

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-535265

(P2019-535265A)

(43) 公表日 令和1年12月12日 (2019. 12. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/079 (2010.01)	C 1 2 N 5/079	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 135 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-524951 (P2019-524951)	(71) 出願人	500213834
(86) (22) 出願日	平成29年11月14日 (2017. 11. 14)		メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月12日 (2019. 7. 12)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/061541	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02018/090002		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成30年5月17日 (2018. 5. 17)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/421, 816		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成28年11月14日 (2016. 11. 14)	(72) 発明者	スチューダー, ローレンツ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, イースト 6 8 ティーエイチ ストリート 4 1 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 幹細胞由来シュワン細胞

(57) 【要約】

本明細書に開示される主題は、幹細胞の、シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞への分化を誘導する *in vitro* 方法、ならびにそのような方法によって生成されたシュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を提供する。本明細書に開示される主題はまた、PNSおよび/もしくはCNSの再生のため、ミエリン損傷の予防および/もしくは修復のため、ならびに/またはシュワン細胞関連障害（例えば、末梢神経障害、例えば糖尿病性末梢神経障害）の予防および/もしくは処置のための、そのようなシュワン細胞前駆体およびシュワン細胞の使用も提供する。

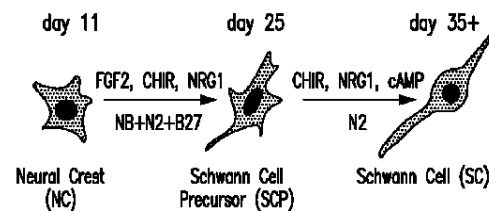


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

幹細胞の分化を誘導する *in vitro* 方法であって、幹細胞の集団を 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接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップ、ならびに 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を 1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させるステップを含む、*in vitro* 方法。

【請求項 2】

前記細胞を前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と約 14 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 20 日以内である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日後と約 15 日後との間である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 11 日後である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記細胞を 1 種または複数の SC 分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記細胞を前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と約 14 日間にわたって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】

前記細胞と前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日後と約 15 日後との間である、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞を前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

幹細胞の前記集団が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 25 日後またはそれ以降に、前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団へと分化する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記幹細胞を 1 種または複数の SMAD 阻害剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 13】

前記幹細胞を TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤および前記 1 種または複数の SMAD 阻害剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞と前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞と Wnt シグナル伝達の前記 1 種または複数の活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 日後である、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記細胞と Wnt シグナル伝達の前記 1 種または複数の活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触と同じ日である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が、SB431542、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 18】

TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が SB431542 である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 種または複数の SMAD 阻害剤が、LDN193189、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 12 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記 1 種または複数の SMAD 阻害剤が LDN193189 である、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 21】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が、Wnt シグナル伝達の活性化に関してグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) を低下させる、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が、CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、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低分子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が CHIR99021 である、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 24】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF、および FBS からなる群から選択される、請求項 6 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が NRG1 である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 1 種または複数の FGF 活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、それらの誘導体、およびそれらの混合

50

物からなる群から選択される、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記 1 種または複数の FGF 活性化因子が FGF2 である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、および SLC10A4 からなる群から選択される、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記幹細胞がヒト幹細胞である、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記ヒト幹細胞が、ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様多能性幹細胞、エピブラスト幹細胞、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 29 に記載の方法。

【請求項 31】

分化した細胞の前記集団を、前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記分化した細胞のシュワン細胞の前記集団への成熟化を支持する前記条件が、前記分化した細胞を 1 種または複数の FGF 活性化因子および 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

分化した SC 前駆体細胞の集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 10 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 35 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、1 種または複数の SC 分化増強剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 31 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の SC 分化増強剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 38】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 10 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 35 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

分化した SC 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子、前記

50

1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記分化した細胞のシュワン細胞の前記集団への成熟化を支持する前記条件が、前記分化した細胞を 1 種または複数の S C 分化増強剤とさらに接触させることを含む、請求項 3 1 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が、環状アデノシンーリン酸 (c A M P)、フォルスコリン、L I F、および C N T F からなる群から選択される、請求項 3 6 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が c A M P である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

分化した細胞の前記集団を 3 D スフェロイドへと凝集させるステップ；ならびに前記 3 D スフェロイドを、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させステップを含む、請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 3 D スフェロイドを接着培養で培養するステップをさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 6】

シュワン細胞の前記集団が、1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、請求項 3 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、L R R T M 4、C D H 1、F A B P 7、B D N F、U N C B 5、S O S T D C 1、O L I G 1、P L A T、K C N J 1 0、S H H、N T N 1、G D N F、E R B B 3、G A P 4 3、S O X 1 0、S 1 0 0、G F A P、P O U 3 F 1、P M P 2 2、M B P、A Q P 4、M P Z、N G F R、N F A T C 4、M O G、I F N G、M A L、N T F 3、T G F B 1、C D 9、C D 8 1、C D 4 4、C D 9 8、C D 4 9 E、C D 4 9 D、T Y R P 1、E N T H D 1、N T 5 E、H T R 2 B、N O V、I L 8、S L C 1 6 A 6、C D K N 2 A、P L P 2、S 1 0 0 A 6、A Q P 9、および C D H 1 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーである、請求項 4 6 に記載の方法。

30

【請求項 4 8】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する i n v i t r o の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が

幹細胞の集団を、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 1 種または複数の W n t 活性化因子と接触させるステップ、ならびに

幹細胞の前記集団を 1 種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させるステップ

40

の後に幹細胞の集団から誘導される、i n v i t r o の分化した細胞の集団。

【請求項 4 9】

前記細胞を前記 1 種または複数の F G F 活性化因子と約 1 4 日間にわたって接触させる、請求項 4 8 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 5 0】

前記細胞と前記 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 0 日以内である、請求項 4 8 または 4 9 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 5 1】

50

細胞と前記１種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の１種または複数の阻害剤との最初の接触から約１０日後と約１５日後との間である、請求項４９に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５２】

前記細胞と前記１種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の１種または複数の阻害剤との最初の接触から約１１日後である、請求項４９に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５３】

前記細胞を、１種または複数の S C 分化誘導剤とさらに接触させる、請求項４８から５２のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５４】

前記細胞を、前記１種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約３日間にわたってさらに接触させる、請求項５３に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５５】

前記細胞と前記１種または複数の S C 分化誘導剤との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の１種または複数の阻害剤との最初の接触から約１０日後と約１５日後との間である、請求項５３または５４に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５６】

前記細胞を、前記１種または複数の W n t 活性化因子、前記１種または複数の F G F 活性化因子、および前記１種または複数の S C 分化誘導剤と同時にさらに接触させる、請求項５３から５５のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５７】

幹細胞の前記集団が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤との最初の接触から約２５日後またはそれ以降に、前記１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団へと分化する、請求項４８から５６のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５８】

幹細胞の前記集団を、１種または複数の S M A D 阻害剤とさらに接触させる、請求項４８から５７のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項５９】

幹細胞の前記集団を、T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤および前記１種または複数の S M A D 阻害剤と同時に接触させる、請求項５８に記載の分化した細胞の集団。

【請求項６０】

前記細胞とシグナル伝達の前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤との最初の接触から約４日以内である、請求項４８から５９のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項６１】

細胞とシグナル伝達の前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤との最初の接触から約２日後である、請求項６０に記載の分化した細胞の集団。

【請求項６２】

細胞とシグナル伝達の前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤との最初の接触と同じ日である、請求項６０に記載の分化した細胞の集団。

【請求項６３】

T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤が、S B

10

20

30

40

50

4 3 1 5 4 2、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 4 8 から 6 3 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 4】

T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が S B 4 3 1 5 4 2 である、請求項 6 3 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 5】

前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 5 8 から 6 4 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 6】

前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が L D N 1 9 3 1 8 9 である、請求項 6 5 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 7】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、W n t シグナル伝達の活性化に関してグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) を低下させる、請求項 4 8 から 6 6 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 8】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、W n t - 1、W N T 3 A、W n t 4、W n t 5 a、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低分子である、請求項 6 7 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 6 9】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 である、請求項 6 8 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 0】

前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、および F B S からなる群から選択される、請求項 5 3 から 6 9 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 1】

前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が N R G 1 である、請求項 7 0 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 2】

前記 1 種または複数の F G F 活性化因子が、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 1 0、F G F 1 8、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、請求項 4 8 から 7 1 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 3】

前記 1 種の F G F 活性化因子が F G F 2 である、請求項 7 2 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 4】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、および S L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、請求項 4 8 から 7 3 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 5】

前記幹細胞がヒト幹細胞である、請求項 4 8 から 7 4 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 7 6】

10

20

30

40

50

前記ヒト幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、請求項 75 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 77】

前記ヒト幹細胞が、ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様多能性幹細胞、エピブラスト幹細胞および 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 75 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 78】

1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を、1 種または複数の FGF 活性化因子および 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させた後に、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の集団から誘導される、*in vitro* の分化した細胞の集団。

10

【請求項 79】

前記分化した細胞の集団が、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の集団を、1 種または複数の SC 分化増強剤とさらに接触させた後に、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団から誘導される、請求項 78 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 80】

前記 1 種または複数の SC 分化増強剤が、環状アデノシンーリン酸 (cAMP)、フォルスコリン、LIF、および CNTF からなる群から選択される、請求項 78 または 79 に記載の分化した細胞の集団。

20

【請求項 81】

前記 1 種または複数の SC 分化増強剤が cAMP である、請求項 80 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 82】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させる、請求項 78 から 81 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

30

【請求項 83】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 10 日間にわたって接触させる、請求項 82 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 84】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 35 日間にわたって接触させる、請求項 82 に記載の分化した細胞の集団。

40

【請求項 85】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の SC 分化増強剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させる、請求項 78 から 84 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 86】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項 48 から 77 のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 10 日間にわたって接触させる、請求項 85 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 87】

50

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する請求項48から77のいずれか一項に記載の細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたって接触させる、請求項85に記載の分化した細胞の集団。

【請求項88】

前記1つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択される1つまたは複数のシュワン細胞マーカーである、請求項77から87のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

10

【請求項89】

請求項48から77のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物。

【請求項90】

請求項78から88のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物。

【請求項91】

対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および/または処置する方法であって、シュワン細胞関連障害に罹患している対象に有効量の以下：

20

(a) 請求項48から77のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団；

(b) 請求項48から77のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物；

(c) 請求項78から88のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団；および

(d) 請求項78から88のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物のうちの1つを投与するステップを含む、方法。

【請求項92】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

30

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項91または92に記載の方法。

【請求項94】

対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および/または処置するための請求項48から77のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団。

【請求項95】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項94に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団。

【請求項96】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項95に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団。

40

【請求項97】

対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および/または処置するための請求項48から77のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物。

【請求項98】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項97に記載の組成物。

【請求項99】

前記末梢神経障害が、糖尿病性末梢神経障害である、請求項98に記載の組成物。

【請求項100】

対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および/または処置するための請求項78か

50

ら 8 8 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団。

【請求項 1 0 1】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 0 0 に記載のシュワン細胞の集団。

【請求項 1 0 2】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 0 1 に記載のシュワン細胞の集団。

【請求項 1 0 3】

対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための請求項 7 8 から 8 8 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物。

10

【請求項 1 0 4】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 0 3 に記載の組成物。

【請求項 1 0 5】

前記末梢神経障害が、糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 0 4 に記載の組成物。

【請求項 1 0 6】

シュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための医薬の製造における請求項 4 8 から 7 7 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団の使用。

【請求項 1 0 7】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 0 6 に記載の使用。

【請求項 1 0 8】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 0 7 に記載の使用。

20

【請求項 1 0 9】

シュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための医薬の製造における請求項 4 8 から 7 7 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物の使用。

【請求項 1 1 0】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 0 9 に記載の使用。

【請求項 1 1 1】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 1 0 に記載の使用。

【請求項 1 1 2】

シュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための医薬の製造における請求項 7 8 から 8 8 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団の使用。

30

【請求項 1 1 3】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 1 4】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 1 5】

シュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための医薬の製造における請求項 7 8 から 8 8 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物の使用。

【請求項 1 1 6】

前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、請求項 1 1 5 に記載の使用。

40

【請求項 1 1 7】

前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、請求項 1 1 6 に記載の使用。

【請求項 1 1 8】

幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、

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

1 種または複数の W n t 活性化因子、および

1 種または複数の F G F 活性化因子

を含む、キット。

【請求項 1 1 9】

50

前記幹細胞の、１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団への分化を誘導するための説明書を含み、前記説明書が、前記細胞を前記１種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約３日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 1 8 に記載のキット。

【請求項 1 2 0】

前記説明書が、前記細胞を、前記１種または複数の F G F 活性化因子と約１４日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 2 1】

前記説明書が、前記細胞と前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約２０日以内に、前記細胞を前記１種または複数の１種または複数の F G F 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 1 9 から 1 2 0 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 1 2 2】

前記細胞と前記１種または複数の１種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記細胞と前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約１０日後と約１５日後との間である、請求項 1 2 1 に記載のキット。

【請求項 1 2 3】

前記細胞と、前記１種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記細胞と、前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から１１日後である、請求項 1 2 0 2 に記載のキット。

20

【請求項 1 2 4】

１種または複数の S C 分化誘導剤をさらに含む、請求項 1 1 8 から 1 2 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 2 5】

前記説明書が、前記細胞を前記１種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約３日間にわたってさらに接触させるステップを含む、請求項 1 2 4 に記載のキット。

【請求項 1 2 6】

前記説明書が、前記細胞を前記１種または複数の S C 分化誘導剤と約１４日間にわたってさらに接触させるステップを含む、請求項 1 2 5 に記載のキット。

【請求項 1 2 7】

前記細胞と前記１種または複数の１種または複数の S C 分化誘導剤との最初の接触が、前記細胞と前記１種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約１０日後と約１５日後との間である、請求項 1 2 4 から 1 2 6 のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項 1 2 8】

前記説明書が、前記細胞を前記１種または複数の F G F 活性化因子および前記１種または複数の S C 分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 1 2 4 から 1 2 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 2 9】

１種または複数の S M A D 阻害剤をさらに含む、請求項 1 1 8 から 1 2 8 のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項 1 3 0】

前記説明書が、前記幹細胞を T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤および前記１種または複数の S M A D 阻害剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 2 9 に記載のキット。

【請求項 1 3 1】

前記説明書が、前記幹細胞を T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤および前記１種または複数の S M A D 阻害剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 1 3 0 に記載のキット。

【請求項 1 3 2】

前記説明書が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記１種

50

または複数の阻害剤との最初の接触から約4日以内に、前記細胞を前記1種または複数のWnt活性化因子と最初に接触させるステップを含む、請求項118から131のいずれか一項に記載のキット。

【請求項133】

前記説明書が、前記幹細胞とTGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約2日後に、前記細胞を前記1種または複数のWnt活性化因子と最初に接触させるステップを含む、請求項132に記載のキット。

【請求項134】

前記説明書が、前記細胞と前記1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触と同じ日に、前記幹細胞をTGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記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132に記載のキット。

10

【請求項135】

TGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤が、SB431542、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項118から134のいずれか一項に記載のキット。

【請求項136】

TGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤がSB431542である、請求項135に記載のキット。

【請求項137】

前記1種または複数のSMAD阻害剤がLDN193189、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項129から136のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項138】

前記1種または複数のSMAD阻害剤がLDN193189である、請求項137に記載のキット。

【請求項139】

前記1種または複数のWnt活性化因子が、Wntシグナル伝達の活性化に関してグリコゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK3) を低下させる、請求項118から138のいずれか一項に記載のキット。

【請求項140】

前記1種または複数のWnt活性化因子が、CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、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低分子である、請求項139に記載のキット。

30

【請求項141】

前記1種または複数のWnt活性化因子がCHIR99021である、請求項140に記載のキット。

【請求項142】

前記1種または複数のSC分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF- β 、およびFBSからなる群から選択される、請求項124から141のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項143】

前記1種または複数のSC分化誘導剤がNRG1である、請求項142に記載のキット。

【請求項144】

前記1種または複数のFGF活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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、請求項118から143のいずれか一項に記載のキット。

【請求項145】

前記1種のFGF活性化因子がFGF2である、請求項144に記載のキット。

【請求項146】

50

1 種または複数の S C 分化増強剤、および前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書をさらに含む、請求項 1 1 8 から 1 4 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 4 7】

前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が、環状アデノシンーリン酸 (c A M P)、フォルスコリン、L I F、および C N T F からなる群から選択される、請求項 1 4 6 に記載のキット。

【請求項 1 4 8】

前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が c A M P である、請求項 1 4 7 に記載のキット。

10

【請求項 1 4 9】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、前記分化した細胞を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させるステップを含む、請求項 1 4 6 から 1 4 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 5 0】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 4 9 に記載のキット。

20

【請求項 1 5 1】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 1 0 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 4 9 に記載のキット。

【請求項 1 5 2】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 3 5 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 5 0 に記載のキット。

30

【請求項 1 5 3】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 4 6 から 1 5 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 5 4】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 1 5 3 に記載のキット。

【請求項 1 5 5】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と約 1 4 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 1 5 4 に記載のキット。

40

【請求項 1 5 6】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と約 3 5 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 1 5 4 に記載のキット。

【請求項 1 5 7】

前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子、前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と同

50

時に接触させるステップを含む、請求項 153 から 156 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 158】

幹細胞の分化を誘導する *in vitro* 方法であって、幹細胞の集団を、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接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップ、および幹細胞の前記集団を 1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させて、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含み、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、*in vitro* 方法。

10

【請求項 159】

前記細胞と、前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、請求項 158 に記載の方法。

【請求項 160】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させる、ステップをさらに含み、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、請求項 158 または 159 に記載の方法。

20

【請求項 161】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤および 1 種または複数の FGF 活性化因子と同時に少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤および 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と、TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、請求項 160 に記載の方法。

30

【請求項 162】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、幹細胞の集団を 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接触させるステップ、前記細胞を 1 種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させるステップの後に幹細胞の集団から誘導され、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤および前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と 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最初の接触から約 20 日以内である、*in vitro* の分化した細胞の集団。

40

【請求項 163】

前記細胞と前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、請求項 162 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 164】

前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 2

50

0日間との間、約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記1種または複数のSC分化誘導剤と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞とTGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約10日以内である、請求項162または163に記載の分化した細胞の集団。

【請求項165】

前記細胞を、1種または複数のSC分化誘導剤および1種または複数のFGF活性化因子と同時に少なくとも約3日間、約3日間と約20日間との間、約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記1種または複数のSC分化誘導剤および1種または複数のFGF活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞とTGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約10日以内である、請求項164に記載の方法。

10

【請求項166】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、神経堤系列細胞の分化を誘導する*in vitro*方法であって、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と接触させるステップを含む、*in vitro*方法。

【請求項167】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間接触させるステップを含む、請求項166に記載の方法。

20

【請求項168】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む、請求項166または167に記載の方法。

【請求項169】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と約5日間と約15日間との間、接触させるステップを含む、請求項166から168のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項170】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と約14日間にわたって接触させるステップを含む、請求項169に記載の方法。

【請求項171】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、請求項166から170のいずれか一項に記載の方法。

【請求項172】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項171に記載の方法。

40

【請求項173】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と最長約30日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項171または172に記載の方法。

【請求項174】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と約14日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項1

50

7 1 から 1 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 5】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および 1 種または複数の S C 分化誘導剤と同時に接触させるステップをさらに含む、請求項 1 7 1 から 1 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 6】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、W n t シグナル伝達の活性化に関してグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) を低下させる、請求項 1 6 6 から 1 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 7】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、W n t - 1、W N T 3 A、W n t 4、W n t 5 a、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低分子である、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 1 7 8】

前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 である、請求項 1 7 7 に記載の方法。

【請求項 1 7 9】

前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、および F B S からなる群から選択される、請求項 1 7 1 から 1 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8 0】

前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が N R G 1 である、請求項 1 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記 1 種または複数の F G F 活性化因子が、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 1 0、F G F 1 8、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、請求項 1 6 6 から 1 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8 2】

前記 1 種または複数の F G F 活性化因子が F G F 2 である、請求項 1 8 1 に記載の方法。

【請求項 1 8 3】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、および S L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、請求項 1 6 6 から 1 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8 4】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、請求項 1 6 6 から 1 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8 5】

前記条件が、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の F G F 活性化因子および 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、請求項 1 8 4 に記載の方法。

【請求項 1 8 6】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 1 8 5 に記載の方法。

【請求項 1 8 7】

10

20

30

40

50

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、請求項186に記載の方法。

【請求項188】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む、請求項186に記載の方法。

【請求項189】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤と接触させることをさらに含む、請求項184から188のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項190】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間にわたってさらに接触させるステップを含む、請求項189に記載の方法。

【請求項191】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約10日間にわたってさらに接触させるステップを含む、請求項190に記載の方法。

【請求項192】

20

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約35日間にわたってさらに接触させるステップを含む、請求項191に記載の方法。

【請求項193】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のSC分化増強剤と同時に接触させるステップを含む、請求項189から192のいずれか一項に記載の方法。

【請求項194】

前記1種または複数のSC分化増強剤が、環状アデノシンリン酸(cAMP)、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される、請求項189から193のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項195】

前記1種または複数のSC分化増強剤がcAMPである、請求項194に記載の方法。

【請求項196】

シュワン細胞の前記集団が、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、請求項184から195のいずれか一項に記載の方法。

【請求項197】

前記1つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択されるシュワン細胞マーカーからなる群から選択される、請求項196に記載の方法。

40

【請求項198】

前記神経堤系列マーカーが、SOX10、p75、HNK1、CD49D、ERBB3、TFAP2、SNAI1、およびSLUGからなる群から選択される、請求項166から197のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 199】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1 種または複数の Wnt 活性化因子、1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間、最長約 30 日間、または約 5 日間と約 15 日間との間、接触させた後に神経堤系列細胞の集団から誘導される、*in vitro* の分化した細胞の集団。

【請求項 200】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子および 1 種または複数の FGF 活性化因子と 14 日間にわたって接触させる、請求項 199 に記載の分化した細胞の集団。

10

【請求項 201】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の SC 分化誘導剤とさらに接触させる、請求項 199 または 200 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 202】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、最長約 30 日間、または約 5 日間と約 15 日間との間、さらに接触させる、請求項 201 に記載の分化した細胞の集団。

20

【請求項 203】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と約 14 日間にわたってさらに接触させる、請求項 202 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 204】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の Wnt 活性化因子、1 種または複数の FGF 活性化因子、および 1 種または複数の SC 分化誘導剤と同時に接触させる、請求項 199 から 203 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 205】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が Wnt シグナル伝達を活性化するためにグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) を低下させる、請求項 199 から 204 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

30

【請求項 206】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が、CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、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低分子である、請求項 205 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 207】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が CHIR99021 である、請求項 206 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 208】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF、および FBS からなる群から選択される、請求項 201 から 207 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

40

【請求項 209】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が NRG1 である、請求項 208 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 210】

前記 1 種または複数の FGF 活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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、請求項 199 から 209 のいずれか一項に記載の分化した

50

細胞の集団。

【請求項 2 1 1】

前記 1 種の F G F 活性化因子が F G F 2 である、請求項 2 1 0 に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 2 1 2】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、および S L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、請求項 1 9 9 から 2 1 1 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

10

【請求項 2 1 3】

前記神経堤系列マーカーが、S O X 1 0、p 7 5、H N K 1、C D 4 9 D、E R B B 3、T F A P 2、S N A I L、および S L U G からなる群から選択される、請求項 1 9 9 から 2 1 2 のいずれか一項に記載の分化した細胞の集団。

【請求項 2 1 4】

幹細胞の分化を誘導する *in vitro* 方法であって、幹細胞の集団を 1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団に *in vitro* で分化させるステップ、および 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、分化した細胞を、1 種または複数の W n t 活性化因子および 1 種または複数の F G F 活性化因子と接触させるステップを含む、*in vitro* 方法。

20

【請求項 2 1 5】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子、1 種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子、1 種または複数の F G F 活性化因子と最長約 3 0 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 2 1 5 に記載の方法。

30

【請求項 2 1 7】

前記分化した細胞を、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子、1 種または複数の F G F 活性化因子と約 5 日と約 1 5 日間との間、または約 1 0 日間と 1 5 日間との間、接触させるステップを含む、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子および 1 種または複数の F G F 活性化因子と約 1 4 日間にわたって接触させるステップを含む、請求項 2 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 2 1 4 から 2 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 2 0】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と最長約 3 0 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 2 2 0 に記載の方法。

50

【請求項 2 2 2】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と約 1 4 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、請求項 2 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の Wnt 活性化因子、1 種または複数の FGF 活性化因子、および 1 種または複数の SC 分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 2 1 4 から 2 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 2 4】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が、Wnt シグナル伝達を活性化するためにグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) を低下させる、請求項 2 1 4 から 2 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が、CHIR99021、Wnt - 1、WNT3A、Wnt 4、Wnt 5a、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低分子である、請求項 2 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子が CHIR99021 である、請求項 2 2 5 に記載の方法。

20

【請求項 2 2 7】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF、および FBS からなる群から選択される、請求項 2 1 9 から 2 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤が NRG1 である、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

前記 1 種または複数の FGF 活性化因子が、FGF 1、FGF 2、FGF 3、FGF 4、FGF 7、FGF 8、FGF 10、FGF 18、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、請求項 2 1 4 から 2 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 3 0】

前記 1 種または複数の FGF 活性化因子が FGF 2 である、2 2 9 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、および SLC10A4 からなる群から選択される、請求項 2 1 4 から 2 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 3 2】

1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、請求項 2 1 4 から 2 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

前記条件が、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の FGF 活性化因子および 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

50

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、請求項233に記載の方法。

【請求項235】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、請求項234に記載の方法。

【請求項236】

1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む、請求項234に記載の方法。

10

【請求項237】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤とさらに接触させることを含む、請求項232から236のいずれか一項に記載の方法。

【請求項238】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間にわたってさらに接触させることを含む、請求項237に記載の方法。

【請求項239】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたってさらに接触させることを含む、請求項238に記載の方法。

20

【請求項240】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたってさらに接触させることを含む、請求項238に記載の方法。

【請求項241】

前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子、前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記1種または複数のSC分化増強剤と同時に接触させることを含む、請求項237から240のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項242】

前記1種または複数のSC分化増強剤が、環状アデノシンーリン酸(cAMP)、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される、請求項237から241のいずれか一項に記載の方法。

【請求項243】

前記1種または複数のSC分化増強剤がcAMPである、請求項242に記載の方法。

【請求項244】

シュワン細胞の前記集団が1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、請求項232から243のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項245】

前記1つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、GFAP、ERBB3、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択される、請求項244に記載の方法。

50

【請求項 2 4 6】

前記幹細胞集団の、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団への *in vitro* 分化が、SMA D シグナル伝達を阻害するステップおよび Wnt シグナル伝達を活性化するステップを含む、請求項 2 1 3 から 2 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記幹細胞集団の、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団への *in vitro* 分化が、前記幹細胞を 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接触させるステップ、および前記細胞を1種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップを含む、請求項 2 1 4 から 2 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 4 8】

幹細胞の前記集団を1種または複数の SMA D 阻害剤と接触させるステップをさらに含む、請求項 2 4 7 に記載の方法。

【請求項 2 4 9】

前記幹細胞を、TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤および前記1種または複数の SMA D 阻害剤と同時に接触させるステップを含む、請求項 2 4 8 に記載の方法。

【請求項 2 5 0】

前記細胞と前記1種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、幹細胞の前記集団と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約4日以内である、請求項 2 4 7 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 5 1】

前記細胞と Wnt シグナル伝達の前記1種または複数の活性化因子との最初の接触が、幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約2日後である、請求項 2 5 0 に記載の方法。

【請求項 2 5 2】

TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤が、SB 4 3 1 5 4 2、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 2 4 7 から 2 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 5 3】

TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤が SB 4 3 1 5 4 2 である、請求項 2 5 2 に記載の方法。

【請求項 2 5 4】

前記1種または複数の SMA D 阻害剤が、LDN 1 9 3 1 8 9、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、請求項 2 4 8 から 2 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 5】

前記1種または複数の SMA D 阻害剤が LDN 1 9 3 1 8 9 である、請求項 2 5 4 に記載の方法。

40

【請求項 2 5 6】

前記神経堤系列マーカーが、SOX 1 0、p 7 5、HNK 1、CD 4 9 D、ERBB 3、TFAP 2、SNAI L、および SLUG からなる群から選択される、請求項 2 1 4 から 2 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 7】

対象における PNS および / または CNS を再生する方法であって、対象に有効量の以下：

(a) 請求項 4 8 から 7 7 および 1 9 7 から 2 1 1 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団；

(b) 請求項 4 8 から 7 7 および 1 9 9 から 2 1 3 のいずれか一項に記載の分化したシュ

50

ワン細胞前駆体の集団を含む組成物；

(c) 請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団；および

(d) 請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物のうちの 1 つを投与するステップを含む、方法。

【請求項 258】

対象における P N S および / または C N S を再生するための、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団。

【請求項 259】

対象における P N S および / または C N S を再生するための、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物。

10

【請求項 260】

対象における P N S および / または C N S を再生するための、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団。

【請求項 261】

対象における P N S および / または C N S を再生するための、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物。

【請求項 262】

P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団の使用。

20

【請求項 263】

P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物の使用。

【請求項 264】

P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団の使用。

【請求項 265】

P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物の使用。

30

【請求項 266】

対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置する方法であって、対象に有効量の以下：

(a) 請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団；

(b) 請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物；

(c) 請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団；および

(d) 請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物のうちの 1 つを投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 267】

対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団。

【請求項 268】

対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物。

【請求項 269】

対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、請求項 78 から 88

50

のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団。

【請求項 270】

対象におけるミエリン損傷を予防および／または処置するための、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物。

【請求項 271】

ミエリン損傷を予防および／または処置するための医薬の製造における、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団の使用。

【請求項 272】

ミエリン損傷を予防および／または処置するための医薬の製造における、請求項 48 から 77 および 199 から 213 のいずれか一項に記載の分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物の使用。

10

【請求項 273】

ミエリン損傷を予防および／または処置するための医薬の製造における、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団の使用。

【請求項 274】

ミエリン損傷を予防および／または処置するための医薬の製造における、請求項 78 から 88 のいずれか一項に記載のシュワン細胞の集団を含む組成物の使用。

【請求項 275】

in vitro の分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の前記集団の少なくとも約 50% が 1 つまたは複数の SC 前駆体マーカーを発現し、細胞の前記集団の約 25% 未満が、幹細胞マーカー、CNS マーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーを発現する、組成物。

20

【請求項 276】

前記 1 つまたは複数の SC 前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、および SLC10A4 からなる群から選択される、請求項 275 に記載の組成物。

30

【請求項 277】

前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SSEA4、および SSEA3 からなる群から選択される、請求項 275 または 276 に記載の組成物。

【請求項 278】

前記 CNS マーカーが、PAX6、NESTIN、および SOX1 からなる群から選択される、請求項 275 から 277 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 279】

前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、および TRKC からなる群から選択される、請求項 275 から 278 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 280】

前記間葉前駆体マーカーが、SMA および CD73 からなる群から選択される、請求項 275 から 279 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 281】

in vitro の分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の前記集団の少なくとも約 50% が 1 つまたは複数の SC マーカーを発現し、細胞の約 25% 未満が、SC 前駆体マーカー、幹細胞マーカー、CNS マーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーを発現する、組成物。

【請求項 282】

50

前記１つまたは複数のＳＣマーカーが、ＬＲＲＴＭ４、ＣＤＨ１、ＦＡＢＰ７、ＢＤＮＦ、ＵＮＣＢ５、ＳＯＳＴＤＣ１、ＯＬＩＧ１、ＰＬＡＴ、ＫＣＮＪ１０、ＳＨＨ、ＮＴＮ１、ＧＤＮＦ、ＳＯＸ１０、Ｓ１００、ＧＦＡＰ、ＰＯＵ３Ｆ１、ＰＭＰ２２、ＭＢＰ、ＡＱＰ４、ＭＰＺ、ＧＦＡＰ、ＥＲＢＢ３、ＣＤ９、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＣＤ９８、ＣＤ４９Ｅ、ＣＤ４９Ｄ、ＮＧＦＲ、ＮＦＡＴＣ４、ＭＯＧ、ＩＦＮＧ、ＭＡＬ、ＮＴＦ３、ＴＧＦＢ１、ＴＹＲＰ１、ＥＮＴＨＤ１、ＮＴ５Ｅ、ＨＴＲ２Ｂ、ＮＯＶ、ＩＬ８、ＳＬＣ１６Ａ６、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＬＰ２、Ｓ１００Ａ６、ＡＱＰ９、およびＣＤＨ１９からなる群から選択される、請求項２８１に記載の組成物。

【請求項２８３】

前記ＳＣ前駆体マーカーが、ＳＯＸ１０、ＧＡＰ４３、ＢＬＢＰ、ＭＰＺ、Ｄｈｈ、Ｐ７５ＮＴＲ、ＣＤ４９Ｄ、ＴＦＡＰ２、ＣＤＨ１９、ＣＤ４４、ＥＲＢＢ３、ＰＯＵ３Ｆ１、ＧＦＡＰ、ＣＡＬＣＢ、ＧＲＰ１１６、ＴＳＰＹＬ５、ＩＴＰＫＡ、ＳＬＣ１７Ａ６、ＳＹＰＬ２、ＬＯＣ１００１２８２５２、ＡＮＧＰＴＬ７、ＬＯＣ７２８９７８、ＺＮＦ５０２、ＳＬＣ１６Ａ６、ＬＰＬ、ＳＬＣ３０Ａ２、およびＳＬＣ１０Ａ４からなる群から選択される、請求項２８１または２８２に記載の組成物。

10

【請求項２８４】

前記幹細胞マーカーが、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＳＥＡ４、およびＳＳＥＡ３からなる群から選択される、請求項２８１から２８３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２８５】

前記ＣＮＳマーカーが、ＰＡＸ６、ＮＥＳＴＩＮ、およびＳＯＸ１からなる群から選択される、請求項２８１から２８４のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項２８６】

前記神経細胞マーカーが、ＴＵＪ１、ＭＡＰ２、ＮＦＨ、ＢＲＮ３Ａ、ＩＳＬ１、ＴＨ、ＡＳＣＬ１、ＣＨＡＴ、ＰＨＯＸ２Ｂ、ＰＨＯＸ２Ａ、ＴＲＫＡ、ＴＲＫＢ、およびＴＲＫＣからなる群から選択される、請求項２８１から２８５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２８７】

前記間葉前駆体マーカーが、ＳＭＡおよびＣＤ７３からなる群から選択される、請求項２８１から２８６のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【０００１】

関連出願への相互参照

本出願は、２０１６年１１月１４日に提出された米国出願番号第６２／４２１，８１６号に基づく優先権を主張しており、そしてその内容は、本明細書中にその全体が参考として本明細書によって援用され、そしてその内容の各々に優先権が主張される。

【０００２】

緒言

本明細書に開示される主題は、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）から誘導されたシュワン細胞前駆体およびシュワン細胞、ならびに末梢神経系（ＰＮＳ）および／もしくは中枢神経系（「ＣＮＳ」）の再生、ミエリン損傷の予防および／もしくは修復、ならびに／または末梢神経障害（例えば、糖尿病性末梢神経障害）の予防および／もしくは処置における細胞に基づく処置のためのその使用に関する。

40

【背景技術】

【０００３】

背景

シュワン細胞（ＳＣ）は、末梢神経系（ＰＮＳ）のグリアであり、ＰＮＳ機能にとって重要である。これらは、神経堤（ＮＣ）からシュワン細胞前駆体（ＳＣＰ）中間体を介して発生する。ＳＣは、ＰＮＳの機能的調節、維持および修復において重要な役割を果たし、傷害後に神経修復を促進する優れた能力を示す（Jessenら、２０１５年；Lavdasら、２

50

008年)。SC欠損は、広範なヒト障害、例えば、神経鞘腫症、シャルコー・マリー・トゥース病、ギラン・バレー症候群、および糖尿病性末梢神経障害(DPN)を含む種々の他の末梢神経障害に関与する。

【0004】

真性糖尿病は、糖尿病患者の30%(Callaghanら、2012年)~60%(Zochodne、2007年)が罹患する末梢神経障害の主要原因である。これは、生活の質の低減ならびに罹患率および死亡率の増加を引き起こす主要な健康上の問題を提示する(La Fontaineら、2014年)。米国におけるDPNに関連する医療費は、2001年には1年間に46億~137億ドルと推定され、増加し続けている(Gordoisら、2003年)。DPNの症状は多様であるが、感覚機能不全および疼痛ならびに自律神経およびENSの合併症が含まれる。

10

【0005】

グルコースレベルを注意深くモニタリングおよび調整することによってさらなる損傷を予防するという主要な目標を追求すること以外、DPNに対する有効な処置は現在存在しない。対症的処置には、抗うつ薬、抗痙攣薬、ならびに神経障害性疼痛に対処するためのオピオイドの使用が含まれる。

【0006】

DPNの病理発生には、末梢神経における細胞毒性および変性をもたらすいくつかの複雑な寄与因子が関与する可能性が高い(SimmonsおよびFeldman、2002年)。糖尿病における高血糖、低酸素および酸化ストレスは、特に感覚神経においてSCの変性をもたらすという証拠がある(Eckersley、2002年)。究極的症狀はニューロンの機能不全から生じるが、感覚ニューロンまたはグリアがDPNの病理発生において重要な役割を果たすかどうかは不明である。そのような機構を詳細に調べることは、疾患表現型に対する非細胞自立因子の複雑な寄与を考慮すれば、現在の動物モデルでは非常に難しい。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Jessen, K.R., Mirsky, R., and Lloyd, A.C. (2015). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a020487.

30

【非特許文献2】Lavdas, A.A., Papastefanaki, F., Thomaidou, D., and Matsas, R. (2008). Schwann cell transplantation for CNS repair. Curr. Med. Chem. 15, 151-160.

【非特許文献3】Callaghan, B.C., Cheng, H.T., Stables, C.L., Smith, A.L., and Feldman, E.L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. Lancet Neurol. 11, 521-534.

【非特許文献4】Zochodne, D.W. (2007). Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. Muscle Nerve 36, 144-166.

【非特許文献5】La Fontaine, J., Bhavan, K., Talal, T.K., and Lavery, L.A. (2014). Current concepts in the surgical management of acute diabetic foot infections. Foot Edinb. Scotl. 24, 123-127.

40

【非特許文献6】Gordois, A., Scuffham, P., Shearer, A., Oglesby, A., and Tobian, J.A. (2003). The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. Diabetes care 26, 1790-1795.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これまでに確立されているhPSC分化プロトコールによって、感覚ニューロンを系統的に入手することが可能であるが、hPSCからSCを誘導する強力な方法はない。さら

50

に、その後のSC様細胞は、重要な系列マーカーの強力な発現を示さず、一般的にミエリン構造を産生することができない。したがって、ヒト幹細胞からSC前駆体およびSCを生成する*in vitro*方法およびプロトコルがなお必要である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の要旨

本明細書に開示される主題は、例えば*in vitro*分化によって幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）から誘導したシュワン細胞前駆体およびシュワン細胞、ならびに前記細胞を作製および使用方法に関する。

【0010】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、神経堤系列細胞の分化を誘導する*in vitro*方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、wingless (Wnt) シグナル伝達の1種または複数の活性化因子（「Wnt活性化因子」と呼ぶ）、および線維芽細胞増殖因子（FGF）シグナル伝達の1種または複数の活性化因子（「FGF活性化因子」と呼ぶ）と接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子、および1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子、および1種または複数のFGF活性化因子と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を1種または複数のWnt活性化因子、および1種または複数のFGF活性化因子と、約5日間と約15日間との間、または約10日間と15日間との間、接触させるステップを含む。

【0011】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、神経堤細胞である。ある特定の実施形態では、神経堤系列マーカーは、SOX10、p75、HNK1、CD49D、ERBB3、TFAP2、SNAI1、およびSLUGからなる群から選択される。

【0012】

ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、シュワン細胞の分化を誘導する1種または複数の分子（「SC分化誘導剤」と呼ぶ）と接触させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団をSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団をSC分化誘導剤と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、SC分化誘導剤と約5日間と約15日間との間、または約10日間と15日間との間、接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、およびSC分化誘導剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

【0013】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導する*in vitro*方法を提供する。

【0014】

ある特定の実施形態では、幹細胞の分化を誘導する*in vitro*方法は、幹細胞の集団（「幹細胞集団」と呼ぶ）を、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団へと*in vitro*で分化させるステップ、ならびに分化した細胞を1種または

10

20

30

40

50

複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子、および1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、分化した細胞を1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と、約5日間と約15日間との間、または約10日間と15日間との間、接触させるステップを含む。

10

【0015】

ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、SC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、SC分化誘導剤と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、SC分化誘導剤と約5日間と約15日間との間、または約10日間と15日間との間、接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、およびSC分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む。

20

【0016】

ある特定の実施形態では、幹細胞の集団の、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団へのin vitro分化は、SMADシグナル伝達の阻害およびWntシグナル伝達の活性化を含む。ある特定の実施形態では、幹細胞集団を1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団にin vitro分化させることは、幹細胞集団をトランスフォーミング増殖因子ベータ(TGFβ)/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、および1種または複数のWnt活性化因子と接触させるステップを含む。

30

【0017】

ある特定の実施形態では、幹細胞の分化を誘導するin vitro方法は、幹細胞の集団をTGFβ/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接触させるステップ、細胞を1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子とさらに接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のSC分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、およびSC分化誘導剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

40

【0018】

ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のFGF活性化因子と約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間、接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を

50

産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のF G F活性化因子と14日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のF G F活性化因子と約15日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。

【0019】

ある特定の実施形態では、1種または複数のF G F活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から少なくとも約5日後（例えば、約20日以内）である。ある特定の実施形態では、1種または複数のF G F活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞集団と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最初の接触の約5後と約20日後との間（例えば、約5日後、約6日後、約7日後、約8日後、約9日後、約10日後、約11日後、約12日後、約13日後、約14日後、約15日後、約16日後、約17日後、約18日後、約19日後、または約20日後）である。

10

【0020】

ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のS C分化誘導剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のS C分化誘導剤と約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間、接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のS C分化誘導剤と約14日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のS C分化誘導剤と約15日間にわたって接触させて、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含む。

20

30

【0021】

ある特定の実施形態では、1種または複数のS C分化誘導剤と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触の少なくとも約5日後（例えば、約20日以内）である。ある特定の実施形態では、1種または複数のS C分化誘導剤と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触の約5日後と約20日後との間（例えば、約5日後、約6日後、約7日後、約8日後、約9日後、約10日後、約11日後、約12日後、約13日後、約14日後、約15日後、約16日後、約17日後、約18日後、約19日後、または約20日後）である。

40

【0022】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導する *in vitro* 方法を提供する。ある特定の実施形態では、幹細胞の集団の分化を誘導する *in vitro* 方法は、幹細胞集団を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、ならびに細胞を1種または複数のF G F活性化因子とさらに接触させるステップを含み、1種または複数のF G F活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞集団と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最初の接触から約20日以内である。

50

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のF G F活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約10日後である。ある特定の実施形態では、1種または複数のF G F活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約11日後である。

【 0 0 2 4 】

ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のS C分化誘導剤と接触させるステップをさらに含み、1種または複数のS C分化誘導剤と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約20日以内である。

10

【 0 0 2 5 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のS C分化誘導剤と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約10日後である。ある特定の実施形態では、1種または複数のS C分化誘導剤と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約11日後である。ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のF G F活性化因子および1種または複数のS C分化誘導剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

20

【 0 0 2 6 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のW n t活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約4日以内である。ある特定の実施形態では、1種または複数のW n t活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約2日後である。ある特定の実施形態では、1種または複数のW n t活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触と同時に起こる。

【 0 0 2 7 】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、およびS L C 1 0 A 4からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1～4に列挙される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1に列挙される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8およびZ N F 5 0 2からなる群から選択される。

30

40

【 0 0 2 8 】

ある特定の実施形態では、方法は、幹細胞をS m a l l M o t h e r s A g a i n s t D e c a p e n t a p l e g i c (S M A D) シグナル伝達の1種または複数の阻害剤(「S M A D阻害剤」と呼ぶ)とさらに接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、幹細胞を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S M A D阻害剤と同時に接触させるステップを含む。

【 0 0 2 9 】

ある特定の実施形態では、方法は、1種または複数のS C前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を、分化した細胞の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現す

50

るシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップをさらに含む。シュワン細胞は、ミエリン形成性シュワン細胞または非ミエリン形成性シュワン細胞となり得る。

【0030】

ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化した細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、条件は、分化した細胞の集団を、シュワン細胞の分化を増強する1種または複数の分子（「SC分化増強剤」と呼ぶ）と接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化した細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子、1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および1種または複数のSC分化増強剤と同時および/または同時並行に接触させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、1種または複数のSC分化増強剤は、環状アデノシンーリン酸（cAMP）、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される。

10

【0031】

ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約11日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させることを含む。

20

30

【0032】

ある特定の実施形態では、条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたって接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のSC分化誘導剤と約11日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたって接触させることを含む。

40

【0033】

ある特定の実施形態では、方法は、細胞を1種または複数のFGF活性化因子、1種または複数のSC分化誘導剤、および1種または複数のSC分化増強剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

50

【0034】

ある特定の実施形態では、分化したSC前駆体細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞の集団を3Dスフェロイドに凝集させること、および3Dスフェロイドを、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、条件は、3Dスフェロイドを、1種または複数のSC分化増強剤と接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、条件は、3Dスフェロイドを、1種または複数のFGF活性化因子、1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および1種または複数のSC分化増強剤と同時および/または同時並行に接触させることを含む。ある特定の実施形態では、方法は、3Dスフェロイドを浮遊培養で培養するステップをさらに含む。

10

【0035】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーは、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のSCマーカーは、表1～4に記載される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1種または複数のSCマーカーは、表2～4に記載される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のSCマーカーは、TYRP1、CD44、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、およびCDKN2Aからなる群から選択される。

20

【0036】

本明細書に開示される主題はまた、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現するin vitroの分化した細胞の集団を提供する。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、本明細書に記載されるin vitro分化方法によって幹細胞集団から誘導される。

30

【0037】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、幹細胞の集団を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および1種または複数のWnt活性化因子と接触させるステップ、ならびに細胞を1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間にわたって(例えば、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間; 約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間)さらに接触させるステップの後に幹細胞集団から誘導される。

40

【0038】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、細胞を1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって(例えば、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間; 約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間)さらに接触

50

させるステップの後に幹細胞集団から誘導される。

【0039】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、幹細胞集団を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1種または複数のWnt活性化因子と接触させるステップ、ならびに細胞を1種または複数のFGF活性化因子とさらに接触させるステップの後に幹細胞集団から誘導され、1種または複数のFGF活性化因子と細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約20日以内（例えば、約10日後と約15日後との間、例えば10日後または11日後）である。

10

【0040】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、細胞を1種または複数のSC分化誘導剤とさらに接触させるステップ後に誘導され、1種または複数のSC分化誘導剤と細胞との最初の接触が、幹細胞と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最初の接触から約20日以内（例えば、約10日後と約15日後との間、例えば10日後または11日後）である。

【0041】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団は、幹細胞集団を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1種または複数のWnt活性化因子と接触させるステップ、ならびに細胞を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のSC分化誘導剤と同時および / または同時並行にさらに接触させるステップの後に幹細胞集団から誘導される。

20

【0042】

本明細書に開示される主題は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現するそのような分化した細胞を含む組成物をさらに提供する。

【0043】

本明細書に開示される主題は、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団も提供する。ある特定の実施形態では、分化した細胞の集団は、本明細書に記載される *in vitro* 分化方法によって、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団から誘導される。

30

【0044】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する分化した細胞の集団は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたって接触させるステップの後に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団から誘導される。

40

【0045】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する分化した細胞の集団は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたってさらに接触させるステップの後に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを

50

発現する分化した細胞の集団から誘導される。

【0046】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する分化した細胞の集団は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を1種または複数のFGF活性化因子、1種または複数のSC分化誘導剤、および1種または複数のSC分化増強剤と同時に少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間さらに接触させるステップの後に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団から誘導される。

10

【0047】

本明細書に開示される主題は、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現するそのような分化した細胞の集団を含む組成物をさらに提供する。

【0048】

さらに、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、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、1種または複数のWnt活性化因子、および1種または複数のFGF活性化因子を含む。ある特定の実施形態では、キットは、幹細胞の、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団への分化を誘導するための説明書を含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間にわたって（例えば、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間；約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間）接触させるステップを含む。

20

【0049】

ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から約20日以内（例えば、10日後または11日後）に、1種または複数のFGF活性化因子を細胞と最初に接触させるステップを含む。

30

【0050】

ある特定の実施形態では、キットは、1種または複数のSC分化誘導剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって（例えば、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間；約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間）接触させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のSC分化誘導剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

40

【0051】

ある特定の実施形態では、キットは、1種または複数のSMA D阻害剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を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SMA D阻害剤と同時に接触させるステップをさらに含む。

50

【0052】

ある特定の実施形態では、キットは、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書をさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約11日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と35日間にわたって接触させるステップを含む。

10

【0053】

ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するためのキットは、1種または複数のSC分化増強剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を、1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたってさらに接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のSC分化増強剤と約11日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団の、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書は、分化したシュワン細胞前駆体の集団を1種または複数のFGF活性化因子、1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および1種または複数のSC分化増強剤と同時および/または同時並行に接触させるステップを含む。

20

30

40

【0054】

ある特定の実施形態では、幹細胞の集団は、幹細胞と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最初の接触から約25日後またはそれ以降に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団へと分化する。

【0055】

ある特定の実施形態では、幹細胞集団は、幹細胞と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最初の接触から約35日後またはそれ以降に、シュワン細胞の集団へと分化する。

50

【 0 0 5 6 】

ある特定の実施形態では、分化したシュワン細胞前駆体の集団は、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する分化した細胞と、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤のうちの1つまたは両方との最初の接触から約10日後またはそれ以降にシュワン細胞の集団へと分化する。

【 0 0 5 7 】

ある特定の実施形態では、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は、SB431542、その誘導体、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。ある特定の実施形態では、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はSB431542である。

10

【 0 0 5 8 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のSMAD阻害剤は、LDN193189、その誘導体、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。ある特定の実施形態では、1種または複数のSMAD阻害剤はLDN193189である。

【 0 0 5 9 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子は、Wntシグナル伝達の活性化のためにグリコゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK3) を低下させる。ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子は、CHIR99021およびWNT3A、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。ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子はCHIR99021である。

20

【 0 0 6 0 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤は、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF、FBS、およびその組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、1つのシュワン細胞分化誘導剤は、ニューレグリン1 (NRG1) である。

【 0 0 6 1 】

ある特定の実施形態では、SC分化増強剤は、ニューレグリン、環状アデノシンリン酸 (cAMP)、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される。

【 0 0 6 2 】

ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子は、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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。ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子はFGF2である。

30

【 0 0 6 3 】

ある特定の実施形態では、幹細胞はヒト幹細胞である。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞は、ヒト多能性幹細胞である。ある特定の実施形態では、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞およびヒト誘導多能性幹細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、非ヒト幹細胞、例えば、哺乳動物幹細胞、霊長類幹細胞、または齧歯類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ等の幹細胞であるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 6 4 】

本明細書に開示される主題は、末梢神経障害であるシュワン細胞関連障害を予防および/または処置する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、末梢神経障害は、糖尿病性末梢神経障害である。ある特定の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載される分化したシュワン細胞前駆体またはそれを含む組成物を、末梢神経障害に罹患している対象に投与するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載される分化したシュワン細胞またはそれを含む組成物を、末梢神経障害に罹患している対象に投与するステップを含む。

【 0 0 6 5 】

50

本明細書に開示される主題は、対象における末梢神経障害を処置するための、本明細書に記載される分化したシュワン細胞前駆体またはそれを含む組成物をさらに提供する。加えて、本明細書に開示される主題は、対象における末梢神経障害を処置するための、本明細書に記載される分化したシュワン細胞またはそれを含む組成物を提供する。

【0066】

本明細書に開示される主題は、末梢神経障害を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載される分化したシュワン細胞前駆体またはそれを含む組成物の使用をさらに提供する。加えて、本明細書に開示される主題は、末梢神経障害を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載される分化したシュワン細胞またはそれを含む組成物の使用を提供する。

10

【0067】

A. 非限定的な実施形態では、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導する *in vitro* 方法であって、幹細胞の集団を 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 1 種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップ、ならびに 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を 1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させるステップを含む、*in vitro* 方法を提供する。

【0068】

A1. 前記細胞を前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と約 14 日間にわたって接触させるステップを含む、A の先述の方法。

20

【0069】

A2. 前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 20 日以内である、A の先述の方法。

【0070】

A3. 前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日後と約 15 日後との間である、A の先述の方法。

【0071】

A4. 前記細胞と前記 1 種または複数の FGF 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 11 日後である、A の先述の方法。

30

【0072】

A5. 前記細胞を 1 種または複数の SC 分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、A の先述の方法。

【0073】

A6. 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、A の先述の方法。

40

【0074】

A7. 前記細胞を前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と約 14 日間にわたって接触させるステップを含む、A の先述の方法。

【0075】

A8. 前記細胞と前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤との最初の接触が、前記幹細胞と TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日後と約 15 日後との間である、A の先述の方法。

【0076】

A9. 前記細胞を前記 1 種または複数の FGF 活性化因子および前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と同時に (concurrently) 接触させるステップを含む、A の先述の方法。

50

【 0 0 7 7 】

A 1 0。幹細胞の前記集団が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 5 日後またはそれ以降に、前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団へと分化する、A の先述の方法。

【 0 0 7 8 】

A 1 1。前記幹細胞を 1 種または複数の S M A D 阻害剤と接触させるステップをさらに含む、A の先述の方法。

【 0 0 7 9 】

A 1 2。前記幹細胞を T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤および前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤と同時に接触させるステップを含む、A の先述の方法。

10

【 0 0 8 0 】

A 1 3。前記細胞と前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、A の先述の方法。

【 0 0 8 1 】

A 1 4。前記細胞と W n t シグナル伝達の前記 1 種または複数の活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 日後である、A の先述の方法。

20

【 0 0 8 2 】

A 1 5。前記細胞と W n t シグナル伝達の前記 1 種または複数の活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触と同じ日である、A の先述の方法。

【 0 0 8 3 】

A 1 6。T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、A の先述の方法。

【 0 0 8 4 】

A 1 7。T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が S B 4 3 1 5 4 2 である、A の先述の方法。

30

【 0 0 8 5 】

A 1 8。前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、A の先述の方法。

【 0 0 8 6 】

A 1 9。前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が L D N 1 9 3 1 8 9 である、A の先述の方法。

【 0 0 8 7 】

A 2 0。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、W n t シグナル伝達の活性化に関してグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) を低下させる、A の先述の方法。

40

【 0 0 8 8 】

A 2 1。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される低分子である、A の先述の方法。

【 0 0 8 9 】

A 2 2。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 である、A の先述の方法。

【 0 0 9 0 】

A 2 3。前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、および F B S からなる群から選択される、A の先述の方法

50

。

【0091】

A24。前記1種または複数のSC分化誘導剤がNRG1である、Aの先述の方法。

【0092】

A25。前記1種または複数のFGF活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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、Aの先述の方法。

【0093】

A26。前記1種または複数のFGF活性化因子がFGF2である、Aの先述の方法。

【0094】

A27。前記1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される、Aの先述の方法。

【0095】

A28。前記幹細胞がヒト幹細胞である、Aの先述の方法。

【0096】

A29。前記ヒト幹細胞が、ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様多能性幹細胞、エピブラスト幹細胞、Fクラス多能性幹細胞からなる群から選択される、Aの先述の方法。

【0097】

A30。分化した細胞の前記集団を、前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、Aの先述の方法。

【0098】

A31。前記分化した細胞のシュワン細胞の前記集団への成熟化を支持する前記条件が、前記分化した細胞を1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、Aの先述の方法。

【0099】

A32。分化したSC前駆体細胞の集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、Aの先述の方法。

【0100】

A33。分化したSC前駆体細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、Aの先述の方法。

【0101】

A34。分化したSC前駆体細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む、Aの先述の方法。

【0102】

A35。分化したSC前駆体細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤と接触させるステップをさらに含む、Aの先述の方法。

【0103】

A36。分化したSC前駆体細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、Aの先述の方法。

【0104】

A37。分化したSC前駆体細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、Aの先述の方法。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 5 】

A 3 8。分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と約 3 5 日間にわたって接触させるステップを含む、A の先述の方法。

【 0 1 0 6 】

A 3 9。分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子、前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と同時に接触させるステップを含む、A の先述の方法。

【 0 1 0 7 】

A 4 0。前記分化した細胞のシュワン細胞の前記集団への成熟化を支持する前記条件が、前記分化した細胞を 1 種または複数の S C 分化増強剤とさらに接触させることを含む、A の先述の方法。

10

【 0 1 0 8 】

A 4 1。前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が、ニューレグリン、環状アデノシンリン酸 (c A M P)、フォルスコリン、L I F、および C N T F からなる群から選択される、A の先述の方法。

【 0 1 0 9 】

A 4 2。前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が c A M P である、A の先述の方法。

【 0 1 1 0 】

A 4 3。分化した細胞の前記集団を 3 D スフェロイドへと凝集させるステップ；ならびに前記 3 D スフェロイドを、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させステップを含む、A の先述の方法。

20

【 0 1 1 1 】

A 4 4。前記 3 D スフェロイドを接着培養で培養するステップをさらに含む、A の先述の方法。

【 0 1 1 2 】

A 4 5。シュワン細胞の前記集団が、1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、A の先述の方法。

【 0 1 1 3 】

A 4 6。前記 1 つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、L R R T M 4、C D H 1、F A B P 7、B D N F、U N C B 5、S O S T D C 1、O L I G 1、P L A T、K C N J 1 0、S H H、N T N 1、G D N F、E R B B 3、G A P 4 3、S O X 1 0、S 1 0 0、G F A P、P O U 3 F 1、P M P 2 2、M B P、A Q P 4、M P Z、N G F R、N F A T C 4、M O G、I F N G、M A L、N T F 3、T G F B 1、C D 9、C D 8 1、C D 4 4、C D 9 8、C D 4 9 E、C D 4 9 D、T Y R P 1、E N T H D 1、N T 5 E、H T R 2 B、N O V、I L 8、S L C 1 6 A 6、C D K N 2 A、P L P 2、S 1 0 0 A 6、A Q P 9、および C D H 1 9 からなる群から選択されるシュワン細胞マーカーからなる群から選択される、A の先述の方法。

30

【 0 1 1 4 】

B。ある特定の実施形態では、本明細書に開示の主題は、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する *i n v i t r o* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が

40

幹細胞の集団を、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 1 種または複数の W n t 活性化因子と接触させるステップ、ならびに

前記細胞を 1 種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させるステップ

の後に幹細胞の集団から誘導される、*i n v i t r o* の分化した細胞の集団を提供する。

【 0 1 1 5 】

B 1。前記細胞を前記 1 種または複数の F G F 活性化因子と約 1 4 日間にわたって接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

50

【 0 1 1 6 】

B 2。前記細胞と前記 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 0 日以内である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 1 7 】

B 3。前記細胞と前記 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 1 0 日後と約 1 5 日後との間である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 1 8 】

B 4。前記細胞と前記 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 1 1 日後である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 1 9 】

B 5。前記細胞を、1 種または複数の S C 分化誘導剤とさらに接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 0 】

B 6。前記細胞を、前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 1 】

B 7。前記細胞と前記前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 1 0 日後と約 1 5 日後との間である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 2 】

B 8。前記細胞を、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子、および前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤と同時にさらに接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 3 】

B 9。幹細胞の前記集団が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 5 日後またはそれ以降に、前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団へと分化する、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 4 】

B 1 0。前記幹細胞を、1 種または複数の S M A D 阻害剤とさらに接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 5 】

B 1 1。前記幹細胞を、T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤および前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤と同時に接触させる、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 6 】

B 1 2。前記細胞とシグナル伝達の前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞の集団と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 7 】

B 1 3。前記細胞とシグナル伝達の前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞の集団と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 2 日後である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

B 1 4。前記幹細胞の集団とシグナル伝達の前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触と同じ日である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 2 9 】

B 1 5。T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が、S B 4 3 1 5 4 2、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 0 】

B 1 6。T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤が S B 4 3 1 5 4 2 である、B の先述の分化した細胞の集団。

10

【 0 1 3 1 】

B 1 7。前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が、L D N 1 9 3 1 8 9、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 2 】

B 1 8。前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤が L D N 1 9 3 1 8 9 である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 3 】

B 1 9。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、W n t シグナル伝達の活性化に関してグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) を低下させる、B の先述の分化した細胞の集団。

20

【 0 1 3 4 】

B 2 0。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される低分子である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 5 】

B 2 1。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 6 】

B 2 2。前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、および F B S からなる群から選択される、B の先述の分化した細胞の集団。

30

【 0 1 3 7 】

B 2 3。前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が N R G 1 である、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 8 】

B 2 4。前記 1 種または複数の F G F 活性化因子が、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 1 0、F G F 1 8、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、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 3 9 】

B 2 5。前記 1 種の F G F 活性化因子が F G F 2 である、B の先述の分化した細胞の集団。

40

【 0 1 4 0 】

B 2 6。前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、および S L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、B の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 4 1 】

50

B 2 7。前記幹細胞がヒト幹細胞である、Bの先述の分化した細胞の集団。

【0142】

B 2 8。前記ヒト幹細胞が、ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様多能性幹細胞、エピブラスト幹細胞およびFクラス多能性幹細胞からなる群から選択される、Bの先述の分化した細胞の集団。

【0143】

C。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する先述の細胞の集団を、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させた後に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する先述の細胞の集団から誘導される、*in vitro* の分化した細胞の集団を提供する。

10

【0144】

C 1。前記分化した細胞の集団が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する先述の細胞の集団を、1種または複数のSC分化増強剤とさらに接触させた後に、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団から誘導される、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0145】

C 2。前記1種または複数のSC分化増強剤が、ニューレグリン、環状アデノシンーリン酸(cAMP)、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される、Cの先述の分化した細胞の集団。

20

【0146】

C 3。前記1種または複数のSC分化増強剤がcAMPである、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0147】

C 4。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0148】

C 5。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

30

【0149】

C 6。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0150】

C 7。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

40

【0151】

C 8。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0152】

C 9。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記先述の集団を、前記1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたって接触させる、Cの先述の分化した細胞の集団。

【0153】

C 10。前記1つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、LRRTM4、CDH1、F

50

A B P 7、B D N F、U N C B 5、S O S T D C 1、O L I G 1、P L A T、K C N J 1 0、S H H、N T N 1、G D N F、E R B B 3、G A P 4 3、S O X 1 0、S 1 0 0、G F A P、P O U 3 F 1、P M P 2 2、M B P、A Q P 4、M P Z、N G F R、N F A T C 4、M O G、I F N G、M A L、N T F 3、T G F B 1、C D 9、C D 8 1、C D 4 4、C D 9 8、C D 4 9 E、C D 4 9 D、T Y R P 1、E N T H D 1、N T 5 E、H T R 2 B、N O V、I L 8、S L C 1 6 A 6、C D K N 2 A、P L P 2、S 1 0 0 A 6、A Q P 9、および C D H 1 9 からなる群から選択されるシュワン細胞マーカーからなる群から選択される、C の先述の分化した細胞の集団。

【 0 1 5 4 】

D。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物を提供する。

10

【 0 1 5 5 】

E。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、シュワン細胞の先述の集団を含む組成物を提供する。

【 0 1 5 6 】

F。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および / または処置する方法であって、シュワン細胞関連障害に罹患している対象に有効量の以下：

- (a) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団；
 - (b) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物；
 - (c) シュワン細胞の先述の集団；および
 - (d) シュワン細胞の先述の集団を含む組成物
- のうちの 1 つを投与するステップを含む、方法を提供する。

20

【 0 1 5 7 】

F 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、F の先述の方法。

【 0 1 5 8 】

F 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、F の先述の方法。

【 0 1 5 9 】

G。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を提供する。

30

【 0 1 6 0 】

G 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、G の分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団。

【 0 1 6 1 】

G 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、G の分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団。

【 0 1 6 2 】

H。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および / または処置するための分化したシュワン細胞前駆体の集団を含む組成物を提供する。

40

【 0 1 6 3 】

H 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、H の先述の組成物。

【 0 1 6 4 】

H 2。前記末梢神経障害が、糖尿病性末梢神経障害である、H の分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団。

【 0 1 6 5 】

I。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および / または処置するためのシュワン細胞の先述の集団を提供する。

【 0 1 6 6 】

50

I 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Iのシュワン細胞の先述の集団。

【0167】

I 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、Iのシュワン細胞の先述の集団。

【0168】

J。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるシュワン細胞関連障害を予防および／または処置するためのシュワン細胞の先述の集団を含む組成物を提供する。

【0169】

J 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Jの先述の組成物。

【0170】

J 2。前記末梢神経障害が、糖尿病性末梢神経障害である、Jの先述の組成物。

【0171】

K。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、シュワン細胞関連障害を予防および／または処置するための医薬の製造における分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団の使用を提供する。

【0172】

K 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Kの先述の使用。

【0173】

K 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、Kの先述の使用。

【0174】

L。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、シュワン細胞関連障害を予防および／または処置するための医薬の製造における分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【0175】

L 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Lの先述の使用。

【0176】

L 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、Lの先述の使用。

【0177】

M。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、シュワン細胞関連障害を予防および／または処置するための医薬の製造におけるシュワン細胞の先述の集団の使用を提供する。

【0178】

M 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Mの先述の使用。

【0179】

M 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、Mの先述の使用。

【0180】

N。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、シュワン細胞関連障害を予防および／または処置するための医薬の製造におけるシュワン細胞の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【0181】

N 1。前記シュワン細胞関連障害が末梢神経障害である、Nの先述の使用。

【0182】

N 2。前記末梢神経障害が糖尿病性末梢神経障害である、Nの先述の使用。

【0183】

P。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、

TGF / アクチピン - ノーダルシグナル伝達の1種または複数の阻害剤

1種または複数のWnt活性化因子、および

10

20

30

40

50

1 種または複数の F G F 活性化因子を含む、キットを提供する。

【0184】

P 1。前記幹細胞の、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団への分化を誘導するための説明書を含み、前記説明書が、前記細胞を前記 1 種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【0185】

P 2。前記説明書が、前記細胞を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子と約 1 4 日間にわたって接触させるステップを含む、P の先述のキット。

10

【0186】

P 3。前記細胞と前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞を前記 1 種または複数の 1 種または複数の F G F 活性化因子と最初に接触させることから約 2 0 日以内である、P の先述のキット。

【0187】

P 4。前記細胞と前記 1 種または複数の 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記細胞と前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約 1 0 日後と約 1 5 日後との間である、P の先述のキット。

【0188】

P 5。前記細胞と、前記 1 種または複数の 1 種または複数の F G F 活性化因子との最初の接触が、前記細胞と、前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約 1 1 日後である、P の先述のキット。

20

【0189】

P 6。1 種または複数の S C 分化誘導剤をさらに含む、P の先述のキット。

【0190】

P 7。前記説明書が、前記細胞を前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたってさらに接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【0191】

P 8。前記説明書が、前記細胞を前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤と約 1 4 日間にわたってさらに接触させるステップを含む、P の先述のキット。

30

【0192】

P 9。前記細胞と前記 1 種または複数の 1 種または複数の S C 分化誘導剤との最初の接触が、前記細胞と前記 1 種または複数の W n t 活性化因子との最初の接触から約 1 0 日後と約 1 5 日後との間である、P の先述のキット。

【0193】

P 1 0。前記説明書が、前記細胞を前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【0194】

P 1 1。1 種または複数の S M A D 阻害剤をさらに含む、P の先述のキット。

40

【0195】

P 1 2。前記説明書が、前記幹細胞を T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤および前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤と接触させるステップをさらに含む、P の先述のキット。

【0196】

P 1 3。前記説明書が、前記幹細胞を T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤および前記 1 種または複数の S M A D 阻害剤と同時に接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【0197】

P 1 4。前記説明書が、前記幹細胞と T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の

50

前記１種または複数の阻害剤との最初の接触から約４日以内に、前記細胞を前記１種または複数のWnt活性化因子と最初に接触させるステップを含む、Pの先述のキット。

【０１９８】

P１５。前記説明書が、前記幹細胞とTGF- β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤との最初の接触から約２日後に、前記細胞を前記１種または複数のWnt活性化因子と最初に接触させるステップを含む、Pの先述のキット。

【０１９９】

P１６。前記説明書が、前記細胞と前記１種または複数のWnt活性化因子との前記最初の接触と同じ日に、前記幹細胞をTGF- β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記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、Pの先述のキット。

10

【０２００】

P１７。TGF- β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤が、SB431542、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、Pの先述のキット。

【０２０１】

P１８。TGF- β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の前記１種または複数の阻害剤がSB431542である、Pの先述のキット。

【０２０２】

P１９。前記１種または複数のSMAD阻害剤が、LDN193189、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、Pの先述のキット。

20

【０２０３】

P２０。前記１種または複数のSMAD阻害剤がLDN193189である、Pの先述のキット。

【０２０４】

P２１。前記１種または複数のWnt活性化因子が、Wntシグナル伝達の活性化に関してグリコゲンシンターゼキナーゼ３（GSK3）を低下させる、Pの先述のキット。

【０２０５】

P２２。前記１種または複数のWnt活性化因子が、CHIR99021、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群から選択される低分子である、Pの先述のキット。

30

【０２０６】

P２３。前記１種または複数のWnt活性化因子がCHIR99021である、Pの先述のキット。

【０２０７】

P２４。前記１種または複数のSC分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォスコリン、TGF- β 、およびFBSからなる群から選択される、Pの先述のキット。

【０２０８】

P２５。前記１種または複数のSC分化誘導剤がNRG1である、Pの先述のキット。

【０２０９】

P２６。前記１種または複数のFGF活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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、Pの先述のキット。

40

【０２１０】

P２７。前記１種のFGF活性化因子がFGF2である、Pの先述のキット。

【０２１１】

P２８。１種または複数のSC分化増強剤、および前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための説明書をさらに含む、Pの先述のキット。

【０２１２】

P２９。前記１種または複数のSC分化増強剤が、ニューレグリン、環状アデノシン

50

リン酸 (c A M P)、フォルスコリン、L I F、および C N T F からなる群から選択される、P の先述のキット。

【 0 2 1 3 】

P 3 0。前記 1 種または複数の S C 分化増強剤が c A M P である、P の先述のキット。

【 0 2 1 4 】

P 3 1。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、前記分化した細胞を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【 0 2 1 5 】

P 3 2。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップを含む、P の先述のキット。

10

【 0 2 1 6 】

P 3 3。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 1 0 日間にわたって接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【 0 2 1 7 】

P 3 4。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子および前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約 3 5 日間にわたって接触させるステップを含む、P の先述のキット。

20

【 0 2 1 8 】

P 3 5。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と接触させるステップをさらに含む、P の先述のキット。

【 0 2 1 9 】

P 3 6。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と少なくとも約 3 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、P の先述のキット。

30

【 0 2 2 0 】

P 3 7。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と約 1 4 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、P の先述のキット。

【 0 2 2 1 】

P 3 8。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と約 3 5 日間にわたって接触させるステップをさらに含む、P の先述のキット。

【 0 2 2 2 】

40

P 3 9。前記分化した細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を誘導するための前記説明書が、分化した S C 前駆体細胞の前記集団を、前記 1 種または複数の F G F 活性化因子、前記 1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記 1 種または複数の S C 分化増強剤と同時に接触させるステップを含む、P の先述のキット。

【 0 2 2 3 】

Q。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、幹細胞の分化を誘導する i n v i t r o 方法であって、幹細胞の集団を、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接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の W n t 活性化因子と接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の F G F 活性化因子と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 2 0 日間との間、約 1 0 日間と約 2 0

50

日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させて、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するステップを含み、前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、*in vitro* 方法を提供する。

【0224】

Q1。前記細胞と、前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、Q の先述の方法。

【0225】

Q2。1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させる、ステップをさらに含み、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、Q の先述の方法。

【0226】

Q3。1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する分化した細胞の集団を産生するために、前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤および 1 種または複数の FGF 活性化因子と同時に少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤および 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と、TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、Q の先述の方法。

【0227】

R。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する *in vitro* の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、幹細胞の集団を TGF- α / 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接触させるステップ、前記細胞を 1 種または複数の Wnt 活性化因子と接触させるステップ、および前記細胞を 1 種または複数の FGF 活性化因子と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させるステップの後に幹細胞の集団から誘導され、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤および前記 1 種または複数の FGF 活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / 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最初の接触から約 20 日以内である、*in vitro* の分化した細胞の集団を提供する。

【0228】

R1。前記細胞と前記 1 種または複数の Wnt 活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 4 日以内である、R の先述の分化した細胞の集団。

【0229】

R2。前記細胞を、1 種または複数の SC 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、約 3 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、または約 10 日間と約 15 日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記 1 種または複数の SC 分化誘導剤と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞と TGF- α / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記 1 種または複数の阻害剤との最初の接触から約 10 日以内である、R の先述の分化した細胞の集団。

【0230】

10

20

30

40

50

R 3。前記細胞を、1種または複数のSC分化誘導剤および1種または複数のFGF活性化因子と同時に少なくとも約3日間、約3日間と約20日間との間、約10日間と約20日間との間、または約10日間と約15日間との間、さらに接触させるステップをさらに含み、前記1種または複数のSC分化誘導剤および1種または複数のFGF活性化因子と前記細胞との最初の接触が、前記幹細胞とTGF β / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約10日以内である、Qの先述の方法。

【0231】

S。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、神経堤系列細胞の分化を誘導する*in vitro*方法であって、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と接触させるステップを含む、*in vitro*方法を提供する。

10

【0232】

S 1。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【0233】

S 2。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

20

【0234】

S 3。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と約5日間と約15日間との間、接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【0235】

S 4。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と約14日間にわたって接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【0236】

S 5。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、Sの先述の方法。

30

【0237】

S 6。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Sの先述の方法。

【0238】

S 7。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と最長約30日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Sの先述の方法。

40

【0239】

S 8。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のSC分化誘導剤と約14日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Sの先述の方法。

【0240】

S 9。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のSC分化誘導剤と同時に接触させるステップをさらに含む、Sの先述の方法。

【0241】

S 10。前記1種または複数のWnt活性化因子が、Wntシグナル伝達の活性化に関

50

してグリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (G S K 3) を低下させる、Sの先述の方法。

【 0 2 4 2 】

S 1 1。前記1種または複数のW n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、W n t - 1、W N T 3 A、W n t 4、W n t 5 a、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低分子である、Sの先述の方法。

【 0 2 4 3 】

S 1 2。前記1種または複数のW n t 活性化因子がC H I R 9 9 0 2 1である、Sの先述の方法。

【 0 2 4 4 】

S 1 3。前記1種または複数のS C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、およびF B S からなる群から選択される、Sの先述の方法。

【 0 2 4 5 】

S 1 4。前記1種または複数のS C 分化誘導剤がN R G 1である、Sの先述の方法。

【 0 2 4 6 】

S 1 5。前記1種または複数のF G F 活性化因子が、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 1 0、F G F 1 8、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、Sの先述の方法。

【 0 2 4 7 】

S 1 6。前記1種または複数のF G F 活性化因子がF G F 2である、Sの先述の方法。

【 0 2 4 8 】

S 1 7。前記1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、およびS L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、Sの先述の方法。

【 0 2 4 9 】

S 1 8。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、Sの先述の方法。

【 0 2 5 0 】

S 1 9。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のF G F 活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、Sの先述の方法。

【 0 2 5 1 】

S 2 0。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のF G F 活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【 0 2 5 2 】

S 2 1。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のF G F 活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【 0 2 5 3 】

S 2 2。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のF G F 活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む、Sの先述の方法。

【 0 2 5 4 】

S 2 3。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の

10

20

30

40

50

前記集団を、１種または複数のＳＣ分化増強剤と接触させることをさらに含む、Ｓの先述の方法。

【０２５５】

Ｓ２４。１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記１種または複数のＳＣ分化増強剤と少なくとも約３日間にわたってさらに接触させるステップを含む、Ｓの先述の方法。

【０２５６】

Ｓ２５。１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記１種または複数のＳＣ分化増強剤と少なくとも約１０日間にわたってさらに接触させるステップを含む、Ｓの先述の方法。

10

【０２５７】

Ｓ２６。１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記１種または複数のＳＣ分化増強剤と少なくとも約３５日間にわたってさらに接触させるステップを含む、Ｓの先述の方法。

【０２５８】

Ｓ２７。１つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記１種または複数のＦＧＦ活性化因子および前記１種または複数のＳＣ分化増強剤と同時に接触させるステップを含む、Ｓの先述の方法。

【０２５９】

Ｓ２８。前記１種または複数のＳＣ分化増強剤が、ニューレグリン、環状アデノシンリン酸（ｃＡＭＰ）、フォルスコリン、ＬＩＦ、およびＣＮＴＦからなる群から選択される、Ｓの先述の方法。

20

【０２６０】

Ｓ２９。前記１種または複数のＳＣ分化増強剤がｃＡＭＰである、Ｓの先述の方法。

【０２６１】

Ｓ３０。シュワン細胞の前記集団が、１つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、Ｓの先述の方法。

【０２６２】

Ｓ３１。前記１つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、ＬＲＲＴＭ４、ＣＤＨ１、ＦＡＢＰ７、ＢＤＮＦ、ＵＮＣＢ５、ＳＯＳＴＤＣ１、ＯＬＩＧ１、ＰＬＡＴ、ＫＣＮＪ１０、ＳＨＨ、ＮＴＮ１、ＧＤＮＦ、ＥＲＢＢ３、ＧＡＰ４３、ＳＯＸ１０、Ｓ１００、ＧＦＡＰ、ＰＯＵ３Ｆ１、ＰＭＰ２２、ＭＢＰ、ＡＱＰ４、ＭＰＺ、ＮＧＦＲ、ＮＦＡＴＣ４、ＭＯＧ、ＩＦＮＧ、ＭＡＬ、ＮＴＦ３、ＴＧＦＢ１、ＣＤ９、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＣＤ９８、ＣＤ４９Ｅ、ＣＤ４９Ｄ、ＴＹＲＰ１、ＥＮＴＨＤ１、ＮＴ５Ｅ、ＨＴＲ２Ｂ、ＮＯＶ、ＩＬ８、ＳＬＣ１６Ａ６、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＬＰ２、Ｓ１００Ａ６、ＡＱＰ９、およびＣＤＨ１９からなる群から選択されるシュワン細胞マーカーからなる群から選択される、Ｓの先述の方法。

30

【０２６３】

Ｓ３２。前記神経堤系列マーカーが、ＳＯＸ１０、ｐ７５、ＨＮＫ１、ＣＤ４９Ｄ、ＥＲＢＢ３、ＴＦＡＰ２、ＳＮＡＩＬ、およびＳＬＵＧからなる群から選択される、Ｓの先述の方法。

40

【０２６４】

Ｔ。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、１つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する*in vitro*の分化した細胞の集団であって、前記分化した細胞の集団が、１つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団を、１種または複数のＷｎｔ活性化因子、１種または複数のＦＧＦ活性化因子と少なくとも約３日間、最長約３０日間、または約５日間と約１５日間との間、接触させた後に神経堤系列細胞の集団から誘導される、*in vitro*の分化した細胞の集団を提供する。

【０２６５】

Ｔ１。１つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記１種ま

50

たは複数の W n t 活性化因子および 1 種または複数の F G F 活性化因子と約 1 4 日間にわたって接触させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0266】

T 2。1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤とさらに接触させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0267】

T 3。1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、最長約 3 0 日間、または約 5 日間と約 1 5 日間との間、さらに接触させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0268】

T 4。1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と約 1 4 日間にわたってさらに接触させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0269】

T 5。1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1 種または複数の W n t 活性化因子、1 種または複数の F G F 活性化因子、および 1 種または複数の S C 分化誘導剤と同時に (simultaneously) 接触させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0270】

T 6。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が W n t シグナル伝達を活性化するためにグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) を低下させる、T の先述の分化した細胞の集団。

【0271】

T 7。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が、C H I R 9 9 0 2 1、W n t - 1、W N T 3 A、W n t 4、W n t 5 a、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低分子である、T の先述の分化した細胞の集団。

【0272】

T 8。前記 1 種または複数の W n t 活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 である、T の先述の分化した細胞の集団。

【0273】

T 9。前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F、および F B S からなる群から選択される、T の先述の分化した細胞の集団。

【0274】

T 1 0。前記 1 種または複数の S C 分化誘導剤が N R G 1 である、T の先述の分化した細胞の集団。

【0275】

T 1 1。前記 1 種または複数の F G F 活性化因子が、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 1 0、F G F 1 8、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、T の先述の分化した細胞の集団。

【0276】

T 1 2。前記 1 種の F G F 活性化因子が F G F 2 である、T の先述の分化した細胞の集団。

【0277】

T 1 3。前記 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーが、S O X 1 0、G A P 4 3、B L B P、M P Z、D h h、P 7 5 N T R、C D 4 9 D、T F A P 2、C D H 1 9、C D 4 4、E R B B 3、P O U 3 F 1、G F A P、C A L C B、G R P 1 1 6、T S P Y L 5、I T P K A、S L C 1 7 A 6、S Y P L 2、L O C 1 0 0 1 2 8 2 5 2、A N G P T L 7、L O C 7 2 8 9 7 8、Z N F 5 0 2、S L C 1 6 A 6、L P L、S L C 3 0 A 2、および S L C 1 0 A 4 からなる群から選択される、T の先述の分化した細胞の集団。

10

20

30

40

50

【0278】

T14。前記神経堤系列マーカーが、SOX10、p75、HNK1、CD49D、ERBB3、TFAP2、SNAIL、およびSLUGからなる群から選択される、Tの先述の方法。

【0279】

U。ある特定の実施形態では、幹細胞の分化を誘導する*in vitro*方法は、幹細胞の集団を1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団に*in vitro*で分化させるステップ、および1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、分化した細胞を、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と接触させるステップを含む。

10

【0280】

U1。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0281】

U2。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子と最長約30日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0282】

U3。前記分化した細胞を、前記1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子と約5日と約15日間との間、または約10日間と15日間との間、接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

20

【0283】

U4。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子と約14日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0284】

U5。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と接触させるステップをさらに含む、Uの先述の方法。

【0285】

U6。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Uの先述の方法。

30

【0286】

U7。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と最長約30日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Uの先述の方法。

【0287】

U8。1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化誘導剤と約14日間にわたって接触させるステップをさらに含む、Uの先述の方法。

40

【0288】

U9。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の集団を産生するために、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および1種または複数のSC分化誘導剤と同時に接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0289】

U10。前記1種または複数のWnt活性化因子が、Wntシグナル伝達を活性化するためにグリコゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK3) を低下させる、Uの先述の方法。

50

【0290】

U11。前記1種または複数のWnt活性化因子が、CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、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低分子である、Uの先述の方法。

【0291】

U12。前記1種または複数のWnt活性化因子がCHIR99021である、Uの先述の方法。

【0292】

U13。前記1種または複数のSC分化誘導剤が、ニューレグリン、LIF、CNTF、フォルスコリン、TGF、およびFBSからなる群から選択される、Uの先述の方法。

10

【0293】

U14。前記1種または複数のSC分化誘導剤がNRG1である、Uの先述の方法。

【0294】

U15。前記1種または複数のFGF活性化因子が、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、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、Uの先述の方法。

【0295】

U16。前記1種または複数のFGF活性化因子がFGF2である、Uの先述の方法。

【0296】

U17。前記1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される、Uの先述の方法。

20

【0297】

U18。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、前記細胞のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供するステップを含む、Uの先述の方法。

30

【0298】

U19。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触させることを含む、Uの先述の方法。

【0299】

U20。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0300】

U21。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約10日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

40

【0301】

U22。1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子および前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と約35日間にわたって接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

【0302】

U23。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤とさらに接触させることを含む、Uの先述の方法。

50

【0303】

U24。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、1種または複数のSC分化増強剤と少なくとも約3日間にわたってさらに接触させることを含む、Uの先述の方法。

【0304】

U25。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を1種または複数のSC分化増強剤と約10日間にわたってさらに接触させることを含む、Uの先述の方法。

【0305】

U26。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を1種または複数のSC分化増強剤と約35日間にわたってさらに接触させることを含む、Uの先述の方法。

10

【0306】

U27。前記条件が、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞の前記集団を、前記1種または複数のFGF活性化因子、前記1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および前記1種または複数のSC分化増強剤と同時に(simultaneously)接触させることを含む、Uの先述の方法。

【0307】

U28。前記1種または複数のSC分化増強剤が、ニューレグリン、環状アデノシンリン酸(cAMP)、フォルスコリン、LIF、およびCNTFからなる群から選択される、Uの先述の方法。

20

【0308】

U29。前記1種または複数のSC分化増強剤がcAMPである、Uの先述の方法。

【0309】

U30。シュワン細胞の前記集団が1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する、Uの先述の方法。

【0310】

U31。前記1つまたは複数のシュワン細胞マーカーが、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、GFAP、ERBB3、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択される、Uの先述の方法。

30

【0311】

U32。前記幹細胞集団の、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団へのin vitro分化が、SMADシグナル伝達を阻害するステップおよびWntシグナル伝達を活性化するステップを含む、Uの先述の方法。

【0312】

U33。前記幹細胞集団の、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の集団へのin vitro分化が、前記幹細胞をTGF α /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接触させるステップ、および前記細胞を1種または複数のWnt活性化因子と接触させるステップを含む、Uの先述の方法。

40

【0313】

U34。幹細胞の前記集団を1種または複数のSMAD阻害剤と接触させるステップをさらに含む、Uの先述の方法。

【0314】

U35。幹細胞の前記集団を、TGF α /アクチビン-ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤および前記1種または複数のSMAD阻害剤と同時に接触させるス

50

テップを含む、Uの先述の方法。

【0315】

U36。前記細胞と前記1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞とTGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約4日以内である、Uの先述の方法。

【0316】

U37。前記細胞とWntシグナル伝達の前記1種または複数の活性化因子との最初の接触が、前記幹細胞とTGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤との最初の接触から約2日後である、Uの先述の方法。

【0317】

U38。TGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤が、SB431542、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、Uの先述の方法。

【0318】

U39。TGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤がSB431542である、Uの先述の方法。

【0319】

U40。前記1種または複数のSMAD阻害剤がLDN193189、その誘導体、およびその混合物からなる群から選択される低分子である、Uの先述の方法。

【0320】

U41。前記1種または複数のSMAD阻害剤がLDN193189である、Uの先述の方法。

【0321】

U42。前記神経堤系列マーカーが、SOX10、p75、HNK1、CD49D、ERBB3、TFAP2、SNAIL、およびSLUGからなる群から選択される、Uの先述の方法。

【0322】

V。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるPNSおよび/またはCNSを再生する方法であって、対象に有効量の以下：

- (a) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団；
 - (b) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物；
 - (c) シュワン細胞の先述の集団；および
 - (d) シュワン細胞の先述の集団を含む組成物
- のうちの1つを投与するステップを含む、方法を提供する。

【0323】

W。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるPNSおよび/またはCNSを再生するための、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を提供する。

【0324】

X。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるPNSおよび/またはCNSを再生するための、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物を提供する。

【0325】

Y。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるPNSおよび/またはCNSを再生するための、シュワン細胞の先述の集団を提供する。

【0326】

Z。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるPNSおよび/またはCNSを再生するための、シュワン細胞の先述の集団を含む組成物を提供する。

【0327】

A A。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団の使用を提供する。

【 0 3 2 8 】

A B。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【 0 3 2 9 】

A C。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、シュワン細胞の先述の集団の使用を提供する。

10

【 0 3 3 0 】

A D。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、P N S および / または C N S を再生するための医薬の製造における、シュワン細胞の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【 0 3 3 1 】

A E。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置する方法であって、対象に有効量の以下：

(a) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団；

(b) 分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物；

20

(c) シュワン細胞の先述の集団；および

(d) シュワン細胞の先述の集団を含む組成物

のうちの1つを投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 3 3 2 】

A F。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を提供する。

【 0 3 3 3 】

A G。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物を提供する。

30

【 0 3 3 4 】

A H。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、シュワン細胞の先述の集団を提供する。

【 0 3 3 5 】

A I。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、対象におけるミエリン損傷を予防および / または処置するための、シュワン細胞の先述の集団を含む組成物を提供する。

【 0 3 3 6 】

A J。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、ミエリン損傷を予防および / または処置するための医薬の製造における、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団の使用を提供する。

40

【 0 3 3 7 】

A K。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、ミエリン損傷を予防および / または処置するための医薬の製造における、分化したシュワン細胞前駆体の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【 0 3 3 8 】

A L。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、ミエリン損傷を予防および / または処置するための医薬の製造における、シュワン細胞の先述の集団の使用を提供する。

50

【 0 3 3 9 】

A M。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、ミエリン損傷を予防および/または処置するための医薬の製造における、シュワン細胞の先述の集団を含む組成物の使用を提供する。

【 0 3 4 0 】

A U。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、*in vitro*で分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の集団の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%）が、1種または複数のSC前駆体マーカーを発現し、細胞の集団の約15%未満（例えば、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、または約0.1%未満）が、幹細胞マーカー、CNSマーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、組成物を提供する。

10

【 0 3 4 1 】

A U 1。前記1つまたは複数のSC前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される、AUの先述の組成物。

20

【 0 3 4 2 】

A U 2。前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SSEA4、およびSSEA3からなる群から選択される、AUの先述の組成物。NAU1。

【 0 3 4 3 】

A U 3。前記CNSマーカーが、PAX6、NESTIN、およびSOX1からなる群から選択される、AUの先述の組成物。

【 0 3 4 4 】

A U 4。前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、およびTRKCからなる群から選択される、AUの先述の組成物。

30

【 0 3 4 5 】

A U 5。前記間葉前駆体マーカーが、SMAおよびCD73からなる群から選択される、AUの先述の組成物。

【 0 3 4 6 】

A V。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される主題は、*in vitro*で分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の集団の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%）が、1種または複数のSCマーカーを発現し、細胞の約15%未満（例えば、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、または約0.1%未満）が、SC前駆体マーカー、幹細胞マーカー、CNSマーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、組成物を提供する。

40

【 0 3 4 7 】

A V 1。前記1つまたは複数のSCマーカーが、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、GFAP、ERBB3CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、

50

NTF3、TGFB1、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、ILL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、およびCDH19からなる群から選択される、AVの先述の組成物。

【0348】

AV2。前記SC前駆体マーカーが、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される、AVの先述の組成物。

10

【0349】

AV3。前記幹細胞マーカーが、OCT4、NANOG、SSEA4、およびSSEA3からなる群から選択される、AVの先述の組成物。NAU1。

【0350】

AV4。前記CNSマーカーが、PAX6、NESTIN、およびSOX1からなる群から選択される、AUの先述の組成物。

【0351】

AV5。前記神経細胞マーカーが、TUJ1、MAP2、NFH、BRN3A、ISL1、TH、ASCL1、CHAT、PHOX2B、PHOX2A、TRKA、TRKB、およびTRKCからなる群から選択される、AVの先述の組成物。

20

【0352】

AV6。前記間葉前駆体マーカーが、SMAおよびCD73からなる群から選択される、AVの先述の組成物。

4. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0353】

【図1A-D】図1A~1Iは、hESCからのSCの誘導を示す図である。(1A)シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を誘導するためのプロトコール(11~35日目)の概略図表示。(1B)分化の11日目、25日目および35日目におけるSOX10:GFP発現。(1C、1D)シュワン細胞の分化およびミエリン形成(1C)ならびに神経の相互作用および支持(1D)に関するシュワン系列マーカーのパネルについてのqRT-PCR。SOX10についての、選別されていないおよびCD49D選別された分化したNC細胞の免疫蛍光。(1E)60日目における、シュワン系列マーカーについてのhESC由来SCの代表的免疫蛍光イメージ。F)(1E)中のマーカーの定量化。(1G)CNS前駆体と比較した、CD49d精製されたNC、CD49d精製されたSCP、ヒト初代シュワン細胞、ならびに分化の50日目および100日目におけるCD98精製されたhESC由来SCの主成分分析。(1H)25日目のSCPおよび100日目のSCにおいて有意に上方調節された、上位10(通常書体)および選択されたさらなる(太字書体)遺伝子。(1I)(1E)中のマーカーの定量化。スケールバー=Bの左および中央のパネルでは100μm、Bの右パネルおよびEでは25μm。

30

40

【図1E-F】図1A~1Iは、hESCからのSCの誘導を示す図である。(1A)シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を誘導するためのプロトコール(11~35日目)の概略図表示。(1B)分化の11日目、25日目および35日目におけるSOX10:GFP発現。(1C、1D)シュワン細胞の分化およびミエリン形成(1C)ならびに神経の相互作用および支持(1D)に関するシュワン系列マーカーのパネルについてのqRT-PCR。SOX10についての、選別されていないおよびCD49D選別された分化したNC細胞の免疫蛍光。(1E)60日目における、シュワン系列マーカーについてのhESC由来SCの代表的免疫蛍光イメージ。F)(1E)中のマーカーの定量化。(1G)CNS前駆体と比較した、CD49d精製されたNC、CD49d精製されたSCP、ヒト初代シュワン細胞、ならびに分化の50日目および100日目におけるCD9

50

8 精製された h E S C 由来 S C の主成分分析。(1 H) 2 5 日目の S C P および 1 0 0 日目の S C において有意に上方調節された、上位 1 0 (通常の本体) および選択されたさらなる (太字の本体) 遺伝子。(1 I) (1 E) 中のマーカーの定量化。スケールバー = B の左および中央のパネルでは 1 0 0 μ m、B の右パネルおよび E では 2 5 μ m。

【図 1 G - H】図 1 A ~ 1 I は、h E S C からの S C の誘導を示す図である。(1 A) シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を誘導するためのプロトコル (1 1 ~ 3 5 日目) の概略図表示。(1 B) 分化の 1 1 日目、2 5 日目および 3 5 日目における S O X 1 0 : : G F P 発現。(1 C、1 D) シュワン細胞の分化およびミエリン形成 (1 C) ならびに神経の相互作用および支持 (1 D) に関するシュワン系列マーカーのパネルについての q R T - P C R。S O X 1 0 についての、選別されていないおよび C D 4 9 D 選別された分化した N C 細胞の免疫蛍光。(1 E) 6 0 日目における、シュワン系列マーカーについての h E S C 由来 S C の代表的免疫蛍光イメージ。F) (1 E) 中のマーカーの定量化。(1 G) C N S 前駆体と比較した、C D 4 9 d 精製された N C、C D 4 9 d 精製された S C P、ヒト初代シュワン細胞、ならびに分化の 5 0 日目および 1 0 0 日目における C D 9 8 精製された h E S C 由来 S C の主成分分析。(1 H) 2 5 日目の S C P および 1 0 0 日目の S C において有意に上方調節された、上位 1 0 (通常の本体) および選択されたさらなる (太字の本体) 遺伝子。(1 I) (1 E) 中のマーカーの定量化。スケールバー = B の左および中央のパネルでは 1 0 0 μ m、B の右パネルおよび E では 2 5 μ m。

【図 1 I】図 1 A ~ 1 I は、h E S C からの S C の誘導を示す図である。(1 A) シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を誘導するためのプロトコル (1 1 ~ 3 5 日目) の概略図表示。(1 B) 分化の 1 1 日目、2 5 日目および 3 5 日目における S O X 1 0 : : G F P 発現。(1 C、1 D) シュワン細胞の分化およびミエリン形成 (1 C) ならびに神経の相互作用および支持 (1 D) に関するシュワン系列マーカーのパネルについての q R T - P C R。S O X 1 0 についての、選別されていないおよび C D 4 9 D 選別された分化した N C 細胞の免疫蛍光。(1 E) 6 0 日目における、シュワン系列マーカーについての h E S C 由来 S C の代表的免疫蛍光イメージ。F) (1 E) 中のマーカーの定量化。(1 G) C N S 前駆体と比較した、C D 4 9 d 精製された N C、C D 4 9 d 精製された S C P、ヒト初代シュワン細胞、ならびに分化の 5 0 日目および 1 0 0 日目における C D 9 8 精製された h E S C 由来 S C の主成分分析。(1 H) 2 5 日目の S C P および 1 0 0 日目の S C において有意に上方調節された、上位 1 0 (通常の本体) および選択されたさらなる (太字の本体) 遺伝子。(1 I) (1 E) 中のマーカーの定量化。スケールバー = B の左および中央のパネルでは 1 0 0 μ m、B の右パネルおよび E では 2 5 μ m。

【 0 3 5 4 】

【図 2 A - E】図 2 A ~ 2 E は、h E S C 由来感覚ニューロンに対してミエリン形成する h E S C - S C および h E S C 由来シュワン細胞の *i n v i t r o* 機能的特徴付けである。(2 A) h E S C 由来感覚または運動ニューロンとの h E S C - S C の同時培養の略図。(2 B) h E S C - S C と h E S C 感覚ニューロンとの物理的会合。(2 C) 透過型電子顕微鏡法により、h E S C - S C と h E S C 感覚ニューロンとの長期間同時培養 (8 0 週間の S C 分化に加えて 4 カ月間の同時培養) における *i n v i t r o* ミエリン形成の証拠が示される。(2 D) h E S C - S C と h E S C 運動ニューロンとの物理的会合。(2 E) h E S C - S C および h E S C 運動ニューロンの同時培養の同時培養後 4 0 日目および 7 0 日目でのカルシウムイメージングの定量。スケールバー = 2 B の左のパネルでは 1 0 0 μ m、2 B の右のパネルでは 2 0 μ m、および 2 C では 0 . 2 μ m。

【 0 3 5 5 】

【図 3 A - E】図 3 A ~ 3 E は、h E S C - S C の *i n v i v o* 機能的特徴付けである。(3 A) 成体ラット座骨神経における h E S C - S C 移植の略図。R F P + h P S C 由来シュワン細胞を、神経挫滅後損傷部位に注射した (成体のシクロスポリン - A 処置 S D ラット)。(3 B) 移植の 8 週間後でのヒト特異的核マーカー S C 1 0 1 に関する移植した座骨神経の免疫蛍光染色。(3 C) 裂いた神経線維の R F P (移植したヒト細胞)、軸索マーカー (N F H)、および D A P I に関する共焦点分析。(3 D) 裂いた神経線維の

RFP（移植したヒト細胞）、ミエリンマーカーMAG（上のパネル）、およびP0（下のパネル）、およびDAPIに関する共焦点分析。（3E）裂いた神経線維のRFPおよび節マーカーKv1.2（K⁺チャネル、矢印の先、上のパネル）、CASP3（矢印の先、中央のパネル）、汎Na⁺（ナトリウムチャネル、矢印の先、下のパネル）に関する共焦点分析。スケールバー＝Bでは100 μm、CおよびDでは20 μm、ならびにEでは10 μm。

【0356】

【図4A～B】図4A～4Bは、hESC由来SCPおよびSC系列の特徴付けを示す図である。（4A）hESC由来NC（11日目）およびSCP（25日目）におけるSOX10::GFPのフローサイトメトリー分析。（4B）*in vitro*分化の間の異なる時点におけるhESC由来SCにおけるGFAPのフローサイトメトリー分析。

10

【0357】

【図5A～B】図5A～5Cは、抗体スクリーニングがヒトSCについての新規表面マーカーを同定することを示す図である。（5A）抗体スクリーニングパラダイムの概略図表示。（5B）一次スクリーニングは、hESC-SCについての新規表面マーカーを同定する。（5C）SC分化の異なる段階における表面マーカー発現の免疫細胞化学およびフローサイトメトリーベースの検証。

【図5C-1】図5A～5Cは、抗体スクリーニングがヒトSCについての新規表面マーカーを同定することを示す図である。（5A）抗体スクリーニングパラダイムの概略図表示。（5B）一次スクリーニングは、hESC-SCについての新規表面マーカーを同定する。（5C）SC分化の異なる段階における表面マーカー発現の免疫細胞化学およびフローサイトメトリーベースの検証。

20

【図5C-2】図5A～5Cは、抗体スクリーニングがヒトSCについての新規表面マーカーを同定することを示す図である。（5A）抗体スクリーニングパラダイムの概略図表示。（5B）一次スクリーニングは、hESC-SCについての新規表面マーカーを同定する。（5C）SC分化の異なる段階における表面マーカー発現の免疫細胞化学およびフローサイトメトリーベースの検証。

【発明を実施するための形態】

【0358】

発明の詳細な説明

30

本明細書に開示される主題は、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）の、*in vitro*でシュワン細胞（「SC」）へとさらに誘導することができる1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞（すなわち、シュワン細胞前駆体「SC前駆体」）への分化を誘導する*in vitro*方法、そのような方法によって産生された細胞（SC前駆体およびSC）、およびそのような細胞を含む組成物に関する。PNSおよび/もしくはCNSの再生のため、ミエリン損傷の予防および/もしくは処置のため、ならびに/またはシュワン細胞関連障害、例えば末梢神経障害（例えば、糖尿病性末梢神経障害）の予防および/もしくは処置のための、ならびにPNSおよび/もしくはCNSの再生、ミエリン損傷の予防および/もしくは処置、および/またはシュワン細胞関連障害、例えば末梢神経障害（例えば、糖尿病性末梢神経障害）の予防および/もしくは処置に適した化合物をスクリーニングするためのそのような細胞の使用も提供される。

40

【0359】

本開示を制限するためではなく明快にする目的のため、詳細な説明を以下のセクションに分ける：

- 1．定義
- 2．幹細胞を分化させる方法
- 3．シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を含む組成物
- 4．処置方法
- 5．キット

【0360】

50

1. 定義

本明細書で使用される用語は一般に、本発明の文脈内で、各用語が使用される具体的な文脈において、当該分野におけるその通常の意味を有する。ある特定の用語は、本発明の組成物および方法ならびにそれらをどのように作製および使用するかを記述するにあたり実務者にさらなるガイダンスを提供するために、以下または本明細書の他の箇所で議論される。

【0361】

用語「約」または「およそ」は、当業者によって決定され、その値がどのように測定または決定されるか、即ち、測定系の限界に一部依存する、特定の値について許容される誤差範囲内を意味する。例えば、「約」は、当該分野における実務に従い、3標準偏差以内または3標準偏差よりも大きいことを意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大で20%、例えば、最大で10%、最大で5%または最大で1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に、生物システムまたはプロセスに関して、この用語は、ある値の1オーダー以内、例えば、5分の1～5倍以内または2分の1～2倍以内を意味し得る。

10

【0362】

本明細書で使用される場合、「シグナル伝達タンパク質」に関して、用語「シグナル伝達」とは、膜受容体タンパク質へのリガンド結合または一部の他の刺激によって活性化されるまたは他の方法で影響されるタンパク質を指す。シグナル伝達タンパク質の例には、線維芽細胞増殖因子(FGF)、SMAD、ベータ-カテニン(catnin)を含むウイングレス(Wnt)複合タンパク質、NOTCH、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF)、アクチビン、ノーダルおよびグリコゲンシンターゼキナーゼ3(GSK3P)タンパク質が含まれるがこれらに限定されない。多くの細胞表面受容体または内部受容体タンパク質について、リガンド-受容体相互作用は、細胞の応答と直接関連するわけではない。リガンド活性化された受容体は、細胞の挙動に対するリガンドの究極的な生理学的影響が生じる前に、細胞の内側の他のタンパク質と最初に相互作用し得る。しばしば、いくつかの相互作用性細胞タンパク質の鎖の挙動は、受容体の活性化または阻害後に変更される。受容体活性化によって誘導される細胞変化のセット全体は、シグナル伝達機構またはシグナル伝達経路と呼ばれる。

20

【0363】

本明細書で使用される場合、用語「シグナル」とは、細胞の構造および機能における変化を制御する内部および外部の因子を指す。これらは、性質が化学的または物理的であり得る。

30

【0364】

本明細書で使用される場合、用語「リガンド」とは、受容体に結合する分子およびタンパク質、例えば、TFG、アクチビン、ノーダル、骨形態形成タンパク質(BMP)などを指す。

【0365】

「阻害剤」とは、本明細書で使用される場合、分子または経路のシグナル伝達機能を妨害する(例えば、低減、減少、抑制、排除または遮断する)化合物または分子(例えば、小分子、ペプチド、ペプチド模倣物、天然化合物、siRNA、アンチセンス核酸、アプタマーまたは抗体)を指す。阻害剤は、一例として、SMADシグナル伝達に直接接触すること、SMAD mRNAに接触すること、SMADのコンフォメーション変化を引き起こすこと、SMADタンパク質レベルを減少させること、またはSMADとシグナル伝達パートナー(例えば、本明細書に記載されるものが含まれる)との相互作用を妨害すること、およびSMAD標的遺伝子(例えば、本明細書に記載されるもの)の発現に影響を与えることを介して、指定されたタンパク質(シグナル伝達分子、指定されたシグナル伝達分子に関連する任意の分子、指定された関連する分子、例えば、グリコゲンシンターゼキナーゼ3(GSK3)) (例えば、本明細書に記載されるシグナル伝達分子が含まれるがこれらに限定されない)の任意の活性を変化させる任意の化合物または分子であり得る。阻害剤には、上流シグナル伝達分子(例えば、細胞外ドメイン内)を妨害するこ

40

50

とによって、S M A Dの生物活性を間接的に調節する分子も含まれ、シグナル伝達分子および効果の例には、骨形態形成タンパク質を隔離し、A L K受容体1、2、3および6の活性化を阻害し、それによって下流S M A D活性化を防止するノギンが含まれる。同様に、コーディン、ケルペロス、フォリスタチンも同様に、S M A Dシグナル伝達の細胞外活性化因子を隔離する。膜貫通タンパク質であるバンビ(Bambi)もまた、細胞外T G F bシグナル伝達分子を隔離する偽受容体として作用する。アクチビン、ノーダル、T G F bおよびB M Pを遮断する抗体は、S M A Dシグナル伝達の細胞外活性化因子を中和するためなどの使用について企図される。阻害剤は、指定された分子の阻害を次に引き起こす、指定されたシグナル伝達分子から上流の分子に結合しそれに影響を与えることによって誘導される阻害に加えて、競合的阻害(別の公知の結合化合物の結合を除外または低減させる様式で活性部位に結合する)およびアロステリック阻害(そのタンパク質の活性部位への化合物の結合を妨害する様式でタンパク質コンフォメーションを変化させる様式でタンパク質に結合する)の観点から記載される。阻害剤は、シグナル伝達標的を実際に接触させることによってシグナル伝達標的またはシグナル伝達標的経路を阻害する「直接的阻害剤」であり得る。

10

20

30

40

50

【0366】

本明細書で使用される場合、用語「シュワン細胞前駆体」とは、本明細書に開示されるシュワン細胞前駆体マーカーが含まれるがこれらに限定されない1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞を指す。適切な成熟化条件下で、シュワン細胞前駆体はシュワン細胞になり得る。

【0367】

本明細書で使用される場合、用語「シュワン細胞」とは、本明細書に開示されるシュワン細胞マーカーが含まれるがこれらに限定されない1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞を指す。シュワン細胞は、ミエリン形成性シュワン細胞または非ミエリン形成性シュワン細胞であり得る。ある特定の実施形態では、シュワン細胞は、末梢神経系においてニューロンの軸索を維持および再生することが可能である(例えば、健康な軸索の維持)。ある特定の実施形態では、シュワン細胞は、ミエリン鞘を形成することが可能である。ある特定の実施形態では、シュワン細胞は、R e m a kバンドル(Remak bundle)を形成することが可能である。

【0368】

「活性化因子」とは、本明細書で使用される場合、分子または経路のシグナル伝達機能、例えば、W n tシグナル伝達またはF G Fシグナル伝達を増加させる、誘導する、刺激する、活性化する、促進する、またはその活性化を増強する化合物を指す。

【0369】

本明細書で使用される場合、用語「誘導體」とは、類似のコア構造を有する化学化合物を指す。

【0370】

本明細書で使用される場合、用語「細胞の集団」または「細胞集団」とは、少なくとも2つの細胞の群を指す。非限定的な例では、細胞集団は、少なくとも約10、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000個の細胞を含み得る。集団は、1つの細胞型を含む純粋な集団、例えば、S C前駆体の集団、S Cの集団、または未分化幹細胞の集団であり得る。あるいは、集団は、1つよりも多い細胞型、例えば、混合細胞集団、例えば、S C前駆体およびS Cの混合集団を含み得る。

【0371】

本明細書で使用される場合、用語「幹細胞」とは、培養物中で不確定の期間にわたって分裂し、特殊化された細胞を生じる能力を有する細胞を指す。ヒト幹細胞とは、ヒト由来の幹細胞を指す。

【0372】

本明細書で使用される場合、用語「胚性幹細胞」とは、着床前段階の胚から誘導され、培養物中で長期間にわたって分化せずに分裂することが可能であり、3つの主な胚葉の細胞および組織へと発生することが公知の、原始的（未分化）細胞を指す。ヒト胚性幹細胞とは、ヒト由来の胚性幹細胞を指す。本明細書で使用される場合、用語「ヒト胚性幹細胞」または「hESC」とは、胚盤胞段階までおよび胚盤胞段階を含む初期段階のヒト胚から誘導され、培養物中で長期間にわたって分化せずに分裂することが可能であり、3つの主な胚葉の細胞および組織へと発生することが公知の、多能性幹細胞（「PSC」）の1つの型を指す。

【0373】

本明細書で使用される場合、用語「胚性幹細胞系」とは、最大で数日間、数ヶ月～数年間にわたって分化せずに増殖することを可能にする *in vitro* 条件下で培養された胚性幹細胞の集団を指す。

10

【0374】

本明細書で使用される場合、用語「全能性」とは、身体全ての細胞型＋胎盤などの胚外組織を構成する全ての細胞型を生じる能力を指す。

【0375】

本明細書で使用される場合、用語「多分化能性」とは、身体1つよりも多い細胞型へと発生する能力を指す。

【0376】

本明細書で使用される場合、用語「多能性」とは、内胚葉、中胚葉および外胚葉を含む生物の3つの発生的胚葉へと発生する能力を指す。

20

【0377】

本明細書で使用される場合、用語「誘導多能性幹細胞」または「iPSC」とは、体細胞、例えば、C14、C72などの中へのある特定の胚性遺伝子（例えば、OCT4、SOX2およびKLF4導入遺伝子）（例えば、参照によって本明細書に組み込まれるTakahashiおよびYamanaka Cell 126巻、663～676頁（2006年）を参照のこと）の導入によって形成される、胚性幹細胞と類似の多能性幹細胞の1つの型を指す。

【0378】

本明細書で使用される場合、用語「体細胞」とは、配偶子（卵または精子）以外の身体中の任意の細胞を指し、「成体」細胞と呼ばれる場合がある。

30

【0379】

本明細書で使用される場合、用語「体性（成体）幹細胞」とは、自己再生（実験室中で）および分化の両方について限定的な能力を有する、多くの臓器および分化した組織において見出される比較的稀な未分化細胞を指す。かかる細胞は、その分化能が異なっているが、起源の臓器中の細胞型に通常は限定される。

【0380】

本明細書で使用される場合、用語「ニューロン」とは、神経系の主要な機能的単位である神経細胞を指す。ニューロンは、細胞体およびその突起、即ち軸索、および1つまたは複数の樹状突起からなる。ニューロンは、シナプスにおいて神経伝達物質を放出することによって、他のニューロンまたは細胞に情報を伝達する。

40

【0381】

本明細書で使用される場合、用語「増殖」とは、細胞数の増加を指す。

【0382】

本明細書で使用される場合、用語「未分化」とは、特殊化された細胞型へと未だ発生していない細胞を指す。

【0383】

本明細書で使用される場合、用語「分化」とは、特殊化されていない胚性細胞が、心臓、肝臓または筋肉細胞などの特殊化された細胞の特色を獲得するプロセスを指す。分化は、細胞表面中に包埋されたタンパク質が関与するシグナル伝達経路を通常は介した、細胞の遺伝子と細胞の外側の物理的および化学的条件との相互作用によって制御される。

50

【0384】

本明細書で使用される場合、用語「方向付けられた分化」とは、特定の（例えば、所望の）細胞型、例えばSC前駆体への分化を誘導するための幹細胞培養条件の操作を指す。

【0385】

本明細書で使用される場合、幹細胞に関して、用語「方向付けられた分化」とは、多能性状態から、より成熟したまたは特殊化された細胞運命（例えば、SC前駆体、SCなど）への幹細胞の移行を促進するための、小分子、増殖因子タンパク質および他の成長条件の使用を指す。

【0386】

本明細書で使用される場合、細胞に関して、用語「分化を誘導する」とは、デフォルト細胞型（遺伝子型および/または表現型）を非デフォルト細胞型（遺伝子型および/または表現型）へと変化させることを指す。従って、「幹細胞において分化を誘導する」とは、幹細胞とは異なる特徴、例えば、遺伝子型（例えば、マイクロアレイなどの遺伝子分析によって決定される、遺伝子発現における変化）および/または表現型（例えば、SC前駆体マーカー（単数または複数）およびSCマーカー（単数または複数）などのタンパク質の発現における変化）を有する子孫細胞へと分裂するように幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）を誘導することを指す。

10

【0387】

本明細書で使用される場合、用語「細胞培養」とは、研究または医学的処置のための人工培地中での *in vitro* での細胞の成長を指す。

20

【0388】

本明細書で使用される場合、用語「培養培地」とは、培養容器、例えば、ペトリプレート、マルチウェルプレートなどの中の細胞を覆う液体を指し、細胞に栄養を与え細胞を支持する栄養素を含む。培養培地は、細胞において所望の変化を生じさせるために添加される増殖因子もまた含み得る。

【0389】

本明細書で使用される場合、細胞を化合物（例えば、1種または複数の阻害剤、活性化因子および/または誘導剤）と「接触させる」という用語は、それが細胞に触れるのを可能にする位置に化合物を配置することを指す。接触させることは、任意の適切な方法を使用して達成され得る。例えば、接触させることは、細胞の管に化合物を添加することによって達成され得る。接触させることは、細胞を含む培養培地に化合物を添加することによっても達成され得る。化合物（例えば、本明細書に開示される阻害剤、活性化因子および誘導剤）の各々は、細胞を含む培養培地に、溶液（例えば、濃縮溶液）として添加され得る。あるいはまたはさらに、化合物（例えば、本明細書に開示される阻害剤、活性化因子および誘導剤）ならびに細胞は、製剤化された細胞培養培地中に存在し得る。

30

【0390】

本明細書で使用される場合、用語「*in vitro*」とは、人工的環境、および人工的環境内で生じるプロセスまたは反応を指す。*in vitro* 環境には、試験管および細胞培養物が例示されるがこれらに限定されない。

【0391】

本明細書で使用される場合、用語「*in vivo*」とは、天然の環境（例えば、動物または細胞）、および天然の環境内で生じるプロセスまたは反応、例えば、胚発生、細胞分化、神経管形成などを指す。

40

【0392】

本明細書で使用される場合、遺伝子またはタンパク質に関して、用語「発現する」とは、アッセイ、例えば、マイクロアレイアッセイ、抗体染色アッセイなどを使用して観察され得る、mRNAまたはタンパク質を作製することを指す。

【0393】

本明細書で使用される場合、用語「マーカー」または「細胞マーカー」とは、特定の細胞または細胞型を同定する遺伝子またはタンパク質を指す。細胞についてのマーカーは、

50

1つのマーカーに限定されなくてもよく、マーカーとは、指定された群のマーカーがある細胞または細胞型を別の細胞または細胞型から同定できるような、マーカーの「パターン」を指し得る。

【0394】

本明細書で使用される場合、用語「～から誘導される」または「～から樹立される」または「～から分化させた」は、本明細書に開示される任意の細胞に関して用いられる場合、任意の操作、例えば、限定なしに、単細胞単離、*in vitro*での培養、例えば、タンパク質、化学物質、照射、ウイルスによる感染、DNA配列による、例えば、モルフォゲンなどによるトランスフェクション、培養された親細胞中に含まれる任意の細胞の選択（例えば、連続培養による）を使用する処理および/または変異誘発を使用して、細胞系、組織（例えば、解離された胚）または体液中の親細胞から得られた（例えば、単離された、精製されたなどの）細胞を指す。誘導された細胞は、増殖因子、サイトカイン、サイトカイン処理の選択された経過に対する応答、接着性、接着性の欠如、選別手順などによって、混合集団から選択され得る。

10

【0395】

本明細書の「個体」または「対象」は、脊椎動物、例えば、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、哺乳動物である。哺乳動物には、ヒト、霊長類、家畜、スポーツ動物（sport animal）、げっ歯類およびペットが含まれるがこれらに限定されない。非ヒト動物対象の非限定的な例には、げっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモット；ウサギ；イヌ；ネコ；ヒツジ；ブタ；ヤギ；ウシ；ウマ；ならびに非ヒト霊長類、例えば、類人猿およびサルが含まれる。

20

【0396】

本明細書で使用される場合、用語「疾患」とは、細胞、組織または臓器の正常な機能を損傷または妨害する任意の状態または障害を指す。

【0397】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」または「処置」とは、処置されている個体または細胞の疾患過程を変更することを試みた臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程の間に実施され得る。処置の治療効果には、限定なしに、疾患の出現または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減殺、転移の予防、疾患進行の速度の減少、疾患状態の軽快または緩和、および寛解または改善された予後が含まれる。疾患または障害の進行を予防することによって、処置は、罹患したもしくは診断された対象、または障害を有すると疑われる対象における障害に起因する悪化を予防できるが、処置は、障害のリスクがある対象または障害を有すると疑われる対象における障害または障害の症状の開始もまた予防し得る。

30

【0398】

2. 幹細胞を分化させる方法

本明細書に開示される主題は、シュワン細胞は、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）の分化を誘導するための *in vitro*での方法を提供する。ある特定の実施形態では、幹細胞はヒト幹細胞である。ヒト幹細胞の非限定的な例には、ヒト胚性幹細胞（hESC）、ヒト多能性幹細胞（hPSC）、ヒト誘導多能性幹細胞（hiPSC）、ヒト単為生殖幹細胞、始原胚細胞様多能性幹細胞、エピプラスト幹細胞、Fクラス多能性幹細胞、体性幹細胞、がん幹細胞、または系列特異的分化が可能な任意の他の細胞が含まれる。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞はヒト多能性幹細胞である。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞はヒト胚性幹細胞（hESC）である。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞はヒト誘導多能性幹細胞（hiPSC）である。ある特定の実施形態では、幹細胞は、哺乳動物幹細胞、霊長類幹細胞、またはげっ歯類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジなど由来の幹細胞が含まれるがこれらに限定されない非ヒト幹細胞である。

40

【0399】

本発明者らは、以前に、1つの型の神経系列への幹細胞（例えば、hPSC）の分化を

50

誘導するための二重 S M A D 阻害の使用を開示した（その全体が参照によって組み込まれる Chambers（2009 年）。さらに、幹細胞は、S M A D シグナル伝達の連続的阻害とその後の W n t シグナル伝達の活性化によって、神経堤系列細胞（例えば、侵害受容器）へと分化させ得る（全て、その全体が参照によって組み込まれる、Chambers（2012 年）；Mica（2013 年）；W O 2011 / 149762；Fattahi（2016 年）；および 2015 年 12 月 23 日出願の米国特許仮出願番号 62 / 387, 468 号）。

【0400】

本明細書に開示される主題は、幹細胞から誘導したシュワン細胞に関する。ある特定の実施形態では、S C への幹細胞の分化は、3 つの相を含む：1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞（神経堤系列細胞）への幹細胞の *in vitro* 分化、S C 前駆体への神経堤系列細胞の *in vitro* 分化、および S C への S C 前駆体の *in vitro* 分化または成熟化。Chambers（2012 年）；Mica（2013 年）；W O 2011 / 149762；2015 年 12 月 23 日出願の米国特許仮出願番号 62 / 387, 468 号；および Fattahi（2016 年）に開示されるものが含まれるがこれらに限定されない、神経堤系列細胞への幹細胞の *in vitro* 分化のための任意の適切な方法が、本明細書に開示される方法の第 1 の相において使用され得る。ある特定の実施形態では、幹細胞の集団を神経堤系列細胞の集団へと *in vitro* で分化させ、神経堤系列細胞の集団を S C 前駆体の集団へと *in vitro* で分化させ、S C 前駆体の集団を S C の集団へと *in vitro* でさらに誘導する。

10

20

【0401】

神経堤系列マーカーの非限定的な例には、S O X 10、p 75、H N K 1、C D 49 D、E R B B 3、T F A P 2、S N A I L および S L U G が含まれる。

【0402】

ある特定の実施形態では、神経堤系列細胞は、S M A D シグナル伝達の阻害および W n t シグナル伝達の活性化によって、幹細胞から *in vitro* で分化させる。ある特定の実施形態では、この方法は、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）の集団を、トランスフォーミング増殖因子ベータ（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 1 種または複数の W n t 活性化因子と接触させるステップを含む。

【0403】

ある特定の実施形態では、S C 前駆体は、S C 分化を誘導することによって、神経堤系列細胞から *in vitro* で分化させる。ある特定の実施形態では、この方法は、神経堤系列細胞（例えば、S M A D シグナル伝達の阻害および W n t シグナル伝達の活性化によって幹細胞から誘導された神経堤系列細胞）の集団を、1 種または複数の W n t 活性化因子および 1 種または複数の F G F 活性化因子と接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、神経堤系列細胞（例えば、S M A D シグナル伝達の阻害および W n t シグナル伝達の活性化によって幹細胞から誘導された神経堤系列細胞）の集団を、1 種または複数の S C 分化誘導剤と接触させるステップを含む。

30

【0404】

ある特定の実施形態では、S C は、S C 分化を増強することによって、S C 前駆体から *in vitro* で分化させる。ある特定の実施形態では、この方法は、S C 前駆体（例えば、S C 分化を誘導することによって神経堤系列細胞から誘導された S C 前駆体細胞）の集団を、1 種または複数の F G F 活性化因子、1 種または複数の S C 分化誘導剤と接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、S C 前駆体（例えば、S C 分化を誘導することによって神経堤系列細胞から誘導された S C 前駆体細胞）の集団を、1 種または複数の S C 分化増強剤と接触させるステップを含む。

40

【0405】

1.1. 神経堤系列細胞への幹細胞の *in vitro* 分化

ある特定の実施形態では、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の分化を *in vitro* で誘導する方法は、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）の集団を、トランスフォーミング増殖因子ベータ（T G F）/ アクチビン - ノーダルシグナル

50

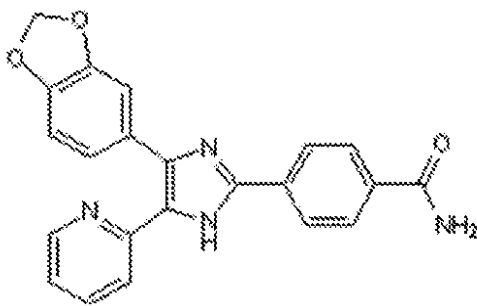
伝達の 1 種または複数の阻害剤と接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤は、TGF、骨形成タンパク質 (BMP)、ノーダルおよびアクチビンを含むリガンドを中和し、または受容体および下流のエフェクターを遮断することを介して、そのシグナル経路を遮断する。TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤の非限定的な例は、その全体が参照によって組み込まれる、WO 2011 / 149762、Chambers (2009 年) および Chambers (2012 年) に開示されている。ある特定の実施形態では、TGF / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤は、SB431542、その誘導体、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。ある特定の実施形態では、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は SB431542 である。

10

【0406】

「SB431542」とは、CAS 番号 301836-41-9、 $C_{22}H_{18}N_4O_3$ の分子式、および 4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) - 5 - (2 - ピリジニル) - 1H - イミダゾール - 2 - イル] - ベンズアミドの名称を有する分子を指す。例えば、以下の構造：

【化 1】



20

を参照のこと。

【0407】

ある特定の実施形態では、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の分化を *in vitro* で誘導する方法は、幹細胞を、Small Mother's Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤 (「SMAD 阻害剤」) と接触させるステップをさらに含む。SMAD 阻害剤の非限定的な例は、その全体が参照によって組み込まれる、WO 2011 / 149762、Chambers (2009 年) および Chambers (2012 年) に開示されている。ある特定の実施形態では、SMAD シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤は、LDN193189、その誘導体、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。ある特定の実施形態では、1 種または複数の SMAD 阻害剤は LDN193189 である。

30

【0408】

「LDN193189」とは、 $C_{25}H_{22}N_6$ の化学式を有し、以下の式

40

C1CCNCC1c2ccc(cc2)-c3cc4nc5c(c3)nc6ccccc6n5

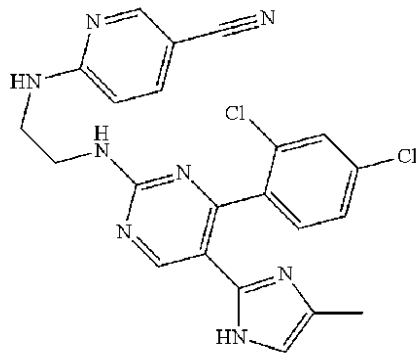
50

れている。ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子は、CHIR99021、WNT3A、Wnt-1、Wnt4、Wnt5a、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。ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子はCHIR99021である。

【0413】

「CHIR99021」（「アミノピリミジン」または「3-[3-(2-カルボキシエチル)-4-メチルピロール-2-メチリデニル]-2-インドリノン」としても公知）とは、以下の式

【化3】



を有する、IUPAC名6-(2-(4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)ピリミジン-2-イルアミノ)エチルアミノ)ニコチノニトリルを指す。

【0414】

CHIR99021は高度に選択的であり、関連するキナーゼおよび関連しないキナーゼのパネルに対してほぼ1000倍の選択性を示し、ヒトGSK3に対してIC50 = 6.7 nM、げっ歯類GSK3ホモログに対してナノモル濃度のIC50値である。

【0415】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の*in vitro*分化のために、幹細胞は、TGF α /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、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、少なくとも約20日間、少なくとも約21日間、少なくとも約22日間、少なくとも約23日間、少なくとも約24日間、少なくとも約25日間、少なくとも約26日間、少なくとも約27日間、少なくとも約28日間、少なくとも約29日間、または少なくとも約30日間にわたって接触され得る。ある特定の実施形態では、幹細胞は、TGF α /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、最大で約3日間、最大で約4日間、最大で約5日間、最大で約6日間、最大で約7日間、最大で約8日間、最大で約9日間、最大で約10日間、最大で約11日間、最大で約12日間、最大で約13日間、最大で約14日間、最大で約15日間、最大で約16日間、最大で約17日間、最大で約18日間、最大で約19日間、最大で約20日間、最大で約21日間、最大で約22日間、最大で約23日間、最大で約24日間、最大で約25日間、最大で約26日間、最大で約27日間、最大で約28日間、最大で約29日間、または最大で約30日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、TGF α /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、約4日間と約30日間との間、約4日間～約27日間の間、約4日間と約26日間との間、約4日間と約25日間との間、約4日間と約24日間との間、約4日間と約20日間との間、約4日間と約15日間との間、約4日間と約10日間との間、約5日間と約

1 5 日間との間、約 5 日間と約 1 0 日間との間、約 1 0 日間と約 1 5 日間との間、約 1 5 日間と約 2 0 日間との間、約 1 0 日間と約 2 0 日間との間、約 2 0 日間と約 2 5 日間との間、または約 2 5 日間と約 3 0 日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、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、1 0 日間と約 1 5 日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、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、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 8 日間、約 9 日間、約 1 0 日間、約 1 1 日間、約 1 2 日間、約 1 3 日間、約 1 4 日間、約 1 5 日間、約 1 6 日間、約 1 7 日間、約 1 8 日間、約 1 9 日間、約 2 0 日間、約 2 1 日間、約 2 2 日間、約 2 3 日間、約 2 4 日間、約 2 5 日間、約 2 6 日間、約 2 7 日間、約 2 8 日間、約 2 9 日間、または約 3 0 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、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、約 1 0 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、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、約 1 1 日間にわたって接触される。

10

20

30

40

50

【0416】

1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の *in vitro* 分化のために、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、少なくとも約 3 日間、少なくとも約 4 日間、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 6 日間、少なくとも約 7 日間、少なくとも約 8 日間、少なくとも約 9 日間、少なくとも約 1 0 日間、少なくとも約 1 1 日間、少なくとも約 1 2 日間、少なくとも約 1 3 日間、少なくとも約 1 4 日間、少なくとも約 1 5 日間、少なくとも約 1 6 日間、少なくとも約 1 7 日間、少なくとも約 1 8 日間、少なくとも約 1 9 日間、少なくとも約 2 0 日間、少なくとも約 2 1 日間、少なくとも約 2 2 日間、少なくとも約 2 3 日間、少なくとも約 2 4 日間、少なくとも約 2 5 日間、少なくとも約 2 6 日間、少なくとも約 2 7 日間、少なくとも約 2 8 日間、少なくとも約 2 9 日間、または少なくとも約 3 0 日間にわたって接触され得る。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、最大で約 3 日間、最大で約 4 日間、最大で約 5 日間、最大で約 6 日間、最大で約 7 日間、最大で約 8 日間、最大で約 9 日間、最大で約 1 0 日間、最大で約 1 1 日間、最大で約 1 2 日間、最大で約 1 3 日間、最大で約 1 4 日間、最大で約 1 5 日間、最大で約 1 6 日間、最大で約 1 7 日間、最大で約 1 8 日間、最大で約 1 9 日間、最大で約 2 0 日間、最大で約 2 1 日間、最大で約 2 2 日間、最大で約 2 3 日間、最大で約 2 4 日間、最大で約 2 5 日間、最大で約 2 6 日間、最大で約 2 7 日間、最大で約 2 8 日間、最大で約 2 9 日間、または最大で約 3 0 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、約 4 日間と約 3 0 日間との間、約 4 日間～約 2 7 日間の間、約 4 日間と約 2 6 日間との間、約 4 日間と約 2 5 日間との間、約 4 日間と約 2 4 日間との間、約 4 日間と約 2 0 日間との間、約 4 日間と約 1 5 日間との間、約 4 日間と約 1 0 日間との間、約 5 日間と約 1 5 日間との間、約 5 日間と約 1 0 日間との間、約 1 0 日間と約 1 5 日間との間、約 1 5 日間と約 2 0 日間との間、約 1 0 日間と約 2 0 日間との間、約 2 0 日間と約 2 5 日間との間、または約 2 5 日間と約 3 0 日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、1 0 日間と約 1 5 日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 8 日間、約 9 日間、約 1 0 日間、約 1 1 日間、約 1 2 日間、約 1 3 日間、約 1 4 日間、約 1 5 日間、約 1 6 日間、約 1 7 日間、約 1 8 日間、約 1 9 日間、約 2 0 日間、約 2 1 日間、約 2 2 日間、約 2 3 日間、約 2 4 日間、約 2 5 日間、約 2 6 日間、約 2 7 日間、約 2 8 日間、約 2 9 日間、または約 3 0 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、約 1 0 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SMA Dシグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、約 1 1 日間にわたって接触される。

【0417】

さらに、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、少なくとも約20日間、少なくとも約21日間、少なくとも約22日間、少なくとも約23日間、少なくとも約24日間、少なくとも約25日間、少なくとも約26日間、少なくとも約27日間、少なくとも約28日間、または少なくとも約29日間、少なくとも約30日間にわたって接触され得る。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、最大で約4日間、最大で約5日間、最大で約6日間、最大で約7日間、最大で約8日間、最大で約9日間、最大で約10日間、最大で約11日間、最大で約12日間、最大で約13日間、最大で約14日間、最大で約15日間、最大で約16日間、最大で約17日間、最大で約18日間、最大で約19日間、最大で約20日間、最大で約21日間、最大で約22日間、最大で約23日間、最大で約24日間、最大で約25日間、最大で約26日間、最大で約27日間、最大で約28日間、最大で約29日間、または最大で約30日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、約4日間と約30日間との間、約4日間～約27日間の間、約4日間と約26日間との間、約4日間と約25日間との間、約4日間と約24日間との間、約4日間と約20日間との間、約4日間と約15日間との間、約4日間と約10日間との間、約5日間と約15日間との間、約5日間と約10日間との間、約10日間と約15日間との間、約15日間と約20日間との間、約10日間と約20日間との間、約20日間と約25日間との間、または約25日間と約30日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、5日間と約15日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間、約16日間、約17日間、約18日間、約19日間、約20日間、約21日間、約22日間、約23日間、約24日間、約25日間、約26日間、約27日間、約28日間、約29日間、または約30日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、約11日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、約10日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、約9日間にわたって接触される。

【0418】

ある特定の実施形態では、幹細胞は、約1 n M～約300 n M、約5 n M～約250 n M、約10 n M～約200 n M、約10 n M～約50 n M、約50 n M～約150 n M、約80 n M～約120 n M、約90 n M～約110 n M、約50 n M～約100 n M、約100 n M～約150 n M、約150 n M～約200 n M、約200 n M～約250 n M、または約250 n M～約300 n Mの濃度の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と接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約80 n M～約120 n Mの濃度の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と接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約100 n Mの濃度の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と接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、上記濃度のいずれか1つの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と、毎日、1日おきに、または2日毎に接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約100 n Mの濃度の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と、毎日接触される。

【0419】

ある特定の実施形態では、幹細胞は、約1 μ M～100 μ M、約1 μ M～20 μ M、約

1 μ M ~ 15 μ M、約 1 μ M ~ 10 μ M、約 1 μ M ~ 5 μ M、約 5 μ M ~ 10 μ M、約 5 μ M ~ 15 μ M、約 15 μ M ~ 20 μ M、約 20 μ M ~ 30 μ M、約 30 μ M ~ 40 μ M、約 40 μ M ~ 50 μ M、約 50 μ M ~ 60 μ M、約 60 μ M ~ 70 μ M、約 70 μ M ~ 80 μ M、約 80 μ M ~ 90 μ M、または約 90 μ M ~ 100 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約 5 μ M ~ 15 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約 10 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、幹細胞は、上記濃度のいずれか 1 つの S M A D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、毎日、1 日おきに、または 2 日毎に接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、約 10 μ M の濃度の S M A D シグナル伝達の 1 種または複数の阻害剤と、毎日接触される。

10

【0420】

ある特定の実施形態では、細胞は、約 1 μ M ~ 100 μ M、約 1 μ M ~ 20 μ M、約 1 μ M ~ 15 μ M、約 1 μ M ~ 10 μ M、約 1 μ M ~ 5 μ M、約 5 μ M ~ 10 μ M、約 5 μ M ~ 15 μ M、約 15 μ M ~ 20 μ M、約 20 μ M ~ 30 μ M、約 30 μ M ~ 40 μ M、約 40 μ M ~ 50 μ M、約 50 μ M ~ 60 μ M、約 60 μ M ~ 70 μ M、約 70 μ M ~ 80 μ M、約 80 μ M ~ 90 μ M、または約 90 μ M ~ 100 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、細胞は、約 1 μ M ~ 5 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、細胞は、約 3 μ M の濃度の 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れる。ある特定の実施形態では、細胞は、上記濃度のいずれか 1 つの W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、毎日、1 日おきに、または 2 日毎に接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、約 3 μ M の濃度の W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、毎日接触される。

20

【0421】

1.2. シュワン細胞前駆体への神経堤系列細胞の *in vitro* 分化

神経堤系列細胞をシュワン細胞前駆体に直接分化させるための、本明細書に開示される分化方法は、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞、例えば、幹細胞の集団を 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任意選択で 1 種または複数の S M A D 阻害剤と接触させるステップ、ならびに細胞を 1 種または複数の W n t 活性化因子とさらに接触させるステップの後に分化した細胞）を、本明細書に記載される 1 種または複数の W n t 活性化因子および F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子（「F G F 活性化因子」）と接触させて、S C 前駆体の集団、例えば 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞、例えば、幹細胞の集団を 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任意選択で 1 種または複数の S M A D 阻害剤と接触させるステップ、ならびに細胞を 1 種または複数の W n t 活性化因子とさらに接触させるステップの後に分化した細胞）を、シュワン細胞の分化を誘導する 1 種または複数の分子（「S C 分化誘導剤」）と接触させて、S C 前駆体の集団、例えば 1 つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞を産生するステップを含む。

30

40

【0422】

S C 分化誘導剤の非限定的な例には、ニューレグリン、L I F、C N T F、フォルスコリン、T G F および F B S が含まれる。ある特定の実施形態では、1 種または複数の S C 分化誘導剤はニューレグリン 1 (N R G 1) である。

【0423】

F G F シグナル伝達の活性化因子の非限定的な例には、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 7、F G F 8、F G F 10、F G F 18、誘導体、およびそれらの混合物が含まれる。ある特定の実施形態では、1 種または複数の F G F 活性化因子は F G F 2 である。

50

【 0 4 2 4 】

ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と同時に接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のSC分化誘導剤と同時に接触される。例えば、1種または複数のWnt活性化因子および1種または複数のFGF活性化因子、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤は全て、細胞（例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）を含む細胞培養培地中に存在する。ある特定の実施形態では、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤は、細胞（例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞、例えば、幹細胞の集団を1種または複数のTGF- α /アクチビン-ノードルシグナル伝達および任意選択で1種または複数のSMAD阻害剤と接触させ、それらの細胞を1種または複数のWnt活性化因子とさらに接触させた後の、分化した細胞）を含む細胞培養培地に、毎日（または1日おきに、もしくは2日毎に）一緒に添加される。

10

【 0 4 2 5 】

1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間にわたって接触され得る。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、少なくとも約10日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、最大で約15日間、最大で約16日間、最大で約17日間、最大で約18日間、最大で約19日間、最大で約20日間、最大で約21日間、最大で約22日間、最大で約23日間、最大で約24日間、最大で約25日間、最大で約26日間、最大で約27日間、最大で約28日間、最大で約29日間、または最大で約30日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、約3日間と約5日間との間、約5日間と約10日間との間、約10日間と約15日間との間、約15日間と約20日間との間、約20日間と約25日間との間、または約25日間と約30日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間、約16日間、約17日間、約18日間、約19日間、約20日間、約21日間、約22日間、約23日間、約24日間、約25日間、約26日間、約27日間、約28日間、約29日間、また

20

30

40

50

は約30日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、約14日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカを発現する細胞は、SC前駆体を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と、約15日間にわたって接触される。

【0426】

ある特定の実施形態では、細胞は、1つまたは複数の神経堤系列マーカを発現する細胞の集団を産生するために、1種または複数のWnt活性化因子と接触され、神経堤系列細胞集団は、1種または複数のWnt活性化因子とさらに接触される。従って、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、合計で少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、少なくとも約20日間、少なくとも約21日間、少なくとも約22日間、少なくとも約23日間、少なくとも約24日間、少なくとも約25日間、少なくとも約26日間、少なくとも約27日間、少なくとも約28日間、または少なくとも約29日間、少なくとも約30日間、少なくとも約31日間、少なくとも約32日間、少なくとも約33日間、少なくとも約34日間、少なくとも約35日間、少なくとも約36日間、少なくとも約37日間、少なくとも約38日間、少なくとも約39日間、または少なくとも約40日間にわたって接触され得る。ある特定の実施形態では、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、合計で最大で約15日間、最大で約16日間、最大で約17日間、最大で約18日間、最大で約19日間、最大で約20日間、最大で約21日間、最大で約22日間、最大で約23日間、最大で約24日間、最大で約25日間、最大で約26日間、最大で約27日間、最大で約28日間、最大で約29日間、最大で約30日間、最大で約31日間、最大で約32日間、最大で約33日間、最大で約34日間、最大で約35日間、最大で約36日間、最大で約37日間、最大で約38日間、最大で約39日間、最大で約40日間、最大で約41日間、最大で約42日間、最大で約43日間、最大で約44日間、最大で約45日間、最大で約46日間、最大で約47日間、最大で約48日間、最大で約49日間、最大で約50日間、最大で約51日間、最大で約52日間、最大で約53日間、最大で約54日間、最大で約55日間、最大で約56日間、最大で約57日間、最大で約58日間、最大で約59日間、または最大で約60日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、約14日間と約20日間との間、約20日間と約25日間との間、約25日間と約30日間との間、約30日間と約35日間との間、約35日間と約40日間との間、約40日間と約45日間との間、約45日間と約50日間との間、約50日間と約55日間との間、または約55日間と約60日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、合計で20日間と約30日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、合計で20日間と約25日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、合計で25日間と約30日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、合計で約14日間、約15日間、約16日間、約17日間、約18日間、約19日間、約20日間、約21日間、約22日間、約23日間、約24日間、約25日間、約26日間、約27日間、約28日間、約29日間、約30日間、約31日間、約32日間、約33日間、約34日間、約35日間、約36日間、約37日間、約38日間、約39日間、約40日間、約41日間、約42日間、約43日間、約44日間、約45日間、約46日間、約47日間、約48日間、約49日間、約50日間、約51日間、約52日間、約53日間、約54日間、約55日間、約56日間、約57日間、約58日間、約59日間または約60日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1種または複数のWnt活性化因子と、合計で約26日間にわたって接触され

10

20

30

40

50

る。ある特定の実施形態では、細胞は、W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、合計で約 2 5 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1 種または複数の W n t 活性化因子と、合計で約 2 4 日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、細胞は、1 種または複数の W n t 活性化因子と、合計で約 2 3 日間にわたって接触される。

【 0 4 2 7 】

ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 n M ~ 1 0 0 n M、約 1 n M ~ 2 0 n M、約 1 n M ~ 1 5 n M、約 1 n M ~ 1 0 n M、約 1 n M ~ 5 n M、約 5 n M ~ 1 0 n M、約 5 n M ~ 1 5 n M、約 1 5 n M ~ 2 0 n M、約 2 0 n M ~ 3 0 n M、約 3 0 n M ~ 4 0 n M、約 4 0 n M ~ 5 0 n M、約 5 0 n M ~ 6 0 n M、約 6 0 n M ~ 7 0 n M、約 7 0 n M ~ 8 0 n M、約 8 0 n M ~ 9 0 n M、または約 9 0 n M ~ 1 0 0 n M の濃度の F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 5 n M ~ 1 5 n M の濃度の F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 0 n M の濃度の F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、上記濃度のいずれか 1 つの F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、毎日、1 日おきに、または 2 日毎に接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 0 n M の濃度の F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、毎日接触される。

【 0 4 2 8 】

ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l、約 1 n g / m l ~ 2 0 n g / m l、約 1 n g / m l ~ 1 5 n g / m l、約 1 n g / m l ~ 1 0 n g / m l、約 1 n g / m l ~ 5 n g / m l、約 5 n g / m l ~ 1 0 n g / m l、約 5 n g / m l ~ 1 5 n g / m l、約 1 5 n g / m l ~ 2 5 n g / m l、約 1 5 n g / m l ~ 2 0 n g / m l、約 2 0 n g / m l ~ 3 0 n g / m l、約 3 0 n g / m l ~ 4 0 n g / m l、約 4 0 n g / m l ~ 5 0 n g / m l、約 5 0 n g / m l ~ 6 0 n g / m l、約 6 0 n g / m l ~ 7 0 n g / m l、約 7 0 n g / m l ~ 8 0 n g / m l、約 8 0 n g / m l ~ 9 0 n g / m l、または約 9 0 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の濃度のシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 5 n g / m l ~ 1 5 n g / m l の濃度のシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 0 n g / m l の濃度のシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、上記濃度のいずれか 1 つのシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と、毎日、1 日おきに、または 2 日毎に接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 0 n g / m l の濃度のシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と、毎日接触される。ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞）は、S C 前駆体を産生するために、約 1 0 n g / m l の濃度のシュワン細胞分化を誘導する 1 種または複数の分子と、毎日接触される。

【 0 4 2 9 】

ある特定の実施形態では、細胞（例えば、1 つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現

する細胞)は、SC前駆体を産生するために、約 $1\mu\text{M} \sim 100\mu\text{M}$ 、約 $1\mu\text{M} \sim 20\mu\text{M}$ 、約 $1\mu\text{M} \sim 15\mu\text{M}$ 、約 $1\mu\text{M} \sim 10\mu\text{M}$ 、約 $1\mu\text{M} \sim 5\mu\text{M}$ 、約 $5\mu\text{M} \sim 10\mu\text{M}$ 、約 $5\mu\text{M} \sim 15\mu\text{M}$ 、約 $15\mu\text{M} \sim 20\mu\text{M}$ 、約 $20\mu\text{M} \sim 30\mu\text{M}$ 、約 $30\mu\text{M} \sim 40\mu\text{M}$ 、約 $40\mu\text{M} \sim 50\mu\text{M}$ 、約 $50\mu\text{M} \sim 60\mu\text{M}$ 、約 $60\mu\text{M} \sim 70\mu\text{M}$ 、約 $70\mu\text{M} \sim 80\mu\text{M}$ 、約 $80\mu\text{M} \sim 90\mu\text{M}$ 、または約 $90\mu\text{M} \sim 100\mu\text{M}$ の濃度の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れる。ある特定の実施形態では、細胞(例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞)は、SC前駆体を産生するために、約 $1\mu\text{M} \sim 5\mu\text{M}$ の濃度の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れる。ある特定の実施形態では、細胞(例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞)は、SC前駆体を産生するために、約 $3\mu\text{M}$ の濃度の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れる。ある特定の実施形態では、細胞(例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞)は、上記濃度のいずれか1つのWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、毎日、1日おきに、または2日毎に接触される。ある特定の実施形態では、細胞(例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞)は、約 $3\mu\text{M}$ の濃度のWntシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、毎日接触される。

10

20

30

40

50

【0430】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞を少なくとも約50%含む細胞集団は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞へと分化させ、細胞のこの集団は、1種のWnt活性化因子(例えば、CHIR99021、例えば、 $3\mu\text{M}$ CHIR99021)、1種のFGF活性化因子(例えば、FGF2、例えば、 10nM FGF2)および1種のSC分化誘導剤(例えば、NRG1、例えば、 10ng/ml NRG1)と、約15日間(例えば、約14日間または約15日間)にわたって接触される。

【0431】

ある特定の実施形態では、幹細胞は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞へと分化させ、この細胞は、TGF β /アクチビン-ノードルシグナル伝達の1種の阻害剤(例えば、SB431542、例えば、 $10\mu\text{M}$ SB431542)および任意選択で1種のSMAD阻害剤(例えば、LDN193189、例えば、 100nM LDN193189)と約10日間(例えば、約10日間または約11日間)にわたって；1種のWnt活性化因子(例えば、CHIR99021、例えば、 $3\mu\text{M}$ CHIR99021)と約23日間(例えば、約23日間または約24日間)にわたって；ならびに1種のFGF活性化因子(例えば、FGF2、例えば、 10nM FGF2)および1種のSC分化誘導剤(例えば、NRG1、例えば、 10ng/ml NRG1)と約15日間(例えば、約14または15日間)にわたって接触される。

【0432】

ある特定の実施形態では、細胞は、ソニックヘッジホッグ(SHH)シグナル伝達の活性化因子には曝露されない。SHHシグナル伝達の活性化因子の非限定的な例には、ソニックヘッジホッグ(SHH)、C25II、スーズンド(SMO)受容体小分子アゴニスト(例えば、プルモルファミン(purmorphamine))、それらの誘導体、およびそれらの混合物が含まれる。ある特定の実施形態では、細胞は、SHHには曝露されない。

【0433】

1.3. シュワン細胞へのシュワン細胞前駆体のin vitro誘導

シュワン細胞前駆体は、シュワン細胞へとin vitroでさらに誘導され得る。分化したSC前駆体は、SC前駆体のシュワン細胞の集団への成熟化を支持する条件に供され得る。シュワン細胞は、ミエリン形成性シュワン細胞または非ミエリン形成性シュワン細胞であり得る。

【0434】

ある特定の実施形態では、シュワン細胞前駆体(SC前駆体)は、SCの集団を産生するために、本明細書に記載される1種または複数のFGF活性化因子、本明細書に記載さ

れる1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤と接触される。ある特定の実施形態では、シュワン細胞前駆体（SC前駆体）は、シュワン細胞分化を増強する1種または複数の分子（「SC分化増強剤」と呼ばれる）と接触される。SC分化増強剤の非限定的な例には、ニューレグリン、環状アデノシンリン酸（cAMP）、フォルスコリン、LIFおよびCNTFが含まれる。ある特定の実施形態では、1種または複数のSC分化増強剤は選択されたcAMPである。ある特定の実施形態では、シュワン細胞前駆体（SC前駆体）は、SCの集団を産生するために、1種のFGF活性化因子および2種のシュワン細胞分化誘導剤と接触される。ある特定の実施形態では、2種のシュワン細胞分化誘導剤は、cAMPおよびNRG1である。

【0435】

10

ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、細胞培養培地中の1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と接触される。ある特定の実施形態では、細胞培養培地は、L-グルタミン（例えば、Gibco製、25030-164）、N2（例えば、Stem Cell Technologies製、07156）およびB27（例えば、Life Technologies製、17504044）を補充したNB培地である。

【0436】

ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約1 ng/ml ~ 100 ng/ml、約1 ng/ml ~ 20 ng/ml、約1 ng/ml ~ 15 ng/ml、約1 ng/ml ~ 10 ng/ml、約1 ng/ml ~ 5 ng/ml、約5 ng/ml ~ 10 ng/ml、約5 ng/ml ~ 15 ng/ml、約15 ng/ml ~ 25 ng/ml、約15 ng/ml ~ 20 ng/ml、約20 ng/ml ~ 30 ng/ml、約30 ng/ml ~ 40 ng/ml、約40 ng/ml ~ 50 ng/ml、約50 ng/ml ~ 60 ng/ml、約60 ng/ml ~ 70 ng/ml、約70 ng/ml ~ 80 ng/ml、約80 ng/ml ~ 90 ng/ml、または約90 ng/ml ~ 100 ng/mlの濃度のシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約15 ng/ml ~ 25 ng/mlの濃度のシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約20 ng/mlの濃度のシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子と接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、上記濃度のいずれか1つのシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子と、毎日、1日おきに、または2日毎に接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約10 ng/mlの濃度のシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子と、毎日接触される。

20

30

【0437】

ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、または少なくとも約15日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約3日間と約40日間との間、約3日間と約35日間との間、約3日間と約30日間との間、約3日間と約25日間との間、約3日間と約20日間との間、約3日間と約15日間との間、約10日間と約40日間との間、約10日間と約20日間との間、約20日間と約40日間との間、約20日間と約30日間との間、または約30日間と約40日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子およ

40

50

び1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約3日間と約15日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約30日間と約40日間との間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約10日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約11日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤と、約35日間にわたって接触される。

10

20

30

40

50

【0438】

ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約1nM~100nM、約1nM~20nM、約1nM~15nM、約1nM~10nM、約1nM~5nM、約5nM~10nM、約5nM~15nM、約15nM~20nM、約20nM~30nM、約30nM~40nM、約40nM~50nM、約50nM~60nM、約60nM~70nM、約70nM~80nM、約80nM~90nM、または約90nM~100nMの濃度のFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SC前駆体を産生するために、約5nM~15nMの濃度のFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、SCを産生するために、約10nMの濃度のFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、上記濃度のいずれか1つのFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、毎日、1日おきに、または2日毎に接触される。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、SCを産生するために、約10nMの濃度のFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と、毎日接触される。

【0439】

ある特定の実施形態では、SC前駆体からSCへの成熟化を支持する条件は、分化したSC前駆体細胞を3Dスフェロイドへと凝集させること、ならびに前記3Dスフェロイドを、1種または複数のFGF活性化因子および1種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、ならびに任意選択で1種または複数のSC分化増強剤とさらに接触させることを含む。ある特定の実施形態では、培養培地は、懸濁培養培地である。

【0440】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞を少なくとも約50%含む細胞集団は、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する細胞へと分化させ、細胞のこの集団は、1種のFGF活性化因子(例えば、FGF2、例えば、10nM FGF2)、2種のSC分化誘導剤(例えば、NRG1(例えば、10ng/ml NRG1)およびcAMP(例えば、100mM cAMP))と、少なくとも約10日間にわたって接触される。

【0441】

ある特定の実施形態では、細胞は、ソニックヘッジホッグ(SHH)シグナル伝達の活性化因子には曝露されない。SHHシグナル伝達の活性化因子の非限定的な例には、ソニックヘッジホッグ(SHH)、C25II、スムーズンド(SMO)受容体小分子アゴニスト(例えば、プルモルファミン)、それらの誘導体、およびそれらの混合物が含まれる。ある特定の実施形態では、細胞は、SHHには曝露されない。

【0442】

1.4.細胞培養培地

ある特定の実施形態では、上記阻害剤、活性化因子、誘導剤および増強剤は、細胞、例えば、幹細胞、1つもしくは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞、1つもしくは複数のSC前駆体マーカーを発現する細胞、1つもしくは複数のSCマーカーを発現する細胞、またはそれらの組合せを含む細胞培養培地に添加される。適切な細胞培養培地には、Knockout(登録商標)Serum Replacement(「KSR」)培地、N2培地、Essential 8(登録商標)/Essential 6(登録商標)(「E8/E6」)培地およびNeurobasal(NB)培地(例えば、N2およびB-27(登録商標)Supplementを補充したNB培地)が含まれるがこれらに限定されない。KSR培地、N2培地、E8/E6培地およびNB培地は、市販されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の*in vitro*分化のための培地は、KSR培地、N2培地、およびそれらの組合せからなる群から選択される培地である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の*in vitro*分化のための培地は、E8/E6培地である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のSC前駆体マーカーを発現する細胞への、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞の*in vitro*誘導のための培地は、NB培地である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のSCマーカーを発現する細胞への、1つまたは複数のSC前駆体マーカーを発現する細胞の*in vitro*誘導のための培地は、NB培地である。

10

【0443】

KSR培地は、培養物中で未分化hESC細胞を成長させ維持するために最適化された、規定された無血清製剤である。KSR培地の構成成分は、WO2011/149762に開示されている。ある特定の実施形態では、KSR培地は、Knockout DMEM、Knockout Serum Replacement、L-グルタミン、Pen/Strep、MEMおよびβ-メルカプトエタノール(13-mercaptoethanol)を含む。ある特定の実施形態では、1リットルのKSR培地は、820mLのKnockout DMEM、150mLのKnockout Serum Replacement、10mLの200mM L-グルタミン、10mLのPen/Strep、10mLの10mM MEM、および55μMのβ-メルカプトエタノール(13-mercaptoethanol)を含み得る。

20

【0444】

E8/E6培地は、ヒト多能性幹細胞の成長および拡大増殖を支持するフィーダーフリーかつゼノフリーの培地である。E8/E6培地は、体細胞初期化を支持することが証明されている。さらに、E8/E6培地は、PSCの培養のためのカスタム培地の製剤化のための基礎として使用され得る。一例のE8/E6培地は、その全体が参照によって組み込まれるChenら、Nat Methods. 2011年5月; 8巻(5号): 424~9頁に記載されている。一例のE8/E6培地は、その全体が参照によって組み込まれるWO15/077648に開示されている。ある特定の実施形態では、E8/E6細胞培養培地は、DMEM/F12、アスコルビン酸、セレン、インスリン、NaHCO₃、トランスフェリン、FGF2およびTGFβを含む。E8/E6培地は、E8/E6培地が活性なBMPもWnt成分も含まないという点で、KSR培地とは異なる。従って、ある特定の実施形態では、幹細胞を培養するためにE8/E6培地が使用される場合、1種または複数のSMAD阻害剤(例えば、BMPを阻害するもの)がE8/E6培地に添加される必要はない。

30

40

【0445】

N2 supplementは、培養物中での未分化神経幹および前駆細胞の拡大増殖のために使用される、化学的に規定された動物フリーのサプリメントである。N2 Supplementは、DMEM/F12培地との使用のために意図される。N2培地の構成成分は、WO2011/149762に開示されている。ある特定の実施形態では、N2培地は、グルコース、炭酸水素ナトリウム、ブトレシン、プロゲステロン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリンおよびインスリンを補充したDMEM/F12培地を含む

50

。ある特定の実施形態では、1リットルのN2培地は、DMEM/F12粉末、1.55gのグルコース、2.00gの炭酸水素ナトリウム、ブトレシン(100mLの蒸留水中に溶解された1.61gの100uLアリコート)、プロゲステロン(100mLの100%エタノール中に溶解された0.032gの20uLアリコート)、亜セレン酸ナトリウム(蒸留水中0.5mM溶液の60uLアリコート)、100mgのトランスフェリン、および10mLの5mM NaOH中25mgのインスリンと共に、985mLの蒸留H₂Oを含む。

【0446】

ある特定の実施形態では、幹細胞は、幹細胞と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最初の接触の約1、約2、約3、約4、または約5、約6、約7、または約8日後から、幹細胞とSC分化誘導剤およびFGF活性化因子との接触まで、漸増量のN2培地で漸進的に置き換えられるKSR培地中で最初に培養される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、幹細胞と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最初の接触後4日目~10日目に、漸増量のN2培地で漸進的に置き換えられるKSR培地中で最初に培養される。

10

【0447】

本明細書に開示される幹細胞の集団を培養するために使用される細胞培養培地は、細胞と接触される阻害剤(単数または複数)、活性化因子(単数または複数)、誘導剤(単数または複数)および増強剤(単数または複数)を決定するだけでなく(例えば、KSR培地については、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1種または複数のSMAD阻害剤が必要とされる; E8/E6培地については、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のみが必要とされる)、阻害剤(単数または複数)、活性化因子(単数または複数)、誘導剤(単数または複数)および増強剤(単数または複数)を細胞培養培地に添加する順序も決定する。

20

【0448】

ある特定の実施形態では、細胞と1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約4日以内(例えば、同時に(同日に)、または約1日後と約4日後との間、例えば、約1日後、約2日後、約3日後もしくは約4日後)である。

30

【0449】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の*in vitro*分化のための細胞培養培地は、KSR培地であり、細胞と1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約2日後である。ある特定の実施形態では、幹細胞と1種または複数のSMAD阻害剤との最初の接触は、例えば、SMAD阻害剤(単数または複数)およびTGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤(単数または複数)を、幹細胞を含む細胞培養培地に同日に最初に添加することによって、幹細胞と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最初の接触と同日である。

40

【0450】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞への幹細胞の*in vitro*分化のための細胞培養培地は、E8/E6培地であり、細胞と1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触は、例えば、Wnt活性化因子(単数または複数)およびTGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤(単数または複数)を、幹細胞を含む細胞培養培地に同日に最初に添加することによって、幹細胞と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最初の接触と同日である。ある特定の実施形態では、BMP活性剤がE8/E6培地に添加される。ある特定の実施形態では、BMP活性剤は、約1日間、約2日間、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、または約10日間の培養後に、培地から取り出される。ある特定の実施形態では、BMP活性剤は、約3日間の培養後に培地か

50

ら取り出される。ある特定の実施形態では、BMP活性剤は、約0.5 ng/mLと約20 ng/mLとの間、または約1 ng/mLと約15 ng/mLとの間、または約2 ng/mLと約10 ng/mLとの間、または約3 ng/mLと約5 ng/mLとの間の濃度で、培養培地中に存在する。ある特定の実施形態では、BMP活性剤は、約5 ng/mLの濃度で培養培地中に存在する。BMP活性剤の非限定的な例には、BMP 1、BMP 2、BMP 3、BMP 4、BMP 5、BMP 6、BMP 7、BMP 8 a、BMP 8 b、BMP 10、BMP 11、BMP 15、それらの誘導体、およびそれらの混合物が含まれる。

【0451】

ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤の細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約20日以内である。ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤の細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から少なくとも約5日後である。ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤の細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約5日後と約20日後との間（例えば、約5日後、約6日後、約7日後、約8日後、約9日後、約10日後、約11日後、約12日後、約13日後、約14日後、約15日後、約16日後、約17日後、約18日後、約19日後、または約20日後）である。ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤の細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約10日後である。ある特定の実施形態では、1種または複数のFGF活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤の細胞との最初の接触は、幹細胞と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最初の接触から約11日後である。

【0452】

ある特定の実施形態では、Wnt活性化因子（単数または複数）、FGF活性化因子（単数または複数）および任意選択でSC分化誘導剤（単数または複数）は、SC前駆体を産生するために、L-グルタミン（例えば、Gibco、25030-164）、N2（例えば、Stem Cell Technologies、07156）およびB27（例えば、Life Technologies、17504044）を補充したNB培地に、（毎日、1日おきに、または2日毎に）添加される。

【0453】

ある特定の実施形態では、SC分化誘導剤（単数または複数）、FGF活性化因子（単数または複数）および任意選択でSC分化増強剤（単数または複数）は、SC前駆体を産生するために、L-グルタミン（例えば、Gibco、25030-164）、N2（例えば、Stem Cell Technologies、07156）およびB27（例えば、Life Technologies、17504044）を補充したNB培地に、（毎日、1日おきに、または2日毎に）添加される。

【0454】

ある特定の実施形態では、TGF β /アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤（単数または複数）、SMAD阻害剤（単数または複数）、Wnt活性化因子（単数または複数）、SC分化誘導剤（単数または複数）、FGF活性化因子（単数または複数）、および任意選択でSC分化増強剤（単数または複数）は、幹細胞を含む細胞培養培地に、毎日（または1日おきに、もしくは2日毎に）添加される。

【0455】

ある特定の実施形態では、幹細胞と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1種または複数のSMAD阻害剤との最初の接触は、0日目であり、細胞と1種または複数のWnt活性化因子との最初の接触は、2日目であり、細

10

20

30

40

50

胞と1種または複数のF G F活性化因子および任意選択で1種または複数のS C分化誘導剤との最初の接触は、11日目であり、細胞と1種または複数のS C分化誘導剤および1種または複数のF G F活性化因子、ならびに任意選択で1種または複数のS C分化増強剤との最初の接触は、25日目である。ある特定の実施形態では、0日目～10日目についての細胞培養培地は、K S R培地、N 2培地、またはそれらの混合物である。ある特定の実施形態では、0日目～3日目についての細胞培養培地は、K S R培地である。ある特定の実施形態では、4日目～10日目についての細胞培養培地は、K S R培地およびN 2培地の組合せである。ある特定の実施形態では、10日目についての細胞培養培地は、N 2培地である。ある特定の実施形態では、11日目およびそれ以降についての細胞培養培地は、L - グルタミン、N 2およびB 2 7を補充したN B培地である。

10

【0456】

ある特定の実施形態では、幹細胞と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1種または複数のW n t活性化因子との最初の接触は、0日目であり、細胞と1種または複数のF G F活性化因子および任意選択で1種または複数のS C分化誘導剤との最初の接触は、11日目（または1日おきに、もしくは2日毎に）であり、細胞と1種または複数のS C分化誘導剤および1種または複数のF G F活性化因子、ならびに任意選択で1種または複数のS C分化増強剤との最初の接触は、25日目である。ある特定の実施形態では、0日目～10日目についての細胞培養培地は、E 8 / E 6培地、N 2培地、またはそれらの混合物である。ある特定の実施形態では、11日目およびそれ以降についての細胞培養培地は、L - グルタミン、N 2およびB 2 7を補充したN B培地である。

20

【0457】

ある特定の実施形態では、細胞は、S C前駆体を産生するために、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1種または複数のS M A D阻害剤と約10日間にわたって；1種または複数のW n t活性化因子と約23日間にわたって；および1種または複数のF G F活性化因子と約14日間にわたって、ならびに任意選択で1種または複数のS C分化誘導剤と約14日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、S C前駆体は、S Cを産生するために、1種または複数のS C分化誘導剤、1種または複数のF G F活性化因子および任意選択で1種または複数のS C分化増強剤と少なくとも8日間（例えば、10日間または35日間）にわたって接触される。

30

【0458】

ある特定の実施形態では、細胞は、S C前駆体を産生するために、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約10日間にわたって；W n tシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と約25日間にわたって；およびF G Fシグナル伝達の1種または複数の活性化因子と約14日間にわたって、ならびに任意選択で1種または複数のS C分化誘導剤と約14日間にわたって接触される。ある特定の実施形態では、S C前駆体は、S Cを産生するために、1種または複数のS C分化誘導剤、1種または複数のF G F活性化因子および任意選択で1種または複数のS C分化増強剤と少なくとも8日間（例えば、10日間または35日間）にわたって接触される。

40

【0459】

シュワン細胞（S C）前駆体（例えば、1つまたは複数の初期シュワン細胞マーカーを発現する細胞）は、T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤（単数または複数）との最初の接触から約35日未満、約34日未満、約33日未満、約32日未満、約31日未満、約30日未満、約29日未満、約28日未満、約27日未満、約26日未満、約25日未満、約24日未満、約23日未満、約22日未満、約21日未満、または約20日未満で、幹細胞から分化し得る。ある特定の実施形態では、S C前駆体は、T G F / アクチビン - ノーダルシグナル伝達の阻害剤（単数または複数）との最初の接触から約25日後またはそれ以降に、幹細胞から分化する。

【0460】

1 . 5 . マーカーおよびレポーター

50

分化したSC前駆体は、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する。シュワン細胞前駆体マーカーの非限定的な例には、SOX10、GAP43、BLBP、ミエリンタンパク質ゼロ(MPZ)、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、SLC10A4、ならびに表1~4に列挙される遺伝子が含まれる。

【0461】

SCは、1つまたは複数のシュワン細胞マーカーを発現する。シュワン細胞マーカーの非限定的な例には、ロイシンリッチリピート膜貫通ニューロン4(LRRTM4)、カドヘリン1(CDH1)、脂肪酸結合タンパク質7(FABP7)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、UNCB5、スクレロスチンドメイン含有1(SOSTDC1)、オリゴデンドロサイト転写因子1(OLIG1)、プラスミノゲン活性化因子(PLAT)、カリウム内向き整流性チャネルサブファミリーJメンバー10(KCNJ10)、ソニックヘッジホッグ(SHH)、ネトリン1(NTN1)、グリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)、erb-b2受容体チロシンキナーゼ3(ERBB3)、成長関連タンパク質43(GAP43)、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、アクアポリン4(AQP4)、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、MPZ、CD9、CD49D、CD49E、CD44、CD98、およびCD81、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、CDH19、ならびに表1~4に列挙される遺伝子が含まれる。

【0462】

分化したSC前駆体およびさらに成熟したSCは、1つまたは複数のレポーターをさらに発現し得る。レポーターの非限定的な例には、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色蛍光タンパク質(EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal)、シアン蛍光タンパク質(ECFP、Cerulean、CyPet、mTurquoise2)および黄色蛍光タンパク質誘導体(YFP、Citrine、Venus、YPet、EYFP))、 β -ガラクトシダーゼ(LacZ)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cat)、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)、酵素(例えば、オキシダーゼおよびペルオキシダーゼ);および抗原性分子が含まれる。本明細書で使用される場合、用語「レポーター遺伝子」または「レポーター構築物」とは、容易に検出可能なまたは容易にアッセイ可能なタンパク質、例えば、有色タンパク質、蛍光タンパク質、例えばGFP、または酵素、例えばベータ-ガラクトシダーゼ(LacZ遺伝子)をコードする核酸を含む遺伝子構築物を指す。

【0463】

分化したSC前駆体およびさらに成熟したSCは、例えば、細胞培養培地中での分化後に精製され得る。本明細書で使用される場合、用語「精製された」、「精製する」、「精製」、「単離された」、「単離する」および「単離」とは、試料からの、少なくとも1つの夾雑物の量における低減を指す。例えば、所望の細胞型は、望ましくない細胞型の量における対応する低減により、少なくとも約10%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、および少なくとも約90%精製される。用語「精製する」とは、試料からのある特定の細胞(例えば、望ましくない細胞)の除去を指し得る。望ましくない細胞の除去または選択は、試料中の所望のSC前駆体またはSCのパーセントにおける増加を生じる。ある特定の実施形態では、SC前駆体は、混合細胞集団を、少なくとも1つのシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞へと選別することによって精製される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP

10

20

30

40

50

116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1～4に列挙される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1に列挙される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978およびZNF502からなる群から選択される。

【0464】

10

本開示の主題は、本明細書に記載される*in vitro*方法によって産生されるSC前駆体およびSCの集団、ならびにかかる細胞を含む組成物もまた提供する。

【0465】

3. シュワン細胞前駆体およびシュワン細胞を含む組成物

本明細書に開示される主題は、本明細書に記載される*in vitro*分化方法によって産生された分化したSC前駆体の集団を含む組成物を提供する。さらに、本明細書に開示される主題は、本明細書に記載される*in vitro*の分化したSC前駆体から成熟したSCの集団を含む組成物を提供する。

【0466】

さらに、本明細書に開示される主題は、*in vitro*の分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の集団の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%）が、SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、およびSLC10A4からなる群から選択される1つまたは複数のSC前駆体マーカーを発現し、細胞の集団の約25%未満（例えば、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、または約0.1%未満）が、幹細胞マーカー、CNSマーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、組成物を提供する。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1～4に記載される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、表1に記載される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーは、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、およびZNF502からなる群から選択される。

20

30

【0467】

40

さらに、本明細書に開示される主題は、*in vitro*で分化した細胞の集団を含む組成物であって、細胞の集団の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%）が、LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、

50

P L P 2、S 1 0 0 A 6、A Q P 9、およびC D H 1 9 からなる群から選択される1つまたは複数のS C マーカーを発現し、細胞の約25%未満(例えば、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、または約0.1%未満)が、S C 前駆体マーカー、幹細胞マーカー、C N S マーカー、神経細胞マーカー、および間葉前駆体マーカーからなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、組成物を提供する。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のS C マーカーは、表1~4に記載される遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のS C マーカーは、T Y R P 1、C D 4 4、E N T H D 1、N T 5 E、H T R 2 B、N O V、I L 8、S L C 1 6 A 6、およびC D K N 2 A からなる群から選択される。

10

【0468】

幹細胞マーカーの非限定的な例には、O C T 4、N A N O G、S S E A 4、およびS S E A 3が含まれる。C N S マーカーの非限定的な例には、P A X 6、N E S T I N、およびS O X 1が含まれる。神経細胞マーカーの非限定的な例には、T U J 1、M A P 2、N F H、B R N 3 A、I S L 1、T H、A S C L 1、C H A T、P H O X 2 B、P H O X 2 A、T R K A、T R K B、およびT R K Cが含まれる。間葉前駆体マーカーの非限定的な例は、S M AおよびC D 7 3である。

【0469】

ある特定の実施形態では、約 1×10^4 ~ 約 1×10^{10} 個、約 1×10^4 ~ 約 1×10^5 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^6 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 個、約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 個、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 個、約 1×10^8 ~ 約 1×10^9 個、約 1×10^8 ~ 約 1×10^{10} 個、または約 1×10^9 ~ 約 1×10^{10} 個の本明細書に開示される幹細胞由来S C 前駆細胞または成熟S C の集団を含む組成物が対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個の本明細書に開示される幹細胞由来S C 前駆体または成熟S C が対象に投与される。

20

【0470】

ある特定の実施形態では、前記組成物は凍結されている。ある特定の実施形態では、前記組成物は、1種または複数の凍結保護剤、例えば限定されないが、ジメチルスルホキシド(D M S O)、グリセロール、ポリエチレングリコール、スクロース、トレハロース、デキストロース、またはその組合せをさらに含み得る。

30

【0471】

ある特定の非限定的な実施形態では、組成物は、生体適合性の足場またはマトリックス、例えば、細胞を対象に植え込むまたは移植する場合に組織再生を促進する生体適合性の三次元足場をさらに含む。ある特定の非限定的な実施形態では、生体適合性の足場は、細胞外マトリックス材料、合成ポリマー、サイトカイン、コラーゲン、ポリペプチドまたはタンパク質、フィブロネクチン、ラミニン、ケラチン、フィブリン、フィブリノーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、アガロースもしくはゼラチンを含む多糖類、および/またはハイドロゲルを含む(例えば、その各々の内容の全体が参照により組み込まれている、米国公開第2015/0159135号、同第2011/0296542号、同第2009/0123433号、および同第2008/0268019号を参照されたい)。

40

【0472】

ある特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。組成物は、末梢神経系(以降、「P N S」)および/もしくは中枢神経系(以降、「C N S」)の再生のため、ミエリン損傷の予防および/もしくは修復のため、ならびに/またはシュワン細胞関連障害、例えば末梢神経障害(例えば、糖尿病性末梢神経障害)の予防および/もしくは処置のために使用することができる。

【0473】

本明細書に開示される主題はまた、本明細書に開示される分化した細胞またはそれを含

50

む組成物を含む装置も提供する。装置の非限定的な例には、シリンジ、細いガラス管、定位針およびカニューレが含まれる。

【0474】

4. 処置方法

*in vitro*の分化したSC前駆体およびSCを、末梢神経系（以降、「PNS」）の再生のために使用することができる。*in vitro*の分化したSC前駆体およびSCはまた、中枢神経系（以降、「CNS」）の再生のためにも使用することができる。さらに、*in vitro*の分化したSC前駆体およびSCは、ミエリン損傷の予防および/または処置/修復のために使用することができる。ミエリンは、PNSミエリンまたはCNSミエリンであり得る。

10

【0475】

*in vitro*で分化したSC前駆体およびSCはまた、シュワン細胞関連障害を予防および/または処置するためにも使用することができる。シュワン細胞関連障害の非限定的な例には、末梢神経障害、神経鞘腫症、シャルコー・マリー・トゥース病、ギラン・バレー症候群、異染性白質ジストロフィー、神経線維腫症、および多発性硬化症（MS）が含まれる。ある特定の実施形態では、末梢神経障害は、糖尿病性末梢神経障害（DPN）である。

【0476】

末梢のグリアは、PNS生理学の多くの重要な側面を調節する。それらは、ニューロンの栄養支援を提供し、軸索に対してミエリン形成し、神経修復を促進する。後根神経節および自律神経節の衛星細胞、神経筋接合部のシナプス周囲シュワン細胞、ならびに末梢ニューロンの軸索を髄鞘化するミエリン形成性および非ミエリン形成性シュワン細胞を含む、末梢グリアの多くのサブタイプが存在する。これらのサブタイプは、胚発達の間にNCから生じることが知られているが、その詳細および機能的成熟化を調節する機構は十分に理解されていない。主要な供給源からこれらの胚系列を得る難しさのために、ヒトにおけるSCの形成およびミエリン形成または非ミエリン形成運命の獲得を支配する分子および細胞機構を詳細に調べる能力は限られている。本明細書に開示されるヒト多能性幹細胞からこれらの系列を誘導する方法により、これらの制限を回避することができ、これらの発達プロセスの厳密な研究が可能となる。ミエリン形成の*in vitro*モデルを利用することにより、ヒトの系におけるミエリン形成プロセスの分子研究を促進することができるであろう。

20

30

【0477】

これらの重要な基本的問題に対処することに加えて、本明細書に記載されるhPSC由来SCはまた、橋渡し研究においても利用することができる。SCは、遺伝子変異、がん化学療法、および放射線により誘導される損傷、または糖尿病などの代謝問題を含む多様な要因によって引き起こされる多くのタイプの末梢神経障害に関係している。

【0478】

SCに影響を及ぼす最も一般的な遺伝的障害の1つは、シャルコー・マリー・トゥース病1A型（CMT1A）である。この疾患は、PMP22遺伝子における重複または三重複によって引き起こされる（Lupski、1998年；Pareyson、1999年）。PMP22は、密集したミエリン構造の一部であり、ミエリン膜層の間の物理的接続の確立に関係している。CMT1Aにおける遺伝子量の増加によるPMP22タンパク質レベルの上昇は、SC膜の脱安定化およびミエリンの脆弱性をもたらす（Lupski、1998年）。SCのこの病態は、筋力低下および感覚障害などの症状をもたらす。CMT1A患者由来のiPSCからSCを生成することによって、またはhESCにPMP22変異を導入し、その後ミエリン形成性SCに分化させることによって、病因および可能性がある処置選択肢に関する洞察を提供する、ヒトモデル系におけるこのミエリン形成欠損の包括的研究が可能となり得る。

40

【0479】

化学療法および放射線療法は、SCまたは末梢ニューロンに対するその関連する損傷に

50

より、がん患者における P N S 損傷の最も一般的な原因の 1 つである (Quasthoff および Hartung)。S C が、P N S 修復の媒介において重要な役割を果たすことを考慮すると、S C の移植は、これらの神経障害の有望な治療機会を提供することができる。移植された S C の再生能は、脊髄損傷の状況でかなり広範囲に研究されている (Williams および Bunge、2012 年)。S C は、脊髄に通常存在しないが、*ex vivo* で増大させた S C の自家移植は、脊髄の修復において有益であることが報告されている (Guest ら、2013 年)。しかし、移植された S C が再生された軸索のミエリン形成に直接寄与するか否か、またはその作用が栄養支援を通して主に媒介されるか否かは明白ではない。これらの移植パラダイムにおける主要な障害は、S C を大規模に得ること、および損傷領域における移植後のその遊走能が限定されることである (Kocsis および Waxman、2007 年)。

10

【0480】

h P S C からの S C の分化は、規模の問題を克服することができ、h P S C 由来系列の胎児性の性質は通常、遊走能の増強に関連する (Master ら、2007 年)。したがって、h P S C - S C は、P N S および C N S における再生を促進するための細胞治療試験にとって新たな可能性を開く。

【0481】

末梢神経障害の主な原因は、真性糖尿病 (Martyn および Hughes、1997 年) である。糖尿病患者において症状を管理するためおよび基礎となる神経損傷を予防するための有効な介入に関して、非常に大きなアンメットニーズが存在する。広範な努力にもかかわらず、今日まで試験した全ての候補薬は、臨床試験の異なる段階で失敗している (Grewal ら、2016 年)。これは、主に、これらの薬物を当初同定または検証したモデル系が不適切であったためである (Callaghan ら、2012 年)。糖尿病性末梢神経障害 (D P N) における神経損傷を予防するための治療を合理的に設計するためには、基礎となる代謝および細胞機構のより良い理解が必要である。

20

【0482】

本明細書に開示される主題は、P N S の再生方法を提供する。本明細書に開示される主題は、C N S の再生方法を提供する。本明細書に開示される主題は、ミエリン損傷を予防および / または処置または修復する方法を提供する。本明細書に開示される主題は、シュワン細胞関連障害を予防および / または処置する方法をさらに提供する。

ある特定の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に有効量の以下の 1 種または複数を投与するステップを含む：

30

【0483】

(a) 本明細書に記載される分化したシュワン細胞前駆体の集団；

【0484】

(b) そのような分化したシュワン細胞前駆体を含む組成物；

【0485】

(c) 本明細書に記載されるシュワン細胞の集団；および

【0486】

(d) そのようなシュワン細胞を含む組成物。

【0487】

さらに、本明細書に開示される主題は、P N S および / もしくは C N S の再生のために、ミエリン損傷を予防および / もしくは処置もしくは修復するために、ならびに / またはシュワン細胞関連障害を予防および / もしくは処置するために、以下の 1 つまたは複数の使用を提供する：

40

(a) 本明細書に記載される分化したシュワン細胞前駆体の集団；

(b) そのような分化したシュワン細胞前駆体を含む組成物；

(c) 本明細書に記載されるシュワン細胞の集団；および

(d) そのようなシュワン細胞を含む組成物。

【0488】

ある特定の実施形態では、ミエリンは P N S ミエリンである。ある特定の実施形態では

50

、ミエリンはCNSミエリンである。

【0489】

ある特定の実施形態では、シュワン細胞関連障害は、末梢神経障害、神経鞘腫症、シャルコー・マリー・トゥース病、ギラン・バレー症候群、異染性白質ジストロフィー、神経線維腫症、および多発性硬化症(MS)からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、末梢神経障害は、糖尿病性末梢神経障害(DPN)である。

【0490】

本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、対象に、全身にまたは直接、投与または提供することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、目的の臓器(例えば、シュワン細胞欠損関連障害(例えば、末梢神経障害)に罹患している臓器)に直接注射される。本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、脳および脊髄を含むがこれらに限定されない有効な神経を有する対象の体の任意の部分に直接投与(注射)することができる。

10

【0491】

本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、任意の生理的に許容される媒体中で投与することができる。薬学的に許容される担体と本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体または成熟SCとを含む医薬組成物も提供される。本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体もしくはそれを含む組成物、成熟SCもしくはそれを含む組成物、または薬学的に許容される担体は、局所注射、正所性(OT)注射、全身注射、静脈内注射、または非経口投与によって投与することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、局所注射を介して対象に投与される。

20

【0492】

本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体またはそれを含む組成物、成熟SCまたはそれを含む組成物は、選択されたpHに緩衝することができる滅菌液体調製物、例えば、等張水溶液、懸濁剤、乳剤、分散剤、または粘性の組成物として簡便に提供することができる。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物および固体組成物よりも調製が容易である。さらに、液体組成物は、特に注射によって投与するために、いくらかより簡便である。他方、粘性組成物は、特定の組織とのより長い接触期間を提供するために、適切な粘性範囲内で製剤化され得る。液体または粘性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る担体を含み得る。無菌の注射可能な溶液は、本開示の主題の組成物、例えば、本明細書に開示される幹細胞から誘導されたSC前駆体または成熟したSCを含む組成物を、所望に応じて種々の量の他の成分と共に、必要な量の適切な溶媒中に取り込むことによって調製され得る。かかる組成物は、適切な担体、希釈剤または賦形剤、例えば、無菌水、生理学的食塩水、グルコース、デキストロースなどとの混合物中にあり得る。これらの組成物は、凍結乾燥もされ得る。これらの組成物は、所望の投与経路および調製物に依存して、補助物質、例えば、湿潤剤、分散剤または乳化剤(例えば、メチルセルロース)、pH緩衝剤、ゲル化添加物または粘性増強添加物、防腐剤、調味剤、顔料などを含み得る。参照によって本明細書に組み込まれる「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE」、第17版、1985年などの標準的な教科書が、過度の実験なしに適切な調製物を調製するために参考にされ得る。

30

40

【0493】

抗菌防腐剤、抗酸化剤、キレート剤および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌性を増強する種々の添加物が添加され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって

50

確実にされ得る。注射可能な医薬品形態の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩アルミニウム (aluminum monostearate) およびゼラチンの使用によってもたらされ得る。しかし、本開示の主題によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤または添加物は、本明細書に開示される幹細胞から誘導されたSC前駆体または成熟したSCまたはそれを含む組成物と適合性でなければならない。

【0494】

当業者は、組成物の構成成分が、化学的に不活性であるように選択されるべきであり、本明細書に開示される幹細胞から誘導したSC前駆体または成熟したSCの生存度にも有効性にも影響を与えないことを認識する。これは、化学および医薬品の原理における当業者にとって問題にはならず、または問題は、標準的な教科書を参照して、もしくは単純な実験によって（過度の実験を伴わずに）、本開示および本明細書で引用された文書から、容易に回避され得る。

10

【0495】

ある特定の非限定的な実施形態では、本明細書に記載されるSC前駆体およびSCは、生体適合性の足場またはマトリックス、例えば、細胞を対象に埋め込んだまたは移植した場合に組織再生を促進する生体適合性の三次元足場をさらに含む組成物中に含まれる。ある特定の非限定的な実施形態では、生体適合性の足場は、細胞外マトリックス材料、合成ポリマー、サイトカイン、コラーゲン、ポリペプチドまたはタンパク質、フィブロネクチン、ラミニン、ケラチン、フィブリン、フィブリノーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、アガロースもしくはゼラチンを含む多糖類、および/またはハイドロゲルを含む（例えば、その各々の内容の全体が参照により組み込まれている、米国公開第2015/0159135号、同第2011/0296542号、同第2009/0123433号、および同第2008/0268019号を参照されたい）。

20

【0496】

「有効量」（または「治療有効量」）は、処置の際に有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1つまたは複数の用量で対象に投与され得る。処置に関して、有効量は、シュワン細胞関連障害（例えば、DPN）を緩和、軽快、安定化、反転するもしくはその進行を緩徐化する、またはシュワン細胞関連障害（例えば、DPN）の病理学的結果を他の方法で低減させるのに十分な量である。有効量は一般に、ケースバイケースで医師によって決定され、当業者の技術範囲内である。典型的には、いくつかの因子が、有効量を達成するための適切な投薬量を決定する場合に考慮される。これらの因子には、対象の年齢、性別および体重、処置されている状態、状態の重症度、ならびに投与される細胞の形態および有効濃度が含まれる。

30

【0497】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体、成熟SCの有効量は、PNSおよび/またはCNSを再生するのに十分な量、ミエリン損傷を予防するのに十分な量、ミエリン損傷を修復/処置するのに十分な量、シュワン細胞関連障害を予防するのに十分な量、および/またはシュワン細胞関連障害を処置する（例えば、その症状の進行を遅らせる、症状を軽減および/または低減させる）のに十分な量である。本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体または成熟SCの投与量は、処置される対象に応じて変化する。ある特定の実施形態では、約 1×10^4 ~ 約 1×10^{10} 個、約 1×10^4 ~ 約 1×10^5 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^6 個、約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個、約 1×10^6 ~ 約 1×10^7 個、約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 個、約 1×10^7 ~ 約 1×10^8 個、約 1×10^8 ~ 約 1×10^9 個、約 1×10^8 ~ 約 1×10^{10} 個、または約 1×10^9 ~ 約 1×10^{10} 個の本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体または成熟SCが対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個の本明細書に開示される幹細胞由来SC前駆体または成熟SCが、対象、例えば末梢神経障害に罹患している対象、例えば、DPNに罹患している対象に投与される。有効用量であると考えられる量の正確な決定は、その特定の対象の体格、年齢、性別、体重、および状態を含む、各々の対象に対して個別の要因に基づき得る。

40

50

投与量は、本開示からおよび当技術分野での知識から当業者が容易に確認することができる。

【0498】

ある特定の実施形態では、PNSおよび/もしくはCNSの再生のため、ミエリン損傷の予防および/もしくは処置/修復のため、ならびに/またはシュワン細胞関連障害(例えば、末梢神経障害)の予防および/もしくは処置のために対象に投与される細胞は、本明細書に開示される幹細胞由来シュワン細胞前駆体から分化/成熟した成熟化シュワン細胞の集団である。

【0499】

5. キット

本明細書に開示される主題は、神経堤系列細胞のSC前駆体への分化を誘導するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、本明細書に記載される1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を含む。ある特定の実施形態では、キットは、神経堤系列細胞(例えば、1つまたは複数の神経堤系列マーカーを発現する細胞)の、SC前駆体(例えば、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞)への分化を誘導するための説明書をさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、または少なくとも約20日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約10日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と最長約15日間、最長約16日間、最長約17日間、最長約18日間、最長約19日間、最長約20日間、最長約21日間、最長約22日間、最長約23日間、最長約24日間、最長約25日間、最長約26日間、最長約27日間、最長約28日間、最長約29日間、または最長約30日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と約3日間と約5日間との間、約5日間と約10日間との間、約10日間と約15日間との間、約15日間と約20日間との間、約20日間と約25日間との間、または約25日間と約30日間との間、接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と約10日間と約15日間との間、接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間、約16日間、約17日間、約18日間、約19日間、約20日間、約21日間、約22日間、約23日間、約24日間、約25日間、約26日間、約27日間、約28日間、約29日間、または約30日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と

10

20

30

40

50

14日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、神経堤系列細胞を1種または複数のWnt活性化因子、1種または複数のFGF活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と15日間にわたって接触させて、SC前駆体を産生するステップを含む。

【0500】

本明細書に開示される主題はまた、幹細胞の分化を誘導するためのキットも提供する。ある特定の実施形態では、キットは、トランスフォーミング増殖因子ベータ(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、wingless(Wnt)シグナル伝達の1種または複数の活性化因子、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子、および任意選択でシュワン細胞分化を誘導する1種または複数の分子を含む。ある特定の実施形態では、キットは、幹細胞の、分化したSC前駆体の集団、例えば、1つまたは複数のシュワン細胞前駆体マーカーを発現する細胞への分化を誘導するための説明書をさらに含む。

10

【0501】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を阻害剤(複数可)、活性化因子(複数可)、および誘導剤(複数可)と特定の順序で接触させるステップを含む。阻害剤(複数可)、活性化因子(複数可)、および誘導剤(複数可)と接触させる順序は、幹細胞を培養するために使用される細胞培養培地によって決定され得る。

【0502】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞をFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と少なくとも約3日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞をFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と15日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞をFGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤と14日間にわたって接触させるステップを含む。

20

【0503】

ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から約4日以内(例えば、同時に(同じ日に)、例えば約1日後と約4日後との間に、例えば、約1日後、約2日後、約3日後、または約4日後)に、細胞を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。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から約2日後/それ以降に、細胞を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。

30

【0504】

ある特定の実施形態では、キットは、Small Mothers Against Decapentaplegic(SMAD)シグナル伝達の1種または複数の阻害剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を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SMAD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。

40

【0505】

ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から約20日以内に、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子、および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を細胞と最初に接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から少なくとも約5日後に、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を細胞と最初に接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞とTGF/アクチビン-ノーダルシグナル伝

50

達の1種または複数の阻害剤との最初の接触から約5日と約20日後との間（例えば、約5日後、約6日後、約7日後、約8日後、約9日後、約10日後、約11日後、約12日後、約13日後、約14日後、約15日後、約16日後、約17日後、約18日後、約19日後、または約20日後）、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を細胞と最初に接触させるステップを含む。

【0506】

ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から10日後に、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を細胞と最初に接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞と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最初の接触から約11日後に、FGFシグナル伝達の1種または複数の活性化因子および任意選択で1種または複数のSC分化誘導剤を細胞と最初に接触させるステップを含む。

10

【0507】

ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約15日間、少なくとも約16日間、少なくとも約17日間、少なくとも約18日間、少なくとも約19日間、少なくとも約20日間、少なくとも約21日間、少なくとも約22日間、少なくとも約23日間、少なくとも約24日間、少なくとも約25日間、少なくとも約26日間、少なくとも約27日間、少なくとも約28日間、少なくとも約29日間、または少なくとも約30日間にわたって接触させ得ることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、最大で約3日間、最大で約4日間、最大で約5日間、最大で約6日間、最大で約7日間、最大で約8日間、最大で約9日間、最大で約10日間、最大で約11日間、最大で約12日間、最大で約13日間、最大で約14日間、最大で約15日間、最大で約16日間、最大で約17日間、最大で約18日間、最大で約19日間、最大で約20日間、最大で約21日間、最大で約22日間、最大で約23日間、最大で約24日間、最大で約25日間、最大で約26日間、最大で約27日間、最大で約28日間、最大で約29日間、または最大で約30日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、約4日間と約30日間との間、約4日間～約27日間の間、約4日間と約26日間との間、約4日間と約25日間との間、約4日間と約24日間との間、約4日間と約20日間との間、約4日間と約15日間との間、約4日間と約10日間との間、約5日間と約15日間との間、約5日間と約10日間との間、約10日間と約15日間との間、約15日間と約20日間との間、約10日間と約20日間との間、約20日間と約25日間との間、または約25日間と約30日間との間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、10日間と約15日間との間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間、約16日間、約17日間、約18日間、約19日間、約20日間、約21日間、約22日間、約23日間、約24日間、約25日間、約26日間、約27日間、約28日間、約29日間、または約30日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を、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、約11日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、幹細胞を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

20

30

40

50

【 0 5 0 8 】

【 0 5 0 9 】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、W n t シグナル伝達の 1 つまたは複数の活性化因子と、少なくとも約 1 4 日間、少なくとも約 1 5 日間、少なくとも約 1 6 日間、少なくとも約 1 7 日間、少なくとも約 1 8 日間、少なくとも約 1 9 日間、少なくとも約 2 0 日間、少なくとも約 2 1 日間、少なくとも約 2 2 日間、少なくとも約 2 3 日間、少なくとも約 2 4 日間、少なくとも約 2 5 日間、少なくとも約 2 6 日間、少なくとも約 2 7 日間、少なくとも約 2 8 日間、または少なくとも約 2 9 日間、少なくとも約 3 0 日間、少なくとも約 3 1 日間、少なくとも約 3 2 日間、少なくとも約 3 3 日間、少なくとも約 3 4 日間、少なくとも約 3 5 日間、少なくとも約 3 6 日間、少なくとも約 3 7 日間、少なくとも約 3 8 日間、少なくとも約 3 9 日間、または少なくとも約 4 0 日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、最大で約 1 5 日間、最大で約 1 6 日間、最大で約 1 7 日間、最大で約 1 8 日間、最大で約 1 9 日間、最大で約 2 0 日間、最大で約 2 1 日間、最大で約 2 2

日間、最大で約 2 3 日間、最大で約 2 4 日間、最大で約 2 5 日間、最大で約 2 6 日間、最大で約 2 7 日間、最大で約 2 8 日間、最大で約 2 9 日間、最大で約 3 0 日間、最大で約 3 1 日間、最大で約 3 2 日間、最大で約 3 3 日間、最大で約 3 4 日間、最大で約 3 5 日間、最大で約 3 6 日間、最大で約 3 7 日間、最大で約 3 8 日間、最大で約 3 9 日間、最大で約 4 0 日間、最大で約 4 1 日間、最大で約 4 2 日間、最大で約 4 3 日間、最大で約 4 4 日間、最大で約 4 5 日間、最大で約 4 6 日間、最大で約 4 7 日間、最大で約 4 8 日間、最大で約 4 9 日間、最大で約 5 0 日間、最大で約 5 1 日間、最大で約 5 2 日間、最大で約 5 3 日間、最大で約 5 4 日間、最大で約 5 5 日間、最大で約 5 6 日間、最大で約 5 7 日間、最大で約 5 8 日間、最大で約 5 9 日間、または最大で約 6 0 日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、約 1 4 日間と約 2 0 日間との間、約 2 0 日間と約 2 5 日間との間、約 2 5 日間と約 3 0 日間との間、約 3 0 日間と約 3 5 日間との間、約 3 5 日間と約 4 0 日間との間、約 4 0 日間と約 4 5 日間との間、約 4 5 日間と約 5 0 日間との間、約 5 0 日間と約 5 5 日間との間、または約 5 5 日間と約 6 0 日間との間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と 2 0 日間と約 3 0 日間との間、接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と 2 5 日間と約 3 0 日間との間、接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と、約 1 4 日間、約 1 5 日間、約 1 6 日間、約 1 7 日間、約 1 8 日間、約 1 9 日間、約 2 0 日間、約 2 1 日間、約 2 2 日間、約 2 3 日間、約 2 4 日間、約 2 5 日間、約 2 6 日間、約 2 7 日間、約 2 8 日間、約 2 9 日間、約 3 0 日間、約 3 1 日間、約 3 2 日間、約 3 3 日間、約 3 4 日間、約 3 5 日間、約 3 6 日間、約 3 7 日間、約 3 8 日間、約 3 9 日間、約 4 0 日間、約 4 1 日間、約 4 2 日間、約 4 3 日間、約 4 4 日間、約 4 5 日間、約 4 6 日間、約 4 7 日間、約 4 8 日間、約 4 9 日間、約 5 0 日間、約 5 1 日間、約 5 2 日間、約 5 3 日間、約 5 4 日間、約 5 5 日間、約 5 6 日間、約 5 7 日間、約 5 8 日間、約 5 9 日間または約 6 0 日間にわたって接触させることを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と約 2 6 日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と約 2 5 日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と約 2 4 日間にわたって接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を W n t シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子と約 2 3 日間にわたって接触させるステップを含む。

【 0 5 1 0 】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子および任意選択で 1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 3 日間、少なくとも約 4 日間、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 6 日間、少なくとも約 7 日間、少なくとも約 8 日間、少なくとも約 9 日間、少なくとも約 1 0 日間、少なくとも約 1 1 日間、少なくとも約 1 2 日間、少なくとも約 1 3 日間、少なくとも約 1 4 日間、少なくとも約 1 5 日間、少なくとも約 1 6 日間、少なくとも約 1 7 日間、少なくとも約 1 8 日間、少なくとも約 1 9 日間、または少なくとも約 2 0 日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子および任意選択で 1 種または複数の S C 分化誘導剤と少なくとも約 1 0 日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の 1 種または複数の活性化因子および任意選択で 1 種または複数の S C 分化誘導剤と最長約 1 5 日間、最長約 1 6 日間、最長約 1 7 日間、最長約 1 8 日間、最長約 1 9 日間、最長約 2 0 日間、最長約 2 1 日間、最長約 2 2 日間、最長約 2 3 日間、最長約 2 4 日間、最長約 2 5 日間、最長約 2 6 日間、最長約 2 7 日間、最長約 2 8 日間、最長約 2 9 日間、または最長約 3 0 日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞

10

20

30

40

50

胞をシュワン細胞の分化を誘導する１種または複数の分子および F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子と約３日間と約１０日間との間、約５日間と約１０日間との間、約１０日間と約１５日間との間、約１５日間と約２０日間との間、約２０日間と約２５日間との間、または約２５日間と約３０日間との間、接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、細胞を F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約１０日間と約１５日間との間、接触させて、S C 前駆体を産生する。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約３日間、約４日間、約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、約１１日間、約１２日間、約１３日間、約１４日間、約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、約２０日間、約２１日間、約２２日間、約２３日間、約２４日間、約２５日間、約２６日間、約２７日間、約２８日間、約２９日間、または約３０日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約１４日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約１４日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。

10

20

【０５１１】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、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 S M A D シグナル伝達の１種または複数の阻害剤と約１１日間にわたって；W n t シグナル伝達の１種または複数の活性化因子と約２３日間にわたって；ならびに F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約１４日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。

【０５１２】

ある特定の実施形態では、説明書は、細胞を、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 S M A D シグナル伝達の１種または複数の阻害剤と約１１日間にわたって；W n t シグナル伝達の１種または複数の活性化因子と約２５日間にわたって；ならびに F G F シグナル伝達の１種または複数の活性化因子および任意選択で１種または複数の S C 分化誘導剤と約１４日間にわたって接触させて、S C 前駆体を産生するステップを含む。

30

【０５１３】

ある特定の実施形態では、キットは、S C 分化を増強する１種または複数の分子（「S C 分化増強剤」）および S C 前駆体の S C への成熟化を誘導するための説明書をさらに含む。ある特定の実施形態では、S C 前駆体の S C への成熟化を誘導するための説明書は、S C 前駆体を１種または複数の F G F 活性化因子、１種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で１種または複数の S C 分化増強剤と接触させて、S C を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、S C 前駆体の S C への成熟化を誘導するための説明書は、S C 前駆体を１種または複数の F G F 活性化因子、１種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で１種または複数の S C 分化増強剤と少なくとも約３日間、少なくとも約４日間、少なくとも約５日間、少なくとも約６日間、少なくとも約７日間、少なくとも約８日間、少なくとも約９日間、少なくとも約１０日間、少なくとも約１１日間、少なくとも約１２日間、少なくとも約１３日間、少なくとも約１４日間、または少なくとも約１５日間にわたって接触させて、S C を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、S C 前駆体の S C への成熟化を誘導するための説明書は、S C 前駆体を１種または複数の F G F 活性化因子、１種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で１種または複数の S C 分化増強剤と約３日間と約４０日間との間、約３日間と約３５日間との間、約３日間と約３０日間との間、約３日間と約２５日間との間、約３

40

50

日間と約 20 日間との間、約 3 日間と約 15 日間との間、約 10 日間と約 40 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、約 20 日間と約 40 日間との間、約 20 日間と約 30 日間との間、または約 30 日間と約 40 日間との間、接触させて、SC を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、SC 前駆体の SC への成熟化を誘導するための説明書は、SC 前駆体を 1 種または複数の FGF 活性化因子、1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 3 日間と約 15 日間との間、接触させて、SC を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、SC 前駆体の SC への成熟化を誘導するための説明書は、SC 前駆体を 1 種または複数の FGF 活性化因子、1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 30 日間と約 40 日間との間、接触させて、SC を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、SC 前駆体の SC への成熟化を誘導するための説明書は、SC 前駆体を 1 種または複数の FGF 活性化因子、1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 11 日間にわたって接触させて、SC を産生するステップを含む。ある特定の実施形態では、SC 前駆体の SC への成熟化を誘導するための説明書は、SC 前駆体を 1 種または複数の FGF 活性化因子、1 種または複数のシュワン細胞分化誘導剤、および任意選択で 1 種または複数の SC 分化増強剤と約 35 日間にわたって接触させて、SC を産生するステップを含む。

10

20

30

40

【0514】

さらに、本明細書に開示される主題は、PNS および / もしくは CNS の再生のため、ミエリン損傷の予防および / もしくは修復のため、ならびに / またはシュワン細胞関連障害（例えば、末梢神経障害、例えば DPN）の処置および / もしくは予防のためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、有効量の本明細書に開示される幹細胞由来 SC 前駆体の集団もしくはそれを含む組成物、または成熟 SC もしくはそれを含む組成物を、単位投与剤形で含む。ある特定の実施形態では、このキットは、治療的組成物を含む無菌コンテナを含む；かかるコンテナは、箱、アンプル、瓶、バイアル、管、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当該分野で公知の他の適切なコンテナ形態であり得る。かかるコンテナは、プラスチック、ガラス、ラミネート加工紙、金属箔、または医薬を保持するのに適切な他の材料で作製され得る。

【0515】

ある特定の実施形態では、このキットは、本明細書に開示される幹細胞から誘導した SC 前駆体の集団もしくはそれを含む組成物、または成熟した SC もしくはそれを含む組成物を、対象、例えば、例えば、シュワン細胞関連障害（例えば、末梢神経障害、例えば、DPN）に罹患している対象に投与するための使用説明書を含む。使用説明書は、PNS および / もしくは CNS の再生のため、ミエリン損傷の予防および / もしくは修復のため、ならびに / またはシュワン細胞関連障害（例えば、末梢神経障害、例えば、DPN）を処置および / もしくは予防するための細胞または組成物の使用についての情報を含み得る。ある特定の実施形態では、使用説明書は、以下のうち少なくとも 1 つを含む：治療剤の説明；PNS および / もしくは CNS の再生のため、ミエリン損傷の予防および / もしくは修復のため、ならびに / またはシュワン細胞関連障害（例えば、末梢神経障害、例えば、DPN）もしくはその症状を処置および / もしくは予防するための投薬スケジュールおよび投与；事前注意；警告；適応症；禁忌（counter-indication）；過量投薬情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；ならびに / あるいは参考文献。使用説明書は、コンテナ上に直接（存在する場合）、またはコンテナに貼られた標識として、またはコンテナ中にもしくはコンテナと同梱された別々のシート、パンフレット、カードもしくはホルダーとして印刷され得る。

【実施例】

50

【0516】

本開示の主題は、限定ではなく本開示の主題の例示として提供される以下の実施例を参照してより良く理解される。

【0517】

(実施例1)

概要

本発明者らは、ヒト幹細胞(例えば、hPSC)から誘導されたシュワン細胞前駆体およびシュワン細胞の非常に効率的な生成および見込みのある単離方法を開発した。幹細胞由来SCは、in vitroでhESC由来感覚ニューロンに対してミエリン形成することができ、hESC由来運動ニューロンの成熟化を加速することができた。幹細胞由来SCはまた、in vivoでのPNS損傷のラットモデルにおいて効率的に定着することができた。ラットの損傷した座骨神経に移植された幹細胞由来SCは、再生しつつある宿主軸索のミエリン形成に寄与し、新たにミエリン形成された線維における適切なイオンチャンネル局在化を促進した。

10

【0518】

方法および材料

未分化ヒト胚性幹細胞(hESC)の培養

hESC系統H9(WA-09)および誘導体(SOX10::GFP;SYN::ChR2-YFP;SYN::YFP;PHOX2B:GFP;EF1::RFP EDNRB-/-)ならびに2つの独立したhiPSC系統(健康および家族性自律神経異常症、センダイベースのOMSK(Cytotune))を、hESCを含むKSR(Life Technologies、10828-028)培地中のマウス胚性線維芽細胞(MEF、Global Stem、Rockville、MD)上で維持した(Chambersら、2009年)。細胞を、1ヶ月間隔でマイコプラズマ試験に供し、STRを、この研究の開始時にプロファイルして、細胞の種類を確認した。

20

【0519】

hESCからの神経堤誘導ならびにシュワン細胞の誘導および拡大増殖

hESCを、10nM FGF2(R&D Systems、233-FB-001MG/CF)を含むhESC培地中で、マトリゲル(BD Biosciences、354234)コーティングしたディッシュ上にプレートした(10^5 細胞/cm²)。分化を、LDN193189(100nM、Stemgent、Cambridge、MA)およびSB431542(10μM、Tocris、Ellisville、MI)を含むknockout serum replacement(KSR)培地(KO DMEM+15%KSR、L-グルタミン(Life Technologies、25030-081)、NEAA(Life Technologies、11140-050)中で開始させた。KSR培地を、以前に記載されたように(Chambersら、2009年)、4日目~10日目に、漸増量のN2培地で漸進的に置き換えた。頭蓋NC(CNC)誘導のために、細胞を、2日目~11日目に、LDNおよびSBに加えて3μM CHIR99021(Tocris Bioscience、4423)で処理する。CNS前駆体対照細胞は、以前に記載されたように(Chambersら、2009年)、0日目~11日目のLDNおよびSBによる処理によって生成した。実施例を通じて、0日目は、培地を、hESC培地からLDNおよびSB含有培地に切り替える日であった。本文および図面中の分化の日数は、多能性段階(0日目)以降の日数を指す。

30

40

【0520】

11日目に、NC細胞を、Ultra Low Attachment 6ウェル培養プレート(Fisher Scientific、3471)中で3Dスフェロイド(500万細胞/ウェル)へと凝集させ、CHIR(3μM、Tocris Bioscience、4423)およびFGF2(10nM、R&D Systems、233-FB-001MG/CF)およびNRG1(10ng/ml、R&D 378-SM-025)を含むL-グルタミン(Gibco、25030-164)、N2(Stem Cell

50

l Technologies、07156)およびB27(Life Technologies、17504044)を補充したNeurobasal(NB)培地中で培養した。14日間の懸濁培養後、スフェロイドを、NRG1(20ng/ml、R&D 378-SM-025)、FGF2(10nM、R&D Systems、233-FB-001MG/CF)およびcAMP(100mM、Sigma、D0260)を含むL-グルタミン(Gibco、25030-164)、N2(Stem Cell Technologies、07156)およびB27(Life Technologies、17504044)を補充したNeurobasal(NB)培地中で、ポリオルニチン/ラミニン/フィブロネクチン(PO/LM/FN)コーティングしたディッシュ(以前に記載されたように調製する)上にプレートする(Lee ら、2007年)。SC前駆体は、プレートしたスフェロイドの外に遊走し、10日以内にSCへと分化する。長期拡大増殖のために、細胞を、PO/LM/FNコーティングしたディッシュ上でシュワン細胞培地(Science11、1701)中で培養した。細胞を、免疫染色のために固定し、または分化の25日目、35日目、50日目、60日目および100日目に、遺伝子発現分析のために収集した。

10

【0521】

FACSおよび免疫蛍光(IF)分析

IFのために、細胞を、4%パラホルムアルデヒド(PFA、Affymetrix-USB、19943)で20分間固定し、次いで、1%ウシ血清アルブミン(BSA、Thermo Scientific、23209)および0.3%triton X-100(Sigma、T8787)を使用して、ブロックおよび透過処理した。次いで、細胞を、一次抗体溶液中で4(セルシウス)で一晩インキュベートし、フルオロフォアコンジュゲートした二次抗体でRTで1時間染色し、次いで、染色された細胞を、DAPI(1ng/ml、Sigma、D9542-5MG)と共にインキュベートし、数回洗浄し、その後イメージングした。フローサイトメトリー分析のために、細胞を、Accutase(Innovative Cell Technologies、AT104)を用いて解離させ、BD Cytifix/Cytoperm(BD Bioscience、554722)溶液を使用して固定および透過処理し、次いで、BD Perm/Wash緩衝剤(BD Bioscience、554723)を製造業者の使用説明書に従って使用して、洗浄、ブロックおよび透過処理した。次いで、細胞を、一次(4で一晩)および二次(室温で30分間)抗体で染色し、フローサイトメーター(FlowJo software)を使用して分析する。一次抗体および希釈のリストは表5に提供される。

20

30

【0522】

表面マーカースクリーニング

特異的表面抗原についてのスクリーニングを、分化の80日目にhESC-SCに対して、BD Lyoplate library(登録商標)(BD、560747)を使用して実施した。細胞を、96ウェルプレート中にプレートし(10,000細胞/ウェル)、製造業者の使用説明書に従って、一次および二次抗体で染色した。染色された細胞を、プレート全体イメージングおよび定量化のために固定した。総GFAPのうちの二重陽性細胞のパーセンテージを、各抗体について定量化した。上位ヒット(>60%二重陽性)を、フローサイトメトリーをさらに使用して検証した。

40

【0523】

遺伝子発現分析

RNA配列決定のために、総RNAを、RNeasy RNA精製キット(Qiagen、74106)を使用して抽出した。qRT-PCRアッセイのために、総RNA試料を、Superscript II Reverse Transcriptase(Life Technologies、18064-014)を使用してcDNAに逆転写した。qRT-PCR反応を、QuantiTect SYBR Green PCRミックス(Qiagen、204148)を使用して設定した。各データポイントは、3つ

50

の独立した生物学的反復を示す。RNA-seq読み取りを、TopHat v2.0を使用して、ヒト参照ゲノム(hg19)にマッピングした。TopHatを、カバー範囲検索に対する例外を伴って、デフォルトパラメーターで実行した。次いで、アラインメントを、HTSeqを使用して定量化し、差示的遺伝子発現を、頭蓋神経堤試料に対して標準化したDESeqを使用して計算した。

【0524】

生存度アッセイ

SCの生存度をモニタリングするために、細胞を、Cytotox 96細胞毒性アッセイキット(Promega、G1780)を使用してLDH活性についてアッセイした。簡潔に述べると、細胞を、30,000細胞/cm²で96ウェルプレート中にプレートする。上清および細胞溶解物を、24時間後に収集し、プレートリーダー(490nm吸光度)を使用してLDH活性についてアッセイした。生存度を、溶解物のLDHシグナルを総LDHシグナル(溶解物+上清から)で除算することによって計算した。細胞を、アッセイの間、PO/LM/FNコーティングしたディッシュ上でシュワン細胞培地(Science11、1701)中で培養した。

【0525】

カルシウムイメージング

MN-SC同時培養物を、既に記載されているように(Barreto-ChangおよびDolmetsch、2009年)培養後40日目および70日目にカルシウムイメージングに供した。簡単に説明すると、細胞を、5μMのFluo-4(Life Technologies)と共に37℃で30分間インキュベートした後、イメージングした。カバーガラスをFC S2イメージングチャンバー(Bioptechs)に載せ、細胞を、既に記載したように0.1重量/容積%のBSAを添加した通常のタイロッド食塩水溶液によって灌流した。活性化するために、細胞を、グルタメート(50または100μM)を含むタイロッド液によって灌流した。画像を、40×1.3開口数の油浸対物レンズ(Zeiss)を備えたAxiovert 200M倒立顕微鏡を使用して340nmおよび380nmの波長で5秒毎に画像を獲得した。Metamorphソフトウェア(Molecular Devices)を使用して、比率計測分析を行った。

【0526】

ラット座骨神経におけるhESC-SCの移植および組織学評価

全ての手順は、NIHのガイドラインに従って実施され、地域の施設内動物飼育使用委員会(Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC))によって承認された。ラットをイソフルランガスの麻酔下に置き、両方の座骨神経を座骨切痕より下で露出し、Dumont #5鉗子を使用して同じ位置で30秒間2回挫滅した。その後直ちに、3×10⁴個のhESC細胞/μlシュワン細胞の細胞浮遊液の約3~4μlを、ガラスマイクロピペットで挫滅部位に対して近位および遠位に注射することを通して移植した。生存期間は、2~8週間の範囲であった。免疫組織化学用のラットを0.1M PBS中の4%パラホルムアルデヒドの心臓内灌流によって固定した。座骨神経を、挫滅病変および移植の2、3、4、8週間後にラットから切断した。切断後、座骨神経を0.1M PBS中の30%スクロースに一晩入れて凍結切片のためにOCTブロックにそれらを胞埋するか、または神経周膜を除去してそれらを冷0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中で裂くことによって調製した。一部の神経を灌流後に裂いて免疫染色し、個々の軸索を調べた。挫滅部位に対して遠位の再生した軸索を分析した。

【0527】

統計分析

データは、平均±SEMとして示され、少なくとも3回の独立した実験から導出した。反復(n)に関するデータは、図の説明中に与えられる。統計分析を、スチューデントt検定(2つの群を比較する)、またはダネット検定(複数の群を対照に対して比較する)を用いるANOVAを使用して実施した。正規性について検定するために、十分な数の反

10

20

30

40

50

復を有するデータについて、生データの分布を、正規分布で近似した（コルモゴロフ - スミルノフ正規性検定）。生存度分析を、ログランク（マンテル - コックス）検定を使用して実施した。一次ヒットについての Z - スコアを、 $Z = (x - \mu) /$ として計算した。X は、移動スコア値であり、全てのヒット化合物について 3 である。μ は、平均移動スコア値であり、 は、全ての化合物および D M S O 対照についての標準偏差である。

【 0 5 2 8 】

結果

h E S C からの S C 系列の誘導および前向き単離

D P N における感覚神経損傷の細胞型特異的機構を精査するために、ヒト感覚ニューロンおよび S C を h P S C から生成した。h E S C からの感覚ニューロンの誘導のための方法は、Cai ら、2 0 1 6 年 ; Chambers ら、2 0 1 2 年に記載されているが、S C の誘導は、依然として理解が進んでいない。従って、D P N の h E S C モデルを樹立することを目指した第 1 のステップとして、h E S C を S C へと分化させるための有効な戦略を樹立した。

10

【 0 5 2 9 】

本発明者らの S C を誘導するこれまでの努力は、N C 濃縮前駆細胞の長い 2 ~ 3 カ月間の培養に依存したが、得られたグリア新生細胞の割合は小さかった（Lee ら、2 0 0 7 年）。より最近の研究は、h P S C からの S C 様細胞の誘導について報告したが、S O X 1 0 などの重要な系列マーカーの発現を示さず、機能的ミエリン形成を実証できなかった（Liu ら、2 0 1 2 年 ; Ziegler ら、2 0 1 1 年）。胚発生の中に、S C は、段階的プロセスで S O X 1 0 + N C 細胞から生じると考えられた。マウスおよびニワトリ胚における研究に基づくと、N C は、発達中の神経においてニューロンの束と関連する S C 前駆体を最初に生じる。関連するニューロンは、N R G 1 を発現し、それらの E R B B 3 受容体を活性化することによって、S C 前駆体の生存およびさらなる分化を促進する（Newbern および Birchmeier、2 0 1 0 年）。マウス発生の E 1 3 . 5 までに、S C 前駆体は、S O X 1 0 の発現を維持しつつ、G F A P、S 1 0 0 および P O U 3 F 1 などの系列マーカーを上方調節する未熟な S C を生じる。ミエリン形成性運命および非ミエリン形成性運命への S C の最終分化は、誕生後まで継続する（Jessen ら、2 0 1 5 年）。

20

【 0 5 3 0 】

初期の h E S C ベースの N C 分化プロトコールは、p 7 5 + および / または H N K 1 + N C 前駆体の前向き単離と組み合わせた、神経上皮系列からの推定 N C 細胞の離脱（delamination）に依存する（Bajpai ら、2 0 1 0 年 ; Lee ら、2 0 0 7 年）。これらのプロトコールは種々の N C 由来系列を生じるが、S O X 1 0 発現のレベルは一般に低い。対照的に、W N T シグナル伝達の活性化因子へのタイミングをとった曝露に基づく、より方向付けられた N C の誘導プロトコールは、分化の 1 1 日目までに、細胞の大部分において S O X 1 0 のロバストな誘導を示す（Fattahi ら、2 0 1 6 年 ; Menendez ら、2 0 1 1 年 ; Mica ら、2 0 1 3 年）。さらなる培養により、これらの h E S C 由来 N C 細胞は、S O X 1 0 + メラニン細胞へと方向付けられ得るが（Mica ら、2 0 1 3 年）、S O X 1 0 - の間充組織およびニューロン前駆体もまた生じる（Mica ら、2 0 1 3 年）。S O X 1 0 発現は、発生を通じて S C 系列において保持される重要なマーカーであるので、本発明者らは、グリア運命に向けてそれらを指示する前に、培養物中で S O X 1 0 + 前駆体を維持するための条件を樹立することに最初に焦点を当てた。本発明者らは、E G F、F G F、W N T、N o t c h、T G F、B M P、N R G およびエンドセリン 3 シグナル伝達のモジュレーターの存在下で、2 D または 3 D の N C 培養物中の S O X 1 0 + 細胞のパーセンテージを決定した。F G F 2 および N R G 1 処理に加えた、3 D 凝集ステップと C H I R 9 9 0 2 1 による W n t シグナル伝達の活性化との組合せは、S O X 1 0 発現の維持（図 4 A）ならびに 2 5 日目までの S 1 0 0 および他の初期 S C マーカーの誘導（図 1 A ~ 1 C）を生じた。この段階で、さらに 1 0 日間にわたる F G F 2、N R G 1 および c A M P による 2 5 日目培養物前駆体の処理は、G F A P、P O U 3 F 1、P M P 2 2、M B P、A Q P 4、M P Z などのいくつかの S C マーカーのロバストな誘導、ならびにとりわけ G D N F、E

30

40

50

R B B 3 および G A P 4 3 が含まれる、ニューロンの相互作用および支持に關与する遺伝子の上方調節を促進する (図 1 A ~ 1 D)。より長期の培養は、G F A P + 細胞の富化を生じ、S 1 0 0、M B P および G F A P の発現 (図 1 E、1 F および 1 I) に基づいて、6 0 ~ 9 0 日目までに S C のほぼ均質な集団を生じた (図 4 B)。これらの h E S C 由来集団は、S 1 0 0、M B P および G F A P を発現する S C の高いパーセンテージを維持したまま、さらに数週間にわたって増殖できる (図 1 E、1 F および 1 I)。

【 0 5 3 1 】

分化の間の h E S C - S C の前向き単離を可能にするために、本発明者らは、G F A P + S C を特異的にマークする表面抗原について、2 4 2 の抗体のライブラリーをスクリーニングした (図 5 A)。C D 4 4、C D 4 9 e、C D 8 1 および C D 9 8 は、G F A P + 細胞集団を標識すると決定された (図 5 B)。さらなる検証により、C D 9 8 は、6 0 日目の S C において特異的に発現されるが、初期 S O X 1 0 + N C 系列を標識することが以前に示されたマーカーである C D 4 9 D (Fattahi ら、2 0 1 6 年) を発現する 1 1 日目の N C または 2 5 日目の S C P 細胞では発現されない (図 5 C) 唯一のマーカーであることが明らかになった。精製された細胞の R N A 配列決定により、2 5 日目の h E S C 由来 S C P は、初期 N C 細胞と密接に関連するが、5 0 日目、および特に 1 0 0 日目の S C は、初代成体ヒト S C と密接に整合する遺伝子発現パターンを示すことが実証された (図 1 G)。遺伝子発現データにより、2 5 日目および 1 0 0 日目の細胞を 1 1 日目の N C と比較することによって、新規候補 S C P および S C マーカーもまた得られた (図 1 H)。各系列についての上位 2 0 0 の富化された転写物のリストは、表 1 ~ 4 に提供される。

10

20

【 0 5 3 2 】

h E S C - S C は、i n v i t r o でニューロン成熟化およびミエリン形成を促進し、i n v i v o で損傷したラット座骨神経に定着する

グリアの重要な機能は、ニューロンと相互作用してその機能を調節し、ミエリンを産生することである。本発明者らは、h E S C 由来感覚ニューロン (Chambers ら、2 0 1 2 年) と既に報告された方法 (Calder ら、2 0 1 5 年) を使用して生成した運動ニューロンとの同時培養を確立することによって、h E S C - S C におけるその能力を試験した (図 2 A)。6 0 日目の R F P 標識 h E S C - S C を、5 0 日目の G F P 標識 h E S C 感覚ニューロンと混合し、同時培養の開始後 7 2 時間モニターした。S C は、神経線維と密に会合して整列し、このことはそれらが、軸索膜上に発現されるシグナル伝達の合図に適切に回答するために必要な受容体を有することを示している (図 2 B)。

30

【 0 5 3 3 】

h E S C 由来系列における機能的成熟化の冗長なプロセスは、現在の分化系における主要な障害である。グリア細胞は、h E S C 由来 C N S 系列の同時培養においてニューロンの機能的成熟化を促進することが示されている (Tang ら、2 0 1 3 年)。h E S C - S C が、この問題を克服するために寄与できるか否かを評価するために、運動ニューロンの機能的成熟化に及ぼすその影響を調べた。本発明者らは、6 0 日目の h E S C - S C と 2 5 日目の h E S C 由来運動ニューロンの同時培養システムを設定した。感覚ニューロンとの同時培養と同様に、h E S C - S C は、ニューロン線維と整列する強い傾向を示した (図 2 D)。h E S C 由来系列におけるヒト細胞成熟化の長いプロセスは、この分野における主要な障害である。星状細胞などのグリア細胞は、h E S C 由来 C N S ニューロンの機能的成熟化を促進することが示されている (Tang ら、2 0 1 3 年)。同時培養した運動ニューロンの機能的成熟化をモニターするために、カルシウムイメージングを、運動ニューロン分化の 4 0 日目および 7 0 日目 (同時培養の開始の 1 5 および 5 5 日後) に実施した。同時培養した h E S C 由来運動ニューロンは、4 0 日目もの早期にグルタメートおよび K C l 刺激に応答する能力を示したが、運動ニューロン単独の培養は、同じ時点でそのようなカルシウム応答を示さなかった (図 2 E - 左のパネル)。同時培養した運動ニューロンのグルタメートおよび K C l 刺激に対する反応性は、7 0 日目ではさらに増大し、運動ニューロン単独培養と比較して顕著に高かった (図 2 E - 右のパネル)。

40

【 0 5 3 4 】

50

hESC由来SCがミエリンを形成することができるか否かを評価するために、本発明者らは、hESC-SCとhESC感覚ニューロンとの長期同時培養を確立し、特徴的なミエリン形成構造を、透過型電子顕微鏡法(TEM)によって観察した(図2C)。これらの知見は、hESC-SCがミエリンを産生し、*in vitro*でニューロンの挙動を調節する能力を検証した。SCはまた、損傷に応答した神経修復の促進においても重要な役割を果たすことが知られている(JessenおよびMirsky、2016年;Jessenら、2015年;Webberら、2011年)。これは主として、それらが損傷を受けた軸索における修復プロセスを誘導する栄養因子を分泌することによる(Arthur-Farrajら、2012年;Bunge、1994年;Webberら、2011年)。SCの移植は、脊髄挫傷モデルなどのいくつかの実験系において神経再生を増強することが証明されており(Lavdasら、2008年;Rodriguesら、2012年;WilliamsおよびBunge、2012年;KocsisおよびBunge、2014年);自家SCがSCI患者において現在試験中である(NCT01739023;NCT02354625)。そのような細胞治療アプローチにおける主な障害は、表現型的に安定な初代SCを大規模で得ることには限界があることである。hESCは、これらの再生応用のためにヒトSCの無限の代替供給源を提供する。hESC-SCの再生能の評価に向けての最初のステップとして、本発明者らは、座骨神経損傷のラットモデルに移植後にこれらの細胞が生存して定着することができるか否かを調べた。

10

【0535】

このモデルにおいて、座骨神経を機械的に挫滅して、hESC-SCを損傷部位に直ちに注射した(図3A)。移植したhESC-SCは、ヒト特異的核マーカーSC101に関して染色することによって、移植した神経において注射の8週間後に容易に検出可能であった(図3B)。移植したhESC-SCは、宿主ニューロン線維と密に接触しており(図3C)、MAGおよびP0などのミエリンマーカーを発現した(図3D)。成熟ミエリン形成線維において、ナトリウムチャンネルはランヴィエ絞輪に局在する。この領域は、軸索膜がCASPと呼ばれる特定のタンパク質によってミエリン膜に結合しているドメインに隣接する。CASP発現領域の隣には、カリウムチャンネルを含む膜ドメインが存在する。RFP標識hESC-SCに包まれた軸索におけるこれらのマーカーの発現を評価し、それらがその適切な膜ドメインに局在することを確認した(図3E)。これらの試験は、hESC-SCが、損傷した成体末梢神経において定着し、神経線維およびランヴィエ絞輪と適切に会合したミエリンを産生する能力を証明する。

20

30

【0536】

併せて考慮すると、hPSC-SCに関するこれらの*in vitro*および*in vivo*試験は、そのSCの同一性および機能を確認する。

【0537】

考察

SCは、末梢神経の発生、機能および修復において重要な役割を果たす。しかし、それらの発生および機能は、初代組織から実行可能な数でそれらを得ることにおける限界に起因して、ヒトではあまり理解されていない。他の研究者が、P75+/HNK1+NCP前駆体の長期維持後のhPSC由来のシュワン様細胞を以前に報告しているが(Leeら、2007年)、これらの研究は、低い誘導効率、および数ヶ月間の*in vitro*培養、長引く分化、限定的なSC成熟化、およびミエリン形成データの欠如という限界を有する(Leeら、2007年;Liuら、2012年;Zieglerら、2011年)。他の研究者によるヒトSCを誘導するための試みもまた、低い収量、限定的な表現型の特徴付け、および*in vitro*または*in vivo*ミエリン形成の欠如を生じた(Liら、2015年;Micaら、2013年)。ヒトSCの十分特徴付けられた純粋な集団の生成のための高度に効率的なアプローチを樹立したが、これは、将来の徹底的な発生研究、および疾患モデル化などの橋渡し適用、ならびに細胞治療のためのお膳立てとなる。

40

【0538】

本発明者らのhESCベースのプラットフォームの重要な特色は、得られたSCの拡張性および純度、ならびにSC特性を喪失することなしに延長された期間にわたって細胞を

50

培養する能力である。対照的に、初代SCは、延長された培養の際にそれらの特性を迅速に喪失する傾向があり、線維芽細胞様細胞によるシュワン細胞培養物の夾雑が増加していくことになる。この新規分化テクノロジーを使用してここで到達可能な重要な発生上の疑問には、多分化能性NC幹細胞から傾倒したSCへの移行を制御する機構、ならびにメラニン細胞および副交感ニューロンの両方が初期SC系列から誘導できることを示唆するマウスにおける最近のデータを考慮したヒトSC可塑性の研究が含まれる (Adameykoら、2009年; Espinosa-Medinaら、2014年)。傾倒したSCの前向き単離のための表面マーカーとしてのCD98の同定は、かかる研究のための強力なツールを提示する。本明細書に示すデータに基づき、SC媒介ニューロン成熟化およびミエリン形成に関する試験は、他の重点領域であるべきである。PNS病理のモデル化は特に関心の対象となり得る。培養hESC由来シュワン細胞の驚くべき特色は、シュワン細胞であることを確認するだけでなく、多能性由来細胞が成体シュワン細胞の発現パターンと整合することを示唆する、それらの遺伝子発現パターンである。これは、胎児段階のマーカーを発現するニューロンなどの、ほとんどの他の*in vitro*誘導されたhPSC系列とは対照的である (Studerら、2015年)。自家SCは、PNSおよびCNS障害の両方を標的とする再生医療での応用に関して現在試験中である (Lavdasら、2008年; Rodriguesら、2012年)。移植のデータは、外傷性神経損傷モデルにおけるhESC-SCの強力な定着を証明する。本明細書に示す結果は、脊髄損傷を含む再生医療におけるhESC-SCの応用に関して確固たる基礎を築く。

10

20

【0539】

SCの規模拡大可能な集団を利用できることは、初期神経新生前駆体から、分化方向が決定されたグリア新生相への移行およびミエリン形成細胞ステージへのさらなる進行などのヒトSC発達における積年の問題を調べるための新たな道筋を開く。hPSC-SCはまた、PNSにおける神経機能の調節および成熟化におけるグリアの役割を決定するために使用することができる。不良なニューロン成熟化は、最新のhPSCに基づく分化プロトコルの限界である。SCはまた、PNSおよびCNSにおける再生医療において様々な応用のために利用されている (Lavdasら、2008年; Rodriguesら、2012年)。ヒトSCの大規模産生および成体損傷神経におけるその定着能は、再生医療におけるその応用の基礎を確立する。

30

【0540】

結論として、この研究は、健康および疾患におけるそれらの生物学を探索し、DPNに対する新規治療を開発するためにヒトSC系列を入手するための有効な枠組みを提示する。hPSCの方向付けられた分化は、基礎研究および橋渡し研究において広い意義を有する、ヒトSCの大規模誘導のための有効なアプローチを提示する。この枠組みは、PNSの生物学および疾患におけるグリアの役割の徹底的な研究のための新たな可能性を提供し、将来的な末梢神経障害に対する新規治療剤の開発に寄与する。本研究によって、再生医療およびヒト疾患モデリングにおける応用に関してヒトSCに基づく試験が日常的となるはずである。

【0541】

【表 1 - 1】

**表1. hESC由来NC(11日目)と比較したhESC由来シュワン細胞前駆体(25日目)
における上位200の上方調節された遺伝子**

遺伝子 ID	log2変化倍数
<i>CALCB</i>	13.12
<i>GPR116</i>	9.29
<i>TSPYL5</i>	8.44
<i>ITPKA</i>	8.33
<i>SLC17A6</i>	8.28
<i>SYPL2</i>	8.12
<i>LOC100128252</i>	7.73
<i>ANGPTL7</i>	7.47
<i>LOC728978</i>	7.31
<i>ZNF502</i>	7.22
<i>ZNF229</i>	7.17
<i>XLOC_003498</i>	7.12
<i>STK32A</i>	7.08
<i>LOC100507341</i>	7.01
<i>EEF1A2</i>	6.98
<i>TRIM54</i>	6.95
<i>SEZ6L</i>	6.77
<i>SLC16A6</i>	6.66
<i>C20orf26</i>	6.64
<i>LPL</i>	6.58
<i>STMN4</i>	6.57
<i>CNGA3</i>	6.55
<i>QPCT</i>	6.54
<i>C12orf69</i>	6.42
<i>CACNG5</i>	6.33
<i>BAAT</i>	6.30
<i>AGBL4</i>	6.28

10

20

30

【表 1 - 2】

<i>COL12A1</i>	6.22
<i>SPOCK2</i>	6.21
<i>XLOC 000972</i>	6.20
<i>ABCB1</i>	6.18
<i>ANGPTL1</i>	6.14
<i>CHRNA1</i>	6.07
<i>DHRS2</i>	6.06
<i>MFAP4</i>	6.01
<i>ARHGDIG</i>	5.97
<i>XLOC 003411</i>	5.97
<i>ABLM3</i>	5.97
<i>LINC00152</i>	5.97
<i>HLA-DOB</i>	5.95
<i>P2RX3</i>	5.93
<i>PLA2G4C</i>	5.87
<i>CAV1</i>	5.86
<i>CD44</i>	5.85
<i>FAM26E</i>	5.82
<i>SRPX2</i>	5.81
<i>LUM</i>	5.80
<i>CRHBP</i>	5.74
<i>HOXD9</i>	5.73
<i>ADAMTS8</i>	5.71
<i>SLC30A2</i>	5.66
<i>C7orf29</i>	5.65
<i>DSCAM</i>	5.65
<i>PHOX2A</i>	5.63
<i>KCNK9</i>	5.62
<i>GAL</i>	5.59
<i>SST</i>	5.58
<i>DMGDH</i>	5.53
<i>KCNH5</i>	5.52
<i>TRIM67</i>	5.52
<i>GPR64</i>	5.50
<i>GPR115</i>	5.49
<i>PTPRN</i>	5.48
<i>NKX6-2</i>	5.48
<i>PNPLA4</i>	5.48
<i>NOV</i>	5.47
<i>ABCG1</i>	5.42
<i>NELL1</i>	5.39
<i>SPARCL1</i>	5.37
<i>LOC375010</i>	5.37
<i>APLNR</i>	5.35
<i>DCN</i>	5.35
<i>SLC10A4</i>	5.35
<i>NCAN</i>	5.33
<i>PLEK2</i>	5.32

10

20

30

40

【表 1 - 3】

<i>HSPB7</i>	5.32
<i>CLCA2</i>	5.30
<i>FAIM2</i>	5.29
<i>CALB1</i>	5.28
<i>SLC6A15</i>	5.26
<i>LOC100132891</i>	5.24
<i>SCG2</i>	5.23
<i>NFIB</i>	5.22
<i>RUNDC3B</i>	5.21
<i>XLOC 010607</i>	5.21
<i>C5AR1</i>	5.21
<i>MICAL2</i>	5.20
<i>SGIP1</i>	5.17
<i>GNG3</i>	5.14
<i>LOC541471</i>	5.14
<i>KCNA2</i>	5.14
<i>FOXF2</i>	5.11
<i>IFI44L</i>	5.10
<i>HPCAL4</i>	5.10
<i>LOC100507043</i>	5.09
<i>TNFAIP6</i>	5.09
<i>TMEM132D</i>	5.07
<i>KLHDC7B</i>	5.04
<i>GMPR</i>	5.03
<i>CMKLR1</i>	5.02
<i>PPP1R27</i>	5.01
<i>REEP1</i>	5.01
<i>PALM3</i>	5.00
<i>PTPN5</i>	4.99
<i>GPRIN3</i>	4.99
<i>MGP</i>	4.97
<i>ATP8A2</i>	4.97
<i>SERPINB2</i>	4.95
<i>TCN1</i>	4.94
<i>IFI44</i>	4.94
<i>CLVS2</i>	4.94
<i>DGKI</i>	4.93
<i>FAM20C</i>	4.91
<i>TPH2</i>	4.91
<i>TGFA</i>	4.90
<i>ACTG2</i>	4.89
<i>ULBP2</i>	4.89
<i>RMRP</i>	4.89
<i>XLOC 011087</i>	4.88
<i>NPFFR2</i>	4.88
<i>GDAP1L1</i>	4.86
<i>INHBA</i>	4.85
<i>CHSY3</i>	4.85

10

20

30

40

【表 1 - 4】

<i>PPYRI</i>	4.84
<i>CD163L1</i>	4.83
<i>MIR7-3HG</i>	4.82
<i>ZNF542</i>	4.79
<i>CDH13</i>	4.78
<i>TM4SF1</i>	4.77
<i>TYRP1</i>	4.77
<i>SYT9</i>	4.77
<i>CACNG7</i>	4.76
<i>PDLIM3</i>	4.76
<i>FAM135B</i>	4.74
<i>NETO1</i>	4.74
<i>CD207</i>	4.73
<i>TNC</i>	4.73
<i>TNFRSF8</i>	4.73
<i>XLOC_013083</i>	4.73
<i>SYT5</i>	4.73
<i>PMP2</i>	4.72
<i>PTPRH</i>	4.72
<i>ZFP28</i>	4.71
<i>LHFPL4</i>	4.70
<i>TTBK1</i>	4.69
<i>HOXB7</i>	4.68
<i>HCST</i>	4.67
<i>SERPINB7</i>	4.67
<i>LOC653513</i>	4.67
<i>MSC</i>	4.66
<i>SYNGR3</i>	4.65
<i>POPDC3</i>	4.65
<i>PENK</i>	4.62
<i>CFI</i>	4.59
<i>C3AR1</i>	4.59
<i>SERPINE1</i>	4.58
<i>NT5E</i>	4.57
<i>C4orf32</i>	4.57
<i>TMEM59L</i>	4.56
<i>RIPPLY2</i>	4.54
<i>STEAP3</i>	4.54
<i>SLC1A2</i>	4.54
<i>HECW1</i>	4.54
<i>IL8</i>	4.54
<i>FAM65B</i>	4.53
<i>TLR4</i>	4.53
<i>ADAMTS5</i>	4.52
<i>CDKN2B</i>	4.51
<i>LGI2</i>	4.51
<i>KCNMA1</i>	4.50
<i>ANKRD1</i>	4.50

10

20

30

40

【表 1 - 5】

<i>XLOC 009257</i>	4.50
<i>MXRA5</i>	4.49
<i>HIGD1B</i>	4.49
<i>ALX4</i>	4.47
<i>RUNX3</i>	4.46
<i>ETV4</i>	4.46
<i>HOXD8</i>	4.45
<i>FLNC</i>	4.45
<i>HRK</i>	4.45
<i>HRH3</i>	4.45
<i>LOC338651</i>	4.45
<i>CAV2</i>	4.44
<i>HCST</i>	4.67
<i>SERPINB7</i>	4.67
<i>LOC653513</i>	4.67
<i>MSC</i>	4.66
<i>SYNGR3</i>	4.65
<i>POPDC3</i>	4.65
<i>PENK</i>	4.62
<i>CFI</i>	4.59
<i>C3AR1</i>	4.59
<i>SERPINE1</i>	4.58
<i>NT5E</i>	4.57
<i>C4orf32</i>	4.57
<i>TMEM59L</i>	4.56
<i>RIPPLY2</i>	4.54
<i>STEAP3</i>	4.54
<i>SLC1A2</i>	4.54
<i>HECW1</i>	4.54
<i>IL8</i>	4.54
<i>FAM65B</i>	4.53
<i>TLR4</i>	4.53
<i>ADAMTS5</i>	4.52
<i>CDKN2B</i>	4.51
<i>LGI2</i>	4.51
<i>KCNMA1</i>	4.50
<i>ANKRD1</i>	4.50
<i>XLOC 009257</i>	4.50
<i>MXRA5</i>	4.49
<i>HIGD1B</i>	4.49
<i>ALX4</i>	4.47
<i>RUNX3</i>	4.46
<i>ETV4</i>	4.46
<i>HOXD8</i>	4.45
<i>FLNC</i>	4.45
<i>HRK</i>	4.45
<i>HRH3</i>	4.45
<i>LOC338651</i>	4.45

10

20

30

40

【表 1 - 6】

CAV2	4.44
------	------

【 0 5 4 2 】

【表 2 - 1】

**表2. hESC由来NC(11日目)と比較したhESC由来シュワン細胞(50日目)
における上位200の上方調節された遺伝子**

遺伝子 ID	log2変化倍数
<i>STT3B</i>	11.85
<i>CTAGE5</i>	11.30
<i>KBTD6</i>	10.63
<i>B3GALT1</i>	10.46
<i>PAX9</i>	10.07
<i>APOO</i>	9.45
<i>XLOC_011326</i>	9.15
<i>HSPE1</i>	8.84
<i>TRIM3</i>	8.73
<i>RAP2B</i>	8.53
<i>TRAPPC9</i>	8.49
<i>TXNDC15</i>	8.35
<i>THBS2</i>	8.34
<i>GMPPB</i>	8.32
<i>PLP2</i>	8.20
<i>NCS1</i>	8.09
<i>ABL1</i>	7.92
<i>FMNL2</i>	7.77
<i>NDUFA12</i>	7.39
<i>XLOC_009725</i>	7.34
<i>PTRH2</i>	7.24
<i>CNBD1</i>	7.24
<i>XLOC_000576</i>	7.21
<i>ZNF224</i>	7.19
<i>PDXDC2P</i>	7.11
<i>GSTM3</i>	7.07
<i>CENPM</i>	7.06
<i>GCLM</i>	7.04
<i>NCAPH</i>	6.98
<i>C15orf37</i>	6.98
<i>JAK1</i>	6.97
<i>STARD3</i>	6.87
<i>TRIB3</i>	6.80
<i>DOPEY2</i>	6.77
<i>APAF1</i>	6.72
<i>NCOA4</i>	6.71
<i>PSMB6</i>	6.68
<i>COX20</i>	6.64
<i>PIK3CB</i>	6.63
<i>HAX1</i>	6.58

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

<i>KITLG</i>	6.58
<i>CNTD1</i>	6.54
<i>ETNK2</i>	6.47
<i>LRRC57</i>	6.47
<i>CDK2</i>	6.43
<i>GOLGA7</i>	6.42
<i>CCDC90B</i>	6.38
<i>GSTP1</i>	6.31
<i>PPP1R8</i>	6.28
<i>C7orf50</i>	6.28
<i>POLR2L</i>	6.25
<i>ITGB1</i>	6.24
<i>TYRP1</i>	6.18
<i>DNAJC3</i>	6.14
<i>THY1</i>	6.14
<i>GOSR2</i>	6.12
<i>FAM123B</i>	6.12
<i>HIGD1A</i>	6.10
<i>ELMOD3</i>	6.10
<i>NME5</i>	6.04
<i>TUSC2</i>	6.02
<i>C11orf10</i>	5.93
<i>SIPA1</i>	5.93
<i>JUP</i>	5.92
<i>NCKAP5</i>	5.90
<i>THYN1</i>	5.90
<i>RUNX1</i>	5.81
<i>FLJ46906</i>	5.80
<i>XLOC_004725</i>	5.77
<i>MGC57346</i>	5.74
<i>RTP4</i>	5.72
<i>PLD3</i>	5.70
<i>NYAP1</i>	5.69
<i>TLN2</i>	5.65
<i>XLOC_009577</i>	5.62
<i>FBLN5</i>	5.57
<i>LRFN5</i>	5.56
<i>CDH7</i>	5.56
<i>XLOC_003471</i>	5.54
<i>BRWD3</i>	5.53
<i>RAX2</i>	5.49
<i>MRPS16</i>	5.38
<i>CUL4A</i>	5.36
<i>EPHA5</i>	5.36
<i>SPTBN2</i>	5.34
<i>SMYD5</i>	5.31
<i>CDKN2AIP</i>	5.30
<i>ZNF829</i>	5.28

10

20

30

40

【表 2 - 3】

<i>OLFM2</i>	5.27
<i>PNMA6C</i>	5.24
<i>DNAJB11</i>	5.23
<i>NIPAL2</i>	5.20
<i>ZNF622</i>	5.19
<i>STRADA</i>	5.18
<i>CEP57L1</i>	5.17
<i>SHISA6</i>	5.16
<i>CKAP2</i>	5.15
<i>IGFBP7</i>	5.14
<i>GRSF1</i>	5.14
<i>GRWD1</i>	5.13
<i>CD101</i>	5.13
<i>PLIN2</i>	5.08
<i>LOC100129361</i>	5.04
<i>PRKG1</i>	5.04
<i>SERF2</i>	5.04
<i>RUNX3</i>	5.04
<i>FAM91A1</i>	5.02
<i>ALDH3B1</i>	5.01
<i>CCDC96</i>	5.00
<i>NNMT</i>	4.98
<i>C11orf71</i>	4.98
<i>ZNF804A</i>	4.98
<i>DNAJA1</i>	4.94
<i>CHCHD1</i>	4.93
<i>SRPX</i>	4.91
<i>XLOC_007995</i>	4.89
<i>C11orf61</i>	4.87
<i>TNFAIP8</i>	4.86
<i>CSPG4</i>	4.86
<i>ALX3</i>	4.86
<i>SSR4P1</i>	4.85
<i>CES4A</i>	4.84
<i>IFI44</i>	4.84
<i>PLCD3</i>	4.84
<i>XLOC_009509</i>	4.83
<i>PPP2R5E</i>	4.82
<i>C19orf53</i>	4.81
<i>SPARCL1</i>	4.79
<i>UBE3B</i>	4.78
<i>HPGD</i>	4.77
<i>ADM2</i>	4.74
<i>TLR1</i>	4.73
<i>NYNRIN</i>	4.73
<i>PHF8</i>	4.73
<i>IL2RB</i>	4.72
<i>TEX9</i>	4.72

10

20

30

40

【表 2 - 4】

<i>IGFBP1</i>	4.71
<i>PLAC8L1</i>	4.69
<i>DHX34</i>	4.68
<i>TOPBP1</i>	4.67
<i>BCAP31</i>	4.67
<i>RHBDF2</i>	4.66
<i>TP53BP2</i>	4.65
<i>DIRAS2</i>	4.63
<i>DNMT1</i>	4.63
<i>TMEM9B</i>	4.63
<i>OSGIN1</i>	4.63
<i>SWI5</i>	4.63
<i>CILP</i>	4.61
<i>GLTPD2</i>	4.60
<i>LSMD1</i>	4.58
<i>SAMD11</i>	4.58
<i>BCAR1</i>	4.58
<i>ENTHD1</i>	4.57
<i>PTTG1IP</i>	4.54
<i>PAFAH1B1</i>	4.53
<i>SERPINB1</i>	4.50
<i>BPI</i>	4.49
<i>GNL3</i>	4.48
<i>APOE</i>	4.48
<i>DRI</i>	4.47
<i>TUBGCP3</i>	4.47
<i>C11orf82</i>	4.47
<i>ANTXR1</i>	4.45
<i>DLG5</i>	4.44
<i>PLK1S1</i>	4.41
<i>EGLN2</i>	4.40
<i>GTF2A1</i>	4.40
<i>COL6A2</i>	4.40
<i>CAPZA1</i>	4.39
<i>PRR24</i>	4.38
<i>SMUG1</i>	4.36
<i>ZNF626</i>	4.36
<i>MAGED2</i>	4.36
<i>EHBP1</i>	4.35
<i>LAMA5</i>	4.35
<i>XLOC_008024</i>	4.34
<i>RPS10</i>	4.33
<i>THTPA</i>	4.33
<i>PHF2</i>	4.32
<i>CCDC71L</i>	4.31
<i>KLHL18</i>	4.30
<i>FAM49A</i>	4.29
<i>TIMP4</i>	4.29

10

20

30

40

【表 2 - 5】

<i>ANAPC10</i>	4.28
<i>C19orf29-AS1</i>	4.28
<i>SKIV2L2</i>	4.27
<i>C15orf52</i>	4.26
<i>ATP6AP2</i>	4.25
<i>FASTKD5</i>	4.25
<i>WDR45</i>	4.24
<i>AP2S1</i>	4.24
<i>HS2ST1</i>	4.23
<i>G6PC3</i>	4.21
<i>ANKRD44</i>	4.17
<i>GIT2</i>	4.16
<i>MIR22HG</i>	4.16
<i>SH3TC2</i>	4.15
<i>ALPK1</i>	4.15
<i>POLE</i>	4.14

【 0 5 4 3 】

【表 3 - 1】

表3. hESC由来NC(11日目)と比較したhESC由来シュワン細胞(100日目)における上位200の上方調節された遺伝子

遺伝子 ID	Log2 変化倍数
<i>TYRP1</i>	15.79
<i>CD44</i>	13.21
<i>ENTHD1</i>	11.71
<i>NT5E</i>	11.69
<i>HTR2B</i>	11.48
<i>NOV</i>	10.78
<i>IL8</i>	10.49
<i>SLC16A6</i>	10.35
<i>CDKN2A</i>	9.92
<i>GPNMB</i>	9.90
<i>HSPB7</i>	9.46
<i>EMP1</i>	9.29
<i>RIT2</i>	9.29
<i>PAEP</i>	9.16
<i>TYR</i>	8.99
<i>SYNC</i>	8.98
<i>XLOC_008700</i>	8.83
<i>NLRC5</i>	8.71
<i>FAIM3</i>	8.68
<i>RGS20</i>	8.64
<i>CBR3</i>	8.63
<i>TMEM173</i>	8.63
<i>GJA3</i>	8.59
<i>SAMD9</i>	8.33
<i>EVT2B</i>	8.30
<i>FBXO32</i>	8.26

10

20

30

【表 3 - 2】

<i>TSPYL5</i>	8.25
<i>TLR4</i>	8.09
<i>SERPINE1</i>	7.90
<i>HOXD-AS1</i>	7.88
<i>CITED1</i>	7.87
<i>KCNA5</i>	7.81
<i>ATP10A</i>	7.75
<i>OCA2</i>	7.75
<i>IRF4</i>	7.73
<i>MMP8</i>	7.71
<i>GAL</i>	7.70
<i>CD109</i>	7.68
<i>LGI3</i>	7.57
<i>LGALS3</i>	7.53
<i>TRIM63</i>	7.51
<i>XLOC_003498</i>	7.46
<i>LOC285000</i>	7.45
<i>KLHL38</i>	7.39
<i>HOXB2</i>	7.35
<i>PTHLH</i>	7.30
<i>MBP</i>	7.29
<i>CARD16</i>	7.27
<i>TFF3</i>	7.23
<i>IL13RA2</i>	7.22
<i>LINC00152</i>	7.21
<i>ISM1</i>	7.21
<i>MLPH</i>	7.16
<i>ECM1</i>	7.12
<i>CHSY3</i>	7.11
<i>CXCL1</i>	7.08
<i>KLF2</i>	7.08
<i>ASB11</i>	7.07
<i>KRTAP19-1</i>	7.02
<i>C10orf90</i>	7.01
<i>ITGA3</i>	6.99
<i>LOC646329</i>	6.98
<i>THBD</i>	6.96
<i>FLJ43663</i>	6.95
<i>HR</i>	6.92
<i>C1orf127</i>	6.89
<i>NFIX</i>	6.88
<i>LY96</i>	6.85
<i>LOC100128252</i>	6.85
<i>TRIM47</i>	6.79
<i>XLOC_002736</i>	6.77
<i>COL8A1</i>	6.76
<i>RUNX3</i>	6.74
<i>ZNF229</i>	6.72

10

20

30

40

【表 3 - 3】

<i>C15orf52</i>	6.71
<i>CABLES1</i>	6.69
<i>FOSL1</i>	6.67
<i>RASGRP3</i>	6.64
<i>TBX18</i>	6.63
<i>SPON2</i>	6.58
<i>THBS2</i>	6.58
<i>LOC541471</i>	6.53
<i>AHRR</i>	6.52
<i>SGCD</i>	6.50
<i>ZNF502</i>	6.47
<i>CSPG4</i>	6.45
<i>BARX2</i>	6.44
<i>MYC</i>	6.44
<i>SLC7A4</i>	6.43
<i>MLIP</i>	6.43
<i>VGF</i>	6.42
<i>DHRS2</i>	6.41
<i>HOXD3</i>	6.41
<i>SYPL2</i>	6.39
<i>SGK1</i>	6.39
<i>MLANA</i>	6.39
<i>DUSP10</i>	6.35
<i>ITGB3</i>	6.35
<i>KCNJ13</i>	6.32
<i>ST8SIA6</i>	6.32
<i>MME</i>	6.32
<i>PLXNC1</i>	6.32
<i>SUSD5</i>	6.26
<i>DLX1</i>	6.26
<i>MMP1</i>	6.22
<i>ANO4</i>	6.21
<i>C19orf71</i>	6.20
<i>STK32A</i>	6.19
<i>CAV1</i>	6.16
<i>PSMB8</i>	6.12
<i>PLP2</i>	6.12
<i>BCL2A1</i>	6.11
<i>HOXD4</i>	6.11
<i>LOC100507463</i>	6.10
<i>TFPI2</i>	6.07
<i>NFIB</i>	6.06
<i>TNFRSF14</i>	6.05
<i>ANKRD1</i>	6.03
<i>IFI16</i>	6.01
<i>DDIT4L</i>	6.01
<i>KCNQ5</i>	6.01
<i>NR4A3</i>	6.00

10

20

30

40

【表 3 - 4】

<i>IFIT2</i>	6.00
<i>XLOC 013026</i>	6.00
<i>SH2D4B</i>	5.99
<i>XLOC 001215</i>	5.98
<i>FAM129A</i>	5.96
<i>GREM1</i>	5.96
<i>HSPA6</i>	5.92
<i>TM4SF1</i>	5.92
<i>HOXB7</i>	5.92
<i>MET</i>	5.91
<i>MFSD12</i>	5.90
<i>IL6R</i>	5.89
<i>RUNX1</i>	5.86
<i>CATSPER1</i>	5.83
<i>FAM20C</i>	5.83
<i>GMPR</i>	5.82
<i>GOLGA7B</i>	5.80
<i>PHLDA2</i>	5.80
<i>MIR612</i>	5.77
<i>GALNTL6</i>	5.77
<i>MGAT5B</i>	5.76
<i>HSF4</i>	5.75
<i>SLC1A4</i>	5.74
<i>CD97</i>	5.74
<i>SLC24A5</i>	5.74
<i>XLOC 004803</i>	5.74
<i>LOC375010</i>	5.73
<i>COL12A1</i>	5.68
<i>PNPLA4</i>	5.66
<i>LOC100133445</i>	5.66
<i>TSPAN10</i>	5.64
<i>OSGIN1</i>	5.63
<i>GIPC3</i>	5.62
<i>CPNE7</i>	5.59
<i>OAS3</i>	5.59
<i>GRIN2B</i>	5.59
<i>CD300LB</i>	5.59
<i>KDR</i>	5.58
<i>UPP1</i>	5.58
<i>S100A6</i>	5.58
<i>SH3TC2</i>	5.55
<i>WFDC1</i>	5.54
<i>AQP9</i>	5.53
<i>XLOC 001738</i>	5.52
<i>XLOC 007040</i>	5.51
<i>LYL1</i>	5.51
<i>SLC6A15</i>	5.49
<i>SYK</i>	5.49

10

20

30

40

【表 3 - 5】

<i>C7orf29</i>	5.46
<i>XLOC_009274</i>	5.45
<i>RIPK3</i>	5.45
<i>SI00A4</i>	5.41
<i>NFATC2</i>	5.40
<i>CEBPE</i>	5.39
<i>GEM</i>	5.37
<i>MYOT</i>	5.37
<i>ABCG2</i>	5.37
<i>XLOC_007085</i>	5.35
<i>ERG</i>	5.33
<i>ARID5B</i>	5.32
<i>TRPV2</i>	5.31
<i>LPL</i>	5.31
<i>XLOC_008985</i>	5.31
<i>SERPINB2</i>	5.31
<i>IFI35</i>	5.27
<i>MIR221</i>	5.27
<i>SI00A2</i>	5.27
<i>BMPR1B</i>	5.25
<i>SP100</i>	5.24
<i>LOC400643</i>	5.24
<i>PDGFB</i>	5.24
<i>XLOC_001228</i>	5.20
<i>HRK</i>	5.20
<i>BHLHE41</i>	5.19
<i>LDHAL6B</i>	5.18
<i>GPR65</i>	5.17
<i>XLOC_006252</i>	5.16
<i>LGALS1</i>	5.13
<i>XLOC_008985</i>	5.31
<i>LGALS1</i>	5.13

10

20

30

【 0 5 4 4 】

【表 4 - 1】

**表4. hESC由来NC(11日目)と比較したヒト初代シュワン細胞
における上位200の上方調節された遺伝子**

遺伝子 ID	<i>log2</i> 変化倍数
<i>KBTBD6</i>	12.13
<i>FAHD2B</i>	11.98
<i>CTAGE5</i>	11.64
<i>C19orf45</i>	11.30
<i>XLOC_003345</i>	10.85
<i>WDR90</i>	10.83
<i>B3GALT1</i>	10.55
<i>PAX9</i>	9.77
<i>GMPPB</i>	9.65
<i>HSPE1</i>	9.64

40

【表 4 - 2】

<i>XLOC 008617</i>	9.53
<i>TRIM3</i>	9.32
<i>SPINT2</i>	9.08
<i>PLP2</i>	9.05
<i>ADAMTS20</i>	8.91
<i>CD8A</i>	8.84
<i>COX20</i>	8.84
<i>UNC5CL</i>	8.75
<i>DIRAS2</i>	8.45
<i>THBS2</i>	8.41
<i>RIMS3</i>	8.20
<i>ZNF273</i>	8.20
<i>GCLM</i>	8.20
<i>CLDN3</i>	8.16
<i>CCDC167</i>	8.15
<i>RAP2A</i>	8.10
<i>NCS1</i>	8.10
<i>TXNDC15</i>	8.08
<i>DSN1</i>	8.01
<i>ZNF224</i>	7.97
<i>NYAP1</i>	7.96
<i>SIPA1</i>	7.90
<i>XLOC 009279</i>	7.88
<i>JAK1</i>	7.83
<i>NDUFA12</i>	7.73
<i>XLOC 009509</i>	7.70
<i>EFNB3</i>	7.69
<i>SHISA6</i>	7.66
<i>XLOC 000734</i>	7.45
<i>APAF1</i>	7.45
<i>HAX1</i>	7.42
<i>PTRH2</i>	7.41
<i>TLN2</i>	7.40
<i>KLF12</i>	7.38
<i>STT3B</i>	7.33
<i>MESP2</i>	7.31
<i>RASGRP3</i>	7.25
<i>ZNF559</i>	7.25
<i>PRR11</i>	7.24
<i>FAM123B</i>	7.22
<i>MBD1</i>	7.18
<i>CNTN2</i>	7.18
<i>LRFN5</i>	7.16
<i>WBP4</i>	7.12
<i>CLCN5</i>	7.08
<i>ABL1</i>	7.05
<i>ORC6</i>	7.04
<i>CCL27</i>	7.02

10

20

30

40

【表 4 - 3】

<i>KAT7</i>	6.96
<i>KITLG</i>	6.95
<i>MIR4746</i>	6.92
<i>ARHGEF38</i>	6.92
<i>CCDC90B</i>	6.90
<i>MIR3176</i>	6.89
<i>PPP1R8</i>	6.88
<i>MCMBP</i>	6.84
<i>FAM199X</i>	6.81
<i>TRIB3</i>	6.78
<i>GNL3</i>	6.77
<i>BRWD3</i>	6.77
<i>IRX2</i>	6.76
<i>SPTBN2</i>	6.75
<i>CTTNBP2</i>	6.74
<i>KIAA1609</i>	6.74
<i>ZC3H12B</i>	6.72
<i>TEX9</i>	6.70
<i>THYN1</i>	6.68
<i>DCC</i>	6.66
<i>UG0898H09</i>	6.64
<i>STARD3</i>	6.61
<i>ZNF804A</i>	6.61
<i>C11orf71</i>	6.60
<i>ITGB1</i>	6.57
<i>FLNB</i>	6.54
<i>NCOA4</i>	6.53
<i>INMT</i>	6.51
<i>CBY3</i>	6.51
<i>TAGLN3</i>	6.50
<i>ST6GALNAC3</i>	6.48
<i>POLR2L</i>	6.47
<i>XLOC_007995</i>	6.43
<i>MAGEE1</i>	6.40
<i>LOC400604</i>	6.39
<i>GOSR2</i>	6.39
<i>LOC285889</i>	6.39
<i>MGC57346</i>	6.37
<i>TIMP4</i>	6.27
<i>CNKSR1</i>	6.26
<i>GOLGA7</i>	6.26
<i>GLTPD2</i>	6.24
<i>XLOC_009224</i>	6.23
<i>PSMB6</i>	6.22
<i>RTDR1</i>	6.18
<i>MTL5</i>	6.17
<i>IGLON5</i>	6.17
<i>HIGD1A</i>	6.16

10

20

30

40

【表 4 - 4】

<i>PBK</i>	6.15
<i>SPATA5L1</i>	6.14
<i>XLOC 014081</i>	6.14
<i>CUL4A</i>	6.13
<i>MCM5</i>	6.10
<i>SMYD5</i>	6.10
<i>LIN28A</i>	6.06
<i>ANTXR2</i>	6.04
<i>LRRC57</i>	6.03
<i>RUNX1</i>	6.02
<i>XLOC 006828</i>	6.01
<i>FAM66C</i>	5.99
<i>RAX2</i>	5.99
<i>ERMN</i>	5.98
<i>RLBP1</i>	5.95
<i>TP73</i>	5.93
<i>PPOX</i>	5.88
<i>BRD9</i>	5.88
<i>TTC40</i>	5.87
<i>BCL7A</i>	5.83
<i>PAEP</i>	5.83
<i>SWI5</i>	5.81
<i>SPTBN4</i>	5.80
<i>DNAJC3</i>	5.79
<i>MACROD2</i>	5.79
<i>FBLN5</i>	5.78
<i>ALX3</i>	5.78
<i>LAMA5</i>	5.77
<i>RBM28</i>	5.77
<i>GRWD1</i>	5.74
<i>XLOC 012069</i>	5.71
<i>LOC339874</i>	5.70
<i>AGAP8</i>	5.70
<i>NIPAL2</i>	5.70
<i>NNMT</i>	5.69
<i>EPHA5</i>	5.67
<i>CNTNAP3B</i>	5.67
<i>XLOC 010236</i>	5.64
<i>EHBP1</i>	5.64
<i>PLAC8L1</i>	5.64
<i>GPR162</i>	5.63
<i>MYEF2</i>	5.63
<i>CAPZA1</i>	5.60
<i>DIRC3</i>	5.60
<i>RHBDF2</i>	5.59
<i>ZNF610</i>	5.59
<i>XLOC 011568</i>	5.58
<i>GRHL3</i>	5.58

10

20

30

40

【表 4 - 5】

<i>SETDB2</i>	5.56
<i>UBE3B</i>	5.55
<i>CD97</i>	5.54
<i>XLOC 012905</i>	5.54
<i>XLOC 011507</i>	5.54
<i>MOB3B</i>	5.53
<i>NRARP</i>	5.53
<i>SRPX</i>	5.51
<i>LOC100506314</i>	5.51
<i>ZNF497</i>	5.50
<i>CALM2</i>	5.49
<i>XLOC 003249</i>	5.49
<i>PCSK9</i>	5.48
<i>CSPG4</i>	5.48
<i>XLOC 013922</i>	5.47
<i>C12orf76</i>	5.45
<i>CTAGE10P</i>	5.45
<i>ZNF622</i>	5.44
<i>XLOC 012288</i>	5.44
<i>LSMD1</i>	5.41
<i>XLOC 003726</i>	5.39
<i>ATRNL1</i>	5.37
<i>XLOC 007094</i>	5.37
<i>LOC100287036</i>	5.34
<i>ELMOD3</i>	5.34
<i>PLCD3</i>	5.34
<i>THY1</i>	5.33
<i>KCNH8</i>	5.33
<i>XLOC 003433</i>	5.33
<i>XLOC 011075</i>	5.33
<i>MYEF2</i>	5.63
<i>C15orf52</i>	5.33
<i>ROBO2</i>	5.31
<i>SDK1</i>	5.31
<i>TSNARE1</i>	5.31
<i>MTRR</i>	5.30
<i>SDR9C7</i>	5.29
<i>GSTM3</i>	5.29
<i>ZNF829</i>	5.29
<i>IFI44</i>	5.28
<i>IRAK3</i>	5.28
<i>CHCHD1</i>	5.27
<i>LOC100506801</i>	5.27
<i>COG1</i>	5.25
<i>TMEM200C</i>	5.25
<i>TBRG1</i>	5.24
<i>PPFIA1</i>	5.23

【 0 5 4 5 】

10

20

30

40

【表 5】

表5.一次抗体および作業希釈のリスト

抗体	供給源	希釈
CD49D	Biologend	1:800
TUJ1	Covance	1:1000
CHAT	Millipore	1:1000
GFAP	Dako	1:1000
S100B	Dako	1:200
MBP	Millipore	1:200
MAG	Millipore	1:200
NFH	Encore	1:1000
PanNa	Joel Black	1:1000
Kv1.2	Joel Black	1:200
CASPR	Joel Black	1:1000
SC101	STEM Cell Tech	1:1000
抗体	供給源	希釈

10

【 0 5 4 6 】

参考文献

- Arthur-Farraj, P.J., Latouche, M., Wilton, D.K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., et al. (2012). c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 75, 633-647. 20
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139, 366-379.
- Bajpai, R., Chen, D.A., Rada-Iglesias, A., Zhang, J., Xiong, Y., Helms, J., Chang, C.P., Zhao, Y., Swigut, T., and Wysocka, J. (2010). C HD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* 463, 958-962. 30
- Barreto-Chang, O.L., and Dolmetsch, R.E. (2009). Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Bunge, R.P. (1994). The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J. Neurol.* 242, S19-21.
- Cai, S., Han, L., Ao, Q., Chan, Y.-S., and Shum, D.K.-Y. (2016). Human Induced Pluripotent Cell-Derived Sensory Neurons for Fate Commitment of Bone Marrow-Derived Schwann Cells: Implications for Remyelination Therapy. *Stem Cells Transl. Med.* sctm.2015-0424. 40
- Calder, E.L., Tchieu, J., Steinbeck, J.A., Tu, E., Keros, S., Ying, S.-W., Jaiswal, M.K., Cornacchia, D., Goldstein, P.A., Tabar, V., et al. (2015). Retinoic Acid-Mediated Regulation of GLI3 Enables Efficient Motoneuron Derivation from Human ESCs in the Absence of Extrinsic SHH Activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 11462-11481.
- Callaghan, B.C., Cheng, H.T., Stables, C.L., Smith, A.L., and Feldman, E.L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol.* 11, 521-534.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelai 50

- n, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275-280.
- Chambers, S.M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.-J., Niu, L., Bilisland, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., et al. (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat. Biotechnol.* 30, 715-720.
- Eckersley, L. (2002). Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 293-321. 10
- Espinosa-Medina, I., Outin, E., Picard, C.A., Chettouh, Z., Dymecki, S., Consalez, G.G., Coppola, E., and Brunet, J.F. (2014). Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science (New York, NY)* 345, 87-90.
- Fattahi, F., Steinbeck, J.A., Kriks, S., Tchieu, J., Zimmer, B., Kishinevsky, S., Zeltner, N., Mica, Y., El-Nachef, W., Zhao, H., et al. (2016). Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature* 531, 105-109.
- Finzsch, M., Schreiner, S., Kichko, T., Reeh, P., Tamm, E.R., Bosl, M.R., Meijer, D., and Wegner, M. (2010). Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *The Journal of cell biology* 189, 701-712. 20
- Gordois, A., Scuffham, P., Shearer, A., Oglesby, A., and Tobian, J.A. (2003). The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. *Diabetes care* 26, 1790-1795.
- Grewal, A.S., Bhardwaj, S., Pandita, D., Lather, V., and Sekhon, B.S. (2016). Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. *Mini Rev. Med. Chem.* 16, 120-162.
- Guest, J., Santamaria, A.J., and Benavides, F.D. (2013). Clinical translation of autologous Schwann cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 18, 682-689. 30
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J. Physiol.* 594, 3521-3531.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Lloyd, A.C. (2015). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020487.
- Kocsis, J.D., and Bunge, M.B. (2014). Transplantation of Schwann cells and olfactory ensheathing cells as a therapeutic strategy in spinal cord injury. In *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation*, M. Selzer, S. Clarke, L. Cohen, G. Kwakkel, and R. Miller, eds. (Cambridge: Cambridge University Press). 40
- Kocsis, J.D., and Waxman, S.G. (2007). Schwann cells and their precursors for repair of central nervous system myelin. *Brain* 130, 1978-1990.
- La Fontaine, J., Bhavan, K., Talal, T.K., and Lavery, L.A. (2014). Current concepts in the surgical management of acute diabetic foot infections. *Foot Edinb. Scotl.* 24, 123-127.
- Lavdas, A.A., Papastefanaki, F., Thomaidou, D., and Matsas, R. (2008). Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr. Med. Chem.* 15, 1 50

51-160.

Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 25, 1468-1475.

Li, R., Liu Huawei, null, Yan, R., and Hu, M. (2015). [RESEARCH ADVANCE OF DIFFERENTIATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS INTO Schwann CELLS IN VITRO]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiu fu Chongjian Waike Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.* 29, 1560-1563.

Liu, Q., Spusta, S.C., Mi, R., Lassiter, R.N., Stark, M.R., Hoke, A., Rao, M.S., and Zeng, X. (2012). Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells: induction, maintenance, and differentiation into functional schwann cells. *Stem cells translational medicine* 1, 266-278.

Lupski, J.R. (1998). Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms. *Mol. Med.* 4, 3-11.

Menendez, L., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., and Dalton, S. (2011). Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19240-19245.

Martyn, C.N., and Hughes, R.A. (1997). Epidemiology of peripheral neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 310-318.

Master, Z., McLeod, M., and Mendez, I. (2007). Benefits, risks and ethical considerations in translation of stem cell research to clinical applications in Parkinson's disease. *J. Med. Ethics* 33, 169-173.

Mica, Y., Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2013). Modeling neural crest induction, melanocyte specification, and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient-specific iPSCs. *Cell Rep.* 3, 1140-1152.

Mizisin, A.P. (2014). Mechanisms of diabetic neuropathy: Schwann cells. *Handb. Clin. Neurol.* 126, 401-428.

Mizisin, A.P., and Powell, H.C. (1993). Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 78-86.

Newbern, J., and Birchmeier, C. (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 922-928.

Oates, P.J. (2002). Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 325-392.

Rodrigues, M.C., Rodrigues, A.A., Jr., Glover, L.E., Voltarelli, J., and Borlongan, C.V. (2012). Peripheral nerve repair with cultured schwann cells: getting closer to the clinics. *The Scientific World Journal* 2012, 413091.

Pareyson, D. (1999). Charcot-marie-tooth disease and related neuropathies: molecular basis for distinction and diagnosis. *Muscle Nerve* 22, 1498-1509.

Quasthoff, S., and Hartung, H.P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.* 249, 9-17.

10

20

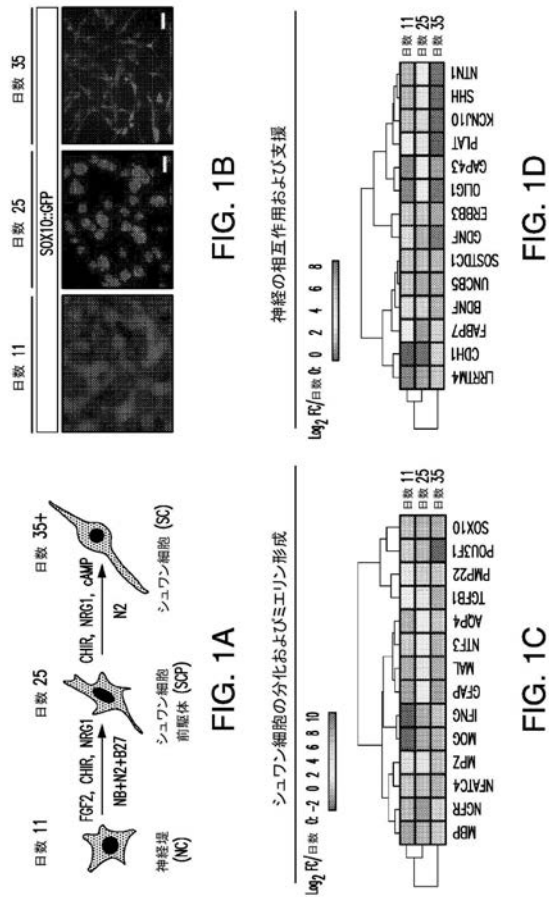
30

40

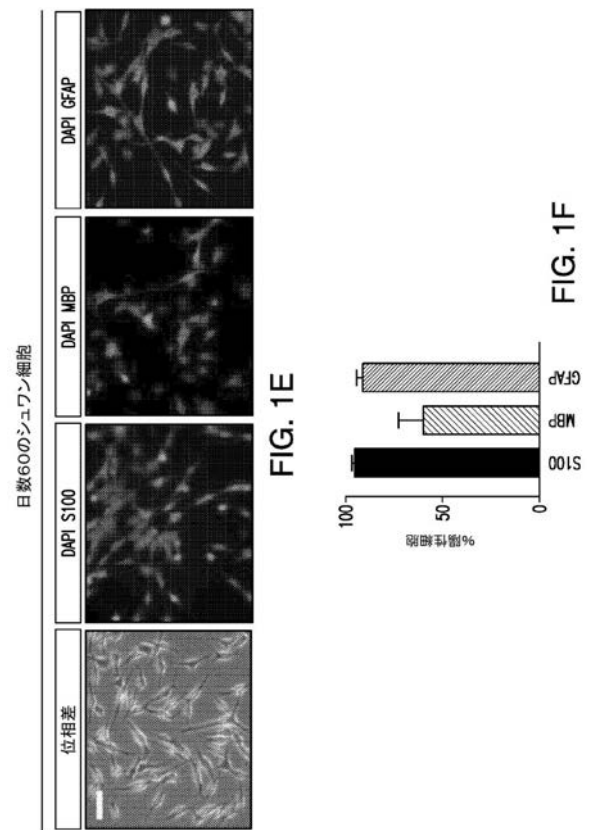
50

- Rodrigues, M.C.O., Rodrigues, A.A., Glover, L.E., Voltarelli, J., and Borlongan, C.V. (2012). Peripheral Nerve Repair with Cultured Schwann Cells: Getting Closer to the Clinics. *Sci. World J.* 2012, e413091.
- Simmons, Z., and Feldman, E.L. (2002). Update on diabetic neuropathy. *Current opinion in neurology* 15, 595-603.
- Studer, L., Vera, E., and Cornacchia, D. (2015). Programming and Reprogramming Cellular Age in the Era of Induced Pluripotency. *Cell stem cell* 16, 591-600.
- Tang, X., Zhou, L., Wagner, A.M., Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Gage, F.H., and Chen, G. (2013). Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 11, 743-757.
- Thompson, S.W., Davis, L.E., Kornfeld, M., Hilgers, R.D., and Standefer, J.C. (1984). Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 54, 1269-1275.
- Webber, C.A., Christie, K.J., Cheng, C., Martinez, J.A., Singh, B., Singh, V., Thomas, D., and Zochodne, D.W. (2011). Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. *Glia* 59, 1503-1517.
- Williams, R.R., and Bunge, M.B. (2012). Schwann cell transplantation: a repair strategy for spinal cord injury? *Prog. Brain Res.* 201, 295-312.
- Zochodne, D.W. (2007). Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve* 36, 144-166.
- Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Goldstein, R.S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem cell reviews* 7, 394-403.

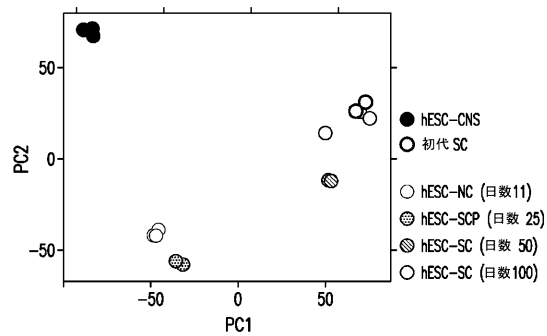
【図 1 A - D】



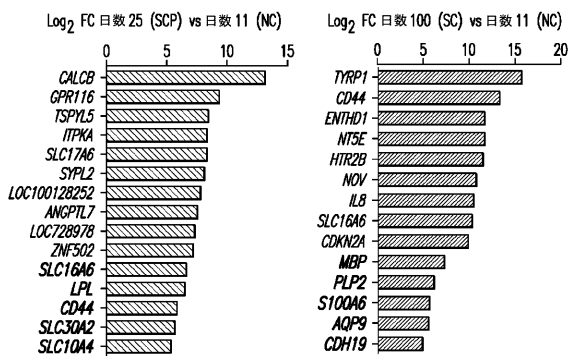
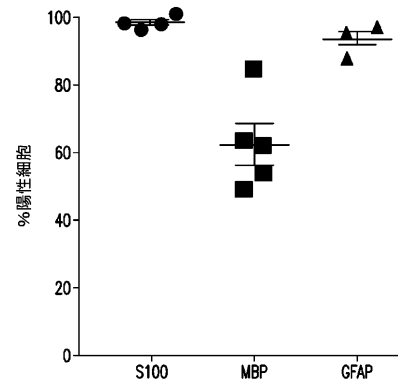
【図 1 E - F】



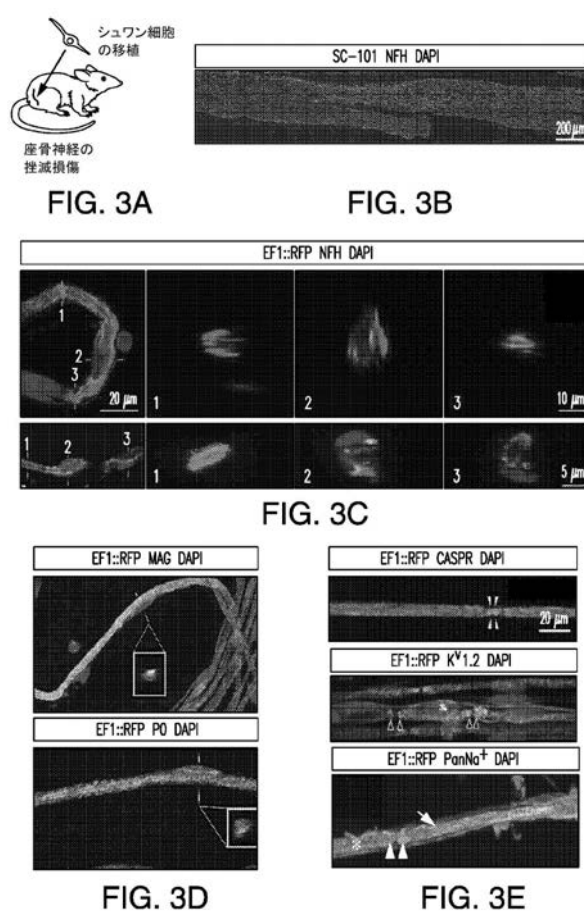
【図 1 G - H】



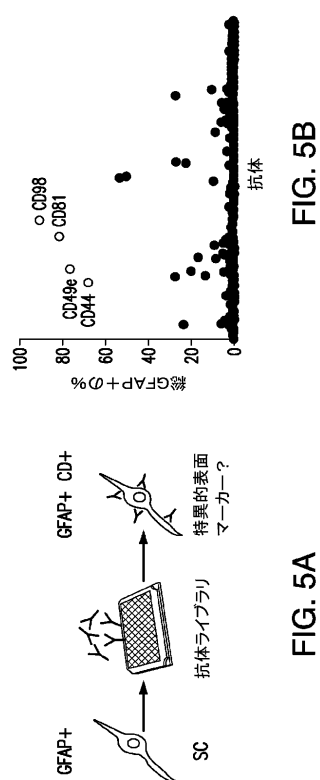
【図 1 I】



【 図 3 A - E 】



【 図 5 A - B 】



【図 5C - 1】

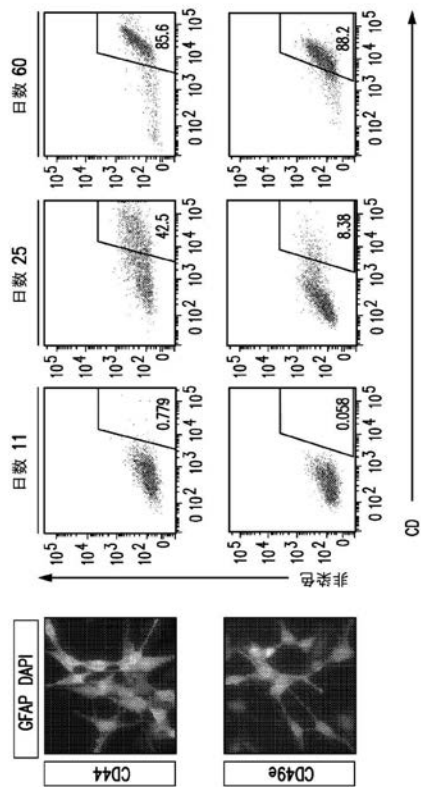


FIG. 5C

【図 5C - 2】

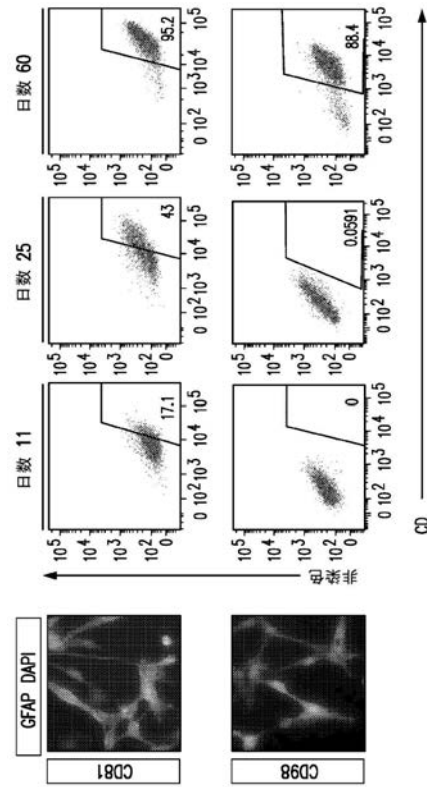


FIG. 5C 続き

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/061541
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 6-47, 53-117, 124-157, 169-198, 204-213, 223-274, 278-280, 284-287 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/061541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/30; C12N 5/079; C12N 5/0797 (2018.01)

CPC - A61K 35/30; C12N 5/0606; C12N 5/0622; C12N 5/0623; C12N 2501/119; C12N 2501/15; C12N 2501/415; C12N 2501/999 (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 424/93.7; 435/325; 435/366; 435/377 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0010515 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 08 January 2015 (08.01.2015) entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283
A	AQUINO et al. "In vitro and In vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells," Exp Neurol, 25 January 2006 (25.01.2006), Vol. 198, No. 2, Pgs. 438-449. entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283
A	CHAMBERS et al. "Highly efficient neural conversion of human ES and IPS cells by dual inhibition of SMAD signalling," Nat Biotechnol, 01 March 2009 (01.03.2009), Vol. 27, No. 3, Pgs. 275-280. entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283
A	DUPIN et al. "Neural crest progenitors and stem cells," C R Biol, 10 May 2007 (10.05.2007), Vol. 330, No. 6-7, Pgs. 521-529. entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283
A	LIU et al. "Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro," PLoS One, 10 April 2015 (10.04.2015), Vol. 10, No. 4, e0123278, Pgs. 1-17. entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 January 2018

Date of mailing of the international search report

07 FEB 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/061541

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZELTNER et al. "Feeder-free derivation of neural crest progenitor cells from human pluripotent stem cells," J Vis Exp, 22 May 2014 (22.05.2014), Vol. 87, No. e51309, Pgs. 1-9. entire document	1-5, 48-52, 118-123, 158-168, 199-203, 214-222, 275-277, 281-283

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/02 (2006.01)		A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 3/10	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)		C 1 2 N 15/12	

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

(72)発明者 ファタヒ , ファラナク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1 , サンフランシスコ , ワーレン ドライブ 4
 4 6 , アpartment 4

Fターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y BB04 BB19 CA24 CA44
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB45 BB64 NA14 ZA20 ZB21 ZC35