

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年3月16日(16.03.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/043605 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *A61L 27/00* (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 35/545 (2015.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/076524
- (22) 国際出願日: 2016年9月8日(08.09.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-176896 2015年9月8日(08.09.2015) JP
- (71) 出願人: 大日本住友製薬株式会社 (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 Osaka (JP). 株式会社ヘリオス (HEALIOS K.K.) [JP/JP]; 〒1056115 東京都港区浜松町2丁目4番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 安藤 覚 (ANDO, Satoshi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町1-5-2 神戸キメックセンタービル5F 大日本住友製薬株式会社内 Hyogo (JP). 黒田 貴雄 (KURODA, Takao); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町1-5-2 神戸キメックセンタービル5F 大日本住友製薬株式会社内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2017/043605 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

(54) 発明の名称: 網膜色素上皮細胞の製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for more efficiently producing retinal pigment epithelial cells from pluripotent stem cells. This method for producing retinal pigment epithelial cells comprises the following steps: (1) a first step of culturing pluripotent stem cells for a period not exceeding 30 days, in a medium including an FGF receptor inhibitor and/or a MEK inhibitor; and (2) a second step of forming retinal pigment epithelial cells by culturing the cells obtained in the first step, in the presence of a Nodal signal transduction pathway inhibitor and/or a Wnt signal transduction pathway inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞をより効率的に製造するための方法を提供する。本発明による網膜色素上皮細胞の製造方法は以下の工程を含む: (1) 多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で、30日を超えない期間培養する第一工程、及び (2) 第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

明 細 書

発明の名称：網膜色素上皮細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、網膜色素上皮(RPE)細胞の製造方法等に関するものである。

背景技術

[0002] 網膜色素上皮細胞は網膜の最外層に存在する色素上皮細胞であり、視細胞外節の貪食、視物質のリサイクルなど視細胞の維持等に重要な役割を担っている。網膜色素上皮細胞が加齢等により異常をきたすことで生じる加齢黄斑変性症は、中心視力の低下や失明を引き起こす眼疾患であり、有効な治療法の開発が望まれている。近年、加齢黄斑変性症の新たな治療法として網膜色素上皮細胞を補充・置換する細胞移植治療が脚光を浴びており、細胞治療用移植材料として網膜色素上皮細胞の活用が期待されている。これまでにヒト多能性幹細胞を用いて網膜色素上皮細胞を分化誘導する方法に関して、いくつかの報告（非特許文献1、2、特許文献1、2、3、4）があるが、再生医療産業においては高品質な網膜色素上皮細胞を安定かつ大量に製造する技術が必要であり、より高効率で簡便な製造方法が切望されていた。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：国際公開第2012/173207号
特許文献2：国際公開第2015/053375号
特許文献3：国際公開第2015/053376号
特許文献4：米国公開公報第2013/0224156号

非特許文献

- [0004] 非特許文献1：Stem Cell Reports, 2(2), 205-218 (2014)
非特許文献2：Cell Stem Cell, 10(6), 771-785 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 多能性幹細胞由来の網膜色素上皮細胞を再生医療等に使用する際に、当該細胞を大量かつ安定的に製造するためには、より高効率な製造方法の開発が急務である。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意検討した結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下に関する。

[0007] [1] 以下の工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法：

(1) 多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で、30日を超えない期間培養する第一工程、及び

(2) 第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[2] 第一工程が、無血清条件下で行われる、上記[1]に記載の製造方法。

[3] 第一工程が、フィーダー細胞非存在下で行われる、上記[1]又は[2]に記載の製造方法。

[4] 第一工程における培地が、さらに未分化維持因子を含む、上記[1]～[3]のいずれかに記載の製造方法。

[5] 未分化維持因子が、FGFシグナル伝達経路作用物質である、上記[4]に記載の製造方法。

[6] FGFシグナル伝達経路作用物質が、bFGFである、上記[5]に記載の製造方法。

[7] FGF受容体阻害物質が、PD173074及びSU5402からなる群から選択される少なくとも1種である、上記[1]～[6]のいずれかに記載の製造方法。

[8] MEK阻害物質が、PD0325901、PD184352、U0126、TAK-733、及びAZD-8330からなる群から選択される少なくとも1種である、上記[1]～[7]のいずれかに記載の製造方法。

[9] Nodalシグナル伝達経路阻害物質が、ALK4, 5, 又は7阻害物質である、上記 [1] ~ [8] のいずれかに記載の製造方法。

[1 0] ALK4, 5, 又は7阻害物質が、SB431542である、上記 [9] に記載の製造方法。

[1 1] Wntシグナル伝達経路阻害物質が、CKI-7である上記 [1] ~ [1 0] のいずれかに記載の製造方法。

[1 2] 多能性幹細胞が、霊長類多能性幹細胞である上記 [1] ~ [1 1] のいずれかに記載の製造方法。

[1 3] 多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である上記 [1] ~ [1 2] のいずれかに記載の製造方法。

[1 4] 第一工程における培地が、さらにBMP受容体阻害物質を含む、上記 [1] ~ [1 3] のいずれかに記載の製造方法。

[1 5] BMP受容体阻害物質が、ALK2/3阻害物質である上記 [1 4] に記載の製造方法。

[1 6] ALK2/3阻害物質が、LDN193189である上記 [1 5] に記載の製造方法。

[1 7] 第一工程における培地が、さらにソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む上記 [1] ~ [1 6] のいずれかに記載の製造方法。

[1 8] ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が、SAGである上記 [1 7] に記載の製造方法。

[1 9] 第一工程における培地が、さらにPKC阻害物質を含む上記 [1] ~ [1 8] のいずれかに記載の製造方法。

[2 0] PKC阻害物質が、Go6983である上記 [1 9] に記載の製造方法。

[2 1'] 第一工程において、培養期間が、眼形成転写因子の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分でありかつ30日を超えない期間である、上記 [1] ~ [2 0] のいずれかに記載の製造方法。

[2 2'] 第一工程において、培養期間が、PAX6、LHX2及びSIX3の少なくとも

も1つの遺伝子発現を誘導するのに十分でありかつ30日を超えない期間である、上記 [1] ~ [20] のいずれかに記載の製造方法。

[21] 第一工程において、培養期間が2日間~13日間である、上記 [1] ~ [20]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の製造方法。

[22] 第一工程において、培養期間が4日間~6日間である、上記 [1] ~ [21]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の製造方法。

[23] 上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を含有してなる、被験物質の毒性・薬効評価用試薬。

[24] 上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞に被験物質を接触させ、該物質が該細胞に及ぼす影響を検定することを含む、該物質の毒性・薬効評価方法。

[25] 上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を含有してなる、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の治療薬。

[26] 上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞の有効量を、移植を必要とする対象に移植することを含む、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の治療方法。

[27] 網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の治療における使用のための、上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞。

[28] 上記 [1] ~ [22]、[21'] 及び [22'] のいずれかに記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を有効成分として含有する、医薬組成物。

発明の効果

[0008] 本発明により、既存の分化誘導方法よりも高効率に網膜色素上皮細胞を製

造する方法を提供する事が可能になった。従って、本発明の方法は、細胞治療用移植用材料、又は化学物質等の毒性・薬効評価に使用する試薬・材料となる網膜色素上皮細胞を効率よく製造するという観点から有用である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]MEK阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03培地、又は、Essential 8培地を使用して製造されたiPS細胞（201B7、又は、1231A3）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養38～42日目の6穴培養プレートの写真。MEKi：MEK阻害物質（「StemFit（登録商標）」AK03培地使用時：1 μ M、Essential 8培地使用時：0.03 μ M PD0325901）。

[図2]MEK阻害物質処理工程を含む製造法で製造されたiPS細胞（201B7）由来RPE細胞を含む培養55日目の6穴培養プレートの写真（a）、低倍率位相差顕微鏡像（b）、高倍率明視野顕微鏡像（c）。MEKi：MEK阻害物質（1 μ M PD0325901）。

[図3]MEK阻害物質処理工程を含まない製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03培地、又は、Essential 8培地を使用して製造されたiPS細胞（201B7、又は、1231A3）由来分化細胞を含む培養38～42日目の6穴培養プレートの写真。

[図4]FGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03培地、Essential 8培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGFを使用して製造されたiPS細胞（201B7、又は、1231A3）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養38～42日目の6穴培養プレートの写真。FGFRi：FGF受容体阻害物質（100 nM PD173074）。

[図5]FGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で製造されたiPS細胞（201B7）由来RPE細胞を含む培養55日目の6穴培養プレートの写真（a）、低倍率位相差顕微鏡像（b）、高倍率明視野顕微鏡像（c）。FGFRi：FGF受容体阻害物質（100 nM PD173074）。

[図6]FGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03培地、Essential 8培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGFを使用して製造されたiPS細胞（201B7、又は、1231A3）由来分化細胞を含む

培養38～42日目の6穴培養プレートの写真。

[図7]MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質と、各種阻害物質、シグナル伝達経路阻害物質又はシグナル伝達経路作用物質との組み合わせ処理工程を含む製造法で製造されたiPS細胞(201B7、又は、1231A3)由来RPE細胞を含む培養38～47日目の6穴培養プレートの写真。比較対象として、MEK阻害物質処理工程を含まない製造法、及び、MEK阻害物質処理工程を含む製造法で製造されたiPS細胞由来RPE細胞を含む6穴培養プレートの写真(図中上段の無処理、及び、MEKi)、並びに、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法、及び、FGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で製造されたiPS細胞由来RPE細胞を含む6穴培養プレートの写真も示す(図中下段の無処理、及び、FGFRi)。MEKi: MEK阻害物質(1 μ M PD0325901)、FGFRi: FGF受容体阻害物質(100 nM PD173074)、BMPri: BMP受容体阻害物質(100 nM LDN193189)、Shh ag: Shhシグナル伝達経路作用物質(30 nM SAG)、PKCi: PKC阻害物質(2 μ M Go6983)。

[図8]ウェル全体に占めるRPE細胞の割合に応じて、0から5の6段階に分けた時の、各段階の代表的な6穴培養プレートの写真(A)、MEK阻害物質処理工程を含まない製造法(無処理)、MEK阻害物質処理工程を含む製造法(MEKi)、および、MEK阻害物質と、各種阻害物質又はシグナル伝達経路阻害物質との組み合わせ処理工程を含む製造法(MEKi+PKCi、MEKi+PKCi+BMPri、MEKi+FGFRi、MEKi+FGFRi+BMPri、MEKi+FGFRi+PKCi、MEKi+FGFRi+PKCi+BMPri)で製造した結果のまとめ(B)、並びに、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法(無処理)、FGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法(FGFRi)、および、FGF受容体阻害物質と、各種阻害物質又はシグナル伝達経路阻害物質との組み合わせ処理工程を含む製造法(FGFRi+PKCi、FGFRi+PKCi+BMPri、FGFRi+MEKi、FGFRi+MEKi+BMPri、FGFRi+MEKi+PKCi、FGFRi+MEKi+PKCi+BMPri)で製造した結果のまとめ(C)。グラフ縦軸は、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合を6段階で表示。値は平均値±標準偏差、nは実験回数を示す。MEKi: MEK阻害物質(1 μ M PD0325901)、FGFRi: FGF受容体阻害物質(100 nM PD173074)、BMPri:

BMP受容体阻害物質（100 nM LDN193189）、PKCi: PKC阻害物質（2 μ M Go6983）。

[図9]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞（Ff-I01、又は、QHJI01）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養43日目の6穴培養プレートの写真（MEKi、又は、FGFRi）。比較対象として、MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養43日目の6穴培養プレートの写真も示す（無処理）。MEKi: MEK阻害物質（1 μ M PD0325901）、FGFRi: FGF受容体阻害物質（100 nM PD173074）。

[図10]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞（QHJI01）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養48日目の6穴培養プレートの写真（MEKi（PD0325901）、又は、FGFRi（PD173074））。阻害物質暴露日数1日間～6日間の効果を検討した。MEKi: MEK阻害物質（1 μ M PD0325901）、FGFRi: FGF受容体阻害物質（100 nM PD173074）。

[図11]MEK阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞（1231A3）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養37日目の6穴培養プレートの写真（MEKi（PD0325901））。比較対象として、MEK阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養37日目の6穴培養プレートの写真も示す（無処理）。阻害物質暴露日数1日間、3日間、6日間、13日間の効果を検討した。MEKi: MEK阻害物質（1 μ M PD0325901）。

[図12]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03N培地を使用して製造された培養43日目のiPS細胞（Ff-I01、又は、QHJI01）由来網膜色素上皮（RPE）細胞のウェル全体に占める割合を図8Aに従い目視判定した結果と、第一工程終了時におけるPAX6、LHX2、SIX3の発現値（Signal）、及び、フラグ（Detection）を示す（MEKi、又は、F

GFRi)。比較対象として、MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞のウェル全体に占めるRPE細胞の割合の目視判定結果と、第一工程終了時に相当する時点でのPAX6、LHX2、SIX3の発現値 (Signal)、及び、フラグ (Detection) を示す (無処理)。MEKi: MEK阻害物質 (1 μ M PD0325901)、FGFRi: FGF受容体阻害物質 (100 nM PD173074)。

[図13]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit (登録商標)」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞 (QHJI01) 由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞を含む培養36日目、49日目の6穴培養プレートの写真 (MEKi (PD0325901)、又は、FGFRi (PD173074))。比較対象として、MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養49日目の6穴培養プレートの写真も示す (無処理)。MEK阻害物質濃度0.25 μ M~4 μ M、FGF受容体阻害物質濃度25 nM~400 nMの効果を検討した。MEKi: MEK阻害物質 (PD0325901)、FGFRi: FGF受容体阻害物質 (PD173074)。

[図14]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit (登録商標)」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞 (QHJI01) 由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞を含む培養49日目の6穴培養プレートの写真 (MEKi (PD0325901)、又は、FGFRi (PD173074))。第二工程開始時の播種細胞数 $0.2 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^4$ 細胞/cm²の効果を検討した。MEKi: MEK阻害物質 (1 μ M PD0325901)、FGFRi: FGF受容体阻害物質 (100 nM PD173074)。

[図15]MEK阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit (登録商標)」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞 (QHJI01、又は、1231A3) 由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞を含む培養49日目、50日目の6穴培養プレートの写真 (MEKi (PD0325901)、MEKi (PD184352)、MEKi (U0126)、MEKi (TAK-733)、又は、MEKi (AZD-8330))。比較対象として、MEK阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養49日目の6穴培養プレートの写真も示す (無処理)。MEKi: MEK阻害物質 (1 μ M PD0325901、1.5 μ M、3

μM 、 $6 \mu\text{M}$ PD184352、 $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ U0126、 $0.3 \mu\text{M}$ TAK-733、 $0.3 \mu\text{M}$ AZD-8330)。

[図16]FGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit (登録商標)」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞(QHJI01、又は、1231A3)由来網膜色素上皮(RPE)細胞を含む培養49日目の6穴培養プレートの写真(FGFRi (PD173074)、又は、FGFRi (SU5402))。比較対象として、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養49日目の6穴培養プレートの写真も示す(無処理)。FGFRi: FGF受容体阻害物質(100 nM PD173074、 $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $20 \mu\text{M}$ SU5402)。

[図17]MEK阻害物質含有「StemFit (登録商標)」AK03N培地を使用した第一工程後の第二工程において、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質存在下での培養によって製造されたiPS細胞(QHJI01)由来網膜色素上皮(RPE)細胞を含む培養43日目の12穴培養プレートの写真(NODALi+WNTi、NODALi、又は、WNTi)。第二工程におけるNodalシグナル伝達経路阻害物質とWntシグナル伝達経路阻害物質の単独暴露による分化誘導効果を検討した。NODALi: Nodalシグナル伝達経路阻害物質($5 \mu\text{M}$ SB431542)、WNTi: Wntシグナル伝達経路阻害物質($3 \mu\text{M}$ CKI-7)。

[図18]MEK阻害物質及びBMP受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit (登録商標)」AK03培地を使用して製造された培養39日目のiPS細胞(201B7)由来網膜色素上皮(RPE)細胞のウェル全体に占める割合を図8Aに従い目視判定した結果(図中上側、MEKi 6日間+BMPRI 1日間、又は、MEKi 6日間+BMPRI 6日間)と、リアルタイムRT-PCR法による培養39日目における網膜色素上皮マーカーBEST1、MITF、眼形成初期マーカーRAXの発現量比較の結果(図中下側、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合(6段階表示)「3」、「5」)。比較対象として、MEK阻害物質及び/又はBMP受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造された培養39日目のiPS細胞由来分化細胞のウェル全体に占めるRPE細胞の割合の目視判定結果(図中上側、無処理)と、BEST1、MITF、RAXの発現量も示す(図中下側、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合(6段階表示))。

「1」)。各検体の遺伝子発現量はGAPDHの発現量で補正し、BEST1、MITF、RAX発現量比較においては、未分化維持培養条件で培養されていたiPS細胞（（図中下側、未分化）の発現量を1とした時の相対量を示した。

[図19]MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造法で、「StemFit（登録商標）」AK03N培地を使用して製造されたiPS細胞（1231A3）由来網膜色素上皮（RPE）細胞を含む培養43日目の6穴培養プレートの写真（図中右側、MEKi（PD0325901）、FGFRi（PD173074））と、RT-PCR法による培養43日目における網膜色素上皮マーカーRPE65、BEST1、CRALBP、内在性コントロールGAPDHの発現確認の結果（図中左側、MEKi（PD0325901）、FGFRi（PD173074））。比較対象として、MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質処理工程を含まない製造法で製造されたiPS細胞由来分化細胞を含む培養43日目の6穴培養プレートの写真（図中右側、無処理）とRPE65、BEST1、CRALBP、GAPDHのRT-PCR結果も示す（図中左側、無処理）。RT-PCR法の陽性対照としてprimary human RPE（図中左側、hRPE）、陰性対照として未分化維持培養条件で培養されていたiPS細胞（図中左側、未分化iPSC）を使用した。

発明を実施するための形態

[0010] 1. 定義

本発明において「多能性幹細胞」とは、自己複製能と多能性を有する細胞であり、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に属する細胞系列すべてに分化しうる能力（多能性（pluripotency））を有する幹細胞をいう。

[0011] 多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ES細胞：Embryonic stem cell）、人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）等を挙げることが出来る。本発明に用いる多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、好ましくはげっ歯類又は霊長類の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。ここで、哺乳動物としては、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、その他イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ウサギ等が挙げられる。

[0012] 胚性幹細胞は、例えば、着床以前の胚盤胞期胚中に存在する内部細胞塊を、フィーダー細胞上又はLIFを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。胚性幹細胞の具体的な製造方法は、例えば、W096/22362、W002/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるKhES-1、KhES-2及びKhES-3は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。いずれもマウス胚性幹細胞である、EB5細胞は国立研究開発法人理化学研究所より、D3株はATCCより、入手可能である。

[0013] ES細胞の一つである核移植ES細胞（ntES細胞）は、細胞核を取り除いた卵子に体細胞の細胞核を移植して作ったクローン胚から樹立することができる。

[0014] 「人工多能性幹細胞」は、体細胞を、公知の方法等により初期化（reprogramming）することにより、多能性を誘導した細胞である。具体的には、例えば線維芽細胞、皮膚細胞、末梢血単核球等の体細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、Myc（c-Myc、N-Myc、L-Myc）、Glis1、Nanog、Sall4、Lin28、Esrrb等の遺伝子群から選ばれる複数の初期化因子の組合せのいずれかを導入することにより初期化され多分化能が誘導された細胞が挙げられる。好ましい初期化因子の組み合わせとしては、（1）Oct3/4、Sox2、Klf4、及びMyc（c-Myc又はL-Myc）、（2）Oct3/4、Sox2、Klf4、Lin28及びL-Myc（Stem Cells, 2013;31:458-466）を挙げる事が出来る。

人工多能性幹細胞は、2006年、山中らによりマウス細胞で初めて樹立され（Cell, 2006, 126(4) pp.663-676）、2007年にはヒト線維芽細胞でも樹立された（Cell, 2007, 131(5) pp.861-872；Science, 2007, 318(5858) pp.1917-1920；Nat. Biotechnol., 2008, 26(1) pp.101-106）。人工多能性幹細胞の誘導方法についてはその後も様々な改良が行われており、具体的な製造方法は、例えば、マウス人工多能性幹細胞については、Cell, 2006 Aug 25;126(4):663-76、ヒト人工多能性幹細胞については、Cell, 2007 Nov 30;131(5):86

1-72等に記載されている。

人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加などにより体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる (Science, 2013, 341 pp. 651-654)。

また、株化された人工多能性幹細胞を入手する事も可能であり、例えば、京都大学で樹立された201B7細胞、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞又は1231A3細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学又はiPSアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。また、株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-I01細胞、Ff-I14細胞及びQHJI01細胞が、京都大学より入手可能である。

[0015] 人工多能性幹細胞を製造する際に用いられる体細胞には、特に限定は無く、具体的には、線維芽細胞、血球系細胞（例えば、末梢血単核球又はT細胞、臍帯血由来細胞）等が挙げられる。線維芽細胞としては、真皮由来のもの等が挙げられる。

[0016] 人工多能性幹細胞を製造する際に、数種類の初期化因子の発現により初期化する場合、遺伝子発現のための手段には特に限定は無く、当業者に周知の遺伝子導入方法、又はタンパク質の直接注入法を用いることができる。前記遺伝子導入法として具体的には、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター）を用いた感染法、プラスミドベクター（例えば、プラスミドベクター、エピソーマルベクター）、もしくはRNAベクターを用いたリン酸カルシウム法、リポフェクション法、レトロネクチン法又はエレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0017] 人工多能性幹細胞を製造する際には、フィーダー細胞存在下またはフィーダー細胞非存在下（フィーダーフリー）で製造できる。フィーダー細胞存在下で人工多能性幹細胞を製造する際には、公知の方法で、未分化維持因子存在下で人工多能性幹細胞を製造できる。フィーダー細胞非存在下で人工多能性幹細胞を製造する際に用いられる培地としては、特に限定は無いが、公知

の胚性幹細胞及び／又は人工多能性幹細胞の維持培地や、フィーダーフリーで人工多能性幹細胞を樹立するための培地を用いることができる。フィーダーフリーで人工多能性幹細胞を樹立するための培地としては、例えばEssential 8培地(E8培地)や、Essential 6培地、TeSR培地、mTeSR培地、mTeSR-E8培地、Stabilized Essential 8培地、StemFit (商標登録)等のフィーダーフリー培地を挙げることができる。人工多能性幹細胞を製造する際、例えば、フィーダー細胞非存在下で体細胞に、センダイウイルスベクターを用いて、Oct 3/4、Sox2、Klf4、及びMycの4因子を遺伝子導入することで、人工多能性幹細胞を作製することができる。

[0018] 本発明に用いられる多能性幹細胞は、好ましくは、げっ歯類又は霊長類の人工多能性幹細胞であり、より好ましくは、ヒト人工多能性幹細胞である。

[0019] 多能性幹細胞は、当業者であれば周知の方法により維持培養・拡大培養する事ができるが、移植細胞製造の安全性等の観点から、多能性幹細胞は、無血清条件下及びフィーダー細胞非存在下で維持培養・拡大培養する事が好ましい。

[0020] 遺伝子改変された多能性幹細胞は、例えば、相同組換え技術を用いることにより作製できる。改変される染色体上の遺伝子としては、例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社(1995); 等に記載の方法を用いて行うことができる。

[0021] 具体的には、例えば、改変する標的遺伝子(例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など)を含むゲノムDNAを単離し、単離されたゲノムDNAを用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製されたターゲットベクターを幹細胞に導入し、

標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子が改変された幹細胞を作製することができる。

[0022] 標的遺伝子を含むゲノムDNAを単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載された公知の方法があげられる。ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム(Genome Systems製)やUniversal GenomeWalker Kits (CLONTECH製)などを用いることにより、標的遺伝子を含むゲノムDNAを単離することもできる。ゲノムDNAの代わりに、標的蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いることもできる。当該ポリヌクレオチドは、PCR法で該当するポリヌクレオチドを増幅することにより取得する事ができる。

[0023] 標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターの作製、及び相同組換え体の効率的な選別は、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ; バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社(1995) ; 等に記載の方法にしたがって行うことができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型又はインサクション型のいずれでも用いることができる。選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、又はポリA選択などの方法を用いることができる。

選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法やPCR法等があげられる。

[0024] 本発明における「眼形成転写因子(Eye Field Transcription Factors)」とは、発生初期において眼形成領域に発現する遺伝子であり、ET (Tbx3) 、 Rx1 (Rax)、 Pax6、 Six3、 Lhx2、 Tlx(Nr2e1)、 Opx2(Six6)などが同定されている。これら眼形成転写因子は、眼形成初期のマーカースとして用いる事ができる。

[0025] 本発明における「網膜色素上皮細胞」とは、生体網膜において神経網膜組織の外側に存在する上皮細胞を意味する。細胞が網膜色素上皮細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば細胞マーカー（RPE65、Mitf、CRALBP、MERTK、BEST1等）の発現や、メラニン顆粒の存在（黒褐色）、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態などにより容易に確認できる。細胞が網膜色素上皮細胞の機能を有するか否かは、VEGF及びPEDF等のサイトカインの分泌能等により容易に確認できる。

[0026] 本発明における「浮遊培養」とは、細胞または細胞の凝集体が培養液に浮遊して存在する状態を維持する条件で行われる培養、すなわち細胞または細胞の凝集体と培養器材等との間に強固な細胞-基質間結合（cell-substratum junction）を作らせない条件での培養をいう。

「接着培養」とは、細胞又は細胞の凝集体を培養器材等に接着させる条件で行われる培養をいう。この場合、細胞が接着するとは、細胞または細胞の凝集体と培養器材の間に、強固な細胞-基質間結合ができることをいう。すなわち、接着培養とは、細胞または細胞の凝集体と培養器材等との間に強固な細胞-基質間結合を作らせる条件での培養をいう。

浮遊培養中の細胞の凝集体では、細胞と細胞が面接着(plane attachment)する。浮遊培養中の細胞の凝集体では、細胞-基質間結合が培養器材等との間にはほとんど形成されないか、あるいは、形成されていてもその寄与が小さい。一部の態様では、浮遊培養中の細胞の凝集体では、内在の細胞-基質間結合が凝集塊の内部に存在するが、細胞-基質間結合が培養器材等との間にはほとんど形成されないか、あるいは、形成されていてもその寄与が小さい。細胞と細胞が面接着するとは、細胞と細胞が面で接着することをいう。より詳細には、細胞と細胞が面接着するとは、ある細胞の表面積のうち別の細胞の表面と接着している割合が、例えば、1%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上であることをいう。細胞の表面は、膜を染色する試薬（例えばDiI）による染色や、細胞接着因子（例えば、E-cadherinやN-cadherin）の免疫染色により、観察できる。

[0027] 接着培養を行う際に用いられる培養器は、「接着培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜培養のスケール、培養条件及び培養期間に応じた培養器を選択することが可能である。このような培養器としては、例えば、組織培養用フラスコ、培養皿（ディッシュ）、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、マイクロキャリア、ビーズ、スピナーフラスコ又はローラーボトルが挙げられる。これらの培養器は、接着培養を可能とするために、細胞接着性であることが好ましい。細胞接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理された培養器が挙げられ、具体的には内部がコーティング剤で被覆された培養器が挙げられる。コーティング剤としては、例えば、ラミニン[ラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ （以下、ラミニン511）、ラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ （以下、ラミニン111）等及びラミニン断片（ラミニン511E8等）を含む]、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン、ビトロネクチン（Vitronectin）、シンセマックス（コーニング社）、マトリゲル等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等が挙げられる。また、正電荷処理等の表面加工された培養容器を使用することもできる。網膜色素上皮細胞の安定かつ効率的な誘導が可能である事から、より好ましくは、ラミニン511E8でコーティングした培養器を用いる（W02015/053375号）。ラミニン511E8は、市販品を購入する事ができる（例：iMatrix-511、ニッピ）。

[0028] 浮遊培養を行う際に用いられる培養器は、「浮遊培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、スピナーフラスコ又はローラーボトルが挙げられる。こ

これらの培養器は、浮遊培養を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等によるコーティング処理、又は、正電荷処理等の表面加工）されていないものなどを使用できる。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を低下させる目的で人工的に処理（例えば、MPCポリマー等の超親水性処理、タンパク低吸着処理等）されたものなどを使用できる。

[0029] 本発明において細胞の培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に通常用いられる培地を基礎培地として調製することができる。市販されている基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM(GMEM)培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、F-12培地、DMEM/F12培地、IMDM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地等が挙げられ、単独又は2種以上を組み合わせ用いる事ができるが、これらに限定されない。

[0030] 本発明における「血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含む培地を意味する。任意の動物由来の血清を使用することができるが、好ましくはウシ、ヒトなどの哺乳動物由来の血清を使用できる。自家移植を目的として培養を行う場合には、患者自身の血清を用いる事もできる。

血清の濃度は、網膜色素上皮細胞を効率的に分化誘導しうる濃度であれば特に限定されないが、例えば約0.5%~30% (v/v) の範囲から適宜設定できる。また、当該濃度は一定でもよく、段階的に変化させてもよい。

[0031] 「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。本発明では、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地も、無調整又は未精製の血清を含まない限り無血清培地に含まれる。

「無血清条件」とは、無調整又は未精製の血清を含まない条件、具体的に

は、無血清培地を使用する条件を意味する。

- [0032] 無血清培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、W098/30679に記載の方法により調製することができる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Knockout™ Serum Replacement (Life Technologies社製：以下、KSRと記すこともある。)、Chemically-defined Lipid concentrate (Life Technologies社製)、Glutamax™ (Life Technologies社製)、B27 (Life Technologies社製)、N2 (Life Technologies社製)が挙げられる。
- [0033] 調製の煩雑さを回避するために、かかる無血清培地として、市販のKSR (ライフテクノロジー (Life Technologies) 社製) を適量 (例えば、約0.5%から約30%、好ましくは約5%から約20%) 添加した無血清培地 (例えば、Glasgow MEM培地に上記濃度範囲のKSRを添加した培地) を使用してもよい。
- [0034] 本発明で用いる培地は、適宜、脂肪酸又は脂質、アミノ酸 (例えば、非必須アミノ酸)、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を含有してもよい。
- [0035] 本発明で用いる培地は、上記の他に、多能性幹細胞の細胞死(アポトーシス)を抑制する目的で、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ) 阻害物質を含有していてもよい。ROCK阻害物質としては、Y-27632、Fasudil又はH-1152が挙げられる。ROCK阻害物質の濃度は、当業者であれば適宜設定できるが、例えばY-27632約50nM~200µMに相当するROCK阻害活性を示す濃度の範囲から設定できる。
- [0036] 本発明に用いる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地 (Chemically defined medium; CDM) である。
- [0037] 本発明における培養は、好ましくはゼノフリー条件で行われる。「ゼノフ

リー」とは、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物種由来の成分（タンパク質等）が排除された条件を意味する。

[0038] 本発明において、「物質Xを含む培地」「物質Xの存在下」とは、外来性（exogenous）の物質Xが添加された培地または外来性の物質Xを含む培地、又は外来性の物質Xの存在下を意味する。すなわち、当該培地中に存在する細胞が当該物質Xを内在的（endogenous）に発現、分泌もしくは産生する場合、内在的な物質Xは外来性の物質Xとは区別され、外来性の物質Xを含んでいない培地は内在的な物質Xを含んでいても「物質Xを含む培地」の範疇には該当しないと解する。

例えば、「FGFシグナル伝達経路作用物質を含む培地」とは、外来性のFGFシグナル伝達経路作用物質が添加された培地または外来性のFGFシグナル伝達経路作用物質を含む培地である。

[0039] 本発明において、「フィーダー細胞」とは、多能性幹細胞を培養するときと共存させる当該幹細胞以外の細胞のことである。多能性幹細胞の未分化維持培養に用いられるフィーダー細胞としては、例えば、マウス線維芽細胞（MEF）、ヒト線維芽細胞、又は、SNL細胞等が挙げられる。フィーダー細胞としては、増殖抑制処理したフィーダー細胞が好ましい。増殖抑制処理としては、増殖抑制剤（例えば、マイトマイシンC）処理又はガンマ線照射等が挙げられる。多能性幹細胞の未分化維持培養に用いられるフィーダー細胞は、液性因子（好ましくは未分化維持因子）の分泌や、細胞接着用の足場（細胞外基質）の作成により、多能性幹細胞の未分化維持に貢献する。

[0040] 本発明において、フィーダー細胞非存在下（フィーダーフリー）とは、フィーダー細胞非存在下にて培養することである。フィーダー細胞非存在下とは、例えば、フィーダー細胞を添加していない条件、または、フィーダー細胞を実質的に含まない（例えば、全細胞数に対するフィーダー細胞数の割合が3%以下）の条件が挙げられる。

[0041] 2. 網膜色素上皮細胞の製造方法

本発明の製造方法は、下記工程（1）～（2）を含む、網膜色素上皮細胞

の製造方法である：

(1) 多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で、30日を超えない期間培養する第一工程、及び

(2) 第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0042] (1) 第一工程

第一工程における好ましい多能性幹細胞として、人工多能性幹細胞、更に好ましくはヒト人工多能性幹細胞が挙げられる。ここで人工多能性幹細胞の製造方法には特に限定はなく、上述のとおり当業者に周知の方法で製造することができるが、人工多能性幹細胞の作成工程（すなわち、体細胞を初期化し多能性幹細胞を樹立する工程）もフィーダーフリーで行うことが望ましい。

[0043] 多能性幹細胞は、通常維持培養・拡大培養の実施後、第一工程に供される。多能性幹細胞の維持・拡大培養は、当業者に周知の方法で実施することができ、好ましくはフィーダー細胞非存在下で実施される。また、多能性幹細胞の維持・拡大培養は、接着培養でも浮遊培養でも実施する事ができるが、好ましくは接着培養で実施される。

[0044] フィーダー細胞非存在下における多能性幹細胞の維持培養・拡大培養は、未分化維持因子を含む培地で実施できる。未分化維持因子は、多能性幹細胞の分化を抑制する作用を有する物質であれば特に限定はないが、通常哺乳動物由来の未分化維持因子である。未分化維持因子は、哺乳動物の種間で交差反応性を有し得るので、培養対象の多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な限り、いずれの哺乳動物の未分化維持因子を用いてもよいが、好適には培養する細胞と同一種の哺乳動物の未分化維持因子が用いられる。

当業者に汎用されている未分化維持因子としては、プライムド多能性幹細胞 (Primed pluripotent stem cells) (例えば、ヒトES細胞やヒトiPS細胞) の場合、FGFシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経

路作用物質等を挙げることができる。FGFシグナル伝達経路作用物質として具体的には、線維芽細胞増殖因子（例えば、bFGF、FGF4やFGF8）が挙げられる。また、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質としては、TGF β シグナル伝達経路作用物質（例えばTGF β 1、TGF β 2）、Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質（例えばNodal、Activin A、Activin B）が挙げられる。ヒト多能性幹細胞（ヒトES細胞、ヒトiPS細胞）を培養する場合、未分化維持因子は好ましくはbFGFである。

[0045] 多能性幹細胞の維持培養・拡大培養において用いられる培地中の未分化維持因子濃度は、多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な濃度であり、当業者であれば、適宜設定することができる。例えば、具体的には、未分化維持因子としてbFGFを用いる場合、その濃度は、通常4~500ng/mL程度、好ましくは10~200ng/mL、より好ましくは30~150ng/mL程度である。

[0046] 未分化維持因子を含む培地（以下、フィーダーフリー培地と記すことがある。）として、幹細胞用の培地として市販されている培地を適宜用いることもでき、例えば、Essential 8（Life Technologies社製）、hESF9（Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 9;105(36):13409-14）、S-medium（DSファーマバイオメディカル社製）、StemPro（Life Technologies社製）、mTeSR1（STEMCELL Technologies社製）、mTeSR2（STEMCELL Technologies社製）、TeSR-E8（STEMCELL Technologies社製）等が市販されている。また、この他に、開発中のフィーダーフリー培地としては、StemFit（登録商標）（味の素社製）が挙げられる。これらの培地を用いることにより、多能性幹細胞の維持培養・拡大培養を実施することが出来る。

[0047] 維持培養・拡大培養された多能性幹細胞を回収する際には、分散操作により、分散した多能性幹細胞を調製する。多能性幹細胞の分散操作は、機械的分散処理、細胞分散液処理、細胞保護剤添加処理を含んでよい。これらの処理を組み合わせてもよい。好ましくは、細胞保護剤添加処理と同時に、細胞分散液処理を行い、次いで機械的分散処理をするとよい。

細胞保護剤添加処理に用いられる細胞保護剤としては、ヘパリン、血清、

又は血清代替物を挙げる事ができる。また、分散により誘導される細胞死（特に、ヒト多能性幹細胞の細胞死）を抑制するために、分散の際に、ROCK阻害物質を添加してもよい。ROCK阻害物質としては、Y-27632、Fasudil (HA1077)、H-1152等を挙げる事ができる。

細胞分散液処理に用いられる細胞分散液としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、プロナーゼ、DNase又はパパイン等の酵素類や、エチレンジアミン四酢酸等のキレート剤のいずれかを含む溶液を挙げる事ができる。市販の細胞分散液、例えば、TrypLE Select (Life Technologies社製)やTrypLE Express (Life Technologies社製)を用いることもできる。

機械的分散処理の方法としては、ピペッティング処理又はスクレーパーでの掻き取り操作が挙げられる。

分散された多能性幹細胞を、新たな培養容器に播種し、第一工程に供することができる。

分散により誘導される細胞死（特に、ヒト多能性幹細胞の細胞死）を抑制するために、多能性幹細胞を、新たな培養容器に播種した後に、ROCK阻害物質存在下で維持培養を継続し、その後第一工程を開始してもよい。ROCK阻害物質処理の期間は、分散により誘導される細胞死が抑制できる限り特に限定されないが、通常、12～24時間程度である。

[0048] 第一工程開始時における多能性幹細胞の濃度は、当業者であれば適宜設定できるが、接着培養の場合であれば、例えば、 1.0×10^2 細胞/cm²から 1×10^6 細胞/cm²、好ましくは 2.0×10^2 細胞/cm²から 2×10^5 細胞/cm²、より好ましくは 5×10^2 細胞/cm²から 1×10^5 細胞/cm²又は 1×10^3 細胞/cm²から 1×10^4 細胞/cm²である。

[0049] 第一工程において用いられる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地である。

[0050] 第一工程において用いられる培地は、血清培地であっても無血清培地であってもよいが、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、無血清培地である。

- [0051] 第一工程において用いられる培地は、細胞死(アポトーシス)を抑制する目的で、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ) 阻害物質を含有していてもよい。ROCK阻害物質としては、Y-27632、Fasudil又はH-1152が挙げられる。ROCK阻害物質は1種のみで用いてもよいし、2種以上を組み合わせて用いてもよい。ROCK阻害物質の濃度は、当業者であれば適宜設定できるが、例えばY-27632約50nM~200 μ Mに相当するROCK阻害活性を示す濃度の範囲から設定できる。
- [0052] 第一工程における培養は、フィーダー細胞存在下で実施してもよいが、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、フィーダー細胞を含まない条件において実施される。
- [0053] 第一工程において用いられる培地は、フィーダー細胞非存在下における培養又はフィーダー細胞存在下における培養に関わらず、外来の未分化維持因子を含んでいても含んでいなくてもよい。本発明の第一工程は、より好ましくはフィーダー細胞非存在下において未分化維持因子を含む培地で行われる。未分化維持因子は、多能性幹細胞の分化を抑制する作用を有する物質であれば特に限定はないが、好ましくはFGFシグナル伝達経路作用物質を含み、より好ましくはbFGFを含む。
- [0054] 第一工程において用いられる培地中の未分化維持因子濃度は、多能性幹細胞の維持培養・拡大培養に用いられる場合における未分化維持因子の濃度範囲であればよく、例えば、未分化維持因子として、フィーダー細胞非存在下でbFGFを用いる場合、その濃度は、通常4~500ng/mL程度、好ましくは10~200ng/mL、より好ましくは30~150ng/mL程度である。
- [0055] 第一工程において用いられる培地は、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む。該培地は、本発明の製造方法による網膜色素上皮細胞の製造効率を著しく(例えば、第一工程を行わない場合の効率と同程度又はそれ以下まで)低減させない限り、さらなる成分(例えば、任意のシグナル伝達経路の作用又は阻害物質)を含むことができる。例えば、該培地は、BMP受容体阻害物質、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質又はPKC阻害物質

を、単独若しくは以下の(1)～(4)のいずれかの組み合わせで、さらに含んでもよい：(1)BMP受容体阻害物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、(2)BMP受容体阻害物質及びPKC阻害物質、(3)ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質及びPKC阻害物質、(4)BMP受容体阻害物質、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質及びPKC阻害物質。

[0056] 本発明において、FGF受容体阻害物質とは、FGFにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得る物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、FGFは少なくとも22種類からなるファミリーを形成している。また、代表的なFGF受容体としてはFGFR1、FGFR2、FGFR3およびFGFR4等が挙げられ、FGF受容体阻害物質はこれらの1つ、複数又は全部を阻害する物質である。当該物質として例えば、FGF又はFGF受容体に直接作用する物質（例えば抗体、アプタマー等）、FGF又はFGF受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、FGF受容体とFGFの結合を阻害する物質（例えば可溶型のFGF受容体、FGFアンタゴニスト等）、FGF受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質[例えば、ATP競合によりFGF受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害するPD173074 (N-[2-[[4-(Diethylamino)butyl]amino]-6-(3,5-dimethoxyphenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-N'-(1,1-dimethylethyl)urea) 又はSU5402 (2-[(1,2-Dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-4-methyl-1H-pyrrole-3-propanoic acid) 等の低分子化合物等]が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は1種のみで用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。ここで、PD173074及びSU5402は公知のFGF受容体阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。FGF受容体阻害物質として好ましくはPD173074又はSU5402が挙げられる。

[0057] 本発明において、培地中に含まれるFGF受容体阻害物質の濃度は、本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造し得る限り特に限定されず、FGF受容体阻害物質の種類に応じて当業者は適宜設定することができる。例えば、FGF受容体阻害物質の濃度として、PD173074 1～1000 nM、好ましくは10～500 nM、更

に好ましくは、25nM~400nM、特に好ましくは30~300 nMのFGF受容体阻害活性に相当する濃度の範囲が挙げられる。また、例えばSU5402であれば、0.1~500 μ M、好ましくは1~100 μ M、より好ましくは5~20 μ Mの濃度範囲が挙げられる。本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造可能な範囲であれば、当該濃度は第一工程を通して一定でもよく、段階的に変化させてもよい。

[0058] 本発明において、MEK阻害物質とは、MEKファミリーの発現又は活性を阻害する物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、代表的なMEKファミリーとしてMEK1、MEK2、MEK3等が挙げられ、MEK阻害物質はこれらMEKファミリーの1つ、複数又は全部の発現又は活性を阻害する物質である。当該物質として例えば、各種MEKをコードする遺伝子の発現を抑制する物質(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等)、各種MEKの酵素活性を阻害する物質[PD0325901 (N-[(2R)-2,3-Dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide)、PD184352 ((2-[(2-Chloro-4-iodophenyl)amino]-N-cyclopropylmethoxy)-3,4-difluorobenzamide)、PD98059 (2'-Amino-3'-Methoxyflavone)、U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)、MEK162(5-[(4-Bromo-2-fluorophenyl)amino]-4-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-1-methyl-1H-benzimidazole-6-carboxamide)、SL327 (α -[Amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzeneacetonitrile)、TAK-733 ((R)-3-(2,3-dihydroxypropyl)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine-4,7(3H,8H)-dione)又はAZD-8330 (2-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-N-(2-hydroxyethoxy)-1,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxamide)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は1種で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。ここで、PD0325901、PD184352、PD98059、U0126、MEK162、SL327、TAK-733及びAZD-8330は公知のMEK阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。MEK阻害物質として好ましくはPD0325901、PD184352、U0126、TAK-733又はAZD-8330が挙げられる。

[0059] 本発明において、培地中に含まれるMEK阻害物質の濃度は、本発明の方法により哺乳動物の網膜色素上皮細胞を製造し得る限り特に限定されず、MEK阻害物質の種類に応じて当業者は適宜設定することができる。例えば、MEK阻害物質の濃度として、PD0325901 0.001~10 μ M、好ましくは0.005~5 μ M、更に好ましくは0.1~4 μ M、更に好ましくは0.25~4 μ M、特に好ましくは0.25~2 μ MのMEK阻害活性に相当する濃度の範囲が挙げられる。例えば、PD184352であれば、例えば、0.01~20 μ M、好ましくは0.1~10 μ M、更に好ましくは1.5~6 μ Mの濃度範囲が挙げられる。本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造可能な範囲であれば、当該濃度は第一工程を通して一定でもよく、段階的に変化させてもよい。

[0060] 本発明においてBMP受容体阻害物質とは、BMPにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得る物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、代表的なBMPとしては、BMP2、BMP4、BMP7及びGDF7等を挙げる事ができる。ここで、BMP受容体(BMPR)は、I型受容体(ALK (activin receptor-like kinase) -1、ALK-2、ALK-3、ALK-6)及びII型受容体(ActRII、BMPRII)のヘテロ二量体として存在する。BMP受容体阻害物質として例えば、BMP又はBMP受容体に直接作用する物質(例えば抗体、アプタマー等)、BMP又はBMP受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等)、BMP受容体とBMPの結合を阻害する物質(例えば可溶性BMP受容体、BMPアンタゴニスト等)、BMP受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質[LDN193189 (4-[6-(4-piperazin-1-ylphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline) 又はDorsomorphin (6-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl]-3-(4-pyridinyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) 等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は1種で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。ここで、LDN193189及びDorsomorphinは公知のBMPI型受容体の阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。BMP受容体阻害物質として好ましくはLDN193189が挙げられるのである。

[0061] 本発明において、ソニック・ヘッジホッグ（以下、Shhと記すことがある。）シグナル伝達経路作用物質とは、Shhにより媒介されるシグナル伝達を強化し得る物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。Shhシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、Hedgehogファミリーに属する蛋白質（例えば、ShhやIhh等）、Shh受容体、Shh受容体アゴニスト[Purmorphamine (9-Cyclohexyl-N-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-2-(1-naphthalenyloxy)-9H-purin-6-amine)、又はSAG (Smoothened Agonist; N-Methyl-N'-(3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclohexane)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は1種で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。ここで、Purmorphamine及びSAGは公知のShhシグナル伝達経路作用物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Shhシグナル伝達経路作用物質として好ましくはSAGが挙げられる。

[0062] 本発明において、PKC阻害物質とは、プロテインキナーゼC (PKC) の発現又は活性を阻害し得る物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、PKCとは、少なくとも10種類以上のアイソザイムから構成されるタンパク質ファミリーであり、PKC阻害物質はこれらの1つ、複数又は全部の発現又は活性を阻害する物質である。当該物質として例えば、PKCをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、PKCの酵素活性を阻害する物質[例えばGo6983 (3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は1種で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。Go6983は公知のPKC阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。PKC阻害物質として好ましくはGo6983が挙げられる。

[0063] 本発明において、培地中に含まれるBMP受容体阻害物質、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質及びPKC阻害物質の濃度は、本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造可能な範囲で当業者は適宜設定することができ

る。例えば、BMP受容体阻害物質の濃度としては、LDN193189 1~1000 nM、好ましくは10~500 nM、より好ましくは、30~300 nMのBMP受容体阻害活性に相当する濃度の範囲が挙げられる。Shhシグナル伝達経路作用物質の濃度としては、SAG 1~2000 nM、好ましくは3~1000 nM、より好ましくは、10~500 nMのShhシグナル伝達作用に相当する濃度の範囲が挙げられる。PKC阻害物質の濃度としては、Go6983 0.05~20 μ M、好ましくは0.2~10 μ M、より好ましくは、0.5~5 μ MのPKC阻害活性に相当する濃度の範囲が挙げられる。

本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造可能な範囲であれば、当該濃度は第一工程を通して一定でもよく、段階的に変化させてもよい。

[0064] 第一工程における多能性幹細胞の培養は、浮遊培養又は接着培養のいずれの条件でおこなわれてもよいが、好ましくは、接着培養により行われる。

[0065] 多能性幹細胞の接着培養に用いる培養器は、細胞の接着培養が可能な限り特に限定されないが、細胞接着性の培養器が好ましい。細胞接着性の培養器としては、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理された培養器を使用することができ、具体的には前述の内部をコーティング剤で被覆された培養器が挙げられる。コーティング剤として好ましくは、ラミニン[ラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ (ラミニン511)、ラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ (ラミニン111)等及びラミニン断片 (ラミニン511E8等) を含む]、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン、ビトロネクチン (Vitronectin)、シンセマックス (コーニング社)、マトリゲル等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等が挙げられ、より好ましくは、ラミニン511E8が挙げられる (W02015/053375号)。ラミニン511E8は、市販品を購入する事ができる (例: iMatrix-511、ニッピ)。

[0066] 多能性幹細胞の浮遊培養に用いる培養器は、細胞の浮遊培養が可能な限り特に限定されないが、細胞非接着性である事が好ましい。

[0067] 第一工程における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は特に限定されるものではないが、例えば約30~40℃、好ましくは約37℃である。またCO₂濃度は、例えば約1~10%、好ましくは約5%である。

[0068] 第一工程の途中において、培地交換を行う事ができる。培地交換の方法は特に限定されず、元の培地の全量程度を新しい培地に交換しても、元の培地の一部のみを新しい培地に交換してもよい。元の培地の一部を新しい培地に交換する場合、第一工程に含まれる物質（MEK阻害物質、FGF受容体阻害物質等）の終濃度を計算した上で、交換する培地の割合に応じた濃度の該物質を含む新しい培地を準備し、元の培地と交換する事ができる。第一工程に含まれる物質の終濃度は、培養の途中で変化させてもよい。

培地交換操作に用いる道具は特に限定されないが、例えば、ピペッター、マイクロピペット、マルチチャンネルマイクロピペット、連続分注器、などが挙げられる。例えば、培養容器として96ウェルプレートを用いる場合、マルチチャンネルピペットマンを使ってもよい。

[0069] 第一工程の日数は、多能性幹細胞に上記FGF受容体阻害物質及び／又はMEK阻害物質等を暴露することで生じる細胞が網膜色素上皮細胞への分化能を保持している期間内であれば特に制限はないが、第一工程における多能性幹細胞は、30日を超えない期間培養される。該期間は、用いる多能性幹細胞の株等に応じて変動し得るが、通常2日以上、好ましくは3日以上、より好ましくは4日以上である。第一工程における多能性幹細胞は、より好ましくは2日間～13日間又は2日間～6日間、更に好ましくは4日～6日間培養される。

[0070] 第一工程の日数は、多能性幹細胞を上記FGF受容体阻害物質及び／又はMEK阻害物質で処理した細胞に発現する特定のマーカーを指標に決定してもよい。具体的には、例えば、PAX6(Paired box protein 6)、LHX2(LIM homeobox 2)及びSIX3(SIX homeobox 3)等の眼形成初期のマーカー、具体的には眼形成転写因子の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分な期間、第一工程の培養を行った後に第二工程に移行する事ができる。すなわち、第一工程における「30日を超えない期間」としては、例えば、「少なくとも1つの眼形成初期のマーカー、具体的には眼形成転写因子の発現を誘導するのに十分でありかつ30日を超えない期間」、及び「PAX6、LHX2及びSIX3の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分でありかつ30日を超えない期間」が挙げら

れる。これらの実施形態において、培養期間の上限は、例えば、30日を超えない期間、13日を超えない期間、または6日を超えない期間などであってもよい。

所定の培養条件において所与の培養期間が「少なくとも1つの眼形成初期のマーカー、具体的には眼形成転写因子の発現を誘導するのに十分な期間」または「PAX6、LHX2及びSIX3の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分な期間」であるか否かは、当該条件における当該期間の培養後の細胞集団において、無処理対照と比べてこれらの少なくとも1つの遺伝子発現が有意に検出されるかどうかを確認することにより決定することができる。当業者であれば、例えば、ノザンプロット、RT-PCR、マイクロアレイ等の手法により、これらの遺伝子の発現を検出する事ができる。

[0071] ここで、PAX6、LHX2及びSIX3とは、発生初期において眼形成領域に遺伝子発現する眼形成転写因子をコードする遺伝子であり、ヒトの遺伝子としては、それぞれGenbank Accession No. : NM_001127612、Genbank Accession No. : NM_004789、Genbank Accession No. : NM_005413として特定される遺伝子である。マウス等の他の動物種におけるこれら遺伝子は、当業者であれば容易に特定する事ができ、例えば<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>に掲載された遺伝子の塩基配列から特定する事ができる。

[0072] すなわち、本発明の一態様として、以下の工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法を提供する。

(1) 眼形成転写因子の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分な期間、多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で培養する第一工程、及び

(2) 第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0073] すなわち、本発明の別の態様として、以下の工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法を提供する。

(1) PAX6、LHX2及びSIX3の少なくとも1つの遺伝子発現を誘導するのに十分な期間、多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で培養する第一工程、及び

(2) 第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0074] 第一工程を接着培養で実施した場合、細胞を培養器から剥離して細胞を回収する事もできる。

[0075] 細胞を培養器から剥離する方法は、一般に細胞を剥離する方法として公知の方法であれば特に限定されないが、トリプシン等の酵素を含む細胞剥離液を用いることができる。また、市販の細胞剥離液[TrypLE select (Life Technologies社)等]を用いる事もできる。剥離し回収した細胞は、通常、PBS (Phosphate Buffered Saline) 及び/又は第二工程で使用する培地を用いて洗浄した後、第二工程に使用する。

[0076] 第一工程で得られる細胞は、その分化状態および生存状態が維持される限り、継代(維持培養)、網膜色素上皮細胞の製造中間体として保存、又はその他の処理に付すことができる。第一工程で得られた細胞を凍結保存する方法は、一般に細胞を凍結保存する方法として公知の方法であれば特に限定されないが、例えば、第一工程で得られた細胞をDMSOやグリセリン等の凍害保護剤を含む培地に懸濁し凍結保存することができる。また、市販の細胞凍結保存液[StemCellBanker(Zenoaq社)]を用いることもできる。

[0077] (2) 第二工程

第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程について説明する。

[0078] 第二工程開始時における細胞濃度は、当業者であれば適宜設定できるが、接着培養の場合であれば、例えば、 1.0×10^2 細胞/cm²から 2×10^6 細胞/cm²、好ましくは 3×10^2 細胞/cm²から 1×10^6 細胞/cm²、より好ましくは 1×10^3 細胞/cm²か

ら 2×10^5 細胞/cm²、更に好ましくは 2×10^3 細胞/cm²から 4×10^4 細胞/cm²である。

[0079] 第二工程において用いられる培地は、上記定義において記載したようなものである限り特に限定されない。第二工程において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得るが、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、無血清培地が好ましい。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地（例えば、Glasgow MEM培地に0.5%から30%の濃度範囲のKSRを添加した培地）を使用することができる。

[0080] 第二工程において用いられる培地は、細胞死(アポトーシス)を抑制する目的で、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ) 阻害物質を含有していてもよい。ROCK阻害物質としては、Y-27632、Fasudil又はH-1152が挙げられる。ROCK阻害物質の濃度は、当業者であれば適宜設定できるが、例えばY-27632約50nM~200 μMに相当するROCK阻害活性を示す濃度の範囲から設定できる。

[0081] 本発明の方法において、Nodalシグナル伝達経路阻害物質は、Nodalにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。Nodalにより媒介されるシグナルは、Nodal受容体を介して伝達される。Nodal受容体は、I型受容体(ALK (activin receptor-like kinase) -4、ALK-5、ALK-7)及びII型受容体(ActRII)のヘテロ二量体として存在する。Nodalシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Nodal又はNodal受容体に直接作用する物質（抗Nodal抗体、抗Nodal受容体抗体等）、Nodal又はNodal受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、Nodal受容体とNodalの結合を阻害する物質（Lefty-A、Lefty-B、Lefty-1、Lefty-2、可溶性Nodal受容体等）、Nodal受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質[ATP競合によりI型受容体のキナーゼ活性を阻害するSB-431542(SB431542) (4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定され

ない。SB-431542は公知のNodalシグナル阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Nodalシグナル阻害物質として好ましくはSB-431542が挙げられる。

[0082] 本発明の方法において、Wntシグナル伝達経路阻害物質は、Wntにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、蛋白質、核酸、低分子化合物等のいずれであってもよい。Wntにより媒介されるシグナルは、Frizzled (Fz) 及びLRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) のヘテロ二量体として存在するWnt受容体を介して伝達される。Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Wnt又はWnt受容体に直接作用する物質 (抗Wnt抗体、抗Wnt受容体抗体等)、Wnt又はWnt受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質 (例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等)、Wnt受容体とWntの結合を阻害する物質 (可溶型Wnt受容体、ドミナントネガティブWnt受容体等、Wntアンタゴニスト、Dkk1、Cerberus蛋白等)、Wnt受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質 [カゼインキナーゼI阻害物質であるCKI-7(N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide)及びD4476 (4-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide)、Axinの代謝回転を阻害する事で β -カテニン分解複合体を安定化させるIWR-1-endo(IWR1e) (4-[(3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-indol-2-yl]-N-8-quinolinyl-benzamide)、並びに、膜結合型O-アシルトランスフェラーゼ (MBOAT) であるPorcupine (Porcn) を不活化しWntタンパク質のパルミチル化を抑制するIWP-2 (N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]acetamide) 等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。CKI-7、D4476、IWR-1-endo (IWR1e)、IWP-2等は公知のWntシグナル阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Wntシグナル阻害物質として好ましくはCKI-7が挙げられる。

[0083] 第二工程においては、Nodalシグナル伝達経路阻害物質又はWntシグナル伝

達経路阻害物質を単独で用いる事もできるが、好ましくは両者を組み合わせ
て用いる。

[0084] 本発明の方法において、培地中に含まれるNodalシグナル伝達経路阻害物質
及びWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、本発明の方法により網膜色素上
皮細胞を製造可能な範囲で当業者は適宜設定することができる。例えば、Nod
alシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542を使用する場合には、その濃度
は通常0.01~50 μ M、好ましくは0.1~10 μ M、より好ましくは、5 μ Mであり、
Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7を使用する場合には、その濃度は
通常0.01~30 μ M、好ましくは0.1~30 μ M、より好ましくは、3 μ Mである。

本発明の方法により網膜色素上皮細胞を製造可能な範囲であれば、当該濃
度は第二工程を通して一定でもよく、段階的に変化させてもよい。

[0085] 第二工程における培養は、浮遊培養又は接着培養のいずれの条件で行われ
てもよいが、好ましくは、接着培養により行われる。

[0086] 第二工程の接着培養に用いる培養器は、細胞の接着培養が可能な限り特に
限定されないが、細胞接着性の培養器が好ましい。細胞接着性の培養器とし
ては、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理された培養器を使用
することができ、具体的には前述の内部をコーティング剤で被覆された培養
器が挙げられる。コーティング剤として好ましくは、ラミニン[ラミニン α 5
 β 1 γ 1 (ラミニン511)、ラミニン α 1 β 1 γ 1 (ラミニン111)等及びラミニン断
片 (ラミニン511E8等) を含む]、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン、ビ
トロネクチン (Vitronectin)、シンセマックス (コーニング社)、マトリゲ
ル等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子
等が挙げられ、より好ましくは、ラミニン511E8が挙げられる (W02015/05337
5号)。ラミニン511E8は、市販品を購入する事ができる (例: iMatrix-511、
ニッピ)。

[0087] 第二工程の浮遊培養に用いる培養器は、細胞の浮遊培養が可能な限り特に
限定されないが、細胞非接着性である事が好ましい。

[0088] 第二工程における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養

温度は、例えば約30℃から約40℃、好ましくは約37℃である。CO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。

[0089] 第二工程の途中において、適宜培地交換を行う事ができる。培地交換の方法は特に限定されず、元の培地の全量程度を新しい培地に交換しても、元の培地の一部のみを新しい培地に交換してもよい。元の培地の一部を新しい培地に交換する場合、第二工程に含まれる物質（Nodalシグナル伝達経路阻害物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、KSR等）の終濃度を計算した上で、交換する培地の割合に応じた濃度の該物質を含む新しい培地を準備し、元の培地と交換する事ができる。第二工程に含まれる物質の終濃度は、培養の途中で変化させてもよい。

培地交換操作に用いる道具は特に限定されないが、例えば、ピペッター、マイクロピペット、マルチチャンネルマイクロピペット、連続分注器、などが挙げられる。例えば、培養容器として96ウェルプレートを用いる場合、マルチチャンネルピペットを使ってもよい。

[0090] 第二工程の培養期間は、目的とする網膜色素上皮細胞を誘導できる期間であれば特に限定されないが、かかる培養期間の例としては、第二工程開始時から起算して、通常14～40日目に網膜色素上皮細胞を生じさせることができる。

また、当業者であれば、細胞マーカー（RPE65（網膜色素上皮細胞）、Mitf（網膜色素上皮細胞）BEST1（網膜色素上皮細胞）、CRALBP（網膜色素上皮細胞）など）の発現や、メラニン顆粒の存在（黒褐色）、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態などにより、網膜色素上皮細胞の生成を確認する事が可能であり、これらを確認する事で培養期間を設定する事も可能である。

[0091] 第二工程終了後、培地を網膜色素上皮細胞の維持培地（以下、RPE維持培地と記載する事もある。）に交換し、更に培養することが好ましい。それにより、さらにはっきりとメラニン色素沈着細胞群や基底膜に接着する多角扁平状の形態を有する細胞群を観察することができる。RPE維持培地による培養は

、網膜色素上皮細胞のコロニーが形成される限り限定されないが、例えば3日に1回以上の頻度で全量培地交換を行いながら5～20日間程度培養を行う。

[0092] 網膜色素上皮細胞の維持培地は、例えばIOVS, March 2004, Vol. 45, No. 3, Masatoshi Haruta, et. al., IOVS, November 2011, Vol. 52, No. 12, Okamoto and Takahashi, J. Cell Science 122 (17), Fumitaka Osakada, et. al., IOVS, February 2008, Vol. 49, No. 2, Gamm, et. al.に記載のものを使用することができ、基礎培地、血清及び／又は血清代替物、及びその他の成分で構成される。

基礎培地としては、上記定義の項に記載したようなものである限り特に限定されない。血清は、ウシ、ヒトなどの哺乳動物に由来する血清を使用できる。本発明においては、目的の細胞の品質管理上の観点から血清代替物を使用する事が好ましく、特に神経細胞培養用血清代替物であるB27が好適である。その他の成分としては、例えば、L-glutamine、ペニシリンナトリウム、硫酸ストレプトマイシン等が挙げられる。

[0093] 第二工程終了後、濃縮・精製操作を行うことにより、高純度の網膜色素上皮細胞を得ることができる。濃縮・精製方法としては、一般に細胞を濃縮・精製する方法として公知の方法であれば特に限定されないが、例えば、濾過（例：W02015/053376）、遠心分離、漕流分離、フローサイトメトリー分離、抗体修飾担体によるトラップ分離などの方法を用いることができる。

[0094] 本発明の製造方法は、第二工程終了後、網膜色素上皮細胞を増幅させる工程を含んでいてもよい。例えば、W02015/053375に記載の方法により、網膜色素上皮細胞を増幅させることが可能である。W02015/053375に記載の増幅方法によれば、培養細胞中に含まれる分化誘導が不十分な細胞等が淘汰され、網膜色素上皮細胞以外の副生成物を相対的に減らすことができるため、当該増幅の工程は、網膜色素上皮細胞の精製工程を兼ねる事ができる。

[0095] 第二工程において、網膜色素上皮細胞を浮遊培養により製造した場合、網膜色素上皮細胞を単独の細胞として回収し、懸濁液として調製した上で利用

する事ができる。

第二工程において、網膜色素上皮細胞を接着培養により製造した場合、網膜色素上皮細胞は互いに接着しシート状構造を採り得る。従って、患者に移植可能な網膜色素上皮細胞のシートを製造する事が可能である。この網膜色素上皮細胞のシートは、網膜疾患を治療する細胞移植治療薬として用いる細胞集団として特に有用である。また、接着培養により製造された網膜色素上皮細胞を、上記方法で剥離させ、網膜色素上皮細胞を独立した単独の細胞として回収し、これらを生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）に懸濁させることにより、懸濁液として調製する事も可能である。

[0096] 3. 毒性・薬効評価方法

本発明の製造方法により製造された網膜色素上皮細胞は、健常および疾患のモデル細胞として、網膜系疾患治療薬および糖尿病など他の合併症の疾患治療薬、またはその予防薬のスクリーニング・薬効評価、化学物質等の安全性試験、ストレス試験、毒性試験、副作用試験、感染・混入試験に活用が可能である。一方、網膜細胞特有の光毒性、網膜興奮毒性等の毒性研究、毒性試験等に活用することも可能である。その評価方法としては、アポトーシス評価などの刺激・毒性試験のほか、前駆細胞から網膜色素上皮細胞および視細胞への正常分化に及ぼす影響を評価する試験（各種遺伝子マーカーのRT-PCR、サイトカインのELISAなどによる発現タンパク質解析、貪食能試験）、光毒性などの毒性試験、視機能に対する網膜電位や経上皮電気抵抗、自己免疫反応に起因する細胞傷害試験などがある。また、これらの試験の為に細胞材料としては、網膜色素上皮細胞のみならず、その前駆細胞も用いることが可能で、例えば、細胞を播種接着したプレート、細胞懸濁液、そのシートまたは成形体を提供することができる。これは、ヒトおよび動物試験の外挿試験として用いることができる。

[0097] 4. 医薬組成物

本発明は、本発明の製造方法により製造される網膜色素上皮細胞の有効量を含む医薬組成物を提供する。

[0098] 該医薬組成物は、本発明の製造方法により製造される網膜色素上皮細胞の有効量、及び医薬として許容される担体を含む。

[0099] 医薬として許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることが出来る。必要に応じて、移植医療において、移植する組織や細胞を含む医薬に、通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を配合させてもよい。

本発明の医薬組成物は、本発明の製造方法により製造される網膜色素上皮細胞を、適切な生理的な水性溶媒で懸濁することにより、懸濁液として製造することができる。必要であれば、凍結保存剤を添加して、液体窒素等により凍結保存し、使用時に解凍し、緩衝液で洗浄し、移植医療に用いても良い。

本発明の製造方法で得られる網膜色素上皮細胞を、ピンセット等を用いて適切な大きさに細切し、シート剤とすることもできる。

また、本発明の製造方法で得られる細胞は、分化誘導を行う第二工程で接着培養を行うことにより、シート状の細胞に成形し、シート剤とすることもできる。

[0100] 本発明の医薬組成物は、網膜色素上皮細胞の障害に基づく（起因する）疾患の治療薬として有用である。

[0101] 5. 網膜疾患治療薬及び治療方法

本発明の製造方法により製造された網膜色素上皮細胞（上記濃縮及び増幅操作等を経た網膜色素上皮細胞を含む。）は、懸濁液やシート形状により生体へ移植して網膜疾患を治療する細胞移植治療薬として用いることができる。また、本発明は当該治療薬を患者に投与することを含む治療方法も提供する。ここで網膜疾患とは、網膜に関わる眼科疾患であって、糖尿病など他の疾患による合併症も含まれる。本発明における網膜疾患としては、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患が挙げられ、例えば、加齢性黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症又は網膜剥離等が挙げられる。すなわち、患者における網膜色素上皮細胞の損傷部位に、本発明の製造方法により製造され

た網膜色素上皮細胞を補充することができる。

[0102] 移植医療においては、組織適合性抗原の違いによる拒絶がしばしば問題となるが、レシピエントと免疫が適合する（例えば、HLA型やMHC型の一部又は全部が適合する）他者の体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、人工多能性幹細胞）、又は、移植のレシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、人工多能性幹細胞）を用いることで当該問題を克服できる。

即ち、好ましい態様において、本発明の方法において、多能性幹細胞として、レシピエントと免疫が適合する他者の体細胞から樹立した多能性幹細胞から、アロの網膜色素上皮細胞又はこれを含む組織を製造し、これが当該レシピエントに移植される。または、レシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、誘導多能性幹細胞）を用いることにより、当該レシピエントについて免疫学的自己の網膜色素上皮細胞又はこれを含む組織を製造し、これが当該レシピエントに移植される。

[0103] 刊行物、特許文献、特許出願明細書等を含む、本明細書に引用された全ての参考文献は、本明細書における引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

実施例

[0104] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

[0105] 以下の実施例及び比較例では、ヒト真皮線維芽細胞由来iPS細胞（201B7、京都大学）、および、京都大学がCellular Technology LimitedのePMBC（登録商標）から樹立したヒト末梢血由来単核球由来iPS細胞（1231A3、Ff-I01、QHJI01）を使用した。

[0106] 実施例1：MEK阻害物質処理工程を含む、ヒトiPS細胞を用いた高効率な網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞（201B7株及び1231A3株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03培地（味の

素) (以下、AK03培地)、又は、Essential 8培地 (Life Technologies) を使用した。

MEK阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 1.2×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[$10 \mu\text{M}$ Y-27632 (和光純薬)]含有AK03培地、又は、Essential 8培地で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) を、AK03培地に最終濃度 $1 \mu\text{M}$ 、又は、Essential 8培地に最終濃度 $0.03 \mu\text{M}$ になるよう添加し (第一工程開始)、6日間暴露した (第一工程終了)。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり、AK03培地使用時には 2.0×10^5 細胞、Essential 8培地使用時には 5.0×10^5 細胞播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した (第二工程開始)。培養1日目は、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加したAK03培地、又は、Essential 8培地を使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542 (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、 0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、 1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、 2 mM L-glutamine (SIGMA)、 100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 3

μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養38日目から42日目に培養プレートを観察した結果、AK03培地、及び、Essential 8培地の両培地使用時、201B7株、1231A3株の両株において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲に及ぶ出現を確認できた(図1)。顕微鏡観察により、それら細胞は、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示していた(図2)。

[0107] 比較例1：MEK阻害物質処理工程を含まない、ヒトiPS細胞を用いた網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞(201B7株及び1231A3株)のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit(登録商標)」AK03培地(味の素)(以下、AK03培地)、又は、Essential 8培地(Life Technologies)を使用した。

MEK阻害物質処理工程を含まない網膜色素上皮(RPE)細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE selectで処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511(ニッピ)(0.5 $\mu\text{g/cm}^2$)でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり、AK03培地使用時には 2.0×10^5 細胞、Essential 8培地使用時には 5.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した。培養1日目は、ROCK阻害物質としてY-27632(和光純薬)(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542(和光純薬)(最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7(SIGMA)(最終濃度3 μM)を添加したAK03培地、又は、Essential 8培地を使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR(Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(

最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養38日目から42日目に培養プレートを観察した結果、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現は、わずかし確認できなかった (図3)。

[0108] 実施例2：FGF受容体阻害物質処理工程を含む、ヒトiPS細胞を用いた高効率な網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞 (201B7株及び1231A3株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit (登録商標)」AK03培地 (味の素) (以下、AK03培地)、又は、Essential 8培地 (Life Technologies) を使用した。

FGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) (0.5 $\mu\text{g/cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 1.2×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632 (和光純薬)]

含有AK03培地、又は、Essential 8培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、FGF受容体阻害物質としてPD173074 (SIGMA) を最終濃度100 nMになるようAK03培地、又は、Essential 8培地に添加し（第一工程開始）、6日間暴露した（第一工程終了）。一例においては、未分化維持因子(bFGF)を含まない培地におけるFGF受容体阻害物質の効果を検討するために、bFGFを添加しないStemSure hPSC Medium Δ (和光純薬) (以降、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF) を使用した。すなわち、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGFに、FGF受容体阻害物質としてPD173074 (SIGMA) を最終濃度100 nMになるように添加し（第一工程開始）、6日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 (0.5 μg/cm²) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり、AK03培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF使用時には2.0 x 10⁵細胞、Essential 8培地使用時には5.0 x 10⁵細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した（第二工程開始）。培養1日目は、ROCK阻害物質としてY-27632 (和光純薬) (最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加したAK03培地、Essential8培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGFを使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies) 、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA) 、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies) 、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA) 、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA) 、100 U/ml ペニシリン-100 μg/ml ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地

、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン] を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養38日目から42日目に培養プレートを観察した結果、AK03培地、Essential 8培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF使用時において、201B7株、及び／又は、1231A3株において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲に及ぶ出現を確認できた (図4)。顕微鏡観察により、それら細胞は、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示していた (図5)。

[0109] 比較例2 : FGF受容体阻害物質処理工程を含まない、ヒトiPS細胞を用いた網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞 (201B7株及び1231A3株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。「StemFit (登録商標)」AK03培地 (味の素) (以下、AK03培地)、又は、Essential 8培地 (Life Technologies) を使用した。

FGF受容体阻害物質処理工程を含まない網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF (和光純薬) で6日間培養したiPS細胞を0.5 x TrypLE selectで処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) ($0.5 \mu\text{g/cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり、AK03培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF使用時には 2.0×10^5 細胞、Essential 8培地使用時には 5.0×10^5 細胞播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。培養1日目は、ROCK阻害物質としてY-27632 (和光純薬) (最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度 $3 \mu\text{M}$) を添加したAK03培地、Essential 8培地、又は、StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGFを使用し、培養2日目から5日目は、20%

KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養38日目から42日目に培養プレートを観察した結果、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現は、わずかし確認できなかった (図6)。

[0110] 実施例3：MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質と、各種阻害物質、シグナル伝達経路阻害物質又はシグナル伝達経路作用物質との組み合わせ処理工程を含む、ヒトiPS細胞を用いた高効率な網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞 (201B7株及び1231A3株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit (登録商標)」AK03培地 (味の素) (以下、AK03培地) を使用した。

MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質と、各種阻害物質、シグナル伝達経路阻害物質又はシグナル伝達経路作用物質との組み合わせ処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE selectで処理後、セルスクレーパーを用いて剥離

し、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 1.2×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[$10 \mu\text{M}$ Y-27632 (和光純薬)]含有AK03培地で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。細胞播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) (最終濃度 $1 \mu\text{M}$)、FGF受容体阻害物質としてPD173074 (SIGMA) (最終濃度 100 nM)、BMP受容体阻害物質としてLDN193189 (STEMGENT) (最終濃度 100 nM)、Shhシグナル伝達経路作用物質としてSAG (Enzo Life Sciences) (最終濃度 30 nM)、PKC阻害物質としてGo6983 (SIGMA) (最終濃度 $2 \mu\text{M}$)を図7に示す組み合わせで培地に添加し(第一工程開始)、6日間暴露した(第一工程終了)。その後、細胞を $0.5 \times \text{TrypLE select}$ で処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した(第二工程開始)。培養1日目は、ROCK阻害物質としてY-27632 (和光純薬) (最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加したAK03培地を使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542 (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、 0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、 1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、 2 mM L-glutamine (SIGMA)、 100 U/ml ペニシリン- $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542 (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542 (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、 1.9 mM L-glutamine、9

6 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含む実施例1、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1、FGF受容体阻害物質処理工程を含む実施例2、および、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない比較例2の条件でも実験を実施した。

培養38日目から47日目に培養プレートを観察した結果、比較例1及び比較例2の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現がわずかであった（図7、無処理）。それに対し、実施例1のMEK阻害物質処理工程を含む製造条件、実施例2のFGF受容体阻害物質処理工程を含む製造条件、及び、MEK阻害物質及び/又はFGF受容体阻害物質と、各種阻害物質、シグナル伝達経路阻害物質又はシグナル伝達経路作用物質との組み合わせ処理工程を含む製造条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示すRPE細胞の広範囲な出現を確認できた（図7）。ウェル全体に占めるRPE細胞の割合を目視で判定し、割合に応じて0から5の6段階に分けた場合（図8A）、図8B及び8Cに示す全ての化合物組み合わせ処理条件において、無処理よりも高い割合のRPE細胞の出現を確認できた（図8B及び8C）。

[0111] 実施例4：MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む、ヒトiPS細胞Ff-I01、QHJI01を用いた高効率な網膜色素上皮細胞の製造

ヒトiPS細胞（Ff-I01株及びQHJI01株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03N培地（味の素）（以下、AK03N培地）を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) (0.5 $\mu\text{g/cm}^2$) でコーティングした6穴培

養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[$10 \mu\text{M}$ Y-27632 (和光純薬)]含有AK03N培地で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) (最終濃度 $1 \mu\text{M}$)、又は、FGF受容体阻害物質としてPD173074 (SIGMA) (最終濃度 100 nM) をAK03N培地に添加し(第一工程開始)、6日間暴露した(第一工程終了)。その後、細胞を $0.5 \times \text{TrypLE select}$ で処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した(第二工程開始)。培養1日目から4日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、 0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、 1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、 2 mM L-glutamine (SIGMA)、 $100 \text{ U}/\text{ml}$ ペニシリン- $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、 1.9 mM L-glutamine、 $96 \text{ U}/\text{ml}$ ペニシリン- $96 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1(ただし、AK03培地はAK03N培地に変更)、及び、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない比較例2の条件(ただし、AK03培地はAK03N培地に変更)でも実験を実施した。

培養43日目に培養プレートを観察した結果、比較例1及び比較例2の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の

出現はほぼ見られなかった（図9、無処理）。一方、MEK阻害物質及びFGF受容体阻害物質で暴露した場合、Ff-I01株、QHJI01株の両株において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた（図9、MEKi、FGFRi）。

[0112] 実施例5：MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程における各阻害物質の暴露日数の検討

ヒトiPS細胞（QHJI01株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03N培地（味の素）（以下、AK03N培地）を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select（TrypLE select（Life Technologies）と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合）で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（ニッピ）（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632（和光純薬）]含有AK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、2日後、3日後、4日後、5日後、又は、6日後に、MEK阻害物質としてPD0325901（SIGMA）（最終濃度1 μM ）、又は、FGF受容体阻害物質としてPD173074（SIGMA）（最終濃度100 nM）をAK03N培地に添加し（第一工程開始）、6日間、5日間、4日間、3日間、2日間、又は、1日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した（第二工程開始）。培養1日目から4日目は、20% KSR（Life Technologies）、Y-27632（最終濃度10 μM ）、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542（和光純薬）（最終濃度5 μM ）、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7（SIGMA）（最終濃度3 μM ）を添加した基礎培地[GMEM培地（SIGMA）、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液（Life Technologies）、1 mM ピルビン酸

ナトリウム (SIGMA) 、 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、 2 mM L-glutamine (SIGMA) 、 100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA) 、 29% F12 (SIGMA) 、 1.9% B-27 supplement (Life Technologies) 、 1.9 mM L-glutamine、 96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養48日目に培養プレートを観察した結果、MEK阻害物質及びFGF受容体阻害物質の両処理において、暴露日数2日間以上で黒褐色を呈する細胞集団の増加が見られ、暴露日数6日間までの間、暴露日数の増加に伴いウェル全体に占める呈色細胞の割合が増加した (図10)。特に暴露日数4日間~6日間で黒褐色を呈する細胞集団の顕著な増加が見られた。

[0113] 実施例6：MEK阻害物質処理工程におけるMEK阻害物質暴露期間の検討

ヒトiPS細胞 (1231A3株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit (登録商標)」AK03培地 (味の素) (以下、AK03培地) を使用した。

MEK阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) (0.5 $\mu\text{g/cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり1.2 x 10⁴細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632 (和光純薬)]を含むAK03培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、4日後、又は、6日後

に、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) (最終濃度1 μM) をAK03培地に添加し (第一工程開始)、6日間、3日間、又は、1日間暴露した (第一工程終了)。また、MEK阻害物質6日間暴露した細胞を0.5 x TrypLE selectで処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 0.8×10^4 細胞播種し、Y-27632(最終濃度10 μM)、及び、PD0325901 (最終濃度1 μM) 含有AK03培地で、37°C、5% CO_2 条件下で更に7日間培養することで、13日間 MEK阻害物質で暴露した (第一工程終了)。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 1.2×10^6 細胞播種し、37°C、5% CO_2 条件下で培養した (第二工程開始)。培養1日目は、Y-27632(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加したAK03培地を使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632 (最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含ま

ない比較例1の条件でもRPE細胞の製造を実施した。

培養37日目に培養プレートを観察した結果、比較例1の条件、及び、MEK阻害物質暴露1日間では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現はほぼ見られなかった（図11、無処理、MEKi 1日間）。一方、MEK阻害物質暴露3日間、6日間では、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認でき（図11、MEKi 3日間、6日間）、暴露日数13日間においても同様に、十分な呈色細胞集団の出現が確認された（図11、MEKi 13日間）。

[0114] 実施例7：MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程終了時の遺伝子発現

ヒトiPS細胞（Ff-I01株及びQHJI01株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03N培地（味の素）（以下、AK03N培地）を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select（TrypLE select（Life Technologies）と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合）で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（ニッピ）（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632（和光純薬）]含有AK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、又は、4日後にMEK阻害物質としてPD0325901（SIGMA）（最終濃度1 μM ）、又は、FGF受容体阻害物質としてPD173074（SIGMA）（最終濃度100 nM）をAK03N培地に添加し（第一工程開始）、6日間、又は、3日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、第二工程に移す細胞分以外はマイクロアレイ用検体としてRNA抽出に使用し、第二工程移行分の細胞は、iMatrix-511（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した（第二工程開始）。培養1

日目は、Y-27632(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加したAK03培地、又は、20% KSR (Life Technologies) 、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、CKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA) 、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies) 、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA) 、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬) 、2 mM L-glutamine (SIGMA) 、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]を使用した。培養1日目にAK03培地 (Y-27632、SB-431542、及び、CKI-7含有) を使用した場合、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies) 、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、CKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA) 、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies) 、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA) 、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA) 、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、 Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA) 、29% F12 (SIGMA) 、1.9% B-27 supplement (Life Technologies) 、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培養1日目に基礎培地 (20%KSR、Y-27632、SB-431542、及び、CKI-7含有) を使用した場合、培養2日目から4日目は、20% KSR (Life Technologies) 、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎

培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542 (最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1の条件 (AK03培地はAK03N培地に変更) でもマイクロアレイ用検体の回収とRPE細胞の製造を実施した。

RNA抽出にはRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を実施した。マイクロアレイ解析は倉敷紡績株式会社の受託解析を利用した。

培養43日目の培養プレートの観察像を元に、図8Aに従い、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合を目視判定した結果 (RPE細胞の割合に応じて0から5の6段階にスコア化) と、マイクロアレイ解析の結果である第一工程終了時における眼形成初期マーカーPAX6、LHX2、SIX3の発現値 (Signal) 、及び、フラグ (Detection) を表にまとめた (図12) 。フラグは発現値の信頼性を表しており、Pは信頼性が高く、Aは信頼性が低いことを意味する。この結果から、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合と、第一工程終了時におけるPAX6、LHX2、SIX3の発現値の間に相関関係が認められた。従って、第二工程への移行時期を、これら遺伝子の発現に基づき決定できる事が判明した。

[0115] 実施例8：MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程における各種阻害物質濃度の検討

ヒトiPS細胞 (QHJI01株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit (登録商標) 」AK03N培地 (味の素) (以下、AK03N培地) を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単

一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[$10 \mu\text{M}$ Y-27632 (和光純薬)]含有AK03N培地で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) を最終濃度 $0.25 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $2 \mu\text{M}$ 、又は、 $4 \mu\text{M}$ 、FGF受容体阻害物質としてPD173074 (SIGMA) を最終濃度 25 nM 、 50 nM 、 100 nM 、 200 nM 、又は、 400 nM になるようAK03N培地に添加し (第一工程開始)、6日間暴露した (第一工程終了)。その後、細胞を $0.5 \times \text{TrypLE select}$ で処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した (第二工程開始)。培養1日目から4日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、 0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、 1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、 2 mM L-glutamine (SIGMA)、 100 U/ml ペニシリン- $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、SB-431542(最終濃度 $5 \mu\text{M}$)、CKI-7(最終濃度 $3 \mu\text{M}$)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、 1.9 mM L-glutamine、 96 U/ml ペニシリン- $96 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1 (AK03培地はAK03N培地に変更)、及び、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない比較例2の条件 (AK03培地はAK03N培地に変更) でもRPE細胞の製造を実施した。

培養36日目と49日目に培養プレートを観察した結果、比較例1及び比較例2の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現はほぼ見られなかった（図13、無処理）。一方、検討した全てのMEK阻害物質濃度（0.25～4 μM ）、及び、FGF受容体阻害物質濃度（25～400 nM）において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた（図13、MEKi:0.25～4 μM 、FGFRi:25～400 nM）。

[0116] 実施例9：第一工程から第二工程移行時の播種細胞数の検討

ヒトiPS細胞（QHJI01株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03N培地（味の素）（以下、AK03N培地）を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select（TrypLE select（Life Technologies）と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合）で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（ニッピ）（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632（和光純薬）]を含むAK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901（SIGMA）（最終濃度1 μM ）、又は、FGF受容体阻害物質としてPD173074（SIGMA）（最終濃度100 nM）をAK03N培地に添加し（第一工程開始）、6日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり0.2、0.4、0.6、1.0、2.0、又は、 4.0×10^5 細胞（0.2、0.4、0.6、1.0、2.0、又は、 4.0×10^4 細胞/cm²）播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した（第二工程開始）。培養1日目から4日目は、20% KSR（Life Technologies）、Y-27632（最終濃度10 μM ）、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542（和光純薬）（最終濃度5 μM ）、Wntシグナル伝達経路阻害物質と

してCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養49日目に培養プレートを観察した結果、検討した全ての播種細胞数 (0.2、0.4、0.6、1.0、2.0、又は、 4.0×10^4 細胞/cm²) において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた (図14)。

[0117] 実施例10：第一工程におけるMEK阻害物質PD184352、U0126、TAK-7331、AZD-8330の検討

ヒトiPS細胞 (QHJI01株及び1231A3株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従い行った。培地は「StemFit (登録商標)」AK03N培地 (味の素) (以下、AK03N培地) を使用した。

MEK阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペッティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) (0.5 $\mu\text{g/cm}^2$) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632 (和光純薬)]を含むA

K03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901 (SIGMA) (最終濃度1 μM)、PD184352 (SIGMA) (最終濃度1.5 μM、3 μM、6 μM)、U0126 (SIGMA) (最終濃度5 μM、10 μM)、TAK-7331 (Selleck) (最終濃度0.3 μM)、又は、AZD-8330 (Selleck) (最終濃度0.3 μM) をAK03N培地に添加し(第一工程開始)、6日間暴露した(第一工程終了)。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (0.5 μg/cm²) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり2.0 x 10⁵細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した(第二工程開始)。培養1日目から4日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ビルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 μg/ml ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542(最終濃度5 μM)、CKI-7(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 μg/ml ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1の条件 (AK03N培地はAK03N培地に変更) でもRPE細胞の製造を実施した。

培養49日目と50日目に培養プレートを観察した結果、比較例1の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現はほぼ見られなかった(図15、無処理)。一方、検討した全てのMEK阻害物質

(PD0325901、PD184352、U0126、TAK-7331、AZD-8330)において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた(図15、PD0325901、PD184352、U0126、TAK-733、AZD-8330)。

[0118] 実施例11：第一工程におけるFGF受容体阻害物質SU5402の検討

ヒトiPS細胞(QHJI01株及び1231A3株)のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit(登録商標)」AK03N培地(味の素)(以下、AK03N培地)を使用した。

FGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮(RPE)細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合)で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511(ニッピ)(0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632(和光純薬)]を含むAK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、FGF受容体阻害物質としてPD173074(SIGMA)(最終濃度100 nM)、又は、SU5402(SIGMA)(最終濃度5 μM 、10 μM 、20 μM)をAK03N培地に添加し(第一工程開始)、6日間暴露した(第一工程終了)。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511(0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した(第二工程開始)。培養1日目から4日目は、20% KSR(Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542(和光純薬)(最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7(SIGMA)(最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地(SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液(Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine(SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン(Life Technologies)]、培養5

日目から8日目は、15% KSR、 Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA) 、29% F12 (SIGMA) 、1.9% B-27 supplement (Life Technologies) 、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 μ g/mlストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、FGF受容体阻害物質処理工程を含まない比較例2の条件 (AK03培地はAK03N培地に変更) でもRPE細胞の製造を実施した。

培養49日目に培養プレートを観察した結果、比較例2の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現はほぼ見られなかった (図16、無処理)。一方、検討した全てのFGF受容体阻害物質 (PD173074、SU5402) において、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた (図16、PD173074、SU5402)。

[0119] 実施例12：第二工程におけるNodalシグナル伝達経路阻害物質とWntシグナル伝達経路阻害物質の単独暴露による分化誘導効果の検討

ヒトiPS細胞 (QHJI01株) のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit (登録商標)」AK03N培地 (味の素) (以下、AK03N培地) を使用した。

MEK阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮 (RPE) 細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select (TrypLE select (Life Technologies) と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合) で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (ニッピ) (0.5 μ g/cm²) でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり2.0 x 10⁴細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μ M Y-27632 (和光純薬)]を含むAK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてP

D0325901 (SIGMA) (最終濃度1 μM) をAK03N培地に添加し (第一工程開始)、6日間暴露した (第一工程終了)。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511 (0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) でコーティングした12穴培養プレートに、1穴あたり 0.8×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO_2 条件下で培養した (第二工程開始)。第二工程では以下の3種類の培地を使用した。培養1日目から12日目に、10% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μM)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μM)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies)] (図17、NODALi+WNTi)、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、SB-431542 (最終濃度5 μM) を添加した基礎培地 (図17、NODALi)、又は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μM)、CKI-7 (最終濃度3 μM)を添加した基礎培地 (図17、WNTi) を使用した。培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。

培養43日目に培養プレートを観察した結果、Nodalシグナル伝達経路阻害物質とWntシグナル伝達経路阻害物質の両処理条件 (NODALi+WNTi)、及び、Nodalシグナル伝達経路阻害物質の単剤処理条件 (NODALi) で同程度の黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現が確認された (図17、NODALi+WNTi、NODALi)。また、Wntシグナル伝達経路阻害物質の単剤処理 (WNTi) では、ウェル全体に占める黒褐色面積の減少は見られたが、十分な数のRPE細胞の特徴を示す細胞の出現を確認できた (図17、WNTi)。以上の結果から、第二工程では、Nodalシグナル伝達経路阻害物質、又は、

Wntシグナル伝達経路阻害物質のどちらか一方が存在していればよいことが確認できた。

[0120] 実施例13：ウェル全体に占める黒褐色細胞の面積割合と網膜色素上皮細胞マーカー遺伝子の発現との関係

ヒトiPS細胞（201B7株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03培地（味の素）（以下、AK03培地）を使用した。

MEK阻害物質及びBMP受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select（TrypLE select（Life Technologies）と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合）で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（ニッピ）（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 1.2×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632（和光純薬）]含有AK03培地で、37°C、5% CO_2 条件下で培養した。MEK阻害物質を6日間、BMP受容体阻害物質を1日間暴露する場合は、播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901（SIGMA）（最終濃度1 μM ）をAK03培地に添加し（第一工程開始）、播種6日後にBMP受容体阻害物質としてLDN193189（STEMGENT）（最終濃度100 nM）をAK03培地に添加することで、MEK阻害物質、BMP受容体阻害物質をそれぞれ6日間、1日間暴露した（第一工程終了）。MEK阻害物質、BMP受容体阻害物質を共に6日間暴露する場合は、播種翌日、PD0325901（最終濃度1 μM ）とLDN193189（最終濃度100 nM）をAK03培地に添加し（第一工程開始）、6日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO_2 条件下で培養した（第二工程開始）。培養1日目は、Y-27632（最終濃度10 μM ）、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542（和光純薬）（最終濃度5 μM ）、Wntシグナル伝達経路阻害物質

としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μ M)を添加したAK03培地を使用し、培養2日目から5日目は、20% KSR (Life Technologies)、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542 (最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 μ g/ml ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養6日目から9日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養10日目から13日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養14日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 μ g/ml ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1の条件でもRPE細胞の製造を実施した。

培養39日目に観察後、細胞を回収してRNA抽出を行い、リアルタイムRT-PCRを実施した。RNA抽出にはRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、リアルタイムRT-PCRにはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用した。BEST1 (Hs00188249_m1)、MITF (Hs01117294_m1)、RAX (Hs00429459_m1)、GAPDH (Hs02758991_g1) のプライマー、プローブはApplied Biosystemsから購入した。各検体のBEST1、MITF、RAXの発現量をGAPDHの発現量で補正し、未分化維持培養条件で培養されていたiPS細胞 (未分化) の発現量を1とした時の相対値で表した。

培養39日目の培養プレートの観察像を元に、図8Aに従い、ウェル全体に占めるRPE細胞の割合を目視判定した。その結果、無処理は「1」、MEK阻害物質6日間+BMP受容体阻害物質1日間暴露は「3」、MEK阻害物質6日間+BMP受容体阻害物質6日間暴露は「5」であった (図18上側、細胞写真)。これら検体と

未分化維持培養を継続していたiPS細胞（未分化）との間で、網膜色素上皮細胞マーカーであるBEST1、MITF、眼形成初期マーカーであるRAXの発現量をリアルタイムRT-PCR法によって比較した結果、黒褐色細胞の面積と上記マーカー遺伝子の発現量との間に相関関係が認められた（図18下側、グラフ）。以上の結果から、黒褐色を呈している細胞が網膜色素上皮細胞マーカー遺伝子及び眼形成初期マーカー遺伝子を発現していることが示唆された。併せて、本製造法によってRPE細胞が製造された事が遺伝子発現レベルにおいても検証された。

[0121] 実施例14：MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む製法によって製造されたRPE細胞のマーカー遺伝子の発現確認

ヒトiPS細胞（1231A3株）のフィーダーフリー条件下での未分化維持培養は、「Nakagawa, M. et. al., Sci. Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594」に記載の方法に従って行った。培地は「StemFit（登録商標）」AK03N培地（味の素）（以下、AK03N培地）を使用した。

MEK阻害物質又はFGF受容体阻害物質処理工程を含む網膜色素上皮（RPE）細胞の製造は以下の通り行った。未分化維持培養していたiPS細胞を0.5 x TrypLE select（TrypLE select（Life Technologies）と0.5 mM EDTA/PBS(-)を等量混合）で処理後、セルスクレーパーを用いて剥離し、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（ニッピ）（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^4 細胞播種し、ROCK阻害物質[10 μM Y-27632（和光純薬）]含有AK03N培地で、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種翌日、MEK阻害物質としてPD0325901（SIGMA）（最終濃度1 μM ）、又は、FGF受容体阻害物質としてPD173074（SIGMA）（最終濃度100 nM）をAK03N培地に添加し（第一工程開始）、6日間暴露した（第一工程終了）。その後、細胞を0.5 x TrypLE selectで処理し、セルスクレーパーを用いて剥離、ピペティングで単一分散後、iMatrix-511（0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）でコーティングした6穴培養プレートに、1穴あたり 2.0×10^5 細胞播種し、37°C、5% CO₂条件下で培養した（第二工程開始）。培養1日目から4日目は、20% KSR（Life Technologies）、Y-2

7632(最終濃度10 μ M)、Nodalシグナル伝達経路阻害物質としてSB-431542 (和光純薬) (最終濃度5 μ M)、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてCKI-7 (SIGMA) (最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地[GMEM培地 (SIGMA)、0.1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、100 U/ml ペニシリン-100 μ g/ml ストレプトマイシン (Life Technologies)]、培養5日目から8日目は、15% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養9日目から12日目は、10% KSR、Y-27632(最終濃度10 μ M)、SB-431542(最終濃度5 μ M)、CKI-7(最終濃度3 μ M)を添加した基礎培地、培養13日目から30日目は、10% KSRのみを添加した基礎培地、培養31日目以降は、RPE維持培地 [67% DMEM low glucose (SIGMA)、29% F12 (SIGMA)、1.9% B-27 supplement (Life Technologies)、1.9 mM L-glutamine、96 U/ml ペニシリン-96 μ g/ml ストレプトマイシン]を使用した。培地は毎日、全量交換した。同時に、MEK阻害物質処理工程を含まない比較例1の条件 (AK03培地はAK03N培地に変更) でも実験を実施した。

培養43日目に観察後、細胞を回収してRNA抽出を行い、RT-PCRを実施した。RNA抽出にはRNeasy Micro Kit (QIAGEN)、逆転写反応にはOligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen)、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)、PCRにはBlend Taq -Plus- (TOYOBO)を使用した。RPE65、BEST1、CRALBP、GAPDHのプライマー配列は以下の通りである。RPE65-F: TCCCAATACAACCTGCCACT (配列番号1)、RPE65-R: CCTTGGCATTGAGAATCAGG (配列番号2)、BEST1-F: TAGAACCATCAGCGCCGTC (配列番号3)、BEST1-R: TGAGTGTAGTGTGTATGTTGG (配列番号4)、CRALBP-F: GAGGGTGCAAGAGAAGGACA (配列番号5)、CRALBP-R: TGCAG AAGCCATTGATTTGA (配列番号6)、GAPDH-F: ACCACAGTCCATGCCATCAC (配列番号7)、GAPDH-R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA (配列番号8)。PCR反応のサイクル数は、RPE65、BEST1、GAPDHが30サイクル、CRALBPは35サイクルで実施した。PCR産物はアガロースゲル電気泳動によって、RPE65は369 bp付近、BEST1は261

bp付近、CRALBPは341 bp付近、GAPDHは452 bp付近に一本のバンドとして検出された。陽性対照としてprimary human RPE (hRPE)、陰性対照として未分化維持培養条件で培養されていたiPS細胞(未分化iPSC)を使用した。

培養43日目に培養プレートを観察した結果、比較例1の条件では、黒褐色、多角、敷石状形態といったRPE細胞の典型的な特徴を示す細胞の出現は、わずかし確認できなかった(図19右側、細胞写真、無処理)。一方、MEK阻害物質及びFGF受容体阻害物質で暴露した場合、黒褐色を呈する細胞集団の広範囲な出現を確認できた(図19右側、細胞写真、MEKi、FGFRi)。RT-PCRを実施した結果、比較例1の条件では、網膜色素上皮細胞マーカーであるRPE65、BEST1、CRALBPのバンドが非常に薄かった(図19左側、電気泳動図、無処理)。一方、MEK阻害物質及びFGF受容体阻害物質で暴露した検体では明瞭なバンドを確認できた(図19左側、電気泳動図、MEKi、FGFRi)。以上の結果より、MEK阻害物質及びFGF受容体阻害物質処理工程を含む製法によって、RPE細胞が高効率に製造された事が遺伝子発現レベルにおいても検証された。

産業上の利用可能性

- [0122] 本発明の製造方法により、高効率に多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞を製造する事が可能である。
- [0123] 本出願は日本で出願された特願2015-176896(出願日:2015年9月8日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

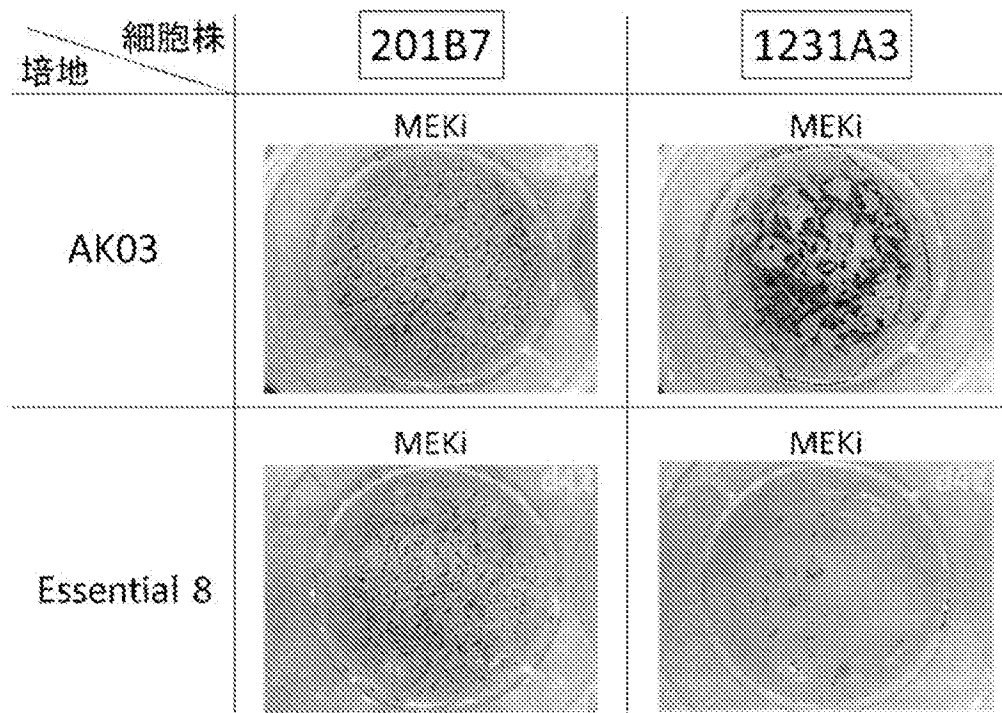
- [請求項1] 以下の工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法：
（１）多能性幹細胞を、FGF受容体阻害物質及び/又はMEK阻害物質を含む培地で、30日を超えない期間培養する第一工程、及び
（２）第一工程で得られた細胞を、Nodalシグナル伝達経路阻害物質及び/又はWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。
- [請求項2] 第一工程が、無血清条件下で行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 第一工程が、フィーダー細胞非存在下で行われる、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] 第一工程における培地が、さらに未分化維持因子を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項5] 未分化維持因子が、FGFシグナル伝達経路作用物質である、請求項4に記載の製造方法。
- [請求項6] FGFシグナル伝達経路作用物質が、bFGFである、請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] FGF受容体阻害物質が、PD173074及びSU5402からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項8] MEK阻害物質が、PD0325901、PD184352、U0126、TAK-733、及びAZD-8330からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1～7のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項9] Nodalシグナル伝達経路阻害物質が、ALK4, 5, 又は7阻害物質である、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項10] ALK4, 5, 又は7阻害物質が、SB431542である、請求項9に記載の製造方法。
- [請求項11] Wntシグナル伝達経路阻害物質が、CKI-7である請求項1～10のいずれか1項に記載の製造方法。

- [請求項12] 多能性幹細胞が、霊長類多能性幹細胞である請求項1～11のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項13] 多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である請求項1～12のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項14] 第一工程における培地が、さらにBMP受容体阻害物質を含む培地である、請求項1～13のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項15] BMP受容体阻害物質が、ALK2/3阻害物質である請求項14に記載の製造方法。
- [請求項16] ALK2/3阻害物質が、LDN193189である請求項15に記載の製造方法。
- [請求項17] 第一工程における培地が、さらにソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む請求項1～16のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項18] ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が、SAGである請求項17に記載の製造方法。
- [請求項19] 第一工程における培地が、さらにPKC阻害物質を含む請求項1～18のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項20] PKC阻害物質が、Go6983である請求項19に記載の製造方法。
- [請求項21] 第一工程において、培養期間が2日間～13日間である、請求項1～20のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項22] 第一工程において、培養期間が4日間～6日間である、請求項1～21のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項23] 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を含有してなる、被験物質の毒性・薬効評価用試薬。
- [請求項24] 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞に被験物質を接触させ、該物質が該細胞に及ぼす影響を検定することを含む、該物質の毒性・薬効評価方法。
- [請求項25] 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を含有してなる、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の

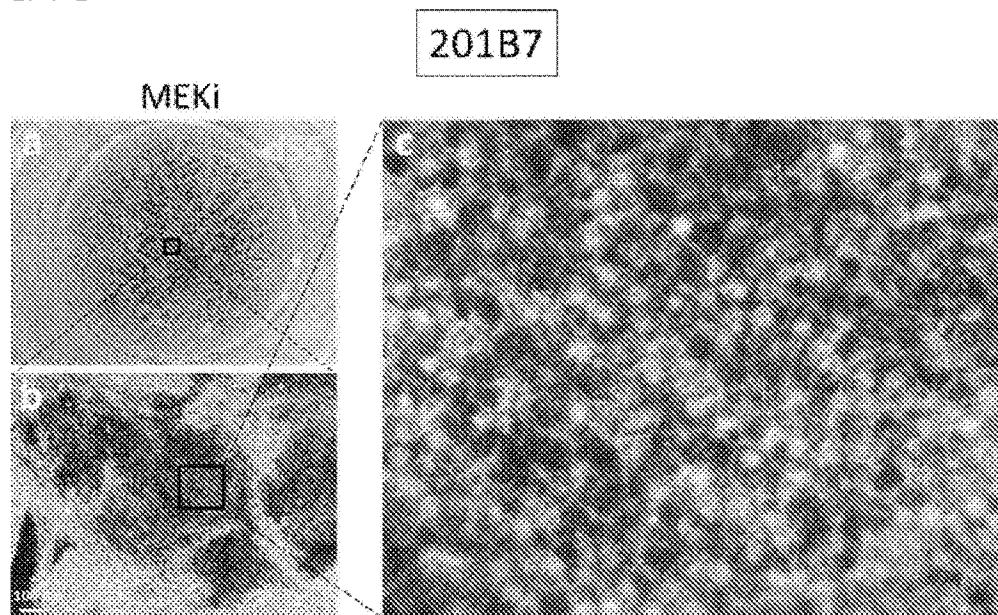
治療薬。

- [請求項26] 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞の有効量を、移植を必要とする対象に移植することを含む、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の治療方法。
- [請求項27] 網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患の治療における使用のための、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞。
- [請求項28] 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法により製造される網膜色素上皮細胞を有効成分として含有する、医薬組成物。

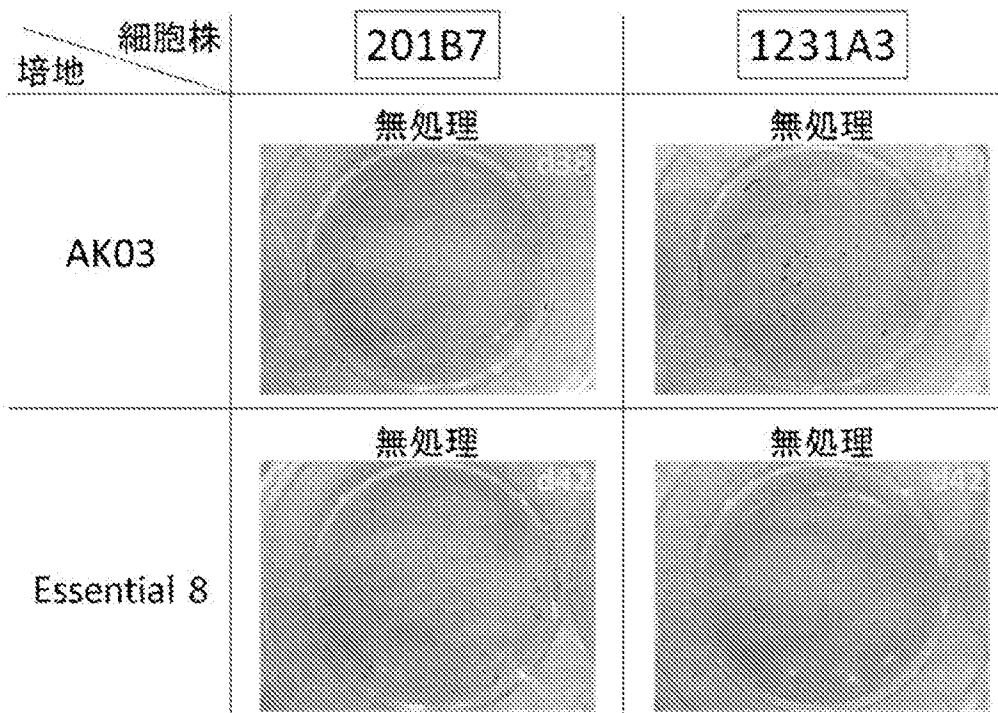
[図1]



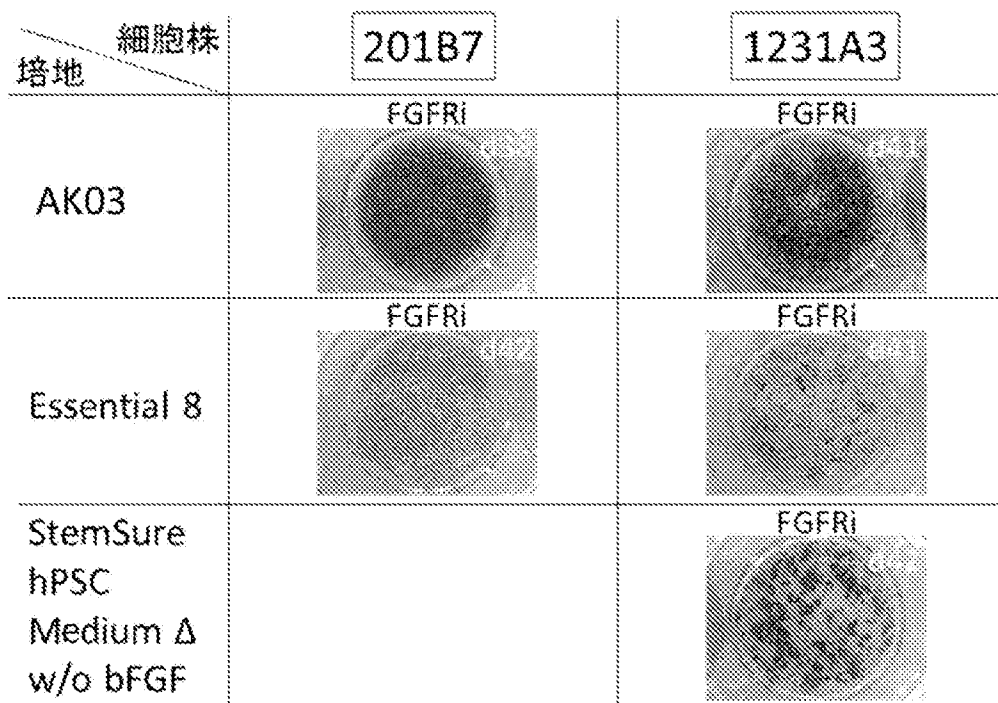
[図2]



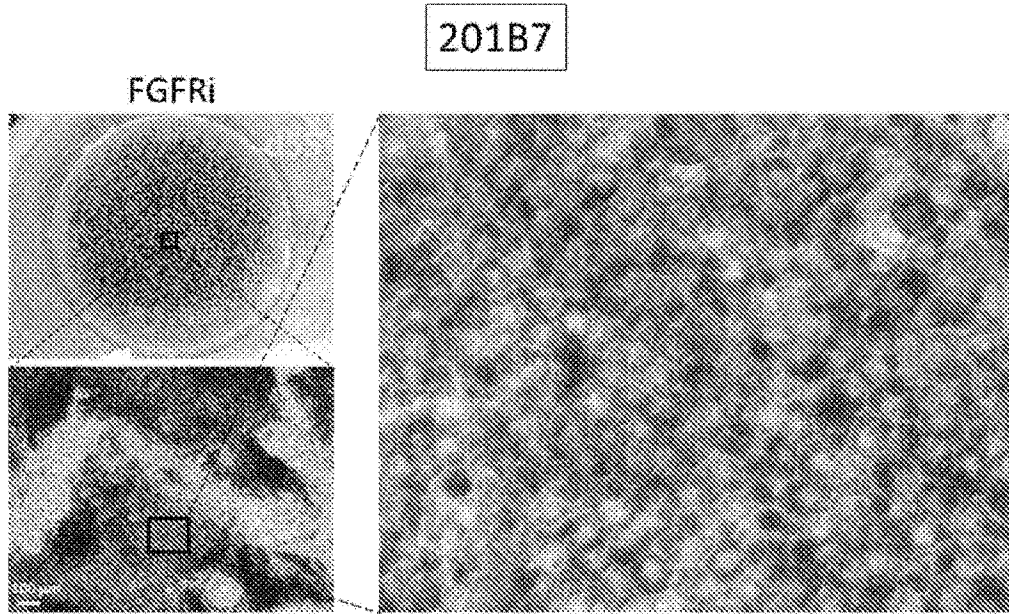
[図3]



[図4]



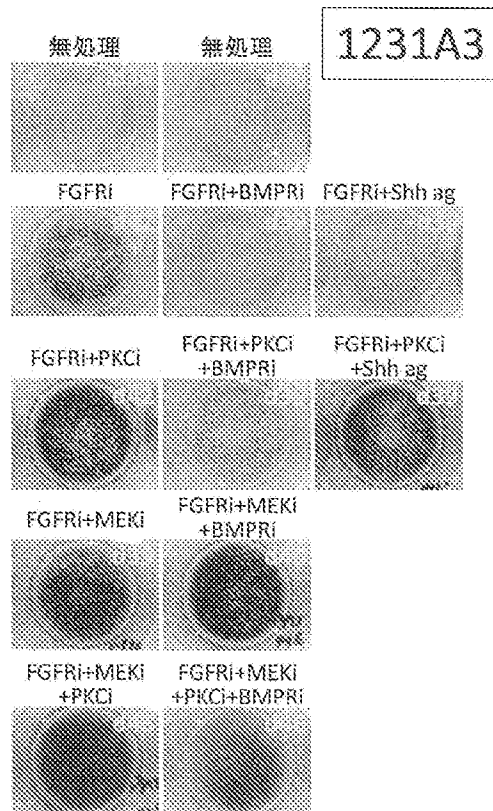
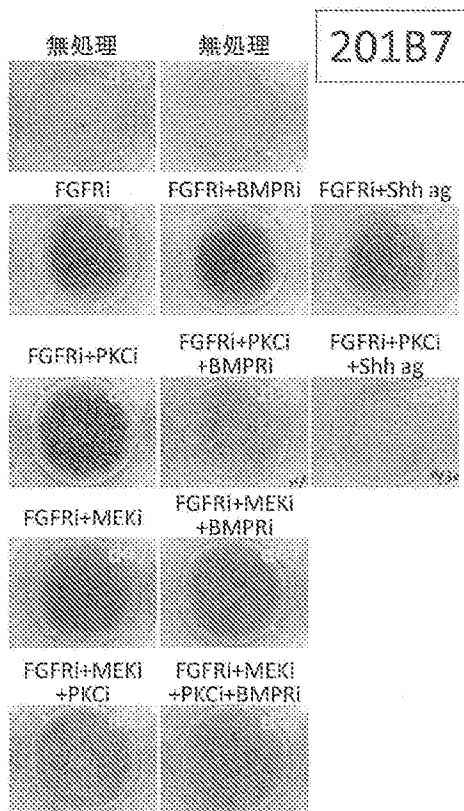
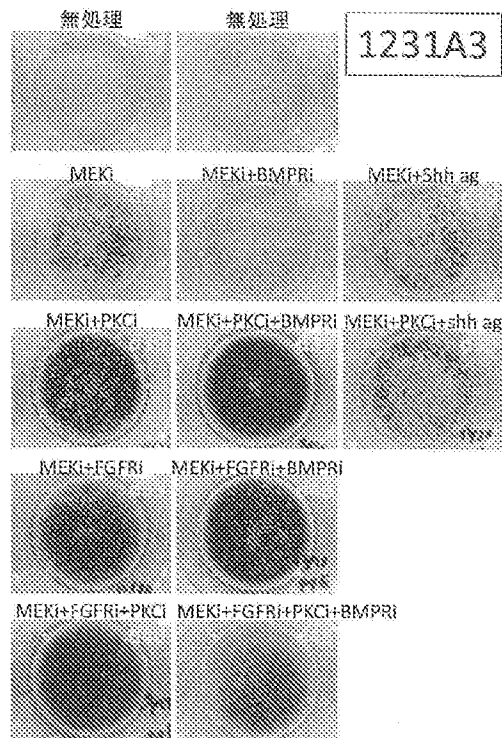
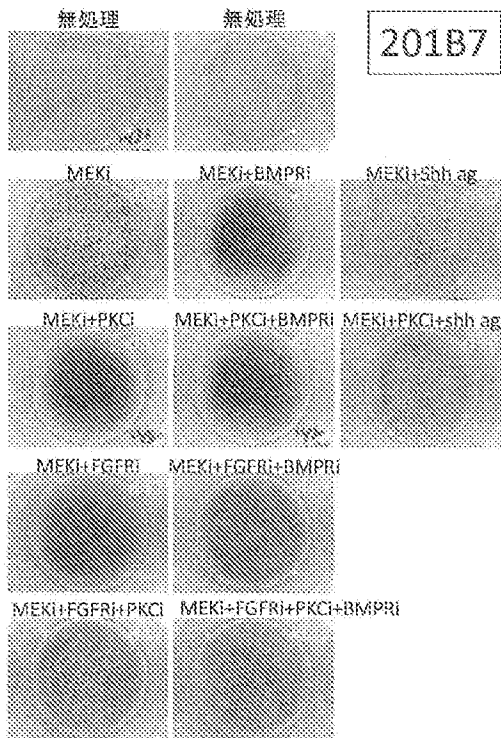
[図5]



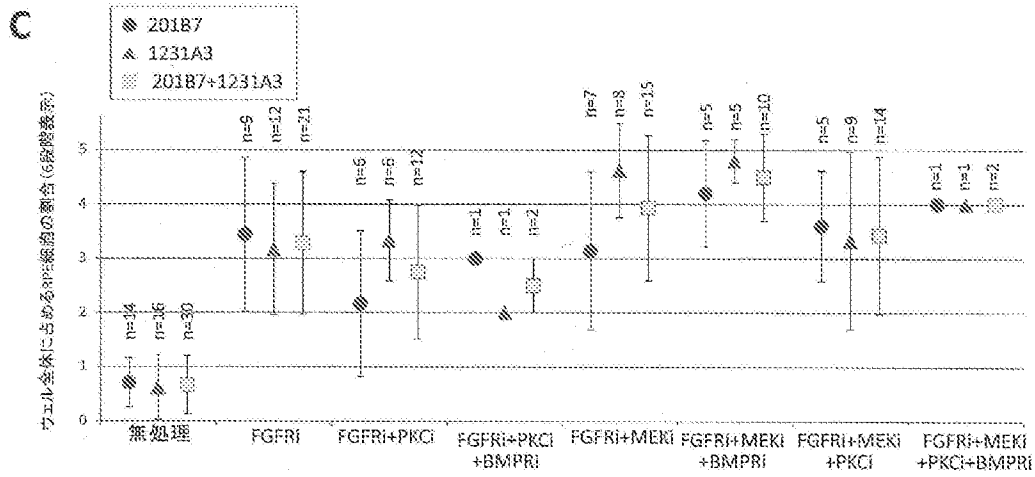
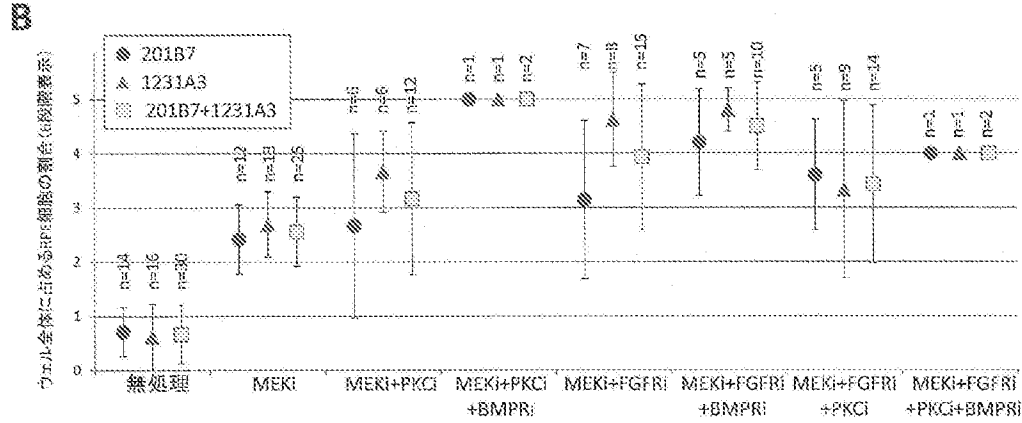
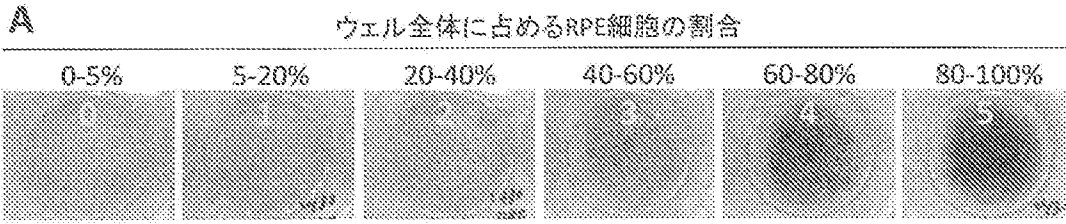
[図6]

細胞株	201B7	1231A3
培地	無処理	無処理
AK03		
Essential 8		
StemSure hPSC Medium Δ w/o bFGF		

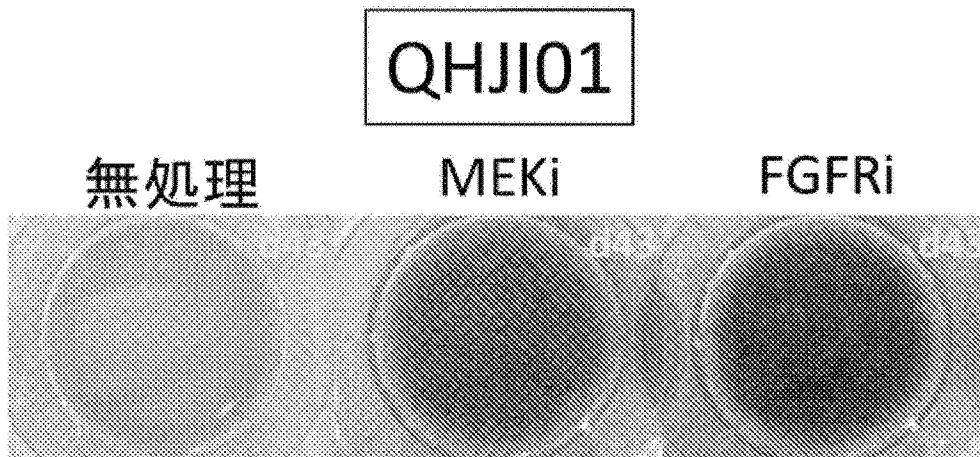
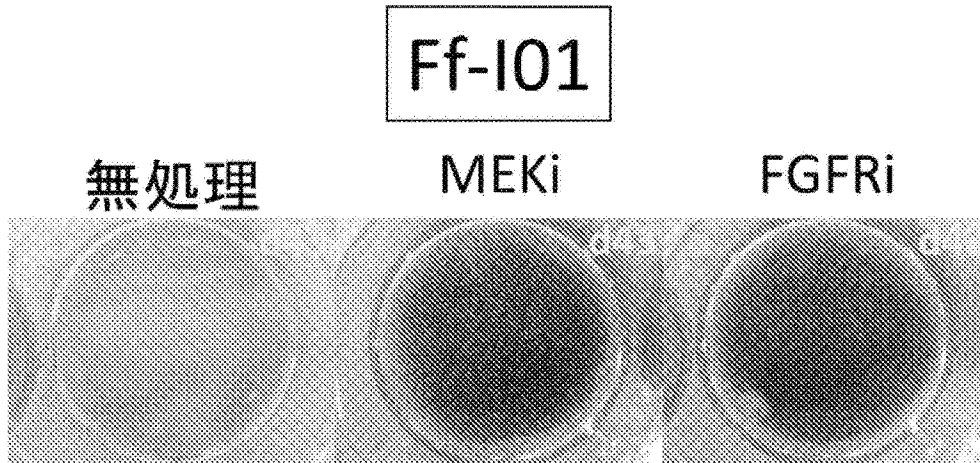
[図7]



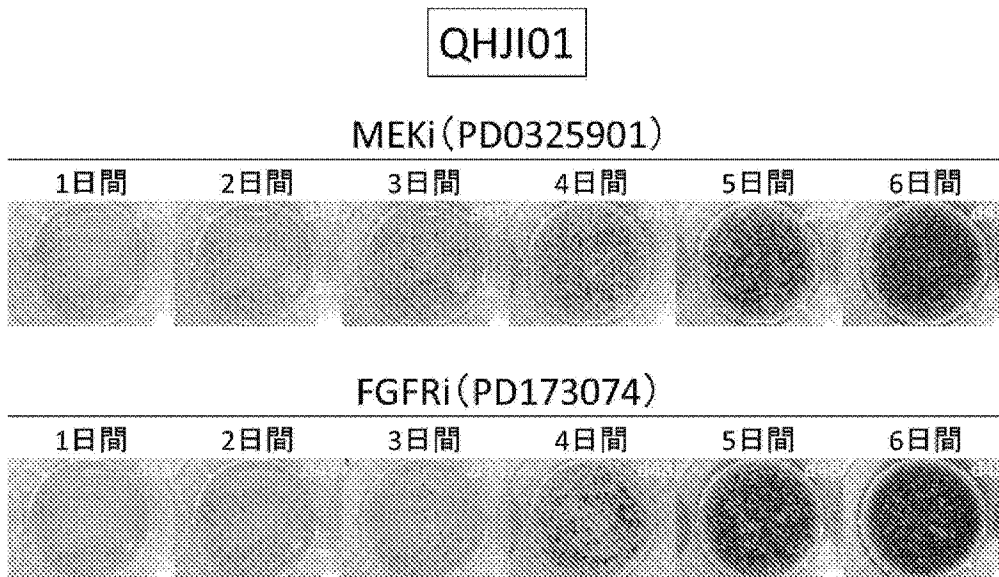
[図8]



[図9]



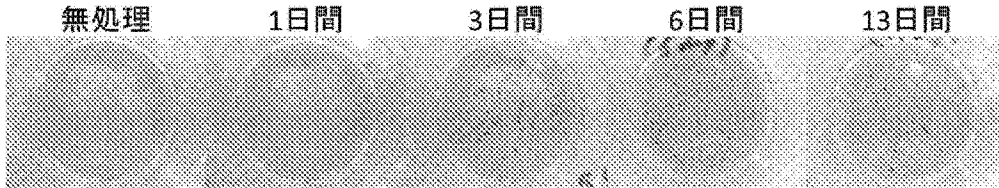
[図10]



[図11]

1231A3

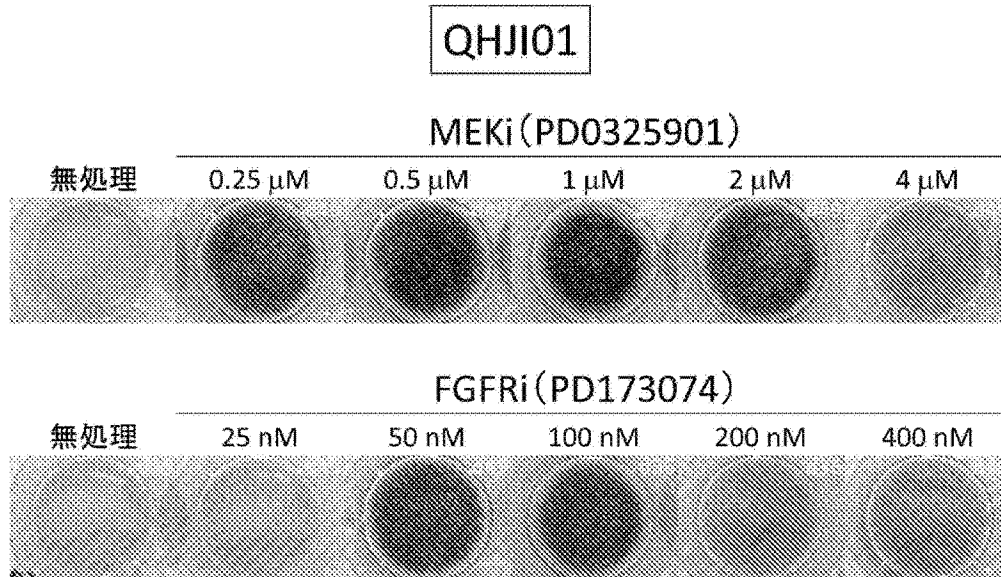
MEKi(PD0325901)



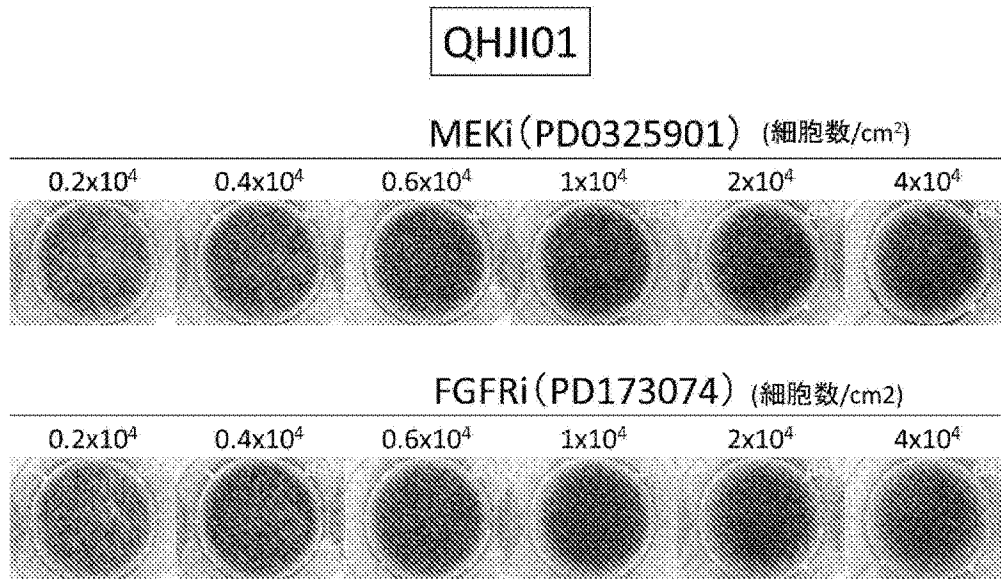
[図12]

品名 品名 品名	0		2		5		5		0		4		1		5	
	個数	質量	個数	質量	個数	質量	個数	質量	個数	質量	個数	質量	個数	質量	個数	質量
PA66 235795.0g	1.0	A	342.5	P	2461.6	P	8152.0	P	93.7	P	2102.1	P	1340.7	P	7586.1	P
PA16 205664.5g	12.5	A	434.0	P	2108.9	P	9210.4	P	164.6	A	2716.6	P	1387.7	P	6747.1	P
EPX2 216140.0g	10.3	A	240.3	P	1161.5	P	35472.9	P	56.8	A	3182.7	P	136.7	A	2584.7	P
EPX2 211215.8g	37.8	A	69.6	A	209.9	P	2941.8	P	10.2	A	375.1	P	81.5	A	414.1	P
SXS 206638.0g	19.7	A	181.0	P	1705.6	P	2275.3	P	282.1	P	275.0	P	1972.3	P	407.4	P
SXS 241254.8g	4.4	A	581.6	P	6001.2	P	7057.9	P	1812.0	P	663.1	P	2801.5	P	1372.6	P

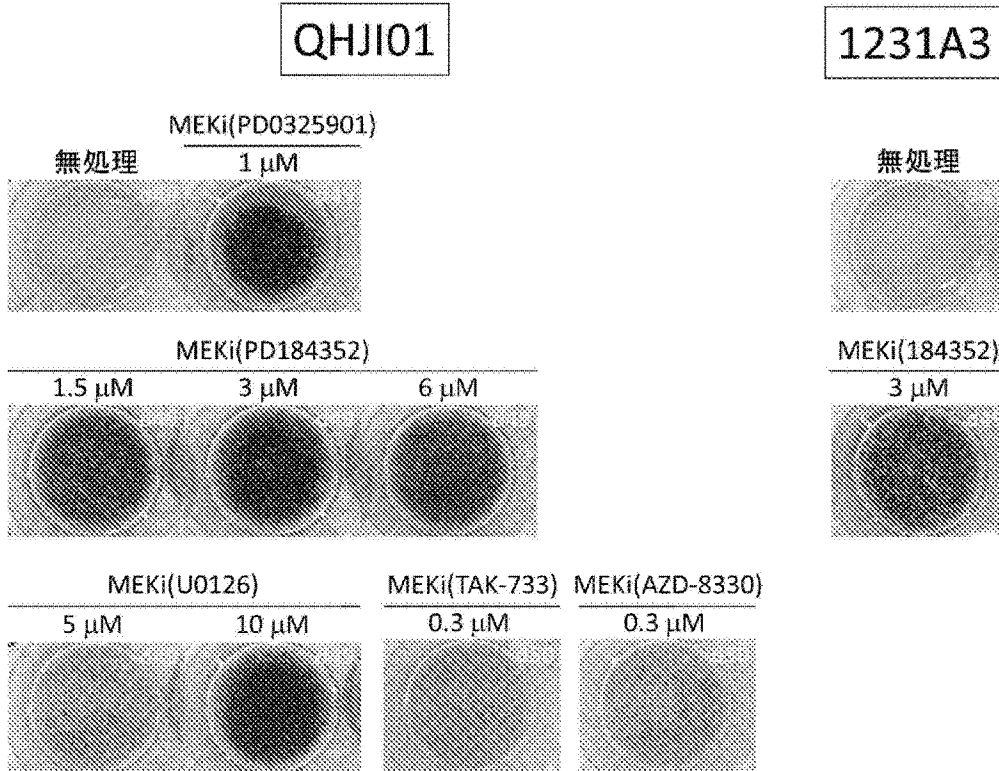
[図13]



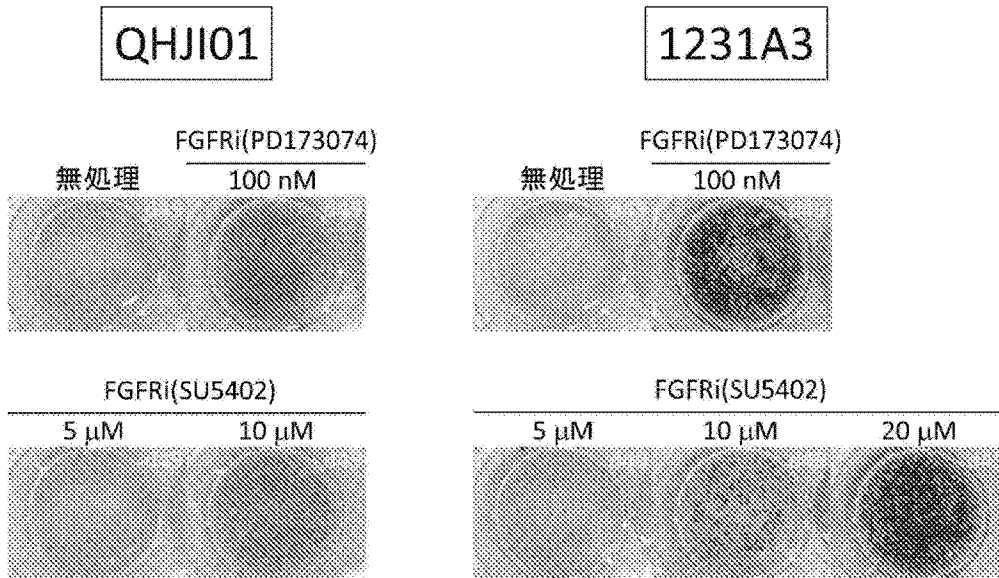
[図14]



[図15]



[図16]



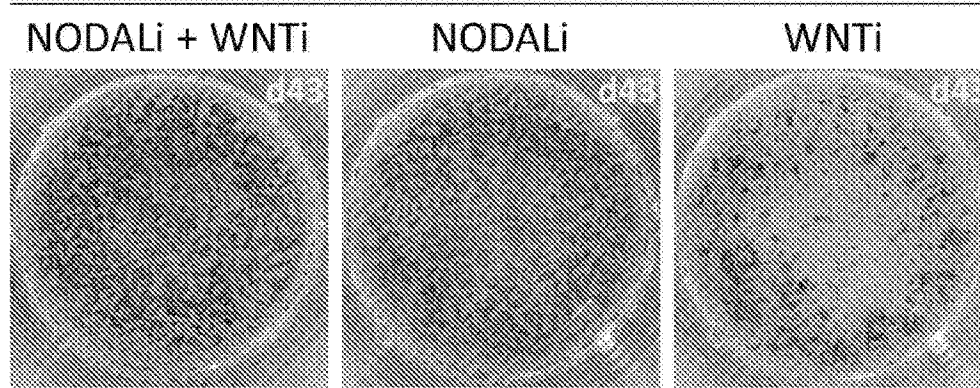
[図17]

QHJI01

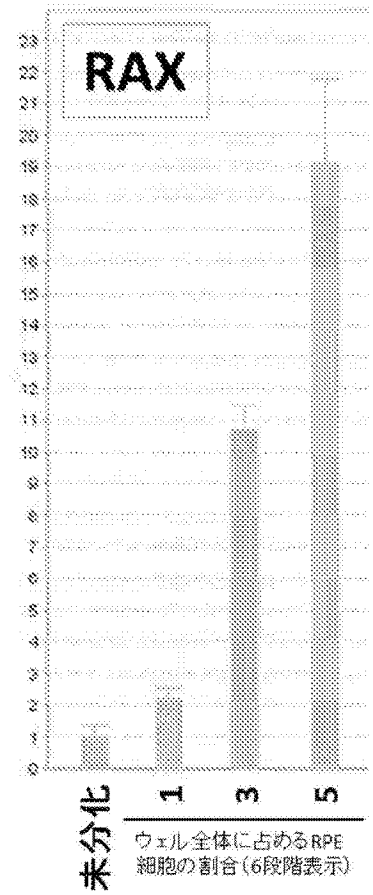
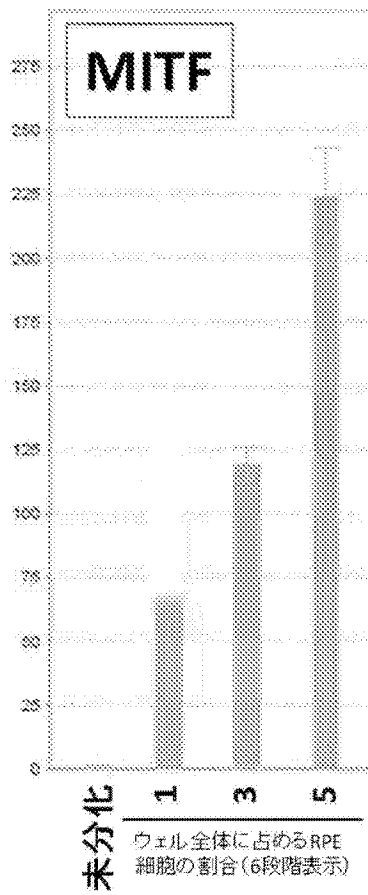
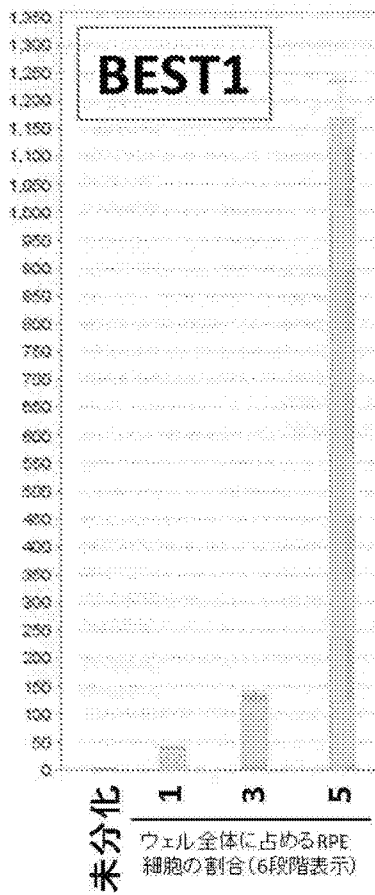
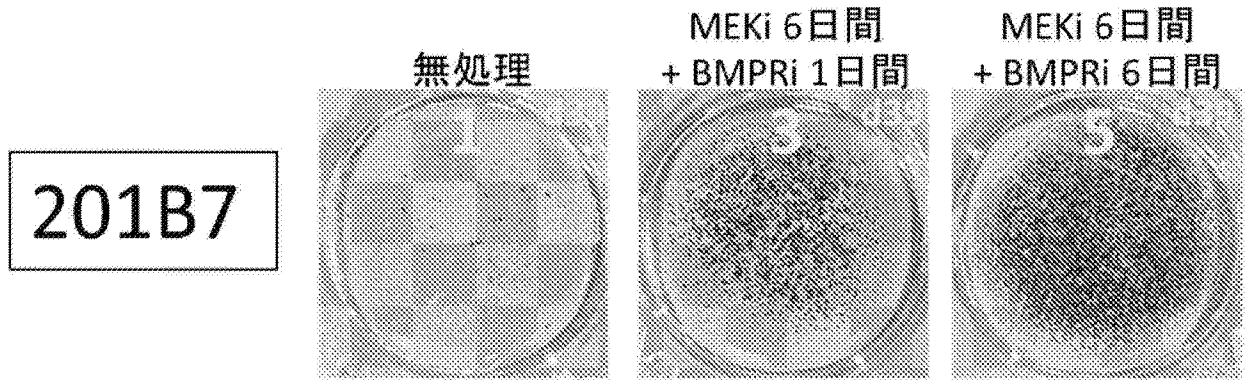
第一工程: MEKi



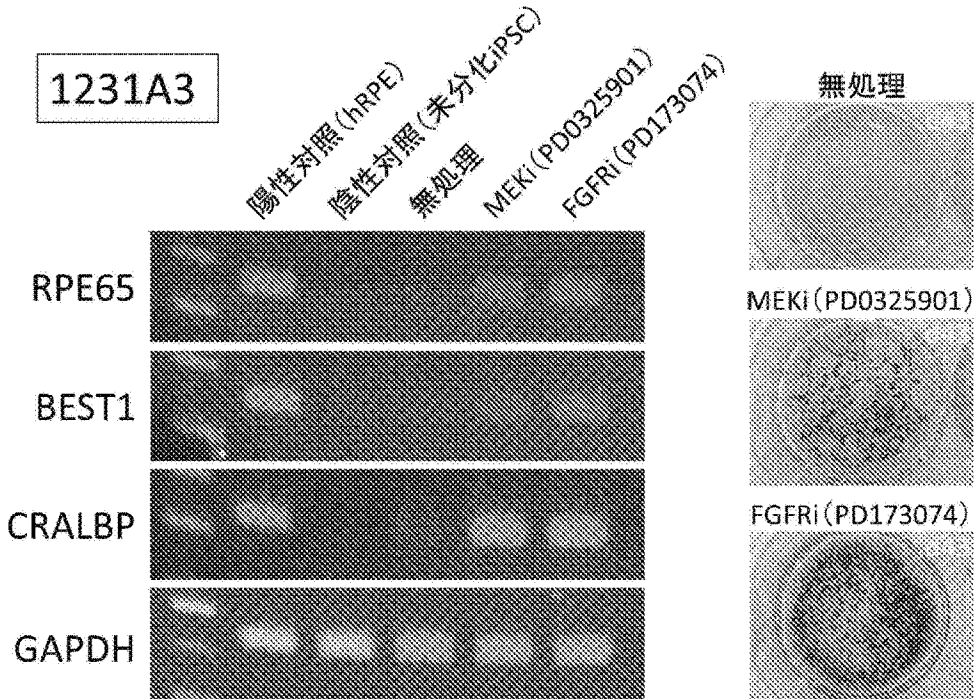
第二工程



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/076524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/071(2010.01)i, A61K35/30(2015.01)i, A61K35/545(2015.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/071, A61K35/30, A61K35/545, A61L27/00, A61P27/02, C12Q1/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014/121077 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES), 07 August 2014 (07.08.2014), claims & JP 2016-512955 A & US 2015/0368713 A1	23-28 1-22
X A	WO 2015/068505 A1 (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 14 May 2015 (14.05.2015), claims & EP 3070162 A1 claims & US 2016/264936 A1 & CA 2930092 A & KR 10-2016-0082248 A	23-28 1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2016 (28.09.16)		Date of mailing of the international search report 11 October 2016 (11.10.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/076524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-519890 A (Kaufman, Dan S.), 16 July 2015 (16.07.2015), paragraph [0085] & US 2013/0287751 A1 paragraph [0133] & WO 2013/163171 A1	19, 20

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61K35/30(2015.01)i, A61K35/545(2015.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/071, A61K35/30, A61K35/545, A61L27/00, A61P27/02, C12Q1/02</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>WO 2014/121077 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2014.08.07, 特許請求の範囲 & JP 2016-512955 A & US 2015/0368713 A1</td> <td>23-28 1-22</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>WO 2015/068505 A1 (住友化学株式会社) 2015.05.14, 特許請求の範囲 & EP 3070162 A1, 特許請求の範囲 & US 2016/264936 A1 & CA 2930092 A & KR 10-2016-0082248 A</td> <td>23-28 1-22</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X A	WO 2014/121077 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2014.08.07, 特許請求の範囲 & JP 2016-512955 A & US 2015/0368713 A1	23-28 1-22	X A	WO 2015/068505 A1 (住友化学株式会社) 2015.05.14, 特許請求の範囲 & EP 3070162 A1, 特許請求の範囲 & US 2016/264936 A1 & CA 2930092 A & KR 10-2016-0082248 A	23-28 1-22	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X A	WO 2014/121077 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2014.08.07, 特許請求の範囲 & JP 2016-512955 A & US 2015/0368713 A1	23-28 1-22										
X A	WO 2015/068505 A1 (住友化学株式会社) 2015.05.14, 特許請求の範囲 & EP 3070162 A1, 特許請求の範囲 & US 2016/264936 A1 & CA 2930092 A & KR 10-2016-0082248 A	23-28 1-22										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>28.09.2016</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>11.10.2016</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>松浦 安紀子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1"> <tr> <td>4N</td> <td>3336</td> </tr> </table>	4N	3336								
4N	3336											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2015-519890 A (カウフマン, ダン エス.) 2015.07.16, 【0085】 & US 2013/0287751 A1 [0133] & WO 2013/163171 A1	19、20