

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6873705号
(P6873705)

(45) 発行日 令和3年5月19日(2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月23日(2021.4.23)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|----------------|-------------------------|---------|-------------|
| C 1 2 N | 5/079 (2010.01) | C 1 2 N | 5/079 Z N A |
| C 1 2 Q | 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02 |
| C 1 2 N | 5/0797 (2010.01) | C 1 2 N | 5/0797 |
| C 1 2 N | 5/0735 (2010.01) | C 1 2 N | 5/0735 |
| C 1 2 N | 5/071 (2010.01) | C 1 2 N | 5/071 |

請求項の数 76 (全 43 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2016-568940 (P2016-568940) | (73) 特許権者 | 514136314 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年5月22日 (2015.5.22) | | ニューヨーク ステム セル ファウンデーション インコーポレイテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2017-524340 (P2017-524340A) | | アメリカ合衆国 10019 ニューヨーク州 ニューヨーク ウェスト フィフティフォース ストリート 619 3階 |
| (43) 公表日 | 平成29年8月31日 (2017.8.31) | (74) 代理人 | 100102978 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2015/032274 | | 弁理士 清水 初志 |
| (87) 国際公開番号 | W02015/179822 | (74) 代理人 | 100102118 |
| (87) 国際公開日 | 平成27年11月26日 (2015.11.26) | | 弁理士 春名 雅夫 |
| 審査請求日 | 平成30年5月15日 (2018.5.15) | (74) 代理人 | 100160923 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/002,048 | | 弁理士 山口 裕孝 |
| (32) 優先日 | 平成26年5月22日 (2014.5.22) | (74) 代理人 | 100119507 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | 弁理士 刑部 俊 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞由来の機能性オリゴデンドロサイト、ならびにその作製方法及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

OLIG2⁺オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の生成方法であって、

a. 以下によって多能性幹細胞(PSC)コロニーを調製する段階；

i. PSCを8,000~11,000細胞/cm²なる低密度で表面上に播種すること；及び

ii. 前記PSCを1~2日間、接着培養することであって、それによりPSCコロニーが調製される、こと；

b. 前記PSCコロニーを、10nM~250nMの低濃度レチノイン酸(RA)と、形質転換増殖因子ベータ(TGF)シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記培養の初日を0日目とする、段階；ならびに

c. コンフルエントな前記細胞を、スムーズドアゴニスト(SAG)及び10nM~250nMの低濃度RAを含む培地中でオーバーコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記細胞がOLIG2を発現する、段階；

を含み、それによりOLIG2⁺OPCが生成される、前記方法。

【請求項2】

d. OLIG2⁺OPCの三次元細胞凝集体を、SAG及び10nM~250nMの低濃度RAを含む培地中で8日間、懸濁培養する段階；

10

20

e. 前記細胞凝集体を、血小板由来増殖因子 (PDGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) 及びニューロトロフィン 3 (NT3) を含む培地中で 10 日間、懸濁培養する段階；

f. 前記細胞凝集体を、スフィア 2 個 / cm^2 の密度でプレートに再播種する段階；ならびに

g. 前記細胞凝集体を、(i) アスコルビン酸 (AA) または (ii) PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含む培地中で、細胞が $\text{O}4^+$ になるまで接着培養する段階；をさらに含み、それにより $\text{O}4^+$ OPC が生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 の非存在下で 3 週間 $\text{O}4^+$ OPC を培養する段階をさらに含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成され、前記オリゴデンドロサイトがミエリン塩基性タンパク質 (MBP)⁺ である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

d. 前記細胞を前記表面から剥離する段階であって、それにより三次元細胞凝集体が形成される、段階；

e. 前記細胞凝集体を、SAG 及び $10\text{ nM} \sim 250\text{ nM}$ の低濃度 RA を含む培地中で 8 日間、懸濁培養する段階；

f. 前記細胞凝集体を、PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含む培地中で 10 日間、懸濁培養する段階；

g. 前記細胞凝集体を、スフィア 2 個 / cm^2 の密度でプレートに再播種する段階；

h. 前記細胞凝集体を、(i) AA または (ii) PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含む培地中で、細胞が $\text{O}4^+$ になるまで接着培養する段階であって、それにより $\text{O}4^+$ OPC が生成される、段階；ならびに

i. 前記 $\text{O}4^+$ OPC を、AA を含むが PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含まない培地中で、細胞が MBP⁺ になるまで培養する段階；をさらに含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、

a. PSC を、(i) 0 日目 ~ 8 日目は二重 SMAD 阻害下で、(ii) 8 日目 ~ 12 日目はソニックヘッジホッグ (SHH) またはスーズンドアゴニストの存在下で、 $10\text{ nM} \sim 250\text{ nM}$ の低濃度 RA を含む培地中で単層接着培養する段階であって、それにより $\text{OLIG}2^+$ 細胞が生成される、段階；

b. 段階 (a) の細胞を、(i) 12 日目 ~ 20 日目は SHH またはスーズンドアゴニスト及び $10\text{ nM} \sim 250\text{ nM}$ の低濃度 RA を含む培地中で、(ii) 20 日目 ~ 30 日目は PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含む培地中で懸濁培養することにより、 $\text{OLIG}2^+$ 細胞を濃縮する段階；

c. 段階 (b) の細胞を、PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含む培地中で 30 日目 ~ 75 日目まで接着培養する段階であって、それにより $\text{O}4^+$ OPC が生成される、段階；ならびに

d. 前記 $\text{O}4^+$ OPC を、AA を含むが PDGF、HGF、IGF-1 及び NT3 を含まない培地中で 75 日目 ~ 95 日目まで接着培養する段階；を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、前記方法。

【請求項 6】

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、：

a. PSC を、(i) 0 日目 ~ 8 日目は二重 SMAD 阻害下で、(ii) 8 日目 ~ 12 日目は SHH またはスーズンドアゴニストの存在下で、 $10\text{ nM} \sim 250\text{ nM}$ の低濃度 RA を含む培地中で単層接着培養する段階であって、それにより $\text{OLIG}2^+$ 細胞が生成される、段階；

b. 段階 (a) の細胞を、(i) 12 日目 ~ 20 日目は SHH またはスーズンドアゴニスト及び $10\text{ nM} \sim 250\text{ nM}$ の低濃度 RA を含む培地中で、(ii) 20 日目 ~ 30

10

20

30

40

50

日目はPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む培地中で懸濁培養することにより、OLIG2⁺細胞を濃縮する段階；ならびに

c. 段階(b)の細胞を、AAを含むがPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない培地中で30日目～60日目まで接着培養する段階；
を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、前記方法。

【請求項7】

前記PSCが胚性幹細胞である、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記PSCが誘導多能性幹細胞(iPSC)である、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項9】

前記iPSCが多発性硬化症患者由来である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記PSCがヒト細胞である、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記表面が基底膜マトリックスを含む、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記PSCが、10,000細胞/cm²で前記表面上に播種される、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項13】

前記PSCコロニーの直径が100μm～250μmである、請求項1または4に記載の方法。

【請求項14】

前記PSCが、rho関連タンパク質キナーゼ(ROCK)の阻害剤を含む培地中で培養される、請求項1、4、5または6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

RAの前記濃度が100nMである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項16】

TGFシグナル伝達の前記阻害剤がSB431542である、請求項1または4に記載の方法。

【請求項17】

BMPシグナル伝達の前記阻害剤がLDN193189である、請求項1または4に記載の方法。

【請求項18】

二重SMAD阻害がSB431542及びLDN193189による、請求項5または6に記載の方法

【請求項19】

コンフルエントな前記細胞がPAX6⁺である、請求項1または4に記載の方法。 40

【請求項20】

前記細胞が8日目までにPAX6⁺になる、請求項5または6に記載の方法。

【請求項21】

SAG及びRAを含む前記培地がSHHを含まない、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

10nM～250nMの低濃度RAを含む前記培地がスムーズンドのアゴニストを含む、請求項5または6に記載の方法。

【請求項23】

- 前記スムーズンドのアゴニストがSAGである、請求項22に記載の方法。
- 【請求項24】
前記細胞が機械的に前記表面から剥離される、請求項4に記載の方法。
- 【請求項25】
前記細胞が酵素的に前記表面から剥離される、請求項4に記載の方法。
- 【請求項26】
前記細胞凝集体をプレートに再播種する段階が、細胞外マトリックスタンパク質及び正荷電ポリアミノ酸を含む表面上で行われる、請求項2～4のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項27】
前記細胞外マトリックスタンパク質がラミニンである、請求項26に記載の方法。 10
- 【請求項28】
前記ポリアミノ酸がポリオルニチンである、請求項26に記載の方法。
- 【請求項29】
段階(c)の前記細胞が、細胞外マトリックスタンパク質及び正荷電ポリアミノ酸を含む表面上で培養される、請求項5または6に記載の方法。
- 【請求項30】
前記細胞外マトリックスタンパク質がラミニンである、請求項29に記載の方法。
- 【請求項31】
前記ポリアミノ酸がポリオルニチンである、請求項29に記載の方法。 20
- 【請求項32】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が更にインスリンを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項33】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が更にトリヨード L サイロニン(T3)を含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項34】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が更にビオチンを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項35】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が更にcAMPを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項36】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)を含まない、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項37】
PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地が上皮増殖因子(EGF)を含まない、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項38】
AAを含む前記培地が更にインスリンを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。 40
- 【請求項39】
AAを含む前記培地が更にT3を含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項40】
AAを含む前記培地が更にビオチンを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項41】
AAを含む前記培地が更にcAMPを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項42】
SAG及びRAを含む前記培地中で培養する前記段階が8日目に開始される、請求項1 50

または 4 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記細胞が 1 2 日目までにオーバーコンフルエントになる、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記懸濁培養する段階が 1 2 日目に開始される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記細胞の少なくとも 5 0 % が 1 2 日目までに O L I G 2 ⁺ になる、請求項 1、5 または 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記細胞の少なくとも 6 0 % が 1 2 日目までに O L I G 2 ⁺ になる、請求項 1、5 または 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記細胞の少なくとも 7 0 % が 1 2 日目までに O L I G 2 ⁺ になる、請求項 1、5 または 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記細胞凝集体が、2 0 日目から、P D G F、H G F、I G F 1 及び N T 3 を含む前記培地中で培養される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記細胞凝集体が 3 0 日目にプレートに播種される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記細胞凝集体が、A A を含むが P D G F、H G F、I G F 1 及び N T 3 を含まない前記培地中で 3 0 日目から培養され、前記細胞の少なくとも 2 5 % が 5 5 日目までに O 4 ⁺ になる、請求項 4 または 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記細胞凝集体が、A A を含むが P D G F、H G F、I G F 1 及び N T 3 を含まない前記培地中で 3 0 日目から培養され、前記細胞の少なくとも 3 0 % が 5 5 日目までに O 4 ⁺ になる、請求項 4 または 6 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記細胞凝集体が、A A を含むが P D G F、H G F、I G F 1 及び N T 3 を含まない前記培地中で 3 0 日目から培養され、前記細胞の少なくとも 4 5 % が 6 3 日目までに O 4 ⁺ になる、請求項 4 または 6 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記細胞凝集体が、A A を含むが P D G F、H G F、I G F 1 及び N T 3 を含まない前記培地中で 3 0 日目から培養され、前記細胞の少なくとも 6 0 % が 7 5 日目までに O 4 ⁺ になる、請求項 4 または 6 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞凝集体が A A を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも 2 5 % が A A を含む前記培地中での 2 5 日間の培養後に O 4 ⁺ になる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記細胞凝集体が A A を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも 3 0 % が A A を含む前記培地中での 2 5 日間の培養後に O 4 ⁺ になる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞凝集体が A A を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも 4 0 % が A A を含む前記培地中での 4 5 日間の培養後に O 4 ⁺ になる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記細胞凝集体が A A を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも 5 0 % が A A を含む前記培地中での 4 5 日間の培養後に O 4 ⁺ になる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞凝集体が A A を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも 6 0 % が A

10

20

30

40

50

Aを含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、請求項2に記載の方法。

【請求項59】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも40%が75日目までにO4⁺になる、請求項4または5に記載の方法。

【請求項60】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも50%が75日目までにO4⁺になる、請求項4または5に記載の方法。

【請求項61】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも60%が75日目までにO4⁺になる、請求項4または5に記載の方法。

【請求項62】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも70%が75日目までにO4⁺になる、請求項4または5に記載の方法。

【請求項63】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも40%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、請求項2に記載の方法。

【請求項64】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも50%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、請求項2に記載の方法。

【請求項65】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも60%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、請求項2に記載の方法。

【請求項66】

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも70%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、請求項2に記載の方法。

【請求項67】

前記O4⁺OPCの少なくとも20%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

前記O4⁺OPCの少なくとも25%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項69】

前記O4⁺OPCの少なくとも30%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

前記O4⁺OPCの少なくとも35%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

10

20

30

40

50

前記細胞の少なくとも20%が60日目にMBP⁺になる、請求項6に記載の方法。

【請求項72】

前記細胞の少なくとも25%が60日目にMBP⁺になる、請求項6に記載の方法。

【請求項73】

前記細胞の少なくとも30%が60日目にMBP⁺になる、請求項6に記載の方法。

【請求項74】

前記細胞の少なくとも25%が60日目にMBP⁺になる、請求項6に記載の方法。

【請求項75】

ミエリン化を促進する化合物の同定方法であって、

a. 請求項3～6のいずれか一項に記載の方法によりオリゴデンドロサイトを生成する段階；

b. 前記オリゴデンドロサイトを候補化合物と接触させる段階；及び

c. 前記候補化合物がニューロンのミエリン化を促進するかどうかを判定する段階を含む、前記方法。

【請求項76】

ハイスループット法である、請求項75に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年5月22日付米国特許仮出願第62/002,048号の優先権の利益を主張するものであり、その内容は参照により本明細書に援用される。

【0002】

本特許文書の開示の一部は著作権保護の対象となる材料を含む。著作権者は、特許商標庁の特許ファイルまたは記録に示してあるように、特許文書または特許開示に関し、いかなる者による複写にも異議はないが、それ以外では、どのようなものでも全ての著作権を保有している。

【0003】

配列表の援用

添付の配列表中の物質は、本明細書では参照により本出願中に取り込まれる。添付の配列を収載しているテキストファイル、ファイル名NYSC1250__1WO__Sequence__Listing__ST25は、2015年5月22日に作成され、2kbである。当該ファイルはWindowsのOSを使用したコンピューター上でMicrosoft Wordを使用して評価することができる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

オリゴデンドロサイトは、脊椎動物に存在する中枢神経系細胞である。オリゴデンドロサイトは、積層された脂質に富むミエリン鞘を生成し、当該ミエリン鞘は、ニューロンの軸索を包んで電気絶縁用の規定のセグメントを形成し、活動電位の伝導速度を最大化する。ミエリンは軸索の完全性及び生存にも重要であり、オリゴデンドロサイトの代謝に影響を与える小さな変化でさえも神経変性を招くことが分かっている。Kassmann, C. M.ら、Nature Genet. 39: 969~976 (2007年) (非特許文献1)。ヒトの脳はミエリン化したニューロン(白質)の含有量が高く、また出生後から生涯を通じてミエリン化が継続することから、ミエリン形成プロセスはヒトにおいて特に重要である。Bartzokis, G., Adolescent Psychiat. 29: 55~96 (2005年) (非特許文献2)。このことは、オリゴデンドロサイトは単に不活性な絶縁体を提供している訳ではなく、むしろミエリン化は認知機能や行動にさえ影響を与える動的なプロセスであることを示唆している。

【0005】

10

20

30

40

50

多発性硬化症 (MS)、副腎白質ジストロフィー、白質消失疾患、ペリツェウス・メルツバッハー病及び白質ジストロフィーは脱髄またはミエリン形成不全障害の例である。また、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病及び統合失調症などの他の多数の神経障害及び神経変性状態において、オリゴデンドロサイトの重要な役割が注目されつつある。Bernstein, H. G. ら、Schizophr. Res. 161: 4~18 (2015年) (非特許文献3); Behrendt, G. ら、Glia 61: 273~286 (2013年) (非特許文献4); Kang, J. ら、Ann. Vasc. Surg. 27: 487~496 (2013年) (非特許文献5); Fennema Notestine, C. ら、Neurology 63: 989~995 (2004年) (非特許文献6)。ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は、インビトロのミエリン化アッセイの開発、ミエリン形成化合物のスクリーニングに用いることが可能であり、最終的には自家細胞補充療法の源になる可能性がある。特に、自家細胞療法のための誘導多能性幹細胞 (iPSC) から患者特異的細胞を生成することは、近年、有望なコンセプトとして注目されつつある。Wang, S. ら、Cell Stem Cell 12: 252~264 (2013年) (非特許文献7); Goldman, S. A. ら、Science 338: 491~495 (2012年) (非特許文献8)。

【0006】

ヒトオリゴデンドロサイトの生物学及びヒトミエリン化の研究は、生検または剖検から得られる初代細胞の利用の制限によって妨げられてきた。この20年間、任意の所望の細胞型を生成することが可能な代替的かつ有用な起源として多能性幹細胞 (PSC) が使用されてきた。これは、胚発生の基本的な段階をインビトロで反復することによって達成された。Irion, S. ら、Cold Spring Harb. Sym. 73: 101~110 (2008年) (非特許文献9)。特に、分化系列決定の重要な経路のほとんどがマウスとヒトの間で高度に保存されており、従って、マウス発生生物学から得られた見識は、ヒトPSC (hPSC) からオリゴデンドロサイトなどの多数の細胞型を生成することに十分に利用されている。Murry, C. E. ら、Cell 132: 661~680 (2008年) (非特許文献10)。

【0007】

マウスでは、オリゴデンドロサイト前駆体は運動ニューロン前駆細胞 (pMN) ドメイン内で発生する。マウス胚発生時にpMNドメインを規定する上で、レチノイン酸 (RA) 経路及びソニックヘッジホッグ (SHH) 経路が重要である。この知見は、インビトロ培養において、神経上皮細胞を、転写因子OLIG2を発現するpMNドメインの前駆細胞に変えるのに活用されてきた。Wichterle, H. ら、Cell 110: 385~397 (2002年) (非特許文献11)。ヒト胚性幹細胞 (hESC) をオリゴデンドロサイトに分化させる方法のほとんどで10 μ Mの濃度のRAが使用されてきた。Izrael, M. ら、Mol. Cell. Neurosci. 34: 310~323 (2007年) (非特許文献12); Nistor, G. I. ら、Glia 49: 385~396 (2005年) (非特許文献13)。Zhang研究室では、OLIG2⁺ NKX2.2⁺ 前駆細胞の誘導と、当該細胞のSOX10、PDGFR、最終的にはO4を発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) への移行にSHHが必要であることを実証した。Hu, B. Y. ら、Development 136: 1443~1452 (2009年a) (非特許文献14)。ヒトモデルでは、マウスモデルと比較してインビトロでのOPCの出現は大幅に緩徐であり; ヒトモデルではOLIG2⁺ 前駆細胞のピークとOPCのピークとの間に10週間もの長い期間がある。Hu, B. Y. ら、Nat. Protoc. 4: 1614~1622 (2009年b)。(非特許文献15)

【0008】

PSCをOPCに分化させるためのプロトコルを考案したグループもいくつかある。Numasawa Kuroiwa, Y. ら; Stem Cell Rep. 2: 648~661 (2014年) (非特許文献16); Stacpoole, S. R. ら、Stem Cell Rep. 1: 437~450 (2013年) (非特許文献17); Wang ら、

10

20

30

40

50

(2013年); Liu, Y. ̄、Nat. Protoc. 6: 640~655 (2011年) (非特許文献18); Sim, F. J. ̄、Nat. Biotechnol. 29: 934~941 (2011年) (非特許文献19)。しかし、これらの分化プロトコルは長く、非効率的であり; その実用的な用途には、O4抗原を発現するOPCを得るのに120日を超える培養期間が必要になるという制限がある。更に、報告されたO4⁺細胞の取得効率は4%~47%の範囲である。また、多くの分化プロトコルは1種または2種のhESC株のみを用いて最適化しており、iPSC株でのその再現性は議論的になっている。Alsanie, W. ̄、Stem Cells Devel. 22: 2459~2476 (2013年) (非特許文献20)。

【0009】

従って、比較的短期間で大量の精製OPCを生成する改良されたオリゴデンドロサイト分化プロトコルが非常に望ましい。更に、このプロトコルは、様々なPSC株に再現性があるべきであり、かつ非常に効率的であるべきである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Kassmann, C. M. ̄、Nature Genet. 39: 969~976 (2007年)

【非特許文献2】Bartzokis, G., Adolescent Psychiat. 29: 55~96 (2005年)

【非特許文献3】Bernstein, H. G. ̄、Schizophr. Res. 161: 4~18 (2015年)

【非特許文献4】Behrendt, G. ̄、Glia 61: 273~286 (2013年)

【非特許文献5】Kang, J. ̄、Ann. Vasc. Surg. 27: 487~496 (2013年)

【非特許文献6】Fennema Notestine, C. ̄、Neurology 63: 989~995 (2004年)

【非特許文献7】Wang, S. ̄、Cell Stem Cell 12: 252~264 (2013年)

【非特許文献8】Goldman, S. A. ̄、Science 338: 491~495 (2012年)

【非特許文献9】Irion, S. ̄、Cold Spring Harb. Sym. 73: 101~110 (2008年)

【非特許文献10】Murry, C. E. ̄、Cell 132: 661~680 (2008年)

【非特許文献11】Wichterle, H. ̄、Cell 110: 385~397 (2002年)

【非特許文献12】Israel, M. ̄、Mol. Cell. Neurosci. 34: 310~323 (2007年)

【非特許文献13】Nistor, G. I. ̄、Glia 49: 385~396 (2005年)

【非特許文献14】Hu, B. Y. ̄、Development 136: 1443~1452 (2009年a)

【非特許文献15】Hu, B. Y. ̄、Nat. Protoc. 4: 1614~1622 (2009年b)。

【非特許文献16】Numasawa Kuroiwa, Y. ̄; Stem Cell Rep. 2: 648~661 (2014年)

【非特許文献17】Stacpoole, S. R. ̄、Stem Cell Rep. 1: 437~450 (2013年)

10

20

30

40

50

【非特許文献18】Liu, Y. *ら*, Nat. Protoc. 6: 640~655 (2011年)

【非特許文献19】Sim, F. J. *ら*, Nat. Biotechnol. 29: 934~941 (2011年)

【非特許文献20】Alsanie, W. *ら*, Stem Cells Devel. 22: 2459~2476 (2013年)

【発明の概要】

【0011】

本発明の主な態様のいくつかを以下にまとめている。更なる態様は、本開示の発明の詳細な説明、実施例、図面、及び特許請求の範囲の項で説明している。本開示の各項における説明は、他の項と併せて読むように意図されている。更に、本開示の各項で説明した様々な実施形態は多様な異なる方法で組み合わせることが可能であり、全てのこのような組み合わせは本発明の範囲内に収まるように意図されている。

10

【0012】

本発明は、75日以内に40%~70%のO4⁺OPCを生成する安定的な分化プロトコルを提供する。Douvaras, P. *ら*, Stem Cell Rep. 3: 250~259 (2014年) (その全体が参照により本明細書に取り込まれる)。また、大幅なコスト削減をもたらす、分化のわずか55日後に約30%のO4⁺OPCを得るための戦略も提供する。Douvaras, P. *ら*, Nat. Protoc. (2015年) (その全体が参照により本明細書に取り込まれる)。精製されるとO4⁺細胞は移植可能になり、シバラー (shi/shi) マウスモデルへの短期間 (16週) 移植研究では、ヒト胎児OPCに匹敵するミエリン化能力を示している。PDGFR よりむしろO4を発現する段階で蛍光活性化細胞選別 (FACS) によりOPCを精製し、それにより混入細胞が除かれて腫瘍形成の可能性が最小限になる。本発明者らのプロトコルは9株を超えるhPSC株を用いて検証され、各株で非常に一貫した結果が見られた。従って、本発明は、胚性幹細胞 (ESC) 及びiPSCを含むPSCからOPC及び成熟オリゴデンドロサイトを効率的に誘導する再現性の高いプロトコルを提供する。

20

【0013】

一態様では、本発明はOLIG2⁺OPCを生成する方法を提供するものであり、該方法は、(a) (i) PSCを低密度で表面上に播種すること、及び(ii) 前記PSCを1~2日間接着培養することにより、PSCコロニーを調製する段階；(b) 前記PSCコロニーを、低濃度RAと、形質転換増殖因子ベータ (TGF β) シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記培養の初日を0日目とする、段階；(c) コンフルエントな前記細胞を、スムーズドアゴニスト (SAG; 3-クロロ-N[(1*r*, 4*r*)-4-(メチルアミノ)シクロヘキシル]-N-[3-(ピリジン-4-イル)ベンジル]ベンゾ[*b*]チオフェン-2-カルボキシアミド) 及び低濃度RAを含む培地中でオーバーコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記細胞がOLIG2を発現する、段階；を含み、それによりOLIG2⁺OPCが生成される。

30

40

【0014】

別の態様では、本発明はO4⁺OPCを生成する方法を提供するものであり、該方法は、(a) OLIG2⁺OPCの3次元細胞凝集体を、スムーズドのアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で約8日間、懸濁培養する段階；(b) 前記細胞凝集体を、血小板由来増殖因子 (PDGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様増殖因子1 (IGF-1)、ニューロトロフィン3 (NT3) を含む培地中で約10日間、懸濁培養する段階；(c) 該細胞凝集体をスフィア2個/cm²の密度でプレートに再播種する段階；(d) 該細胞凝集体を(i) アスコルビン酸 (AA) または(ii) PDGF、HGF、IGF-1及びNT3を含む培地中で、細胞がO4⁺になるまで接着培養する段階；を含み、それによりO4⁺OPCが生成される。O4⁺OPCをPDGF、HGF、IGF-1及

50

びNT3の非存在下で約3週間培養することにより成熟オリゴデンドロサイトを生成することができ；それによりミエリン塩基性タンパク質(MBP⁺)を発現するオリゴデンドロサイトが生成される。

【0015】

更なる態様では、本発明はオリゴデンドロサイトを生成する方法を提供するものであり、該方法は、(a)(i)PSCを低密度で表面上に播種すること、及び(ii)前記PSCを1~2日間接着培養することにより、PSCコロニーを調製する段階；(b)前記PSCコロニーを、低濃度RAと、TGFシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、BMPシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記培養の初日を0日目とする、段階；(c)コンフルエントな前記細胞を、スムーズドアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中でオーバーコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記細胞がOLIG2⁺OPCである、段階；(d)前記細胞を前記表面から剥離する段階であって、それにより3次元細胞凝集体が形成される、段階；(e)前記細胞凝集体を、スムーズドのアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で約8日間、懸濁培養する段階；(f)前記細胞凝集体を、PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中で約10日間、懸濁培養する段階；(g)前記細胞凝集体をスフィア2個/cm²の密度でプレートに再播種する段階；(h)前記細胞凝集体を(i)AAまたは(ii)PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中で、細胞がO4⁺になるまで接着培養する段階であって、それによりO4⁺OPCが生成される、段階；ならびに(i)O4⁺OPCを、AAを含むがPDGF、HGF、IGF1及びNT3を含まない培地中で、細胞がMBP⁺になるまで培養する段階；を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される。

【0016】

本発明の別の態様は、オリゴデンドロサイトを生成する方法であり、該方法は、(a)PSCを、(i)0日目~8日目は二重SMAD阻害下で、(ii)8日目~12日目はSHHまたはスムーズドアゴニストの存在下で、低濃度RAを含む培地中で単層接着培養する段階であって、それによりOLIG2⁺細胞が生成される、段階；(b)段階(a)の細胞を、(i)12日目~20日目はSHHまたはスムーズドアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で、(ii)20日目~30日目はPDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中で懸濁培養することにより、OLIG2⁺細胞を濃縮する段階；(c)段階(b)の細胞を、PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中で30日目~75日目まで接着培養する段階であって、それによりO4⁺OPCが生成される、段階；ならびに(d)O4⁺OPCを、AAを含むがPDGF、HGF、IGF1及びNT3を含まない培地中で75日目~95日目まで接着培養する段階；を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される。

【0017】

本発明の更なる態様は、オリゴデンドロサイトを生成する方法であり、該方法は、(a)PSCを、(i)0日目~8日目は二重SMAD阻害下で、(ii)8日目~12日目はSHHまたはスムーズドアゴニストの存在下で、低濃度RAを含む培地中で単層接着培養する段階であって、それによりOLIG2⁺細胞が生成される、段階；(b)段階(a)の細胞を、(i)12日目~20日目はSHHまたはスムーズドアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で、(ii)20日目~30日目はPDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中で懸濁培養することにより、OLIG2⁺細胞を濃縮する段階；ならびに(c)段階(b)の細胞を、AAを含むがPDGF、HGF、IGF1及びNT3を含まない培地中で30日目~60日目まで接着培養する段階；を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される。

【0018】

また、ミエリン化を促進する化合物を同定する方法も提供し、該方法は、(a)本発明の方法によりオリゴデンドロサイトを生成する段階；(b)前記オリゴデンドロサイトを候補化合物と接触させる段階；及び(c)前記候補化合物がニューロンのミエリン化を促

10

20

30

40

50

進するかどうかを判定する段階；を含む。

【0019】

別の実施形態は、対象の神経疾患または障害を治療する方法であり、該方法は、(a) 本発明の方法によりオリゴデンドロサイトを生成する段階；(b) 有効量のオリゴデンドロサイトを対象に投与する段階；を含み、前記オリゴデンドロサイトが前記対象の神経系のミエリン形成を促進し、それにより前記対象の神経疾患が治療される。

【0020】

本発明は、本発明の方法により生成されたオリゴデンドロサイト前駆細胞及びオリゴデンドロサイト、ならびにそれらを含む非ヒト哺乳動物も包含する。

以下に、本発明の基本的な諸特徴および種々の態様を列挙する。

[1]

OLIG2⁺オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の生成方法であって、

a. 以下によって多能性幹細胞(PSC)コロニーを調製する段階；

i. PSCを低密度で表面上に播種すること；及び

ii. 前記PSCを1~2日間、接着培養することであって、それによりPSCコロニーが調製される、こと；

b. 前記PSCコロニーを、低濃度レチノイン酸(RA)と、形質転換増殖因子ベータ(TGF β)シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記培養の初日を0日目とする、段階；ならびに

c. コンフルエントな前記細胞を、スムーズドアゴニスト(SAG)及び低濃度RAを含む培地中でオーバーコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記細胞がOLIG2を発現する、段階；

を含み、それによりOLIG2⁺OPCが生成される、前記方法。

[2]

O4⁺オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の生成方法であって、

a. OLIG2⁺OPCの三次元細胞凝集体を、SAG及び低濃度RAを含む培地中で約8日間、懸濁培養する段階；

b. 前記細胞凝集体を、血小板由来増殖因子(PDGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)及びニューロトロフィン3(NT3)を含む培地中で約10日間、懸濁培養する段階；

c. 前記細胞凝集体を、スフィア2個/cm²の密度でプレートに再播種する段階；ならびに

d. 前記細胞凝集体を、(i)アスコルビン酸(AA)または(ii)PDGF、HGF、IGF-1及びNT3を含む培地中で、細胞がO4⁺になるまで接着培養する段階；を含み、それによりO4⁺OPCが生成される、前記方法。

[3]

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、[2]の方法に従ってO4⁺OPCを生成する段階；ならびに前記O4⁺OPCをPDGF、HGF、IGF-1及びNT3の非存在下で約3週間培養する段階；を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成され、前記オリゴデンドロサイトがミエリン塩基性タンパク質(MBP)⁺である、前記方法。

[4]

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、

a. 以下によってPSCコロニーを調製する段階；

i. PSCを低密度で表面上に播種すること；及び

ii. 前記PSCを1~2日間、接着培養することであって、それによりPSCコロニーが調製される、こと；

b. 前記PSCコロニーを、低濃度RAと、TGF β シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、BMPシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記培養の初日を0日目とする、段階；

10

20

30

40

50

c . コンフルエントな前記細胞を、S A G及び低濃度R Aを含む培地中でオーバーコンフルエントになるまで培養する段階であって、前記細胞がO L I G 2 ⁺ O P Cである、段階；

d . 前記細胞を前記表面から剥離する段階であって、それにより三次元細胞凝集体が形成される、段階；

e . 前記細胞凝集体を、S A G及び低濃度R Aを含む培地中で約8日間、懸濁培養する段階；

f . 前記細胞凝集体を、P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む培地中で約10日間、懸濁培養する段階；

g . 前記細胞凝集体を、スフィア2個/cm²の密度でプレートに再播種する段階；

h . 前記細胞凝集体を、(i) A Aまたは(i i) P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む培地中で、細胞がO 4 ⁺になるまで接着培養する段階であって、それによりO 4 ⁺ O P Cが生成される、段階；ならびに

i . 前記O 4 ⁺ O P Cを、A Aを含むがP D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含まない培地中で、細胞がM B P ⁺になるまで培養する段階；
を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、前記方法。

[5]

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、

a . P S Cを、(i) 0日目～8日目は二重S M A D阻害下で、(i i) 8日目～12日目はソニックヘッジホッグ(S H H)またはスムーズドアゴニストの存在下で、低濃度R Aを含む培地中で単層接着培養する段階であって、それによりO L I G 2 ⁺細胞が生成される、段階；

b . 段階(a)の細胞を、(i) 12日目～20日目はS H Hまたはスムーズドアゴニスト及び低濃度R Aを含む培地中で、(i i) 20日目～30日目はP D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む培地中で懸濁培養することにより、O L I G 2 ⁺細胞を濃縮する段階；

c . 段階(b)の細胞を、P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む培地中で30日目～75日目まで接着培養する段階であって、それによりO 4 ⁺ O P Cが生成される、段階；ならびに

d . 前記O 4 ⁺ O P Cを、A Aを含むがP D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含まない培地中で75日目～95日目まで接着培養する段階；
を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、前記方法。

[6]

オリゴデンドロサイトの生成方法であって、：

a . P S Cを、(i) 0日目～8日目は二重S M A D阻害下で、(i i) 8日目～12日目はS H Hまたはスムーズドアゴニストの存在下で、低濃度R Aを含む培地中で単層接着培養する段階であって、それによりO L I G 2 ⁺細胞が生成される、段階；

b . 段階(a)の細胞を、(i) 12日目～20日目はS H Hまたはスムーズドアゴニスト及び低濃度R Aを含む培地中で、(i i) 20日目～30日目はP D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む培地中で懸濁培養することにより、O L I G 2 ⁺細胞を濃縮する段階；ならびに

c . 段階(b)の細胞を、A Aを含むがP D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含まない培地中で30日目～60日目まで接着培養する段階；
を含み、それによりオリゴデンドロサイトが生成される、前記方法。

[7]

前記P S Cが胚性幹細胞である、[1]、[4]、[5]または[6]のいずれかの方法。

[8]

前記P S Cが誘導多能性幹細胞(i P S C)である、[1]、[4]、[5]または[6]のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[9]

前記 iPSC が多発性硬化症患者由来である、[8] の方法。

[10]

前記 PSC がヒト細胞である、[1]、[4]、[5] または [6] のいずれかの方法。

[11]

前記表面が基底膜マトリックスを含む、[1]、[4]、[5] または [6] のいずれかの方法。

[12]

前記 PSC が、約 $10,000$ 細胞 / cm^2 で前記表面上に播種される、[1]、[4]、[5] または [6] のいずれかの方法。

10

[13]

前記 PSC コロニーの直径が約 $100 \mu\text{m}$ ~ 約 $250 \mu\text{m}$ である、[1] または [4] の方法。

[14]

前記 PSC が、rho 関連タンパク質キナーゼ (ROCK) の阻害剤を含む培地中で培養される、[1]、[4]、[5] または [6] のいずれかの方法。

[15]

RA の前記濃度が 100nM である、[1] ~ [6] のいずれかの方法。

[16]

TGF β シグナル伝達の前記阻害剤が SB431542 である、[1] または [4] の方法。

20

[17]

BMP シグナル伝達の前記阻害剤が LDN193189 である、[1] または [4] の方法。

[18]

二重 SMAD 阻害が SB431542 及び LDN193189 による、[5] または [6] の方法。

[19]

コンフルエントな前記細胞が PAX6⁺ である、[1] または [4] の方法。

30

[20]

前記細胞が 8 日目までに PAX6⁺ になる、[5] または [6] の方法。

[21]

SAG 及び RA を含む前記培地が SHH を含まない、[1] ~ [4] のいずれかの方法。

[22]

低濃度 RA を含む前記培地がスムーズドのアゴニストを含む、[5] または [6] の方法。

[23]

前記スムーズドのアゴニストが SAG である、[22] の方法。

40

[24]

前記細胞が機械的に前記表面から剥離される、[4] の方法。

[25]

前記細胞が酵素的に前記表面から剥離される、[4] の方法。

[26]

前記細胞凝集体をプレートに再播種する段階が、細胞外マトリックスタンパク質及び正荷電ポリアミノ酸を含む表面上で行われる、[2] ~ [4] のいずれかの方法。

[27]

前記細胞外マトリックスタンパク質がラミニンである、[26] の方法。

[28]

50

- 前記ポリアミノ酸がポリオルニチンである、[2 6]の方法。
- [2 9]
段階 (c) の前記細胞が、細胞外マトリックスタンパク質及び正荷電ポリアミノ酸を含む表面上で培養される、[5]または[6]の方法。
- [3 0]
前記細胞外マトリックスタンパク質がラミニンである、[2 9]の方法。
- [3 1]
前記ポリアミノ酸がポリオルニチンである、[2 9]の方法。
- [3 2]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が更にインスリンを含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。 10
- [3 3]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が更にトリヨード L サイロニン (T 3) を含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [3 4]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が更にビオチンを含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [3 5]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が更に c A M P を含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。 20
- [3 6]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が塩基性繊維芽細胞増殖因子 (b F G F) を含まない、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [3 7]
P D G F、H G F、I G F 1及びN T 3を含む前記培地が上皮増殖因子 (E G F) を含まない、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [3 8]
A Aを含む前記培地が更にインスリンを含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [3 9]
A Aを含む前記培地が更に T 3 を含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。 30
- [4 0]
A Aを含む前記培地が更にビオチンを含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [4 1]
A Aを含む前記培地が更に c A M P を含む、[2] ~ [6]のいずれかの方法。
- [4 2]
S A G及びR Aを含む前記培地中で培養する前記段階が8日目に開始される、[1]または[4]の方法。
- [4 3]
前記細胞が12日目までにオーバーコンフルエントになる、[1]または[4]の方法。 40
- [4 4]
前記懸濁培養する段階が12日目に開始される、[4]の方法。
- [4 5]
前記細胞の少なくとも50%が12日目までにO L I G 2 +になる、[1]、[5]または[6]のいずれかの方法。
- [4 6]
前記細胞の少なくとも60%が12日目までにO L I G 2 +になる、[1]、[5]または[6]のいずれかの方法。
- [4 7]
前記細胞の少なくとも70%が12日目までにO L I G 2 +になる、[1]、[5]ま 50

たは [6] のいずれかの方法。

[4 8]

前記細胞凝集体が、20日目から、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養される、[4]の方法。

[4 9]

前記細胞凝集体が30日目にプレートに播種される、[4]の方法。

[5 0]

前記細胞凝集体が、AAを含むがPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも25%が55日目までにO4⁺になる、[4]または[6]の方法。

10

[5 1]

前記細胞凝集体が、AAを含むがPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも30%が55日目までにO4⁺になる、[4]または[6]の方法。

[5 2]

前記細胞凝集体が、AAを含むがPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも45%が63日目までにO4⁺になる、[4]または[6]の方法。

[5 3]

前記細胞凝集体が、AAを含むがPDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも60%が75日目までにO4⁺になる、[4]または[6]の方法。

20

[5 4]

前記細胞凝集体がAAを含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも25%がAAを含む前記培地中での25日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[5 5]

前記細胞凝集体がAAを含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも30%がAAを含む前記培地中での25日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[5 6]

前記細胞凝集体がAAを含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも40%がAAを含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

30

[5 7]

前記細胞凝集体がAAを含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも50%がAAを含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[5 8]

前記細胞凝集体がAAを含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも60%がAAを含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[5 9]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも40%が75日目までにO4⁺になる、[4]または[5]の方法。

40

[6 0]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも50%が75日目までにO4⁺になる、[4]または[5]の方法。

[6 1]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも60%が75日目までにO4⁺になる、[4]または[5]の方法。

[6 2]

50

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で30日目から培養され、前記細胞の少なくとも70%が75日目までにO4⁺になる、[4]または[5]の方法。

[63]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも40%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[64]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも50%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

10

[65]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも60%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[66]

前記細胞凝集体が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中で培養され、前記細胞の少なくとも70%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含む前記培地中での45日間の培養後にO4⁺になる、[2]の方法。

[67]

前記O4⁺OPCの少なくとも20%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、[3]~[5]のいずれかの方法。

20

[68]

前記O4⁺OPCの少なくとも25%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、[3]~[5]のいずれかの方法。

[69]

前記O4⁺OPCの少なくとも30%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、[3]~[5]のいずれかの方法。

30

[70]

前記O4⁺OPCの少なくとも35%が、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない前記培地中での20日間の培養後にMBP⁺になる、[3]~[5]のいずれかの方法。

[71]

前記細胞の少なくとも20%が60日目にMBP⁺になる、[6]の方法。

[72]

前記細胞の少なくとも25%が60日目にMBP⁺になる、[6]の方法。

[73]

前記細胞の少なくとも30%が60日目にMBP⁺になる、[6]の方法。

40

[74]

前記細胞の少なくとも25%が60日目にMBP⁺になる、[6]の方法。

[75]

ミエリン化を促進する化合物の同定方法であって、
a. [3]~[6]のいずれかの方法によりオリゴデンドロサイトを生成する段階；
b. 前記オリゴデンドロサイトを候補化合物と接触させる段階；及び
c. 前記候補化合物がニューロンのミエリン化を促進するかどうかを判定する段階を含む、前記方法。

[76]

50

ハイスループット法である、[7 5]の方法。

[7 7]

対象における神経疾患または障害の治療方法であって、

a . [3] ~ [6] のいずれかの方法によりオリゴデンドロサイトを生成する段階；及
び

b . 有効量の前記オリゴデンドロサイトを前記対象に投与する段階であって、前記オリ
ゴデンドロサイトが前記対象の神経系においてミエリン形成を促進する、段階
を含み、それにより前記対象における前記神経疾患が治療される、前記方法。

[7 8]

前記神経疾患または障害が脱髄疾患またはミエリン形成不全疾患である、[7 7]の方
法。

10

[7 9]

前記脱髄疾患が多発性硬化症である、[7 8]の方法。

[8 0]

前記脱髄疾患が一次進行型多発性硬化症である、[7 8]の方法。

[8 1]

前記神経疾患または障害が神経変性疾患である、[7 7]の方法。

[8 2]

前記 P S C が前記対象の体細胞から生成された誘導多能性幹細胞 (i P S C) である、
[7 7]の方法。

20

[8 3]

[1] または [2] の方法により生成された、オリゴデンドロサイト前駆細胞。

[8 4]

[3] ~ [6] のいずれかの方法により生成された、オリゴデンドロサイト。

[8 5]

[1] または [2] の方法により生成されたオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む、非
ヒト哺乳動物。

[8 6]

[3] ~ [6] のいずれかの方法により生成されたオリゴデンドロサイトを含む、非ヒ
ト哺乳動物。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】 選択肢 A (図 1 A) 及び選択肢 B (図 1 B) に従ったオリゴデンドロサイト分化のタイムラインを示す。三角形は、段階特異的なマーカーの発現を免疫蛍光法により評価するために推奨する時点を表す。S B : S B 4 3 1 5 4 2 ; L D N : L D N 1 9 3 1 8 9 ; S A G : スムーズドアゴニスト ; T 3 : トリヨードチロニン ; R A : オールトランス型レチノイン酸 ; P D G F : 血小板由来増殖因子 ; H G F : 肝細胞増殖因子 ; I G F I : インスリン様増殖因子 1 ; N T 3 : ニューロトロフィン 3 ; A A : アスコルビン酸。

【図 2】 O L I G 2 + 前駆細胞を誘導するために R A 及び S H H が必要であることを示す。図 2 A は、R A 及び S H H の種々の条件下での分化 1 4 日目の O L I G 2 G F P 細胞のライブイメージング及びフローサイトメトリーによる定量を示す。G F P + 細胞の収率は、0 日目から濃度 1 0 0 n M の R A を使用した場合に最も高い。図 2 B は、最も良好な R A 条件について 8 日目から S H H または S A G を添加した場合のライブイメージング及び F A C S 分析による比較を示す。陰性対照 : h E S C 株 R U E S 1 。図 2 C は、最適な R A 及び S H H 条件下での P A X 6 、 O L I G 2 及び N K X 2 . 2 の経時的な遺伝子発現プロファイルを示す。エラーバーは S E M である (N = 3) 。 R U E S 1 細胞を使用した場合と O L I G 2 G F P レポーター株を使用した場合に同等の結果が得られている。図 2 D は、選別されていない細胞、選別された G F P + 細胞、または G F P - 細胞のスフィア形成の評価を示す。G F P + 細胞のみがスフィアを形成し、G F P + 集団の濃縮をもた

40

50

らしている。

【図3】OLIG2⁺前駆細胞にはSHH及び二重SMAD阻害が必要であることを示す。図3Aは、0日目からRAのみに曝露した細胞と、0日目からRAを添加し8日目からSHH/SAGを添加して培養した場合との間の、分化14日目のOLIG2、PTCH1及びSHHのmRNAレベルの比較を示す。内因性SHHレベルは、SHH/SAGに曝露しなかった試料の方が高い。エラーバーはSEMである(N=3)。図3Bは、分化の初めの12日間、RAのみに曝露した細胞とRA及びSAGに曝露した細胞との間の、分化75日目のO4⁺細胞に関するFACS分析を示す。分化の初期段階でSAGを付与されなかった細胞において、O4⁺集団は56%減少していることが観察された。陰性対照：APC結合2次抗体のみ。図3Cは、異なるSMAD阻害剤下での、分化14日目の

10

ライブライメーキング及びFACS分析を示す。GFP⁺細胞の実質的な集団はSMADタンパク質の二重阻害下でのみ存在し、このことはRAとSMADの二重阻害との相乗効果を示している。DSi：二重SMAD阻害；SB：SB431542；LDN：LDN189193。

【図4】ヒト多能性幹細胞からのオリゴデンドロサイトの生成を示す。図4AはhPSCから成熟オリゴデンドロサイトへの分化プロトコルの概略図を示す。図4B~4MはRUES1細胞のインビトロでのオリゴデンドロサイト分化の連続段階であり、8日目のPAX6⁺神経幹細胞(B)、12日目の多層構造の位相差像(C)、18日目のOLIG2⁺NKX2.2⁺pre OPC(D)、SOX10⁺OLIG2⁺初期OPC(E)、O4⁺後期OPCのライブライメーキング(F)、O4⁺細胞の分枝プロセスを強調するようトリミングされた画像(G)、OLIG2を共発現するO4⁺OPC(H)、SOX10を共発現するO4⁺OPC(I)、SOX10及びNG2を共発現する、選別されたO4⁺OPC(J)、低倍率(K)及び高倍率(x64)(L)で示す最終分化MBP⁺オリゴデンドロサイト、ならびにオリゴデンドロサイト培養におけるMAP2⁺及びGFAP⁺細胞(M)を示す。PSC：多能性幹細胞；NSC：神経幹細胞；OPC：オリゴデンドロサイト前駆細胞；OL：オリゴデンドロサイト；pO/L：ポリLオルニチン/ラミニン。

20

【図5】増殖性オリゴデンドロサイト及び他の神経細胞型を示す。図5Aは、50日目のOLIG2、SOX10及びKi67の代表的な免疫蛍光染色を示す。OLIG2とSOX10はほぼ完全に共局在している。図5Bは、分化30日目~50日目のOLIG2⁺及びSOX10⁺の前駆細胞の増殖割合を示すKi67⁺細胞の経時的定量を示す。エラーバーはSEMである(N=2)。図5Cは、73日目の免疫蛍光染色画像であり、多数のO4⁺細胞を示しているが、Ki67を共発現する細胞はほぼない。図5Dは、増殖因子除去から4週間後のMBPを共発現するO4⁺細胞の割合を示す(グリア培地)。エラーバーはSEMである(N=4)。図5Eは、分化の78日目~88日目の3つの独立した実験における、細胞総数に対するMAP2⁺ニューロン及びGFAP⁺アストロサイトの割合を示す。エラーバーはSEMである(N=3)。

30

【図6】選択肢Bのプロトコルに従った分化の53日目(図6A、6D)、63日目(図6B、6E)及び73日目(図6C、6F)のO4ライブライメーキングである。図6A~6Cは低倍率での代表的な視野を示し；O4⁺細胞の数は経時的に増加している。図6D~6Fは、それぞれ図6A~6Cの高倍率画像であり、細胞の形態を強調している。図6Gは、選択肢B(「迅速」)プロトコル(55日目、63日目及び75日目)及び選択肢A(「オリジナル」)プロトコルを使用して異なる時点でフローサイトメトリーにより計算されたO4⁺細胞の出現率の代表的な例を示す。スケールバー：500µm(6A~6C)；200µm(6D~6F)。

40

【図7】hPSCからオリゴデンドロサイトへの分化の基本的な段階を示す。図7Aは、分化の8日目のPAX6⁺神経幹細胞を示す(PAX6、緑；核はDAPIの青色で染色している)。図7Bは、3次元構造を表す12日目の培養物の典型的な形態を示す。図7Cは、免疫蛍光分析によって示されている12日目のOLIG2及びNKX2.2の発現を示す(OLIG2、緑；NKX2.2、赤；核はDAPIの青色で染色している

50

)。図7Dはスフィア選択を示し、矢印は、丸形で、金色/茶色で、中心は比較的濃く、直径は300 μ m~800 μ mである、良好なスフィアを示す。感嘆符は、穏やかにピペッティングすることにより単一のスフィアに分けることが可能な一対の接合スフィアを示す。避けるべき凝集体は、小型で透明であるか(矢頭)、または非常に大型で形状が不規則で、通常は機械的消化によって誘導される(星印)。図7Eは、NKX2.2(緑)、SOX10(赤)及びOLIG2(青)を共発現している56日目の前駆細胞の免疫蛍光染色を示す。図7Fは、細胞の高度に分枝した形態を示すO4(緑)ライブ染色である。図7Gは、分化の最後のMBP⁺(赤)オリゴデンドロサイトを示す(核はDAPIの青色で染色している)。図7Hは、MBP⁺(赤)オリゴデンドロサイトの形態を高倍率(64 \times)で示す。当該培養物中には、MAP2⁺(緑)及びGFAP⁺(青)の細胞も存在する。図7Iは、選別から24時間後の精製O4⁺細胞が依然として典型的な分枝形態を維持していることを示している。スケールバー:500 μ m(図7A、7B、7G);200 μ m(図7C、7E、7F、7I);1mm(図7D)。

【図8】PPMSのiPSC株の生成及び特性評価を示す。図8Aは、PPMS株のmRNA/miRNAリプログラミングであり、代表的な、リプログラミングの7日目の皮膚線維芽細胞、12日目の明白なiPSC様コロニー、及び15日目のTRA160⁺コロニーを示す。図8Bは、PPMS iPSC102の多能性マーカーの免疫蛍光を示す。図8Cは、胚様体を経たインビトロでの自発的分化後の、内胚葉マーカーAFP、中胚葉マーカーSMA、及び外胚葉マーカーIHHチューブリンの免疫蛍光を示す。核はDAPIで染色している。図8Dは、免疫不全マウスにPPMS iPSCを注入した後のインビボでのテラトーマ形成のH&E染色切片であり、腺組織(内胚葉)、軟骨(中胚葉)、及び色素上皮(外胚葉)の代表的な構造を示す。図8Eは、hESC株と比較した、未分化PPMS iPSC及び親線維芽細胞の多能性遺伝子発現を示す。ANPEP遺伝子は線維芽細胞に特異的である。図8Fは、細胞遺伝学的解析を示し、全てのPPMS iPSC株が正常な核型を示している。

【図9】iPSC株でのテラトーマ形成の特性評価を示す。iPSC株102の細胞を免疫不全マウスへ移植した後の、インビボでのテラトーマ形成の内胚葉(図9A)、外胚葉(図9B)、及び中胚葉(図9C)の代表的な写真。

【図10】PPMS iPSCはインビトロでOPC及び成熟オリゴデンドロサイトを生成することを示す。図10A~10Iは、PPMS iPSCのインビトロでのオリゴデンドロサイト分化の連続段階であり、8日目のPAX6⁺細胞(A)、12日目の多層構造の位相差像(B)、12日目のOLIG2⁺及びNKX2.2⁺の細胞(C)、SOX10⁺OLIG2⁺初期OPC(D)、73日目のO4⁺後期OPCのライブイメージング(E)、O4⁺細胞の分枝プロセスを強調するようトリミングされた画像(F)、低倍率(G)及び高倍率(\times 64)(H)で示す最終分化MBP⁺オリゴデンドロサイト、ならびにオリゴデンドロサイト培養物中のMAP2⁺細胞(I)を示す。図10Jは、RUES1及びPPMS iPSCからの分化から75日後のO4⁺細胞の、FACS分析による定量を示す。ゲートは、O4染色については2次Ab APCのみに基づき、PDGFR染色についてはPE結合同位体対照に基づく(陰性対照)。総O4⁺細胞出現率(O4⁺)は括弧内に示す。

【図11】インビボ試験のための移植の前の細胞の特性評価を示す。図11Aは、MEF上で増殖したiPSC株における多能性マーカーを示すFACSプロットを示しており、同マーカーは分化の81日目の細胞には存在しないことを示している。図11Bは、インビボでの移植のための単離及び凍結保存の前にO4⁺細胞を選別するために使用するよりストリンジентなゲートを示すプロットである。図11Cは、凍結保存後にプレートに播種した、48時間の回復期中のO4⁺選別細胞の明視野画像を示す。図11Dは、選別したOPCにおけるライブO4染色を示し、O4の保持及び適切な分枝形態を示す。

【図12】インビボで生着し、ミエリン形成オリゴデンドロサイトに分化するPPMS由来OPCを示す。図12Aは、新生仔シバラ/rag2マウスに移植されたヒトPPMS iPSC由来O4⁺OPCを示す。16週時点でヒト細胞は検体脳梁で高密度の生着

10

20

30

40

50

を示した (hNA、赤)。多数がMBP発現オリゴデンドロサイトとして分化し (緑)、検体脳梁全体に拡散して分布した。図12Bは、マウス軸索 (神経フィラメント; NF、赤) 及びMBP⁺ヒトオリゴデンドロサイト (緑) の共局在を示す共焦点像である。図12C及び図12Dは、ミエリン化した軸索の電子顕微鏡写真であり、周期線 (矢頭) 及び周期線が交互に存在する特徴的なコンパクトミエリンを示す。図12Eから、移植されたヒト細胞は、約80%のhNA⁺細胞がOLIG2 (緑; 16週) を発現するという前駆細胞の特長を保持していたことが分かる。図12Fは、16週時点で個々のNG2細胞が表層大脳皮質に移行し始めたことを示す。図12Gは、iPSC由来のO4選別OPCによりインビボでの限定された両能性が実証されたことを示し、わずかなGFAP⁺アストロサイトだけが側脳室の近傍で見られた。

10

【図13】iPSC株が由来するMS患者及び健常な個人についての人口統計情報を示す。

【図14】iPSCへの皮膚線維芽細胞のリプログラミングを示す。図14Aは、形態が明らかに変化した線維芽細胞がリプログラミングの3日目で視認可能になることを示している。図14Bは、nGFPのmRNAを用いて評価した7日目のトランスフェクション効率を示す。図14Cは、12日目のiPSC様コロニーを示す。図14Dは、フィーダーフリー条件で増殖したiPSCクローンを示す。

【図15】多能性に関するnanosttring解析によるiPSC株の特性評価を示す。図15Aは、MS患者または健常対照由来の3種のhESC株、2種の線維芽細胞株及び5種のiPSC株のnanosttring解析を示し、iPSC株はhESC株と区別できない。図15Bは、インビトロでの自発的な胚様体分化により全胚葉由来の細胞が生じることを示している。左から右へ: AFP⁺内胚葉細胞、Tuj1⁺外胚葉細胞、aSMA⁺の中胚葉細胞。

20

【図16】多発性硬化症の理解へのアプローチを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

本発明者らは、増殖因子に富む化学的組成が明らかな培地を用いる、PSCからヒトオリゴデンドロサイトを生成する安定的で迅速かつ再現可能な分化プロトコルを開発した。本発明者らのプロトコルは発生中のオリゴデンドロサイト分化を模倣している。PSCは8日以内にPAX6⁺神経幹細胞に分化し、該細胞から12日目までにOLIG2⁺前駆細胞が発生する。OLIG2⁺細胞は、18日目前後に共発現NKX2.2によってオリゴデンドロサイト系列にコミットされ、その後、40日目前後にSOX10及びPDGFRの上方制御により初期OPCに分化する。O4抗体(O4⁺)に認識される硫酸化糖脂質抗原を発現する後期OPCが50日目前後に出現し、それは分化の75日目までに細胞集団の40~70%に達する。O4⁺オリゴデンドロサイト前駆細胞は、ミエリン化の研究のために細胞選別により単離することができ、または最終的にMBP⁺の成熟オリゴデンドロサイトに分化することができる。本発明者らのオリゴデンドロサイト分化プロトコルのタイムラインを図1に示す。

30

【0023】

オリゴデンドロサイトを生成するために本発明者らが操作するシグナル伝達経路は、齧歯類の脊髄胚発生の研究から得た知識に基づいて選択した。Hura、(2009年a)。インビトロでは、RA及びSHHシグナル伝達は、OLIG2前駆細胞へのPSCの分化を誘導するpMN環境を模倣する。本発明者らの培養では、SHHシグナル伝達はヒト組換えSHHタンパク質の代わりにスーズンドアゴニストを介して活性化する。本発明者らは、(SB431542による)アクチビン/ノーダル/TGFの阻害及び(LDN193189による)BMP4阻害を、RA及びSHHシグナル伝達と組み合わせることにより、OLIG2⁺前駆細胞の収率が最大になることを見出した。SB431542及びLDN193189の相乗作用により、12日目に70%を超える細胞がOLIG2を発現する。このことは、本発明者らのプロトコルとWangら(2013年)のプロトコ

40

50

ルとの間の重要な違いである。アクチビン/ノーダル/TGFシグナル伝達及びBMPシグナル伝達両方の阻害は「二重SMAD阻害」とも呼ばれる。

【0024】

本発明者らの方法と過去に発表されたプロトコルとの間には、他の重要な違いがいくつか存在する。例えば、本発明者らは、懸濁培養とは対照的に、接着培養下での二重SMAD阻害により神経誘導を開始した。Wangら(2013年);Huら(2009年b);Nistorら(2005年)。このアプローチにより、本発明者らは、0日目にわずか10,000細胞/cm²で開始し、それにも関わらず神経前駆細胞の大幅な増殖を達成し、最終的に大量のOPC生成を達成した。また、本発明者らの実施におけるRA最適濃度は約100nMであることが分かり、これは他のグループで使用された濃度の100倍低い濃度である。Gil, J. E.ら、FEBSLetters 583:561~567(2009年);Israelら(2007年);Nistorら(2005年)。更に、外因性SHHを使用しないRAのみによる誘導は驚くほど大きなOLIG2⁺細胞集団を生成した。本発明者らは、スムーズドのアゴニストはSHHに対する効果的な代替物であり、実際に本発明者らの実施において優れた有効性を示すことを確認した(Stacpooleraら、2013年)。更に注目すべきことに、線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナル伝達を使用しないRAによるOLIG2誘導を示したのは本発明が最初である。RA及びFGFシグナル伝達の組み合わせは、ニワトリの発生中にOLIG2発現を促進することが知られており、ヒトESC及びiPSC両方のインビトロ分化に使用されてきた。Pouya, A.ら、PLoS One 6:e27925(2011年);Nistorら(2005年);Novitch, B. G.ら、Neuron 40:81~95(2003年)。近年の研究から、塩基性FGF(bFGF)は腹側前脳由来のオリゴデンドロサイトの特定に不可欠であるが、それは脊髄からのオリゴデンドロサイトの特定中に神経分化を阻害することが示唆された。Stacpooleraら(2013年)。それにもかかわらず、本発明者らはインビトロでの分化において、外因性FGFの非存在下で高収率のOPCを達成した。最後に、12日目の細胞スフィアの接着培養から懸濁培養への移行は、OLIG2⁺細胞集団を増加させて本発明者らの培養物の分化をオリゴデンドロサイト系列に限定するための重要な段階であることが判明した。

【0025】

本発明者らはまた、PPMS患者の皮膚線維芽細胞のリプログラミングを介してミエリン化オリゴデンドロサイトを誘導できるという最初の証拠も提供する。MS由来のiPSCに関する過去の唯一の報告は、1人の35歳のRRMS患者に由来する、レトロウイルスによってリプログラミングされた、遺伝子を組み込んでいるiPSC株から、インビトロでオリゴデンドロサイトが分化され得ることを示していた。Song, B.,ら、Stem Cell Res. 8:259~273(2012年)。本発明者らは、50~62歳の男女のPPMS患者から得た4種の、遺伝子挿入のないiPSC株に由来するOPCによるインビボでのミエリン化を実証する。従って、本発明者らのiPSC株がPPMS患者に由来するという点で、本発明は、iPSC由来OPCを用いた近年の研究とは異なる。更に、分化能を最大限に制限するために、インビボでの移植に使用する細胞は、後期OPCマーカーO4を使用して選別した。これらの違いにもかかわらず、PPMS由来のO4⁺で選別したOPCは、過去に報告されたiPSC由来の非選別OPCと比較して、同等の生着効率、同等の有糸分裂率、及び同等の割合の被鞘された宿主軸索を示したが、GFAP⁺アストロサイトの生成は少なかった。まとめると、本発明者らのデータは、PPMS由来のOPCが少なくとも健常iPSC由来細胞(Wangら、2013年)と同じくらい効率的にインビボで作用することを示し、本発明者らのiPSC誘導及びOPC誘導プロトコルは、1人の患者試料からミエリン形成性オリゴデンドロサイトを生成し、これをMSの自家細胞補充療法に使用可能にすることを確立している。

【0026】

本発明の特定の実施形態は、最初にPSCコロニーを調製することによりOLIG2⁺OPCを生成する方法である。PSCを低密度で(プレートに)播種し、約1~2日間の

接着培養で増殖させる。「低密度」とは、約8,000~約11,000細胞/cm²を意味する。細胞を、好ましくは約9,500~約10,500細胞/cm²、より好ましくは約10,000細胞/cm²で播種する。1~2日後、PSCは、好ましくは直径約75μm~約300μm、より好ましくは直径約100μm~約250μmのコロニーを形成する。

【0027】

用語「PSC」は、当該技術分野における通常の意味を持ち、すなわち、内胚葉、外胚葉、及び中胚葉細胞へと発生する能力を有する自己複製細胞である。PSCはhPSCであることが好ましい。PSCにはESC及びiPSC、好ましくはhESC及びhiPSCが挙げられる。PSCは、ゲルまたは基底膜マトリックスなどのマトリックスを含む表面上に播種することができる。好ましいマトリックスは、MATRIGEL（登録商標）、CULTREX（登録商標）及びGELTREX（登録商標）などの商品名で販売されている、Engelbreth Holm Swarm (EHS) マウス肉腫細胞によって分泌されるタンパク質混合物である。他の適切なマトリックスとしては、コラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、ポリリジン、ビトロネクチン及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0028】

PSCを培養する培地は、rho関連タンパク質キナーゼ(ROCK)の阻害剤、例えばGSK269962、GSK429286、H1152、HA1077、RKI1447、チアゾピピン、Y27632、またはこれらの誘導体を含むことが好ましい。

20

【0029】

その後、PSCコロニーを、低濃度RAと、TGFシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、BMPシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でコンフルエントになるまで単層培養する。ここでは、この培地中での培養の初日を0日目とする。「低濃度RA」とは約10nM~約250nMである。RAの濃度は、好ましくは約10nM~約100nM、または約25nM~約100nM、または約20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、及び好ましくは、約100nM以下である。TGFシグナル伝達の阻害剤には、例えばGW788388、LDN193189、LY2109761、LY2157299及びLY364947が挙げられる。TGFシグナル伝達の好ましい阻害剤は小分子SB431542である。BMPシグナル伝達の阻害剤には、例えばDMH1、ドルソモルフィン、K02288及びノギンが挙げられる。BMPシグナル伝達の好ましい阻害剤は小分子LDN193189である。

30

【0030】

約8日目に細胞がコンフルエントに達してPAX6を発現すると、その時点で該コンフルエント細胞を、SHHまたはスーズンドアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で培養する。スーズンドアゴニストには、例えば、SAG及びパルモルファミンが挙げられる。SHHは組換えヒトSHHとすることができる。培地にSHHが含まれないことが好ましい。PSCからOLIG2⁺前駆細胞への移行には、培養物をオーバーコンフルエントにする大量増殖が伴い、その結果、理想としては約12日までに細胞が三次元構造を形成する。「オーバーコンフルエント」とは、細胞全てが培養表面と完全に接触している訳ではなく、いくつかの細胞は培養表面とは全く接触せずに細胞同士のみが接触するように、細胞が互いに重なり合っていることを意味する。約12日目までにオーバーコンフルエントな細胞の少なくとも約50%、60%または70%がOLIG2⁺になることが好ましい。

40

【0031】

OLIG2⁺細胞を更にO4⁺細胞に分化させる場合、オーバーコンフルエントな細胞を培養表面から剥離し、細胞凝集体またはスフィアを形成させる。OLIG2⁻細胞は凝集体を形成せず、したがって、このプロセスによりOLIG2⁺集団が濃縮され、OLI

50

G2⁺細胞はその後の培地交換中に徐々に除かれる。本発明の目的では、用語「凝集体」及び「スフィア」は同じ意味で使用され、好ましくは、必要ではないが少なくとも約100個の細胞の多細胞三次元構造を指す。

【0032】

剥離は、セルスクレーパーもしくは他の好適な器具で機械的に、または化学的に行うことができる。化学的剥離は、タンパク質分解酵素、例えば、コラゲナーゼ、トリプシン、トリプシン様プロテナーゼ、商品名TRYPLE（登録商標）で販売されているような組換え酵素、商品名ACCUTASE（登録商標）で販売されているような天然由来酵素、及びこれらの組み合わせを用いて行う。化学的剥離はまた、EDTAのようなキレート剤、または尿素などの化合物を用いて行うこともできる。機械的な剥離（lifting）または剥離（detachment）は細胞死を最小限にするという利点をもたらすが、サイズが不均一な凝集体が生成され、従って好適なスフィアは手動の採取プロセスを介して選択する必要がある。良好なスフィアは、丸型で、金色/茶色で、中心が濃く、直径が約300μm～約800μmであるものとして定義される。酵素消化などの化学的方法を用いて細胞を剥離すると、その後の培養に適したスフィアが主に生成される。従って、スフィアの手動採取を必要とせず、剥離段階は自動化に適合し、ハイスループット試験に使用することが可能になる。しかし、酵素消化は細胞死を増加させ、結果としてスフィアの数減少させる。

10

【0033】

本発明者らは更に、OLIG2⁺OPCからO4⁺OPCを生成する方法を提供する。OLIG2⁺OPCの三次元凝集体を、スムーズドアゴニスト及び低濃度RAを含む培地中で約8日間、懸濁培養する。OLIG2⁺OPCは、例えば上述のような本発明の方法、または当技術分野で公知の他の方法により生成することができる。スムーズドアゴニスト及びRAを含む培地に入れて約8日後、該培地を、PDGF、HGF、IGF1及びNT3、任意でインスリン（好ましくは約10μg/ml～約50μg/ml、より好ましくは約25μg/ml）、T3（好ましくは約20ng/ml～約100ng/ml、より好ましくは約60ng/ml）、ピオチン（好ましくは約50ng/ml～約150ng/ml、より好ましくは約100ng/ml）、及び/またはcAMP（好ましくは約100nM～約5μM、より好ましくは約1μM）を含む培地と交換する。培地にはbFGF及び上皮増殖因子（EGF）が含まれないことが好ましい。OLIG2⁺細胞を本発明の方法により生成する場合、懸濁培養は約12日目に開始することが好ましく、PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中での培養は約20日目に開始することが好ましい。

20

30

【0034】

PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地中での約10日間の懸濁培養後、細胞凝集体をスフィア約2個/cm²の密度で接着培養に移す。（これは、前記方法における、RAと、TGFシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と、BMPシグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤とを含む培地中でのPSCの培養開始を0日目とした場合の、約30日目であることが好ましい。）細胞凝集体の播種及び培養を行う表面は、細胞外マトリックスタンパク質（例えばコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン）及び/または正に荷電したポリアミノ酸（例えばポリアルギニン、ポリリジン、ポリオルニチン）を含むことができる。表面はラミニン及び/またはポリオルニチンを含むことが好ましい。

40

【0035】

細胞凝集体をプレートに播種する際、PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地を引き続き使用することが可能であり（選択肢A）、あるいはAAを含む増殖因子（PDGF、HGF、IGF1、NT3、bFGF及び/またはEGF）を含まない培地を使用することができる（選択肢B）。AAを含む培地は任意でインスリン、T3、ピオチン及び/またはcAMPを含むことができる。PDGF、HGF、IGF1及びNT3を含む培地で培養した細胞は、プレートへの播種から約45日後までにO4⁺になることが好ましい。これらの細胞の少なくとも約35%、40%、45%、50%、55%

50

、60%、65%、70%、75%または80%はプレートへの播種から約45日後までにO4⁺になることが好ましい(75日目)。AAを含む培地で培養した細胞はプレートへの播種から約25日後までにO4⁺になることが好ましい。これらの細胞の少なくとも約20%、25%、30%、35%または40%はプレートへの播種から約25日後までにO4⁺になることが好ましい(55日目)。これらの細胞の少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%または60%はプレートへの播種から約33日後までにO4⁺になることが好ましい(63日目)。これらの細胞の少なくとも約35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%はプレートへの播種から約45日後までにO4⁺になることが好ましい(75日目)。

【0036】

ミエリン塩基性タンパク質を発現する成熟オリゴデンドロサイトは、細胞がMBP⁺になるまでの約3週間、PDGF、HGF、IGF 1及びNT3の非存在下でO4⁺OPCを培養することにより生成できる。PDGF、HGF、IGF 1及びNT3を含まない培地中での培養の約20日後に、O4⁺OPCの約20%、25%、30%、35%、40%または45%がMBP⁺になることが好ましい。このことは「選択肢A」の細胞については約95日目に、「選択肢B」の細胞については約60日目に発生する。「選択肢B」の細胞を少なくとも約75日目まで培養すると、MBP⁺発現細胞の収率が高まる。

【0037】

本発明はまた、本発明の方法で生成されたOPC、オリゴデンドロサイト、及びミエリン生成細胞、ならびにそれらを含む非ヒト哺乳動物、好ましくはマウス及び/またはラットを包含する。ミエリン生成細胞は、ミエリンを生成する細胞であればどのような細胞でもよく、オリゴデンドロサイトが挙げられるがこれに限定するものではない。いくつかの実施形態では、ミエリン生成細胞はPSCから分化し、このような実施形態では、PSCはiPSCとすることもできる。iPSCは対象の体細胞から誘導することができる。一態様では、対象は脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害に罹患している。

【0038】

一態様では、本発明は、MS、特にPPMSの患者からウイルスフリーで遺伝子挿入のないiPSCを生成する方法を提供する。シバラーマウスにおけるインピボでのミエリン化で実証されているように、そのようなiPSCをOPCや機能的オリゴデンドロサイトへと効率的に分化させるために本発明者らの分化プロトコルを使用することができる。

【0039】

本発明は、神経疾患、好ましくは脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害のためのモデル系も提供する。一態様では、当該モデル系は、脱髄またはミエリン形成不全状態の対象由来のiPSCから分化したミエリン生成細胞を含む。当該モデル系は、ミエリン生成細胞が移植された非ヒト哺乳動物を更に含むことができる。一実施形態では、非ヒト哺乳動物はマウスまたはラットである。本発明により提供されるモデル系を使用して、脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害を研究することが可能であり、この研究には、基礎となるメカニズムを理解し、治療標的を定義することも含まれる。

【0040】

本発明はまた、本発明の方法に従ってOPCまたはオリゴデンドロサイトを生成し；有効量の細胞を対象に投与することにより対象の神経疾患または障害を治療及び/または予防する方法も提供する。移植されると、オリゴデンドロサイト、またはインピボでオリゴデンドロサイトに分化したOPCは、対象の神経系においてミエリン形成を促進する。従って、本発明は、対象の神経疾患または障害の治療及び/または予防における本発明のOPCまたはオリゴデンドロサイトの使用を提供する。当該神経疾患または障害は、脱髄もしくはミエリン形成不全疾患、または神経変性疾患であってもよい。当該神経疾患または障害は、中枢神経系、末梢神経系、またはその両方に影響を与える可能性がある。いくつかの実施形態では、脱髄またはミエリン形成不全疾患は、炎症性脱髄疾患(多発性硬化症、視神経炎、デビック病、急性播種性脳脊髄炎及び横断性脊髄炎など)、ウイルス性脱髄、後天性代謝障害に起因する脱髄、白質ジストロフィー(ペリツェウス・メルツバッハー

10

20

30

40

50

病及び遺伝性痙性対麻痺などのミエリン形成不全疾患)、プロテオリピド・タンパク質生成のX連鎖遺伝病、代謝性脱髄及びリソソーム貯蔵障害(異染性白質ジストロフィー MLD、テイザックス病、サンドホフ及びクラッペ病など)、白質消失病、ならびに脳室周囲白質軟化症である。MS、特にPPMSはまた、本発明の方法によって治療または予防することが可能な状態でもある。好ましい実施形態では、本発明の方法によって生成したOPCまたはオリゴデンドロサイトは、対象の体細胞から生成したiPSCに由来する。

【0041】

iPSC技術は、その自家細胞移植の可能性と同時に、新薬を開発し、疾患の病因への見識を得るためのツールとして注目されつつある。Han, S. S. W.ら、Neuron. 70: 626~644 (2011年)。本発明の方法及び細胞は、ミエリン化を促進する化合物についてのハイスループット・インビトロスクリーニングの開発を補助することになる。Lee, S.ら、Nat Protoc. 8: 771~782 (2013年)。その目的のため、本発明者らは、ミエリン化を促進する化合物を同定する方法を提供する。該方法は、本発明の方法によりミエリン生成細胞を生成する段階; ミエリン生成細胞を候補化合物と接触させる段階; 候補化合物がニューロンのミエリン化を促進するかどうかを判定する段階を含む。一実施形態では、化合物は脱髄またはミエリン形成不全状態などの神経疾患または障害を治療するための候補治療薬であり、該方法には、候補治療薬がニューロンのミエリン化に有益な効果を与えるかどうかを判定することも含まれ、ここではこのような有益な効果は脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害を治療するための候補治療薬の指標である。有益な効果は、例えば、ニューロン脱髄の予防、ニューロンの脱髄の減少、ニューロン電導性の増加、及び/またはニューロンのミエリン化の促進であつてもよい。好ましくは、該方法はハイスループット形式で行われる。

【0042】

本発明の細胞、システム、及び方法は、神経疾患を研究するためにも有用である可能性がある。特に、本明細書で説明したPPMS iPSC株は、特にMSにおける神経変性の過程を研究するための新たな情報源を提供する(図16)。

【0043】

本明細書及び添付の請求項で使用しているように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「1つの(the)」は、その文脈が特段に明示していない限り複数の指示対照を包含する。用語「1つの(a)」(または「1つの(an)」)ならびに用語「1つまたは複数」及び「少なくとも1つ」は同じ意味で使用し得る。

【0044】

更に、「及び/または」は、他のものが存在しても存在しなくても2種の特長または各構成要素の特定の開示であると解するべきである。従って、「A及び/またはB」などの文言で使用しているような用語「及び/または」は、A及びB、AまたはB、A(のみ)、ならびにB(のみ)を包含するように意図されている。同様に、「A、B及び/またはC」などの文言で使用されているような用語「及び/または」は、A、B及びC; A、BまたはC; AまたはB; AまたはC; BまたはC; A及びB; A及びC; B及びC; A(のみ); B(のみ); C(のみ)を包含するように意図されている。

【0045】

特段に規定していない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が関連する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、The Dictionary of Cell and Molecular Biology (第5版、J. M. Lackie編集、2013年)、the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (第2版、R. Cammackら編集、2008年)、及びThe Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, P. S. Juo, (第2版、2002年)は本明細書で使用されるいくつかの用語の一般的な定義を当業者に提供することができる。

【0046】

単位、接頭辞及び記号は、その国際単位系（S I）に承認された形式で表示されている。数値範囲は範囲を規定する数値を包含する。本明細書で提供される見出しは、本発明の多様な態様または実施形態を限定するものではなく、全体として明細書を参照することにより包含され得る。従って、下記に定義される用語はその全体が明細書を参照することによって、より完全に定義される。

【0047】

いかなる状況で実施形態が語句「含む」で説明されていても、「からなる」及び/または「から本質的になる」の用語で記載された他の類似の実施形態も包含される。

【0048】

「対象」、「個体」または「患者」が意味するものは、診断、予後診断または治療が必要な対象、特に哺乳動物対象であればどのような対象も含まれる。哺乳動物対象としては、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、ブタ等を含むヒト、飼育動物、家畜、競争用動物及び動物園の動物が挙げられる。

10

【0049】

「治療する」または「治療」または「治療すること」または「緩和する」または「緩和すること」などの用語は、診断された病理学的状態または障害の症状を治癒、鈍化、緩和し、かつ/あるいはその進行を停止させる治療措置を指す。従って治療を必要とする対象には、既に障害を有する対象も含まれる。特定の実施形態では、例えば疾患または障害に関連する症状の全体的、部分的または一時的緩和または消失が患者に見られた場合、対象は、本明細書に提供された方法に従って神経疾患または障害、特に脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害に対して良好に「治療された」ことになる。

20

【0050】

「予防する」または「予防」は、標的とする病理学的状態または障害の発症を予防及び/または遅延させる予防 (prophylactic or preventative) 措置を指す。従って、予防が必要な対象には、該疾患または障害に罹患または感染しやすい対象も含まれる。特定の実施形態では、本発明の方法に供しなかった患者と比較して、例えば軽微であるか軽度である疾患もしくは障害に関連する症状を患者が過渡的または持続的に示すか、あるいは疾患または障害に関連する症状の開始が遅かった場合、疾患または障害、特に脱髄またはミエリン形成不全疾患もしくは障害は、本明細書で提供された方法に従って良好に予防されたことになる。

30

【0051】

本発明は更に、以下の非限定的な実施例に説明されている。

【実施例】

【0052】

実施例1. hESC株からのオリゴデンドロサイトの分化

OLIG2 GFPノックインhESCレポーター株 (Liur、2011年) を使用し、ライブ蛍光イメージングによりOLIG2⁺前駆細胞を追跡した。初めに、接着培養においてSMADシグナル伝達の二重阻害を利用してPAX6⁺細胞を誘導した。Chambers, S.M.ら、Nat Biotechnol. 27: 275~80 (2009年)。次に、胚脊髄環境を模倣するために、様々な時間で様々な濃度のRA及び/またはSHHを使用し、フローサイトメトリーによりOLIG2 GFP発現を定量した (図2A)。誘導開始時から100nMのRAを使用したところ、40.6%のOLIG2⁺前駆細胞が生成されたが、8日目からSHHを100ng/ml添加したところ、その収率は57.7%に増加した (図2B)。興味深いことに、外因性SHHを含まない細胞は初めの12日間でSHHのmRNAの上方制御を示し (図3A)、また、SHHで処置した細胞と比較して低い効率ではあったが、O4⁺細胞に分化した (図3B)。

40

【0053】

続いて、組換えヒトSHHタンパク質の代わりにSAGを用いたところ、OLIG2⁺前駆細胞の収率は更に70.1%に増加した (図2B)。12日目に、細胞を剥離して低

50

接着性プレートに入れ、スフィアへの凝集を促した。スフィアの形成に必要な細胞の最小数は少なくとも100個であり、本発明者らはスフィア中の大部分を占める細胞がGFP⁺であることに注目した。これをさらに調べるため、本発明者らが12日目の培養物をGFPに関して選別したところ、GFP⁺細胞だけが凝集体を形成していることが観察された(図2C)。このことは、凝集段階だけでOLIG2⁺集団の濃縮がもたらされたことを示唆している。

【0054】

次に、第2のhESC株(RUES1)を分化させてqRT-PCRによりPAX6、OLIG2及びNKX2.2の転写レベルを比較することにより、OLIG2⁺前駆細胞の生成までの初期段階を検証した。これらの転写因子の上方制御はOLIG2-GFP株の上方制御と類似の経時的パターンに従っており、PAX6誘導は7日目前後であり、OLIG2ピークは13日目前後であり、NKX2.2が持続的に高レベルになるのは10日目以降であった(図2D)。これらの結果に基づき、遺伝子操作していないRUES1株を使用して、プロトコルの後続段階(OLIG2⁺前駆細胞からMBP⁺成熟オリゴデンドロサイトまで)を開発した(図4A)。7日目にPAX6⁺細胞が生じ、それらは12日目までに多層構造の配置になった(図4B、4C)。12日目~30日目に細胞はスフィア状に増殖し、その後、プロトコルの残りの段階のためにポリ-L-オルニチン/ラミニン(pO/L)被覆ディッシュに細胞を播種した。

10

【0055】

O4⁺段階へと成熟を促進するため、20日目以降、PDGF-AA、HGF、IGF1及びNT3を培養培地に添加した。OLIG2⁺前駆細胞は、NKX2.2が、次にSOX10が上方制御されて、最終的に後期OPCへと成熟し、それはO4ライブ染色及び高度分枝プロセスによって同定された(図4D~4G)。OLIG2、SOX10及びNG2(図4H~4J)を発現するO4⁺OPCは、50日目という早期に出現し、その数は75日目前後に劇的に増加した。Ki67染色によって示されているように、分化中、前駆細胞の40~50%が増殖性であった。しかし、高度に分枝状になったO4⁺細胞はインビトロで分裂しなかった(図5A~5C)。また、少なくとも2週間、培地から増殖因子を除いた後、34±4%のO4⁺OPCがMBP⁺成熟オリゴデンドロサイトに分化した(図4K~4L、図5D)。これらの培養物はまた、他の細胞型、すなわち、それぞれ全細胞の15±2%のGFAP⁺アストロサイト及び20±2%のMAP2⁺ニューロンからも構成されていた(図4M、図5E)。

20

30

【0056】

本発明者らはまた、培養からわずか55日後に約30%のO4⁺細胞を生成する代替戦略を利用して、分化にかかる期間とコストを大幅に削減した。30日目という早期に培地からマイトジェンPDGF、NT3、IGF1及びHGFを除いて、選択したスフィアを播種した。この結果、55日目にO4⁺細胞が出現した。培養を継続し、O4⁺細胞の出現率を、長期プロトコルに匹敵するレベルまで増加させた(図6)。

【0057】

表1に示すように、O4収率は9種の異なるPSC株で28%~80%になり、平均は4株で60%を上回っていた。細胞をO4抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。1種のhESC株(RUES1)及び8種のhiPSC株を試験した。各株の種々のバッチを種々の継代で用いて技術的反复を実施した。結果は平均割合±SEMとしても表している。

40

【0058】

(表1)分化から約75日後のO4⁺OPCの割合

| 細胞株 | N | O4 ⁺ (%) | 平均±SEM (%) |
|-------|---|---------------------|------------|
| 102 | 4 | 40, 71, 72, 74 | 61.8±7.6 |
| 104 | 4 | 55, 61, 61, 68 | 61.3±2.7 |
| 107 | 1 | 48 | |
| 109 | 3 | 55, 60, 70 | 61.7±4.2 |
| 110 | 3 | 29, 37, 73 | 46.2±13.7 |
| 111 | 2 | 46, 47 | 46.4±0.4 |
| 130 | 4 | 43, 47, 58, 76 | 56.1±7.2 |
| 197 | 1 | 28 | |
| RUES1 | 5 | 36, 54, 68, 78, 80 | 62.9±8.2 |

N = 技術的反復数

【0059】

両戦略では、マイトジェンを除くことによって、MBPを発現するオリゴデンドロサイトへのOPCの最終分化が促進されるが、これらの培養条件下ではMBP⁺細胞は軸索線維に整列しない(図7G、7H)。ミエリン化の研究では、蛍光活性化細胞選別(FACS)によりO4⁺OPCを精製し、インビトロで移植することができる。O4⁺細胞は、選別の直後に凍結保存し、移植の24~48時間前に解凍することもできる。

【0060】

上述のとおり、プロトコルの様々な段階で、qRT-PCRまたは免疫蛍光法により、適当なマーカーの発現について培養物を確認した。PAX6(図7A)については8日目、OLIG2及びNKX2.2については12日目(図7C)に、培養物の免疫蛍光分析を行うと、その出現率はPAX6⁺細胞では90%、OLIG2⁺細胞では70%、及びOLIG2⁺/NKX2.2⁺細胞では30%である可能性が高い。40~50日目までに、SOX10が発現してOLIG2及びNKX2.2と共局在化する可能性が高い(図7E)。50~75日目に、ライブO4染色を行い、O4⁺細胞の出現及びその増殖を検出することができる(図6A~6F、図7F)。ヒトの発生では、OPCは、PDGFR及びNG2の発現と、その後のO4の発現が特長的である。Jakovcevski, I.ら、Front Neuroanat. 3:5(2009年)。本発明者らの培養条件下では、75日目までに、ほとんどのO4⁺細胞がPDGFRを失ったが、NG2発現は維持していた。この段階では、培養物中に多能性細胞の残留は観察されなかった。

【0061】

最終的に、O4⁺細胞は、FACSを介して単離されるか、またはMBP⁺オリゴデンドロサイトへと更に分化することができる(図7G、7H)。割合は低い但他的細胞型も75日目の培養物中に存在する。全体として、全細胞集団に対して約15%のGFAP⁺細胞及び約20%のIIIチューブリン⁺細胞が見られる(図7H)。最終分化段階後、グリア培地中で2週間培養すると、O4⁺細胞の約35%はMBPも発現する可能性が高い。

【0062】

実施例2. PPMS iPSC株からのオリゴデンドロサイトの分化

本発明者らのプロトコルがiPSC株に適用できることを示すため、4人のPPMS患者から皮膚生検を取得した。生検から繊維芽細胞の培養物を樹立し、最も不応性の株のリプログラミング効率を改善するためにmiRNAのクラスターと共に修飾mRNAカクテル(Warrenら、Cell Stem Cell. 7:618~30(2010年))を毎日トランスフェクションしてiPSCを生成した(Stemgent社)。リプログラミングの12日目~15日目に、TRA-1-60⁺コロニー(図8A)をライブ染色で同定し、選択し、増殖させ、多能性マーカーの免疫蛍光法により特徴付けした(図8

10

20

30

40

50

B)。

【0063】

7種の多能性遺伝子の発現プロファイリングにより、全4種のiPSC株が参照hESC株と同等で親繊維芽細胞とは異なるプロファイルを示すことが確認された(図8C)。全てのiPSC株が正常な核型(図8D)を示し、(胚様体の自発的分化により)インビトロ(図8E)及び(テラトーマアッセイにより)インビボ(図8F;図9)の両方で3つの胚葉の細胞型へ分化することができた。

【0064】

次に、プロトコルが本発明者らのPPMS iPSC株で再現可能であるか否かを評価した。試験した全てのiPSC株がRUES1株と同様に機能することが分かった(図10A~10I)。選別O4⁺OPC出現率で計算したところ、RUES1からのO4⁺細胞は最大70%、PPMSのiPSC株からは43.6%~62.1%であり、当該プロトコルは非常に再現可能でありかつ高効率であった。また、本発明者らは、O4⁺画分にはPDGFR⁺との二重陽性を示す細胞の亜集団が含まれていることを見出した(図10J)。O4⁺細胞は、蛍光活性化細胞選別(FACS)により容易に精製し、その形態を喪失することなく凍結し、解凍することができた(図11D)。

【0065】

実施例3. PPMS由来後期OPCによるマウス脳軸索ミエリン化

本発明者らのプロトコルにより得たOPCが機能的にミエリンを形成し得ることを検証するため、75日目のFACS精製O4⁺細胞(10⁵細胞/匹)を免疫無防備状態のシパラーマウス新生仔の前脳に注射した(図11A)。フローサイトメトリーによる多能性マーカーSSEA4及びTRA-1-60の分析により示されるとおり、注入した細胞にはiPSCの混入はなかった(図11B)。しかし、臨床試験に移行できる可能性を維持するため、インビボでの移植前に該培養物を精製した。細胞を凍結し、解凍し、移植の24~48時間前に元の状態にした(図11C)。ヒトhNA⁺細胞が検体脳梁及び前脳白質全体に分布した時点の12~16週目に動物を屠殺した。12週目の検体脳梁内のhNA⁺細胞の密度は34,400±3,090細胞/mm³であり、ヒト細胞数は16週目までに12週目のおよそ2倍になった。細胞クラスターの存在または明確な腫瘍形成は観察されず、生着したhNA⁺細胞の増殖画分は12週目で17%であり、16週目にはKi67⁺はわずか8%まで減少し、このとき細胞の5%だけがPCNA⁺であった。重要なのは、検体脳梁中80%を超えるhNA⁺細胞がOLIG2タンパク質を共発現したことであり、このことは生着細胞がオリゴデンドロサイト系列に限定されることを示唆していた(図12E)。更に、12及び16週目に、ヒトMBP⁺オリゴデンドロサイトは生着した検体脳梁全体に散見された(図12A)。16週目に、生着したマウス検体脳梁内で31±3%の宿主マウス軸索が被鞘されていた(図12B)。

【0066】

16週齢の検体脳梁の透過型電子顕微鏡検査により、周期線と周期間線が交互に存在する成熟コンパクトミエリンが見られた(図12C、12D);一方、注入していないシパラ/rag2マウスのミエリンは薄く、被覆は緩かった。同様に、g比(g-ratio)の測定によって評価されたように、いくつかの脳梁軸索においてミエリン被鞘の厚さは正常ミエリンの回復を反映していた。

【0067】

12週目では、検体脳梁において移植hNA⁺細胞はNG2⁺OPCのままであり(図12E)、16週までには表層大脳皮質に移行し始めた(図12F)。ごく少数のO4選別細胞はhGFAP⁺アストロサイトとして分化したが、hGFAP⁺細胞の大部分はSVZや脳室周囲に局在しており(図12G)、これらの領域では局所環境によりアストロサイト分化が誘導される可能性が示唆された。同様に、hNESTIN発現細胞は、検体脳梁ではほとんど見られなかったがSVZでは高濃度であった。生着した動物のいずれにおいてもIIIチューブリン⁺ニューロンが検出されなかったことは重要である。まとめると、本発明者らのデータから、PPMS由来のO4選別細胞は、インビボで成熟オリ

ゴデンドロサイトに分化し、脳内で正常ミエリンに類似した高密度のコンパクトミエリンを形成できることが明らかになった。

【0068】

実施例4．実施例1～3の詳細な実験手順

細胞株

3種のhESC株及び4種のhiPSC株を使用した。RUES1及びHUES45は両方ともNIHで承認されたhESC株であり；OLIG2 GFPレポーター株はBG01のhESC株(University of Texas Health Science Center、ヒューストン)に由来する。4種のiPSC株は、本発明者らの研究所において、mRNA/miRNA法(Stemgent社)によりPPMS患者の皮膚生検から誘導された。

10

【0069】

hPSC培養条件

HUESM(Human Embryonic Stem Medium)培地及び10ng/mlのbFGF(Stemcell Technologies社)を使用してマウス胚線維芽細胞(MEF)層上でhESC及びhiPSC株を培養し増殖させた。オリゴデンドロサイト分化の場合は、細胞を、MATRIGEL(登録商標)でコーティングしたディッシュ上でのmTeSR1培地(Stemcell Technologies社)での培養に移した。HUESMは、ノックアウトDMEM、20%ノックアウト血清、2mMのglutamax、0.1mMのNEAA、0.1mMの1XP/S及びメルカプトエタノールから構成され、これらは全てLife Technologies社(グランドアイランド、ニューヨーク州)から購入した。全段階で分化細胞は5%CO₂インキュベーター中で培養する。

20

【0070】

詳細な分化プロトコル

10µMのROCK阻害剤Y27632(Stemgent社；ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を含むmTeSR1培地(Stemcell Technologies社；バンクーバー、ブリティッシュコロンビア州、カナダ)中、 10×10^3 細胞/cm²の密度でPSCをMATRIGEL(登録商標)(BD Biosciences社；サンノゼ、カリフォルニア州)上に播種し、24時間、平板培養した。播種したhPSCのこの密度は、分化の8日目までに十分にコンフルエントになるように、また分化の12日目に多層構造になるように最適化したものである。この構成には、6ウェルプレートのうち1ウェル(80%コンフルエント)だけで、少なくとも 2×10^6 個のオリゴデンドロサイトを分化及び単離するのに十分な細胞を含んでいるため、大幅なPSC増殖は必要ない。hPSCコロニーが直径100～250µmに達するまで細胞を1～2日間インキュベートした。

30

【0071】

分化誘導の当日(0日目)に、小分子として10µMのSB431542(Stemgent社)及び250nMのLDN193189(Stemgent社)、ならびに100nMのall trans RA(Sigma Aldrich社；セントルイス、ミズーリ州)を含むmTeSR Custom Medium(Stemcell Technologies社)であるNeural Induction Mediumに培地を変更した。mTeSR Custom Mediumは、市販のmTeSR 1培地と同じ組成ではあるが、多能性を維持する5つの要素、すなわち塩化リチウム、GABA、ピペコリン酸、bFGF、及びTGF-1(Stemcell Technologies社)は含んでいない。mTeSR Custom Mediumの代わりに、約25µg/mlのインスリンを添加したDMEM/F12を使用することができた。新鮮なRA、SB431542、及びLDN193189を培地に毎日添加して、培地の交換を8日目まで毎日行った。

40

【0072】

50

8日目までに細胞はコンフルエントになり、PAX6発現がピークになる可能性が高い(図7A)。8日目に培地を、100nMのRA、1μMのSAG(EMD Millipore社;ビルリカ、マサチューセッツ州)または100ng/mlのrhSHH(R&D Systems社;ミネアポリス、ミネソタ州)を含むN₂培地に変更し、毎日新鮮なRA及びSAGを培地に添加して毎日交換した。

【0073】

12日目までにオーバーコンフルエントな細胞が積み重なり、三次元構造が明確に視認可能になった(図7B);これは分化を進める前の重要なチェックポイントである。細胞はOLIG2及びNKX2.2を発現した(図7C)。12日目に、機械的または酵素的に接着細胞を剥離してスフィアを形成させた。スフィアの形成により、OLIG2⁺前駆細胞が濃縮された。OLIG2⁺細胞だけが凝集してスフィアになったが、OLIG2⁻細胞は単一細胞のままであった。単層の機械的分散を利用した場合に最大数のO4⁺細胞のスフィアが最終的に得られた。単層の酵素的分散を利用した場合は、より均一なスフィアが少数得られた。機械的剥離では、栄養素が凝集体内の全細胞に到達できるように、セルリフターを使用して細胞を剥離し、細胞の単層を破壊して小さな塊にした。接着したままの細胞を確実に残さないように、ウェルを顕微鏡下で検査した。酵素消化に関しては、ACCUTASE(登録商標)(1ml/2mlDMEM/F12培地)をウェルに添加し、培養物を単一細胞懸濁液に分離した。

【0074】

1μMのSAGを含むN₂B₂7培地の超低接着プレートに凝集体を再播種し、1日おきにその培地を交換した。20日目に、培地をPDGF培地に変更し、2/3の培地の交換を1日おきに行った。培地交換中、穏やかにピペティングを行い、互いに付着していた凝集体を全てばらばらにした。30日目、ポリ-Lオルニチン臭化水素酸塩(50μg/ml;Sigma Ardrich社)及びラミニン(20μg/ml;Life Technologies社)でコーティングしたプレートに、スフィア2個/cm²(6ウェルプレートの1ウェル当たり約20個のスフィア)の密度でスフィアを播種した。この密度は、細胞がスフィアの外に移動して増殖し、継代を必要とせずにプロトコルの最後までにディッシュ全体に広がることのできるように最適化されたものである。p200ピペットを用いて、丸形で、金色/茶色で、中心は濃く、直径は300~800μmである凝集体を選択した(図7D)。完全に透明なスフィアは、オリゴデンドロサイトに分化しないため避けた。

【0075】

この段階では、プレートに播種したスフィアをマイトジェン含有培地(選択肢A)またはマイトジェンを全く含まない培地(選択肢B)で培養した。選択肢Aは、O4⁺細胞の最高収率を得るために最適化されたものであり、選択肢Bは、より短期間で低コストの形式のプロトコルを提供するように開発されたものである。

【0076】

選択肢A

30日目に、スフィアを上述のようにPDGF培地中、pO/Lプレートに播種し、分化の75日目まで1日おきにPDGF培地の2/3を交換した。55日目以降に、ライブO4染色によりO4⁺細胞の出現を評価した(図6)。75日目に、FACSによってO4⁺OPCを単離することができた(図7I)。あるいは、最終オリゴデンドロサイト分化(図7G、7H)では、75日目から細胞をグリア培地中で培養し、3日おきに2週間、培地の2/3を交換した。

【0077】

選択肢B

30日目に、スフィアを上述のようにグリア培地中、pO/Lプレートに播種し、分化の55日目まで1日おきにグリア培地の2/3を交換した。55日目に、ライブO4染色によりO4⁺細胞が視認可能になり(図6A~F、図7F)、またはFACSにより該細胞を単離した(図6G)。75日目に、FACSによりO4⁺OPCを単離することがで

10

20

30

40

50

きた。あるいは、75日目までグリア培地中で培養物を維持し、O4⁺細胞の収率を高めた(図6)。約60日目にMBP⁺細胞が出現し始めたことが観察された。

【0078】

選択肢A及び選択肢Bの両プロトコルでは、分化の30日目の凝集体及び終了時の細胞を生存率>70%で凍結保存できた。凝集体の生存率は、解凍後、pO/Lでコーティングしたディッシュに再接着する解凍スフィアの数に基づく。選別したO4⁺細胞は選別の直後に凍結できた。選別したO4⁺細胞の予測解凍後生存率は70~80%である。

【0079】

表2は、プロトコルに使用した培地組成のリストを提供する。

【0080】

(表2) 培養培地の詳細な組成

| 培地 | 成分 | 供給業者 | 最終濃度 |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------|
| N ₂ 培地 | DMEM/F12 | Life Technologies | |
| | Glutamax (100X) | Life Technologies | 1X |
| | 非必須アミノ酸 (100X) | Life Technologies | 1X |
| | β-メルカプトエタノール(1000X) | Life Technologies | 1X |
| | ペニシリン-ストレプトマイシン (100X) | Life Technologies | 1X |
| | N ₂ サプリメント(100X) | Life Technologies | 1X |
| N ₂ B ₂₇ | N ₂ 培地 | | |
| | B ₂₇ サプリメント(50X) | Life Technologies | 1X |
| PDGF 培地 | N ₂ B ₂₇ 培地 | | |
| | PDGF | R&D Systems | 10ng/ml |
| | IGF-1 | R&D Systems | 10ng/ml |
| | HGF | R&D Systems | 5ng/ml |
| | NT3 | EMD Millipore | 10ng/ml |
| | インスリン | Sigma-Aldrich | 25µg/ml |
| | ビオチン | Sigma-Aldrich | 100ng/ml |
| | cAMP | Sigma-Aldrich | 1µM |
| | T3 | Sigma-Aldrich | 60ng/ml |
| グリア培地 | N ₂ B ₂₇ 培地 | | |
| | アスコルビン酸 | Sigma-Aldrich | 20µg/ml |
| | HEPES | Sigma-Aldrich | 10mM |
| | インスリン | Sigma-Aldrich | 25µg/ml |
| | ビオチン | Sigma-Aldrich | 100ng/ml |
| | cAMP | Sigma-Aldrich | 1µM |
| | T3 | Sigma-Aldrich | 60ng/ml |

【0081】

パンチ生検からの皮膚繊維芽細胞の誘導

皮膚生検をMS患者及び健常者から得た(図13)。Tisch Multiple Sclerosis Research Center of New Yorkの4人の匿名患者が、標準的な診断基準に従ってPPMSと診断された。施設内倫理委員会の承認(BRANY)及びインフォームド Consentの下に当該患者らの生検を得た。患者は全て白人である。患者102及び107は男性で、それぞれ56歳及び61歳であり;患者104及び109は女性で、それぞれ62歳及び50歳である。

【0082】

3mmの皮膚生検をRPMI1460(Life Technologies社)及び1xのAntibiotic Antimycotic(Life Technologies社)から構成される生検回収培地に回収した。生検をスライスして小片(<1mm)にし、TC処理した35mmディッシュに5分間置いて乾燥させ、最後に、ロックアウトDMEM、2mMのGLUTAMAX(商標)、0.1mMのNEAA、0.1mMのメルカプトエタノール、10%ウシ胎児血清(FBS)、1xのペニシリン ストレプトマイシン(P/S;全てLife Technologies社製)及び1%ヌクレ

10

20

30

40

50

オシド (EMD Millipore 社) から構成された生検平板培養培地中で5日間、または最初の繊維芽細胞が生検から増殖するまでインキュベートした。あるいは、1000 U/ml の Collagenase 1A (Sigma Aldrich 社) で生検を37 °C で1.5時間消化し、洗浄し、回収し、生検平板培養培地中、1%ゼラチンでコーティングされた35mmディッシュで5日間平板培養した。その後、繊維芽細胞を、DMEM (Life Technologies 社)、2mMのGLUTAMAX (商標)、0.1mMのNEAA、0.1mMのメルカプトエタノール、10% FBS 及び1xのP/Sから構成された培養培地中で増殖させ、1日おきに培地を交換した。

【0083】

皮膚繊維芽細胞のリプログラミング

継代3~5代目の皮膚繊維芽細胞をStemgent社のmRNA/miRNAキットを使用してリプログラミングし、これによりOCT4、SOX2、KLF4、cMYC及びLIN28の修飾RNAを介して、遺伝子挿入がないウイルスフリーのヒトiPSCが生成された(図14)。特定のmiRNAクラスターの添加によってリプログラミング効率が上がる事が分かっている(Stemgent社)。すなわち、繊維芽細胞を、培養培地中 5.5×10^3 細胞/cm²の密度で、Matrigelでコーティングした6ウェルまたは12ウェルプレート上に播種した。翌日、培地を、B18Rを含有するNuff-conditioned Pluriton reprogramming mediumと交換した。細胞は、STEMFECT (商標) を用いて、0日目はmiRNAのみ、1日目~3日目はmRNAカクテルのみ、4日目はmRNAを加えたmiRNAカクテル、5日目~11日目はmRNAカクテルのみを用いて連続11日間トランスフェクションされた。11日目の後、ライブTRA-160のために陽性染色された視認可能コロニーを選択し、HUESM培地を用いてMEF上に再播種した。

【0084】

テラトーマアッセイ

実験はColumbia Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) に承認されたプロトコルに従って行った。

【0085】

iPSCコロニーをCollagenase (Sigma Aldrich 社) を用いて37 °C で15分間かけて分離し、洗浄し、回収し、200µlのHUESMに再懸濁した。その後、細胞を氷上で200µlのMatrigel (BD Biosciences 社) と混合し、免疫不全マウス (Jackson Laboratory; バーバー、メイン州) に皮下注射した。テラトーマを9~12週間かけて増殖させ、切開により単離し、4% PFA中、4 °C で一晩固定した。固定した組織をパラフィンに包埋し、厚さ10µmの切片にし、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E) で染色した。

【0086】

インビトロでの自発的分化

iPSCをACCUTASE (登録商標) (Life Technologies 社) で37 °C 、5分間かけて分離し、bFGFを含まないHUESM中、超低接着6ウェルプレートに播種し、1日おきに培地を交換した。培養から3週間後、胚様体 (EB) を1%ゼラチンでコーティングしたTC処理ディッシュ上で更に2週間平板培養した。EB及びそれらの派生物を4% PFA中、RTで8分間固定し、適当なマーカーで免疫染色した。

【0087】

RNA単離及びqRT-PCR

QIAshredder (Qiagen 社; ヒルデン、ドイツ) を含むRNeasy Plus Mini Kitを使用してRNA単離を行った。すなわち、細胞をペレット化し、PBSで洗浄し、溶解緩衝液に再懸濁した。その後、メーカーの使用説明書に従って更に処理するまで、試料を-80 °C で保存した。RNAを30µlのRNA分解酵素フリーddH₂O中に溶出し、NanoDrop 8000分光光度計 (Thermo Sc

10

20

30

40

50

ientific社;サマセット、ニュージャージー州)で定量した。

【0088】

qRT PCRでは、0.5 μgのRNA及びランダムプライマーを含むGoScript(商標)Reverse Transcription System(Promega社;マジソン、ウィスコンシン州)を用いてcDNAを合成した。その後、20ngのcDNAを、10 μlのGoTaq(登録商標)qPCR Master Mix及び1 μlの各プライマー(10 nM)を含む20 μlの反応液と共に96ウェル反応プレートにロードし、プレートをStratagene Mx300P qPCR System(Agilent Technologies社;サンタクララ、カリフォルニア州)中でPCRに供した。表3はプライマー配列のリストである。

10

【0089】

(表3) qRT PCRに使用するプライマーの配列

| SEQ ID. NO. | 標的遺伝子 | フォワードプライマー | SEQ ID. NO. | リバースプライマー |
|-------------|---------------|-------------------------|-------------|--------------------------|
| 1 | <i>PAX6</i> | TTGCCCAGAAAGACTAGC | 2 | CATTGGCCCTTCGATTAGA |
| 3 | <i>OLIG2</i> | TGCGCAAGCTTTCCAAGAT | 4 | CAGCGAGTTGGT GAGCATGA |
| 5 | <i>NKX2.2</i> | GACAACGGGTGGCAGATTCGCTT | 6 | AGCCACAAAGAAAGGAGTTGGACC |
| 7 | <i>PTCH1</i> | ATCTGCACCGGCCAGCTACT | 8 | CCACCGCGAAGGCCCAAATA |
| 9 | <i>SHH</i> | AAACACCGGAGCGGACAGGC | 10 | GGTCGCGGTCAGACGTGGTG |

20

【0090】

多能性に関するNanosttring解析

上述したように、未分化iPSC及びhESC HUES45からRNAを単離した。メーカーの使用説明書に従って、特定のReporter Code Set及びCapture Probe Set(NanoString Technologies社;シアトル、ワシントン州)を用いてハイブリダイゼーション用のRNA(100ng/試料)をロードした。データは、以下のハウスキーピング遺伝子:ACTB、POLR2A、ALAS1に対して正規化した。データは、hESC株(HUES45=1)の発現に対する変化倍率として表した。図15を参照されたい。

30

【0091】

核型分析

正常な核型を確認するため、全iPSC株をCell Line Geneticsによる細胞遺伝学的分析に供した。

【0092】

免疫染色及び画像処理

細胞を、PBST(0.1%Triton X100を含むPBS)中で10分間かけて3回洗浄し、ブロッキング血清(5%ヤギまたはロバ血清を含むPBST)中で2時間インキュベートし、一次抗体を添加して4で一晩置いた(表4)。翌日、細胞をPBST中で15分間かけて3回洗浄し、室温(RT)で二次抗体と共に2時間インキュベートし、PBST中で10分間かけて3回洗浄し、室温で15分間DAPIにより対比染色し、PBSで2回洗浄した。Invitrogen(商標)のAlexa Fluor二次抗体、ヤギまたはロバの抗マウス、ラット、ウサギ、ヤギ及びニワトリ488、555、568及び647を1:500希釈して使用した(Life Technologies社)。

40

【0093】

Olympus社の蛍光用DP30BW白黒デジタルカメラ及びH&E染色用DP72デジタルカラーカメラを備えたOlympus社のIX71倒立顕微鏡を用いて画像を取得した。Olympus社のソフトウェアDP ManagerまたはImageJを用いてデジタル処理で蛍光色を適用した。計数するために、少なくとも3つの重複していな

50

い領域をImageJに取り込ませ、閾値決定し、手動でスコアを付けた。

【0094】

フローサイトメトリー

37、25分間のACCUTASE（登録商標）処理により細胞を酵素的に回収し、単一細胞懸濁液を得た。次いで、適当な量の一次抗体または蛍光結合抗体のいずれかを含有する培地それぞれ100 μ lに細胞を再懸濁し、遮光して氷上で30分間インキュベートした。二次抗体を使用する場合、一次抗体はPBSで洗浄し、二次抗体は氷上に30分間置いた。染色された細胞、またはGFPを発現する細胞をPBSで洗浄し、20psiの100 μ mのセラミックノズルを使用した5レーザーのBD Biosciences社製ARIA IIu（商標）Cell Sorterで即時に選別した。死細胞を排除するためにDAPIを使用した。BD FACSDiva（商標）ソフトウェアを用いてフローサイトメトリーデータを分析した。

10

【0095】

シバラー（shi/shi）xRag2^{-/-}マウスへの移植

シバラー/Rag2マウス（University of Rochester；Windrem, M.S.ら、Cell Stem Cell. 2:553~565（2008年））を用いた全実験は、University at Buffalo Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）に承認されたプロトコルに従って行った。事前に凍結保存されていたFACS選別O4⁺OPCを解凍し、PDGF培地中、pO/Lディッシュ上で平板培養することにより手術前の1~2日間で回復させた。1 μ l当り1 \times 10⁵個で細胞を再懸濁することにより、細胞を注射用に調製した。

20

【0096】

既述のとおり注射を行った。Sim, F.J.ら（2011年）。仔動物を低体温法で麻酔し、5 \times 10⁴個の細胞を出生後2~3日の仔動物の検体脳梁に、各部位両側に1.1mmの深さで注射した。細胞はブルドガラスピペットにより注入し、仮定標的部位に頭蓋骨から直接挿入した。12~16週目に動物を屠殺し、生理食塩水で灌流し、続いて4%パラホルムアルデヒドで灌流した。マウス前脳の凍結保存された冠状切片（16 μ m）を切断し、160 μ mごとに採取した。Sim, F.J.ら（2011年）。ヒト細胞をマウス抗ヒト核（hNA）で同定し、ミエリン塩基性タンパク質発現オリゴデンドロサイトをMBPで標識した。ヒトアストロサイト及びOPCは、それぞれhGFAP及びhNG2に対するヒト特異的抗体で染色した。マウス神経フィラメント（NF）をSMI311及びSMI312の1:1混合物で染色した。Invitrogen（商標）のAlexa Fluor二次抗体、ヤギ抗マウス488、594及び647を1:500に希釈して使用した（Life Technologies社）。透過型電子顕微鏡検査のため、組織を上述のように処理した。Sim, F.J.ら、Molec. Cell. Neurosci. 20:669~682（2002年）。表4は使用する一次抗体のリストである。

30

【0097】

（表4）一次抗体

40

| 抗原 | 希釈度 | ホスト | 供給業者 | 抗原 | 希釈度 | ホスト | 供給業者 |
|--------------------|-------|------|--------------|---------------------------------|--------|------|-------------|
| OCT4 | 1:250 | ウサギ | Stemgent | SOX10 | 1:100 | ヤギ | R&D Sys. |
| TRA-1-60 | 1:250 | マウス | Millipore | NG2 | 1:200 | マウス | BD Biosci. |
| SOX2 | 1:250 | ウサギ | Stemgent | PDGFR α -PE | 1:5 | マウス | BD Biosci. |
| TRA-1-81 | 1:250 | マウス | Millipore | O4 | 1:30 | マウス | Goldman lab |
| NANOG | 1:100 | ウサギ | Cell Signal. | MBP | 1:200 | ラット | Millipore |
| SSEA4 | 1:250 | マウス | Abcam | MAP2 | 1:5000 | ニワトリ | Abcam |
| AFP | 1:300 | ウサギ | Dako | GFAP | 1:750 | ウサギ | Dako |
| α SMA | 1:300 | マウス | Sigma | hNAクローン235-1 | 1:100 | マウス | Millipore |
| β III-チューブリン | 1:500 | ニワトリ | Neuromics | GFAP (インビボ) | 1:800 | マウス | Covance |
| PAX6 | 1:250 | ウサギ | Covance | NG2 (インビボ) | 1:800 | マウス | Millipore |
| OLIG2 | 1:500 | ウサギ | Millipore | SMI311, SMI312 (マウス神経フィラメント) | 1:800 | マウス | Covance |
| NKX2.2 | 1:75 | マウス | DSHB | | | | |

10

【 0 0 9 8 】

参考文献

20

本開示の他の項で引用された文献に加えて、以下の参考文献により更なる状況が提供され得る。本開示に引用された参考文献は全て、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。更に、本明細書に引用または言及されているあらゆる製品のメーカーの使用説明書またはカタログが、参照により取り込まれる。参照により本文書に取り込まれた文献またはその中のあらゆる教示を、本発明の実施において使用することができる。参照により本文書に取り込まれた文献は、先行技術であると認めたものではない。

Antel, J. *et al.*, *Acta Neuropathol.* 123:627–638 (2012).

Boulting, G.L. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 29:279-286 (2011).

Hauser, S.L. *et al.*, *Ann Neurol.* 74:317-327 (2013).

30

Hu, Z. *et al.*, *Differentiation* 78:177-184 (2009).

Miller, R.H. *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 76:9-19 (2004).

Patani, R. *et al.*, *Nature Communications* 2:214 (2011).

Rice, C.M. *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Ps.* 84:1100–1106 (2013).

Tomassy, G.S. *et al.*, *Frontiers Cell. Neurosci.* 8:201 (2014).

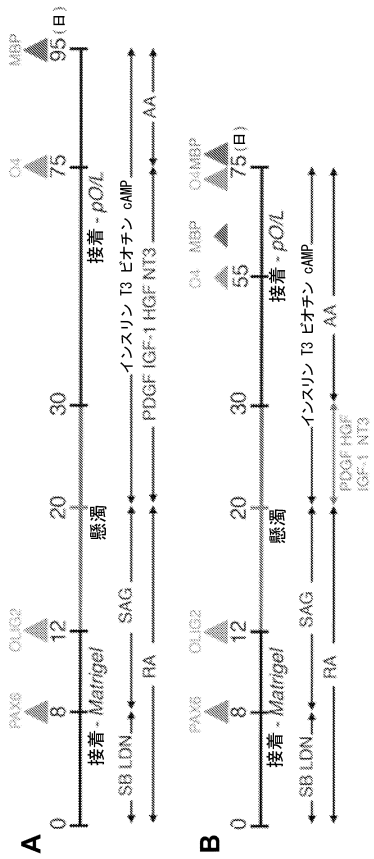
Yamada M. *et al.*, *Nature* 510:533-536 (2014).

【 0 0 9 9 】

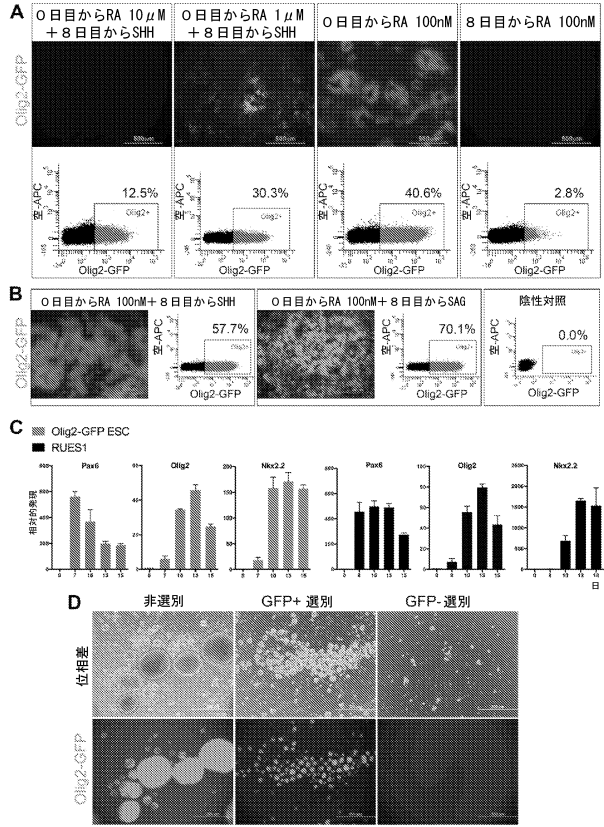
40

特定の実施形態の上述の説明は本発明の全体的な特性を完全に明らかにし、そうすることにより、本発明の全体的な概念から逸脱することなく、多様な用途のために当業者がこのような特定の実施形態を容易に改変及び/または適合させる範囲内にある知識を、他者が不必要な実験をすることなく適用することが可能になる。従って、そのような適合及び改変は、本明細書に提示された教示及び指針に基づいて、開示された実施形態の等価物の意味及び範囲内にあるように意図されている。本明細書の用語または表現が上記教示及び指針を鑑みて当業者によって解釈されるように本明細書の表現または用語は説明する目的であり、限定する目的ではないことは理解されているものとする。本発明は、以下の特許請求の範囲によってさらに説明される。

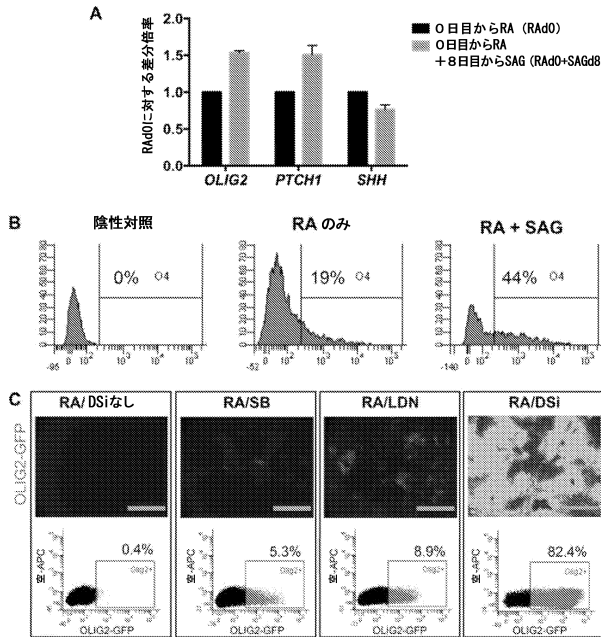
【 図 1 】



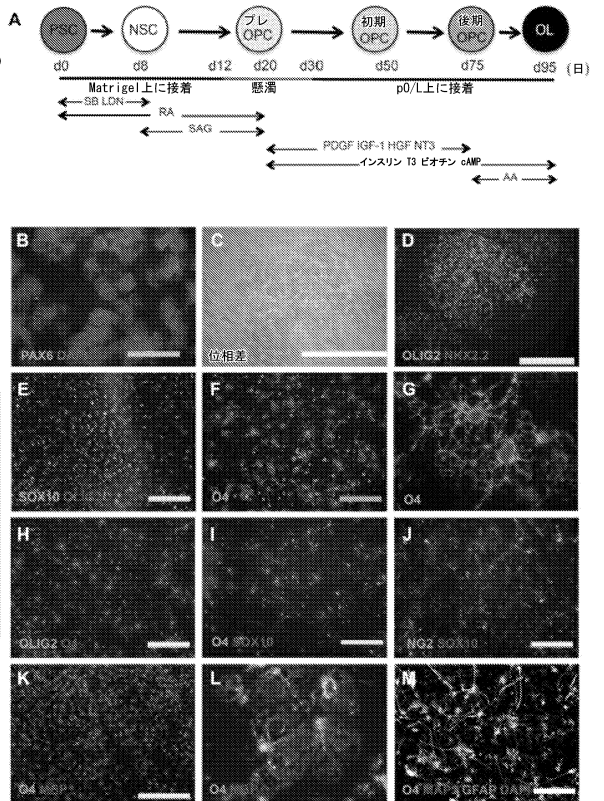
【 図 2 】



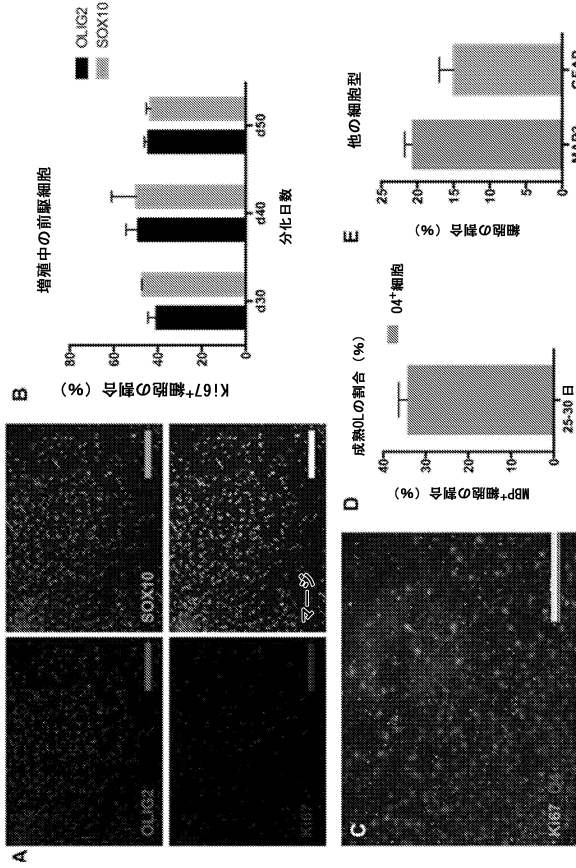
【 図 3 】



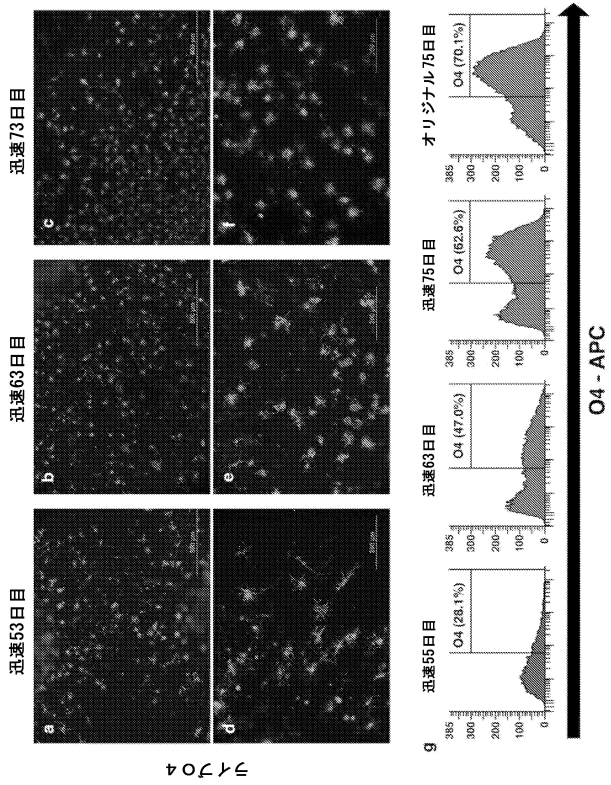
【 図 4 】



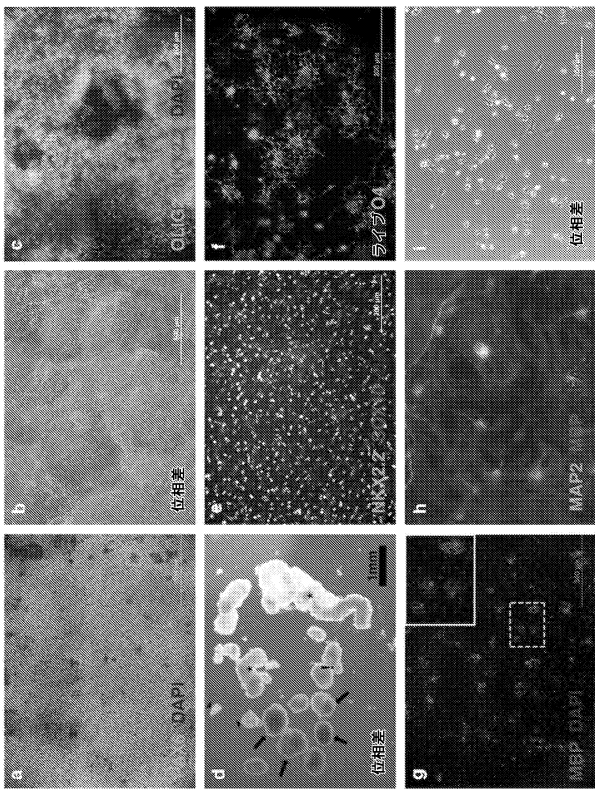
【 図 5 】



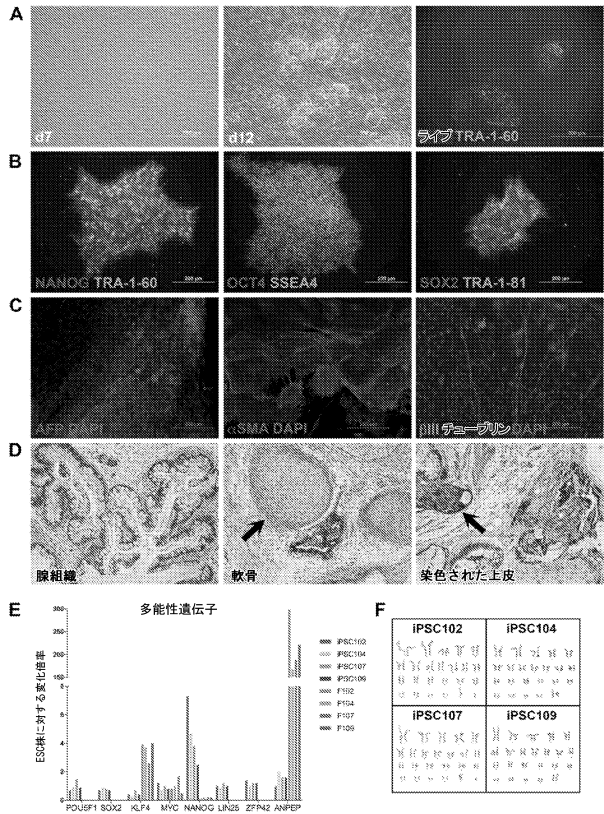
【 図 6 】



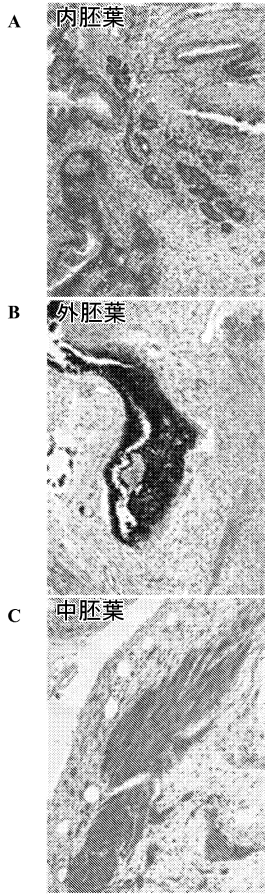
【 図 7 】



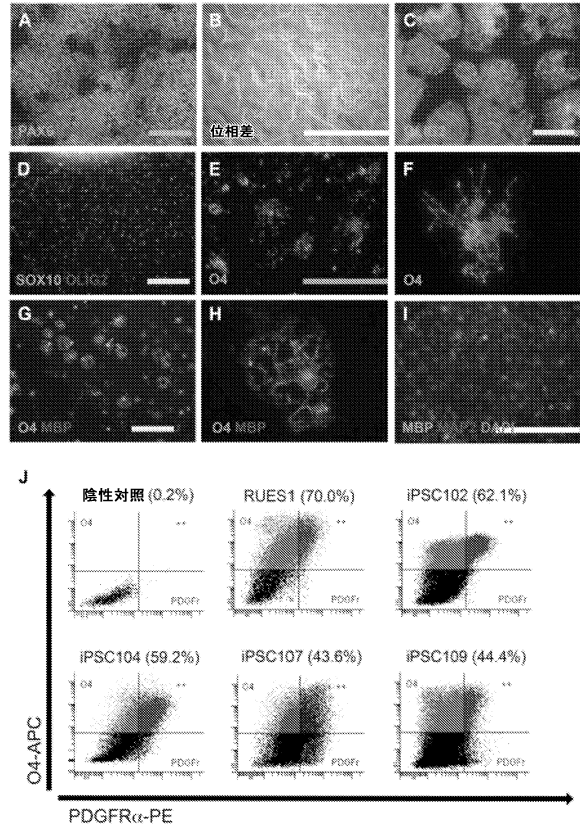
【 図 8 】



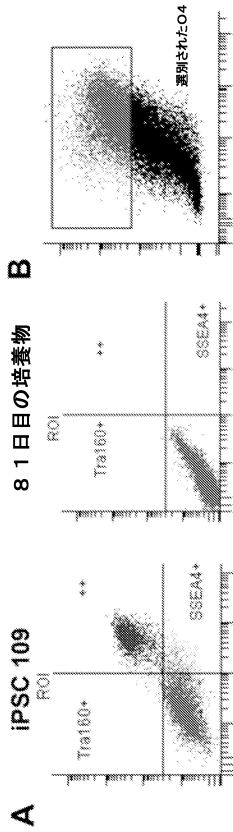
【図9】



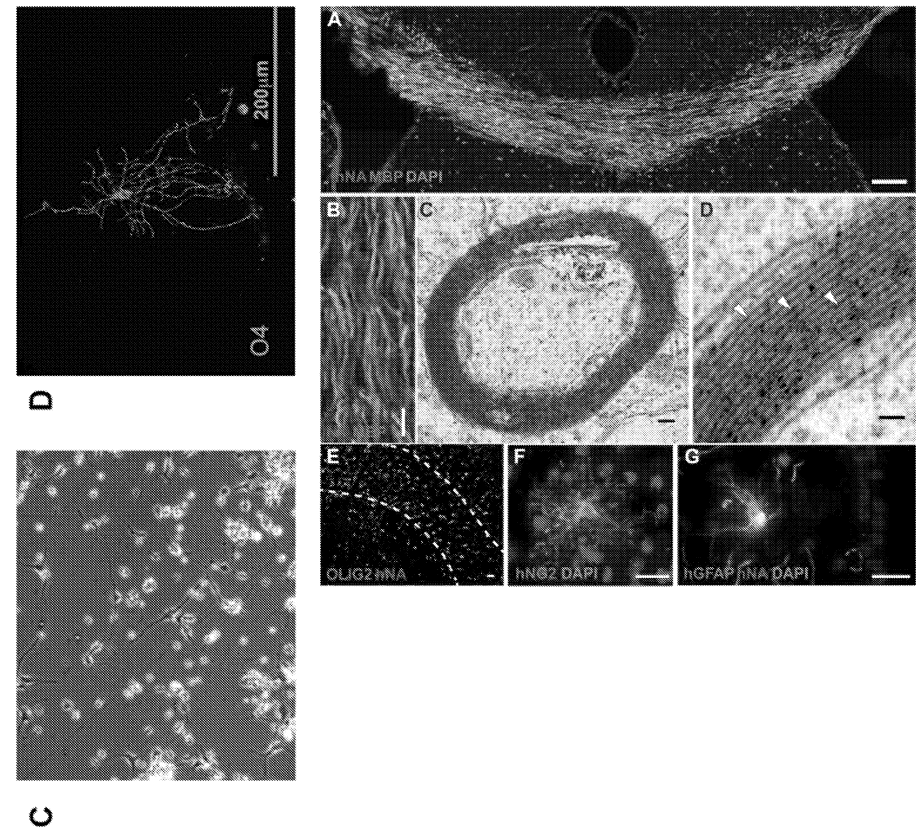
【図10】



【図11】



【図12】



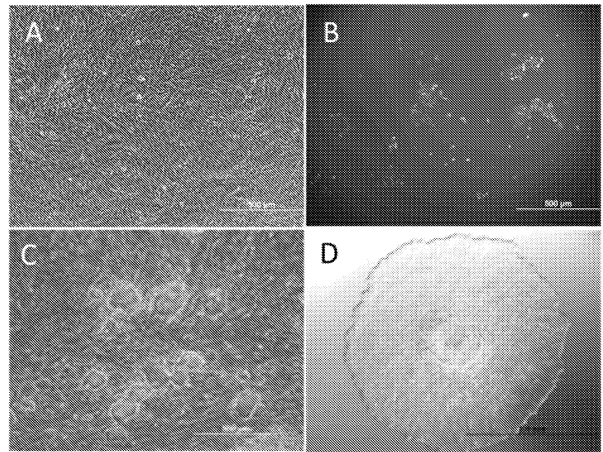
【図13】

| iPS株 | MSの病型 | 性別 | 年齢 |
|------|-------|----|----|
| 106 | 再発寛解型 | 男性 | 24 |
| 112 | 再発寛解型 | 女性 | 63 |
| 108 | 再発寛解型 | 女性 | 50 |
| 105 | 二次進行型 | 女性 | 63 |
| 103 | 二次進行型 | 男性 | 42 |
| 101 | 二次進行型 | 男性 | 58 |
| 105 | 二次進行型 | 女性 | 63 |
| 102 | 一次進行型 | 男性 | 56 |
| 107* | 一次進行型 | 男性 | 61 |
| 109 | 一次進行型 | 女性 | 50 |
| 104 | 一次進行型 | 女性 | 62 |
| 111 | 健常対照 | 男性 | 28 |
| 110* | 健常対照 | 男性 | 66 |
| 130 | 健常対照 | 男性 | 52 |
| 197 | 健常対照 | 男性 | 66 |
| 223 | 健常対照 | 女性 | 50 |

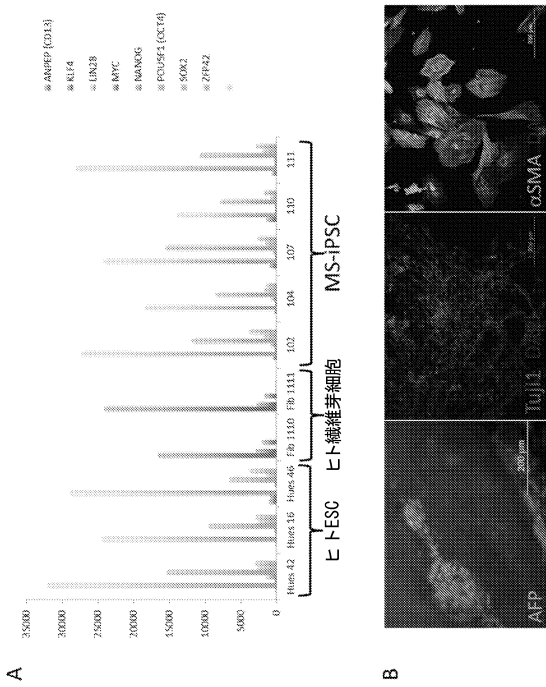
*=兄弟

【図14】

リプログラミング技術：
フィーダーフリーのmRNA/miRNA (StemGent社)

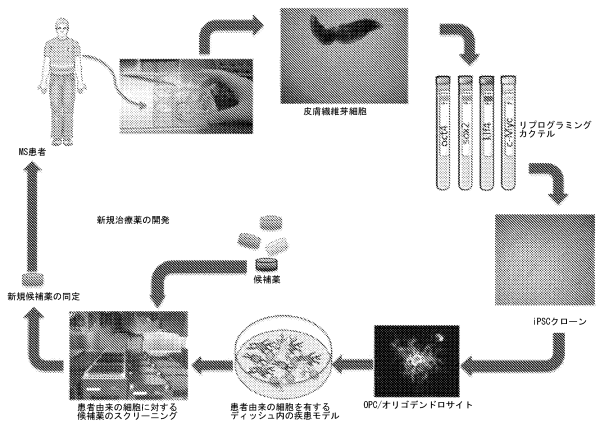


【図15】



【図16】

MSを理解するためのNYSCFアプローチ



【配列表】

0006873705000001.app

フロントページの続き

| | | | | |
|-------------|-------|-----------|---------|---------|
| (51)Int.Cl. | | F I | | |
| A 6 1 K | 35/15 | (2015.01) | A 6 1 K | 35/15 Z |
| A 6 1 P | 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/00 |
| A 6 1 P | 25/28 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/28 |

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フォサッティ バレンティナ
アメリカ合衆国 1 0 0 2 3 ニューヨーク州 ニューヨーク ブロードウェイ 1 9 9 5 スイ
ート 6 0 0

(72)発明者 ドウバラス パナギオティス
アメリカ合衆国 1 0 0 2 3 ニューヨーク州 ニューヨーク ブロードウェイ 1 9 9 5 スイ
ート 6 0 0

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0159595 (US, A1)
Development, 2009年, Vol. 136, pp. 1443-1452, Supplementary Material
Stem Cell Reports, 2013年, Vol. 1, pp. 437-450
Nat Methods., 2011年, Vol. 8, pp. 957-962, Supplementary Material

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 7 9

A 0 1 K 6 7 / 0 2 7

C 1 2 N 5 / 0 7 9 7

C 1 2 Q 1 / 0 2

A 6 1 K 3 5 / 1 5

A 6 1 P 2 5 / 0 0

A 6 1 P 2 5 / 2 8

C 1 2 N 5 / 0 7 1

C 1 2 N 5 / 0 7 3 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)