

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年2月6日(2020.2.6)

【公表番号】特表2019-503679(P2019-503679A)

【公表日】平成31年2月14日(2019.2.14)

【年通号数】公開・登録公報2019-006

【出願番号】特願2018-533140(P2018-533140)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0793 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

C 0 7 K 14/50 (2006.01)

A 6 1 P 1/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/02 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/05 (2006.01)

A 6 1 K 31/18 (2006.01)

C 1 2 N 5/0797 (2010.01)

C 1 2 N 5/074 (2010.01)

C 1 2 N 5/095 (2010.01)

C 1 2 N 5/0775 (2010.01)

C 1 2 N 5/0789 (2010.01)

C 0 7 K 14/81 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/0793 Z N A

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 9/99

C 0 7 K 14/50

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 25/02

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 35/545

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 38/05

A 6 1 K 31/18

C 1 2 N 5/0797

C 1 2 N 5/074

C 1 2 N 5/095

C 1 2 N 5/0775

C 1 2 N 5/0789

C 0 7 K 14/81

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月19日(2019.12.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

幹細胞の分化を誘導するための *in vitro* 方法であって、幹細胞集団を、有効量の TGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および有効量の Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触させるステップ、およびさらに前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間接触させて、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団を生成するステップを含む、方法。

【請求項2】

前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と約6日間接触させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞集団と前記 Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記細胞集団と前記 Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から少なくとも約2日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記細胞集団と前記 Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約4日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記幹細胞集団が、それらと前記 TGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約11日目またはそれより後に、前記1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団に分化している、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記幹細胞集団を、SMA Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と接触させるステップを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記幹細胞集団を、前記 TGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および前記 SMA Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と同時に接触させるステップを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記幹細胞集団と前記 TGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約4日間以内に、前記細胞集団を、前記 Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるステップを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記幹細胞集団と前記 TGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数

の阻害剤との初期接触から約2日目に、前記細胞集団を、前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるステップを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記集団と前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触と同日に、前記幹細胞集団を、前記TGF α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と最初に接触させるステップを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

(a) 前記TGF α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、SB431542、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である；かつ/または

(b) 前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、Wntシグナル伝達の活性化のために、グリコゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3) を低減する；かつ/もしくは前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、CHIR99021、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である；かつ/または

(c) 前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、レチノイン酸、レチノール、レチナール、トレチノイン、イソトレチノイン、アリトレチノイン、エトレチネート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダパレン、FGFシグナル伝達の活性化因子、Wnt活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、もしくは前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、FGFシグナル伝達の活性化因子、Wntシグナル伝達の活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、

請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記細胞集団を、迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子と接触させるステップを含み、必要に応じて、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子が、レチノイン酸である、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記細胞集団を、迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種と接触させるステップを含み、必要に応じて、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および1種または複数のWnt活性化因子であり、必要に応じて、a) 前記FGFシグナル伝達の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF7、およびFGF8からなる群から選択される；かつ/またはb) 前記Wntシグナル伝達の活性化因子が、CHIR99021およびWNT3Aからなる群から選択される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記迷走神経堤パターン形成が、1種または複数の領域特異的ホメオボックス(HOX)遺伝子の発現によって特徴付けられ、必要に応じて、前記1種または複数の領域特異的HOX遺伝子が、HOXB2、HOXB3、HOXB4、およびHOXB5からなる群から選択される、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記1種または複数の腸神経堤システムマーカが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記分化細胞集団が、1種または複数のSOX10⁺神経堤システムマーカをさらに発現し、必要に応じて、前記SOX10⁺神経堤システムマーカが、CD49Dである、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記幹細胞が、ヒト幹細胞であり、必要に応じて、前記ヒト幹細胞が、ヒト胚幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様の多能性幹細胞、胚盤葉上層幹細胞、およびFクラス多能性幹細胞からなる群から選択される、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

さらに前記分化細胞を1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する細胞集団に成熟させるのに好都合な条件に、前記分化細胞集団を晒すステップを含み、必要に応じて、前記分化細胞を前記腸ニューロン集団に成熟させるのに好都合な前記条件が、前記分化細胞を適切な細胞培養培地中で培養することを含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記適切な細胞培養培地が、腸ニューロンへの腸神経堤(ENC)前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子を含み、必要に応じて、前記腸ニューロンへのENC前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子が、成長因子およびWnt活性化因子からなる群から選択される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記成長因子が、FGFシグナル伝達の活性化因子、グリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)、およびアスコルビン酸からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記適切な細胞培養培地が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子およびWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含み、必要に応じて、前記分化細胞が、前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含む前記適切な細胞培養培地中で約4日間培養される、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF8、およびFGF7からなる群から選択される、請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

前記1種または複数の腸ニューロンマーカーが、Tuj1、MAP2、PHOX2A、PHOX2B、TRKC、ASCL1、HAND2、EDNRB、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、請求項19から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現するin vitro分化細胞の細胞集団であって、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法にしたがって幹細胞集団から誘導される、分化細胞集団。

【請求項26】

1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現するin vitro分化細胞の細胞集団であって、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する請求項25に記載の細胞集団から誘導され、必要に応じて、請求項19から24のいずれか一項に記載の方法にしたがって、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団から誘導される、分化細胞集団。

【請求項27】

請求項25または26に記載の細胞集団を含む、組成物。

【請求項28】

対象の腸神経系障害の予防および/または処置において使用するための、請求項25もしくは26に記載の細胞集団または請求項27に記載の組成物であって、必要に応じて、前記腸神経系障害が、ヒルシュスプルング病である、細胞集団または組成物。

【請求項 29】

ヒルシュスプルング病、ヒルシュスプルング病関連遺伝的欠陥、および/または別の腸神経系障害を予防および/または処置するのに適した化合物を同定する *in vitro* 方法であって、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する請求項 40 から 69 のいずれか一項に記載の細胞集団、1種または複数の腸神経のマーカーを発現する請求項 71 から 83 のいずれか一項に記載の細胞集団、およびそれらの組合せから選択される細胞集団によって提示される少なくとも1つの遊走欠損を救済することができる化合物を同定するステップを含み、事前分化した幹細胞が、エンドセリン受容体 B 型 (EDNRB) においてホモ接合性機能喪失変異を含む、方法。

【請求項 30】

(a) (i) 前記細胞集団、および (ii) 試験化合物を提供するステップと、
 (b) 前記細胞集団を、前記試験化合物と接触させるステップと、
 (c) 前記細胞集団の遊走挙動を測定するステップと
 を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞集団が、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する請求項 40 から 69 のいずれか一項に記載の細胞集団である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞集団が、前記試験化合物と少なくとも約 6 時間、少なくとも約 12 時間、または少なくとも約 24 時間接触される、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、

(a) TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤であって、必要に応じて、前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤が、SB431542、それらの誘導體、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤、

(b) Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子であって、必要に応じて、前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子が、Wnt シグナル伝達の活性化のためにグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK3) を低減する；かつ/または前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子が、CHIR99021、それらの誘導體、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子、

(c) 迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子であって、必要に応じて、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子が、レチノイン酸、レチノール、レチナール、トレチノイン、イソトレチノイン、アリトレチノイン、エトレチネート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダパレン、FGF シグナル伝達の活性化因子、Wnt 活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される；または前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子が、FGF シグナル伝達の活性化因子、Wnt シグナル伝達の活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択され、必要に応じて、前記 FGF シグナル伝達の活性化因子が、FGF 2、FGF 4、FGF 7、および FGF 8 からなる群から選択される、かつ/または前記 Wnt シグナル伝達の活性化因子が、CHIR99021 および WNT3A からなる群から選択される、迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子；ならびに必要に応じて、

(d) 1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団への前記幹細胞の分化を誘導するための指示書であって、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と、少なくとも約 2 日間接触させるための指示を含み、必要に応じて、前記指示書が請求項 2 から 18 のいずれか一項に記載の方法を含む指示書、および

(e) SMA D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤であって、必要に応じて、前記 S

M A Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、S M A Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤
を含む、キット。

【請求項34】

幹細胞の分化を誘導するための *in vitro* 方法であって、幹細胞集団を、有効量の T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および有効量の W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触させるステップ、およびさらに前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間、約2日間～約20日間の間、または約2日間～約6日間の間接触させて、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団を生成するステップを含み、前記細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記 W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に行われ、必要に応じて、前記細胞集団と前記 W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触が、前記幹細胞集団と前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から始まる約4日間以内に行われる、方法。

【請求項35】

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する *in vitro* 分化細胞集団であって、請求項34に記載の方法にしたがって幹細胞集団から誘導される、分化細胞集団。

【請求項36】

幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、(a) T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、(b) W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子、(c) 迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子、および必要に応じて(d) 1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団への前記幹細胞の分化を誘導するための指示書であって、前記細胞集団と前記 W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と最初に接触させ、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間、約2日間～約20日間の間、または約2日間～約6日間の間接触させるための指示を含む指示書を含み、必要に応じて、前記指示書が、前記幹細胞集団と前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約4日間以内に、前記細胞集団を、前記 W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるための指示を含む、キット。

【請求項37】

in vitro 分化細胞集団を含む組成物であって、前記細胞集団の少なくとも約70%が、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現し、前記細胞集団の約15%未満が、幹細胞マーカー、C N Sマーカー、脳神経堤(C N C)マーカー、メラニン形成細胞コンピテント神経堤(M N C)マーカー、神経細胞マーカー、および間葉系前駆体マーカーからなる群から選択される1種または複数のマーカーを発現する、組成物。

【請求項38】

(a) 前記腸神経堤システムマーカーが、P A X 3、E D N R B、R E T、P H O X 2 A、P H O X 2 B、N T R K - 3、H A N D 2、H O X B 3、H O X B 5およびA S C L 1からなる群から選択される；かつ/または

(b) 前記幹細胞マーカーが、O C T 4、N A N O G、S O X 2、L I N 2 8、S S E A 4およびS S E A 3からなる群から選択される；かつ/または

(c) 前記C N Sマーカーが、P A X 6、N E S T I N、ビメンチン、F O X G 1、S O X 2、T B R 1、T B R 2およびS O X 1からなる群から選択される；かつ/または

(d) 前記CNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される；かつ/または

(e) 前記MNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される；かつ/または

(f) 前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、TRKC、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される；かつ/または

(g) 前記間葉系前駆体マーカーが、SMA、ビメンチン、HLA-ABC、CD105、CD90およびCD73からなる群から選択される；かつ/または

(h) 前記1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する約 1×10^4 ~ 約 1×10^{10} 個の細胞集団を含む、

請求項37に記載の組成物。

【請求項39】

in vitro分化細胞集団を含む組成物であって、前記細胞集団の少なくとも約70%が、1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現し、前記細胞集団の約15%未満が、幹細胞マーカー、腸神経堤システムマーカー、CNSマーカー、脳神経堤(CNC)マーカー、メラニン形成細胞コンピテント神経堤(MNC)マーカー、神経細胞マーカー、および間葉系前駆体マーカーからなる群から選択される1種または複数のマーカーを発現する、組成物。

【請求項40】

(a) 前記腸神経堤システムマーカーが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される；かつ/または

(b) 前記腸ニューロンマーカーが、Tu j 1、MAP2、PHOX2A、PHOX2B、TRKC、ASCL1、HAND2、EDNRB、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される；かつ/または

(c) 前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SOX2、LIN28、SSEA4およびSSEA3からなる群から選択される；かつ/または

(d) 前記CNSマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される；かつ/または

(e) 前記CNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される；かつ/または

(f) 前記MNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される；かつ/または

(g) 前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、TRKC、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される；かつ/または

(h) 前記間葉系前駆体マーカーが、SMA、ビメンチン、HLA-ABC、CD105、CD90およびCD73からなる群から選択される；かつ/または

(i) 前記1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個の細胞集団を含む、

請求項39に記載の組成物。

【請求項41】

ENS障害(例えば、HD)の予防および/または処置において使用するための、
セクレターゼ(BACE)の阻害剤を含む組成物。

【請求項42】

前記 B A C E の阻害剤が、B A C E 2 の阻害剤、L Y 4 5 0 1 3 9、L Y 2 8 8 6 7 2 1、L Y 2 8 1 1 3 7 6、ベルベセスタット (M K - 8 9 3 1)、および A Z D 3 8 3 9 からなる群から選択され、必要に応じて、前記 B A C E の阻害剤が、B A C E 2 の阻害剤であり、必要に応じて、前記 B A C E 2 の阻害剤が、B A C E 阻害剤 I V (B A C E 阻害剤 C 3) である、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

E N S 障害 (例えば、H D) の予防および / または処置において使用するための、酸性プロテアーゼの阻害剤を含む組成物。

【請求項 4 4】

前記酸性プロテアーゼの阻害剤が、ペプスタチン A、リトナビル、インジナビル、ザンキレン、アリスキレンおよび L Y - 4 5 0 1 3 9 からなる群から選択され、必要に応じて、前記酸性プロテアーゼの阻害剤が、ペプスタチン A である、請求項 4 3 に記載の組成物。

。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 1 7】

W . ある特定の実施形態では、本開示の主題は、E N S 障害を予防および / または処置するための、酸性プロテアーゼの阻害剤の使用を提供する。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

幹細胞の分化を誘導するための i n v i t r o 方法であって、幹細胞集団を、有効量の T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤および有効量の W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と接触させるステップ、およびさらに前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と、少なくとも約 2 日間接触させて、1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団を生成するステップを含む、方法。

(項目 2)

前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と約 6 日間接触させるステップを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から約 8 日間以内に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から少なくとも約 2 日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から約 4 日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるステップを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記幹細胞集団が、それらと前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触から約 1 1 日目またはそれより後に、前記 1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団に分化している、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記幹細胞集団を、S M A Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と接触させるステップを含む、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記幹細胞集団を、前記T G F /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および前記S M A Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と同時に接触させるステップを含む、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記幹細胞集団と前記T G F /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約4日間以内に、前記細胞集団を、前記W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるステップを含む、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記幹細胞集団と前記T G F /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約2日目に、前記細胞集団を、前記W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるステップを含む、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記集団と前記W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触と同日に、前記幹細胞集団を、前記T G F /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と最初に接触させるステップを含む、項目9に記載の方法。

(項目12)

前記T G F /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目1から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記S M A Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、W n tシグナル伝達の活性化のために、グリコゲン合成酵素キナーゼ3 (G S K 3)を低減する、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、レチノイン酸、レチノール、レチナール、トレチノイン、イソトレチノイン、アリトレチノイン、エトレチネート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダバレン、F G Fシグナル伝達の活性化因子、W n t活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、F G Fシグナル伝達の活性化因子、W n tシグナル伝達の活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記細胞集団を、迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子と接触させるステップを含む、項目16または17に記載の方法。

(項目19)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子が、レチノイン酸である、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記細胞集団を、迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種と接触させるステップを含む、項目17に記載の方法。

(項目21)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および1種または複数のWnt活性化因子である、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記FGFシグナル伝達の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF7、およびFGF8からなる群から選択される、項目21に記載の方法。

(項目23)

前記Wntシグナル伝達の活性化因子が、CHIR99021およびWNT3Aからなる群から選択される、項目21または22に記載の方法。

(項目24)

前記迷走神経堤パターン形成が、1種または複数の領域特異的ホメオボックス(HOX)遺伝子の発現によって特徴付けられる、項目1から23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記1種または複数の領域特異的HOX遺伝子が、HOXB2、HOXB3、HOXB4、およびHOXB5からなる群から選択される、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記1種または複数の腸神経堤システムマーカが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される、項目1から25のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

前記分化細胞集団が、1種または複数のSOX10⁺神経堤システムマーカをさらに発現する、項目1から26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記SOX10⁺神経堤システムマーカが、CD49Dである、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記幹細胞が、ヒト幹細胞である、項目1から28のいずれか一項に記載の方法。

(項目30)

前記ヒト幹細胞が、ヒト胚幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様の多能性幹細胞、胚盤葉上層幹細胞、およびFクラス多能性幹細胞からなる群から選択される、項目1から28のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

さらに前記分化細胞を1種または複数の腸ニューロンマーカを発現する細胞集団に成熟させるのに好都合な条件に、前記分化細胞集団を晒すステップを含む、項目1から30のいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

前記分化細胞を前記腸ニューロン集団に成熟させるのに好都合な前記条件が、前記分化細胞を適切な細胞培養培地中で培養することを含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記適切な細胞培養培地が、腸ニューロンへの腸神経堤(ENC)前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子を含む、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記腸ニューロンへのENC前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子が、成長因子およびWnt活性化因子からなる群から選択される、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記成長因子が、FGFシグナル伝達の活性化因子、グリア細胞系由来神経栄養因子（GDNF）、およびアスコルビン酸からなる群から選択される、項目34に記載の方法。

（項目36）

前記適切な細胞培養培地が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子およびWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含む、項目34に記載の方法。

（項目37）

前記分化細胞が、前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含む前記適切な細胞培養培地中で約4日間培養される、項目36に記載の方法。

（項目38）

前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF8、およびFGF7からなる群から選択される、項目35から37のいずれか一項に記載の方法。

（項目39）

前記1種または複数の腸ニューロンマーカーが、Tuj1、MAP2、PHOX2A、PHOX2B、TRKC、ASCL1、HAND2、EDNRB、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、項目31から38のいずれか一項に記載の方法。

（項目40）

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する*in vitro*分化細胞集団であって、

幹細胞集団を、有効量のTGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および有効量のWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触させるステップ、および

さらに前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間接触させるステップ

の後に幹細胞集団から誘導される、分化細胞集団。

（項目41）

前記細胞集団が、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と約6日間接触される、項目40に記載の分化細胞集団。

（項目42）

前記細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に行われる、項目40または41に記載の分化細胞集団。

（項目43）

前記細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から少なくとも約2日目に行われる、項目42に記載の分化細胞集団。

（項目44）

前記幹細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約4日目に行われる、項目43に記載の分化細胞集団。

（項目45）

前記幹細胞集団が、それらと前記TGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触後、約11日目またはそれより後に、前記1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団に分化している、項目40から44のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

（項目46）

前記幹細胞集団が、SMA Dシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と接触される、項

目 4 0 から 4 5 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 4 7)

前記幹細胞集団が、前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤および前記 S M A D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と同時に接触される、項目 4 6 に記載の分化細胞集団。

(項目 4 8)

前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触が、前記幹細胞集団と前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触から始まる約 4 日間以内に行われる、項目 4 0 から 4 7 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 4 9)

前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触が、前記幹細胞集団と前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触から約 2 日目に行われる、項目 4 8 に記載の分化細胞集団。

(項目 5 0)

前記幹細胞集団と前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触が、前記細胞集団と前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触と同日に行われる、項目 4 8 に記載の分化細胞集団。

(項目 5 1)

前記 T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目 4 0 から 5 0 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 2)

前記 S M A D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目 4 7 から 5 1 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 3)

前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子が、W n t シグナル伝達の活性化のためにグリコゲン合成酵素キナーゼ 3 (G S K 3) を低減する、項目 4 0 から 5 2 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 4)

前記 W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目 4 0 から 5 3 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 5)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子が、レチノイン酸、レチノール、レチナール、トレチノイン、イソトレチノイン、アリトレチノイン、エトレチネート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダバレン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目 4 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 6)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子が、F G F シグナル伝達の活性化因子、W n t シグナル伝達の活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目 4 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目 5 7)

前記細胞集団が、迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種の分子と接触される、項目 5 6 に記載の分化細胞集団。

(項目 5 8)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種の分子が、レチノイン酸である、項目 5 7 に記載の分化細胞集団。

(項目 5 9)

前記細胞集団が、迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種と接触される、項目56に記載の分化細胞集団。

(項目60)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および1種または複数のWnt活性化因子である、項目59に記載の分化細胞集団。

(項目61)

前記FGFシグナル伝達の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF7、およびFGF8からなる群から選択される、項目56または60に記載の分化細胞集団。

(項目62)

前記Wntシグナル伝達の活性化因子が、CHIR99021およびWNT3Aからなる群から選択される、項目56または60に記載の分化細胞集団。

(項目63)

前記1種または複数の腸神経堤システムマーカーが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される、項目40から62のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目64)

前記迷走神経堤パターン形成が、1種または複数の領域特異的ホメオボックス(HOX)遺伝子の発現によって特徴付けられる、項目40から63のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目65)

前記1種または複数の領域特異的HOX遺伝子が、HOXB2、HOXB3、HOXB4、およびHOXB5からなる群から選択される、項目64に記載の分化細胞集団。

(項目66)

1種または複数のSOX10⁺神経堤システムマーカーをさらに発現する、項目40から65のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目67)

前記SOX10⁺神経堤システムマーカーが、CD49Dである、項目66に記載の分化細胞集団。

(項目68)

前記幹細胞が、ヒト幹細胞である、項目40から67のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目69)

前記ヒト幹細胞が、ヒト胚幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様の多能性幹細胞、胚盤葉上層幹細胞、およびFクラス多能性幹細胞からなる群から選択される、項目40から67のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目70)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目40から69のいずれか一項に記載の分化細胞集団を含む、組成物。

(項目71)

1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する*in vitro*分化細胞集団であって、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目40から69のいずれか一項に記載の細胞集団から誘導される、分化細胞集団。

(項目72)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団を、適切な細胞培養培地中で培養した後、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団から誘導される、項目71に記載の分化細胞集団。

(項目73)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団を、適切な細胞培養培

地中で少なくとも約1日間培養した後、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団から誘導される、項目71または72に記載の分化細胞集団。

(項目74)

前記適切な細胞培養培地が、腸ニューロンへのENC前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子を含む、項目73に記載の分化細胞集団。

(項目75)

前記腸ニューロンへのENC前駆体の成熟を増強する1種または複数の分子が、成長因子およびWnt活性化因子からなる群から選択される、項目74に記載の分化細胞集団。

(項目76)

前記成長因子が、FGFシグナル伝達の活性化因子、GDNF、およびアスコルビン酸からなる群から選択される、項目75に記載の分化細胞集団。

(項目77)

前記適切な細胞培養培地が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子およびWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含む、項目76に記載の分化細胞集団。

(項目78)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団を、前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子を含む適切な細胞培養培地中で約4日間培養した後、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する細胞集団から誘導される、項目77に記載の分化細胞集団。

(項目79)

前記適切な細胞培養培地が、GDNFおよびアスコルビン酸を含む、項目72から76のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目80)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する前記細胞集団が、GDNFおよびアスコルビン酸を含む適切な細胞培養培地中で約10日間、約25日間、または約45日間培養した後、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する細胞集団から誘導される、項目79に記載の分化細胞集団。

(項目81)

前記FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF8、およびFGF7からなる群から選択される、項目76から78のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目82)

前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、CHIR99021およびWNT3Aからなる群から選択される、項目76から78のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目83)

前記1種または複数の腸ニューロンマーカーが、Tuj1、MAP2、PHOX2A、PHOX2B、TRKC、ASCL1、HAND2、EDNRB、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、項目71から82のいずれか一項に記載の分化細胞集団。

(項目84)

1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する項目71から83のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、組成物。

(項目85)

対象の腸神経系障害を予防および/または処置する方法であって、腸神経系障害に罹患している対象に、有効量の、以下：

(a) 1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目40から69のいずれか一項に記載の細胞集団、

(b) 項目 7 0 に記載の組成物、

(c) 1 種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する項目 7 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の細胞集団、および

(d) 項目 8 4 に記載の組成物

の 1 つを投与するステップを含む、方法。

(項目 8 6)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

対象の腸神経系障害を予防および/または処置するための、1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する、項目 4 0 から 6 9 のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目 8 8)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 8 7 に記載の分化細胞集団。

(項目 8 9)

腸神経系障害を予防および/または処置するための医薬の製造における、1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目 4 0 から 6 9 のいずれか一項に記載の細胞集団の使用。

(項目 9 0)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 8 9 に記載の使用。

(項目 9 1)

対象の腸神経系障害を予防および/または処置するための、項目 7 0 に記載の組成物。

(項目 9 2)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 9 1 に記載の組成物。

(項目 9 3)

対象の腸神経系障害を予防および/または処置するための、1 種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する、項目 7 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の細胞集団。

(項目 9 4)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 9 3 に記載の細胞集団。

(項目 9 5)

腸神経系障害を予防および/または処置するための医薬の製造における、1 種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する項目 7 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の細胞集団の使用。

(項目 9 6)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 9 5 に記載の使用。

(項目 9 7)

対象の腸神経系障害を予防および/または処置するための、項目 8 4 に記載の組成物。

(項目 9 8)

前記腸神経系障害が、ヒルシュスブルング病である、項目 9 7 に記載の組成物。

(項目 9 9)

ヒルシュスブルング病、ヒルシュスブルング病関連遺伝的欠陥、および/または別の腸神経系障害を予防および/または処置するのに適した化合物を同定する *in vitro* 方法であって、1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目 4 0 から 6 9 のいずれか一項に記載の細胞集団、1 種または複数の腸神経のマーカーを発現する項目 7 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の細胞集団、およびそれらの組合せから選択される細胞集団によって提示される少なくとも 1 つの遊走欠損を救済することができる化合物を同定するステップを含み、事前分化した幹細胞が、エンドセリン受容体 B 型 (E D N R B) においてホモ接合性機能喪失変異を含む、方法。

(項目 1 0 0)

(a) (i) 前記細胞集団、および (i i) 試験化合物を提供するステップと、

(b) 前記細胞集団を、前記試験化合物と接触させるステップと、

(c) 前記細胞集団の遊走挙動を測定するステップと

を含む、項目 99 に記載の方法。

(項目 101)

前記細胞集団が、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する項目 40 から 69 のいずれか一項に記載の細胞集団である、項目 100 に記載の方法。

(項目 102)

前記細胞集団が、前記試験化合物と少なくとも約 6 時間、少なくとも約 12 時間、または少なくとも約 24 時間接触される、項目 100 または 101 に記載の方法。

(項目 103)

幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、

(a) TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤、

(b) Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子、

(c) 迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子、および

(d) 1 種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団への前記幹細胞の分化を誘導するための指示書であって、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と、少なくとも約 2 日間接触させるための指示を含む指示書

を含む、キット。

(項目 104)

前記指示書が、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と約 6 日間接触させるための指示を含む、項目 103 に記載のキット。

(項目 105)

前記指示書が、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から約 8 日間以内に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるための指示を含む、項目 103 または 104 に記載のキット。

(項目 106)

前記指示書が、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から少なくとも約 2 日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるための指示を含む、項目 105 に記載のキット。

(項目 107)

前記指示書が、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子との初期接触から約 4 日目に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する 1 種または複数の分子と最初に接触させるための指示を含む、項目 106 に記載のキット。

(項目 108)

SMA D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤を含む、項目 103 から 107 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 109)

前記指示書が、前記幹細胞集団を、前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤および前記 SMA D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と同時に接触させるための指示を含む、項目 108 に記載のキット。

(項目 110)

前記指示書が、前記幹細胞集団と前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触から約 4 日間以内に、前記細胞集団を、前記 Wnt シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と最初に接触させるための指示を含む、項目 103 から 109 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 111)

前記指示書が、前記幹細胞集団と前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤との初期接触から約 2 日目に、前記細胞集団を、前記 Wnt シグ

ナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるための指示を含む、項目110に記載のキット。

(項目112)

前記指示書が、前記細胞集団と前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触と同日に、前記幹細胞集団を、前記TGF β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と最初に接触させるための指示を含む、項目110に記載のキット。

(項目113)

前記TGF β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、SB431542、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目103から112のいずれか一項に記載のキット。

(項目114)

前記SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤が、LDN193189、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目108から113のいずれか一項に記載のキット。

(項目115)

前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、Wntシグナル伝達の活性化のためにグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3)を低減する、項目103から114のいずれか一項に記載のキット。

(項目116)

前記Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子が、CHIR99021、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される小分子である、項目103から115のいずれか一項に記載のキット。

(項目117)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、レチノイン酸、レチノール、レチナール、トレチノイン、イソトレチノイン、アリトレチノイン、エトレチネート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダパレン、FGFシグナル伝達の活性化因子、Wnt活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目103から116のいずれか一項に記載のキット。

(項目118)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子が、FGFシグナル伝達の活性化因子、Wntシグナル伝達の活性化因子、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目103から116のいずれか一項に記載のキット。

(項目119)

迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子を含む、項目117に記載のキット。

(項目120)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種の分子が、レチノイン酸である、項目119に記載のキット。

(項目121)

迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種を含む、項目118に記載のキット。

(項目122)

前記迷走神経堤パターン形成を誘導する2種またはそれよりも多い分子種が、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子およびWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子である、項目121に記載のキット。

(項目123)

前記FGFシグナル伝達の活性化因子が、FGF2、FGF4、FGF7、およびFGF8からなる群から選択される、項目122に記載のキット。

(項目124)

前記Wntシグナル伝達の活性化因子が、CHIR99021およびWNT3Aからな

る群から選択される、項目122に記載のキット。

(項目125)

幹細胞の分化を誘導するための *in vitro* 方法であって、幹細胞集団を、有効量の TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および有効量の Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触させるステップ、およびさらに前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間、約2日間～約20日間の間、または約2日間～約6日間の間接触させて、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団を生成するステップを含み、前記細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に行われる、方法。

(項目126)

前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触が、前記幹細胞集団と前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から始まる約4日間以内に行われる、項目125に記載の方法。

(項目127)

1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する *in vitro* 分化細胞集団であって、幹細胞集団を、有効量の TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤および有効量の Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触させるステップ、さらに、前記細胞集団を、有効量の迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間、約2日間～約20日間の間、または約2日間～約6日間の間接触させるステップの後に幹細胞集団から誘導され、前記細胞集団と前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子との初期接触が、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に行われる、分化細胞集団。

(項目128)

前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触が、前記幹細胞集団と前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から始まる約4日間以内に行われる、項目127に記載の分化細胞集団。

(項目129)

幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、(a) TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、(b) Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子、(c) 迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子、および(d) 1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する分化細胞集団への前記幹細胞の分化を誘導するための指示書であって、前記細胞集団と前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子との初期接触から約8日間以内に、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と最初に接触させ、前記細胞集団を、前記迷走神経堤パターン形成を誘導する1種または複数の分子と、少なくとも約2日間、約2日間～約20日間の間、または約2日間～約6日間の間接触させるための指示を含む指示書を含む、キット。

(項目130)

前記指示書が、前記幹細胞集団と前記 TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤との初期接触から約4日間以内に、前記細胞集団を、前記 Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化因子と最初に接触させるための指示を含む、項目129に記載のキット。

(項目131)

in vitro 分化細胞集団を含む組成物であって、前記細胞集団の少なくとも約70%が、1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現し

前記細胞集団の約15%未満が、幹細胞マーカー、CNSマーカー、脳神経堤(CNC)マーカー、メラニン形成細胞コンピテント神経堤(MNC)マーカー、神経細胞マーカー、および間葉系前駆体マーカーからなる群から選択される1種または複数のマーカーを発現する、組成物。

(項目132)

前記腸神経堤システムマーカーが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される、項目131に記載の組成物。

(項目133)

前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SOX2、LIN28、SSEA4およびSSEA3からなる群から選択される、項目131または132に記載の組成物。

(項目134)

前記CNSマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目131から133のいずれか一項に記載の組成物。

(項目135)

前記CNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目131から134のいずれか一項に記載の組成物。

(項目136)

前記MNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目131から135のいずれか一項に記載の組成物。

(項目137)

前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、TRKC、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、項目131から136のいずれか一項に記載の組成物。

(項目138)

前記間葉系前駆体マーカーが、SMA、ビメンチン、HLA-ABC、CD105、CD90およびCD73からなる群から選択される、項目131から137のいずれか一項に記載の組成物。

(項目139)

前記1種または複数の腸神経堤システムマーカーを発現する約 1×10^4 ~ 約 1×10^{10} 個の細胞集団を含む、項目131から138のいずれか一項に記載の組成物。

(項目140)

*in vitro*分化細胞集団を含む組成物であって、前記細胞集団の少なくとも約70%が、1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現し

、前記細胞集団の約15%未満が、幹細胞マーカー、腸神経堤システムマーカー、CNSマーカー、脳神経堤(CNC)マーカー、メラニン形成細胞コンピテント神経堤(MNC)マーカー、神経細胞マーカー、および間葉系前駆体マーカーからなる群から選択される1種または複数のマーカーを発現する、組成物。

(項目141)

前記腸神経堤システムマーカーが、PAX3、EDNRB、RET、PHOX2A、PHOX2B、NTRK-3、HAND2、HOXB3、HOXB5およびASCL1からなる群から選択される、項目140に記載の組成物。

(項目142)

前記腸ニューロンマーカーが、Tu j 1、MAP2、PHOX2A、PHOX2B、T

RKC、ASCL1、HAND2、EDNRB、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、項目140または141に記載の組成物。

(項目143)

前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SOX2、LIN28、SSEA4およびSSEA3からなる群から選択される、項目140から142のいずれか一項に記載の組成物。

(項目144)

前記CNSマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目140から143のいずれか一項に記載の組成物。

(項目145)

前記CNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目140から144のいずれか一項に記載の組成物。

(項目146)

前記MNCマーカーが、PAX6、NESTIN、ビメンチン、FOXG1、SOX2、TBR1、TBR2およびSOX1からなる群から選択される、項目140から145のいずれか一項に記載の組成物。

(項目147)

前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、TRKC、5HT、GABA、NOS、SST、TH、CHAT、DBH、サブスタンスP、VIP、NPY、GnRH、およびCGRPからなる群から選択される、項目140から146のいずれか一項に記載の組成物。

(項目148)

前記間葉系前駆体マーカーが、SMA、ビメンチン、HLA-ABC、CD105、CD90およびCD73からなる群から選択される、項目140から147のいずれか一項に記載の組成物。

(項目149)

前記1種または複数の腸ニューロンマーカーを発現する約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個の細胞集団を含む、項目140から148のいずれか一項に記載の組成物。

(項目150)

ENS障害(例えば、HD)を予防および/または処置する方法であって、対象に有効量の - セクレターゼ(BACE)の阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目151)

前記BACEの阻害剤が、BACE2の阻害剤、LY450139、LY2886721、LY2811376、ベルベセスタット(MK-8931)、およびAZD3839からなる群から選択される、項目150に記載の方法。

(項目152)

前記BACEの阻害剤が、BACE2の阻害剤である、項目151に記載の方法。

(項目153)

前記BACE2の阻害剤が、BACE阻害剤IV(BACE阻害剤C3)である、項目151に記載の方法。

(項目154)

ENS障害(例えば、HD)を予防および/または処置する方法であって、対象に有効量の酸性プロテアーゼの阻害剤を投与するステップを含む、方法。

(項目155)

前記酸性プロテアーゼの阻害剤が、ペプスタチンA、リトナビル、インジナビル、ザンキレン、アリスキレンおよびLY-450139からなる群から選択される、項目154

に記載の方法。

(項目156)

前記酸性プロテアーゼの阻害剤が、ペプスタチンAである、項目155に記載の方法。

(項目157)

ENS障害を予防および/または処置するための、BACE阻害剤の使用。

(項目158)

ENS障害を予防および/または処置するための、酸性プロテアーゼの阻害剤の使用。

4. 図面の簡単な説明