 1 + ニューロンの百分率が有意に低下した (  $66.7 \pm 6.1\%$  ;  $p = 0.03$  )。5 ~ 30 W P D でほとんどのニューロンが G A B A (  $75 \sim 86\%$  ) 及び V G A T (  $53 \sim 78\%$  ) を発現した。興奮性ニューロンマーカー T B R 1 は、まれな細胞 ( ニューロン 3 , 110 個中 11 個 ) を除いて発現しなかった。C A L B は経過時間全体を通じてニューロンに発現した (  $24 \sim 36\%$  )。これに対して、S S T + ニューロン及び C A L R + ニューロンの百分率は経時的に増大し、10 ~ 20 W P D では有意に誘導された ( S S T :  $2.8 \pm 1\% \sim 12.8 \pm 9\%$  ;  $p = 0.03$  及び C A L R :  $8.8 \pm 4.9\% \sim 52.6 \pm 6.2\%$  ;  $p = 0.004$  )。30 W P D までに S S T + ニューロンの百分率が  $40.6 \pm 8.6\%$  に増大し、C A L R + ニューロンの百分率が  $77.7 \pm 14.9\%$  に増大した。これとは逆に、P V + ニューロンは 30 W P D までに検出されず ( ニューロン 1 , 146 個中 0 個 )、N P Y + ニューロンはまれであった ( ニューロン 819 個中 6 個、不掲載 )。したがって、N K X 2 . 1 - G F P + M G E 様細胞は C A L B、C A L R 及び / または S S T サブタイプマーカーを発現する N K X 2 . 1 + 及び N K X 2 . 1 陰性 G A B A 作動性介在ニューロンに成熟し、10 ~ 20 W P D の間に顕著な S S T 及び C A L R サブタイプ成熟がみられた。

30

40

#### 【 0 2 6 5 】

本発明者らの h E S C 由来 G A B A 作動性介在ニューロンが S S T 及び C A L R の実質

50

的な発現を示すのに20～30週間を要したのは驚くべきことであった。しかし、このような分化時系列の遅延はヒト胎児及び乳児の介在ニューロンサブタイプ発生に類似している(Fertuzinhos, S.ら(2009). Cereb Cortex 19, 2196-2207)。本発明者らは、自ら発生段階のヒト皮質及びMGEの組織学的分析を実施してこれらの観察結果を確認した(図12A及び12B)。ヒト胎児MGE由来の運命をさらに検討するため、本発明者らは、妊娠18週(gw)のヒト胎児MGE細胞を切り出し、UbC-RFPウイルスで標識し、共培養した。培養第12週までにRFP+ヒト胎児MGE細胞がCALB+、CALR+、SST+及びGABA+ニューロンに成熟し、TBR1を発現しなかった(図12C)。したがって、hESC由来MGE様細胞成熟は内因性のヒト胎児MGE発生と培養したヒト胎児MGE発生の両方に類似していた。すなわち、同等の介在ニューロンサブタイプがほぼ同じ順序及び時間枠で生成した。

#### 【0266】

図5. hESC-MGE前駆体様細胞由来GABA作動性介在ニューロンの成熟及び発火特性。

(A) ML培養物を分離し、UbC-RFPレンチウイルスで標識し、第35日にGFP+細胞をFACS分取し、共培養した。

(B) VGAT、SST、CALB及びCALRを発現する高度に分岐したRFP+ヒトニューロンを示す第30週の培養物の免疫染色。スケールバー：50µm。

(C) 5週間、10週間、20週間及び30週間にわたる免疫染色分析の定量化。データは平均±SEMで表されている。このほか図11及び12を参照されたい。

(D) 12WPD及び30WPDのhESC由来ニューロンのDIC画像であり、挿入画像は記録ニューロンのRFP発現を示している。スケールバー：20µm。

(E) 膜抵抗(Rm)、静止膜電位(RMP)、膜容量(Cm)及び活動電位(AP)1/2幅を示す統計結果。

(F) 各段階の閾値付近(上)及び閾値超(下)の電流注入時の代表的なAP発火パターン。スケールバー：50mV及び100ms。このほか図13を参照されたい。

(G) 閾値電流注入時の最初のAPトレースの平均。スケールバー：25mV及び25ms。

(H) 各段階のAHPを示す統計結果(破線=ベースライン)。

(I~J) 段階的電圧(持続時間500ms)の下で測定した各段階のNa<sup>+</sup>電流(I)及びK<sup>+</sup>電流(J)のI-V曲線。E、H、I、J：データは平均±SEMで表されている。\*\*\*はp<0.001を表す。

#### 【0267】

図11. 図5に関連したhESC由来MGE前駆体様細胞のGABA作動性介在ニューロンサブタイプへの成熟。

UbC-RFPウイルスで予め標識し、第35日にGFPについてFACS分取し、分化後10週間及び20週間(WPD)共培養したNKX2.1-GFP+細胞の免疫染色分析。10WPDまでにhESC由来ニューロンがVGAT及びカルビンジン(CALB1)を発現し、まれな細胞がカルレチニン(CALB2)またはSSTを発現した。20WPDまでにヒトニューロンがVGAT、CALB1、CALB2及びSSTを発現した。パルプアルブミン(PVALB)はいずれの時点でも検出されなかった。青色=DAPI。

#### 【0268】

図12. 図5に関連したヒト胎児皮質及びMGEならびにヒト胎児MGE由来の培養物における介在ニューロンサブタイプの発生。

(A) 14~15gw、24gw及び生後(pn)8か月(mo)のヒト胎児皮質切片における介在ニューロンサブタイプマーカーの発現。CALB及びCALRは全試料に発現したが、SST及びPVはそれぞれ24gwと8moの試料及び8moの試料にのみ発現した。青色=DAPI。

(B) 15gwヒト胎児MGE切片におけるサブタイプマーカーの発現。CALB及びC

A L Rともに発現し、N K X 2 . 1 と共局在していた。青色 = D A P I。

( C ) ヒト胎児 M G E を分離し、U b C - R F P で標識し、R F P + 細胞を F A C S 分取し、分離したヒト胎児皮質細胞と共培養した。R F P + 細胞は C A L B、C A L R、S S T 及び G A B A を発現したが、T B R 1 は発現しなかった。青色 = D A P I。

#### 【 0 2 6 9 】

実施例 6 : h E S C 由来 M G E 様細胞の機能的成熟 : 介在ニューロン様発火特性、シナプス形成及び G A B A 作動性出力

h E S C 由来細胞が機能的なニューロンであるかどうかを試験するため、本発明者らは、様々な W P D ( 第 8 週、 $n = 21$  ; 第 12 週、 $n = 35$  ; 第 15 週、 $n = 31$  ; 第 30 週、 $n = 18$  ) に全細胞パッチ記録を実施して、その電気生理学的特性を検討した。本発明者らは、最初の A P の A P 1 / 2 幅が広いこと、後過分極 ( A H P ) が小さいこと及び高電流を注入すると反復して発火できないことから判断して、8 W P D では h E S C 由来ニューロンの活動電位 ( A P ) 発火パターンが全く未成熟であることを発見した ( 図 5 E ~ 5 H ) 。ピーク電位依存性 N a + 及び K + チャネル電流は 8 W P D から 12 W P D の間に有意に増大し ( 図 5 I 及び 5 J ) 、同時に膜抵抗 ( R m ) が有意に減少した ( 図 5 E ) 。12 W P D 及び 15 W P D では、閾値付近の電流注入時に多くのニューロンがより成熟した反復性 A P 発火を示した ( 図 5 F、13 B 及び 13 C ) 。30 W P D までには、閾値超の電流注入時に h E S C 由来ニューロンが高頻度の反復性 A P 発火 ( 図 5 F 及び 13 D ) とともに、これに対応する膜容量 ( C m ) の増大及びより過分極した静止膜電位 ( R M P ) を示した ( 図 5 E ) 。さらに、30 W P D のニューロンでは A P 1 / 2 幅が小さくなり ( 図 5 E ) 、A H P が大きくなった ( 図 5 G 及び 5 H ) 。ほかに、ここに挙げたより成熟した生物物理学的特性と同じように、30 W P D では、h E S C 由来ニューロンの形態が前段階の 12 W P D よりも成熟した多数の長い突起を有するものであることがわかった ( 図 5 D ) 。

#### 【 0 2 7 0 】

次に本発明者らは、M G E 様細胞をマウスグリア細胞と共培養し、そのシナプス特性を調べることによって、同細胞が G A B A 作動性ニューロンであるかどうかを検討した。h E S C 由来 N K X 2 . 1 - G F P + ニューロン突起と点状のシナプス前 V G A T 発現が共局在し、G A B A 作動性シナプスの形成が示唆された ( 図 6 A ) 。分化後第 8 週までに自発的シナプス後電流 ( s P S C ) が検出され、G A B A A 受容体阻害剤のビククリンメチオジド ( B M I、 $20 \mu M$  ) によって完全に遮断されたことから、機能的な G A B A 作動性特異的シナプス形成が示された ( 図 6 B ) 。s P S C を受け取ったニューロンの百分率は、8 W P D に  $33.3\%$  (  $n = 12$  ) であったのが 12 W P D に  $82.1\%$  に増大した (  $n = 28$ 、図 6 C ) 。G A B A 作動性ニューロンが隣接ニューロンに出力を送ることが可能であることを確認するため、本発明者らは、半数のニューロンにシナプシンプロモーターのチャンネルロドプシン 2 - E Y F P ( C h R 2 - E Y F P ) をレンチウイルス感染によって形質導入した。青色光で刺激したところ、E Y F P 陽性ニューロンに活動電位発火が確実に誘起され ( 図 13 F ) ( W e i c k , J . P . ら ( 2011 ) , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 108 , 20189 - 20194 ) 、隣接ニューロンに強いシナプス後電流 ( P S C ) が誘発された ( 図 6 D 及び 6 E ) 。さらに、P S C は、G A B A 作動性 P S C の特徴である長い減衰時間を示した (  $31.4 \pm 1.9 ms$ 、 $n = 26$  ) 。B M I による光誘発 P S C の可逆的遮断によってこのことをさらに検証した ( 図 6 D 及び 6 E ) 。光誘発 P S C の逆転電位は、本発明者らの記録条件下で予想される C l - 逆転電位 [  $-37.3 mV = -53.4 mV$  ( ネルンストの式による ) +  $16.1 mV$  ( 接合部電位 ) ] に近い  $-32.7 mV$  であった ( 図 6 F 及び 6 G ) 。以上の結果から、h E S C 由来 M G E 様介在ニューロンが G A B A 作動性シナプス出力のみを生じることが示唆された。

#### 【 0 2 7 1 】

h E S C 由来介在ニューロンが初代ヒトニューロンにシナプスを形成することができるかどうかを検討するため、4 W P D に M G E 様細胞を C h R 2 - Y F P 及び U b C - R F

Pウイルスで標識し、RFP + FACS分取細胞を20gwの分離ヒト胎児皮質細胞と7週間共培養した。共培養後、RFP陰性初代皮質ニューロンから全細胞記録を得た(図6H)。hESC由来ニューロンの青色光刺激によって、記録した初代ニューロンにGABA作動性特異的PSCが誘起され、BMIによって完全に遮断された(図6I及び6J)。さらに、光刺激時に多シナプス応答がみられ(図6I)、これも同じくBMIによって遮断されたことから、hESC由来ニューロンが培養ヒト胎児ニューロン回路に堅固にシナプス統合されたことが示された。したがって、hESC由来ニューロンが機能的ニューロンの特性を有し、シナプス出力がGABA作動性に限られ、サブタイプマーカー発現のペースが遅いのも同じよう介在ニューロン発火特性の成熟が遅く30週間かかることが示された。

10

#### 【0272】

図6. hESC由来介在ニューロンのGABA作動性シナプス特性。

(A) 12WPDのhESC由来NKX2.1-GFP+ニューロンにおけるVGAT発現を示す画像。右: 破線の長方形で囲った部分を拡大した画像。スケールバー: 左、50  $\mu$ m; 右、10  $\mu$ m。

(B) hESC由来ニューロンの自発的シナプス後電流(PSC)を示すトレース。下段: PSCがBMIによって完全に遮断された。スケールバー: 100 pA、5秒及び中段のトレースは0.25秒(破線)。

(C) 様々な段階の自発的PSCを示すニューロンの百分率。

(D) hESC由来ニューロンにChR2-EYFPで形質導入した。トレースは、青色光のパルス(青色のバー)が隣接細胞にPSCを誘発し、これがBMIによって可逆的に遮断されたことを示している。スケールバー: 50 pA及び50 ms。このほか図13を参照されたい。

20

(E) 光誘発GABA作動性PSC及びBMI適用の平均振幅。

(F~G) 様々な保持電位での光誘発(青色のバー)PSCを示すトレース。光誘発GABA作動性PSCのI-V曲線を示す結果のまとめ(n=7)(G)。

(H) 分取したUbC-RFP+及びChR2形質導入hESC由来ニューロンと共培養したヒト胎児皮質細胞のDICを示すマージ画像。スケールバー: 20  $\mu$ m。

(I) 記録したRFP陰性ヒト胎児皮質ニューロンにおけるhESC由来ニューロンの青色(青色のバー)刺激によって誘発されたPSCを示すトレース。上のパネルはPSC単シナプス応答を示し、下のパネルは多シナプス応答のみられるPSCを示し、ともにBMIによって完全に遮断された。スケールバー: 50 pA及び50 ms。

30

(J) 光誘発PSC及びBMI適用の平均振幅。E、J: データは平均 $\pm$ SEMで表されている。

#### 【0273】

図13. 図5及び6に関連したhESC由来介在ニューロンの発火特性の成熟。

(A~D) 分化後の様々な段階における活動電位(AP)のトレースの例。様々な段階において、段階的電流を-60 mV~-70 mVの $V_{hold}$ で記録ニューロンに注入した: (A) 8WPD (B) 12WPD (C) 15WPD (D) 30WPD。赤色のトレースは閾値電流を注入したときのAPを示していた。黒色のトレースは閾値の2倍または3倍の電流を注入したときのAPを示していた。スケールバー: 50 mV及び200 ms。

40

(E~F) ChR2-EYFP陽性hESC由来ニューロンにおいて青色光により誘起されたAP。10WPDにおけるEYFP蛍光とDICのマージ画像(E)。スケールバー: 20  $\mu$ m。青色光のパルス(青色のトレース)によりChR2発現ニューロンに確実にAPが誘起された(黒色のトレース)(F)。

#### 【0274】

実施例7: マウス脳におけるhESC由来MGE様介在ニューロンの成熟及び機能的統合

細胞の運命及び機能を厳密に評価するため、hESC由来MGE様細胞をマウス脳内に移植した。本発明者らは、未分化NKX2.1+神経幹細胞の注入が回避されるようわれ

50

われのプロトコルを修正した(図16)。N o t c hシグナル伝達経路の $\gamma$ セクレターゼ阻害剤、D A P Tによる処置を用いて、ニューロン分化を組み合わせたニューロン前駆体のP S A - N C A M精製を誘導した(S c h m a n d t, T.ら(2005). S t e m C e l l s D e v 14, 55-64)。平均 $75.7 \pm 5.2\%$ ( $n = 12$ )のN K X 2.1 - G F P + 細胞がF A C Sにより高P S A - N C A M発現に陽性を示し(図14A)、G A B A作動性ニューロン前駆体を富化した第35日のN K X 2.1 - G F P + 及びP S A - N C A M + 細胞(図3E)を重症複合免疫不全(S C I D)新生仔マウスの皮質に注入した(図7A)。ヒト特異的核抗原(H N A)陽性ヒト細胞が注入後7か月間(M P I)(最も長い時点)生存し、一部のヒト細胞が注入部位から1 mm超移動した(図7B、14B及び14C)。2 M P I、4 M P I及び7 M P I後のヒト細胞の生存率(注入した細胞の%)はそれぞれ $5.6 \pm 2.6\%$ 、 $3.1 \pm 1.5\%$ 及び $8.6 \pm 3.1\%$ であった。2 M P I後、H N A及びN K X 2.1 - G F P( $67.8 \pm 1.6\%$ )、K I 6 7( $25.5 \pm 1.7\%$ )またはD C X( $79.8 \pm 3.8\%$ )を発現するヒト細胞はほとんどが依然として注入部位に存在していた(図7B及び14B)。しかし、4 M P IまでにはK I 6 7発現が有意に減少し( $1.7 \pm 0.27\%$ ;  $p = 0.04$ )、D C X発現も同様に経時的に減少した(7 M P Iまでに $5.9 \pm 4.9\%$ ;  $p = 0.008$ )。このほか、7 M P I後にはN K X 2.1 - G F Pがヒト細胞の $35.6 \pm 1.4\%$ にのみ検出され、この百分率は30 W P Dの共培養物よりも低い値であった。分裂終了ニューロンマーカーのN E U Nには逆の傾向がみられ、7 M P Iまでにヒト細胞の $68.4 \pm 8.3\%$ に増大した。これに対して、グリア細胞マーカーのG F A P及びO L I G 2は、7 M P Iではこれよりも低い百分率のヒト細胞に発現した(それぞれ $11.2 \pm 4.3\%$ 及び $10.7 \pm 4.4\%$ )。一部のh E S C由来培養物を注入前にU b C - R F Pウイルスで標識した。7 M P I後のマウス脳では、ニューロンの形態を有するR F P + ヒト細胞がG A B A、S S T、C A L B及びC A L Rを発現していることが明らかになった(図7C及び7E)。P V + ヒト細胞については、弱いシグナルを有するまれな細胞(細胞1, 829個中4個)を除いて、検出されなかった。以上をまとめると、マウス皮質に注入したM G E様G A B A作動性ニューロン前駆体は主として、介在ニューロンサブタイプマーカーのS S T、C A L R及びC A L Bを発現するニューロンに成熟した。

#### 【0275】

h E S C由来M G E様細胞がi n v i v oでシナプスによって統合される機能的介在ニューロンになることができるかどうかを検討するため、本発明者らは、7 M P Iのマウス脳スライスでR F P + ヒト細胞の全細胞記録を実施した。ニューロバイオチンの細胞内注入及び後染色により、記録R F P + ニューロンの旺盛な突起分岐が明らかになった(図7F)。3個体からパッチした計17個のヒト細胞のうち、16個のニューロンが平均 $-64.8 \pm 4.0$  mVのR M Pで活動電位を発火する能力を示した。さらに、膜特性及び発火パターンが異なるI型及びII型の2つのグループの介在ニューロンが確認された。I型介在ニューロンは平均R M Pが $-67.3 \pm 2.9$  mV、R mが $257 \pm 78$  M $\Omega$ 、C mが $69.4 \pm 0.6$  pFであった。I型介在ニューロンの発火パターンは閾値でのスパイクに大幅な遅延を示し、閾値超の電流注入時にほとんど順応を示さなかった(図7G及び14D)。II型介在ニューロンはI型よりも過分極R M Pが大きく( $-80.1 \pm 3.4$  mV)、R mが小さく( $91 \pm 28$  M $\Omega$ )、C mが小さかった( $27.75 \pm 4.6$  pF)。II型介在ニューロンの発火パターンは、閾値超の電流注入時に迅速に最初のスパイクの順応を示した(図7G及び14E)。さらに、移植したh E S C由来介在ニューロンは、B M I感受性G A B A作動性の成分及び6 - シアノ - 2, 3 - ジヒドロキシ - 7 - ニトロ - キノキサリン(C N Q X)感受性グルタミン酸作動性の成分の両方を含むシナプス入力を受け取った(16個中16個)(図7H)ことから、宿主皮質内への機能的統合が示唆された。

#### 【0276】

図7. マウス脳におけるh E S C由来M G E様介在ニューロン前駆細胞の成熟及び機能的統合。

10

20

30

40

50

(A) NKX2.1-GFP及びPSA-NCAMについてFACS分取し、新生仔マウス皮質に注入した第35日のML培養物。このほか図16を参照されたい。

(B) ヒト特異的hNA、GFP、及びKI67について染色した2MPI及び7MPIのマウス脳組織切片。青色：DAPI。スケールバー：200µm。このほか図14を参照されたい。

(C) 7MPIにNEUN、GABA、SST、CALB及びCALRを同時発現したUbc-RFP標識ヒト細胞(矢印)の組織学的分析。青色：DAPI。スケールバー：50µm。

(D~E) 2MPI(黒色)、4MPI(オレンジ色)及び7MPI(青色)の組織学的分析ならびにSST、CALB及びCALR(E)の定量化。データは平均±SEMで表されている。

(F) ニューロビオチン(NB、緑色)の細胞内注入によって標識したhESC由来ニューロン。挿入画像：注入ニューロン7MPIのRFP蛍光。スケールバー：20µm；挿入画像、5µm。

(G) 7MPIにおける閾値付近(上)及び閾値超(下)の電流注入時のI型(左)及びII型(右)hESC由来ニューロンのAP発火パターンのトレース。スケールバー：50mV及び100ms。

(H) 左のパネル：注入後にhESC由来ニューロンで記録された自発的PSCのトレース；右上：BMIにより遅い減衰時間(矢印)を示すPSCが遮断され、速い減衰時間(矢頭)を示す残りのPSCはのちのCNQX適用によって遮断された(右下のパネル)。スケールバー：50pA、2.5秒及び拡大したトレースでは0.2秒(破線)。このほか図14を参照されたい。

#### 【0277】

図14、図7及び図16に関連したマウス脳におけるhESC由来MGE様介在ニューロン及びサブタイプの発火特性の成熟。

(A) アイソタイプ抗体対照(灰色)と比較した、ほとんどのGFP+細胞(赤色)によるPSA-NCAMの高い発現を示す第35日のFACS解析のヒストグラム。

(B) 注入後2か月、4か月及び7か月(MPI)のNKX2.1-GFP+及びPSA-NCAM+hESC由来MGE様細胞の移動及び成熟に関する免疫染色分析。7MPIまでにヒト特異的核抗原(hNA)+ヒト細胞が移動し、GFP及びDCXを下方制御し、神経成熟のマーカー、NEUNを上方制御することができた。青色=DAPI。

(C) 6匹のマウスにおけるhESC由来MGE様細胞遊走。2MPI、4MPI及び7MPIに単一の注入部位に隣接する吻側及び尾側皮質の切片のヒト細胞を計数した。7MPIまでにいくらかの移動が検出された。注入細胞の百分率としてプロットした。

(D~G) 7MPIのI型及びII型hESC由来介在ニューロンの発火特性。閾値付近(上)及び閾値超(400~500pA、下)の電流注入時のI型(D)及びII型(E)ニューロンのAP発火特性。各段(上のトレース及び下のトレース)は1個のニューロンのAP発火パターンを表す。上のパネル：赤色のトレースは閾値のAP発火パターンを表し；黒色のトレースは閾値の2倍のAP発火パターンを表す。スケールバー：50mV及び200ms。(F) I型ニューロンとII型ニューロンとの間にAPの特徴の差があることを示す統計結果。データは平均±SEMで表されており、統計学的比較には学生t検定を用いた。\*は $p < 0.05$ を表す。(G) 閾値超の電流注時のAP発火頻度の分析。II型ニューロンは迅速な順応発火特性を示した。

#### 【0278】

図16、図7及び14に関連したhESC分化プロトコル最適化、動物移植及び腫瘍発生率のまとめ。

#### 【0279】

実施例8：hESC由来MGE前駆体様細胞

臨床グレードのGMP適合hESC系列ESI17(図17)、ESI35(図18)、ESI51(図19)及びH9(図20)がMGE前駆体様細胞に分化し(上の列)、

さらに介在ニューロンに分化した（下の列）。

【0280】

図17～20の上の列：第7日まで浮遊胚様体（sEB）として培養したのち、第28日まで接着EB（aEB）として培養するB27+5F法によりhESC系列を分化させた。培養物を免疫蛍光染色用に固定した。接着EBの細胞のほとんどがマーカーMGE（NKX2.1）、終脳（FOXG1）及びニューロン特定（ASCL1）のマーカーの高い発現を示した。少数の細胞が腹側視床下部（NKX2.2）及びオリゴデンドロサイト前駆細胞（OLIG2）のマーカーを発現した。

【0281】

図17～20、下の列：第28日のaEB培養物を分離して単一の細胞にし、単層として再播種し、B27サプリメントを加えたneurobasal培地にBDNF、DAPT、SHHを添加して、または添加せずにさらに2週間培養し、同分析用に固定した。この第42日の単層培養物はNKX2.1、ニューロンマーカー（TUJ）を発現し、抑制性ニューロンマーカー（GABA）を発現し始めた。OLIG2発現は検出されず、NKX2.2はまれな細胞にのみ認められた。

【0282】

実施例9：ナイーブ型ヒト多能性幹細胞からのMGE前駆細胞の誘導

典型的なプライム型HES3（NKX2.1-GFP）hESCには核内に均一なOCT4が発現するが、ナイーブ型幹細胞マーカーのTFE3は均一に発現しない（図21、上の列）。公開されている方法を用いて、プライム型HES3（NKX2.1-GFP）hESCをナイーブ型HES3幹細胞に変換した（Gafni及びHannaら、Nature 2013）。ナイーブ型hESCでは、ほとんどすべての細胞の核内にTFE3が発現した（図21、中央の列）。B27+5F法を用いてナイーブ型幹細胞を分化させたところ、2～6週間の接着EB培養によってHES3 hESCがMGEマーカーのNKX2.1-GFP、NKX2.1及びLHX6を発現する細胞に分化した（図21、下の列）。

【0283】

ナイーブ型ES細胞は、bFGFのみを含む典型的な培地で増殖させた従来のヒトES/iPS細胞よりも未分化の状態にある。従来のhPSCの方がマウスmPSCよりも後期段階の移植後胚盤葉上層に等価であり、マウスmPSCは初期段階の移植前内部細胞塊の方に類似している。したがって、ナイーブ型ヒトES細胞及びiPS細胞の方がマウスES細胞に類似している。その特性（遺伝子発現及びエピジェネティクス）は移植前の胚と同等である。これらは転写因子TFE3の発現及び核局在及びコロニー形態によって確認することができる。これらの特性によってナイーブ型細胞と従来のプライム型hPSCが識別される。

【0284】

実施例10：in vitroでhPSCから分化させたMGE前駆細胞に由来する介在ニューロンの選択及び精製へのMGE富化エンハンサー配列の利用

様々なエンハンサー-レポーター導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスが利用可能である。このようなマウスでは、レポーター遺伝子がエンハンサーのDNA配列に応じて様々なパターン及び系列特異性で前脳に発現する（図22A～22D）。

【0285】

MGE富化エンハンサー配列を、トランスジェニックマウスの前脳におけるその発現パターンに基づいてウイルスベクターにクローン化し、MGEを選択するように蛍光レポーター遺伝子及び/または抗生物質耐性遺伝子の発現を駆動させた。この構築物にはほかにも、安定なトランスジェニックhPSCの選択及び拡大を可能にするRex1-抗生物質耐性カセットが含まれていた（図22、E）。

【0286】

レンチウイルスを用いて、mCherry RFPレポーター遺伝子（i12b-RFP）を駆動する遺伝子間DLX1/2 i12b（422）エンハンサーをHES3 NK

10

20

30

40

50

X2.1 - GFP hESC系に送達し、mCherryに関するゲノムDNA PCRによって確認される2つの安定な細胞系(#5及び#10)を生成した(図22、F)。

【0287】

この改変した細胞系をB27+5F法を用いて分化させ、分化3週間後にi12b-RFP発現がNKX2.1とともに検出された(図22、G)。EB中のi12b-RFP+細胞はGABA作動性ニューロンマーカーのDLX2及びニューロンマーカーのTUJ1を同時発現した(図22、H及びI)。

【0288】

フローサイトメトリー分析により、B27+5F法によって誘導した多くの細胞がNKX2.1-GFP及びi12b-RFPを同時発現することが確認された(図22、J)。これらの培養物をNOTCH経路阻害剤のDAPTで処置したところ、この二重陽性を示すMGE由来介在ニューロンの集団が著明に増加した(図22、K)。

【0289】

二重陽性(NKX2.1-GFP+及びi12b-RFP+)MGE前駆細胞をFACSによって精製し、SCIDマウスの皮質に移植した。注入から数か月後、NKX2.1-GFP及びi12b-RFPの両方を発現するヒト細胞が注入部位から拡散し、げっ歯類灰白質周囲に統合されていることが明らかになり、これはMGE由来介在ニューロンへの分化を示す顕著な特徴と一致するものであった(図22、L)。

【0290】

このほか、培養hPSC由来MGEに由来しi12b-RFPを発現する介在ニューロン(図22、M)を電気生理学的方法を用いて分析した。記録RFP+介在ニューロンが一連の反復性活動電位を発火したことから、そのニューロン運命が確認された(図22、N)。

【0291】

実施例11：長期浮遊培養を用いたMGE由来介在ニューロンの生成

正常酸素圧ガス(酸素圧20%)中、B27+5F条件を用いてsEBとして分化させたHES3 hESCからNKX2.1-GFP及びLHX6を発現するMGE介在ニューロンが生じた。この細胞を培養第35日に分析した(図23、A列)。

【0292】

正常酸素圧ガス中B27+5F条件を用いてsEBとして分化させたHES3 hESCからNKX2.1-GFP及びLHX6を発現するMGE介在ニューロンが生じた。この分化プロトコルでは、(培養期間全体を通じてSHHアゴニスト(プルモルファミン)が存在した上の図23、A列とは対照的に)第21日にSHHアゴニスト(プルモルファミン)を除去した。培養第35日に細胞を分析した(図23、B列)。

【0293】

HES3 hESCを高酸素圧ガス(酸素圧40%)中、KSR、N2及びB27サプリメント(逐次的に添加)ならびにROCK阻害剤、WNT阻害剤、SMAD阻害剤及びSHHアゴニストを含むGMEM及びDMEM/F12培地で培養した。培養第35日に細胞を分析した(図23、C列)。

【0294】

KSR、N2及びB27サプリメント(逐次的に添加)ならびにROCK阻害剤、WNT阻害剤、SMAD阻害剤及びSHHアゴニスト含みマトリゲル(1~2%)を添加したGMEM及びDMEM/F12培地でHES3 hESCを培養した。高酸素圧ガスで培養するとsEBが50日間超維持された。培養第60日に細胞を分析した(図23、D列)。

【0295】

実施例12：BMP及びWNTシグナル伝達経路の小分子阻害剤を用いたMGE前駆細胞の生成

以下に記載するのは、MGE前駆細胞の生成に有用なBMP及びWNTシグナル伝達経路の小分子阻害剤のさらなる例である。分化プロトコルは実施例1に記載されている通り

10

20

30

40

50

である。

【0296】

図24、A：BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれBMPRI A及びDKK1を用いたB27+5F分化プロトコルによって、hESCからNKX2.1GFP（上）及びFOXG1（下）を同時発現するMGE前駆細胞への分化が誘導された（詳細に関してこのほか実施例1を参照されたい）。

【0297】

図24、B：BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれLDN193189（0.1μM、カタログ番号04-0019（Stemgent））及びXAV939（2μM、カタログ番号3748（Tocris））を用いたB27+5F分化プロトコルによって、hESCからNKX2.1GFP（上）及びFOXG1（下）を同時発現するMGE前駆細胞への分化が誘導された。

10

【0298】

図24、C：BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれLDN193189（0.1μM、カタログ番号04-0019（Stemgent））及びIWR1e（3μM、Cayman Chemical、カタログ番号13659）を用いたB27+5F分化プロトコルによって、hESCからNKX2.1GFP（上）及びFOXG1（下）を同時発現するMGE前駆細胞への分化が誘導された。

【0299】

図24、D：BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれLDN193189（0.1μM、カタログ番号04-0019（Stemgent））及びIWP2（5μM、Stemgent、カタログ番号04-0034）を用いたB27+5F分化プロトコルによって、hESCからNKX2.1GFP（上）及びLHX6（下）を同時発現するMGE前駆細胞への分化が誘導された。

20

【0300】

図24、E：BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれドルサモルフィン（Dorsamorphin）（1μM、Sigma、カタログ番号P5499）及び（CKI）-7（1μM、Sigma、カタログ番号C0742）を用いたB27+5F分化プロトコルによって、hESCからNKX2.1GFP及びNKX2.1を同時発現するMGE前駆細胞への分化が誘導された。

30

【0301】

BMP及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤の添加のタイミングは図1Aに図示される通りであった。

【0302】

図24、下のパネル：フローサイトメトリーを用いて、小分子阻害剤を使用した場合のNKX2.1GFP+MGE前駆細胞の生成効率を求めた。NKX2.1GFP+MGE前駆細胞の生成効率は、分析した細胞のうちNKX2.1GFP+MGE前駆細胞である細胞のパーセントとして求めた。

【0303】

BMPシグナル伝達経路及びWNTシグナル伝達経路の阻害剤としてそれぞれBMPRI A及びDKK1を用いたB27+5F分化プロトコルでは生成効率が81.6%であった。BMPRI A及びDKK1の代わりにLDN193189及びXAV939を用いた場合、NKX2.1GFP+MGEの生成効率は86.9%であった。BMPRI A及びDKK1の代わりにLDN193189及びIWRを用いたところ、89.3%の効率でNKX2.1GFP+MGEが生成した（図24、下のパネル）。30,000~100,000個の細胞を分析した。

40

【図 1】

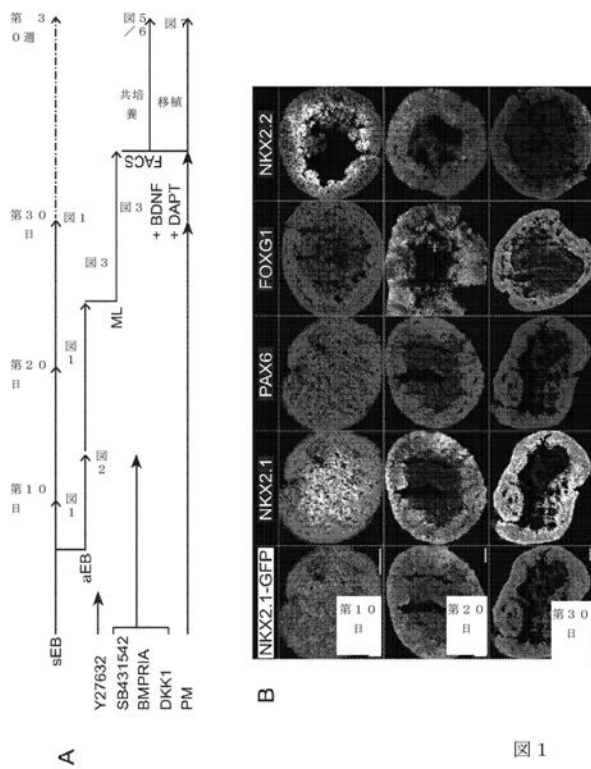


図 1

【図 2 - 1】

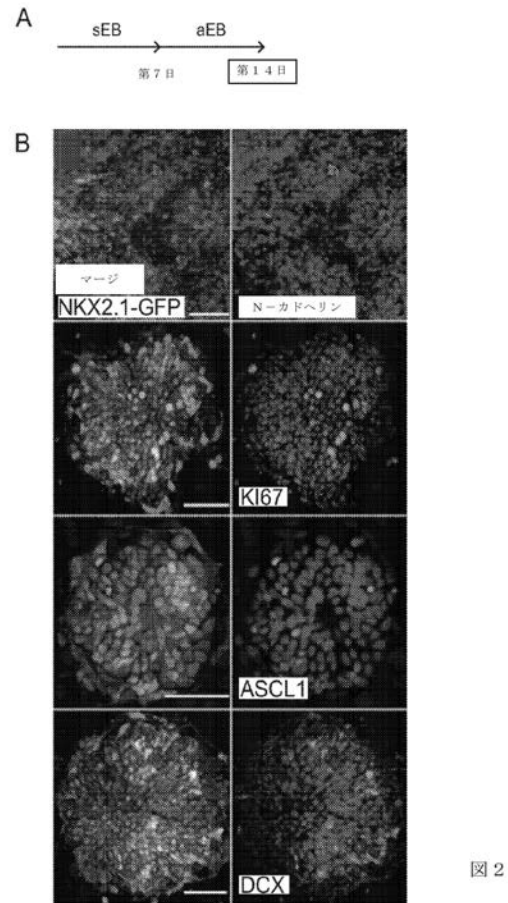


図 2

【図 2 - 2】

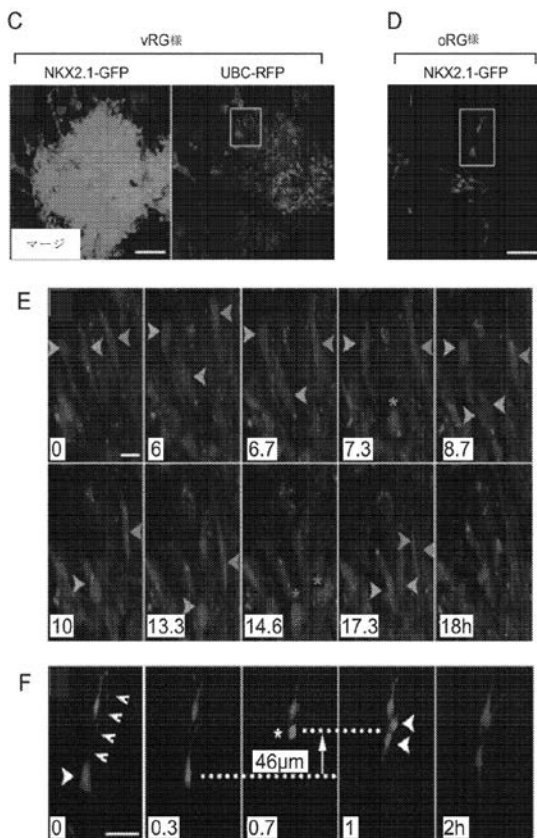


図 2 (続き)

【図 3 - 1】

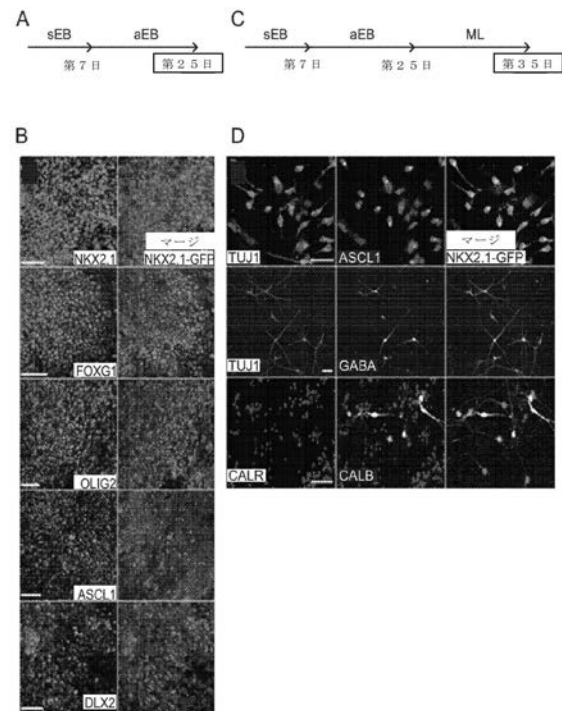


図 3

【図 3 - 2】

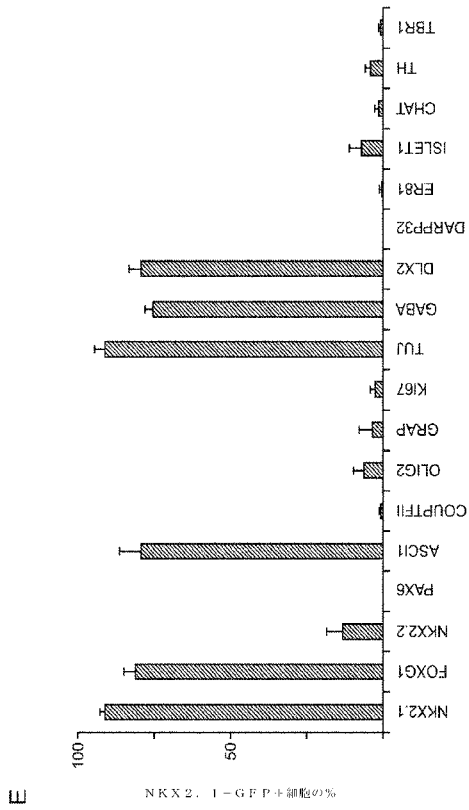


図 3 (続き)

【図 4 - 1】

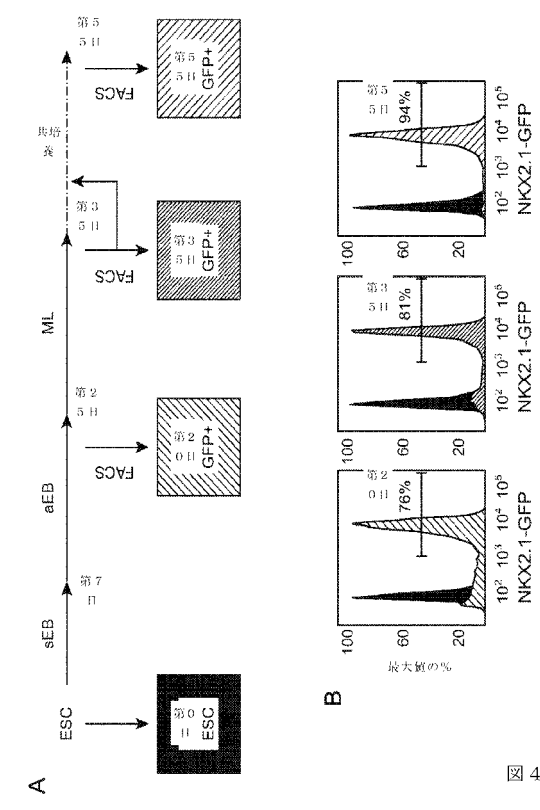


図 4

【図 4 - 2】

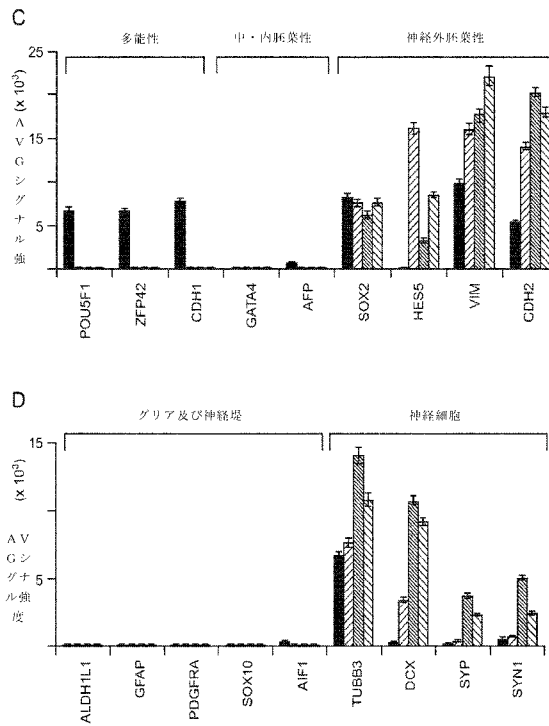


図 4 (続き)

【図 4 - 3】

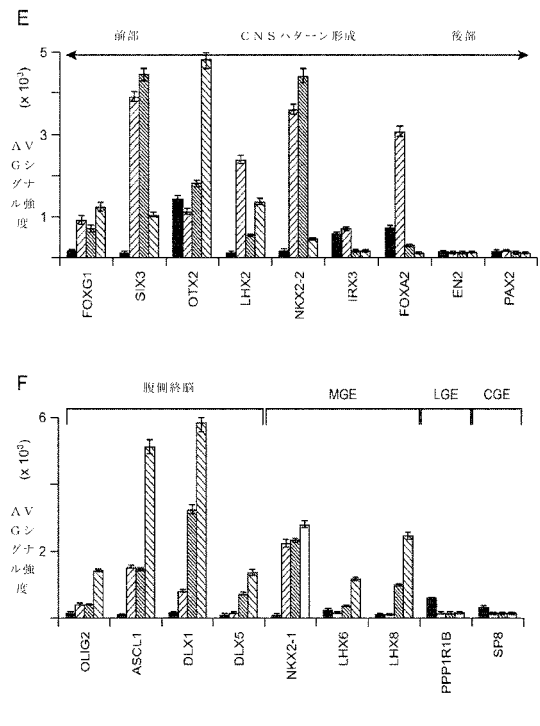


図 4 (続き)

【図 4 - 4】

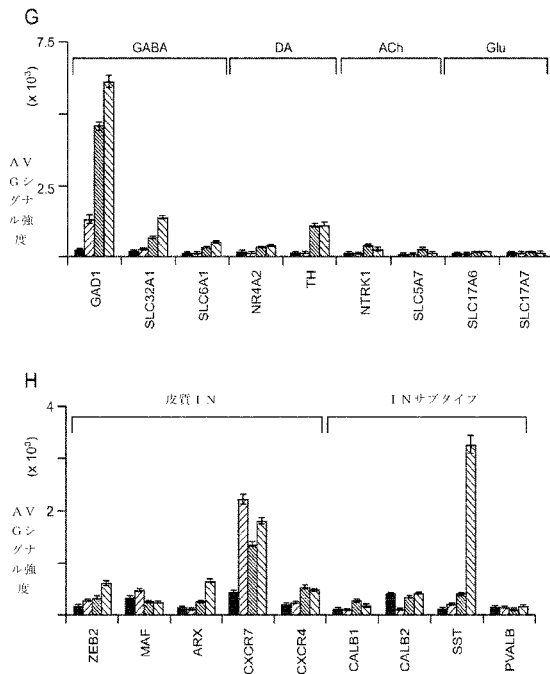


図 4 (続き)

【図 5 - 1】

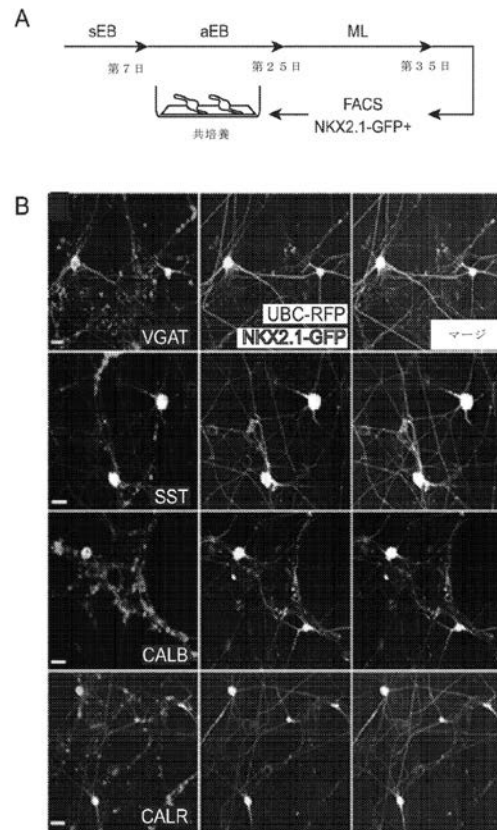


図 5

【図 5 - 2】

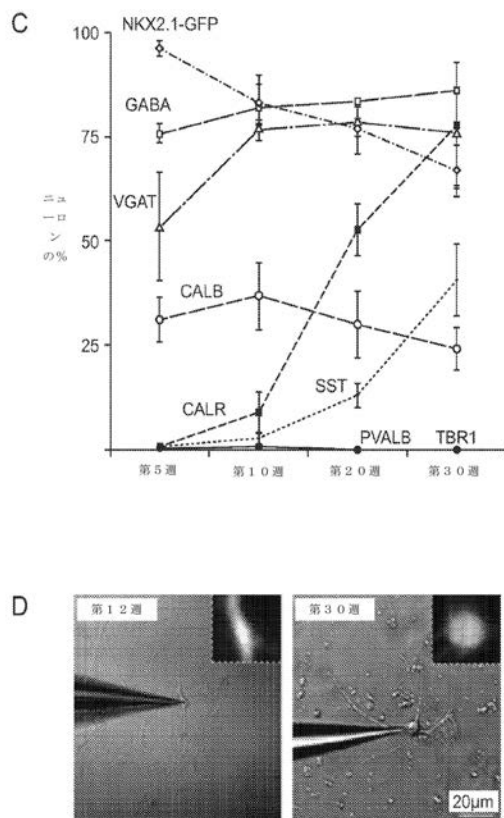


図 5 (続き)

【図 5 - 3】

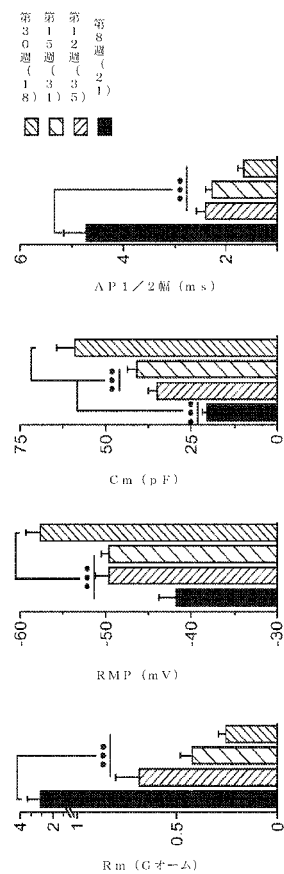


図 5 (続き)

【図 5 - 4】

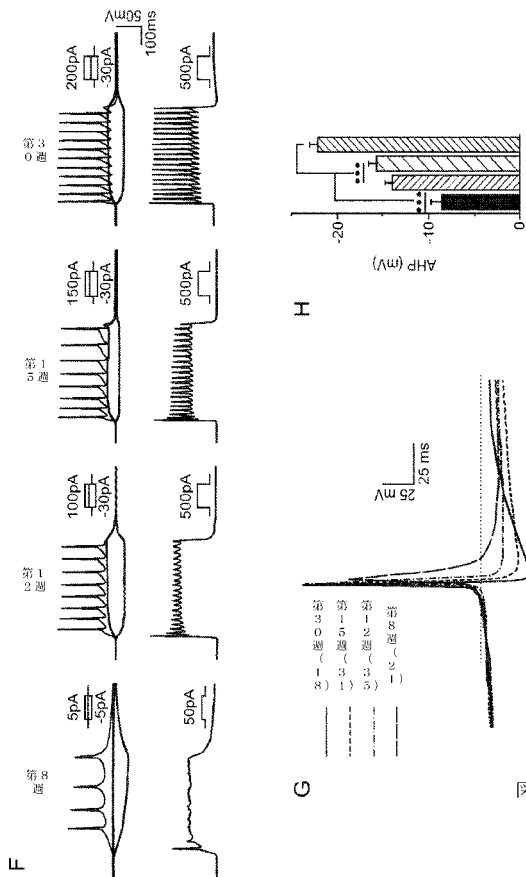


図 5 (続き)

【図 5 - 5】

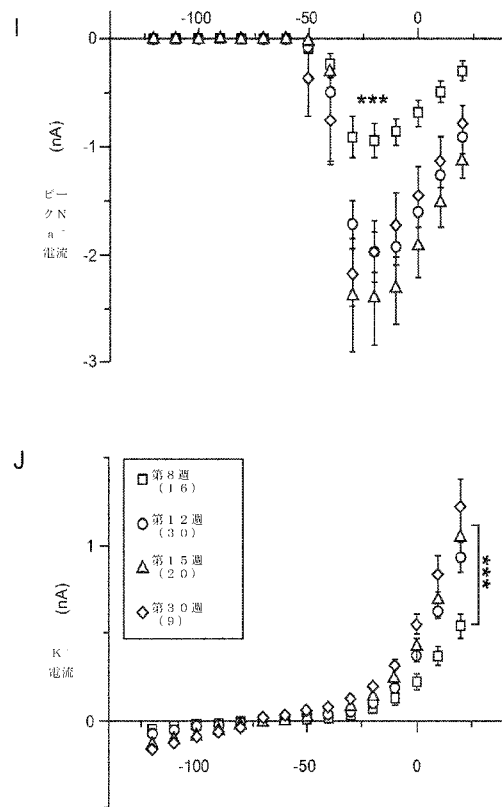


図 5 (続き)

【図 6 - 1】

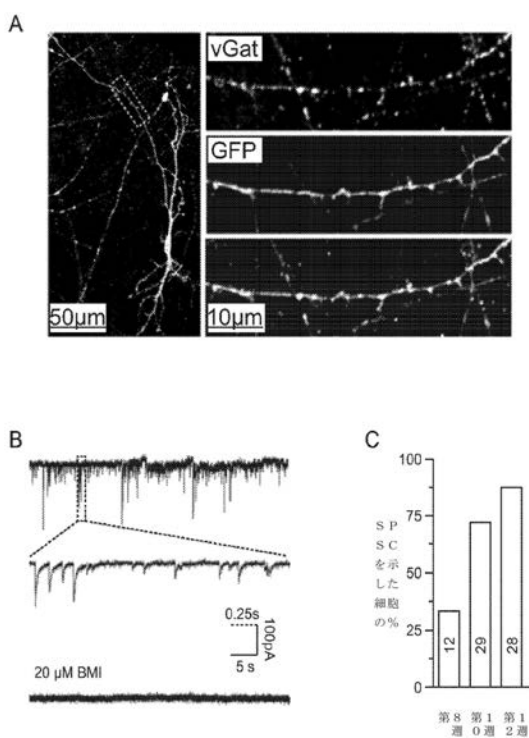


図 6

【図 6 - 2】

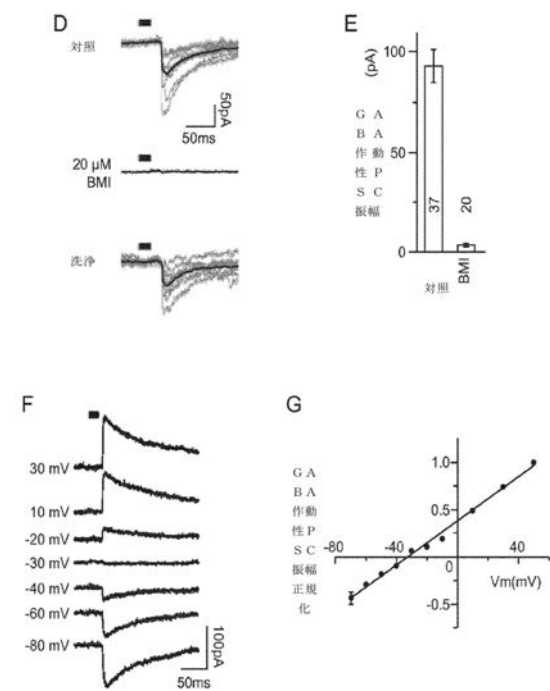


図 6 (続き)

## 【図 6 - 3】

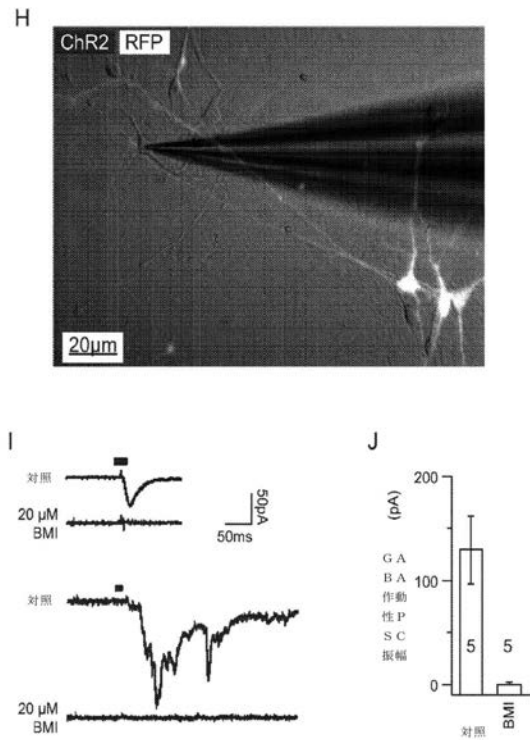


図 6 (続き)

## 【図 7 - 1】

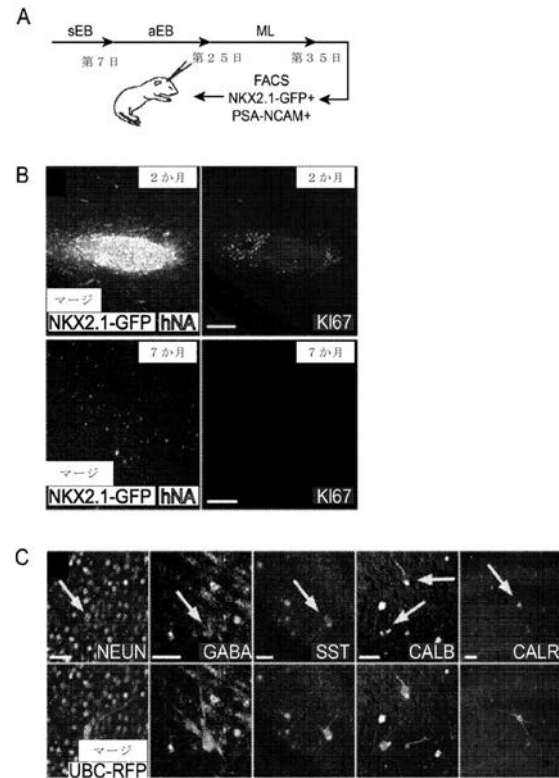


図 7

## 【図 7 - 2】

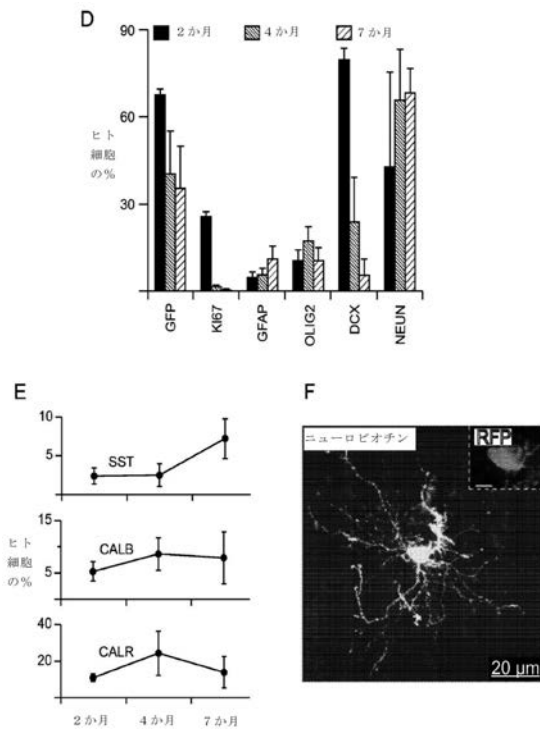


図 7 (続き)

## 【図 7 - 3】

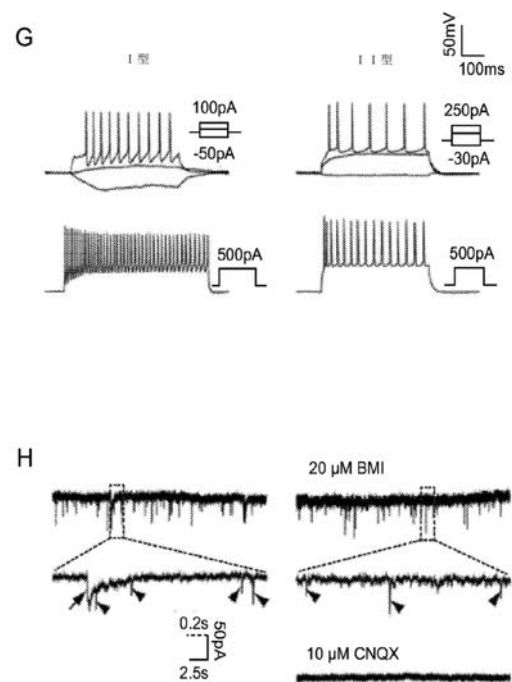


図 7 (続き)

【図 8 - 1】

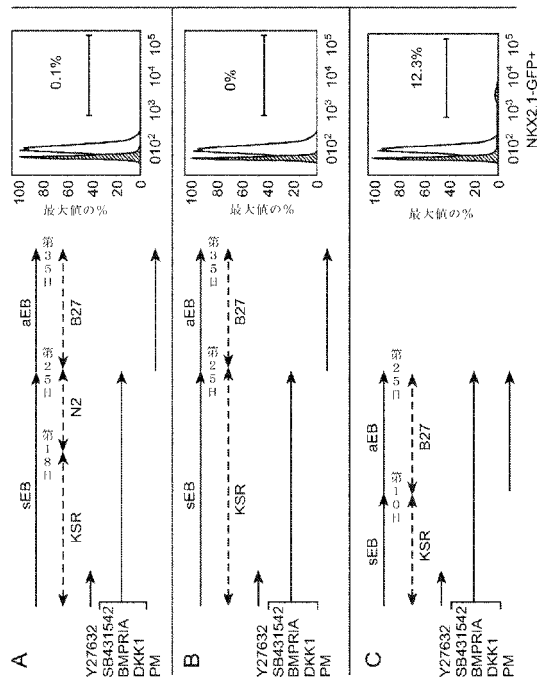


図 8

【図 8 - 2】

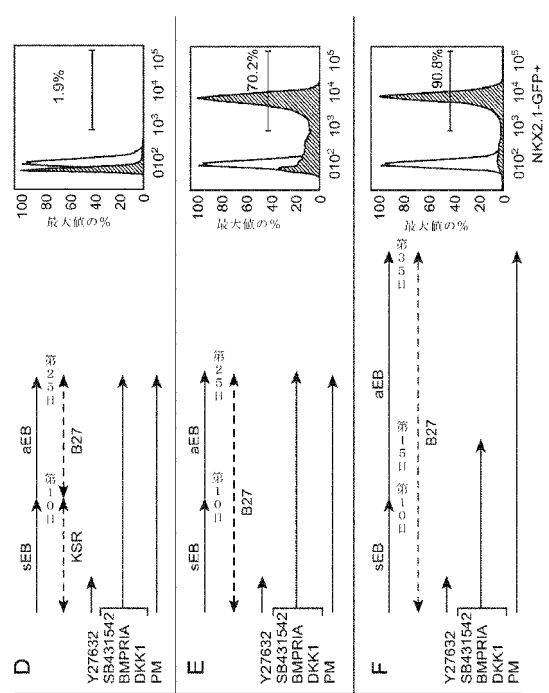


図 8 (続き)

【図 9】

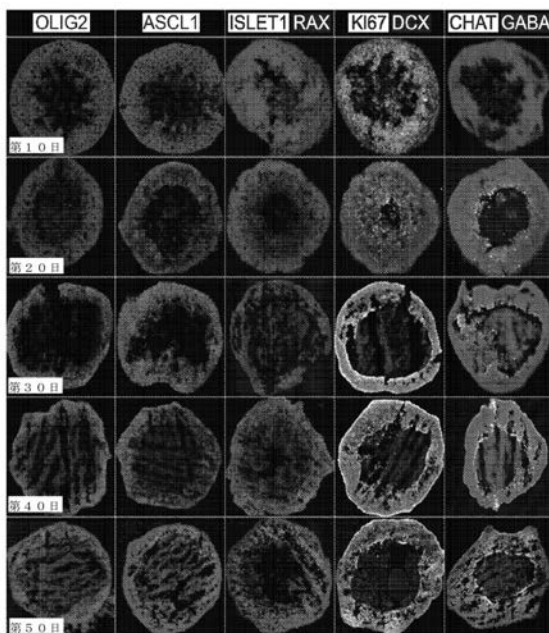


図 9

【図 10 - 1】

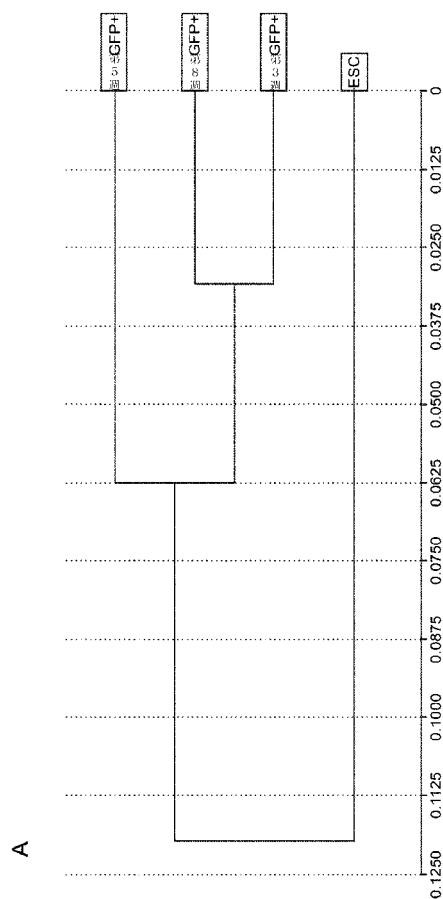


図 10

【図 10 - 2】

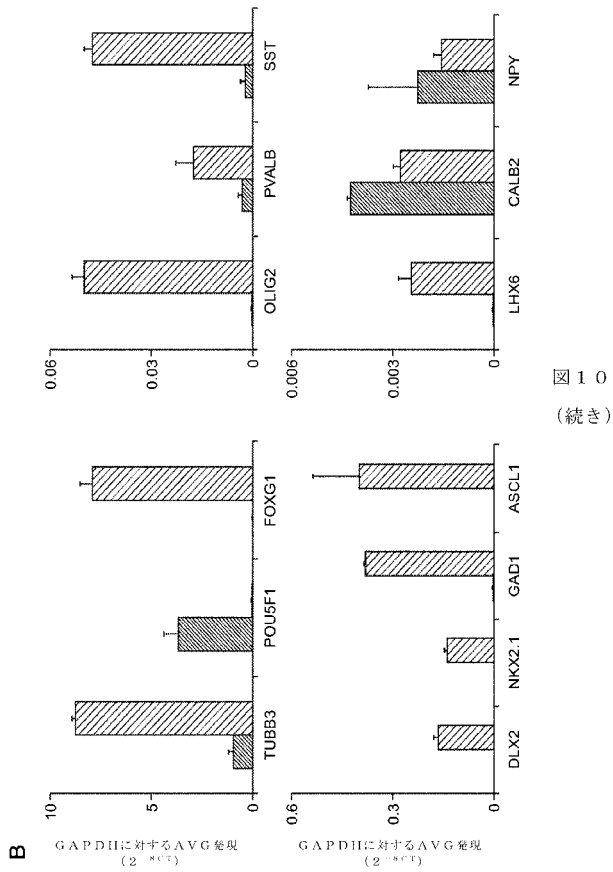


図 10 (続き)

【図 10 - 3】

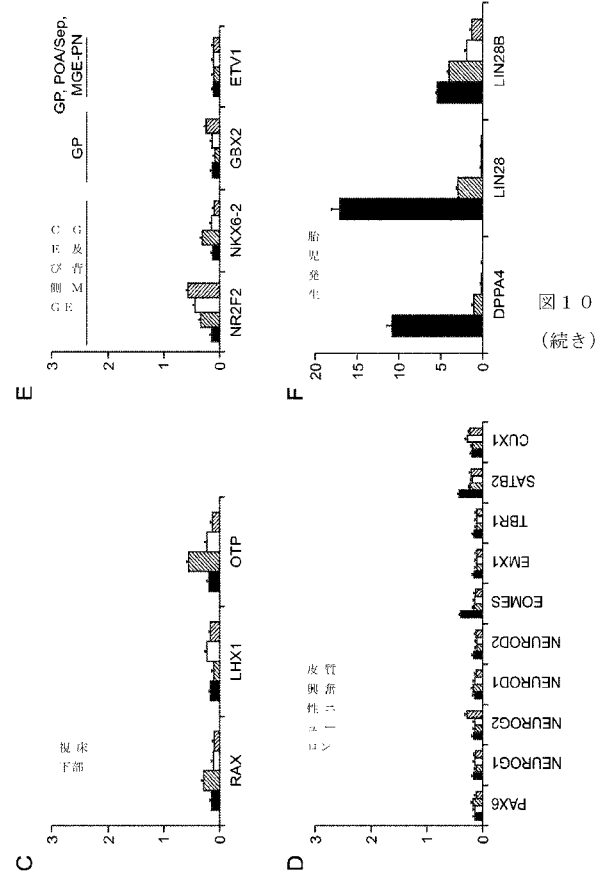


図 10 (続き)

【図 11】

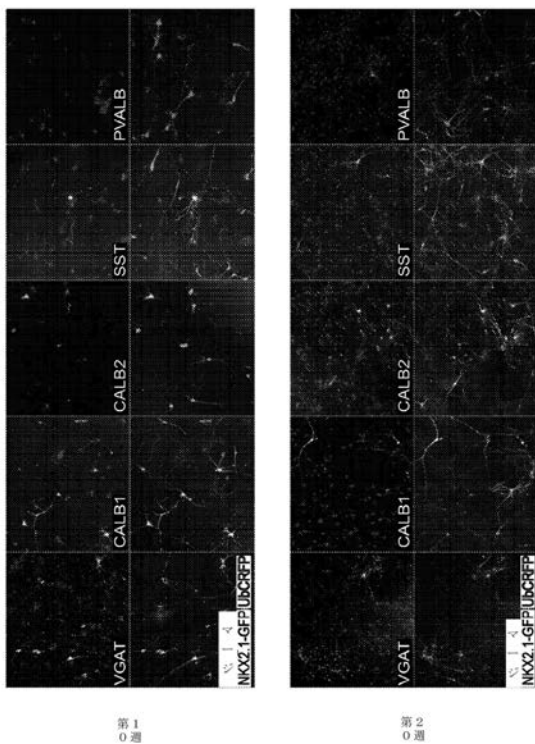


図 11

【図 12】

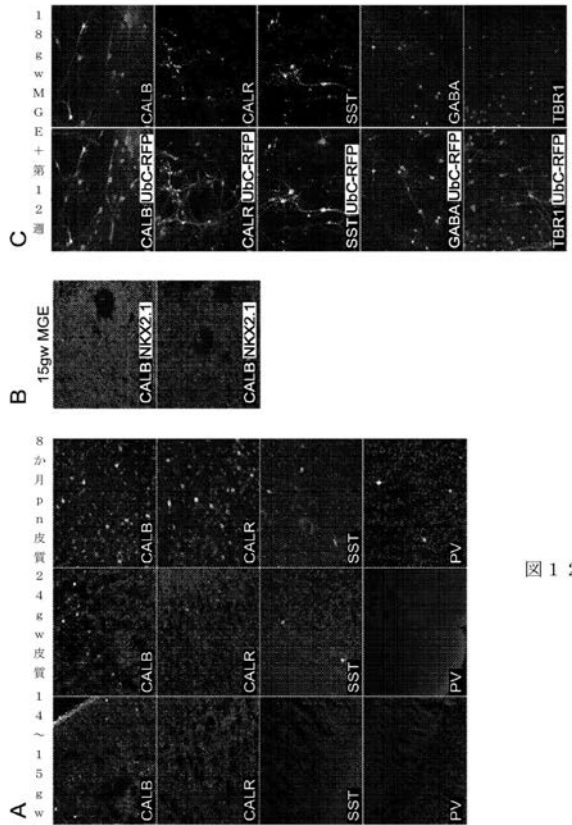


図 12

【図 13】

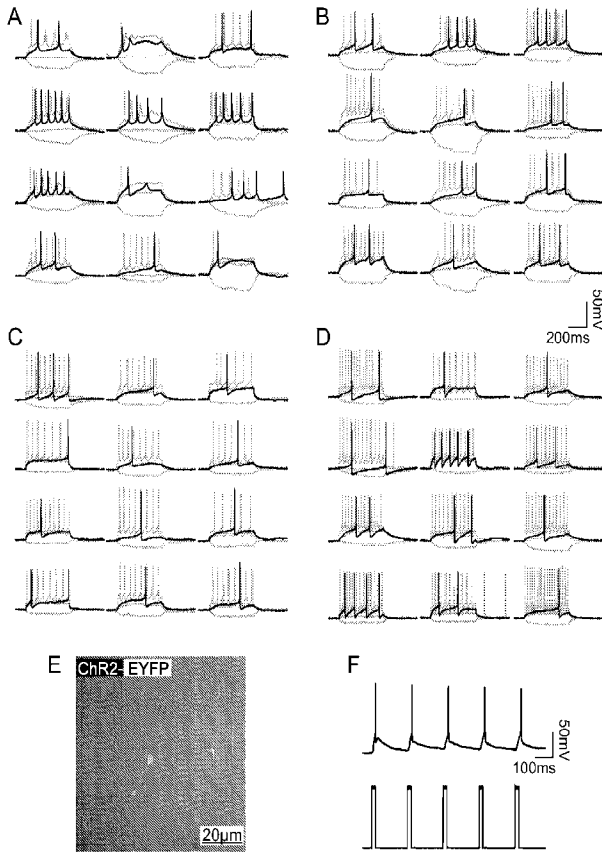


FIG. 13

【図 14 - 2】

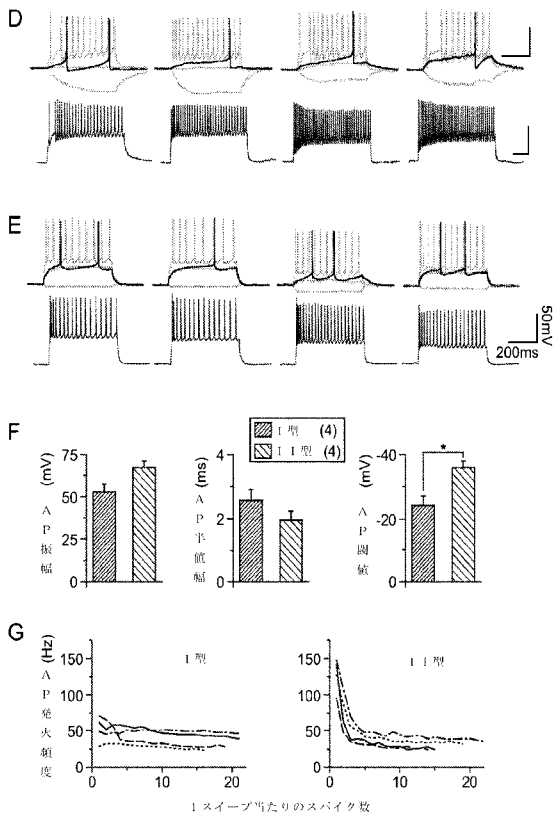
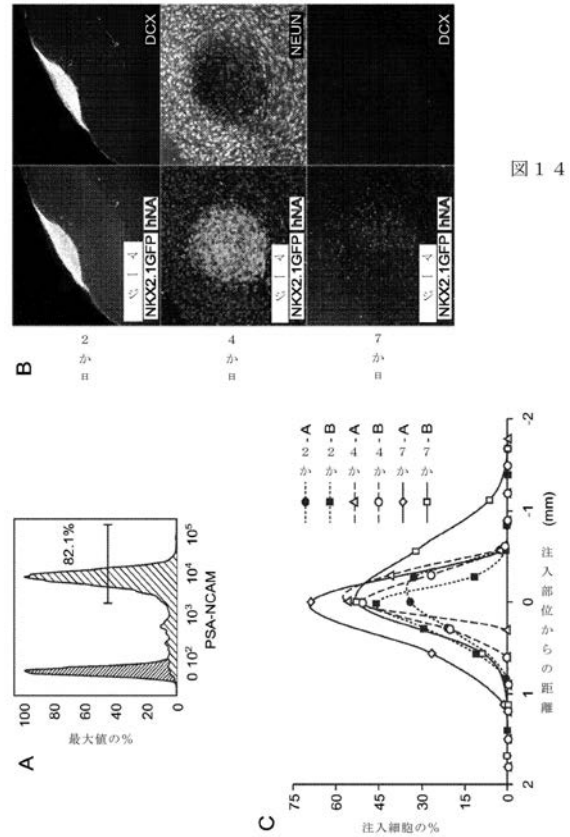


図 14 (続き)

【図 14 - 1】



【図 15】

図 15

|        | 第10日 | 第20日 | 第30日 | 第40日 | 第50日 |
|--------|------|------|------|------|------|
| NKX2.1 | →    | →    | →    | →    | →    |
| NKX2.2 | →    | →    | →    | →    | →    |
| FOXP1  | →    | →    | →    | →    | →    |
| ASCL1  | →    | →    | →    | →    | →    |
| OLIG2  | →    | →    | →    | →    | →    |
| DCX    | →    | →    | →    | →    | →    |
| GABA   | →    | →    | →    | →    | →    |
| ISLET1 | →    | →    | →    | →    | →    |

【図 16】

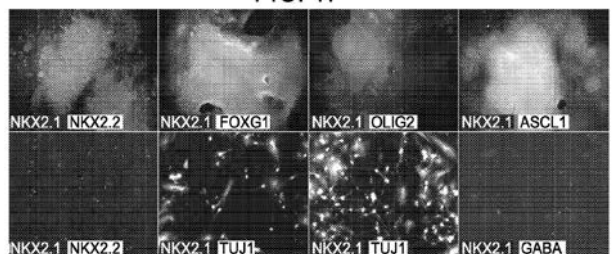
図 16

| プロトコル     | 注入したマウス | 睡眠のみなられたマウス | %発生率 |
|-----------|---------|-------------|------|
| 未処置       | 12      | 12          | 100  |
| 低密度       | 12      | 6           | 50   |
| DAPT      | 9       | 3           | 33   |
| PSANCAM - | 4       | 3           | 75   |
| PSANCAM + | 6       | 0           | 0    |

a) いずれの処置もNKX2.1-GFP+細胞のFACS分取を含む  
b) マウスは生存した細胞を含んでいた  
c) IINA+K167+注入核が注入後4か月以上存続した

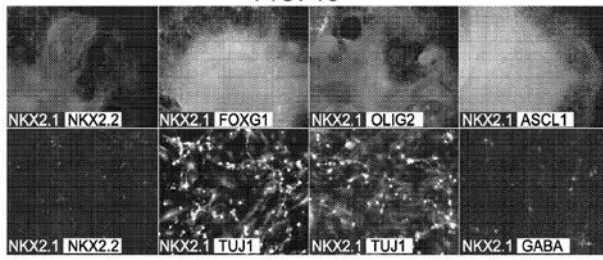
【図 17】

FIG. 17



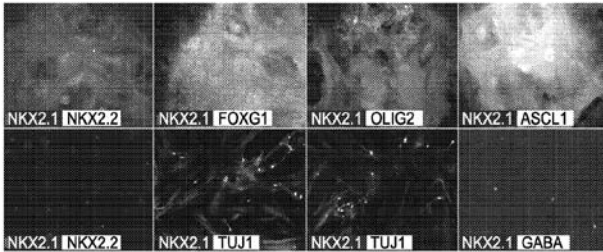
【 図 1 8 】

FIG. 18



【 図 1 9 】

FIG. 19



【 図 2 1 】

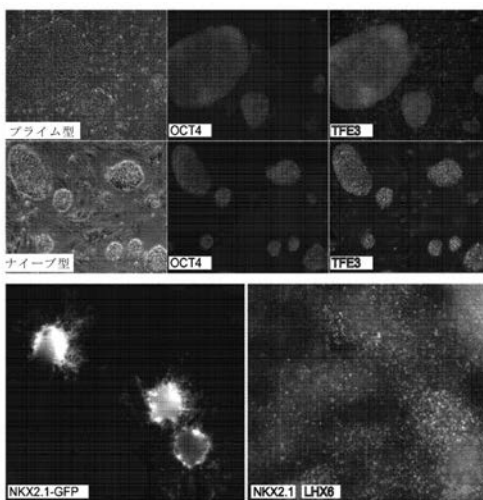
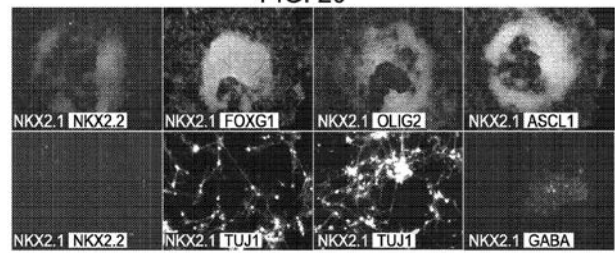


図 2 1

【 図 2 0 】

FIG. 20



【 図 2 2 - 1 】

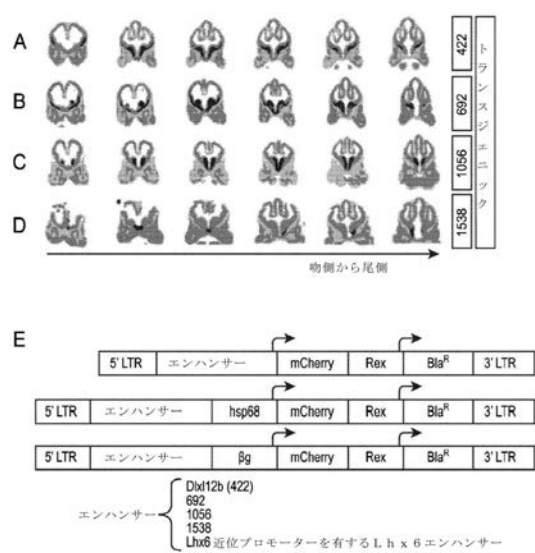


図 2 2



【 図 2 2 - 2 】

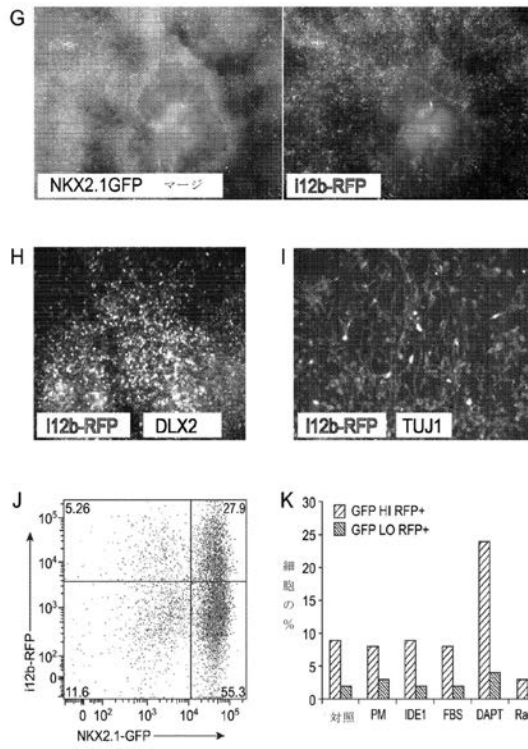


図 2 2 ( 続き )

【 図 2 2 - 3 】

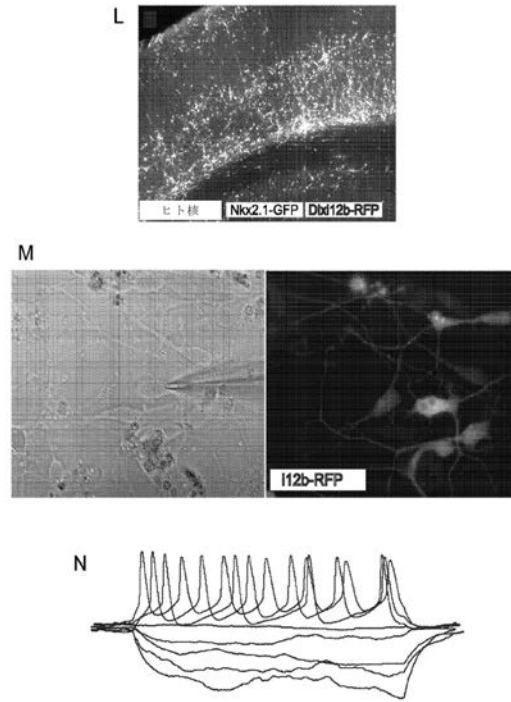


図 2 2 ( 続き )

【 図 2 3 】

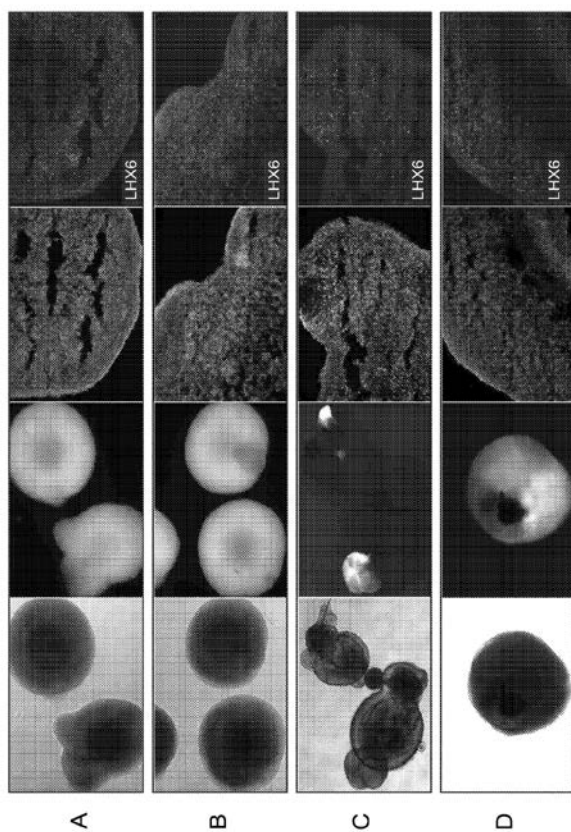


FIG. 23

【 図 2 4 】

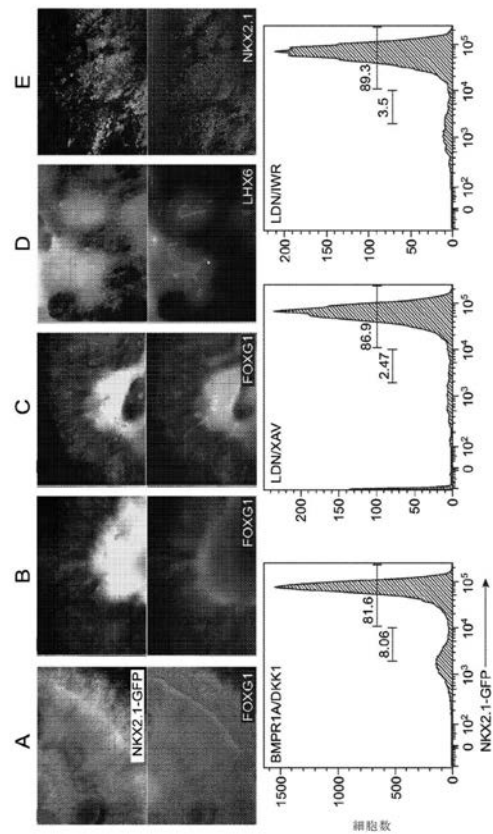


図 2 4

## 【手続補正書】

【提出日】令和1年11月7日(2019.11.7)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0220

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0220】

ある特定の実施形態では、MGE前駆細胞を神経障害、例えば発作性障害、例えば、癲癇、ハンチントン病、パーキンソン病、ALS、統合失調症、アルツハイマー病、自閉症、ジスキネジア、慢性疼痛、痙攣、神経因性疼痛、多発性硬化症、外傷性脳損傷、髄鞘形成不全疾患、双極性障害、うつ病及び癌などを有するか、その発症リスクのある対象に投与し得る。

本開示は以下の実施形態を含む。

## [1]

霊長類多能性幹(pPS)細胞からの内側神経節隆起(MGE)前駆細胞の作製方法であって、

ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と神経誘導サプリメントとを含む無血清培地で前記pPS細胞を培養して前記MGE前駆細胞を生成することを含む、方法。

## [2]

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記pPS細胞を培養して胚様体(EB)を生成することを含み、前記EBが前記MGE前駆細胞を含む、[1]に記載の方法。

## [3]

前記神経誘導サプリメントがB27を含む、[1]～[2]のいずれかに記載の方法。

## [4]

前記神経誘導サプリメントがNS21を含む、[1]～[2]のいずれかに記載の方法。

。

## [5]

前記pPS細胞がヒト多能性幹(hPS)細胞である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

## [6]

前記hPS細胞がヒト胚性幹(hES)細胞である、[5]に記載の方法。

## [7]

前記hPS細胞が人工多能性幹(iPS)細胞である、[5]に記載の方法。

## [8]

前記pPS細胞を接着培養で培養する、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

## [9]

前記pPS細胞を浮遊培養で培養する、[1]～[7]のいずれか1項に記載の方法。

## [10]

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記pPS細胞を培養する前に、前記pPS細胞の分化を誘導する、[1]～[9]のいずれか1項に記載の方法。

## [11]

前記ソニックヘッジホッグ経路活性化因子と前記神経誘導サプリメントとを含む前記無血清培地で前記pPS細胞を培養する前に、フィーダー層の非存在下で培養することによって前記pPS細胞の分化を誘導する、[10]に記載の方法。

## [12]

前記EBを単離することと、

前記単離した E B を接着基質に播種して接着 E B を得ることと、  
前記接着 E B を培養することと  
を含む、

[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 3 ]

前記 E B を単離することと、  
前記 E B を機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすることと、  
前記分離した細胞を接着基質に播種して接着単層を得ることと、  
前記接着単層を培養することと  
を含む、

[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 4 ]

前記 E B を単離することと、  
前記 E B を機械的または酵素的に分離して単一細胞または細胞塊にすることと、  
前記分離した細胞をフィーダー細胞層上に播種して接着共培養物を得ることと、  
前記接着共培養物を培養することと  
を含む、

[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の方法。

[ 1 5 ]

前記 E B、接着 E B、単層または共培養物を単離することと、  
前記 E B、接着 E B、単層または共培養物を機械的または酵素的に分離して単一細胞に  
することと、  
単一細胞を、M G E 前駆細胞の細胞表面マーカーに対する抗体とインキュベートするこ  
とと、

前記前駆細胞を単離することと  
を含む、

[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 6 ]

前記 E B、接着 E B、単層、共培養物、分離した培養物または分取した細胞を単離する  
ことと、  
凍結保護物質を添加することと  
を含む、[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 7 ]

前記 E B、接着 E B、単層、共培養物、分離した培養物または分取した細胞を単離する  
ことと、  
霊長類神経系に細胞懸濁物を移植することと  
を含む、[ 2 ] ~ [ 1 1 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G A B A 作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物を提供する方法であって、

a) 霊長類多能性幹 ( p P S ) 細胞の培養物を提供すること、および

b) 前記培養物に、

i) ソニックヘッジホッグ ( s h h ) 経路活性化因子と

i i) S M A D 阻害剤と

i i i ) w n t 経路阻害剤と  
i v ) N o t c h 経路阻害剤と  
を含む複数の因子を導入すること  
を含み、

ステップ a ) および b ) が、G A B A 作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物  
をもたらす、  
方法。

【請求項 2】

前記 G A B A 作動性ニューロン前駆体は N K X 2 . 1 - G F P および i 1 2 b - R F P  
を同時発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 G A B A 作動性ニューロン前駆体は N K X 2 . 1 の発現が下方制御されている、請  
求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 p P S 細胞は無血清培地中に提供される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方  
法。

【請求項 5】

前記 p P S 細胞はヒト人工多能性幹細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の  
方法。

【請求項 6】

前記 p P S 細胞はヒト胚性幹細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 p P S 細胞はフィーダー層の非存在下で培養される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項  
に記載の方法。

【請求項 8】

前記 p P S 細胞は浮遊培養される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

2 つ以上の S M A D 阻害剤が前記培養物に導入される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に  
記載の方法。

【請求項 10】

アポトーシス阻害剤が前記培養物に導入される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の  
方法。

【請求項 11】

前記アポトーシス阻害剤は R h o 結合キナーゼ ( R O C K ) 阻害剤である、請求項 10  
に記載の方法。

【請求項 12】

神経サプリメントが前記培養物に添加される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の  
方法。

【請求項 13】

有糸分裂阻害化合物が前記培養物に添加される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載  
の方法。

【請求項 14】

神経栄養因子が前記培養物に添加される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法  
。

【請求項 15】

G A B A 作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物に凍結保護物質を添加するこ  
とをさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 p P S 細胞は遺伝子改変されている、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法  
。

**【請求項 17】**

前記 p P S 細胞は蛍光タンパク質を発現する、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記 G A B A 作動性ニューロン前駆体を単離することをさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記単離することは、機械的手段を使用することを含む、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記単離することは、前記 G A B A 作動性ニューロン前駆体に結合する親和性試薬を使用することを含む、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記単離することは、酵素的手段を使用することを含む、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 22】**

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法を使用して産生される、G A B A 作動性ニューロン前駆体が富化された細胞培養物。

**【請求項 23】**

前記 G A B A 作動性ニューロン前駆体は遺伝子改変されている、請求項 22 に記載の細胞培養物。

**【請求項 24】**

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法を使用して産生される G A B A 作動性ニューロン前駆体を含む、組成物。

**【請求項 25】**

前記組成物の細胞は前記培養物から単離されている、請求項 24 に記載の組成物。

**【請求項 26】**

凍結保護物質をさらに含む、請求項 24 に記載の組成物。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00

(72)発明者 ニコラス、 コリー アール .  
アメリカ合衆国 9 4 1 2 1 カリフォルニア州 サンフランシスコ フォーティーサード アベ  
ニュー 4 0 1 アpartment 2 0 6

(72)発明者 ルーベンスティン、 ジョン エル .  
アメリカ合衆国 9 4 1 1 7 カリフォルニア州 サンフランシスコ ウッドランド アベニュー  
7 1

(72)発明者 クリーグステイン、 アーノルド アール .  
アメリカ合衆国 9 4 9 4 1 カリフォルニア州 ミルバレー マルグリート アベニュー 1 7  
3

(72)発明者 アルバレス - バイラ、 アートゥロ  
アメリカ合衆国 9 4 0 6 2 カリフォルニア州 ウッドサイド フォレスト ビュー ドライブ  
1 4 0

F ターム(参考) 4B065 AB01 AC12 AC20 BA02 BA25 BB13 BB19 CA44  
4C087 AA01 AA02 AA04 BB33 BB64 CA04 MA67 NA14 ZA02

【外国語明細書】  
2020031644000001.pdf